

2016

YÜKSEK LİSANS

HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ

EBRU AKA



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
VHE

**BROYLER CİVCİVLERİN DALAĞINDA
TLR4 VE MHC II MOLEKÜLLERİNİN
DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI**

**EBRU AKA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN**

AYDIN-2016

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BROYLER CİVCİVLERİN DALAĞINDA
TLR4 VE MHC II MOLEKÜLLERİNİN DAĞILIMININ
ARAŞTIRILMASI**

**EBRU AKA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÜLKER EREN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-14020 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2016

KABUL ve ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji- Embryoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ebru AKA tarafından hazırlanan “Broyler civcivlerin dalağında TLR4 ve MHC II moleküllerinin dağılımının araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/01/2016



Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Ülker EREN

Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Şadiye KUM

Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY

Ankara Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bilgi ve deneyiminden yararlandığım, yardımını ve desteğini esirgemeyen danıőmanım Prof. Dr. Őlker EREN'e, istatistiksel analizlerde yardım eden Yrd. Doç. Dr. Őzay GŐLEŐ'e, Tez Projesinin gerçekleŐtirilmesi için sağlanan maddi ve manevi destekten dolayı Adnan Menderes Őniversitesi Bilimsel AraŐtırma Projeleri Komisyonu ve Bilimsel AraŐtırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve ayrıca her zaman benim yanımda yer alıp destek olan aileme teŐekkűr ederim.



İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanatlılarda Dalak	5
2.1.1. Dalağın Gelişimi	5
2.1.2. Dalağın Histolojik Yapısı	6
2.1.2.1. Dalağın Damarlanması	6
2.1.2.2. Beyaz Pulpa	7
2.1.2.2.1. Arteriyol çevresi lenfatik kılıf (Peri-Arteriyolar Lymphoid Sheath/ PAL)	8
2.1.2.2.2. Peri-elipsoidal lenfoid doku (Peri-ellipsoidal lymphoid tissue/ PEL)	8
2.1.2.2.2.1. Elipsoid ile ilişkili hücreler (EACs), elipsoid ve elipsoid kapsülü (Capsule of Schweigger-Seidel sheath/ Schweigger-Seidel kılıfın kapsülü/ CSS).....	9
2.1.2.2.2.2. B hücre katmanı	10
2.1.2.2.2.3. Makrofaj halkası	10
2.1.2.2.3. Doğurucu merkez (germinal center/ GC) :	10
2.1.2.3. Kırmızı Pulpa.....	11
2.1.3. Tavuk Dalağında Antijen Sunan Hücreler.....	12
2.1.4. Göç Yolu.....	13
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.2. Dokuların Hazırlanması.....	17
3.3. Boyama Metotları	17
3.4. Strept ABC Boyama Yöntemi	17

3.4.1. TLR4 boyama	17
3.4.2. MHC II boyama	18
3.5. Doku Kesitlerinin İncelenmesi ve Değerlendirilmesi.....	19
3.6. İstatistiksel Analiz.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Histolojik Bulgular	21
4.1.1. Kapsül, Trabekül ve Kan Damarları	21
4.1.2. Pulpa	27
4.1.2.1. Beyaz Pulpa	27
4.1.2.2. Kırmızı Pulpa.....	30
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	32
4.2.1. TLR4.....	32
4.2.2. MHC II.....	36
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- BF** : Bursa of Fabricius/ Bursa Fabrisius
- CSS** : Capsule of Schweigger-Seidel sheat/ Schweigger-Seidel kılıfın kapsülü
- DCs** : Dendritic cells/ Dendritik hücreler
- EACs** : Ellipsoid associated cells/ Elipsoidle ilişkili hücreler
- EARCs** : Ellipsoid associated reticular cells/ Elipsoidle ilişkili retiküler hücreler
- FDC** : Follicular dendritic cell/ Foliküler dendritik hücre
- GC** : Germinal center/ Germinal merkez
- H₂O₂** : Hidrojen peroksit
- HSP** : Heat schock protein/ Isı şok proteini
- IDC** : Interdigital dendritic cell/ Interdigital dendritik hücre
- LPS** : Lipopolysaccaride/ Lipopolisakkarit
- LRR** : Leucine rich repeats/ Leusinden zengin tekrarlar
- MHC II** : Major histocompalibitiy complex class II/ Başlıca Doku uyum kompleksi sınıf II
- NLRs** : The nükleotide-binding oligometrization domain reseptors/ NOD-like receptors/ NOD-benzeri reseptörler
- PAL** : Periarteriolar lymphoid tissue/ Arteriyolar çevresi lenfoid doku
- PAMPs** : Pathogen-associated moleculer patterns/ Patojen ilişkili moleküler yapılar
- PAP** : Peroxidase anti-peroxidase/ Peroksidaz anti-peroksidaz

PBS	: Phospat buffer Saline/ Fosfat Buffer Salin
PEL	: Periellipsoidal lymphoid tissue/ Elipsoid avresi lenfoid doku
PRRs	: Patologic pattern recognition receptors/ Patojenik yapıları tanıyan reseptörler
PVL	: Perivenous lymphoid tissue/ Perivenöz lenfoid doku
RLRs	: Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors/ RIG-I like receptors/ RIG-I benzeri reseptörler
SCL	: Sub-capsular lymphoid tissue / Kapsül altı lenfoid doku
SSS	: Schweigger-Seidel sheath / Schweigger-Seidel kılıf
TBS	: Tris buffer saline
TCR	: T cell reseptor / T hücre reseptörü
TIR	: Toll / IL-I (Interleukin I / Interlökin I) reseptor / Toll interlökin-I reseptör
TLR	: Toll-like receptor / Toll-benzeri reseptör

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Dört günlük kontrol grubuna ait bir örnekte fibröz kapsül görünümü (Ok başları). Üçlü Boyama Yöntemi.21
- Şekil 2.** Bir günlük LPS (A), dört günlük PBS (B) ve 14 günlük kontrol grubu (C) örneklerinde kapsülde elastik ipliklerin görünümü (oklar). Orsein-Giemsa Boyama Yöntemi.....22
- Şekil 3.** Bir günlük (A) ve 14 günlük (B) kontrol grubu örneklerinde kapsülde retikulum ipliklerin görünümü (oklar). Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Yöntemi.22
- Şekil 4.** Bir günlük (A) ve 14 günlük (B) kontrol grubu örneklerinde kapsülde düz kas hücrelerinin görünümü (oklar). Üçlü Boyama Yöntemi.22
- Şekil 5.** On dört günlük LPS grubunda kapsül dışında a. lienalis ve v. lienalisin görünümü. a: a. lienalis, v: v. lienalis, k: kapsül, d: dalak parenşimi. Üçlü Boyama Yöntemi.23
- Şekil 6.** On dört günlük PBS (A) ve 14 günlük kontrol grubu (B) örneklerinde kapsülde bulunan arter (a), vena (v) ve lenf kapıllarlarının (L) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi.....23
- Şekil 7.** Bir günlük kontrol grubu (A) ve on günlük kontrol grubu (B) örneklerinde trabeküler arter (a), vena (v) ve trabeküler bağdokunun (*) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi..24
- Şekil 8.** On dört günlük kontrol grubunda trabeküler arter (A), On dört günlük kontrol grubunda trabeküler arter duvarında elastik iplik (B) ve bir günlük kontrol grubunda trabeküler arter duvarında retikulum ipliklerinin (C) görünümü. a: arter, vs: venöz sinus, lamina elastika interna (mavi ok) ve lamina elastika eksterna (yeşil ok). Sırasıyla Üçlü Boyama, Orsein-Giemsa ve Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Metodu.24
- Şekil 9.** A. Dört günlük civcive ait doku kesitlerinde arteriyol (a) ve penisilar kapıllarların (pc) görünümü. B. On günlük civcive ait doku kesitinde arteriyol (a) ve penisilar – elipsoid- kapıllarların (Pc/Ec) (oklar) görünümü. PAL: Periarteriyoler lenfoid doku, ok başı: arteriyol duvarında düz kas hücreleri. Üçlü boyama.25
- Şekil 10.** A: 14 günlük PBS grubunda parenşimde arteriyol ve penisilar kapılların (ok başı) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi B: Yedi günlük kontrol grubunda arteriyol duvarında elastik iplik görünümü (ok) ve penisilar kapıllar (p). Orsein-Giemsa Boyama Yöntemi, C: Bir günlük PBS grubunda arteriyol duvarındaki retikulum ipliklerinin görünümü (a) penisilar kapıllar (ok başı). Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Yöntemi.25
- Şekil 11.** Venöz sinusların görünümü. A. Penisilar arteriyol sonrası venöz sinus (vs), penisilar arteriyol (p) B. On dört günlük kontrol grubunda arter yakınında bulunan venöz sinus (vs) arter (a) C. Kapsül altında venöz sinus (vs), kapsülde lenf damarı (L). Üçlü Boyama Yöntemi.26

- Şekil 12.** Venöz sinusların görünümü. A. Bir günlük kontrol grubunda kapsül altında bulunan venöz sinus (vs), B, C. 14 günlük kontrol grubunda kırmızı pulpada venöz sinusler (vs). Orcein-Giemsma Boyama Yöntemi.....26
- Şekil 13.** A: On dört günlük kontrol grubu örneklerinde parenşimde venanın görünümü (v). Üçlü Boyama Yöntemi B: Venanın duvarında elastik iplik görünümü (oklar). Orcein-Giemsma Boyama Yöntemi, C: Vena duvarında retikulum ipliklerinin görünümü (oklar). Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Yöntemi.....26
- Şekil 14.** A. Dört günlük kontrol grubu B. Dört günlük LPS uygulanmış olan grup C. 14 günlük kontrol grubuna ait dalak kesitlerinde, venaların duvarında gözlenen lenfoid hücre kümeleri (kesikli çizgi ile sınırlandırılmış alan), v (vena). Üçlü Boyama.27
- Şekil 15.** Bir gün 3 saatlik kontrol grubuna ait dalak kesitlerinden görüntüler A. Arteriyol çevresinde lenfoid dokunun görünümü (daire içinde PAL), B. Vena çevresinde lenfoid dokunun görünümü (PVL), C. Kapsül altında lenfoid dokunun görünümü (elips içinde SCL). Üçlü Boyama.27
- Şekil 16.** A. Elipsoid ve elipsoid çevresi lenfoid dokunun görünümü. Pc: Penisilar kapillar, EAC: elipsoid ilişkili hücreler, e: elipsoid, PEL: Elipsoid çevresi lenfoid doku. Üçlü Boyama Yöntemi. B. Penisilar kapillar çevresinde, Elipsoidin etrafında ve elipsoid çevresi lenfoid doku hücreleri arasında bulunan retikulum ipliklerinin görünümü. Pc: Penisilar kapillar, e: elipsoid, PEL: elipsoid çevresi lenfoid doku. Gordon ve Sweet'in gümüşleme Metodu.....28
- Şekil 17.** Elipsoid çevresinde Schweigger-Seidel kapsülünün görünümü. A. Schweigger-Seidel kapsülünü oluşturan retikulum iplikleri (ok başları). Gordon ve Sweet'in gümüşleme Metodu. B: Schweigger-Seidel kılıfın görünümü (ok başı) Üçlü Boyama Yöntemi.28
- Şekil 18.** Elipsoid çevresi lenfoid dokuyu oluşturan hücrelerin görünümü. A-E: Sırasıyla 1, 4, 7, 10 ve 14 günlük örneklerde elipsoid çevresi lenfoid dokunun görünümü (sınırlanmış alan). Pc: Penisilar kapillar Çizgi: elipsoid çevresi lenfoid doku bölgesi. Üçlü Boyama.29
- Şekil 19.** Germinal merkezin görünümü. A-B: Sırasıyla bir ve dört günlük örneklerde germinal merkez taslağının (Gcd) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi. C-D: Sırasıyla yedi ve 14 günlük örneklerde germinal merkez (Gc) çevresinde retikulum ipliklerinin görünümü. Gordon ve Sweet'in gümüşleme Metodu.....29
- Şekil 20.** On dört günlük örneğe ait dalak kesitinde arteriyol yakınında germinal merkezin görünümü. a: arteriyol, Gc: germinal merkez, e: elipsoid kapillar, kesik çizgilerle sınırlandırılmış bölge: Elipsoid çevresi lenfoid doku sınırı. RP: kırmızı pulpa. Üçlü Boyama.30
- Şekil 21.** On dört günlük kontrol grubuna ait dalak dokusunda A. Kapsüle yakın, B. Parenşim içerisinde, C. Venöz sinüs çevresi lenfoid dokuda germinal merkezin (Gc) görünümü. Sv: Subkapsüler venöz sinus, Vs: venöz sinüs. Üçlü Boyama.30

- Şekil 22.** A. Bir günlük civcivlerin dalağında granülopoezisin görünümü. RP: kırmızı pulpa, WP: beyaz pulpa, pa: penisilar arteriyol, Pc: penisilar kapillar. B. Granülosit görünümü. gc: granüllü hücreler.....31
- Şekil 23.** On dört günlük civcivlerde dalak parenşiminin görünümü. RP: Kırmızı pulpa, pc: penisilar kapillar, EAC: elipsoid ilişkili hücreler, PEL: perielipsoidal lenfoid doku, PAL: Periarteriyoler lenfoid doku. Üçlü Boyama.31
- Şekil 24.** On günlük civcivlerde dalakta TLR4 pozitivitesinin görünümü. Daire: Difuz granuler TLR4 pozitivitesi, oklar: yoğun hücresele TLR4 pozitivitesi, kare: negatif TLR4 pozitivitesi olmayan hücreler, a: arter, *: arter duvarı düz kas hücrelerinde TLR4 pozitivitesi. Strept ABC metodu.32
- Şekil 25.** On günlük civcivlerde dalakta TLR4 pozitivitesi. Ok başı: elipsoid kapillar endotelinde TLR4 pozitivitesi, e: elipsoid. Strept ABC metodu.33
- Şekil 26.** On günlük civcivlerde dalakta TLR4 pozitivitesinin görünümü. Ok başı: yoğun TLR4 pozitivitesine sahip hücreler, WP: beyaz pulpa, RP: kırmızı pulpa, daire: Difuz granuler TLR4 pozitivitesi. Strept ABC metodu.33
- Şekil 27.** PEL'de TLR4 pozitif hücrelerin görünümü. A. Dört günlük civcivlerde PEL'de TLR4 pozitivitesi. PEL: peri elipsoidal lenfoid doku, ec: elipsoid kapilları, ok: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler. B. On günlük civcivlerde PEL'de TLR4 pozitivitesi. e: elipsoid, PEL: peri elipsoidal lenfoid doku, ok: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler. Strept ABC metodu.....34
- Şekil 28.** GC'da TLR4 pozitif hücrelerin görünümü. A. On günlük civcivlerde TLR4 pozitivitesi. Gc: germinal merkez, oklar: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler, a. arter. B. On dört günlük civcivlerde TLR4 pozitivitesi. Gc: germinal merkez, oklar: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler. Strept ABC metodu.....34
- Şekil 29.** Kapsül altı lenfoid dokuda, MHC II pozitif hücreler. SCL: kapsül altı lenfoid doku, ok başı: kapsül. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitivitesinin görünümü. B. Dört günlük örnekte MHC II pozitivitesinin görünümü. C. On dört günlük örnekte MHC II pozitivitesinin görünümü.36
- Şekil 30.** PAL'da MHC II pozitivitesinin görünümü. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitif hücreler. PAL: peri elipsoidal lenfoid doku, ok: MHC II pozitif hücre, a: arter. B. On dört günlük örnekte MHC II pozitif hücreler. PAL: peri elipsoidal lenfoid doku, e: elipsoid, a: arter, PEL: peri elipsoidal lenfoid doku. ...36
- Şekil 31.** PEL'da MHC II pozitivitesinin görünümü. PEL: peri elipsoidal lenfoid doku, oklar: PEL'de MHC II pozitif hücreler, ok başları: elipsoid ilişkili hücrede MHC II pozitivitesi, kesik çizgiler: elipsoid, ec: elipsoid kapillar. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitivitesi. B. On dört günlük örnekte MHC II pozitivitesi.....37
- Şekil 32.** PVL'da MHC II pozitivitesinin görünümü. PVL: peri venöz lenfoid doku, ok: MHC II pozitif hücre, v: vena. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte PVL'de MHC II pozitif hücreler. B. On dört günlük örnekte PVL'de MHC II pozitif hücreler.37

- Şekil 33.** GC'de MHC II pozitivitesinin görünümü (kahverengi çökelti). Gc: germinal merkez, oklar: Gc içinde ve çevresinde MHC II pozitif hücreler, a: arter. Strept ABC metodu. A. On günlük örnekte GC'de MHC II pozitif hücreler. B. On dört günlük örnekte GC'de MHC II pozitif hücreler.....38
- Şekil 34.** Strept ABC metodu. A. Dört günlük örnekte, B. 10 günlük örnekte ve C. 14 günlük örnekte gözlenen MHC II pozitif hücre kümeleri (oklar).38
- Şekil 35.** Kırmızı pulpa alanlarında MHC II pozitivitesinin görünümü (kahverengi çökelti). RP: kırmızı pulpa, ok başları: MHC II pozitif hücreler, oklar: venöz sinüsler. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitif hücreler. B. On dört günlük örnekte MHC II pozitif hücreler.39



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Materyalden oluşturulan ana ve alt gruplar ile birlikte alt gruplardan doku alma saatleri	16
Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer antikorlar	17
Tablo 3: Bir, dört ve yedi günlük civcivlerin dalağında granülopoezis yoğunluğu.....	32
Tablo 4: Kesitlerde gözlenen difüz granüler TLR4 pozitifitesinin yoğunluğu.	35
Tablo 5: Birim alanda gözlenen, yoğun TLR4 pozitifitesi gösteren hücrelerin sayıları.	35
Tablo 6: Kesitlerde gözlenen MHC II pozitifitesinin yoğunluğu.	39



ÖZET

BROYLER CİVCİVLERİN DALAĞINDA TLR4 VE MHC II MOLEKÜLLERİNİN DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI

Aka E. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Programı (Veteriner) Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2016.

Sunulan çalışmada, broyler civcivlerin yaşamlarının ilk iki haftası içinde, dalak dokusunun gelişimi ile beraber, TLR4 ve MHC II moleküllerinin dağılımının, kontrol ve antijen ile uyarılmış gruplarda araştırılması amaçlandı.

Materyal olarak 225 adet Ross 308 ticari etlik civciv kullanıldı. Civcivler 1, 4, 7, 10, 14 günlük olmak üzere her biri 45'er adet civciv içeren 5 ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde kontrol, PBS ve LPS uygulanan gruplar olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Antijenik uyarım 1mg/kg LPS'nin intra-abdominal uygulaması ile gerçekleştirildi. Uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra PBS ve LPS uygulanan üçer hayvandan doku örneği alındı. Aynı saatlerde, kontrol grubundan da üçer hayvandan doku örneği alındı. Histolojik inceleme için örnekler üçlü boyama, Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu ve orsein-giemsaa boyama yöntemleriyle boyandı. İmmunohistokimyasal olarak TLR4 ve MHC II'nin ekspresyonlarını belirlemek için, strept-ABC yöntemi uygulandı.

Bir ve 14 gün arasında dalağın histolojik gelişimi kaydedildi. Başlangıçtan dört günlük olana kadar yoğun granülopoezis görüldü. Bir günlükten itibaren dalakta TLR4 pozitivitesinin bulunduğu, yaygın granüler tarzda olduğu ve genellikle kırmızı pulpada olan bazı hücrelerde yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti. Dört günlük örneklerde PEL'de, yedi günden itibaren GC'de belirgin TLR4 pozitivitesi gösteren hücreler gözlemlendi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, farklı günlerde difuz granüler TLR4 pozitivitesinde dalgalanmalar olduğu tespit edildi. Yoğun TLR4 pozitivitesi içeren hücrelerin ise 14 günlük örneklerde antijen uyarımı ile arttığı belirlendi. TLR4 yoğunluğunun nonspesifik savunma hücrelerinin yanında, endotel ve düz kas hücrelerinde de olduğu gözlemlendi.

MHC II pozitivitesinin bir günlükten itibaren SCL, PAL, PEL, PVL, GC'de ve kırmızı pulpada bulunduğu görüldü. Kontrol grubunda bir günlük örneklerde diğer gruplardan daha az olduğu dikkati çekti. LPS uyarımı ile bir ve 14 günlük örneklerde yoğunluğunun arttığı belirlendi.

Dalakta bir günlükten itibaren nonspesifik savunma mekanizmasının var olduğu ve on dört günlük örneklere dalağın histolojik ve fonksiyonel anlamda gelişmiş olduğu gözlendi. Bundan sonraki çalışmalarda dalakta TLR4 ve MHC II pozitivitesinin hücre bazında çalışılmasının uygun olacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Broyler, Dalak, MHC II, Tavuk, TLR4.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE DISTRIBUTION OF MHC II MOLECULES AND TLR4 IN SPLEEN OF BROILER CHICKS

Aka E. Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Histology-Embryology Master of Science Program (Veterinary) Master Thesis, Aydın, 2016.

The purpose of the present study was to investigate histological development and distribution of TLR4 and MHC II molecules in the spleen of control and LPS stimulated groups within the first two weeks of life.

A total of 225 Ross-308 commercial broiler chicks were used. The chicks were divided into 5 main groups (age: 1, 4, 7, 10 and 14 days), each group had 45 chicks. Each main group was divided into three subgroups which included control (conventional), PBS and LPS-injected groups. Antigenic stimulation was carried out through intra-abdominal (i.a.) administration of LPS at a dosage of 1mg/kg. Tissue samples in the subgroups were collected separately at 1, 3, 6, 12, and 24h after LPS or PBS injection. At the same time, tissue samples were obtained from three animals in the control group. Tissue sections were stained using triple staining, Gordon and Sweet's silver staining. Furthermore, orcein-giemsa methods as well as immunohistochemistry were performed to determine the expression of TLR4 and MHC II molecules.

Histological development of the spleen was recorded between one and 14 days. Granulopoiesis was observed in the chicks until the age of 4 days. Between 1-14 days of age, a diffused expression of TLR4 was found in the tissue but generally in red pulp, some cells showed strong expression. Whereas, some cells showed intense TLR4 expression in PEL and GC, at the age of 4th and 7th day, respectively. Variations in the statistical evaluation were found in diffused granular expression of TLR4 density on different days. The number of dense positive cells was increased again by antigenic stimulation in 14 days old chicks. Besides the non-specific defense cells, TLR4 expression was also observed in endothelial and smooth muscle cells.

MHC II molecules were diffusely observed at SCL, PAL, PEL, PVL, GC and red pulp from post-hatch day one onwards. It was noticed that the control group had lesser

expression of TLR4 as compared to other groups on daily basis. Moreover, it increased after LPS stimulation at one and 14 days of age.

It is suggested that spleen has nonspecific defense processes from post-hatch day one onwards. Functional splenic development is completed histologically at 14 days of age. It is suggested that TLR4 and MHC II positivity must be examined in the spleen on the basis of cell types with further research.

Keywords: Broiler, Chicken, Spleen, MHC II, TLR4.



1. GİRİŞ

Çeneli vertebrali canlılarda antijenlere karşı savunma mekanizmasını gerçekleştiren immun sistem, doğuştan gelen (innate, non-specific) ve edinilmiş (accured/adptive, specific) bağışıklığı gerçekleştiren kısımlar olmak üzere iki büyük alt bölümden oluşur. Bu iki sistem arasındaki temel farklılık, patojenleri tanımak için kullandıkları reseptörlerin farklılığıdır (Medzhitov, 2007).

Herhangi bir enfeksiyöz ajanın vücuda girişinden sonra doğuştan bağışıklığın iki fazı ve edinilmiş bağışıklık aşamaları arka arkaya gelir. Doğuştan gelen bağışıklığın ilk aşaması, antijen girişinden itibaren ilk dört saatlik süreyi kapsayan erken spesifik olmayan (early non- specific) fazdır. Bu aşamada konakçının deri pH'sı, tükrük proteazı gibi fizyolojik özellikleri devreye girer. Doğuştan gelen bağışıklığın ikinci aşaması ise 4-96 saat arasında meydana gelen uyarılmış non-spesifik (induced non-specific) fazdır. Bu aşamada fagositoz, komplement aktivasyonu, diğer yangısel mekanizmalar ve sitokin sekresyonu gerçekleşir. Edinilmiş bağışıklık; 96 saatten sonra gerçekleşmeye başlayan ve B lenfosit, yardımcı T lenfosit ile sitotoksik T lenfositin gerçekleştirdiği, uyarılmış spesifik savunma aşamasıdır (Mak ve Saunders, 2006).

İnfektif patojenlerin en üst seviyede bir yeterlilikle elimine edilebilmesi için bu iki mekanizmanın birlikte gerçekleştirdikleri savunma gereklidir. Non-spesifik savunma, evrimsel olarak korunmuş olan, ilk koruma hattıdır ve patojene maruz kalındığı anda devreye girer. İnvaze olan mikrobiyal patojenlere karşı makrofaj ve dendritik hücreler gibi fagositleri ile korunma sağlar. Bu hücreler yangısel yanıtı uyarırlar (Kawai ve Akira, 2009). Edinilmiş bağışıklık ise oldukça spesifiktir ve uzun süreli immunolojik belleğe sahiptir fakat infeksiyonun geç fazında gelişir (Alberts ve ark, 2002; Kawai ve Akira, 2009). Edinilmiş bağışıklığın immunkomponent hücreleri antijen sunan hücreler, yardımcı ve sitotoksik T lenfositler ile B lenfositlerdir (Schatz ve ark, 1992). T ve B hücrelerinin antijeni algılaması ile spesifik olan, hücrelerin aracılık ettiği ve humoral immun yanıt başlamış olur (Abbas ve Lichtman, 2006).

Doğuştan gelen savunma mekanizması elemanları, konakçıyı koruyucu yanıtı oluşturmak üzere, patojen ilişkili moleküler yapıları (pathogen-associated molecular patterns / PAMPs) tanıyabilme özelliğine sahiptirler (Janeway ve Medzhitov, 2002).

PAMPs'lerin tanınmasına, Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors/ TLRs) (Iwasaki ve Medzhitov, 2004), NOD-benzeri reseptörler (The nucleotide-binding oligomerization domain receptors/ NOD-like receptors/ NLRs) (Franchi ve ark, 2008) ve RIG-I benzeri reseptörleri (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RLRs) (Yoneyama ve Fujita, 2008) içeren ve genel olarak patojenik yapıları tanıyan reseptörler (patologic pattern recognition receptors/ PRRs) olarak bilinen reseptörler aracılık ederler. Bunlar, kalıtsal olarak kodlanmış, her biri özellikle mikroorganizmaların korunmuş ve değişmeyen yapıları için yaygın bir özgünlüğe sahip olan reseptörlerdir (Medzhitov ve ark, 1997; Medzhitov, 2007). Bunlardan en iyi çalışılan TLR'ler bakteri, virüs, mantar ve parazitlerin doğal ve geniş bir yelpazede olan korunmuş moleküler motiflerini tanıyan, korunmuş transmembran protein ailesidir (Brownlie ve Allan, 2011). TLR'ler hem hücrenin dışında yer alan hem de endozom ve lizozomlarda bulunan patojenleri tanıyabilirler (Chen ve ark, 2013). TLR'ler ısı şok proteinleri (Heat Shock Protein / HSP) gibi enfeksiyon sırasında yapılan endojen ligandları da tanıyabilirler. Genel TLR yapısında, hücrenin dış kısmında N-terminal kısmı (leusinden zengin tekrarları -leucine rich repeats/ LRRs) ve bir veya iki sisteinden zengin bölge), membranda bulunan kısım ve oldukça korunmuş olan intra-sitoplazmik Toll/IL-I reseptör (TIR) kısmı bulunur. LRRs'nin organizasyonu tür ve TLR gruplarında değişiklik gösterirken TIR kısmı korunmuştur (Brownlie ve Allan, 2011).

PAMPs arasında Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS(Lipopolysaccaride/ Lipopolisakkarit), Gram (+) bakterilerin yüzeyinde bulunan lipoteikoik asit, bakteriyel flagellin, peptidoglikan ve virüslerle ilişkili yapılar örneğin çift sarmal RNA sayılabilir (Akira ve ark, 2006).

TLR'ler; makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler, T lenfositler, doğal katil hücreler, mast hücreleri, fibroblastlar, epitel hücreleri, astrositler ve endotel hücrelerinin bazıları gibi immunolojik olan ve olmayan birçok hücre tarafından eksprese edilirler (Akira ve ark, 2006; Zhang ve Schluesener, 2006)

TLR'ler, nonspesifik savunma mekanizmasının hücreleri tarafından çeşitli sitokinler ve kemokinlerin sentezinin gerçekleşmesi ve salgılanmaları için gerekli olan hücre içi sinyal yollarını başlatırlar. TLR'lerin indüklediği non-spesifik yanıtlar adaptif immunitenin oluşması için de ön koşuldur. Bundan dolayı TLR'ler patojenlere karşı konakçı savunmasında ilk hattır ve hem nonspesifik hem de spesifik immunitede önemli rol oynarlar. Son yıllarda birçok patolojik durumda endojen uyarıcıların TLR

sinyalizasyonunu aktive ederek steril yangısal yanıtı başlattıklarını gösteren deliller artmıştır (Yu ve ark, 2010).

Günümüzde tavuklarda chTLR1La, chTLR1Lb, chTLR2a, chTLR2b, chTLR3, chTLR4, chTLR5, chTLR7, chTLR15 ve chTLR21 olmak üzere toplam 10 adet TLR karakterize edilmiştir. Bunlardan beş tanesinin (TLR2a, 2b, 4, 5 ve 7) insan ve farelerde bulunanlarla ortolog olduğu bilinmektedir. Tavuklarda bulunan chTLR15 ve chTLR21 ise memelilere bulunmamaktadır (Brownlie ve Allan, 2011; Chen ve ark, 2013; Kestra ve ark, 2013).

Spesifik immun reaksiyonda özgül antijen tanıma görevi, lenfositlerin üzerindeki antijen reseptörleri ile gerçekleştirilir. B lenfositlerde antikolar, T lenfositlerde T hücre reseptörleri (T cell receptors, TCR) bu görev için kodlanmıştır. Bu reseptörleri kodlayan genler, kalıtsal olarak gen segmentlerinden bir araya getirilmiştir. Bu segmentlerin somatik rekombinasyonu, rastgele fakat sınırlı spesifikliği ile reseptörlerin repertuar farklılığının oluşmasını sağlar (Schatz ve ark, 1992; Metzhitov, 2007; Liu ve ark, 2008; Abbas ve Lichtman, 2006). Antijen reseptörleri T ve B lenfositler üzerine klonal olarak dağılmışlardır yani bu dağılım, belli bir özgülüğü olan lenfositlerin her bir klonunun (bir klon: ata hücre ve kendi soyundan gelen hücreler) tek bir reseptöre sahip olması ve tüm diğer klonların reseptörlerinden farklılık göstermesi anlamına gelir. Bu durum immunolojik hafızanın temelini oluşturur. Başka bir deyişle her bir lenfosit tek bir spesifik antijen reseptörünü eksprese eder. Böylece lenfositlerin sadece spesifik popülasyonları, patojene kapsamlı bir yanıt için seçilmiş olur. Bundan dolayı nonspesifik ve spesifik savunmada hücreler, temelde farklı yollarla patojenlerin moleküler farklılığı ile ilgilenirler (Medzhitov, 2007; Abbas ve Lichtman, 2006).

Fagositler dendiği zaman nötrofil, makrofaj ve dendritik hücreleri (Dendritic Cells/ DCs) içeren heterojen bir aile ifade edilmiş olur. Nötrofil ve makrofaj doğuştan immunitenin kritik çalışanlarıdır. Her ikisi de lokal yangısal yanıt aracılığıyla, patojenlerin derhal temizlenmesinde yer alırlar (Savina ve Amigorena, 2007).

Dendritik hücreler, B lenfositler ve makrofajlar doku uyum molekülü sınıf II (Major Histocompatibility Complex Class II/ MHC II) molekülü eksprese ettikleri için immun sistemin profesyonel antijen sunan hücreleri olarak kabul edilmektedirler (Kambayashi ve Laufer, 2014).

Adaptif immun yanıtın başlaması, antijen sunan hücrelerin ko-stimulatör molekülleri ve sitokinleri eksprese etmesine bağlıdır (Metzhitov ve ark, 1997) Makrofajlar bakterileri fagosite ettikten sonra T lenfositleri de aktive edebilirler. Bununla birlikte antijeni T lenfositlere sunan ve adaptif immunitiyi başlatan özelleşmiş hücreler DCs'dir (Janeway ve ark, 2001).

DCs fagositlerin özel grubuna daha sonraları katılmıştır. DCs diğerlerinden farklı olarak direkt patojen temizlenmesine dahil olmazlar. Bu açıdan bakıldığında doğuştan immunitenin kritik çalışanı olarak tanımlanmazlar. DCs tıpkı makrofajlar gibi bütün perifer dokularda bulunurlar ve patojen girişinin olduğu yerlerde birikirler. DCs fagositik reseptörlerin büyük bir kısmını eksprese ederler ve etkin bir şekilde patojenleri fagosite ederler (Savina ve Amigorena, 2007).

Herhangi bir uyarı yokken DCs perifer dokularda ve lenfoid organlarda dinlenme halindedirler. Olgunlaşmasını tamamlamamış (immatür) olan bu hücreler az miktarda MHC II, ko-stimulatör ve adezyon molekülleri ile karakterizedirler (Irla ve ark, 2010; Steinman ve ark, 2003). İnflamasyon, enfeksiyonlar ve doku hasarı gibi sinyaller DC'lerin olgunlaşmasını indükler. Olgunlaşma işlemi MHC II, ko-stimulatör ve adhezyon moleküllerinin artışı, yangısal mediatörlerin salgılanması ve göç özelliklerinin kazandırılması gibi değişikliklerle kendini belli eder (Irla ve ark, 2010). MHC II'den zengin kompartımanlar immatür dendritik hücrelerde baskındır. Bu kompartımanlar geç endozomal yapılardır. Olgunlaşma sırasında bu kompartımanlar non-lizozomal veziküllere dönüşürler ve MHC II-peptit komplekslerini hücre yüzeyine boşaltırlar. İmmatur dendritik hücrelere antijen talimatı geldiğinde, antijen parçalarını MHC II moleküllerine yükler ve hücre yüzeyine gönderir ve bu parçalar günlerce burada sabit kalabilir (Banchereau ve Steinman, 1998).

DC'lerin olgunlaşmasından sonra, uyarılmamış T lenfositlerin aktivasyonu, klonal artışı ve efektör T lenfositleri ile bellek T lenfositlerin oluşması işlemi gerçekleşir (Irla ve ark, 2010). DCs bu şekilde innate immun mekanizmayı adaptif immun mekanizmaya bağlamış olurlar (Savina ve Amigorena, 2007).

Kuşlarda bulunan primer lenfoid organlar, T lenfositlerin olduğu timus ve B lenfositlerin olduğu Bursa Fabricius (BF)'tur. Lenfositler timus ve BF'den sekonder nitelikli olan dalak ve mukoza ilişkili lenfoid dokulara göç ederler (Ciriaco ve ark, 2003). Bazı su kuşları dışında kanatlılarda lenf düğümü bulunmamaktadır (Tanyolaç, 1999) Bu nedenle dalak kuşlar için temel sekonder lenfoid organdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanatlılarda Dalak

Dalak kan dolaşımından antijenleri alabilen, gerçek lenf düğümlerine benzeyen fakat afferent ve efferent lenf damarları olmayan, en büyük sekonder lenfoid organdır. Dalak kanı filtre eder (Turley ve ark, 2010). Dalağın kan hücrelerini oluşturma, hemoglobin ve demir metabolizmasına katılma, yaşlanmış eritrositlerin yıkımı, fagositoz ve kanın antijenden temizlenmesi görevleri vardır. En önemli görevlerinden biri immun yanıtın oluşturulmasıdır (Banks, 1993).

Kanatlılarda bulunan dalak kırmızı kahverengi renkte oval şekilli, proventrikulus'un dorsalinde ve karaciğerin sağ lobunun dorsal yüzüne bitişik durumdadır (Nickel ve ark, 1977). Ayrıca aksesör (eklenik) dalaklar, dalağın kranialinde, kaudalinde ve dalağa bitişik olarak bulunur (Glick, 1986).

2.1.1. Dalağın Gelişimi

Kuluçka döneminde dalak, lenfoid ve non-lenfoid hücreler arasındaki etkileşim için vazgeçilmez bir mikroçevre sağlayan sekonder lenfoid organ olarak gelişmeye başlar (Rajput ve ark, 2013). İlk olarak 48 saatlik embriyoların mezenşimal hücrelerinin bir birikimi olarak görülür. İnkübasyon sürecinin 5. gününde mezenşimde eritrosit içeren sinozoidler görülür. Granülopoezis, 7. gündeki eritropoesizi takiben 11. günde başlar. Asıl dalak gelişimi kuluçka döneminden sonra, antijenle karşılaşmayı takiben gerçekleşir. Kuluçkadan sonraki ilk altı hafta boyunca hızlı bir şekilde büyür ve 10. haftada maksimum büyüklüğe ulaşır (Olah ve Vervelde, 2008; Liman ve Bayram, 2011).

Memelilerle karşılaştırıldığında kanatlı dalağı, eritrositlerin dolaşıma hızlı salınması için bir rezervuar gibi düşünülmez. Dalak, lenfositlerin antijenden bağımsız olarak çoğaldıkları ve farklılaştıkları primer lenfoid organ değildir. Bununla birlikte B lenfosit progenitörlerinin bursa Fabricius'a kolonize olmadan önce Ig genlerinin yeniden düzenlendiği yer olarak embriyonik lenfopoeziste önemli bir role sahiptir (Olah ve Vervelde, 2008).

Kuluçkadan çıktıktan sonra dalağın hücre içeriğinde dramatik değişiklikler meydana gelir. Granülositopoetik fonksiyonlar çok kısa zaman periyodunda azaltılır ve organ predominant olarak lenfosit üreten ve eritrosit yıkan bir organ haline gelir. Kuluçkadan çıktıktan hemen sonraki 24 saat içerisinde lenfosit ve monosit gelişimini takiben dalaktan heterofillerin uzaklaştığı görülür. Kuluçkadan çıktıktan hemen sonraki 48 saat içerisinde, lenfositler organın dominant hücreleri haline gelirler (Hodges, 1974; Olah ve Vervelde, 2008).

2.1.2. Dalağın Histolojik Yapısı

Kanatlı dalağının ince bir kapsülle sarılmış olduğu kaydedilmiştir (Hodges, 1974; Akter ve ark, 2006; Olah ve Vervelde, 2008; Liman ve Bayram, 2011; Bingöl ve ark, 2014). Peritoneal mezotelle kaplandığı, çoğunlukla kollagen iplikler olmak üzere retiküler iplikler ve düz kas telleri ile eser miktarda da elastik iplik içerdiği bildirilmiştir (Hodges, 1974; Akter ve ark, 2006; Olah ve Vervelde, 2008; Liman ve Bayram, 2011; Kannan ve ark, 2015). Kapsülün eksternal yüzeyinde, mezotel hücrelerinin mikrovilluslu olduğu kaydedilmiştir (Kannan ve ark, 2015).

Kanatlılarda dalakta gerçek trabekülün olmadığı, bunun yerine kapsülden dalak dokusuna giren az miktarda bağ doku ve bu bağ doku içerisinde kan damarları bulunduğu ifade edilmiştir (Hodges, 1974; Akter ve ark, 2006).

Dalağın parankimine pulpa denir. Dalağın pulpası, farklı görevleri üstlenen beyaz pulpa ve kırmızı pulpa olmak üzere iki ana bölgeden oluşur. Dalak diğer lenfoid organlar gibi retikulum hücreleri ve ipliklerinden meydana gelen ağ içinde lenfositler, makrofajlar ve antijen sunan hücrelerden oluşur (Tanyolaç, 1999).

2.1.2.1. Dalağın Damarlanması

Dalağa gelen kan, dalağa giriş yapan A. gastrika ve hepatica ya ait küçük dallar ile A. Linealis kranialis ve kaudalis tarafından sağlanır. Kapsülden dalak dokusuna, bağ dokusu az olan trabekül giriş yapar. Dalak arteri bu trabekül içerisinde kollara ayrılır, tek tabaka düz kas içeren sentral arteriyelleri oluşturur. Bunlar da elipsoid kapillarlara ayrılırlar (Olah ve Vervelde, 2008).

Kübik endotel hücreleri ile sınırlandırılmış olan elipsoid kapillarlarda kas teli bulunmaz ve gözeneklere sahiptir. Ayrıca, -elipsoid/ Schweigger-Seidel sheat/ Schweigger-Seidel kılıf/ SSS- adı verilen bir katmanla çevrelenir (Olah ve Vervelde, 2008).

Venöz sinüsler ile elipsoid kapıllarların bağlantılarına dair tartışma devam etmektedir. Kapalı dolaşım teorisi, elipsoid kapıllarların doğrudan venöz sinüslara bağlandığını ifade eder. Memelilerde tarif edilen açık dolaşım teorisinde ise elipsoid kapıllarlardan kanın pulpa kordonlarına serbestçe dağıldığını ve oradan endotelial hücrelerin arasından sinüslere girdiğini anlatır. Bu nedenle Billroth kordonları ya da pulpa, venöz sinüsler ve arteriyol arasındaki dolaşımın bir parçası olarak kabul edilebilir (Nagy ve ark, 2005). Kanatlılarda perfüzyon tekniğinin kullanıldığı, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde yapılan çalışmalar (Olah ve Glick, 1982) kapıllarların sinüsler ile bağlantılı olduklarını, kırmızı pulpaya girdiklerini ve yavaş yavaş genişlediğini göstermiştir. Bundan dolayı memeliler açık dolaşım sistemine, kanatlılar ise kapalı dolaşım sistemine sahiptir (Olah ve Vervelde, 2008).

2.1.2.2. Beyaz Pulpa

Ogata ve ark (1977), tavuk dalağında beyaz pulpanın; arteriyol çevresi lenfoid doku (periatriolar lymphoid tissue/PAL), vena çevresi lenfoid doku (perivenous lymphoid tissue /PVL), elipsoid çevresi lenfoid doku (periellipsoidal lymphoid tissue/PEL) ve germinal merkez (germinal center/ GC) olmak üzere dört farklı kısımdan oluştuğunu bildirmişlerdir.

Tavuklarda peri-elipsoidal lenfoid doku, germinal merkez ve plazma hücre hattındaki hücreler, BF bağımlı bölgelerdir (Mori ve Hoshi, 1971; Hoshi, 1972; Hoffmann ve ark, 1977; Jeurissen ve ark, 1992; Gumati ve ark, 2003). Ördeklerde de peri-elipsoidal lenfoid dokunun BF bağımlı olduğu bildirilmiştir (Sugimura ve Hashimoto, 1980). Peri-elipsoidal lenfoid doku ve germinal merkezde az miktarda T lenfosit bulunduğu da kaydedilmiştir (Hoffmann ve ark, 1977).

Memelide marjinal zon, beyaz pulpanın perifer sınırı ile kırmızı pulpa arasında bulunan bir kısımdır. Marjinal zon'da sinüsler, dendritik hücre hattı, makrofajlar ve lenfoid hücreler bulunur. Burada lenfoid hücre olarak hem T hem de B lenfositler vardır (Banks, 1993). Kanatlılarda ise marjinal zon yoktur (Olah ve Glick, 1982; Zhang ve ark, 2015). Buna karşılık, antijen dağıtımı ve mitojenik antijenlerin reaksiyonuyla ilgili, işlevsel olarak

benzer olan bir kompartman tarif edilmiştir (Jeurissen ve ark, 1992; Jeurissen, 1993; Kasai ve ark, 1995; Gumati ve ark, 2003; Olah ve Vervelde, 2008). Araştırmacılar (Jeurissen, 1993; Olah ve Vervelde, 2008) bu kompartmanın retiküler hücreler tarafından oluşturulan kısım, B hücre katmanı ve onu çevreleyen makrofaj halkasının oluşturduğu kompleks bir yapı olarak tanımlayıp, memelilerdeki marjinal zonun karşılığı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

2.1.2.2.1. Arteriyol çevresi lenfatik kılıf (Peri-Arteriyolar Lymphoid Sheath/ PAL)

PAL, kas tabakası görülebilen sentral arter çevresinde bulunur ve T lenfositlerden oluşan yoğun bir katman ile az sayıda B lenfositlerden oluşmuştur (Mori ve Hoshi, 1971; Hoshi, 1972; Hoffmann ve ark, 1977; Sugimura ve Hashimoto, 1980; Jeurissen ve ark, 1992; Jeurissen 1993; Gumati ve ark, 2003; Nagy ve ark, 2005; Olah ve Verve, 2008; Liman ve Bayram, 2011).

Bu T hücreleri CD3⁺ (genel T lenfosit belirteci) ve daha çok CD4⁺ alfabeta1TCR (yardımcı T lenfosit belirteci) moleküllerini eksprese ederler. Diğer T hücrelerini de (CD4⁺ ve TCR alfabeta2 ya da CD8⁺ ve TCR alfabeta1 -sitotoksik T lenfosit belirteci-) bulundurlar. TCR alfabeta1 hücreleri tükendiğinde, bunların yerine PAL'ta artış gösteren TCR alfabeta2 hücreleri geçer. Bu hücreler kısmen aynı fonksiyonu yerine getirirler. Memelilerdeki gibi immun cevapta CD4⁺ yardımcı hücreler merkezi rol oynar. Sitotoksik T lenfositler ve B hücrelerinin cevabı için ön şart CD4⁺ yardımcı hücrelerin aktive edilmesidir. Yardımcı T lenfositlerin GC'ın yanında ve içinde bulunmaları, B hücrelerinin olgunlaşmasında rol aldığını ortaya koyar (Olah ve Vervelde, 2008).

PAL'ta interdigital dendritik hücreler (interdigital dendritic cells/IDC), T hücreleri arasında dağılmışlardır ve KUL-01⁺, MHC II⁺, CD57⁺ dirler. PAL'daki IDC'ler S-100 ve -74.3 antijenlerini bulundurlar. Bu hücrelerin foliküler dendritik hücrelerin (Follicular dendritic cell/ FDC) öncüleri olduğu ileri sürülebilir (Mast ve Goddeeris, 1998a).

2.1.2.2.2. Peri-elipsoidal lenfoid doku (Peri-ellipsoidal lymphoid tissue/ PEL)

Elipsoidin çevresinde yer alan lenfoid doku, peri-elipsoidal lenfatik doku (peri-elipsoidal lymphoid tissue/ PEL) olarak tanımlanır (Olah ve Glick, 1982; Olah ve Vervelde, 2008). PEL, B lenfositlerden oluşan yoğun bir katmandan oluşur (Mori ve Hoshi, 1971; Mast ve Goddeeris, 1999).

2.1.2.2.2.1. Elipsoid ile ilişkili hücreler (EACs), elipsoid ve elipsoid kapsülü (Capsule of Schweigger-Seidel sheat/ Schweigger-Seidel kılıfın kapsülü/ CSS)

En içteki elipsoid kapillar -ya da penisilar kapillar-, retikulum ipliklerinin fazlaca olduğu bir bazal membrana oturur. Elipsoid kapillarların etrafında; yuvarlağımsı oval şekilli olan, elipsoid hücreler veya destek hücreleri olarak isimlendirilen, retikulum hücrelerinden oluşmuş bir hücre katmanı bulunur (Olah ve Glick, 1982). Araştırmacılar bu hücreleri elipsoidle ilişkili retiküler hücreler (Ellipsoid associated reticular cells / EARCs) (Mast ve Goddeeris 1998a), elipsoidal retikulum hücreleri (Kasai ve ark, 1995) veya elipsoidi destekleyen hücreler (Nagy ve ark, 2005) olarak da isimlendirmişlerdir. Elipsoidle ilişkili hücreler (EACs), kan kökenli olup tavuk dalağının antijen tutan bölgesinde yerleşen, oldukça fagositik hücrelerdir (Olah ve Glick 1982; Igyarto ve ark, 2007). Kannan ve ark (2015) EACs içerisinde az sayıda makrofaj olduğunu bildirmişlerdir.

EACs'de E5G12 (Igyarto ve ark, 2007) ve -68.2 (Olah ve Vervelde, 2008), S-100 (Gallego ve ark, 1993) gibi mAb tarafından tanınan belirteçler bulunur. Bu hücreler düşük asit fosfataz pozitif olup sirkülasyondan antijenlerin temizlenmesinden sorumludurlar. EACs'nin sitoplazmalarında ısı şok proteini (HSP) 47, yüzeylerinde antijen CSA-1 bulunur. Ayrıca elipsoid kapillarların endotelial hücrelerine benzer şekilde HSP47 proteini içerirler (Kasai ve ark, 1995). HSP47, kuşlarda prokollegene bağlanır ve özellikle I, II ve IV kollegen tipleri için şaperon rolü oynar (Olah ve Vervelde, 2008). Del Cacho ve ark (1995) EACs'in, PAL ve GC'ye antijen taşıdıklarını ileri sürmektedirler.

Elipsoid, endotel hücreleri kalın bazal membran üzerine oturmuş halde bulunan elipsoid kapillar ile çevresindeki retikulum hücrelerinin oluşturduğu yapı olarak tanımlanmaktadır (Olah ve ark, 1994; Gumati ve ark, 2003). Elipsoid ilk kez kanatlı dalağında Billroth (1857) tarafından keşfedilmiş (Gumati ve ark, 2003) ve Schweigger-Seidel (1863), bu kısmın filtre aparatı olduğundan bahsetmiştir. Olah ve ark (1994) elipsoid yerine Schweigger-Seidel Sheath tanımlamasının daha doğru olacağını ileri sürmektedirler. SSS yani elipsoid (elipsoid kapillar + EACs), PEL içinde gömülüdür (Gumati ve ark, 2003). Elipsoid, ekstrasellüler matriksi ile gerçekleştirilen mekanik eliminasyon ve hücresel komponentleriyle gerçekleştirilen fagositik fonksiyonlarıyla iyi bir filtrasyon aparatıdır.

Ayrıca elipsoidin hücreleri, dış taraftan kesintili bir kapsülle çevrelenmiştir, bu kısımda bağdoku elemanlarının bulunduğu gözlenmiş ve bu kısma CSS adı verilmiştir

(Gumati ve ark, 2003; Nagy ve ark, 2005). Gumati ve ark (2003) bu kapsülde retikulum iplikleri ve tenaskin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bazal membran ve CSS üç boyutlu bir ağ oluşturan ince retikular iplikler ile birbirine bağlanır. Antijenler veya damara enjekte edilen ekstrasellüler iz maddeler kapillar açıklıklar aracılığıyla sirkülasyondan ayrılır ve elipsoide girerler. Antijenlerle karşılaşan ilk hücreler elipsoiddeki hücrelerdir. CSS'nin kapsülü antijenin perielipsoidal beyaz pulpa içine serbestçe girişini engeller. Böylece CSS mekanik filtrasyon cihazı gibi işlev görür. Bunu da ekstrasellüler matriksi ile gerçekleştirdiği mekanik filtrasyon mekanizmasıyla sağlar. (Olah ve Glick, 1982; Nagy ve ark, 2005). EACs fonksiyonunu antijenin yapısından bağımsız olarak -canlı ya da ölü, eriyebilir ya da parçalı, timus bağımlı ya da bağımsız tip I ve II ile bir Fc kuyruğu olan ya da olmayan- gerçekleştirir. Bu açıdan elipsoid, memeli dalağının marjinal sinusuna benzemektedir (Olah ve Vervelde, 2008).

2.1.2.2.2. B hücre katmanı

İmmun komplekslerin intravenöz enjeksiyonundan sonra immün komplekslerin geçici tuzaklanması SSS'nin periferik kısmında gerçekleşir (Eikelenboom ve ark, 1983). EACs halkası PEL bünyesindeki B lenfositler tarafından çevrelenmiştir ve bu hücrelerde chB6 ve CD57 ekspres ederler (Mast ve Goddeeris, 1998a).

2.1.2.2.3. Makrofaj halkası

Elipsoid ilişkili makrofajlar CSS dışında lokalize olmuşlardır (Nagy ve ark, 2005). PEL etrafındaki makrofaj halkasını oluşturan hücreler mAb -74.2 ve KUL-01 ile saptanabilmişlerdir (Jeurissen ve ark, 1992; Mast ve Goddeeris, 1998a). Elipsoid ilişkili makrofajlar T bağımlı bölgelere göç ederek antijenleri T lenfositlere sunarlar (Jeurissen 1993).

2.1.2.2.3. Doğurucu merkez (germinal center/ GC)

GC'lar sadece memeli ve kuşlarda bulunur. Memeli dalağının GC'ı primer foliküllerde gelişir. Karşılaştırıldığında tavuk dalağında primer B hücre folikülleri bulunmaz. Tavuk dalağının GC'ları sadece antijenik sitümlasyondan sonra görülür ve sadece sekonder foliküller olarak vardır (Yasuda ve ark, 2003).

Kuşlarda germinal merkez, çevresinde ince kollagen ipliklerden oluşan ince bir kapsüle sahiptir (Olah ve Vervelde, 2008). Bazen bu kısım bitişiğindeki arterlerin adventisyasındaki bağ doku ile karışmış olabilir. Memeli lenfoid organlarda görülenlerden farklı olarak kuşların germinal merkezine penetre olmuş bir damar bulunmaz (Hoshi, 1972). Graczyk ve ark (2003)'te tavuk dalağında iki tip germinal merkez tanımlamışlardır. Pulpa arterinin yakınında yerleşen ilk tipin etrafı fibröz bağdoku ile sınırlandırılmıştır ve kan damarı içermez. İkinci tip GC da daha küçük olup pulpa arteri ile penisilar arteriyol arasında bulunup daha az bağ doku ile sınırlandırılmıştır (Graczyk ve ark, 2003). Olah ve Vervelde (2008)'de PAL'ın başladığı yerde, arterlerin çatallanma kısmında geliştiğini bildirmişlerdir. Ogata ve ark (1977) ise PVL'de GC'a rastladıklarını bildirmişlerdir.

Tavuk dalağının GC'ları sadece antijenik sitümülasyondan sonra görülür ve sadece sekonder foliküller olarak var olduğu kaydedilmiştir (Yasuda ve ark, 2003). Bursa bağımlı bir oluşumdur (Hoshi, 1972; Mori ve Hoshi, 1971; Sugimura ve Hashimoto, 1980; Ewijk ve Nieuwenhuis, 1985; Claassen ve ark, 1986; Jeurissen ve ark, 1992; Gumati ve ark, 2003). Beyaz pulpada gözlenen GC'de dentritik hücreler, plazma hücreleri ve lenfositler bulunur (Venkatesan ve Vijayaragavan, 1997). Antijenik sitümülasyondan sonra lenfoid dokuda, genç hücrelerin oluşturduğu B hücre bölgeleri meydana gelir (Yasuda ve ark, 2003).

2.1.2.3. Kırmızı Pulpa

Kapalı dolaşıma sahip olan kanatlılarda kapillarlar kırmızı pulpaya girer ve sinuslar olarak devam eder. Sinuslar yassı endotelle kaplanmış ve birbirleri ile bağlantıda olan yapılardır. Bu sinüsler toplayıcı venlere bağlanırlar, büyük trabeküler venler oluşturulur ve dalaktan ayrılır. Kırmızı pulpada hem lenfoid hem de non-lenfoid hücreler bulunur (Olah ve ark, 2012).

Dalak oluştuktan kısa bir süre sonra hemapoetik organ olarak çalışmaya başlar. Türlerin çoğunda bu fonksiyon geçicidir ve kırmızı pulpa ile sınırlıdır. Hemopoezisten sonra, dolaşımda yaşlanan eritrositlerin ortadan kaldırılması için dalağın çatısındaki elementler gelişir (Olah ve Vervelde, 2008).

Kanatlılarda kırmızı pulpada lenfoid ve non-lenfoid hücrelerin her ikisinde tanımlanmıştır. Sinüslerde T hücreleri baskın olarak bulunurlar. Bunlar CD8⁺ ve TCR gamadelta⁺ dir. Buna rağmen bazı CD4⁺, TCR alfabet1 veya TCR alfabet2 hücreleri de

bulunur. Erişkin kuşlarda TCR gamadelta⁺ hücreleri baskın olarak heterodimerik CD8 alfabeta reseptörlerine sahiptir. Fakat embriyo ve yeni doğanların dalaklarında büyük oranla CD8⁺, TCR gamadelta⁺ hücreleri bulunur ve bunlar sadece CD8⁺ heterodimerik zincirini eksprese ederler (Tregaskes ve ark, 1995).

İmmunohistokimyasal araştırmalarda dalağın ekstrasellüler matriksinin son derece kompleks olduğu, her bir bölümde özel yapılara sahip olduğu tespit edilmiştir (Gumati ve ark, 2003) ki bu da lökositlerin ve sabit hücrelerin yapışması ve göçü için gerekli olan spesifik kompozisyona sahip kompartmanlardan oluştuğu anlamına gelmektedir. Temel bileşenlerden olan retikulum iplikleri ince destekleyici bir ağ yapar (Olah ve Vervelde, 2008).

Ig izotiplerini eksprese eden plazma hücreleri de kırmızı pulpada ve özellikle büyük kan damarlarının yanında bulunurlar. Ig'ler sitoplazma boyanırlar ve hücrelerin CD57 pozitivitesi vardır fakat chB6 negatiftir (Mast ve Goddeeris, 1998a). Kırmızı pulpada MHC II antijenlerine sahip çok fazla makrofaj ve non-lenfoid hücrelerden heterofiller de bulunur (Olah ve ark, 2012).

2.1.3. Tavuk Dalağında Antijen Sunan Hücreler

Profesyonel antijen sunumu makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından gerçekleştirir (Abbas ve Lichtman, 2007; Wu ve Kaiser, 2011). Tavuk dalağında makrofajların yerleştikleri yerler kırmızı pulpa, GC ve elipsoid'dir.

Dendritik hücreler kemikiliği kökenli, dendritik benzeri sitoplazmik uzantıları olan profesyonel antijen sunan hücrelerdir. Dendritik hücreler patojen ilişkili yapıları tanırlar ve daha sonra spesifik savunmayı aktive ederler, uyarılmamış T lenfositleri uyarırlar (Steinman, 2007). Böylece non- spesifik ve spesifik immun yanıt arasında köprü görevi görürler. Bu hücreler az sayıda olsalar bile çok geniş bir alanda perifer dokulara bağlanırlar. Buldukları çevredeki patojen ilişkili molekülleri tanıyarak aktivasyon programı başlatırlar. Dendritik hücreler örnekleme işlemini gerçekleştirdikten sonra proksimal sekonder lenfoid organların T bölgelerine göç ederler. Göç boyunca MHC-II, CD80 ve CD86 gibi yüzey moleküllerini hazırlarlar. Bu moleküller uyarılmamış T lenfositler ile bağlantısı için gereklidir. Böylece olgun dendritik hücre fenotipi oluşur (Hansell ve ark, 2007).

Dendritik hücreler heterojen olup IDC ve FDC olarak ayrılırlar. Tavuk dalağında IDC'ler PAL ve elipsoide yerleşirler. Foliküler dendritik hücreler ise sadece GC'da bulunmaktadır (Olah ve Vervelde, 2008).

Del Cacho ve ark (2009) *Eimeria tenella* sporozoitlerine karşı elde edilen anti serumu kullanarak tavukların sekal tonsillerde antijen bağlayan hücreleri izole etmişlerdir. Bu hücreleri CD45⁺, IDC ve CD45⁻ dendritik hücreler olduğunu belirlemişlerdir. IDC'lerin MHC I, MHC II ve selectin ekspres ettiklerini, CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonlarını uyardıklarını ve otolog T hücrelerinin interferon γ sekresyonunu arttırdıklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca FDC'lerin LPS uygulanmış allojenik B hücrelerin çoğalmalarını sitimimüle ettiklerini yine LPS ile uyarılmış B hücrelerinin Ig G sekresyonunu arttırdıklarını göstermişlerdir.

Wu ve ark (2009) tavuk kemik iliği hücrelerini yedi gün boyunca, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte-makrofaj colony stimulating factor/GM-CSF) ve IL-4 kullanılarak kültüre etmişlerdir. Daha sonra tipik morfoloji gösteren dendritik hücrelerin MHC II⁺ (yüksek), CD11c⁺ (yüksek), CD40⁺ (orta), CD1.1⁺ (orta), CD86⁺ (düşük), CD83 ve DEC205 olduklarını göstermişlerdir.

2.1.4. Göç Yolu

Karbon taşıyan EACs'ler elipsoidden PEL'ye göç ederler. Önce kırmızı pulpaya geçerler sonra da PAL yakınındaki GC'da görülürler. Bu göç yolu, EACs'lerin IDC ve FDC'lerin preküsör hücreleri olduğu hipotezine izin verir (Olah ve Glick, 1982). Araştırmacıların (Del Cacho ve ark, 1995; Gallego ve ark, 1997) bulguları da dendritik hücrelerin EACs den GC'a göç ettiği hipotezini desteklemiştir.

Dalak, non-spesifik ve spesifik savunmanın yeterli bir şekilde gerçekleştiği bir yer olup, immunité için önemli bir organdır. Dalaktaki lenfoid ve non-lenfoid hücreler temel alındığında PAL, adaptive (spesifik) immunité için çok önemli gibi görülürken elipsoid ve PEL'lerin hem spesifik hemde non-spesifik savunma ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır (Olah ve Vervelde, 2008).

Sunulan projede, broyler civcivlerin yaşamlarının ilk iki haftası içinde, LPS (Lipopolysaccaride/ Lipopolisakkarit) sitimulasyonundan sonra dalakta; TLR4 ile MHC II

moleküllerinin dağılımının araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma sonunda, kuluçka sonrası gelişme gösterdiği bilinen (Withanage ve ark, 2004; Sklan, 2005; Fasina ve ark, 2008) dalağın savunma mekanizmasının, antijenik uyarıma verdiği yanıt ve bu kapsamda TLR4 ve MHC II moleküllerinin dokudaki dağılımları, dolayısıyla antijen varlığında ve yokluğunda dalağın kuluçka sonrası fonksiyonel gelişimi incelenmiş olacaktır. Paul ve ark (2011) 100 µg ve 500 µg im olarak LPS enjekte edip dalakta sitokin üretimine bakarak TLR4 ve TLR21 stimülasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir fakat histolojik olarak dokuda TLR demonstrasyonu yapmamışlardır. TLR4 demonstrasyonu tavuklarda Subedi ve ark (2007) ile Ozoe ve ark (2009) tarafından dişi genital kanalda gerçekleştirilmiştir. Tavukların dalağında ise Toll-benzeri reseptörlerin ve MHC II moleküllerinin histolojik demonstrasyonları ve dağılımları ile ilgili kaynağa rastlanamamıştır. Sunulan çalışmada bu iki molekül, dalağın kuluçka sonrası gelişim aşamasında incelenmiş olacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak toplam 225 adet Ross 308 ticari etlik civciv kullanıldı. Ticari bir işletmeden (Egetav), kuluçkadan yeni çıkmış ve aşılanmamış olarak sağlanan civcivler; Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi'nde, izole bir ortamda, talaş altlıklı yer bölmelerinde barındırıldı. Bölmelerin üzerine asılan yüksekliği ayarlanabilir elektrikli ısıtıcılarla, ortam sıcaklığının civciv sırt seviyesinde ilk üç gün 32-33 °C, 4-7. günlerde 30-32 °C, 8-14. günlerde ise 28-30 °C olması sağlandı. Civcivlere 0-7 günler arasında etlik civciv yemi (3060 kcal ME/kg, %23 ham protein), 8-14 günler arasında etlik piliç büyütme yemi (3200 kcal ME/kg, %22 ham protein) ve su *ad libitum* olarak verildi. Bütün prosedür etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi (Etik Kurul Onay Karar No: **B.30.2.ADÜ.0.00.00/050.04/2010/106**)

Çalışmada antijenik uyarım, LPS ile intra abdominal yolla bir kez gerçekleştirildi. Bakteriyel LPS'nin (Purified lipopolysaccaride from *E.coli* 011:B4 strain) fosfat buffer salin (Phosphat Buffer Saline / PBS)'de hazırlanmış solüsyonu intra abdominal 1mg/kg dozda (Koutsos ve Klasing, 2001; Ozoe ve ark, 2009) uygulandı.

Civcivler 1, 4, 7, 10, 14 günlük olmak üzere her biri 45'er adet civciv içeren 5 ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde; iki uygulama yapılan (PBS ve LPS uygulanan) ve hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Belirtilen günlerde LPS ve PBS uygulanan alt gruplardan, uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra üçer hayvandan doku örneği alındı. Aynı saatlerde, kontrol alt grubundan üçer hayvandan da doku örneği alındı (Tablo 1).

Tablo 1: Materyalden oluşturulan ana ve alt gruplar ile birlikte alt gruplardan doku alma saatleri

ÇALIŞMA GRUPLARI														
1 Günlük (1. grup)			4 Günlük (2. grup)			7 Günlük (3. grup)			10 Günlük (4. grup)			14 Günlük (5. grup)		
LPS (Alt Grup 1)	PBS (Alt Grup 2)	Kontrol (Alt Grup 3)	LPS (Alt Grup 1)	PBS (Alt Grup 2)	Kontrol (Alt Grup 3)	LPS (Alt Grup 1)	PBS (Alt Grup 2)	Kontrol (Alt Grup 3)	LPS (Alt Grup 1)	PBS (Alt Grup 2)	Kontrol (Alt Grup 3)	LPS (Alt Grup 1)	PBS (Alt Grup 2)	Kontrol (Alt Grup 3)
1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)	1. saat (n=3)
3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)	3. saat (n=3)
6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)	6. saat (n=3)
12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)	12. saat (n=3)
24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)	24. saat (n=3)

3.2. Dokuların Hazırlanması

Hayvanlar belirtilen zamanlarda dekapitasyon yöntemi ile öldürülerek dalakları çıkarıldı ve 18-24 saat %10'luk tamponlu nötral formalinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin doku takip (yıkama, dehidrasyon, şeffaflandırma) işleminden sonra parafinde bloklandılar. Bloklama yapılırken, aynı alt gruptaki her üç hayvandan alınan dalak örnekleri parafinde bir arada bloklandı.

Parafin bloklardan 60 µm arayla 6 µm kalınlığında alınan kesitler APES (Sigma) ile kaplanmış lamlar üzerine alındı. Uygulanan boyama metotları için seri kesitler alındı.

Parafin kesitlerde, aynı doku alma saatine denk gelen kontrol, PBS ve LPS uygulanan grupların bloklarından elde edilen kesitler aynı lam üzerine alındılar. Böylelikle aynı günün aynı saatine denk gelen kontrol, PBS ve LPS uygulamalarına ait doku kesitlerinin aynı ortamda boyanmaları sağlandı.

3.3. Boyama Metotları

Parafin kesitlere deparafinizasyon ve yıkama işleminden sonra, genel dalak histolojisinin incelenmesi amacıyla Crossman'ın üçlü boyama yöntemi (Crossman, 1937), retikulum ipliklerinin belirlenmesi için Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu (1936), elastik iplikler için Orcein-Giemsa boyama metodu, MHC II (Honig ve ark, 2005) ve TLR4 (Subedi ve ark, 2007) moleküllerinin varlığının araştırılması için de immunohistokimyasal yöntem (strept ABC metodu) uygulandı.

3.4. Strept ABC Boyama Yöntemi

İmmunohistokimyasal boyama için Tablo 2'de gösterilen primer antikorlar kullanıldı. Boyamaların kontrolü için gerçekleştirilen negatif kontrol kesitleri, primer antikor kullanmadan sadece antikor seyreltme solüsyonu ile inkube edildiler.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primer antikorlar

Antikor	İzotip	Sulandırma	Konsantrasyon	Reaktivite
MCA2171/AbD Secrotec	IgG1	1:100	1mg/1ml	Tavuk MHC II
ABIN604783/antibodies-Online Inc.	Poliklonal	1:300	1mg/1ml	İnsan TLR4 terminal

3.4.1. TLR4 boyama

Kesitler deparafinizasyon ve hidrasyondan sonra distile suda 5 dk tutuldu. Antijenik bölgeleri açığa çıkarmak için sitrat buffer (pH 6) solüsyonunda mikrodalga fırında orta ayarda 10 dk bekletildi. Kesitler mikrodalgadan çıktıktan sonra 20 dk oda ısısında bekletildi. Endojen peroksidazın ortadan kaldırılması için kesitler distile su ile hazırlanmış, %3 H₂O₂ (Hidrojen peroksit)'de 5 dk bekletildi. Daha sonra 5 dk distile suda yıkandı. Takiben iki kez 5 dk PBS-Tweende bekletildi. PBS-Tweenden alınan kesitler kurulandı. Protein bloking'de 30 dk bekletildi. Kesitler yıkamadan kurulandı ve primer antikorda, 1 gece + 4°C de inkube edildi.

TLR4 için antikor ile ilgili önerilen 1:200 oranda ve % 1 BSA içerecek şekilde PBS ile seyreltildi. İnkubasyondan sonra kesitler PBS-Tweende iki kez 5 dk yıkandı. Sekonder antikorda (IHC kit /Abcam ab93677) 1 saat inkube edildi. PBS-Tweende iki kez 5 dk yıkandı. Streptavidin peroksidaz (IHC kit /Abcam ab93677) solüsyonunda bir saat tutuldu. PBS-Tweende 2 kez 5 dk yıkandı. AEC Peroksidaz Substrat Solüsyonunda 30 saniye tutularak kırmızı çökelti olarak görünür hale getirildi, PBS'de yıkandı. Çekirdeğin boyanması için kesitler, Mayer'in Hemalaun solüsyonuna batırılıp çıkartıldı. PBS'de 5 dk yıkandı ve son olarak su bazlı kapatıcı (mouse mountain medium) ile kapatıldı.

3.4.2. MHC II boyama

Kesitler deparafinizasyon ve hidrasyon işlemlerinden sonra distile suda 5 dk tutuldu. Antijenik bölgeleri açığa çıkarmak için sitrat buffer (pH 6) solüsyonunda mikrodalga fırında orta ayarda 10 dk bekletildi. Mikrodalgadan çıkartılan kesitler oda ısısında sitrat buffer içinde 20 dk bekletildi. Endojen peroksidazın ortadan kaldırılması için kesitler, distile su ile hazırlanmış %3 H₂O₂'de 5 dk bekletildi. Daha sonra distile sudan geçirilirdi ve 5 dk PBS'te tutuldu. Protein Blocking'de (IHC kit / Abcam ab93677) 10 dk bekletildi. Solüsyon fazlası kurutma kağıdıyla alındıktan sonra primer antikorda 4 saat oda ısısında inkübe edildi. Kesitler TBS (Tris Buffer Saline)'te yıkandıktan sonra TBS'te 5 dk tutuldu. Devamında biotinli sekonder antikorda (Mouse and rabbit specific HRP detection IHC kit /Abcam ab93677) 20 dakika tutuldu. Kesitler TBS ile yıkandıktan sonra TBS de 5 dk tutuldu. Streptavidin peroksidazda (Mouse and rabbit specific HRP detection IHC kit /Abcam ab93677) 30 dk tutuldu. TBS de iki kez 5 dk yıkandı. DAB solüsyonunda 5 dk tutularak kahverengi çökelti olarak görünür hale getirildi. Çeşme suyunda yıkandı.

Çekirdek boyası için Mayer'in Hemalaun solüsyonuna batırıp çıkartıldı. Çeşme suyunda preparatlar yıkandı. 5-6 dk distile suda tutuldu. Dehidrasyon ve şeffaflandırmadan sonra entellan ile kapatıldı.

3.5. Doku Kesitlerinin İncelenmesi ve Değerlendirilmesi

Uygulanan boyama yöntemlerinin her biri için, her hayvana ait dalak örneklerinden hazırlanan preparatlar Leica DMLB araştırma mikroskopunda incelendi. İmmunohistokimyasal metot sonrası kesitlerde kahverengi presipitasyonun görülmesi, reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Görüntüler Leica DC200 video kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Uygun görülen yerlerin fotoğrafları çekildi.

Araştırma mikroskobu (Leica DMLB) ve görüntü analiz programı (Leica Q win standart) kullanılarak, her grubun üç saatlik örneklerinde, 20'lik objektifte ve $0,145\text{mm}^2$ birim alanda granülopoezis oranı tespit edildi. Bu amaçla, kapsül altından başladıktan sonra bir görüntü alanı arayla, her kesitte toplam beş görüntü alanında ölçüm yapıldı. İnteraktif olarak granülopoetik hücrelerin bulunduğu bölgeler sınırlandırıldı ve kapladıkları alan kaydedildi. Her hayvandan üç adet kesitte toplamda 15 görüntü alanında granülopoetik hücrelerin kapladığı alan belirlenmiş oldu. Daha sonra 1, 4 ve 7 günlük civcivlerde $0,145\text{mm}^2$ 'de kaydedilen veriler 1mm^2 alanda olacak şekilde dönüştürülerek istatistiki incelemesi yapıldı. On ve 14 günlük örneklerde granülopoezis görülmediği için değerlendirme yapılmadı.

Dalakta TLR4 pozitivitesi; her hayvandan ikişer kesitte incelendi. Bu amaçla kapsül altından başladıktan sonra 40'lık objektifte bir görüntü alanı atlayarak, her kesitte toplam üç farklı fotoğraf alındı. TLR4 boyamasında -alınan fotoğraflarda difüz granüler pozitivite yoğunluğu -0:yok, 1:az, 2:orta, 3:çok- olarak puanlandı. Ayrıca yoğun TLR4 pozitivitesi gösteren hücre sayısı kaydedildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Dalakta MHC II pozitivitesi; her hayvandan ikişer kesitte incelendi. Bu amaçla kapsül altından başladıktan sonra 20'lik objektifte bir görüntü alanı arayla, her kesitte toplam üç farklı fotoğraf alındı. MHC II boyamasında alınan fotoğraflarda pozitivite yoğunluğu -0:yok, 1:az, 2:orta, 3:çok- olarak puanlandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows; version 11,5) hazır paket programı kullanıldı. Granülopoezis için, aynı gün içinde gruplar arası farklılıklar ve aynı grup içinde günler arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farkların önem kontrolü ise *post hoc* Duncan testi ile yapıldı.

İmmunohistokimyasal boyama tekniği ile semi-kantitatif olarak belirlenen MHC II ve TLR4 yoğunluğu ile TLR4 hücre sayısı Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için *post hoc 97 multiple comparison testi* (Conover, 1980) yapıldı.

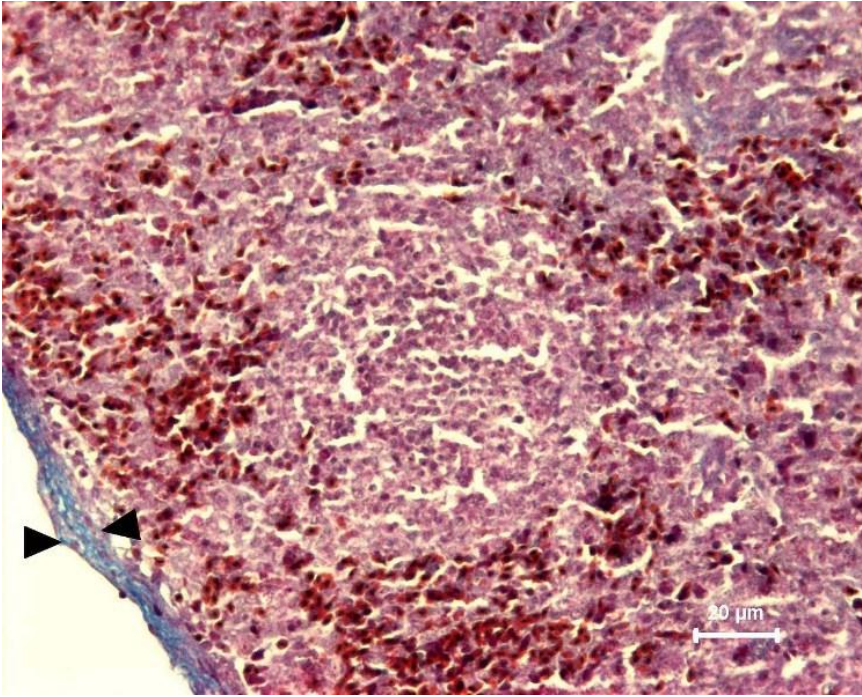
Yapılan istatistiksel analizlerde, farklılıkları $P < 0,05$ olan değerler önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

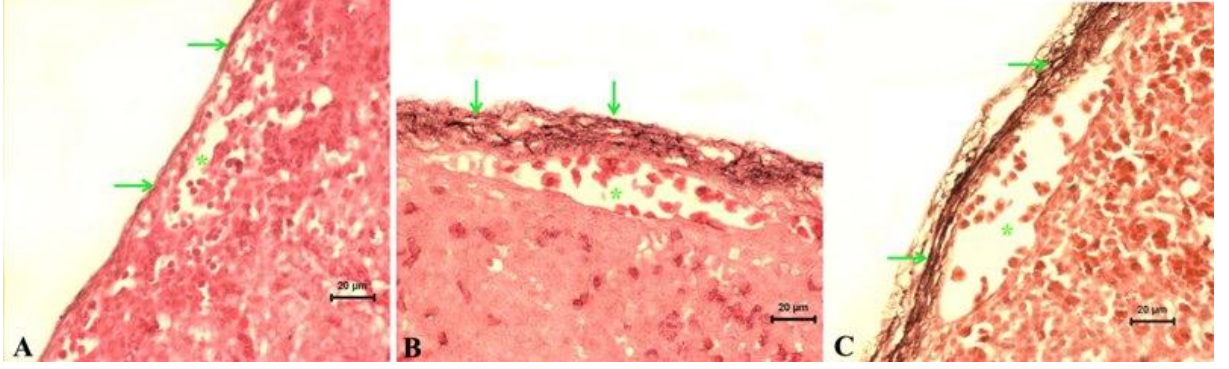
4.1.1. Kapsül, Trabekül ve Kan Damarları

Dalak kesitleri genel histolojik görünüm açısından incelendiğinde fibröz bir kapsüle sahip oldukları görüldü (Şekil 1). Bütün gruplara ait örneklerde, bir günlükten on dört günlüğe doğru kapsül kalınlığının arttığı gözlemlendi.

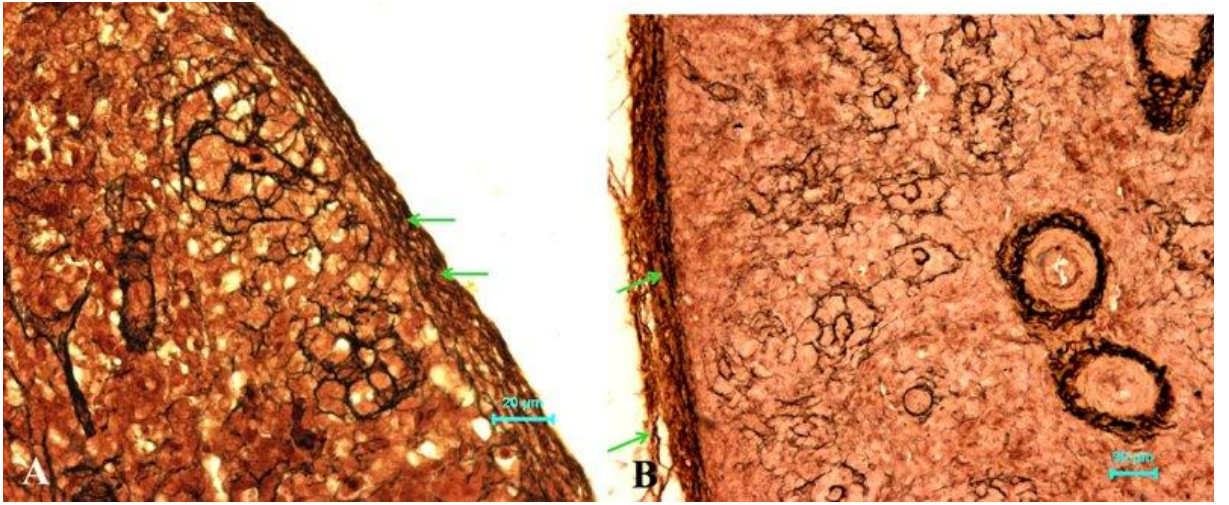


Şekil 1. Dört günlük kontrol grubuna ait bir örnekte fibröz kapsül görünümü (Ok başları). Üçlü Boyama Yöntemi.

Kapsülde kollagen ipliklerin yanında, elastik iplik ve retikulum ipliği de tespit edildi. Elastik iplik yoğunluğunun gittikçe arttığı dikkati çekti (Şekil 2). Retikulum ipliklerinin oranının ise bir günlük örneklerde fazla olduğu ve gün sayısı arttıkça oranının değişmediği gözlemlendi (Şekil 3).

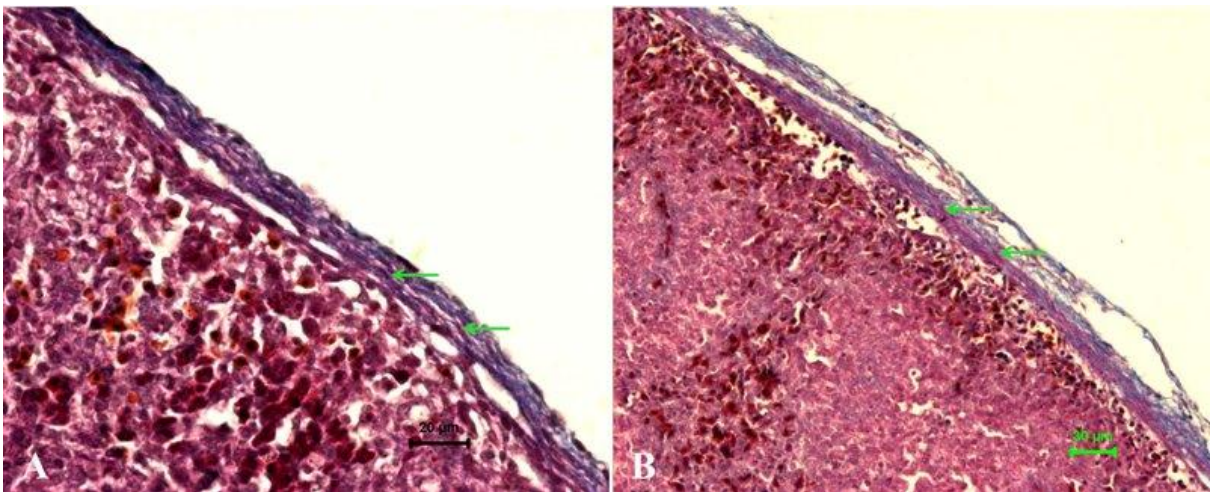


Şekil 2. Bir günlük LPS (A), dört günlük PBS (B) ve 14 günlük kontrol grubu (C) örneklerinde kapsülde elastik ipliklerin görünümü (oklar). Orsein-Giemsma Boyama Yöntemi.



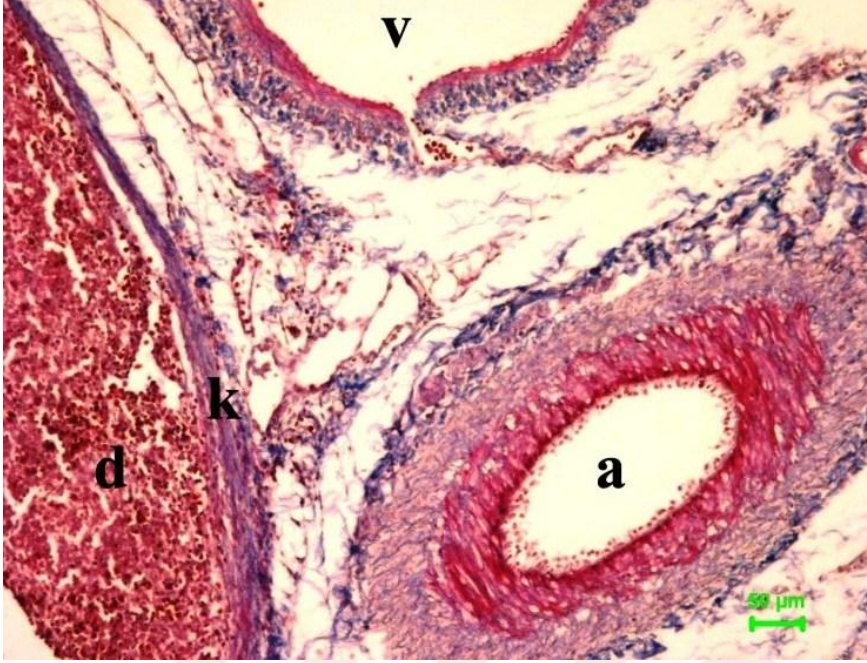
Şekil 3. Bir günlük (A) ve 14 günlük (B) kontrol grubu örneklerinde kapsülde retikulum ipliklerin görünümü (oklar). Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Yöntemi.

Kapsülde parenşime yakın kısımda daha yoğun olmak üzere düz kas hücrelerine rastlandı, ilerleyen günlerde sayılarının arttığı gözlemlendi (Şekil 4).



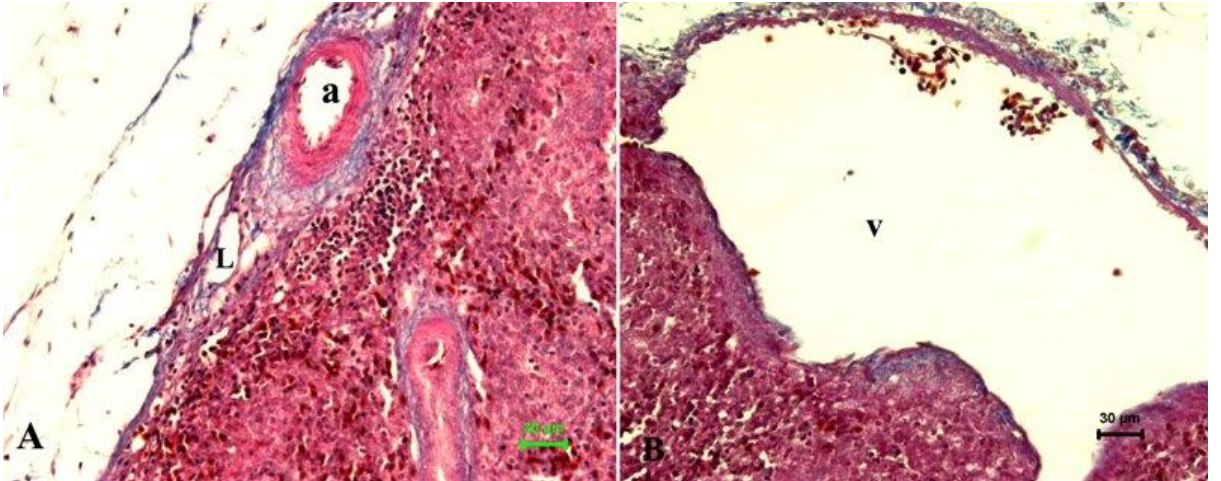
Şekil 4. Bir günlük (A) ve 14 günlük (B) kontrol grubu örneklerinde kapsülde düz kas hücrelerinin görünümü (oklar). Üçlü Boyama Yöntemi.

Dalağın kan damarları olan a. ve v. lienalis kapsül dışında görüntülendi (Şekil 5).

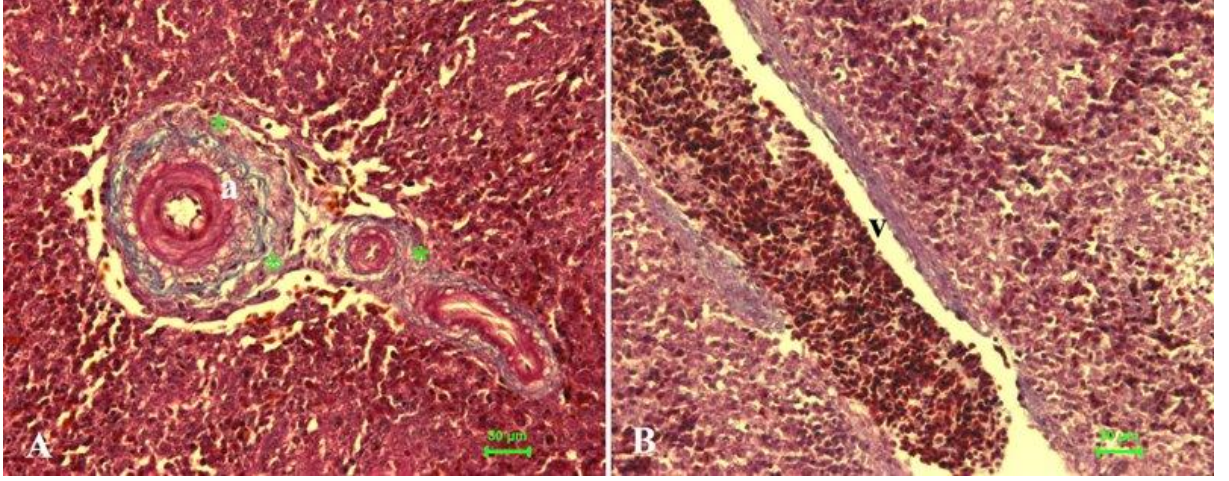


Şekil 5. On dört günlük LPS grubunda kapsül dışında a. lienalis ve v. lienalisin görünümü. a: a. lienalis, v: v. lienalis, k: kapsül, d: dalak parenşimi. Üçlü Boyama Yöntemi.

Kapsülde arter, vena ve çok sayıda lenf kapilları görüntülendi (Şekil 6). Organ kapsülünden parenşime doğru düzenli bir trabekül girişine rastlanmadı. Parenşimde trabeküler bağ dokuya, özellikle arterlerin etrafında daha belirgin olarak rastlandı (Şekil 7).

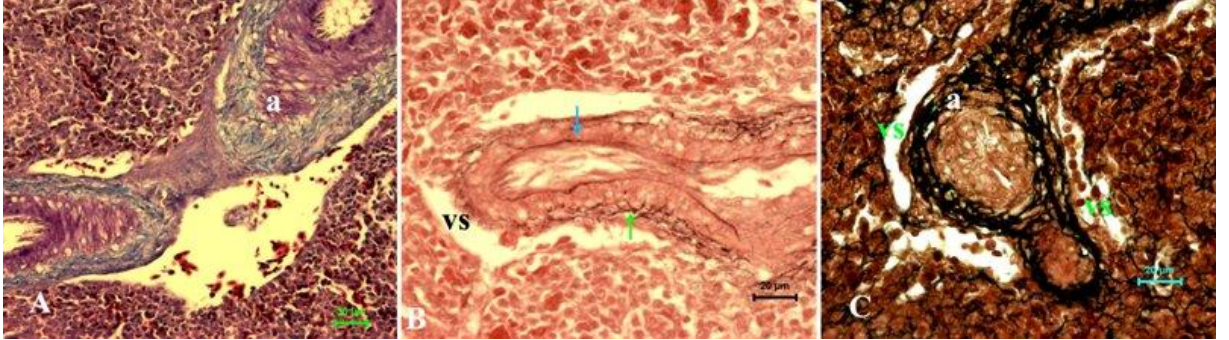


Şekil 6. On dört günlük PBS (A) ve 14 günlük kontrol grubu (B) örneklerinde kapsülde bulunan arter (a), vena (v) ve lenf kapillarlarının (L) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi.



Şekil 7. Bir günlük kontrol grubu (A) ve on günlük kontrol grubu (B) örneklerinde trabeküler arter (a), vena (v) ve trabeküler bağdokunun (*) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi.

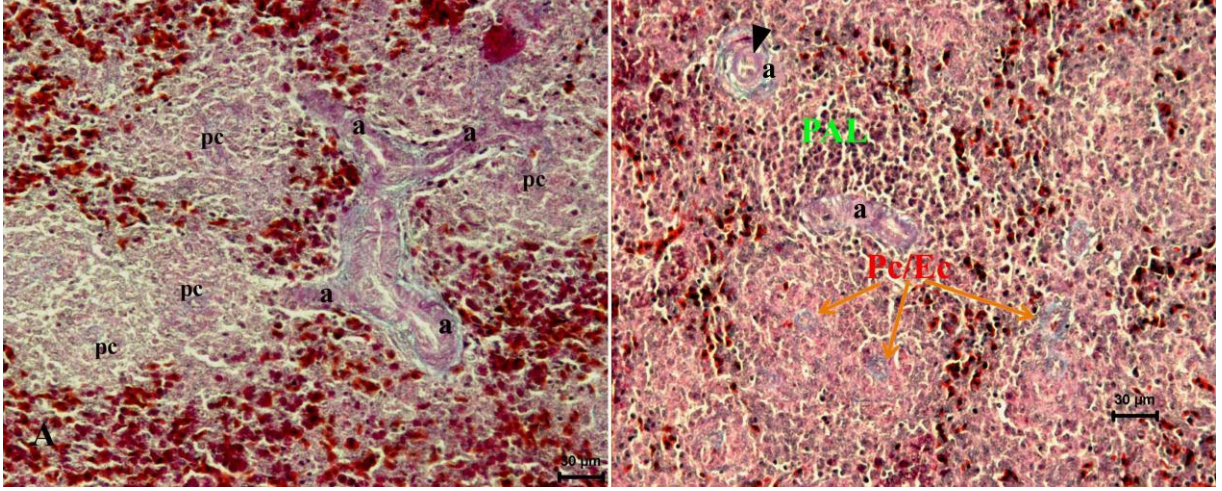
Trabeküllerde ve parenşimde bulunan arter ve arteriyol duvarları incelendi. Orta çaplı arterlerin duvarında elastik ipliklerinin oluşturduğu laminalar yanında, retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti (Şekil 8).



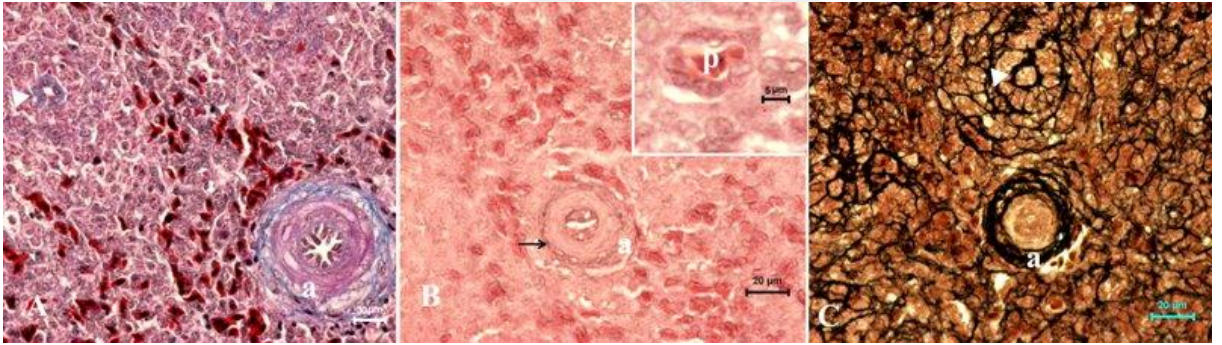
Şekil 8. On dört günlük kontrol grubunda trabeküler arter (A), On dört günlük kontrol grubunda trabeküler arter duvarında elastik iplik (B) ve bir günlük kontrol grubunda trabeküler arter duvarında retikulum ipliklerinin (C) görünümü. a: arter, vs: venöz sinus, lamina elastika interna (mavi ok) ve lamina elastika eksterna (yeşil ok). Sırasıyla Üçlü Boyama, Orcein-Giemsma ve Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Metodu.

Bir günlük örneklerden itibaren dalak kesitlerinde arteriyollerin duvarında bir miktar düz kas hücrelerinin bulunduğu görüldü. Arteriyollerin elipsoid kapillar olarak dallandıkları gözlemlendi (Şekil 9, Şekil 10A). Elipsoid kapillarlar duvarında düz kas hücrelerinin kalmadığı fakat çok az miktarda bağ doku elemanının varlığı dikkati çekti (Şekil 9 Pc/Ec). Arteriyollerin yapısında elastik iplik miktarının azaldığı fakat retikulum ipliği miktarında değişiklik olmadığı gözlemlendi (Şekil 10). Elipsoid kapillarların etrafında

elastik iplik bulunmazken (Şekil 10Bp) retikulum ipliklerinin varlığını sürdürdüğü dikkati çekti (Şekil 10C ok başı).

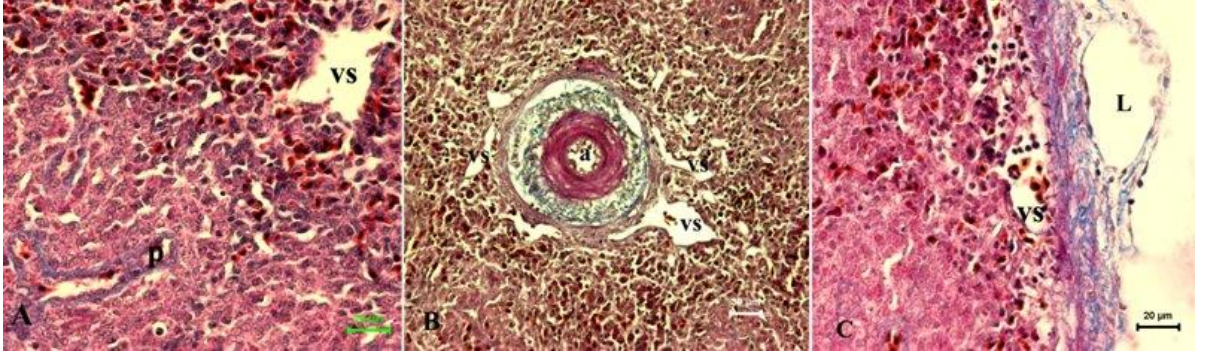


Şekil 9. A. Dört günlük civcive ait doku kesitlerinde arteriyol (a) ve penisilar kapıllarların (pc) görünümü. B. On günlük civcive ait doku kesitinde arteriyol (a) ve penisilar –elipsoid-kapıllarların (Pc/Ec) (oklar) görünümü. PAL: Periarteriyoler lenfoid doku, ok başı: arteriyol duvarında düz kas hücreleri. Üçlü boyama.

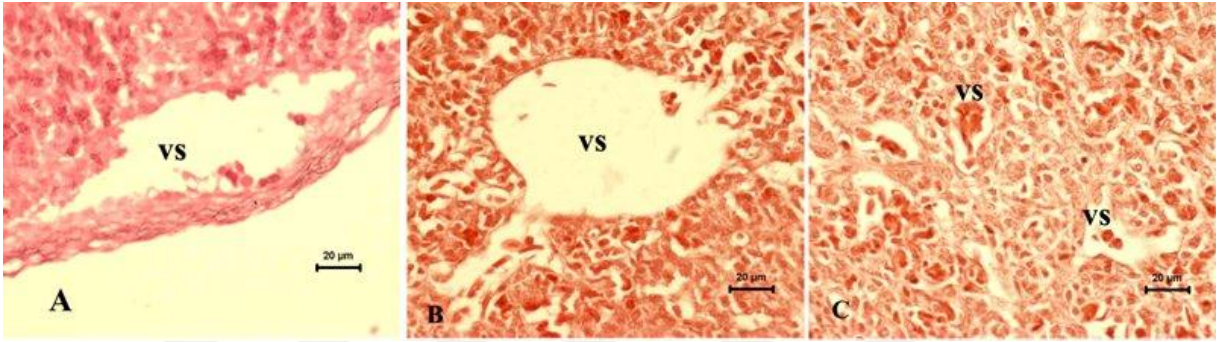


Şekil 10. A: 14 günlük PBS grubunda parenşimde arteriyol ve penisilar kapılların (ok başı) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi B: Yedi günlük kontrol grubunda arteriyol duvarında elastik iplik görünümü (ok) ve penisilar kapıllar (p). Orcein-Giemsa Boyama Yöntemi, C: Bir günlük PBS grubunda arteriyol duvarındaki retikulum ipliklerinin görünümü (a) penisilar kapıllar (ok başı). Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Yöntemi.

Histolojik kesitlerde venöz sinuslar, pulpa venleri ve vena trabekularis ayırt edildi. Venöz sinüs görüntülerine penisilar arteriyolden sonraki kırmızı pulpa kısmında (Şekil 11A), trabeküler arterlerin yakınılarında (Şekil 11 B) ve kapsül altında da rastlandı (Şekil 11C). Bir günlükten itibaren, kapsül altında venöz sinusların varlığı dikkati çekti (Şekil 12). Venöz sinusların duvarında az miktarda retikulum ipliği bulunmasına rağmen elastik ipliklere rastlanmadı (Şekil 8, 12).

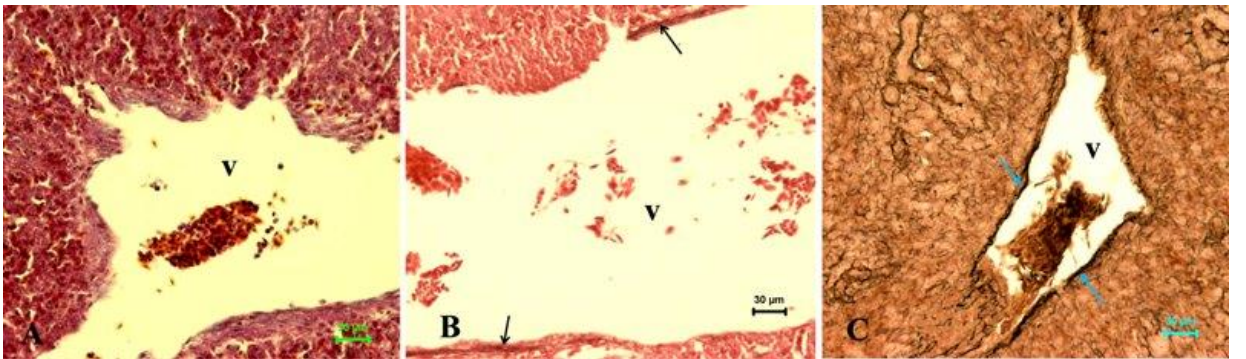


Şekil 11. Venöz sinusların görünümü. A. Penisilar arteriyol sonrası venöz sinus (vs), penisilar arteriyol (p) B. On dört günlük kontrol grubunda arter yakınında bulunan venöz sinus (vs) arter (a) C. Kapsül altında venöz sinus (vs), kapsülde lenf damarı (L). Üçlü Boyama Yöntemi.



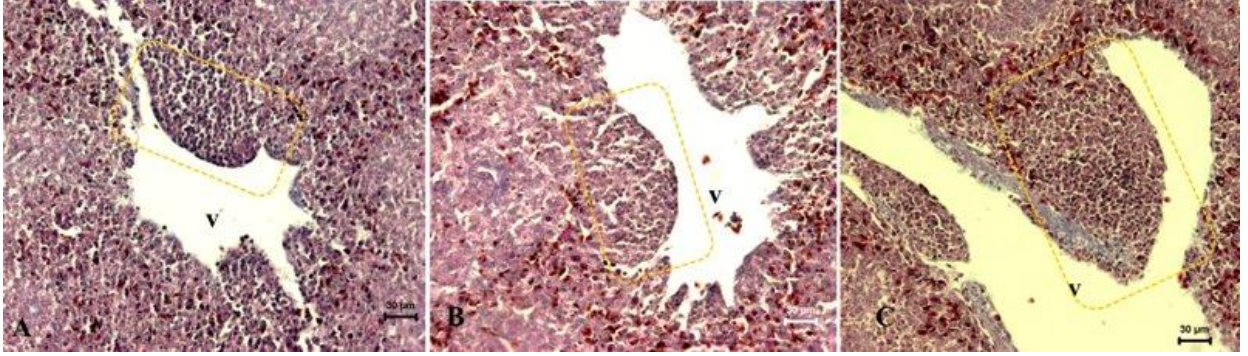
Şekil 12. Venöz sinusların görünümü. A. Bir günlük kontrol grubunda kapsül altında bulunan venöz sinus (vs), B, C. 14 günlük kontrol grubunda kırmızı pulpda venöz sinusler (vs). Orcein-Giemsa Boyama Yöntemi.

Dalak parenşiminde ve trabeküllerde bulunan venalarda az miktarda da olsa elastik iplik görüntüleri görüldü. Retikulum ipliklerinin elastik ipliklere göre daha yoğun olduğu dikkati çekti (Şekil 13).



Şekil 13. A: On dört günlük kontrol grubu örneklerinde parenşimde venanın görünümü (v). Üçlü Boyama Yöntemi B: Venanın duvarında elastik iplik görünümü (oklar). Orcein-Giemsa Boyama Yöntemi, C: Vena duvarında retikulum ipliklerinin görünümü (oklar). Gordon ve Sweet'in Gümüşleme Yöntemi.

Bütün gruplara ait dalak kesitlerinde, bir günlüklerde daha küçük olmak üzere, bazı venaların duvarında, lenfoid hücre birikimlerine rastlandı (Şekil 14).



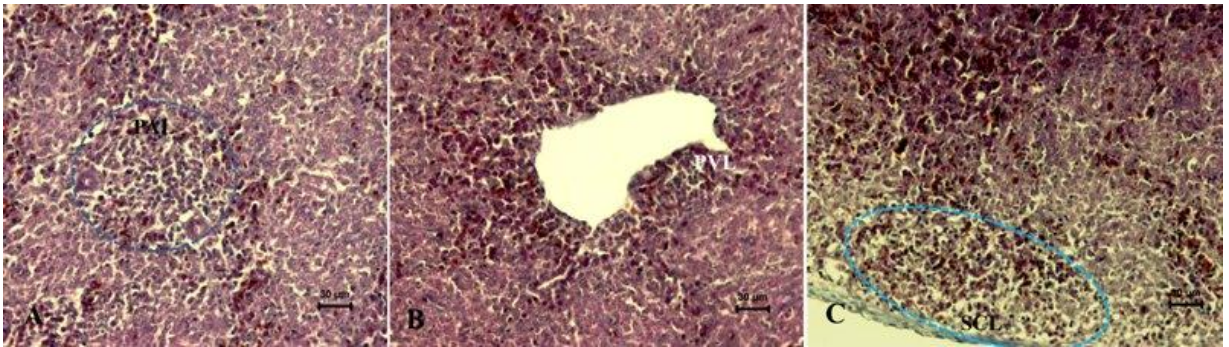
Şekil 14. A. Dört günlük kontrol grubu B. Dört günlük LPS uygulanmış olan grup C. 14 günlük kontrol grubuna ait dalak kesitlerinde, venaların duvarında gözlenen lenfoid hücre kümeleri (kesikli çizgi ile sınırlandırılmış alan), v (vena). Üçlü Boyama.

4.1.2. Pulpa

Dalağın parenşim dokusu kırmızı ve beyaz pulpa olarak ayırt edildi.

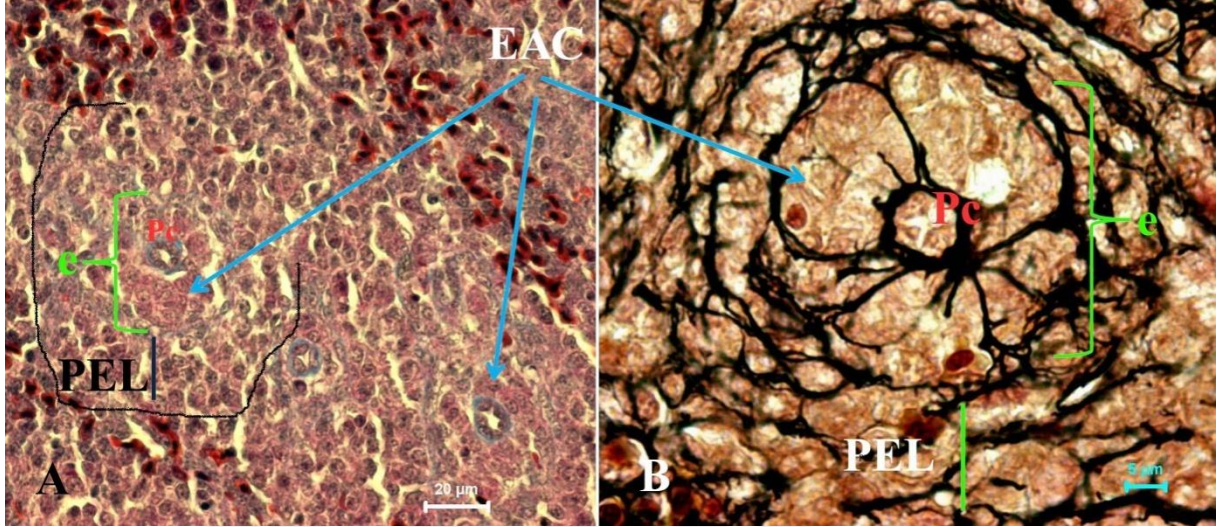
4.1.2.1. Beyaz Pulpa

Beyaz pulpa, “dalakta görülen lenfoid kısımlar” olarak değerlendirildi. Beyaz pulpanın; PAL, PVL, PEL, GC ve kapsül altı lenfoid doku (Sub-capsular Lymphoid Tissue / SCL) olmak üzere beş bölge halinde olduğu dikkati çekti. Beyaz pulpanın gelişimi bu bölgeler göz önüne alınarak incelendi. PAL, PVL ve SCL bir gün üç saatlik örneklerden itibaren görülmeye başlandı (Şekil 15).

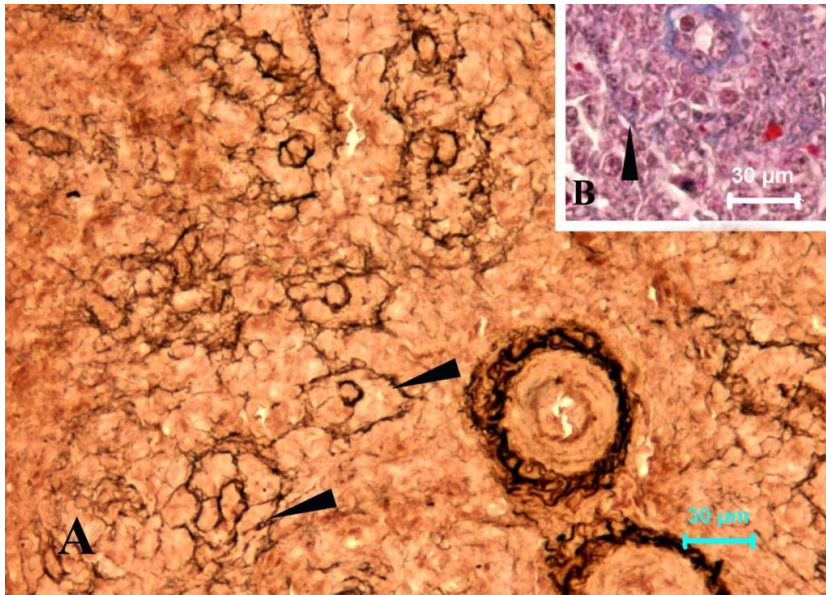


Şekil 15. Bir gün 3 saatlik kontrol grubuna ait dalak kesitlerinden görüntüler A. Arteriyol çevresinde lenfoid dokunun görünümü (daire içinde PAL), B. Vena çevresinde lenfoid dokunun görünümü (PVL), C. Kapsül altında lenfoid dokunun görünümü (elips içinde SCL). Üçlü Boyama.

Elipsoid, elipsoid kapillarlar ve çevrelerindeki EACs ile ayırt edildi. Retikulum ipliklerinin kapillar endoteli ve EACs'in etrafında yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi (Şekil 16). Ayrıca EACs'nin dış kısmında yer alan ve kapillar endotele doğru ince kollar gönderen Schweigger-Seidel kapsülünün (Şekil 17) oluşumuna retikulum ipliklerinin katkı verdiği görüldü.

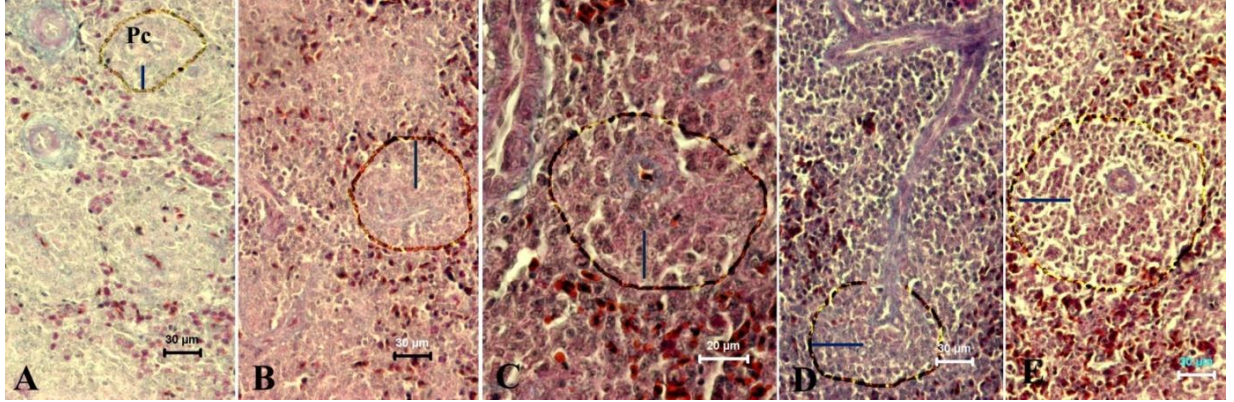


Şekil 16. A. Elipsoid ve elipsoid çevresi lenfoid dokunun görünümü. Pc: Penisilar kapillar, EAC: elipsoid ilişkili hücreler, e: elipsoid, PEL: Elipsoid çevresi lenfoid doku. Üçlü Boyama Yöntemi. B. Penisilar kapillar çevresinde, Elipsoidin etrafında ve elipsoid çevresi lenfoid doku hücreleri arasında bulunan retikulum ipliklerinin görünümü. Pc: Penisilar kapillar, e: elipsoid, PEL: elipsoid çevresi lenfoid doku. Gordon ve Sweet'in gümüşleme Metodu.



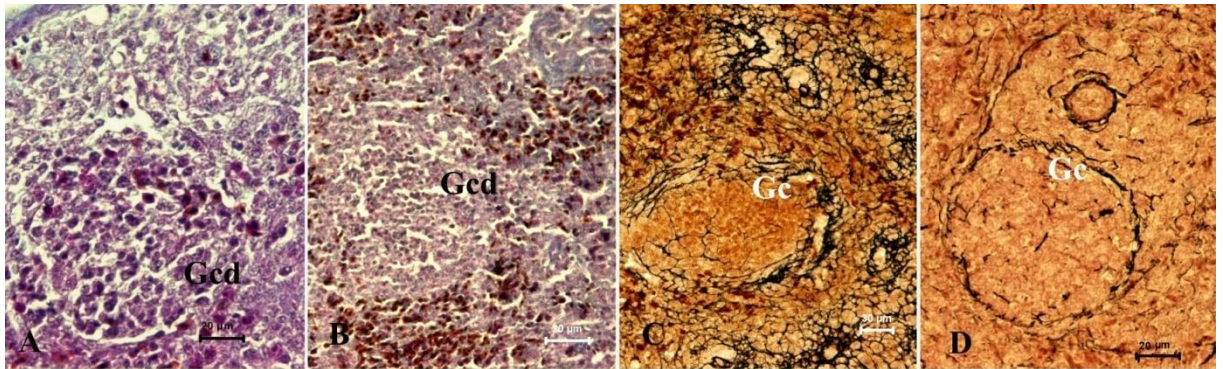
Şekil 17. Elipsoid çevresinde Schweigger-Seidel kapsülünün görünümü. A. Schweigger-Seidel kapsülünü oluşturan retikulum iplikleri (ok başları). Gordon ve Sweet'in gümüşleme Metodu. B: Schweigger-Seidel kılıfın görünümü (ok başı) Üçlü Boyama Yöntemi.

Başlangıçta elipsoid çevresindeki hücrelerin sitoplazmalarının açık renkte ve sınırlarının çok net olmadığı gözlemlendi. Daha sonraki günlerde, özellikle yedinci günden itibaren bu kısımlarda lenfoid doku (PEL) daha belirgin olarak ayırt edildi (Şekil 18).



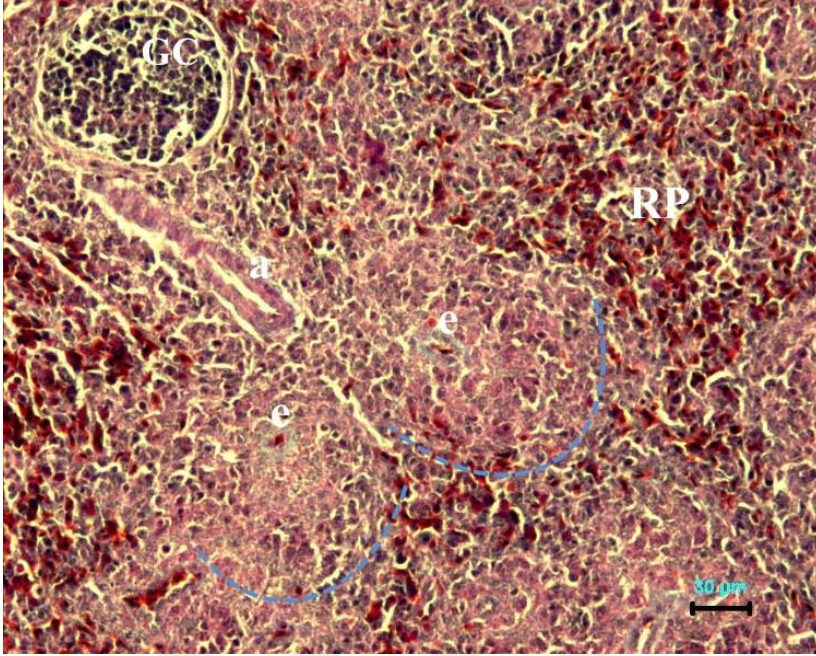
Şekil 18. Elipsoid çevresi lenfoid dokuyu oluşturan hücrelerin görünümü. A-E: Sırasıyla 1, 4, 7, 10 ve 14 günlük örneklerde elipsoid çevresi lenfoid dokunun görünümü (sınırlandırılmış alan). Pc: Penisilar kapillar Çizgi: elipsoid çevresi lenfoid doku bölgesi. Üçlü Boyama.

GC taslakları birinci günden itibaren görülebilmeye rağmen, retikulum ipliklerinin dört günlükten sonraki örneklerde germinal merkez sınırını oluşturmaya başladığı gözlemlendi. Yedi günden itibaren retikulum ipliklerinin net olarak ayırt edildiği görüldü. Devamında on ve on dört günlük civcivlerin dalağında GC'ların retikulum ipliklerinden oluşan belirgin bir kapsülle çevrelendiği (Şekil 19) dikkati çekti.

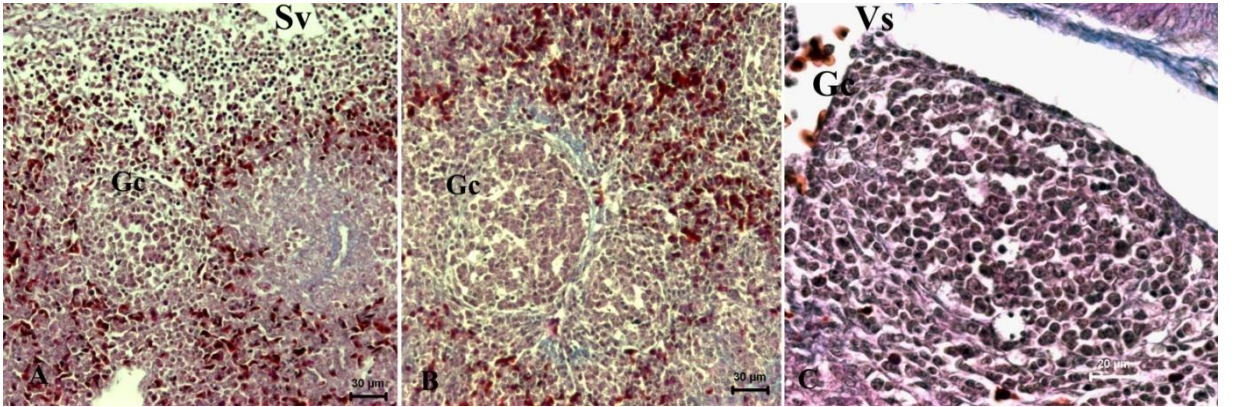


Şekil 19. Germinal merkezin görünümü. A-B: Sırasıyla bir ve dört günlük örneklerde germinal merkez taslağının (Gcd) görünümü. Üçlü Boyama Yöntemi. C-D: Sırasıyla yedi ve 14 günlük örneklerde germinal merkez (Gc) çevresinde retikulum ipliklerinin görünümü. Gordon ve Sweet'in gümüşleme Metodu.

GC parenşim dokusunda farklı yerlerde; arteriyol yakınında (Şekil 20), kapsüle yakın, parenşimin herhangi bir yerinde veya PVL içinde rastlandı (Şekil 21). GC'ın on dört günlük örneklerde en net haliyle görülebmesinden dolayı beyaz pulpayı oluşturan kısımların gelişimlerini tamamlamış olduklarına karar verildi.



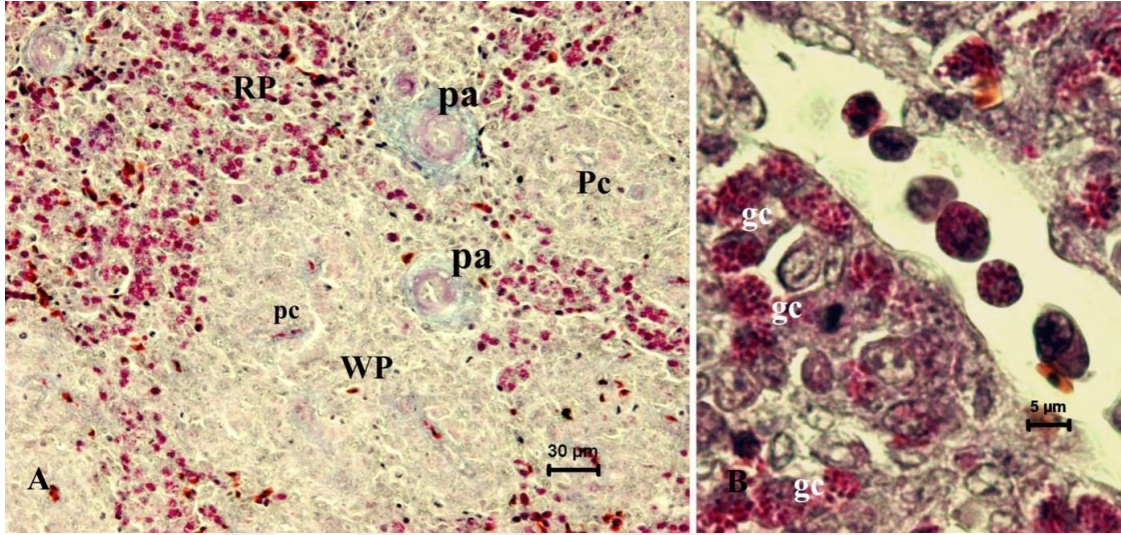
Şekil 20. On dört günlük örneğe ait dalak kesitinde arteriyol yakınında germinal merkezin görünümü. a: arteriyol, Gc: germinal merkez, e: elipsoid kapillar, kesik çizgilerle sınırlanmış bölge: Elipsoid çevresi lenfoid doku sınırı. RP: kırmızı pulpa. Üçlü Boyama.



Şekil 21. On dört günlük kontrol grubuna ait dalak dokusunda A. Kapsüle yakın, B. Parenşim içerisinde, C. Venöz sinüs çevresi lenfoid dokuda germinal merkezin (Gc) görünümü. Sv: Subkapsüler venöz sinüs, Vs: venöz sinüs. Üçlü Boyama.

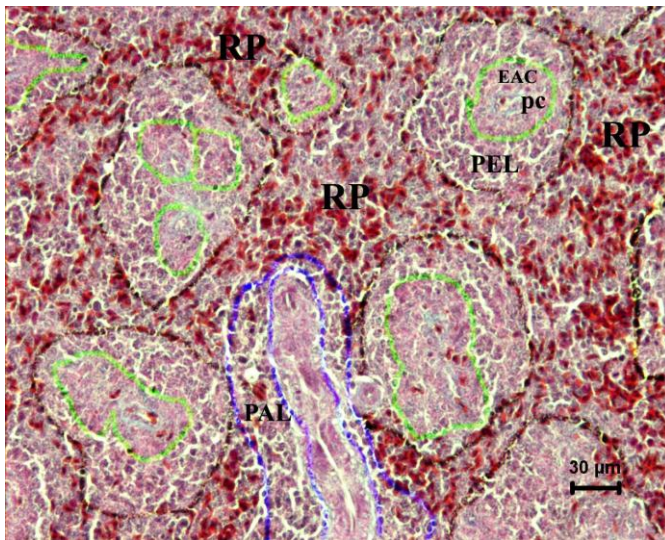
4.1.2.2. Kırmızı Pulpa

Beyaz pulpa ve trabeküller dışında kalan, venöz sinuslar ile kırmızı pulpa alanları, kırmızı pulpa olarak değerlendirildi. Venöz sinuslara kapsül altında, trabeküler arterlerin çevresinde ve parenşimde rastlandı (Şekil 12). Kırmızı pulpa alanlarında, birinci günde en yoğun olmak üzere, granülopoezis gözlemlendi (Şekil 22).



Şekil 22. A. Bir günlük civcivlerin dalağında granülopoezisin görünümü. RP: kırmızı pulpa, WP: beyaz pulpa, pa: penisilar arteriyol, Pc: penisilar kapillar. B. Granülosit görünümü. gc: granüllü hücreler.

Granülopoetik hücrelerin dört, yedi, on ve on dört günlük civcivlerde yavaş yavaş ortadan kalkarak yerine eritrositlere bıraktığı görüldü (Şekil 9B, Şekil 23).



Şekil 23. On dört günlük civcivlerde dalak parenşiminin görünümü. RP: Kırmızı pulpa, pc: penisilar kapillar, EAC: elipsoid ilişkili hücreler, PEL: perielipsoidal lenfoid doku, PAL: Periarteriyoler lenfoid doku. Üçlü Boyama.

Granülopoezisin yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildi. Saat farkı gözetmeden aynı grup içerisinde günler arası farklılıklara bakıldığında granülopoezisin yoğunluğunun her üç alt grubunda bir günde en fazla olduğu görüldü ($P < 0.001$) (Tablo 1). Granülopoezisin yoğunluğu dört ve yedinci günlerde büyük bir azalma belirlendi. On günlük örneklerde tektük rastlanan granülopoetik hücreler ondördüncü günde gözlenmedi (Şekil 23).

Tablo 3: Bir, dört ve yedi günlük civcivlerin dalağında granülopoezis yoğunluğu.

Xmm ² ± SE/ 1mm ²	1 gün	4 gün	7 gün	P
Kontrol	0,279 ^a ±0,015	0,042 ^{b,A} ±0,003	0,007 ^c ±0,001	***
PBS	0,268 ^a ±0,017	0,021 ^{b,B} ±0,001	0,013 ^b ±0,002	***
LPS	0,244 ^a ±0,013	0,054 ^{b,A} ±0,007	0,013 ^c ±0,002	***
P	ÖD	***	ÖD	

a,b,c: Aynı satırda farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir ($P < 0,05$)

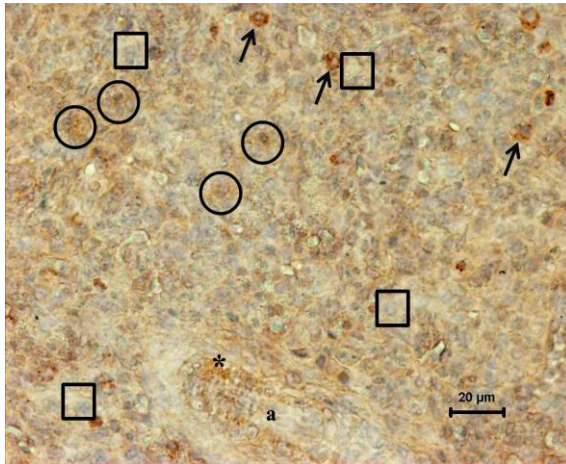
A,B: Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir ($P < 0,05$)

ÖD: $P > 0.05$, ***: $P < 0.001$

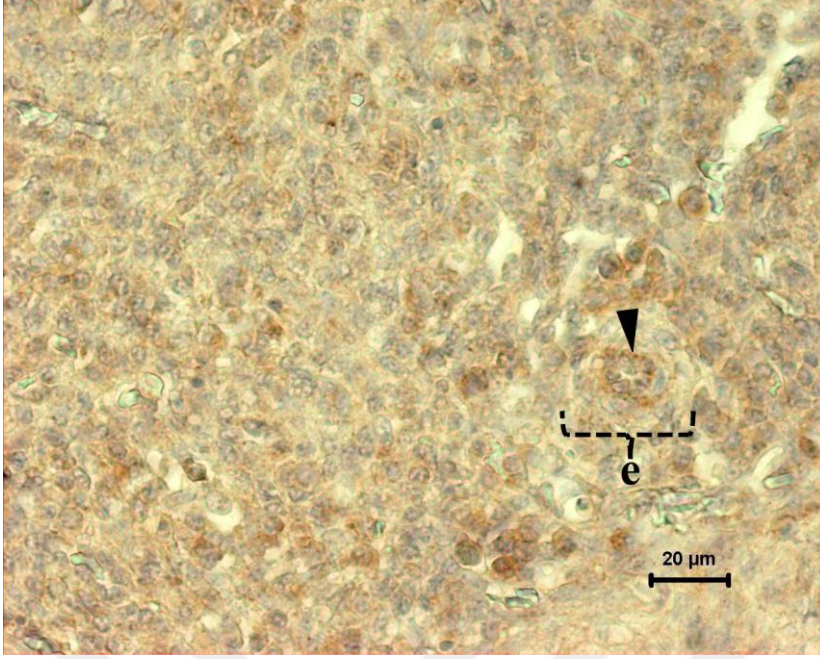
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1. TLR4

Dalakta TLR4 pozitifitesi kesitlerde difuz granüler düzeyde ve yoğun hücre pozitifitesi şeklinde olmak üzere iki farklı formda tespit edildi. Ayrıca arter duvarındaki düz kas hücrelerinde (Şekil 24) ve bazı elipsoid kapılların endotelinde de (Şekil 25) pozitivite görüldü. Bir günlük örneklerden itibaren bütün gruplarda damarların etrafında ve pulpada pozitivite tespit edildi.

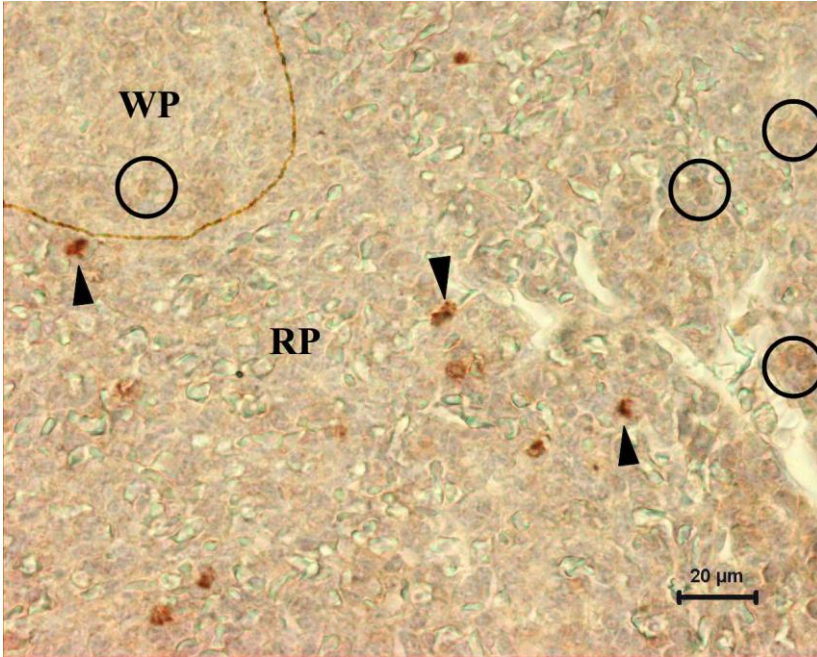


Şekil 24. On günlük civcivlerde dalakta TLR4 pozitifitesinin görünümü. Daire: Difuz granüler TLR4 pozitifitesi, oklar: yoğun hücre TLR4 pozitifitesi, kare: negatif TLR4 pozitifitesi olmayan hücreler, a: arter, *: arter duvarı düz kas hücrelerinde TLR4 pozitifitesi. Strept ABC metodu.



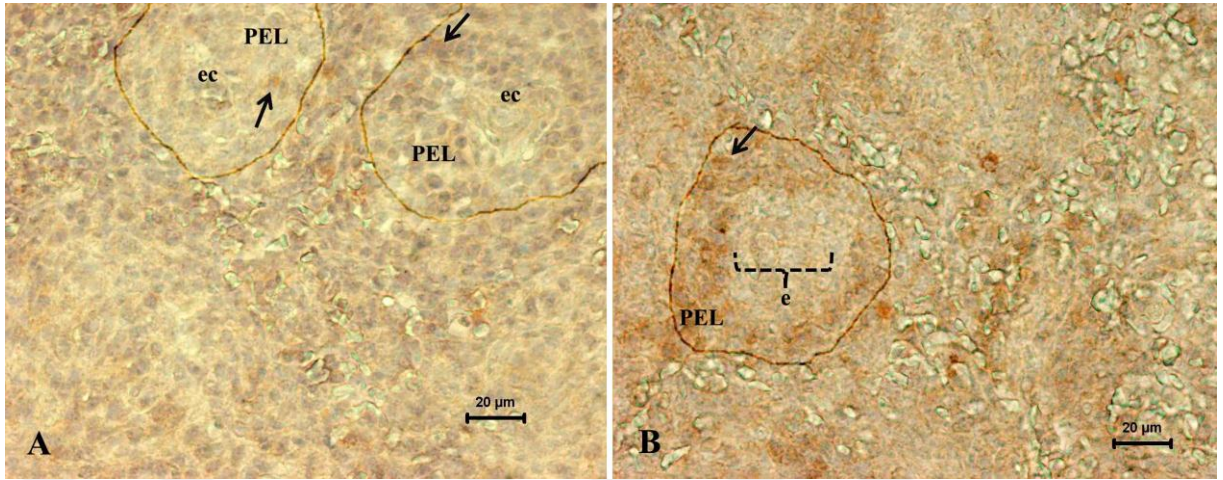
Şekil 25. On günlük civcivlerde dalakta TLR4 pozitivitesi. Ok başı: elipsoid kapillar endotelinde TLR4 pozitivitesi, e: elipsoid. Strept ABC metodu.

Yoğun TLR4 pozitivitesi gösteren hücrelerin genellikle kırmızı pulpa alanlarında bulunduğu dikkati çekti (Şekil 26). Difuz granuler pozitivite gösteren hücreler hem kırmızı pulpa alanlarında hem de farklı beyaz pulpa bölgelerinde ayırt edildi (Şekil 26).



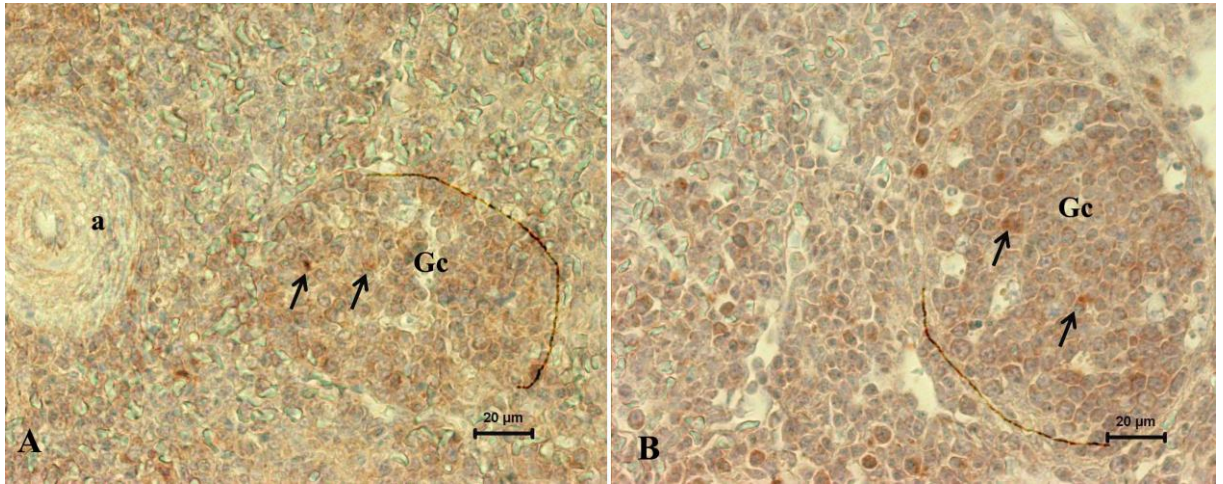
Şekil 26. On günlük civcivlerde dalakta TLR4 pozitivitesinin görünümü. Ok başı: yoğun TLR4 pozitivitesine sahip hücreler, WP: beyaz pulpa, RP: kırmızı pulpa, daire: Difuz granuler TLR4 pozitivitesi. Strept ABC metodu.

Beyaz pulpada dört günlük örneklerden itibaren PEL’de daha belirgin pozitivite gösteren hücreler gözlemlendi (Şekil 27).



Şekil 27. PEL’de TLR4 pozitif hücrelerin görünümü. A. Dört günlük civcivlerde PEL’de TLR4 pozitivitesi. PEL: peri elipsoidal lenfoid doku, ec: elipsoid kapilları, ok: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler. B. On günlük civcivlerde PEL’de TLR4 pozitivitesi. e: elipsoid, PEL: peri elipsoidal lenfoid doku, ok: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler. Strept ABC metodu.

Yedi günlükten itibaren de GC’da belirgin pozitivite gösteren hücreler ayırt edildi (Şekil 28).



Şekil 28. GC’da TLR4 pozitif hücrelerin görünümü. A. On günlük civcivlerde TLR4 pozitivitesi. Gc: germinal merkez, oklar: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler, a. arter. B. On dört günlük civcivlerde TLR4 pozitivitesi. Gc: germinal merkez, oklar: belirgin TLR4 pozitivitesine sahip hücreler. Strept ABC metodu.

Pulpada tespit edilen difüz granüler TLR4 pozitifitesi yoğunluğu birim alanda subjektif olarak puanlandırıldı (0-yok, 1-az, 2-orta, 3-çok) ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4). Saat farkı gözetmeden günler arası farklar incelendiğinde kontrol grubu serisinde farklılık olmadığı fakat PBS ve LPS grubunda günler arası değerlerde dalgalanmalar olduğu dikkati çekti (Tablo 4). Alt gruplar arasında da örnek alınan günlerde dalgalanmalar olduğu saptandı (Tablo 5).

Tablo 4: Kesitlerde gözlenen difüz granüler TLR4 pozitifitesinin yoğunluğu.

X±SE/0,036mm ²	1 gün	4 gün	7 gün	10 gün	14 gün	P
Kontrol	2,2 ^A ±0,088	1,9 ^B ±0,108	2,1±0,092	2,1 ^B ±0,118	2,1±0,079	ÖD
PBS	2 ^{b,A,B} ±0,131	2,3 ^{b,A} ±0,122	2,1 ^b ±0,115	2,6 ^{a,A} ±0,083	2 ^b ±0,126	**
LPS	1,8 ^{c,B} ±0,070	2,5 ^{a,A} ±0,082	1,9 ^c ±0,067	2,2 ^{b,B} ±0,063	1,8 ^c ±0,111	***
P	*	**	ÖD	**	ÖD	

0:yok, 1:az, 2:orta, 3:çok

a,b,c: Aynı satırda farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0,05)

A,B: Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0,05)

ÖD: P>0.05, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

Genellikle kırmızı pulpada bulunan ve yoğun pozitifite gösteren hücrelerin sayımı sonucunda elde edilen veriler saat farkı gözetmeden istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubunda yedinci günden itibaren sayılarının azaldığı (P<0,05) (Tablo 5), PBS ve LPS gruplarında ise on dört günlük örneklerde sayının arttığı (P<0,01) (Tablo 5) dikkati çekti. İncelenen günlerde uygulama grupları arasında farklılıklar incelendiğinde bir ve 14 günlük civcivlerde istatistiksel düzeyde farklılık tespit edildi (sırasıyla P<0.05 ve P<0.01). Ondördüncü günde uygulama gruplarında sayının artmış olması dalağın gelişimi açısından anlamlı bulundu.

Tablo 5: Birim alanda gözlenen, yoğun TLR4 pozitifitesi gösteren hücrelerin sayıları.

X±SE/0,036mm ²	1 gün	4 gün	7 gün	10 gün	14 gün	P
Kontrol	7,7 ^{a,A} ± 1,054	7 ^a ± 0,594	5,3 ^b ± 0,365	5,1 ^b ± 0,451	4,9 ^{b,B} ± 0,512	*
PBS	4,8 ^{c,B} ± 0,897	6,8 ^{a,b} ± 0,455	5,2 ^{b,c} ± 0,397	6,2 ^{b,c} ± 0,429	8,4 ^{a,A} ± 0,854	**
LPS	6,9 ^{a,A} ± 0,706	6,5 ^{a,b} ± 0,381	5,2 ^b ± 0,349	5,1 ^b ± 0,384	8,1 ^{a,A} ± 0,864	*
P	*	ÖD	ÖD	ÖD	**	

0:yok, 1:az, 2:orta, 3:çok

a,b,c: Aynı satırda farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0,05)

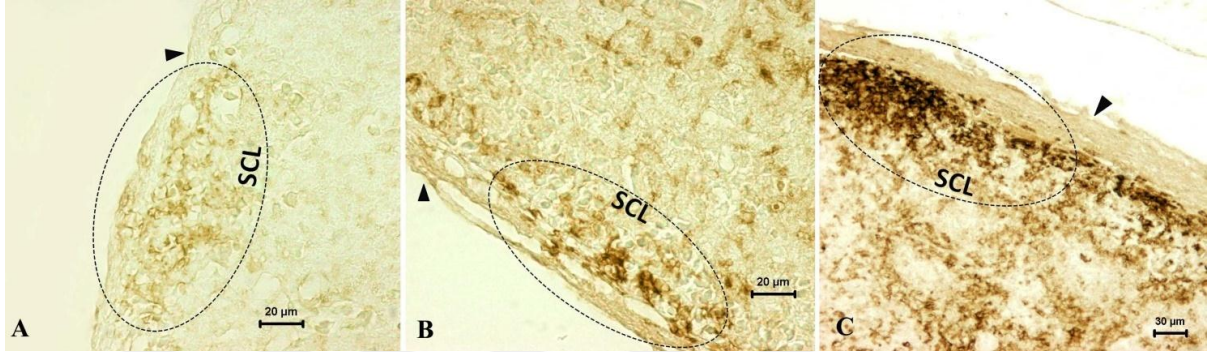
A,B: Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0,05)

ÖD: P>0.05, *: P<0.05, **: P<0.01

4.2.2. MHC II

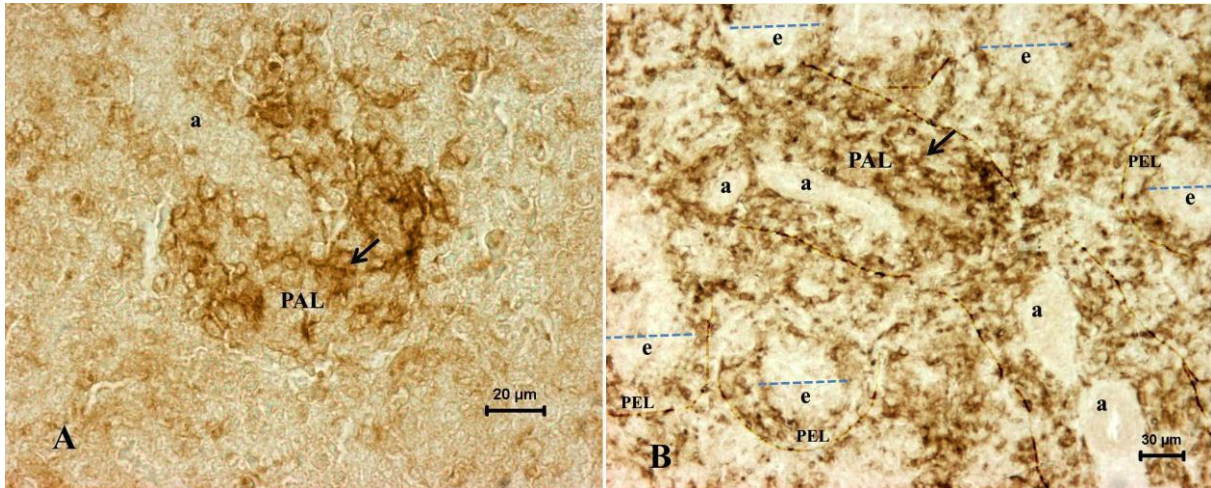
Dalakta bütün beyaz pulpa bölümlerinde ve kırmızı pulpada farklı yoğunluklarda MHC II pozitif hücreler tespit edildi.

Kapsül altında, bazen ince bir hat halinde ve bazen SCL halinde MHC II pozitivitesi gözlemlendi (Şekil 29).



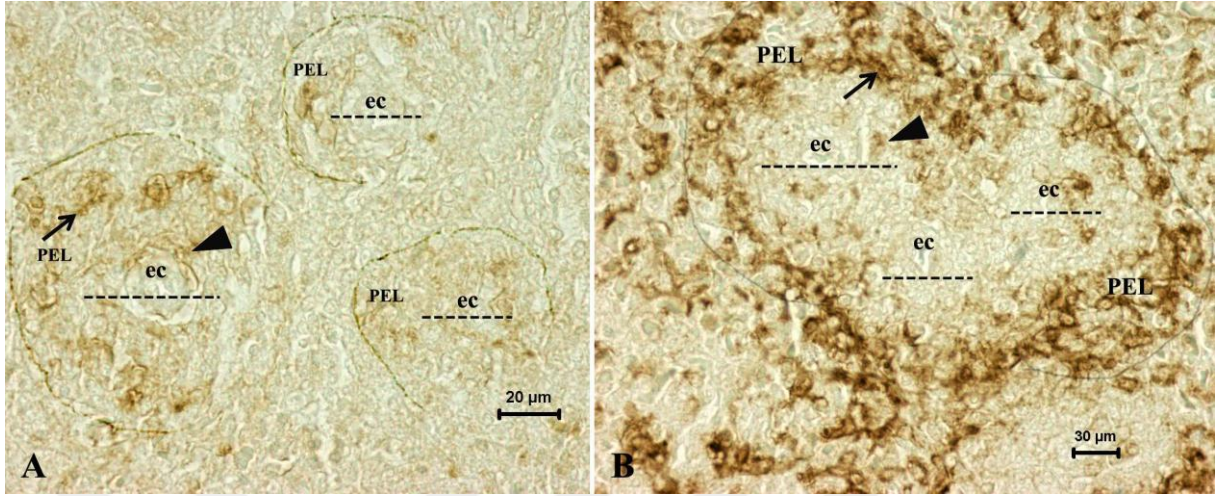
Şekil 29. Kapsül altı lenfoid dokuda, MHC II pozitif hücreler. SCL: kapsül altı lenfoid doku, ok başı: kapsül. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitivitesinin görünümü. B. Dört günlük örnekte MHC II pozitivitesinin görünümü. C. On dört günlük örnekte MHC II pozitivitesinin görünümü.

Arteriyol çevresi lenfoid doku (PAL)'da bir günlükten itibaren MHC II pozitif hücrelerin yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti (Şekil 30).



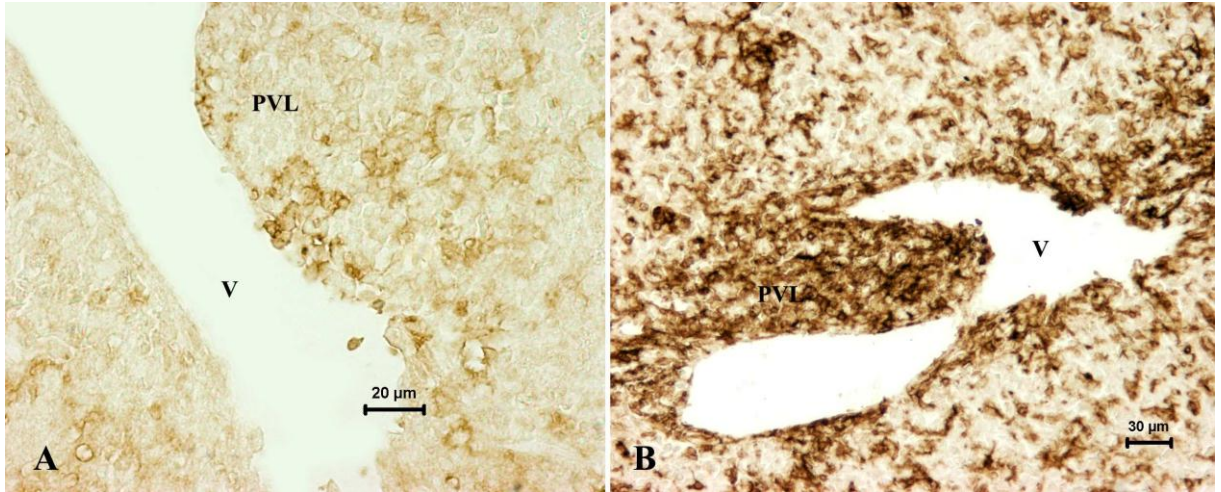
Şekil 30. PAL'da MHC II pozitivitesinin görünümü. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitif hücreler. PAL: peri elipsoidal lenfoid doku, ok: MHC II pozitif hücre, a: arter. B. On dört günlük örnekte MHC II pozitif hücreler. PAL: peri elipsoidal lenfoid doku, e: elipsoid, a: arter, PEL: peri elipsoidal lenfoid doku.

PEL'de ve bazı EACs'de bir günden itibaren MHC II pozitif hücrelerin bulunduğu görüldü (Şekil 31).



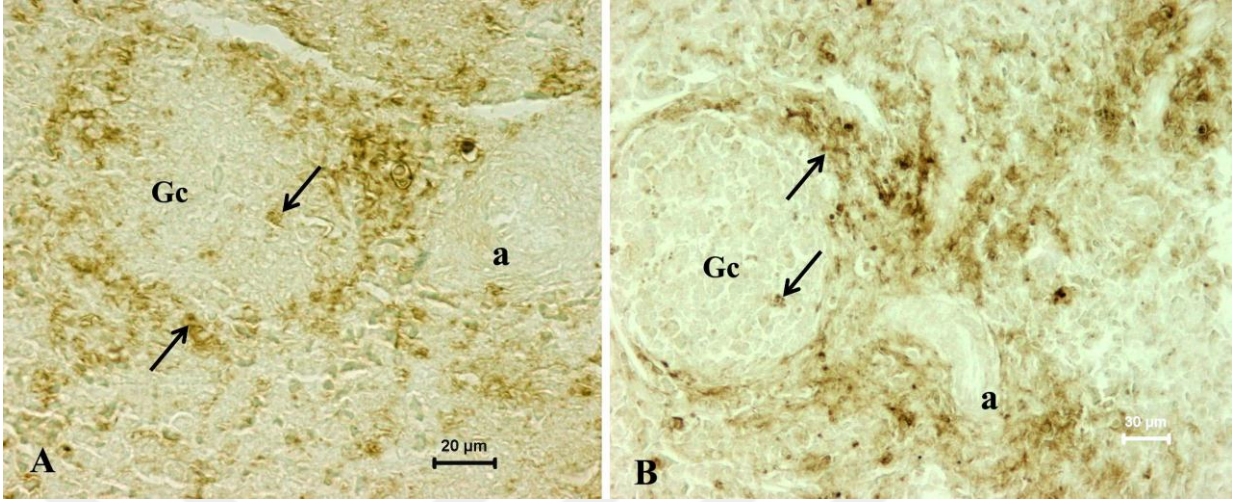
Şekil 31. PEL'de MHC II pozitifitesinin görünümü. PEL: peri elipsoidal lenfoid doku, oklar: PEL'de MHC II pozitif hücreler, ok başları: elipsoid ilişkili hücrede MHC II pozitifitesi, kesik çizgiler: elipsoid, ec: elipsoid kapıllar. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitifitesi. B. On dört günlük örnekte MHC II pozitifitesi.

MHC II pozitif hücrelerin PVL'da bir günden itibaren sayıca arttığı tespit edildi (Şekil 32).



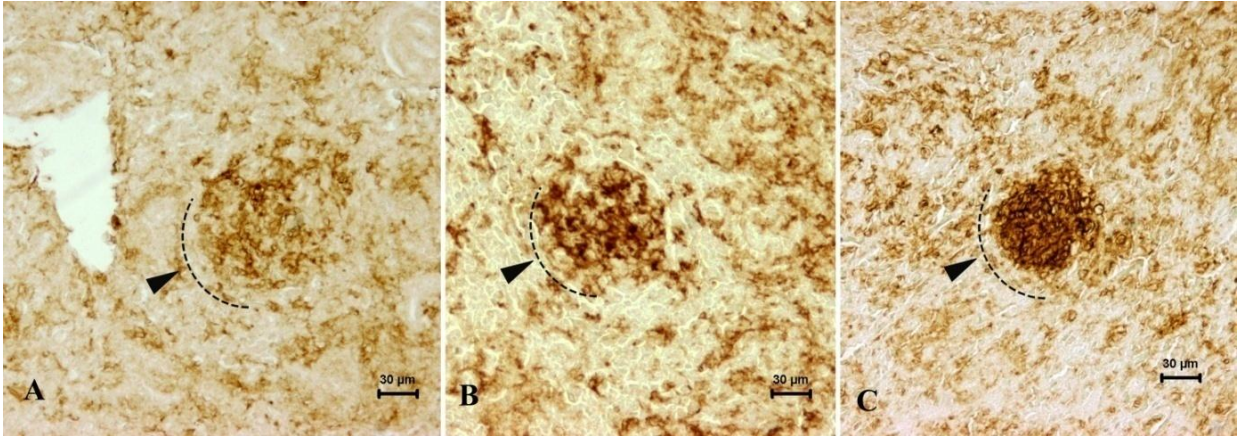
Şekil 32. PVL'da MHC II pozitifitesinin görünümü. PVL: peri venöz lenfoid doku, ok: MHC II pozitif hücre, v: vena. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte PVL'de MHC II pozitif hücreler. B. On dört günlük örnekte PVL'de MHC II pozitif hücreler.

Germinal merkezde az sayıda MHC II pozitif hücre görüldü. Ayrıca GC'in MHC II pozitif hücrelerle çevrelendiği dikkati çekti (Şekil 33).



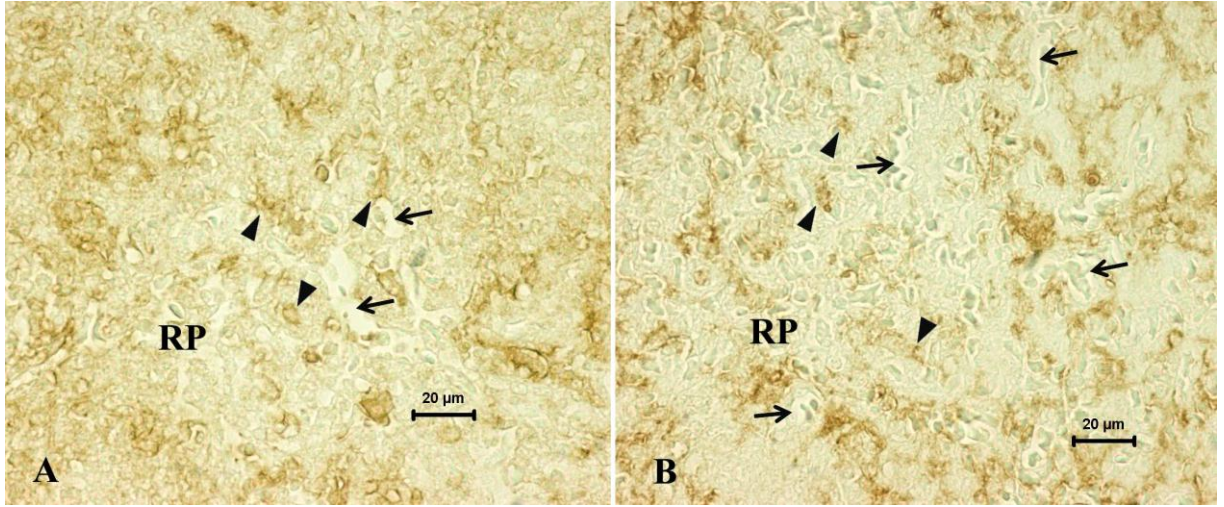
Şekil 33. GC'de MHC II pozitifitesinin görünümü (kahverengi çökelti). Gc: germinal merkez, oklar: Gc içinde ve çevresinde MHC II pozitif hücreler, a: arter. Strept ABC metodu. A. On günlük örnekte GC'de MHC II pozitif hücreler. B. On dört günlük örnekte GC'de MHC II pozitif hücreler.

Farklı bölgelerde, bir günlükten itibaren MHC II pozitif hücre kümelerine de rastlandı (Şekil 34).



Şekil 34. Strept ABC metodu. A. Dört günlük örnekte, B. 10 günlük örnekte ve C. 14 günlük örnekte gözlenen MHC II pozitif hücre kümeleri (oklar).

Dalakta kırmızı pulpa alanlarında da MHC II pozitif hücreler tespit edildi (Şekil 35).



Şekil 35. Kırmızı pulpa alanlarında MHC II pozitivitesinin görünümü (kahverengi çökelti). RP: kırmızı pulpa, ok başları: MHC II pozitif hücreler, oklar: venöz sinüsler. Strept ABC metodu. A. Bir günlük örnekte MHC II pozitif hücreler. B. On dört günlük örnekte MHC II pozitif hücreler.

Tablo 6: Kesitlerde gözlenen MHC II pozitivitesinin yoğunluğu.

$\bar{X} \pm SE/0,145mm$ ²	1 gün	4 gün	7 gün	10 gün	14 gün	P
Kontrol	1,5 ^{b,B} ±0,059	2,4 ^{a,A} ±0,063	2,2 ^a ±0,074	2,2 ^a ±0,074	2,2 ^{a,B} ±0,081	***
PBS	2 ^{c,A} ±0,063	2,1 ^{b,c,B} ±0,078	2,3 ^a ±0,077	2,1 ^{b,c} ±0,074	2,2 ^{a,b,B} ±0,086	*
LPS	2,1 ^{c,A} ±0,061	2,5 ^{b,A} ±0,066	2,4 ^b ±0,076	2,3 ^b ±0,086	2,8 ^{a,A} ±0,093	***
P	***	***	ÖD	ÖD	***	

0:yok, 1:az, 2:orta, 3:çok

a,b,c: Aynı satırda farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0,05)

A,B: Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir (P<0,05)

ÖD: P> 0.05, *: P< 0.05, ***: P< 0.001

Grup içi değerler incelendiğinde kontrol grubunda bir günlük örneklerde diğer günlere göre MHC II pozitivitesinin az olduğu (P< 0.001)(Tablo 6) tespit edildi. Dört günlükten itibaren diğer günler arasında farklılık gözlenmedi. PBS grubunda günler arasında dalgalanma olmakla birlikte yedi ve on dört günlük örneklerde MHC II pozitivitesinin bir miktar fazla olduğu (P< 0.05)(Tablo 6) gözlemlendi. LPS grubunda ise bir günlükten sonra artmış olduğu (P< 0.001)(Tablo 6) dikkati çekti.

Kontrol ve LPS gruplarının değerleri karşılaştırıldığında bir ve ondördüncü günde LPS grubu verilerinin daha fazla olduğu (P< 0.001)(Tablo 6) görüldü.

5. TARTIŞMA

Kanatlı dalağının ince bir kapsülle sarılmış olduğu, peritoneal mezotelle kaplandığı, çoğunlukla kollagen iplikler olmak üzere retiküler iplikler ve düz kas telleri ile eser miktarda elastik iplik içerdiği bildirilmiştir (Hodges, 1974; Akter ve ark, 2006; Olah ve Vervelde, 2008; Liman ve Bayram, 2011; Kannan ve ark, 2015). Memeli dalağında trabeküller bulunmasına rağmen (Tanyolaç, 1999), kanatlılarda gerçek trabekülün olmadığı, bunun yerine kapsülden dalak dokusuna giren az miktarda bağ doku ve içerisinde kan damarları bulunduğu ifade edilmiştir (Hodges, 1974; Venkatesan ve Vijayaragavan, 1997; Akter ve ark, 2006; Zhang ve ark, 2015; Kannan ve ark, 2015). Bingöl ve ark (2014) kaz dalağının histolojik yapısının birçok yönden diğer kanatlılarla benzerlik göstermesine karşın, trabeküllerinin daha belirgin olması nedeniyle, memeli dalağına daha benzer yapıda olduğunu bildirilmişlerdir.

Sunulan çalışmada kapsül içeriği ile ilgili elde edilen bulgular araştırmacıların (Hodges, 1974; Akter ve ark, 2006; Olah ve Vervelde, 2008; Liman ve Bayram, 2011; Kannan ve ark, 2015) bildirdikleriyle uyumludur. Bunun yanında; yapılan çalışmada dalak kapsülünün kalınlığının bir günden giderek arttığı, parenşime yakın kısımda daha yoğun olmak üzere düz kas hücrelerinin bulunduğu ve ilerleyen günlerde bu hücrelerin sayılarının arttığı gözlenmiştir. Kollagen ipliklerin yanında elastik ipliklerin yoğunluğunun da giderek arttığı fakat retikulum ipliklerinin oranının değişmediği dikkati çekmiştir.

Dalağına gelen kanın, dalağına giriş yapan A. gastrika ve A. hepatica'ya ait küçük dallar ile A. Linealis kranialis ve kaudalis tarafından sağlandığı bildirilmiştir (Julian ve ark, 1993; Olah ve Vervelde, 2008). Dalak arterinin kollarının, az miktarda bağdoku ile pulpaya girdiği ve sentral arter adını aldığı, daha sonra da duvarında tek tabaka düz kas içeren sentral arteriyollerini oluşturduğu, devamında elipsoid kapillarlara ayrıldıkları kaydedilmiştir (Olah ve Vervelde, 2008).

Sunulan araştırmada da kapsülde arter, vena ve çok sayıda lenf kapilları görüntülendi. Organ kapsülünden parenşime doğru düzenli bir trabekül girişine rastlanmadı. Bunun yanında özellikle arterlerin etrafında daha belirgin olmak üzere bağ

doku bölmeleri gözlemlendi. Araştırmacıların (Julian ve ark, 1993; Olah ve Vervelde, 2008) bildirdiği şekilde sentral arter, sentral arteriyol ve elipsoid kapillarlar ayırt edildi.

Araştırmada, trabeküllerde ve parenşimde bulunan arter/arteriyol duvarları incelendi. Orta çaplı arterlerin duvarında elastik ipliklerinin oluşturduğu laminalar yanında, retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti. Bir günlük örneklerden itibaren sentral arteriyollerin duvarında bir miktar düz kas hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi. Elipsoid kapillar duvarında düz kas hücrelerinin olmamasıyla küçük çaplı arteriyollerden ayrılabilirdi, fakat endotel çevresinde çok az miktarda bağ doku elemanının varlığı dikkati çekti. Arteriyollerin yapısında elastik iplik miktarının azaldığı fakat retikulum ipliği miktarında değişiklik olmadığı gözlemlendi. Elipsoid kapillarların etrafında elastik iplik bulunmazken retikulum ipliklerinin varlığını sürdürdüğü dikkati çekti. Akter ve ark (2006) broyler civcivlerde sentral arter ve elipsoid kapillar duvarında retikulum ipliklerinin varlığını bildirmişler fakat sentral arteriyol tanımlaması yapmamışlardır. Liman ve Bayram (2011) da bildirdiği benzer şekilde sentral arter, sentral arteriyol ve elipsoid kapillar duvarında retikulum ipliklerinin varlığını bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (Fukuta ve ark, 1976; Venkatesan ve Vijayaragavan, 1997) tavuk dalağında, terminal arterial kapillarlar ile venöz sinüsler arasında anastomozlaşmanın olmadığını (açık dolaşım) ileri sürmüşlerdir. Bunun yanında kapalı dolaşım olduğunu bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (Miyamoto ve ark, 1980; Gumati ve ark, 2003; Nagy ve ark, 2005). Miyamoto ve ark (1980) elektron mikroskopi düzeyinde yaptıkları çalışmada kapalı dolaşımın olduğunu bildirmişlerdir. Perfüzyon tekniğinin kullanıldığı, ışık ve elektron mikroskopik düzeyde yapılan bir çalışmada da (Olah ve Glick, 1982) kapillarların sinüsler ile bağlantılı olduklarını, kırmızı pulpaya girdiklerini ve yavaş yavaş genişlediğini göstermiştir

Sunulan çalışmada, kesitlerde venöz sinüsler, pulpa venleri ve vena trabekularis ayırt edildi. Venöz sinüslerin duvarında az miktarda retikulum ipliği bulunmasına rağmen elastik ipliklere rastlanmadı. Venalarda az miktarda elastik iplik, daha fazla miktarda olmak üzere retikulum ipliklerinin olduğu dikkati çekmiştir. Venaların duvarında bulunan bağdokusu iplikleri ile ilgili herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

Dalak parenşimi beyaz pulpa ve kırmızı pulpadan oluşmaktadır (Hodges, 1974). Ogata ve ark (1977) tavuk dalağında beyaz pulpanın; PAL, PVL, PEL ve GC olmak üzere

dört farklı kısımdan oluştuğunu bildirmişlerdir. Belirtilen beyaz pulpa kısımlarına ilaveten sunulan araştırmada SCL tanımlanmış ve farklı günlerde alınan doku örneklerinde pulpanın gelişimi bu bölgeler göz önüne alınarak incelenmiştir.

Araştırmacıların bir kısmı (Nagy ve ark, 2005; Hoffmann ve ark, 1977; Ewijk ve Nieuwenhuis 1985; Claassen ve ark, 1986; Jeurissen ve ark, 1992; Gumati ve ark, 2003) sentral arter çevresinde bulunan hücre birikimini 'PAL' olarak tanımlarken, Liman ve Bayram (2011) sentral arteriyol çevresinde bulunan lenfoid hücre birikimini de "PAL" olarak adlandırmışlardır. Araştırmacılar (Ogata ve ark, 1977) PAL'ı iki günlüklerde bir adet civcivde (white Leghorn Babcock B 300), dört günlükten itibaren bütün civcivlerde gözlemişlerdir.

Sunulan çalışmada ise PAL, PVL ve SCL bir gün üç saatlik örneklerden itibaren kesitlerde görülmeye başlanmıştır. Araştırmacılar (Ogata ve ark, 1977) kuluçkadan çıktığı gün bir civcivde lenfosit birikimi olarak PVL gördüklerini, iki günden sonra bütün civcivlerde PVL'nin bulunduğu dikkat çekmişlerdir. Tespit edilen farklılıkların, kullanılan materyalin farklı ırk olmasından kaynaklanmış olabileceği ileri sürülebilir. Yapılan literatür taramasında dalakta SCL tanımlanmasına rastlanmadı. Bunun yanında gözlenen SCL odakların, lenf düğümlerinde varlığı bilinen sub-kapsuler sinüs makrofaj odakları (Kuka ve Iannacone, 2014) benzeri bir yapı olduğu düşünüldü.

Sunulan çalışmada elipsoid; bağ doku elemanları (kollagen ve retikulum iplikler) ile çevrelenmiş elipsoid kapillarlar ve çevrelerindeki EACs'lerle birlikte ayırt edildi. Elipsoidin çevresinde de bağdoku elemanlarından oluşan kapsül (CSS) gözlemlendi. Ayrıca elipsoid ilişkili hücrelerin dış kısmında yer alan ve kapillar endotele doğru ince kollar gönderen CSS'nin oluşumuna retikulum ipliklerinin yoğun katkı verdiği ayırt edildi. Elde edilen bulgular araştırmacıların bulguları ile uyumludur (Olah ve Glick 1982; Olah ve ark, 1994; Gumati ve ark, 2003; Nagy ve ark, 2005). Gumati ve ark (2003) beçtavuğunda yaptıkları çalışmada ise penisilar endotel çevresinde ve PEL'de kollagen tip III'ün (retikulum ipliğinin) bulunmadığını fakat PAL'da görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu farklı sonuç kullanılan materyalin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Elipsoidin temel histolojik yapısı ve işlevinin, memeliler ve kanatlılarda özdeş olduğu kaydedilmiş, fakat iki türde de farklı kısımlarda lokalize olduğu ifade edilmiştir.

Memelilerde, kırmızı pulpa alanlarındaki Billroth kordonlarında bulunurken, kanatlılarda ise, bunların PEL içine gömülü olduğu kaydedilmiştir (Gumati ve ark, 2003).

Yapılan araştırmada, elipsoid çevresinde PEL'i oluşturan hücrelerin araştırmacıların bildirdiği gibi (Mori ve Hoshi, 1971; Liman ve Bayram, 2011) başlangıçta sitoplazmalarının açık renkte ve sınırlarının çok net olmadığı gözlemlendi. Ogata ve ark (1977) PEL'in lenfosit birikimleri halinde ilk kez 6. günde görüldüğünü, ikinci haftadan sonra PEL'de bulunan lenfositlerde artış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mori ve Hoshi (1971) ise iki-üç günlük civcivlerde başlangıçta elipsoid çevresinde orta büyüklükte lenfositler görüldüğünü, iki haftanın sonunda perielipoidal lenfoid dokunun tanımlanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Mishra ve ark (2010) da gelişimin onuncu gününde beyaz pulpa ve kırmızı pulpanın düzenlenmesinin daha da belirginleştiğini bildirilmişlerdir. Sunulan çalışmada özellikle yedinci günden itibaren PEL hücreleri daha belirgin olarak ayırt edildi. Bunun yanında PEL'in bulunduğu alanda bir günlükten itibaren MHC II molekülleri ve difuz granüler tarzda TLR4 molekülleri gözlemlendi. Dört günlükten itibaren de biraz daha yoğun TLR4 içeren hücreler görüldü. Bu bulgular bir günlükten itibaren PEL bölgesinde non-spesifik savunma hücrelerinin aktif olduğunu gösterir. Yapılan literatür taramasında bu konuyla ilgili herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır. Adaptive immunité ile ilgili olarak ise Mast ve Goddeers (1999) broyler civcivlerde antikor oluşturabilecek şekildeki immün yeterliliğin kuluçka sonrası dönemde 12. günden itibaren oluştuğunu bildirmişlerdir.

Yasuda ve ark (2003) tavuk dalağında GC'ların sadece antijenik sitimülasyondan sonra görüldüğünü ileri sürmüşlerdir. Oysa sunulan çalışmada, GC taslakları bütün gruplarda birinci günden itibaren görülebilmemesine rağmen, retikulum ipliklerinin dört günlükten sonraki örneklerde germinal merkez sınırını oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir. Yedi günden itibaren retikulum ipliklerinin net olarak ayırt edildiği görülmüştür. Devamında on ve on dört günlük civcivlerin dalağında GC'ların retikulum ipliklerinden oluşan belirgin bir kapsülle çevrelendiği dikkati çekmiştir. GC parenşim dokusunda farklı yerlerde; arteriyol yakınında, kapsüle yakın, parenşimin herhangi bir yerinde veya PVL içinde rastlanmıştır. Ogata ve ark (1977) da PVL de GC'a rastladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada, yedi günlük örneklerde GC'de belirgin yoğunlukta TLR4 pozitivitesi gösteren hücreler gözlemlenmiştir. Bunun anlamı buradaki non-spesifik savunma hücrelerinin aktif olduklarıdır. Bunun yanında, GC'ın on dört günlük örneklerde en net haliyle

görülebilmemesinden dolayı, beyaz pulpayı oluşturan kısımların gelişimlerini 14 günde tamamlamış olduklarına karar verilmiştir.

Sunulan çalışmada inkübasyonun birinci gününden itibaren granülopoezisin var olduğu, bununla beraber daha sonra azaldığı, yedinci günde ise oldukça az olduğu dikkati çekti. Liman ve Bayram (2011) ise bildircinlarda kuluçka sonrası granülosit adacıklarının kaybolduğunu bildirmişlerdir. Olah ve Vervelde (2008)'de kuşlarda kuluçkadan çıktıktan hemen sonraki 24 saat içerisinde lenfosit ve monosit gelişimini takiben dalakta heterofillerin uzaklaştığını, kuluçka sonrası 48 saat içerisinde lenfositlerin organın dominant hücreleri haline geldiğini belirtmişlerdir.

He ve ark (2006) tavuk monositlerindeki TLR ekspresyon görünümünü incelemek için RT-PCR analizini kullanmışlardır ve tavuklarda TLR2, 3, 4, 6 ve 7 eksprese edildiğini kaydetmişlerdir. Ancak TLR5'i TR-PCR ile tespit edememişlerdir. TLR4, LPS molekülü tanır (Brownlie ve Allan, 2011). LPS Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunur, potent yangısal mediatördür ve tavuklarda deneysel bakteriyel infeksiyon modeli oluşturmak üzere kullanılmıştır (Korver ve Klasing, 1997; Medzhitov and Janeway, 1997; Yang ve ark, 2008). Sunulan çalışmada bir günlük civcivlere, intra abdominal LPS enjeksiyonuyla, immun uyarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiş ve ilk iki hafta içindeki non-spesifik savunma elemanlarından TLR4'ün dokudaki ekspresyonları araştırılmıştır.

Leveque ve ark (2003) tavuk TLR4 proteininin %46 oranında insan TLR4'ü ile identik (%64 similarity) olduğunu ileri sürmüşlerdir. Keestra ve Putten (2008) tavuk TLR4'ünün insan TLR4'ü ile protein seviyesinde %43 homolog olduğunu bildirmişlerdir. Tavuklarda bulunan beş adet TLR'nin (TLR2a, 2b, 4, 5 ve 7) insan ve farelerde bulunanlarla ortolog olduğu da bilinmektedir (Brownlie ve Allan, 2011). Ticari olarak tavuklara özel TLR4 antikoru bulunmadığından, araştırmacıların bulgularına dayanarak (Leveque ve ark, 2003; Keestra ve Putten, 2008; Brownlie ve Allan, 2011) sunulan çalışmada insan için olan monoklonal TLR4 antikoru denenmiştir.

Paul ve ark (2011) tavuklara 100 µg ve 500 µg im olarak LPS enjekte edip sitokin üretimini inceleyerek, TLR sitimilasyonunu gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Yapılan araştırmada periton içine 1mg/kg LPS enjekte edildi ve TLR4 ekspresyonu demonstre edildi. Iqbal ve ark (2005) tarafından yapılan çalışmada tavukta dalak dokusunda TLR4 eksprese edildiği gösterilmiş fakat histolojik lokalizasyonu incelenmemiştir.

Sunulan çalışmada TLR4 pozitifitesi, difuz granüler tarzda ve yoğun düzeyde olmak üzere iki farklı formda gözlemlendi. Yoğun TLR4 pozitifitesi gösteren hücrelerin genellikle kırmızı pulpa alanlarında bulunduğu dikkati çekti. Difuz pozitifite gösteren hücreler hem kırmızı pulpa alanlarında hem de farklı beyaz pulpa bölgelerinde ayırt edildi. Bir günlük örneklerden itibaren bütün gruplarda damarların etrafında ve pulpada TLR4 pozitifitesi tespit edildi. Arter duvarındaki düz kas hücrelerinde, bazı elipsoid kapılların endotelinde pozitifite görüldü. Kanatlılarda endotel TLR ekspresyonu ile ilgili kaynak bilgiye rastlanamamıştır. Faure ve ark (2000) insan dermal endotel hücrelerinde TLR4 ekspresyonu edildiğini göstermişlerdir. Otsui ve ark (2007) insanda arter duvarı düz kas hücrelerinde, Scirocco ve ark (2010) insan barsak duvarı düz kas hücrelerinde, Eren ve ark (2015 yayınlanmamış) ise civciv barsak düz kas hücrelerinde TLR4 ekspresyonunu göstermişlerdir. Düz kas hücrelerinde tespit edilen TLR4 ekspresyonu, TLR4'ün düz kas hücrelerinde kontraksiyonla ilgili fizyolojik rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Araştırmada beyaz pulpada dört günlük örneklerden itibaren PEL'de daha belirgin TLR4 pozitifitesi gösteren hücreler gözlemlendi. Yedi günlükten itibaren de GC'da belirgin pozitifite gösteren hücreler ayırt edildi. Bu bölgelerde TLR pozitifitesi gösteren hücrelerin makrofajlar, dendritik hücreler ve B lenfositler olabileceği düşünüldü. TLR4 ekspresyonu makrofajlar (Alkie ve ark, 2015), dendritik hücreler (Hemmi ve Akira, 2005) ve B lenfositlerde (Paul ve ark, 2012b) daha önce bildirilmiştir.

Pulpada, birim alanda subjektif puanlama sonucu elde edilen, difuz granüler TLR4 yoğunluğu ile ilgili veriler, istatistiksel olarak değerlendirildi. Saat farkı gözetmeden günler arası farklar incelendiğinde, kontrol grubunda farklılık olmadığı fakat PBS ve LPS grubunda günler arası değerlerde dalgalanmalar olduğu dikkati çekti. Gruplar arasında da örnek alınan günlerde dalgalanmalar olduğu saptandı. TLR4 pozitifitesinde gözlenen bu dalgalanmaların nedeninin, dalağın histolojik gelişiminin ve adaptif immun mekanizmanın gelişiminin henüz tamamlanmamış olduğundan kaynaklandığı düşünüldü. Adaptif immun sistem hücrelerinin de TLR4 ekspresyonu ettiği bildirilmiştir (Alkie ve ark, 2015).

Genellikle kırmızı pulpada bulunan ve yoğun pozitifite gösteren hücrelerin sayımı sonucunda elde edilen veriler saat farkı gözetmeden istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubunda yedinci günden itibaren sayılarının azaldığı ($P<0,05$) görülmüştür. Kontrol grubunda yoğun TLR4 pozitif hücre sayısındaki bu azalma granülopoezisin azaldığı zamana denk gelmektedir. PBS ve LPS gruplarında ise

dalgalanmalar olmakla birlikte, ondört günlük örneklerde sayının arttığı (sırasıyla $P<0,01$, $P<0,05$) dikkati çekmiştir. Bu durum PBS grubunda istenmeyen bir kontaminasyonuna işaret edebilir. LPS stimülasyonu ile yoğun TLR4 pozitif hücre sayısındaki artma ise beklenen bir durumdur.

İncelenen günlerde, uygulama grupları arasında farklılıklar incelendiğinde bir günlük civcivlerde istatistiksel düzeyde farklılık tespit edildi ($P<0,05$). PBS grubundan kaynaklanan farklılığın nedeni açıklanamadı. Ondördüncü günde uygulama gruplarında sayının artmış olması ($P<0,01$) dalağın gelişimi açısından anlamlı bulundu. Bu artışa neden olan TLR4 pozitivitesinin makrofaj veya dendritik hücrelerden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Heterofil, kuşlarda en önemli polimorfonükleer hücre olup, memeli nötrofil ile benzer bir fonksiyonel kapasiteye sahiptir. Heterofiller esas olarak TLR4 ekspresyonunda bulunurlar (Kogut ve ark, 2005). Trombositlerin de TLR ekspresyonunda olduğu bildirilmiştir (Paul ve ark, 2012a). Sunulan çalışmada yoğun pozitivite gösteren ve kontrol grubunda yedinci günden itibaren azalan hücrelerin, triple boyamada belirlenen granüllü hücreler yani heterofiller olduğuna karar verildi. Üçlü boyama yapılan kesitlerde de benzer şekilde 7. günden itibaren granüler hücrelerin azaldığı tespit edilmişti. Söz konusu yoğun boyanan hücrelerin on dört günlük örneklerde PBS ve LPS gruplarında artması ise stimülasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Uyarıya bağlı olarak nötrofil, makrofaj, dendritik hücre belki de trombosit sayısı artmış olabilir.

Dalakta bütün beyaz pulpa bölümlerinde ve kırmızı pulpada bir günlükten itibaren farklı yoğunluklarda MHC II pozitif hücreler tespit edildi. Kapsül altında, bazen ince bir hat halinde ve SCL'de MHC II pozitivitesi gözlemlendi. Bu hücrelerin lenf düğümünde olduğu gibi (Kuka ve Iannacone, 2014) dalakta kapsül altı sinüs makrofaj odakları olabileceği düşünüldü.

PAL'da bir günlükten itibaren MHC II pozitif hücrelerin yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti. PEL'de ve bazı EACs'de bir günlükten itibaren MHC II pozitif hücrelerin bulunduğu görüldü. Bu kısımlarda bulunan B lenfositler, IDC'ler (White ve ark, 1970; Banchereau ve Steinman, 1998) ve makrofajlar (Wu ve Kasier, 2011) MHC II ekspresyonunda bulunmuş olabilirler.

Banchereau ve Steinman (1998) immatür dendritik hücrelerde MHC II'den zengin kompartımanların baskın olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar (Banchereau ve Steinman, 1998) bu kompartımanların geç endozomal yapılar olduğunu, olgunlaşma sırasında bu kompartımanların non-lizozomal veziküllere dönüştüklerini ve MHC II-peptit komplekslerini hücre yüzeyine boşalttıklarını tespit etmişlerdir.

Makrofajlar MHC I, MHC II ve kostimulatör (eş uyarıcı) moleküllerini eksprese ederler (Wu ve Kasier, 2011). Kanatlı DC'e göre kanatlı makrofajlarının biyolojisi çok iyi çalışılmıştır (Kaspers ve ark, 2008). Memeli makrofajlarındaki gibi kanatlı makrofajlarının mikrobial enfeksiyonlara karşı vücut savunmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Wu ve Kasier, 2011).

MHC II pozitif hücrelerin PVL'de bir günden itibaren sayıca arttığı tespit edildi. Burada MHC pozitivitesi gösteren hücrelerin B lenfositler olduğu ileri sürülebilir çünkü aynı bölgede germinal merkez olduğu bildirilmiş (Ogata ve ark, 1977), ayrıca sunulan çalışmada da PVL'de germinal merkez kaydedilmiştir. Germinal merkez bursa bağımlı bir savunma alanıdır (Gumati ve ark, 2003).

Araştırmada farklı noktalarda gözlenen germinal merkezlerde az sayıda MHC II pozitif hücre görüldü. GC'in MHC II pozitif hücrelerle çevrelediği de dikkati çekti. Germinal merkezde pozitivite gösteren hücreler; B lenfositler, folliküler dendritik hücreler ve makrofajlar olabilir. Ayrıca Jeurissen (1991) GC'de gözlenen hücrelerin B lenfosit ve foliküler dendritik hücreler olduğunu bildirmiştir.

Farklı bölgelerde, bir günden itibaren dendritik hücre veya makrofaj odakları olabileceği düşünülen MHC II pozitif hücre kümelerine de rastlandı. Nitekim Olah ve Vervelde (2008) GC büyüklüğünde dendritik hücre odaklarından bahsetmektedirler.

Dalakta kırmızı pulpa alanlarında da MHC II pozitif hücreler tespit edildi. Burada da bu pozitivitenin kaynağının makrofajlar ve B lenfositler olduğu düşünüldü. Olah ve ark (2012) nin yaptıkları çalışmada MHC II pozitivitesinin kaynağının makrofajlar olduğunu bildirmişlerdir.

Nonspesifik savunma ile adaptif reaksiyonlar arasında bağ kuran MHC II moleküllerinin, dalak dokusunda histolojik ekspresyonları ile ilgili olarak herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır. Kontrol grubunda bir günlük örneklerde diğer günlere göre

MHC II pozitifitesinin az olduğu ($P < 0.001$) tespit edildi. Dört günlükten itibaren gruplar arasında fark gözlenmedi. Sunulan araştırmada PBS grubunda günler arasında dalgalanma olmakla birlikte yedi ve on dört günlük örneklerde MHC II pozitifitesinin bir miktar fazla olduğu ($P < 0.05$) gözlendi. LPS grubunda ise bir günlükten sonra artmış olduğu ($P < 0.001$) dikkati çekti. Burada LPS grubunda bir günlükten sonra MHC II pozitifitesinin artması stimulasyonun en azından makrofajlar ve dendritik hücreler açısından gerçekleştiğinin göstergesi olabilir. Nitekim kontrol ve LPS gruplarının değerleri karşılaştırıldığında bir ve ondördüncü günde LPS grubu verilerinin daha fazla olduğu ($P < 0.001$) görüldü. Dalakta gözlenen MHC II pozitifitesinin kaynağının, makrofaj ve dendritik hücre ve B lenfositleri kapsayan antijen sunan hücreler olduğu (Kambayashi ve Laufer, 2014) düşünüldü.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; araştırmada bir günlükten 14 günlük olana kadar civciv dalağının histolojik gelişimi, TLR4 ve MHC II moleküllerinin dağılımı, kontrol grubu ve antijen ile uyarılmış gruplarda incelendi.

Bir ve 14 gün arasında dalağın histolojik gelişimi kaydedildi. Başlangıçtan dört günlük olana kadar yoğun granülopoezis görüldü. Bir günlükten itibaren dalakta TLR4 pozitivitesinin bulunduğu, yaygın granüler tarzda olduğu ve genellikle kırmızı pulpada olan bazı hücrelerde yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti. Dört günlük örneklere PEL'de, yedi günden itibaren GC'de belirgin TLR4 pozitivitesi gösteren hücreler gözlendi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, farklı günlerde difuz granüler TLR4 pozitivitesinde dalgalanmalar olduğu tespit edildi. Yoğun TLR4 pozitivitesi içeren hücrelerin ise 14 günlük örneklere antijen uyarımı ile arttığı belirlendi. TLR4 yoğunluğunun nonspesifik savunma hücrelerinin yanında, endotel ve düz kas hücrelerinde de olduğu gözlendi.

MHC II pozitivitesinin bir günlükten itibaren SCL, PAL, PEL, PVL, GC'de ve kırmızı pulpada bulunduğu görüldü. Kontrol grubunda bir günlük örneklere diğer gruplardan daha az olduğu dikkati çekti. LPS uyarımı ile bir ve 14 günlük örneklere yoğunluğunun arttığı belirlendi.

Dalakta bir günlükten itibaren nonspesifik savunma mekanizmasının varolduğu ve on dört günlük örneklere dalağın histolojik ve fonksiyonel anlamda gelişmiş olduğu gözlendi. Elde edilen bulgular civciv dalağının iki haftalık gelişimi için bilgi birikimine katkı oluşturacak niteliktedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar civciv savunma mekanizması çalışacak kişiler için kaynak veriler oluşturacaktır. Bundan sonraki çalışmalarda dalakta TLR4 ve MHC II pozitivitesinin hücre bazında çalışılmasının uygun olacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH.** Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2006.
- Abbas AK, Lichtman AH.** Temel İmmunoloji. 1. Baskı. İstanbul. Medikal Yayıncılık, 2007, 57.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124(4), 783-801.
- Akter S, Khan MZI, Jahan MR, Karim MR, Islam MR.** Histomorphological study of the lymphoid tissues of broiler chickens. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 2006, 4(2), 87-92.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molecular Biology of the Cell. 4th edition. In: Chapter 24: The adaptive immune system.. New York, Garland Science, 2002.
- Alkie TN, Paul MS, Barjesteh N, Brisbin J, Sharif S.** Expression profiles of antiviral response genes in chicken bursal cells stimulated with Toll-like receptor ligands. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2015, 163, 157-163.
- Banchereau J, Steinman RM.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392(6673), 245-252.
- Banks WJ.** Applied Veterinary Histology. Mosby Year Book, London, 1993, 283-289.
- Billroth T.** Beitrage zur vergleichenden Histologie der Milz. *Müllers Arch* 1857, 88, 88-108.
- Bingöl SA, Yecan Gülmez N, Deprem T, Koral Taşçı S, Aslan Ş.** Histologic and histometric examination of spleen in geese (*Anser anser*). *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2014, 9(3), 157-162.
- Brownlie R, Allan B.** Avian toll-like receptors. *Cell and Tissue Research* 2011, 343(1), 121-130.
- Chen S, Cheng A, Wang M.** Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds. *Veterinary Research* 2013, 9(44), 82.
- Ciriaco E, Pinera PP, Diaz-Esnal B, Laura R.** Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa fabricius). *Microscopy Research and Technique* 2003, 62, 482-487.

- Claassen E, Kors N, Dijkstra CD, Rooijen NV.** Marginal zone of the spleen and the development and localization of specific antibody-forming cells against thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens. *Immunology* 1986, 57, 399–403.
- Conover WJ.** Practical nonparametric statistics. 2nd Ed. New York, John Wiley and Sons, 1980.
- Crossman GA.** Modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anatomica Record* 1937, 69, 33-38.
- Culling CFA, Allison RT, Barr WT.** Cellular pathology technique. (Fourth Edition). Orceingiemsa method of staining. London. Elsevier. 1985.
- Del Cacho E, Gallego M, Arnal C, Bascuas JA.** Localization of splenic cells with antigen-transporting capability in the chicken. *The Anatomical Record* 1995, 241, 105-112.
- Del Cacho E, Gallego M, Lillehoj H, Lopez-Bernard F, Sanchez-Acedo C.** Avian follicular and interdigitating dendritic cells: Isolation and morphologic, phenotypic, and functional analyses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009, 129, 66-75.
- Eikelenboom P, Kroese FGM, Van Rooijen N.** Immune complex-trapping cells in the spleen of the chicken. *Cell and tissue research* 1983, 231(2), 377-386.
- Eren U, Kum S, Nazligul A, Gules O, Aka E, Zorlu S.** The investigation of various elements of intestinal innate immune system of day-old chicks (unpublished data). 2015.
- Ewijk WN, Nieuwenhuis P.** Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. *Experientia* 1985, 41, 199–208.
- Fasina YO, Holt PS, Moran E T, Moore R W, Conner DE, McKee SR.** Intestinal cytokine response of commercial source broiler chicks to *Salmonellatyphimurium* infection. *Poultry Science* 2008, 87, 1335-1346.
- Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M.** Bacterial Lipopolysaccharide Activates NF- κ B through Toll-like Receptor 4 (TLR-4) in Cultured Human Dermal Endothelial Cells. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF TLR-4 AND TLR-2 IN ENDOTHELIAL CELLS. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(15), 11058-11063.
- Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG, Nunez G.** Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiology* 2008, 10(1), 1-8.
- Fukuta K, Nishida T, Mochizuki K.** Electron microscopy of the splenic circulation in the chicken. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 1976, 38(3), 241-254.

- Gallego M, Del Cacho E, Lopez-bernad F, Bascuas J.A.** Identification of Avian Dendritic Cells in the Spleen Using a Monoclonal Antibody Specific for Chicken Follicular Dendritic Cells. *The Anatomical Record* 1997, 249, 81–85.
- Gallego M, Olah I, Del Cacho E. and Glick B.** Anti-S-100 antibody recognizes ellipsoid-associated cells and other dendritic cells in the chicken spleen. *Developmental Comparative Immunology* 1993, 17, 77–83.
- Glick B.** Avian Physiology, Sturkie PD. (Edt), Immunophysiology. Springer-verlag, New York, 1986, 658.
- Gordon, H and Sweet, HH.** A simple method for the silver impregnation of reticulin. *American Journal of Pathology* 1936, 12, 545.
- Graczyk S, Kuryszko J, Madej J.** Reactivity of spleen germinal centres in immunized and ACTH-treated chickens. *Acta Veterinaria Brno* 2003, 72(4), 523-531.
- Gumati MK, Magyar A, Nagy N, Kurucz E, Felföldi B, Olah I.** Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell and Tissue Research* 2003, 312, 333–343.
- Hansell C, Wu Zhu X, Brooks H, Sheppard M, Withanage S, Maskell D, McConnell I.** Unique Features and Distribution of the Chicken CD83Cell. *The Journal of Immunology* 2007, 179, 5117–5125.
- He H, Genovese KJ, Nisbet DJ, Kogut MH.** Profile of Toll-like receptor expressions and induction of nitric oxide synthesis by Toll-like receptor agonists in chicken monocytes. *Molecular Immunology* 2006, 43(7), 783-789.
- Hemmi H, Akira S.** TLR Signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunology Allergy* 2005, 86, 120-35.
- Hodges RD.** The Histology of The Fowl. Academic Press, London, 1974, 221-225.
- Hoffmann-Fezer G, Rodt H, Götze D, Thierfelder S.** Anatomical distribution of T and B lymphocytes identified by immunohistochemistry in the chicken spleen. *International Archives of Allergy and Immunology* 1977, 55(1-6), 86-95.
- Honig A, Rieger L, Kapp M, Dietl J, Kammerer U.** Immunohistochemistry in human placental tissue--pitfalls of antigen detection. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005, 3(11), 1413-1420.
- Hoshi, H.** On the nature of the periellipsoidal lymphoid tissue of chick spleen. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1972, 106(3), 285-305.
- Igyarto BZ, Magyar A, Olah I.** Origin of follicular dendritic cell in the 407 chicken spleen. *Cell and Tissue Research* 2007, 327, 83–92.

- Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL.** Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005, 104(1), 117-127.
- Irla M, Küpfer N, Suter T, Lissilaa R, Benkhoucha M, Skupsky J, Lalive PH, Fontana A, Reith W, Hugues S.** MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 2010, 207(9), 1891-1905.
- Iwasaki A, Medzhitov R.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 2004, 5(10), 987-995.
- Janeway CA, Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002, 20, 197–216.
- Janeway CA Jr, Walport MJ, Travers P, Shlomchik M.** Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. (5th edition). Garland Science, New York, 2001.
- Jeurissen SHM.** Structure and function of the chicken spleen. *Volume* 1991, 142(4), 352-355.
- Jeurissen SHM.** The role of various compartments in the chicken spleen during an antigenspecific humoral response. *Immunology* 1993, 80, 29–33.
- Jeurissen SHM, Claassen E, Janse EM.** Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology* 1992, 77, 75–80.
- Julian JB, King AS, Breazile JE, Evans HE, Vanden Berge JC.** Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium. (Edt), Raymond A. Paynter Jr. Cambridge, Massachusetts, Published by the Club, 1993.
- Kambayashi T, Laufer TM.** Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?. *Nature Reviews Immunology* 2014, 14, 719-730.
- Kannan TA, Ramesh G, Ushakumari S, Dhinakarraj G, Vairamuthu S.** Electron microscopic studies of spleen in chicken (*Gallus domesticus*). *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology* 2015, 4(1), 160-165.
- Kasai K, Nakayama A, Ohbayashi M, Nakagawa A, Ito M, Saga S, Asai J.** Immunohistochemical characteristics of chicken spleen ellipsoids using established monoclonal antibodies. *Cell and Tissue Research* 1995, 281, 135–141.
- Kaspers B, Kothlow S, Butter C.** Avian antigen presenting cells. *Avian Immunology* 2008, 183.
- Kawai T, Akira S.** The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology* 2009, 21(4), 317-337.

- Keestra AM, Putten JPM.** Unique properties of the chicken TLR4/MD-2 complex: selective lipopolysaccharide ctivation of the myd88-dependent pathway. *Journal of Immunology* 2008, 181, 4354-4362.
- Keestra AM, Zoete MR, Bouwman LI, Vaezirad MM, van Putten JP.** Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental and Comparative Immunology* 2013, 41(3), 316-323.
- Kogut MH, Iqbal M, He H, Philbin V, Kaiser P, Smith A.** Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Developmental and Comparative Immunology* 2005, 29(9), 791-807.
- Korver DR, Klasing KC.** Dietary fish oil alters specific and inflammatory immune responses in chicks. *The Journal of Nutrition* 1997, 127, 2039-2046.
- Koutsos EA, Klasing KC.** The acute phase response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2001, 128(2), 255-263.
- Kuka M, Iannacone M.** The role of lymph node sinus macrophages in host defense. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2014, 1319(1), 38-46.
- Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loreda-Osti JC, Morgan K, Malo D.** Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity* 2003, 71(3), 1116-1124.
- Liman N, Bayram GK.** Structure of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) spleen during pre- and post-hatching periods. *Revue de Medecine Veterinaire* 2011, 162(1), 25-33.
- Liu Z, Shimada M, Richards JS.** The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2008, 25(6), 223-228.
- Mak TW, Saunders ME.** The immune response: Basic and Clinical Principles Elseiver Inc. Academic press, Google e-books, 2006.
- Mast J, Goddeeris BM.** CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken. *Cell and Tissue Research* 1998a, 291, 107–115.
- Mast J, Goddeeris BM.** Development of immunocompetence of broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999, 70(3), 245-256.
- Medzhitov R.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007, 18, 449(7164), 819-826.
- Medzhitov R, Janeway CA.** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 1997, 9, 4–9.

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, 24, 388(6640), 394-397.
- Mishra UK, Singh GK, Chauhan RS.** Histomorphological development of lymphoid organs in chicken: II. Spleen and Caecum. *Journal of Immunology and Immunopathology* 2010, 12(2), 106-113.
- Miyamoto H, Seguchi H, Ogawa K.** Electron microscopic studies of the Schweigger-Seidel Sheath in hen spleen with special reference to the existence of “closed” microcirculation. *Journal of Electron Microscopy* 1980, 29(2), 158-172.
- Mori T, Hoshi H.** The periellipsoidal lymphoid tissue in chick spleen: A bursa-dependent area of the white pulp. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 1971, 104(2), 201-202.
- Nagy N, Biro E, Takacs A, Polos M, Magyar A, Olah I.** Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Developmental Dynamics* 2005, 232(1), 55-66.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Siller WG, Wight PAL.** Anatomy of the Domestic Birds. Siproinger-verlag, New York, 1977.
- Ogata K, Sugimura M, Kudo N.** Developmental studies on embryonic and posthatching spleens in chickens with special reference to development of white pulp. *Japanese Journal of Veterinary Research* 1977, 25(3-4), 83-92.
- Olah I, Glick B.** Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. *American Journal of Anatomy* 1982, 4, 445-480.
- Olah I, Kupper A, Ducz P.** Schweigger-Seidel sheath or ellipsoid in the spleen of guinea hen. *Acta Biologica Hungarica* 1994, 45(2-4), 375-386.
- Olah I, Nagy N, Vervelde L.** Structure of the Avian Lymphoid System. Avian Immunology, Schat KA, Kaspers B, Kaiser P. (Eds.). Academic Press. 2012, 24-29.
- Olah I, Vervelde L.** Structure of the Avian Lymphoid System. *Avian Immunology* 2008, 42-47.
- Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Honjo T, Takahashi M, Hirata K, Kaeashima S, Yokoyama M.** Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart and Vessels* 2007, 22(6), 416-422.
- Ozoe A, Isobe N, Yoshimura Y.** Expression of Toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009, 15, 127(3-4), 259-268.

- Paul MS, Mallick AI, Haq K, Orouji S, Abdul-Careem MF, Sharif S.** In vivo administration of ligands for chicken toll-like receptors 4 and 21 induces the expression of immune system genes in the spleen. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011, 144(3), 228-237.
- Paul MS, Paolucci S, Barjesteh N, Wood RD, Schat KA, Sharif S.** Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands. *PloS one* 2012a, 7(8).
- Paul MS, Paolucci S, Read LR, Sharif S.** Characterization of responses elicited by Toll-like receptor agonists in cells of the bursa of Fabricius in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012b, 149(3), 237-244.
- Rajput IR, Wu BB, Li LY, Xu X, Cui ZW, Yu DY, Li WF.** Establishment of Optimal Culturing Method and Biological Activity Analysis of Chicken Bone Marrow Dendritic Cells using Chi-rGM-CSF. *International Journal of Agriculture Biology* 2013, 15–3, 401–409.
- Savina A, Amigorena S.** Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews* 2007, 219, 143-156.
- Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS.** V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annual Review Immunology* 1992, 10, 359-383.
- Schweigger-Seidel F.** Untersuchungen über die Milz. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 1863, 27(5-6), 460-504.
- Scirocco A, Matarrese P, Petitta C, Cicienia A, Ascione B, Mannironi C, Ammoscato F, Cardi M, Fanello G, Guarino MPL, Malorni W, Severi C.** Exposure of Toll-like receptors 4 to bacterial lipopolysaccharide (LPS) impairs human colonic smooth muscle cell function. *Journal of Cellular Physiology* 2010, 223(2), 442-450.
- Sklan D.** Development of defense mechanisms in the digestive tract of the chick. *The Journal of Applied Poultry Research* 2005, 14, 437-443.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC.** Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review Immunology* 2003, 21, 685-711.
- Steinman RM.** Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology* 2007, 37(S1), S53-S60.
- Subedi K, Isobe N, Nishibori M, Yoshimura Y.** Changes in the expression of toll-like receptor mRNAs during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in the ovarian follicles of laying hens. *Journal of Reproduction and Development* 2007, 53(6), 1227-1235.
- Sugimura, M, Hashimoto Y.** Quantitative histological studies on the spleen of ducks after neonatal thymectomy and bursectomy. *Journal of Anatomy* 1980, 131(3), 441-452.
- Tanyolaç A.** Özel Histoloji. Yorum Basın Yayınevi, Ankara, 1999.

- Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E, Chen CL, Ratcliffe MJ, Davison TF, Young JR.** Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gama delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *The Journal of Immunology* 1995, 154, 4485–4494.
- Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG.** The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nature Reviews Immunology* 2010, 10(12), 813-825.
- Venkatesan, S, Vijayaragavan C.** Histology of the spleen of the japanese quail (*Coturnix coturnix Japonica*). *IndianJournal of Veterinary Anatomy* 1997, 9(1/2), 57-59.
- White RG, French VI, Stark JM.** A study of the localisation of a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centres. *Journal of Medical Microbiology* 1970, 3(1), 65-83.
- Withanage GSK, Kaiser P, Wigley P, Powers C, Mastroeni P, Brooks H, Barrow Paul, Smith A, Maskell D, McConnell I.** Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* 2004, 72, 2152-2159.
- Wu Z, Kaiser P.** Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. *Immunobiology* 2011, 216, 1177-1183.
- Wu Z, Rothwell L, Young JR, Kaufman J, Butter C, Kaiser P.** Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 2009, 129, 133-145.
- Yang X, Guo Y, He X, Yuan J, Yang Y, Wang Z.** Growth performance and immune responses in chickens after challenge with lipopolysaccharide and modulation by dietary different oils. *Animal* 2008, 2(2), 216-223.
- Yasuda M, Kajiwara E, Ekino S, Taura Y, Hirota Y, Horiuchi H, Matsuda H, Furusawa S.** Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. *Developmental and Comparative Immunology* 2003, 27, 159–166.
- Yoneyama M, Fujita T.** Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity* 2008, 29(2), 178-181.
- Yu L, Wang L, Chen S.** Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2010, 14(11), 2592-2603.

Zhang Q, Chen B, Yang P, Zhang L, Liu Y, Ullah S, Wu L, Waqas Y, Le Y, Chen W, Chen Q. Identification and structural composition of the blood–spleen barrier in chickens. *The Veterinary Journal* 2015, 204(1), 110-116.

Zhang Z, Schluesener HJ. Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, 63(24), 2901-2907.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : AKA EBRU
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : ÇİNE/1990
Telefon : 0 5535901696
E-mail : ebruaka09@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	xxx Adnan Menderes Üniversitesi	
Y. Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Böümü	21/06/2012

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2004-2011	xxxx	
2000-2002	xxx	xxx

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

xxx

2. PROJELER

Broyler civcivlerin barsak mukozasında dendritik hüceler ve toll-benzeri reseptörlerin araştırması.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

