

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA MELATONİN UYGULAMASININ DALAK HİSTOLOJİSİNDE  
YAŞA BAĞLI ETKİLERİ

Melike Nur KAYTAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA  
2023

Her hakkı saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### SIÇANLARDA MELATONİN UYGULAMASININ DALAK HİSTOLOJİSİNDE YAŞA BAĞLI ETKİLERİ

Melike Nur KAYTAZ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin Özsoy ERDAŞ

Bu çalışmada, genç ve yaşlı sıçanların dalak dokularına melatoninin etkisi incelenmiştir. Dalak dokularının kesitleri, Hematoksilen-Eozin (H&E), Periyodik asit-Schiff (PAS) ve gümüşleme (retikülin) boya ile boyanarak ışık mikroskopunda analiz edilmiştir. Yaşa bağlı olarak dalak dokusundaki histolojik değişimler değerlendirilmiştir. Genç sıçanlarda dalak yapısının doku bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Yaşlı sıçanlarda ise dalak dokusunun parankimasını ve stromasını oluşturan yapısal elemanlarda bazı dejenerasyonlar tespit edilmiştir. Yaşlı sıçanların beyaz pulpasında atrofiye giden lenf folikülleri gözlenmiştir. Kırmızı pulpada, hemosiderin pigment artışı ve bazı venöz sinüslerin lümeninde içi boş yuvarlak yapılı, hasarlanmış eritrosit kümeleri dikkati çekmiştir. Gerek beyaz pulpa gerekse kırmızı pulpadaki lenfosit hücre popülasyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Dalak kırmızı pulpası ve beyaz pulpasını ayıran marjinal bölge yaşlı sıçanlarda tam olarak izlenememiştir. Dalak stromasını oluşturan yoğun retiküler fibril ağının iyi organize olamadığı tespit edilmiştir. Melatonin uygulanan yaşlı sıçan gruplarında ise beyaz pulpa oranının arttığı, kırmızı pulpada hemosiderin pigmentlerinin yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca melatoninin hem beyaz pulpada hem de kırmızı pulpadaki hücre popülasyonunu arttırdığı da gözlenmiştir. Dalak stromasını oluşturan retiküler lif ağının bütünlüğünün korunduğu ve sinüslerin çevresindeki lif desteğinin sağlandığı görülmüştür. Yapılan histolojik ve histomorfometrik analizlerin sonuçlarına göre melatonin uygulamasının dalak dokusunda yaşlanma sürecine bağlı olarak oluşan doku hasarlanmasını kısmen iyileştirdiği ifade edilebilir.

**Mart 2023, 88 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Dalak, yaşlanma, melatonin, ışık mikroskobu, histomorfometri

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

### **AGE-RELATED EFFECTS OF MELATONIN ADMINISTRATION ON SPLEEN HISTOLOGY IN RATS**

Melike Nur KAYTAZ

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

In this study, the effects of melatonin on spleen tissues of young and old rats were investigated. Sections of spleen tissues were stained with Hematoxylin-Eosin (H&E), Periodic acid-Schiff (PAS) and silvering (reticulin) stains and analyzed under light microscope. Age-related histologic changes in spleen tissue were evaluated. It was observed that the tissue integrity of the spleen structure was preserved in young rats. In old rats, some degenerations were detected in the structural elements forming the parenchyma and stroma of the spleen tissue. Atrophied lymph follicles were observed in the white pulp of old rats. In the red pulp, increased hemosiderin pigment and hollow round clusters of damaged erythrocytes in the lumen of some venous sinuses were observed. Reduced lymphocyte cell population was observed in both white and red pulp. The marginal zone separating the red pulp and white pulp of the spleen could not be completely observed in old rats. The dense reticular fibril network forming the splenic stroma was not well organized. In melatonin-treated old rat groups, it was determined that the white pulp ratio increased and the density of hemosiderin pigments decreased in the red pulp. It was also observed that melatonin increased the cell population in both white and red pulp. It was observed that the integrity of the reticular fiber network forming the splenic stroma was preserved and fiber support around the sinuses was provided. According to the results of histological and histomorphometric analyses, it can be stated that melatonin application partially improves the tissue damage caused by the aging process in the spleen tissue.

**March 2023, 88 pages**

**Key Words:** Spleen, aging, melatonin, light microscopy, histomorphometry

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a, çalışmalarım süresince yardımseverliği ve engin bilgisi ile bana destek olan, Ankara Üniversitesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlilerinden değerli hocam Öğr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e, çalışmamızda teçhizat konusunda yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Zooloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın hocam Prof. Dr. Suna CEBESOY'a ve Arş. Gör. Hatice MUTLU EYİSON'a, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni destekleyen ailem ve dostlarıma en derin duygularla teşekkür ederim.

Melike Nur KAYTAZ  
Ankara, Mart 2023



## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                                           |      |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| ETİK.....                                                                 | i    |
| ÖZET.....                                                                 | ii   |
| ABSTRACT .....                                                            | iii  |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....                                                    | iv   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                      | vii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                     | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                   | xiii |
| 1. GİRİŞ .....                                                            | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ .....                             | 2    |
| 2.1 Dalak Anatomisi ve Histolojisi.....                                   | 2    |
| 2.2 Yaşlanma.....                                                         | 4    |
| 2.2.1 Yaşlanma teorileri.....                                             | 4    |
| 2.2.2 Yaşlanmada reaktif oksijen türleri.....                             | 5    |
| 2.3 Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizması ..... | 7    |
| 2.4 Melatonin .....                                                       | 8    |
| 2.4.1 Melatonin biyosentezi ve antioksidan etkileri .....                 | 8    |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                | 11   |
| 3.1 Deney Hayvanları.....                                                 | 11   |
| 3.2 Uygulanan Yöntemler .....                                             | 11   |
| 3.2.1 Araştırma planı .....                                               | 11   |
| 3.2.2 Doku kesitlerinin hazırlanması ve boyanması.....                    | 12   |
| 3.2.2.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama yöntemi .....                   | 12   |
| 3.2.2.2 Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama yöntemi .....                  | 13   |
| 3.2.2.3 Gümüşleme (retikülin) boyama yöntemi .....                        | 13   |
| 3.2.3 Preparatlardan görüntülerin elde edilmesi .....                     | 14   |
| 3.2.4 Histomorfometrik analiz .....                                       | 14   |
| 3.2.5 İstatistiksel analiz.....                                           | 15   |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                               | 16   |
| 4.1 Histokimyasal Sonuçlar .....                                          | 16   |

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.1.1 Hematoksilen &amp; Eozin (H&amp;E) .....</b> | <b>16</b> |
| <b>4.1.2 Periyodik asit-Schiff (PAS) .....</b>        | <b>39</b> |
| <b>4.1.3 Gümüşleme (Retikülin).....</b>               | <b>47</b> |
| <b>4.2 Histomorfometrik Analiz .....</b>              | <b>72</b> |
| <b>4.3 İstatistiksel Analiz .....</b>                 | <b>74</b> |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                     | <b>75</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                | <b>80</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                  | <b>88</b> |



## SİMGELER DİZİNİ

|    |            |
|----|------------|
| cm | Santimetre |
| °C | Santigrat  |
| gr | Gram       |
| mg | Miligram   |
| µm | Mikrometre |
| µl | Mikrolitre |

## Kısaltmalar

|     |                |
|-----|----------------|
| PBS | Fosfat Tamponu |
|-----|----------------|

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 İnsanlarda melatonin sentezi yolağı .....                                                                                                                                                      | 9  |
| Şekil 4.1 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçanların dalak kesitinin genel görünümü. ....                                                                                                                    | 17 |
| Şekil 4.2 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülü (BP) görünümü .....                                                                                                          | 17 |
| Şekil 4.3 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) .....                                                                                     | 18 |
| Şekil 4.4 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa foliküllerinde (BP) santral arteriyolları (SA) çevreleyen germinal merkezler (GM) .....                                               | 18 |
| Şekil 4.5 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, komşu folikülleri (F) olan bir beyaz pulpa folikülü (BP) .....                                                                                    | 19 |
| Şekil 4.6 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, bir komşu folikül (F) ve onu çevreleyen marjinal sinüs (MS) .....                                                                                 | 19 |
| Şekil 4.7 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) gözlenen trabekül (T), trabeküler ven (TV), venöz sinüs (VS) yapıları ve sinüsler arasında uzanan dalak kordonları (K). .... | 20 |
| Şekil 4.8 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) venöz sinüs (VS) ve endotel hücreleri (E) .....                                                                              | 20 |
| Şekil 4.9 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, morfolojisi farklılaşmış beyaz pulpa folikülü (BP) .....                                                                                         | 21 |
| Şekil 4.10 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, morfolojisi farklılaşmış bir beyaz pulpa folikülü (BP) .....                                                                                    | 22 |
| Şekil 4.11 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, atrofiye uğramış bir beyaz pulpa folikülü (BP) .....                                                                                            | 22 |
| Şekil 4.12 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, marjinal sinüsü (MS) belirsizleşmiş beyaz pulpa folikülü (BP) .....                                                                             | 23 |
| Şekil 4.13 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) belirsizleşmiş marjinal bölge (MB) ve kırmızı pulpada (KP) gözlenen venöz sinüsler (VS) .....                                | 23 |
| Şekil 4.14 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) deforme olmuş farklı boyutlarda venöz sinüsler (VS) .....                                                                  | 24 |
| Şekil 4.15 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, anormal dağılım gösteren kalınlaşmış trabekül (T) yapıları .....                                                                                | 24 |
| Şekil 4.16 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpaya (KP) dağılmış şekilde hemosiderin pigmentleri (H) ve venöz sinüste (VS) hasarlı eritrosit hücreleri (Er) .....                  | 25 |
| Şekil 4.17 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) ve kırmızı pulpada (KP) gözlenen yapılar .....                                                             | 26 |
| Şekil 4.18 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA) .....                                          | 26 |
| Şekil 4.19 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP), marjinal sinüs (MS) .....                                                                       | 27 |

|                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.20 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpanın komşu folikülü (F) çevresindeki marjinal sinüs (MS).....                                                                    | 27 |
| Şekil 4.21 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, hücreleri, sıkı paketlenmiş görünüm sergileyen periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) ve marjinal bölge (MB) alanları.....                    | 28 |
| Şekil 4.22 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, hücreleri, sıkı paketlenmiş görünüm sergileyen periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) ve marjinal bölge (MB) alanları.....                    | 28 |
| Şekil 4.23 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülü (BP).....                                                                                                            | 30 |
| Şekil 4.24 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa foliküller(BP) .....                                                                                                          | 30 |
| Şekil 4.25 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) koyu boyanmış periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) alanı .....                                                | 31 |
| Şekil 4.26 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) alanı .....                                                              | 31 |
| Şekil 4.27 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) alanında dalak kordonları (K) .....                                      | 32 |
| Şekil 4.28 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) santral arteriyolu (SA) çevreleyen germinal merkez (GM) .....                                                | 32 |
| Şekil 4.29 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) santral arteriyolu (SA) çevreleyen germinal merkez (GM) .....                                                | 33 |
| Şekil 4.30 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal sinüs (MS) görünümü .....                                                                  | 33 |
| Şekil 4.31 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal sinüs (MS) görünümü .....                                                                  | 34 |
| Şekil 4.32 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal bölge (MB) görünümü .....                                                                  | 34 |
| Şekil 4.33 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal bölge (MB) görünümü .....                                                                  | 35 |
| Şekil 4.34 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıfta (PALS) hücrelerin sıkı paketlenmiş görünümü .....                                       | 35 |
| Şekil 4.35 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıfta (PALS) ve marjinal bölgede (MB) hücrelerin sıkı paketlenmiş görünümü .....              | 36 |
| Şekil 4.36 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) trabekül (T) yapılarının dağınık görünümü .....                                                               | 36 |
| Şekil 4.37 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) farklı boyutlarda venöz sinüsler (VS) ve dalak kordonları (K) .....                                           | 37 |
| Şekil 4.38 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) farklı boyutlarda venöz sinüsler (VS), dalak kordonları (K) ve soluk renkli hemosiderin pigmentleri (H) ..... | 37 |

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.39 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, iki beyaz pulpa folikülü (BP) arasında kümelenmiş lenfosit (L) görünümü.....                                                                | 38 |
| Şekil 4.40 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağı kesitlerinde kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler .....                                                                                          | 40 |
| Şekil 4.41 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağı kesitlerinde ok uçlarıyla belirtilmiş, PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler .....                                                                               | 41 |
| Şekil 4.42 Yaşlı kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağı kesitlerinde kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hasarlı hücreler .....                                                                                 | 42 |
| Şekil 4.43 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağı kesitlerinde kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler.....                                                                        | 44 |
| Şekil 4.44 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağı kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler .....                                                                                      | 46 |
| Şekil 4.45 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında beyaz pulpada (BP) retiküler lifler (R) .....                                                                                                                    | 48 |
| Şekil 4.46 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerde (SA) retiküler lif görünümü ve kırmızı pulpa alanında (KP) trabekül yapılarının (T) retiküler fibril görünümleri..... | 48 |
| Şekil 4.47 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R).....                                                                                         | 49 |
| Şekil 4.48 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, iki farklı küçük beyaz pulpa folikülünde (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R) .....                                                             | 49 |
| Şekil 4.49 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R) .....                                                                              | 50 |
| Şekil 4.50 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R).....                                                                                         | 50 |
| Şekil 4.51 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) yapısı korunmuş retiküler lifler (R) .....                                                                                                   | 51 |
| Şekil 4.52 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) santral arteriyol (SA) çevresinde gözlenen düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R).....                                        | 51 |
| Şekil 4.53 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) ince bir ağ şeklinde gözlenen retiküler lifler (R).....                                                                             | 52 |
| Şekil 4.54 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kesik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R) .....                                              | 53 |
| Şekil 4.55 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kesik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R) .....                                              | 53 |
| Şekil 4.56 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kesik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R) .....                                              | 54 |
| Şekil 4.57 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kesik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R) .....                                              | 54 |
| Şekil 4.58 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşarak ağaç dalı görünümü sergileyen retiküler lifler (R).....                                                                        | 55 |
| Şekil 4.59 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşarak, ağaç dalı görünümü sergileyen retiküler lifler (R).....                                                                       | 55 |

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.60 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşarak, ağaç dalı görünümü sergileyen retiküler lifler (R).....                       | 56 |
| Şekil 4.61 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerin (SA) çevresinde retiküler liflerin görünümü .....                    | 56 |
| Şekil 4.62 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerin (SA) çevresinde retiküler liflerin görünümü .....                    | 57 |
| Şekil 4.63 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerin (SA) çevresinde retiküler liflerin görünümü .....                    | 57 |
| Şekil 4.64 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) retiküler liflerin yoğunlaşmış görünümleri.....                  | 58 |
| Şekil 4.65 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) retiküler liflerin yoğunlaşmış görünümü .....                    | 58 |
| Şekil 4.66 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) yoğun şekilde gözlenen kalınlaşmış retiküler fibriller (R) ..... | 59 |
| Şekil 4.67 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, kapsül (Ka), kırmızı pulpa alanı (KP) ve beyaz pulpa folikülünün (BP) genel görünümü.....    | 60 |
| Şekil 4.68 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında kapsül (Ka), kırmızı pulpa alanı (KP) ve beyaz pulpa folikülünün (BP) genel görünümü.....     | 60 |
| Şekil 4.69 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R).....                | 61 |
| Şekil 4.70 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R) .....          | 61 |
| Şekil 4.71 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R).....           | 62 |
| Şekil 4.72 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R).....           | 62 |
| Şekil 4.73 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyol (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R).....                           | 63 |
| Şekil 4.74 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyol (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R).....                           | 63 |
| Şekil 4.75 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) ince bir şekilde gözlenen retiküler liflerin (R) ağ görünümü.....                            | 64 |
| Şekil 4.76 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kapsül (Ka) ve kırmızı pulpa alanının (KP) genel görünümü .....                             | 65 |
| Şekil 4.77 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kapsül (Ka) ve kırmızı pulpa alanının (KP) genel görünümü .....                             | 65 |
| Şekil 4.78 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa (BP) genel görünümü.....                                                        | 66 |
| Şekil 4.79 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) gözlenen trabekül yapılarının (T) genel görünümü .....                 | 66 |
| Şekil 4.80 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP), santral arteriyolün (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R) .....                      | 67 |

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.81 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP), santral arteriyolün (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R) .....                                                | 67 |
| Şekil 4.82 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşmış-düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R).....                                                            | 68 |
| Şekil 4.83 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R) .....                                                                       | 68 |
| Şekil 4.84 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kısmen düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R).....                                                                 | 69 |
| Şekil 4.85 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) gözlenen retiküler liflerin (R) yoğunlaşmış görünümü .....                                   | 69 |
| Şekil 4.86 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) ince bir şekilde gözlenen retiküler liflerin (R) ağ görünümü.....                                                     | 70 |
| Şekil 4.87 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) ince ve ağ şeklinde olan retiküler lifler (R) ile trabekül yapılarını (T) oluşturan retiküler liflerin görünümü ..... | 70 |
| Şekil 4.88 Kontrol ve deney gruplarında beyaz pulpa alanlarının (BP) ve kırmızı pulpa alanlarının (KP) dağılımı.....                                                                              | 74 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.1 H&E boyalı 4 farklı gruba ait sıçan dalak kesitlerinde gözlenen histolojik karakterlerin, gözlenme seviyelerine göre derecelendirilmesi.....                                                                       | 39 |
| Çizelge 4.2 PAS boyalı 4 farklı gruba ait sıçan dalak kesitlerinde gözlenen histolojik karakterlerin, gözlenme seviyelerine göre derecelendirilmesi.....                                                                       | 47 |
| Çizelge 4.3 Retikülin boyalı 4 farklı gruba ait sıçan dalak kesitlerinde gözlenen histolojik karakterlerin, gözlenme seviyelerine göre derecelendirilmesi.....                                                                 | 72 |
| Çizelge 4.4 Histomorfometrik analiz için preparatlarda ölçülen toplam beyaz pulpa alanları (taBP $\mu\text{m}^2$ ), toplam kırmızı pulpa alanları (taKP $\mu\text{m}^2$ ) ve toplam dalak alanları (taD $\mu\text{m}^2$ )..... | 73 |
| Çizelge 4.5 Kontrol ve deney gruplarında toplam beyaz pulpa alanlarının (taBP) ve toplam kırmızı pulpa alanlarının (taKP) toplam dalak alanlarına (taD) yüzde oranları .....                                                   | 73 |
| Çizelge 4.6 Kontrol ve deney gruplarında toplam beyaz ve kırmızı pulpa alanlarının, toplam dalak alanlarına yüzde oranlarının toplamalarının ortalaması $\pm\text{SEM}$ . Her grup için $n=3$ .....                            | 74 |

## 1. GİRİŞ

Olağanüstü histolojik bir yapıya sahip, sekonder lenfoid organ olan dalak, kanın bağışıklık sistemi gözetiminde görevlidir ve tüm omurgalı türlerinde bulunmaktadır (Steiniger 2015). Dalak, farelerde ve sıçanlarda lenfosit dolaşımı için en önemli organlardan biridir (Pabst 1988, Steiniger 2015). Fareler, sıçanlar ve insanlarda bulunan dalağın özellikleri söz konusu olduğunda ise diğer türlerden farklı olarak 3 ana özellik ön plana çıkmaktadır (Steiniger 2015). Bunlar; 1) Dalakta diğer birçok organın aksine, orta büyüklükteki dalak atardamarları ve toplardamarları paralel değildir, 2) splenik kırmızı pulpa kılcal damarları açık bir mikrosirkülasyonu beslemektedir ve 3) dalak, diğer organlarda, venöz sinüslerde bulunmayan, kendine özgü bir tür mikrodamar yapısı sergilemektedir (Steiniger 2015).

Organizmada bulunan diğer sistemler gibi, bağışıklık sisteminde de yaşa bağlı değişiklikler nedeniyle, oksidan-antioksidan homeostazın bozulması organizmanın stresle etkili bir şekilde mücadele etme yeteneğini olumsuz yönde etkilemektedir (Sadighi Akha 2018). Blagosklonny (2008), yaşlanma için anahtar kelimelerin “serbest radikaller” olduğunu belirtmiştir (Blagosklonny 2008, Warraich vd. 2020). Yaşlanma sürecinde, organizmada oksidan-antioksidan homeostazın dengelenmesinde, serbest radikaller grubundan olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oksidan olarak görev aldığı ve melatoninin de etkili bir serbest radikal temizleyici olarak antioksidan olarak önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Vishwas vd. 2013).

Yaşlanma sürecinde, zayıflayan bağışıklık fonksiyonları organizmada bulunan dalakta hem morfolojik hem de histolojik değişikliklere neden olmaktadır. Organizmada meydana gelen bu değişikliklerin ve antioksidan tedavinin bu değişikliklerde oluşturacağı iyileştirmenin araştırılmasında ve anlaşılmasında, histolojik incelemeler literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Bu çalışmada, güçlü bir antioksidan olan melatoninin uygulanmasının, genç ve yaşlı sıçanlarda dalak dokusuna etkisinin histolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır ve bu histolojik incelemelere ek olarak çalışmadan elde edilen veriler histomorfometrik analiz ile kantitatif şekilde analiz edilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Dalak Anatomisi ve Histolojisi

Vücuttaki en büyük sekonder lenfoid organ olan dalak, diyaframın sol kubbesinde yer alan intraperitoneal bir organdır ve dokuzuncu, onuncu, on birinci kaburgalarla temas halinde bulunmaktadır (Varga vd. 2018, Mahadevan 2019, El-naseery vd. 2020). Oval şekilde olan dalak, arkadan ve üstten, öne ve alta eğik olarak yerleşmiştir ve en geniş kısmı, uzunlamasına boyutuyla ölçüldüğünde, sağlıklı yetişkinlerde 7 ila 14 cm arasında değişmektedir ve ortalama çevresi de 11 cm'dir (Varga vd. 2018). Ayrıca, içerdiği kan hacmine bağlı olarak bir dalağın ağırlığı 150-200 gr aralığındadır (Varga vd. 2018). Dalağın öne çıkan önemli fonksiyonları ise bağışıklık cevabı, kanın filtrelenmesi ve demir geri dönüşümüdür (Chadburn 2000, Mebius ve Kraal 2005, Zygmunt ve Veldhoen 2011, Ogembo 2012, Liszewski vd. 2013, Yiannikourides ve Latunde-Dada 2019, El- Naseery vd. 2020, Crane vd. 2021). Dalak stromasında yer alan ve içerisinde ven, arter veya sinirleri bulundurabilen trabekül yapıları, diğer bir stromal yapı olan kapsülden dalak parankimine uzanmaktadır (Cesta 2006). Ayrıca retiküler liflerden oluşan dalak stroması, dalağın iki önemli bileşeni olan beyaz pulpa ve kırmızı pulpayı yapısal olarak desteklemektedir (Rebelatto 2018).

**Kapsül:** Histolojik kesitte belirgin bir şekilde gözlenemeyen mezotelyal hücrelerden oluşan ve yoğun fibröz doku, elastik lifler ile düz kastan meydana gelen kapsül yapısı dalağın dış tabakasını çevrelemektedir (Cesta 2006).

**Trabekül:** Düz kas ve fibroelastik dokudan oluşan trabekül, arterler, venler, lenf damarları ile sinirleri içermektedir ve düzensiz-aralıklı şekilde dalakta gözlenmektedir (Cesta 2006). Kapsülden parankime uzanan trabekül yapıları, kapsüle sürekli bir yapı kazandırarak kapsülle birlikte dalak için destek yapısı görevi görmektedir (Crane vd. 2021).

**Beyaz pulpa:** Genel olarak dalak hacminin %25'ini oluşturan beyaz pulpa dalağın baskın lenfoid bölmesidir (Crane vd. 2021). Retiküler bir çerçeve içinde lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler, plazma hücreleri, arteriyoller ve kılcal damarlardan oluşan beyaz pulpa, periarteriolar lenfoid kılıftan (PALS, T-hücre alanı), komşu foliküllerden (B-hücre alanı) ve marjinal bölgeden (B-hücre alanı) oluşmaktadır (Saito vd. 1988, Cesta 2006). Segmental arterler dalak hilumuna girdikten sonra trabeküler arterleri oluşturmaktadır ve bu trabeküler arterler de kırmızı pulpaya girerek, beyaz pulpada bulunan PALS ile çevrili olan merkezi arteriyollerini oluşturmaktadır (Crane vd. 2021). PALS, iç ve dış PALS olmak üzere ikiye ayrılmaktadır ve histolojik incelemelerde T hücre bağımlı olan iç PALS alanının, dış PALS alanına göre daha koyu renkte boyandığı gözlenmektedir (Matsuno vd. 1989, Dijkstra ve Veerman 1990, Nicander vd. 1993, Van Rees vd. 1996, Cesta 2006, Haley 2017). Komşu foliküller ise merkezi arteriyollerin çatallanma bölgelerinde bulunmaktadır ve daha az hücrenin varlığı nedeniyle daha az boyanan germinal merkezler içerebilirler (Cesta 2006).

**Marjinal bölge:** Beyaz pulpa ile arasında marjinal sinüs sınırı bulunan ve beyaz pulpa ile kırmızı pulpa alanlarını birbirinden ayıran marjinal bölge, her zaman belirgin olmamakla birlikte, lenf düğümü foliküllerinin aksine dalakta yer alan marjinal bölgeler daha belirgin bir görünüme sahip olmaktadır (Cesta 2006, Crane vd. 2021). Ek olarak marjinal bölge beyaz pulpaya daha yakın bir iç halka oluşturan metalofilik makrofajlar ve bir dış halka oluşturan marjinal bölge makrofajları olmak üzere iki farklı makrofaj seti içermektedir (Crane vd. 2021).

**Kırmızı pulpa:** Kanın süzülmesi ve antikor üretimi görevleri bulunan kırmızı pulpada dalak kordonları (Billroth'un kordonları) ve dalak sinüzoidleri (kan damarları) bulunmaktadır (Mebius ve Kraal 2005, Crane vd. 2021). Dalak kordonları retiküler lifler, retiküler hücreler ve ilişkili makrofajlardan oluşan geniş bir ağ yapısındadır. Retiküler lifler kollajen ve elastik lifler, mikrofibriller, retiküler hücre bazal laminaları ve miyelinsiz adrenerjik sinir liflerinden oluşmaktadır (Saito vd. 1988, Cesta 2006). Retiküler hücreler ise miyofibroblastlar olarak kabul edilmektedir ve dalağın kasılmasında görev almaktadır (Saito vd. 1988, Cesta 2006). Makrofajlar, oksidatif hasarı önlediği için demir metabolizmasında önemli bir role sahip olan hemosiderinin esas

olarak bulunduğu yerlerdir (Knutson ve Wessling-Resnick 2003, Munoz vd. 2011, Yiannikourides ve Latunde-Dada 2019). Lizozomlarda, ferritinin kısmi sindiriminden kaynaklanan çözünmeyen bir demir deposu olan hemosiderin, hücrede artan demir miktarının depolanmış şeklidir ve bu depolama şekli oksidatif hasarı önlemektedir (Knutson ve Wessling-Resnick 2003, Munoz vd. 2011, Yiannikourides ve Latunde-Dada 2019). Ek olarak kordonlar arasındaki boşluklarda eritrositler, granülositler ve dolaşımdaki mononükleer hücreler dahil olmak üzere kan hücreleri bulunmaktadır (Cesta, 2006). Kırmızı pulpanın retiküler lifleri ve bir bazal membran üzerinde oturan endotel hücrelerinin gevşek ağı ile çevrelenmiş olan dalak sinüzoidleri ise kırmızı pulpa boyunca gözlenmektedir. (Saito vd. 1988, Cesta 2006).

## **2.2 Yaşlanma**

### **2.2.1 Yaşlanma teorileri**

Biyolojik ve dejeneratif bir süreç olan yaşlanma yavaş ilerlemektedir ve yaşlanma sürecinde meydana gelen değişiklikler organizmaların zamanla fizyolojik fonksiyonları gibi fonksiyonel düşüslere neden olarak yaşam süresi 80 yıl olan sağlıklı bir insanda ölüme ve patofizyolojik durumlara yol açmaktadır (Lee ve Wei 2012, Labat-Robert ve Robert 2015, Kauppila vd. 2017, Theurey ve Pizzo 2018, Warraich vd. 2020). Günümüze kadar yaşlanmanın biyolojik temeline dair birçok soru cevaplanamamıştır fakat yaşlanmanın arkasındaki itici gücü açıklamak için bilim camiası tarafından birçok mekanik ve evrimsel teoriyi içeren 300'den fazla teori önerilmiştir (López Otín vd. 2013, Jang vd. 2018, Pomatto ve Davies 2018, Warraich vd. 2020).

Somatik mutasyon ve artan DNA hasarının yaşlanmada büyük ölçüde rol aldığını ileri süren “somatik mutasyon teorisi” ve yaşla birlikte somatik dokularda progresif telomer kısalması ile ilişkili hücresel bölünme kapasitesinin azaldığını öne süren “telomer kaybı teorisi”, yaşlanma biyolojisinin ölçümlerini mümkün duruma getirebilecek genomik istikrarsızlık ve telomer uzunluğu parametrelerine önemli kaynaklar sağlamaktadır (Theurey ve Pizzo 2018, Ferrucci vd. 2020, Warraich vd. 2020).

Belirli faktörlerin, hücrel işlevi korumak için vazgeçilmez olan protein döngüsü ve zamanla değiştirilmiş proteinler ile hasarlı proteinlerin birikmesi gibi yaşa bağlı bazı rahatsızlıklarla ilişkisini varsayan "değiştirilmiş proteinler ve atık birikimi teorisi" ise diğer yaşlanma teorileri gibi serbest radikallerin veya serbest oksijen radikallerinin (ROS) yaş gelişiminden sorumlu olduğuna işaret etmektedir (Theurey ve Pizzo 2018, Warraich vd. 2020).

Gerschman ve arkadaşlarının (1954) yapmış oldukları çalışmaya dayanan ve Harman' ın (1956) ortaya koyduğu "serbest radikal yaşlanma teorisi" kapsamında oksijen toksisitesinin, ROS'un üretimi ve ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlikten dolayı oluşan oksidatif strese kaynaklandığı gözlemlendikten sonra bağ dokuları ve hücre bileşenleri üzerinde zararlı yan saldırılar üreten oksidatif hasarın yaşlanmaya neden olduğu varsayılmıştır (Gerschman vd. 1954, Harman 1956, Warraich vd. 2020).

Daha sonra yapılan çalışmalarda, "serbest radikal yaşlanma teorisi" hakkında, genel olarak kabul edilebilir bir teori olduğu fakat eksik yönlerinin de olduğu öne sürülmüş ve hücrenin metabolik organizasyonu, bireyin genotipi ile bireyin koruyucu sistemleri yardımıyla ROS'un yaşlanma sürecine katılarak hücrel hasara neden olduğu gözlemlenmiş ve oksidasyona bağlı hasarın hem sıralı yaşlanma hem de kırılabilirlik ile ilişkilendirildiği yeni bir teori olan "serbest radikal kırılabilirlik teorisi" tanımlanmıştır (Carocho vd. 2018, Viña 2019, Warraich vd. 2020). Serbest radikal kırılabilirlik teorisinin varsayımı, radikallerin yalnızca zarar verici moleküller olarak değil, aynı zamanda hücre fonksiyonunu kontrol eden sinyaller olarak hareket ettiği ve birçok durumda oksidatif hasarın kronolojik değil, yaşlanmadaki başarısızlıkla ilişkili olduğu temellerine dayanmaktadır (Viña 2019).

### **2.2.2 Yaşlanmada reaktif oksijen türleri**

Oksijen belirli moleküllerle etkileşime girdiğinde, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron(lar) bulunan oldukça reaktif atomlar veya moleküller olan serbest radikaller oluşmaktadır ve bu serbest radikaller hücrelerde tek bir elektron kaybedilerek veya kazandırılarak üretilmektedir ve oksidan veya indirgeyici gibi davranmaktadırlar

(Lobo vd. 2010, Chandrasekaran vd. 2017, Liguori vd. 2018). Oksijenin reaktif ve reaktif olmayan radikal türlerini ifade eden reaktif oksijen türleri (ROS) ise tüm aerobik hücreler tarafından üretilerek yaşa bağlı hastalıkların yanı sıra yaşlanmada, organik moleküllerden enerjinin çıkarılmasında, bağışıklık savunmasında ve sinyal verme sürecinde önemli rol oynamaktadır (Genestra 2007, Powers vd. 2011, Venkataraman vd. 2013, Liguori vd. 2018). Yüksek seviyede ROS üretiminin bir sonucu olarak hücrelerdeki oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olurken, enzimatik temizleyiciler yüksek seviyede ROS'u nötralize edemediğinde, dokularda biriken ROS, lipid, protein ve DNA hasarı dahil olmak üzere oksidatif stres aracılığıyla doku yaralanmalarının artmasına neden olabilmektedir (Venkataraman vd. 2013, Liu vd. 2014).

Serbest radikal yaşlanma teorisi, yaşa bağlı fonksiyonel kayıpların, ROS kaynaklı hasarların birikmesinden kaynaklandığı hipotezine dayanmaktadır ve oksidatif stres kaynaklı yaşlanmanın kesin mekanizması hala net olmamakla birlikte muhtemelen artan ROS seviyelerinin, replikasyon sırasında meydana gelen hasarlara yanıt olarak hücresel proliferasyonu durduran fizyolojik bir mekanizma olan hücresel yaşlanmaya yol açtığı düşünülmektedir (Beckman ve Ames 1998, Liguori vd. 2018). Yaşlanmanın, özellikle sinir, endokrin ve bağışıklık sistemleri gibi düzenleyici sistemleri etkileyen kronik oksidatif strese bağlı homeostaz kaybı olduğu göz önüne alındığında oksidatif stres, inflamasyon ve yaşlanma arasındaki yakın ilişki dikkat çekmektedir (Liguori vd. 2018). Bu ilişkiye dikkat çeken “yaşlanmanın oksidasyon-inflamatuvar teorisi”, bu durumu bağışıklık sisteminin aktivasyonunun, kronik oksidatif stres ve inflamasyonun birbirini beslediği bir kısır döngü oluşturan inflamatuvar durumu indükleyerek yaşa bağlı morbidite ve mortaliteyi artırdığı şeklinde açıklamaktadır (De la Fuente ve Miquel 2009, Liguori vd. 2018). Oksidasyon-inflamatuvar teorisinde yer alan “oksi-enflamasyon-yaşlanma” fikri aynı zamanda bağışıklık sisteminin, organizmanın yaşlanma hızında önemli bir rol oynadığını da öne sürmektedir (Garrido vd. 2019).

Bağışıklık hücreleri, farklı fonksiyonlarını yerine getirirken oksidan ve inflamatuvar bileşikler üretme kapasiteleri nedeniyle, yaşa bağlı oksidatif hasar sonucunda kendi redoks ve inflamatuvar dengelerini düzenleme kapasitelerini kaybettiklerinde

organizmanın oksidatif-inflamatuar stresi artmaktadır ve yaşlanmada, farklı organ sistemleri bağlamında, homeostazı sürdürme ve bağışıklık sistemindeki, enfeksiyonla savaşıma yeteneğinde yetersizlik gibi ortaya çıkabilen bir dizi fonksiyonel ve yapısal değişiklikler meydana gelmektedir (Bauer 2005, De La Fuente ve Miquel 2009, Bauer ve De la Fuente 2016, Sadighi Akha 2018, Garrido vd. 2019). Bu değişikliklerin oluşmasında oksidatif strese neden olan ROS, aktif rol oynamaktadır (Sadighi Akha 2018).

### **2.3 Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizması**

Günümüzde geniş çapta kabul gören, biyolojik materyallerin serbest radikal ürettiği gerçeği ilk kez 1954 yılında belirtilmiştir (Commoner vd. 1954, Powers vd. 2011). Yalnızca oksijen merkezli radikalleri ifade etmeyen, aynı zamanda oksijenin radikal olmayan fakat reaktif türevlerini de (örn. hidrojen peroksit) içeren genel bir terim olarak reaktif oksijen türleri (ROS), insan vücudundaki normal, temel metabolik süreçlerden veya X-ışınlarına maruz kalma, ozon, sigara içimi, hava kirleticiler ve endüstriyel kimyasallar gibi dış kaynaklarla da oluşmaktadır (Bagchi ve Puri 1998, Lobo vd. 2010).

Fagositlerin artan radikal üretici enzimlerini (örneğin; ksantin oksidaz, lipogenaz, siklooksijenaz) aktive etmesi ile serbest demirin ve bakır iyonlarının salınması veya oksidatif fosforilasyonun elektron taşıma zincirlerinin bozulması gibi nedenlerle fazla ROS üretimi gerçekleşmektedir ve artan ROS üretimi ile antioksidan savunmalar arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres, lipidler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türlerin hasar görmesi ile ilişkilendirilmektedir (Mc Cord 2000, Lobo vd. 2010). Oksidatif stresin neden olduğu bu hücrel hasarı geciktiren veya engelleyen kararlı moleküller mevcuttur ve bunlar, serbest radikal süpürücü özellikleri ile antioksidanlardır (Halliwell 1995, Powers vd. 2011).

Antioksidanların, oksidanları nötralizasyonu için öne sürülen iki temel etki mekanizması vardır; 1) Birincil antioksidanın, sistemlerde bulunan serbest radikale bir elektron verdiği bir zincir kırma mekanizmasıdır ve 2) zincir başlatıcı katalizörü söndürerek ROS/reaktif nitrojen türleri başlatıcılarının (ikincil antioksidanlar) uzaklaştırılmasını içeren



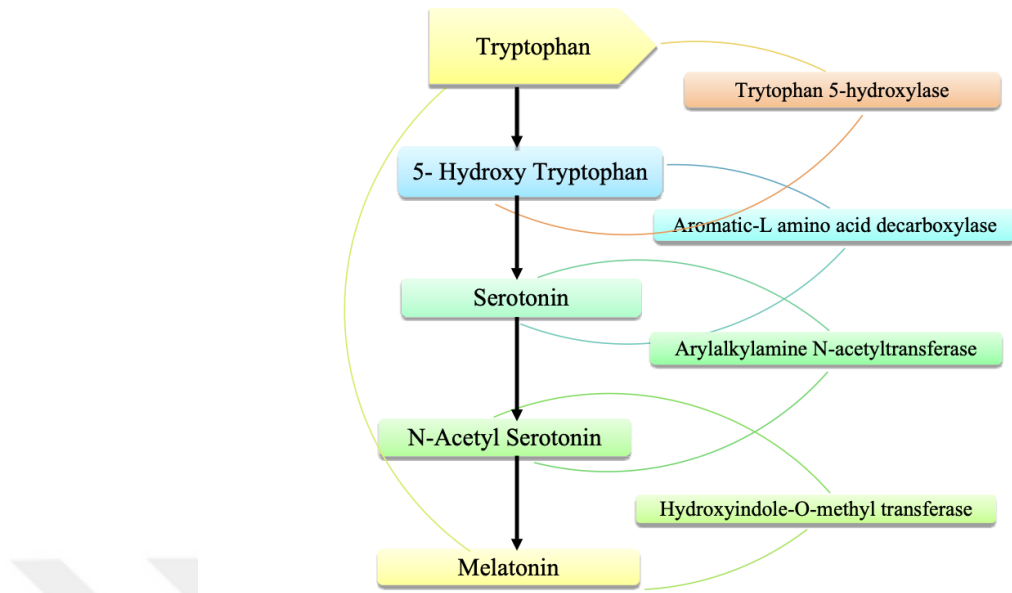
mekanizmadır (Rice-Evans ve Diplock 1993, Powers vd. 2011). Ek olarak, antioksidanlar biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini elektron verme, metal iyon şelasyonu, yardımcı antioksidanlar veya gen ekspresyonu düzenlemesi gibi farklı mekanizmalarla gösterebilmektedir (Krinsky 1992, Powers vd. 2011).

Hücre içi ve hücre dışı ortamda bulunan antioksidanlar enzimatik olan (endojen) ve enzimatik olmayan (ekzojen) antioksidanlar olarak işlev görür ve birbirlerinin tamamlayıcısı olarak davranırlar (Frei vd. 1988, Lobo vd. 2010, Warraich vd. 2020). Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutamil transpeptidaz (GT) başlıca enzimatik antioksidanlara birer örnektir ve enzimatik olmayan antioksidanlara da mineraller (selenyum, çinko), vitaminler (C, E) ve ayrıca ürik asit, ubikinol, tokoferol, retinol ve glutatyon içeren diyet bileşikleri örnek olarak verilebilir (Mommataz ve Abdollahi 2012, Warraich vd. 2020).

## **2.4 Melatonin**

### **2.4.1 Melatonin biyosentezi ve antioksidan etkileri**

Doğada yaygın olarak bulunan ve birçok canlı organizma tarafından üretilen bir molekül olan melatonin, insanlarda esas olarak epifiz bezinde üretilirken daha az ölçüde retina, lenfositler, kemik iliği, gastrointestinal sistem ve timus tarafından da üretilmektedir (Ahmad vd. 2023). Bir indoleamin olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), ağırlıklı olarak epifiz bezi tarafından, esansiyel amino asidin, triptofan hidroksilaz ile hidroksilasyonu yoluyla 5-hidroksi-triptofanı oluşturduktan sonra, 5-hidroksi-triptofanın dekarboksilasyonu, arilalkilamin N-asetiltransferaz enzimi tarafından asetilasyon üzerine melatoninin hemen öncüsü olan N-asetil serotonini üreten anahtar bir nörotransmitter olan 5-hidroksitriptamini (serotonin) vermektedir ve asetil-serotonin-metiltransferaz (ASMT) enzimi, metilasyon süreci boyunca N-asetil serotonini melatonine dönüştürmektedir (Coon vd. 2001, Ahmad vd. 2023) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 İnsanlarda melatonin sentezi yolağı (Coon vd. 2001, Ahmad vd. 2023)

Oksidatif stresi azaltma konusunda oldukça etkili olan melatonin, bunu doğrudan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin detoksifikasyonu şeklinde ve dolaylı olarakta pro-oksidan enzimlerin aktivitesini baskımlarken antioksidan enzimleri uyararak veya Fenton/Haber-Weiss reaksiyonlarında yer alan geçiş metallerini de şelatlayarak gerçekleştirmektedir (Reiter vd. 2016). Ek olarak, klonlanan memeli melatonin reseptörlerinin iki alt tipi MT1 ve MT2 alt tipleridir ve hem MT1 hem de MT2, yedi geçişli transmembran G proteinine bağlı reseptör ailesinin üyeleridir (Claustrat vd. 2005). MT1 reseptörü, adenilil siklaz inhibisyonuna ve fosfolipaz C $\beta$  aktivasyonuna aracılık eden farklı G-proteinlerine bağlanırken, MT2 reseptörü de adenilil siklaz inhibisyonuna bağlanır ve ek olarak çözünür guanilil siklaz yolunu inhibe etmektedir (Claustrat vd. 2005).

Güçlü serbest radikal temizleyiciler için referans olarak gösterilen E vitamininden daha güçlü etkiye sahip olan melatonin, son derece toksik hidroksil radikalini ve diğer oksijen merkezli radikalleri doğrudan temizlemektedir (Claustrat vd. 2005). Literatürde, septik yenidoğanlarla ve asfiktik yenidoğanlarla yapılan iki farklı çalışmada melatonin uygulamasının sağkalım oranını artırdığı gözlenmiştir (Fulia vd. 2001, Gitto vd. 2001, Claustrat vd. 2005). Ayrıca, kronik hemodiyaliz hastaları ile yapılan bir çalışmada da

anemi tedavisi için verilen demir ve eritropoietinin neden olduğu oksidatif stresin, oral melatonin (0,3 mg/kg) uygulaması ile önlendiği belirtilmiştir (Herrera vd. 2001, Claustrat vd. 2005). Ek olarak, melatoninin antioksidan özelliği, beyin ve kalpte, sırasıyla inme ve kalp krizine karşı iyi bir şekilde gözlemlenirken, antiradikal mekanizmaları aracılığıyla, zararlı reğeteli ilağların ve kötüye kullanılan bir ilağ olan metamfetaminin toksisitesini de azalttığı ve tedaviye dirençli kanserleri çeşitli terapötik ajanlara karşı duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Reiter vd. 2016).

Melatonin, lenfoid organlardaki hücrelerde spesifik membran bağlanma bölgeleri ile etkileşim oluşturabilmektedir ve nöroendokrin ile immün-hematopoetik sistemler arasında işlevsel bir bağlantı sağlamaktadır (Claustrat vd. 2005). Buna ek olarak, epifiz bezi ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimler çift yönlüdür çünkü interlökinler ve sitokinler (interferon gama) melatonin sentezini ve salınımını etkilemektedir (Withyachumnarnkul vd. 1990, Claustrat vd. 2005). Güçlü immünomodülatif bir antioksidan olarak bilinen melatonin, birçok hayvan türünde genel bir bağışıklık artırıcı özelliğe sahiptir ve iltihaplanma, hücrel apoptozla mücadele etme, doku fonksiyonunu eski haline getirme amacıyla etkili bir şekilde kullanımı mümkündür (Nelson 2004, Ahmad ve Haldar 2010, Vishwas vd. 2013, Reiter vd. 2016). Ek olarak, çoklu antioksidan etkilerinden dolayı özellikle yaşa bağlı çeşitli hastalıkları geciktirmede ve belki de tedavi etmede faydalı olabileceği düşünölmektedir (Reiter vd. 2016).

### **3. MATERİYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Deney Hayvanları**

Bu çalışmada önceden laboratuvarında bloklanarak muhafaza edilmiş olan, melatonin uygulanmış genç ve yaşlı sıçanların dalak dokuları kullanılmıştır.

#### **3.2 Uygulanan Yöntemler**

##### **3.2.1 Araştırma planı**

##### **Deney grupları**

Çalışmada toplam 16 adet Wistar albino erkek sıçan kullanılmıştır. 6 genç sıçan (3 aylık), kontrol grubu (n=3) ve melatonin verilen deney grubu (n=3) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 10 yaşlı sıçan (24 aylık), kontrol grubu (n=5) ve melatonin verilen deney grubu (n=5) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

- 1) Kontrol grubu (Melatonin verilmeyen genç sıçanlar) (n=3)
- 2) Kontrol grubu (Melatonin verilmeyen yaşlı sıçanlar) (n=3)
- 3) Deney grubu (Melatonin verilen genç sıçanlar) (n=5)
- 4) Deney grubu (Melatonin verilen yaşlı sıçanlar) (n=5)

Çalışmada tüm sıçanlar standart koşullarda  $22 \pm 2$  °C' de 12 saatlik aydınlık/ karanlık döngüsünde (ışıklar 08:00-20:00 saatleri arasında açık) tutularak ve ad libitum yiyecek ve su sağlanmıştır. Melatonin 21 gün boyunca saat 18:00'de %1 etanol:fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde 10 mg/kg/gün dozunda subkutan (sc) olarak uygulanmıştır. Aynı yaştaki kontrol grubundaki sıçanlara aynı dönem için eşit miktarlarda %1 etanol: PBS sc verilmiştir. 3 haftanın sonunda hayvanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında feda edilerek derhal dalak dokuları çıkarılmıştır.

### 3.2.2 Doku kesitlerinin hazırlanması ve boyanması

Doku örnekleri %10'luk formaldehit çözeltisinde tespit edilmiştir. Yaklaşık bir gece akarsu altında kaldıktan sonra %70'lik alkole alınıp bekletilmiştir. Alkol ve parafin serilerinden geçirilerek bloklama yapılmıştır.

#### Alkol serileri

- |                                          |                   |
|------------------------------------------|-------------------|
| 1- %80 alkol                             | 1 saat            |
| 2- %95 alkol                             | 1 saat            |
| 3- Absolü alkol                          | 1 saat            |
| 4- Absolü alkol                          | 1 saat            |
| 5- Ksilen                                | 1,5 saat          |
| 6- Ksilen                                | 1,5 saat          |
| 7- 45°'lik parafin                       | 1,5 saat (2 defa) |
| 8- 55°'lik parafin                       | 1,5 saat (2 defa) |
| 9- 55°'lik parafin ile blok yapılmıştır. |                   |

Bloklanan doku örneklerinden Thermo-Scientific marka mikrotom yardımı ile 4-5 µm kalınlığında kesitler histokimyasal inceleme için normal lamlara alınmıştır. Histopatolojik inceleme için doku kesitleri Hematoksilen-Eozin (H&E), Periyodik asit-Schiff (PAS) ve gümüşleme (retikülin) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

#### 3.2.2.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama yöntemi

1. Parafinin uzaklaştırılması için kesitler iki defa ksilenden geçirilmiştir.

1. Minumum 30 dakika
2. Minumum 30 dakika

2. Ksilenin uzaklaştırılması ve doku suyunun çekilmesi için azalan alkol serilerinden geçirilmiştir.

- |                   |          |
|-------------------|----------|
| Absolü etil alkol | 5 dakika |
| Absolü etil alkol | 5 dakika |
| %95 etil alkol    | 5 dakika |

3. Çeşme suyundan geçirilmiştir.
4. Harris hematoksisleninde boyanmıştır (10-15 dk.).
5. Çeşme suyundan geçirilmiştir.
6. Asit alkolde diferansiye edilmiştir (batırılıp çıkarılmıştır).
7. Tekrar çeşme suyundan geçirilmiştir.
8. Scott'un solüsyonunda 5-10 dk. mavileştirilmiştir.
9. Birkaç dakika suda yıkanmıştır.
10. 1-3 dk. kadar eozinle zıt boyama yapılmıştır.
11. Bir dakika kadar eozinin fazlası gidene kadar akarsuda yıkanmıştır.
12. Kesitlerin suyunu almak için yükselen alkol serilerinden geçirilmiştir.

|                   |          |
|-------------------|----------|
| %95 etil alkol    | 5 dakika |
| Absolü etil alkol | 5 dakika |
| Absolü etil alkol | 5 dakika |
13. Alkolu uzaklaştırmak ve parlaklaştırmak için ksilenden geçirilmiştir

|        |          |
|--------|----------|
| Ksilen | 1-2 saat |
|--------|----------|
14. Entellan ile kapatılmıştır.

### **3.2.2.2 Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama yöntemi**

1. Deparafinizasyon işlemlerinden sonra kesitler distile su ile yıkanmıştır.
2. Periyodik asit solüsyonunda 5 dk. tutulmuştur.
3. Çeşme suyundan geçirildikten sonra distile su ile yıkanmıştır.
4. Schiff solüsyonunda 15 dk. bekletilmiştir.
5. Çeşme suyundan geçirildikten sonra distile su ile yıkanmıştır.
6. Gill III Hematoksilen solüsyonunda 2 dk. tutulmuştur.
7. Çeşme suyundan geçirilmiştir.
8. %95'lik alkol, saf alkol ve ksilolden (her birinden 2'şer kez ve 5 dk.) geçirilerek şeffaflaştırılmıştır ve entellan ile kapatılmıştır.

### **3.2.2.3 Gümüşleme (retikülin) boyama yöntemi**

1. Deparafinizasyon işlemlerinden sonra kesitler distile su ile yıkanmıştır.

2. Asidifiye Potasyum Permanganat ile kesitler 5 dk. okside edilmiştir.
3. Çeşme suyu ile yıkanmıştır.
4. Oksalik asit solüsyonunda kesitler 1 dk. süre ile şeffaflaştırılmıştır.
5. Çeşme suyu ile yıkanmıştır.
6. Ferrik amonyum sülfat solüsyonunda 15 dk. tutulmuştur.
7. Distile su ile 2-3 kere yıkanmıştır.
8. Amonyak gümüş solüsyonunda 12-15 sn. tutulmuştur.
9. Distile su ile 2-3 kere yıkanmıştır.
10. %10'luk formalin solüsyonunda 1-2 dk. tutulmuştur.
11. Distile su ile yıkanmıştır.
12. Sodyum tiyosülfat solüsyonunda 5 dk. tutulmuştur.
13. Sırasıyla %90'lık etanol, %100'lük etanolde 5'er dk., ksilende ise 2'şer kere 30 dk. süre ile bekletilmiştir ve entellan ile kapatılmıştır.

### **3.2.3 Preparatlardan görüntülerin elde edilmesi**

Çalışmada kullanılan preparatlardan, kamera entegreli “Olympus CS50” model ışık mikroskobu kullanılarak farklı büyütme oranlarında (4x, 10x, 20x, 40x) incelenmek üzere mikrograflar elde edilmiştir.

### **3.2.4 Histomorfometrik analiz**

H&E boyalı üç kesitin 4x büyütmede ışık mikrografları elde edilmiştir ve daha sonra bu mikrograflar Adobe Photoshop 24.1.0 programı kullanılarak kesitlerin tam görüntüsü oluşturulacak şekilde işleme tâbi tutularak morfometrik olarak değerlendirilmiştir. Kesitlerde beyaz pulpa (BP) ve kırmızı pulpa (KP) alanlarının toplam dalak alanına oranı ölçülmüştür. Her kesitteki dalak dokusunun toplam alanları, BP alanları ve KP alanları, ImageJ (sürüm 1.53k) görüntü analiz yazılımındaki Fiji dağılımı kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra, toplam BP ve KP alanlarının toplam dalak alanına oranları hesaplanmıştır ve yüzde olarak gösterilmiştir.

### 3.2.5 İstatistiksel analiz

İncelenen her parametre için elde edilen verilerle R versiyon 4.1.2 (2021-11-01) kullanılarak, Bonferroni düzeltmeli, Kruskal-Wallis testi yapılmıştır ve farklılıklar  $p < 0.05$ ' te anlamlı kabul edilmiştir.





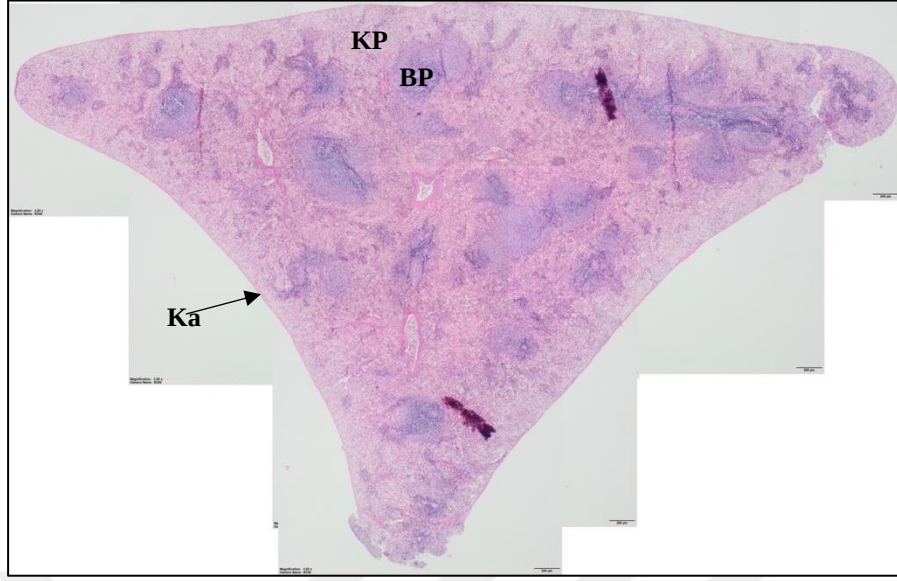
## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1 Histokimyasal Sonuçlar**

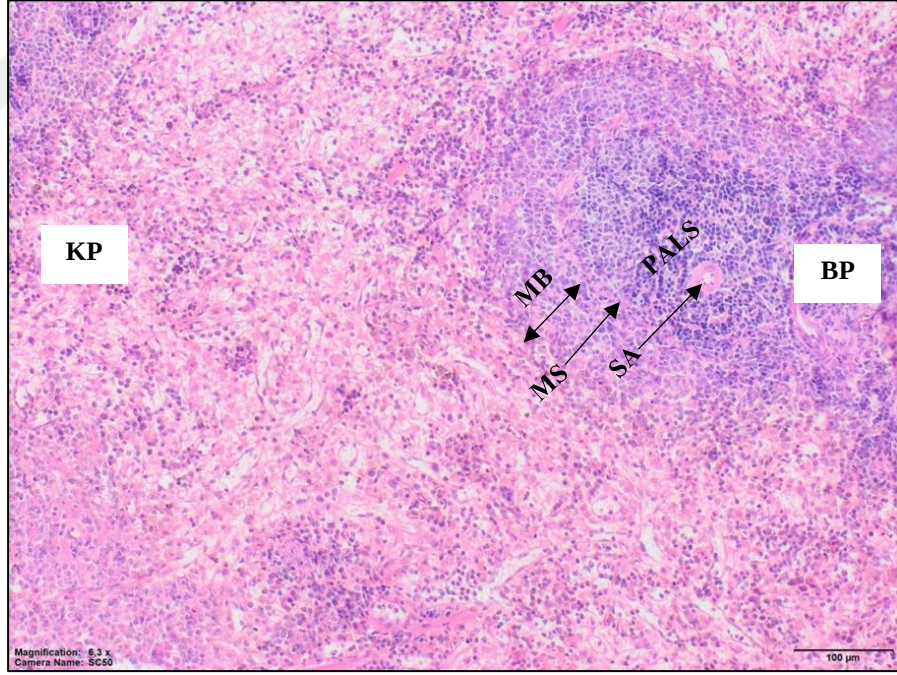
Farklı büyütmelelerde (4x, 10x, 20x, 40x) elde edilen mikrograflar kalitatif olarak analiz edilmiştir ve aşağıdaki sonuçlar gözlenmiştir.

#### **4.1.1 Hematoksilen & Eozin (H&E)**

Genç kontrol grubunda (Grup 1) Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanmış dalak kesitlerinde, kırmızı pulpa ve beyaz pulpanın normal bir dağılım gösterdiği ve dalak kesitinin dış tabakasında yer alan kapsülün ince tabaka halinde dalak kesiti boyunca sürekli bir yapı sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.1). Beyaz pulpa foliküllerinde içten dışa doğru, ilk olarak santral arteriyol ve onu çevreleyen periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), ikinci olarak PALS'ın etrafında sürekli bir şekilde devamlı olan marjinal sinüs ve son olarak beyaz pulpa ve kırmızı pulpayı birbirinden ayıran ve yapıda devamlı ve belirgin şekilde gözlenen marjinal bölge ayırt edilmiştir (Şekil 4.2-4.3). PALS, kesitlerde küçük T-lenfositleri içerdiği için en koyu boyanan bölge olmuştur. Bazı beyaz pulpa foliküllerinde santral arteriyolün çevresinde germinal merkezler de gözlenmiştir (Şekil 4.4). Ayrıca bazı beyaz pulpa foliküllerinde belirgin şekilde marjinal sinüs ile çevrelenmiş ve PALS'a bitişik şekilde komşu foliküller gözlenmiştir (Şekil 4.5-4.6). Kırmızı pulpada venöz sinüs yapıları ve sinüsler arasında uzanan dalak kordonları izlenmiştir. Kırmızı pulpada trabekül yapıları, kan damarları ile birlikte veya damarsız şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.7). Bazı kesitlerde kırmızı pulpada venöz sinüsü döşeyen endotel hücreleri de izlenmiştir (Şekil 4.8).

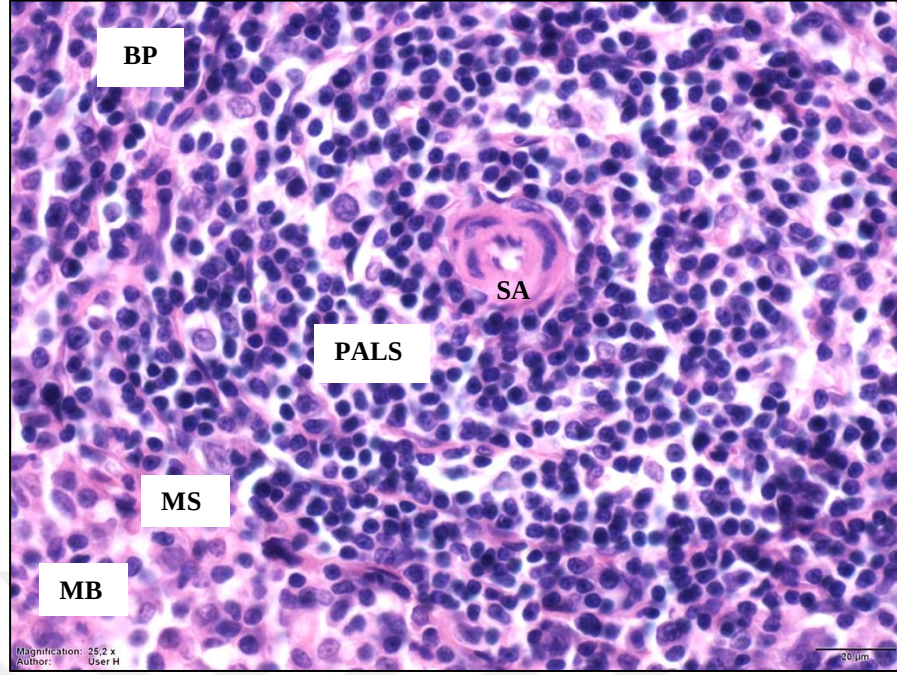


Şekil 4.1 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçanların dalak kesitinin genel görünümü. Beyaz pulpa (BP), kırmızı pulpa (KP), kapsül (Ka). H&E, Bar: 200 µm

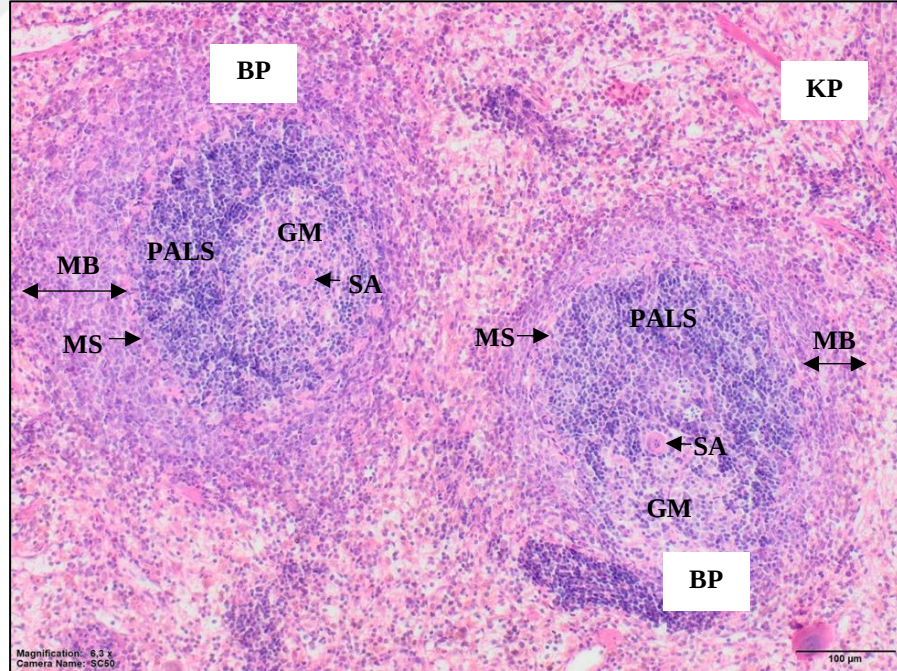


Şekil 4.2 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülü (BP), santral arteriyol (SA), marjinal sinüs (MS), marjinal bölge (MB) ve kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm



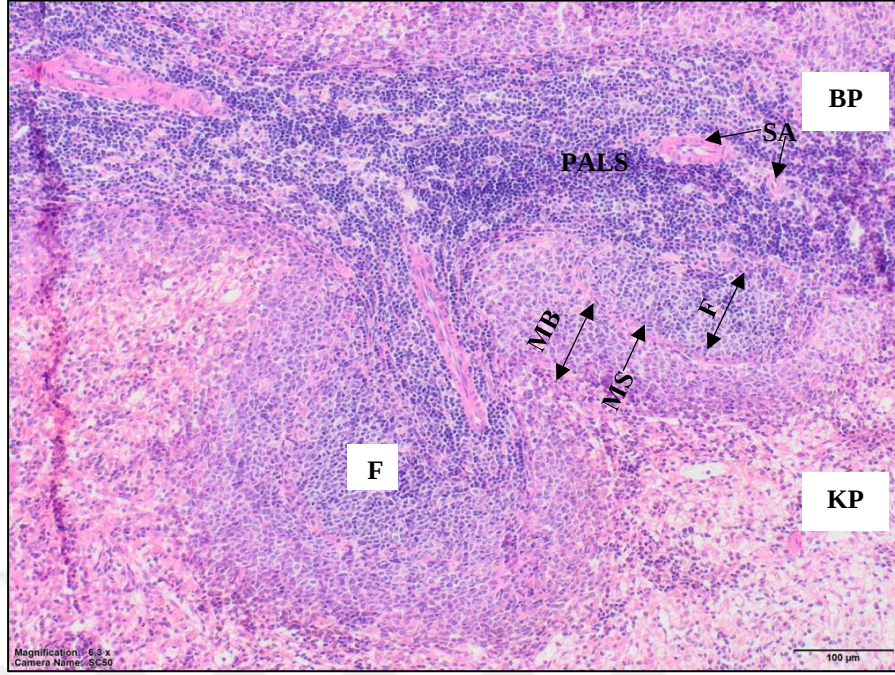


Şekil 4.3 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS). Santral arteriyol (SA), marjinal sinüs (MS), marjinal bölge (MB). H&E, Bar: 20 µm

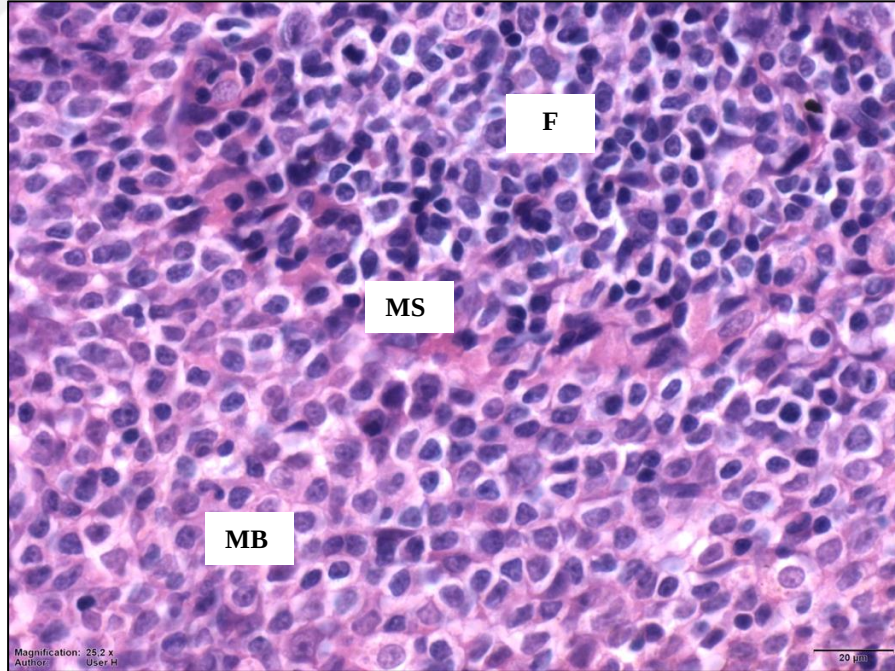


Şekil 4.4 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa foliküllerinde (BP) santral arteriyolleri (SA) çevreleyen germinal merkezler (GM). Periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal sinüs (MS), marjinal bölge (MB), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm



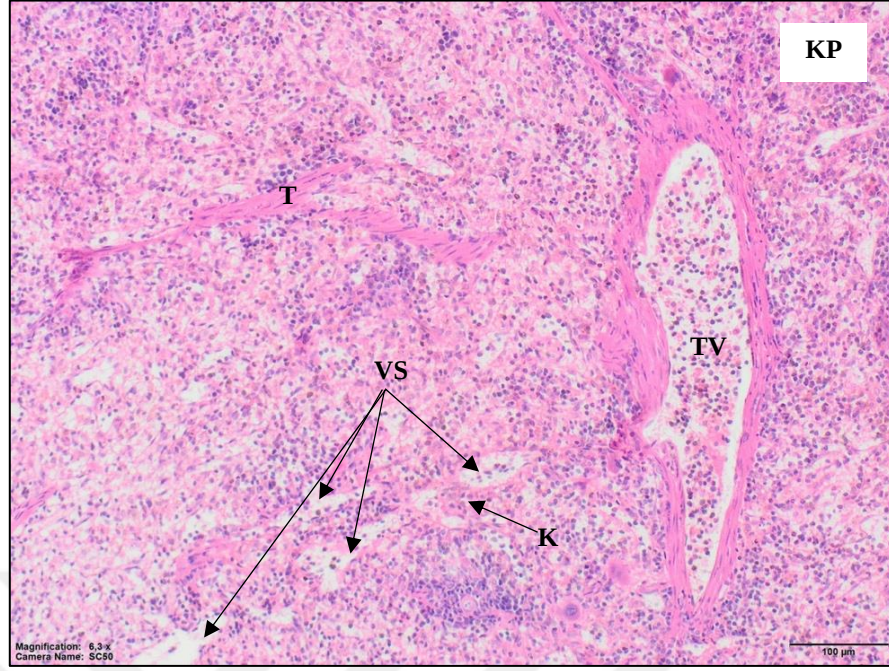


Şekil 4.5 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, komşu folikülleri (F) olan bir beyaz pulpa folikülü (BP). Santral arteriyol (SA), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal sinüs (MS), marjinal bölge (MB), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm

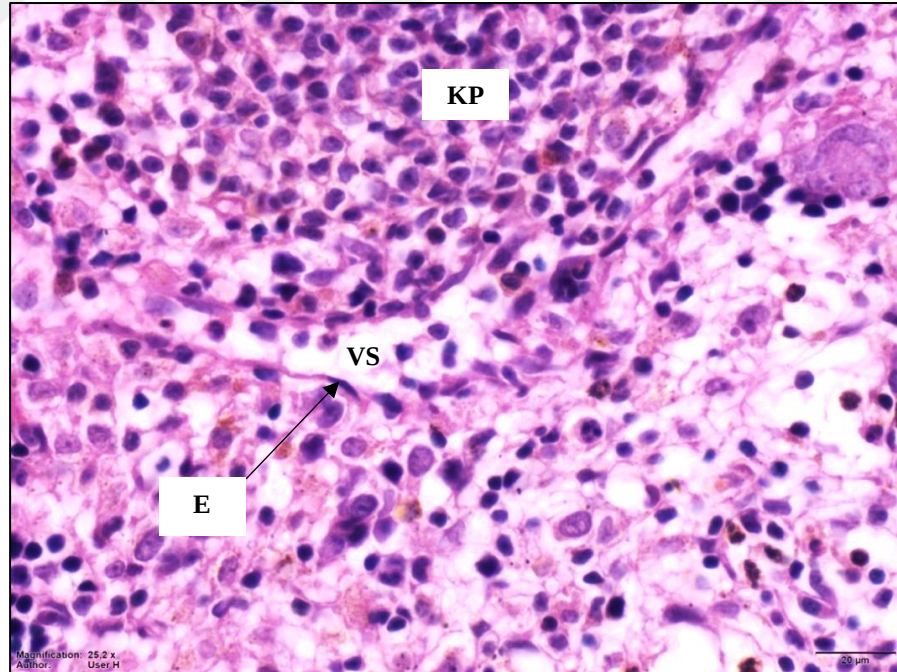


Şekil 4.6 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, bir komşu folikül (F) ve onu çevreleyen marjinal sinüs (MS). Marjinal bölge (MB). H&E, Bar: 20 µm



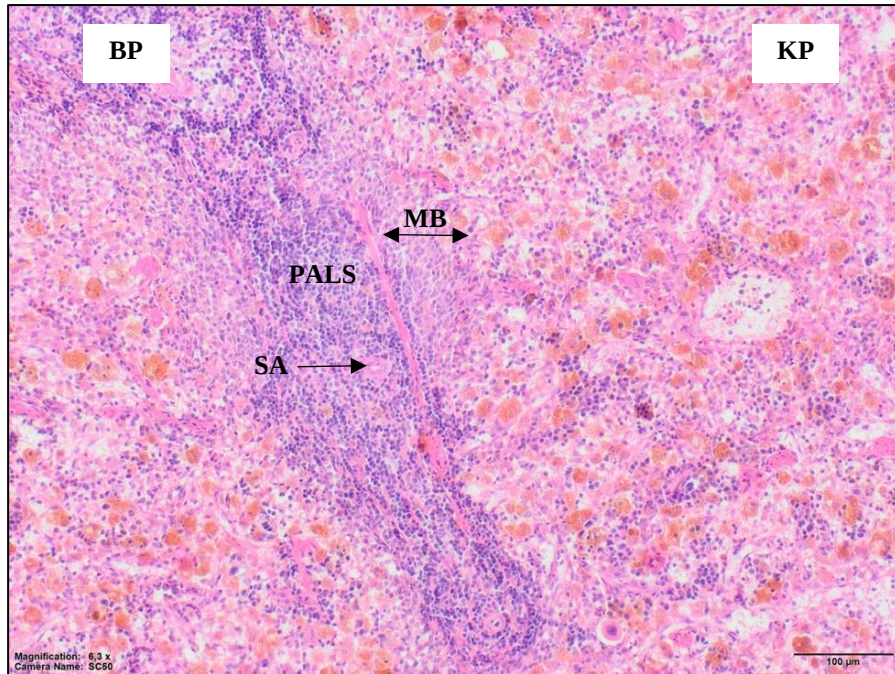


Şekil 4.7 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) gözlenen trabekül (T), trabeküler ven (TV), venöz sinüs (VS) yapıları ve sinüsler arasında uzanan dalak kordonları (K). H&E, Bar: 100 µm



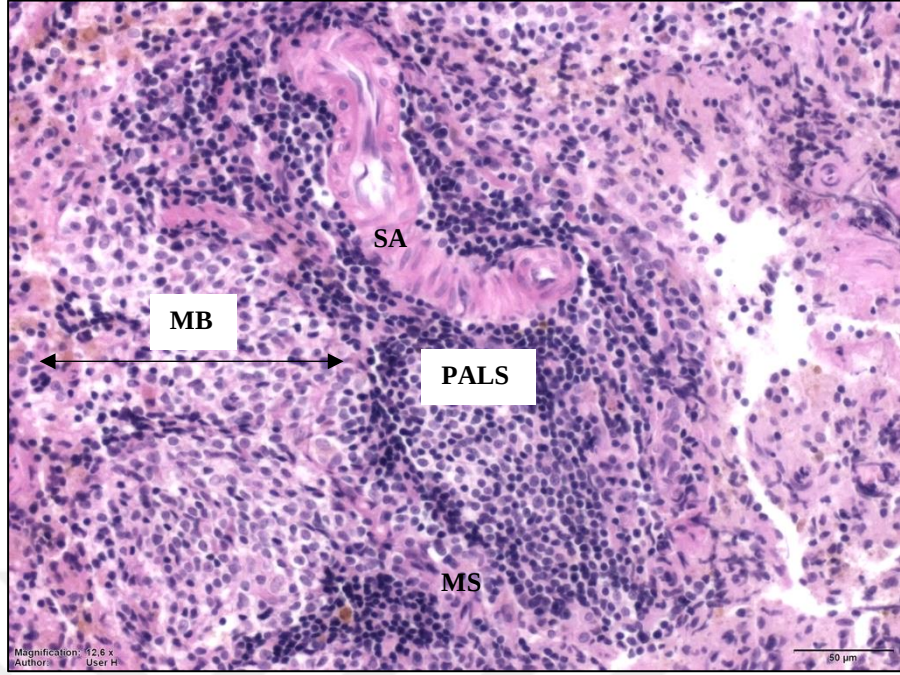
Şekil 4.8 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) venöz sinüs (VS) ve endotel hücreleri (E). H&E, Bar: 20 µm

Yaşlı kontrol grubu sıçanların (Grup 2) H&E ile boyanmış dalak kesitleri, kontrol grubu genç sıçanların dalak kesitleriyle karşılaştırıldığında beyaz pulpada santral arteriyol ve PALS yapılarının gözlenmesi ile birlikte beyaz pulpa morfolojilerinin, farklılaşan bir görünüm sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.9-4.10). Bazı beyaz pulpa foliküllerinin atrofiye uğradığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.11). Genel olarak beyaz pulpa foliküllerinde, PALS ve marjinal bölge arasında genç kontrol grubu sıçanlarda net bir şekilde gözlenen marjinal sinüs yapısı, yaşlı kontrol grubu sıçanlarda, PALS ve marjinal bölge sınırında sürekli olmayan bir görünüm sergilemiş ve belirsizleşmiştir (Şekil 4.12). Kesitlerde, marjinal bölgelerin zayıf bir şekilde gözlenmiş olması nedeniyle beyaz pulpa ile kırmızı pulpa arasındaki sınırların belirsizleştiği ve bu alanlar arasında net olmayan sınırların olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Kırmızı pulpada, şişmiş endotel hücreleri de bulunan büyük ve küçük boyutlarda venöz sinüsler gözlenmiştir (Şekil 4.13-4.14). Ayrıca, kırmızı pulpada anormal dağılım gösteren kalınlaşmış trabekül yapıları da tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Ek olarak, kırmızı pulpada belirgin hemosiderin pigment artışı ve bazı venöz sinüslerin lümeninde içi boş yapılar şeklinde gözlenen hasarlı eritrositler dikkati çekmiştir (Şekil 4.16).

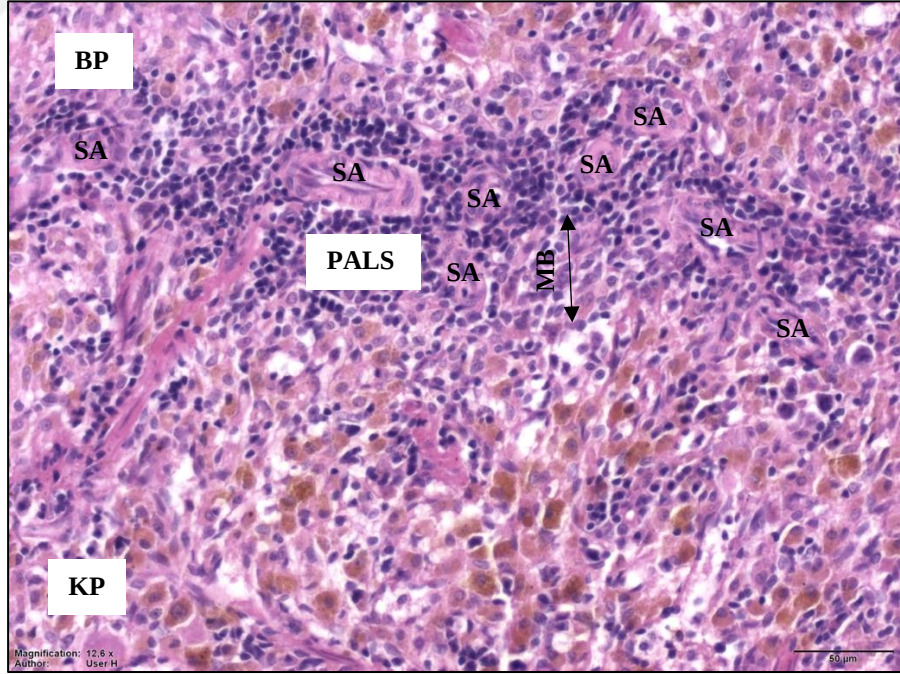


Şekil 4.9 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, morfolojisi farklılaşmış beyaz pulpa folikülü (BP). Santral arteriyol (SA), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal bölge (MB), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm



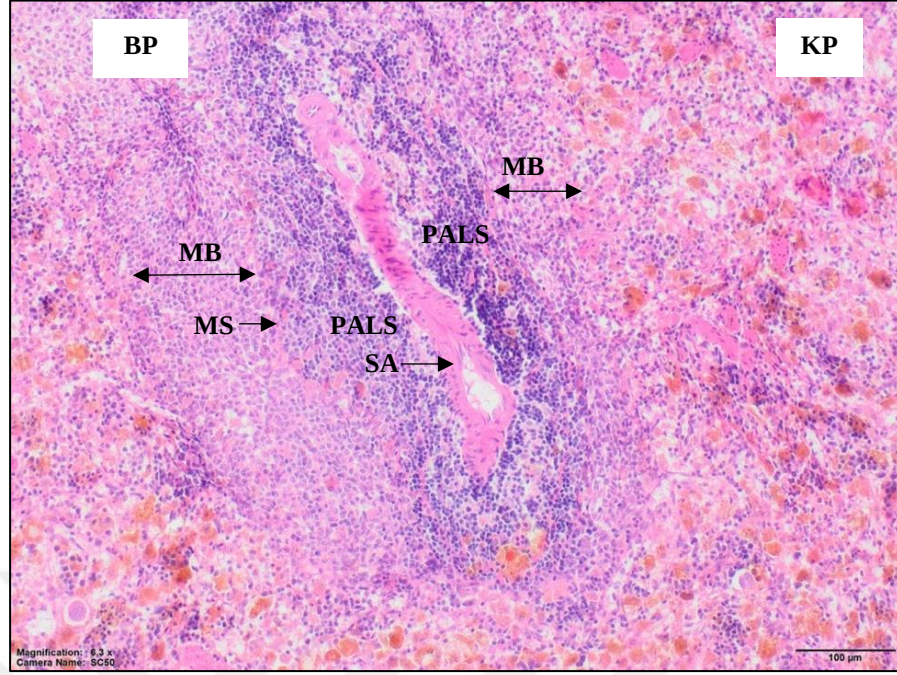


Şekil 4.10 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, morfolojisi farklılaşmış bir beyaz pulpa folikülü (BP). Santral arteriyol (SA), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal sinüs (MS), marjinal bölge (MB). H&E, Bar: 50 µm

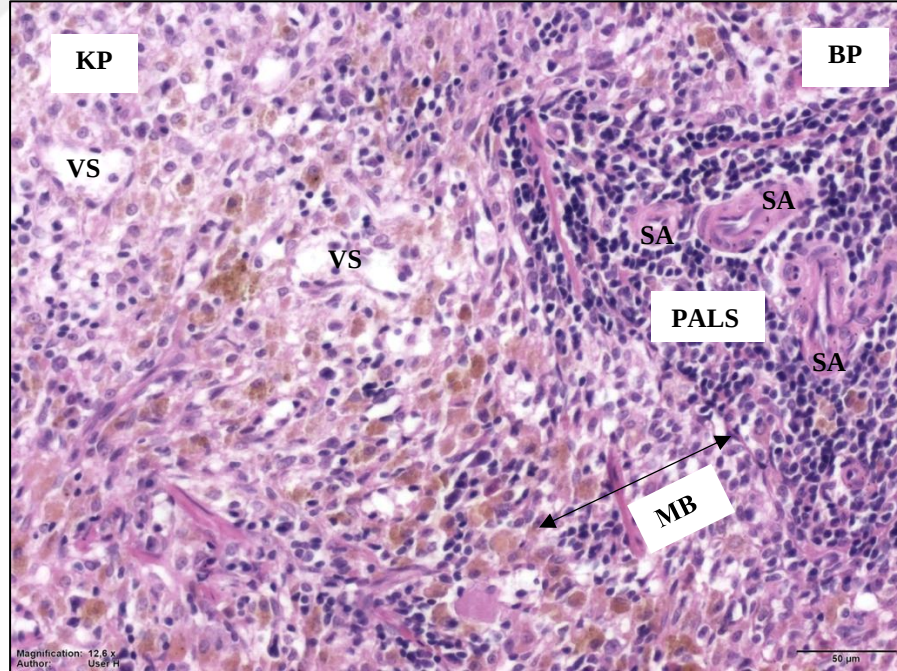


Şekil 4.11 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, atrofiye uğramış bir beyaz pulpa folikülü (BP). Santral arteriyol (SA), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal bölge (MB), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 50 µm



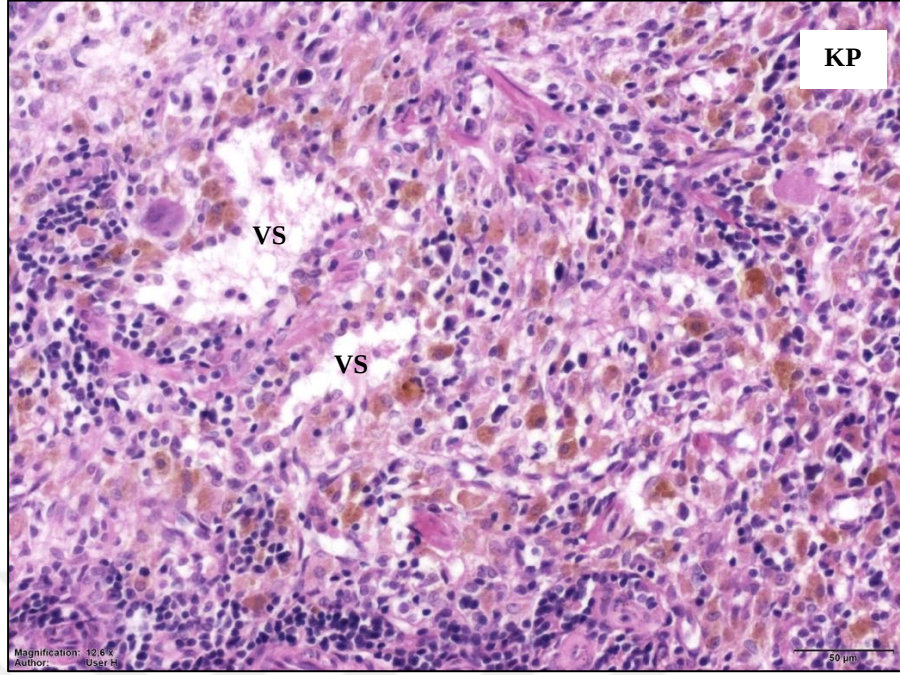


Şekil 4.12 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, marjinal sinüsü (MS) belirsizleşmiş beyaz pulpa folikülü (BP). Santral arteriyol (SA), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal sinüs (MS), marjinal bölge (MB), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm

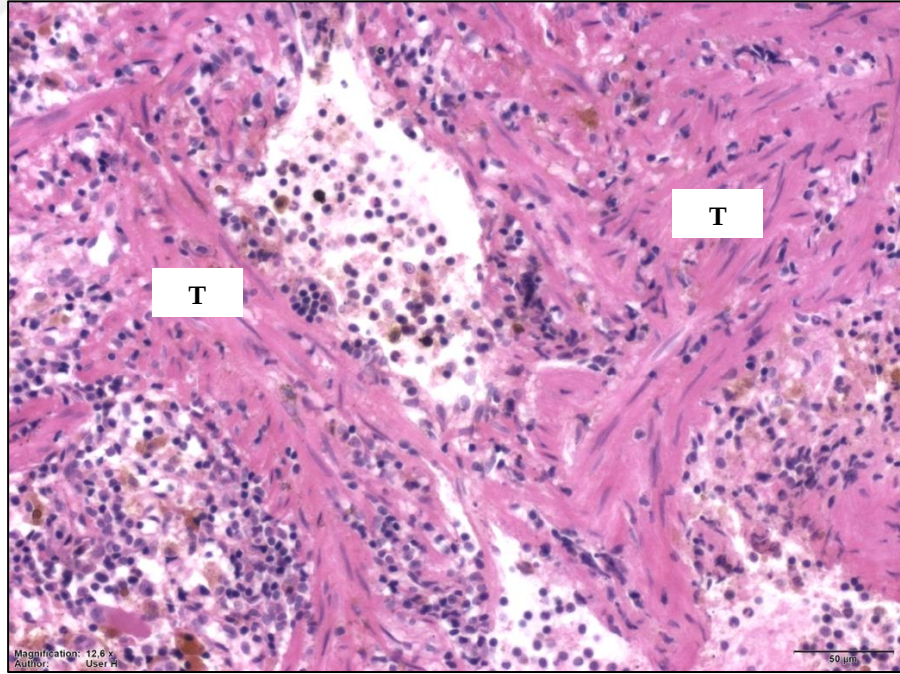


Şekil 4.13 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) belirsizleşmiş marjinal bölge (MB) ve kırmızı pulpada (KP) gözlenen venöz sinüsler (VS). Santral arteriyoller (SA), periarteriyol lenfoid kılıf (PALS). H&E, Bar: 50 µm

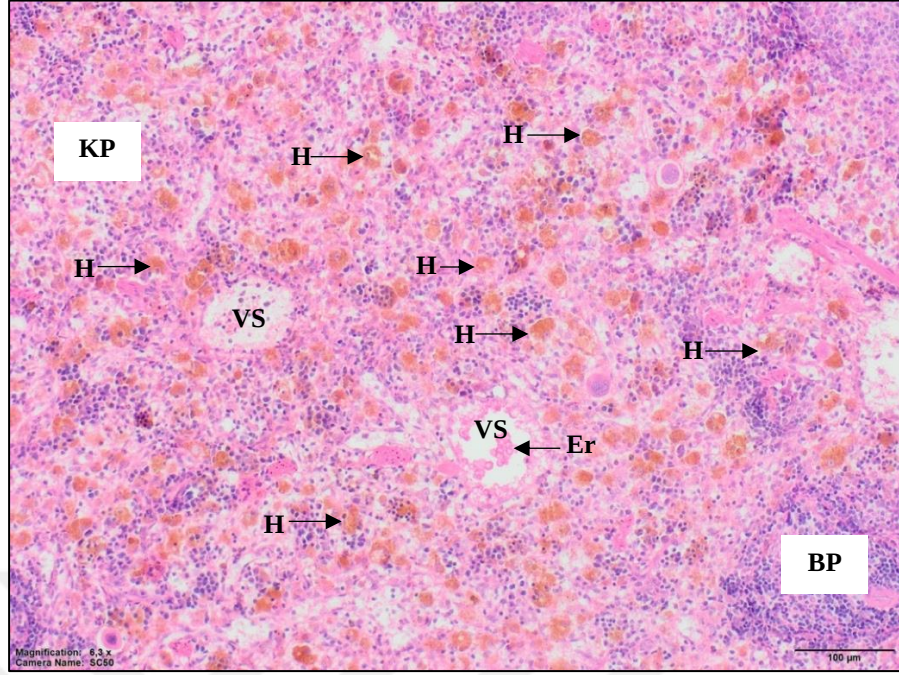




Şekil 4.14 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) deforme olmuş farklı boyutlarda venöz sinüsler (VS). H&E, Bar: 50 µm



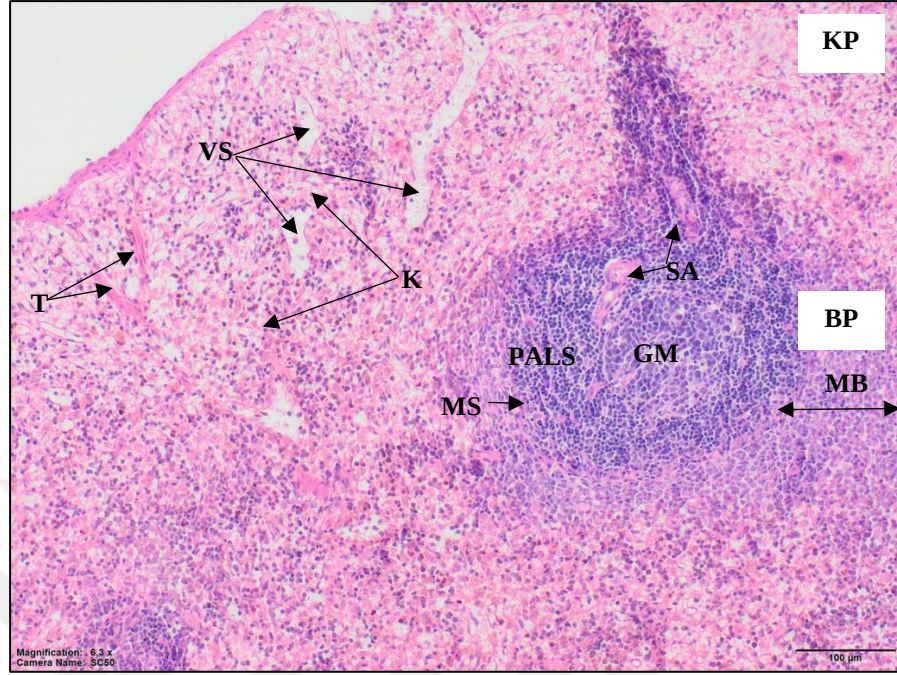
Şekil 4.15 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, anormal dağılım gösteren kalınlaşmış trabekül (T) yapıları. H&E, Bar: 50 µm



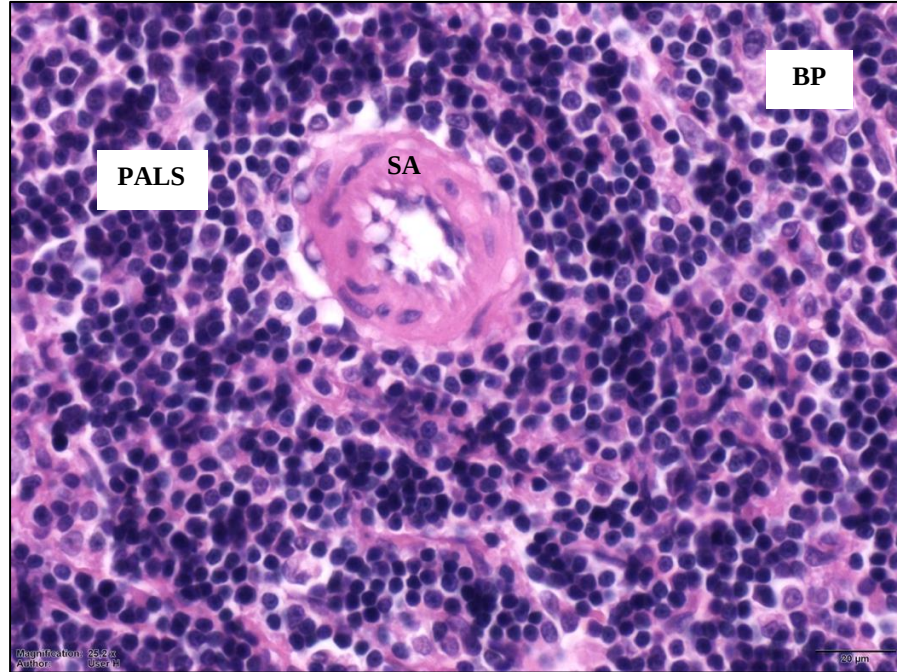
Şekil 4.16 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpaya (KP) dağılmış şekilde hemosiderin pigmentleri (H) ve venöz sinüste (VS) hasarlı eritrosit hücreleri (Er). Beyaz pulpa (BP). H&E, Bar: 100 µm

Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) H&E ile boyanmış sıçan dalak kesitleri, genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalak kesitleri ile karşılaştırıldığında beyaz pulpada, santral arteriyollerin çevresinde PALS alanları gözlenirken bazı beyaz pulpa foliküllerinde bulunan germinal merkezlerin, santral arteriyolleri çevrelediği ve santral arteriyollerin, germinal merkezin kenarında bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17). Ayrıca, genel olarak kırmızı pulpada, venöz sinüslerin düzenli görünüm sergilediği gözlenirken, trabekül yapılarının da sağlıklı ve kırmızı pulpada dağınık şekilde görünüm sergilediği gözlenmiştir. Venöz sinüslerin aralarında dalak kordonları da ayırt edilmiştir (Şekil 4.17). Kesitlerde, PALS bölgesinde güçlü boyama da gözlenmiştir (Şekil 4.18). Kontrol grubu genç sıçanların dalak kesitleriyle benzer özellikler gözlenmiştir ve genç kontrol grubu (Grup 1) kesitlerine göre genç deney grubunun kesitlerinde, beyaz pulpada bulunan marjinal sinüslerin hem PALS çevresinde hem de kesitlerde gözlenen komşu foliküllerin çevresinde daha fazla belirginleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.19-4.20). Ek olarak, T-lenfosit alanı (PALS) ve B-lenfosit alanlarının (marjinal bölge) genç kontrol grubunda (Grup 1) gözlenenlere göre daha sıkı paketlenmiş bir görünüm sergilemesi dikkati çekmiştir (Şekil 4.21-4.22).



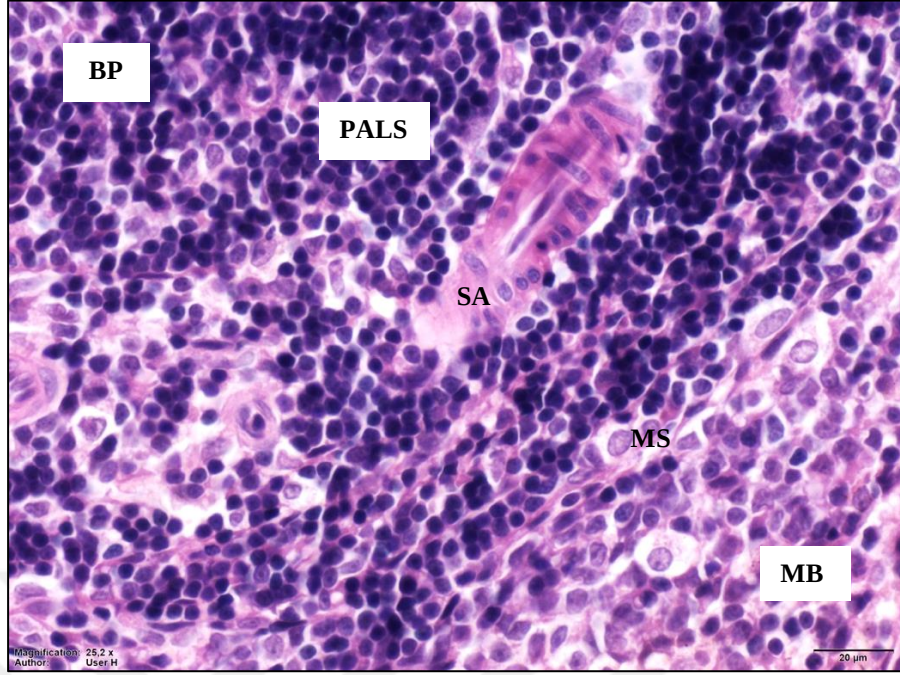


Şekil 4.17 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) ve kırmızı pulpada (KP) gözlenen yapılar. Venöz sinüs (VS), trabekül (T), dalak kordonları (K), marjinal bölge (MB), marjinal sinüs (MS), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), germinal merkez (GM), santral arteriyoller (SA). H&E, Bar: 100 µm

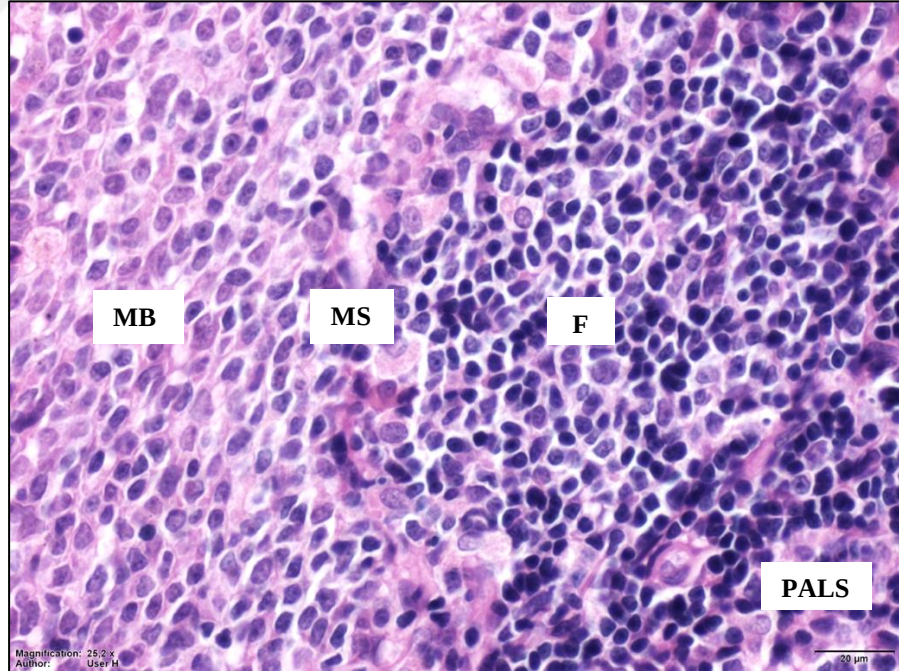


Şekil 4.18 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA). H&E, Bar: 20 µm



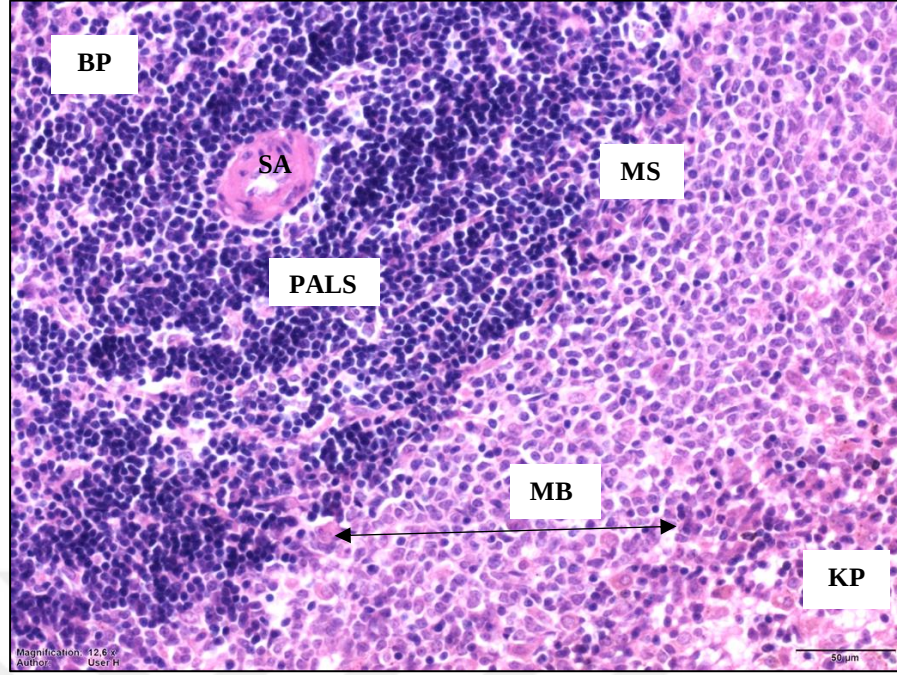


Şekil 4.19 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında beyaz pulpa folikülünde (BP), marjinal sinüs (MS). Periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA), marjinal bölge (MB). H&E, Bar: 20 µm

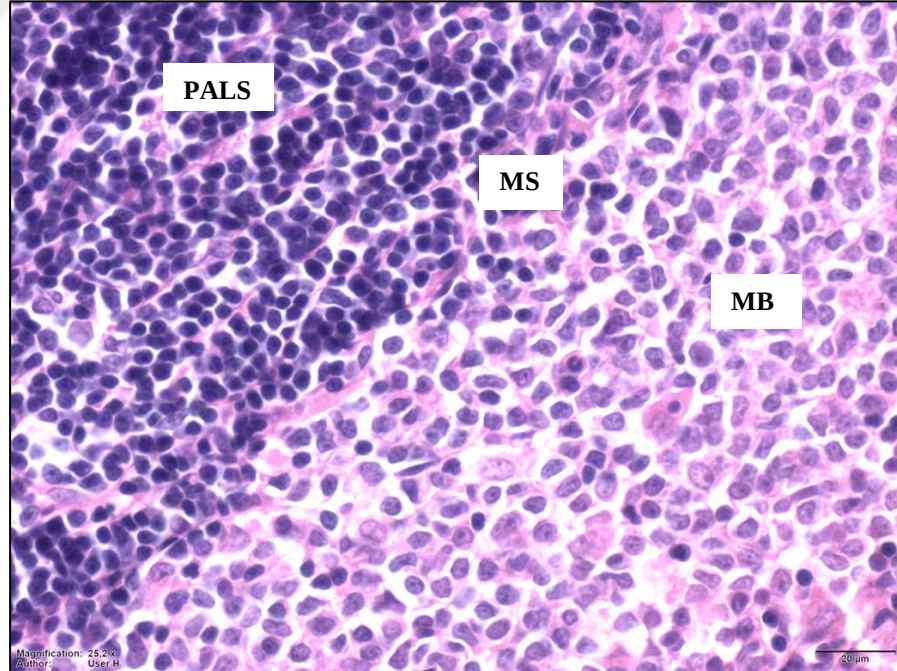


Şekil 4.20 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpanın komşu folikülü (F) çevresindeki marjinal sinüs (MS). Periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), marjinal bölge (MB). H&E, Bar: 20 µm





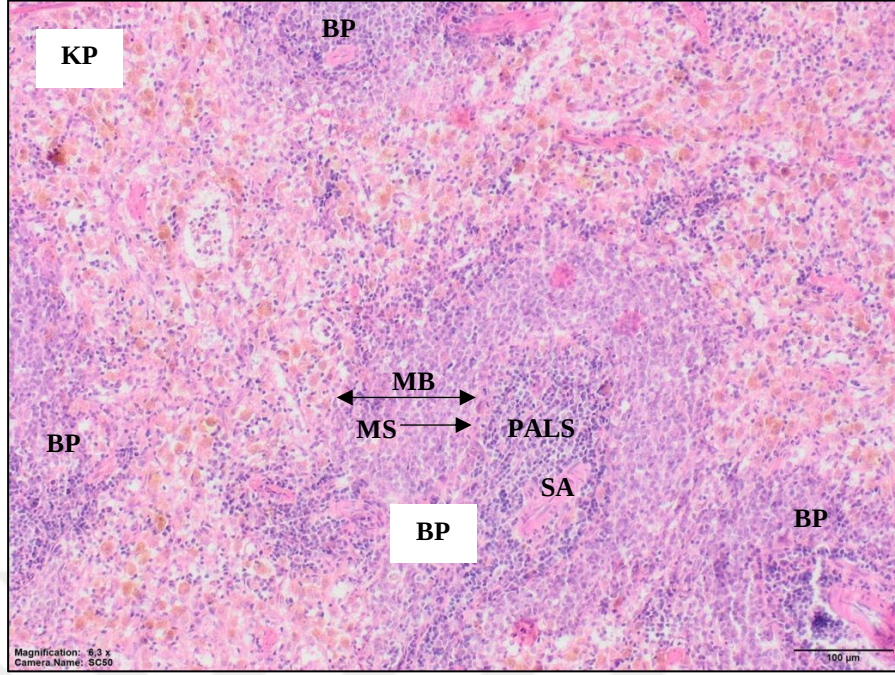
Şekil 4.21 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, hücreleri, sıkı paketlenmiş görünüm sergileyen periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) ve marjinal bölge (MB) alanları. Beyaz pulpa (BP), marjinal sinüs (MS), santral arteriyol (SA) ve kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 50 µm



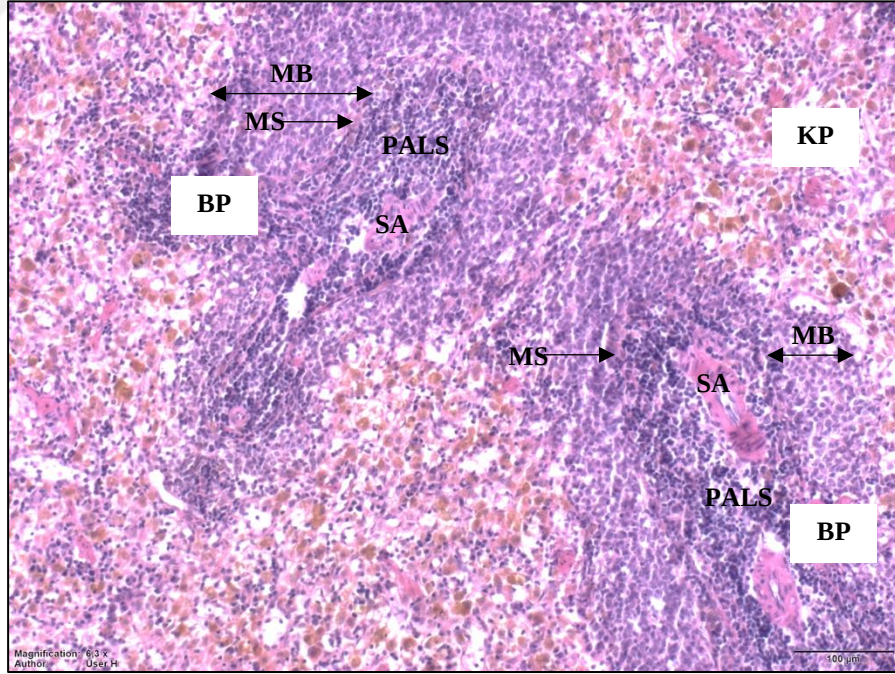
Şekil 4.22 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, hücreleri, sıkı paketlenmiş görünüm sergileyen periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) ve marjinal bölge (MB) alanları. Marjinal sinüs (MS). H&E, Bar: 20 µm

H&E ile boyanmış son grup olan melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağı kesitlerinde, beyaz pulpa ve kırmızı pulpa alanlarının yaşlı kontrol gruplarına (Grup 2) göre sınırlarının daha net olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23-4.24). PALS bölgelerinde güçlü boyamalar gözlenmiştir (Şekil 4.25-4.27). Ayrıca, sağlıklı görünüme sahip bazı beyaz pulpa foliküllerinde santral arteriyollerini çevreleyen germinal merkezler de dikkati çekmiştir (Şekil 4.28-4.29). Genç kontrol grubu (Grup 1) ve genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalak kesitleriyle benzer olarak, melatonin uygulanmış yaşlı sıçan dalak kesitlerinde, marjinal sinüsler, PALS çevresinde birçok beyaz pulpada düzgün ve belirgin şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.30-4.31). Kesitlerde, kırmızı pulpa ve beyaz pulpa alanlarını ayıran marjinal bölgeler de birçok beyaz pulpada da düzgün ve belirgin şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.32-4.33). Ayrıca, B lenfosit alanları (marjinal bölge) ve T lenfosit alanlarının (PALS) sıkı bir şekilde paketlenmiş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.34-4.35). Kırmızı pulpada bulunan trabekül yapıları yaşlı kontrol grubu (Grup 2) ile karşılaştırıldığında yoğunlaşmamış şekilde, genç kontrol grubu (Grup 1) ile benzer olarak kırmızı pulpada dağınık şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.36). Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçanların dalak kesitleriyle karşılaştırıldığında, melatonin uygulanmış yaşlı sıçanların doku kesitlerinde venöz sinüslerin girintili çıkıntılı kıvrımlı ağ oluşturan yapısal bütünlüğü ve aralarında dalak kordonları izlenebilmiştir (Şekil 4.37-4.38). Kırmızı pulpada hemosiderin pigmentlerinin soluk renge boyanmış olduğu kesitlerde, hemosiderin pigmentlerinin dokuda azalmış bir görüntü sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.38). Ayrıca hem beyaz pulpada hem de kırmızı pulpada lenfosit alanlarındaki artış nedeniyle, lenfosit yoğunluğunun yaşlı kontrol grubuna (Grup 2) göre arttığı da dikkati çekmiştir (Şekil 4.39).



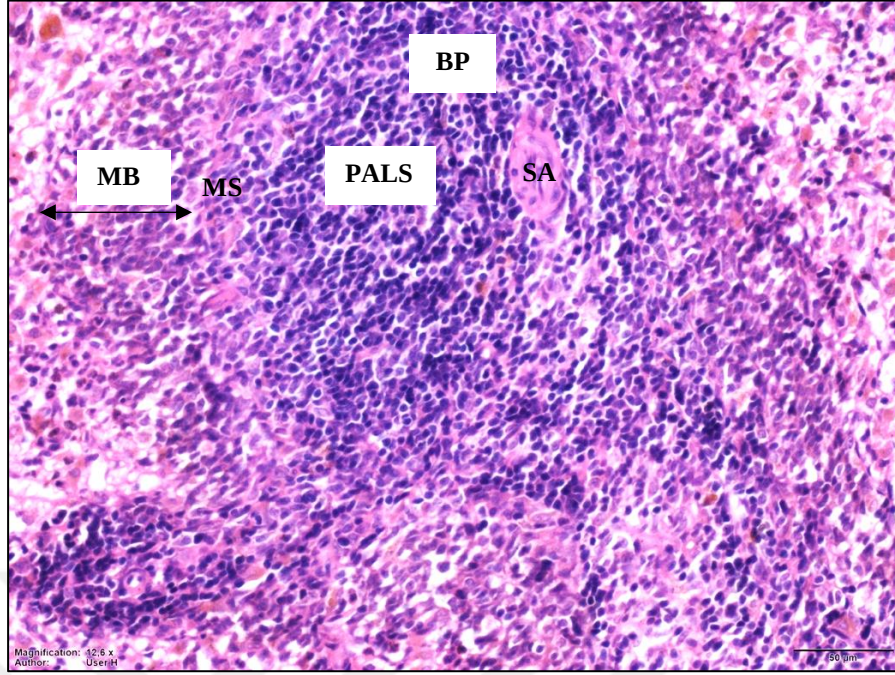


Şekil 4.23 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülü (BP). Marjinal bölge (MB), marjinal sinüs (MS), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm

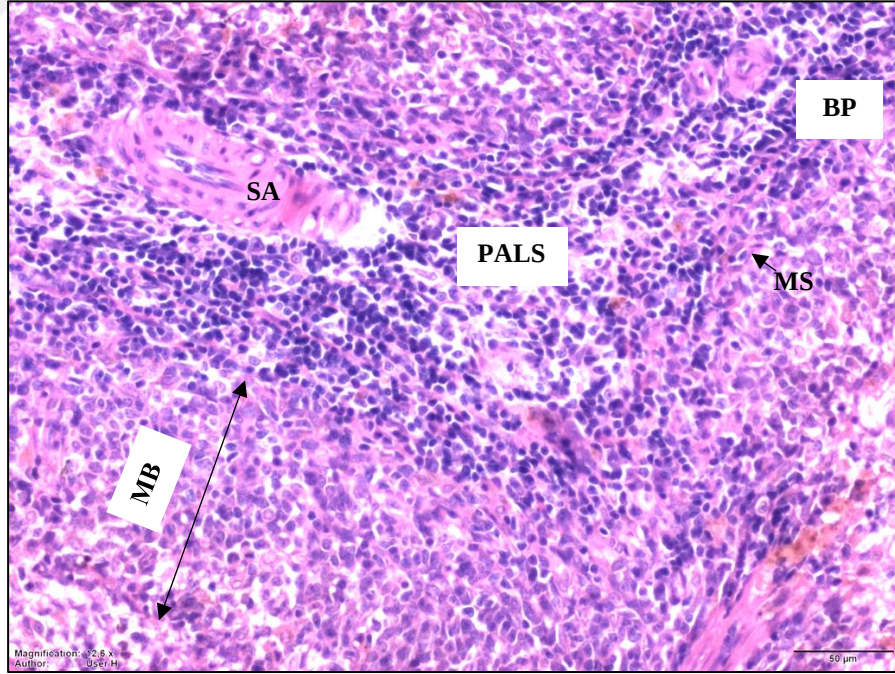


Şekil 4.24 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülleri (BP). Marjinal bölge (MB), marjinal sinüs (MS), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm



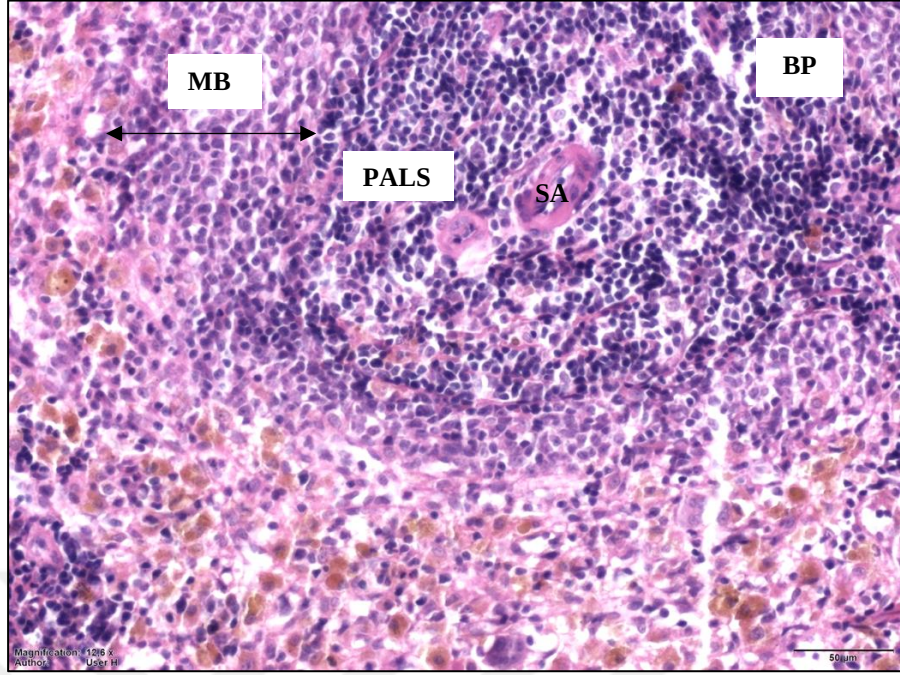


Şekil 4.25 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) koyu boyanmış periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) alanı. Marjinal bölge (MB), marjinal sinüs (MS), santral arteriyol (SA). H&E, Bar: 50 µm

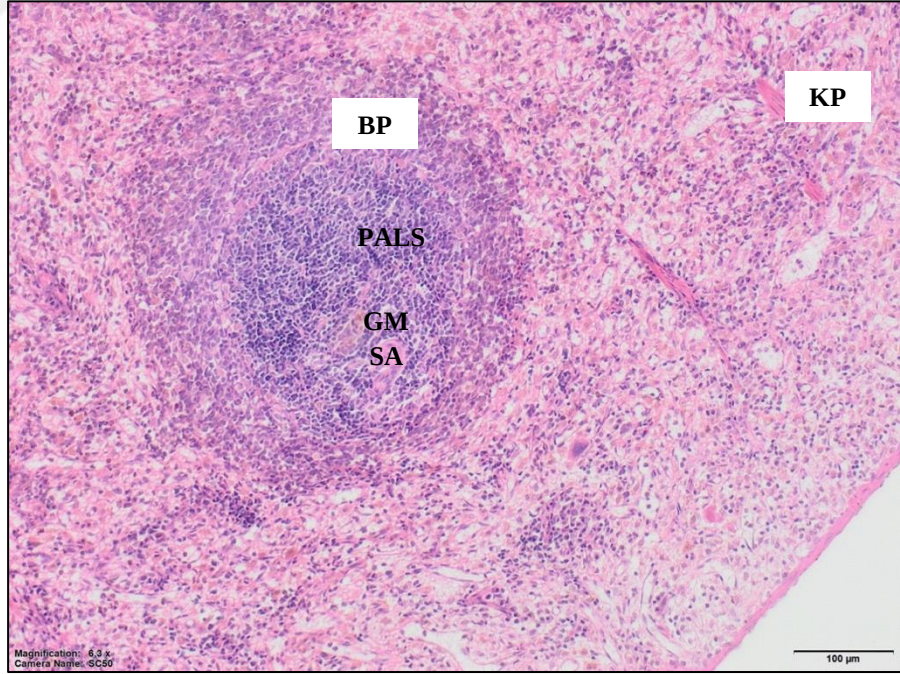


Şekil 4.26 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) alanı. Marjinal bölge (MB), marjinal sinüs (MS), santral arteriyol (SA). H&E, Bar: 50 µm



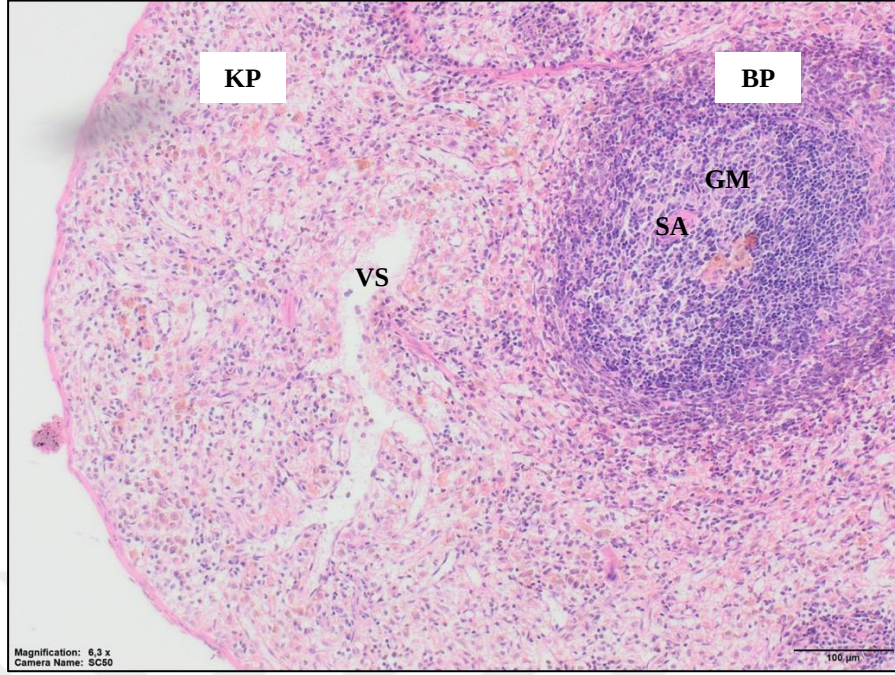


Şekil 4.27 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) periarteriolar lenfoid kılıf (PALS). Marjinal bölge (MB), marjinal sinüs (MS), santral arteriyol (SA). H&E, Bar: 50 µm

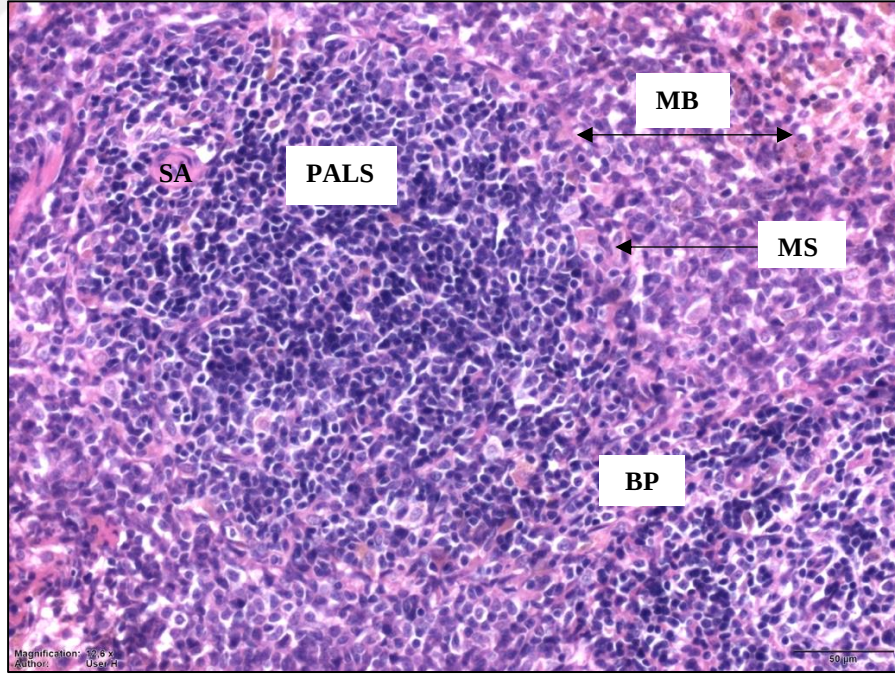


Şekil 4.28 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) santral arteriyolü (SA) çevreleyen germinal merkez (GM). Periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm



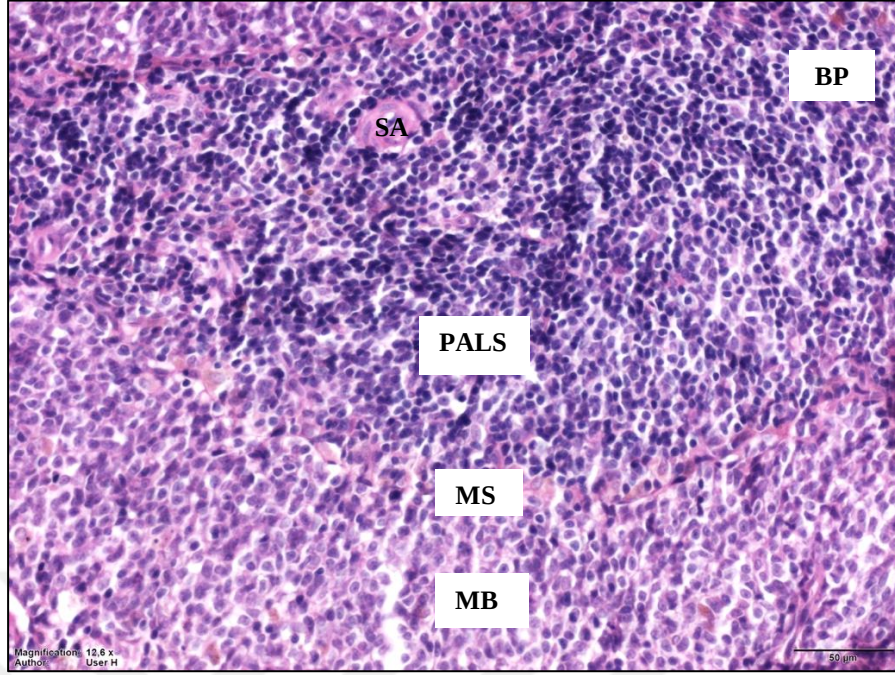


Şekil 4.29 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) santral arteriyölü (SA) çevreleyen germinal merkez (GM). Periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), kırmızı pulpa (KP), venöz sinüs (VS). H&E, Bar: 100 µm

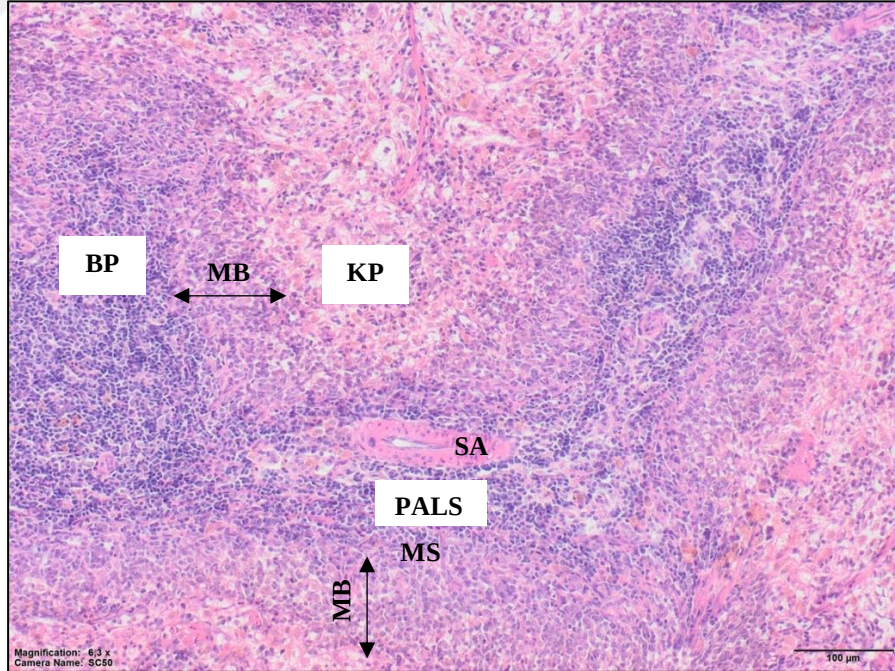


Şekil 4.30 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal sinüs (MS). Marjinal bölge (MB), santral arteriyöl (SA), Periarteriolar lenfoid kılıf (PALS). H&E, Bar: 50 µm



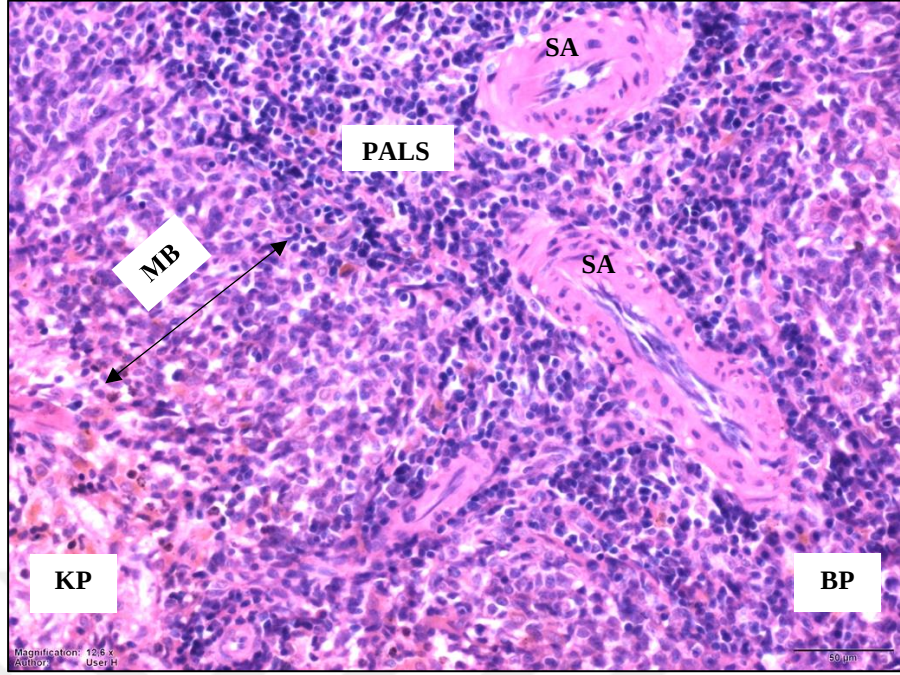


Şekil 4.31 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal sinüs (MS). Marjinal bölge (MB), santral arteriyol (SA), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS). H&E, Bar: 50 µm

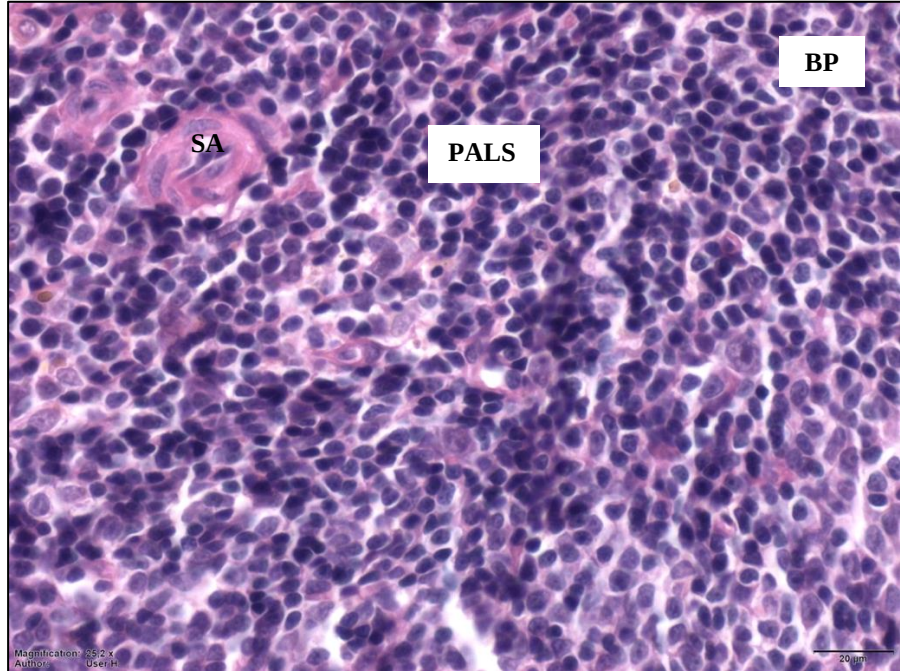


Şekil 4.32 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal bölge (MB). Marjinal sinüs (MS), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA) ve kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm



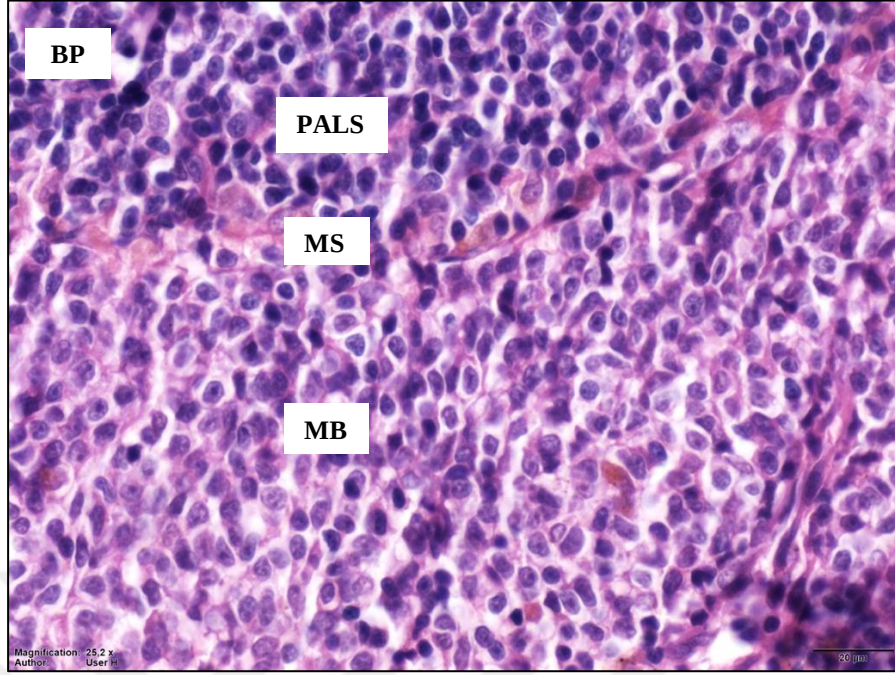


Şekil 4.33 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) belirgin marjinal bölge (MB). Marjinal sinüs (MS), periarteriolar lenfoid kılıf (PALS), santral arteriyol (SA) ve kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 50 µm

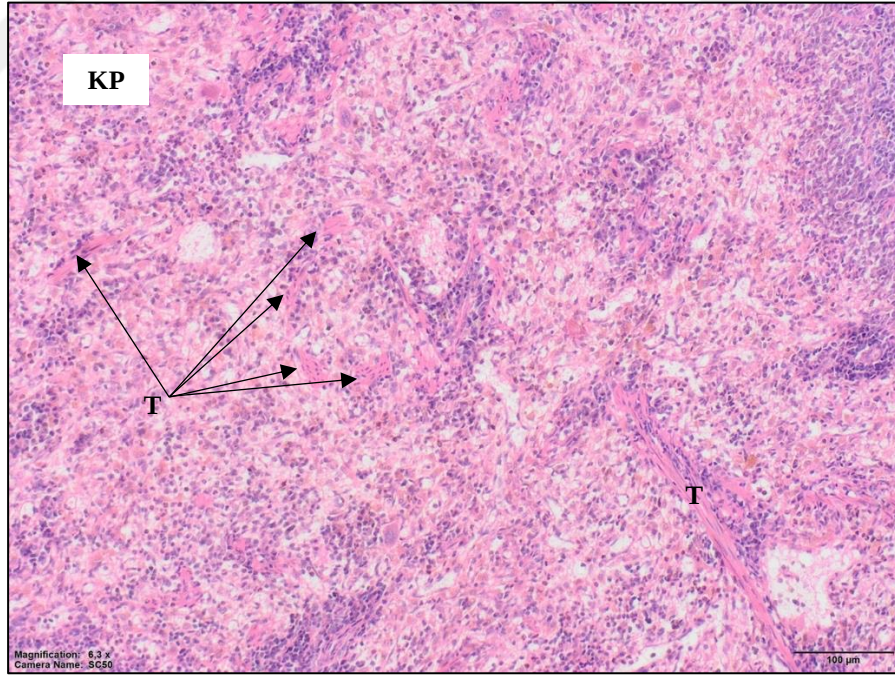


Şekil 4.34 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıfta (PALS) sıkı paketlenmiş hücreler. H&E, Bar: 20 µm



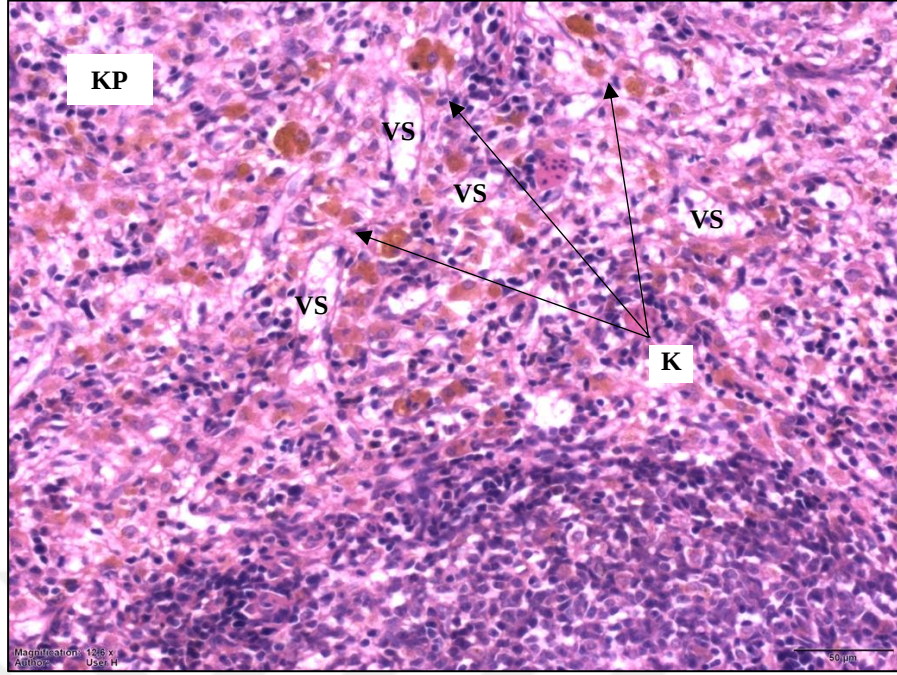


Şekil 4.35 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) periarteriolar lenfoid kılıfta (PALS) ve marjinal bölgede (MB) hücrelerin sıkı paketlenmiş görünümü. Marjinal sinüs (MS). H&E, Bar: 20 µm

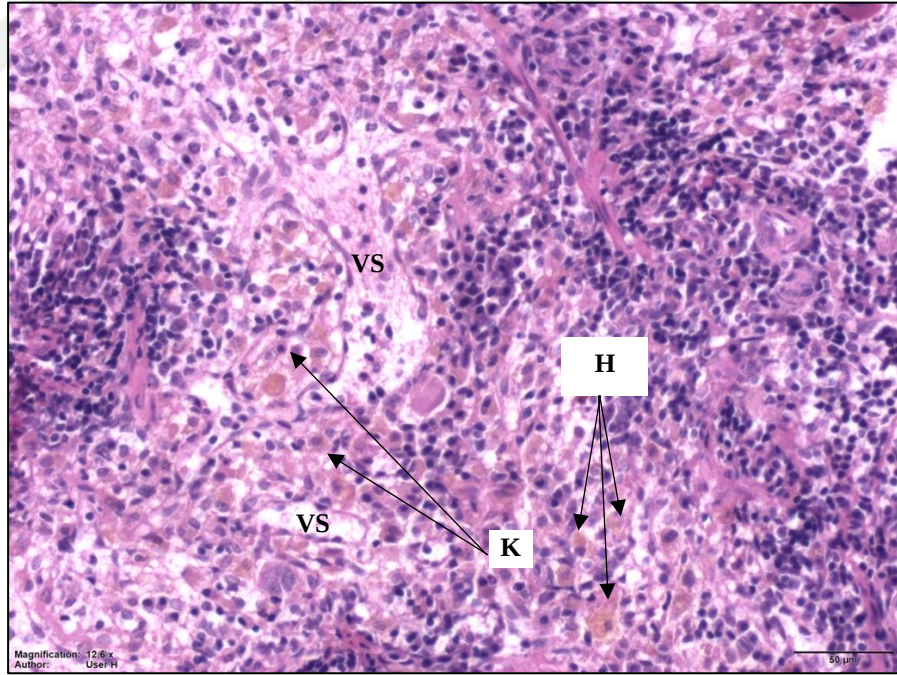


Şekil 4.36 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) trabekül (T) yapıları. H&E, Bar: 100 µm

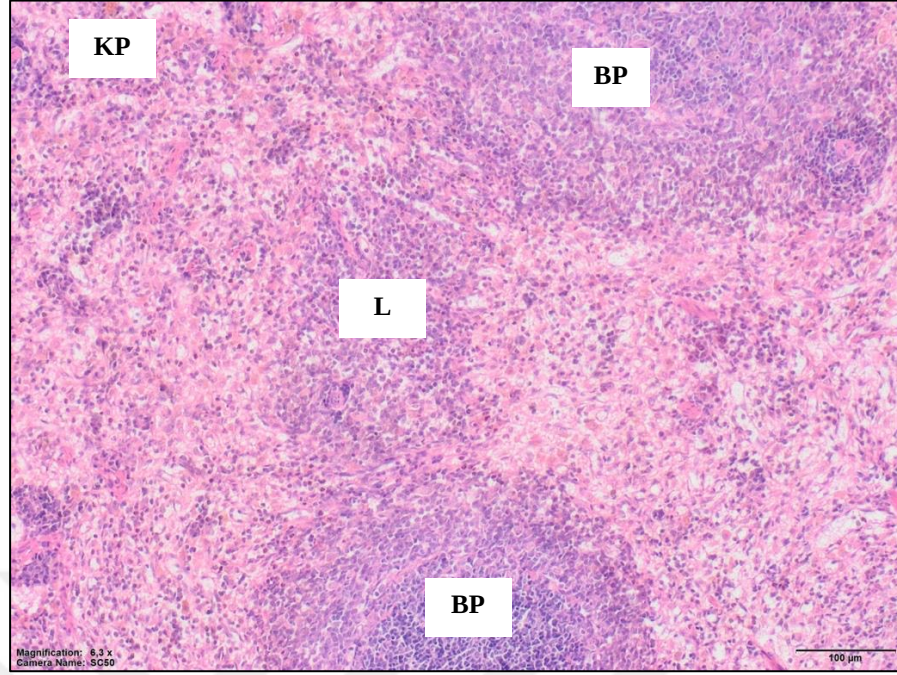




Şekil 4.37 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) venöz sinüsler (VS) ve dalak kordonları (K). H&E, Bar: 50 µm



Şekil 4.38 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) farklı boyutlarda venöz sinüsler (VS), dalak kordonları (K) ve soluk renkli hemosiderin pigmentleri (H). H&E, Bar: 50 µm



Şekil 4.39 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, iki beyaz pulpa folikülü (BP) arasında kümelenmiş lenfositler (L). Kırmızı pulpa (KP). H&E, Bar: 100 µm

Mikrograf verilerinden elde ettiğimiz yukarıda yer alan bu sonuçlar kalitatif olarak aşağıdaki çizelgede özetle listelenmiştir. Gruplara göre değerlendirdiğimiz histolojik karakterler, incelediğimiz kesitlerdeki gözlenme seviyelerine göre aşağıdaki çizelgede derecelendirilmiştir. Derecelendirdiğimiz kesitlerdeki gözlenme seviyeleri hiç gözlenmeyen (-) seviyeden başlayarak, yüksek seviyede (+++++) gözlenen histolojik karakterler ile 5 farklı değerde yapılmıştır.

Çizelge 4.1 H&E boyalı 4 farklı gruba ait sıçan dalak kesitlerinde gözlenen histolojik karakterlerin, gözlenme seviyelerine göre derecelendirilmesi

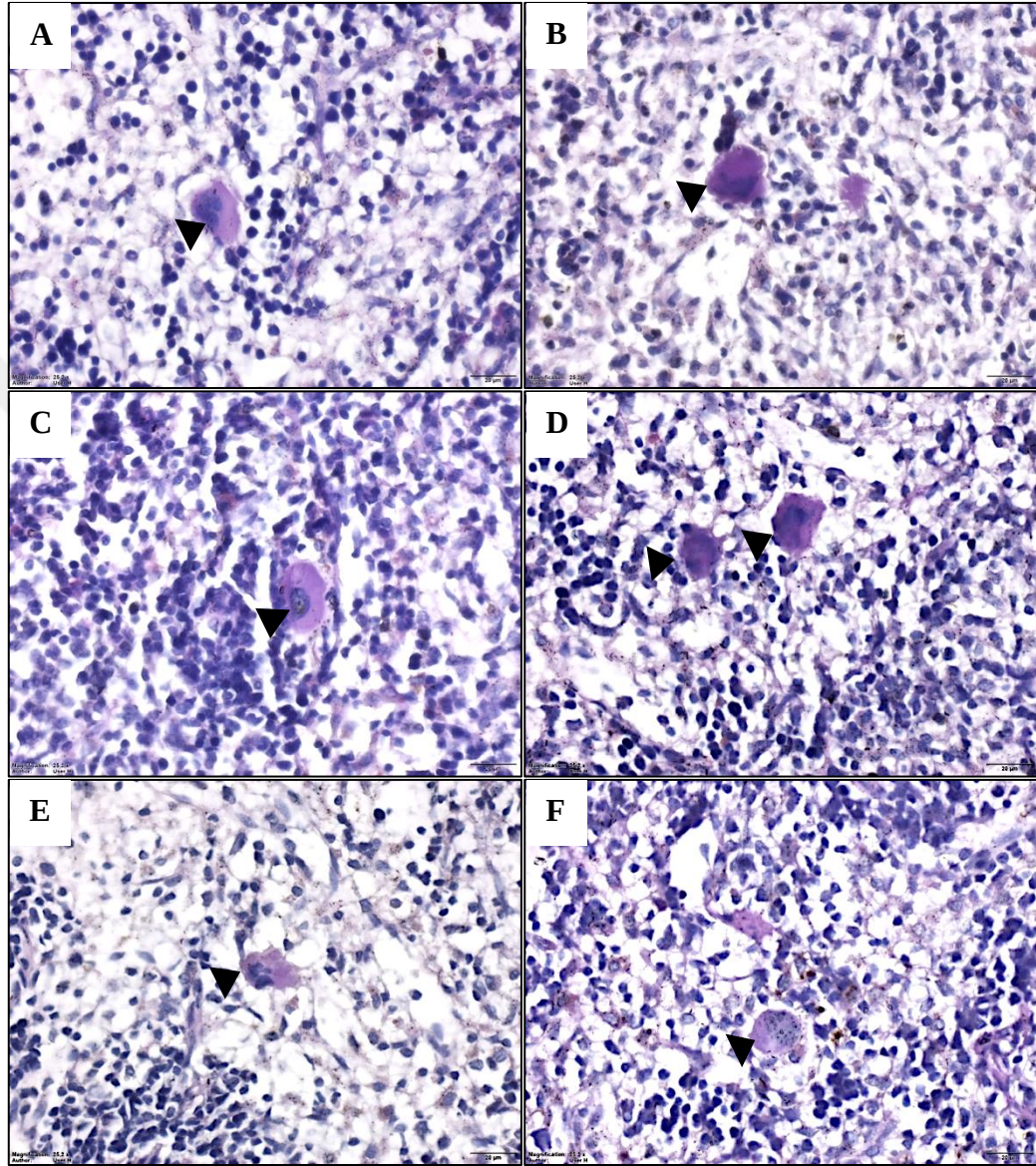
| HİSTOLOJİK<br>KARAKTERLER                                                                                                       | GRUPLAR                              |                                                            |                                       |                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                 | Genç<br>Kontrol<br>Grubu<br>(Grup 1) | Melatonin<br>Uygulanmış<br>Genç Deney<br>Grubu<br>(Grup 3) | Yaşlı<br>Kontrol<br>Grubu<br>(Grup 2) | Melatonin<br>Uygulanmış<br>Yaşlı Deney<br>Grubu<br>(Grup 4) |
| <b>Beyaz Pulpa</b>                                                                                                              |                                      |                                                            |                                       |                                                             |
| Yoğun boyanan<br>PALS* alanı                                                                                                    | ++++                                 | +++++                                                      | +                                     | +++                                                         |
| Germinal<br>merkezler                                                                                                           | +++                                  | ++++                                                       | +                                     | ++                                                          |
| Komşu foliküller                                                                                                                | +++                                  | +++                                                        | +                                     | ++                                                          |
| Marjinal sinüs<br>bütünlüğü                                                                                                     | ++++                                 | +++++                                                      | ++                                    | +++                                                         |
| Marjinal bölge<br>bütünlüğü                                                                                                     | ++++                                 | +++++                                                      | +                                     | ++++                                                        |
| <b>Kırmızı Pulpa</b>                                                                                                            |                                      |                                                            |                                       |                                                             |
| Trabekül<br>yoğunluğu                                                                                                           | +                                    | +                                                          | +++++                                 | +++                                                         |
| Hemosiderin**<br>yoğunluğu                                                                                                      | -                                    | -                                                          | +++++                                 | ++++                                                        |
| Venöz sinüslerin<br>yapısal bütünlüğü                                                                                           | ++++                                 | ++++                                                       | ++                                    | +++                                                         |
| - , gözlenmedi; +, çok az seviyede; ++, az seviyede; +++ , orta seviyede; +++++, yüksek seviyede; ++++++ , çok yüksek seviyede. |                                      |                                                            |                                       |                                                             |
| *PALS: Periarteriolar lenfoid kılıf                                                                                             |                                      |                                                            |                                       |                                                             |
| **Hemosiderin: Hemosiderin pigmentleri                                                                                          |                                      |                                                            |                                       |                                                             |

#### 4.1.2 Periyodik asit-Schiff (PAS)

Genç ve yaşlı kontrol grupları (Grup 1 ve Grup 2) ve melatonin uygulanmış genç ve yaşlı deney gruplarının (Grup 3 ve Grup 4) sıçan dalak kesitlerinde, sitoplazmasında polisakkarit granülleri olan hücrelerin periyodik asit reaksiyonları pozitif olmuştur. Grupların hepsinde PAS pozitif reaksiyon sonucunda sitoplazması magenda renginde olan hücreler kalitatif olarak gözlenmiştir (Şekil 4.40-4.44).



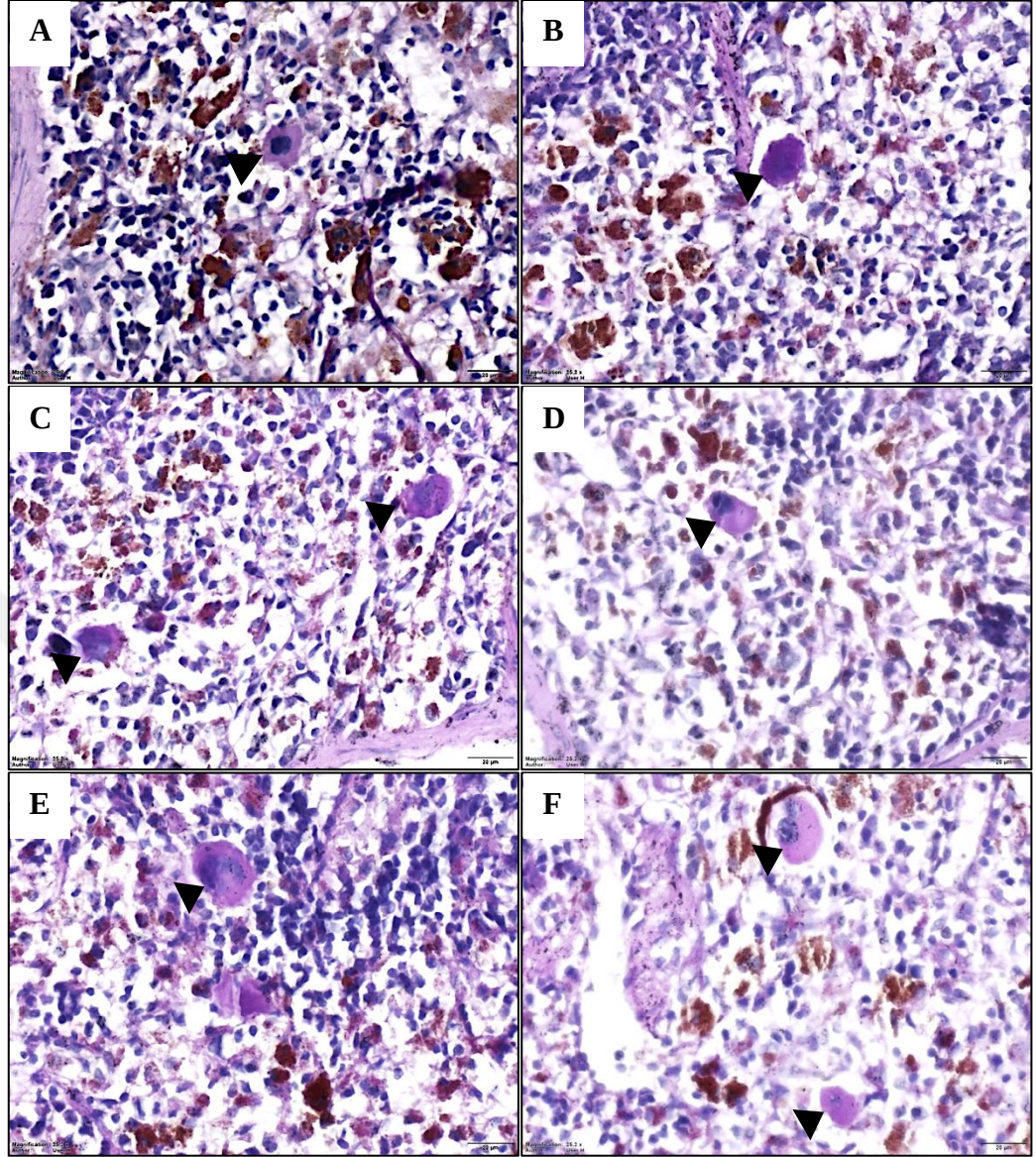
Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağı kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler, diğer kesitlere oranla daha az gözlenmiştir (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağı kesitlerinde kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler (A-F) (ok başları). PAS, Bar: 20 µm

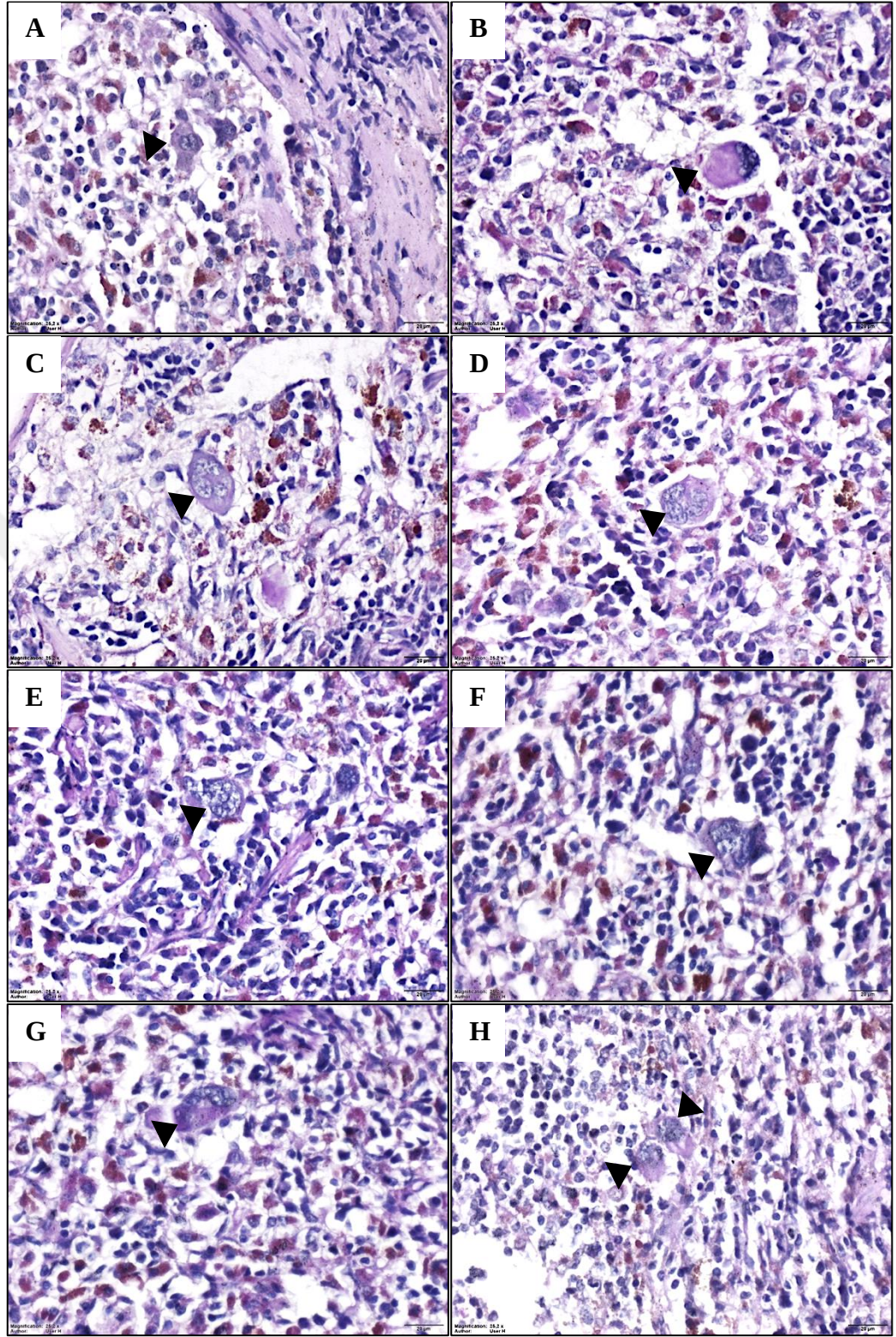
Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağı kesitlerinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında PAS pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin bu grupta, daha yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.41). Ayrıca bu grupta, PAS pozitif reaksiyon gösteren hasarlı hücrelerin de olması dikkati çekmiştir (Şekil 4.42).





Şekil 4.41 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağı kırmızı pulpasında PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler (A-F) (ok başları). PAS, Bar: 20 µm



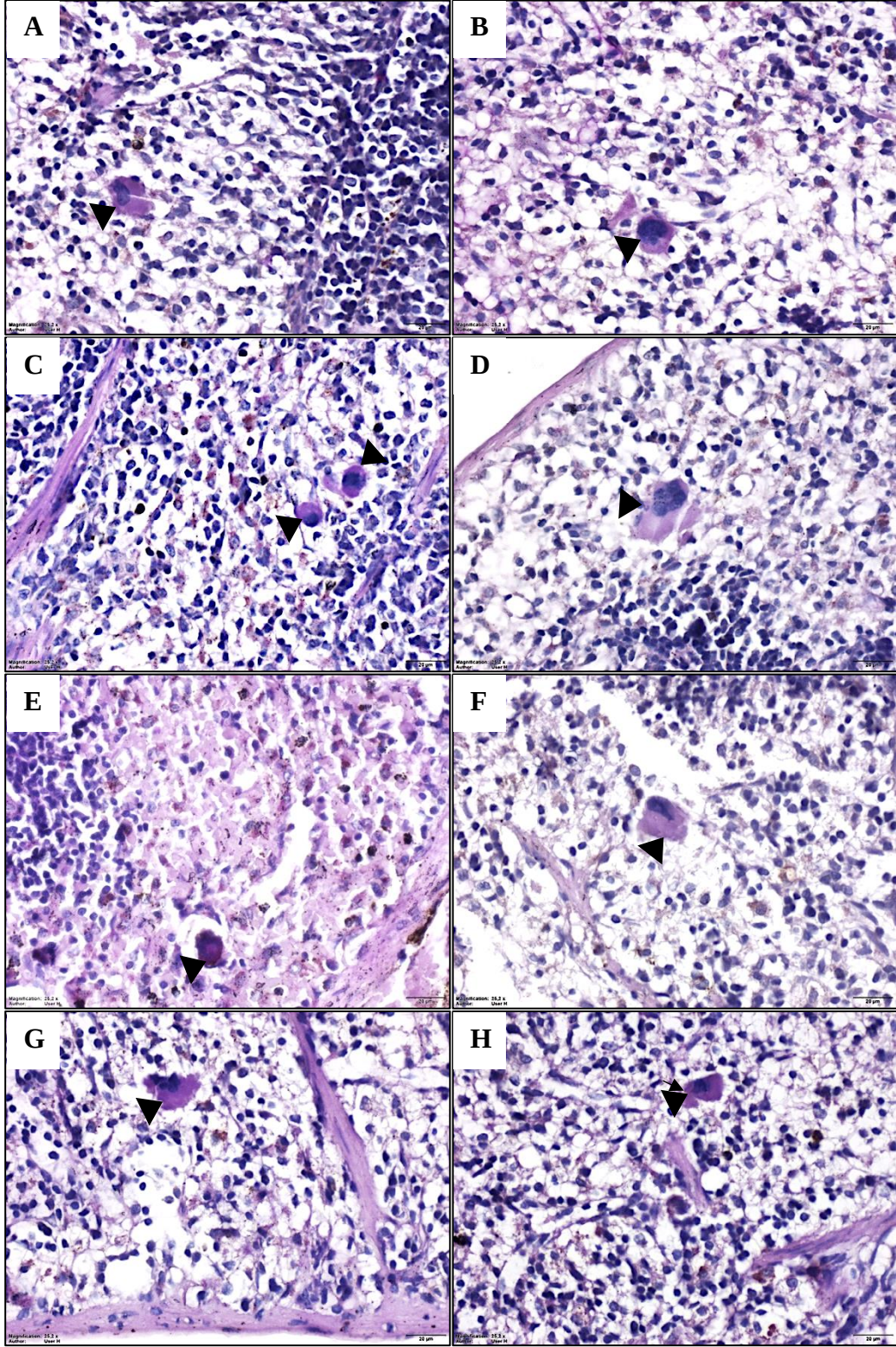


Şekil 4.42 Yaşlı kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağı kesitlerinde kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hasarlı hücreler (A-H) (ok başları). PAS, Bar: 20 µm

Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağı kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler tespit edilmiştir ve genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağı kesitleri ile karşılaştırıldığında PAS pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin genç kontrol grubu ile benzer özellikler gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.43).





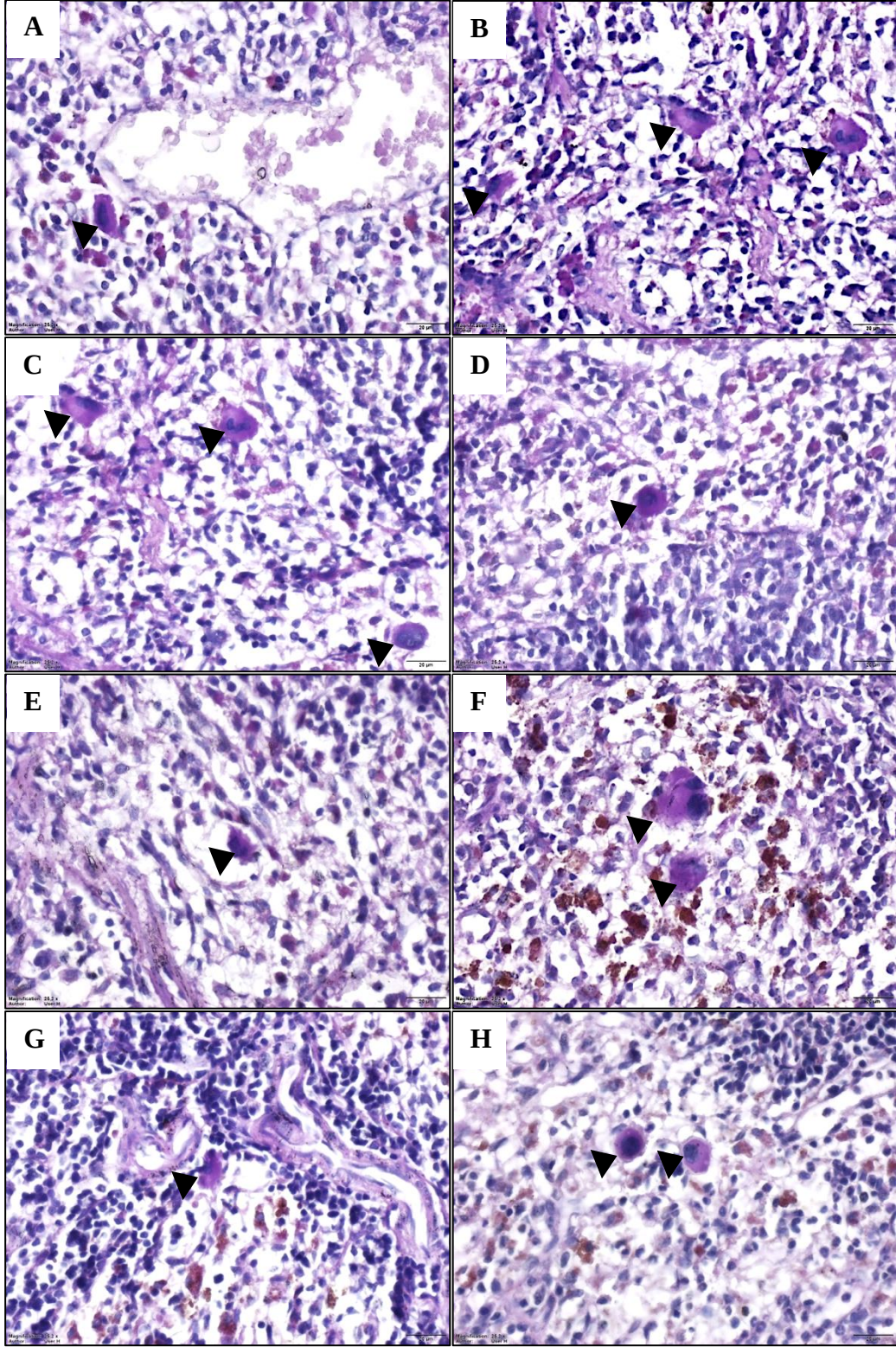


Şekil 4.43 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağı kesitlerinde kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler (A-H) (ok başları). PAS, Bar: 20 µm

Melatonin uygulanmış yaşı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağı kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler tespit edilmiştir ve yaşı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağı kesitleri ile karşılaştırıldığında daha az PAS pozitif reaksiyon gösteren hasarlı hücre olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.44).







Şekil 4.44 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağı kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler. Kırmızı pulpada geniş bir venöz sinüsün yanında, PAS pozitif reaksiyon gösteren hücre (A). Kırmızı pulpada PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler (B-H) (ok başları). PAS, Bar: 20 µm



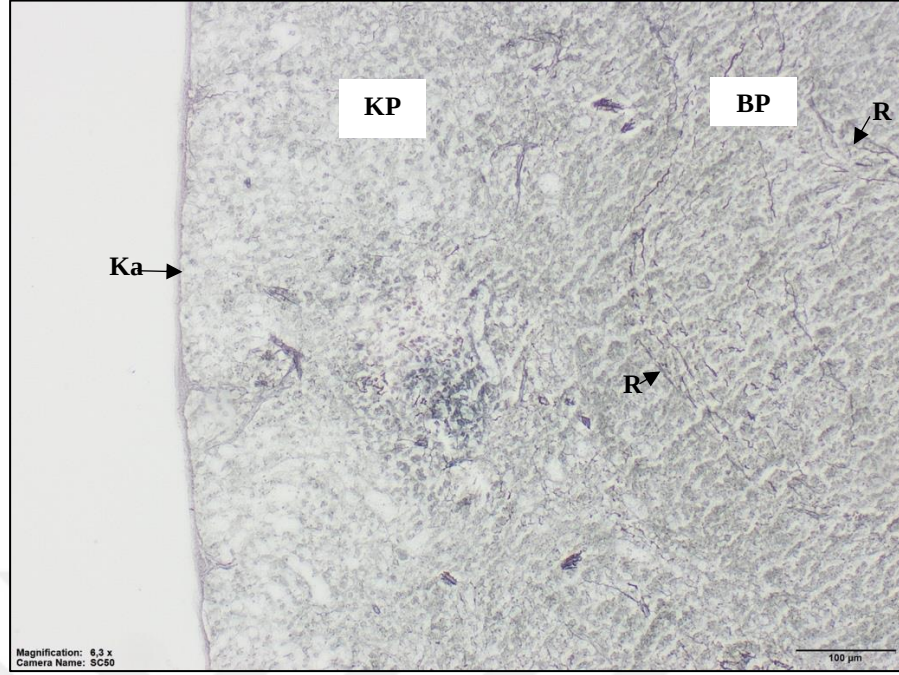
Mikrograf verilerinden elde ettiğimiz yukarıda yer alan bu sonuçlar kalitatif olarak aşağıdaki çizelgede özetle listelenmiştir. Gruplara göre değerlendirdiğimiz histolojik karakterler, incelediğimiz kesitlerdeki gözlenme seviyelerine göre aşağıdaki çizelgede derecelendirilmiştir. Derecelendirilen kesitlerdeki gözlenme seviyeleri, hiç gözlenmeyen (-) seviyeden başlayarak, yüksek seviyede (+++++) gözlenen histolojik karakterler ile 5 farklı değerde yapılmıştır.

Çizelge 4.2 PAS boyalı 4 farklı gruba ait sıçan dalak kesitlerinde gözlenen histolojik karakterlerin, gözlenme seviyelerine göre derecelendirilmesi

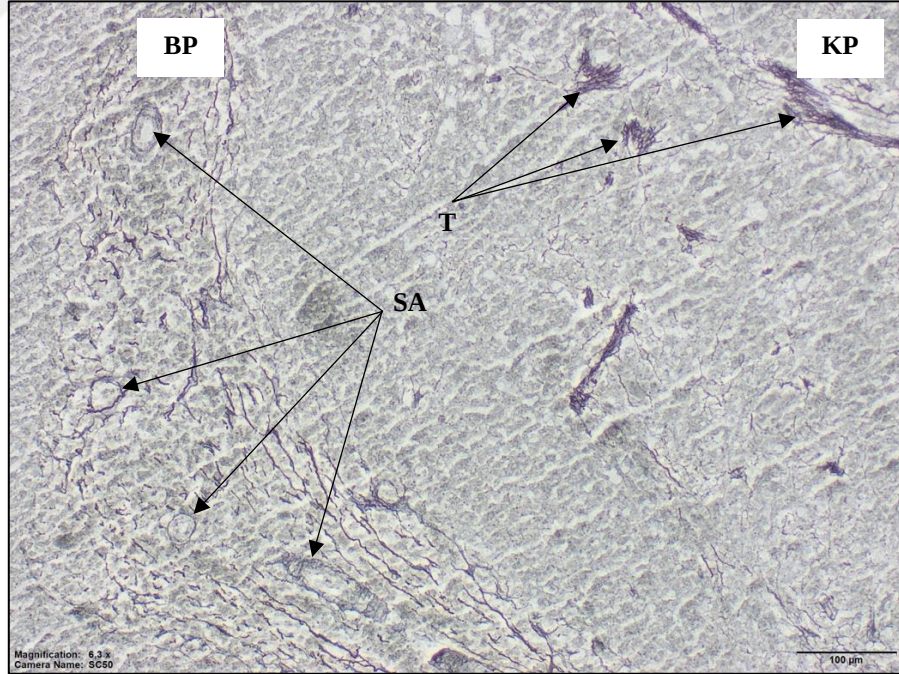
| <b>HİSTOLOJİK<br/>KARAKTERLER</b>                                                                                                  | <b>GRUPLAR</b>                                 |                                                                       |                                                 |                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                    | <b>Genç<br/>Kontrol<br/>Grubu<br/>(Grup 1)</b> | <b>Melatonin<br/>Uygulanmış<br/>Genç Deney<br/>Grubu<br/>(Grup 3)</b> | <b>Yaşlı<br/>Kontrol<br/>Grubu<br/>(Grup 2)</b> | <b>Melatonin<br/>Uygulanmış<br/>Yaşlı Deney<br/>Grubu<br/>(Grup 4)</b> |
| PAS* pozitif reaksiyon gösteren hücreler                                                                                           | +                                              | +                                                                     | ++++                                            | +++                                                                    |
| PAS pozitif reaksiyon gösteren hasarlı hücreler                                                                                    | +                                              | -                                                                     | ++++                                            | ++                                                                     |
| - , gözlenmedi; + , çok az seviyede; ++ , az seviyede; +++ , orta seviyede; +++++ , yüksek seviyede; ++++++ , çok yüksek seviyede. |                                                |                                                                       |                                                 |                                                                        |
| *PAS: Periyodik asit-Schiff                                                                                                        |                                                |                                                                       |                                                 |                                                                        |

#### 4.1.3 Gümüşleme (Retikülin)

Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalak kesitlerinde, doku bütünlüğünün korunduğu, hem stroma hem de parankimada retiküler lif dağılımının düzgün ve normal şekilde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.45-4.46). Retiküler liflerin beyaz pulpa genelinde düzenli şekilde sürekli bir görünüme sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.47-4.51). Ayrıca, beyaz pulpada retiküler liflerin santral arteriyoller çevresinde de düzenli bir görünüm sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.52). Kırmızı pulpada ise retiküler lifler ince bir ağ yapısı şeklinde ve trabekül yapılarında da ince fibriller şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.53).

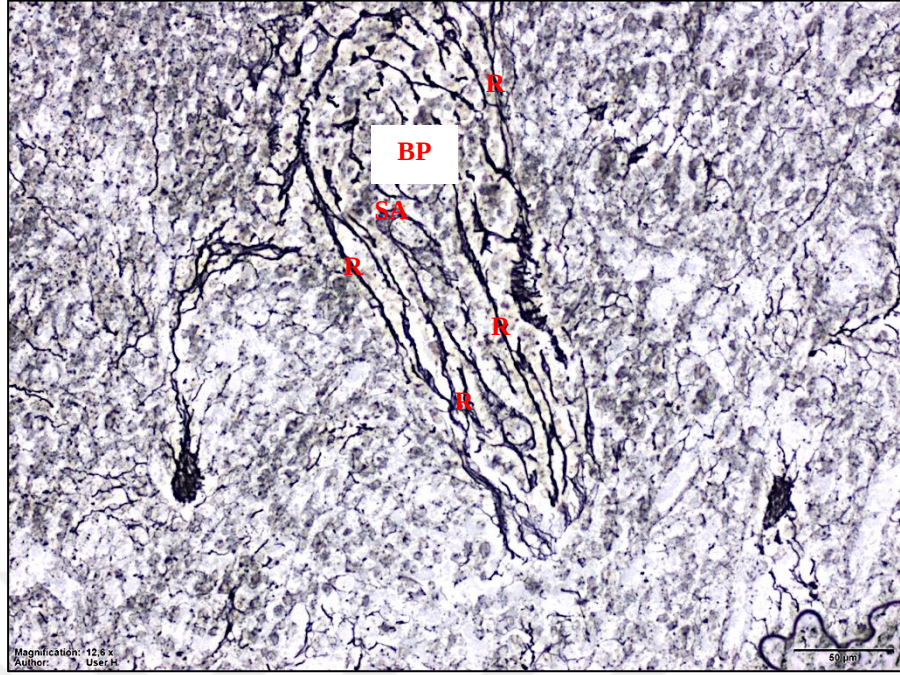


Şekil 4.45 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında beyaz pulpada (BP) retiküler lifler (R). Kapsül (Ka), kırmızı pulpa (KP). Retikülin, Bar: 100 µm

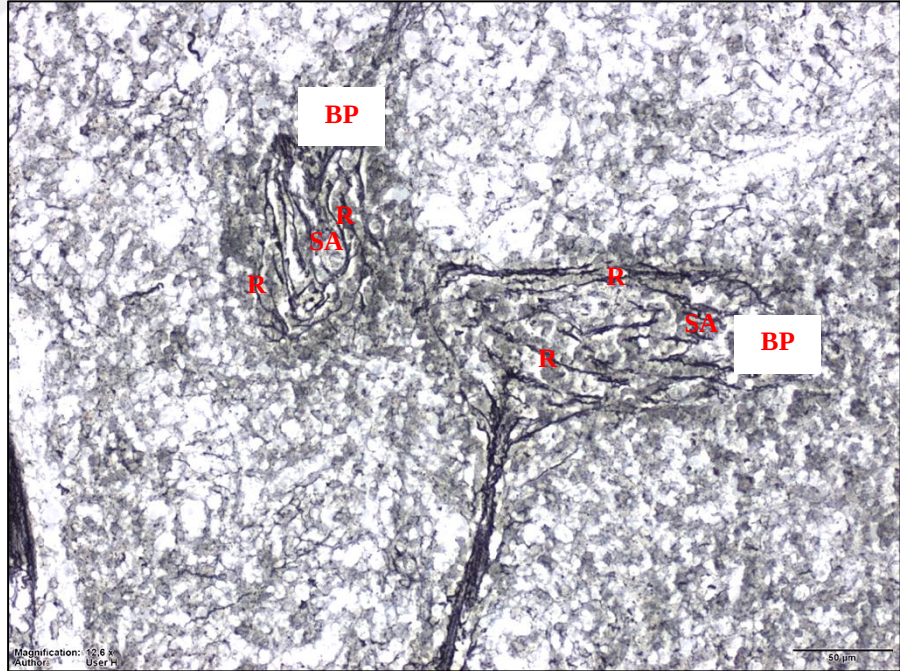


Şekil 4.46 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerde (SA) retiküler lif görünümü ve kırmızı pulpa alanında (KP) trabekül yapılarının (T) retiküler fibril görünümü. Retikülin, Bar: 100 µm



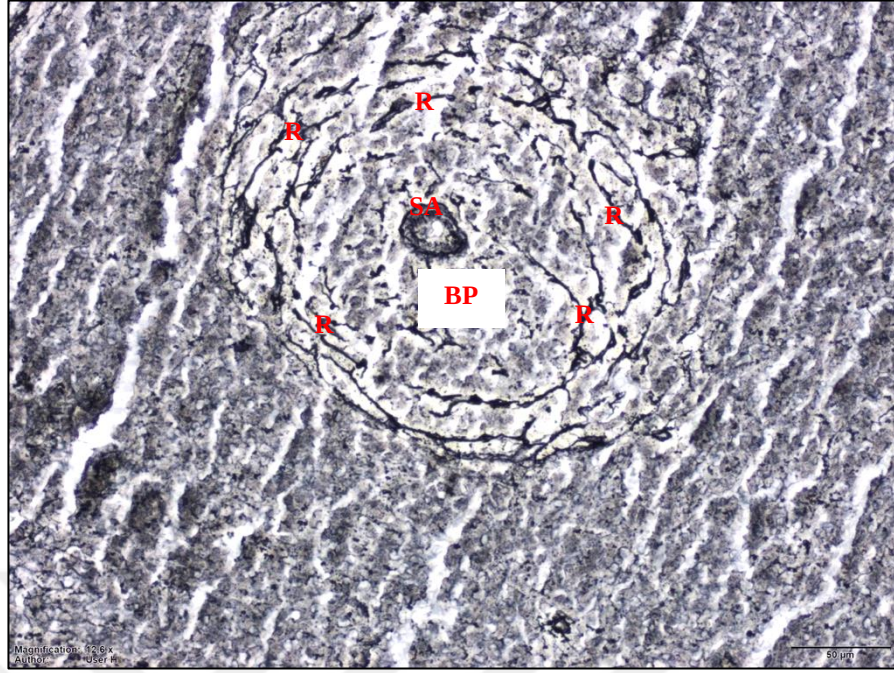


Şekil 4.47 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

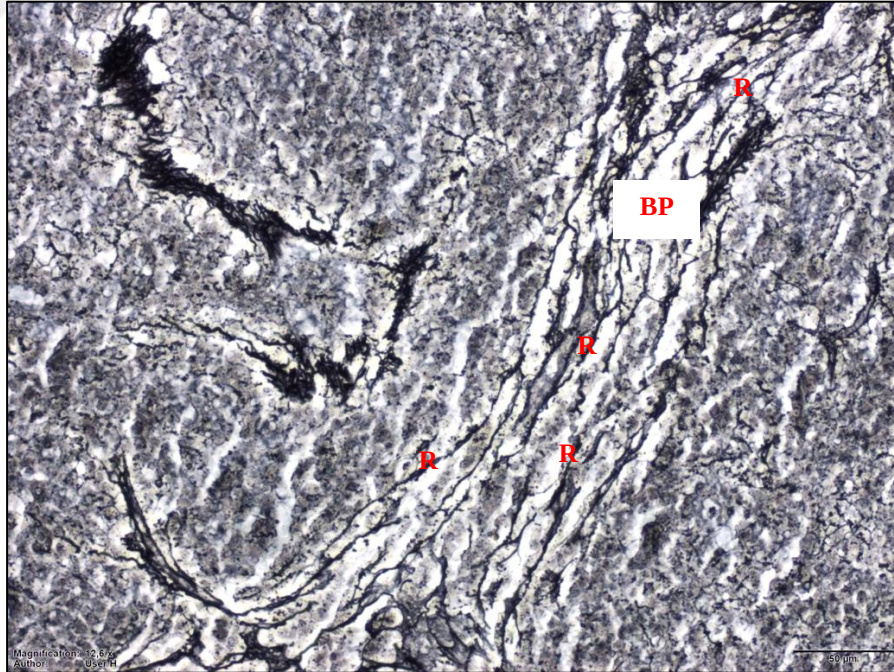


Şekil 4.48 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, iki farklı küçük beyaz pulpa folikülünde (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm



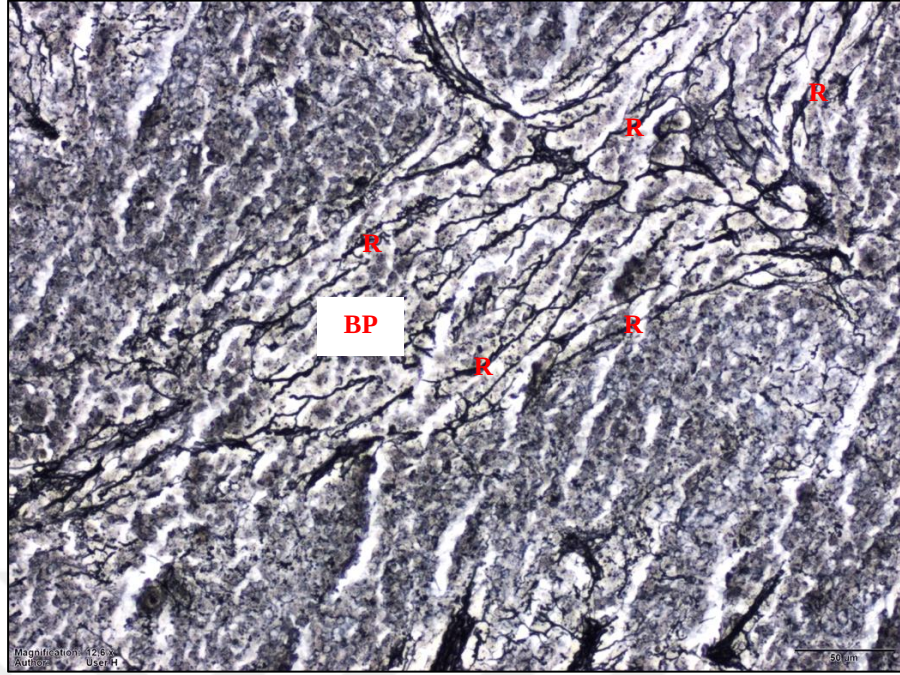


Şekil 4.49 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

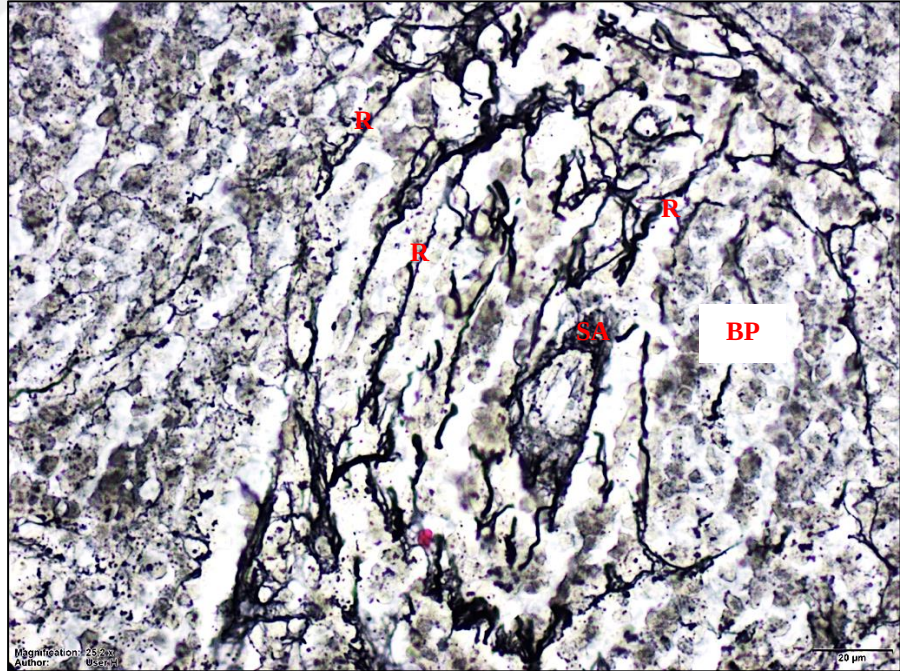


Şekil 4.50 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) düzenli görünüm sergileyen retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 50 µm



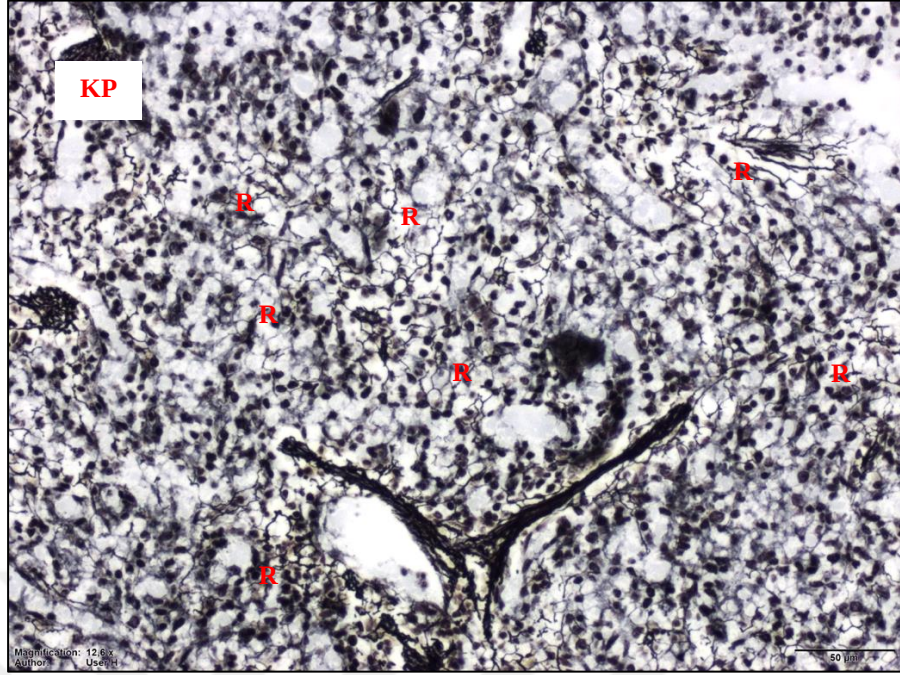


Şekil 4.51 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) yapısı korunmuş retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 50 µm



Şekil 4.52 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, beyaz pulpa folikülünde (BP) santral arteriyol (SA) çevresinde gözlenen düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 20 µm

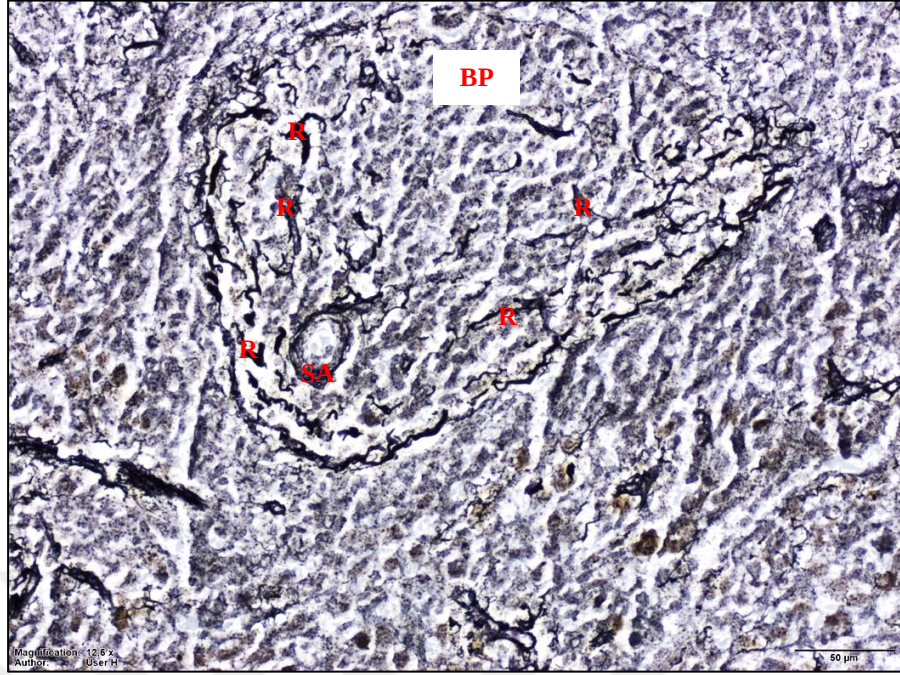




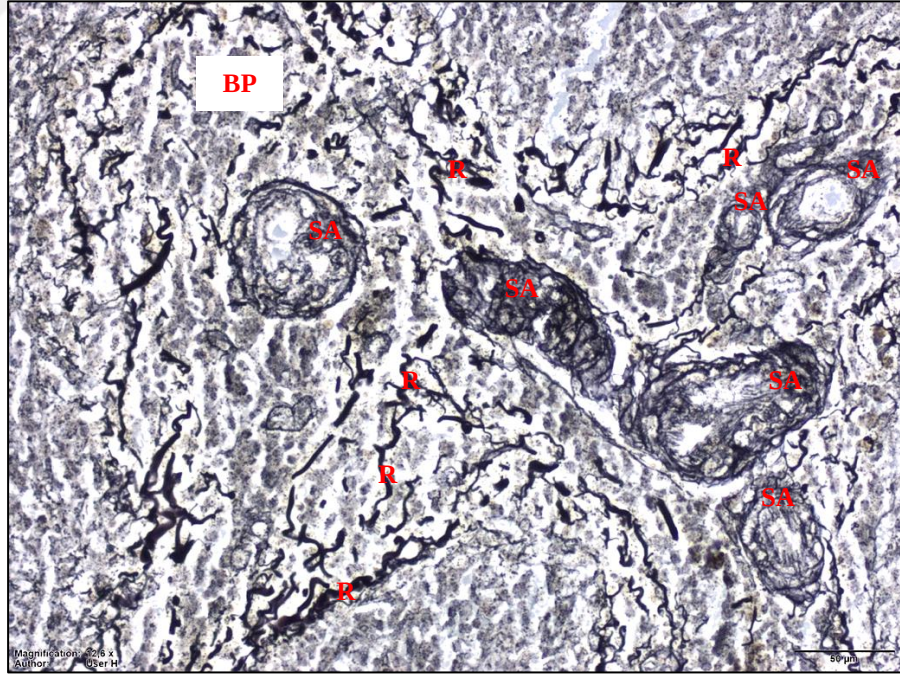
Şekil 4.53 Genç kontrol grubu (Grup 1) sıçan dalağında, kırmızı pulpa alanında (KP) ince bir ağ şeklinde gözlenen retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 50 µm

Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağı kesitlerinde, özellikle beyaz pulpayı yapısal olarak destekleyen stromada ve kırmızı pulpada trabekül yapılarının retikulum stromasında, retiküler lif artışı ve retiküler liflerde kalınlaşma gözlenmiştir. Genç kontrol grubu sıçanların dalak kesitleriyle karşılaştırıldığında retiküler liflerin özellikle beyaz pulpanın retiküler ağında kesik-kesik görünüm sergilemesi, iyi organize olamamış retiküler ağ yapısını göstermiştir (Şekil 4.54-4.57). Bazı beyaz pulpaların retiküler ağlarında ise ağaç dalına benzer şekilde kalınlaşmış retiküler lifler gözlenmiştir (Şekil 4.58-4.60). Ek olarak, beyaz pulpada yer alan santral arteriyollerin çevresinde endotele yapısal olarak destek sağlayan retiküler liflerin yoğunlaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.61-4.63). Kırmızı pulpada ise trabekül yapılarında retiküler liflerin kalınlaşarak, koyu boyanan yoğunlaşmış retiküler lif kümeleri oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.64-4.66).



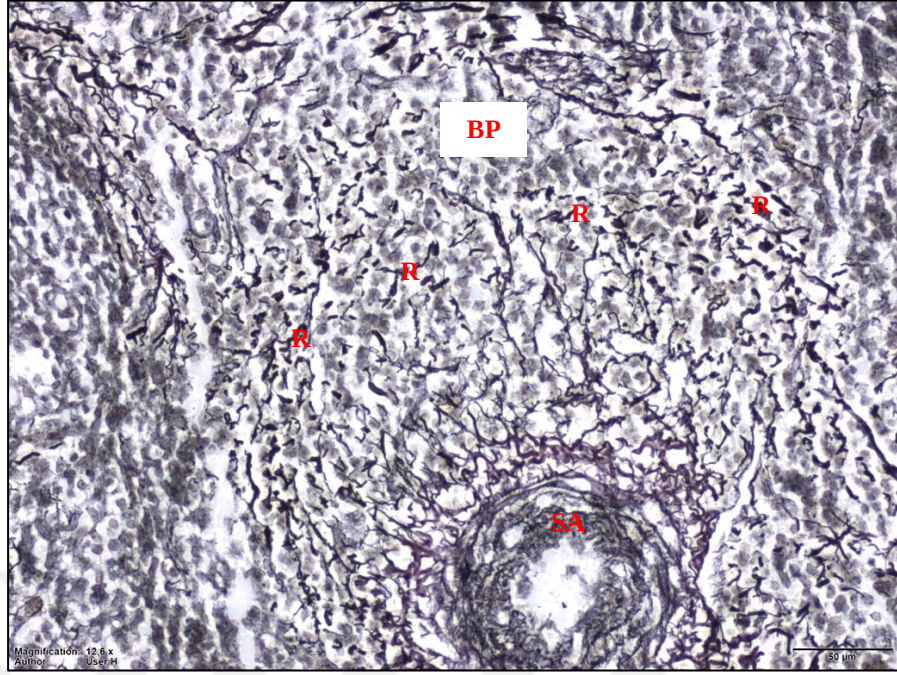


Şekil 4.54 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kesik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50  $\mu$ m

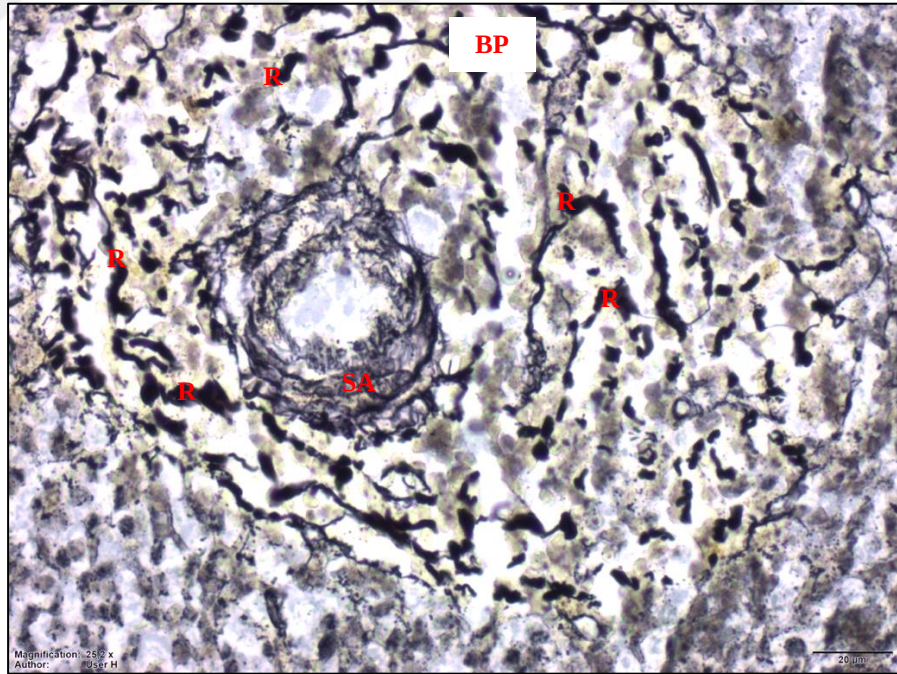


Şekil 4.55 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kesik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50  $\mu$ m



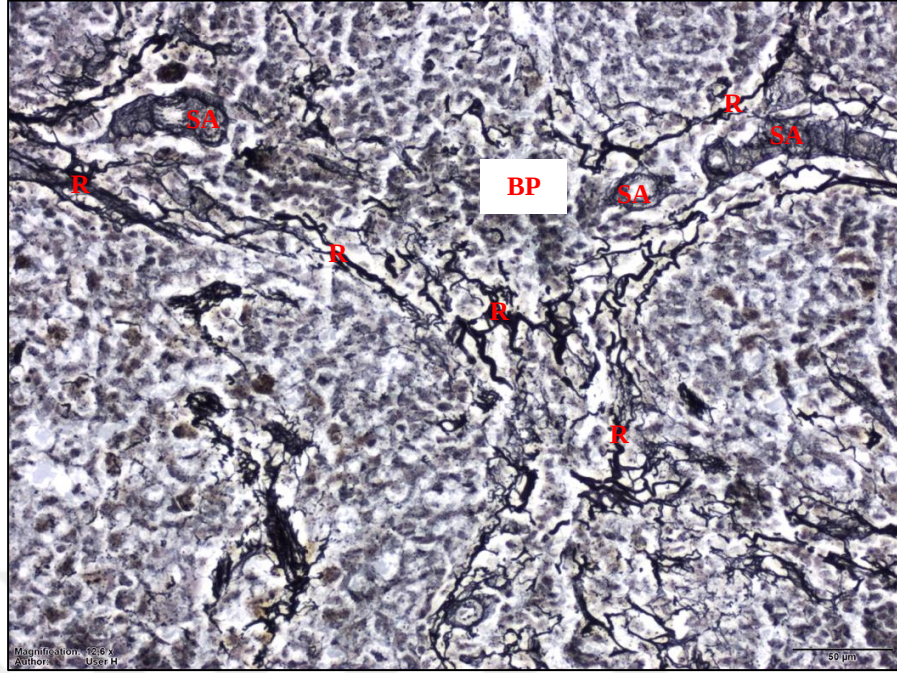


Şekil 4.56 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kestik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

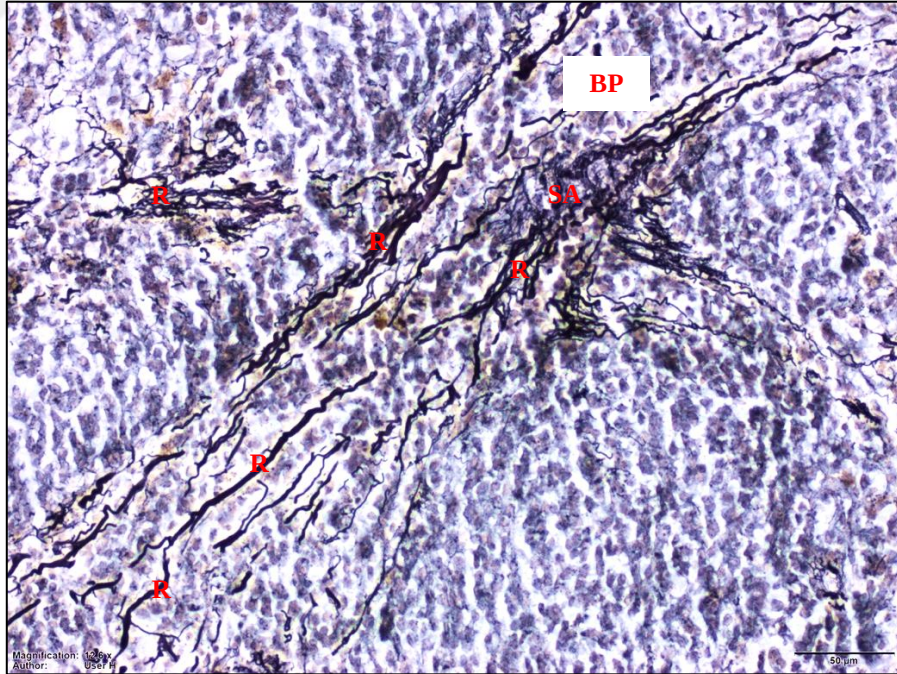


Şekil 4.57 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kesik-kestik ve kalınlaşmış şekilde gözlenen düzensiz görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 20 µm



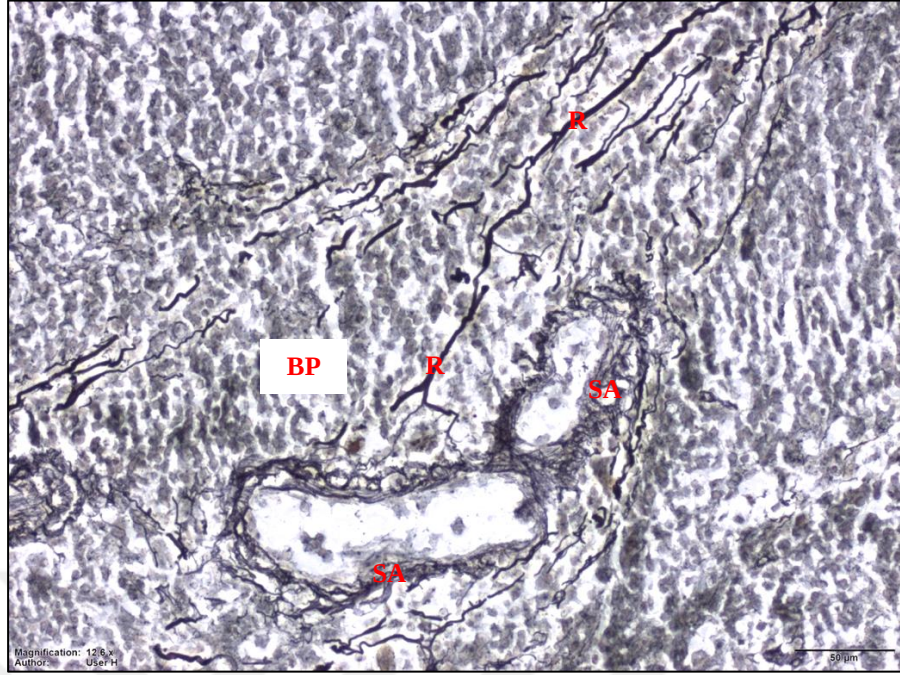


Şekil 4.58 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşarak, ağaç dalı görünümü sergileyen retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

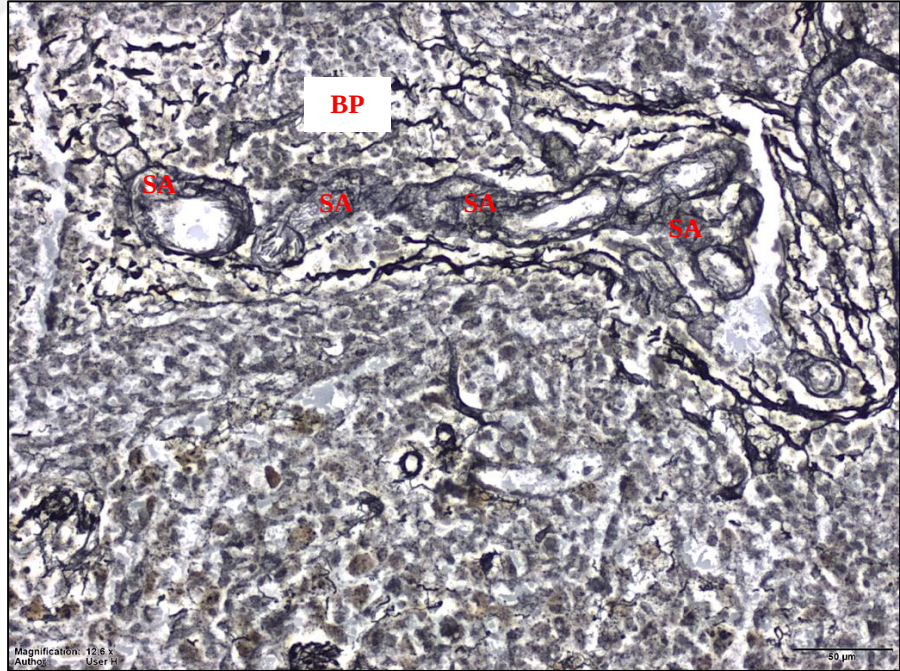


Şekil 4.59 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşarak, ağaç dalı görünümü sergileyen retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm



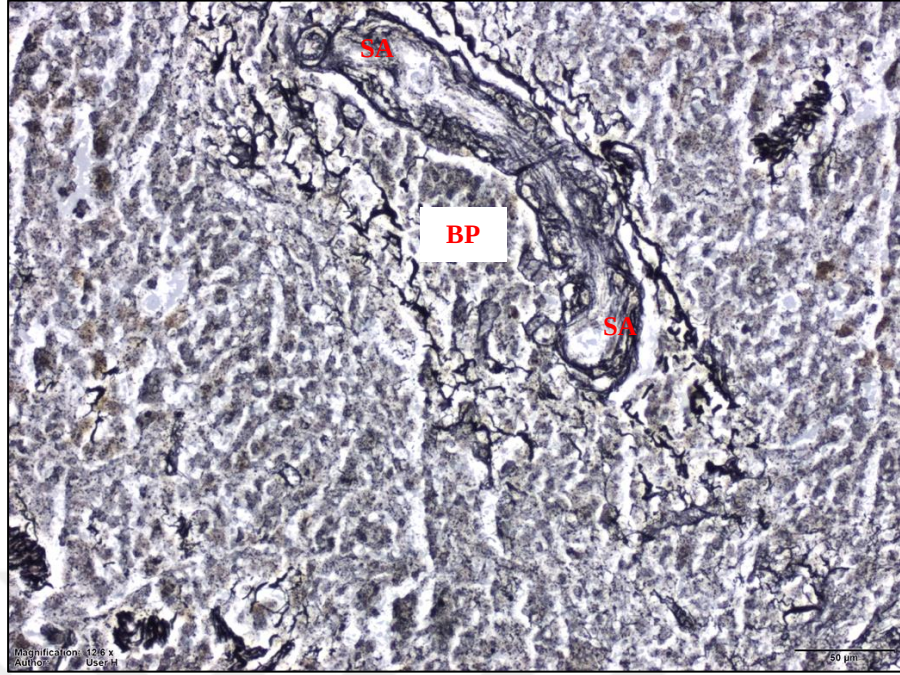


Şekil 4.60 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kalınlaşarak, ağaç dalı görünümü sergileyen retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50  $\mu$ m

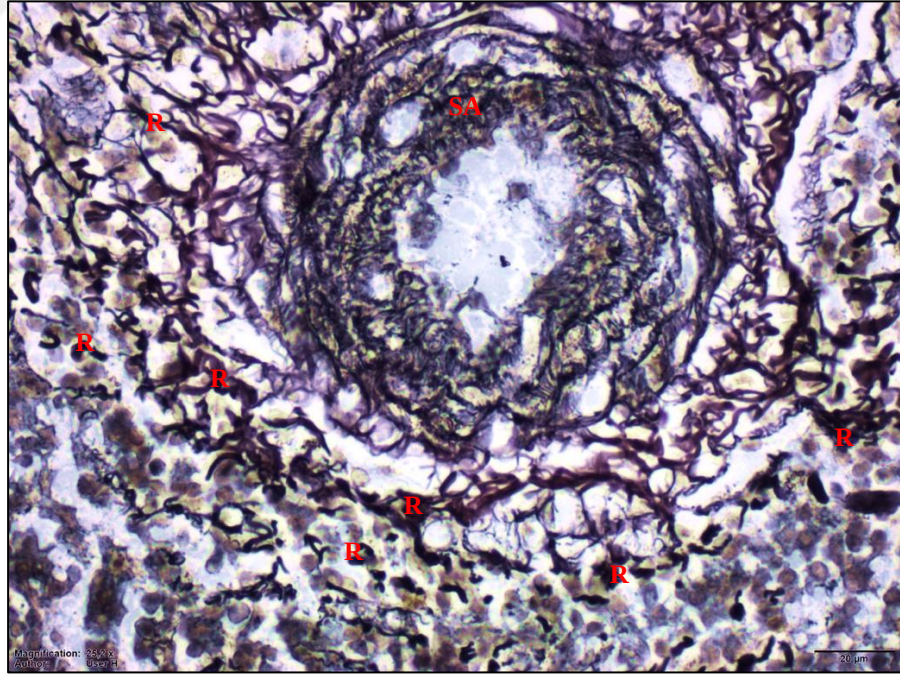


Şekil 4.61 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerin (SA) çevresinde retiküler liflerin görünümü. Retikülin, Bar: 50  $\mu$ m



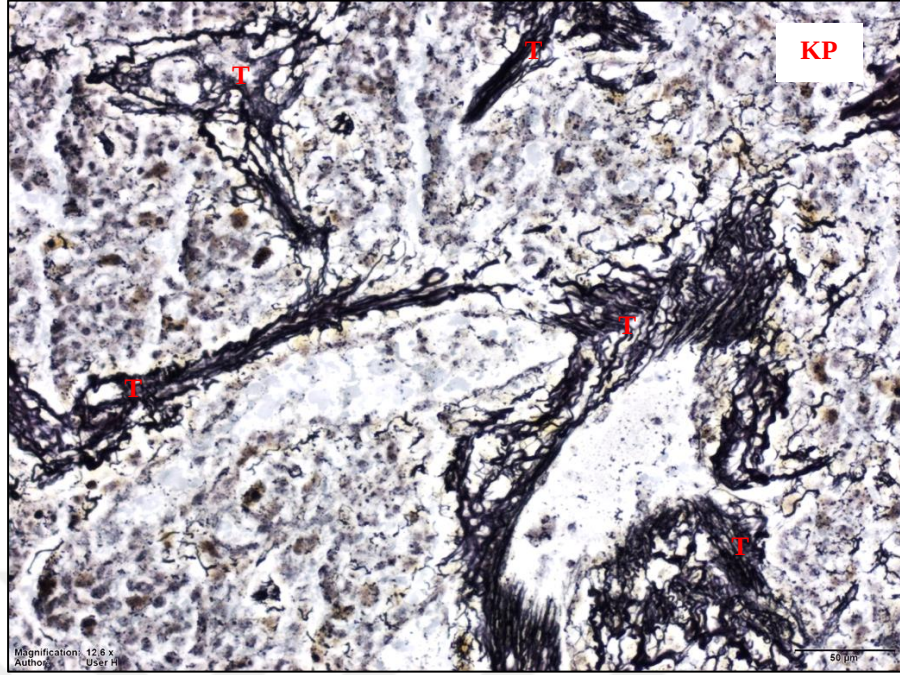


Şekil 4.62 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerin (SA) çevresinde retiküler liflerin görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm

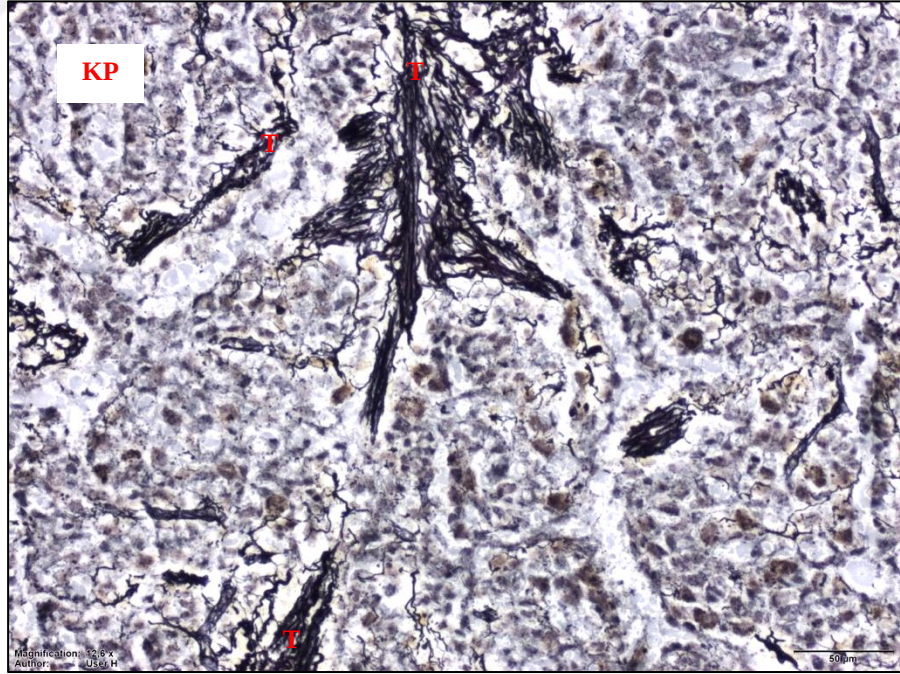


Şekil 4.63 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyollerin (SA) çevresinde retiküler liflerin görünümü. Retikülin, Bar: 20 µm



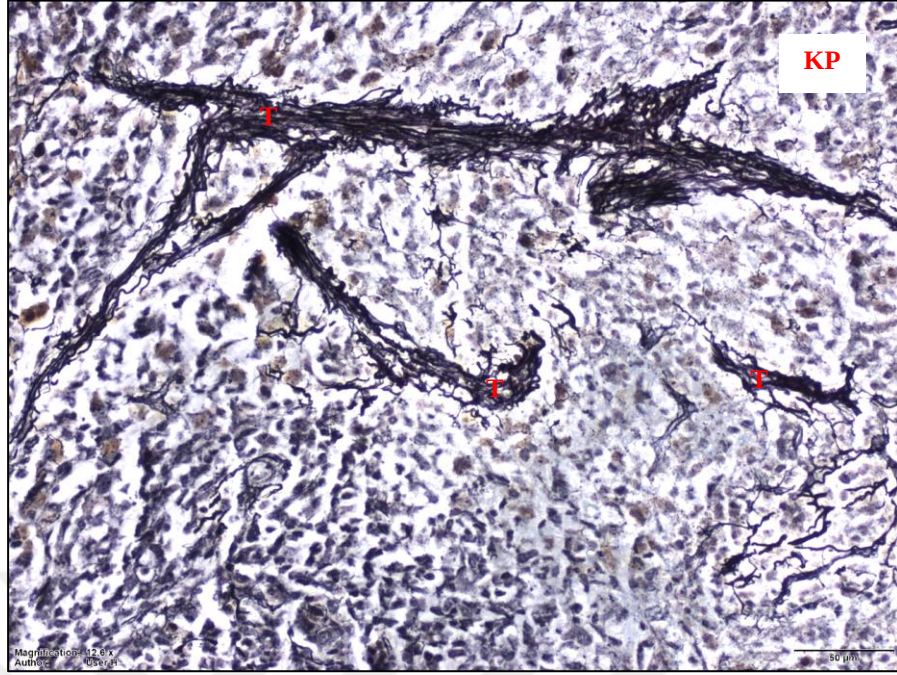


Şekil 4.64 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) retiküler liflerin yoğunlaşmış görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm



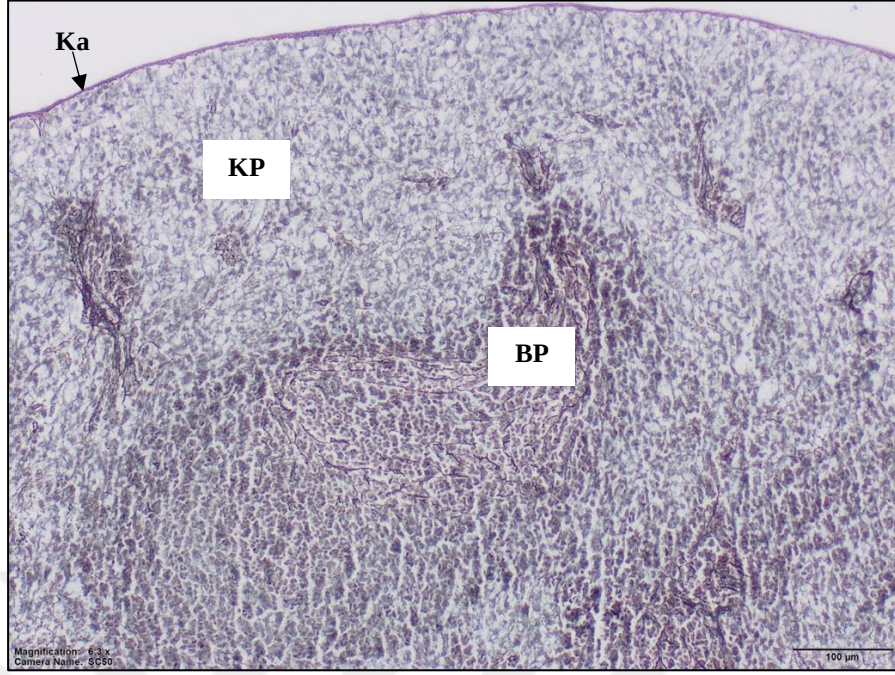
Şekil 4.65 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) retiküler liflerin yoğunlaşmış görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm



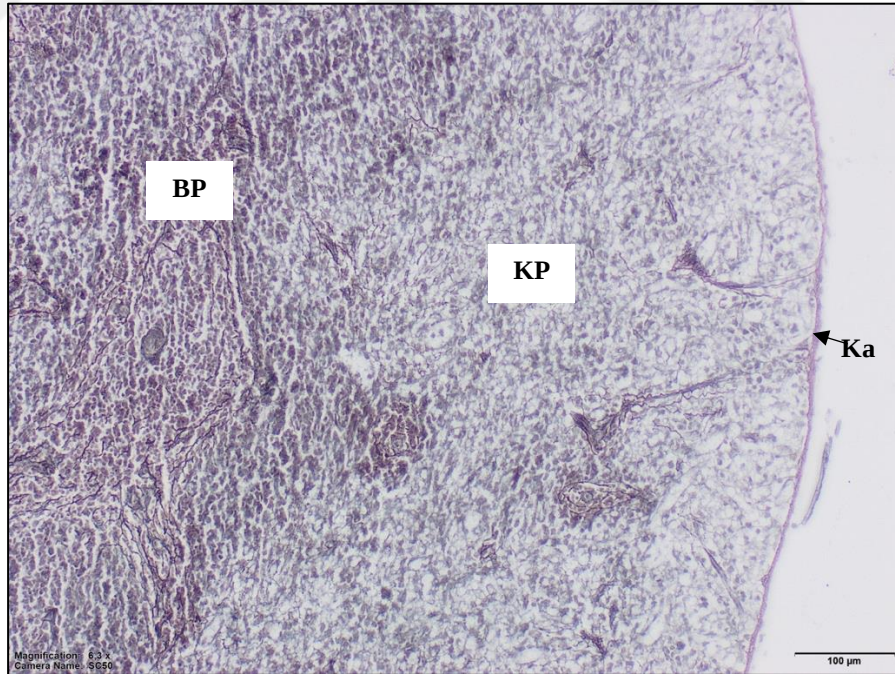


Şekil 4.66 Yaşlı kontrol grubu (Grup 2) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) retiküler liflerin yoğunlaşmış görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm

Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağı kesitlerinde, genç kontrol grubu dalak kesitleriyle benzer olarak doku bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.67-4.68). Stromada bulundukları alanlarda retiküler lifler devamlı bir yapı sergilediği için beyaz pulpada da düzenli bir görünüm gözlenmiştir (Şekil 4.69-4.72). Ayrıca beyaz pulpada santral arteriyoller çevresinde retiküler lifler gözlenmiştir (Şekil 4.73-4.74). Ek olarak, kırmızı pulpada retiküler lifler ince ve ağ şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.75).

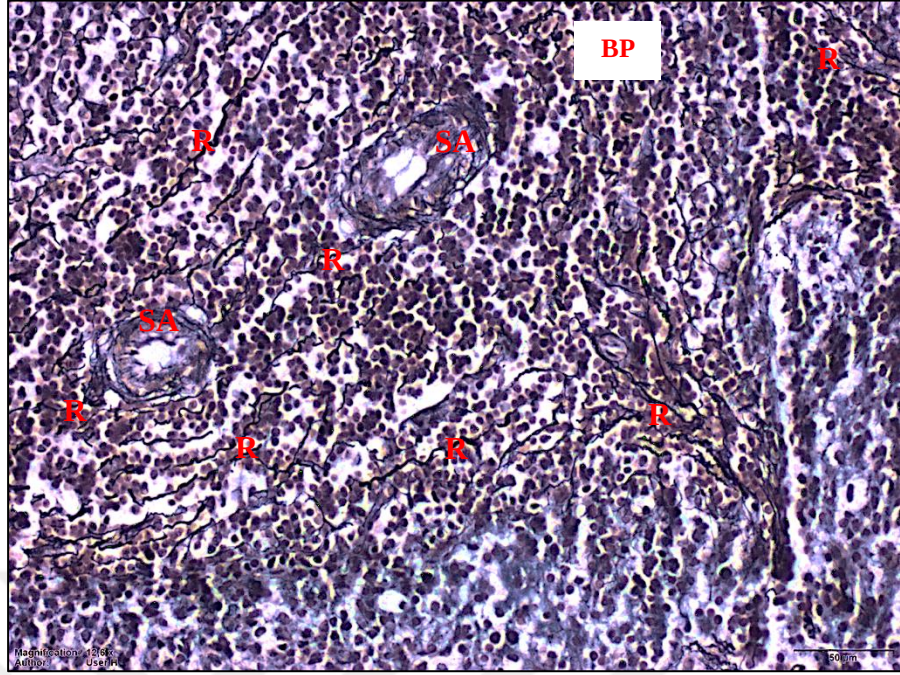


Şekil 4.67 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, kapsül (Ka), kırmızı pulpa alanı (KP) ve beyaz pulpa folikülünün (BP) genel görünümü. Retikülün, Bar: 100 µm

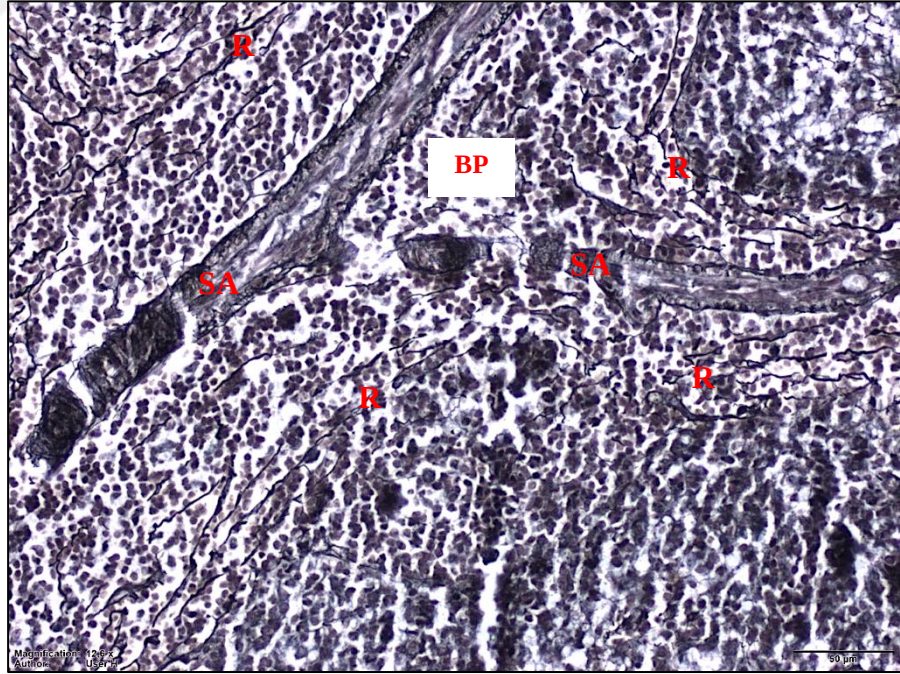


Şekil 4.68 Melatonin uygulanmış genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, kapsül (Ka), kırmızı pulpa alanı (KP) ve beyaz pulpa folikülünün (BP) genel görünümü. Retikülün, Bar: 100 µm



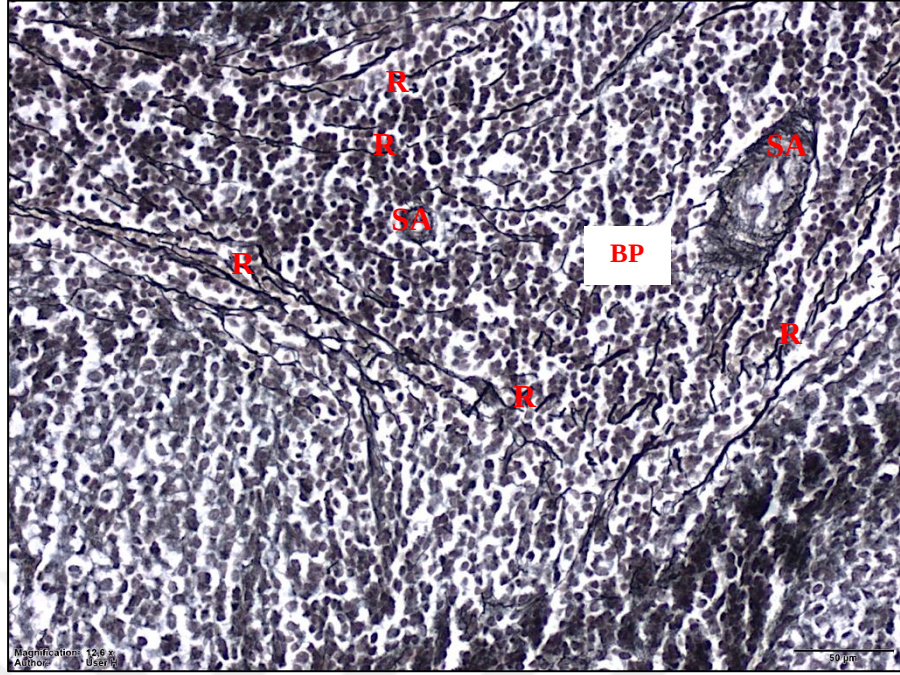


Şekil 4.69 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

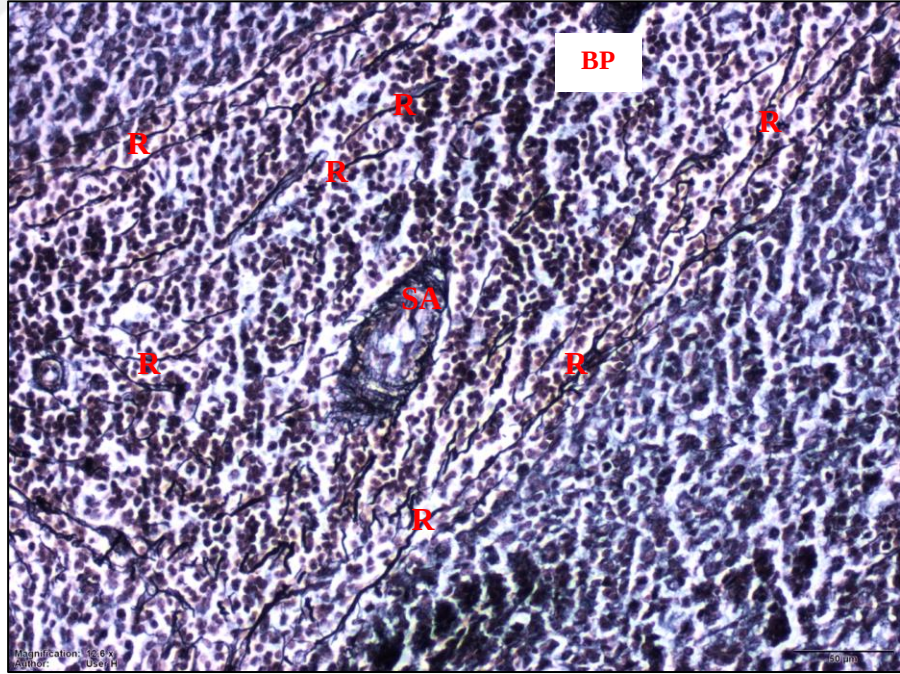


Şekil 4.70 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm



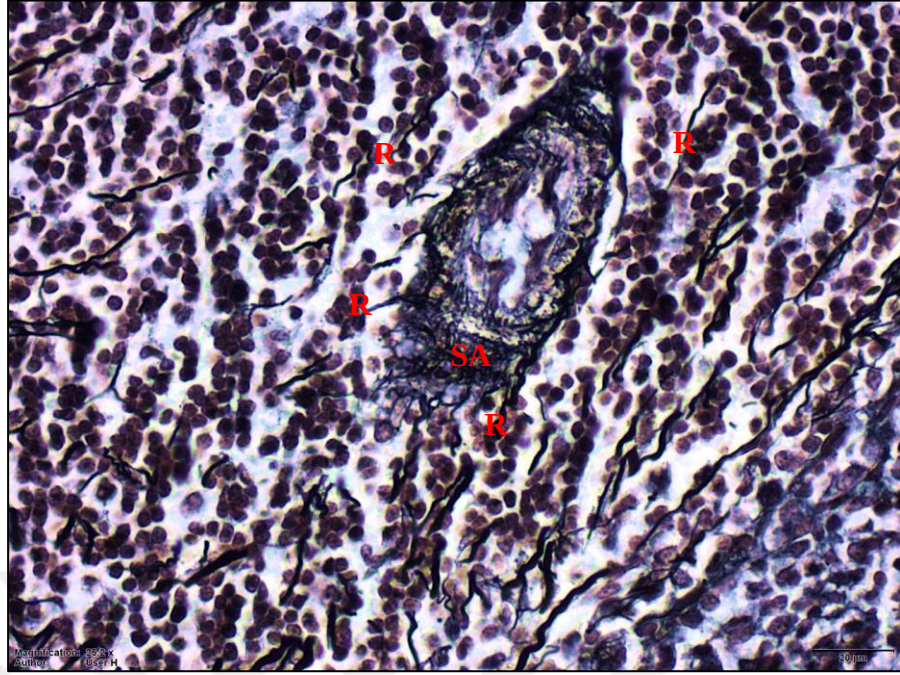


Şekil 4.71 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

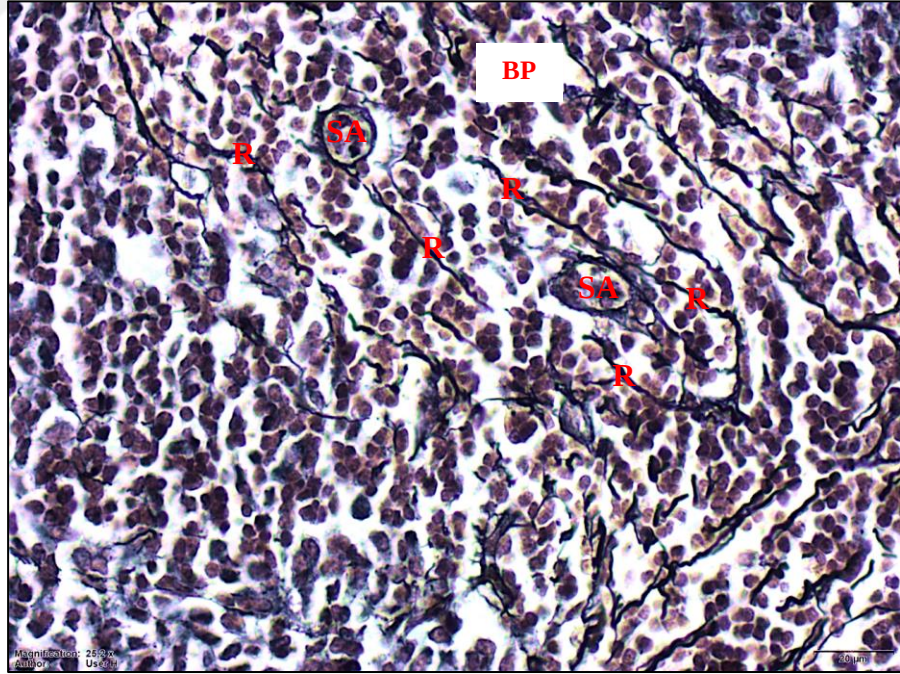


Şekil 4.72 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) gözlenen düzenli görünüme sahip, süreklilik gösteren, ince retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm



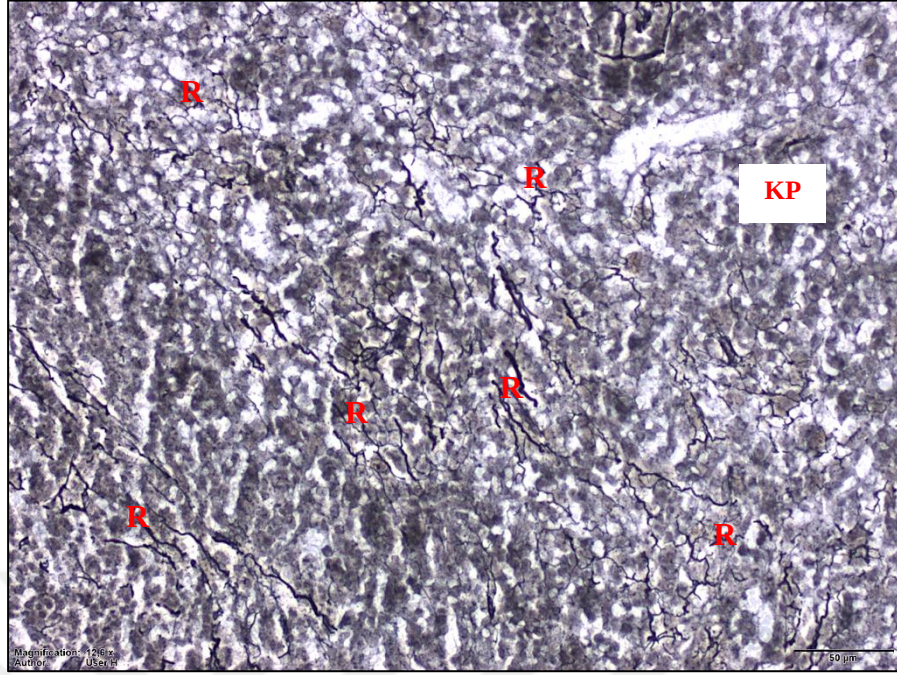


Şekil 4.73 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyol (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 20 µm



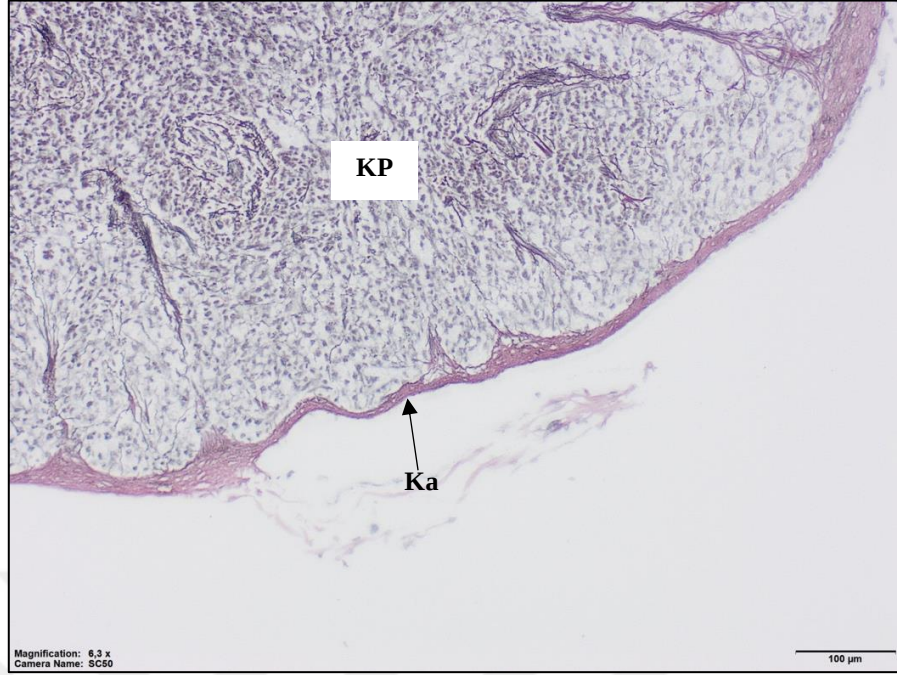
Şekil 4.74 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) santral arteriyol (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 20 µm



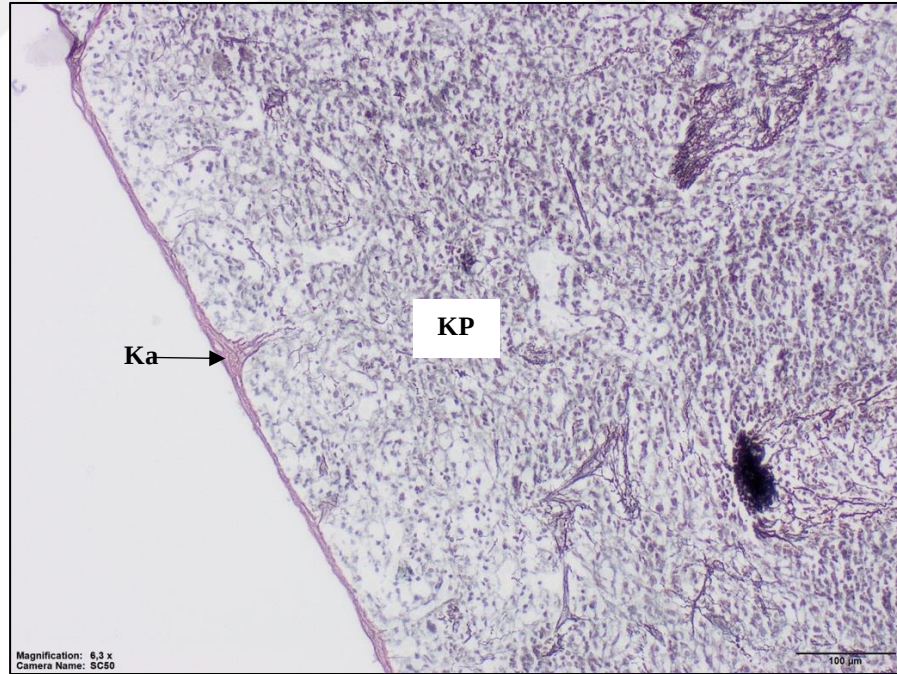


Şekil 4.75 Genç deney grubu (Grup 3) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) ince bir şekilde gözlenen retiküler liflerin (R) ağ görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm

Yaşlı deney grubu sıçanların (Grup 4) dalak dokusu kesitlerinde kontrol grubu yaşlı sıçanlarla karşılaştırıldığında doku bütünlüğünün korunmuş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.76-4.79). Genç gruplarda (Grup 1 ve Grup 3) beyaz pulpada, santral arteriyoller çevresinde gözlenen retiküler lifler bu grupta da gözlenmiştir (Şekil 4.80-4.82). Kesitlerde, beyaz pulpada bir kısım retiküler liflerde kalınlaşma gözlenmiş olsa da liflerin dağılımı süreklilik gösterdiği için kısmen düzenli görünüm gözlenmiştir (Şekil 4.82-4.84). Yaşlı deney grubunun kırmızı pulpasında bulunan retiküler lif ağı, sürekli ve ince bir görünüm sergilediği için yaşlı kontrol grubuna göre kısmen daha düzenli görünüm sergilemiştir ve kalınlaşarak yoğunlaşmış retiküler lifler kısmen daha az gözlenirken kırmızı pulpa alanına yayılmış olan retiküler lifler ince ve ağ şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.85-4.87).

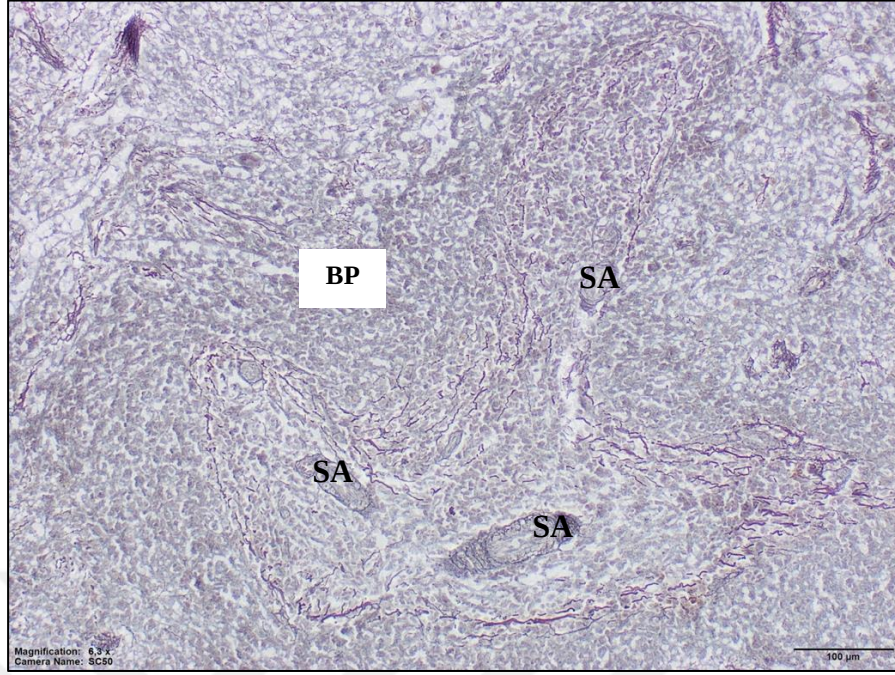


Şekil 4.76 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kapsül (Ka) ve kırmızı pulpa alanının (KP) genel görünümü. Retikülin, Bar: 100 µm

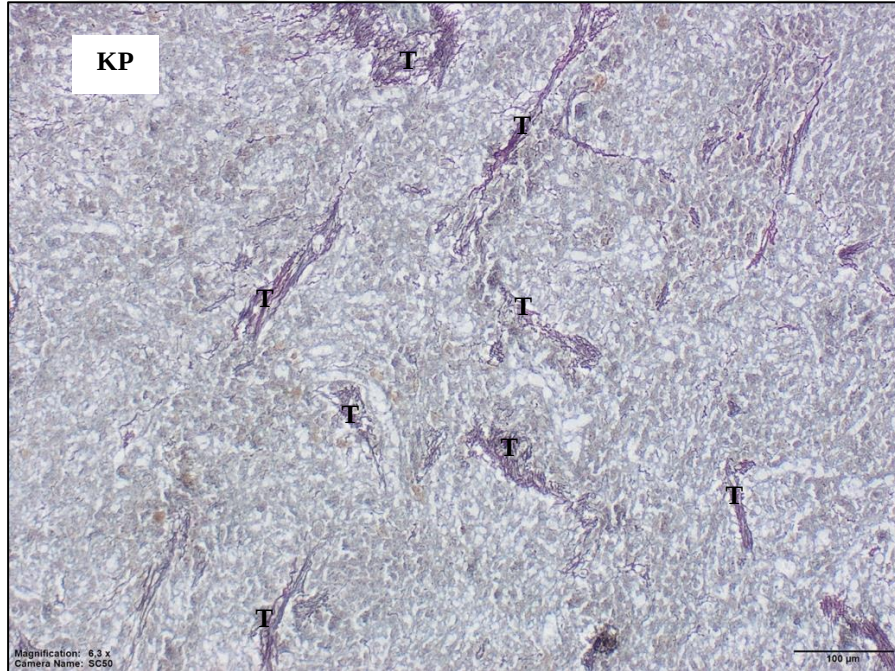


Şekil 4.77 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kapsül (Ka) ve kırmızı pulpa alanının (KP) genel görünümü. Retikülin, Bar: 100 µm



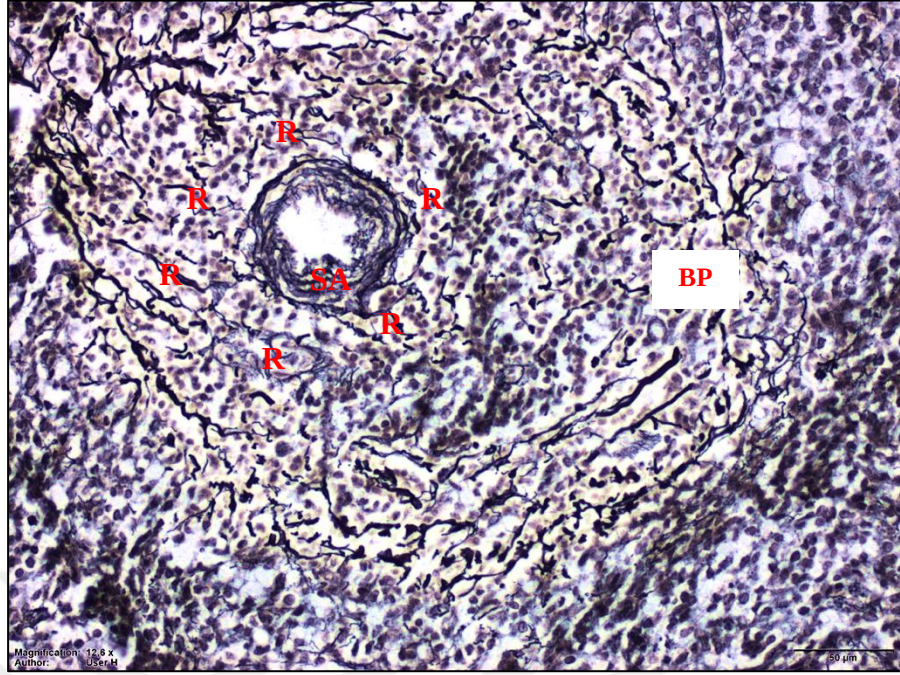


Şekil 4.78 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpa (BP) genel görünümü. Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 100 µm

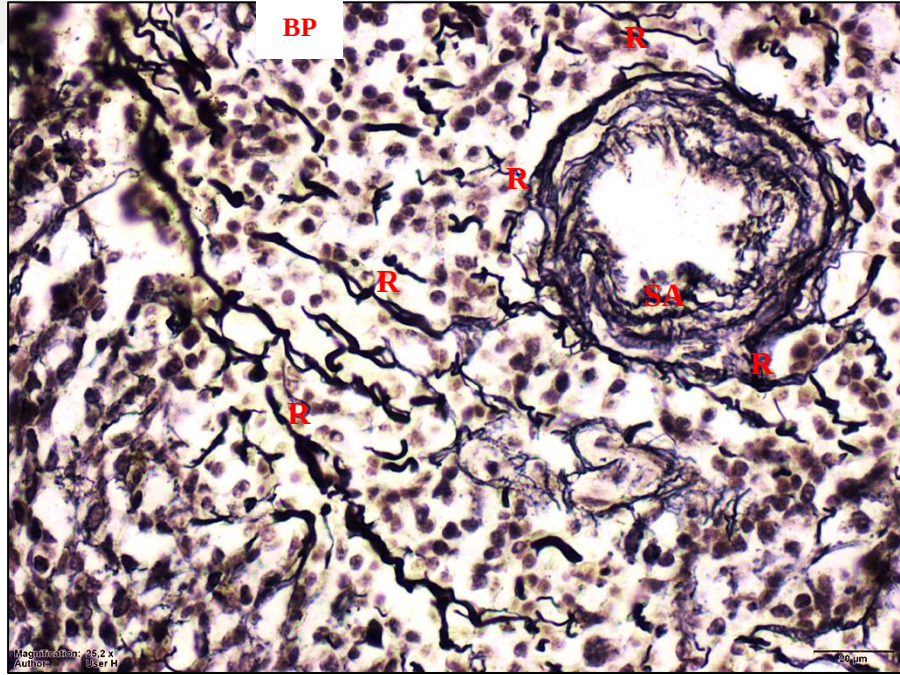


Şekil 4.79 Melatonin uygulanmış yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarının (T) genel görünümü. Retikülin, Bar: 100 µm



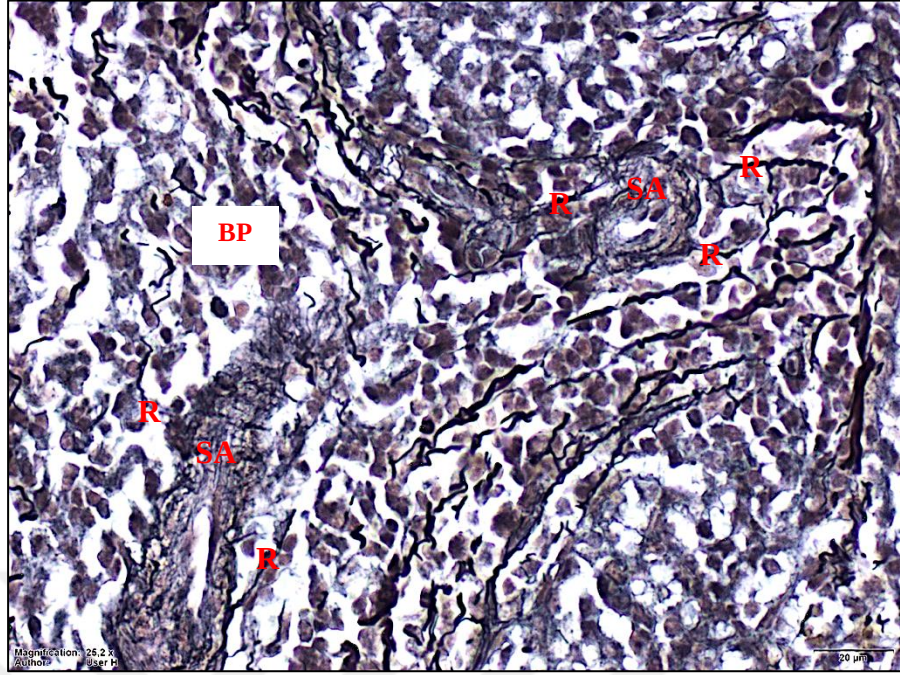


Şekil 4.80 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP), santral arteriyolün (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 50 µm

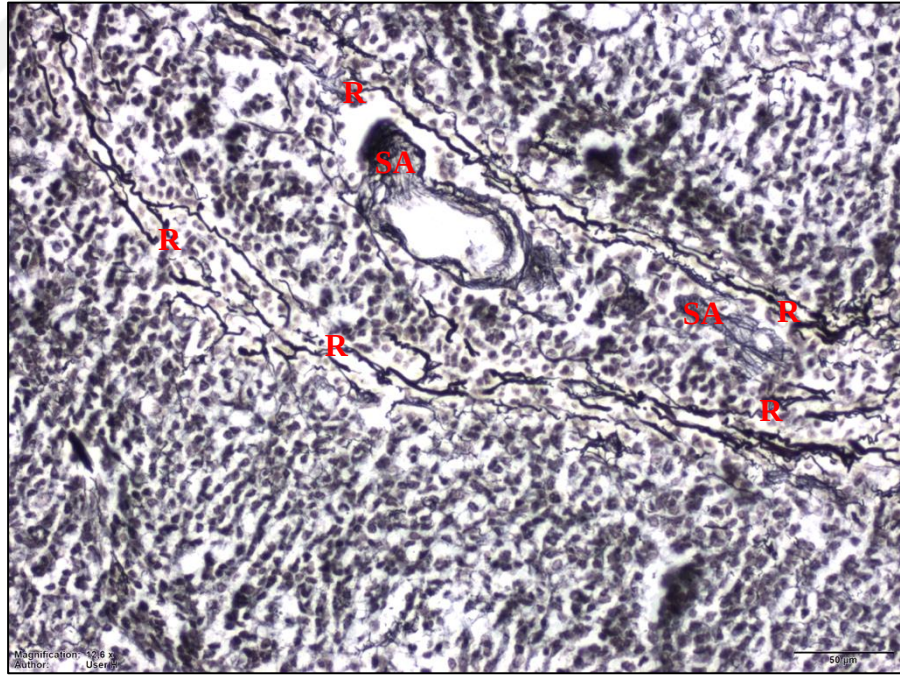


Şekil 4.81 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP), santral arteriyolün (SA) çevresinde gözlenen retiküler lifler (R). Retikülin, Bar: 20 µm



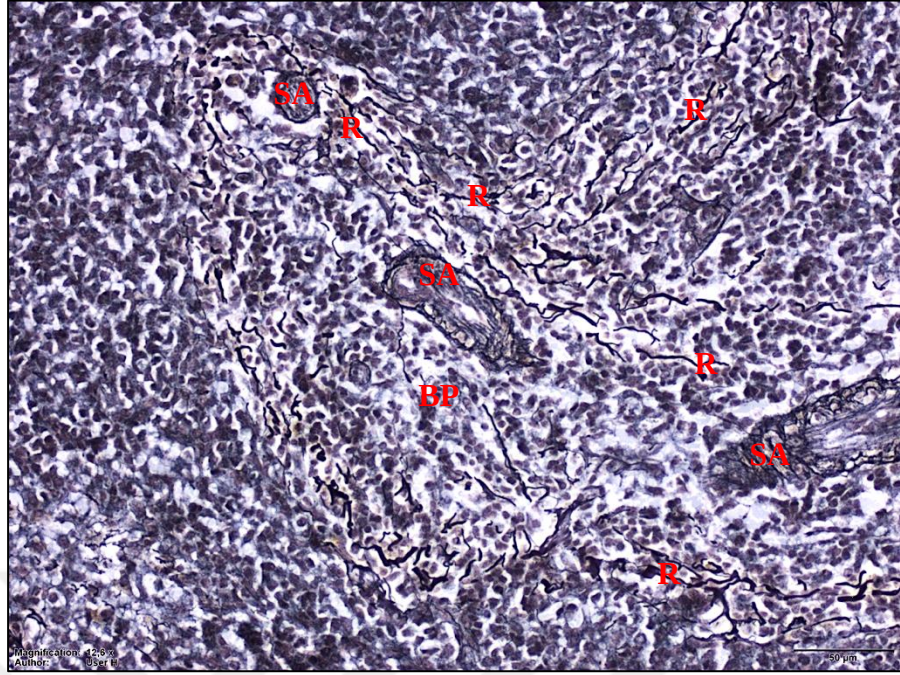


Şekil 4.82 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kısmen kalınlaşmış-düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 20 µm

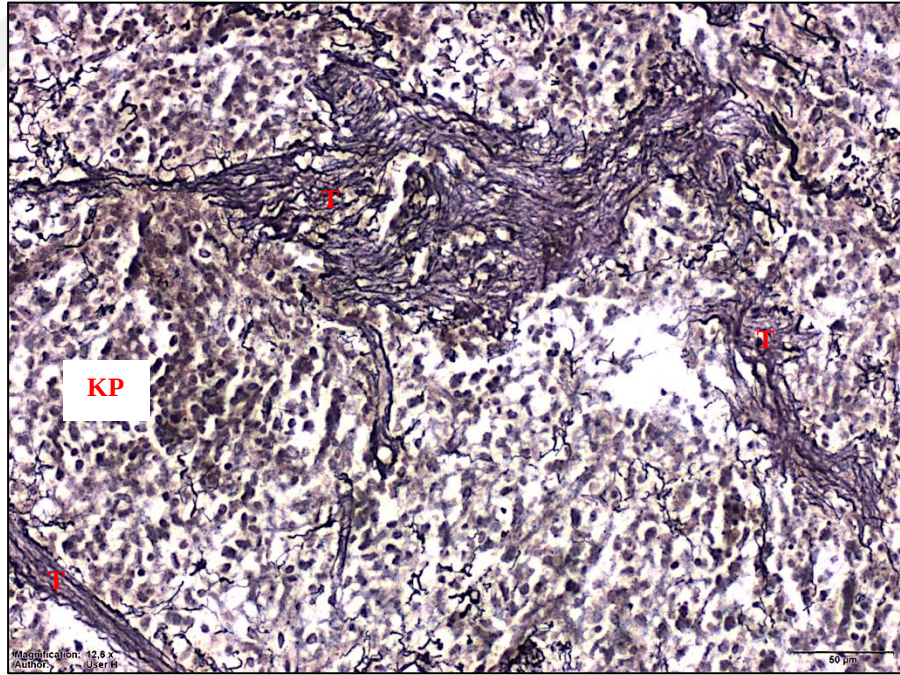


Şekil 4.83 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm



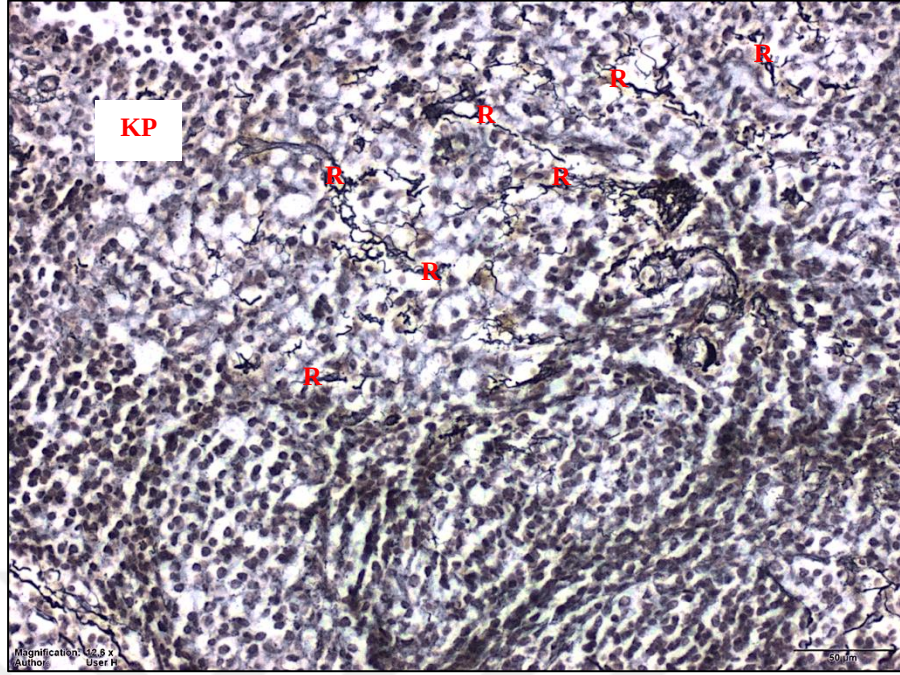


Şekil 4.84 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, beyaz pulpada (BP) kısmen düzenli görünüme sahip retiküler lifler (R). Santral arteriyol (SA). Retikülin, Bar: 50 µm

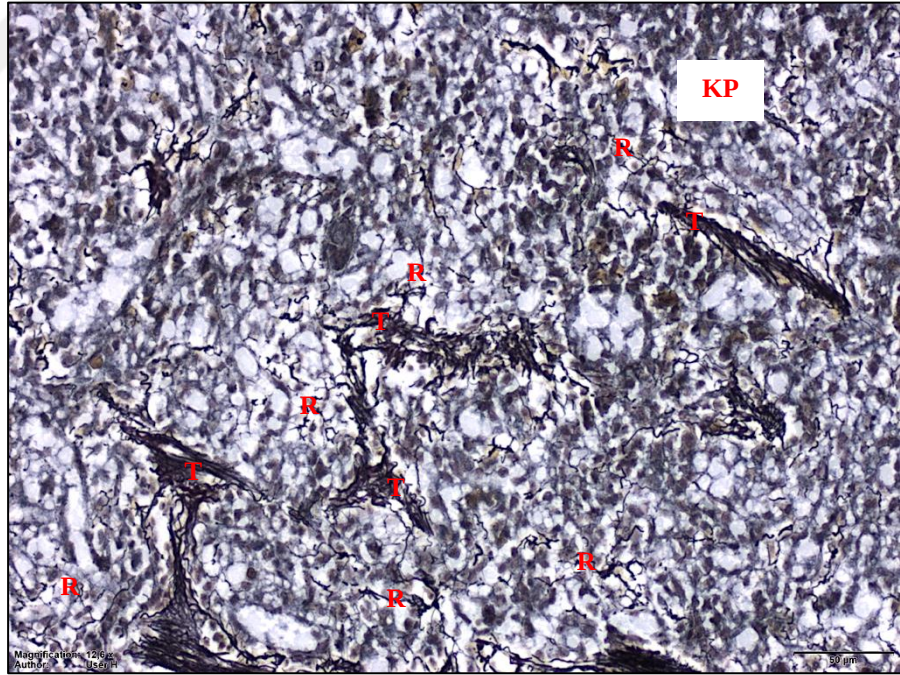


Şekil 4.85 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) trabekül yapılarında (T) retiküler liflerin yoğunlaşmış görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm





Şekil 4.86 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) ince bir şekilde gözlenen retiküler liflerin (R) ağ görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm



Şekil 4.87 Yaşlı deney grubu (Grup 4) sıçan dalağında, kırmızı pulpada (KP) ince ve ağ şeklinde olan retiküler lifler (R) ile trabekül yapılarını (T) oluşturan retiküler liflerin görünümü. Retikülin, Bar: 50 µm

Mikrograf verilerinden elde ettiğimiz yukarıda yer alan bu sonuçlar kalitatif olarak aşağıdaki çizelgede özetle listelenmiştir. Gruplara göre değerlendirdiğimiz histolojik karakterler, incelediğimiz kesitlerdeki gözlenme seviyelerine veya sayılarına göre aşağıdaki çizelgede derecelendirilmiştir. Derecelendirdiğimiz kesitlerdeki gözlenme seviyeleri, hiç gözlenmeyen (-) seviyeden başlayarak, yüksek seviyede (+++++) gözlenen histolojik karakterler ile 5 farklı değerde yapılmıştır.





Çizelge 4.3 Retikülin boyalı 4 farklı gruba ait sıçan dalak kesitlerinde gözlenen histolojik karakterlerin, gözlenme seviyelerine göre derecelendirilmesi

| HİSTOLOJİK<br>KARAKTERLER                                                                                                        | GRUPLAR                              |                                                            |                                       |                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                  | Genç<br>Kontrol<br>Grubu<br>(Grup 1) | Melatonin<br>Uygulanmış<br>Genç Deney<br>Grubu<br>(Grup 3) | Yaşlı<br>Kontrol<br>Grubu<br>(Grup 2) | Melatonin<br>Uygulanmış<br>Yaşlı Deney<br>Grubu<br>(Grup 4) |
| <b>Beyaz Pulpa</b>                                                                                                               |                                      |                                                            |                                       |                                                             |
| Düzensiz<br>görünümüne sahip<br>(kesik-kesik)<br>retiküler fibriller                                                             | +                                    | +                                                          | ++++                                  | +++                                                         |
| Kalınlaşmış<br>retiküler fibriller                                                                                               | +                                    | +                                                          | +++++                                 | +++                                                         |
| <b>Kırmızı Pulpa</b>                                                                                                             |                                      |                                                            |                                       |                                                             |
| Trabekül<br>yapılarında<br>yoğunlaşmış<br>retiküler fibriller                                                                    | +                                    | ++                                                         | +++++                                 | ++++                                                        |
| Trabekül<br>yapılarında<br>kalınlaşmış<br>retiküler fibriller                                                                    | +                                    | +                                                          | +++++                                 | +++                                                         |
| Retiküler liflerin<br>ince-ağ yapısı<br>dağılımı                                                                                 | ++++                                 | ++++                                                       | ++                                    | +++                                                         |
| - , gözlenmedi; + , çok az seviyede; ++ , az seviyede; +++ , orta seviyede; ++++ , yüksek seviyede; +++++ , çok yüksek seviyede. |                                      |                                                            |                                       |                                                             |

#### 4.2 Histomorfometrik Analiz

Kontrol gruplarının (Grup 1 ve 2) ve melatonin uygulanmış deney gruplarının (Grup 3 ve 4) beyaz pulpa alanı, kırmızı pulpa alanı ve toplam dalak alanı ölçülmüştür (Çizelge 4.4). Her veri için, beyaz ve kırmızı pulpa alanlarının, toplam dalak alanına oranı yüzde olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Sonuçlar, Ortalama  $\pm$  SEM olarak özetlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.88). Elde edilen verilere göre, melatonin uygulanmış gruplarda (Grup 3 ve

4) beyaz pulpa oranının kontrol grupları (Grup 1 ve 2) ile karşılaştırıldığında arttığı gözlenmiştir; ancak bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 4.4 Histomorfometrik analiz için preparatlarda ölçülen toplam beyaz pulpa alanları (taBP  $\mu\text{m}^2$ ), kırmızı pulpa alanları (taKP  $\mu\text{m}^2$ ) ve toplam dalak alanları (taD  $\mu\text{m}^2$ )

|                                                           | taBP ( $\mu\text{m}^2$ )                | taKP ( $\mu\text{m}^2$ )                 | taD ( $\mu\text{m}^2$ )                  |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Grup 1</b><br>(Genç Kontrol)                           | <b>1A-</b> 10110893,121 $\mu\text{m}^2$ | <b>1A-</b> 11737008.114 $\mu\text{m}^2$  | <b>1A-</b> 21847901.235 $\mu\text{m}^2$  |
|                                                           | <b>2B-</b> 9867368,846 $\mu\text{m}^2$  | <b>2B-</b> 23934340,259 $\mu\text{m}^2$  | <b>2B-</b> 33801709,105 $\mu\text{m}^2$  |
|                                                           | <b>3B-</b> 4529756,952 $\mu\text{m}^2$  | <b>3B-</b> 10361909,715 $\mu\text{m}^2$  | <b>3B-</b> 14891666.667 $\mu\text{m}^2$  |
| <b>Grup 2</b><br>(Yaşlı Kontrol)                          | <b>19B-</b> 4912372,794 $\mu\text{m}^2$ | <b>19B-</b> 10158773,787 $\mu\text{m}^2$ | <b>19B-</b> 15071146.581 $\mu\text{m}^2$ |
|                                                           | <b>20B-</b> 3956894,487 $\mu\text{m}^2$ | <b>20B-</b> 12064367,881 $\mu\text{m}^2$ | <b>20B-</b> 16021262.368 $\mu\text{m}^2$ |
|                                                           | <b>21B-</b> 4145922,396 $\mu\text{m}^2$ | <b>21B-</b> 12228224,75 $\mu\text{m}^2$  | <b>21B-</b> 16374147.146 $\mu\text{m}^2$ |
| <b>Grup 3</b><br>(Melatonin<br>Uygulanmış<br>Genç Deney)  | <b>9B-</b> 6536448,704 $\mu\text{m}^2$  | <b>9B-</b> 10521323,93 $\mu\text{m}^2$   | <b>9B-</b> 17057772.634 $\mu\text{m}^2$  |
|                                                           | <b>10B-</b> 5663158,694 $\mu\text{m}^2$ | <b>10B-</b> 8971757,04 $\mu\text{m}^2$   | <b>10B-</b> 14634915.734 $\mu\text{m}^2$ |
|                                                           | <b>12A-</b> 3306178,08 $\mu\text{m}^2$  | <b>12A-</b> 6364248,494 $\mu\text{m}^2$  | <b>12A-</b> 9670426.574 $\mu\text{m}^2$  |
| <b>Grup 4</b><br>(Melatonin<br>Uygulanmış<br>Yaşlı Deney) | <b>15B-</b> 6029328,69 $\mu\text{m}^2$  | <b>15B-</b> 13236620,384 $\mu\text{m}^2$ | <b>15B-</b> 19265949.074 $\mu\text{m}^2$ |
|                                                           | <b>16B-</b> 6568761,76 $\mu\text{m}^2$  | <b>16B-</b> 14424504,058 $\mu\text{m}^2$ | <b>16B-</b> 20993265.818 $\mu\text{m}^2$ |
|                                                           | <b>17B-</b> 4408196,095 $\mu\text{m}^2$ | <b>17B-</b> 11089581,266 $\mu\text{m}^2$ | <b>17B-</b> 15497777.361 $\mu\text{m}^2$ |

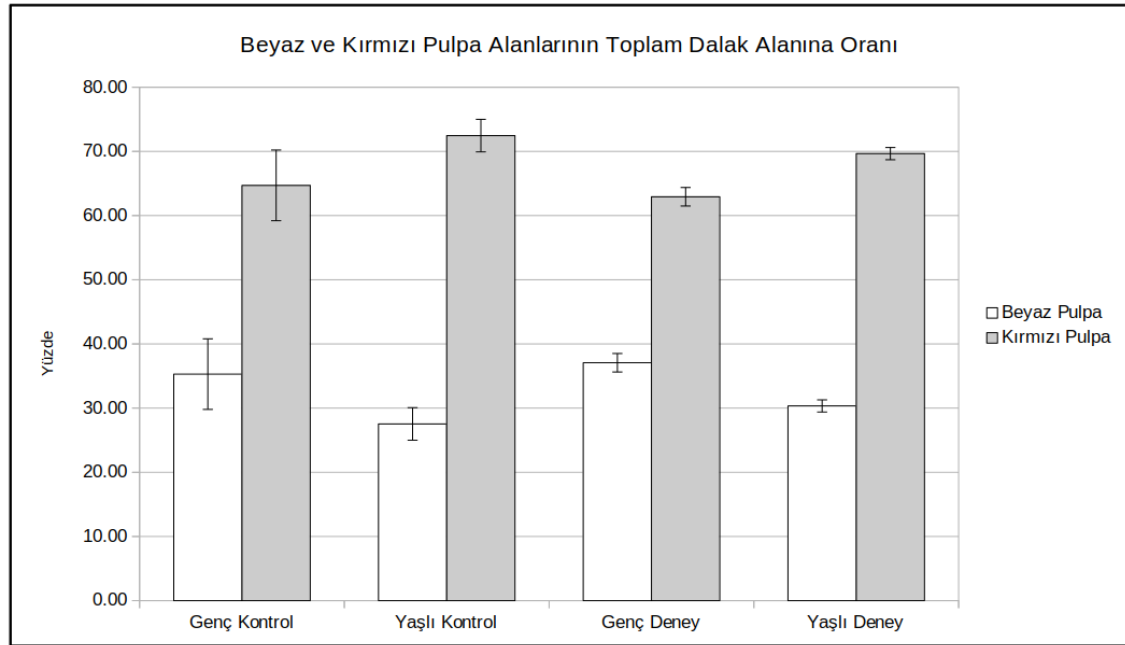
Çizelge 4.5 Kontrol ve deney gruplarında toplam beyaz pulpa alanlarının (taBP) ve toplam kırmızı pulpa alanlarının (taKP) toplam dalak alanlarına (taD) yüzde oranları

| Deney Grupları                                         | Preparatlar | taBP/taD (%) | taKP/taD (%) |
|--------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>Grup 1</b> (Genç Kontrol)                           | <b>1A</b>   | 46,2785      | 53,7214      |
|                                                        | <b>2B</b>   | 29,1919      | 70,8080      |
|                                                        | <b>3B</b>   | 30,4180      | 69,5819      |
| <b>Grup 2</b> (Yaşlı Kontrol)                          | <b>19B</b>  | 32,5945      | 67,4054      |
|                                                        | <b>20B</b>  | 24,6977      | 75,3022      |
|                                                        | <b>21B</b>  | 25,3199      | 74,6800      |
| <b>Grup 3</b> (Melatonin<br>Uygulanmış Genç<br>Deney)  | <b>9B</b>   | 38,3194      | 61,6805      |
|                                                        | <b>10B</b>  | 38,6962      | 61,3037      |
|                                                        | <b>12A</b>  | 34,1885      | 65,8114      |
| <b>Grup 4</b> (Melatonin<br>Uygulanmış Yaşlı<br>Deney) | <b>15B</b>  | 31,2952      | 68,7047      |
|                                                        | <b>16B</b>  | 31,2898      | 68,7101      |
|                                                        | <b>17B</b>  | 28,4440      | 71,5559      |



Çizelge 4.6 Kontrol ve deney gruplarında toplam beyaz ve kırmızı pulpa alanlarının, toplam dalak alanlarına yüzde oranlarının toplamalarının ortalaması  $\pm$ SEM. Her grup için n=3

| Deney Grupları                                   | T <sub>taBP</sub> /T <sub>taD</sub> (%) | T <sub>taKP</sub> /T <sub>taD</sub> (%) |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Grup 1 (Genç Kontrol)</b>                     | 35,30 $\pm$ 5,50                        | 64.70 $\pm$ 5,50                        |
| <b>Grup 2 (Yaşlı Kontrol)</b>                    | 27,54 $\pm$ 2,53                        | 72.46 $\pm$ 2,53                        |
| <b>Grup 3 (Melatonin Uygulanmış Genç Deney)</b>  | 37,07 $\pm$ 1.44                        | 62,93 $\pm$ 1,44                        |
| <b>Grup 4 (Melatonin Uygulanmış Yaşlı Deney)</b> | 30,34 $\pm$ 0,95                        | 69,66 $\pm$ 0,95                        |



Şekil 4.88 Kontrol ve deney gruplarında beyaz pulpa alanlarının (BP) ve kırmızı pulpa alanlarının (KP) dağılımı. Toplam beyaz pulpa (taBP) ve toplam kırmızı pulpa (taKP) alanlarının toplam dalak alanına (taD) oranlarını yüzde olarak gösteren çubuk grafik. Veriler ortalama  $\pm$  SEM. Her grup için n = 3

### 4.3 İstatistiksel Analiz

R versiyon 4.1.2 (2021-11-01) kullanılarak, Bonferroni düzeltmeli, Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Beyaz pulpa ve kırmızı pulpa alanlarının toplam dalak alanlarına oranları arasında kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşlanma, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hasarlara karşı organizmayı savunan çeşitli koruyucu mekanizmaların başarısızlığının veya yavaşlamasının bir sonucu olarak gelişen bir süreçtir (Vishwas vd. 2013). Ayrıca, ROS kaynaklı oksidatif stresin neden olduğu homeostaz kaybı, bağışıklık sisteminde inflamasyonla birlikte dokularda, yaşlanma sürecindeki hasarı derinleştirmektedir. İyi bilinen ekzojen antioksidanlardan biri olan melatonininin ise oldukça fazla koşulda oksidatif stresi azaltmada alışılmadık derecede etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada yaşlanmaya karşı bir etki olarak melatonin uygulamasının, genç ve yaşlı sıçanlarda dalak dokusuna etkisi histolojik olarak incelenmiştir.

Dalağın histolojik yapısı, türler arasında bazı belirgin farklılıklar gösterse de türlerin çoğunda hemen hemen benzer olduğu bildirilmiştir (Elmore 2006, El-naseery vd. 2020). Genel görünümde sıçan dalağının beyaz pulpası, diğer türlere göre daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir (Cesta 2006). Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanmış sıçan dalağının normal mimarisinde, genç kontrol sıçanlarda beyaz pulpa alanının soluk germinal merkezleri olan lenfatik foliküllerden oluştuğu ve bir santral arteriyolün, lenfatik folikülün çevresinde periarteriolar lenfatik kılıf (PALS) içine alındığı belirtilmiştir (El-naseery vd. 2020). Ayrıca, genç sıçanlarda beyaz pulpada bulunan foliküllerin, PALS alanından belirgin bir şekilde marjinal sinüs ile ayrıldığı gösterilmiştir (Cesta 2006). İlave olarak, sıçanlarda hemisferik lenfoid foliküllerin (komşu folikül), manto bölgesi olarak adlandırılan sıkı paketlenmiş B lenfositlerinden oluşan bir alanla çevrili olduğu, büyük ve aktif olarak bölünen lenfositler içeren soluk renkli bir germinal merkeze sahip olduğu ve PALS alanının dış kısmında bitişik şekilde bulunduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kohn vd. 1999, Gruver vd. 2007). Kırmızı pulpada kapsülden dalak parankimine uzanan ve içerisinde ven, arter ve sinirleri bulundurabilen trabekül yapıları, dalak kordonları ve özellikle marjinal bölgenin çevresinde dalak sinüzoidlerinin yer aldığı dalağın normal histolojik yapısında izlenmiştir (Cesta 2006). H&E ile boyanan dalak kesitinde PALS bölgesinin ağırlıklı olarak küçük lenfositlerin varlığından dolayı beyaz pulpanın en koyu boyanan bölgesi olarak görüldüğü bildirilmiştir (Elmore 2006). Bizim çalışmamızda genç kontrol grubu (Grup 1) sıçanların



dalak kesitlerinde, kırmızı pulpa alanına dağılmış şekilde damar içeren veya damar içermeyen şekilde trabekül yapıları ve bütünlüğü korunmuş venöz sinüsler gözlenmiştir. Beyaz pulpada ise santral arteriyolden kırmızı pulpaya doğru sırasıyla santral arteriyolu çevreleyen PALS yapısı, marjinal sinüs ve marjinal bölge sınırları belirgin şekilde foliküllerde gözlenmiştir. Ayrıca, kesitlerde H&E ile boyanan en koyu alanlar, PALS alanları olmuştur. Ek olarak, bazı beyaz pulpalarda santral arteriyol çevresinde germinal merkezler ve PALS alanına bitişik olan komşu foliküller de gözlenmiştir.

Yaşlı sıçanlarda, H&E boyalı kesitler incelendiğinde beyaz pulpa ve kırmızı pulpa arasındaki sınırın belirsizleştiği tespit edilmiştir (El-naseery vd. 2020). Sıçan dalağında, lenfoid bölüm olan beyaz pulpada yaşla birlikte atrofi gözlenmesinin yaygın bir değişiklik olduğu ve yapılan çalışmalarda, ışık mikroskobu incelemesinde belirgin bir etiyoloji olmaksızın azalmış lenfosit yoğunluğunun gözlenebileceği belirtilmiştir (Losco 1992, Cesta 2006, El-naseery vd. 2020). Bizim çalışmamızda da, bu bulgularla uyumlu olarak yaptığımız histomorfometrik analiz sonucunda yaşlı sıçanların beyaz pulpa alanının genç sıçanların beyaz pulpa alanına göre daha azaldığı ve yaşlı sıçanların dalak kesitlerinin ışık mikroskobu incelemesinde kalitatif olarak lenfosit yoğunluğunda da azalma olduğu gözlenmiştir. Beyaz pulpada atrofiye giden lenf folikülleri de dikkati çekmiştir. Beyaz pulpa ve kırmızı pulpa arasındaki marjinal bölgenin yaşlı sıçanlarda net bir şekilde izlenemediği tespit edilmiştir. Melatonin uygulanmış gruplarda ise genç kontrollere yakın görüntüler elde edilmiştir.

Dalakta çeşitli pigmentlerin gözlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda yaşlı sıçanların kırmızı pulpasında ve bazen de beyaz pulpasında makrofajların sitoplazmasındaki hemosiderin pigmentlerinin tipik bir bulgu olduğu tespit edilmiş ve aynı bölgelerde retiküler hücre ve makrofaj sayısında da artış olduğu gösterilmiştir (Losco 1992, Cesta 2006). Yaptığımız çalışmada bu bulgularla uyumlu olarak, yaşlı sıçanların kırmızı pulpasında belirgin bir şekilde hemosiderin pigmentleri gözlenmiştir. Ayrıca, melatonin uygulanan yaşlı deney grubu sıçanlarda hemosiderin pigmentlerinin kontrol grubundaki yaşlı sıçanlara göre daha soluk renge boyandığı ve azaldığı tespit edilmiştir.

El-Sokkary ve arkadaşları (2003) çalışmalarında yaşlı sıçanların dalak dokularında histopatolojik olarak hem beyaz pulpa hem de kırmızı pulpalarda lenfoid elemanların azaldığını, hemosiderin pigment birikimi olduğunu ortaya koymuşlardır ve melatonin desteğinin hücrelerde proliferatif aktiviteyi restore ettiğini ifade etmişlerdir (El-Sokkary vd. 2003). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde yaşlı sıçanların dalak dokularındaki lenfoid yapılarda hücre azalması ve hemosiderin pigment artışı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda melatoninin dozu ve veriliş şekli ile ilgili olarak El-Sokkary ve arkadaşlarının (2003) yapmış oldukları uygulamalardan farklı metot kullanılmıştır. Çalışmamızda uygulanan melatonin dozunun yaşlı sıçanların dalak dokusundaki hasarları kısmen telafi edebildiği gözlenmiştir.

Yaşlanma ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan metabolik yaşlanmış deney hayvanlarının yanında, kimyasallar kullanılarak çeşitli organ sistemlerindeki değişimler indüklenmiş ve bu şekilde deneysel yaşlandırılmış hayvanlar da kullanılmaktadır (Cebe vd. 2014). Yapılan çalışmalarda kronik D-galaktoz maruziyetinin sıçanlarda doğal yaşlanmaya benzer şekilde erken yaşlanmaya neden olduğu doğrulanmıştır (Ho vd. 2003, Aydın vd. 2012, Cebe vd. 2014, Liu vd. 2017). Deney hayvanlarında, D-galaktoz ile deneysel yaşlanma modeli kullanılarak farklı antioksidanların, yaşlanmada ortaya çıkan değişikliklere olan etkisi araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur ve ayrıca bu çalışmalarda yaşlı sıçan dalağı da incelenmiştir (Li vd. 2014, Chen vd. 2017, Zheng 2020). Bu uygulama, kolay olması, modelin oluşturulması için kısa süre, nadir tümör insidansı, düşük maliyet ve deneysel yaşlanma dönemi boyunca yüksek sağkalım oranı gibi avantajlara sahip olmasına karşın D-galaktozun organizmada oluşturacağı fizyolojik değişiklikler için optimal etkisinin dozaj, yaş grubu ve zaman aralığına bağlı olarak değişip değişmediği konusunda farklı görüşler bildirilmiştir (Cebe vd. 2014, Yanar vd. 2011). Doğal yaşlanmada ise doğal yaşlanma sürecinin zaman, maliyet, ölüm riski ve hastalıklar gibi sınırlayıcı yönleri bulunmaktadır (Cebe vd. 2014). Bizim çalışmamızda doğal olarak yaşlanmış sıçanların dalak dokuları incelenmiştir.

Periyodik asit-Schiff (PAS) ile boyanmış genç ve yaşlı sıçan dalak kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (El-naseery vd. 2020). Genç sıçanların dalak dokularında dağınık şekilde PAS pozitif hücreler



gözlenirken, yaşlı sıçanların dalak dokularında dejenerasyona uğrayan hücrelerin PAS pozitif kümeleşmiş yığınlar oluşturduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da genç ve yaşlı sıçan kesitlerinde PAS pozitif boyamalar gözlenmiştir. Özellikle yaşlı kontrol grubu (Grup 2) kesitlerinde genç kontrollere göre PAS pozitif reaksiyon gösteren hücreler daha yoğun gözlenmiştir. Melatonin uygulanmış yaşlı deney gruplarında ise daha az PAS pozitif reaktiviteye rastlanmıştır.

Retiküler lif histopatolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı patolojik süreçlerde retiküler liflerde proliferasyon ve dolayısıyla retiküler lif artışı olduğu görülmüştür (Vardı vd. 2005, Mizuno vd. 2018). Bazı patolojik durumlarda da retiküler liflerin azaldığı, düzensiz dağılım gösterdiği ve kısaldığı bildirilmiştir (Chyatte vd. 1990). Bizim çalışmamızda da yaşlı sıçanların dalak dokularında iyi organize olamamış retiküler liflere rastlanılmıştır. Retikülin boyaması sonuçları melatonin uygulamasının retiküler lif organizasyonu üzerinde onarıcı görev gördüğünü düşündürmüştür.

Melatoninin çeşitli antijenlere karşı antikor yanıtlarını artırdığı ve yaşlanma ile ilgili olan süreçte antikor üretimini geri kazandırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Caroleo vd. 1992, Akbulut vd. 2001). Ayrıca melatoninin spesifik bir antijene karşı, hafıza immün reaktivitesini spesifik ve kalıcı olarak artırabileceği de tespit edilmiştir (Caroleo vd. 1994). Rassmussen ve arkadaşları (2001), genç ve orta yaşlı sıçanlarda yaşa bağlı melatonin düzeyinde azalma tespit etmişlerdir ve yaşlanma sürecinde melatonin sentezinin azaldığını belirtmişlerdir (Rassmussen vd. 2001). Bir başka rodent olan farelerde melatonin sentezinin baskılanmasının primer antikor yanıtında, dalak ve timusta immün hücre sayısında azalmaya neden olduğu ve eksojen melatoninin immün hasarı telafi edebildiği Maestroni ve arkadaşları (1988) tarafından bildirilmiştir (Maestroni vd. 1988). Yapılan başka bir çalışmada ise eksojen melatonin, yaşlı sıçanlarda IgM ve IgG1 seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir ve bu çalışmada eksojen melatoninin yaşlı hayvanlarda baskılanmış humoral immün yanıtları artırabildiği ifade edilmiştir (Akbulut vd. 2001). Bizim yaptığımız histolojik çalışmada da yaşlı sıçanlarda kalitatif hücre sayısının azaldığı, melatonin uygulanan gruplarda ise bunun telafi edilebildiği ortaya konmuştur.

Yapılan çalışmalarda yaşlanma ve bazı patolojik süreçlerde melatonin uygulanmasının beyin, karaciğer, pankreas ve akciğerde oksidatif hasarı tedavi edici etki gösterdiği ifade edilmiştir (Melchiorri vd. 1994, Reiter 1995a, b, Yüzüak 2014). Etkili bir immünomodülatör ve antioksidan olan melatoninin radikal süpürücü etkisini, yaşlı gruplarda gençlere kıyasla daha belirgin olarak gösterdiği belirtilmiştir (Kędziora-Kornatowska vd. 2007, Yüzüak vd. 2014). Rassmussen ve arkadaşları (2001) çalışmalarında genç ve orta yaşlı erkek Sprague-Dawley sıçanlarında günlük melatonin tedavisinin enerji düzenlemesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (Rassmussen vd. 2001). Yaptıkları çalışma sonucunda, melatonin uygulamasının yeniliğe tepki testinde orta yaşlı sıçanların davranışsal yanıt verebilirliğini uyardığını ve gençlik seviyelerini geri getirdiğini fakat genç sıçanların davranışsal yanıt verebilirliğini önemli ölçüde değiştirmedğini belirtmişlerdir (Rassmussen vd. 2001). Bizim yaptığımız çalışmada da, genç kontrol ve melatonin uygulanmış genç deney gruplarında (Grup 1 ve Grup 3) belirgin değişiklikler gözlenmezken, yaşlı kontrol ve melatonin uygulanmış yaşlı deney gruplarında (Grup 2 ve Grup 4) belirgin değişiklikler gözlenmiştir.

Sonuç olarak; yaşlanma ile gelişen süreçte dalak doku parankimasının hem beyaz pulpa hem de kırmızı pulpasında bazı hasarlanmalar tespit edilmiştir. Beyaz pulpada lenf foliküllerinin bir kısmının atrofiye uğradığı ve genç kontrollere göre beyaz pulpa oranının azaldığı görülmüştür. Kırmızı pulpada belirgin hemosiderin pigment artışı, bazı venöz sinüslerin lümeninde hasarlı eritrosit kümeleri gözlenmiştir. Hem beyaz pulpada hem de kırmızı pulpada lenfosit yoğunluğunda azalma olduğu da dikkati çekmiştir. Beyaz pulpa ve kırmızı pulpa arasındaki marjinal bölge yaşlı sıçanlarda net olarak izlenememiştir ve dalak stromasında retiküler liflerin iyi organize olamadığı ve kalınlaştığı tespit edilmiştir. Melatoninin, yapılan histolojik incelemelerin sonuçlarına göre kırmızı pulpa sinüzoidleri ve retiküler lif organizasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu ve kırmızı pulpadaki hemosiderin pigmentlerini azalttığı tespit edilmiştir. Melatonin uygulanan yaşlı deney gruplarında hücre yoğunluğunun genç kontrollere benzer görüntü vermesi melatoninin hücrelerde hiperplaziyi tetiklediğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmada genç kontrollerle melatonin uygulanan genç deney grupları arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Bu gruplarda doku bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre melatonin uygulamasının yaşlanma ile ilgili süreçte ortaya çıkan doku hasarlanmasını kısmen telafi edebildiği histolojik incelemelerle gösterilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan melatonin dozunun uygun olduğu düşünülmüştür.



## KAYNAKLAR

- Ahmad, R. ve Haldar, C. 2010. Melatonin and androgen receptor expression interplay modulates cell mediated immunity in tropical rodent *Funambulus pennanti*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 71, 420–430.
- Akbulut, K. G., Gönül, B. ve Akbulut, H. 2001. The Effects of Melatonin on Humoral Immune Responses of Young and Aged Rats. *Immunological Investigations*, 30(1), 17-20.
- Aydın, S., Yanar, K., Atukeren, P., Dalo, E., Sitar, M. E., Uslu, E., Caf, N. ve Çakatay, U. 2012. Comparison of oxidative stress biomarkers in renal tissues of D-galactose induced, naturally aged and young rats. *Biogerontology*, 3(3), 251–260.
- Bagchi, K. ve Puri, S. 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Journal*, 4(2), 350-360.
- Bauer, M. E. 2005. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*, 8(1), 69-83.
- Bauer, M. E. ve De la Fuente, M. 2016. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, 156, 27–37.
- Beckman, K. B. ve Ames, B. N. 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547–581.
- Blagosklonny, M. V. 2008. Aging: ROS or TOR. *Cell Cycle*, 7(21), 3344-3354.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., Morales ve P. ve Soković, M. 2018. Antioxidants and Prooxidants: Effects on Health and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-2.
- Caroleo, M. C., Doria, G. ve Nistico, G. 1994. Melatonin restores immunodepression in aged and cyclophosphamide-treated mice. *Annals of the New York Academy of Science Journal*, 719(May 31), 343-351.
- Caroleo, M. C., Frasca, D., Nistico, G. ve Doria, G. 1992. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology*, 23(3), 81-89.
- Cebe, T., Atukeren, P., Yanar, K., Kuruç, A. I., Ozan, T., Kunbaz, A., Sitar, M. E., Mirmaroufizibendah, R., Aydın, S. ve Çakatay, U. 2014. Oxidation scrutiny in persuaded aging and chronological aging at systemic redox homeostasis level. *Experimental Gerontology*, 57, 132–140.
- Chen, N. Y., Liu, C. W., Lin, W., Ding, Y., Bian, Z., Huang, L., Huang, H., Yu, K. H., Chen, S. B., Sun, Y., Wei, L., Peng, J. H., Pan, S. L. 2017. Extract of *Fructus*

- Cannabis Ameliorates Learning and Memory Impairment Induced by D-Galactose in an Aging Rats Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-13.
- Cesta, M. F. 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 455-465.
- Chadburn, A. 2000. The Spleen: Anatomy and Anatomical Function. *Seminars in Hematology*, 37(1), 13-21.
- Chandrasekaran, A., Idelchik, M. D. P. S. ve Melendez, J. A. 2017. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, 11, 91–102.
- Chyatte, D., Reilly, J., Tilson, M. D. 1990. Morphometric analysis of reticular and elastin fibers in the cerebral arteries of patients with intracranial aneurysms. *Neurosurgery*, 26(6), 939-943.
- Crane, M. G., Liu, Y. C. ve Chadburn, A. 2021. Spleen: Development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 38(2), 112-124.
- Commoner, B., Townsend, J. ve Pake, G. E. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature*, 174, 689-691.
- Coon, S. L., Weller, J. L., Korf ve H. W. 2001. cAMP regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87), a new cell line (1e7) provides evidence of intracellular AANAT activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 24097–24107.
- De la Fuente ve M., Miquel, J. 2009. An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging: The Involvement of the Immune System in Oxi-Inflamm-Aging. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3003–3026.
- Dijkstra, C. D. ve Veerman, A. J. P. 1990. Normal Anatomy, Histology, Ultrastructure, Rat, In: *Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Hemopoietic System*. Jones, T. C., Ward, J. M., Mohr, U. ve Hunt, R. D. (eds.), Springer-Verlag, 185-193, Berlin.
- El-naseery, N. I., Mousa, H. S E., Noreldin, A. E., El-Far, A. H. ve Elewa, Y. H. A. 2020. Aging-associated immunosenescence via alterations in splenic immune cell populations in rat. *Life Sciences*, 241, 1-14.
- El-Sokkary, G. H., Reiter, R. J., Abdel-Ghaffar, S. K. 2003. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thymic lymphocytes of old rats. *Neuro Endocrinology Letters*, 24(3-4), 215-223.
- Elmore, S. A. 2006. Enhanced Histopathology of Spleen. *Toxicologic Pathology*, 34, 648-655.



- Ferrucci, L., Gonzalez-Freire, M., Fabbri, E., Simonsick, E., Tanaka, T., Moore, Z., Salimi, S., Sierra, F. ve de Cabo, R. 2020. Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell*, 19(2), 1-21.
- Frei, B., Stocker, R. ve Ames, B. N. 1988. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma (oxidants/polymorphonuclear leukocytes/ ascorbate/ plasma peroxidase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 9748-9752.
- Garrido, A., Cruces, J., Ceprián, N., Vara, E. ve de la Fuente, M. 2019. Oxidative-Inflammatory Stress in Immune Cells from Adult Mice with Premature Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 1-23.
- Genestra M. 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signaling*, 19(9), 1807–1819.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. ve Fenn, O. F. 1954. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*, 119, 623-626.
- Gitto, E., Karbownik, M., Reiter, R. J., Tan, D. X., Cuzzocrea, S., Chiurazzi, P., Cordaro, S., Corona, G., Trimarchi, G. ve Barberi, I. 2001. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatric Research*, 50, 756-60.
- Gruver, A. L., Hudson, L. L. ve Sempowski, G. D. 2007. Immunosenescence of ageing. *Journal of Pathology*, 211(2), 144-156.
- Haley, P. J. 2017. The lymphoid system: A review of species differences. *Journal of Toxicologic Pathology*, 30(2), 111-123.
- Halliwell, B. 1995. How to characterize an antioxidant-An update. *Biochemical Society Symposium*, 61, 73-101.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *The Journals of Gerontology*, 2, 298–300.
- Herrera, J., Nava, M., Romero, F., Rodriguez-Iturbe, B. 2001. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *American Journal of Kidney Diseases*, 37, 750-7.
- Ho, S. C., Liu, J. H., Wu, R. Y. 2003. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology*, 4(1), 15-18.
- Jang, J. Y., Blum, A., Liu, J. ve Finkel, T. 2018. The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 128 (9), 3662-3670.
- Kauppila, T. E. S., Kauppila, J. H. K. ve Larsson, N. G. 2017. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metabolism*, 25(1), 57-71.

- Kohn, D. B., Bauer, G., Rice, C. R., Rothschild, J. C., Carbonaro, D. A., Valdez, P., Hao, Q., Zhou, C., Bahner, I., Kearns, K., Brody, K., Fox, S., Haden, E., Wilson, K., Salata, C., Dolan, C., Wetter, C., Aguilar-Cordova, E. ve Church, J. 1999. A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*, 94(1), 368–371.
- Kędziora-Kornatowska, K., Szewczyk-Golec, K., Czuczejko, J., Lumen, K.v.M.d., Pawluk, H., Motyl, J., Karasek, M. and Kędziora, J. 2007. Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects. *Journal of Pineal Research*, 42, 53-158.
- Knutson, M. ve Wessling-Resnick, M. 2003. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 61–88.
- Krinsky N. I. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200, 248-54.
- Labat-Robert, J. ve Ladislas, R. 2015. Longevity and aging. Mechanisms and perspectives. *Pathologie Biologie*, 63(6), 272-276.
- Lee, H. C. ve Wei, Y. H. 2012. Mitochondria and Aging Advances in Mitochondrial Medicine. Springer, 311-327.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. ve Abete, P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772.
- Liszewski, M. K., Koley, M., Le Friec, G., Leung, M., Bertram, P. G., Fara, A. F., Subias, M., Pickering, M. C., Drouet, C., Meri, S., Arstila, T. P., Pekkarinen, P. T., Ma, M., Cope, A., Reinheckel, T., Rodriguez de Cordoba, S., Afzali, B., Atkinson, J. P. ve Kemper, C. 2013. Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and Mediates Effector Differentiation. *Immunity*, 39, 1143-1157.
- Li, M., Ouyang, W., Wu, X., Zheng, Y., Wei, Y. ve An, L. 2014. Kinetin inhibits apoptosis of aging spleen cells induced by D-galactose in rats. *Journal of Veterinary Science*, 15(3), 353-359.
- Liu, C., Hu, J., Mao, Z., Kang, H., Liu, H., Fu, W., Lv, Y. ve Zhou, F. Acute kidney injury and inflammatory response of sepsis following cecal ligation and puncture in d-galactose-induced aging rats. *Clinical Interventions in Aging*, 2017(12), 593-602.
- Liu, C., Li, M., Cao, Y., Qu, J. P., Zhang, Z. W., Xu, S. W. ve Li, S. 2014. Effects of avermectin on immune function and oxidative stress in the pigeon spleen. *Chemico-Biological Interactions*, 210(1), 43-50.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. ve Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126.
- Lopez-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. ve Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- Losco, P. 1992. Normal Development, Growth, and Aging of the Spleen, In: *Pathobiology of the Aging Rat*. Mohr, U., Dungworth, D. L. ve Capen, C. C. (eds.), ILSI Press, 75-94, Washington, D.C.
- Maestroni, G. J. M., Conti, A. ve Pierpaoli, W. 1988. Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Annals of the New York Academy Science*, 521, 140-148.
- Mahadevan, V. 2019. Anatomy of the pancreas and spleen. *Surgery (Oxford)*, 37(6), 297-301.
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kotani, M. ve Matsuno, K. 1989. Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS): An immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophils and ED2-positive macrophages in the rat. *Cell and Tissue Research*, 257, 459-470.
- Mizuno, H., Sekine, A., Oguro, M., Oshima, Y., Kawada, M., Sumida, K., ... Ubara, Y. 2018. Renal histology in a patient with TAFRO syndrome: a case report. *Human Pathology*, 82, 258-263.
- Mc Cord, J. M. 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*, 108, 652-9.
- Mebius, R. E. ve Kraal, G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 606-616.
- Melchiorri, D., Reiter, R. J., Attia, A. M., Hara, M., Burgos A. ve Nistico, G. 1994. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sciences*, 56, 83-89.
- Montaz, S. ve Abdollahi, M. 2012. A comprehensive review of biochemical and molecular evidences from animal and human studies on the role of oxidative stress in aging: an epiphenomenon or the cause. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, ISSN 1683-9919, 1-18.
- Munoz, M., Garcia-Erce, A. J. ve Remacha, F. A. 2011. Disorders of iron metabolism. Part 1: Molecular basis of iron homeostasis. *Journal of Clinical Pathology*, 64, 281-286.
- Nelson, R. J. 2004. Seasonal immune function and sickness responses. *Trends in Immunology*, 25, 187–192.



- Nicander, L., Brown, E. M., Dellmann, H. D. ve Landverk, T. 1993. Lymphatic Organs, In: Textbook of Veterinary Histology. Dellmann, H.D. (ed.), Lea and Febiger, 120-135, Philadelphia.
- Ogembo, J. G., Milner, D. A., Mansfield, K. G., Rodig, S. J., Murphy, G. F., Kutok, J. L., Pinkus, G. S. ve Fingerioth, J. D. 2012. SIRP $\alpha$ / CD172a and FHOD1 Are Unique Markers of Littoral Cells, a Recently Evolved Major Cell Population of Red Pulp of Human Spleen. *The Journal of Immunology*, 188(9), 4496-4505.
- Pabst, R. 1988. The spleen in lymphocyte recirculation. *Immunology Today*, 9, 43-45.
- Pomatto, L. C., Davies, K. J. 2018. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 420-430.
- Powers, S. K., Ji, L. L., Kavazis, A. N. ve Jackson, M. J. 2011. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, 1(2), 941-969.
- Rasmussen, D. D., Mitton, D. R., Larsen, S. A. ve Yellon, S. M. 2001. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *Journal of Pineal Research*, 31, 89-94.
- Rebelatto, M. C. 2018. Chapter 24- Spleen, Lymph Nodes, and Thymus, In: Boorman' s Pathology of the Rat (2nd Ed.), Suttie, A. W. (eds), Academic Press, 469-491.
- Reiter, J. 1995a. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16, 383-415.
- Reiter, R. J. 1995b. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal*, 9(7), 526-533.
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M. ve Qin, L. 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of Pineal Research*, 253-278.
- Rice-Evans, C. A. ve Diplock, A. T. 1993. Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 15, 77-96.
- Sadighi Akha, A. A. 2018. Aging and the immune system: An overview. *Journal of Immunological Methods*, 463, 21-26.
- Saito, H., Yokoi, Y., Kuroda, H. ve Namihisa, T. 1988. Reticular Meshwork of the Spleen in Rats Studied by Electron Microscopy. *The American Journal of Anatomy*, 181, 235-252.
- Steiniger, B. S. 2015. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. *Immunology*, 145, 334-346.

- Theurey, P., Pizzo, P., 2018. The aging mitochondria. *Genes*, 9(1), 22.
- Vardı, N. , Iraz, M. , Öztürk, F. , Uçar, M. , Gül, M. , Eşrefoğlu, M. & Otlı, A. 2005. Deneyisel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin İyileştirici Etkileri. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 12 (3), 145-152.
- Warraich, U. A., Hussain, F. ve Kayani, H. U. R. 2020. Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon*, 6(5), 1-11.
- Withyachumnarnkul, B., Nonaka, K. O., Santana, C., Attia, A. M. ve Reiter, R. J. 1990. Interferon  $\gamma$  Modulates Melatonin Production in Rat Pineal Glands in Organ Culture. *Journal of Interferon Research*, 10, 403-411.
- Van Rees, E. P., Sminia, T. ve Dijkstra, C. D. 1996. Structure and development of the lymphoid organs, In: *Pathobiology of the Aging Mouse*. Mohr, U., Dungworth, D. L., Capen, C. C., Caldron, W. W., Sundberg, J. P. ve Ward J. M. (eds), ILSI Press, 173-187, Washington D.C.
- Varga, I., Babala, J. ve Kachlik, D. 2018. Anatomic variations of the spleen: current state of terminology, classification, and embryological background. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 40, 21–29.
- Venkataraman, K., Khurana, S. ve Tai, T. C. 2013. Oxidative Stress in Aging-Matters of the Heart and Mind. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17897–17925.
- Viña, J. 2019. The free radical theory of frailty: Mechanisms and opportunities for interventions to promote successful aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 690-694.
- Vishwas, D. K., Mukherjee, A., Haldar, C., Dash, D. ve Nayak, M. K. 2013. Improvement of oxidative stress and immunity by melatonin: An age dependent study in golden hamster. *Experimental Gerontology*, 48(2), 168-182.
- Yanar, K., Aydın, S., Çakatay, U., Mengi, M., Buyukpınarbaşı, N., Atukeren, P., Sitar, M.E., Sönmez, A., ve Uslu, E., 2011. Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 109, 423-433.
- Yiannikourides, A. ve Latunde-Dada, G. O. 2019. A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines*, 6(85), 2-15.
- Yüzüak, H., Akbulut, K. G. Ve Yüzüak, S. 2014. Yaşlanma sürecinde melatoninin pankreas dokusundaki oksidan ve antioksidanlara etkisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5(4), 583-588.

Zheng, S. 2020. Protective effect of Polygonatum sibiricum Polysaccharide on D-galactose-induced aging rats model. Scientific Reports, 10(2246), 1-13.

Zygmunt, B. ve Veldhoen, M. 2011. T Helper Cell Differentiation: More than Just Cytokines. Advances in Immunology, 109, 159.