TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİNDİLERDE (MELEAGRİS GALLOPAVO) PİLORİK TONSİL BÖLGESİ ÜZERİNE HİSTOKİMYASAL VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Nuh YILDIRIM

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY

ANKARA

2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİNDİLERDE (MELEAGRİS GALLOPAVO) PİLORİK TONSİL BÖLGESİ ÜZERİNE HİSTOKİMYASAL VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Nuh YILDIRIM

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 17L0239011 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Hindilerde (*Meleagris gallopavo*) Pilorik Tonsil Bölgesi Üzerine Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.
Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nuh YILDIRIM
Tarih:
İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanatlıların Savunma Sistemi	2
1.1.1. Timus	4
1.1.2. Bursa Fabricius	6
1.1.3. Dalak	8
1.1.4. Harder Bezi	10
1.1.5. CALT (Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku)	11
1.1.6. NALT (Nazal Bölge İlişkili Lenfoid Doku)	12
1.1.7. BALT (Bronşla İlişkili Lenfoid Doku)	12
1.1.8. GALT (Genital Sistemle İlişkili Lenfoid Doku)	14
1.1.9. SALT (Deri ile İlişkili Lenfoid Doku)	15
1.1.10. PALT (Pineal Bez ile İlişkili Lenfoid Doku)	16
1.1.11. Kemik İliği	17
1.1.12. GALT (Sindirim Sistemi ile İlişkili Lenfoid Doku)	18
1.1.12.1. Faringeal Tonsil	22
1.1.12.2. Özofageal Tonsil	23
1.1.12.3. Pilorik Tonsil	24
1.1.12.4. Peyer Plakları	25
1.1.12.5. Meckel Divertikülümü	26
1.1.12.6. Sekal Tonsil	27
1.1.13. Diğer Tam Olmayan Lenfoid Yapılar	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Histokimyasal İncelemeler	30
2.2. İmmunohistokimyasal İncelemeler	30
2.3. İmmunofloresan İncelemeler	32
2.4. Yarı İnce Kesitlerin Elde Edilmesi ve İncelenmesi	32
3. BULGULAR	34
3.1. Histokimyasal Boyamalardan Elde Edilen Bulgular	34
3.1.1. Crossman'ın Modifiye Üçlü Boyama Bulguları	34
3.1.2. Safranin O Boyama Bulguları	45
3.1.3. PAS Boyama Bulguları	46
3.2. İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları	47

3.2.1. T-Lenfositlerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular 48
3.2.2. B-Lenfositlerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular 50
3.2.3. Tip III Collagenin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular 51
3.2.4. Foliküler Dendritik Hücrelerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular 51
3.2.5. M Hücresi Benzeri Hücrelerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular 52
3.3. İmmunofloresan Boyama Bulguları 53
3.4. Yarı İnce Kesitlerden Elde Edilen Bulgular 54

4. TARTIŞMA 56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 63
ÖZET 66
SUMMARY 68
KAYNAKLAR 70
ÖZGEÇMİŞ 82

ÖNSÖZ

Temel immunoloji üzerine yapılan çalışmalar için önemli bir model olan kanatlılar immun sistemin mevcut konseptlerinin anlaşılmasına büyük katkılar sağlamıştır. Bu nedenle çoğu immunoloji araştırmasına evcil tavuklar (*Gallus gallus domesticus*) dahil edilmiştir. Ancak kanatlıların memeliye göre farklı spesifik özelliklerinin hala açıklanmaya ihtiyacı vardır. Kanatlı savunma sistemi denilince timus ve Bursa fabricius gibi primer lenfoid organlar akla gelmekte ve bu organlar üzerinde çok sayıda detaylı çalışma yapıldığı görülmektedir. Buna karşılık sekonder lenfoid organlar üzerine yapılan çalışmalar daha azdır. Bağırsakla ilişkili lenfoid dokunun bir parçası olan pilorik tonsilin geçmişi çok eski olmadığından bu konuda tavuklar üzerine yapılan birkaç çalışma ile ördek ve kınalı kekliklerde yapılan birer çalışma dışında başka bir araştırma bulunmamaktadır. Yapılan literatür taramasında ise hindilerde pilorik tonsilin varlığına ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Bilinen histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle T ve B lenfositlerin yerleşimi ve dağılımı belirlenerek hindilerdeki durum ortaya konulmuştur. Bunun dışında da hindilerde yapılan ön çalışma sonucu histolojik olarak beklenen yapı dışında daha farklı bir yapısal durumun ortaya konabileceği görülmüştür.

Kanatlı sindirim sistemi ile ilgili hastalıklarda bulaşma sonucu toplu hayvan ölümleri hem yetiştiriciye hem de ülke ekonomisinde büyük maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu tür kanatlı hayvanların savunma sistemleri üzerine yapılacak araştırmalar, aşı ve diğer tür ilaçların geliştirilmesi konusunda çalışacaklara yardımcı olacaktır. Yapılan bu çalışma ile literatürdeki açığı gidererek bundan sonra yapılacak benzer bilimsel çalışmalara destek ve katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

Doktora öğrenimimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik gelişimime her açıdan katkı sağlayan kıymetli danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY'a, Tez İzleme komitemde yer alan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Levent ERGÜN'e ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Öneri ve katkılarıyla tez sürecime olumlu katkılarını sunan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm öğretim üyelerine ve öğretim yardımcıları olan tüm çalışma arkadaşlarıma müteşekkirim. Tarafımdan yapılan deneylerde hem bilgisiyle yol gösteren hem de sarf malzeme desteğini hiç çekinmeden sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih BOZKURT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin tüm aşamalarında benden sevgi ve desteklerini esirgemeyen, her zorlukta bir an bile tereddüt etmeden yanımda durma erdemini gösteren ve yaptığım her hatanın gelişim sürecime katkı sağlayacak birer araç olduğunu öğreten annem ile babama sonsuz teşekkür ediyorum. Tez süresince sürekli yardım ve desteklerini gördüğüm ve sevgilerinden hiç şüpheye düşmediğim kardeşlerime şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması, 17L0239011 kodlu "Hindilerde (Meleagris gallopavo) Pilorik Tonsil Bölgesi Üzerine Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar" başlıklı proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kurumunca desteklendiği için BAP'a teşekkürü bir borç bilirim.

.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
AIV	Kuş Gribi Virüsü
APC	Antijen Sunan Hücreler
β	Beta
BALT	Bronşla İlişkili Lenfoid Doku
BSDC	Bursa Salgısal Dendritik Hücreler
CALT	Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku
CD	Yüzey Farklılaşma Antijenleri
CK18	Sitokeratin 18
CTL	Sitotoksik T Lenfositler
δ	Delta
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
Є	Epsilon
FAE	Foliküle İlişkili Epitel
γ	Gama
g	Gram
GALT	Genital Sistemle İlişkili Lenfoid Doku
GALT	Sindirim Sistemi ile İlişkili Lenfoid Doku
HG	Harder Bezi
HRP	Horse Radish Peroksidaz
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
İFE	İnterfoliküler Epitel
İFN	İnterferon

İL	İnterlökin
İVLD	İntra Villöz Lenfoid Doku
µg	Mikrogram
µ	Mikron
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Mol
M hücresi	Membran Benzeri Hücre
MALT	Mukoza ile İlişkili Lenfoid Doku
MDV	Marek Hastalığı Virüsü
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MRC	Mezenkimal Retiküler Hücreler
NALT	Nazal Bölge İlişkili Lenfoid Doku
NDV	Newcastle Hastalığı Virüsü
PALS	Periarteriolar Lenfoid Kılıf
PALT	Pineal Bez ile İlişkili Lenfoid Doku
PAS	Periyodik asit-Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
pIgR	Polimerik Ig Reseptörü
PP	Peyer Plakları
PRR	Patern Tanıma Reseptörleri
PWP	Peri-Elipsoidal Beyaz Pulpa
SALT	Deri ile İlişkili Lenfoid Doku
sIgA	Salgısal IgA
sIgY	Salgısal IgY
TCR	T-lenfosit Reseptörü
TEC	Timik Epitel Hücreleri
TLR	Toll benzeri reseptörler

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Tavuk sindirim kanalı boyunca seyreden lenfoid dokular (Casteleyn ve ark., 2010). 1: Faringeal tonsil; 2 ve 2': Sırasıyla özofagusun servikal ve torasik bölgesi; 3: Özofageal tonsil; 4: Proventriküler lenfoid doku; 5:Pilorik tonsil; 6: Peyer plakları; 7: Meckel divertikülümü; 8 ve 8": Sırasıyla sekal tonsil ve sekumun apikal duvarındaki lenfoid doku; 9: Bursa fabricius; 10: Proktodeum'daki lenfoid doku. A: Özofagustan duodenuma kadar olan kısım; B: Duodenum; C: Jejunum; D: İleum; E: Sekum, rektum ve kloaka kısmı. 19

Şekil 1.2. İleumdaki Foliküle ilişkili epitel ve histolojik olarak villus ve kriptlerin gösterimi (Oláh ve ark., 2014). A: İnce bağırsağın bir parçası olan ileumdaki FAE ile villus ve kript yapısının şematize edilmiş hali. B: İleumdaki villus ve kript yapısını gösteren histolojik resim. İEL: İntraepitelyal lenfositler, M hücreleri: Membran benzeri hücreler. 21

Şekil 3.1. Pilorik tonsil bölgesinin değişik yerlerindeki lenf folikülü içeren ve içermeyen villusların Crossman'ın modifiye üçlü boyama yöntemi ile karşılaştırılması. Sarı renkli yıldız: Villuslar içindeki foliküller. Yeşil ok: Kript bölgesi. Kırmızı ok: İki villus arasındaki füzyon noktası. X100. 35

Şekil 3.2. Crossman'ın modifiye üçlü boyaması ile pilorik tonsil bölgesinde içerdiği lenfoid dokuya göre farklı büyüklükteki villuslar. Sarı renkli yıldız: Belirgin olan foliküller. Kırmızı ok: Kript bölgesi. Yeşil ok başı: Foliküllerin etrafındaki kapsül. X50. 36

Şekil 3.3. Bağırsağın enine kesitinin genel histolojik görüntüsü. Kesikli siyah çizgi: Hayali olarak kesit alındığı varsayılan seviye. 37

Şekil 3.4/1. Pilorik tonsil bölgesinin farklı seviyelerinden alınan ve birbirini takip eden kesitlerdeki değişimlerin genel görüntüleri. A-G: Farklı formlarda olan ve lenf folikülü içeren villus alanları. Kırmızı ok başı: İleriki kesitlerde kaynaşacak noktaların gösterimi. Yeşil renkli ok başı: Kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu noktaların gösterimi. X50. 39

Şekil 3.4/2. Pilorik tonsil bölgesinin farklı seviyelerinden alınan ve birbirini takip eden kesitlerdeki değişimlerin genel görüntüleri. A-G: Farklı formlarda olan ve lenf folikülü içeren villus alanları. Kırmızı ok başı: İleriki kesitlerde kaynaşacak noktaların gösterimi. Yeşil renkli ok başı: Kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu noktaların gösterimi. X50. 41

Şekil 3.4/3. Pilorik tonsil bölgesinin farklı seviyelerinden alınan ve birbirini takip eden kesitlerdeki değişimlerin genel görüntüleri. A-G: Farklı formlarda olan ve lenf folikülü içeren villus alanları. Kırmızı ok başı: İleriki kesitlerde kaynaşacak noktaların gösterimi. Yeşil renkli ok başı: Kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu noktaların gösterimi. X50. 43

Şekil 3.5. Villusların birbirlerine yaklaştıkları alanlarda yüzey epitelinde meydana gelen değişimin 100X (sağ üstteki küçük resim) ve 200X büyütmelerdeki görüntüleri. Beyaz ok: Villusların yüzeyini örten tek katlı prizmatik epitel. Yeşil ok başı: Lenfoepitelyum bölgesi. 44

Şekil 3.6. Safranin O boyaması ile pilorik tonsilde foliküllerin etrafındaki kapsül kılıfın gösterimi. Yeşil ok başı: Lenf folikülünün etrafındaki kapsül. X200. 45

Şekil 3.7. PAS boyaması ile pilorik tonsil bölgesinin biraz ilerisindeki alanda villusların genel durumu ve bazı villuslarda oldukça küçülmüş lenf foliküllerinin gösterilmesi. X50. 46

Şekil 3.8. PAS boyaması ile pilorik tonsil bölgesinin enine kesitinde PAS pozitif kadeh hücrelerinin (Sarı oklar) ve folikülün etrafındaki kapsülün (beyaz oklar) gösterilmesi. X 400. 47

Şekil 3.9. CD3 antikoru ile boyama sonucunda aynı kesitte farklı bölgelerde ve değişik büyütmelerde pozitif reaksiyonun gösterilmesi. (a): Pilorik tonsil bölgesinin genel görüntüsü (12,5X); (b): a karesindeki belirli bir alanın 100X büyütmesi; (c): a karesindeki belirli bir alanın 200X büyütmesi. Siyah, kırmızı ve sarı ok başları: Farklı bölgelerdeki CD3 pozitif T-lenfositler. 49

Şekil 3.10. CD268 antikoru ile pozitif reaksiyonun üç farklı alanda ve değişik büyütmelerde gösterilmesi. Sarı renkli yıldız: Lenf folikülü içerisindeki pozitif B-lenfositler. Yeşil ok başları: İnterfoliküler ve subepitelyal bölgedeki pozitif B-lenfositler. Resim a ve b: X400, Resim c: X100. 50

Şekil 3.11. Collagen III antikoru ile boyama sonucu Collagen III pozitif hücrelerin (sarı ok başı) gösterilmesi. X200. 51

Şekil 3.12. Vimentin (RV202) antikoru ile boyama sonucunda pozitif reaksiyonun gösterilmesi. Siyah ok: Folikül içindeki Vimentin (RV202) pozitif foliküler dendritik hücre. Kırmızı renkli yıldız: Vimentin (RV202) pozitif diğer hücreler. X200. 52

Şekil 3.13. İmmunofloresan boyama ile Vimentin (RV202) pozitif reaksiyonun gösterilmesi. Kırmızı ok başı: Vimentin (RV202) pozitif foliküler dendritik hücre. X200. 54

Şekil 3.14. Toluidine blue boyaması ile yarı ince kesitte lenfoepitelyumun gösterimi. (a): Bölgenin genel görüntüsü (200x); (b): a karesindeki belirli bir alanın 400X büyütmesi; (c): a karesindeki belirli bir alanın 1000X büyütmesi. Kırmızı ok başı: Lenfosit. Siyah ok: Mavi renkli boyanan epitel hücrelerinin gösterildiği alan. 55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Yağları tıraşlanmış, bir porsiyon (85 g) pişmiş etteki besin madde bileşimleri (Sipahi, 2010). 1

Çizelge 3.1. İmmunohistokimyasal boyama için seçilen antikorlar ve deneme sonuçları. 48

Çizelge 3.2. İmmunofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve elde edilen sonuçları gösteren tablo. 53

1. GİRİŞ

Kanatlı et üretiminde dünya genelinde üretim ve tüketim açısından ilk sırayı tavuk eti, ikinci sırayı ise hindi eti almaktadır (Eratalar ve Akbay, 2008). Hindilerin, tavuklara göre uzun ömürlü ve karkas randımanının yüksek oluşu nedeniyle hindi etine olan talep yükselme eğilimi göstermektedir (Konca, 2010). Hayvansal gıdalar içerisinde hindi etinin de içinde yer aldığı beyaz et, kolesterol seviyesinin düşüklüğü ve protein/kalori oranının yüksek olması dolayısıyla sağlık açısından kırmızı et yerine tercih edilebilmektedir (Kırkpınar ve Mert, 2004). Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi etlerin protein içeriği arasında dikkat çekici bir fark bulunmamakla birlikte hindi göğüs eti, domuz (bel üstü) ve koyun (incik) eti ile birlikte piyasada pazar payına sahip et ürünleri arasında, en yüksek protein içeriğine sahip ürünüdür (Eratalar ve Akbay, 2008).

Çizelge 1.1. Yağları tıraşlanmış, bir porsiyon (85 g) pişmiş etteki besin madde bileşimleri (Sipahi, 2010).

	Kalori	Yağdan Gelen Kalori	Toplam Yağ (g)	Doymuş Yağ (g)	Kolesterol (mg)	Sodyum (mg)	Protein (g)	Demir (%)
Hindi göğüs eti	120	10	1,0	0,0	55	45	26	8
Piliç göğüs eti	120	15	1,5	0,5	70	65	24	4
Sığır eti (bel üstü, biftek)	180	70	8,0	3,0	65	60	24	10
Sığır eti (ön kol)	140	40	4,0	2,0	60	55	25	10
Domuz (bel üstü)	170	60	7,0	2,0	70	55	26	4
Domuz (fileto)	140	35	4,0	1,0	65	50	24	6
Koyun (bel)	180	80	8,0	3,0	80	70	25	10
Koyun (incik)	160	45	5,0	2,0	90	65	26	10
Dana (bel)	150	50	6,0	2,0	90	80	22	4
Dana (kuşbaşı)	130	25	3,0	1,0	90	60	24	4

Yukarıda beyan edildiği gibi etinin sahip olduğu avantajlar ve hastalıklara tavuklara göre daha duyarlı oluşu sebebiyle hindilerin immunolojik çalışmalar için etkili bir model hayvan olabileceği öngörülmektedir.

1.1. Kanatlıların Savunma Sistemi

İmmun sistem, enfeksiyöz mikroorganizmalara karşı konakçının korunmasını ve buna bağlı olarak canlıların hayatta kalmasını sağlamak amacıyla sürekli evrilmek zorundadır. Bağışıklık sistemi ile ilgili genlerin patojenik mikroorganizmaların konakçıya zarar vermesini önleyebilmek için belirgin bir evrimsel baskı altında olduğu ileri sürülmüştür. Bu nedenle konakçılar patojenleri tanıyıp onlarla savaşmak zorundayken, patojenler artan konakçı savunmalarının üstesinden gelmek üzere evrilmeye devam etmektedir (Woolhouse ve ark., 2002). Konakçı tarafından dirençteki kademeli artış ile elde edilen yanıttan patojenlerin kaçınma mekanizmaları, iyi kurulmuş ortak evrimsel bir dinamik olan "konakçı-patojen silahlanma yarışı" nın temelini oluşturmaktadır (Decaestecker ve ark., 2007).

Janeway (1989), immun yanıt hususunda 'özellik tanıma teorisi' adını verdiği bir teori ileri sürmüştür. Bu teori ile doğal immun yanıt ve onun adaptif bağışıklığın aktivasyonundaki rolünü anlamamız için kavramsal bir çerçeve ortaya konulmuştur. Janeway, mikroorganizmaların yüzeyinde konakçı hücrelerinde bulunanlardan farklı ve dolayısıyla ayırt edilebilir olan ortak paternlerin olduğunu ve antijen sunan hücrelerin bu paternleri tanıyan patern tanıma reseptörleri (PRR) ile donatıldığını dile getirmiştir ve bunun evrimsel olarak korunan ilk savunma hattı olduğunu ileri sürmüştür. İmmunitede rol alan bu hücreler yabancı antijenleri alır ve bunları kazanılmış bağışıklığa ait olan immun sistem hücrelerine sunarak adaptif immun yanıtı tetiklemektedir (Janeway, 1992).

Genel olarak kanatlı immun sistemi, yukarıda sözü edilen temel immunoloji üzerine yapılan çalışmalar için önemli bir model sağlamış ve özellikle evcil tavuklar (*Gallus gallus domesticus*) çoğu immunolojik araştırmaya dahil edilmiştir. Kanatlı

immunoloji araştırmalarının ufuk açan bulguları ile temel immunolojik konseptler daha iyi anlaşılabilmiştir. Bu araştırmaların şüphesiz en önemli katkısı kazanılmış bağışıklığın iki ana kolu olan sıvısal (humoral) ve hücresel (selüler) yanıt gelişiminin detaylı bir şekilde ortaya konulmasıdır. Gelişmekte olan T ve B-lenfosit bağımlı lenfosit hatlarının tam olarak ayrımının yapılmış olması da diğer bir önemli kazanımdır. Bunların dışında kanatlılar, aşı biliminin gelişimine de yardımcı olmuştur. Tüm bu ilerlemelere rağmen kanatlı hayvanların memelilere göre spesifik olan özelliklerinin hala açıklanmaya ihtiyacı olduğu bir gerçektir (Davison ve ark., 2011).

Kanatlılardaki immun sistemin memeliler ile balık, amfibian ve sürüngenler arasındaki geçiş formu olduğu yaygın bir kabuldür (Good ve Finstad, 1967). Tıpkı primitif canlılarda olduğu gibi kanatlı hayvanlarda da vücut boyunca dağılmış lenfoid doku birikimleri mevcuttur. Ancak kanatlıların periferal lenfoid dokuları alt omurgalılardan farklı olarak memelilerde olduğu gibi bir germinal merkeze sahiptir. Kanatlılarda ve memelilerde lenfoid dokular iki kompartman içerir ve bu kompartmanların biri hücre aracılı immunitenin sağlanmasından sorumlu olan T-lenfosit bağımlı bölgeler, diğeri immunglobulin (Ig) üretiminde görev alan B-lenfosit bağımlı bölgelerdir (Warner ve Szenberg, 1962 ve Warner, 1967). Su, bataklık ve sahil kuş türleri hariç kanatlılar, insan ve diğer memelilerden farklı olarak vücut boşluklarında kapsüllü lenf düğümleri yerine diffuz lenfoid dokular ihtiva etmektedir (White ve ark., 1970).

Yukarıda sözü edilen lenfoid sistem mezoderm adı verilen germinal yapraktan gelişir ama antijenler dış ortamdan vücut içerisine ektoderm ve endoderm denilen embriyonal yapraklardan meydana gelen yapıları geçerek girerler. Bir başka deyişle vücut içerisinde antijenlerle immun sisteme ait olan hücrelerin direkt karşı karşıya gelmesi söz konusu değildir. Bu nedenle, lenfoid sistem her iki germinal katman ile yapısal ve fonksiyonel bağlantılar kurmak zorundadır. Bu amaçla ektoderm ile bağlantı deri ile ilişkili lenfoid doku aracılığıyla kurulurken, sindirim ve solunum sistemine ait olan lenfoid dokular endodermal bağlantı yerlerini oluşturmaktadır (Finke ve Kraehenbuhl, 2001; Glick ve Oláh, 1981; Reese ve ark., 2005 ve Streilein, 1983).

Kanatlılarda antijen bağımsız farklılaşma ve lenfosit proliferasyon alanları olan bursa fabricius ve timus gibi organlar primer lenfoid organ olarak anılırken; dalak, harder bezi, CALT (Konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku), NALT (Nazal bölge ilişkili lenfoid doku), BALT (Bronşla ilişkili lenfoid doku), GALT (Genital sistemle ilişkili lenfoid doku), GALT (Sindirim sistemi ile ilişkili lenfoid doku: faringeal tonsil, özofageal tonsil, pilorik tonsil, Peyer plakları, sekal tonsil ve Meckel divertikülümü), SALT (Deri ile ilişkili lenfoid doku) ve PALT (Pineal bez ile ilişkili lenfoid doku) sekonder lenfoid organlar olarak sınıflandırılmaktadır (Oláh ve ark., 2014). Bu sekonder lenfoid organlardan GALT, mukoza ile ilişkili lenfoid dokunun (MALT) büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Sarı ve Kurtdede, 2007). Burada ifade edilen lenfoid yapıların yanısıra proventriküler lenfoid doku, soliter lenf folikülleri ve intraepitelyal lenfositler de kanatlı savunma sisteminin birer parçasıdır (Çolakoğlu ve Dönmez, 2018).

Aşağıda kanatlılardaki yapısal durumları tek tek ele alınacak primer ve sekonder lenfoid dokular mümkün olduğunca memelilerdeki benzer yapılar ile de kıyaslanmaya çalışılacaktır.

1.1.1. Timus:

Memeli timusu perikardiyal mediastinumda, kalbin büyük damarlarının anteriorunda ve kalbin bazisi ile aortik arkın ventralinde bulunurken (Haley, 2003) kanatlı timusu vagus siniri ve internal juguler venlere paralel uzanmış şekilde konumlanmıştır (Hodges, 1974). Kanatlılarda boynun her iki tarafında üçüncü servikal omurdan üst torakal segmentlere uzanan 7-8 ayrı lob vardır (Kendall, 1980) ve genel olarak kanatlı türlerine göre lob sayısında farklılıklar gözlemlenmiştir (Gülmez ve Aslan, 1999). Kümes hayvanlarında bulunan timusunun histolojik yapısı memelilerinkine benzerlikler gösterir ve her bir lob ince lifli bir bağ dokusu kapsülü ile sarılı olarak yağ doku içerisinde gömülü vaziyettedir. Embriyolojik dönemde oluşan lenfoid organların ilki olan timus, doğum sonrası antijen stimülasyonuna ve çok sayıda olgun T-lenfositlere duyulan ihtiyaca bağlı olarak önemli ölçüde büyümektedir

(Pearse, 2006). Tavuklarda düğme veya fasulye şekilli timik loblar, 3-4 aylıkken maksimum 6-12 mm çapa ulaşır ve sonra yavaş yavaş gerilemeye başlar. Kapsülden çıkan septalar timik parankimaya girer ve bu lobları tam olmayan lobcuklara ayırır (Ciriaco ve ark., 2003) ve lobcuklar dıştan koyu bir korteks ve içte soluk bir medulladan meydana gelir (King ve McLelland, 1984).

Timus, yabancı antijenlerle etkili bir şekilde reaksiyona girebilen ve aynı zamanda kendi yüzey antijenlerine karşı tolerans gösterebilen fonksiyonel T-lenfositlerin üretimi için benzersiz bir mikro ortam sağlayan epitelyal bir organdır (Zúñiga-Pflücker, 2004). Histolojik olarak korteks ve medullada, timik epitel hücrelerinin yanı sıra, timositler, mezenkimal hücreler, endotel hücreleri ve dendritik hücreler bulunmaktadır (Gordon ve Manley, 2011). Yetişkin timus bu nedenle, her biri farklı fonksiyonlara sahip spesifik hücrelerden oluşan farklı mikroçevrelerin bir toplamı olarak addedilmektedir (Petrie ve Zúñiga-Pflücker, 2007). Timustaki destek olma görevi gören yapının büyük kısmı epitelyal retiküler hücre ağından oluşmaktadır (Banks, 1993). Timusun subkapsüler bölgesinde bir veya iki sıra hücreden ibaret olan bir epitel katmanı vardır. Dış kortekste bulunan ve kan-timus bariyeri oluşumunda görev alan epitel hücreleri incedir ancak başka yerlerde yıldız şeklinde bir görünüm kazanmaktadır. Epitelyal hücreler, antijenik ekspresyonu, ultrastrüktürel özellikleri ve timik hormonlar olan timülin, timozin, timopoetin ve timik humoral faktör sentezleme kapasiteleri bakımından farklı hücre alt tiplerine sahiptir (DeWaal ve ark., 1997).

İmmunohistokimyasal olarak, bu alt tipler sırasıyla; Subkapsüler kortikal, İç kortikal, Medullar epitel hücreleri ve Hassall korpusküleridir. Farelerde yapılan bir çalışmada yaşla birlikte farklı antijenik epitelyal popülasyonlarda sayısal bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir (Pearse, 2006). Tavuk ve bıldırcınlarda yapılan bir çalışmada, korteks medulla sınırının Majör histokompatibilite kompleks (MHC) II antijeni eksprese eden ve T-lenfositlerin negatif seleksiyonunda rol oynayabilen dendritik hücreler için bir bariyer görevi gördüğü tespit edilmiştir (Guillemot ve ark.,1984). Farelerde yapılan her iki çalışmada gelişimleri sırasında, timik epitel hücreleri (TEC) ve timositlerin fonksiyonel olarak olgunlaşması için zorunlu olan karşılıklı iletişim kurdukları ortaya konulmuştur (Klug ve ark., 2002 ve van Ewijk ve

ark., 1994). Bu bağlamda timik epitel ağının eşsiz üç boyutlu mimarisi TEC-timosit etkileşimlerini kolaylaştırmaktadır (van Ewijk ve ark., 1999). Fareler üzerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise lenfoid progenitör hücrelerin düzenli olarak bulundukları bölgeden gelen farklı sinyal iletim sistemlerinin yönlendirmeleri sonucu olgunlaştıkları ortaya konulmuştur (Prockop ve ark., 2002). Her ne kadar kortikal bölgenin çift negatif alt popülasyon ekspansiyonu ve pozitif seleksiyondan (Savage ve Davis 2001), medullar kompartmanın ise negatif seleksiyonun gerçekleşmesinden sorumlu olduğu bilinse de (Anderson ve ark., 2007 ve Takahama, 2006) bu iki ana timik bölmede bulunan daha spesifik ortamların karakterizasyonu tam olarak gerçekleştirilememiştir (Cejalvo ve ark., 2013).

1.1.2. Bursa Fabricius:

Bursa fabricius veya Bursa fabricii kanatlıların lenfoepitelyal bir organı olup ilk kez Hieronymus Fabricius tarafından açıklanmıştır. Kloakanın dorsalinde yer almasından ötürü bu yapı "kloakal bursa (Bursa cloacalis)" olarak da adlandırılmaktadır (Glick, 1979; Ratcliffe, 2002 ve Sayegh ve ark., 2000). Kloaka ve sakrum arasında bulunan Bursa fabricius tavuklarda kestane şeklinde bir yapıya sahiptir. Yarık benzeri bursal kanal, proktodeum ve bursal lümen arasında sürekli ve serbest bir iletişim sağlamaktadır. Kloakanın divertikülü olan bursanın endodermal kaynaklı olduğu düşünülen epitel ile kaplı olduğu varsayılırken yakın tarihli bir deneysel çalışmada epitelin ektodermden köken aldığı iddia edilmiştir (Nagy ve Oláh, 2010). Tavuklarda 8-10 haftalıkken maksimum boyutuna ulaşan Bursa fabricius daha sonra timus gibi involusyona uğrar ve 6-7 aylık yaşta, bu yapının çoğu dejenere olmaktadır (Ciriaco ve ark., 2003). B-lenfositlerin gelişim ve farklılaşmasının yanısıra immunoglobulin izotip değişiminden de sorumlu olan (Ratcliffe, 2002) Bursa fabricius'un epitelinde B-lenfosit farklılaşma faktörlerinin de yer almasına bağlı olarak B-lenfositlerin gelişiminde etkisi olduğu bildirilmiştir (Oláh ve Glick, 1995). Yukarıda sözü edilen yapısal özelliklerine ilave olarak kloakaya açılan kanalda küçük bir T-lenfosit kümesi bulunduğu için kloakal bursa sekonder lenfoid organ olarak da görev yaptığı ifade edilmiştir (Pike ve ark., 2004).

Bursa fabricius'un duvarı histolojik olarak tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere üç tabakadan oluşur. Tunika mukoza katmanı lamina epitelyalis, lamina propria ve submukoza katmanlarından meydana gelir (Hassa, 1961; Hodges, 1974 ve Tanyolaç, 1993). Bursa fabricius'un tunika mukoza katmanı bursa lümenine doğru türlere göre sayıları 12 ile 15 arası değişen kıvrımlar yapmaktadır (King ve McLelland, 1984 ve Nickel ve ark., 1977). Bu kıvrımların yüzey epitelyumu hem interfoliküler epitel (İFE) hem de foliküle ilişkili epitel (FAE) ile kaplanmıştır (Bockman ve Cooper, 1973). Oláh ve Glick (1978), iki ila on iki hafta arasında değişen yaşta toplam on altı New Hampshire tavukta yaptıkları çalışma sonucunda bu kıvrımların oransal olarak yaklaşık %90 İFE, %10 FAE ile örtülü olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise İFE'nin yalancı çok katlı prizmatik epitel tarafından örtüldüğü, FAE'nin ise lenf foliküllerinin üzerini örten özelleşmiş bir epitel olduğu dile getirilmiştir (Sarı ve Kurtdede, 2006). Her bursa folikülü, bir medulla ve bir korteksten oluşmaktadır (Bockman ve Cooper, 1973). Tavuklarda bursal ontogeni sırasında, medullar taslağın embriyonal inkubasyonun 11-12. gününde ortaya çıktığı ve bunu FAE oluşumunun takip ettiği belirlenmiştir (Oláh ve ark., 1986 ve Ratcliffe, 2006). Dört haftalık tavuklarda yapılan çalışma korteksin yumurtadan çıktıktan iki hafta sonra gelişimini tamamladığını, bursal kıvrımların oval şekilli ve yaklaşık 0.2-0.4 mm çapında foliküllerle kaplı olduğunu ortaya koymuştur (Oláh ve Glick, 1978). Timus gibi medulla da klasik bir lenfoepitelyal doku olup kanla taşınan BSDC öncüleri (bursa salgısal dendritik hücreler) (Oláh ve ark., 1986) ve lenfositler (Nagy ve Oláh, 2010) yüzey epiteline girerek mezenkime doğru tomurcuklanmayı indüklemektedir. Tomurcuğa ait epitel hücreleri ve BSDC öncülleri, B-lenfosit prekürsörlerini bölgeye alabilen geçici bir dendro-epitel dokusu oluşturmaktadır (Nagy ve ark., 2004).

Bursal foliküllerin hematopoietik kolonizasyonu ise iki aşamada gerçekleşmektedir. Birincisi, embriyonik testosteron uygulaması (Oláh ve ark., 1986 ve Nagy ve Oláh, 2010) ile inhibe edilebilen dendroepitelyal doku oluşumudur. İkincisi ise dendroepitelyal dokunun pre B-lenfositler ile dolması olgusudur (Le Douarin ve ark., 1975). Medullanın hücresel bileşimi nispeten basit ve kararlıdır. Tavuklarda yapılan çalışma ile hücresel kompozisyonun, ektodermin anal invaginasyonundan köken alan epitel hücreleri, lenfoid hücreler, dendritik hücreler ve

makrofajların dahil olduğu kanla taşınan hematopoietik hücreler ile çok az sayıdaki plazma hücresinden meydana geldiği tespit edilmiştir (Nagy ve Oláh, 2010).

Kadeh şeklindeki korteks kuluçka döneminde gelişmeye başlar ve kortiko-medullar sınırın bazal laminası tarafından medulladan ayrılan korteksin yüzeyi ince kollajenden zengin bir kapsül ile çevrelenmiş vaziyettedir. Medulladan farklı olarak sadece mezodermden gelişen kortekstеki MRC (Mezenkimal Retiküler Hücreler), korteksin destekleyici hücreleri olup vimentin ve dezmin ara filamanlarını eksprese ettikleri tavuklarda yapılan çalışma ile belirlenmiştir (Oláh ve Glick, 1995). Bursa fabricius'ta bulunan kasların kasılması, medulla içindeki hücrelerin yer değiştirmesine ve lenf damarlarının içeriklerini boşaltmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca korteksin kortiko-medullar bazal laminaya bitişik olarak seyreden zengin bir kılcal ağa da sahip olduğu ifade edilmiştir (Oláh ve ark., 2014).

1.1.3. Dalak:

Dalağın ilk organ taslağı 48 saatlik kanatlı embriyosunda bir mezenkimal hücre kütlesi olarak ortaya çıkmaktadır (Romanoff, 1960). Memelilerin aksine, kanatlıların dalağı dolaşıma hızlıca eritrositlerin salınması için bir rezervuar olarak kabul edilmemektedir (Sturkie, 1943). 4-8 haftalık New Hampshire ve White Leghorn tavuklarda yapılan çalışma ile kanatlılarda dalağın "gerçek" lenf düğümlerinden farklı olarak afferent ve efferent lenfatik damarlardan yoksun olan en büyük lenfoid organ olduğu ve bu yapının kan dolaşımından antijenleri aldığı tespit edilmiştir (Oláh ve Glick, 1982). Her ne kadar bu sekonder lenfoid organ antijen bağımsız olarak lenfosit farklılaşması ve proliferasyonu için birincil bir bölge olmasa da embriyonik lenfopoezde önemli bir role sahiptir. Burada Bursa fabricius'a kolonize olmadan önce B-lenfosit progenitörlerinin Ig genleri yeniden düzenlendiği bildirilmiştir (Masteller ve Thompson, 1994). Tavuk dalağının temel yapısı memeli dalağının yapısı ile aynı olup kırmızı ve beyaz pulpa alanları ihtiva eden bu organda beyaz pulpa alanları eritrosit içermez ve ağırlıklı olarak lenfositler tarafından doldurulmuş vaziyettedir. Oksijen dolaşımına daha az katkısı ile tutarlı olarak, kanatlı kırmızı pulpa alanları

memeli muadiline göre daha az yer kaplamaktadır, bir başka deyişle insanlarda dalağın %76-79'u kırmızı pulpadan meydan gelirken, kanatlılarda bu oran yalnızca %40-45'tir (John, 1994).

Kanatlı dalağı, organ taslağının ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra hematopoietik bir yapı olarak işlev görmeye başlamaktadır. Çoğu türde, bu fonksiyon kırmızı pulpa ile sınırlı olup geçicidir ve hematopoez sonlanır sonlanmaz, kırmızı pulpanın temel fonksiyonu dolaşımdaki yaşlanan eritrositleri filtre etmeye dönüşmektedir. Bunu gerçekleştirmek için dalak stromal elemanları dolaşım ile kendine özgü bir iletişim geliştirmektedir. İmmunohistokimyasal araştırmalar, dalak ekstraselüler matriksinin oldukça karmaşık olduğunu, her bölmenin lenfositlerin ve bölgede yerleşik halde bulunan hücrelerin adezyon ve/veya yer değiştirmesine katkıda bulunan spesifik bir kompozisyona sahip olduğunu göstermektedir. Temel bileşenleri tip I ve III kollajen olan retiküler lifler ise ince bir destek ağı oluşturmaktadır (Nagy ve ark., 2005a). Hem lenfoid hem de lenfoid sisteme ait olmayan hücreler kırmızı pulpada yerleşik halde bulunur ve CD8 ve TCR gamadelta pozitif olan T-lenfositler sinüslerde bol miktarda bulunurken bazı CD4+ TCRαβ1 veya TCRαβ2 lenfositlere bölgede rastlanılmaktadır. Yetişkin kuşlarda, çoğu TCRγδ+ lenfositler heterodimerik CD8αβ reseptöre sahipken, embriyonik ve neonatal dalaklarda, CD8+ TCRγδ+ lenfositlerinin büyük bir kısmı CD8α zincirinin sadece bir homodimerini eksprese etmektedir (Tregaskes ve ark., 1995).

Tavuk beyaz pulpa alanları morfolojik olarak farklı bölgeler içerir ve bu bölgeler merkezi arterleri çevreleyen periarteriolar lenfoid kılıflar (PALS) ve penisiliar kapillarları çevreleyen peri-elipsoidal beyaz pulpadır (PWP). PWP bazen memeli marjinal bölgesinin analogu olan peri-elipsoid lenfoid kılıf olarak tanımlanmaktadır. Schweigger-Seidel kılıfları veya elipsoidleri de PWP içine gömülü vaziyette bulunmaktadır. Bir bağ dokusu ile çevrili olan germinal merkez ise arterlerin çatallanması sonucu gelişmektedir (Oláh ve ark., 2014). Arteriyoller, yoğun T-lenfosit kılıfı ile çevrili olup bu T-lenfositler CD3 pozitiftir ve çoğu CD4 ve TCRαβ1 moleküllerini eksprese etmektedir. Geriye kalan T-lenfositler tarafından CD4 ve TCRαβ2 veya CD8 ve TCRαβ1 eksprese edilmektedir. Timektomi yapılan civcivler

üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada TCR αβ1+ lenfositlerin yokluğu nedeniyle PALS'taki TCR αβ2+ lenfosit sayısının bu eksikliği kompanze etmek için artığı tespit edilmiştir (Cihak ve ark., 1991). Memelilerde olduğu gibi tavuklarda da CD4+ yardımcı lenfositler bağışıklık yanıtında merkezi bir rol oynamaktadır ve bunların aktivasyonu, sitotoksik T-lenfosit ve B-lenfosit yanıtları için bir ön koşuldur. Bu hücrelerin germinal merkezin çevresinde ve içerisindeki merkezi lokalizasyonları, B lenfositlerin olgunlaşmasındaki rollerini ortaya koymaktadır. PALS'ta birbirine kenetlenen dendritik hücreler, T-lenfositlerin arasına dağılmıştır ve bu hücrelerin MHC II pozitif fakat CD57 negatif olduğu ifade edilmiştir (Igyarto ve ark., 2007).

1.1.4. Harder Bezi:

Gözle ilişkili büyük lenfoid dokular Harder bezinde (HG) ve alt göz kapağının konjunktivasında bulunur (Oláh ve ark., 2014). Bunlardan biri olan ve çoğu karada yaşayan omurgalılarda bulunan HG (glandula lacrimalis accesoria) ilk olarak 1694'te Johann Jacob Harder (1656-1711) tarafından tanımlandığı bildirilmiştir (Payne, 1994). HG tavuklarda göz küresinin arka tarafında göz yuvalarının içine yerleşik durumdadır ve bezin salgı kanalı niktitatif membranın yüzeyine açılmaktadır (van Ginkel ve ark., 2009). Bez çeşitli görevleri yerine getirmekte olup bunların başlıcaları (a) gözün ve membrana niktitansın yağlanması, (b) kuşlardaki immun yanıt, (c) rodentlerde ışığı algılama, (d) retina-pineal eksenin bir parçası olma, (e) feromon üretimi, (f) kemirgenlerde termoregülatör lipit üretimi, (g) bazı sürüngenlerde ozmoregülasyon, (h) bazı kaplumbağalarda büyüme faktörleri ve (i) tükürük üretimidir (Chieffi ve ark., 1996 ve Payne, 1994).

Kanatlılarda beze ait duktus ekskretoryusun bezin baş kısmından içeri girdiği ve kanalın yüzeyinin klasik bir FAE veya lenfoepitelyal organizasyona sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bezin baş kısmı tipik bir sekonder lenfoid organın yapısını göstermektedir ve bu yapı içerisinde B-lenfosit bağlı germinal merkez, FAE ve T-lenfosit bağlı interfoliküler bölgeler ile dağınık seyreden T lenfositler ve makrofajlar bulunur. Bezin gövdesi ise birçok B-lenfositi ve plazma hücresi içermektedir ve

gelişim seviyesine bağlı olarak B ve T-lenfositler ayrı yerlerde kümelenme eğilimi göstermektedir (Oláh ve ark., 2014).

1.1.5. CALT (Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku):

Konjuktiva ilişkili lenfoid doku (CALT) hakkında nispeten az şey bilinmektedir. Fix ve Arp (1991), dört farklı yaş grubunda (1, 3, 5 ve 7 haftalık) olan broyler tavuklarda yaptıkları çalışma ile CALT lenfoepitelyumunda partikül alımını gözlemlemiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre civcivlerde 1 hafta içinde rastgele dağılmış lenfosit infiltrasyonlarına, 4 hafta sonra ise BALT benzeri germinal merkez ve plazma hücreleri içeren bir organize yapıya dönüşümü tespit edilmiş ve böylece CALT'ın immunolojik gelişimi açıklanmıştır (Fix ve Arp, 1991 ve Maslak ve Reynolds, 1995).

Devekuşunda yapılan çalışmada ise bu dokunun dom, korona, germinal merkez ve interfoliküler alanlara sahip olduğu tespit edilmiştir (Bayraktaroğlu ve ark., 2011). Sığırlarda yapılan başka bir çalışmada benzer şekilde lenf foliküllerinin germinal merkez, korona bölgesi, interfoliküler bölge ve dom bölgelerinden meydana geldiği saptanmıştır (Aştı ve Bayraktaroğlu, 2006). CALT'ın hücresel kompozisyonu incelendiğindeyse B-lenfositler, γδ pozitif T-lenfositler ve CTL (Sitotoksik T-Lenfositler)'i ihtiva ettiği bildirilmiştir. İmmunizasyon çalışmaları ile bu bölgede antijene spesifik IgA salgılayan hücrelerin varlığı da ortaya konulmuştur. Buna ilave olarak CALT'da polimerik immunglobulin reseptörünün ekspresyonu ile IgA'nın lakrimal sıvıya salgılandığı da tespit edilmiştir (van Ginkel ve ark., 2012). 5-6 aylık sağlıklı Ankara keçilerinde yapılan çalışma sonucunda soliter ve agregat lenf foliküllerindeki lenfoepitelyumda yassılaşmış epitel hücrelerine, lenfositlere, monositlere, polimorf nüklear lökositlere rastlanmasına karşın kadeh hücresinin bulunmadığı ifade edilmiştir (Aştı ve ark., 2000).

1.1.6. NALT (Nazal Bölge İlişkili Lenfoid Doku):

Hava kesesi sistemi, sert akciğer yapısı ve tidal ventilasyondan ziyade sürekli hava akışı ile kanatlı solunum sisteminin morfolojisi, diğer omurgalılarınkinden oldukça farklıdır. Burun boşluğundan geçiş sırasında hava genişlemiş bir yüzey alanı ile NALT adı verilen organize lenfoid yapılar içeren mukoza kaplı konkaları geçer (Bang ve Bang, 1968). 25 haftalıktan 1-2 yaşına kadar olan 18 White Leghorn horozun materyal olarak kullanıldığı çalışma ile lenfositlerin burun mukozasında, lateral burun bezleri ve bu bezlerin salgı kanallarında bulunduğu, burun boşluğunda lenfositlerin öncelikle solunum epiteline veya altına yerleşim gösterirken nazal girişteki vestibüler bölgede ve olfaktör bölgede nispeten nadir olarak görüldüğü beyan edilmiştir. CD8+ T-lenfositlerin epitel ve lamina propriaya dağılırken, CD4+ T-lenfositlerin büyük ölçüde subepitelyal katmanda gözlemlendiği bildirilmiştir (Ohshima ve Hiramatsu, 2000).

Tavuklarda ve bıldırcınlarda lateral burun bezlerinde ve bezlerin salgı kanallarında bulunabilen lenfoid yapılar (Bang ve Bang, 1968) burun boşluğunun vestibüler epitelyumu ile benzer bir lenfosit alt grup dağılımı göstermektedir. Tavuklarda yukarıda ifade edilen NALT'ın temel özellikleri, yer yer germinal merkez oluşturan sınırlı B-lenfosit alanlarının varlığı ve bu oluşumun apikal taraftan CD4+ T-lenfositler ile sınırlandırılmış olmasıdır. Bu lenfoid foliküllerin yüzeyi silyumsuz epitel ile kaplıdır. Ig pozitif B-lenfositler, NALT yapıları içerisinde bulunmakta ve CD8 pozitif lenfositler benzer şekilde epitel boyunca dağılmaktadır (Ohshima ve Hiramatsu, 2000).

1.1.7. BALT (Bronşla İlişkili Lenfoid Doku):

Kanatlı akciğeri organize lenfoid yapıların yanısıra dağınık olarak yerleşmiş lenfoid ve miyeloid hücrelerden oluşmaktadır. Bu yapısal durum ilk olarak birçok memeli ile kuşların akciğer ve bağışıklık sistemlerini karşılaştıran ve primer

bronşlarda Peyer plakları ve sindirim sistemi ile ilişkili diğer lenfoid yapılara benzerlik gösteren lenfoid dokular Bienenstock ve ark. (1973), tarafından ortaya konulmuştur. Bronşla ilişkili lenfoid doku (BALT) olarak adlandırılan bu yapılar tavuklarda sabit bir doku olup diğer türlere göre çok daha sık görülmektedir (Jeurissen ve ark.,1994 ve van Alstine ve Arp, 1988). BALT'ın Broyler tavuklarda yapılan bir çalışma ile primer bronş ve kaudal sekonder bronşların kavşaklarında (Fagerland ve Arp, 1993b), hindilerde yapılan bir başka çalışma ile hava keselerinin giriş yerlerinde gelişim gösterdiği ifade edilmiştir (Myers ve Arp, 1987). Tavuklarda organize BALT nodülleri, kuluçkadan sonraki üçüncü ila dördüncü haftadan önce tespit edilemezken tam olarak gelişmiş bir BALT yapısı ancak 6 haftalık veya daha yaşlı olanlarda gözlemlenebilmektedir (Fagerland ve Arp, 1990 ve Fagerland ve Arp, 1993a).

Gelişimini tamamlamış BALT bölgesi çok sayıda lenfositi barındıran belirgin bir epitel tabakası olan FAE ile örtülü vaziyettedir (Bienenstock ve Befus, 1984 ve Fagerland ve Arp, 1993a). Gelişim aşamasına bağlı olarak epitel dokusu değişen miktarlarda siliyumlu ve siliyumsuz hücrelerden oluşur ve kadeh hücreleri bulunmaz. Bazı FAE hücreleri düzensiz mikrovilluslara sahiptir ve lenfositler ile miyeloid hücrelerle yakın temas halindedir. Bu durumun Peyer plaklarının M (Membran benzeri) hücrelerinin homologu olabileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte, bu hücreler tarafından partikül alımı gözlemlenmemiştir (Fagerland ve Arp, 1993b). Lohmann Brown ırkı tavuklar kullanılarak yapılan yakın tarihli bir çalışmada parankimde bulunan APC (antijen sunan hücreler)'in, antijenleri alıp BALT yapılarına transfer ettiği ve böylece bağışıklık yanıtını hazırladığı varsayılmıştır (de Geus ve ark., 2012b). Bu hipotez lehine kanıt ise farelerde yapılan bir çalışmadan gelmektedir ve elde edilen sonuçlar antijen yüklü dendritik hücrelerin BALT'a migrasyonunun, etkili T lenfosit aktivasyonu ve BALT'ın idamesi için çok önemli olduğunu ortaya koymuştur (Halle ve ark., 2009).

6-8 haftalık tavuklarda BALT'ı oluşturan foliküller arasında büyük çaplı olanlarda B-lenfosit yoğunluğunun fazla olduğu ve bu hücrelerin başlıca IgM pozitif hücrelerinden şekillendiği tespit edilmiştir. IgY+ ve IgA+ B-lenfositler ise bölgede çok daha az sayıda gözlemlenmektedir. Hem tavukta hem de hindide, çoğu BALT

nodülünde germinal merkez geliştiği ve bu yapının CD4+ T-lenfositler tarafından apikal kısımlarından sınırlandırıldığı belirtilmiştir. CD4+ lenfositlerinin tersine, CD8 pozitif T-lenfositler lenfoid nodüller arasında dağınık bir şekilde yerleşmektedir. Yalnızca CD8 pozitif T-lenfositler değil CD4+ T-lenfositler de germinal merkezde seyrek görülürken, plazma hücreleri lenfoid dokunun kenar kısımlarında ve FAE'in altında bulunmaktadır (Fagerland ve Arp, 1993a).

1.1.8. GALT (Genital Sistemle İlişkili Lenfoid Doku):

Ovaryum ve ovidukt içerisinde bir dizi lenfosit organizasyonu vardır. Bu organlarla ilgili az sayıda fonksiyonel çalışma olmasına rağmen, histolojik ve immunohistolojik yöntemler bu yapıların varlığını ortaya koymak adına yaygın olarak kullanılmıştır. Tavuklarda histolojik incelemeler ile ovidukta dağılmış şekilde lenfositler ve lenfosit agregatlarının varlığı ortaya konulmuştur (Biswal, 1954). 1970'lerde IgA salgılayan hücrelerin dağılımı da dahil olmak üzere immunglobulin salgılayan hücrelerin genital kanal içindeki yerleşimi açıklanmıştır (Lawrence ve ark., 1979 ve Lebacq-Verheyden ve ark., 1974). Bu çalışmalara göre ovidukt epitelinin altında çok sayıda IgA salgılayan hücrelerin bulunduğu tespit edilmiştir.

B-lenfositler ve bunlarla ilişkili Ig alt sınıflarının yumurtacı tavuklardaki lokalizasyonu Kimijima ve ark. (1990), tarafından ortaya konulmuş ve bu çalışmayla oviduktun epitel ve glanduler dokusu ile ilişkili IgY pozitif B-lenfositlerinin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca bu hücrelerin infundibulumun epitel katmanında ve magnum ile uterusun glanduler dokusunda bol miktarda olduğu, IgM+ ve IgA+ B-lenfositlerin magnumun glanduler dokusunda daha sık bulunduğu belirtilmiştir. Withanage ve ark. (1997), ise erişkin tavukların genital sisteminde B-lenfosit dağılımını araştırmış ve ovidukt boyunca dağınık şekilde olduklarını ve oviduktta IgY+ B-lenfositler yerine IgM+ ve IgA+ hücrelerin bulunduğunu ifade etmişlerdir. IgA pozitif B-lenfositlerin esas olarak epitelyumun hemen altında bulunurken, IgY+ B-lenfositlerin tübüler bezlerde, IgM+ B-lenfositlerin ise magnum ve isthmusla ilişki halinde olduğu gözlemlenmiştir.

Bir diğer lenfoid hücre grubu olan T-lenfositlerin yalnızca ovaryuma değil ovidukta da yerleştiği ve B-lenfositlerinden farklı olarak, hem CD4+ hem de CD8+ T-lenfositlerin oviduktta önemli sayıda bulunduğu belirtilmiştir. Gelişmekte olan ovidukttaki agregatların başlıca CD4+ lenfositlerden oluştuğu, ancak CD8+ lenfositlerin baskın olduğu daha küçük agregatların da bulunduğu yumurtacı tavuklarda yapılan çalışma ile ortaya konulmuştur (Johnston ve ark., 2012). Khan ve Hashimoto (2001), büyük granüler lenfositlerin tavukların oviduktundaki varlığını tespit etmişler ve bunların glanduler hücrelerle ve epitel ile ilişkili halde magnum ve vajinada bulunduğunu dile getirilmişlerdir. Ayrıca TCRgamadelta lenfositlerin önemli bir miktarının reprodüktif kanal epitelyumu ile ilişki halinde olduğu da ortaya konulmuştur.

1.1.9. SALT (Deri ile İlişkili Lenfoid Doku):

Deri memelilerde vücudu dış ortamdan ayıran bir bariyerdir ve çok sayıda fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal etkenlere maruz kalmaktadır. Derinin homeostazisinin sürdürülmesi için çeşitli immun sistem hücreleri ya deri içerisine sürekli yerleşim göstermekte ya da inflamatuar yanıtla bölgeye göç etmektedir (Kabashima ve ark., 2019). Ayrıca deri sürekli maruz kaldığı ve immunolojik özelliklerini önemli ölçüde değiştiren ultraviyole ışınlar gibi fizikokimyasal stresler nedeniyle kendine özgü bir lenfoid ve retiküler hücre popülasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bu ihtiyaca bağlı olarak yukarıda oluşmasının gerekli olduğu ifade edilen Deriyle ilişkili lenfoid dokunun (SALT) varlığına dair kanıtlar ise şunlardır; (1) kutanöz mikroçevrenin, antijenleri kabul etme, işleme ve sunma yeteneğine sahip olması; (2) stratejik olarak yerleşim gösteren periferik lenf düğümlerin deride üretilen immunojenik sinyalleri kabul edilebilmesi; (3) T-lenfosit alt tiplerinin, deri ve bununla ilişkili periferal düğümler için farklı bir afinite göstermesi ve (4) bu afinitenin T-lenfositler tarafından en azından kısmen elde edilmesi ve yerleşik kutanöz hücrelerden alınan farklılaşma sinyallerinin saptanmasıdır. Derinin savunma sisteminin temel komponenti olan SALT'ın oluşumu ve devamlılığı ise, her biri benzersiz bir şekilde

katkıda bulunan keratinositler, Langerhans hücreleri ve lenfositlere bağımlılık göstermektedir (Streilein, 1983).

Deride bulunan immun sisteme ait hücreler daha detaylı incelendiğindeyse makrofajlar, mast hücreleri, dermal dendritik hücreler ve yakın zamanda keşfedilen gamadelta pozitif dermal T-lenfositlerin sürekli olarak bölgede bulundukları tespit edilmiştir (Tay ve ark., 2014). Ayrıca inflamasyon durumunda derideki immun yanıtı koordine etmek ve destek olmak için bölgeye monosit, nötrofil, bazofil ve eozinofil granulositler göç etmektedir (Ono ve Kabashima, 2015). Geleneksel olarak derinin B-lenfositlerden yoksun olduğuna inanılmaktaydı ve bu yüzden deri üzerine yapılan immunolojik çalışmalarda diğer lökositler üzerine yoğunlaşılmıştı. Ancak yapılan güncel çalışmalar ile deride homeostazise katılan ve yara iyileşmesi yoluyla derinin tamirine dahil olan B-lenfositlerin varlığı ortaya konulmuştur (Debes ve Mcgettigan, 2019).

Son zamanlarda, kıl folikülleri de dahil olmak üzere kanatlılarda derinin bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olduğu anlaşılmıştır. Marek hastalığı virüsü (MDV) (Calnek, 1970) ve tavuk enfeksiyöz anemi virüsü (Davidson ve ark., 2008) gibi birçok virüs kıl folikülü ve/veya kıl folikülü epitelinde çoğalır veya bu yapılarla ilişki halindedir. Abdul-Careem ve ark. (2008), MDV ile enfeksiyondan 4 ila 10 gün sonra CD4+ ve CD8+ T-lenfositlerin kıl folikülüne yoğun bir şekilde giriş yaptıklarını gözlemlemiştir. Bunun dışında, interlökin (IL)-18, IL-6, interferon (İFN)-γ ve MHC I genlerinin transkripsiyonun artması kıl folikküllerinde bağışıklık yanıtının oluştuğunu düşündürmüştür.

1.1.10. PALT (Pineal Bez ile İlişkili Lenfoid Doku):

Tavuklarda epifiz bezinde lenfoid infiltrasyonunun yaklaşık 3 haftalık yaşta başladığı ve epifiz kütlesinin %50'sine kadar ulaşabildiği Cogburn ve Glick (1981) tarafından dile getirilmiştir. Bu lenfoid dokunun immunolojik olarak aktif ve antikor

üretme yeteneğine sahip olduğu da ifade edilmiştir (Cogburn ve Glick, 1983). Lenfoid birikiminin, bezin distal ucundaki venlerle yakından ilişkili olduğu ve lenfoid dokunun germinal merkezlerin bulunduğu yerler olan pial veya pineal septaları doldurduğu belirtilmiştir (Oláh ve ark., 2014). Pineal bez hücreleri ile lenfoid hücreler arasındaki topografik ilişki ile lenfoepitelyal dokuda var olan ilişkinin identikal olduğu belirtilmiştir (Oláh ve Glick, 1983). Epifiz foliküllerinin duvarından lenfositler, plazma hücreleri ve esas olarak eozinofil ve bazofil granülositler olmak üzere birkaç miyeloid hücre folikül lümenine girebilmektedir. Periferal lenfoid organlarda olduğu gibi epifizde de lenfoid yapı sıkı bir şekilde organize olmuştur ve burada T-lenfositleri içeren bölgeler ve B-lenfositlerden oluşan germinal merkezlerin varlığı belirgindir (Oláh ve ark., 2014).

1.1.11. Kemik İliği:

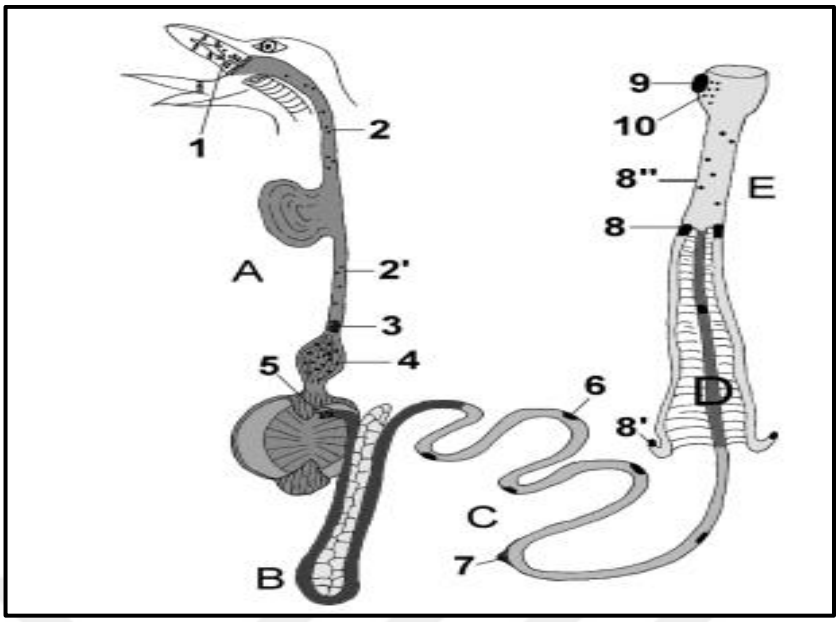
Memelilerde kemik iliği antikor oluşumunun başlıca merkezi olup insan ve farelerde, uzun süre varlığını sürdüren plazma hücreleri için elverişli bir ortamdır (Radbruch ve ark., 2006 ve Tokoyoda ve ark., 2010). Kanatlılarda memelilerin aksine kemik iliğinin antikor oluşumuna katkısı tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konuda çelişkili veriler mevcuttur. Lawrence ve ark. (1981), ters hemolitik plak deneyi kullanarak kemik iliğinde çok sayıda Ig salgılayan hücre tespit ederken, Mast ve Goddeeris (1998), immunohistokimya boyama yönteminden elde ettikleri bulgular ile az sayıda yüzey IgM'ye sahip hücre olduğunu ve hiçbirinin IgY veya IgA eksprese etmediklerini ifade etmişlerdir. Russell ve Koch (1993), ise tavukları okülonazal veya intravenöz yolla Newcastle hastalığı virüsü (NDV) ile immunize etmişler ve kemik iliğinde HG'deki yanıttan daha düşük fakat dalağa benzer büyüklükte bir primer ve sekonder Ig salgılayan hücre yanıtı gözlemlemişlerdir.

Tavuklarda kuş gribi virüsü (AIV) ile enfeksiyondan sonra kemik iliğinde virüse özgü Ig salgılayan hücrelerin toplam sayısı, primer ve sekonder enfeksiyondan sonra NDV enfeksiyonuna karşı elde edilen sonuçlara göre önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. AIV ile enfekte olmuş tavukların kemik iliğindeki Ig salgılayan

hücrelerin sayısı, akciğerde Ig üreten hücre sayısı ile tutarlılık gösterirken dalakta Ig salgılayan hücrelerde benzeri bir durum söz konusu olmadığı ortaya konulmuştur (de Geus ve ark., 2012a). Tavuklarda yapılan her iki çalışmada (de Geus ve ark., 2012a ve Russell ve Koch, 1993) Ig salgılayan hücre yanıtının fareye göre nispeten daha az dalak merkezli olduğu ifade edilmiştir.

1.1.12. GALT (Sindirim Sistemi ile İlişkili Lenfoid Doku):

İnsanlarda ve hayvanlarda antijenik uyarımlardan en fazla etkilenen ve çok geniş bir yüzeye sahip olan bölgelerin başında sindirim sistemi mukozası gelmektedir (Arda ve ark., 1994 ve Husband ve Gowans, 1978). Sindirim sisteminde mukozal direnç immunolojik ve nonimmunolojik savunma mekanizmaları ile sağlanmaktadır. Nonimmunolojik savunma mekanizmaları; midenin asit ve pepsin salgıları, ince bağırsağa dökülen safra salgısı, peristaltik hareketler, mukoza yüzeyindeki mukus salgısı, epitel yüzeyindeki glikokaliks ile tight junction'ların varlığı ve bazal membranın tek bir katman halinde bulunmasıdır. Bağırsak mukozasında bağırsak ile ilişkili lenfoid dokuyu içeren lenforetiküler sistem, bu savunma mekanizmalarının immunolojik olarak aktif bölümünü temsil etmektedir (Bockman ve ark., 1983 ve Egberts ve ark., 1985). GALT, gastrointestinal kanal boyunca mukozada yerleşmiş soliter ve agregat lenf folikülleri ile intraepitelyal lenfositleri ihtiva etmektedir (Gartner ve Hiatt, 1997). Şekil 1.1 şematik olarak tavuk sindirim kanalında bulunan başlıca lenfoid dokuların lokalizasyon yerlerini göstermektedir.



Şekil 1.1. Tavuk sindirim kanalı boyunca seyreden lenfoid dokular (Casteleyn ve ark., 2010). 1: Faringeal tonsil; 2 ve 2': Sırasıyla özofagusun servikal ve torasik bölgesi; 3: Özofageal tonsil; 4: Proventriküler lenfoid doku; 5: Pilorik tonsil; 6: Peyer plakları; 7: Meckel divertikülümü; 8 ve 8": Sırasıyla sekal tonsil ve sekumun apikal duvarındaki lenfoid doku; 9: Bursa fabricius; 10: Proktodeum'daki lenfoid doku. A: Özofagustan duodenuma kadar olan kısım; B: Duodenum; C: Jejunum; D: İleum; E: Sekum, rektum ve kloaka kısmı.

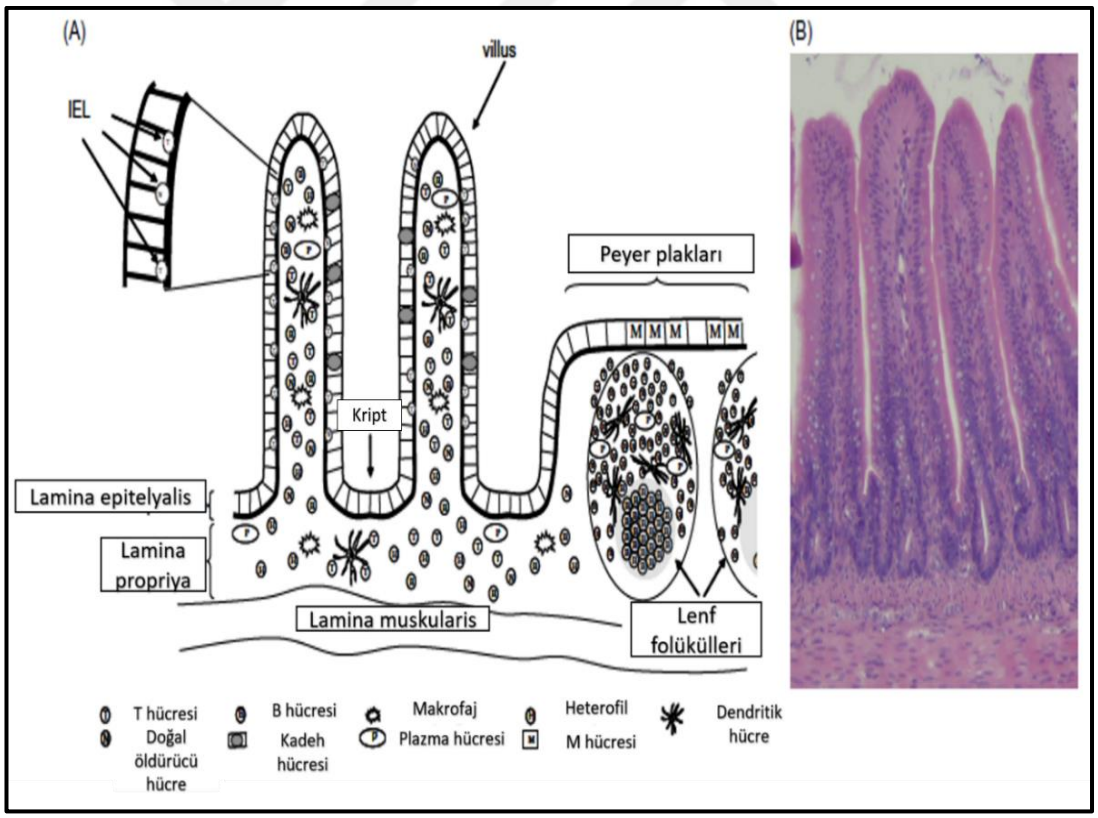
Tavuk ve bıldırcınlarda yapılan çalışmada konvansiyonel başka bir deyişle bilinmeyen yahut kontrol edilemeyen mikroorganizmal floraya sahip olan kanatlılarla, vücutlarında hiçbir mikroorganizma taşımayanlar kıyaslandığında Bursa fabricius, timus veya dalağın ağırlıklarında tutarlı bir farklılık olmamasına rağmen GALT'a dahil olan lenfoid dokularda dikkate değer bir azalma ve sekal tonsillerde lenfoid foliküllerin oluşmadığı gözlenmiştir (Hedge ve ark., 1982). GALT'ın gelişimi bağ dokusu iplikleri, düz kas telleri, sinirler, kan ve lenf damarları içeren lamina propriya katmanında başlamaktadır. Bu bölgede bulunan lenfosit sayısı ne kadar çok ise B ve T-lenfosit alanları da o kadar belirginleşir (Jeurissen ve ark., 1994). Lenfoid dokunun gelişiminde lamina propria'nın orta ve dip kısmındaki T-lenfosit alanlarında B lenfositleri ihtiva eden foliküller ve germinal merkezler oluşmaktadır (Hoshi ve Mori, 1973). Lamina propria, luminal tarafta bulunan kalın ve kesintisiz bir bazal membran ile sınırlanmıştır. Bu kalın zarın üzerinde prizmatik epitel hücreleri ve bu epitel hücrelerinin arasına dağılmış mukus üreten kadeh hücreleri bulunmaktadır. Prizmatik epitel hücreleri spesifik karbonhidratlar veya lektinler gibi çeşitli hücre determinantları (Alroy ve ark., 1989 ve Vervelde ve ark., 1993) ve polimerik IgA'nın bağlandığı

polimerik Ig reseptörü (pIgR) eksprese etmektedir (Wieland ve ark., 2004). Benzer şekilde işgalci patojenleri tespit eden ve anti-mikrobiyal yanıt veren TLR (Toll benzeri reseptör)'ler intestinal kanal boyunca gözlemlenebilmektedir (Iqbal ve ark., 2005).

Genellikle lenfoid dokularda, T-lenfositler interfoliküler boşluklarda birikme eğilimi gösterirken, B-lenfositler foliküller ve germinal merkezler oluştururlar ve tüm bu yapı FAE ile örtülmektedir. Daha önce ifade edildiği gibi organize lenfoid dokuların yanı sıra, sindirim kanalı boyunca lamina propria ve epitel dokuda tekli lenfositlere de rastlanmaktadır. Hem B hem de T-lenfositlere ev sahipliği yapan lamina propriadaki T-lenfositlerin çoğu CD4 ve TCRαβ1'i eksprese etmektedir (Cihak ve ark., 1991). CD8+ TCRγδ+ lenfositler ve CD4+ TCRαβ2+ lenfositler de lamina propria boyunca dağılmış şekilde bulunmaktadır (Bucy ve ark., 1988). İnce bağırsakta nadiren görülen TCRαβ2+ lenfositler sekal tonsillerde nisbeten daha yüksek oranlarda bulunmaktadır. Villuslarda IgM+, IgA+ ve IgY+ plazma hücreleri bulunmasına rağmen lamina propriada IgA salgılayan hücreler daha baskındır. IgM ve IgY pozitif plazma hücreleri çoğunlukla kriptlerin arasına yerleşirken IgA eksprese eden plazma hücreleri genellikle kriptlerden villusların uç kısımlarına kadar geniş bir dağılım sergiler. MHC II antijeni ve asit fosfataz sentezleyen makrofajlar özellikle subepitelyal bölgeye konumlanmıştır (Jeurissen ve ark., 1989).

Peyer plakları (PP), sekal tonsiller, Bursa fabricius ve Meckel divertikülü gibi organize lenfoid dokuları örten epitel, villuslar ve intestinal bezleri örten epitelden oldukça farklıdır. Bu epitel düzensiz mikrovilluslar, çok sayıda apikal tübüller, veziküller, vakuoller ve yoğun sitoplazma ile karakterizedir. Lenfositler, Bursa fabriciusun dışında yukarıda adı geçen diğer lenfoid yapılarda bir lenfoepitelyum oluşturmak için epitel hücrelerinin arasına girmektedir. Özelleşmiş bu epitelyumun bir diğer özelliği ise yüksek oranda pinositik aktivite gösteren absorptif M hücrelerini içermesidir (Bockman ve Cooper, 1973 ve Burns, 1982).

Memelilerde FAE'nin elektron mikroskobik incelemelerinde M hücrelerinin apikal yüzeyi mikrofold da denilen komşu bağırsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarından daha kısa ve kalın mikrovilluslara sahip olduğu belirlenmiştir (Kuhn ve Kaup, 1996 ve Neutra ve ark., 1987). M hücrelerinin apikal sitoplazmalarında çok sayıda vezikül bulunur. Ayrıca sitoplazmalarında bol miktarda mitokondriyon, gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum, belirgin Golgi kompleksi ve az sayıda lizozom varlığı tespit edilmiştir (Jarry ve ark., 1989). Yapılan bir çalışma ile tavuk M hücrelerinin ve normal epitel hücrelerinin fenotiplerinin ve fonksiyonlarının memelilerde bulunan hücrelerden farklı olarak belirgin bir ayrıma sahip olmadığı ortaya konulmuştur (Jeurissen ve ark., 1999). Şekil 1.2'de kanatlı ince bağırsağındaki (ileum) foliküle ilişkili lenfoid doku ve bu dokuya ait hücrelerin şematik hali (A) ile histolojik boyama uygulanmış genel bir kesit detaylı bilgi vermek için buraya ilave edilmiştir.



Şekil 1.2. İleumdaki Foliküle ilişkili epitel ve histolojik olarak villus ve kriptlerin gösterimi (Oláh ve ark., 2014). A: İnce bağırsağın bir parçası olan ileumdaki FAE ile villus ve kript yapısının şematize edilmiş hali. B: İleumdaki villus ve kript yapısını gösteren histolojik resim. İEL: İntraepitelyal lenfositler, M hücreleri: Membran benzeri hücreler.

Epitel hücrelerinin arasına heterojen şekilde yerleşen lenfositler intraepitelyal lenfosit (İEL) olarak adlandırılmaktadır ve 3H-timidin uygulanan tavuklar üzerine yapılan bir çalışmada İEL'in lamina propriadan epitel katına göç eden lenfositler olduğu gerçeği açığa çıkarılmıştır (Bäck, 1972b). İEL, özofagusun çok katlı yassı epitelinde ve bağırsakların tek katlı prizmatik epitelinde tespit edilmesine karşın proventrikülüs epitelinde nadir olarak görülmektedir (Vervelde ve Jeurissen, 1993). İEL, epitelin bazal ve apikal kısmında yer alan heterojen hücre popülasyonundan meydana gelmektedir (Bäck, 1972a ve Vervelde ve Jeurissen, 1993) ve CD3+ İEL ağırlıklı olarak CD8α+ lenfositler olup çoğu TCRαδ eksprese etmektedir (Bucy ve ark., 1988). Bununla birlikte, tavuklarda yapılan bir diğer çalışmada CD8α pozitif İEL'in yaklaşık %30'unun CD3 negatif olduğu bildirilmiştir (Göbel ve ark., 2001) ve Ig üretemeyen bu hücrelerin (Back, 1970) NK (doğal öldürücü) hücre benzeri aktivite gösterdiğinden bahsedilmektedir (Pink ve Rijnbeek, 1983; Veromaa ve ark., 1988 ve Vervelde ve Jeurissen, 1993). Epitel dokuda bulunan ve hatalı bir isimlendirmeye tabi tutulan hücre ise granül ihtiva eden globuler lenfositlerdir. Bu hücreler diğer İEL'den biraz daha büyüktür ve NK hücrelerine benzer bir morfolojiye sahiptir (Kitagawa ve ark., 1988).

1.1.12.1. Faringeal Tonsil:

Kanatlıların orofarinksinde bol miktarda lenfoid doku bulunur (Rose, 1981) ve özellikle adı geçen bu doku faringeal bölgede yoğunlaşmaktadır (Crole ve Soley, 2012 ve McLelland, 1979). Bu lenfoid doku bulunduğu bölge dolayısıyla “faringeal tonsil” adını alır (Berens von Rautenfeld, 1993; Casteleyn ve ark., 2010 ve Rose, 1981) ve bu tonsiler yapı özofageal, pilorik ve sekal tonsillerin de dahil olduğu kanatlı sindirim kanalındaki lenfoid sistemin önemli bir parçasıdır.

Kanatlılarda faringeal bölgede bulunan lenfoid dokuyu tanımlamak için kullanılan tonsil terimi memelilerde bulunan tonsiler yapılarla kıyaslandığında yeterince düşünülmeden bu adın kullanıldığı açıktır. Örneğin, kanatlı hayvanlarda lenfoid doku iyi organize olmamış ve tonsiler kriptlerden yoksun olmasına karşın

faringeal tonsil olarak adlandırılmıştır (Casteleyn ve ark., 2010). Aksine memeli tonsilleri yoğun lenfoid doku tarafından çevrelenmiş kriptlerle karakterize kompleks yapılar olarak tanımlanmıştır (Oláh ve ark., 2003). Ancak Cesta (2006), memelilerde kript içermeyen tonsil varlığından söz etmiştir. Ayrıca memelilerde yüzük şeklinde olan faringeal tonsiller kanatlılarda lenfoid doku birikimi şeklindedir (Rose, 1981).

1.1.12.2. Özofageal Tonsil:

Tavuklarda, memelilerde var olan ve ikinci bariyer sistemi görevi gören mezenterik lenf düğümlerinin var olmaması nedeniyle antijenler tavuklarda lenf damarları vasıtasıyla kana geçebilmektedir. Bu bariyer sisteminin eksikliğine karşılık mide ve bağırsağın girişinde ileri derecede gelişmiş ve tavuklara spesifik olan özofageal ve pilorik tonsillerin kan dokusuna antijenlerin yayılmasını önlemede görev yaptıkları düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak immunolojik olarak özofageal tonsilin midenin girişi için, pilorik tonsilin ise duodenumun girişi için büyük bir öneme sahip olduğu söylenmiştir (Casteleyn ve ark., 2010 ve Nagy ve Oláh, 2007).

Özofagus ile proventrikulusun bağlantı noktasında lenfoid doku varlığı 40 yıldan daha uzun bir süre önce gözlenmesine rağmen (Hodges, 1974) bu yapının detaylı olarak tanımlanması çok daha sonra olmuştur (Oláh ve ark., 2003 ve Nagy ve ark., 2005b). Özofageal tonsil, özofagusun proventrikulusa bağlandığı noktada bulunurken, pilorik tonsil midenin duodenumla birleştiği noktaya yerleşim gösteren daimi bir lenfoid yapıdır. Tavukların özofagusunda 6 ila 8 adet uzunlamasına kıvrımlar şekillenir ve lenfoid doku bu kıvrımların distal uçlarında izole tonsil birimleri oluşturmaktadır. Lenfoid ünitelerin sayısının, kıvrım sayısı ile pozitif korelasyon göstermesi bu ünitelerin sabit yapılar olduğu varsayımını akla getirmiştir. Tonsiler yapı, kıvrımların altından başlayan bir kript ve çevresindeki lenfoid dokudan ibaret olduğu bildirilmiştir. Peyer plakları submukozal katmanı da işgal etmesine karşın özofageal tonsiller sadece lamina propria ile sınırlıdır. (Nagy ve ark., 2005b).

1.1.12.3. Pilorik Tonsil:

Duodenumun başlangıç kısmında yer alan ve pilorik tonsil bölgesi olarak tanımlanan bölge ilk olarak tavuklarda yapılan bir çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu tonsiler alanda lieberkühn kriptlerinin tonsiler kriptlere dönüştüğü ve bölgedeki kriptlerin yüzeyinin lenfoepitelyum ile örtüldüğü bildirilmiştir. Dahası pilorik bölgenin lenfoid dokusunun lokalizasyonu, bağırsağın antimezenterik tarafında bulunan Peyer plaklarından farklı olarak bağırsağın tüm duvarını kapladığı ve böylece tam bir halka oluşturduğu açıklığa kavuşturulmuştur. Ayrıca pilorik bölgenin en az 15-20 tonsiler üniteyi bünyesinde ihtiva ettiği tespit edilmiştir (Nagy ve Oláh, 2007). Benzer şekilde ördek (Gedam ve ark., 2018) ve kınalı kekliklerde (Arugh ve Hamedi, 2019) pilorik tonsil bölgesi ile ilgili çalışmalar yapılarak bölgenin yapısal özellikleri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Genellikle tonsiler birimlerin lamina propriya içerisinde lamina muskularis katmanına yakın bir şekilde yerleştiği ve her biri kapsülle çevrelenmiş bu lenfoid yapıların etrafındaki kapsülle lamina muskularis katmanındaki bağ dokusunun kaynaştığı ifade edilmiştir (Nagy ve Oláh, 2007). Bu tonsiler ünitelere ördeklerde submukoza ve hatta lamina muskularis katmanında dahi rastlanıldığı ifade edilmiştir (Gedam ve ark. 2018).

Bu lenfoid dokunun iki önemli görevinin olduğu varsayılmaktadır. İlk olarak tonsiler bölge mide ile bağırsağın arasında bulunan önemli bir lenfoid yapı olup çevresel antijenlere yoğun bir şekilde maruz kalmaktadır. İkincisi tonsiler alan tıpkı peyer plaklarında olduğu gibi B-lenfositlerin gelişimine katılabilmektedir (Oláh ve ark., 2014). Oláh ve ark. (2003), tonsillerin çevredeki antijenler için bir "geçiş kapısı" olarak işlev gördüklerini belirtmişler ve bu yapılar vasıtasıyla antijenlerin veya alerjenlerin bağışıklık sistemini sürekli olarak uyardığını ve onları aktif halde tuttuklarını ileri sürmüşlerdir.

1.1.12.4. Peyer Plakları:

Memeli peyer plaklarının (PP) karakteristik özelliklerine sahip olan lenfoid agregatlar kanatlılarda bulunmaktadır (Befus ve ark., 1980 ve Burns, 1982). Bağırsaklarda yaygın olarak belli aralıklarla dağılmış altı adete kadar PP tespit edilmiştir (Befus ve ark., 1980). Genelde foliküler bir yapının olması, M hücrelerini içeren özelleşmiş bir epitelin bulunması ile embriyonun gelişim sürecinde aktif antijen alımı lenfoid agregatların spesifik özellikleri arasında sayılabilmektedir (Jeurissen ve ark., 1989). Ayrıca M hücrelerini bünyesinde bulunduran Dom bölgesinin piramit ya da kubbe şeklinde çıkıntı yaptığı ve bunu sınırlandıran FAE ya da dom bölgesi epitelinin villus intestinalisleri örten epitelden daha düzensiz olduğu, kadeh hücreleri içermediği ve çok sayıda intraepitelyal lenfosit ve makrofajı içinde barındırdığı ifade edilmiştir (Gebert ve ark.,1996 ve Kurtdede ve ark., 2000). Peyer plaklarındaki germinal merkez, subepitelyal bölge ve interfoliküler alanlar sekal tonsillerdeki alanlarla benzerlik göstermektedir. Makrofajların daha yaygın olduğu subepitelyal bölge B-lenfosit bağımlı alanlar olup tüm B-lenfositler chB6 antijenini eksprese ederler (Jeurissen ve ark., 1989). İnterfoliküler bölgede T lenfositler bulunur ve hemen hemen tüm T-lenfositler TCRα+ olup bu hücrelerin çoğu CD4 eksprese ederler (Bucy ve ark., 1988).

Ankara keçilerinin ileumu üzerine yapılan çalışmada korona bölgesi ve interfoliküler alanlarda T-lenfositlerin, germinal merkezde B-lenfositlerin ve dom bölgesinde her iki lenfosit tipinin bulunduğu saptanmıştır (Kurtdede ve ark., 2000). Kanatlılarda yapılan çalışmada ise germinal merkez ve interfoliküler alanlarda çoğunlukla IgY+ ve daha az sayıda IgA+ ve IgM+ plazma hücreleri bulunduğu ifade edilmiştir. Epitelin luminal sınırı IgA ve IgY için pozitiftir ancak IgM için değildir (Burns, 1982). Muir ve ark. (2000), Bursa fabricius'un yanısıra Peyer plakları ve sekal tonsillerin de prekürsör B-lenfositleri ihtiva ettiğini bildirmiştir. Bursa fabriciusları çıkarılan tavuklara bu dokularda bulunan öncü B-lenfositlerin aktarılmasını müteakiben intestinal lamina propriada IgA+ plazma hücrelerinin yeniden doldukları ortaya konulmuştur. Elde edilen bu sonuç GALT'ın primer lenfoid doku olarak rol aldığını göstermektedir.

1.1.12.5. Meckel Divertikülümü:

Vitellus kanalının kalıntısı olan Meckel divertikülümü, jejunumun ortalarında bulunan ince bağırsağın bir uzantısıdır. Kuluçkadan sonra, civciv için besin kaynağı sağlamak adına yumurta sarısının önemli miktarı bağırsaklara geçmektedir. Başlangıçta vitellus kesesini ve embriyonun bağırsağını birbirine bağlayan vitellus kanalının kalıntısı kuluçka döneminden sonraki ilk 5 haftaya kadar varlığını sürdürür (Latimer, 1924). Meckel divertikülümünün duvarı histolojik olarak dört farklı tabakadan oluşmaktadır. Seroza katmanı, bağırsağın subserozasına karşılık gelen kalın bir bağ doku tabakasını dıştan sarmaktadır. Bu katmandan içeri doğru gidildikçe demetler halindeki düz kaslar, Meckel divertikülümünün çevresine hizalanmış konumdadır. Kasların luminal yüzeyindeki bağ dokusu geniş kan damarları ve gangliyonlar içerir. Bu katman divertikülümün lümenine doğru kıvrılır ve bu katlantının lümene bakan yüzü mukus üreten kadeh hücrelerini içeren prizmatik epitel ile örtülü vaziyettedir (Oláh ve ark., 2014).

Meckel divertikülümünün sekal tonsil ve peyer plaklarına anatomik benzerliğinin çok bariz olmasına karşın, bağırsak antijenlerine daha az maruz kalması nedeniyle germinal merkez gelişiminin daha sonra ortaya çıktığı yapılan incelemelerle tespit edilmiştir (Brambell, 1970 ve Jeurissen ve ark., 1988). Kuluçka döneminde Meckel'de lenfoid doku bulunmadığı ancak kuluçkadan sonraki ilk iki haftalık periyoda denk gelen sarı kesenin gerilemesi sırasında, lenfopoietik dokunun divertikülümün bağırsaklara yakın olan daha proksimal kısımdaki subepitelyal bağdokuda oluşmaya başladığı, miyelopoietik dokunun ise daha distal uça yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Oláh ve Glick, 1984). Tavuklarda yapılan başka bir çalışmada ise Meckel divertikülümündeki germinal merkezin oluşumunun 5 ila 7 hafta arasını bulduğu, lenfoid dokunun tam olarak meydana gelişinin 10. haftalara tekabül ettiği bildirilmiştir (Çolakoğlu ve Dönmez, 2018).

Kuluçkadan sonra, epitel dokusunun subepitelyal bağ dokusuna doğru genişleyerek uzunlamasına kıvrımlar oluşturduğu ve epitelin hemen altında küçük gruplar halinde lenfositik hücrelerin biriktiği gözlemlenmiştir. CD45+ lenfositler epitele ve bağ dokusuna infiltre olurken, IgY+ veya IgA+ B-lenfositlerden ziyade IgM+ B lenfositlerin oluşan infiltratlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mononükleer fagositik hücrelerin Meckel divertikülümü boyunca yerleşim gösterdiği de bildirilmiştir (Oláh ve ark., 2014). Meckel divertikülündeki lenfoid doku yavaş yavaş yaşla birlikte artarak kıvrımları doldurur. Eşzamanlı olarak, kadeh hücrelerinin sayısında azalma, epitel dokusuna lenfositlerin infiltre olması ve kıvrımların içinde dendritik hücrelerin çevresinde lenfoblast kümelerinin oluşması da gözlemlenmiştir (Jeurissen ve ark., 1988 ve Oláh ve ark., 1984). Daha ileri yaşlarda hem B hem de T-lenfosit alanları ayırt edilebilmektedir. T-lenfosit alanları germinal merkeze bitişikken, B-lenfosit alanları genellikle epitelin altında bulunur (Jeurissen ve ark., 1988). Plazma hücre yoğunluğu ise HG'yi anımsatmaktadır (Brambell, 1970 ve Jeurissen ve ark., 1988) ve Meckel divertikülümü boyunca dağılmış vaziyette IgA ve IgY plazma hücreleri ve sIgA (salgısal IgA)+ ve sIgY (salgısal IgY)+ hücreler bulunmaktadır (Jeurissen ve ark., 1988).

1.1.12.6. Sekal Tonsil:

Kümes hayvanlarında sekal keselerin her birinin proksimal ucunda bulunan sekal tonsillerin primordiyumunun (ilk organ taslağı) yaklaşık embriyonik inkubasyon zamanının 10. günde gözlenirken, lenfositlerin bu yapıya göç etmelerinin primordiyum oluşumundan yaklaşık sekiz gün sonrasına rast geldiği ifade edilmiştir (Payne, 1971). Tavuk ve bıldırcınlarda kuluçkadan sonraki birinci haftada lenfosit sayısının artma eğilimi gösterdiği ve ikinci hafta ortaya çıkmaya başlayan germinal merkez sayısının yaşla birlikte arttığı tespit edilmiştir. Patojen içermeyen bir ortamda yetiştirilme sonucunda sekal tonsillerde germinal merkezlerin görülmeyip lenfoid dokunun belirgin şekilde azaldığı ortaya konulmuştur ve bu durumun bağırsak florasının sekal tonsillerin tam olarak gelişmesini sağlamak için gerekli olduğu savının ortaya atılmasına neden olmuştur (Hedge ve ark., 1982). Kloakal dudaklara uygulanan

ince parçacık süspansiyonu ile antijenin, tıpkı Bursa fabricius için tarif edilene benzer şekilde retroperistalsis ile sekal tonsillere ulaşabildiği tespit edilmiştir (Glick, 1978; Oláh ve Glick, 1978 ve Sorvari ve ark., 1977).

Kanatlılarda özelleşmiş bir lenfoepitel dokusuna, subepitelyal bir bölgeye, germinal merkez ve interfoliküler alanlara sahip olan sekal tonsillerin genel yapısının Peyer plaklarının yapısı ile benzer olduğu dile getirilmiştir. Tonsillerin subepitelyal bölgesinde chB6+ (tavuk B lenfosit markırı) ve IgM+ B-lenfositlerin yoğun olarak bulunduğu beyan edilmiştir ve bahsedilen bu hücrelerin yanısıra bazı IgY+ B-lenfositlerin, bazı IgM+ ve IgA+ plazma hücrelerinin ve TCRγδ veya TCRαβ1'i eksprese eden az sayıda CD4+ ve CD8α+ T-lenfositlerin bu alana yerleşim gösterdiği ifade edilmiştir. Mononükleer fagositik hücrelerin ise sekal tonsiller boyunca dağılım göstermekle birlikte en yaygın olarak epitelin hemen alt tarafına yerleştiği gözlemlenmiştir. İnterfoliküler T-lenfosit bağımlı alanların esas olarak CD4+ TCRαβ1+ hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir (Oláh ve Glick, 1987).

1.1.13. Diğer Tam Olmayan Lenfoid Yapılar:

Proventriküler lenfoid doku, soliter lenf folikülleri ve intraepitelyal lenfositler bu gruba dahildir. Kanatlılarda proventrikülüste lenfoid bir dokunun varlığı ilk olarak Arai ve ark. (1988), tarafından ortaya konulmuştur. Bu lenfoid yapıda T-lenfositler mukozanın birer katmanı olan lamina epitelyalis ve lamina propriadaki lenfoid doku birikimlerinin esasını oluşturmaktadır. Bazı lenfoid doku birikimlerinde ise benzersiz bir dağılım sonucu periferde B-lenfositlerin ve merkezde T-lenfositlerin bulunduğu bildirilmektedir (Matsumoto ve Hashimoto, 2000). B-lenfosit hücre toplulukları proventrikülüste bulunan glanduler bezlerin dip kısımlarını doldururken (Ogunkoya ve Cook, 2009), T-lenfositlere aynı bölgede bulunan bezlere ait kanalların epitelinde rastlanmıştır (Matsumoto ve Hashimoto, 2000). Kanatlıların bir diğer lenfoid yapısı, sindirim kanalında bulunan agregat lenfoid oluşumların haricindeki soliter yapıdaki lenfositik hücre topluluklarıdır. Lenf folikülleri yönünden yetersiz olduğu bilinen kolonun kloakal keseye açıldığı yerde (Clench, 1999), koprodeumda (Schat ve Myers,

1991), proktodeumda ve ürodeumda bu tip lenfosit infiltrasyonu bulunduğu bildirilmiştir (Clench, 1999).

Lenfositlerin bir kısmının intestinal mukozanın lamina propriyasından epitelyum katına doğru göç ederek epitel hücrelerinin arasında bulunduklar tespit edilmiş ve bu nedenle hücreler intraepitelyal olarak adlandırılmıştır (Schat ve Myers, 1991). Farelerde yapılan çalışma sonucunda genellikle T-lenfositlerin epitel katına yerleşim gösterdikleri ve B-lenfositlerin çoğunlukla lamina propriyada kaldığı belirlenmiştir (Guy-Grand ve ark., 1991). Yapılan bir çalışmada ise kanatlılarda intraepitelyal lenfosit hücre popülasyonunun en bol duodenum ve jejunumda olduğu sekumun proksimal kısmı ve kolonda sayısal azalma gözlendiği ve sporadik olarak bu hücrelere proventrikülüste rastlandığı bildirilmiştir. Tavuklarda tüm intraepitelyal lenfositik hücrelerin lenfositler için ortak bir markır olan CD45 pozitif olduğu ve CD45+ bu hücrelerin %35'inin T-lenfosit, %50'sinin ise B-lenfosit markırı eksprese ettiği beyan edilmiştir (Vervelde ve Jeurissen, 1993). Jeurissen ve ark. (1989), bu T lenfositlerin γδ tipi T-lenfositler olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde memelilerin intestinal epiteline çok sayıda lenfosit infiltre olduğu (Beagley ve Husband, 1998 ve Viney ve ark., 1990) ve bu lenfositlerin başlıca γδ tipi lenfositler olduğu ortaya konulmuştur (de Geus ve ark., 1990 ve Viney ve ark., 1990).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada doku materyali olarak hindilerde duodenumun başlangıç kısmında yer alan pilorik tonsil bölgesi kullanılmıştır. Materyal, Ankara civarında bulunan hindi yetiştiriciliği ve kesimi yapan özel işletmelerde kesilen sağlıklı ve erişkin beş erkek ve beş dişi toplam on adet Amerikan bronz hindiden elde edilmiştir.

2.1. Histokimyasal İncelemeler:

Alınan dokularda normal yapıyı incelemek için %10 tamponlanmış formol, Bouin ve Maksimov tespit yöntemleri uygulanmıştır. Tespit işlemlerinden sonra dereceli alkoller, metilbenzoat ve benzol serilerinden geçilerek doku parçaları paraplasta gömülerek bloklanmış (Bancroft ve Gamble, 2008) ve bu bloklardan Anabilim dalımızda bulunan mikrotom (Leica RM2125 RTS) ile 5-6 mikrometre kalınlıkta kesitler alınmıştır. Kesitler 24 saat 37 °C'deki etüvde (Nüve EN 500P) bekletilerek kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kesitlere, Crossman'ın modifiye üçlü boyama yöntemi ile PAS (Periyodik asit-Schiff) ve Safranin O boyama yöntemleri uygulanmıştır (Bancroft ve Gamble, 2008).

2.2. İmmunohistokimyasal İncelemeler:

Alınan doku örneklerini tespit etmek için %10 Tamponlanmış Formol tespit solüsyonu kullanılmıştır. Tespit işleminden sonra dereceli alkoller, metilbenzoat ve benzol serilerinden geçilerek doku parçaları paraplastta bloklanması gerçekleştirilmiştir. Bu bloklardan mikrotom (Leica RM2125 RTS) ile 5-6 mikrometre kalınlıkta kesitler alınıp, poli-L-lizinli lamlar üzerine yerleştirilmiştir. Kesitlerin 24 saat 37 °C'deki etüvde (Nüve EN 500P) bekletilerek kurutulması işlemine geçilmiştir. Alınan bu kesitlerin immunohistokimyasal boyaması için aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

İlk olarak kesitler +58 °C'lik etüvde 30 dakika tutulduktan sonra 20 dakika kadar oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu kesitlere deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Deparafinizasyondan sonra doku kesitlerinde, hücrelerin yüzeyinde bulunan antijenlerin tespit solüsyonu ile oluşturduğu bağları kopartarak hücre membranındaki epitopların açığa çıkarılması için sitrat buffer solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında antijen retrieval işlemi 20 dakika süreyle uygulanmıştır.

Kesit yüzeyinden sitrat buffer uzaklaştırıldıktan sonra endojen peroksitlerin aktivasyonunu engellemek için hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit karanlık ortamda 20 dakika uygulanmıştır. Hücre içerisinde bulunan primer antikora özgü antijenlerin (Collagen III, Vimentin ve CK18) boyamasının yapılacağı durumlarda ise 20 dakika antijen retrieval işleminden sonra hücrelerin geçirgenliğini arttırmak için %0,2 PBS-Triton-X 15 dakika süreyle uygulanmış ve sonrasında hidrojen peroksit uygulaması 20 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Serum blocking işlemi nemli ve karanlık ortamda 10 dakika kadar uygulanmıştır. CD79A, Collagen III, Vimentin ve Anti-sitokeratin18 (CK18) için 1:50 oranında, CD268 antikoru için 1:200 oranında ve CD3ϵ (epsilon) için ise 10 µg/ml olacak şekilde sulandırma yapılarak üzerine primer antikor konulan kesitler nemli bir kap içerisinde +4 °C'de bir gece bekletilmiştir.

Ertesi gün sabah PBS ile yıkama işleminden sonra primer antikora karşı üretilmiş olan biyotinli sekonder antikor nemli ve karanlık ortamda 30 dakika süreyle kesitlere uygulanmıştır. 15 dakika PBS ile sekonder antikorun fazlası kesitlerden uzaklaştırıldıktan sonra biyotine spesifik olan Streptavidinli HRP (Horseradish Peroxidase) yine 30 dakika olacak şekilde uygulanmış ve sonrasında 15 dakika PBS ile bu kimyasal maddenin fazlasının uzaklaştırılması yoluna gidilmiştir. Anılan bu işlemden sonra AEC (3-amino-9-etilkarbazol) kromojeni 1-5 dakika olacak şekilde kesitlere karanlık ortamda uygulanmış ve yukarıda beyan edilen antikorlardan sadece CD268 primeri uygulanan kesitlere 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) kromojeni ile boyama yapılmıştır. Pozitif reaksiyonun görülmesinden sonra kesitler 5 dakika distile su ile yıkanarak AEC'nin ve CD268 primeri uygulanan kesitlerde DAB'ın fazlası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 2 dakika çeşme suyunda yıkanan kesitlere Gill's hematoksilen karşıt boyası 5 saniye süreyle uygulanmıştır. Kesitlerin tekrar çeşme

suyunda bu defa 15 dakika olacak şekilde yıkama işleminden sonra DAB ve AEC için ayrı kapatma işlemleri uygulanarak AEC kesitleri direk su ile bağdaşan maounting medyumla kapatılırken, DAB uygulanan kesitler çeşme suyundan sonra alkol ve ksilol serilerine girdikten sonra mounting medyumla kapatılmıştır. İnceleme ve sonrasında fotoğraf çekme işlemi Leica DM2500 marka-floresan filtre ataçmanlı mikroskop ile gerçekleştirilmiştir.

2.3. İmmunofloresan İncelemeler:

İmmunohistokimyada uygulanan prosedür burada da takip edilmiştir. Burada farklı olarak biyotinli yerine floresans işaretli sekonder antikor (Goat anti-Mouse IgG (H+L), AlexaFluor Plus 488) 30 dakika süreyle kesitlere uygulanmıştır. Sekonder antikorun fazlasının uzaklaştırılması işleminden sonra boyanın solmasını önleyen mounting medyum ile kesitlerin kapatma işlemi yapılarak Leica DM2500 marka-floresan filtre ataçmanlı mikroskop ile fotoğraf çekme işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.4. Yarı İnce Kesitlerin Elde Edilmesi ve İncelenmesi:

Işık mikroskop düzeyinde daha detaylı inceleme için bir erkek ve bir dişi hayvandan alınan doku örnekleri elektron mikroskobik tespit yöntemi ile bloklama yapılarak yarı ince kesitleri alınmış ve incelenmiştir. Bunun için doku parçalarına gluteraldehit-paraformaldehit ön tespitleri 2-6 saat yapıldıktan sonra yıkama işlemi 0,1 M Kakodilat tamponu (pH:7,4) ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem her 15 dakikada bir tamponu değiştirmek suretiyle 3 saat süreyle uygulanmıştır. Dokular ozmik asitte ikinci kez 2 saat tespit edilmiştir. Ozmik asitin fazlası kakodilat tamponunda 20 dakika yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Sonrasında dokular sırasıyla 30, 50 ve 70 dereceli alkollerden 30 dakika olacak şekilde geçirildikten sonra bir gece buzdolabında bekletildi. Ertesi gün uranil boyası içerisine alınan dokular 2 saat buzdolabında tutuldu. Daha sonra dokular 96, 100 ve propilen oksit ile her biri 1 saat olacak şekilde yıkandı ve sonrasında Araldit ile blokaj işlemi yapıldı. Son olarak bloklardan

piramitom ile 1mikron (µ) kalınlığında kesitler alınarak Toluidine blue ile boyama yapıldıktan sonra kesitler kapatılmış ve fotoğraf çekme işlemi Leica DM2500 marka-floresan filtre ataçmanlı mikroskop ile gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

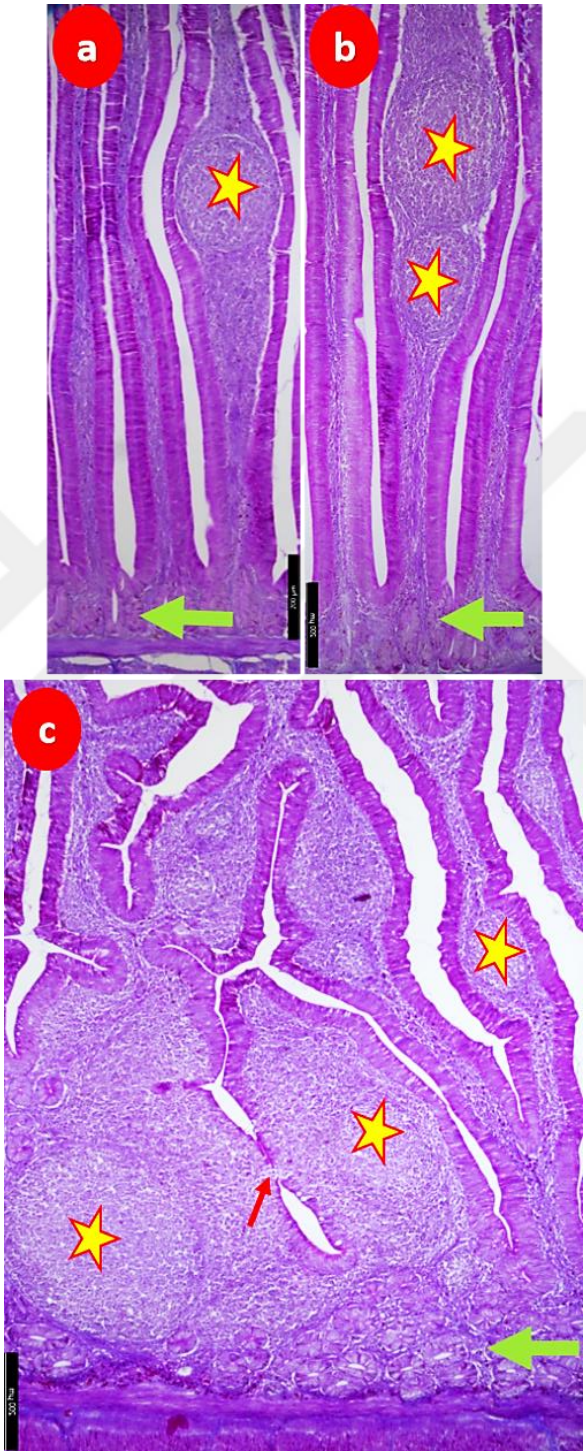
3.1. Histokimyasal Boyamalardan Elde Edilen Bulgular:

3.1.1. Crossman'ın Modifiye Üçlü Boyama Bulguları:

Yapılan çalışmada Pilorus sfinkteri seviyesinde Pilorustan duodenuma doğru geçişte bu iki bölüm arasında literatürde pilorik tonsil olarak adlandırılan ve pilorus ile duodenumdan yapısal olarak farklı olduğu iddia edilen bir geçiş bölgesinin var olduğu gözlenmiştir. Yapılan incelemede hindilerde bu yapının ayrı bir parça olmayıp duodenum yapısında olduğu ancak başlangıç kısmındaki villuslarda hacimsel artış ve şekil değişimi sonucu farklı bir görüntünün meydana geldiği tespit edilmiştir. Pilorik tonsil bölgesi olarak anılan alanın histolojik yapısının ortaya konulması amacıyla %10 tamponlu formol, Bouin ve Maksimow olmak üzere üç farklı tespit solüsyonu kullanılmıştır. Bu tespit solüsyonlarının materyalimizin doku bütünlüğüne olan etkisi karşılaştırıldığında en olumlu sonuçların %10 tamponlu formol tespiti uygulanan dokulardan elde edildiği saptanmıştır. Bouin ve Maksimow tespit solüsyonları kullanılmasını takiben elde edilen kesitler histolojik olarak incelendiğinde epitel ile altındaki bağdokusuyla normalde var olan ilişkinin tamamen kaybolduğu ve yer yer epitelin döküldüğü gözlemlenirken, %10 tamponlu formol tespitli dokulardan daha iyi sonuçlar alınmıştır.

Hindilerde tonsiler bölgede bulunan lenf foliküllerinin bağırsağın yuvarlak olan enine kesitinde sadece üst ya da alt kısımda değil tüm duvar boyunca halka şeklinde dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Lenf foliküllerinin mideden tam duodenuma geçişin olduğu bölge hariç kriptler hizasında veya altında değil villusların içerisine yerleşmiş olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.1'deki üç farklı resim incelendiğinde villusların lamina propriyasında tekli, ikili veya daha fazla sayıda ve farklı büyüklüklerde lenf folikülleri olduğu gözlemlenmiştir. Bu foliküller 1-2 adet olduğunda konum olarak çoğunlukla villusların orta kısımlarında gözlendikleri daha fazla sayıda olduklarında ise tabandan uca kadar yayılabildiği saptandı. Histolojik

yönden villusların boyu ile kriptlerin derinliği oransal olarak kıyaslandığında birim alanda villusların kriptlere göre çok daha uzun olduğu gözlemlendi.



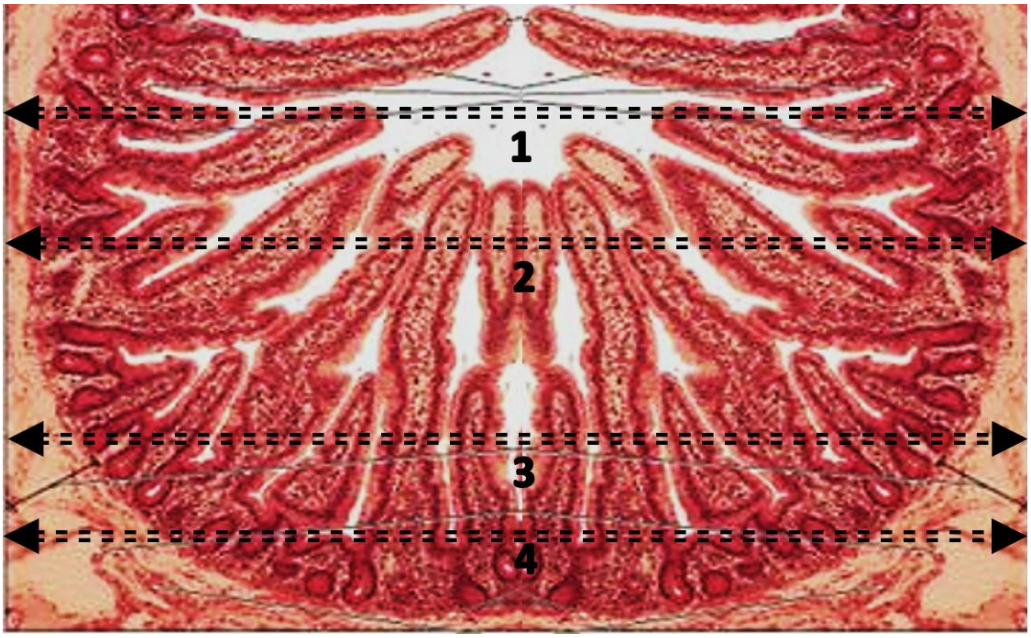
Şekil 3.1. Pilorik tonsil bölgesinin değişik yerlerindeki lenf folikülü içeren ve içermeyen villusların Crossman'ın modifiye üçlü boyama yöntemi ile karşılaştırılması. Sarı renkli yıldız: Villuslar içindeki foliküller. Yeşil ok: Kript bölgesi. Kırmızı ok: İki villus arasındaki füzyon noktası. X100.

Villusların içerisindeki lenf folikülleri sayısal olarak karşılaştırıldığında Şekil 3.1'de tekli ve ikili lenf folikülleri (sarı renkli yıldız) bulunurken Şekil 3.2'ye bakıldığında ise 3-5 adet lenf folikülünün tek villus içerisinde konumlanabildiği farkedilmiştir. Ancak bu resimlerde villus içerisinde bulunan folikül çapları kendi aralarında kıyaslandığında hepsinin uniform olmayıp farklı büyüklüklerde olabildiği tespit edilmiştir. Her bir folikülün birbirinden ayrı olacak şekilde bir bağdokusu kapsülü ile çevrelenmiş olduğu da belirlenmiştir. Bununla birlikte villuslar, ihtiva etttikleri foliküllerin sayısı ve çapına bağlı olarak değişik yönlerde genişleme eğilimi göstermiştir.



Şekil 3.2. Crossman'ın modifiye üçlü boyaması ile pilorik tonsil bölgesinde içerdiği lenfoid dokuya göre farklı büyüklükteki villuslar. Sarı renkli yıldız: Belirgin olan foliküller. Kırmızı ok: Kript bölgesi. Yeşil ok başı: Foliküllerin etrafındaki kapsül. X50.

Şekil 3.3 herhangi bir ince bağırsağın genel histolojik görüntüsü olup ilerde yapılacak anlatım ve benzetmelerin daha iyi anlaşılması için burada yukarıdan aşağıya doğru dört adet kesikli siyah çizgi kullanılmıştır. Kullanılan bu çizgiler hayali olarak kesit alınmış alanları tasvir etmektedir. En üst tarafta bulunan bir numaralı çizginin olduğu alandan horizantal kesit alındığı varsayılırsa sadece bağırsak duvarının sağ ve solunda bulunan villuslar kesit yüzeyine düşecektir. Burada görüldüğü gibi kesitte her bir villustan eşit miktarda parça düşmesi ya da tüm villusun görüntülenmesi mümkün değildir. Resimde görülebileceği gibi villusların bazılarının uç bazılarının ise orta kısmı kesite düşmektedir. İki nolu çizginin olduğu seviyeden kesit alındığı kabul edilirse hem yan tarafta hem de alt tarafta bulunan villuslardan parçalar kesit alanında olacaktır. Burada dikkat edilirse yan duvarlardaki villusların verev kesit nedeniyle bir kısmının oval şekli kesit içerisinde olurken alt tarafta bulunan ve dikine görülen villusların sadece belirli bir kısımları yani villusların enine kesilmiş görüntüleri kesit alanında bulunacaktır. Buradan daha derine gidildikçe (3 nolu çizgi) yan duvarlarda bulunan villuslar artık görülemeyecektir. Alt kısımda bulunan villusların gövde kısımlarından kesit alınmaya başlanmış olacaktır. Dört numaralı çizginin işaret ettiği bölgenin kesilmesi halinde sadece kriptler kesit alanında bulunacaktır.



Şekil 3.3. Bağırsağın enine kesitinin genel histolojik görüntüsü. Kesikli siyah çizgi: Hayali olarak kesit alındığı varsayılan seviye.

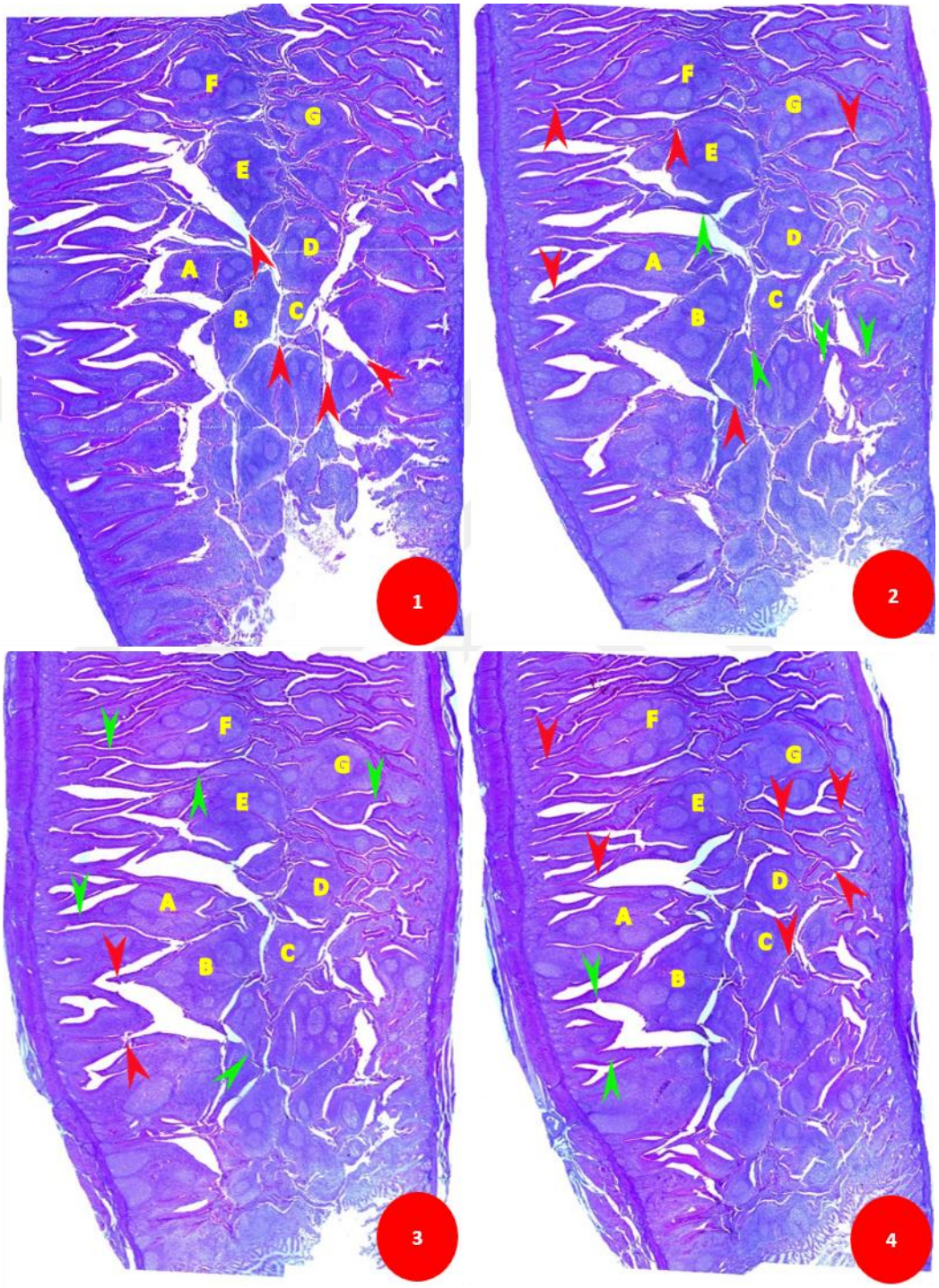
Şekil 3.4'de bulunan toplam on iki resim Şekil 3.3'de tarif edildiği gibi bağırsağın pilorik tonsil bölgesinden uzamına ve horizantal olarak alınmıştır. Bir numaralı resim tonsiler bölgenin orta kısmından alındıktan sonra onu takip eden diğer fotoğraflar ise belirli aralıklarla tabana doğru birbirinin devamı olan fotoğraflardır. On iki numaralı resim ise diğerlerine göre ilgili bölgenin en alt kısmını göstermektedir. Seri kesitlerde tarafımızca seçilen belirli alanların daha derine gidildikçe nasıl değişim gösterdiğinin net bir şekilde anlaşılması adına resimlerin üzerine o alanları belirtecek A'dan G'ye kadar harfler konulmuştur. Böyle alanların seçilmesinin nedeni bu belirlenen alanlar ile onların çevresindeki değişimleri takip ederek en önemli bulgularımızdan biri olan villus kaynaşmasını (füzyonunu) göstermektir. Resimlerdeki kırmızı ok başlarının işaret ettiği alanlar takip eden kesitlerde kaynaşmaların olacağı yerleri işaret etmektedir. Yeşil ok başları ise bir önceki resimde kırmızı ok başlarının işaret ettiği alanda kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğunu göstermektedir.

Bir nolu resimde açıklayıcı olması ve ilerleyen kesitlerde lokal şekilsel değişimi gösterecek toplam 7 farklı alan harflerle işaretlenmiştir. Ayrıca aynı resimde gösterilen toplam dört adet kırmızı ok başlarının işaret ettiği alanlar daha önce belirtildiği gibi sonraki kesitlerde villusların bu noktalardan birbirleriyle kaynaşacağını göstermek için kullanılmıştır.

İki numaralı resime bakıldığında bu kaynaşmaların gerçekleştiği yerler yeşil renkli ok başlarıyla gösterilmiştir. İlk resimde olduğu gibi bu ikinci resimde de aynı yedi farklı alandaki yapıların nasıl şekil değiştirdikleri gözlenmektedir. Bir önceki resime göre alanların daha büyük oldukları görülmektedir. İki numaralı resimde yeni beş farklı bölgeye kırmızı ok başı konulmuştur.

Üç nolu resime bakıldığında yeşil renkli ok başlarıyla artık bu noktalarda kaynaşmaların gerçekleşmiş olduğu gösterilmiştir. İlk iki resimde olduğu gibi üç nolu resimde de yedi alan bulunmakta ve iki adet kırmızı ok başı takip eden dört nolu resimde kaynaşmanın şekilleneceği alanlara işaret etmektedir. Üç nolu resimde A harfi

ile işaretlenmiş alandaki genişlemiş villusun bölgenin yan duvarına tamamen temas ettiği gözlenmektedir.



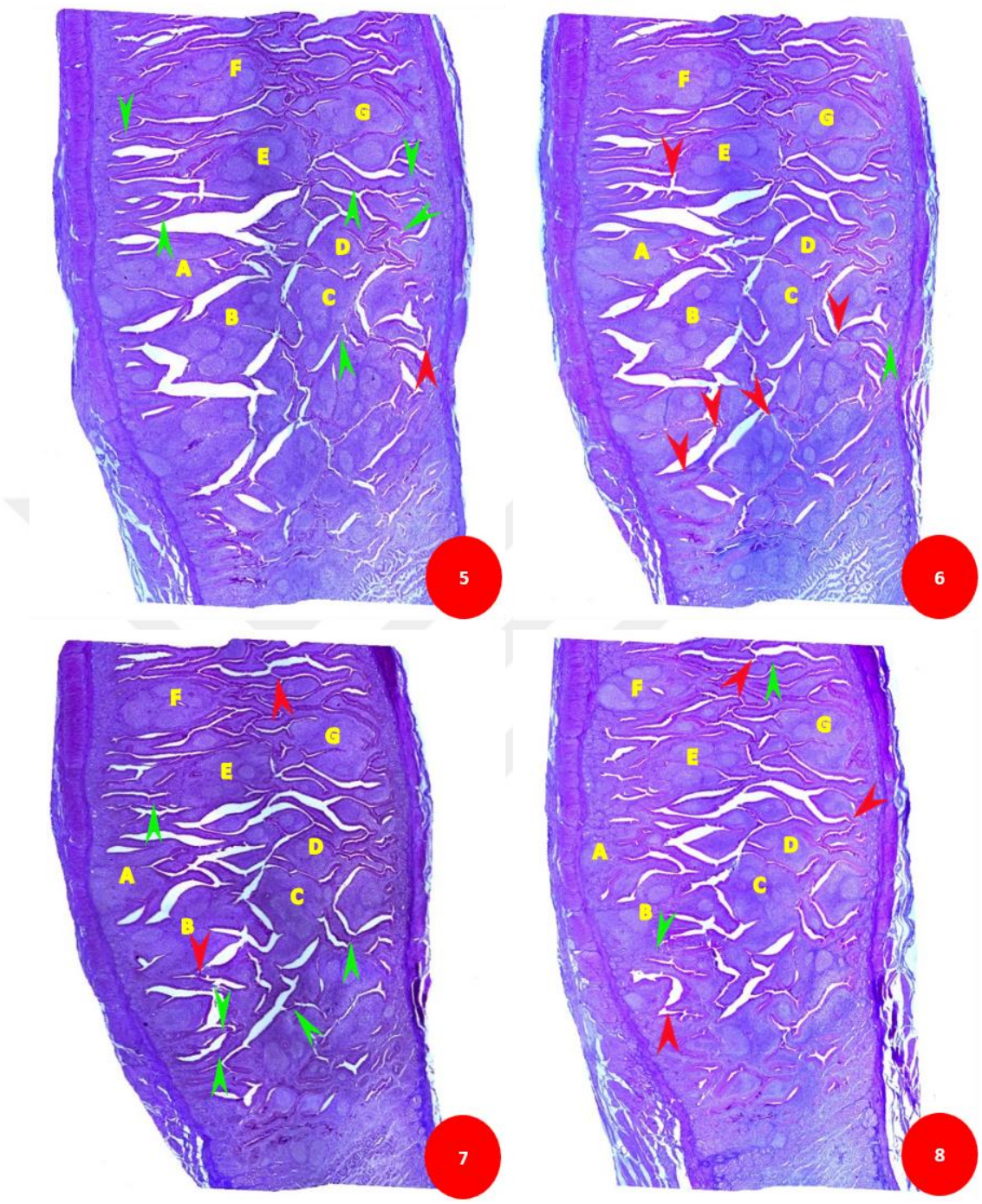
Şekil 3.4/1. Pilorik tonsil bölgesinin farklı seviyelerinden alınan ve birbirini takip eden kesitlerdeki değişimlerin genel görüntüleri. A-G: Farklı formlarda olan ve lenf folikülü içeren villus alanları. Kırmızı ok başı: İleriki kesitlerde kaynaşacak noktaların gösterimi. Yeşil renkli ok başı: Kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu noktaların gösterimi. X50.

Dört numaralı resimde hala harflerle işaretli alanların tamamı mevcut olup kaynaşmaya aday yeni altı adet farklı nokta (kırmızı ok başı) görülmektedir. Burada B harfiyle gösterilen alanın yan duvarla kaynaşmış olduğu ve E harfi ile gösterilen alanın da aynı şekilde kaynaştığı saptanmıştır.

Önceki resimlere göre daha alt kısımdan alınmış olan beş numaralı resimde daha önce ifade edilen ve harfle gösterilen alanların çok daha genişlemiş olduğu görülmektedir. Bu resimde altı farklı kaynaşma noktası ve bir adet daha sonra şekillenecek bağlanma bölgesi vardır. Buna ilave olarak burada F harfi ile gösterilen alanın yan duvar ile neredeyse tamamen kaynaşmış olduğu görülmektedir.

Altı nolu resimde ise beş adet kırmızı ve bir adet yeşil ok başı ile ilgili alanlar işaretlenmiştir. Takip eden yedi nolu resimde iki adet kaynaşmaya aday nokta ve beş adet kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu nokta gözlemlenmektedir. Bu resimden itibaren C harfi ile belirtilen alanın ince bir kol ile de olsa yan duvar ile ikinci bağlantısı oluşturduğu ve F harfi ile gösterilen alanın küçülme eğilimi göstermeye başladığı belirlenmiştir.

8 nolu resimde harf ile ifade edilen tüm yerler hala mevcut olup 2 farklı kaynaşmanın gerçekleştiği ve ileride 3 farklı bağlanmanın da şekilleneceği yerler işaret edilmiştir. 9 numara ile kodlanan resimden itibaren ise ilk sekiz resimde çok sayıda olduğu farkedilen büyük lenf foliküllerin sayısal olarak azalmış oldukları görülmektedir. Bunun sebebi ise artık derine inildikçe yani kriptlere yaklaşıldıkça foliküllerin villus içindeki sayısının ve hacminin kademeli olarak azalmasıdır. Aynı resimde A harfi ile gösterilen alan tamamen kaybolmuştur ve üç kaynaşmaya aday nokta ile üç kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu yer gösterilmiştir.



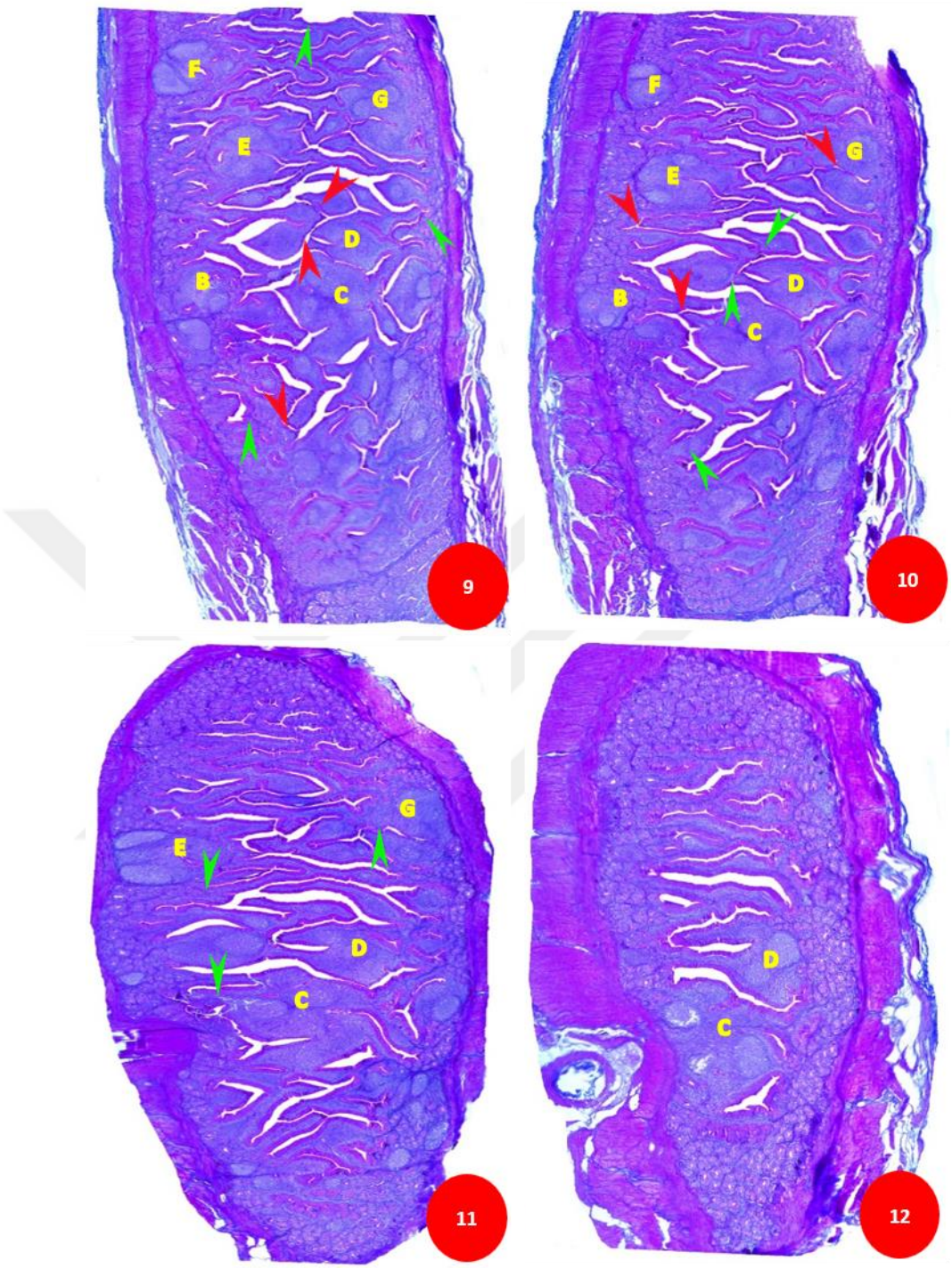
Şekil 3.4/2. Pilorik tonsil bölgesinin farklı seviyelerinden alınan ve birbirini takip eden kesitlerdeki değişimlerin genel görüntüleri. A-G: Farklı formlarda olan ve lenf folikülü içeren villus alanları. Kırmızı ok başı: İleriki kesitlerde kaynaşacak noktaların gösterimi. Yeşil renkli ok başı: Kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu noktaların gösterimi. X50.

10 numaralı resimde üç kırmızı ok başı kullanılırken, kaynaşmanın gösterildiği üç nokta yeşil ok başları ile işaretlenmiştir. Dokuz numaralı resimde varlığı biten A harfli bölgenin yerinde bu resimde kriptler yer almaktadır.

On bir nolu resimde ise tabana yaklaştıkça geriye sadece C, D, E ve G nolu alanların kaldığı görülmektedir. Aynı resimde üç adet kaynaşma noktası tespit edilmiştir.

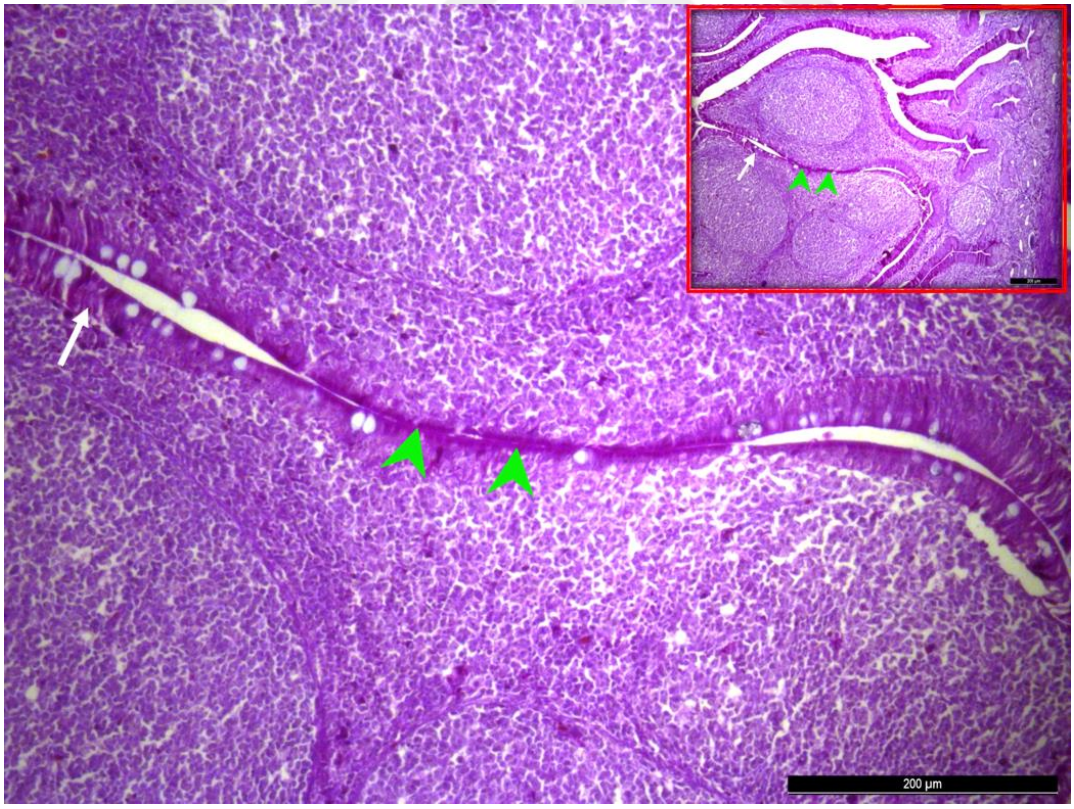
On ikinci resimde sadece C ve D harfiyle işaretlenen bölgelerin kesit alanında varlığını sürdürmekte olduğu ve diğer alanların küçülerek yok olduğu anlaşılmaktadır. 11 numaralı resimde yan taraflarda görülmeye başlanan kriptlerin on iki nolu resimde daha fazla arttığı rahatlıkla gözlenmektedir. Bu resimde lenf folikülleri bittiği halde villusların tabanda hala bir uçtan diğer uca kadar birbirleriyle ilişkili olduğu görülmektedir.

Alınan yüzlerce kesitten elde edilen resimler topluca değerlendirildiğinde, villuslar arasında gerçekleşen bu kaynaşmalar sonucunda, villusların birbirleri ile sürekli iletişimde olmalarını sağlayan özel bir ağ şekillendirmiş oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 3.4/3. Pilorik tonsil bölgesinin farklı seviyelerinden alınan ve birbirini takip eden kesitlerdeki değişimlerin genel görüntüleri. A-G: Farklı formlarda olan ve lenf folikülü içeren villus alanları. Kırmızı ok başı: İleriki kesitlerde kaynaşacak noktaların gösterimi. Yeşil renkli ok başı: Kaynaşmanın gerçekleşmiş olduğu noktaların gösterimi. X50.

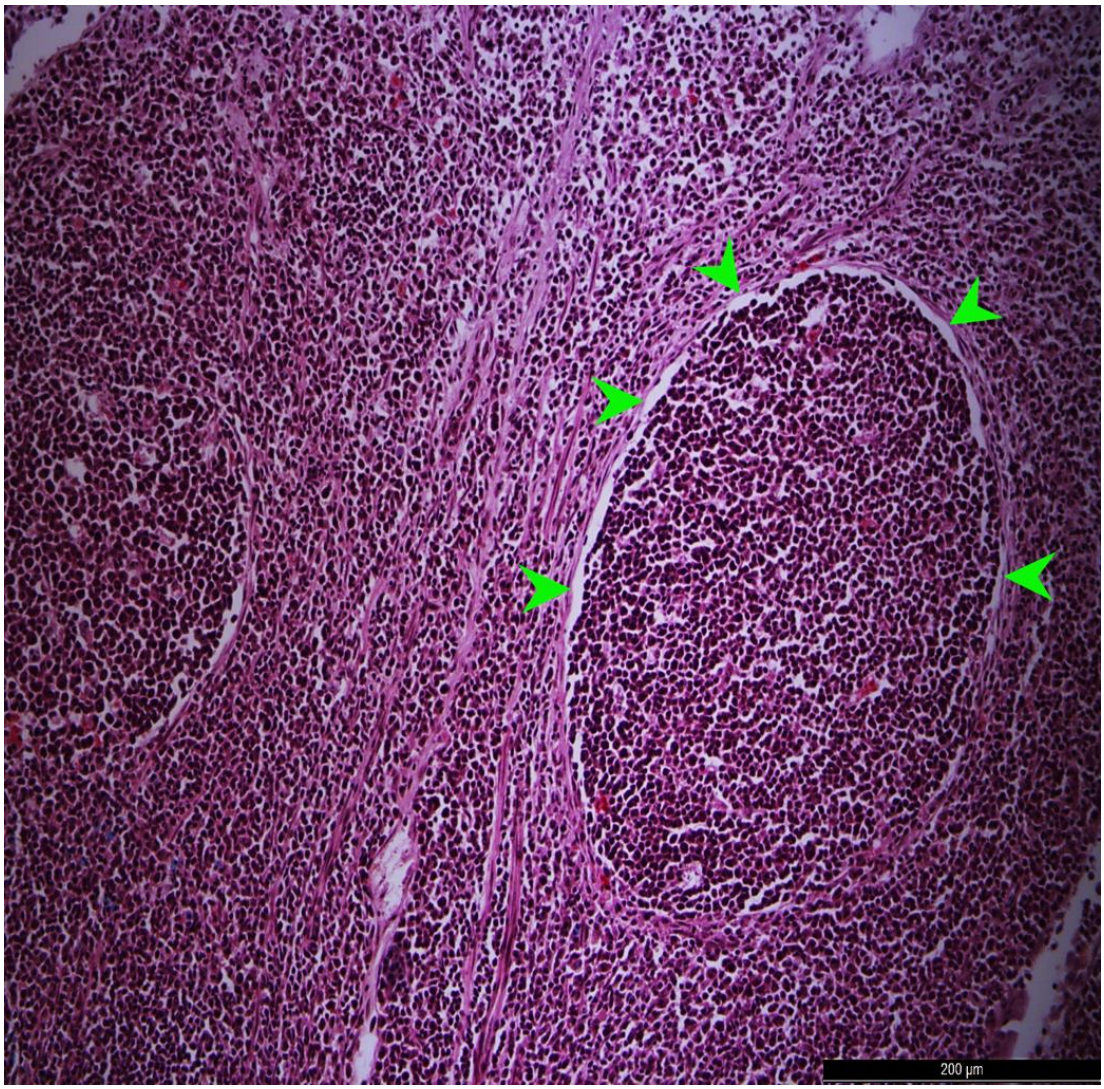
Bu çalışmanın bir diğer bulgusu ise lenf folikülleri içeren villusları örten prizmatik epitelin yer yer incelerek lenfoepitelyuma dönüşmesidir. Bu lenfoepitelyum değişiminin villusun tüm uzunluğu boyunca değil bazı özel durumlarda ve çoğunlukla da epitelin karşı karşıya geldiği yerlerde meydana geldiği gözlemlenmiştir. Işık mikroskobik inceleme amaçlı 5-6µ kalınlığında alınan ve üçlü boyama uygulanan kesitlerde, bazı yerlerde villusu sınırlandıran epitelin temas bölgelerine doğru gittikçe transforme olduğu prizmatik hücrelerin boylarını kısaltarak gittikçe yassılaştıkları farkedilmiştir. Şekil 3.5'deki beyaz ok villusları sınırlandıran normal tek katlı prizmatik örtü epitelini gösterirken, yeşil ok başları lenfoepitelyuma doğru dönüşümün olduğu alana işaret etmekte ve bu bölgede epitel hücrelerinin yüksekliğinin gittikçe azaldığı gösterilmektedir. Ayrıca epitelin incelendiği bu alanda kadeh hücrelerinin varlığını hala sürdürdüğü saptanmıştır. Tek katlı prizmatik epitelden lenfoepitelyuma dönüşümün 1µ'luk kesitlerde daha detaylı sergilendiği resimler ileriki bölümlerde gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Villusların birbirlerine yaklaştıkları alanlarda yüzey epitelinde meydana gelen değişimin 100X (sağ üstteki küçük resim) ve 200X büyütmelerdeki görüntüleri. Beyaz ok: Villusların yüzeyini örten tek katlı prizmatik epitel. Yeşil ok başı: Lenfoepitelyum bölgesi.

3.1.2. Safranin O Boyama Bulguları:

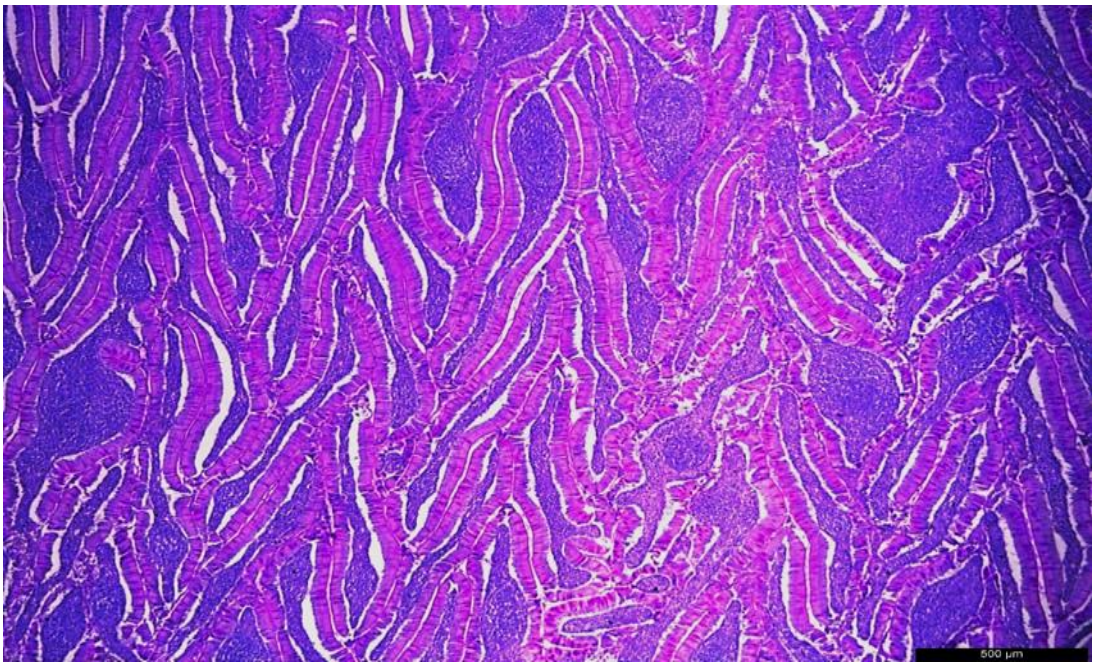
Safranin O boyası uygulanan kesitlerde net bir şekilde germinal merkezlerin etrafında açık kırmızı renkte boyanan bir bağdoku kapsülü gözlenmiştir (Şekil 3.6). Benzer şekilde Şekil 3.2'de de foliküllerin etrafındaki kapsülün varlığına (yeşil ok başı) işaret edilmiştir.



Şekil 3.6. Safranin O boyaması ile pilorik tonsilde foliküllerin etrafındaki kapsül kılıfın gösterimi. Yeşil ok başı: Lenf folikülünün etrafındaki kapsül. X200.

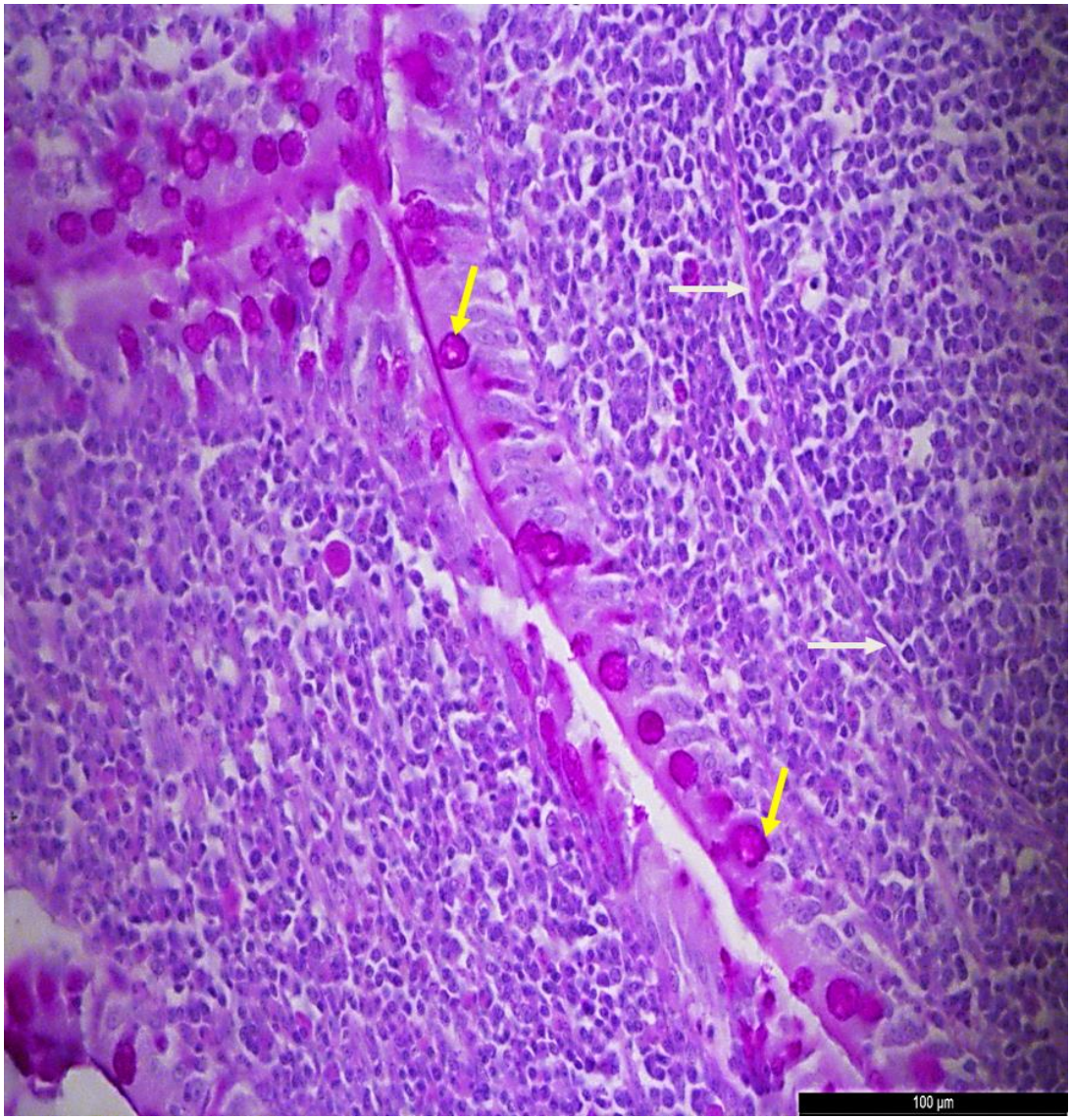
3.1.3. PAS Boyama Bulguları:

Duodenumun daha ileri kısmına gidildikçe villusların içinde lenf foliküllerinin hem sayısal hem de hacimsel olarak azaldığı, villuslar arası kaynaşmaların bittiği ve bölgede villusları örten epitelin bütünlüğü PAS boyaması uygulanmış genel bir alanda görülmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. PAS boyaması ile pilorik tonsil bölgesinin biraz ilerisindeki alanda villusların genel durumu ve bazı villuslarda oldukça küçülmüş lenf foliküllerinin gösterilmesi. X50.

Şekil 3.8'de ise daha büyük büyütmede PAS boyaması ile lenf foliküllerinin bulunduğu villuslar ve onları örten epitel katmanında pembe renkte boyanan kadeh hücreleri görülmektedir. Safranin O ile pozitif reaksiyon veren ve lenf folikülünün etrafında bulunan kapsülün PAS ile de boyandığı belirlenmiştir.



Şekil 3.8. PAS boyaması ile pilorik tonsil bölgesinin enine kesitinde PAS pozitif kadeh hücrelerinin (Sarı oklar) ve folikülün etrafındaki kapsülün (beyaz oklar) gösterilmesi. X400.

3.2. İmmunohistokimyasal Boyama Bulguları:

İmmunohistokimyasal boyamalar için kullanılan antikorlar ve bu antikorlar ile yapılan boyamalar sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1'de tablo haline getirilerek özetlenmiştir. Uygulama sonucunda bölgedeki T-lenfositlerin gösterimi için kullanılan Anti CD3 antikorlarından pAb anti- CD3ϵ klonu negatif sonuç verirken CD3 A0452 Dako klonu pozitif reaksiyon vermiştir. Bölgedeki B-lenfositlerin gösterilmesi amacıyla da iki farklı antikor kullanılmıştır. Bunlardan Anti CD79a-HM57 (NB100-64347) klonunun boyama sonucu negatifken, Anti CD268 BAFF-R

antibody (MCA6011GA) klonu pozitif reaksiyon vermiştir. Germinal merkezlerin etrafında var olduğu düşünülen Tip III kollajenin gösterimi için Collagen III Orb304041 klonu kullanılmış ve yapılan boyamalardan elde edilen bulgular ışığında reaksiyonun kısmi pozitif olduğu varsayılmış ve tabloya bu şekilde işlenmiştir. Foliküler dendritik hücre varlığını göstermek için Vimentin (RV202) OMA 1-06001 adlı antikorla yapılan boyamalardan pozitif sonuçlar alınırken M hücre benzeri hücrelerin ortaya konulması için uygulanan CK18 antikoru negatif sonuç vermiştir.

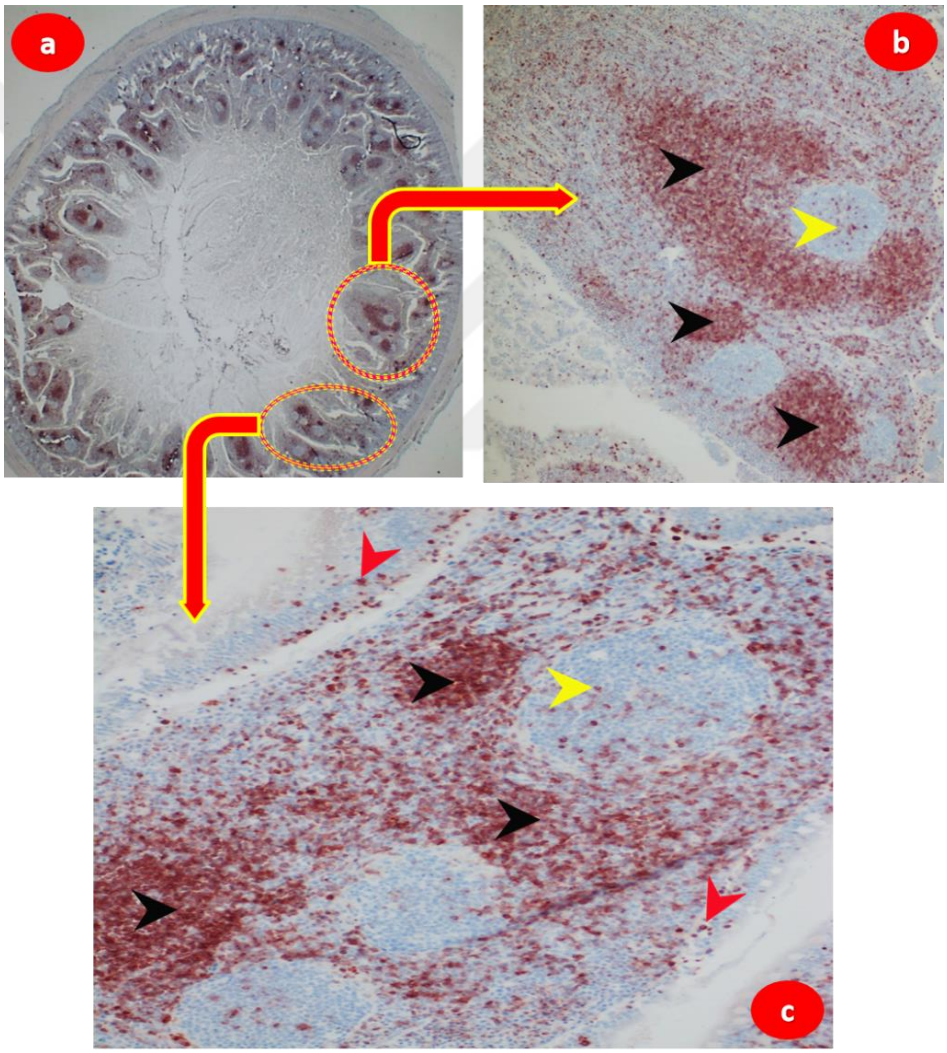
Çizelge 3.1. İmmunohistokimyasal boyama için seçilen antikorlar ve boyama sonuçları.

Antikorun adı	Klon adı	Sonuç
Anti-CD3	pAb anti- CD3ϵ (NB100-2000)	Negatif
Anti-CD3	CD3 A0452 Dako	Pozitif
Anti-CD79a	Anti CD79A-HM57 (NB100-64347)	Negatif
Anti-CD268	Anti CD268 BAFF-R antibody (MCA6011GA)	Pozitif
Anti-Collagen III	Orb304041	Kısmi pozitif
Anti-Vimentin (RV202)	OMA 1-06001	Pozitif
Anti-CK18	Anti Sitokeratin18 (NBP1-97715)	Negatif

3.2.1. T-Lenfositlerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular:

Pilorik tonsil bölgesinde var olan T-lenfositlerin ortaya konulması amacıyla iki farklı antikor kullanılmıştır. Bunlardan Anti CD3ϵ antikoru ile yapılan boyamalardan olumsuz sonuçlar elde edilirken aynı antikorun farklı bir klonu olan A0452 Dako ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak bölgedeki T-lenfositlerin CD3ϵ eksprese etmiyor olabilecekleri düşünülmektedir. Şekil 3.9 a karesinde pilorik tonsil bölgesinin enine kesitine ait olan genel görüntü gösterilmiş olup burada lenf

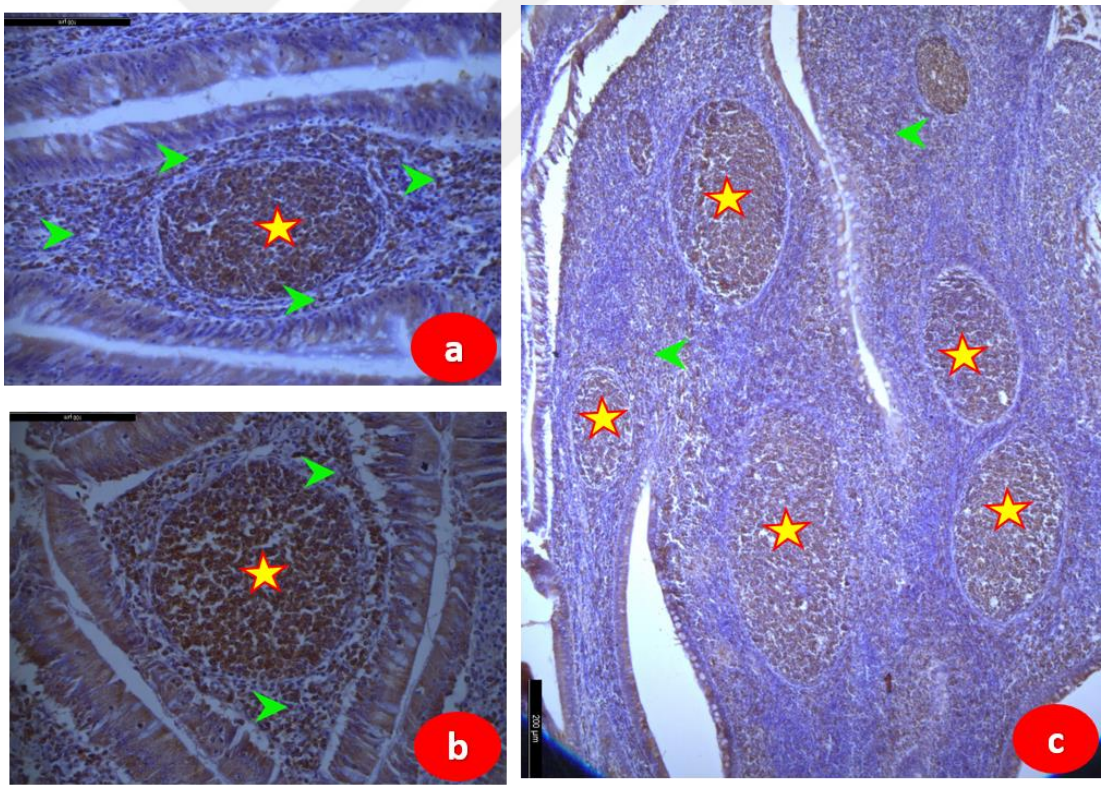
foliküllerinin, bulgularımızın giriş kısmında belirtildiği gibi belirli bir alanda değil tüm bağırsak duvarı boyunca halka şeklinde lokalize olduğu görülmektedir. Aynı kesitin farklı alanlarından büyütülerek elde edilen b ve c karelerinde siyah ok başları interfoliküler alanda, sarı ok başları ise germinal merkezde pozitif reaksiyon veren T-lenfositleri göstermektedir. Burada T-lenfositlerin interfoliküler alanda çok yoğun olarak bulunmasına karşın germinal merkezlerde çok az sayıda olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca şeklin c karesinde intraepitelyal alanda CD3+ T-lenfositlere (kırmızı ok başı) rastlanılmıştır.



Şekil 3.9. CD3 antikoru ile boyama sonucunda aynı kesitte farklı bölgelerde ve değişik büyütmelerde pozitif reaksiyonun gösterilmesi. (a): Pilorik tonsil bölgesinin genel görüntüsü (12,5X); (b): a karesindeki belirli bir alanın 100X büyütmesi; (c): a karesindeki belirli bir alanın 200X büyütmesi. Siyah, kırmızı ve sarı ok başları: Farklı bölgelerdeki CD3 pozitif T-lenfositler.

3.2.2. B-Lenfositlerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular:

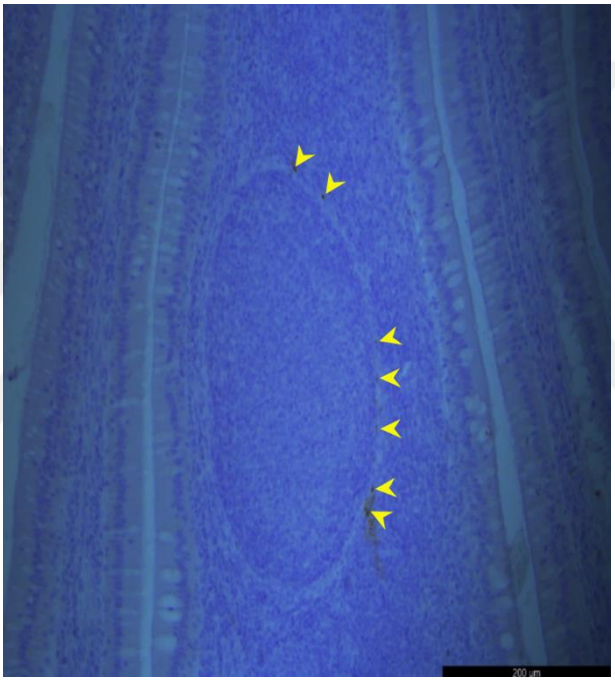
Lenf foliküllerindeki B-lenfositleri göstermek için kullanılan CD79A antikoru ile yapılan boyama denemelerinden negatif sonuç alınmıştır. Bu amaçla farklı bir antikorun temini yoluna gidilerek CD268 antikoru kullanılmış ve B-lenfositlerin bölgedeki varlıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Şekil 3.10'da yapılan boyama sonucunda CD3 eksprese eden T-lenfositlerden farklı olarak CD268 antijeni eksprese eden periferal B-lenfositler en çok folikülün germinal merkezinde (sarı renkli yıldız) gözlenmiştir. Bu B-lenfositlere, T-lenfositlerin bol miktarda bulunduğu interfoliküler alanlarda da (yeşil ok başı) rastlanılmıştır. Aynı resmin hem a hem de b karelerinde B-lenfositlerin subepitelyal bölgedeki varlığı (yeşil ok başı) gösterilmiştir. C karesi ise hem folikül içerisinde hem de interfoliküler alandaki B-lenfositleri göstermektedir.



Şekil 3.10. CD268 antikoru ile pozitif reaksiyonun üç farklı alanda ve değişik büyütmelerde gösterilmesi. Sarı renkli yıldız: Lenf folikülü içerisindeki pozitif B-lenfositler. Yeşil ok başları: İnterfoliküler ve subepitelyal bölgedeki pozitif B-lenfositler. Resim a ve b: X400, Resim c: X100.

3.2.3. Tip III Collagenin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular:

Lenf foliküllerinin etrafındaki Tip III kollajenin gösterimi için Anti-Collagen III antikoru ile yapılan boyamada resimde görüldüğü üzere sarı ok başları folikülün etrafında tam olmayan ve genellikle bir iki sıra halinde gözlemlenen ve pozitif reaksiyonlar veren hücreleri işaret etmektedir (Şekil 3.11). Elde edilen bu sonuç doyurucu nitelikte olmadığı için tabloda kısmi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

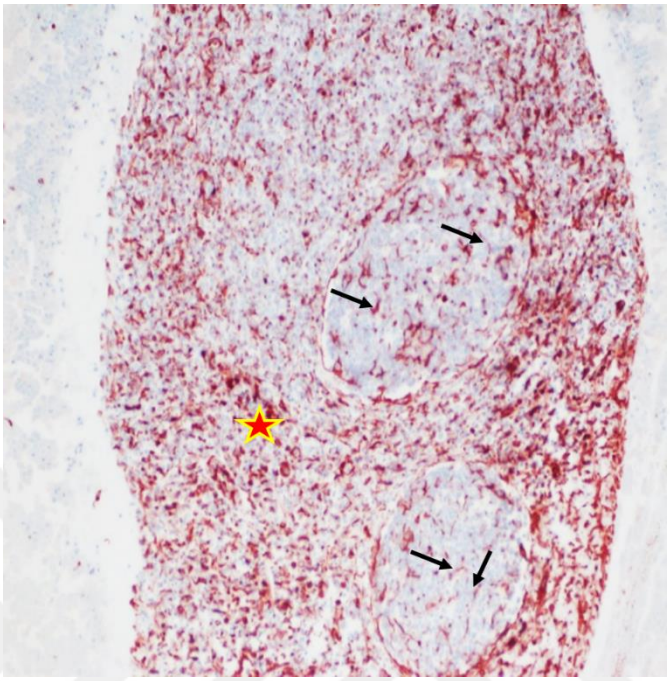


Şekil 3.11. Collagen III antikoru ile boyama sonucu Collagen III pozitif hücrelerin (sarı ok başı) gösterilmesi. X200.

3.2.4. Foliküler Dendritik Hücrelerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular:

Vimentin antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamanın sonucunda foliküllerin içerisinde bulunan ve antijen sunan bir hücre olan foliküler dendritik hücrelerin (siyah oklar) boyandığı gözlenmiştir (Şekil 3.12). Benzer şekilde folikülün dış kısmında bulunan diğer bazı hücrelerde de (kırmızı renkli yıldız) reaksiyon

gözlenmiştir. Bunun nedeni olarakta vimentinin hücre iskeletinin temel elemanlarından birisi olması şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 3.12. Vimentin (RV202) antikoru ile boyama sonucunda pozitif reaksiyonun gösterilmesi. Siyah ok: Folikül içindeki Vimentin (RV202) pozitif foliküler dendritik hücre. Kırmızı renkli yıldız: Vimentin (RV202) pozitif diğer hücreler. X200.

3.2.5. M Hücresi Benzeri Hücrelerin Gösterimi Amaçlı Yapılan İmmunohistokimyasal Boyamadan Elde Edilen Bulgular:

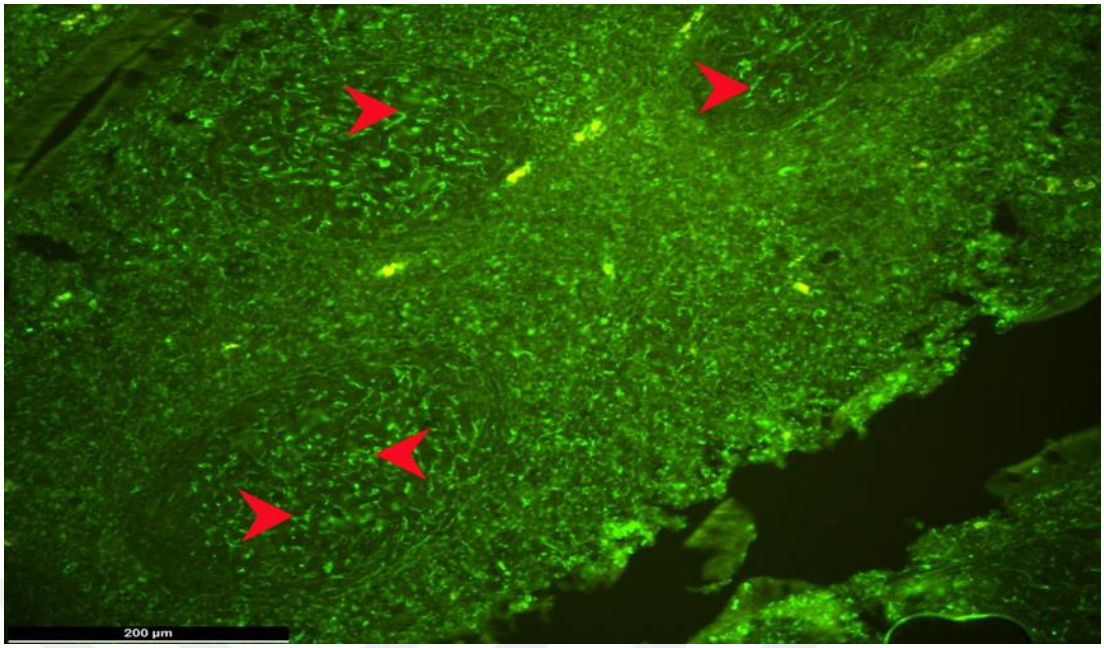
Bu boyamanın temel yapılma amacı lenfoepitelyumda olması beklenen M hücresi benzeri hücrelerin ilgili antijeni eksprese edip etmediklerinin ortaya konulabilmesidir. Bu amaçla yapılan CK18 boyamasından da negatif sonuç alınmıştır. Bu sonuçlar antikorun hindilerde M hücresi benzeri hücrelerin varlığını göstermekte yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

3.3. İmmunofloresan Boyama Bulguları:

İmmunofloresans boyama denemelerinde Anti-CD3ϵ, Anti CD79A, Anti-Collagen III, Anti-Vimentin (RV202) ve Anti-CK18 antikorları kullanılmıştır. Bunlar tıpkı immunohistokimyasal amaçlı boyamalarda olduğu gibi sırasıyla T-lenfosit, B-lenfosit, kollagen III varlığı, foliküler dendritik hücrelerin ortaya konulması ve M hücresi benzeri hücreleri tespit etmek için seçilmiş ve boyamalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan boyama sonuçlarından elde edilen bulgular ile kullanılan antikorlar ve klonları Çizelge 3.2'de özetlenmiştir. Bu tabloya göre sadece vimentin antikoru ile yapılan immunufloresans denemelerinden pozitif reaksiyon alınmıştır. Şekil 3.13'de folikülün içerisindeki foliküler dendritik hücreler yeşil renkli pozitif reaksiyon (kırmızı ok başları) vermiştir.

Çizelge 3.2. İmmunofloresans boyamada kullanılan antikorlar ve elde edilen sonuçları gösteren tablo.

Antikorun adı	Klon adı	Sonuç
Anti-CD3	pAb anti- CD3ϵ (NB100-2000)	Negatif
Anti-CD79A	Anti CD79A-HM57 (NB100-64347)	Negatif
Anti-Collagen III	Orb304041	Negatif
Anti-Vimentin (RV202)	OMA 1-06001	Pozitif
Anti-CK18	Anti Sitokeratin 18 (NBP1-97715)	Negatif

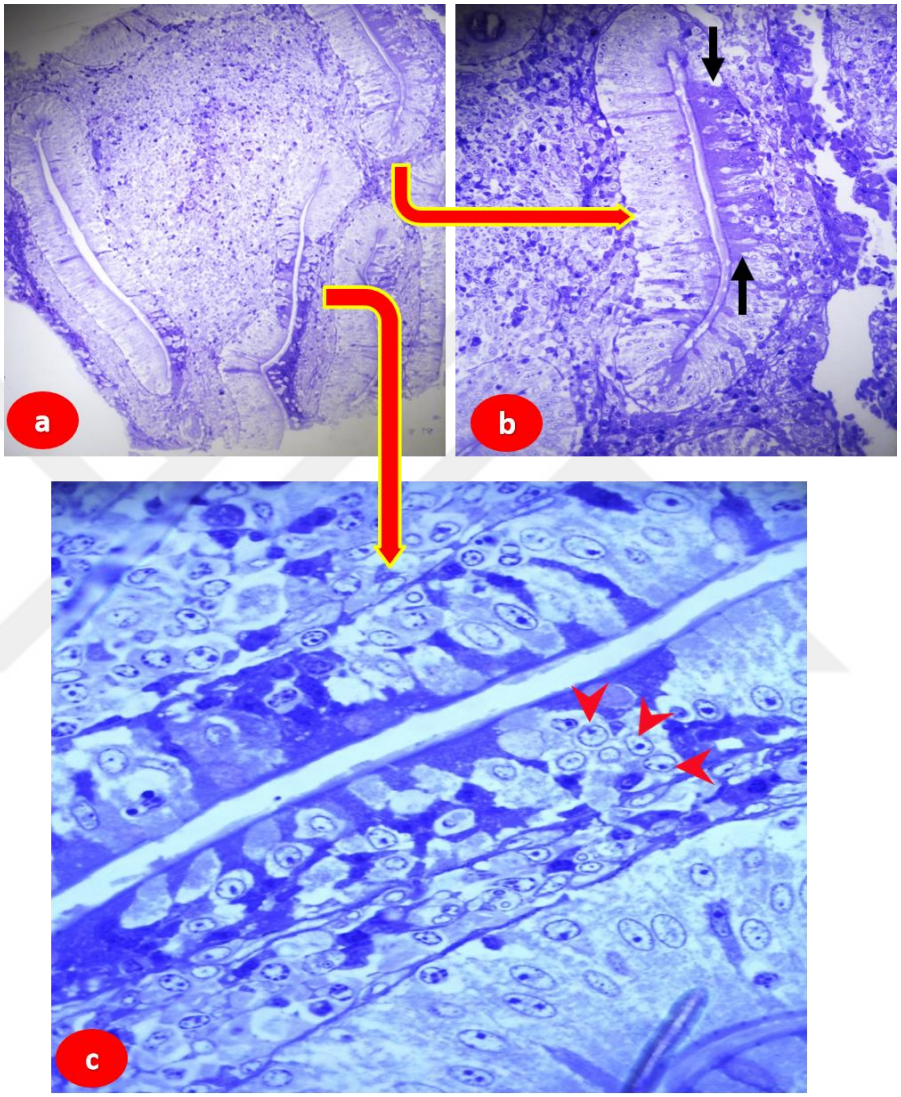


Şekil 3.13. İmmunofloresan boyama ile Vimentin (RV202) pozitif reaksiyonun gösterilmesi. Kırmızı ok başı: Vimentin (RV202) pozitif foliküler dendritik hücre. X200.

3.4. Yarı İnce Kesitlerden Elde Edilen Bulgular:

Toluidine blue ile boyanmış olan yarı ince kesitlerde lenfoepitelyuma dönüşümün varlığı çeşitli büyütmelerle ortaya konulmuştur (Şekil 3.14). Şeklin a karesinde 200X büyütmede prizmatik epitelden lenfoepitelyuma dönüşümün hem hazırlık aşaması hem de gerçekleşmiş olduğu yerler aynı fotoğraf alanında gösterilmektedir. Şeklin b karesinde de normal tek katlı prizmatik epitel ile aynı boyda olup lenfoepitelyuma dönüşme hazırlığında olduğu düşünülen mavi renge boyanmış bir grup prizmatik hücre görülmektedir. Bu epitel hücrelerinin renginin beyazdan maviye dönmüş olması (karşılıklı iki siyah ok arası) bu hücrelerin önce fonksiyonel karakterini değiştirip daha sonra boylarını kısaltma yoluna gittikleri şeklinde yorumlanmıştır. Daha önce üçlü boyama ile gösterdiğimiz (Şekil 3.5) boyu kısalarak yassılaşmış epitel hücrelerinin durumu benzer bir alanda 1µ'luk kesitlerle daha detaylı olarak şeklin c karesinde 1000X büyütme ile gösterilmiştir. Bölgede bulunan lenfoepitelyumun kendisi ve bu lenfoepitelyumun bir komponenti olup buraya göç eden lenfositlerin paketlenmiş halde epitel içinde oldukları görülmektedir. Bu hücreler resimde kırmızı ok başları ile gösterilmiş ve sayılarının yaklaşık 5-6'ya kadar ulaştığı

belirlenmiştir. Villusların uygun yerlerindeki bazı bölgelerde yarı ince kesitlerde net görülen bu şekildeki hücre dizaynı lenfositlerin üzerinde yer alan ve lümenden antijenleri alıp bunlara ileten M hücre benzeri hücrelerin var olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3.14. Toluidine blue boyaması ile yarı ince kesitte lenfoepitelyumun gösterimi.
(a): Bölgenin genel görüntüsü (200X); (b): a karesindeki belirli bir alanın 400X büyütmesi;
(c): a karesindeki belirli bir alanın 1000X büyütmesi. Kırmızı ok başı: Lenfosit. Siyah ok: Mavi renkli boyanan epitel hücrelerinin gösterildiği alan.

4. TARTIŞMA:

Memelilerde bulunmayan ancak kanatlılarda duodenumun giriş bölgesinde yer alan ve lenf damarları yoluyla kana geçerek tüm vücuda dağılabilecek patojen etkenlerle mücadele ettiği varsayılan pilorik tonsilin varlığı ve histolojik yapısı araştırmacılar tarafından ilk olarak tavuklarda ortaya konulmuştur (Casteleyn ve ark., 2010 ve Nagy ve Oláh, 2007). Tavuklarda bu yapının keşfedilmesinden sonra diğer kanatlı hayvanlarda bu yapının benzer olup olmadığı merak konusu olmuştur. Ördek (Gedam ve ark., 2018) ve kınalı kekliklerde (Arugh ve Hamedi, 2019) benzer çalışmalar yapılmış ve pilorik tonsilin bu kanatlı türlerinde yapısı ortaya konulmuştur. Tarafımızca yapılan literatür taramasında hindilerde bu bölgenin histolojik yapısı ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Mevcut çalışma ile hindilerde pilorik tonsil bölgesi olarak işaret edilen kısmın histolojik yapısı ortaya konulmuş ve bu alanda yapılmış sınırlı literatür verileriyle tartışılmıştır.

Yukarıda sözü edilen bu yapının içindeki lenfoid dokunun lokal yerleşimi ile dağılımını tanımlamak ve daha iyi anlamak için memelilerin sindirim kanalının bir parçası olan ileumdaki lenf foliküllerinin lokalizasyonu ile karşılaştırıldığında, farklı olarak tüm kanal duvar boyunca çepeçevre yerleşim gösterdiği bildirilmiştir. Başka bir ifadeyle ileum ve sekumdaki lenf folikülleri anti mezenteriyel bölgede bulunurken (Oláh ve ark., 2014), pilorik tonsildeki 15-20 adet olan ve lenf foliküllerinden oluşan bu tonsiler ünitelere bağırsağın hem üst hem de alt duvarında yani halka şeklinde dağılım gösterdiği ifade edilmiştir (Nagy ve Oláh, 2007). Hindilerde bölgenin içinde yer alan lenfoid dokunun dağılımı ile ilgili bulgularımızla literatür bilgisi arasında paralellik görülmüştür.

Fonksiyon ve yapı yönünden ele alındığında sindirim ve solunum kanallarının çok sayıda yabancı antijenin giriş noktası olması nedeniyle adı geçen bölgelerde tonsiler yapıların bulunduğu belirtilmiştir (Casteleyn ve ark., 2010). Geleneksel histoloji ders kitapları tonsili mukoza katmanı içerisine yerleşmiş lenf folikülleri olarak tanımlamaktadır (Eurell and Frappier, 2006 ve Samuelson, 2007). Perry (1994),

yaptığı çalışmada tonsiler bölgede çok sayıda kör uçla sonlanan kriptlerden, onların yan dallarından ve bu kısımlarda bulunan lenfoid dokulardan bahsetmiştir. Oláh ve ark. (2003), ise tonsili yoğun lenfoid doku tarafından çevrelenmiş kript adı verilen çöküntüyü içeren kompleks bir yapı olarak ifade etmişlerdir. Sindirim kanalı boyunca lokal olarak yer alan tonsillerin şu ana kadar tanımlamalarında mide yüzeyi düzleminin devam ettiği hayal edilmiş ve sadece kript ve lamina muskularis seviyesinde lenfoid dokunun bulunabileceği düşünülmüştür. Casteleyn ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada özofageal, proventriküler, pilorik ve sekal tonsillerin hepsinde lenfoid dokulara düzlemin altında rastlanıldığı ifade edilmiştir. Yapılan bu çalışmadan alınan sonuçlarla pilorik tonsille ilgili mevcut literatürler karşılaştırılmış ve pilorik tonsil bölgesindeki lenfoid dokunun böyle bir yapılanması gözlenmemiştir. Aksine hindilerde pilorik tonsil bölgesindeki villuslar ve kriptlerin düzlemsel olarak normal bağırsak yapısındaki gibi çıkıntı ve girinti şeklinde olduğu saptanmıştır. Ancak savunmada görevli lenf foliküllerinin çoğunlukla kriptler seviyesinde değil, villusun içinde değişik seviyelerinde bulunduğu ve bu lenf foliküllerinin de bulundukları her villusta hacimsel olarak artışa ve şekil değişikliğine neden olduğu görülmüştür. Bu durum mevcut literatürle elde ettiğimiz bulgular arasındaki temel farklılıklardan biri olmuştur.

Yukarıda ifade edilen durum gözden geçirildiğinde mevcut literatürlerde yaygın bir şekilde kullanılan tonsil teriminin hindilerde bulunan pilorik bölgedeki yapıyı tanımlamakta yetersiz olduğu açıktır. Bu yapının üç boyutlu mikroanatomik durumu ile histolojik bulguları göz önünde bulundurulduğunda yeniden tanımlanmaya ihtiyacı olduğu ve lenfoid dokuyu şekillendiren lenf foliküllerinin de mevcut literatür bilgisinden farklı olarak villus içerisinde bulunmasından dolayı İntra Villöz Lenfoid Doku (İVLD) tanımının hindilerdeki bu bölgeyi daha iyi tanımlayacağı düşünülmüştür.

Nagy ve Oláh (2007), Lieberkühn kriptlerinin lenfoepitelyal tonsiler kriptlere dönüştüğünü ve bu alandaki lamina propriya katmanında primer ve sekonder lenfoid foliküller ile interfoliküler bölgeler bulunduğunu belirtirken, Gedam ve ark. (2018), submukoza ve hatta lamina muskularis katmanında lenf foliküllerinin bulunduğunu

ifade etmişlerdir. Ancak yapılan bu çalışmada geçişin olduğu ilk kısım hariç ne kriptler seviyesinde ne lamina muskularis bölgesinde ne de submukozada böyle bir lenf folikülü yerleşimi gözlenmemiştir. Miktar olarak lenf folikülleri 1-2 adet olduğunda villusların çoğunlukla orta kısımlarında, daha fazla olduğunda tabandan uca kadar yayılabildiği saptanmıştır. Mevcut literatürden (Casteleyn ve ark., 2010; Nagy ve Oláh, 2007; Gedam ve ark., 2018 ve Arugh ve Hamedi, 2019) farklı olarak elde edilen diğer bir bulgu ise çeşitli büyüklüklerdeki lenf foliküllerinin varlığı ve bazen tek bir villusun içerisinde 5-6 lenf folikülünün olması nedeniyle çok fazla genişleme kapasitesinin olduğunun ortaya konmasıdır.

Bulgularımızdan elde ettiğimiz bir diğer yenilik ise mevcut literatürde bulunmayan villus kaynaşması (füzyonu) olgusudur. Çok sayıda seri kesit alınıp incelenmesi sayesinde aşama aşama villuslar arasında yakınlaşma ve kaynaşma yerleri ortaya konulabilmiştir. Özellikle devam eden horizantal kesitlere bakıldığında rahatlıkla villusların belli noktalardan ya da seviyelerden bir ağ yapacak şekilde birbirleriyle birleştiklerini görebilmekteyiz. Villus füzyonu sonucu şekillenen bu ağ şeklindeki yapısal organizasyonu değişik formlarda olan yüksek binaların yer seviyesinde değil de farklı irtifalarda birbiriyle bağlantılar sayesinde geçişlerin mümkün olmasına benzetilirse, villuslar arasındaki bu bağlantıların varlığının immunolojik yönden katkısının çok büyük olabileceği düşünülmektedir. Buna göre bağlantılar sayesinde şekillenen ağ ile bir villusta aktive olan antijen sunan hücrelerin patojen mikroorganizma ile ilgili bilgiyi aldıktan sonra diğer villuslara kolay bir şekilde geçiş yapabileceği ve gittiği yerde bulunan immun sistem hücrelerini uyararak kısa zamanda etkili bir immun yanıt oluşturabileceğini söylemek yanlış olmayacaktır. Benzer bir başka yaklaşım ise yoğun patojen girişi olan belirli bir bölgeye bu bağlantılar sayesinde komşu villuslardan immun sistem hücrelerinin takviye edilerek hızlı bir immun yanıtının ortaya konulabileceği varsayımıdır. Bu çalışmanın bir diğer bulgusu da duodenumun daha ilerisine gidildikçe villus içinde küçük lenf folikülleri bulunsa bile yukarıda ifade edilen villuslar arasındaki kaynaşmanın görülmemesi ve füzyonun sadece geçiş bölgesine özgü olduğunun gösterilmesidir.

Lenf foliküllerinin ovoid veya sirküler şekilli germinal merkezlerin çoğunun bağırsağın lamina muskularis katmanına yakın yerleşim gösterdiği ve foliküllerin etrafında tip III kollagenden meydan gelen kapsülün lamina muskularis katmanına ait olan bağ doku kapsülü ile kaynaştığı ifade edilmiştir (Nagy ve Oláh, 2007). Mevcut çalışmada lenf foliküllerinin yerleşimindeki farklılığa bağlı olarak böyle bir ilişkiye rastlanılmamıştır. Ancak Nagy ve Oláh (2007), ile Gedam ve ark. (2018),'nın yaptıkları çalışmalar ile uyumlu olarak germinal merkezlerin bulundukarı yerde her birinin kendine ait kapsülle sınırlandırıldığı ve birbirleriyle dahi kaynaşmadıkları saptanmıştır.

Literatürde Peyer plakları ve Meckel divertikülü gibi organize lenfoid dokuları örten epitelin, villuslar ile intestinal bezler olarak da adlandırılan kriptleri sınırlandıran epitelden oldukça farklı olduğu belirtilmiştir. Bu epitelin düzensiz mikrovilluslar, çok sayıda apikal tübüller, veziküller, vakuoller ve yoğun sitoplazma ile karakterize olduğu ve epitel katmanının daha yassılaşmış olup arada mukus üreten kadeh hücrelerini içermediği beyan edilmiştir (Bockman ve Cooper, 1973 ve Burns, 1982). Ancak yapılan bu çalışmada ışık mikroskop düzeyinde özellikle büyük lenf foliküllerini içeren villusların bazı bölgelerinde epitelin inceldiği ve az sayıda da olsa kadeh hücresi içerdiği saptanmıştır. Bu durum yukarıda ifade edilen literatür bulgularından farklıdır.

Mason ve ark. (1995), memelilerde öncü B-lenfositlerde plazma hücresine dönüşüme kadar olan farklılaşma sürecinin tüm aşamalarındaki B-lenfositlerin CD79A antijenini eksprese ettiklerini ortaya koymuşlardır. Bu reseptörün hindilerde eksprese edilip edilmediğinin ortaya konması için kesitlere anti CD79A antikoru ile immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulanmış ve bu denemelerden alınan negatif sonuçlarla hindi pilorik tonsilinde bulunan B-lenfositlerin ilgili reseptörü sentezlemedikleri ortaya konulmuştur. Daha sonra bölgede bulunan B-lenfosit popülasyonunun varlığının gösterilmesi için periferal B-lenfositler tarafından eksprese edilen CD268 antijenine (Reddy ve ark., 2008) karşı yaptığımız antikor boyaması sonucunda B-lenfositlerin germinal merkezlerde yoğun bir şekilde bulunduğu saptanmış olup bu durum genel literatür bilgisi ile uyumluluk göstermiştir. T-lenfosit

bölgesi olan interfoliküler alanlarda pozitif reaksiyon veren B-lenfositlerin az da olsa bulunması BALT dokusu çalışması (Fagerland ve Arp, 1993b) ve Ankara keçilerinin ileumu üzerine yapılan çalışmaya (Aştı ve ark., 2000) ait bulgularla parallelik arz etmektedir. Bu lenfositlere literatürle uyumlu olarak ayrıca intraepitelyal bölgede de rastlanılmıştır.

Harder bezi ile GALT'ın birer parçası olan sekal tonsiller ve peyer plaklarında T-lenfositlere bağlı interfoliküler bölgelerin varlığı daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Oláh, 2014). Sindirim kanalında bulunan ve GALT'ın bir parçası olan lenfoid dokularda, T-lenfositlerin genellikle interfoliküler boşluklarda birikme eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Cihak ve ark., 1991). Benzer bulgular peyer plaklarının interfoliküler bölgesinde de tespit edilerek hemen hemen tüm T-lenfositlerin TCRa pozitif olup bu hücrelerin çoğunun CD4 pozitif olduğu beyan edilmiştir. Aynı çalışmada kanatlı sindirim kanalının bir diğer lenfoid dokusu olan sekal tonsillerde de T-lenfositlerin interfoliküler alana yerleşme eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Bucy ve ark., 1988). Nagy ve Oláh (2007), ise CD3 pozitif T-lenfositlerin interfoliküler alanlarda yoğunlaştıklarını ve bu hücre tipinin germinal merkezde de önemli bir miktarda bulunduklarını ifade etmişlerdir. Hindilerde de CD3 pozitif T-lenfositlerin bölgedeki varlığı ve lokalizasyonu yapılan immunohistokimyasal boyama ile ortaya konulmuş ve literatür ile uyumlu benzer bulgular elde edilmiştir.

Gastrointestinal kanal boyunca mukoza katmanındaki epitel hücrelerinin arasına heterojen bir şekilde intraepitelyal lenfositlerin yerleştiği (Gartner ve Hiatt, 1997) ve bu hücrelerin lamina propriadan epitel katmanına göç eden lenfositler olduğu bildirilmiştir (Bäck, 1972a). Genellikle T-lenfositler epitel katına yerleşim gösterirken B-lenfositlerin çoğunlukla lamina propriyada kaldığı belirtilmiştir (Guy-Grand ve ark., 1991). Vervelde ve Jeurissen (1993), tarafından yapılan çalışmada lenfositlerin özofagusun çok katlı yassı epitelinde ve bağırsakların tek katlı prizmatik epitelinde oldukları tespit edilmiştir. CD3+ olan intraepitelyal hücrelerin ağırlıklı olarak CD8a+ hücreler olup çoğunun TCRγδ eksprese ettikleri belirtilmiştir (Bucy ve ark., 1988). Hindi pilorik tonsil kesitlerine uyguladığımız immunohistokimyasal boyama

sonucunda literatürle benzer şekilde CD3+ T-lenfositlerin epitel katmanında var olduğu ortaya konmuştur.

Lenf foliküllerinin germinal merkezinde bulunan foliküler dendritik hücreler çok sayıda ince sitoplazmik uzantılara sahiptir ve bu uzantılar B-lenfositlerin arasında bulunur. CD45 negatif olan bu hücrelerin yalnızca primer ve sekonder lenfoid folliküllerde bulunduğu ve fagositik aktivitesi olmayan bu dendritik hücre tipinin, antijenin yakalanmasında ve antikor ile birleşmesinde oldukça etkin bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Yeşilyurt ve Fidan, 2011). Tavuklarda pilorik tonsil bölgesini ilk defa ortaya koyan çalışmada (Nagy ve Oláh, 2007) Anti Vimentin boyaması ile germinal merkeze yerleşmiş olan foliküler dendritik hücrelerde vimentin ara filamanının varlığı ortaya konulmuştur. Ayrıca sitoplazmadan çıkan ve hücreye özgü olan dikensi uzantıların varlığı da teyit edilmiştir. Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak foliküler dendritik hücreler foliküllerin içerisinde tespit edilmiştir.

Nagy ve Oláh (2007), tavuklarda yaptıkları çalışmada retiküler ipliklerde var olan ve tonsiler birimlerde bulunduğu bildirilen Collagen III'ün pilorik tonsil bölgesindeki lenf foliküllerinin germinal merkezlerinin etrafında bulunduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmada hindilerin pilorik bölgesine ait lenf foliküllerinin etrafındaki Tip III kollajenin varlığının gösterilmesi amacıyla anti Collagen III antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda literatürlerle uyumlu olarak folikülün etrafında kapsül olduğu gözlemlenmiştir.

Tonsillerde kript boyunca lenfoepitelyum görülürken (Oláh ve ark., 2003), ileumda dom bölgesinde sadece kubbenin üstünde olduğu bildirilmiştir (Gebert ve ark.,1996 ve Kurtdede ve ark., 2000). Hindilerde yapılan bu çalışmada ise villusun lümenle ilişkide olan herhangi bir yerinde geniş veya dar bir alanda prizmatik epitelin lenfoepitelyuma dönüştüğü ve bu dönüşümün aşamalı şekilde gerçekleştiği Toluidine blue ile boyanan 1 µ'luk kesitlerde daha net gözlemlenmiştir.

Hondo ve ark. (2011), sığırlarda jejunal ve ileal bölgedeki foliküle ilişkili olan epitelde CK18 eksprese eden M hücrelerinin bulunduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise hindilerde pilorik tonsil bölgesindeki lenfoepitelyumda M hücrelerin varlığını göstermek için Anti-CK18 antikoru ile boyama denemeleri yapılmış ancak negatif reaksiyon alınmıştır. Ancak yarı ince kesitlerde birkaç lenfositi örten ve M hücresine benzer incelmiş hücrelerin varlığı tespit edildiğinden bu konuda elde edilen negatif sonuçların hindilerde bölgedeki M hücrelerini göstermede ilgili bu antikorun yetersiz olduğunu ve daha önce T ve B-lenfositlerin boyamalarında olduğu gibi hindilerde bu konuda da farklı bir özellik olabileceği akla geldiğinden, başka antikor klon denemelerinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak gerçekleştirilen bu çalışma ile literatürde kanatlıların savunmasıyla ilgili olduğu belirtilen, mide ile duodenum arasına lokalize olduğu, duodenum ile pilorustan yapısal olarak farklılık gösterdiği söylenen ve pilorik tonsil olarak adlandırılan alanın hindilerdeki durumu histolojik yöntemler kullanılarak ortaya konulmuştur. Hindilerde pilorik tonsil bölgesinin yapılmış çalışmaların aksine normal bağırsak yapısında olduğu görülmüş ve bu bölgenin temel komponenti olan lenf foliküllerinin literatürde iddia edildiği gibi kriptler hizasında veya daha altında bulunmadığı tespit edilmiştir. İnceleme sonucunda özel bir bulgu olarak da villusların içerisinde farklı sayıda ve çeşitli büyüklüklerde foliküller geliştiği ortaya konmuştur. Bu villuslardaki folikül sayısının villlusta hacimsel değişikliğe neden olduğu ve villusların değişik şekil ve büyüklükte görülmesine neden olduğu gözlenmiştir. Villus içinde bir veya iki adet folikül olduğunda bu foliküllerin villusun orta kısımlarında bulunduğu, daha fazla folikül olması halinde ise tabandan uç kısma doğru bir yerleşim gösterdiği saptanmıştır. Sadece bir villusun kesitinde bile 5-6 aktif folikül olabileceği de sergilenmiştir. Bu lenf foliküllerin yerleşimi göz önünde bulundurularak bölgeyi tanımlamak için kullanılan tonsil teriminin bu geçiş bölgesini açıklamakta ve adlandırmakta yetersiz kaldığı ve ilgili alan için pilorik tonsil yerine İntravillöz Lenfoid Doku (İVLD) teriminin kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda lenfoid dokunun kriptler arasında veya kriptlerin alt tarafında olduğunu ifade eden araştırmacıların (Casteleyn ve ark., 2010; Nagy ve Oláh, 2007 ve Gedam ve ark., 2018) bölgeden seri kesitler alıp inceleme yapmadıkları için yanılgıya düşmüş olabilecekleri sanılmaktadır. İlk bakışta lenfoid üniteler yüzey alanını artırmak için gerçekten de derin kriptlere sahipmiş gibi görülebilirler. Fakat seri kesitlerimize bakacak olursak tam geçiş bölgesi hariç aslında kriptler seviyesinde çoğunlukla gelişmiş bir lenfoid doku görülmeyip bazen yer yer lenfosit infiltrasyonlarına rastlanılmıştır. Yapılan bu çalışma ile lenfoid dokunun mevcut literatürden farklı olarak çoğunlukla villusların çeşitli seviyelerinde bulunduğu gösterilmiştir.

Seri kesitlerden elde edilen ve mevcut literatürde bulunmayan önemli bir diğer bulgu ise villus füzyonu olgusudur. Çalışmamaızda villusların belirli noktalardan birbirleriyle kaynaştığı tespit edilmiştir. Bu kontakt noktaları sayesinde villusların kendi aralarında dış etkilerden korunmuş ve kapalı devre gibi çalışan özel bir ağ oluşturdukları ortaya konulmuştur. Kaynaşma sonucu meydana gelen bu spesifik ağ sayesinde bölgeye çeşitli yollarla gelen patojenlere karşı hızlı ve daha etkili mücadele edebilmek için savunma sistemi hücrelerinin çok daha hızlı yer değiştirmeleri ve diğer hücrelerle kontakt kurabilmelerinin mümkün olabildiği düşünülmektedir. Bununla birlikte çalışmanın önemli bir diğer verisi ise villusların taban kısmına yakın yerlerde çoğunlukla içlerinde folikül bulundurmasalar da bir uçtan diğer uca kadar uzanır şekilde bağlantı halinde olduklarının tespitidir.

Çalışma sonucunda tek katlı prizmatik epitel ile örtülü villusların uygun yerlerinde epitelin lenfoepitelyuma dönüşümü hem üçlü boyama ile hem de yarı ince kesit toluidine blue boyamalarında gözlemlenmiştir. Özellikle yarı ince kesit görüntülerine bakıldığında lenfoepitelyuma dönüşecek olan tek katlı prizmatik epitelin farklı renk ile boyanmasından yola çıkılarak diğer epitel hücreleri ile aynı yükseklikteyken bu hücrelerin öncelikle fonksiyonel yönden karakter değiştirdiği ve daha sonra yassılaşma yoluna gittiği varsayılmaktadır. Boyları kısalmış ve lenfoepitelyuma dönüşmüş epitel hücrelerinin de aynı şekilde mavi renge boyandığı görülmüştür.

Yapılan immunohistokimyasal boyamalarla bölgenin lenfosit infiltrasyonundan ziyade gerçek bir lenfoid doku organizasyonuna sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bölgede hem T hem de B bağımlı alanların tespiti ile germinal merkezlerin etrafında var olduğu söylenen kapsül ve folikül içerisinde antijen sunan dendritik hücrelerin yerleşimleriyle ilgili elde edilen bulguların bu konudaki genel bilgilerle uygunluğu ortaya konulmuştur. Bu bilgilere ek olarak hindilerde pilorik tonsil bölgesi adı verilen alanda lenfoepitelyumun bir parçası olduğu kabul edilen M hücresi benzeri hücrelerin tespiti için kullanılan CK18 antikoru yerine farklı antikorların denenmesi gerektiği belirlenmiştir.

Elde edilen bulgularımız literatür bilgi birikimine katkı oluşturacak nitelikte olup bu konuda farkındalığı ortaya koymuştur. İleride kanatlılarda sindirim kanalının savunma mekanizması ile ilgili çalışma planlayacak araştırıcılar için kaynak veri oluşturacağını düşünüyoruz. Ayrıca diğer çalışmalardan farklı olarak ortaya konan villuslarda yer yer görülen füzyon olgusu, lenf foliküllerinin gelişimi nedeniyle villusların hacimsel artışı, özellikle villusların alt 1/3'lük bölümünde kriptlere yakın seviyede villusların birbiriyle hala ilişkili olduğu ve karşıdan karşıya uzanması gibi dikkat çeken yeni bulgulardan yola çıkarak bundan sonra hindilerin yumurtadan çıkmadan, yumurtadan yeni çıkmış, civciv, genç ve erişkin aşamalarından materyal alınarak bu bölgenin her yönüyle nasıl ve ne aşamada şekillenmeye başladığı ve ne zaman yapılanmanın son halini aldığının ortaya konmasına yönelik bir çalışma planlanmasının tamamlayıcı olacağı kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Hindilerde (*Meleagris gallopavo*) Pilorik Tonsil Bölgesi Üzerine Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar

Hayvansal gıdalar içerisinde kolesterol seviyesinin düşüklüğü, protein/kalori oranının yüksek olması ve içerdiği düşük sodyum miktarı ile insan sağlığı açısından önemli bir protein kaynağı olan ve tavuklara göre hastalıklara karşı daha az dirençli olan hindilerin savunma sisteminin araştırılması önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışma ile kanatlılardaki GALT'ın önemli bir parçası olan ve kanatlılarda pilorik tonsil olarak adlandırılan alanın hindilerdeki şekil ve yapısal özellikleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla çalışmada Ankara ilinde hindi yetiştiriciliği ve kesimi yapan işletmelerden 5 adet erkek 5 adet dişi olmak üzere toplam 10 adet erişkin hindi kullanılmıştır. Alınan bu materyallere %10 tamponlanmış formol, Bouin ve Maksimow tespit solüsyonları kullanılarak doku takip prosedürü gerçekleştirilmiştir. Dokuların bloklanması ve kesit alınması işlemlerinden sonra kesitler çeşitli boyalarla boyanarak incelenmiş ve tonsiler bölgenin histolojik yapısı ortaya konulmuştur.

İmmunolojik yönden fonksiyonel olduğu varsayılan bu yapının genel özelliklerini ortaya koymak için histokimyasal, immunohistokimyasal ve immunofloresan boyamalar uygulanmıştır. Pilorik tonsil bölgesinin genel histolojik yapısını gösterebilmek için Crossman'ın modifiye üçlü boyası kullanılırken, mukus sentezleyen kadeh hücrelerinin yoğunluğunu ortaya koymak adına PAS (Periyodik asit-Schiff), foliküllerin etrafındaki kapsülü belirleyebilmek amacıyla ise Safranin O boyaması yapılmıştır. Işık mikroskobik düzeyde bu geçiş bölgesinin daha detaylı değerlendirilmesi amacıyla 1 µ'luk yarı ince kesitler incelemeye alınmıştır. İmmunohistokimyasal ve immunofloresan boyama yöntemleriyle de T-lenfositlerin bölgedeki varlığının belirlenmesi için CD3, foliküler dendritik hücrelerin belirlenmesi için Vimentin, germinal merkezin etrafındaki kapsül varlığını ortaya koymak ve böylece ilgili bölgenin lenfosit infiltrasyonundan ayrımının gösterilebilmesi için Collagen III antikoru, B-lenfositlerin belirlenmesi için CD79A ile CD268 antikoru ve M hücrelerinin varlığını belirleme denemesi için CK18 antikoru kullanılmıştır.

Üçlü boyama sonucunda duodenumun bir parçası olan ve literatürde pilorik tonsil bölgesi olarak adlandırılan alanın hindilerde hem villus hem de kriptlere sahip olması nedeniyle normal bağırsak histolojisi gösterdiği tespit edildi. Savunmada görevli lenf foliküllerinin kriptler veya daha alt seviyelerde değil villusların içinde yerleşim gösterdiği gözlendi. Bahsi geçen ve eşit büyüklükte olmayan foliküllerin bir villus içerisinde tek ya da daha çok sayıda (5-6) olabileceği ortaya konuldu. Folikül sayısının sadece villus içerisindeki lokalizasyonu etkilemediği bunun yanısıra villusların hacimsel genişlemesini tetikleyerek çok sayıda folikülü içinde barındıracak kadar büyümesine yol açtığı anlaşıldı. Foliküllerin mevcut literatürden farklı olarak villusa lokalize olması bölgenin adlandırılmasında kullanılan klasik tonsil tanımına uymadığı ve bu yüzden bölgenin İntravillöz lenfoid doku (İVLD) olarak adlandırılmasının daha uygun olacağı düşünüldü. Üçlü boyamalardan elde edilen diğer önemli bulguda villusların farklı seviyelerde bazı noktalardan birbirleriyle kaynaşması ve hatta bu villusların tabana yakın yerlerde bir uçtan diğerine kadar uzanması olmuştur. Bu kaynaşmaların bölgeye has kendi içinde bir ağın oluşmasına yol açtığı ve bunun da savunma görevini yerine getiren yapının bünyesindeki hücrelerin daha hızlı ve etkili yanıt vermesine yardımcı olabileceği düşünüldü. Bunun haricinde villusun lümenle ilişkili olan herhangi bir

yerinde örtü epitelinin şekil değiştirerek lenfoepitelyum oluşturduğu gözlemlendi. Yapılan PAS boyamasında lenfoepitelyal bölge içerisinde az sayıda da olsa kadeh hücreleri tespit edildi. Üçlü boyama bulgularıyla uyumlu olarak Safranin O boyamalarında germinal merkezlerin etrafında bir kapsül olduğu gösterildi. İmmunohistokimyasal boyamalarda ise bölgenin sıradan bir lenfosit infilitrasyon kümelerinden oluşmadığı ve organize bir lenfoid doku ihtiva ettiği ortaya kondu. Yarı ince kesitlerin incelenmesi sonucunda da tek katlı prizmatik epitelin lenfoepitelyuma dönüşmeden önce yapısal karakterini değiştirmesi sonucu farklı renkte boyandığı ve sonrasında boylarını kısaltma yoluna gittikleri gösterildi.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile kanatlılarda pilorik tonsil olarak adlandırılan bölgenin hindilerde hem tonsil tanımına uymadığı hem de literatürde açıklanan tavuk, kınalı keklik ve ördek pilorik tonsilinden yapısal olarak farklı özelliklere sahip olduğu tespit edildi. Araştırmanın sonucunda elde edilen ve mevcut literatürden farklı olan bulguların bu alandaki literatür bilgisine katkı sağlayacağı ve kanatlı sindirim kanalı immunolojisi üzerine çalışma planlayacak araştırıcılara yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: GALT, Hindi, Histoloji, İmmunohistokimya, Pilorik tonsil.

SUMMARY

Histochemical and Immunohistochemical Investigations on Pyloric Tonsil in Turkeys (*Meleagris gallopavo*)

Turkeys, which are less resistant to disease than chickens, are an important source of protein with low cholesterol levels, high protein/calorie ratio, and low sodium content for human health among animal foods and therefore it is crucial to investigate the defense system of turkeys. A special area called pyloric tonsil is an important part of GALT in poultry. In this study, shape and structural features of this region have been tried to be revealed in turkeys.

For this purpose, a total of 10 adult turkeys, 5 of which are male, 5 of which are female, were taken from farms engaged in turkey breeding and slaughtering in Ankara province. The tissues are fixated by 10% neutral buffered formalin, Bouin, and Maksimow solutions and then they were performed tissue preparation protocol. After embedding and sectioning steps, slides were stained by applying various dyes and were examined. Thus, structure of tonsillar region was demonstrated histologically.

It is assumed that forementioned structure is immunologically functional. Histochemical, immunohistochemical, and immunofluorescent stainings were applied to reveal the general characteristic of immunocompetent region. While Crossman's modified triple staining was put into practice to demonstrate the general histological structure, PAS (Periodic acid-Schiff) was performed to detect the density of goblet cells that synthesize mucus, and Safranin O was implemented to determine the capsule around the follicles. Semi-thin sections (1 μ) were examined in order to evaluate this transition region in a more detailed way at light microscopic level. By using immunohistochemical and immunofluorescent method, we aimed at demonstrating the presence of T cells, B cells and follicular dendritic cells in the lymphoid follicles. While CD3 antibody was chosen for detecting T-lymphocytes, Vimentin antibody was applied in order to reveal dendritic cells in pyloric region. CD79A and CD268 antibodies were used for finding out existence of B-lymphocytes in follicles. Moreover, we sought a specific marker for M cells in pyloric tonsil of turkeys and tried to stain capsule around the germinal centers. CK18 antibody was put into practice to determine whether it is a specific antibody for M cells or not. Collagen III antibody was chosen to dye the capsule surrounding germinal zone. In this way, the staining of collagen III would explain that the relevant area was an organized unit instead of lymphocyte infiltration.

As a result of triple staining, it was found that the area, which is a part of the duodenum and called the pyloric tonsil region in the literature, showed normal intestinal histology in turkeys since it is composed of both villi and crypts. It was observed that the lymph follicles involved in defense system were located in the villi, but not in the crypt regions or at lower levels. It was demonstrated that the aforementioned and different sized follicles may be present single or multiple (5-6) in a villus. It was understood that the number of follicles did not only affect the localization within the villi, but also triggered the volumetric expansion of the villi. According to this phenomenon, amount of follicles into villi forces villi to enlarge enough and thus villi can contain a number of follicles. Unlike the current literature, it was thought that the term pyloric tonsil is used to refer to this region did not conform with classical tonsil definition due to presence of the follicles into villi. Correspondingly, it was considered that it would be more appropriate to be called the region as intravillous lymphoid tissue (IVLD) instead of pyloric tonsil. Another important finding obtained from triple staining was the fusion of villi at different levels. According to this evidence, villi fused with each other at

some points. Apart from that, villi extended from one end to the other near the base level. It was suggested that villi fusion enable the region to form a specific internal network and that this network could help the cells responsible for defense mechanism to deal with pathogens more quickly and effectively. Furthermore, it was noticed that the epithelial layer which settles in any part of the villus changed shape and transformed the lymphoepithelium. This transformation was detected at some locations where villi were in contact with luminal surface. In the PAS staining, a small number of goblet cells were detected in the lymphoepithelial area. In accordance with triple staining findings, Safranin O staining disclosed a capsule around the germinal centers. Immunohistochemical staining revealed that the region did not consist of ordinary lymphocyte infiltration clusters and contained an organized lymphoid tissue. When examined semi-thin sections, it was shown that some of columnar epithelial cells were stained differently from other epithelial cells. The reason why they were dyed distinctively is that these cells alter its structural features before turning into lymphoepithelium. Later, it was detected that length of the cells whose structural properties modified also decreased.

To sum up, it was determined in this study that the region referred to as pyloric tonsil in turkeys is not conformed with tonsil concept commonly used for description of avian pyloric area. Present data show here that pyloric region in turkeys is structurally dissimilar to pyloric tonsil described in chicken, chukar partridge, and duck. Findings obtained from this research are different from the existing literature data. These results will contribute to the knowledge of literature in this scope and will also help researchers who will plan a study on poultry digestive tract immunology.

Key words: GALT, Histology, Immunohistochemistry, Pyloric tonsil, Turkey.

KAYNAKLAR

ABDUL-CAREEM MF, HUNTER BD, SARSON AJ, PARVİZİ P, HAGHİGHİ HR, READ LR, HEİDARİ M. SHARİF S (2008). Host responses are induced in feathers of chickens infected with Marek's disease virus. *Virology,* **370:** 323-332.

ALROY J, GOYAL V, LUKACS NW, TAYLOR RL, STROUT RG, WARD HD, PEREİRA ME (1989). Glycoconjugates of the intestinal epithelium of the domestic fowl (Gallus domesticus): a lectin histochemistry study. *Histochem. J.,* **21:** 187-193.

ANDERSON G, LANE PJ, JENKİNSON EJ (2007). Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nature Reviews Immunology*. **7:** 954–963.

ARAİ N, HASHİMOTO Y, KİTAGAWA H, KON Y, KUDO N (1988). Immunohistochemical study on the distribution of lymphoid tissues in the upper alimentary and respiratory tracts of chickens. *The Japanese Journal of Veterinary Science,* **50(1):** 183-192.

ARDA M, MİNBAY A, AYDIN N, AKAY Ö, İZGÜR M, DİKER KS (1994). İmmunoloji. Medisan Yayın Serisi. I. Baskı. Ankara, s: 123-129.

ARUGH PA, HAMEDİ S (2019). A histomorphometric study on age-related changes in selected lymphoid structures of Chukar partridge (Alectoris chukar). *Iranian journal of veterinary research,* **20(3):** 186-191.

AŞTI RN, KURTDEDE N, ALTUNAY H, ÖZEN A (2000). Electron microscopic studies on conjuctiva associated lymphoid tissue (CALT) in Angora goats. *DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift, **107*****(5):** 196-198.

AŞTI RN, BAYRAKTAROĞLU AG (2006). Sığırlarda konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku (CALT) üzerinde ışık ve elektron mikroskobik çalışmalar (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı).

BACK O (1970). Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. IV. Effect of bursectomy. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol*., **39:** 342-351.

BÄCK O (1972a). Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. I. Ontogeny. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.,* **80A:** 84-90.

BÄCK O (1972b). Studies on the lymphocytes in the intestinal epithelium of the chicken. II. Kinetics. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*., **80A:** 91-96.

BANCROFT JD, GAMBLE M (2008). Theory and practice of histological techniques. Elsevier Health Sciences.

BANG BG, BANG FB (1968). Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. *Am. J. Pathol.,* **53:** 735-751.

BANKS W (1993). Applied Veterinary Histology. Mosby, St. Louis

BAYRAKTAROĞLU AG, KORKMAZ D, AŞTİ RN (2011). Conjunctiva associated lymphoid tissue in the ostrich (*Struthio camelus*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg,* **17(1):** 89-94.

BEAGLEY KW, HUSBAND AJ (1998). Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. *Crit. Rev. Immunol.,* **18:** 237–254.

BEFUS AD, JOHNSTON N, LESLİE GA, BİENENSTOCK J (1980). Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches. *J. Immunol.,* **125:** 2626-2632.

BERENS VON RAUTENFELD D (1993). Systema lymphaticum et spleen [Lien]. In Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium. 2nd edition. Edited by Baumel JJ, King AS, Breazile JE, Evans HE, Vanden Berge JC. Cambridge, Massachusetts: Nuttall Ornithological Club; p.: 477–492.

BİENENSTOCK J, JOHNSTON N, PEREY DY (1973). Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab. Invest.,* **28:** 686-692.

BİENENSTOCK J, BEFUS D (1984). Gut- and bronchus associated lymphoid tissue. *Am. J. Anat.,* **170:** 437-445.

BİSWAL G (1954). Additional histological findings in the chicken reproductive tract. *Poultry Sci.* **33:** 843-851.

BOCKMAN DE, COOPER MD (1973). Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *American Journal of Anatomy*, **136(4):** 455-477.

BOCKMAN DE, BOYDSTON WR, BEEZHOLD DH (1983). The role of epithelial cells in gut-associated immune reactivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **409(1):** 129-144.

BRAMBELL FWR (1970). The transmission of passive immunity from mother to young, In: Frontiers in Biology, **18:** 385-395. North Holland Publishing Company, Amsterdam.

BUCY RP, CHEN CL, CİHAK J, LÖSCH U, COOPER M (1988). Avian T cells expressing γδ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.* **141:** 2200-2205.

BURNS RB (1982). Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (Gallus domesticus). *Res. Vet. Sci.* **32:** 359-367.

CALNEK BW, ADLDİNGER HK, KAHN DE (1970). Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.,* **14:** 219-233.

CASTELEYN C, DOOM M, LAMBRECHTS E, VAN DEN BROECK W, SİMOENS P, CORNİLLİE P (2010). Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-monthold chicken: a review. *Avian Pathol,* **39:** 143–150.

CEJALVO T, MUNOZ JJ, TOBAJAS E, FANLO L, ALFARO D, GARCÍA-CECA J, ZAPATA A (2013). Ephrin-B–dependent thymic epithelial cell–thymocyte ınteractions are necessary for correct t cell differentiation and thymus histology organization: Relevance for thymic cortex development. *The Journal of Immunology,* **190(6):** 2670-2681.

CESTA MF (2006). Normal structure, function and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol,* **34:** 599–608.

CHİEFFİ G, BACCARİ GC, Dİ MATTEO L, D'ISTRİA M, MİNUCCİ S, VARRİALE B (1996). Cell biology of the Harderian gland. *Int Rev Cytol.,* **168:** 1–80.

CİHAK J, HOFFMAN-FEZER G, ZİEGLER-HEİBROCK HWL, STEİN H, KASPERS B, CHEN CH, COOPER MD, LOSCH U (1991). T cells expressing the Vβ1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88:** 10951-10955.

CİRİACO E, PİNERA PP, DİAZ-ESNAL B, LAURA R (2003). Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc. Res. Tech*., **62:** 482-487.

CLENCH MH (1999). The Avian Cecum: Uptade and Motility Rewiev. *J Exp Zool,* **283:** 441-447.

COGBURN LA, GLİCK B (1981). Lymphopoiesis in the chicken pineal gland. *Am. J. Anat*. **162:** 131-142.

COGBURN LA, GLİCK B (1983). Functional lymphocytes in the chicken pineal gland. *J. Immunol.,* **130:** 2109-2112.

CROLE MR, SOLEY JT (2012). Evidence of a true pharyngeal tonsil in birds: a novel lymphoid organ in Dromaius novaehollandiae and Struthio camelus (Palaeognathae). *Frontiers in zoology,* **9(1):** 1-12.

ÇOLAKOĞLU F, DÖNMEZ HH (2018). Kanatlıların Sindirim Kanalı Lenfoid Dokusu. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.,* **13(1):** 106-111, DOI: 10.17094/ataunivbd.417626.

DAVİDSON I, ARTZİ N, SHKODA I, LUBLİN A, LOEB E, SCHAT KA (2008). The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. *Virus Res.* **132:** 152-159.

DAVİSON F, KASPERS B, SCHAT K A, KAİSER P (Eds.). (2011). Avian immunology. 1st Ed. Academic Press.

DEBES GF, MCGETTİGAN SE (2019). Skin-associated B cells in health and inflammation. *The Journal of Immunology,* **202(6):** 1659-1666.

DECAESTECKER E, GABA S, RAEYMAEKERS JA, STOKS R, VAN KERCKHOVEN L, EBERT D, DE MEESTER L. (2007). Host-parasite 'Red Queen' dynamics archived in pond sediment. *Nature.* **450(7171):** 870-3.

DE GEUS B, VAN DEN ENDEN M, COOLEN C, NAGELKERKEN L, VAN DER HEİJDEN P, ROZİNG J (1990). Phenotype of intraepithelial lymphocytes in euthymic and athymic mice: implications for differentiation of cells bearing a CD3-associated γ δ T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* **20:** 291–298.

DE GEUS ED, REBEL JM, VERVELDE L (2012a). Kinetics of the avian influenza-specific humoral responses in lung are indicative of local antibody production. *Dev. Comp. Immunol.* **36:** 317-322.

DE GEUS ED, JANSEN CA, VERVELDE L (2012b). Uptake of particulate antigens in a nonmammalian lung: phenotypic and functional characterization of avian respiratory phagocytes using bacterial or viral antigens. *J. Immunol*, **188:** 4516-4526.

DEWAAL EJ, SCHUURMAN HJ, VAN LOVEREN H, VOS JG (1997). Differential effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis(tri-n-butyltin) oxide and cyclosporine on thymus histophysiology. *Crit Rev Toxicol.,* **27:** 381–430.

EGBERTS HJA, BRİNKHOFF MGM, MOUWEN JMVM, VAN DİJK JE, KONİNKX JFJG (1985). Biology and pathology of the intestinal M-cell. A review. *Veterinary Quarterly*, **7(4):** 333-336.

ERATALAR SA, AKBAY R (2008). Beyaz hindilerde yerleşim sıklığının performans, karkas kalitesi ve bazı stres parametrelerine etkisi (Doctoral dissertation, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı).

EURELL JA, FRAPPIER BL (2006). Textbook of VeterinaryHistology, 6th edn. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

FAGERLAND JA, ARP LH (1990). A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys. *Am. J. Anat.* **189:** 24-34.

FAGERLAND JA, ARP LH (1993a). Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related differences. *Reg. Immunol.* **5:** 28-36.

FAGERLAND JA, ARP LH (1993b). Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens. *Avian Dis.* **37:** 10-18.

FİNKE D, KRAEHENBUHL JP (2001). Formation of Peyer's patches. *Curr Opin Genet Dev* **11:** 561–567.

FİX AS, ARP LH (1991). Quantification of particle uptake by conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) in chickens. *Avian Dis.* **35:**174-179.

GARTNER LP, HİATT JL (1997). Digestive system II–alimentary canal. Color Textbook of Histology. 1st Ed. Philadelphia, PA: Saunders, 330.

GEBERT A, ROTHKÖTTER HJ, PABST R (1996). M cells in Peyer's patches of the intestine. *In International review of cytology*, **167:** 91-159.

GEDAM PM, NANDESHWAR NC, SALANKAR AM, SHİRSİKAR PM, KAWARETİ PK, GANGULY S (2018). Histomorphological and histochemical studies on lymphoid tissue of pyloric region in khaki campbell breed of duck (Anas platyrhynchos). *Journal of Entomology and Zoology Studies*; **6(1):** 1222-1224.

GLİCK B (1978). The immune response in the chicken: lymphoid development of the bursa of Fabricius and thymus and avian immune response role for the gland of Harder. *Poultry Sci.* **57:** 1441-1444.

GLİCK B (1979). The Avian Immune System. *Avian Diseases,* **23(2):** 282-289.

GLİCK B, OLÁH I (1981). Gut-associated-lymphoid tissue of the chicken. *Scan Electron Microsc Pt* **3:** 99–108.

GÖBEL TWF, KASPERS B, STANGASSİNGER M (2001). NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int. Immunol.* **13:** 757-762.

GOOD RA, FİNSTAD J (1967). In: Germinal Centers in Immune Responses. Ed. H Cottier, N Odartchenko, R Schindler and C C Congdon. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg; p.:4-27.

GORDON J, MANLEY NR (2011). Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development,* **138(18):** 3865-3878.

GUİLLEMOT FD, OLİVER PD, PEAULT BM, LE DOUARİN N (1984). Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J. Exp. Med.* **160:** 1803-1819.

GUY-GRAND D, CERF-BENSUSSEN N, MALİSSEN B, MALASSİS-SERİS M, BRİOTTET C, VASSALLİ P, (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation, *J Exp Med,* **173:** 471-481.

GÜLMEZ N, ASLAN Ş (1999). Histological and histometrical investigations on bursa of Fabricius and Thymus of Native Geese. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,* **23(2):** 163-172.

HALEY PJ (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* **188:** 49–71.

HALLE S, DUJARDİN HC, BAKOCEVİC N, FLEİGE H, DANZER H, WİLLENZON S, SUEZER Y, HAMMERLİNG G, GARBİ N, SUTTER G, WORBS T, FORSTER R (2009). Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **206:** 2593-2601.

HASSA O (1961). Tavukların Sindirim Sistemi Üzerinde Histolojik Incelemeler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 132.

HEDGE SN, ROLLS BA, TURVEY A, COATES ME (1982). Influence of gut microflora on the lymphoid tissue in the chicken (Gallus domesticus) and Japanese quail (Coturnix coturnix Japonica). *Comp. Biochem. Physiol.* **72A:** 205-209.

HODGES RD (1974). The circulatory system. In: The Histology of the Fowl, Academic Press, London.

HONDO T, KANAYA T, TAKAKURA I, WATANABE H, TAKAHASHİ Y, NAGASAWA Y, TERADA S, OHWADA S, WATANABE K, KİTAZAWA H, ROSE MT, YAMAGUCHİ T, ASO H (2011). Cytokeratin 18 is a specific marker of bovine intestinal M cell. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,* **300(3):** G442-G453.

HOSHİ H, MORİ T (1973). Identification of the bursa dependent and thymus-dependent areas in the tonsilla caecalis of chickens. *Tohuku J. Exp. Med*. **111:** 309-322.

HUSBAND AJ, GOWANS JL (1978). The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med*, **148(5):** 146-1160

IQBAL M, PHİLBİN VJ, SMİTH AL (2005). Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet. Imm. Immunopathol.* **104:** 117-127.

IGYARTO BZ, MAGYAR A, OLÁH I (2007). Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen. *Cell Tissue Res*. **327:** 83-92.

JANEWAY CA, (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **54 (1):** 1-13.

JANEWAY CA (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today,* **13(1):** 11-16.

JARRY A, ROBASZKİEWİCZ M, BROUSSE N, POTET F (1989). Immune cells associated with M cells in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches in the rat. *Cell and tissue research,* **255(2):** 293-298.

JEURİSSEN SHM, JANSE EM, KOCH G (1988). Meckel's diverticulum: a gut associated lymphoid organ in chickens. In: Histophysiology of the Immune System, (Fossum, S. and Rolstad, B., eds.), p.: 599-605. Plenum Publishing Corporation, New York.

JEURİSSEN SHM, JANSE EM, KOCH G, DE BOER GF (1989). Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in the chicken. *Cell Tissue Res*. **258:** 119-124.

JEURİSSEN SH, VERVELDE L, JANSE ME (1994). Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poultry Sci. Rev.* **5:** 183-207.

JEURİSSEN SHM, WAGENAAR F, JANSE EM (1999). Further characterisation of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken. *Poultry Sci.* **78:** 965-972.

JOHN JL (1994). The avian spleen: a neglected organ. *Quart. Rev. Biol*. **69:** 327-351.

JOHNSTON CE, HARTLEY C, SALİSBURY AM, WİGLEY P (2012). Immunological changes at point-of-lay increase susceptibility to Salmonella enterica Serovar Enteritidis infection in vaccinated chickens. PLoS One 7, e48195.

KABASHİMA K, HONDA T, GİNHOUX F, EGAWA G (2019). The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology,* **19(1):** 19-30.

KENDALL MD (1980). Avian thymus glands: a review. *Dev. Comp. Immunol.* **4:** 191-210.

KHAN MZ, HASHİMOTO Y (2001). Large granular lymphocytes in the oviduct of developing and hormone-treated chickens. *Br. Poultry Sci.* **42:** 180-183.

KIRKPINAR F, MERT S (2004). Etlik Hindi Üretiminin Temel İlkeleri. *Hasad, Hayvancılık Dergisi,* **2 (9):** 24-27.

KİMİJİMA T, HASHİMOTO Y, KİTAGAWA H, KON Y, SUGİMURA M (1990). Localization of immunoglobulins in the chicken oviduct. Nippon Juigaku Zasshi **52:** 299-305.

KİNG A S, MCLELLAND J (1984). Birds Their Structure and Function. Second Ed. Bailliere Tindall. England.

KİTAGAWA H, HASHİMOTO Y, KON Y, KUDO N (1988). Light and electron microscopic studies on chicken intestinal globule leukocytes. *Jpn. J. Vet. Res.* **36:** 83-117.

KLUG DB, CARTER C, GİMENEZ-CONTİ IB, RİCHİE ER (2002). Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J. Immunol.* **169:** 2842–2845.

KONCA Y (2010). Türkiye ve Avrupa Birliği'nde hindi eti üretimi, tüketimi ve politikaları. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.,* **47(2):** 201-209.

KUHN EM, KAUP FJ (1996). Morphological Characteristics of the Heal Peyer's Patches in the Rhesus Macaque: a Histological and Ultrastructural Study. *Anatomia, histologia, embryologia*, **25(1):** 65-69.

KURTDEDE N, AŞTI RN, ALTUNAY H, ÖZEN A (2000). "Ankara keçilerinin ileum'undaki peyer plakları ve M hücreleri üzerinde ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar." *AÜ Vet.Fak. Derg*, **47(1):** 39-49.

LATİMER HB (1924). Postnatal growth of the body, systems, and organs of the single comb white Leghorn chicken. *J. Agric. Rec.* **29:** 363-397.

LAWRENCE EC, ARNAUD-BATTANDİER F, KOSKİ IR, DOOLEY NJ, MUCHMORE AV, BLAESE RM (1979). Tissue distribution of immunoglobulin-secreting cells in normal and IgA-deficient chickens. *J. Immunol.* **123:** 1767-1771.

LAWRENCE EC, ARNAUD-BATTANDİER F, GRAYSON J, KOSKİ IR, DOOLEY NJ, MUCHMORE AV, BLAESE RM (1981). Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. *Clin. Exp. Immunol.* **43:** 450-457.

LEBACQ-VERHEYDEN AM, VAERMAN JP, HEREMANS JF (1974). Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology* **27:** 683-692.

LE DOUARİN NM, HOUSSAİNT E, JOTEREAU FV, BELO M (1975). Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72:** 2701-2705.

MASLAK DM, REYNOLDS DL (1995). B cells and Tlymphocyte subsets of the head-associated lymphoid tissues of the chicken. *Avian Dis.* **39:** 736-742.

MASON DY, CORDELL J L, BROWN MH, BORST J, JONES M, PULFORD K, JAFFE E, RALFKİAER E, DALLENBACH F, STEİN H, PİLER, S., GATTER KC (1995). CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood,* **86(4):** 1453-1459.

MAST J, GODDEERİS BM (1998). CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken. *Cell Tissue Res.* **291:** 107-115.

MASTELLER EL, THOMPSON CB (1994). B cell development in the chicken. *Poultry Sci.* **73:** 998-1011.

MATSUMOTO R, HASHİMOTO Y (2000). Distribution and developmental change of lymphoid tissues in the chicken proventriculus. *J Vet Med Sci,* **62:** 161- 167.

MCLELLAND J (1979). Digestive system. In Form and Function in Birds. Volume 1. Edited by King AS, McLelland J. San Diego: Academic Press; 1979: 69–92.

MUİR WI, BRYDEN WL, HUSBAND AJ (2000). Investigation of the site of precursors for IgA-producing cells in the chicken intestine. *Immunol. Cell Biol.* **78:** 294-296.

MYERS RK, ARP LH (1987). Pulmonary clearance and lesions of lung and air sac in passively immunized and unimmunized turkeys following exposure to aerosolized Escherichia coli. *Avian Dis.* **31:** 622-628.

NAGY N, MAGYAR A, TOTH M, OLÁH I (2004). Quail as the chimeric counterpart of the chicken: morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. *J. Morphol.* **259:** 328-339.

NAGY N, BÍRÓ É, TAKÁCS Á, PÓLOS M, MAGYAR A, OLÁH I (2005a). Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev. Dyn.* **232:** 55-66.

NAGY N, IGYARTO B, MAGYAR A, GAZDAG E, PALYA V, OLÁH I (2005b). Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta Vet. Hung.* **53:** 173-188.

NAGY N, OLÁH I (2007). Pyloric tonsil as a novel gut associated lymphoepithelial organ of the chicken. *Journal of anatomy,* **211(3):** 407-411.

NAGY N, OLÁH I (2010). Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development* **137:** 3019-3023.

NEUTRA MR, PHİLLİPS TL, MAYER EL, FİSHKİND DJ (1987). Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell and tissue research,* **247(3):** 537-546.

NİCKEL R, SCHUMMER A, SEİFERLE E (1977). Anatomy of the Domestic Birds. Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg

OGUNKOYA YO, COOK RD (2009). Histomorphology of the proventriculus of three species of Avustralian Passerines: Lichmera indistincta, Zosterops lateralis and Poephila guttata. *Anat Histol Embryol,* **38:** 246-253.

OHSHİMA K, HİRAMATSU K (2000). Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chicken. *Histol. Histopathol.* **15:** 713-720.

OLÁH I, GLİCK B (1978). The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poultry Sci.* **57:** 1445-1450.

OLÁH I, GLİCK B (1982). Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. *Am. J. Anat.* **165:** 445-480.

OLÁH I, GLİCK B (1983). Avian lymph node; light and electronmicroscopic study. *Anat. Rec.* **205:** 287-299.

OLÁH I, GLİCK B (1984). Meckel's Diverticulum. I. Extramedullary myelopoiesis in the yolk sac of hatched chickens (Gallus domesticus). *Anat. Rec.* **208:** 243-252.

OLÁH I, GLİCK B, TAYLOR JR RL (1984). Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken. *Anat. Rec.* **208:** 53-263.

OLÁH I, GLİCK B, TORO I (1986). Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. *Poultry Sci.* **65:** 574-588.

OLÁH I, GLİCK B (1987). Bursal secretory cells: an electron microscope study. *Anat. Rec.* **219:** 268-274.

OLÁH I, GLİCK B (1995). Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *The Anatomical Record.* **243:** 384–389.

OLÁH I, NAGY N, MAGYAR A, PALYA V (2003). Esophageal tonsil: a novel gutassociated lymphoid organ. *Poultry Sci,* **82:** 767–770.

OLÁH I, NAGY N, VERVELDE L (2014). Structure of the avian lymphoid system. In Avian immunology. Second ed. Academic press.

ONO S, KABASHİMA K (2015). Novel insights into the role of immune cells in skin and inducible skin-associated lymphoid tissue (iSALT). *Allergo journal international,* **24(6):** 170-179.

PAYNE LN (1971): "The lymphoid system: In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl (BELL, D. J, and BM FREEMAN eds.): vol. 2." 985-1037. Academic Press, London.

PAYNE AP (1994). The Harderian gland: a tercentennial review. *J Anat,* **185:** 1–49.

PEARSE G (2006). Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic pathology,* **34(5):** 504-514.

PERRY ME (1994). The specialised structure of crypt epithelium in the human palatine tonsil and its functional significance. *Journal of anatomy,* **185(1):** 111-127.

PETRİE HT, ZÚÑİGA-PFLÜCKER JC (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.* **25:** 649–679.

PİKE KA, BAİG E, RATCLİFFE MJH (2004). The avian B-cell receptor complex: distinct roles of Iga and Igb in B-cell development. *Immunological Reviews,* **197:** 10–25.

PİNK JR, RİJNBEEK AM (1983). Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma* **2:** 287-296.

PROCKOP S E, PALENCİA S, RYAN CM, GORDON K, GRAY D, PETRİE HT (2002). Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J. Immunol.* **169:** 4354–4361.

RADBRUCH A, MUEHLİNGHAUS G, LUGER EO, INAMİNE A, SMİTH KG, DÖRNER T, HİEPE F (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* **6:**741-750.

RATCLİFFE MJH (2002). B cell development in gut associated lymphoid tissues. *Vet Immunol Immunopathol* **10:** 337–340.

RATCLİFFE MJH (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev. Comp. Immunol.* **30:** 101-118.

REDDY SK, HU T, GUDİVADA R, STAİNES KA, WRİGHT KE, VİCKERSTAFF L, KOTHLOW S, HUNT LG, BUTTER C, KASPERS B, YOUNG JR (2008). The BAFF-Interacting receptors of chickens. *Developmental & Comparative Immunology, **32*****(9):** 1076-1087.

REESE S, DALAMANİ G, KOTHLOW S, KASPERS B (2005). Ontogenesis of the chicken bronchus associated lymphoid tissue (BALT). *Anat Histol Embryol,* **34:** 41.

ROMANOFF AL (1960). In: The Avian Embryo, Structural and Functional Development. Macmillan, New York.

ROSE ME (1981). Lymphatic system. In Form and Function in Birds. Volume 2. Edited by King AS, McLelland J. London: Academic Press; p.:341–372.

RUSSELL PH, KOCH G (1993). Local antibody forming cell responses to the Hitchner B1 and Ulster strains of Newcastle disease virus. *Vet. Imm. Immunopathol.* **37:** 165-180.

SAMUELSON DA (2007). Textbook of Veterinary Histology.St. Louis: Saunders– Elsevier.

SARI EK, KURTDEDE N (2006). Bursa Fabricius' un Histolojik Yapısı. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **12(2):** 205-209.

SARI EK, KURTDEDE N (2007). İntestinal İmmun Sistem Histolojisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi* **78(4):** 57-62.

SAVAGE P A, DAVİS MM (2001). A kinetic window constricts the T cell receptor repertoire in the thymus. *Immunity* **14:** 243–252.

SAYEGH CE, DEMARİES SL, PİKE KA, FRİEDMAN JE, RATCLİFFE MJH (2000). The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunological Reviews,* **75:** 187–200.

SCHAT KA, MYERS TJ (1991). Avian Intestinal Immunity. *Crit Rev Poult Biol,* **3:** 19-34.

SİPAHİ C (2010). Entansif hindi yetiştiriciliği işletmelerinde kârlılık ve verimlilik analizleri. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, Ankara.

SORVARİ R, NAUKKARİNEN A, SORVARİ TE (1977). Anal suckling-like movements in the chicken and chick embryo followed by the transportation of environmental materials to the bursa of Fabricius, caeca and caecal tonsils. *Poultry Sci.* **56:** 1426-1429.

STREİLEİN JW (1983) Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J Invest Dermatol* **80 (Suppl.):** 12–16.

STURKİE PD (1943). The reputed reservoir function of the spleen of the domestic fowl. *Am. J. Physiol.* **138(4):** 599-602.

TAKAHAMA Y (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* **6:** 127–135.

TANYOLAÇ A (1993). Özel Histoloji. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Sti. Ankara.

TAY SS, ROEDİGER B, TONG PL, TİKOO S, WENİNGER W (2014). The skin-resident immune network. *Current dermatology reports,* **3(1):** 13-22.

TOKOYODA K, HAUSER AE, NAKAYAMA T, RADBRUCH A (2010). Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nat. Rev. Immunol.* **10:** 193-200.

TREGASKES CA, KONG FK, PARAMİTHİOTİS E, CHEN CLH, RATCLİFFE MJ, DAVİSON TF, YOUNG JR (1995). Identification and analysis of the expression of CD8 and CD8 isoforms in chickens reveals a major TCRγδ-CD8 subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.* **154:** 4485-4494.

VAN ALSTİNE WG, ARP LH (1988). Histologic evaluation of lung and bronchus-associated lymphoid tissue in young turkeys infected with Bordetella avium. *Am. J. Vet. Res.* **49:** 835-839.

VAN EWİJK W, SHORES EW, SİNGER A (1994). Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol.* Today **15:** 214–217.

VAN EWİJK W, WANG B, HOLLANDER G, KAWAMOTO, H. SPANOPOULOU, E. ITOİ, M. AMAGAİ, T. JİANG Y. F., GERMERAAD W. T., CHEN W. F., KATSURA Y. (1999). Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D?. *In Semin. Immunol.* **11:** 57–64.

VAN GİNKEL FW, DE-CHU CT, GULLEY SL, TORO H (2009). Induction of mucosal immunity in the avian Harderian gland with a replication-deficient Ad5 vector expressing avian influenza H5 hemagglutinin. *Developmental & Comparative Immunology,* **33(1):** 28-34.

VAN GİNKEL FW, GULLEY SL, LAMMERS A, HOERR FJ, GURJAR R, TORO H (2012). Conjunctiva-associated lymphoid tissue in avian mucosal immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **36:** 289-297.

VERVELDE L, VERMEULEN AN, JEURİSSEN SHM (1993). Common epitopes on Eimeria tenella sporozoites and cecal epithelium of chickens. *Infect. Immun.* **61:** 4504-4506.

VERVELDE L, JEURİSSEN SHM (1993). Postnatal development of intra-epithelial leukocytes in the chicken digestive tract: phenotypical characterisation in situ. *Cell Tissue Res.* **274:** 295-301.

VEROMAA T, VAİNİO O, EEROLA E, TOİVANEN P (1988). Monoclonal antibodies against chicken Bu-1a and Bu-1b alloantigens. *Hybridoma* **7:** 41-48.

VİNEY JL, KİLSHAW P J, MACDONALD TT (1990). Cytotoxic α β+ and γ δ+ cells in murine intestinal epithelium. *Eur. J. Immunol.* **20:** 1623–1626.

WARNER NL, SZENBERG A (1962). Effect of neonatal thymectomy on the immune response in the chicken. *Nature,* **196(4856):** 784-785.

WARNER NL (1967). The immunological role of the avian thymus and bursa of fabricius. *Folia biologica,* **13(1):** 1.

WHITE RG, FRENCH VI, STARK JM (1970). A study of the localization of a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centres. *Journal of Medical Microbiology* **3:** 65-83.

WİELAND WH, ORZAEZ D, LAMMERS A, PARMENTİER H, VERSTEGEN MW, SCHOTS A (2004). A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (Gallus domesticus) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochem. J.* **380:** 669-676.

WİTHANAGE GSK, BABA E, SASAİ K, FUKATA T, KUWAMURA M, MİYAMOTO T, ARAKAWA A (1997). Localization and enumeration of T and B lymphocytes in the reproductive tract of laying hens. *Poultry Sci.* **76:** 671-676.

WOOLHOUSE ME, WEBSTER JP, DOMİNGO E, CHARLESWORTH B, LEVİN BR (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature genetics,* **32(4):** 569-77.

YEŞİLYURT E, FİDAN, I (2011). Dendritik Hücreler ve Enfeksiyonlardaki Rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg,* **41(3):** 91-102, doi:10.5222/TMCD.2011.091.

ZÚÑİGA-PFLÜCKER JC (2004). T-cell development made simple. *Nature Reviews Immunology,* **4(1):** 67-72.

ÖZGEÇMİŞ

I. Kişisel bilgiler:

Adı:	Nuh
Soyadı:	YILDIRIM
Doğum yeri ve tarihi:	Uğurludağ 10/10/1988
Uyruğu:	T.C.
Medeni durumu:	Bekar
İletişim bilgileri:	nuhyldrm1988@gmail.com

II. Eğitim bilgileri:

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Doktora) (2013-Halen)

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi (Lisans) (2006-2011)

Reha Alemdaroğlu lisesi (Ankara) (2003-2005)

Yabancı dil: İngilizce (İleri), Almanca (Orta) ve Fransızca (Başlangıç)

III. Ünvanları:

Araştırma Görevlisi (2013-Halen)

Veteriner Hekim (2011-Halen)

IV. Mesleki deneyim:

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi (2013-Halen)

V. Üyesi olduğu kuruluşlar:

Türk Histoloji Embriyoloji Derneği

VI. Bilimsel ilgi alanları

Yayınlar:

Özbek M, Ergün E, Beyaz F, Ergün L, **Yıldırım N**, Özgenç Ö, Erhan F. Prenatal development and histochemical characteristics of gastrointestinal mucins in sheep fetuses. *Microscopy Research and Technique*, 81, 630-648, 2018.

Özbek M, Hitit M, **Yıldırım N,** Özgenç Ö, Ergün E, Ergün L, Beyaz F, Kurtdede N, Altunay H. Expression pattern of galectin-1 and galectin-3 in rat testes and epididymis during postnatal development, *Acta Histochemica*, 120, 814-827, 2018.

Özbek M, Ergün E, Ergün L, Beyaz F, Erhan F, Kandil B, **Yıldırım N,** Özgenç Ö. Toll-like Receptor 2 Expression on Ovine Ileum Throughout Fetal Development, *Dicle Vet Derg*, 2,78-82, 2019.

Ozlu B, Ergin M, Budak S, Tunali S, **Yildirim N,** Erisken C (2019). A bioartificial rat heart tissue: Perfusion decellularization and characterization. *The International Journal of Artificial Organs*, 42(12), 757-764.

Özbek, M, Hitit, M, Ergün, E, Ergün, L, Beyaz, F, Erhan, F, **Yıldırım, N,** Kandil, B, Özgenç, Ö, Memili, E. Expression Profile of Toll-Like Receptor 4 in Rat Testis and Epididymis throughout Postnatal Development, *Andrologia*, 2020.

Bildiriler:

Bayraktaroğlu, A.G., Özbek M., Kurtdede N., Altunay H., Ergün L., Ergün E**.**, Aştı R.N., **Yıldırım N.** "Histological Structure of the Colonic Lypmhoglandular Complex in the Angora Goat". International Congress "One world- One Health-One Vision" Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, October 14-16, 2015.

Özbek M, Ergün E, Beyaz F, Ceylan A, Ergün L, **Yıldırım N**, Erhan F, Özgenç Ö. "The cell proliferation in terminal ileum of sheep fetuses during prenatal period". 1st International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics Congress (ICAVST), Bosnia and Herzegovina (Sarajevo). 25-29 Ağustos 2016.

Özbek M, Ergün E, Ceylan A, Beyaz F, **Yıldırım N**, Erhan F, Özgenç Ö, Ergün L. "Caspase-3 expression and determination of apoptotic cell in rat testis during postnatal period". 1st International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics Congress (ICAVST), Bosnia and Herzegovina (Sarajevo). 25-29 Ağustos 2016.

Özbek M, Ergün E, Beyaz F, Ergün L, **Yıldırım N,** Özgenç Ö, Erhan F . "Immunohistochemical investigation of TLR4 in rat testis and epididymis during postnatal development", 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 18-21 May 2017, Antalya.

Özbek M, Ergün E, Beyaz F, Ergün L, **Yıldırım N**, Özgenç Ö, Erhan F. "Exploration of protein expression by immunohistochemistry of Toll-like receptor 2 (TLR 2) in rat testis and epididymis during postnatal developmen"t, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 18-21 May 2017, Antalya.

Özbek M, Ergün E, Beyaz F, Ergün L, **Yıldırım N**, Özgenç Ö, Erhan F. "Expression of TLR2 in Sheep Ileum during Prenatal Development", 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 18-21 May 2017, Antalya.

Ergün E, Özbek M, Beyaz F, Ergün L, Altunay H, Kurtdede N, **Yıldırım N**, Özgenç Ö. "Differences in Immunohistochemical Localization and Distribution of Galectin 1 and-3 in Rat Testes and Epididymis During Postnatal Development", 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 18-21 May 2017, Antalya.

Özbek M, Ergün E, Beyaz F, Ergün L, Erhan F, **Yıldırım N**, Özgenç Ö (2017). "Expression of Toll like receptors in rat testicular and epididymal tissues". 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST), Skopje, Macedonia, October 4 - 8, 2017.

Erhan F, Özbek M, Ceylan A, Ergün E, Beyaz F, Ergün L, **Yıldırım N**, Özgenç Ö (2017). "Apoptosis and cell proliferation during postnatal development of the testis in the rat". 2nd International Congress on Advances in Veterinary Sciences & Technics (ICAVST), Skopje, Macedonia, October 4 - 8, 2017.

VII. Bilimsel etkinlikler:

Projeler:

Postnatal Gelişim Dönemlerindeki Sıçanların Testis ve Epididimislerinde Galektin 1 ve -3'ün İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları ve Dağılımındaki Farklılıklar, Ankara Üniversitesi BAP projesi, **Araştırmacı**, Proje no:15B0239004, 2015. (Tamamlandı) (ULUSAL).

Sindirim Sistemine ait boşluklu organların yüzey ve duvar yapılarının Scanning taramalı Elektron Mikroskobik görüntülerine benzer üç boyutlu renkli görüntülerinin elde edilmesini sağlayacak düşük maliyetli hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntemin geliştirilmesi, Ankara Üniversitesi BAP projesi, **Araştırmacı**, Proje No: 16A0239001, 2016. (Tamamlandı) (ULUSAL)

Toll Benzeri Reseptör 4'ün (TLR4) Postnatal Gelişim Dönemlerindeki Sıçanların Testis ve Epididimislerinde Protein Ekspresyonunun Araştırılması, Ankara Üniversitesi BAP projesi, **Araştırmacı**, Proje No: 16H0239005, 2016. (Tamamlandı) (ULUSAL).

Hindilerde (Meleagris gallopavo) Pilorik Tonsil Bölgesi Üzerine Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Çalışmalar, Ankara Üniversitesi BAP projesi, **Araştırmacı**, Proje No: 17L0239011, 2017 (Tamamlandı) (ULUSAL).

Fibrochondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through Chemical Stimulation, Nazarbayev Üniversitesi Araştırma Projesi, **Araştırmacı**, Proje no: SOE2018012 (Devam ediyor).

Seminerler:

Hücre adezyon molekülleri ve günümüzde nanoteknolojinin dokulardaki uygulama yöntemleri-2016.

VIII. Diğer bilgiler:

Akademik-İdari Görevler:

Veteriner Fakültesi Açık Ders Erişim Takip Komisyonu Üyeliği (2019-Halen)

Katıldığı kurslar:

TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Hücre Biyolojisi Laboratuvarı tarafından 04-08 Mayıs 2015 tarihleri arasında düzenlenen "Temel Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Kursu".

Türk Histoloji Embriyoloji Derneği tarafından 23-24 Mayıs 2015 tarihleri arasında düzenlenen "Laboistatistik Kursu".

TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Hücre Biyolojisi Laboratuvarı tarafından 08 -12 Haziran 2015 tarihleri arasında düzenlenen "İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Eğitimi".

ANKÜSEM tarafından düzenlenen Deney Hayvanlar Kullanım Sertifikası Eğitim Programı – 2016 Eylül Dönemi Kursu (26.09.2016-05.10.2016 tarihleri arasında).

Ankara Üniversitesi Hizmet İçi Eğitim Koordinatörlüğü tarafından düzenlenen Araştırma Görevlileri İçin Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı (02.05.2017-06.06.2017 tarihleri arasında).