



**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
VHE-YL-2007-0003**

**BILDIRCIN VE RATLARDA KARIN BOŞLUĞUNDA  
LOKAL SAVUNMA ODAKLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Biyolog  
Senem SAYDAM**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ülker EREN**

AYDIN-2007

## ÖNSÖZ

Karın boşluğu ile (peritoneal boşluk) bağlantılı bir çok özelleşmiş savunma mekanizması vardır. Bunlar peritondan bakteri ve toksinlerin absorpsiyonu, fagositoz, opsonizasyon, komplement aktivasyonu ve peritoneal boşluktan enfeksiyonun bertaraf edilmesidir. Peritoneal boşluk içerdiği sabit ve göç eden hücre popülasyonlarıyla bakteriyel invazyona karşı lokal savunma yanıtında çok önemli rol oynar.

İnsan, rat ve farelerde omentumda belirlenen milky spotların peritoneal boşluk savunmasında önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Bu odaklardan peritoneal boşluk içine hücresel göç submezotelyal bağ dokuda bazal laminanın bulunmamasından dolayı kolaylaşmıştır. Bu yüzden, hücrelerin milky spotlardaki interstisyel alanlardan göçü, interselüler boşluklarla mezotelyal hücreler arasındaki fibröz bariyerlerden içeriye süzülmesiyle gerçekleşmektedir.

Bu çalışmada karın boşluğu ile ilişkili lokal savunma odakları, literatür verileri olan ratlar ile henüz veri bulunmayan bıldırcınlarda araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, klinik olarak da oldukça önemli olan karın boşluğu ile ilişkili yapılarda gerçekleşen savunma mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bıldırcında elde edilen veriler ilk olup araştırmalarda ve klinik uygulamalarda kullanılabilinecektir.

Araştırma, “Bıldırcın ve ratlarda karın boşluğunda lokal savunma odaklarının araştırılması” isimli ve VTF-06010 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                   | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖNSÖZ .....                                                       | i     |
| İÇİNDEKİLER .....                                                 | ii    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                           | iii   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                             | iv    |
| GİRİŞ .....                                                       | 1     |
| 1.1. İmmun Reaksiyon .....                                        | 2     |
| 1.1.1. Lenfositler.....                                           | 3     |
| 1.1.1.1. T Lenfositler .....                                      | 3     |
| 1.1.1.2. B Lenfositler.....                                       | 4     |
| 1.1.2. Mononükleer fagositik sistem.....                          | 5     |
| 1.1.2.1. Makrofajlar.....                                         | 5     |
| 1.2. Mukozal Yüzeylerdeki Lenfoid Dokular .....                   | 7     |
| 1.3. Karın Boşluğu.....                                           | 8     |
| 1.4. Milky Spot.....                                              | 12    |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                          | 15    |
| 2.1. Gereç .....                                                  | 15    |
| 2.2. Yöntem.....                                                  | 17    |
| 2.2.1. Histolojik ve histokimyasal yöntem.....                    | 17    |
| 2.2.2. İmmunositokimyasal yöntem.....                             | 17    |
| 2.2.3. Lenfoid hücre birikimlerinin alanlarının hesaplanması..... | 18    |
| 2.3. İstatistiksel Analiz .....                                   | 18    |
| 3. BULGULAR .....                                                 | 19    |
| 3.1. Ratlarda Lenfoid Hücre Birikimleri.....                      | 19    |
| 3.1.1. Histolojik bulgular.....                                   | 19    |
| 3.1.2. Histokimyasal bulgular .....                               | 28    |
| 3.1.3. İmmunositokimyasal bulgular .....                          | 30    |
| 3.1.4. İstatistiksel bulgular.....                                | 33    |
| 3.2. Bıldırcınlarda Lenfoid Hücre Birikimleri.....                | 35    |
| 3.2.1. Histolojik bulgular.....                                   | 35    |
| 3.2.2. Histokimyasal bulgular .....                               | 39    |
| 3.2.3. İmmunositokimyasal bulgular .....                          | 40    |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 3.2.4. İstatistiksel bulgular..... | 40 |
| 4. TARTIŞMA .....                  | 43 |
| 5. SONUÇ .....                     | 46 |
| ÖZET .....                         | 47 |
| SUMMARY .....                      | 49 |
| KAYNAKLAR .....                    | 51 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                     | 55 |
| TEŞEKKÜR .....                     | 56 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|               |                                                                                    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| APC           | Antigen Presenting Cell (Antijen sunan hücreler)                                   |
| BALT          | Bronchus Associated Lymphoid Tissue (bronş ilişkili lenfoid doku)                  |
| BSA           | Bovine serum albumin (sığır serum albumini)                                        |
| CAMs          | Cell Adhesion Molecules (hücre adezyon molekülleri)                                |
| CD            | Cluster of Differentiation                                                         |
| CSF           | Coloni Stimulating Factor (koloni uyarıcı faktör)                                  |
| GALT          | Gut Associated Lymphoid Tissue (barsak ilişkili lenfoid doku)                      |
| HALT          | Head Associated Lymphoid Tissue (baş ilişkili lenfoid doku)                        |
| ICAM-1        | Intercellular Adhesion Molecule (hücrelerarası adezyon molekülleri)                |
| IEL           | Intra Epithelial Lymphosit (epitel içi lenfositler)                                |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gamma (interferon gamma)                                                |
| IL-15         | Interleukin 15 (interlökin 15)                                                     |
| IL-2          | Interleukin 2 (interlökin 2)                                                       |
| LPS           | Lipopolisaccarit (lipopolisakkarit)                                                |
| MALT          | Mucosa Associated Lymphoid Tissue (mukoza ilişkili lenfoid doku)                   |
| MHC           | Major Histocompatibility Kompleks (doku uyum molekülleri)                          |
| MPS           | Mononuclear Phagocytic System (mononükleer fagositik sistem)                       |
| PALT          | Peritoneum associated lymphoid tissue (periton ilişkili lenfoid doku)              |
| PAS           | Periodic Acid Schiff                                                               |
| TNF- $\alpha$ | Tumor necrosis factor alpha (tümör nekrozis factor alfa)                           |
| StreptABC     | Streptavidin-biotin peroxidase complex (Strept avidin-biyotin peroksidaz kompleks) |

## ÇİZELGELER

|               |                                                                                                                                                                                   | Sayfa |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 1.1   | Mononükleer fagositik Sistem Hücreleri                                                                                                                                            | 6     |
| Çizelge 3.1.A | Periton boşluğuna BSA ve NaCl enjekte edilmiş ratların omentum dokusunda lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları ve uygulama süresine göre belirlenen farklılıklar         | 34    |
| Çizelge 3.1.B | Lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları arasındaki farklılıklar                                                                                                            | 34    |
| Çizelge 3.2.A | Periton boşluğuna BSA ve NaCl enjekte edilmiş bıldırcınların mezenter dokusunda lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları ve uygulama süresine göre belirlenen farklılıklar. | 42    |
| Çizelge 3.2.B | Lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları arasındaki farklılıklar                                                                                                            | 42    |

## ŞEKİLLER

|            |                                                                                                                                                                                               | Sayfa |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1  | Araştırmada kullanılan rat ve bıldırcınlardan oluşturulan deney grupları.                                                                                                                     | 16    |
| Şekil 3.1  | Kontrol grubuna ait omentum dokusunda lenfoid hücre birikimi, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                                                                            | 20    |
| Şekil 3.2  | Kontrol grubuna ait mezenter dokusunda lenfoid hücre birikimi, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                                                                           | 20    |
| Şekil 3.3  | Kontrol grubuna ait parietal periton dokusunda lenfoid hücre birikimi, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                                                                   | 21    |
| Şekil 3.4  | Periton boşluğuna NaCl verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                     | 22    |
| Şekil 3.5  | Periton boşluğuna NaCl verilen ratların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                    | 23    |
| Şekil 3.6  | Periton boşluğuna NaCl verilen ratların parietal periton örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.                                            | 24    |
| Şekil 3.7  | Periton boşluğuna BSA verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                      | 26    |
| Şekil 3.8  | Periton boşluğuna BSA verilen ratların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.                                                     | 27    |
| Şekil 3.9  | Periton boşluğuna BSA verilen ratların parietal periton örneklerinde uygulamadan 6 saat sonra belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.                                      | 28    |
| Şekil 3.10 | Rat omentum doku kesitlerinde lenfoid hücre birikimi, PAS Reaksiyonu.                                                                                                                         | 28    |
| Şekil 3.11 | Ratlarda omentum, mezenter ve parietal periton örneklerinde plazma hücreleri, Methyl Green Pyronin Boyama Yöntemi.                                                                            | 29    |
| Şekil 3.12 | Ratlarda BSA verilen grupta dokulardaki hücre birikimlerinde mast hücreleri, Toluidin Blue Boyama Yöntemi.                                                                                    | 30    |
| Şekil 3.13 | Periton boşluğuna BSA verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerindeki makrofajlar, Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi. | 31    |
| Şekil 3.14 | Periton boşluğuna NaCl verilen ratların omentum örneklerinde farklı                                                                                                                           | 32    |

|            |                                                                                                                                                 |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|            | zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerindeki makrofajlar, Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi.                      |    |
| Şekil 3.15 | Kontrol grubuna ait omentum dokusunda lenfoid hücre birikimindeki makrofajlar, Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi.         | 33 |
| Şekil 3.16 | Bıdırcınlarda kontrol grubuna ait mezenter dokusunda lenfoid hücre birikimi, Üçlü Boyama Yöntemi.                                               | 35 |
| Şekil 3.17 | Periton boşluğuna NaCl verilen bıdırcınların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi. | 36 |
| Şekil 3.18 | Periton boşluğuna BSA verilen bıdırcınların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.  | 38 |
| Şekil 3.19 | Bıdırcınlarda mezenter örneklerinde belirlenen hücre birikimlerinde mast hücreleri, Toluidin Blue Boyama Yöntemi.                               | 39 |
| Şekil 3.20 | Kontrol grubuna ait omentum dokusunda lenfoid hücre birikimindeki makrofajlar, Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi.         | 40 |



## 1. Giriş

Çok değişik özellikteki binlerce mikroorganizmaya karşı vücudun basit bir savunma mekanizması ile korunamayacağı açıktır, çünkü her mikroorganizmanın özel bir yapısı vardır. Ayrıca vücuda giriş yollarından hastalık oluşturma mekanizmalarına kadar çok farklı özelliklere sahiptirler. Bu nedenle vücut da kendisini savunmak için giriş noktalarındaki basit engellerden farklı hücreleri ve molekülleri kapsayan inanılmaz derecede karmaşık bir sisteme kadar çeşitli yolları kullanır. Bu farklı savunma aşamaları savunma sisteminin temel kavramlarını oluşturmaktadır (Arda ve ark 1994).

Antikor üretimine neden olan ve bu antikorlara spesifik reaksiyon veren maddelere antijen denir. Hücrel bağışıklığı uyaran maddeleri de içine alan immunojen terimi, immun yanıt uyaran maddeler için kullanılır. Ancak yaygın kullanımda, böyle bir ayırım yapılmamakta ve her iki terim eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Özetle, immun yanıt oluşumuna neden olan tüm maddelere antijen veya immunojen denmektedir. Antijen veya immunojen, spesifik bir yanıt oluşturmak üzere lenfositleri uyaran maddeler şeklinde de tanımlanabilir. Bu terimlerle ilişkili olarak; bir maddenin immun yanıt oluşturma yeteneğine antijenite veya immunojenite, bu yeteneğe sahip maddelere antijenik veya immunojenik denir (Diker 1998).

İmmun sistem, doğal (nonspesifik) ve kazanılmış (spesifik) olarak ayrılan iki kısımda incelenebilen bir savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiri ile çok hassas bir denge içerisinde ve yardımlaşma ile çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır (Ellis 2001).

Doğal immunité, vücudun kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı ayırma kapasitesine sahip, patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen savunma sistemidir. Kazanılmış immunité ise antijenle karşılaştığında oluşan, antijene spesifik savunma ve tekrarlanan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma özelliğidir (Janeway ve Medzhitov 2002).

Nonspesifik immunit  elemanları immün sistemin birer parçasıdır. Ancak, antijene özel bir yanıt oluşturamazlar. Vücuda giren mikroorganizmaların antijenlerini ayırt etmeden, tümüne karşı aynı etkiyi gösterirler. Nonspesifik immunit  elemanlarının başlıcaları, doku sıvılarında bulunan bazı moleküller (humoral etkenler) ile dokularda ve doku sıvılarında bulunan hücrelerdir (nötrofil, makrofaj) (Diker 1998).

Kazanılmış immunit  olarak da isimlendirilen spesifik immunit , vücutta hazır olarak bulunmayan, ancak belirli reaksiyonlardan sonra kazanılan bir durumdur. Bağışıklık gerek doğal koşullarda geçirilen enfeksiyonlar ile gerekse yapay olarak uygulanan aşılar ile kazanılır. Ayrıca, bağışıklık immün sistemin aktif olarak çalışması ile kazanılabildiği gibi, önceden hazırlanmış bağışıklık elemanlarını vererek, bir bireyi bağışık hale getirmek de mümkündür. Bu açılardan bakıldığında organizma aktif ya da pasif şekilde bağışıklık kazanılabilir; her iki durumda da doğal veya yapay yolları kullanabilir (Arda ve ark 1994).

### **1.1 İmmün Reaksiyon**

Vücudun yabancı etkenlere karşı gösterdiği tepkilerin tümüne immün reaksiyon (immün yanıt) adı verilmektedir. Doğal engelleri aşan mikroorganizmalar, immün sistemin bir parçası olan hücreler ve moleküllerle karşılaşırlar. Bu mekanizmalarla sağlanan korumaya doğal (nonspesifik) bağışıklık denir. Yabancı etkenler vücuda girdikten sonra hücreler uyarılır, bu etkenlerin moleküllerini özel olarak tanır ve bu etkenlere karşı g  lenirlerse buna da spesifik (kazanılmış) bağışıklık adı verilir. Doğal bağışıklıkta rolü olan hücreler ve moleküller fonksiyonlarını tek başlarına y r tebilmelerinin yanında immün yanıt sırasında spesifik bağışıklığın uyarılmasında da önemli rol oynar ve spesifik bağışıklık elemanları ile birlikte çalışırlar. Spesifik bağışıklık, vücutta hazır olarak bulunmayan, ancak belirli bir reaksiyondan sonra kazanılan bir durumdur (Diker 1998).

Vücut savunması ile direkt yada dolaylı olarak ilişkili hücrelerin tümü, immün sistem hücreleri olarak nitelendirilir. Tüm immün sistem hücreleri pluripotent köken hücrelerden gelişir. Lenfoid sistemden oluşan hücreler lenfositleri, myeloid kökenden oluşan hücreler ise

fagositik hücreleri ve diğer hücre tiplerini oluştururlar (Diker 1998). Lenfoid seride yer alan lenfositler, farklı görevleri yürüten T ve B lenfositlere ayrılırlar. Lenfoid seriye ait diğer bir hücre de doğal öldürücü (natural killer cells) hücrelerdir. Myeloid kökenden oluşan iki temel hücre grubu ise monosit/makrofaj (mononükleer fagositik sistem) ve granülositlerdir (Diker 1998). Spesifik immun yanıtta rol alan hücreler lenfositler ve makrofajlardır.

### **1.1.1. Lenfositler**

Lenfoid seride yer alan lenfositler T ve B lenfositlere ayrılır (Diker 1998). B lenfositler sıvısal (humoral) bağışıklıkta, T lenfositler hücresel bağışıklıktan sorumlu olan hücrelerdir (Aştı 2001).

#### **1.1.1.1. T lenfositler**

Lenfosit olma yönünde uyarılan progenitör hücrelerin (lenfoblast) bir kısmı kemik iliğinden dolaşıma geçerek timusun korteksine göçerler ve hiçbir antijenle temasa geçmeden timustaki retikulum hücrelerinin salgıladığı timopietin, timozin, timositimulin, timik humoral faktörler ile makrofajlar tarafından salgılanan bazı lenfokinlerin etkisiyle bölünüp çoğalırlar ve T lenfositlere farklılaşırlar. Bu farklılaşma sırasında T lenfositler antijenleri tanıma özelliği olan yüzey reseptörleri, ayrıca MHC (major histocompatibility kompleks-doku uyum molekülleri) reseptörleri ve CD (cluster of differentiation) molekülleri ile donanırlar. T lenfositlerin büyük bir bölümü, timusun korteksinde iken pozitif ve negatif seleksiyona uğratarak, makrofajlar tarafından yıkımlanır. Böylece antijenik molekülleri tanıma özelliği kazanırlar ve korteksten medullaya geçerler, dolaşım sistemine girerek immun kompetan hale gelirler. Dolaşım yolu ile sekonder lenfoid doku ve organlara giderler. Buralarda antijenle karşılaşan inaktif immun kompetan T lenfositler, gelişip irileşerek tekrar lenfoblastlara dönüşürler. Lenfoblastlar da bölünüp çoğalarak aktif T lenfositleri meydana getirirler (Aştı 2001).

### **1.1.1.2. B lenfositler**

B Lenfositler T lenfositlerden farklı olarak, hücre membranlarında antijenle direk bağlanabilen immunoglobulin reseptörlerine sahiptirler. Antijenle direkt uyarılabilirler de, etkili bir uyarım için makrofajların ve yardımcı T lenfositlerin salgıladığı lenfokinlerin yardımına gereksinimleri vardır.

B lenfosit yapımı kanatlılarda ve memelilerde farklı organlarda meydana gelmektedir. Kanatlılarda B lenfositler, Bursa Fabricius denilen kloakaya bağlı bir primer lenfoid organda gerçekleşir. Memelilerde ise kırmızı kemik iliğinde yapılır (Aştı 2001).

Kanatlılarda kırmızı kemik iliğinden ayrılan bir kısım lenfoblast Bursa Fabricius'a yerleşir. Burada bölünüp çoğalarak inaktif B lenfositlere farklılaşırlar. Bu organdan dolaşıma geçip dalak ve barsaklara giderek, bu organlardaki lenf foliküllerine yerleşirler. Memelilerde ise kırmızı kemik iliğinden farklılaşan inaktif B lenfositler yine aynı organlara gelir ve foliküllere yerleşirler. İnaktif B lenfositlerle donanan ve orta kısımları da periferleri gibi koyu görünüşte olan lenf foliküllerine primer lenf folikülleri denir. Doğumdan sonra organizmaya antijenler girince primer lenf folikülleri de bundan etkilenir ve foliküllerin ortalarında sentrum germinativum denilen, periferden daha soluk görünüşlü merkezler şekillenir. Bu kısımlarda bulunan inaktif B lenfositler antijenle karşılaşarak aktifleşip irileşirler ve tekrar lenfoblastlara dönüşürler. Şekillenen lenfoblastlar üst üste bölünerek sayılarını arttıırırlar ve bunlardan bir bölümü, önce foliküllerin periferlerine, oradanda medullar kordonlara geçerken farklılaşmalarına devam ederler. Önce proplazmasit ardında plazma hücresi olurlar (Aştı 2001).

### **1.1.2. Mononükleer fagositik sistem**

Mononükleer fagositik sistem, monositlerden köken alan makrofaj adı verilen hücreleri kapsar. Bu hücreler mononükleer fagosit olarak da adlandırılır. Makrofajlar benzer hücre organellerine, ortak fonksiyonlara ve tek bir kökene sahip olmalarına rağmen, vücutta değişik dokulara dağılmış halde bulunurlar ve bulundukları dokuya göre farklı isimler alırlar (Diker 1998).

#### **1.1.2.1. Makrofajlar**

Mononükleer fagositik sistemin bütün hücreleri, monoblastlar denen kemik iliği hücrelerinden köken alırlar. Koloni uyarıcı faktör (coloni stimulating factor-CSF) adı verilen sitokinin etkisi ile monoblastlar promonositlere, promonositler de monositlere dönüşür. Bu olaylar kemik iliğinde gerçekleşir. Kemik iliğinden ayrılan monositler kana geçer ve dolaşımda yaklaşık üç gün bulunurlar (periferal kandaki lökositlerin %5'i monositlerdir). Bu sürenin sonunda monositler kandan ayrılarak çeşitli dokulara yerleşirler ve olgun makrofaj halini alırlar. Makrofajlar yerleştikleri dokularda bölünerek de çoğalabilirler (Diker 1998).

Farklı dokularda veya organlarda bulunan makrofajlar çeşitli isimler alırlar ve bulundukları ortama veya fonksiyonlarına göre gruplandırılabilirler (Çizelge 1).

Çizelge 1.1. Mononükleer fagositik sistem hücreleri

| <b>Makrofaj</b> | <b>Bulunduğu doku</b> |
|-----------------|-----------------------|
|-----------------|-----------------------|

|                                                                                                             |                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Doku yerleşik makrofaj</b><br>Histiosit<br>Mikroglia<br>Mezengial Hücre                                  | Bağ doku<br>Beyin<br>Böbrek                          |
| <b>Sinus yerleşik makrofaj</b><br>Dalak makrofajı<br>Lenf nodülü makrofajı<br>Kupffer hücresi<br>Osteoklast | Dalak<br>Lenf nodülü<br>Karaciğer<br>Kemik           |
| <b>Serbest makrofaj</b><br>Alveolar<br>Peritoneal<br>Serozal                                                | Akciğer alveolu<br>Periton boşluğu<br>Serozal boşluk |
| <b>Antijen sunan hücre</b><br>Langerhans<br>Foliküler<br>İnterdigital                                       | Deri<br>Lenfoid doku<br>Lenfoid doku                 |
| <b>Aktif makrofaj</b><br>Epiteloid hücre<br>Dendritik hücre                                                 | Katı dokular<br>Katı dokular                         |

Doku yerleşik makrofajlar: Bu grupta bulunan hücreler arasında, bağ dokuda histiositler, beyinde mikroglia hücreleri ve böbrekte mezengial hücreler sayılabilir. Bu hücreler bulundukları dokunun içinde yayılmışlardır.

Sinus yerleşik makrofajlar: Bu gruptaki makrofajlar sinüzoidal yapıya sahip dalak, lenf nodülü, kemik iliği ve karaciğer gibi organların sinusları boyunca yerleşmişlerdir. Dalak ve lenf nodülü sinus makrofajları özel bir isim almazken, karaciğerde bulunanlara Kupffer'in yıldız hücreleri, kemik iliğinde bulunanlara osteoklast adı verilir.

Serbest makrofajlar: Herhangi bir doku içine yerleşmemiş, vücut boşluklarında veya serozal yüzeylerde bağımsız olarak bulunan hücrelerdir. Akciğer alveollerinde bulunanlara alveolar makrofaj, periton boşluğunda bulunanlara peritoneal makrofaj adı verilir. Serozal boşluklarda bulunan hücrelerin tümü için serozal makrofaj genellemesi de yapılabilir.

Antijen sunan hücreler: Makrofajların tümü antijen sunma işlemini yapabilirse de, bazıları bu işi diğerlerinden çok daha etkili şekilde yaptıkları için antijen sunan hücreler

(APC) grubuna girerler. Antijen sunma işi için özelleşmiş mononükleer seri hücrelerine dendritik hücre denir. Bu hücrelerin deride bulunanlarına Langerhans hücreleri, lenfoid dokuda bulunanlarına foliküler dendritik hücre ve interdigital dendritik hücre şeklinde özel isimler verilir.

Epiteloid hücreler: Dokularda bulunan makrofajlar yan yana dizilimleri sonucunda epitel hücresine benzer bir şekil alabilir. Yabancı bir partikülün dokuda uzun süre bulunmasına bağlı olarak şekillenen bu yeni makrofaj formuna epiteloid hücre denir. Eğer partikül büyürse, epiteloid hücreler arasında membranlar birleşerek çok çekirdekli dev hücreler oluşur (Diker 1998 ).

## **1.2. Mukozal Yüzeylerdeki Lenfoid Dokular**

Vücut savunmasındaki önemlerinden dolayı, mukozal yüzeylerde çok miktarda lenfoid doku bulunur. Mukozal yüzeylerdeki bazı lenfoid dokular, immun yanıtı gerçekleştirebilmek için gerekli tüm elemanlara (makrofajlar, T-hücreleri ve B-hücreleri) sahiptirler. Bu dokular arasında farinksteki tonsiller, barsaktaki Peyer plakları, lokal lenf düğümleri, appendiks ve akciğerdeki lenfoid düğümler sayılabilir. Barsaktaki lenfoid düğümler, Peyer plakları ve serbest lenfositlerin ortak adı GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue-barsak ilişkili lenfoid doku ), akciğerdeki bronşlarla ilgili lenfoid dokunun ortak adı BALT (Bronchus Associated Lymphoid Tissue- bronş ilişkili lenfoid doku) olarak adlandırılır. Vücuttaki tüm mukoz membranlarda bulunan lenfoid dokular ise MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue-mukoza ilişkili lenfoid doku) olarak adlandırılır (Diker 1998).

Mukozal lenfoid dokular fonksiyonlarına göre iki kategoride incelenebilir. Bunlar antijenlerin işlendiği ve immun yanıtın başladığı uyarıcı odaklar ve antikörlerin üretilip hücresel bağışıklığın geliştiği efektör odaklardır (Diker 1998). Uyarıcı lenfoid odaklar, lenf nodüllerinin aksine antijeni afferent lenf dolaşımından değil, doğrudan mukoz membranların lumeninden alırlar. Tüm bu lenfoid dokular, kısmende olsa, sistemik immun sistemden bağımsız olarak çalışırlar. Mukozal yüzeylerde uyarılmış B lenfositler, barsağın lenfoid dokusu arasında, hatta solunum sistemi, meme ve salgı bezleri arasında dolaştığı için, bunlar

mukozal immun sistemin bir parçası olarak da kabul edilirler. Mukozal lenfoid dokuların en önemlisi Peyer plaklarıdır. Ruminantlarda fonksiyonel olarak iki tip Peyer plağı vardır. İleumda bulunan plaklar doğumdan altıncı aya kadar büyürler ve daha sonra küçülerek sadece bir iz halini alırlar. Jejunumda bulunan plaklar ise tüm hayvanlarda yaşam boyunca kalırlar. Barsağın savunmasında jejunal Peyer plaklarının önemli rolü vardır. Peyer plakları foliküller şeklinde organize olmuş lenfositler kümelerinden oluşmuştur. Bu plakların üzeri, M hücreleri olarak adlandırılan özel epitel hücrelerini de içeren bir epitel tabakası ile kaplanmıştır. M hücreleri antijen işleyen hücrelerdir ve barsak lümeninden aldıkları partiküler antijenleri doğrudan yardımcı T lenfositlere veya intraepitelyal lenfositlere (IEL) sunarlar. Diğer uyarıcı odaklar, lenfosit kümelerinden oluşan ve tüm mukoz membranlara yayılmış lenfoid düğümlerdir (Diker 1998).

Tavuklar da lenfatik dolaşım ile bağlantılı lenfoid foliküller bulunur. Bunlar baş lenfoid dokusu (HALT-Head Associated Lymphoid Tissue-baş ilişkili lenfoid doku), bronş-ilişkili lenfoid doku (BALT) ve barsak-ilişkili lenfoid dokudur (GALT). Barsak-ilişkili lenfoid dokunun bir kısmı sekal tonsillerde ve Peyer plaklarında organize olmuştur. Tavuklarda ayrıca, lenf damarları boyunca yayılmış mural nodüller bulunur (Diker 1998).

### **1.3. Karın Boşluğu**

Periton, vaskülarize konnektif dokunun desteklediği, tek sıra mezotel hücrelerinin bazal membran üzerinde sıralanmasıyla oluşan seröz bir zardır. Abdomenin iç yüzünü ve içindeki organları saran periton, visceral ve parietal olmak üzere iki yapraktan oluşmaktadır. Karın boşluğunun duvarlarını saran parçasına parietal periton, karın organlarını saran parçasına da visceral periton denir. Periton abdomenin iç yüzeyini, diyafragmatik, retroperitoneal ve pelvik yüzeyleri kaplar ve böylece peritoneal kavite oluşur. Peritonun bağırsakları sararak karın boşluğunun tavanına asan bölümüne de mesenterium adı verilmektedir (Öcal ve ark 1999).

Periton karın ön duvarından karaciğerin ön yüzüne uzanır ve bu organı sarar. Bu şekilde karaciğeri saran periton, birleşik iki yaprak halinde midenin curvatura minörüne ve



duodenuma doğru uzanarak; mide, karaciğer ve duodenum arasında omentum minusu oluşturur. Daha sonra mide ve duodenumu sarar ve midenin curvatura ventriculi majorundan itibaren omentum majus olarak geriye doğru symphysis pubis hizasına kadar uzanıp, dalak ve colon transversuma yapışarak sonlanır. Ratlarda omentum majus üzerinde yayılmış doku parçaları şeklinde pankreas görülür (Chiasson 1994).

Omentum peritoneal boşlukta immun savunmada oldukça önemli bir yere sahip olup, 300 - 2000 gr ağırlığında ve 300 - 1500 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahiptir (Platell ve ark. 2000). Omentum majus, mide borusunun dorsalinde gebeliğin 8. haftasında gelişmeye başlar. Gevşek bağ dokuda genellikle yağ dokuya gömülmüş mononükleer fagositik hücre kümeleri ve iki mezotelyal tabakadan oluşmaktadır (Platell ve ark 2000).

Mezotelyum üç serozal boşluğu (pleura, periton, perikard) ve erkeklerde testisi çevreleyen keseyi (periorchium) kaplar. Vücut duvarını çevreleyen mezotelyuma parietal mezotelyum, iç organları kaplayan mezotelyuma visseral mezotelyum denilmektedir. Rat, fare, köpek, hamster, tavşan, at ve insanlar dahil olmak üzere memelilerde yapılan çeşitli morfolojik çalışmalarda, küçük istisnalar dışında, mezotelyumun anatomik yer veya tür gözemeksizin, küçük farklılıklarla birlikte benzer olduğu ortaya konmuştur (Gaudio ve ark 1988, Mutsaers 2002).

Vücudun anatomik boşluklarında (periton, pleura, perikard gibi) kanın diyalizinden kaynaklanan seröz bir sıvı bulunur. Bu sıvının kimyasal özellikleri, kanda bulunan maddelerin konsantrasyonları ve membran permeabilitesi gibi faktörlere bağlıdır. Normalde protein konsantrasyonları kandan düşük ve volümleri az olan bu sıvıların başlıca fonksiyonları, organların çalışması sırasında yeterli ıslaklık ve kayganlığı sağlayarak, çalışmalarını kolaylaştırmaktır (Turgut 2000). Mezotelyum, sadece sınırlandırıcı ve koruyucu bir tabaka değil aynı zamanda organların yapışmadan korunabildiği serozal mekanizmayı düzenleyen dinamik yapılardır (Mutsaers 2002).

Mezotelyumun iki ana fonksiyonu vardır. Bunlardan birincisi koruyucu bir bariyer olması diğeri ise organ ve dokuların, ara yüzeylerde birbirlerine sürtünmeden, serbest hareket etmelerini sağlamaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, mezotel hücrelerinin hücre

transportunda, mezotel hücreleri tarafından salgılanan maddelerin ise doku tamirinde, yangının kararlılığında önemli roller aldığı, fibrin birikimini engellediği, mikroorganizmaların hücumuna ve olası tümör yayılmalarına karşı koruyucu bir görev aldığı belirlenmiştir (Mutsaers 2002). Mezotel hücrelerinin interselüler adezyon molekülleri (ICAM-1) yardımı ile profesyonel olmayan antijen sunumunda görev aldıkları da bildirilmiştir (Hausmann ve ark 2000).

Von Recklinghause, 1863'te iki veya daha fazla mezotel hücresi arasındaki bağlantılarda bulunan boşlukların yani stomatanın varlığını tanımlamıştır. Araştırmacı, stomataların seröz boşluklarda partiküler materyallerin ve sıvının hareketine izin verdiğini ileri sürmüştür. Stomataların pleural ve peritoneal boşluklar arasında direkt bağlantı sağladığı ileri sürülebilir (Mutsaers 2002).

Pleural, perikardial ve peritoneal infeksiyonlarda, serozal yüzeylerde oluşan yangıda, olgun lökositler bu kısımlara gönderilir (Mutsaers 2002). Topley ve ark (1996) lökositlerin yangı bölgesine salınımının dört temel olayla meydana geldiğini belirtmektedirler.

1. Lökosit hücrelerinin aktive olabileceği bir aktivasyon bölgesine ihtiyaç vardır.
2. Bu bölgeye salınan hücreler aktive olur ve cevap üretirler.
3. Yangı bölgesine direkt olarak lökositler kemotaksik yolla da gidebilirler.
4. Adhezyon molekülleri, lökositlerin serozal alanlar içine salınımını, göçünü ve bu bölgede aktive olarak değişmelerini kapsayan mekanizmayı kontrol altında tutup düzenlerler.

Önceleri, serozal yangının mezotel hücrelerinden kemokinlerin serbest kalmasıyla aktive olduğu sanılmaktaydı. Kemokinlerin sekresyonu mezotel hücrelerinin bazolateralinden apikale doğru polarizedir. Mutsaers (2002)'in bildirdiği çalışmalarda, nötrofil ve monositlerin bu yolu takip ettikleri görülmekte ve tek tabakalı mezotel hücrelerinin stomata denilen açıklıkları arasından veya üzerinden geçmektedirler. Polarize bölgelerdeki kemokinlerin salgılanması mezotel hücrelerinde hem nötrofil hem de monositlerin direkt bir şekilde transmezotelyal göçünü arttırdığını göstermektedir (Mutsaers 2002).

Hausmann ve ark (2000) APC'lerin yokluğunda insan mezotel hücrelerinin, yardımcı T lenfositlerin çoğalmasını indüklemek amacıyla IFN- $\gamma$  salgıladıklarını göstermişlerdir. Mezotel hücrelerinde IFN- $\gamma$  uygulamasını takiben yüksek seviyede ICAM-1 belirlenmiştir. Bunun yanında B7-1 ve B7-2 molekülleri tespit edilmemiştir. Mezotel hücrelerinin antijen sunmaları için esas yardımcı molekülünün ICAM-1 olduğu belirtilmiştir.

Mezotel hücrelerinin IFN- $\gamma$  aktivasyonu ile IL-15 üretimi indüklenebilir. IL-15, T hücrelerinin artışı gibi hücrelerin aracılık ettiği immunité mekanizması ile ilgili bir sitokindir. Buna ilaveten IL-2 ile yardımlaşarak immün yanıtın başlatılmasında da görev alır (Mutsaers 2002).

Peritoneal boşlukla bağlantılı bir çok özelleşmiş savunma mekanizması vardır. Bunlar peritondan bakteri ve toksinlerin absorpsiyonu, fagositoz, opsonizasyon, komplement aktivasyonu ve peritoneal boşluktan infeksiyonun ayrılmasıdır. GALT ve PALT (Peritoneum associated lymphoid tissue-periton ilişkili lenfoid doku) peritoneal boşluğun savunmasında çok önemli rol oynarlar. İmmün sistemin birçok hücreleri arasında mast hücreleri gamma delta T lenfositlerin peritoneal boşluktaki savunma mekanizmasının başlatılması ve düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. T lenfositler (gamma delta) peritonitiste koruyucu rol oynayan sitokin ve kemokinleri salgırlar. Bu sitokinlerden özellikle IFN-gamma makrofajları aktive ederek birçok proinflammator sitokin ve faktörleri salgırlar. Diğer yandan mast hücreleri TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha, tümör nekrozis faktör alfa) ile peritoneal boşluğun savunmasında rol alırken, histamin bırakarak fibrinolizisi engellerler (Szczepanik ve ark 1999)

Peritoneal boşluk içerdığı sabit ve göç eden hücre popülasyonlarıyla bakteriyel invazyona karşı lokal savunma yanıtında çok önemli rol oynar. Peritoneal boşluğun sağlığı için mononükleer fagositler predominant iken son zamanlarda dikkat mezotelyal ve dendritik hücrelere odaklanmıştır (Broche ve Tellado 2001)

Cui ve ark (2002)'nin yaptıkları bir çalışmada peritoneal boşlukta bulunan omentum majustaki milky spotlarda lökositlerin ve mezotel hücrelerindeki hücre adezyon moleküllerinin (CAMs) lokalizasyonunu immunolojik olarak incelemişler, omental milky spotların lökosit göçü için aktif yerler olduğunu, milky spotlardaki mezotelyal hücrelerde

ICAM-1'in seviyesinin diğer omental bölgelerden oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Cui ve ark 2002).

#### **1.4. Milky Spot**

Omentumda damarların çevresinde lökosit birikimleri yer alır ki bunlar milky spot olarak adlandırılırlar. Bu yapılar ilk olarak 1874 yılında Fransız anatomist Ranvier tarafından tanımlanmıştır (Van Vught ve ark 1996). Hücreler mononükleer fagositik sistemden köken alırlar (Wijffels ve ark 1992) ve mezotelin altında uzanan omental glomerilusların etrafında birikirler (Shimotsuma ve ark 1993). Bu yapılar zayıf retikular bir ağ ile desteklenirler (Shimotsuma ve ark 1989).

Milky spotlardan peritoneal boşluk içine hücrel göç submezotelyal bağ dokuda bazal laminanın bulunmamasından dolayı kolaylaşmıştır. Bu yüzden, hücrelerin milky spotlardaki interstisyel alanlardan göçü, interselüler boşluklarla mezotelyal hücreler arasındaki fibröz bariyerlerden içeriye süzülmesiyle olmaktadır (Cranshaw ve Leak 1990).

Milky spotlarda bulunan makrofajların, peritoneal boşluklardaki mikroorganizmalar ve özellikle de tümör hücrelerinin temizlenmesinde, karın boşluğunda yapılan cerrahi müdahaleler sonucunda oluşan peritonitis ve bakteriyel enfeksiyonların iyileşmesinde önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Van Vught ve ark 1996).

Ratlarda milky spot'ların %70'ini makrofajlar, %13-14'ünü T ve B lenfositler, geri kalan kısmını da mast hücreleri (Di Paolo ve Sacchi 2000) ve stromal hücreler oluşturmaktadır (Krist ve ark 1995, Platell ve ark 2000). Milky spotların immun merkezlere yardımcı ya da periton boşluğunda lenfoid organlar gibi görev yaptıkları düşünülmektedir (Mutsaers 2002).

Milky spotları insan ya da hayvanlarda çıplak gözle görmek mümkün değildir. Hayvanlarda %5'lik aktif kömür solüsyonunun intraperitoneal enjeksiyonundan 20-30 dakika sonra abdomende, operasyon mikroskobu ile 0,1-2,0 mm büyüklüğünde siyah lekeler halinde

gözlemlemek mümkündür. İnsanlarda ise aynı yöntemler kullanılarak sadece omentumda gözlenmiştir. Çalışmalarda esteraz tabanlı gümüşleme teknikleri kullanılarak işaretlenmiş ve tanımlanmıştır (Shimotsuma ve ark 1989).

Ultrastruktural olarak incelendiğinde milky spotlara giren veya ayrılan makrofajların olgunlaşma sürecinin farklı aşamalarında olduğu görülmüştür (Zhu ve ark 1997). Omentumdaki olgunlaşmış makrofajlar kemik iliğinden türeyen öncü makrofajlara bağlı olmayan ve milky spotlardaki öncü monositik hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan hücrelerdir. Bunlar dendiritik şekilli ve fagositik karakterlidirler. İntraperitoneal olarak enjekte edilen karbon partiküllerini ve bakterileri etkili bir şekilde fagosit ederler. Aktive olduğu zaman milky spotlarda öncü makrofajlar çoğalırlar, mezotelyal yüzeye göç ederler ve dendirik şekilli makrofajlara dönüşürler. Omental makrofajların dendirik biçimleri, gerçek dendiritik hücrelerin özel şekillerine göre farklılık içerir (Platell ve ark 2000).

Bir diğer çalışmada ise Wijffels ve ark (1992) öncü makrofajların antijenlerini tanıyan monoklonal antikör grupları kullanılarak milky spotları araştırmışlardır. Bu çalışmada milky spotlarda monoblastlar gibi, mononükleer fagosit sisteme (Mononuclear Phagocytic System-MPS) uygun olan hücrelerin öncülerini, ultra yapısının temelinde endojen peroksidaz içeren hücrelerin oluşturduğu bildirilmektedir. Öncü makrofajların antijenleri ER-MP12 ve ER-MP 58'in yalnızca bu milky spotların içine lokalize olan makrofajlarda olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, makrofaj farklılaşma esnasından sonra antijenin yok olduğu, ER-MP20'nin milky spotların hem içinde hem de aralarında yüksek miktarda olduğu bildirilmiştir. Açıkça bu makrofaj öncülerinin milky spotların iç kısımlarında merkezi olarak lokalize olduğunu, farklılaşan hücrelerin ise periferik alanlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Wijffels ve ark 1992). Milky spotların peritonda güçlü bir şekilde antijenlere karşı tepki gösterdikleri bilinmekte, fakat kesin fonksiyonları tam olarak açıklanamamaktadır (Van Vugt ve ark 1996).

Bir milky spottaki hücrelerin sayısı yaklaşık olarak 600 tanedir. Omentum majustaki milky spot denilen bu özel yapılar insanlarda gebeliğin 20. ile 35. haftaları arasında gelişir. Milky spotların sayıları bebeklerde yüksekken gittikçe azalmaya başlar (Platell ve ark. 2000).

Ratlarda kan damarlarından zengin olan omentumun kapilar damarları etrafında milky spotlara bolca rastlandığı bildirilmektedir (Wijffels ve ark 1992, Van Vugt ve ark 1996, Hekking ve ark 2001)

Kanatlı hayvanlarda omentum bulunmamaktadır. Bıldırcınlarda ise karın boşluğunda lokal savunma odaklarının araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

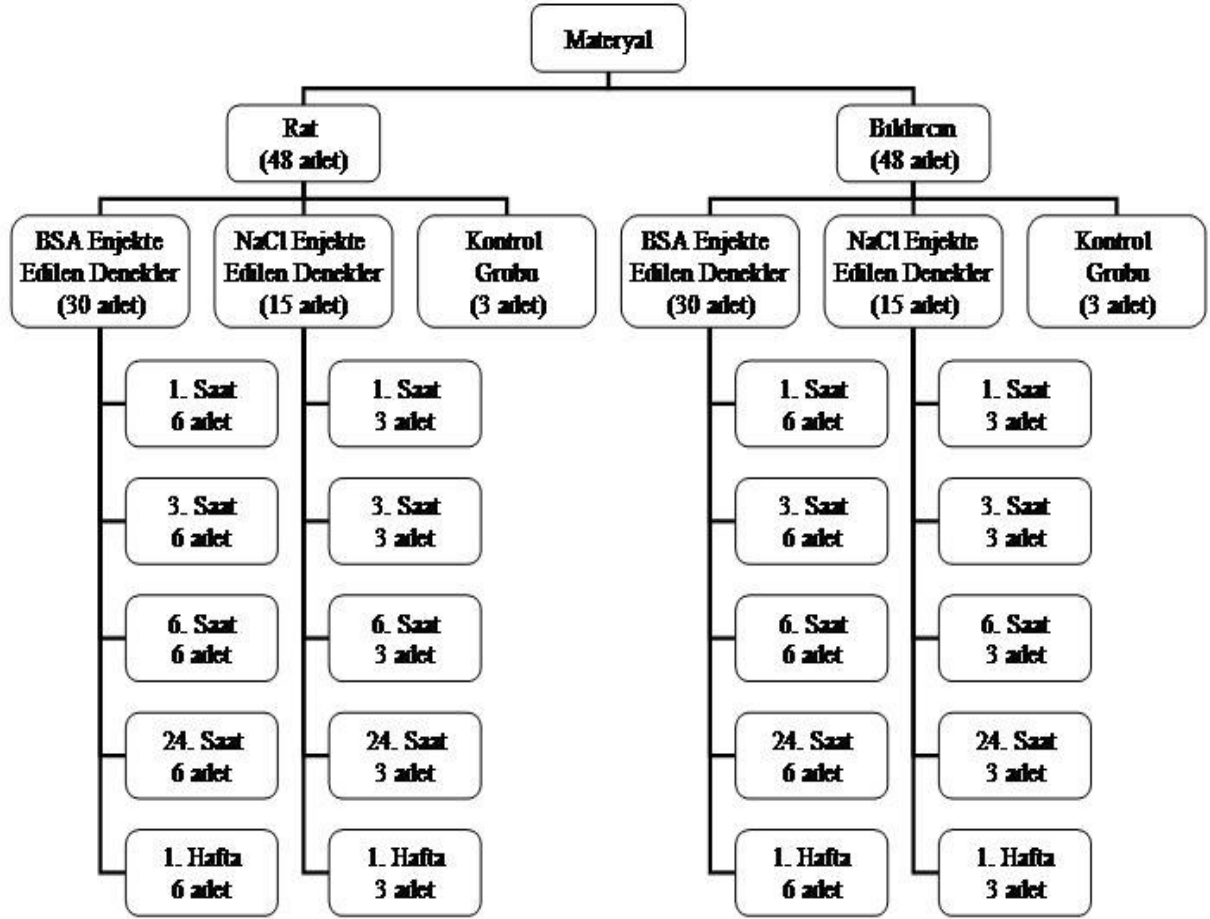
Sunulan çalışmada rat ve bıldırcında olası savunma odaklarının araştırılması ve farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla histolojik, histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerin kullanılması, verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek bulgular, karın boşluğuna ait savunma reaksiyonları ile ilgili araştırmalar ve tedavi yöntemlerinde gerekli olan temel bilgi birikimine katkı oluşturacaktır.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

## 2.1. Gereç

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan 48 adet 8 haftalık erişkin erkek Wistar rat ve Adnan Menderes Üniversitesi Kanatlı Araştırma Birimi'nden sağlanan 48 adet 8 haftalık Japon bıldırcını (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı. Rat ve bıldırcınlar araştırma süresince 12 saat aydınlık/karanlık ortamda *ad libitum* su ve yem ile beslendi. Araştırmada rat ve bıldırcınlar üçer gruba ayrılarak, birinci grupta otuzar hayvan, ikinci grupta ise onbeşer hayvan kullanıldı (Şekil 2.1). Birinci gruptaki hayvanlara intraperitoneal olarak, 0.1 ml % 0.9 NaCl'de 80 mg BSA (Bovine serum albumin-BSA-Sigma) eritilerek hazırlanan stok solusyondan, 80 mg/kg (Gedah ve ark., 2002) olacak şekilde enjekte edildi. Aynı işlem ikinci grup olan ratlara aynı oranda sadece % 0.9 NaCl verilerek gerçekleştirildi.

BSA enjekte edilen grupta enjeksiyondan 1, 3, 6, 24 saat ve bir hafta sonra, her seferinde altışar adet hayvan öldürülerek, bıldırcınlarda parietal periton, mezenter; ratlarda parietal periton, mezenter ve omentum majus örnekleri toplandı. Aynı işlem %0.9 NaCl verilen grupta da her defasında üç hayvanda gerçekleştirildi. Rat ve bıldırcınlarda herhangi bir uygulama yapılmayan üçüncü gruptan (kontrol grubu) da üçer hayvandan doku örnekleri alındı.



Şekil 2.1. Araştırmada kullanılan rat ve bıldırcınlardan oluşturulan deney grupları



## **2.2. Yöntem**

Deney süresi sonunda sekiz haftalık rat ve bıldırcınlar bir gece öncesinden aç bırakıldı. Ksilazine (Alfazyne %2, 4 mg/kg, Ege-Vet®) + ketamine (ketamin %10, 80 mg/kg, Bremer/Farma) anestezi ile ötenazi uygulanan hayvanlardan alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu nötral formalin ile tespit edildi. Rutin doku takibi işlemlerinden sonra dokular parafinde bloklandı.

### **2.2.1. Histolojik ve histokimyasal yöntemler**

Hazırlanmış bloklardan 50 µm ara ile 6 µm kalınlığında seri kesitler alınarak aşağıdaki histolojik ve histokimyasal boyama metotları uygulandı (Culling ve ark 1985).

1. Genel histolojik inceleme için Mallory'nin modifiye ettiği üçlü boyama tekniği,
2. Bazal membranın belirlenebilmesi için Periodic Acid Schiff (PAS) reaksiyonu,
3. Plazma hücrelerinin belirlenmesi için Metyl Green Pyronin boyama metodu,
4. Mast hücre demonstrasyonu için Toluidin blue (pH:2,5) boyama metodu

### **2.2.2. İmmunositokimyasal yöntem**

Ratlarda ve bıldırcınlarda makrofajların demonstrasyonu için strept avidin-biotin peroksidaz kompleks boyama yöntemi uygulandı.

BSA verilen grupların doku örneklerinden (ratlarda; omentum, mezenter ve parietal periton, bıldırcınlarda; mezenter ve parietal periton) hazırlanmış bloklardan 50 µm ara ile 6 µm kalınlığında alınan kesitler organasilan ile kaplanmış lamalar üzerine alındı. Kesitler 37 °C'de bir gece inkübe edildi. İki kez beşer dakika ksilolde, iki kez üçer dakika saf alkolde, bir dakika %96'lık ve %80'lik alkollerde tutuldu. Kesitler 37 °C'lik nemlendirilmiş etüvde 37 °C'ye getirilmiş distile suyun içinde beş dakika bekletildi. Daha sonra yine 37 °C'lik etüvde

antijenik bölgeleri açmak için 30 dakika proteaz içinde bekletildi. Proteolitik uygulamadan sonra oda ısısına getirilen kesitlere strept avidin-biotin peroksidaz kompleks yöntemi uygulandı. Monoklonal antikor olarak ratlarda, Pan macrophage (1:1000 oranında PBS ile sulandırılmış GTX15637, GeneTex), bıldırcınlarda ise monoklonal [KSK 001-02] MHC II beta (1:1000 oranında PBS ile sulandırılmış ab23488, Abcam) kullanıldı. Sekonder antikor olarak Strept ABCompleks/HRP Duet Mouse/Rabbit (K0492 Dako) kullandı. İmmunperoksidaz aktivitesi 3,3'-di-aminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB) (0,05 mg/ml, Sigma) 0,05 M pH 7,6 olan Tris tamponda çözündürüldü. Devamında %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den eklendi. Bütün kesitler zıt boya olan Haris Hematoksilen ile boyanarak faramount (Dako-Lot:2332) ile kapatıldı.

### **2.2.3. Lenfoid hücre birikimlerinin alanlarının hesaplanması**

Hazırlanan seri kesitlerden ratlarda omentum kesitlerinde 12 ve bıldırcınlarda mezenter kesitlerinde altışar lenfoid hücre birikiminin alanı, X40'lık büyütme kullanılarak görüntü analiz sistemi (Leica DMLB araştırma mikroskobu ve DC 200 CCD kamera ile Q Win Standart görüntü analiz programı) yardımıyla interaktif yolla hesaplandı.

### **2.3. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows 10.0) hazır paket programı kullanıldı. Deney gruplarında saatler arası farklılık, herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu sıfıncı saat kabul edilerek, tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA), farkların önem kontrolü ise Duncan testi ile yapıldı.

NaCl ve BSA verilen deney grupları arasındaki farklılık her saat için ayrı olmak üzere Simple T test'i ile belirlendi.

### **3. BULGULAR**

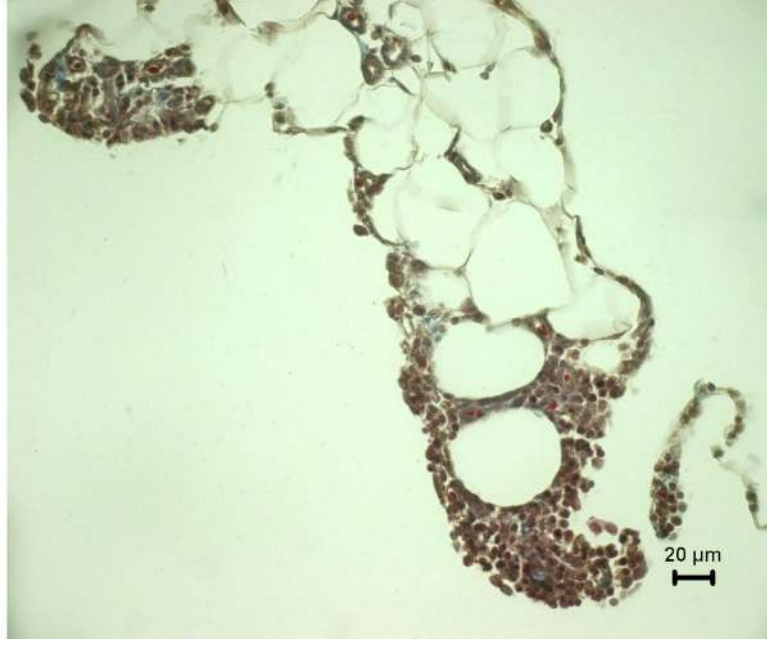
Karın boşluğunda lokal savunma odakları ratlarda omentum, mezenter ve parietal peritonda, bıldırcınlarda ise mezenter ve parietal peritonda arandı. Ratlarda omentum, mezenter ve parietal peritonda; bıldırcınlarda ise sadece mezenterde lenfoid hücre birikimleri halinde lokal savunma odaklarına rastlandı.

#### **3.1.Ratlarda Lenfoid Hücre Birikimleri**

##### **3.1.1. Histolojik bulgular**

Kontrol grubu ratların omentum örneklerinde lenfoid hücre birikimleri (milky spot) mikroskopik olarak incelendiğinde belirgin bir kapsül ile sarılı olmadıkları, kapilar damarların bulunduğu, az miktarda bağ doku içermekle birlikte bünyelerinde yağ hücreleri içerdikleri gözlemlendi. Boyutlarının yaklaşık  $12193,42 \pm 25 \mu\text{m}^2$  olduğu belirlendi (Çizelge 3.1) (Şekil 3.1).

Mezenter ve parietal periton örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine az sayıda ve daha küçük boyutlarda rastlandı (Şekil 3.2, Şekil 3.3).



Şekil 3.1 Kontrol grubuna ait omentum dokusunda lenfoid hücre birikimi,  
Üçlü Boyama Yöntemi

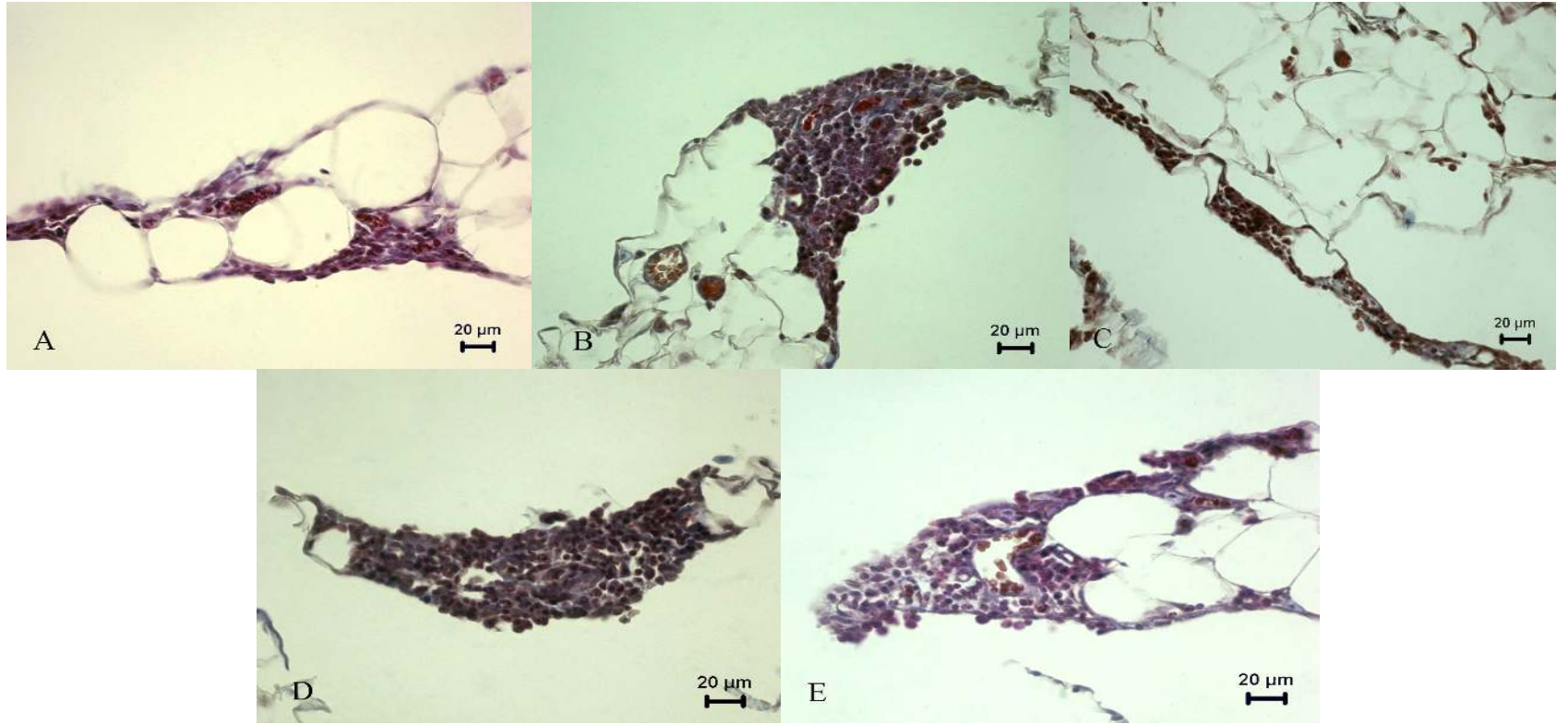


Şekil 3.2 Kontrol grubuna ait mezenter dokusunda lenfoid hücre birikimi,  
Üçlü Boyama Yöntemi.

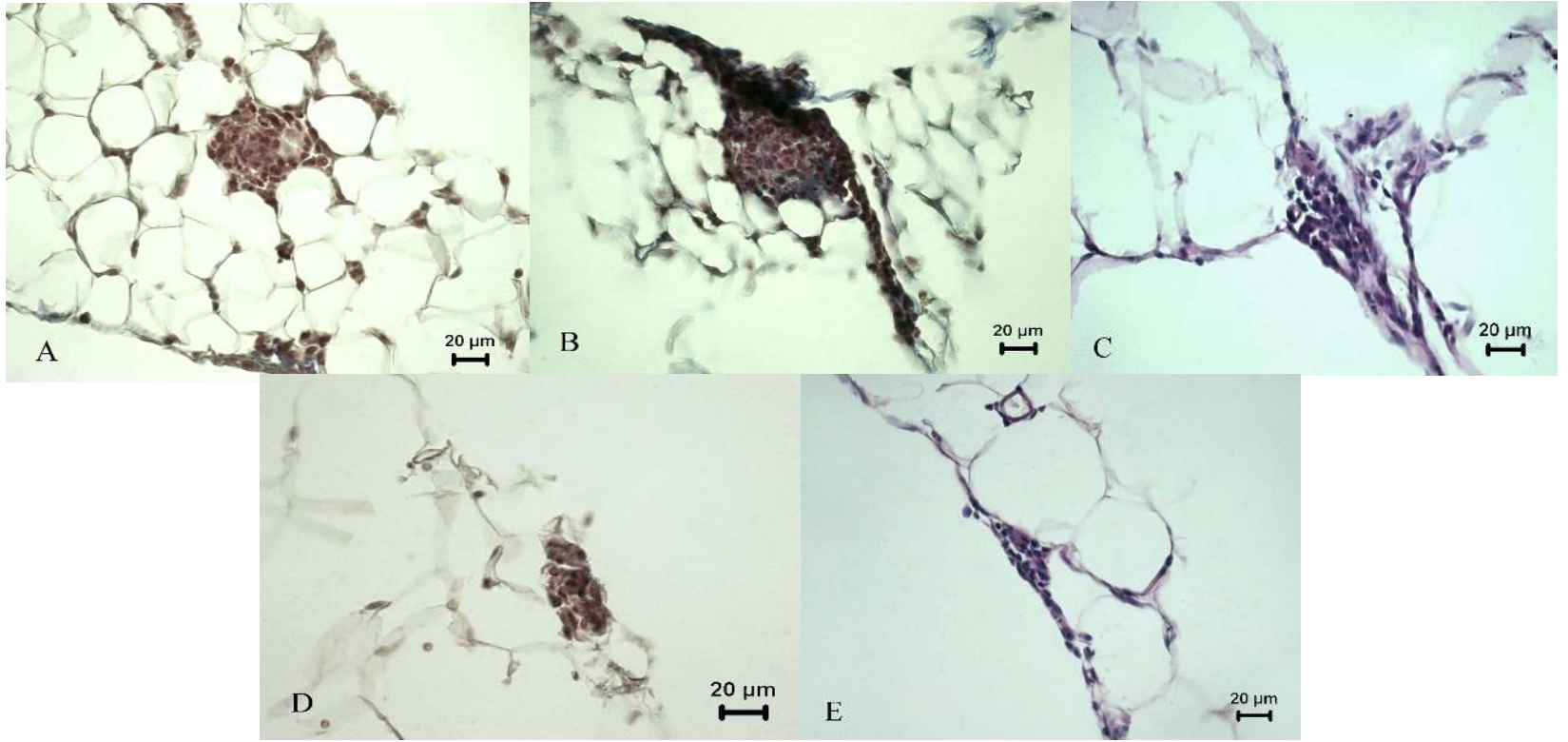


Şekil 3.3 Kontrol grubuna ait parietal periton dokusunda lenfoid hücre birikimi, Üçlü Boyama Yöntemi.

Periton boşluğuna % 0.9'luk NaCl verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerinin (Şekil 3.4) boyutları Çizelge 3.1'de gösterildi. Mezenter ve parietal periton örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine az sayıda ve daha küçük boyutlarda rastlandı (Şekil 3.5, Şekil 3.6).

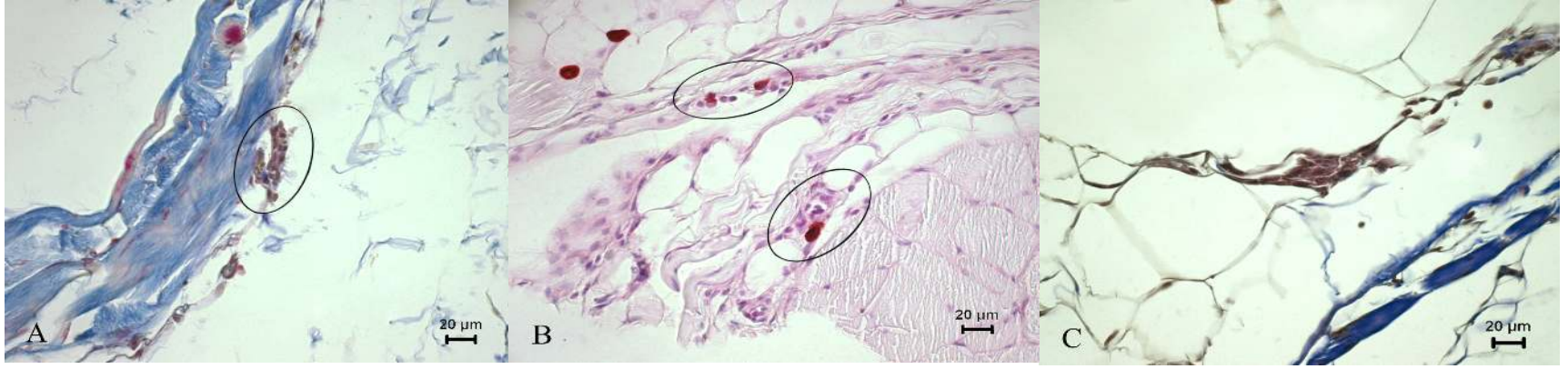


Şekil 3.4 Periton boşluğuna NaCl verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, B: Uygulamadan 3 saat sonra, C: Uygulamadan 6 saat sonra, D: Uygulamadan 24 saat sonra, E: Uygulamadan 1 hafta sonra lenfoid hücre birikimi görüntüleri, Üçlü Boyama Yöntemi.



Şekil 3.5 Periton boşluğuna NaCl verilen ratların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, B: Uygulamadan 3 saat sonra, C: Uygulamadan 6 saat sonra, D: Uygulamadan 24 saat sonra, E: Uygulamadan 1 hafta sonra lenfoid hücre birikimi görüntüleri, Üçlü Boyama Yöntemi



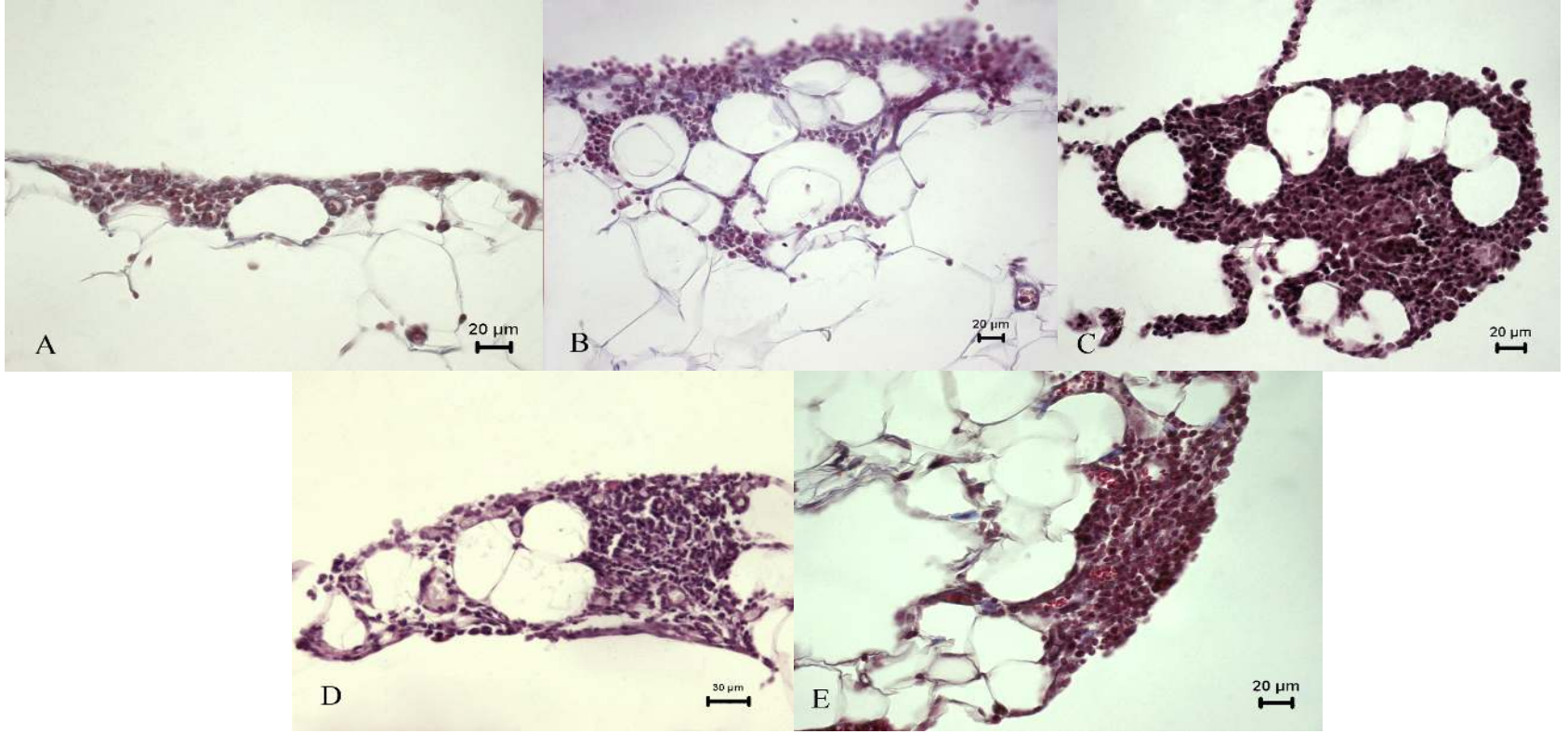


Şekil 3.6 Periton boşluğuna NaCl verilen ratların parietal periton örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, B: Uygulamadan 6 saat sonra, Metyl Green Pyronin Boyama Yöntemi, C: Uygulamadan 24 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi.

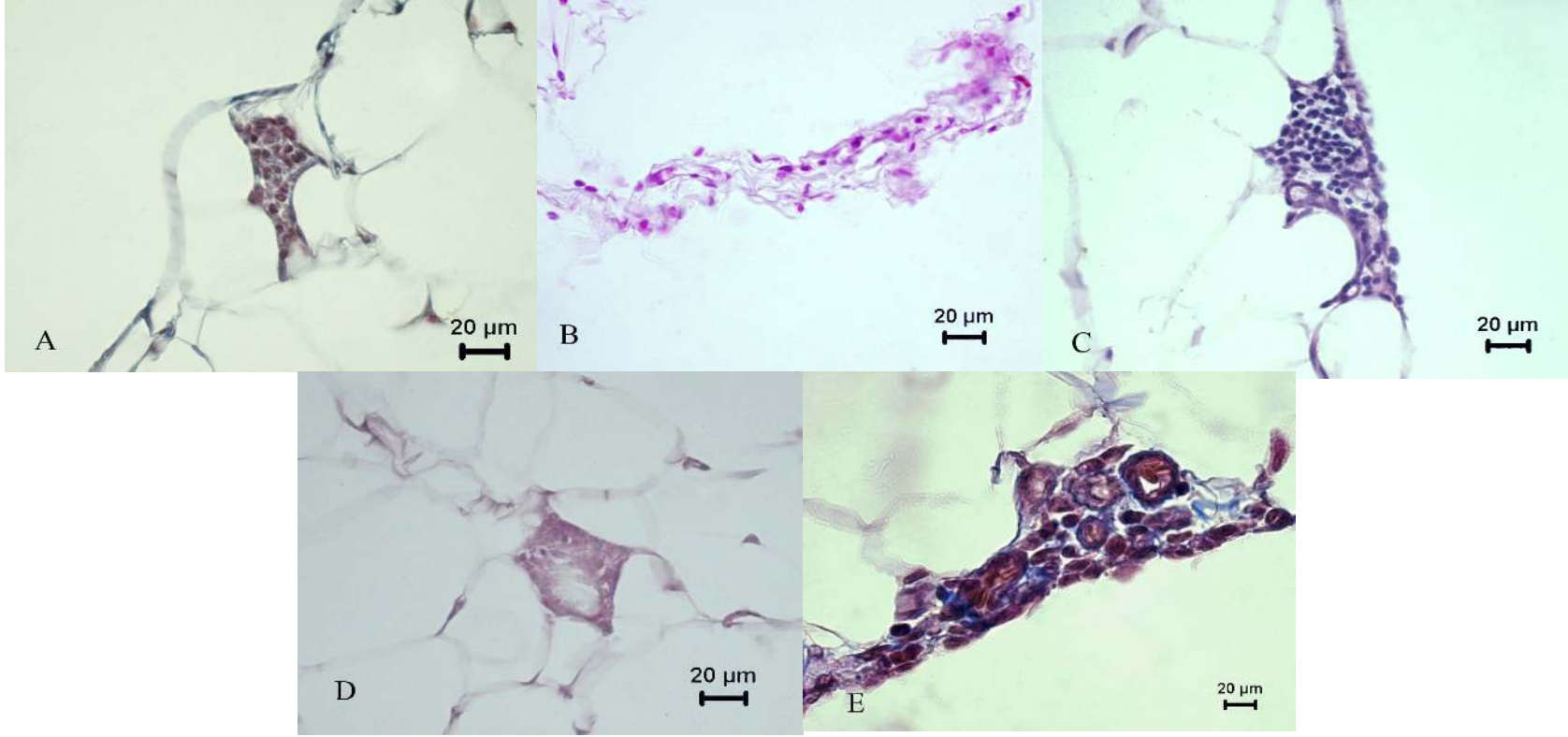


Periton boşluğuna 80 mg/kg oranında BSA verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerinin (Şekil 3.7) boyutları Çizelge 3.1’de gösterildi. Mikroskopik inceleme sırasında milky spotların bünyesinde ve çevresinde bulunan yağ hücrelerinin, özellikle uygulamadan altı saat sonra belirgin şekilde azaldığı dikkati çekti. Uygulamadan 24 saat sonra yağ hücrelerinin tekrar artmaya başladığı görüldü.

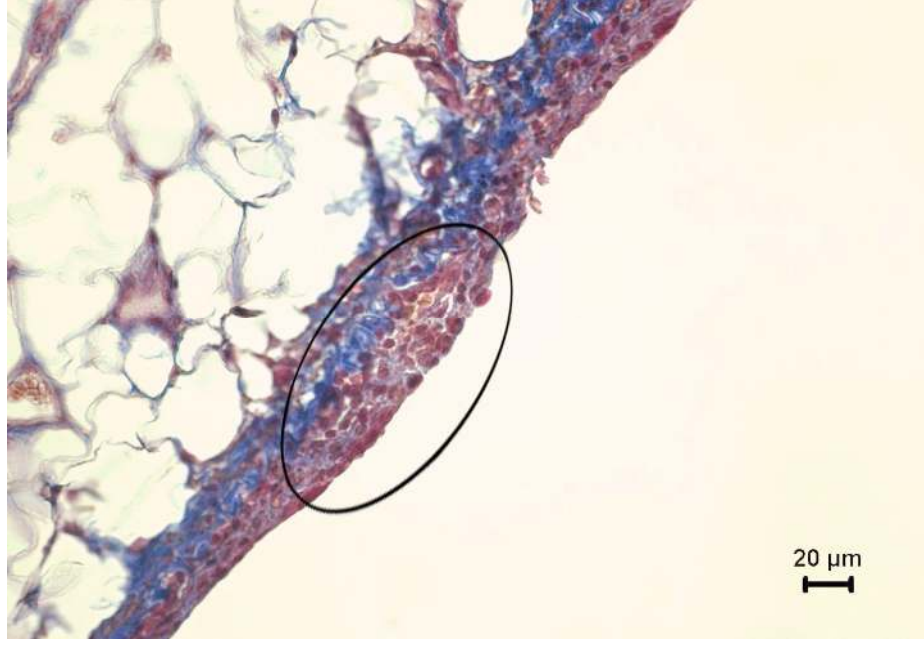
Mezenter ve parietal peritonda örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine daha az sayıda ve daha küçük boyutlarda rastlandı (Şekil 3.8, Şekil 3.9).



Şekil 3.7 Periton boşluğuna BSA verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi; B: Uygulamadan 3 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi; C: Uygulamadan 6 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, D: Uygulamadan 24 saat sonra,PAS reaksiyonu, E: Uygulamadan 1 hafta sonra, Üçlü Boyama Yöntemi.



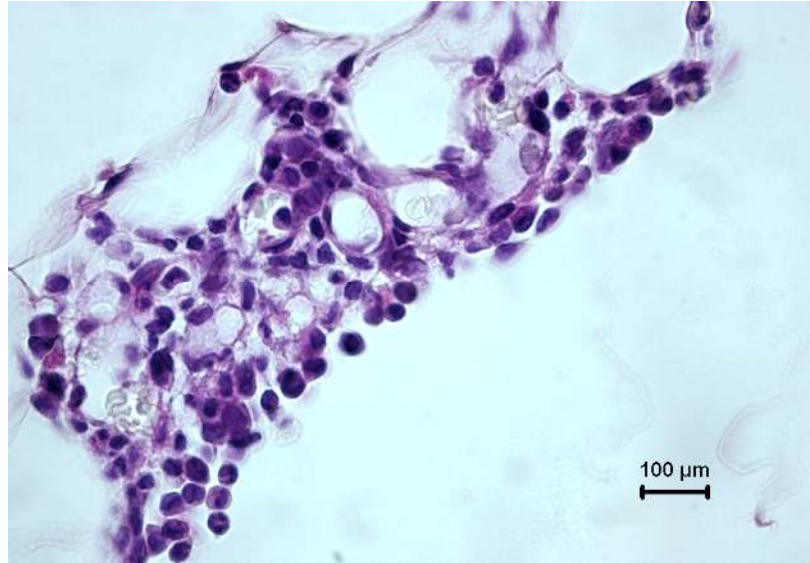
Şekil 3.8 . Periton boşluğuna BSA verilen ratların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, B: Uygulamadan 3 saat sonra, Methyl Green Pyronin Boyama Yöntemi, C: Uygulamadan 6 saat sonra,PAS reaksiyonu, D: Uygulamadan 24 saat sonra, Methyl Green Pyronin Boyama Yöntemi, E: Uygulamadan 1 hafta sonra, Üçlü Boyama Yöntemi.



Şekil 3.9 Periton boşluğuna BSA verilen ratların parietal periton örneklerinde Uygulamadan 6 saat sonra belirlenen lenfoid hücre birikimleri, Üçlü Boyama Yöntemi.

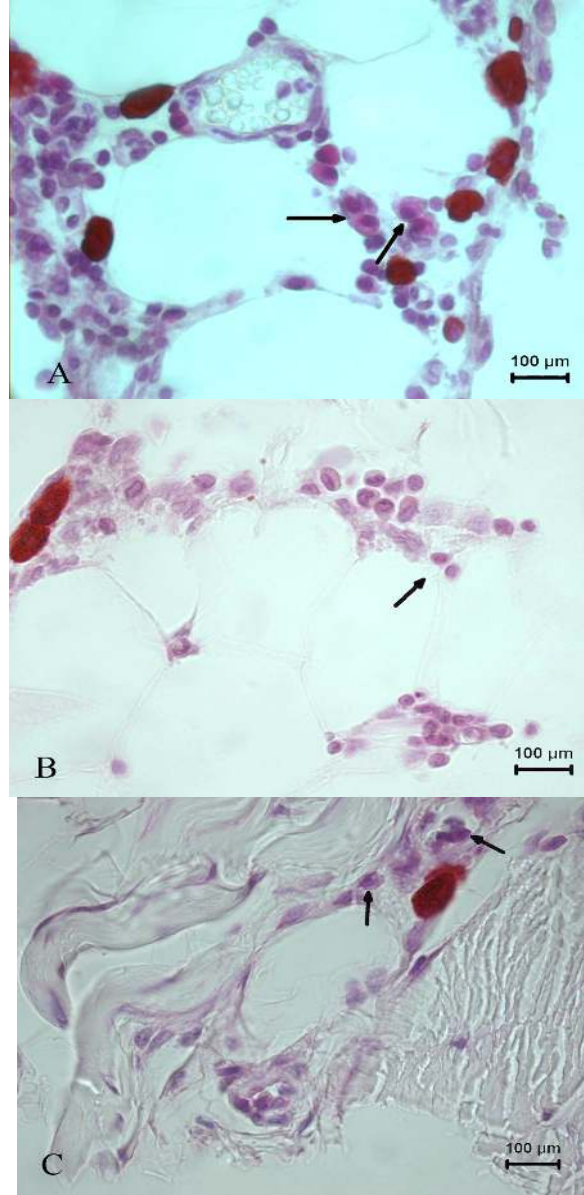
### 3.1.2. Histokimyasal bulgular

Ratlarda alınan doku örneklerine uygulanan PAS reaksiyonu sonucunda lenfoid hücre birikimlerinin bulunduğu bölgelerde bazal laminaya rastlanmadı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Rat omentum doku kesitlerinde lenfoid hücre birikimi, PAS reaksiyonu.

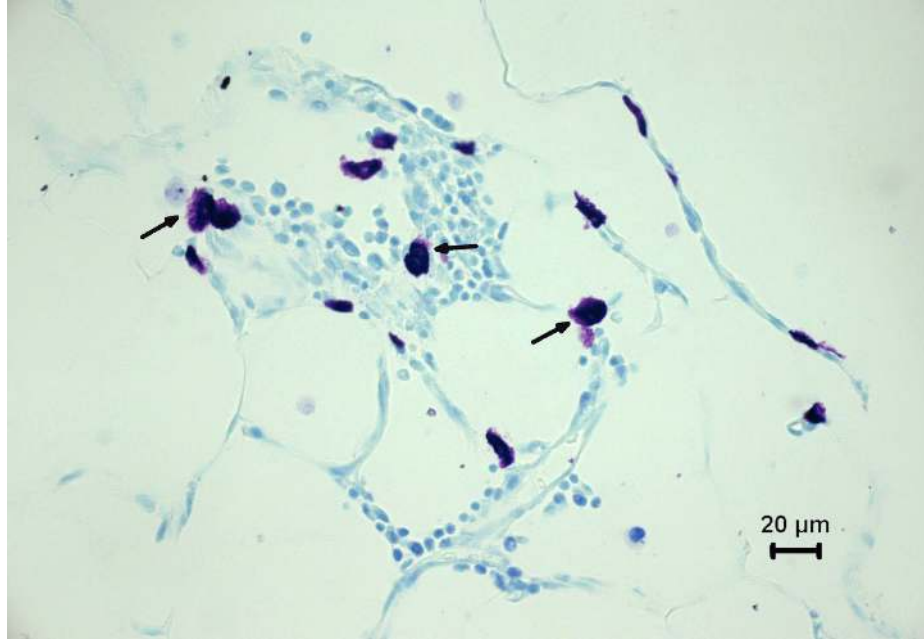
Doku örneklerine methyl green pyronin metodu uygulandığında omentum, mezenter ve parietal periton örneklerinde belirlenen hücre birikimlerinde plazma hücreleri ayırt edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Ratlarda omentum, mezenter ve parietal periton örneklerinde plazma hücreleri (oklar), A: Omentum dokusunda plazma hücresi, B: Mezenter dokuda plazma hücresi, C: Parietal Peritonda plazma hücresi, Methyl Green Pyronin Boyama Yöntemi.



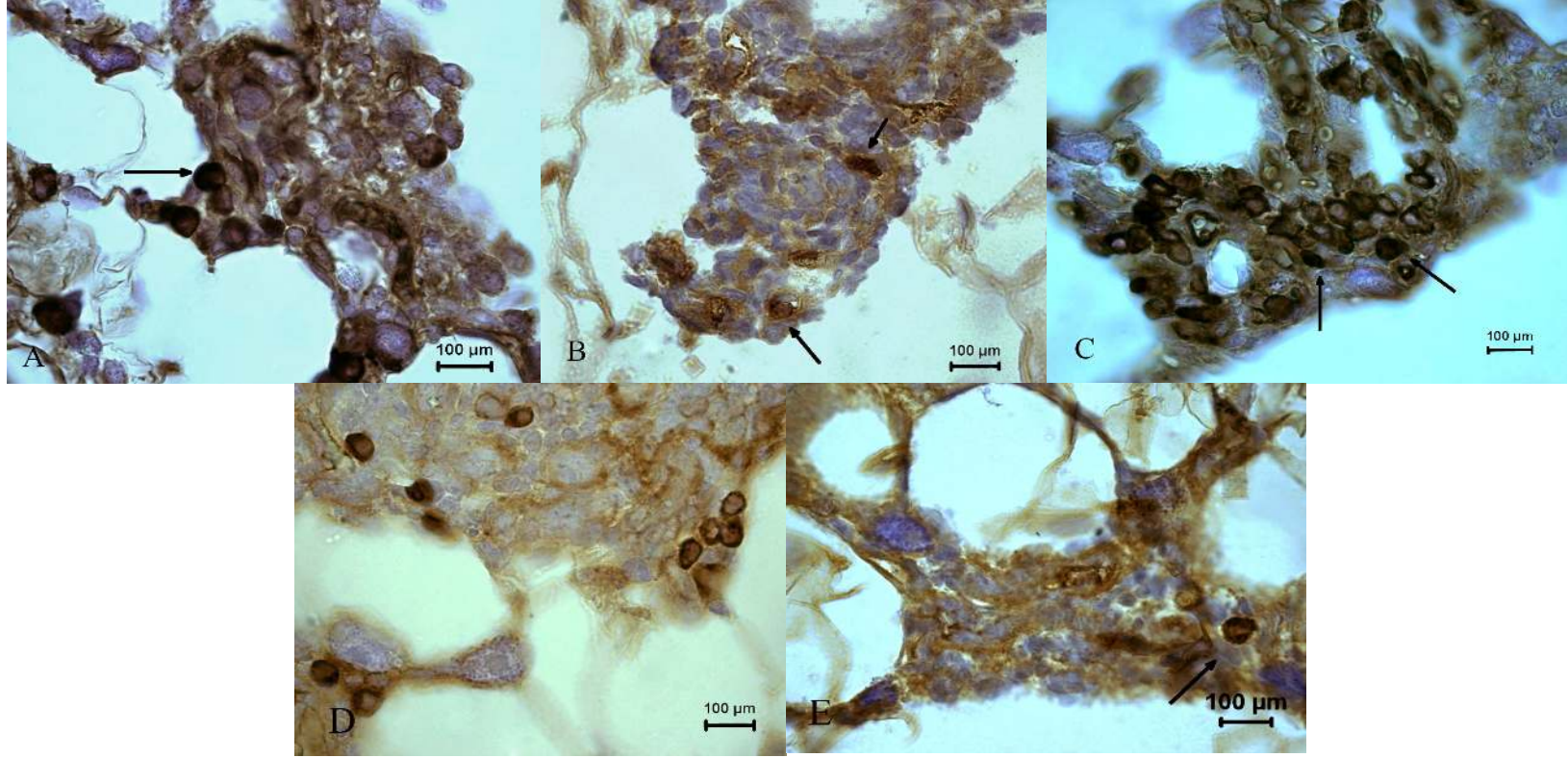
Toluidin blue (pH:2,5) boyama metodu ile boyanan; doku kesitleri incelendiğinde omentum, mezenter ve parietal periton örneklerinde belirlenen hücre birikimlerinde mast hücrelerinin bulunduğu tespit edildi (Şekil 3.12).



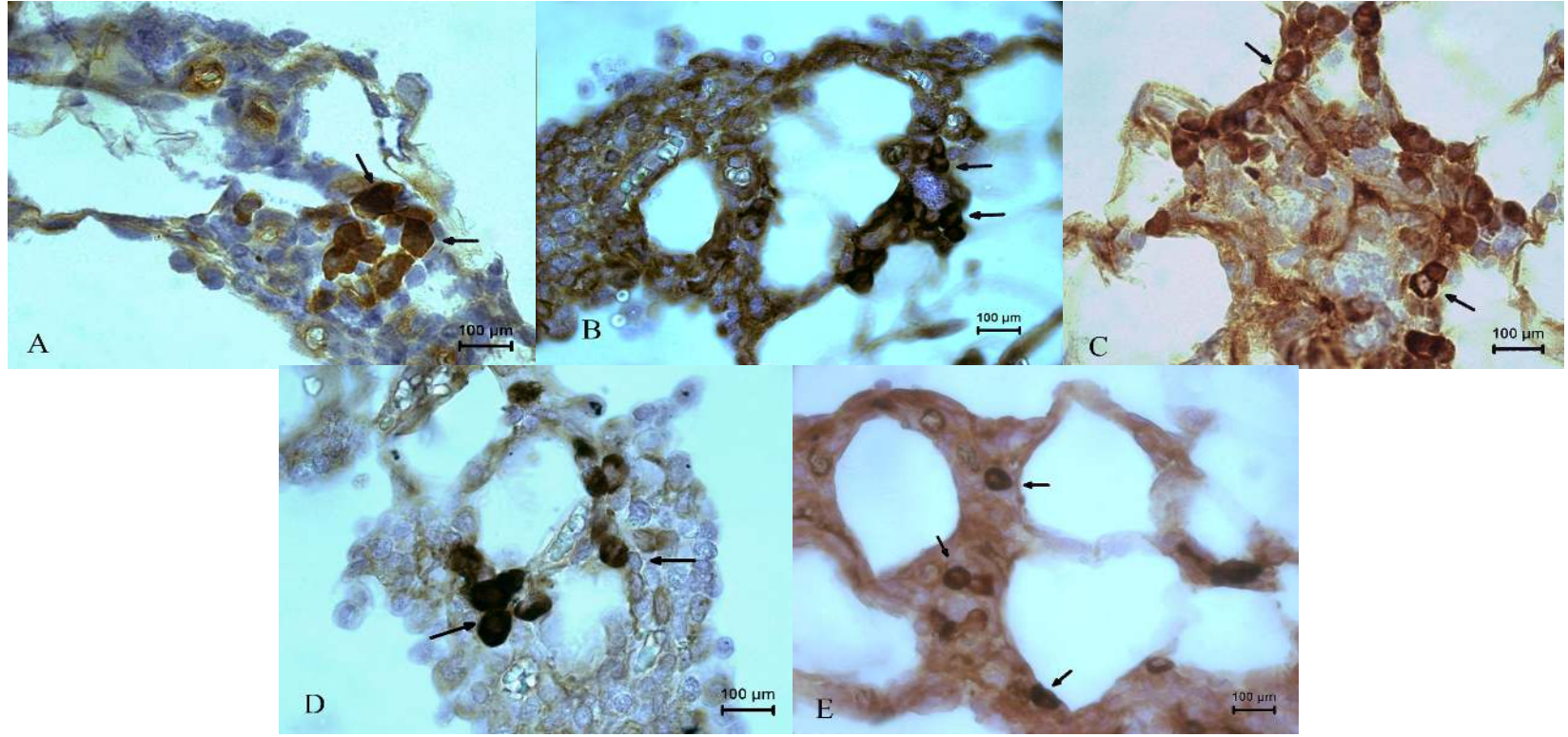
Şekil 3.12 Periton boşluğuna BSA verilen ratların omentum dokularında uygulamadan 24 saat sonra belirlenen hücre birikimlerinde mast hücreleri (oklar), Toluidin Blue Boyama Metodu.

### 3.1.3. İmmunositokimyasal bulgular

Ratlarda yapılan histolojik ve histokimyasal incelemeler sonucunda, özellikle omentumda daha belirgin hücre birikimleri tespit edildiğinden, omentum dokularına ait kesitlere avidin-biotin peroksidaz kompleks boyama metodu uygulandı. Kesitler incelendiğinde lenfoid hücre birikimlerinde makrofaj hücreleri belirgin bir şekilde ayırt edildi (Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15).

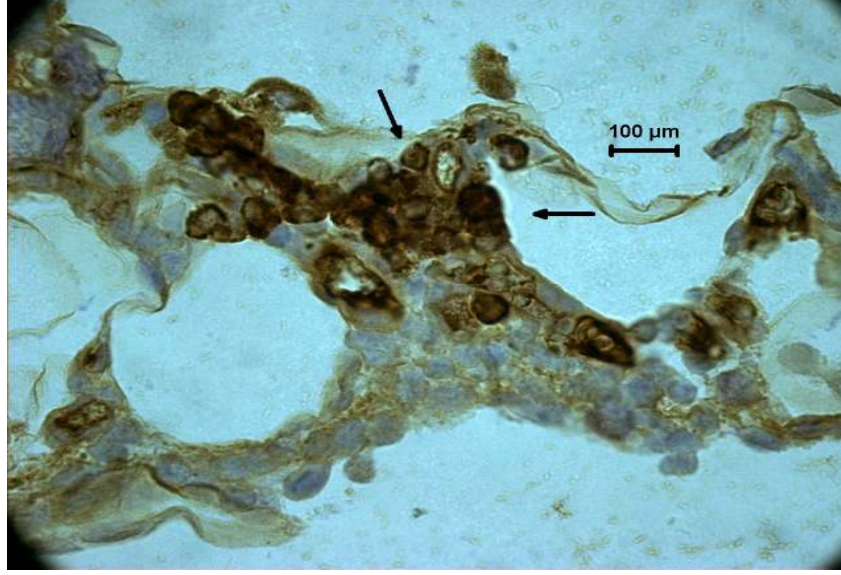


Şekil 3.13 Periton boşluğuna BSA verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerindeki makrofajlar (oklar). A: Uygulamadan 1 saat sonra, B: Uygulamadan 3 saat sonra, C: Uygulamadan 6 saat sonra, D: Uygulamadan 24 saat sonra, E: Uygulamadan 1 hafta sonra, Kompleks Avidin-Biotin Peroksidaz Boyama Yöntemi.



Şekil 3.14 Periton boşluğuna NaCl verilen ratların omentum örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerindeki makrofajlar (oklar). A: Uygulamadan 1 saat sonra, B: Uygulamadan 3 saat sonra, C: Uygulamadan 6 saat sonra, D: Uygulamadan 24 saat sonra, E: Uygulamadan 1 hafta sonra, Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi





Şekil 3.15 Kontrol grubuna ait omentum dokusunda lenfoid hücre birikimindeki makrofajlar (oklar), Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi.

#### 3.1.4. İstatistiksel bulgular

Periton boşluğuna BSA enjekte edilen grupta, enjeksiyondan bir saat sonra kontrol grubuna göre (0. saat) milky spot alanının küçüldüğü daha sonra büyümeye başladığı görüldü. Uygulamadan bir hafta sonra alanın tekrar küçülmeye başladığı görüldü. Bununla birlikte farklılığın 6. ve 24. saatte anlamlı olduğu tespit edildi ( $p<0,001$ ) (Çizelge 3.1.A).

Periton boşluğuna NaCl enjekte edilen grupta, sadece uygulamadan üç saat sonra alınan örneklerde milky spot alanındaki artışın önemli olduğu belirlendi ( $p<0,001$ ) (Çizelge 3.1.A).

BSA ve NaCl grupları arasındaki farklılıklar incelendiğinde; bir ve üçüncü saatlerde BSA verilen grupta milky spot alanının NaCl verilen gruba göre önemli oranda küçük olduğu, altı, 24 ve 168. saatlerde ise NaCl verilen gruba göre önemli oranda arttığı tespit edildi (Çizelge 3.1.B).

**Çizelge 3.1. A-** Periton boşluğuna BSA ve NaCl enjekte edilmiş ratların omentum dokusunda lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları ve uygulama süresine göre belirlenen farklılıklar

| GRUP                                                               | Uygulama Süresi (saat)    |                          |                           |                          |                          |                          |     |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----|
|                                                                    | 0                         | 1                        | 3                         | 6                        | 24                       | 168                      | P   |
| <b>BSA</b><br>( $\bar{X} \pm S_x = \mu\text{m}^2$<br>alan) (n=12)  | 12193,42±25 <sup>cd</sup> | 8061,21±17 <sup>d</sup>  | 10230,35±12 <sup>cd</sup> | 56084,31±56 <sup>a</sup> | 33989,88±38 <sup>b</sup> | 19300,74±15 <sup>c</sup> | *** |
| <b>NaCl</b><br>( $\bar{X} \pm S_x = \mu\text{m}^2$<br>alan) (n=12) | 12193,42±25 <sup>b</sup>  | 14180,36±14 <sup>b</sup> | 22885,35±18 <sup>a</sup>  | 11582,34±12 <sup>b</sup> | 9672,72±78 <sup>b</sup>  | 14009,71±18 <sup>b</sup> | *** |

\*\*\*: P<0,001 ; a, b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

**B-** Lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları arasındaki farklılıklar

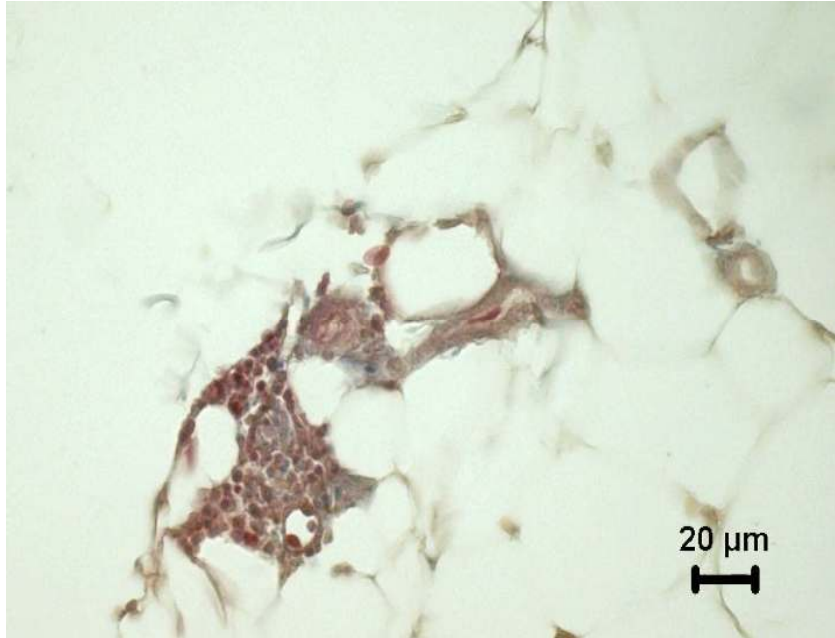
| Uygulama süresi (saat) | Grup | $\bar{X} \pm S_x = \mu\text{m}^2$ | P   |
|------------------------|------|-----------------------------------|-----|
| 1                      | BSA  | 8061,21±17                        | *   |
|                        | NaCl | 14180,36±14                       |     |
| 3                      | BSA  | 10230,35±12                       | *** |
|                        | NaCl | 22885,35±18                       |     |
| 6                      | BSA  | 56084,31±56                       | *** |
|                        | NaCl | 11582,34±12                       |     |
| 24                     | BSA  | 33989,88±39                       | *** |
|                        | NaCl | 9672,72±78                        |     |
| 168                    | BSA  | 19300,74±15                       | *   |
|                        | NaCl | 14009,71±18                       |     |

\* : p< 0,05 ; \*\*\* : p < 0,001

### 3.2. Bıldırcınlarda Lenfoid Hücre Birikimleri

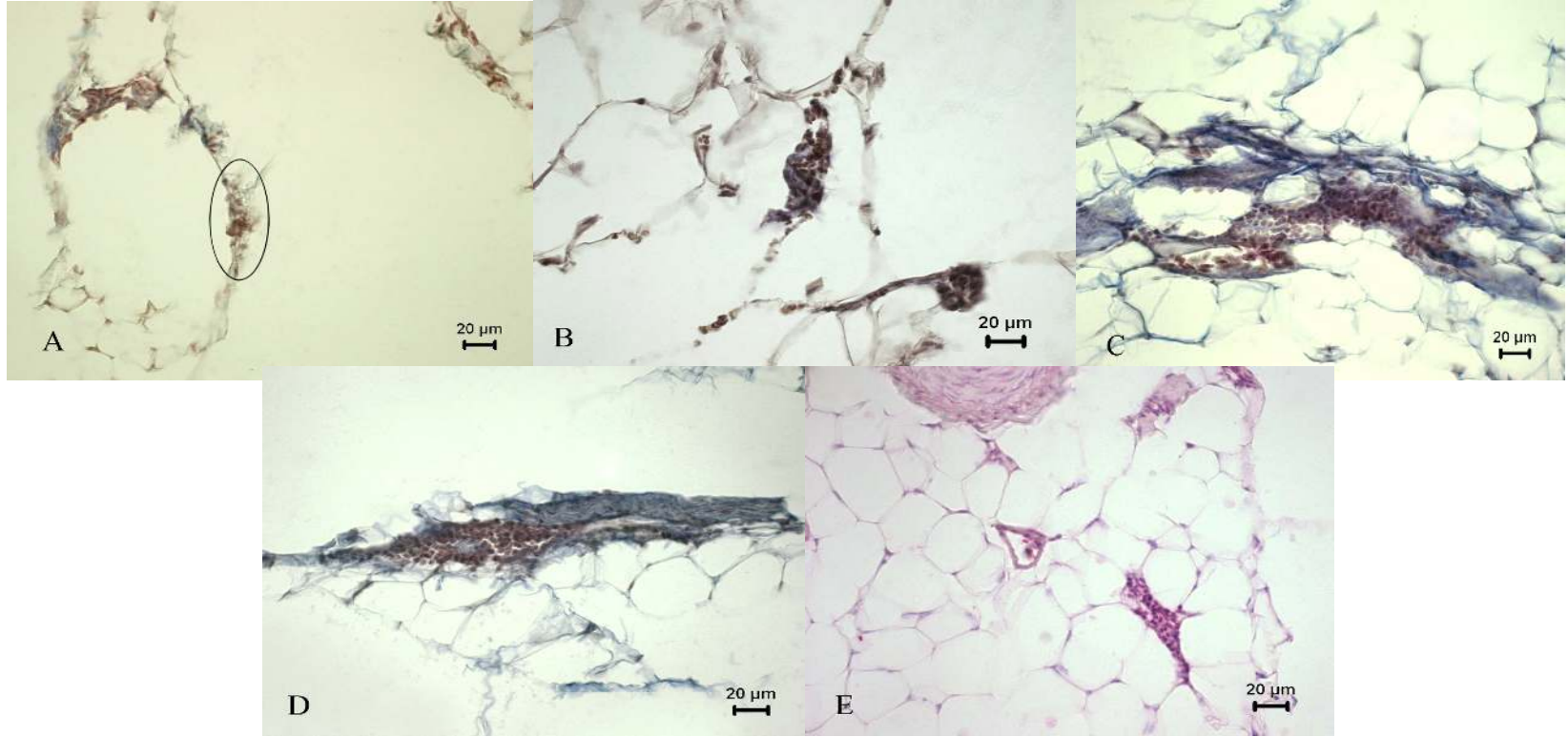
#### 3.2.1. Histolojik bulgular

Sekiz haftalık bıldırcınların kontrol gruplarında parietal periton ve mezenter dokularından alınan kesitler incelendi. Mezenter örneklerinde yaklaşık  $2492,14 \pm 32 \mu\text{m}^2$  boyutunda lenfoid hücre birikimlerine rastlandı (Şekil 3.16). Parietal periton örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine rastlanmadı.



Şekil 3.16 Kontrol grubuna ait mezenter dokusunda lenfoid hücre birikimi, Üçlü Boyama Yöntemi.

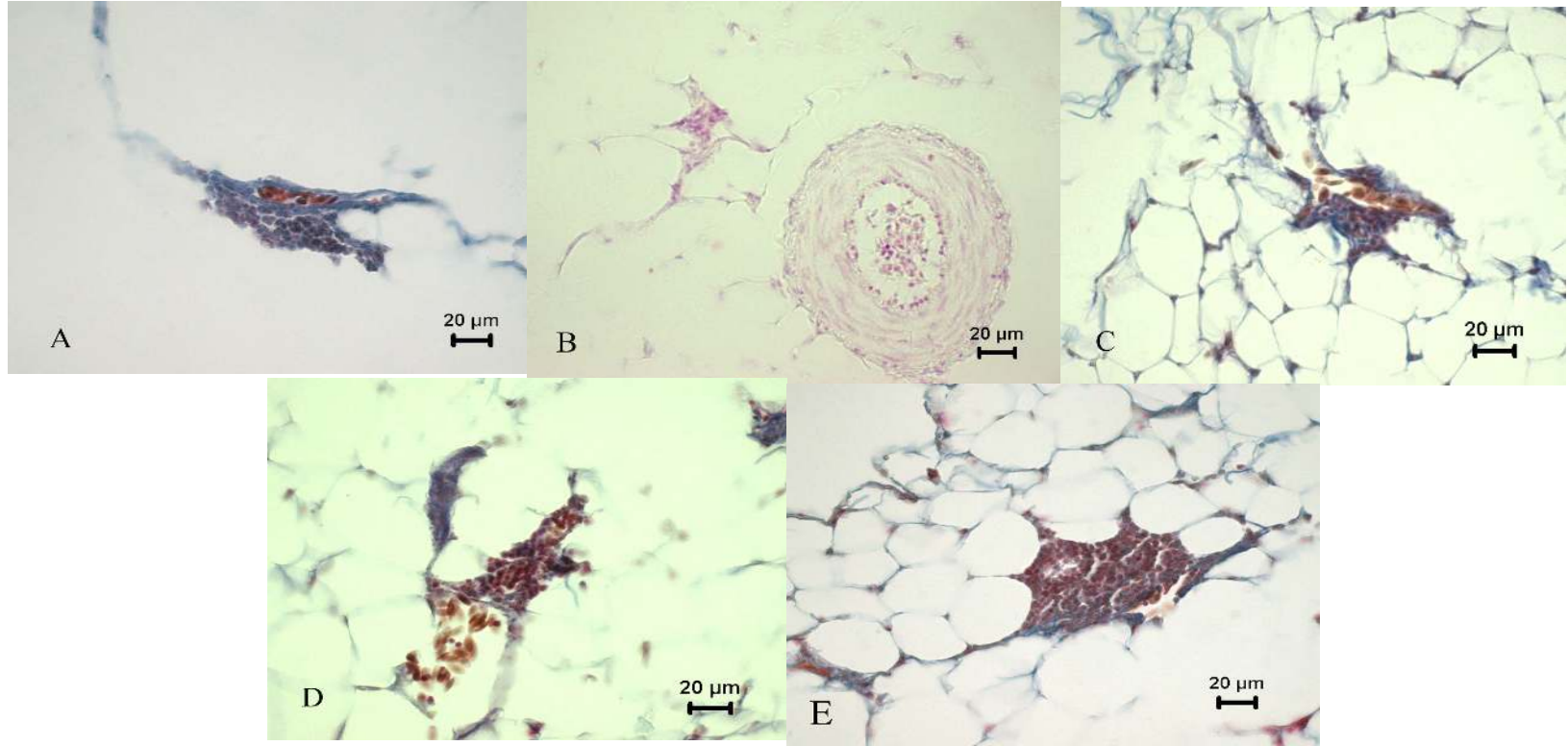
Periton boşluğuna %0.9'luk NaCl verilen bıldırcınların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerinin (Şekil 3.17) boyutları Çizelge 4'de gösterildi. Parietal periton örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine rastlanmadı.



Şekil 3.17 Periton boşluğuna NaCl verilen bıldırcınların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, B: Uygulamadan 3 saat sonra, Methyl Green Pyronin Boyama Yöntemi, C: Uygulamadan 6 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, D: Uygulamadan 24 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, E: Uygulamadan 1 hafta sonra, PAS reaksiyonu ile lenfoid hücre birikimi görüntüleri.

Periton boşluğuna 80 mg/kg oranında BSA verilen bıldırcınlarda, mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimlerinin (Şekil 3.18) boyutları Çizelge 2.2 'de gösterildi.

Bıldırcınlarda parietal periton örneklerinde lenfoid hücre birikimlerine rastlanmadı.



Şekil 3.18 Periton boşluğuna BSA verilen bıldırcınların mezenter örneklerinde farklı zamanlarda belirlenen lenfoid hücre birikimleri. A: Uygulamadan 1 saat sonra, Üçlü Boyama Yöntemi, B: Uygulamadan 3 saat sonra, Methyl Green Pyronin Boyama Yöntemi, C: Uygulamadan 6 saat sonra, D: Uygulamadan 24 saat sonra, E: Uygulamadan 1 hafta sonra lenfoid hücre birikimi görüntüleri, Üçlü Boyama Yöntemi.

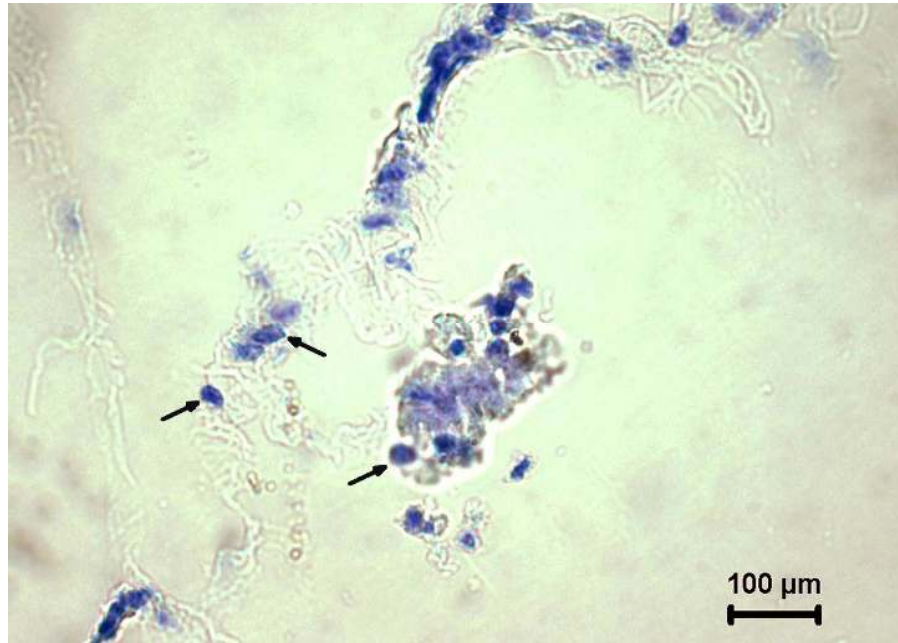


### 3.2.2. Histokimyasal bulgular

Bıldırcınlardan alınan doku örneklerine uygulanan PAS reaksiyonu sonucunda lenfoid hücre birikimlerinin bulunduğu bölgelerde bazal laminaya rastlanmadı.

Doku örneklerine methyl green pyronin metodu uygulandığında mezenter örneklerinde belirlenen hücre birikimlerinde plazma hücreleri ayırt edilemedi.

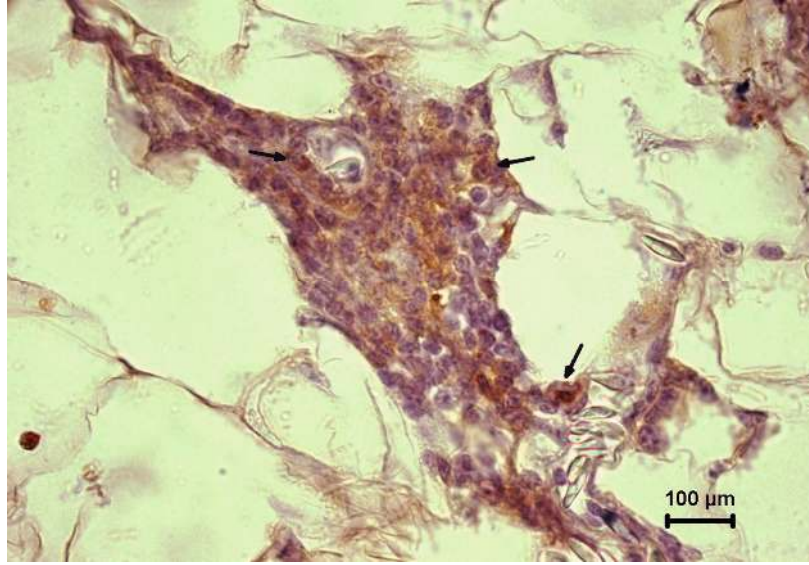
Toluidin blue (pH:2.5) boyama metodu ile boyanan doku kesitleri incelendiğinde, belirlenen hücre birikimlerinde mast hücrelerinin bulunduğu tespit edildi (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 Bıldırcınlarda mezenter örneklerinde belirlenen hücre birikimlerinde mast Hücreleri (oklar), Toluidin Blue Boyama Yöntemi.

### 3.2.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

Periton boşluğuna BSA verilen bıldırcınların mezenter örneklerinde yapılan histolojik ve histokimyasal incelemeler sonucunda, hücre birikimleri tespit edildiğinden, mezenter dokularına ait kesitlere strept avidin-biotin peroksidaz kompleks boyama metodu uygulandı. Kesitler incelendiğinde lenfoid hücre birikimlerinde makrofajlar ayırt edildi (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 Kontrol grubuna ait omentum dokusunda lenfoid hücre birikimindeki makrofajlar (oklar), Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks Boyama Yöntemi.

### 3.2.4. İstatistiksel bulgular

Periton boşluğuna BSA enjekte edilen grupta, enjeksiyondan bir saat sonra kontrol grubuna göre (0. saat) lenfoid hücre birikim alanlarının arttığı ( $p<0,01$ ) daha sonra küçülerek kontrol grubu ile benzer büyüklüğe ulaştığı görüldü (Çizelge 3.2.A).



Periton boşluğuna NaCl enjekte edilen grupta, enjeksiyondan sonraki bir ve 3. saatlerde kontrol grubuna göre lenfoid hücre alanlarının küçüldüğü ( $p<0,01$ ), daha sonraki uygulama saatlerinde ise kontrol grubu büyüklüğüne ulaştığı görüldü ( izelge 3.2.A).

BSA ve NaCl grupları arasındaki farklılıklar incelendiğinde; bir ( $p<0,001$ ) ve üçüncü ( $p<0,01$ ) saatlerde BSA verilen grupta lenfoid hücre alanlarının NaCl verilen gruba göre önemli oranda büyük olduğu, altı, 24 ve 168. saatlerde ise NaCl ve BSA grubu değerleri arasındaki farklılığın önemli olmadığı görüldü ( izelge 3.2.B).

**Çizelge 3.2. A-** Periton boşluğuna BSA ve NaCl enjekte edilmiş bıldırcınların mezenter dokusunda lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları ve uygulama süresine göre belirlenen farklılıklar

| GRUP                                                              | Uygulama Süresi (saat)  |                         |                         |                         |                         |                         | P  |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----|
|                                                                   | 0                       | 1                       | 3                       | 6                       | 24                      | 168                     |    |
| <b>BSA</b><br>( $\bar{X} \pm S_x = \mu\text{m}^2$<br>alan) (n=6)  | 2492,14±32 <sup>b</sup> | 4559,41±31 <sup>a</sup> | 2325,45±35 <sup>b</sup> | 2889,30±66 <sup>b</sup> | 2247,18±28 <sup>b</sup> | 2657,79±39 <sup>b</sup> | ** |
| <b>NaCl</b><br>( $\bar{X} \pm S_x = \mu\text{m}^2$<br>alan) (n=6) | 2492,14±32 <sup>a</sup> | 1306,28±51 <sup>b</sup> | 1218,22±32 <sup>b</sup> | 2386,40±43 <sup>a</sup> | 2238,95±21 <sup>a</sup> | 2346,03±30 <sup>a</sup> | ** |

\*\* : P<0,01 ; a, b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

**B-** Lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanları arasındaki farklılıklar

| Uygulama süresi (saat) | Grup | ( $\bar{X} \pm S_x = \mu\text{m}^2$<br>alan) | P   |
|------------------------|------|----------------------------------------------|-----|
| 1                      | BSA  | 4559,41±31                                   | *** |
|                        | NaCl | 1306,28±50                                   |     |
| 3                      | BSA  | 2325,45±35                                   | **  |
|                        | NaCl | 1218,22±32                                   |     |
| 6                      | BSA  | 2889,30±67                                   | ÖD  |
|                        | NaCl | 2386,40±40                                   |     |
| 24                     | BSA  | 2247,18±28                                   | ÖD  |
|                        | NaCl | 2238,95±20                                   |     |
| 168                    | BSA  | 2657,79±39                                   | ÖD  |
|                        | NaCl | 2346,03±30                                   |     |

\* : p< 0,05 ; \*\*\* : p < 0,001; ÖD : Önemli değil

## 4.TARTIŞMA

Karın boşluğunda lokal savunma odakları ratlarda (Wijffels ve ark 1992, Van Vught ve ark 1996, Dı Paolo ve Sacchi 2000, Hekking ve ark 2001), farelerde (Dux 1986, Cranshaw ve Leak 1990, Wijffels ve ark 1992) ve insanlarda (Shimotsuma ve ark 1991, Shimotsuma ve ark 1993, , Takemori ve ark 1995, Krist ve ark1997, Wilkosz ve ark 2005) hücre kompozisyonu ve fonksiyonları açısından çalışılmıştır. Bildircinlarda ise literatürde karın boşluğunda lokal savunma odakları hakkında herhangi bir bulguya rastlanamamıştır.

Ratlarda milky spotlarda çoğunlukla makrofaj olmak üzere T, B lenfositler ve mast hücrelerinin bulunduğu bildirilmiştir (Takemori ve Ito 1981, Cranshaw ve Leak 1990, Krist ve ark. 1995, Van Vught ve ark 1996, Dı Paolo ve Sacchi 2000, Cui ve ark. 2002).

Sunulan çalışmada da ratlarda ve bildircinlarda lenfosit, makrofaj ve mast hücreleri belirlendi. Ratlarda ayrıca plazma hücreleri de ayırt edildi.

Ratlarda BSA verilen gruplarda germinatif merkez tespit edilmedi. Bununla birlikte kontrol grubuna göre lenfoid hücre birikimlerinin alanının uygulamadan 6 ve 24 saat sonra ( $P<0,001$ ), bildircinlarda bir saat sonra ( $P<0,001$ ) anlamlı şekilde arttığı tespit edildi (Çizelge 3.1.A).

Ratlarda milky spot alanlarının kontrole göre BSA verilen grupta enjeksiyondan bir ve üç saat sonraki küçülmeler (Çizelge 3.1.A, B), antijenin varlığında birikim alanından hücrelerin ayrılması şeklinde yorumlanabilir. Nitekim altı ve 24 saat sonraki örneklerde hücre birikimlerinin alanlarının arttığı tespit edildi. Bu durum da immun reaksiyon hücrelerinin uyarım ile artışına işaret etmektedir.

İnsanlarda Shimotsuma ve ark (1993) ile Krist ve ark (1995); ratlarda Van Vught ve ark (1996)'nın bildirdiği gibi omental milky spotlar peritoneal boşluğun savunmasında ilk hat

olmakla birlikte sekonder lenfoid organ değildir. Bununla birlikte lokal antijenik uyarıma cevap vermesinden dolayı sekonder özellikle lenfoid hücre birikimleri olarak değerlendirilebilirler.

Gehad ve ark (2002) White legorn horozlarda T bağımlı antijen olarak BSA kullanmışlar ve en uygun dozunu 80 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada bıldırcınlarda da BSA verilen grupta mezenter örneklerinde germinatif merkez tespit edilmedi. Ratlardan farklı olarak enjeksiyondan bir saat sonra kontrol grubuna göre (0. saat) lenfoid hücre birikimlerinin alanlarının arttığı ( $p<0,01$ ) daha sonra küçülerek kontrol grubu ile benzer büyüklüğe ulaştığı görüldü (Çizelge 3.2.A, B). Bu sonuç ratlara göre bıldırcınların daha hızlı reaksiyon gösterdiğini işaret etmekle birlikte reaksiyonun daha kısa sürede sonlandığını da açığa çıkarmıştır. Bu durum bıldırcınlarda BSA'nın antijenitesi ile ilgili olabilir. Lesli ve Benedict (1969) tavuk, sülün ve bıldırcın karşılaştırıldığında BSA enjeksiyonuna en zayıf humoral immun yanıtın bıldırcınlarda oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Nitekim bıldırcın doku örneklerine uygulanan methyl green pyronin boyama reaksiyonunda plazma hücreleri ayırt edilememiştir. Lenfoid hücre birikimlerinde BSA uygulamasına verilen yanıtın makrofaj kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Farelerde Zhu ve ark (1997), milky spotlarda M-CSF'nin lokal olarak üretildiğini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada bıldırcınlarda makrofaj tespiti için, anti chicken MHC II beta fare monoclonal antikoru kullanıldı. Shiina ve ark (2004) tarafından bıldırcın ve tavuk MHC I ve MHC II gen sekanslarının filogenetik açıdan yakın olduğu bildirilmiştir.

Periton boşluğuna %0,9'luk NaCl enjeksiyonu ratlarda 3. satte bir reaksiyon doğurmuş ve sonra etki ortadan kalkmıştır (Çizelge 3.1. A). Gösterilen reaksiyon periton boşluğuna sıvının uyguladığı hacimden kaynaklanıyor olabilir. Sonraki örneklerde milky spot alanları normale dönmüştür.

Bıldırcınlarda periton boşluğuna %0,9'luk NaCl enjeksiyonundan bir ve üç saat sonra alınan mezenter örneklerinde, hücre birikim alanlarında belirlenen küçülmeler ise (Çizelge 3.2. A) BSA'ya da hızlı ve düşük oranda reaksiyon veren bıldırcınlarda %0,9'luk NaCl solusyonunun periton boşluğunu yıkama etkisinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir.

İster antijen varlığında ister serum fizyolojik etkisiyle hücre birikim alanlarından hücrelerin ayrılmasında, araştırmacıların bildirdiği (Cranshaw ve Leak 1990) ve sunulan çalışmada da onaylandığı gibi, hücre birikimlerinin olduğu alanlarda bazal laminanın bulunmamasının kolaylaştırıcı rol oynadığı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada özellikle rat omentumunda milky spotların bünyesinde gözlenen yağ hücreleri dikkati çekmiş, milky spotların alanlarının arttığı gruplarda sayılarının azaldığı gözlenmiştir. Pond (2003, 2005) da lenfositlerin ve dendritik hücrelerinin yağ hücreleri ile fonksiyonları açısından yakın ilişkide olduğunu bildirmiştir. İmmun reaksiyonda rol alan hücrelerin yağ hücreleri ile olan ilişkisi konusunda araştırmaların artırılması savunma reaksiyonunun daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

## 5. SONUÇ

1. Ratlarda omentum, mezenter ve parietal periton; bıldırcınlarda ise mezenter ve parietal peritonda lenfoid hücre birikimlerinin varlığı ve hücre kompozisyonu araştırıldı.
2. Ratlarda lenfoid hücre birikimlerinin özellikle omentumda belirgin olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ratların omentum örneklerinde milky spotların ortalama alanı belirlendi.
3. Bıldırcınlarda lenfoid hücre birikimlerinin özellikle mezenterde belirgin olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu bıldırcınların mezenter örneklerinde lenfoid hücre birikimlerinin ortalama alanı belirlendi.
4. Ratlarda milky spot olarak isimlendirilen lenfoid hücre birikimlerinde lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ve mast hücreleri belirlendi.
5. Bıldırcınlarda lenfoid hücre birikimlerinde lenfosit, makrofaj ve mast hücreleri belirlendi.
6. Periton boşluğuna NaCl'de eritilmiş BSA ve NaCl enjekte edilerek lenfoid hücre birikimlerinde reaksiyon gerçekleşip gerçekleşmediği araştırıldı. Lenfoid hücre birikimlerinin alanları hesaplanarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Sonuç olarak; ratlarda ve bıldırcınlarda karın boşluğunda (omentum, mezenter ve parietal peritonda) lenfoid hücre birikimlerinin bulunduğu ve antijenik uyarıma cevap verdiği tespit edildi. Ratlarda bu odakların hem uyarıcı hem de efektör odak olarak görev yapabilecek nitelikte ve sekonder özellikli olduğuna, bıldırcınlardaki bu odakların niteliğinin kesinleştirilebilmesi için farklı antijenlerle yapılacak çalışmalara gereksinim olduğuna karar verildi.

## ÖZET

Araştırmada rat ve bıldırcınlarda karın boşluğunda lokal savunma odaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 48 adet 8 haftalık erişkin erkek Wistar rat ve 48 adet 8 haftalık Japon bıldırcını (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı. Birinci gruptaki hayvanlara intraperitoneal olarak, 0.1 ml %0.9 NaCl'de 80 mg BSA (Bovine serum albumin-BSA-Sigma) eritilerek hazırlanan stok solusyondan, 80 mg/kg olacak şekilde enjekte edildi. Aynı işlem ikinci grup olan ratlara aynı oranda sadece %0.9 NaCl verilerek gerçekleştirildi.

Enjeksiyondan 1, 3, 6, 24 saat ve bir hafta sonra, her seferinde altışar adet hayvan öldürülerek, bıldırcınlarda parietal periton, mezenter; ratlarda parietal periton, mezenter ve omentum majus örnekleri toplandı. Aynı işlem %0.9 NaCl verilen grupta da her defasında üç hayvanda gerçekleştirildi. Rat ve bıldırcınlarda herhangi bir uygulama yapılmayan üçüncü gruptan da üçer hayvandan doku örnekleri alındı. Hazırlanmış bloklardan 50 µm ara ile 6 µm kalınlığında alınan seri kesitlere Üçlü Boyama tekniği, Periodic Acid Schiff (PAS) reaksiyonu, Metyl Green Pyronin, Toluidin blue (pH:2,5) boyama metodu, ve makrofajların demonstrasyonu için Strept Avidin-Biotin Peroksidaz Kompleks boyama yöntemi uygulandı.

Ratlarda omentum ve bıldırcınlarda mezenter kesitlerinde lenfoid hücre birikimlerinin alanı, X40'luk büyütme kullanılarak görüntü analiz sistemi (Leica DMLB araştırma mikroskobu ve DC 200 CCD kamera ile Q Win Standart görüntü analiz programı) yardımıyla interaktif yolla hesaplandı.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopik düzeyde incelenerek gerekli görülen kısımların fotoğrafları alındı.

Ratlarda omentum, mezenter ve parietal peritonda; bıldırcınlarda ise sadece mezenterde lenfoid hücre birikimleri halinde lokal savunma odaklarına rastlandı.

Ratların omentum örneklerinde lenfoid hücre birikimlerinin bir kapsül ile sarılı olmadıkları, kapilar damarların bulunduğu, az miktarda bağ doku içermekle birlikte bünyelerinde yağ hücrelerini içerdikleri gözlemlendi. Boyutlarının yaklaşık  $12193,42 \pm 25 \mu m^2$  olduğu belirlendi. Mezenter ve parietal periton örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine az sayıda ve daha küçük boyutlarda rastlandı. PAS reaksiyonu sonucunda lenfoid hücre birikimlerinin bulunduğu bölgelerde bazal laminaya rastlanmadı. Omentum, mezenter ve parietal periton örneklerinde lenfoid hücre birikimlerinde lenfositler, makrofajlar, plazma hücreleri, mast hücreleri, tespit edildi.

Ratlarda BSA enjekte edilen grupta farklılığın 6. ve 24. saatte anlamlı olduğu tespit edildi ( $p < 0,001$ ).

Bıldırcınların mezenter örneklerinde lenfoid hücre birikimlerinin yaklaşık  $2492,14 \pm 32 \mu m^2$  olduğu belirlendi. Parietal periton örneklerinde ise lenfoid hücre birikimlerine rastlanmadı. PAS reaksiyonu sonucunda lenfoid hücre birikimlerinin bulunduğu bölgelerde bazal laminaya rastlanmadı. Mezenter örneklerinde belirlenen hücre birikimlerinde plazma hücreleri ayırt edilemedi. Lenfositler, mast hücreleri ve makrofajlar belirlendi.

Periton boşluğuna BSA enjekte edilen grupta, enjeksiyondan bir saat sonra kontrol grubuna göre lenfoid hücre birikim alanlarının arttığı ( $p < 0,01$ ) görüldü.

Sonuç olarak; ratlarda ve bıldırcınlarda karın boşluğunda (omentum, mezenter ve parietal peritonda) lenfoid hücre birikimlerinin bulunduğu ve antijenik uyarıma cevap verdiği tespit edildi. Ratlarda bu odakların sekonder nitelikte olduğuna, bıldırcınlardaki bu odakların niteliğinin kesinleştirilebilmesi için farklı antijenlerle yapılacak çalışmalara gereksinim olduğuna karar verildi.

Anahtar kelimeler; Milky spot, rat, bıldırcın, omentum, mezenter, parietal periton, sekonder lenfoid odak, antikor, sıgır serum albumini.



## SUMMARY

The study aimed to investigate local immune focuses in the peritoneal cavity of the rats and quails.

For this purpose, 8 weeks old 48 male Wistar rats and Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) were used. Animals of both arts divided into subgroups. One groups received 80 mg BSA (Bovine serum albumin-BSA-Sigma) dissolved in 0.1 ml 0.9% NaCl intraperitoneally. Second groups received the same amount NaCl solution. Another groups with no application of BSA or NaCl served as controls.

At the 1, 3, 6 and 24 h after injections 6 animals from BSA injected groups and 3 animals from NaCl injected groups from both species were scarified. Parietal peritoneum and mesentery samples from quails, and parietal peritoneum, mesentery and omentum majus samples from rats were collected. Similarly, tissue samples from 3 animals in control groups were also taken. Triple staining technique, Periodic Acid Schiff (PAS) reaction, Methyl Green Pyronin, Toluidin blue (pH:2,5) staining method, and for the demonstration of macrophages Strept Avidin-Biotin Peroxidase Kompleks method were applied on the 6  $\mu$  thick serial sections with 50  $\mu$  intervals taken from prepared blocks.

The aggregation areas of the lymphoid cells were calculated on the omentum sections of rats and mesentery sections of quails at X40 magnification with help of the system (Leica DMLB research microscopy and DC 200 CCD camera with Q Win Standard image analyzer program) by the interactive rout.

Prepared sections were investigated with light microscopy, and if necessary, photographed by the research microscopy with help of image analyzer system attached to it. Local immune focuses were seen as locale lymphoid cell aggregations in the omentum,

mesentery and parietal peritoneum in rats, whereas in quails they were only seen in mesentery.

It was observed that in omentum samples of rats the lymphoid cell aggregates were not surrounded by a capsule, there were capillaries, they had some connective tissue and included fatty cells in their structure. Their dimension was in mean  $12193.42 \pm 25 \mu\text{m}^2$ . On contrary, lesser lymphoid cell aggregates with smaller dimensions were observed on mesentery and parietal peritoneum. PAS reaction revealed the absence of the basal lamina in the regions where lymphoid cell aggregates were located. Lymphocytes, macrophages, plasma cells and mast cells were detected on the lymphoid cell aggregates of omentum, mesentery and parietal peritoneum samples.

In BSA-injected group of rats the differences were significant at the 6th and 24th hours ( $p < 0,001$ ).

The dimensions of the lymphoid cell aggregates on the mesentery samples of quails were in mean  $2492,14 \pm 32 \mu\text{m}^2$ . There was no lymphoid cell aggregate on parietal peritoneum samples. PAS reaction revealed the absence of the basal lamina in the regions where lymphoid cell aggregates were located. In the cell aggregates found on mesentery samples no plasma cell was detected, but lymphocytes, mast cells and macrophages were.

It was seen that when compared to controls the lymphoid cell aggregates increased in BSA-injected group of quails after 1 hour of injection ( $p < 0,01$ ).

As a result, it was determined that both in rats and quails lymphoid cell aggregates are present in the abdominal cavity (in omentum, mesentery and parietal peritoneum) and they react to antigenic stimulation. It was decided that these focuses are of secondary characteristic. However, studies with different antigens have been seen as necessary to make a definite decision in quails.

Key words; Milky spot, rat, quail, omentum, mesentery, parietal peritoneum, secundar lymphoid focuses, antibody, bovine serum albumin.

## KAYNAKLAR

**Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Diker S** (1994) *İmmunoloji*, Medisan yayı serisi No:13, Ankara

**Broche F, Tellado JM** (2001) *Defense mechanism of the peritoneal cavity*, Curr Opin Crit Care, 7:105-116

**Chiasson B.Robert** (1994) *Laboratory Anatomy of White Rat*, The McGraw-Hill Companies, pp:55-56

**Cranshaw ML, Leak LV** (1990) *Milky spots of the omentum: a source of peritoneal cells in the normal and stimulated animal*, Arch Histol Cytol., 53:165-77

**Cui L, Johkura K, Liang Y, Teng R, Ogiwara, Okouchi Y, Asanuma K, Sasaki K** (2002) *Biodefense function of omental milky spots through cell adhesion molecules and leukocyte proliferation*, Cell Tissue Res, 310:321-330

**Culling CFA, Allison RT, Barr WT** (1985) *Cellular pathology technique* Butter and Tanner LTD, London

**Di Paolo N, Sacchi G** (2000) *Atlas of Peritoneal Histology*. Peritoneal Dialysis International, 20: 3

**Diker S** (1998) *İmmunoloji, İmmunolojinin Temel Kavramları*, Medisan Yayın serisi:37, 1.Baskı, ISBN: 975-7774-34-0, Ankara.

**Dux K** (1986), *Proliferative activity of macrophages in the greater omentum of the mouse in relation to the early postnatal development of the vascular structures* Journal of Leukocyte Biology, 40:445-458

**Ellis AE (2001)** *The Immunology of Teleost*, Ronald J Roberts, Fish Pathology, WB Saunders, ISBN: 0 7020 2563 1, s:133.

**Gaudio E, Rendina EA, Pannarale L, Ricci C, Marinozzi G** (1988) *Surface morphology of the human pleura. A scanning electron microscopic study*, Chest., 93:149-153

**Gedah AE, Lillehoj HS, Hendricks GL, Mashaly MM** (2002) *Initiation of humoral immunity. II. The effect of T-independent and T-dependent antigens on the distribution of lymphocyte population*, Developmental and Comparative Immunology, 26:761-771

**Hausmann MJ, Rogachev B, Weiler M, Chaimovitz C, Douvdevani A** (2000) *Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T cell growth*, Kidney Int., 57: 476-86.

**Hekking LHP, Zareie M, Driesprong BAJ, Faict D, Welten AG, Greeuw I, Schadee-Eestermans LI, Havenith CE, Van Den Born J, Ter Wee PM, Beelen RHJ** (2001) *Beter preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution*, J Am Soc Nephrol 12:2775-2786  
Igaku Zasshi, 56:199-216.

**Janeway CA, Medzhitov R** (2002) *Innate immune recognition*, Annu Rev Immunol, 20:197-216

**[Krist LF](#), [Eestermans IL](#), [Steenbergen JJ](#), [Hoefsmit EC](#), [Cuesta MA](#), [Meyer S](#), [Beelen RH](#)** (1995) *Cellular composition of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical and ultrastructural study*, [Anat Rec.](#), 241(2):163-174

**[Krist LFG](#), [Koenen H](#), [Calame W](#), [Van Der Harten JJ](#), [Van Der Linden JC](#), [Eestermans IL](#), [Meyer S](#), [Beelen RHJ](#)** (1997) *Ontogeny of milky spots in the human greater omentum: An immunochemical study*, The Anatomical Record 249:399-404

**Leslie GA and Benedict AA** (1969) *Structural and antigenic relationships between avian Immunoglobulin I. The immun responses of pheasants and quail and reductive dissociation of their immunoglobulins*, The Journal of Immunology, 103:1356-1365

**Mutsaers SE** (2002) *Mesothelial cell: Their structure, function and role in serosal repair*, Respiriology, 7:171-191

**Öcal MK, Dabanoğlu İ, Kara ME** (1999) *Evcil Memeli Hayvanlarda Anatomi (Boyun-Göğüs-Karın-Pelvis)* Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları No: 11 Syf:87-89  
Aydın

**Platell C, Cooper D, Papadimitriou JM, Hall JC** (2000) *The omentum*, World J Gastroentero, 6(2):169-176

**Pond CM** (2003) *Paracrine Interactions of mammalian adipose tissue*, Journal of Experimental Zoology 295:99-110

**Pond CM** (2005) *Adipose tissue and the immune sistem*, Prostaglandin, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 73:17-30

**Sağlam M, Aştı RN, Özer A** (2001) *Genel Histoloji*, Yorum matbaacılık Ankara

**Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Kohara S, Watanabe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H** (2004) *Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions* The Journal of Immunology, 172:6751-6763

**Shimotsuma M, Kawata M, Hagiwara A, Takahashi T** (1989) *Milky spots in the human greater omentum. Macroscopic and histological identification*, Acta Anatomica, 136:211-216

**Shimotsuma M, Takahashi T, Kawata M, Dux K** (1991) *Cellular subsets of the milky spots in the human greater omentum*, Cell Tissue Res., 264(3):599-601

**[Shimotsuma M](#), [Shields JW](#), [Simpson-Morgan MW](#), [Sakuyama A](#), [Shirasu M](#), [Hagiwara A](#), [Takahashi T](#)** (1993) *Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity*, Lymphology, 26:90-101

**Szczepanik M, Gryglewski A, Solecki R** (1999) *Defense mechanisms in the peritoneum* Przegl Lek., 56(3):227-300

**Takemori N, Ito T** (1981) *Response of the omental milky spots to colloidal saccharated ferric oxide in the mouse: light and electron microscopic study*, Hokkaido Igaku Zasshi, 56 (2): 199-216

**Takemori N, Hirai K, Onodera R, Saito N, Namiki M** (1995) *Light and electron microscope study of splenoportal milky spots in New Zealand black mice: comparison between splenoportal milky spots and aberrant spleens* J.Anat. 186:287-299

**Topley N, Liberek T, Davenport A, Li FK, Fear H, Williams JD** (1996) *Activation of inflamation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity*, Kidney Int., 56:17-21

**Turgut K** (2000) *Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis*,. Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş., Bölüm 14, s: 542-560, Konya

**Van Vugt E, Van Rijthoven AME, Kamperdijk EWA, Beelen RH** (1996) *Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats*, The Anatomical Record, 244:235-245

**Wijffels JF, Hendrickx RJ, Steenbergen JJ, Eestermans IL, Beelen RH** (1992) *Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages*, Res Immunol., 143(4):401-409

**Wilkosz S, Ireland G, Khwaja N, Walker M, Butt R, Miller AG, Herrick SE** (2005) *A comparative study of the structure of human and murine greater omentum* Anat Embryol 209:251-261

**Zhu H, Naito M, Umezu H, Moriyama H, Takatsuka H, Takahashi K, Shultz LD** (1997) *Macrophage differentiation and expression of macrophage colony stimulating factor in murine milky spots and omentum after macrophage elimination*. J Leukocyte Biology, 61:436-444

## ÖZGEÇMİŞ

Malatya’da 1982 yılında doğdu. İlkokul, orta okul ve liseyi Ankara’da okudu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2004 yılında mezun oldu. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda 2004 yılında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans tez çalışmamda yardımlarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Ülker EREN'e, araştırmanın hayvan materyalini sağlamamda desteklerini esirgemeyen Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı ve Fizyoloji Anabilim Dalı'na, arkadaşlarıma, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve sevgili eşime teşekkür ederim.