



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUŞLARDA *MACRORHABDUS ORNİTOGASTER* ENFEKSİYONUNDA
TNF- α EKSPRESYONLARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Damla ATAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Burdur-2024

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUŞLARDA *MACRORHABDUS ORNİTOGASTER* ENFEKSİYONUNDA
TNF- α EKSPRESYONLARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Damla ATAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Özlem ÖZMEN**

Bu Araştırma “Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü” tarafından 0995-YL-24 proje numarası ile desteklenmiştir

Burdur-2024

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Damla ATAY tarafından *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN* yönetiminde hazırlanan “*Kuşlarda Macrorhabdus ornitogaster Enfeksiyonunda TNF- α Ekspresyonlarının Immunohistokimyasal Olarak Araştırılması*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veterinerlik Patolojisi Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 17/01/2025

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Başkan

Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ
Bursa Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

Doç. Dr. Volkan İPEK
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşıp rehber olan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli Arş. Gör. Şerife TAŞAN'a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez sürecinde bana sürekli moral ve motivasyon veren aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ETİK BEYANI

“Kuşlarda *Macrorhabdus ornitogaster* Enfeksiyonunda TNF- α Ekspresyonlarının Immunohistokimyasal Olarak Araştırılması ” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Özlem ÖZMEN danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim

Öğrencinin Adı Soyadı: Damla ATAY

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	iii
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYANI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sindirim Sisteminin Anatomisi	2
2.2. Macrorhabdus ornithogaster	2
2.3. Kuşlarda Sindirim Sistemi Hastalıkları	4
2.4. Makrorabdozis	4
2.5. Tümör nekroz faktörü (TNF)	7
2.6. TNF- α 'nın Biyolojik Roller	8
2.7. Etki Mekanizmaları	9
2.8. TNF- α 'nın Etkileri	9
2.9. Terapötik İlaçlar Olarak TNF- α İnhibitörleri	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama	14
3.2. PAS Boyama	15
3.3. Gomori Methanamine Silver Boyama	15
3.4. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	15
4. BULGULAR	17
4.1. Nekropsi Bulguları	17
4.2. Sitolojik Bulgular	18
4.3. Histopatolojik Bulgular	21
4.4. PAS Bulguları	25
4.5. Gomori Methanamine Silver (GMS) Boyaması Bulguları	27
4.6. TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları	29
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKÇA	36
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Makrorabdozisli muhabbet kuşlarında sternal kemiğin belirginleşmesi ve ishal tablosu	17
Şekil 4.2.	Makrorabdozisten ölen bir muhabbet kuşunun proventrikulus sitolojisi, çok sayıda etken (oklar), Giemsa, 20µm.	18
Şekil 4.3.	Makrorabdozisten ölen bir başka muhabbet kuşunun proventrikulus sitolojisi, yoğun ve çok sayıda etken (oklar), Giemsa, 50µm.	19
Şekil 4.4.	Yukarıdaki resmin yakından görüntüsü, Giemsa, 20µm.	19
Şekil 4.5.	Etkenlerinin daha yakından görünümü ve segmentli yapısı (oklar), Giemsa, 20µm.	20
Şekil 4.6.	Bir başka kuşun proventrikulus sitolojisinde etkenler (oklar) ve eritrosit (ok başı) ve çok sayıda bakteri, Giemsa, 20µm.	20
Şekil 4.7.	Bir muhabbet kuşunda proventrikulusun histopatolojik görünümü ve etkenlerin mukoza üzerinde kolonizasyonu (ok), HE, Bar= 50µm.	21
Şekil 4.8.	Bir başka muhabbet kuşunda proventrikulusun histopatolojik görünümü ve etkenlerin mukoza üzerinde kolonizasyonu (oklar), HE, Bar= 20µm.	22
Şekil 4.9.	Bir başka muhabbet kuşunda proventrikulusun histopatolojik görünümü ve etkenlerin mukoza üzerinde kolonizasyonu (oklar), HE, Bar= 50µm.	22
Şekil 4.10.	Bir muhabbet kuşunda proventrikulusun mukozası ve bezlerinde etkenlerin görünümü (oklar), HE, Bar= 20µm	23
Şekil 4.11.	Bir muhabbet kuşunda ince bağırsakta çok sayıda etken (oklar) ve kanama (ok başları), HE, Bar= 200µm.	23
Şekil 4.12.	Yukarıdaki resmin yakından görünümü çok sayıda etken (oklar) ve kanama (ok başları), HE, Bar= 50µm.	24
Şekil 4.13.	Bir başka muhabbet kuşunda bağırsakta çok sayıda etken (oklar), HE, Bar= 20µm.	24
Şekil 4.14.	Bir muhabbet kuşunda bağırsaklarda etkenlerin görünümü, HE, Bar= 20µm.	25
Şekil 4.15.	Bir kuşun proventrikülüsünde yoğun şekilde <i>Macrorabdus ornitogaster</i> etkenleri (ok), PAS, Bar= 200µm.	25

Şekil 4.16.	Yukarıdaki olgudaki etkenlerin (ok) yakından görünümü, PAS, Bar= 50µm.	26
Şekil 4.17.	Etkenlerin (ok) daha büyük büyütmedeki görünümü, PAS, Bar= 20µm.	26
Şekil 4.18.	Bir başka kuşun proventrikülüsünde etkenlerin (ok) görünümü, PAS, Bar= 50µm.	27
Şekil 4.19.	Bir kuşun proventrikülüsünde siyah renkte boyanmış etkenler (ok), GMS, Bar= 200µm.	27
Şekil 4.20.	Bir başka kuşun proventrikülüsündeki etkenler (ok), GMS, Bar= 100µm.	28
Şekil 4.21.	Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü ve etkenler (ok), GMS, Bar= 50µm.	28
Şekil 4.22.	Etkenlerin büyük büyütmedeki görünümü, GMS, Bar= 20µm.	29
Şekil 4.23.	Kontrol kuşlarında bağırsaklarda negatif TNF-α ekspresyonu, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=20µm.	30
Şekil 4.24.	Bir başka kontrol kuşunda bağırsaklarda negatif TNF-α ekspresyonu, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50µm.	30
Şekil 4.25.	Makrorabdozisli bir kuşun bağırsağında yoğun etkenler (ok) ve artmış TNF-α ekspresyonu (ok başı), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=20µm.	31
Şekil 4.26.	Makrorabdozisli bir başka kuşun bağırsağında yoğun etkenler (ok) ve artmış TNF-α ekspresyonu (ok başı), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=20µm.	31

SİMGELER ve KISALTMALAR

AS	: Ankilozan Spondilitis
CD	: Crohn's disease
CD120a	: Farklılaşma Kümesi (Cluster of Differentiation)120a
CD40L	: Farklılaşma Kümesi40L
CDP87	: Farklılaşma Kümesi87
cIAP1/2	: Hücresel apoptoz inhibitör proteinleri
DAB	: Diaminobenzidine
DC	: Dentritik Hücre
E. coli	: <i>Escherichia coli</i>
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi proteini
FasL	: Fas ligandı
Fc	: Fibriler bölge
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
GMS	: Gomori Methanamine Silver
HE	: Hematoksilen-Eozin Boyama
HRP	: Horseradish Peroksidaz
HSV	: Herpes simpleks virusu
HVEM	: Herpesvirus giriş mediyatörü
ICAM	: Hücrelerarası adhezyon molekülü
IFN- γ	: İnterferon gama
IgG1	: İmmünoglobulin G1
IL	: İnterleukin
JIA	: Juvenil İdiyopatik Artritis
kDa	: Kilodalton
LIGHT	: Lenfotoksin-benzeri indüklenebilir protein
LT	: T lenfotoksin
LUBAC	: Lineer ubiquitin zinciri oluşturma kompleksi
MAPK	: Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz
MLKL	: Miks soylu kinaz benzeri
MO	: <i>Macrorhabdus ornithogaster</i>
NF- κ b	: Nuclear Factor kappa B
NK	: Doğal öldürücü
p55	: 55 kilodalton moleküler ağırlığında bir protein

PAS	: Periodic Acid-Schiff
PBS	: Fosfat Tamponlu Fizyolojik Serum
PEG	: Polietilen glikoz
PS	: Pulmoner Stenoz
PsA	: Psoriatic Arthritis
RA	: Romatoid artrit
RIPK	: Reseptör-etkileşimli protein kinaz
sTNF- α	: Çözünür tümör nekroz faktörü alfa
TACE	: TransArteriyel KemoEmbolizasyon
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
Th	: T yardımcı
TIMP	: Metaloproteinazların doku inhibitörleri
tmTNF- α	: Transmembran Tümör nekroz faktörü alfa
TNFR1	: Tümör nekroz faktörü reseptörü 1
TNFRSF1A	: Tümör nekroz faktörü reseptörü 1A
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü alfa
TRADD	: TNF Reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi
TRAF2/5	: TNF reseptör-iliskili faktör 2/5
TRAIL	: TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand
UC	: Ülseratif kolitis
VACM-1	: Vasküler Hücre Yapışma Molekülü 1
μm	: Mikrometre

ÖZET

Kuşlarda önemli ve bulaşıcı bir hastalık olan megabakteriyozis (makrorabdozis) hastalığında mide ve bağırsaklarda patolojik lezyonlara sebep olur. Tedavisi çok zor ve genellikle başarısızdır. Özellikle psittasin ve paserin kuşlarda önemli kayıplara yol açar. Bu sebeple hastalığın tedavisinde birçok yöntem denenmektedir. TNF- α birçok hastalıkla ekspresyonu artan bir sitokindir ve bunun inhibisyonunun birçok hastalık tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı Anabilim Dalımız arşivinde bulunan megabakteriyozisli kuş bloklarından alınacak kesitlerde TNF- α ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak tespiti ve bu hastalıkta TNF- α inhibisyonunun tedavi amacıyla kullanılıp kullanılamayacağının değerlendirilmesidir. Bu amaçla 25 adet daha önce makrorabdozis teşhis edilen muhabbet kuşunun mide bağırsak sistemine ait parafin bloklar kullanıldı. Bloklardan histopatolojik incemeler için hematoksilin-eozin boyaması, etkenler için periodik Schiff (PAS) ve Gomori Methanamine Silver boyaması ve immunohistokimyasal olarak TNF- α ekspresyonlarının değerlendirilmesi için olmak üzere dörder adet kesit alındı. Histopatolojik olarak proventrikülüs bölgesinde daha belirgin olmak üzere eroziv ülseratif lezyonlar ve yoğun şekilde etkenler saptandı. Etkenler PAS ve Gomori Methanamine Silver boyaması ile daha net tespit edildi. İmmunohistokimyasal olarak TNF- α ekspresyonlarının lezyonların olduğu bölgelerde epitel hücreleri başta olmak üzere tüm hücrelerde belirgin şekilde arttığı saptandı. Bu çalışmanın sonuçları muhabbet kuşlarında önemli kayıplara yol açan bu hastalığın patogenezinde TNF- α 'nın önemli rol oynadığını gösterdi. Bu sonuçlar hastalık tedavisinde TNF- α antagonistleri veya inhibitörlerinin bir tedavi seçeneği olarak düşünülebileceği fikrini uyandırdı. Bu konuda yeni ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Makrorabdozis, muhabbet kuşu, TNF- α , patoloji, ihc.

ABSTRACT

The Immunohistochemical Investigation of TNF- α Expressions in *Macrorhabdus ornithogaster* Infection in Birds.

Macrorhabdosis, a significant and contagious disease in birds, causes pathological lesions in the stomach and intestines. Treatment is extremely challenging and often unsuccessful. It leads to substantial losses, especially in psittacine and passerine birds. For this reason, various methods are being explored for its treatment. TNF- α is a cytokine whose expression increases in many diseases, and its inhibition is known to be utilized in the treatment of several conditions. This study aimed to evaluate TNF- α expression immunohistochemically in sections obtained from archived blocks of birds diagnosed with macrorhabdosis and assess whether TNF- α inhibition could be used as a treatment strategy for this disease. For this purpose, paraffin blocks containing gastrointestinal tissues from 25 budgerigars previously diagnosed with macrorhabdosis were used. Four sections were prepared from each block for histopathological examination using hematoxylin-eosin staining, detection of pathogens with Periodic Acid-Schiff (PAS) and Gomori Methanamine Silver staining, and evaluation of TNF- α expression via immunohistochemistry. Histopathological examination revealed erosive and ulcerative lesions, particularly pronounced in the proventriculus region, along with a high density of pathogens. Pathogens were more clearly identified with PAS and Gomori Methanamine Silver staining. Immunohistochemically, TNF- α expression was significantly increased in the lesion areas, notably in epithelial cells and other cell types. The results of this study demonstrated the critical role of TNF- α in the pathogenesis of this disease, which causes significant losses in budgerigars. These findings suggest that TNF- α antagonists or inhibitors could be considered as a potential treatment option for macrorhabdosis. Further comprehensive studies are needed on this topic.

Keywords: Macrorhabdosis, budgerigar, TNF- α , pathology, IHC.

1. GİRİŞ

Macrorhabdus ornithogaster (MO) enfeksiyonu, dünya çapında kuşlar arasında yaygın ve önemli bir sağlık sorunu oluşturur. Özellikle evcil kuşlar ve kanatlı sektöründe, bu maya nedeniyle büyük ekonomik kayıplar yaşanabilir. MO, Psittaciformes, Passeriformes, Galliformes gibi geniş bir kuş türü yelpazesinde tanımlanmış olup, hastalık klinik olarak hem akut hem de kronik belirtilerle kendini gösterebilir. Akut formda ani ölümle sonuçlanabilirken, kronik formda ise iştahsızlık, kilo kaybı ve sindirim sorunları gibi uzun süreli problemlere yol açar. Enfekte kuşlarda sindirim sistemi üzerinde ciddi tahribatlar meydana gelir ve bu durum hem bireysel sağlığı hem de ticari verimliliği olumsuz etkiler. Ayrıca, hastalığın teşhis ve tedavi süreçleri, mikroskopik inceleme ve kültür yöntemlerinin zorlukları nedeniyle karmaşık hale gelir. Bu nedenle, MO enfeksiyonu, kuş sağlığı açısından büyük önem taşıyan ve kontrol altına alınması gereken bir hastalıktır. MO enfeksiyonu kuşlarda görülen bir tür mide-bağırsak enfeksiyonudur. Bu hastalık, mide veya bağırsaklarda aşırı bakteri çoğalmasına ve inflamasyona yol açar, genellikle sindirim sistemi sorunları ve genel zayıflık ile kendini gösterir. Bu hastalık uygun tedavi edilmezse hayvanların genel sağlık durumunu olumsuz yönde etkileyebilir. Ancak hastalığın net ve kesin bir tedavisi bilinmemektedir.

TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), vücudun inflamatuvar yanıtlarını düzenleyen önemli bir sitokin olup, birçok akut ve kronik hastalığın patogeneğinde rol oynar. Özellikle otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar ve kanser gibi durumlarda TNF- α düzeylerinin yüksek olduğu görülür. Bu sitokin, inflamasyonun teşvik edilmesinde, hücre ölümünde ve bağışıklık yanıtlarında önemli bir rol oynar. TNF- α 'nın aşırı üretimi, dokularda hasara ve hastalıkların ilerlemesine yol açabilir. Bu nedenle, TNF- α 'nın inhibe edilmesi, birçok inflamatuvar hastalığın tedavisinde büyük bir öneme sahiptir. TNF- α inhibitörleri, birçok hastalıkların yönetiminde etkin bir tedavi seçeneği sunar; inflamasyonu azaltarak semptomların iyileşmesine ve hastaların yaşam kalitesinin artmasına yardımcı olur. Ayrıca, bu tedavi yöntemleri, hastalıkların seyrini yavaşlatarak, organ hasarının önlenmesine ve uzun dönemde sağkalım oranlarının yükselmesine katkı sağlar.

TNF- α inhibisyonu, bağışıklık sisteminin aşırı yanıtlarını baskılayarak iltihaplanmayı azaltabilir. MO enfeksiyonu gibi hastalıklarda, özellikle inflamasyonun ve bağışıklık yanıtının kontrol altına alınması, enfeksiyonun daha iyi yönetilmesine yardımcı olabilir. Ancak, bu tedavi yaklaşımının etkili olup olmayacağına dair daha fazla araştırma ve klinik veri gereklidir. Bu tez çalışmasının amacı doğal olarak MO ile enfekte kuşlarda sindirim sisteminde TNF- α ekspresyonlarının incelenmesi ve TNF- α 'nın bu hastalığı patojenezindeki rolünün belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sindirim Sisteminin Anatomisi

Sindirim sistemi yalnızca besin sindirimi ve emilimi için önemli olmakla kalmaz, aynı zamanda vücuttaki en büyük bağışıklık organıdır ve eksojen patojenlere karşı koruma sağlar. Sindirim sistemi, kuşlarda uçuşu kolaylaştırmak için tasarlanmış adaptasyonlara sahiptir. Kuşlarda bağırsakların boyu memelilere göre daha kısadır. Ayrıca kuşlarda dişler ve ağır çene kasları yoktur, bunlar daha hafif bir gaga ile değiştirilmiştir. Yiyecek parçacıkları bütün olarak yutulur ve daha sonra vücut boşluğunda bulunan ventrikulus (taşlık) tarafından öğütülür (McLelland, 1975; McLelland, 1979; Denbow, 2022).

Memelilerden farklı olarak, kuş özefagusu servikal ve torasik bölgeye ayrılmıştır. Ayrıca, kuşların özefagusunda memelilerde bulunan hem üst hem de alt yemek borusu sfinkterleri yoktur (Mule, 1991).

Memelilerde mide tek bir bölmeden oluşur. Ancak kuşlarda mide, proventrikulus ve ventrikulus olmak üzere iki bölmeden oluşur ve memelilerdeki karşılığıdır. Proventrikulus veya bezli mide, ventrikulus veya kaslı mideye bağlantılıdır. Proventrikulus, türler arasında boyut ve şekil bakımından farklılık gösteren, suda yaşayan etoburlarda nispeten büyük ve gerilebilirken, granivor türlerde nispeten küçük olan fusiform bir organdır. Devekuşlarında proventrikulus özellikle büyüktür (McLelland, 1979).

Proventrikulus hem miyenterik hem de submukozal pleksus içerir (Martinez ve diğerleri, 2000). Taşlığın iç yüzeyi, bazen koilin olarak adlandırılan ve mukozal bezler tarafından üretilen bir kütikül ile kaplıdır. Kütikül, taşlığı proventrikulus tarafından salgılanan asit ve proteolitik enzimlerden ve sert gıda maddelerinin öğütülmesi sırasında oluşan yaralanmalardan korur. Kütikülün yeşilimsi veya kahverengimsi rengi, duodenumdan safra pigmentlerinin geri akışından kaynaklanır (Vergara ve ark., 1989).

2.2. *Macrorhabdus ornithogaster*

Macrorhabdus ornithogaster (MO), kuşların proventrikulus ve ventrikulusları arasındaki dar bir bölgede (istmus) bulunan bir mayadır (Filippich ve Parker, 1994; Gerlach, 2001). Bu maya, Saccharomycet'lere ait olup istmusda kolonize olabildiği bilinen tek, anamorfik askomisettir (Phalen, 2005; Tomaszewski ve ark., 2003). MO, evcil kuşlar ile dünya çapındaki avikültür koleksiyonlarındaki kuşlarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu mikroorganizma, Psittaciformes (çengel

gagalılar), Passeriformes (ötücü kuşlar), Galliformes (tavukgiller), Struthioniformes (devekuşları), Anseriformes (su kuşları), Pelecaniformes (pelikanlar) ve Rheiformes (rea-devekuşu benzeri- kuşları) dahil olmak üzere 40'tan fazla kuş türünde tanımlanmıştır (Filippich ve Parker, 1994; Gerlach, 2001). Araştırmalar bu hastalığın kanatlı sektöründe büyük ekonomik kayıplara neden olacağını bildirilmiştir (Martins ve ark. 2006).

Dünya çapında bir dağılıma sahip olan MO enfeksiyonunun görülme sıklığının esaret altında yaşayan muhabbet kuşlarında (*Melopsitticus undulatus*), küçük papağanlarda (*Forpus spp.*) ve kanaryalarda (*Serinus canaria*) çok yüksektir (Baker, 1992; Dorrestein ve ark., 1980; Filippich ve ark., 1993; Hargreaves, 1981; Henderson ve ark., 1988; Phalen, 2005; Van Herck ve ark., 1984). Etken esaret altında yetiştirilen büyük nandularda (*Rhea americana*), kümes hayvanları ve deve kuşları gibi türlerde de tespit edilmiş ancak hastalıkla ilgili bulgular pek saptanmamıştır (Behnke ve Fletcher, 2011; Martins ve ark., 2006; Phalen 2014; Piasecki ve ark. 2012).

MO, ilk olarak 1980'lerin başında, evcil ve yabani kuş türlerinde görülmüş ve giderek dünya çapında yaygınlaşmıştır (Barker ve ark., 1985; Dorrestein ve ark., 1980; Van Herck ve ark., 1984). Bu mikroorganizma ilk teşhis edildiğinde bir bakteri olarak değerlendirilmiş ancak antibiyotiklere cevap vermemesi, antifungal ilaçlar ile tedavi edilebilmesi sebebiyle daha sonra bir maya olduğu saptanmıştır (Phalen 2014). Bu sebeple önceleri "megabakteri" olarak adlandırılmıştır (Scanlan ve Graham 1990; Van Herck ve ark., 1984).

Hastalık, taze dışkının mikroskopik incelemesiyle teşhis edilir. Ölü kuşlarda, mikroorganizma doğrudan istmusun tuşe preparasyonu ile tespit edilebilir. MO, 20-80 µm uzunluğunda ve 2-3 µm genişliğinde, mikroaerofilik, ince, düz çubuklar şeklinde olup yuvarlak uçlara sahiptir. Mikroskop altında ıslak preparasyonlar doğrudan incelendiğinde, organizma içinde düzenli aralıklarla küçük, dikdörtgen şekilli, ışık kırıcı çekirdekler bulunduğu gözlenir (Dorrestein ve ark., 1980; Phalen, 2005). Periyodik asit-Schiff (PAS) ve Gram pozitifdir, hematoksilin ve eozin boyasıyla kristal şeklinde görünürler. Giemsa boyasıyla mikroorganizmalar kırmızımsı-mor renkte boyanırken Gram boyası sadece sitoplazmayı boyar (Baker, 1992; Ozmen ve ark., 2013; Phalen, 2006; Scanlan ve Graham, 1990; Schmidt ve ark., 2024; Tomaszewski ve ark., 2003). Etken floresan mikroskopta Kalkoflor beyaz M2R boyasıyla tespit edilebilir. Bu boyayla kitini ve selülozu boyar bu sebeple tipik hücre duvarı gözlemlenebilir (Tomaszewski ve ark., 2003).

MO, taze dışkının mikroskopik incelemesiyle kolayca tanımlanabildiğinden, mantar kültürü rutin bir tanı testi değildir. Bu organizma standart mikrobiyolojik izolasyon teknikleriyle izole edilemez.

Kültür, minimum esansiyel maddeler (Eagle medyum ve fetal sığır serumu) içeren sıvı besiyerinde veya sakaroz ya da glikoz eklenmiş besiyerinde mümkündür. Ayrıca, MO'yu üretmek için en iyi pH aralığı konusunda bilgiler farklılık göstermektedir. Ek tanı testleri arasında flotasyon teknikleri ve polimeraz zincir reaksiyonu testi yer alır (Borrelli ve ark., 2015; Hannafusa ve ark., 2007; Martins e-ve ark., 2006; Mutlu ve ark., 1997; Phalen, 2006; Phalen, 2014; Wolf, 2000).

2.3. Kuşlarda Sindirim Sistemi Hastalıkları

Kuşların sindirim sistemi hastalıkları arasında bakteriyel, fungal, viral ve paraziter etkenlerin neden olduğu enfeksiyöz hastalıklar yaygın şekilde görülmektedir (Ritzman, 2005). Gastrointestinal sistemi oluşturan organlara bağlı hastalıkları kısaca özetlemek gerekirse; orofarangeal bölgede *Staphylococcus* sp. ve *Klebsiella* sp., gibi gram negatif bakterilerden kaynaklanan bakteriyel enfeksiyonlar, mikobakterlere (*Mycobacterium avium*, *M. tuberculosis*, *M. genovense*) bağlı ağız boşluğunda granulom oluşumu, kandidiyazis, A vitamini yetmezliği, capillaria sp. ve trichomoniasis ile ilişkili paraziter hastalıklar, pox virus enfeksiyonu, travma ve neoplaziler yer almaktadır. Kursaklar ağız boşluğunu etkileyen hastalıkların çoğundan etkilenmektedir. Bunlar arasında bakteriyel, fungal hastalıklardan özellikle kandidiyazis ve ayrıca trikomoniyazis, kapillariasis yaygın görülen hastalıklar arasında olup, nonenfeksiyöz problemler arasında kursak fistülü, travmatik yaralanmalar, yabancı cisim ve neoplaziler yer almaktadır (Hadley, 2005). Proventrikulus ve ventrikuluslarda ise MO fungal etkenin neden olduğu megabakteriyozis dışında *E. coli*, *klebsiella*, *salmonella*, *enterobacter* spp. etkenlerinin neden olduğu bakteriyel proventrikülitis gözlenebilir. Bunların dışında yabancı cisme bağlı travma, kronik stres-yabancı cisim-enfeksiyöz hastalıklara bağlı proventriküler ve ventriküler ülserasyonlar ile adenokarsinom-karsinom-leyomyosarkom karakterinde neoplaziler görülebilmektedir (Klasing, 1999; Brandão ve Beaufrère, 2013).

2.4. Makrorabdozis

MO, enfekte kuşların postmortem incelemelerinde istmustan alınan kazıntılarının süspansiyonlarında kolayca tanımlanabilir. Histolojik olarak, organizmalar soluk eozinofilik renkte olup, istmus yüzeyinde ve proventrikulus ile istmus arasındaki bezlerin arasında paralel şekilde dizilim gösterirler. Şiddetli vakalarda etken proventrikulus istmusunun bezleri arasına ve ventrikulusa invaze olarak ventrikulusun keratin tabakasına kadar ilerleyip lenfoplazmasitik bir yangısal reaksiyona neden olabilir (Baker, 1997; De Herdt ve ark., 1997; Phalen, 2005).

MO ile enfekte kuşlar klinik hastalık belirtileri göstermeyebilir (Baker, 1997; Lanzarot ve ark., 2013). Ancak kusma, koyu katran renginde dışkı, kronik zayıflama ve şiddetli vakalarda ölüme yol açan hastalıklara neden olabilir (Baker, 1997; Lanzarot ve ark., 2013; Ravelhofer ve ark., 1998; Martins ve ark., 2003). Eşzamanlı hastalıkların, konakçı kuşun bağışıklık sistemi ve sindirim sistemi florası üzerinde etkili olduğu, bu durumun MO enfeksiyonuna bağlı klinik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olduğu düşüncesi giderek daha belirgin hale gelmektedir (Baker, 1997; De Herdt ve ark., 1997; Phalen, 2014; Robino ve ark., 2019). Hastalığın endemik olduğu yerlerde kuşlarda makrorabdozisin yaygınlığı ve patolojik bulgularının %27-64 arasında değiştiği bildirilmiştir (Baker, 1997; Phalen, 2006).

Hastalık kuşlarda, akut ve kronik olarak iki farklı klinik belirti göstermektedir (Henderson ve ark., 1988; Phalen, 2006; Snyder ve Treuting, 2014).

Akut formda, kuşlar sağlıklı görünseler de aniden iştahsızlık ve bazen kanlı bir kusma görülebilir. Klinik bulguların hemen ardından hayvan 1-2 gün içinde ölür. Akut form papağanlarda daha sık gözlenirken muhabbet kuşlarında daha nadir görülür (Filippich ve ark., 1993; Phalen ve ark., 2020).

Kronik formda, kuşlar iştahsızdır ve kilo kaybı görülür. Hasta kuşlar yiyeceklerini ağızlarına alır ancak yutmazlar. Kusma sık gözlenen bulgulardandır. Gaga çevresinde kurumuş ya da taze tükürük bulunur. İshal sık gözlenen diğer bir bulgudur. MO, isthmus bezlerinin yüzeyinde mikroskobik olarak bulunabilir. Organizmalar koilin tabakasını genellikle aşamazlar. İsthmus bezlerine invaze olarak koilin tabakasına ilerleyebilir. Etken istmusa bezlerin atrofisine ve nekrozuna yol açar. Bu nedenle, yiyecekler sindirilemez ve dışkıda sindirilmemiş taneler veya peletler görülür. Kuşlar verim azalır ve uzun süreli kilo kaybı gözlenir. Diğer spesifik olmayan klinik belirtiler uyuşukluk ve polifaji veya anoreksidir (Phalen, 2006).

Kronik formda, klinik belirtiler orta yaşlı ya da yaşlı kuşlarda daha yaygındır (Baker, 1997; Phalen, 2006). Enfekte kuşlarda gözlenen klinik belirtiler arasında paketlenmiş hücre hacimlerinde azalma ve sodyum, klor, fosfat, glikoz, kolesterol ve aspartat aminotransferaz değerlerinde düşme sayılabilir (Henderson ve ark., 1988).

Gastrik ülserasyon olduğunda, total protein konsantrasyonlarında azalmalar gözlenebilir. Kontrastlı radyografide bazı kuşlarda proventrikulusta genişleme ve geçiş süresinde artış gözlenebilir (Filippich ve ark., 1993; Filippich ve Parker, 1994).

Patolojik bulgular, proventriküler ve ventriküler ülserasyon, istmus bezi atrofisi veya nekrozu, goblet hücresi hiperplazisi, inflamasyon, koilin bozulması ve gastrik perforasyonlar olarak sıralanabilir. Organizmalar histolojik kesitlerde en çok proventriküler istmusun yüzeysel mukozal bezlerinde görülür. Lezyonlar, muhabbet kuşlarında daha yaygındır (Henderson ve ark., 1988; Kheirandish ve Salehi, 2011; Moore ve ark., 2001; Ozmen ve ark., 2013; Powers ve ark., 2019). Nekropside, zayıflama ve kataral veya hemorajik, ülseratif proventrikülitis bulunabilir. Değişiklikler genellikle mukoza ile sınırlıdır; sadece çok şiddetli vakalarda proventrikülüs kası da etkilenir. Ayrıca ülserasyonlar ve nekroz görülebilir. Distal proventrikulus ve ventrikulus ile proventrikulus arasındaki istmus çoğu vakada genişlemiştir ve proventrikulus duvarı incedir. Proventrikulus ve istmus mukozasında opak mukus tabakaları da görülebilir (Hanka ve ark., 2010; Phalen, 2006; Tsai ve ark., 1992). Diğer histolojik bulgular arasında kısmi lenfositler, plazma hücreleri ve fibroblastlardan oluşan lamina proprianın inflamatuvar reaksiyonu sayılabilir (Baker, 1985; Filippich ve ark., 1993; Phalen, 2006; Schmidt ve ark., 2024; Tsai ve ark., 1992).

Üreme, tüy dökme, kötü hijyen ve sahip değişikliği gibi stres faktörlerinin hastalık için predispoze faktörler arasında olduğu rapor edilmiştir (Baker, 1997; Hanka ve ark., 2010; Gerlach, 2001). Bazı araştırmalarda, erkek muhabbet kuşlarının dişilere göre hastalıktan daha çok etkilendiği bildirilmiştir. Bu nedenle, erkeklerde cinsiyet yatkınlığı olduğundan şüphelenilmektedir ancak herhangi bir yaş yatkınlığı belirlenmemiştir (Filippich ve Hendrikz, 1998; Lanzarot ve ark., 2013; Tuschak ve ark., 1990).

MO, enfeksiyonunun ortaya çıktığı vakalarda, kuşlarda önemli morbidite ve mortaliteye yol açabilir. Bu nedenle, enfekte kuşları erken ve doğru bir şekilde tespit etmek çok önemlidir. Böylece enfekte kuşlar izole edilip tedavi edilerek avikültür koleksiyonunda bulaşma ve yaygınlaşma engellenebilir. Benzer şekilde, hastalık belirtisi göstermeyen taşıyıcı kuşlar, çevresel kontaminasyonun sürekli kaynağı olabilir ya da yavrularına bu enfeksiyonu bulaştırarak etkenin gelecek nesillere aktarılmasına neden olabilirler (Moore ve ark., 2001).

Enfeksiyonun teşhisi zor olabilir, çünkü klinik belirtiler spesifik değildir (Speer ve ark., 2004). Antemortem (ölüm öncesi) teşhis koymak için en yaygın kullanılan test, kuşların dışkılarının mikroskopik incelemesidir. Bu amaçla, taze dışkılar %0,9'luk sodyum klorür çözeltisi ile karıştırılarak doğrudan ıslak preparatlar hazırlanır ve 40'lık objektif altında incelenir (Phalen, 2005).

Genellikle tespit edilmiş dışkı sürüntülerinde, MO'nun varlığını incelemek için Gram boyama ve Diff-Quik gibi hızlı boyama yöntemleri kullanılır. Ancak değişken boyama özellikleri ve zayıf

boyanmalar sebebiyle gözden kaçabilir. Uygun şekilde boyandığında, organizmalar gram pozitif olup Diff-Quik boyaları ile koyu mavi renkte boyanır. MO'yu yoğunlaştırmak ve organizmaları diğer katı dışkı materyallerinden ayırmak için dışkıları hacimlerinin yaklaşık 20 katı fizyolojik tuzlu su ile küçük bir tüpte homojen hale getirilebilir. Ardından homojenleştirilmiş dışkı süspansiyonun üst kısmından küçük bir damla pipete çekilir pipet içinde 10 saniye dinlendirilir ve ilk birkaç damla atıldıktan sonra bir damla lam üzerine damlatılır ve mikroskopla incelenir. MO'nun partiküllerden daha uzun sürede dibe çökmesi nedeniyle, bu yoğunlaştırma tekniği ile organizmanın daha kolay görülebildiği bildirilmiştir (Phalen, 2014).

MO'nun neden olduğu hastalığın tedavisi zordur. Enfeksiyonu gösteren klinik belirtiler yoksa tedavi önerilmez (Borrelli ve ark., 2015; Hannafusa ve ark., 2007; Martins e-ve ark., 2006; Mutlu ve ark., 1997; Phalen, 2006; Phalen, 2014; Wolf, 2000). İyi hijyen ve yüksek kaliteli yem kullanımı, enfeksiyonun en aza indirilmesine ve diğer kuşların korunmasına yol açan önleme tedbirleridir (Amer ve Mekky, 2020).

Tümör nekroz faktörü α (TNF- α), serumda endotoksin kaynaklı faktör, kaşektin ve farklılaşmayı indükleyen faktör olarak da bilinir.

2.5. Tümör nekroz faktörü (TNF)

Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi, fizyolojik süreçlerde, sistematik inflamasyonda, tümör lizisi, apoptozis ve akut faz reaksiyonunun başlatılmasında rol oynayan en önemli sitokinlerden bazıları olan TNF- α , TNF- β , CD40 ligandı (CD40L), Fas ligandı (FasL), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ve LIGHT'ı (lenfotoksinlere homologdur, indüklenebilir ekspresyon gösterir ve T lenfositleri tarafından ifade edilen bir reseptör olan HVEM için HSV glikoprotein D ile rekabet eder) içerir (Chu, 2013).

Kaşeksini, esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenen ve ayrıntılı olarak T-lenfosit, nötrofil, mast hücresi, fibroblast ve endotel hücrelerinin de üretimine katkısı sunan bir çeşit glikoproteindir. Doku yaralanması ya da fiziksel stres sonucunda kanda ilk saptanabilen sitokindir ve birçok otoimmün hastalıkta tedavinin başlangıcında ve devam ettirilmesinde önemli özellikleri mevcuttur (Vilcek, 2008). Özellikle gram-pozitif bakteri, parazit, virus ve tümör hücreleri, immün kompleks oluşumu, komplement sistemi aktivasyonu, interleukin (IL)-1, IL-2 ve interferon- γ ile artış sağlanmaktadır. Hatta kendisi ile dahi salınımı indüklenebilmektedir (Tseng ve ark.,2018)

Tümör nekrotik aktivitesini düzenleyen biyolojik bir faktörün varlığına dair ipuçları, 18. yüzyılda şiddetli bakteriyel enfeksiyona maruz kalan kanser hastalarının tümörlerinde ara sıra küçülme gözlemlenmesinin ardından ortaya çıkmıştır (Coley, 1991). 1975 yılında yapılan deneyler, “Tümör Nekroz Faktörü” (TNF- α) adı verilen bir proteinin, retiküloendotelial sistemlerinin uyarılması ve lipopolisakkarit zorluğunun ardından hayvanların dolaşımına salındığını göstermiştir (Carswell ve ark., 1975). Bu proteinin belirli tümör formlarında hızlı nekrotik gerilemeye neden olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle bu isim verilmiştir. TNF- α 'nın nekrotik yeteneğinin tüm tümör tipleri için doğru olmadığı kanıtlanmıştır. TNF- α 'nın terapötik potansiyeli etkili konsantrasyonlardaki sistemik toksisitesi tarafından engellenmiştir. Bu ayrımcı TNF- α aracılı sitotoksosite, tümör hücresinin nitrotirozinlenmiş tubulin aracılı mikrotübül disfonksiyonu geçirme yeteneği ile ilişkili olabilir (Idriss, 2000). Ancak, TNF- α 'nın tümör hücreleri üzerindeki spesifik nekrotik etkileri interferon varlığıyla artmıştır (Fiers, 1991). Hem TNF- α hem de lenfotoksin (TNF- β olarak adlandırılır ve ayrıca (T lymphotoxin alpha) LT α olarak da adlandırılır) yapısal ve işlevsel olarak ilişkili iki proteini tanımlar (Idriss ve Naismith 2000; Armitage, 1994; Bazzoni ve Beutler, 1996; Beyaert ve Fiers, 1994; Fiers, 1991; Vilcek ve Lee, 1991). Her iki proteini de belirtmek için TNF kısaltması kullanılmaktadır. Her iki protein de sırasıyla 1984 yılında aktive edilmiş makrofajlardan ve T hücrelerinden izole edilmiştir (Gray ve diğerleri, 1984; Pennica ve diğerleri, 1984).

2.6. TNF- α 'nın Biyolojik Roller

TNF- α 'nın biyolojik işlevleri çeşitlidir ve etki mekanizması bir bakıma karmaşıktır. Bir yandan belirli enfeksiyon tiplerine karşı direnç kazandıran, diğer yandan patolojik komplikasyonlara neden olan bu protein, çelişkili roller üstlenir (Fiers, 1991). Bu, aktive edilen çeşitli sinyal yollarıyla ilişkili olabilir.

TNF- α vücutta immunostimülasyon, enfeksiyon etkenlerine karşı direnç, tümörlere karşı direnç (Idriss ve Naismith 2000; Vilcek ve Lee, 1991) ve embriyonik gelişim (Wride ve Sanders, 1995) gibi çeşitli terapötik roller oynar. Öte yandan, parazitik, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar TNF- α dolaşımı nedeniyle daha patojenik veya ölümcül hale gelir (Fiers, 1991). Bununla birlikte, TNF- α 'nın başlıca rolü bu tür enfeksiyonlara karşı dirençte önemli bir aracı olarak görünmektedir (Goldfeld ve Tsai, 1996).

TNF- α , nötrofillerin ve trombositlerin aktivasyonu, makrofaj/NK hücre öldürme yeteneklerinin artırılması ve bağışıklık sisteminin uyarılması yoluyla enfeksiyona karşı dirence katkıda bulunabilir (Fiers, 1991). TNF- α özellikle interferon ile kombinasyon halinde anti-malign hücre sitotoksitesi gösterir (Fiers, 1991; Gruss ve Dower, 1995). Böyle bir kombinasyon, hayvan modellerinde agresif non-immun tümörleri tedavi edebilir.

2.7. Etki Mekanizmaları

TNF- α , etkisini, bir trimer olarak bağlanarak ve çoğu hücre zarında büyük sayılarda bulunan yüksek afiniteli reseptörleri kümeleyerek gösterir (Loetscher ve ark., 1991a; Schoenfeld ve ark., 1991). TNF- α , çeşitli reaksiyonları kışkırtan bir dizi ikincil proteini aktive ederek etkilerini gösterir. TNF- α , hücre içinde çeşitli tepkileri tetikleyen bir dizi ikincil proteini aktive ederek etkilerini gösterir (Beyaert and Fiers, 1994; Darnay and Aggarwal, 2000; Thornberry and Lazebnik, 1998; Vilcek and Lee, 1991).

TNF- α , moleküler ağırlığı 55 ve 75 kDa olan iki benzer reseptöre bağlanır. (Loetscher ve ark., 1991b). Bu reseptörler, hücre dışı bölgede çok sınırlı bir homolojiye sahiptir. TNF reseptör üst ailesi, tekrarlayan sistein kümelerinin varlığıyla tanımlanır. Proteinlerin hücre içi bölgelerinde hiçbir homoloji görülmez (Beutler ve Bazzoni, 1998'de incelenmiştir). Hücre içi bölgelerde homolojinin olmaması, iki reseptörün farklı sinyal yollarını aktive ettiğini düşündürmektedir. TNF- α reseptörleri, eritrositler ve uyarılmamış T lenfositler gibi birkaç istisna dışında, bilinen hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunur. Reseptör yoğunluğu hücre başına 200-10.000 arasındadır. Bir hücrede bulunan reseptör sayısı ile TNF- α 'nin neden olduğu yanıtın büyüklüğü veya yönü arasında bir korelasyon yok gibi görünmektedir (Beyaert ve Fiers, 1994).

2.8. TNF- α 'nın Etkileri

IL-1, IL-6, IL-18 ve TNF- α proinflatuar etki ve IL-10, TGF- β ise antiinflatuar etki göstermektedir. TNF- α 'nın pleiotropik etkileri söz konusudur, yani inflamatuvar gidişat sırasında çeşitli evrelerde çeşitli şekillerde değiştirilebilir ve farklı etkiler gün boyunca korunur. TNF- α , akut rejimde endotel ömrü adezyon molekülleri ve göçten sorumlu küçük sitokinleri, yani kemokinleri üretim adına uyarılmaktadır. Neticede, nötrofil ve makrofajların çalıştırılmasına aracılık edilerek söylenebilmektedir. TNF- α 'nın enerji metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rolleri mevcuttur. TNF- α ayrıca viral replikasyonu baskılamakta ve patojenlerin makrofajlarca ortadan kaybolmalarını sağlamaktadır.

TNF- α , çeşitli hücre tipleri üzerinde pleotropik etkilere sahip bir sitokindir. İnflatuar yanıtın önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmış olup bazı inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir (Bradley, 2008). Yapısal olarak TNF- α , esasen aktive edilmiş makrofajlar, T-lenfositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen 157 amino asitten oluşan bir homotrimer proteindir (Horiuchi ve ark., 2010). Diğer sitokinler ve kemokinler de dahil olmak üzere bir

dizi çeşitli inflamatuvar molekülü tetiklediği işlevsel olarak bilinmektedir. TNF- α , çözünür ve transmembran formda bulunur. Transmembran TNF- α (tmTNF- α), başlangıçta sentezlenen öncü formdur ve çözünür TNF- α (sTNF- α) olarak salınması için membrana bağlı bir parçalanma metalloproteinaz olan TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından işlenmesi gerekir (Jiang ve ark., 2017). İşlenen sTNF- α daha sonra tip 1 reseptörler (TNFR1, TNFRSF1A, CD120a ve p55 olarak da bilinir) ve tip 2 reseptörler (TNFR2, TNFRSF1B, CD120b ve p75 olarak da bilinir) aracılığıyla çeşitli biyolojik aktiviteleri kolaylaştırır (Vandenabeele ve ark., 1995, Bazzoni ve Beutler, 1996, RA, 1997, Moss ve ark., 1997). tmTNF- α ayrıca hem TNFR1 hem de TNFR2 üzerinde etki eder, ancak biyolojik aktivitelerinin esas olarak TNFR2 aracılığıyla yapılmaktadır (Grell ve ark., 1995). TNFR1, tüm insan dokularında ifade edilir ve TNF- α için temel sinyal reseptörüdür. TNFR2 genellikle bağışıklık hücrelerinde ifade edilir ve sınırlı biyolojik tepkileri kolaylaştırır (Morita ve ark., 2001). Genel olarak, TNF- α reseptörlerine, esas olarak TNFR1 ve TNFR2'ye bağlanır ve daha sonra inflamasyon ve hücre ölümü gibi biyolojik işlevler için moleküler sinyaller iletir. TNFR1, hem sTNF- α hem de tmTNF- α tarafından aktive edilir ve TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) adaptör proteini ile etkileşime giren bir ölüm alanını (DD) işler (Pobezinskaya ve Liu, 2012)

TNFR1'in aktivasyonu, kompleks I, IIa, IIb ve IIc olarak adlandırılan farklı sinyal komplekslerinin oluşumunu tetikleyebilir ve bu da farklı hücresel yanıtlarla sonuçlanır (Pasparakis ve Vandenabeele, 2015; Brenner ve Mak, 2015). Kompleks I'in birleştirilmesi sırasında, aktive edilmiş TNFR1, TRADD'ye bağlanır ve bunu reseptörle etkileşen serin/treonin-protein kinaz 1 (RIPK1), TNFR ile ilişkili faktör 2 veya 5 (TRAF2/5), apoptozis proteininin hücresel inhibitörü 1 veya 2 (cIAP1/2) ve linear ubiquitin zincir birleştirme kompleksi (LUBAC) dahil olmak üzere çeşitli bileşenlerin birleşmesi ve etkileşimi izler (Holbrook ve ark., 2019). Bu sinyal yolu, nükleer faktör κ B'nin (NF- κ B) ve mitogenle aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) aktivasyonu ile sonuçlanır (Haas ve ark. 2009; Gerlach ve ark. 2011). Kompleks I sinyalleşmesinin işlevsel sonucunun inflamasyon, doku, hücre sağkalımı ve çoğalması ve patojenlere karşı bağışıklık savunmasının indüklenmesi olduğu bilinmektedir (Brenner ve Mak, 2015; Aggarwal ve ark., 2012). Plazma membranında bir araya gelen kompleks I'in aksine, kompleks IIa, IIb ve IIc sitoplazmada bir araya gelir (Kalliolias ve Ivashkiv, 2016). Kompleks IIa, TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2, pro-Kaspaz-8 ve ölüm alanı olan Fas ile ilişkili proteinden (FADD) oluşur (Wang ve ark. 2008; Wilson ve ark. 2009). Kompleks IIb, RIPK3'ün eklenmesiyle kompleks IIa ile aynı bileşime sahiptir (Wang ve ark. 2008). Kompleks IIa ve IIb'nin (apoptozom olarak da bilinir) oluşumu kaspaz-8'i aktive eder ve apoptozla sonuçlanır. Kompleks IIc'nin (nekrozom olarak bilinir), ayrılmamış halde kaldıklarında kompleksi oluşturmak üzere bağlanan RIPK1 ve RIPK3 tarafından oluşturulduğu bilinmektedir. Kompleks IIc, nekroptozu ve inflamasyonu indükleyen RIPK3 aracılı fosforilasyon yoluyla karışık soy kinaz alanı benzeri proteini (MLKL) aktive eder (Holbrook ve ark.,

2019; Cho ve ark. 2009). TNFR2'nin, öncelikle hücre-hücre etkileşimleri bağlamında, tmTNF- α tarafından tamamen aktive edildiği ileri sürülmektedir. TNFR1'den farklı olarak, TNFR2 bir ölüm alanından yoksundur ve bu nedenle programlanmış hücre ölümünü doğrudan indükleyemez (Grell ve ark. 1998). Birleştirme sırasında, TNFR2, TRAF1, cIAP1 ve cIAP2 ile birlikte TRAF2'yi de işe alır ve bu kompleks, NF- κ B, MAPK'lar ve protein kinaz B'nin (AKT) aşağı akış aktivasyonuna izin verir (Kalliolias ve Ivashkiv, 2016). İşlevsel olarak, TNFR2 esasen doku rejenerasyonu, hücre çoğalması ve hücre sağkalımı dahil olmak üzere homeostatik biyoaktivitelerle ilişkilidir (Probert, 2015). Bununla birlikte, bu yolun aynı zamanda patojenlere karşı inflammatuar yanıtları ve konak savunmasını tetiklediği de bilinmektedir. Genel olarak, TNFR1 sitotoksik ve proinflammatuar TNF- α yanıtlarını indüklemek için gereklidir, TNFR2 ise büyük ölçüde hücre aktivasyonu, göçü veya çoğalmasına aracılık eder.

2.9. Terapötik İlaçlar Olarak TNF- α İnhibitörleri

İnfliximab (Remicade®), bir fare değişken bölgesi ve bir insan IgG1 sabit bölgesi içeren rekombinant bir kimerik monoklonal TNF- α antikorudur. İnsanlarda tüm TNF- α formları için spesifiktir ve TNF- α 'nın çözünür ve transmembran reseptörlerine bağlanmasını etkili bir şekilde engeller (Monaco ve ark. 2015). İnflammatuar bağırsak hastalığı olan hastalarında infliximab tedavisinden sonra, tamamlayıcı bağımlı ve antikor bağımlı sitotoksikite ile TNF- α ifade eden hücre hatlarının lizisinin arttığı ve yangılı dokunun azaldığı bildirilmiştir (Tracey ve ark. 2008). Apoptozu uyarmaya ilaveten infliximab, kolon ve uyarılmış T hücrelerinde IFN- γ üretimini engeller ve anti-inflamasyon meydana gelir (Danese, 2008). Ayrıca, infliximab hücre içi yapışma molekülü 1'i (ICAM-1) ve vasküler hücre yapışma molekülü 1'i (VACM-1) azaltır ve MMP'ler/metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) dengesini düzenler (Arijs ve ark. 2011; Guo ve ark. 2013). İnfliximab'ın yarı ömrü yaklaşık 8-10 gündür ve her sekiz haftada bir doz uygulanarak sürdürülebilir (Chatzantoni ve Mouzaki, 2006). İnfliximab başlangıçta 1998'de Chron hastalığının tedavisi için daha sonra da romatoid artrit tedavisi için FDA onayı almıştır. Daha sonra ankilozan spondilitis (AS), Psoriatic arthritis (PsA), Crohn's disease (CD) ve (pulmoner stenoz)PS tedavisi için onaylamıştır (Melsheimer ve ark. 2019)

Etanercept (Enbrel®), insan IgG1'in Fc parçasına bağlı iki özdeş TNFR2 hücre dışı bölgesini içeren bir füzyon proteindir (Lim ve ark. 2018). Her etanercept grubunun çok az farkla çeşitli varyantları vardır (Jang ve ark. 2021). Etanercept, sTNF- α veya tmTNF- α 'ya bağlanır ve reseptörlerle etkileşimi bloke ederek bunları inaktif eder (Tracey ve ark. 2008). Bağlanma yeri alt birimler arasındaki yarıktaki yer aldığından yalnızca aktif trimerik TNF- α 'ya bağlanmasını sağlar (Banner ve ark. 1963). Etanercept'in deri altı enjeksiyondan sonra yarı ömrü 3-3,5 gündür (Chatzantoni ve Mouzaki, 2006). Artrit semptomlarını hafifletir ve hastalarda RA'nın ilerlemesini önler (Moreland LW ve ark., 1999).

Etanercept'in ayrıca plak PS'deki NF- κ B gibi proinflamatuvarları modüle ettiği düşünölmektedir. Bu da TNF- α üretiminde önemli bir azalmaya neden olur. Ayrıca plak içinde çok sayıda bulunan dentritik hücrelerin (DC) apoptozuna neden olur ve bu da DC'lerin aktivasyonu ve olgunlaşmasından önce erken apoptotik hücre ölümüyle TNF- α ile ilişkili pozitif geri bildirimi durdurur (Tan ve ark 2007). Etanercept 1998'de FDA tarafından juvenil idiyopatik artrit (JIA) ve Psoriatic arthritis (PsA), Romatoid artrit (RA), pulmoner stenoz (PS) ve ankilozan spondilitisin (AS) tedavisi için onaylanmıştır (Azevedo ve ark. 2015). Eklem tutulumu için olumlu sonuçlar bildirilmiştir, ancak üveitis gibi oküler inflamasyonda sınırlı bir sonuç alındığı bildirilmiştir (Jang ve ark. 2021).

Adalimumab (Humira®), işlevi ve yapısı doğal insan IgG1'yle aynı olduğundan, insan TNF- α 'nın reseptörlere bağlanmasını spesifik olarak bloke edebilen tamamen insan IgG1 monoklonal antikorudur (Mease, 2007). Adalimumab, yaklaşık 10-13 gün olan nispeten daha uzun yarı ömrü nedeniyle daha az sıklıkta deri altı uygulamaya ihtiyaç duyar (Ramael ve ark 2018). Ayrıca, adalimumab infliximab'dan daha düşük immunojenite gösterir (Rau, 2002). Adalimumab daha iyi toleransa ve daha düşük immunojeniteye sahip olduğundan, Crohn hastalığı (CD) bulunan hastalar için de etkili bir şekilde kullanılır ve infliximab'a alerjik reaksiyon gösteren hastalara uygulanabilir. Adalimumab ile tedavi edilen PsA hastalarında, TNF- α ve IL-6 seviyelerinde ve ayrıca inflamasyonun akut faz reaktanlarında düşüşler gözlenmiştir (Kobayashi ve ark. 2014). Ayrıca, RA'nın adalimumab ile tedavisinin, tedavi edilmeyen hastalara kıyasla düzenleyici T hücrelerinin (Treg) sayısını artırarak Th17 hücreleri tarafından aşırı salgılanan IL-17'yi inhibe edebildiği bulunmuştur (McGovern ve ark 2012). Adalimumab, 2002 yılında FDA tarafından RA tedavisi için onaylanmış, ardından PsA, PS, AS, JIA ve CD'nin yanı sıra üveitis tedavisi için de onay almıştır (Rau, 2002); LaMattina ve Goldstein, 2017).

Certolizumab Pegol (Cimzia®) (CDP87), polietilen glikozlanmış (PEG) bir Fab parçasına sahip ve Fc bölgesinden yoksun bir humanize monoklonal antikorudur (Rivkin, 2009). Fc bölgesinin olmaması nedeniyle, tamamlayıcı veya antikor bağımlı sitotoksiste oluşturmaz. Diğer TNF- α inhibitörlerine kıyasla dikkate değer bir etki mekanizmasına sahip yeni bir TNF- α inhibitörüdür. PEGilasyon nedeniyle, certolizumab pegol, infliximab ve adalimumab'a kıyasla inflamasyonlu dokulara daha fazla yayılabilir (Acosta-Felquer ve ark. 2016). İnhibitörün farklı yapısı, certolizumab pegol'ün diğer TNF- α inhibitörlerine kıyasla daha yüksek etkililiğinin arkasındaki neden olabilir (Desai ve ark. 2012). Certolizumab pegol'ün PEGilasyonu, yarı ömrünü iki haftaya çıkarır; bu, yangılı dokularda incelenen inhibitörün yüksek konsantrasyonuna bağlanabilir (Keystone ve ark. 2008). Certolizumab pegol, 2018 yılında FDA tarafından CD, RA, PsA, AS ve plak PS tedavisi için onaylanmıştır (Curtis ve ark. 2019).

Golimumab (Simponi®) Golimumab, insan TNF- α için işlevsel özgüllüğe sahip humanize bir IgG1 monoklonal antikorudur (Curtis ve ark. 2010). İnfliximab ve adalimumab ile karşılaştırıldığında, golimumab daha yüksek bir afiniteye sahiptir ve sTNF- α ve tmTNF- α 'nın nötralizasyonunda daha güçlüdür, bu nedenle TNF- α 'nın biyolojik aktivitesini etkili bir şekilde inhibe edebilir (Shealy ve ark. 2010). Ayrıca, E-selectin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi hücre yapışma proteinlerinin yanı sıra proinflamatuvar sitokin salgılanmasını önleyerek lökosit infiltrasyonunu da engeller (Oldfield ve Plosker, 2009) Golimumab'ın yarı ömrü yaklaşık 7-20 gündür (Zhou ve ark. 2007). Golimumab, metotreksat ile karışım halinde enjekte edildiğinde RA tedavisi için 2009 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Ayrıca UC, AS ve PsA tedavisi için de onaylanmıştır (Mazumdar ve Greenwald, 2009).

Bu çalışmanın amacı özellikle muhabbet kuşlarında sık gözlenen ve etkili bir tedavisi olmayan makrorabdoziste mide bağırsak sisteminde TNF- α ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak incelenmesidir. Böylelikle TNF- α inhibitörlerinin insanlarda birçok hastalıkta olduğu gibi muhabbet kuşlarında da bu hastalıkta kullanılabilirliğinin önü açılmış olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması için Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı arşivinde bulunan 25 adet muhabbet kuşuna ait parafin bloklar, histopatolojik ve sitolojik preparatlar kullanıldı. Tüm histopatolojik preparatlar incelendi, kesitleri yeterli olmayan vakalardan tekrar histopatolojik incelemeler için kesitler alındı. Ayrıca etkenlerin boyanması için ve immunohistokimyasal incelemeler için kesitler alındı.

Parafin bloklardan kesit almak için bloklar soğuk tabla üzerine yerleştirildi. Blokların soğumasının ardından tüm bloklardan rotary mikrotom cihazıyla (Leica RM2155, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin, PAS ve Groccot boyamaları için lamlara alındı. İmmunohistokimyasal boyama için polilizinli lamlara çekildi. Özellikle proventrikülüs ve ventrikülüs ile bağırsaklardan kesitlerin alınmasına dikkat edildi.

3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Normal lamlara alınan ve kurutulan bir seri kesit 1 saat kadar 60 °C'ye kadar ısıtılmış etüv içinde tutularak hem kesitlerin tamamen kuruyarak lam üzerine yapışmaları hem de üzerlerindeki parafinin eritilmesi sağlandı. Etüvden alınarak soğutulan kesitler daha sonra rutin boyama prosedürüne alındı. Bu amaçla 30'ar dakika 3 ayrı ksilol serisinde bekletildi. Böylelikle kesitler üzerinde bulunan parafin kalıntılarının uzaklaştırılması sağlandı. Ardından ksilolün uzaklaştırılması ve rehidrasyon için derecesi azalan alkol serilerinden geçirildi. Bu amaçla %100'lük absöü alkolden başlanarak %70'lik alkole kadar kesitlerin geçirilmesi sağlandı. Bu aşamadan sonra 5 dakikalık bir süreyle distile suda yıkanarak tüm kesitlerin rehidrasyon işlemi tamamlandı. Hemen ardından Harris hematoksilen ile 10 dakika takiben eozin ile 3 dakika boyandı. Akar su altında yıkanan kesitler bu kez dehidrasyon için düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere son olarak da absöü alkole alındı ve tüm kesitler dehidre edildi. Ksilolde parlatılan kesitlere entellan damlatılarak üzerlerine lamel kapatıldı. Kuruyan kesitler ışıık mikroskobunda (Zeiss Axioscope 5, Zeiss Suzhou Co., Ltd) incelendi ve mikrofotografı çekildi.

3.2. PAS Boyama

PAS boyama yöntemi için kesitler histopatolojik yöntemde açıklandığı gibi deparafinize ve rehidrate edildikten sonra hazır boyama kiti (PAS Stain Kit (Fungus, Periodic Acid Schiff Stain), ab245886 (Abcam, İngiltere) kullanılarak üretici firma talimatlarına göre boyandı. Boyamanın ardından dehire edilen ve ksilolde parlatılan kesitler üzerine entallan damlatılarak lamel kapatıldı. Bir gün oda ısısında kurumaya bırakılan kesitler ardından ışık mikroskobu altında incelendi.

3.3. Gomori Methanamine Silver Boyama

Gomori Methanamine Silver boyama yöntemi için kesitler deparafinize ve rehidrate edildi. Ardından sonra hazır boyama kiti (GMS Stain Kit, ab287884 (Abcam, İngiltere)) kullanılarak üretici firma talimatlarına göre boyama metodu tamamlandı. Boyanan kesitler dehidre edildikten sonra ksilolde parlatıldı. Üzerlerine entallan damlatılarak lamel kapatıldı. Bir gün oda ısısında kurutulduktan sonra tüm preparatlar ışık mikroskobunda değerlendirildi.

3.4. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hasta ve sağlıklı kuşların gastrointestinal sistem kesitleri TNF- α ekspresyonları açısından immunohistokimyasal olarak boyandı. Sekoder antikor olarak ve UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Horseradish Peroxidase) (Ready-To-Use) (TP-060-HL, Thermo Fisher Scientific, USA) kiti ve kromojen olarak 3,3' Diaminobenzidine (DAB) kiti ((DAB Substrate System) (TA-060-HD, Thermo Fisher Scientific, USA)) kullanıldı.

Polilizinli lamlara çekilen kesitler histopatolojik yöntemde açıklanan şekilde deparafinize ve rehidre edildi. Ardından sitrat tampon solüsyonu ile 5 dakika iki kez kaynatıldı. Takiben alınan tüm kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğumasının ardından immunohistokimyasal boyama aşamasına geçildi. İmmunohistokimyasal boyama, UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent HRP kit protokolüne göre yapıldı. Endojen peroksidaza bağlı spesifik olmayan arka plan boyamasını azaltmak için, kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika inkübe edildi. İki kez PBS (Fosfat tamponlu salin) içinde 5 dakika yıkandı. Ultra V Block uygulanarak spesifik olmayan arka plan boyamasını engellemek amacıyla oda sıcaklığında 10 dakikayı aşmadan inkübe edildi. Ardından PBS uygulanmadan kesitler üzerindeki fazla bloking solüsyonu atılarak kesitler üzerine primer antikor uygulandı ve +4°C'de bir gece buzdolabında inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün dolaptan alınarak PBS içinde yıkandı. Kesitler üzerine biotinli Keçi serumu uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe

edildi. Bu aşamadan sonra tüm kesitler tekrar PBS içinde yıkandı. Ardından streptavidin peroksidaz uygulandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS içinde yıkama yapıldı. Ardından DAB kromojen ile boyandı. Takiben Harris Hematoksilen ile arkaplan boyaması yapıldı ve akan suda yıkandı. Ardından kesitler sırasıyla %96 etanol ve absölü etanolden geçirildi. Ksilol ile parlatılan kesitler üzerlerine entellan damlatılarak kapatıldı.



4. BULGULAR

4.1. Nekropsi Bulguları

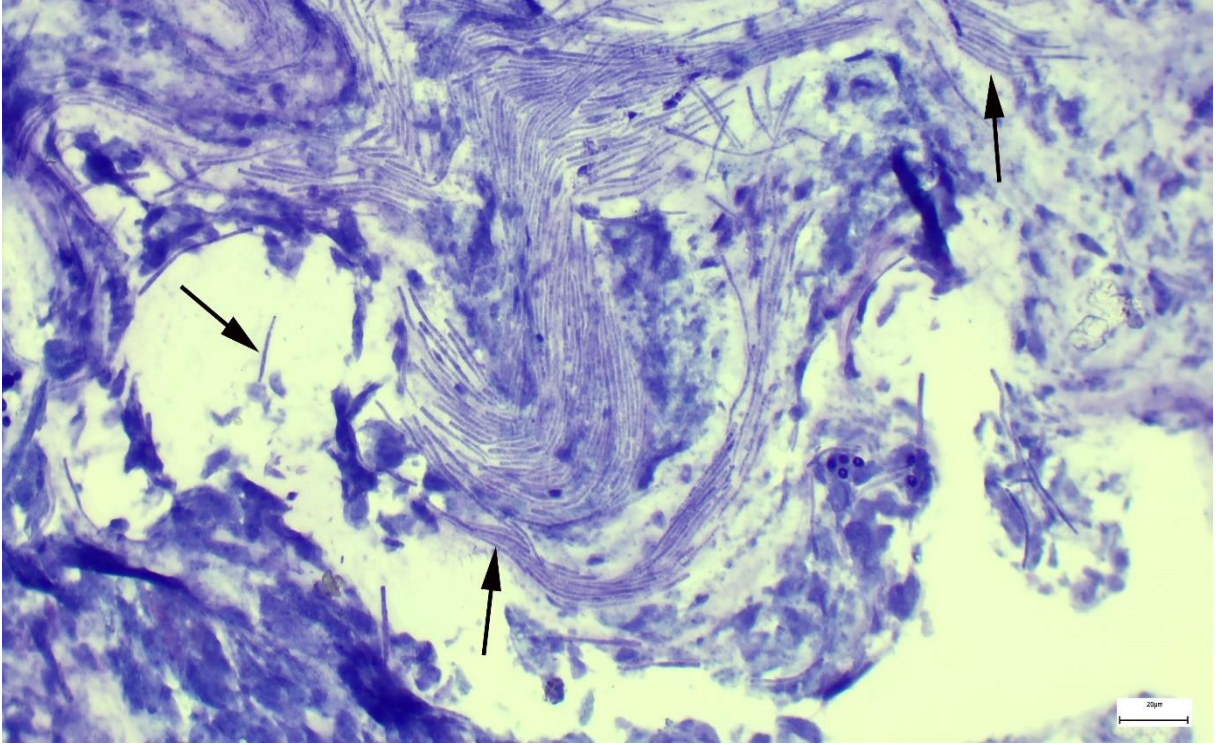
Makrorabdozis şüpheli olarak ölen ve teşhis için anabilim dalımıza getirilen muhabbet kuşlarının nekropsilerinde en sık gözlenen bulgu hayvanların şiddetli şekilde zayıflamış olduklarıydı. Sternum belirginleşmiş ve kolaylıkla palpe edilebilir bir şekildeydi. Sternal kasların belirgin şekilde atrofik bir hal aldıkları saptandı (Şekil 4.1). Bunun dışındaki en önemli bulgu bazı hayvanlarda gözlenen değişik şiddetlerdeki ishal tablosuydu. Proventrikulus ve ventrikulus duvarlarında kalınlaşma, proventrikulus mukozasının yoğun bir mukusla kaplanması, proventrikulus ve ventrikulus mukozasında ülserasyon ve hemoraji, koilin tabakasının gevşek bir görünüm alması ve proventrikulus- ventrikulus lümenlerinde kanama sıkça tespit edildi.



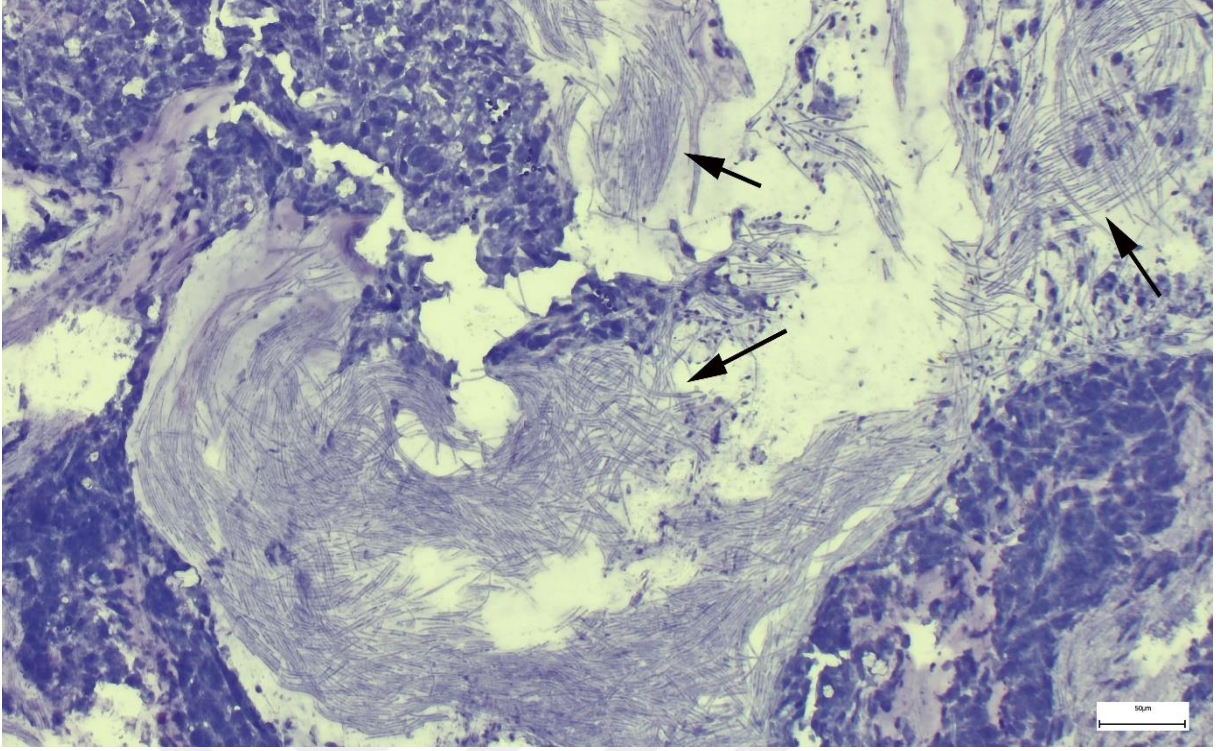
Şekil 4.1. Macrorabdozisli muhabbet kuşlarında sternal kemiğin belirginleşmesi ve ishal tablosu

4.2. Sitolojik Bulgular

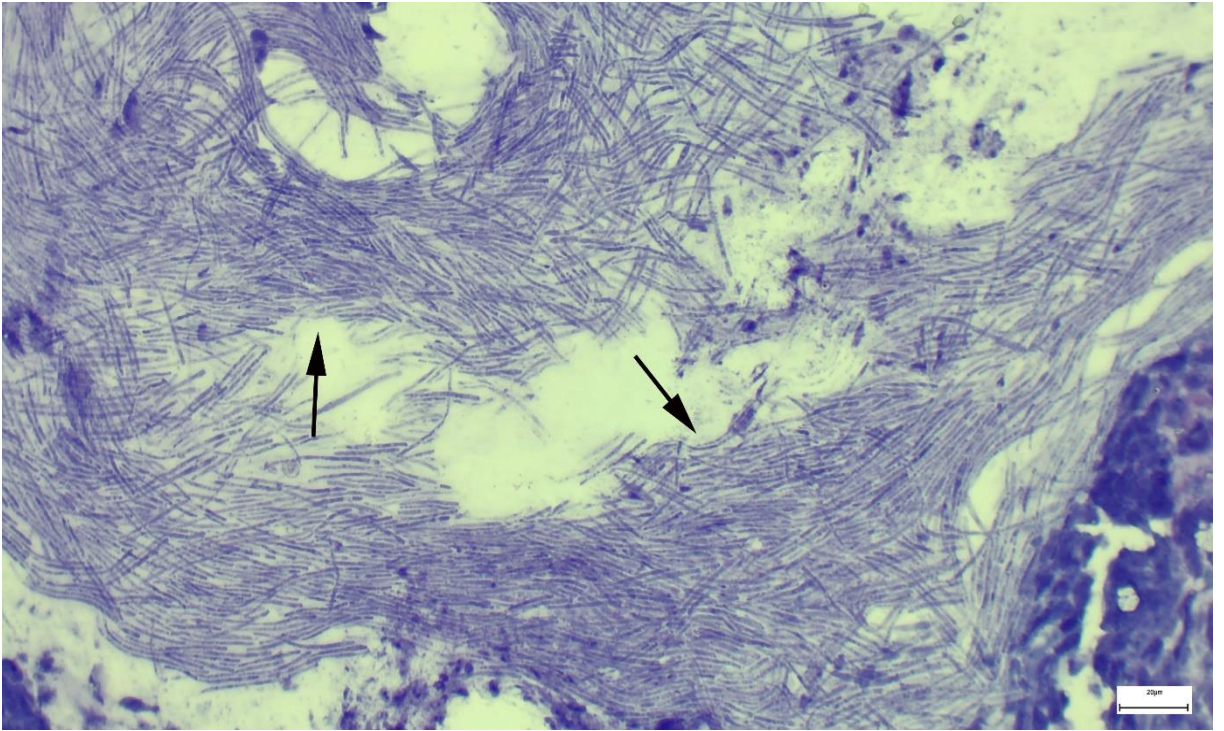
Hastalık şüpheli olarak anabilim dalımız rutin teşhis laboratuvarına getirilmiş olan kuşların proventrikülüslerinden alınan ve Giemsa ile boyanan sitolojik preparatların incelenmesinde çok sayıda kümeler ve demetler halinde mavi boyalı etkenlere rastlandı. Büyük büyütmelerde etkenin segmentli yapısı net olarak gözlemlendi (Şekil 4.2-4.6).



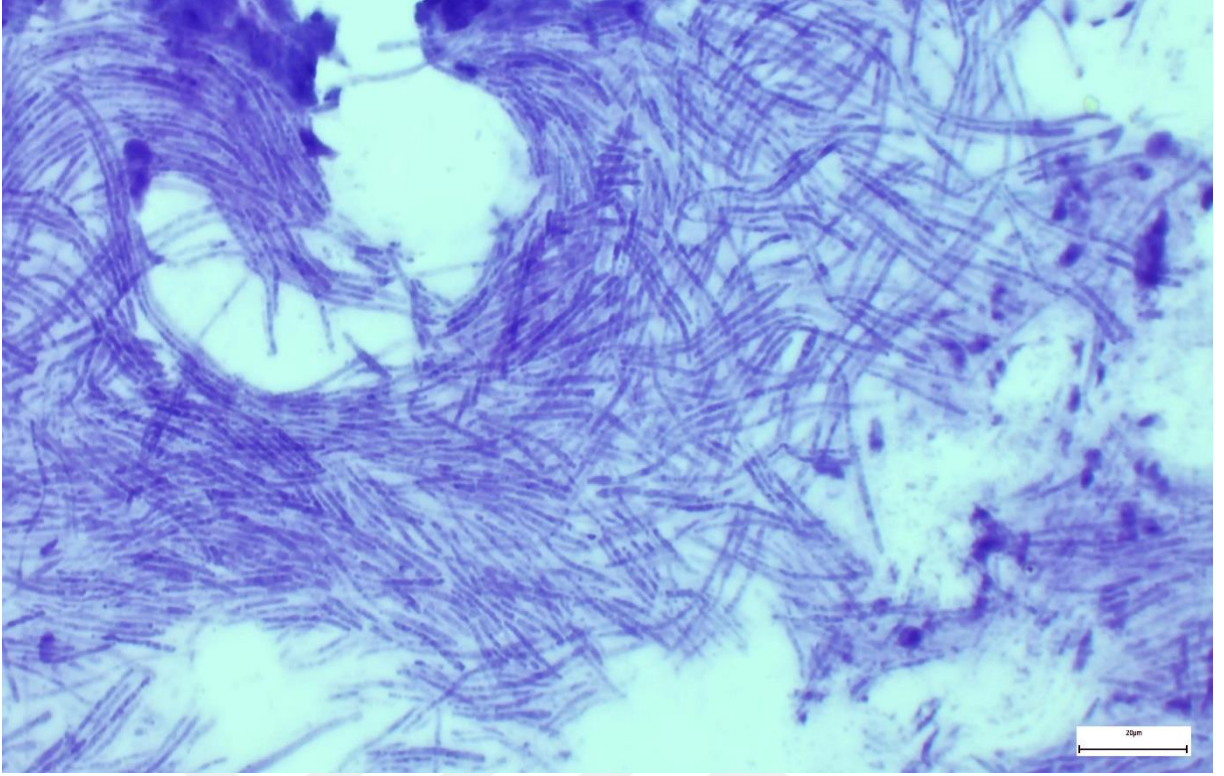
Şekil 4.2. Makrorabdozisten ölen bir muhabbet kuşunun proventrikulus sitolojisi, çok sayıda etken (oklar), Giemsa, 20µm.



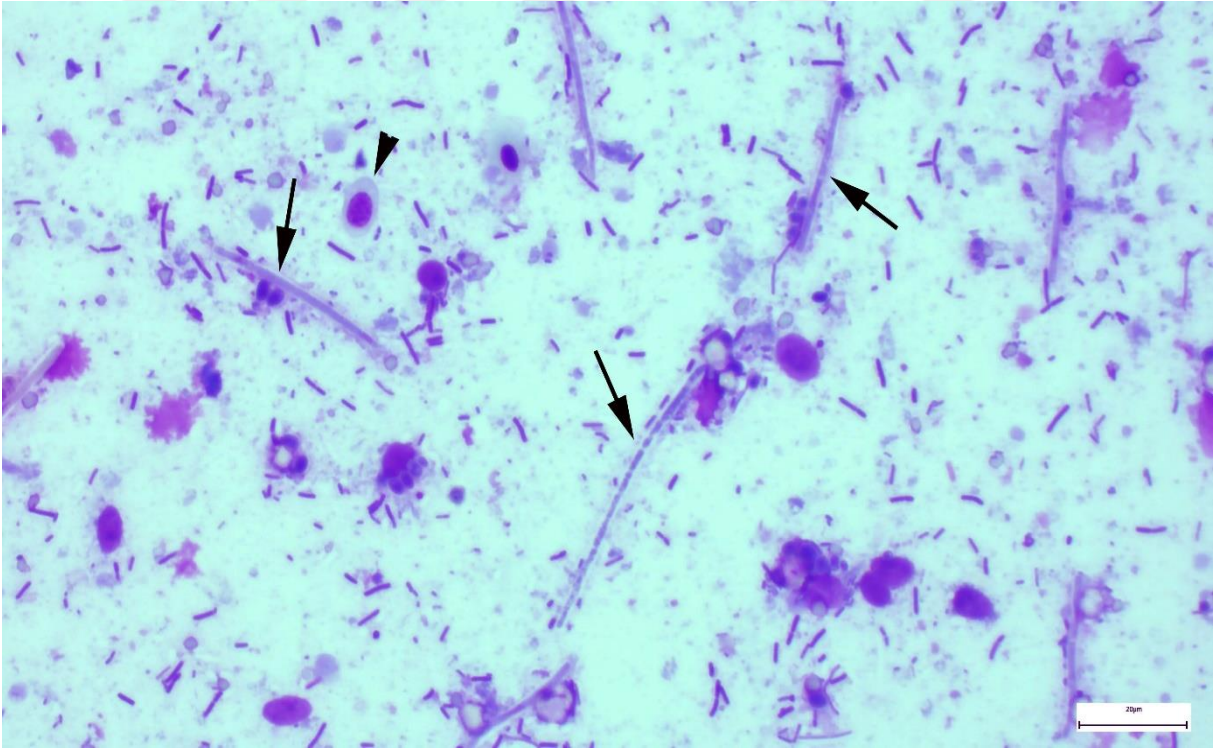
Şekil 4.3. Makrorabdozisten ölen bir başka muhabbet kuşunun proventrikulus sitolojisi, yoğun ve çok sayıda etken (oklar), Giemsa, 50µm.



Şekil 4.4. Yukarıdaki resmin yakından görüntüsü, Giemsa, 20µm.



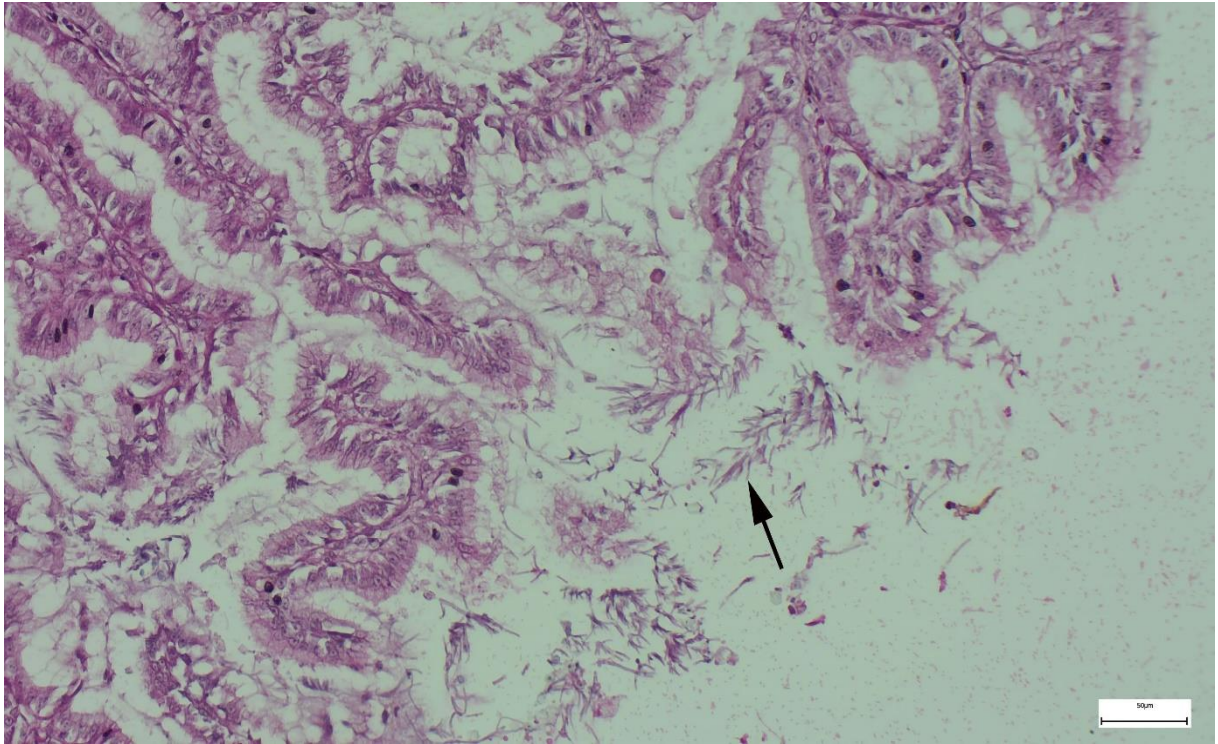
Şekil 4.5. Etkenlerinin daha yakından görünümü ve segmentli yapısı (oklar), Giemsa, 20µm.



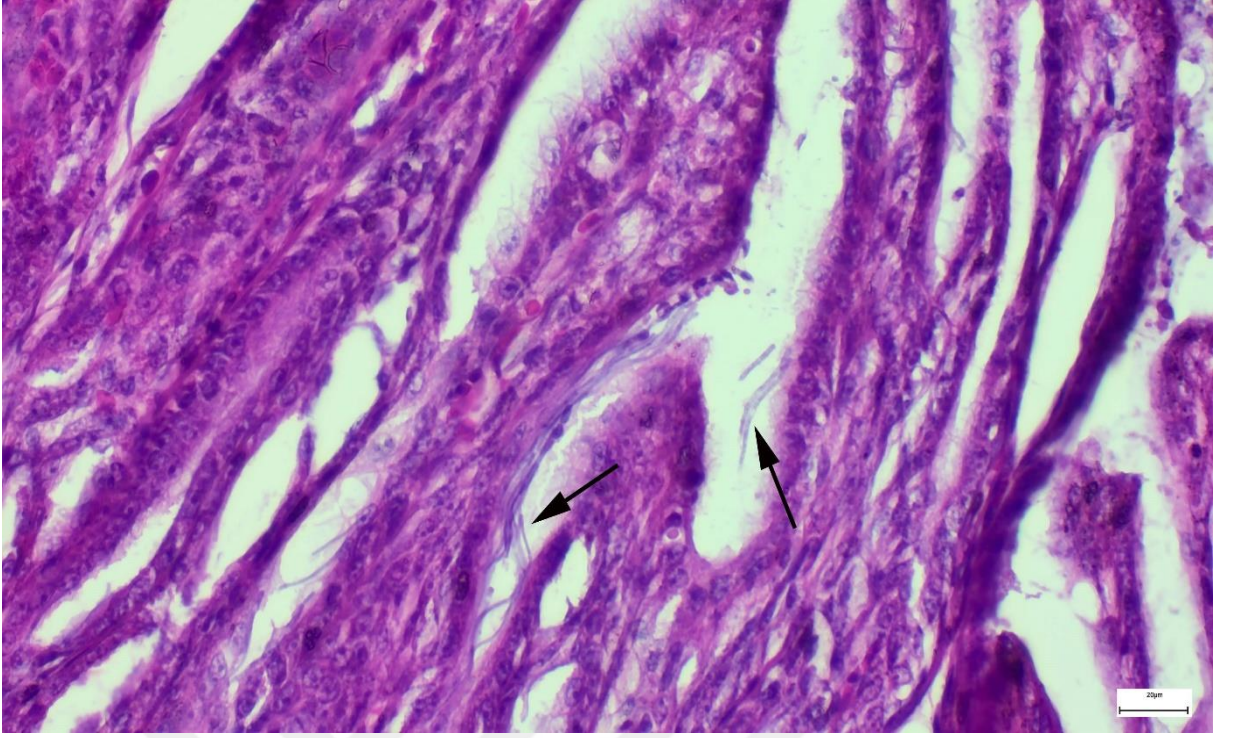
Şekil 4.6. Bir başka kuşun proventrikulus sitolojisinde etkenler (oklar) ve eritrosit (ok başı) ve çok sayıda bakteri, Giemsa, 20µm.

4.3. Histopatolojik Bulgular

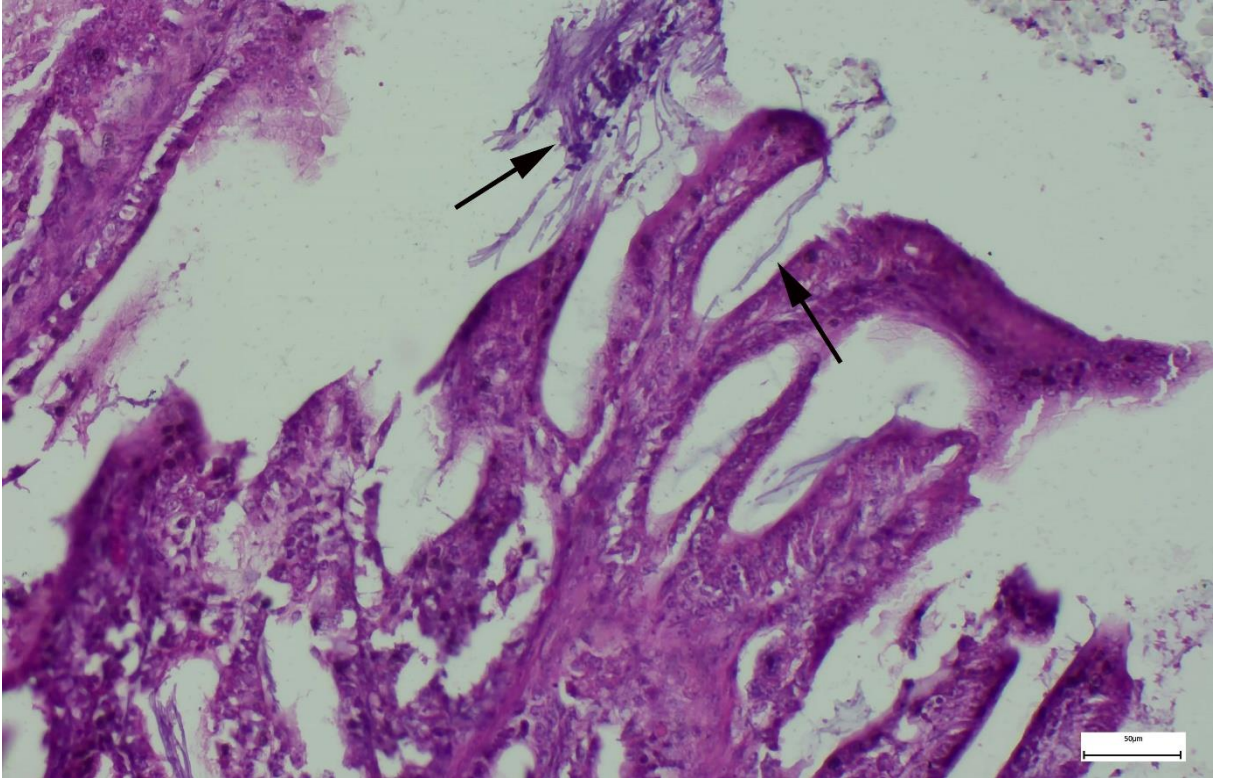
En şiddetli histopatolojik lezyonlar, proventrikulusta ve bazı kuşlarda ventrikulusta saptandı. Organizmaların yüzeysel veya proventrikulus kriptlerinde bazı hayvanlarda ise bezlerin daha derin kısımlarına yerleştikleri gözlemlendi. Bazı kuşlarda etkenler daha az sayıda iken bazı kuşlarda tüm mide ve bağırsaklarda yoğun şekilde etkenlere rastlandı. Etkenlerin fazla gözlemlendiği hayvanlarda mukozada eroziv ve ülseratif lezyonlar daha belirgin oldukları dikkati çekti. Ayrıca, bazı kuşlarda daha belirgin yangısal hücre infiltrasyonlarına rastlandı (Şekil 7-14).



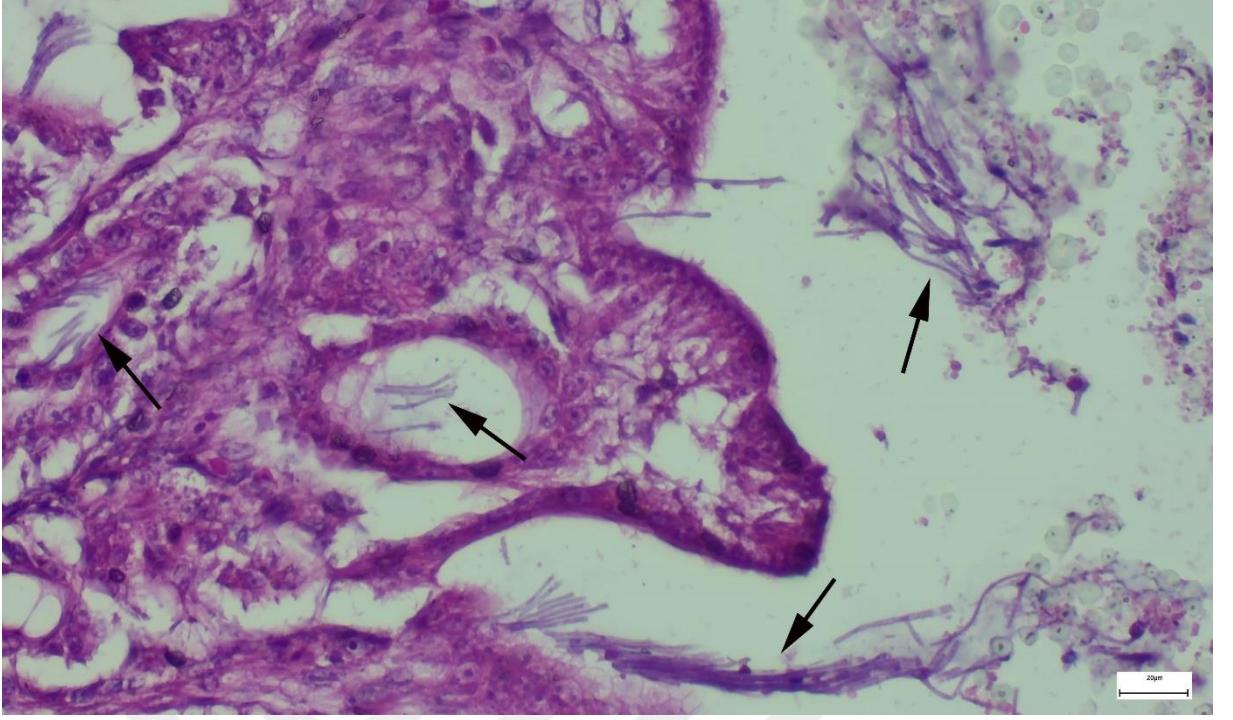
Şekil 4.7. Bir muhabbet kuşunda proventrikulusun histopatolojik görünümü ve etkenlerin mukoza üzerinde kolonizasyonu (ok), HE, Bar= 50µm.



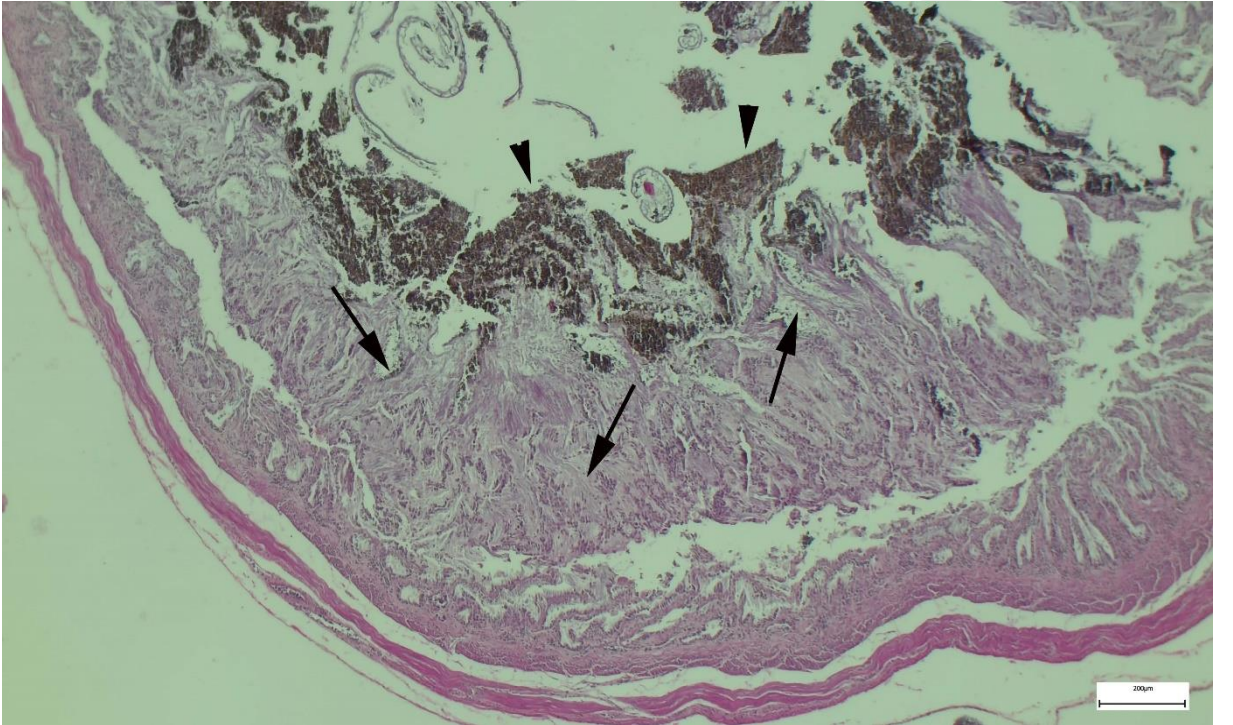
Şekil 4.8. Bir başka muhabbet kuşunda proventrikulusun histopatolojik görünümü ve etkenlerin mukoza üzerinde kolonizasyonu (oklar), HE, Bar= 20µm.



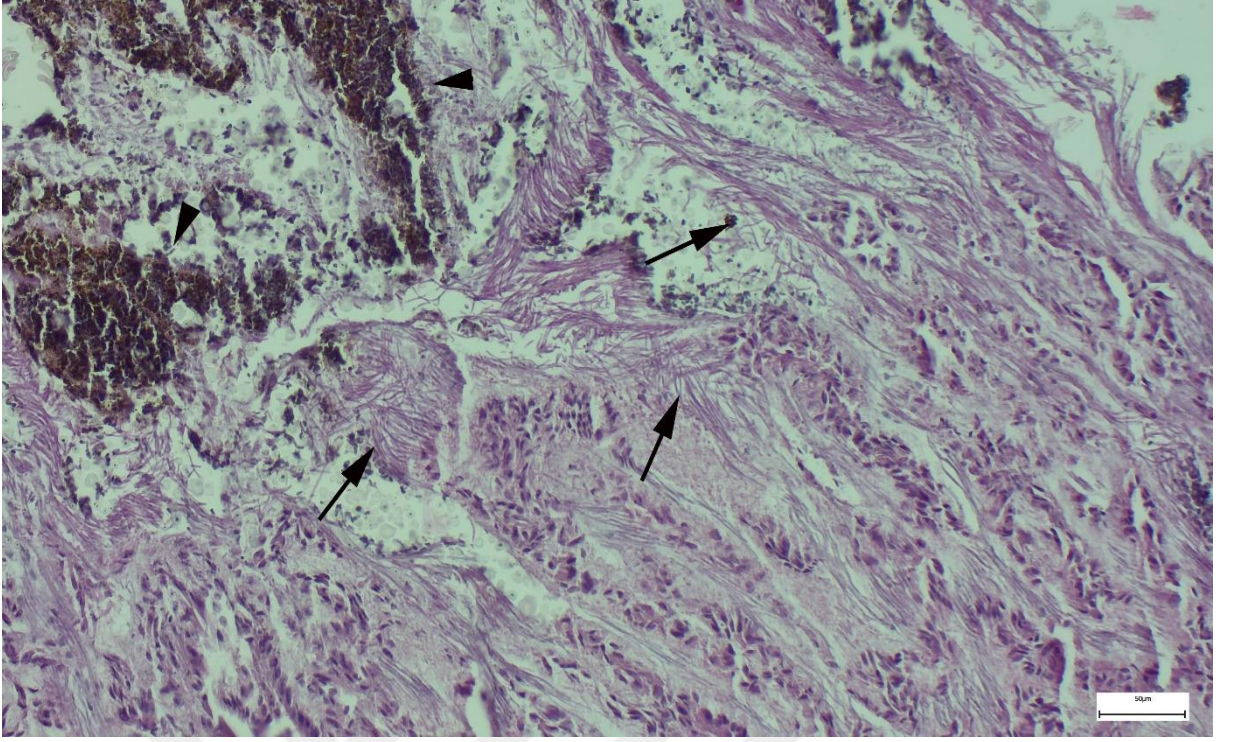
Şekil 4.9. Bir başka muhabbet kuşunda proventrikulusun histopatolojik görünümü ve etkenlerin mukoza üzerinde kolonizasyonu (oklar), HE, Bar= 50µm.



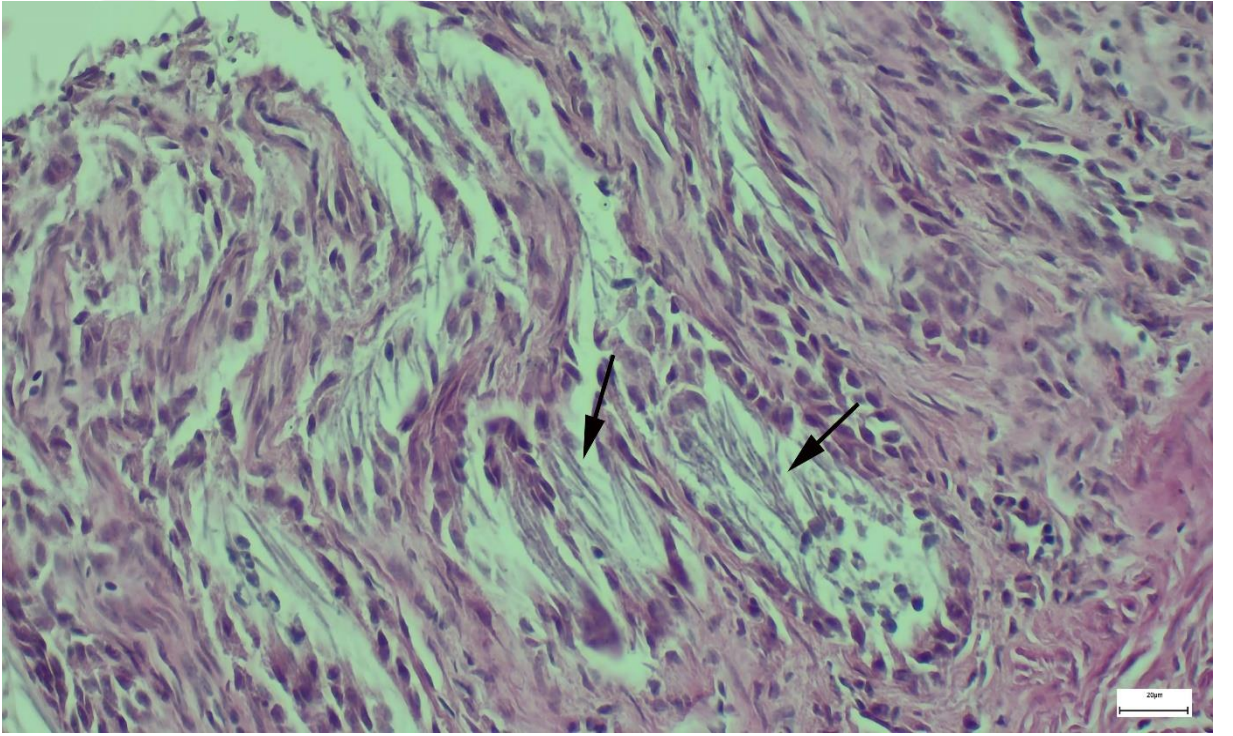
Şekil 4.10. Bir muhabbet kuşunda proventrikulusun mukozası ve bezlerinde etkenlerin görünümü (oklar), HE, Bar= 20µm.



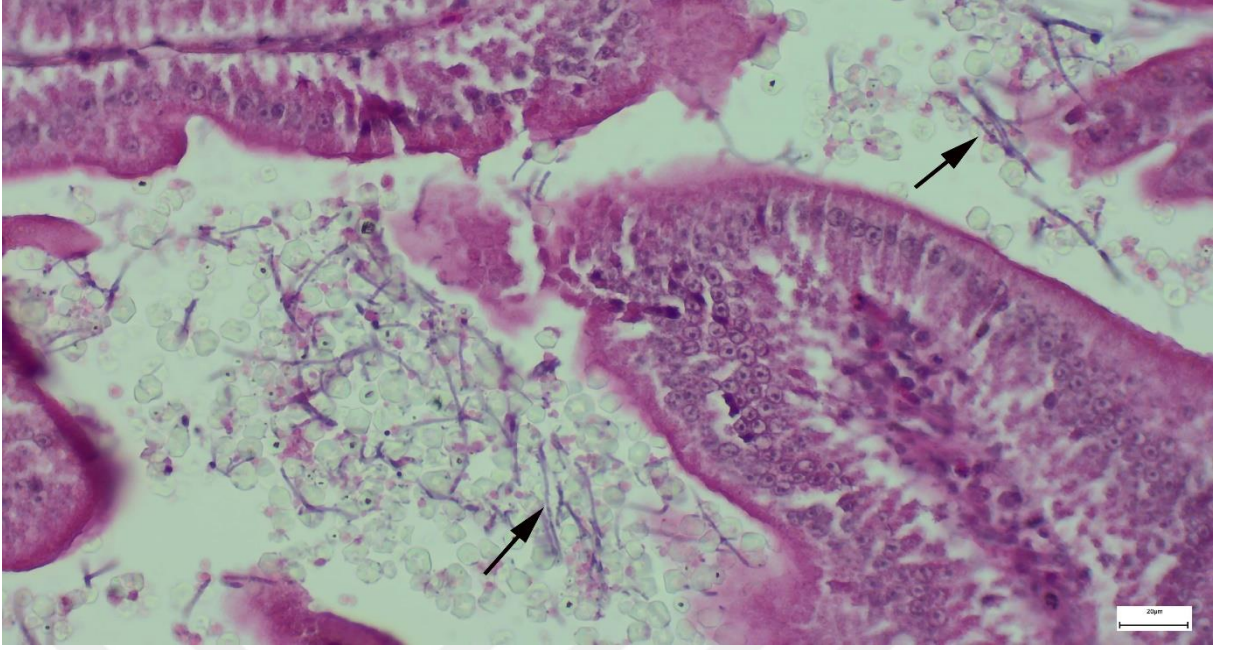
Şekil 4.11. Bir muhabbet kuşunda ince bağırsakta çok sayıda etken (oklar) ve kanama (ok başları), HE, Bar= 200µm.



Şekil 4.12. Yukarıdaki resmin yakından görünümü çok sayıda etken (oklar) ve kanama (ok başları), HE, Bar= 50µm.



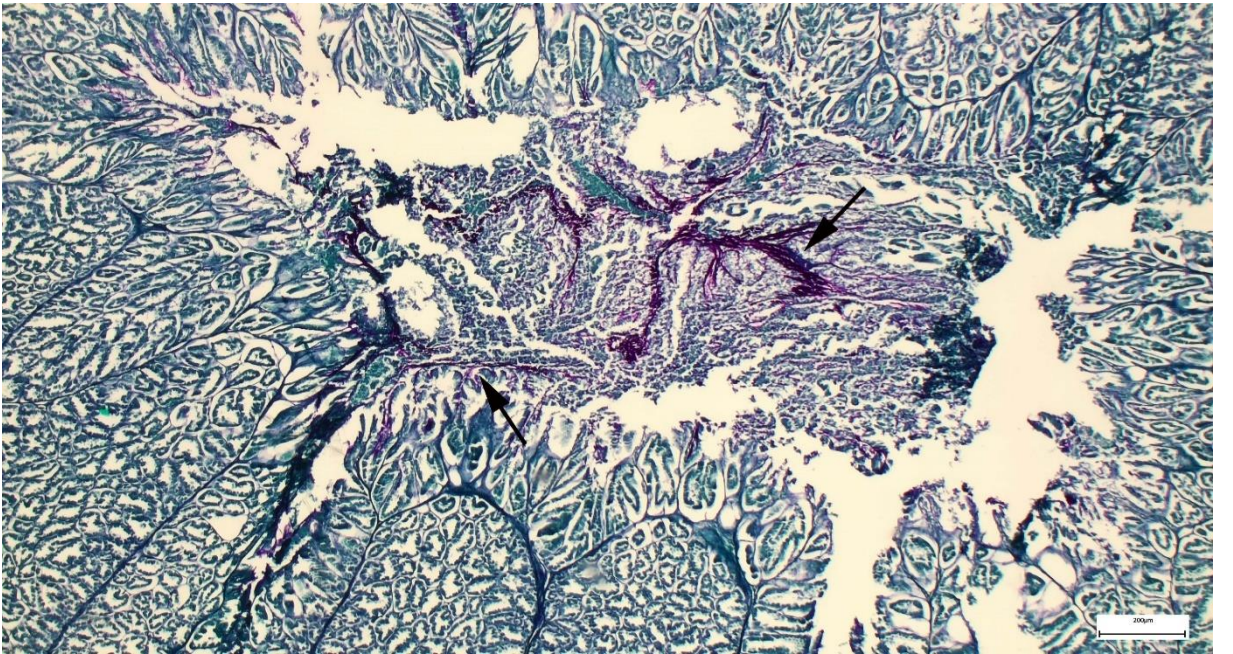
Şekil 4.13. Bir başka muhabbet kuşunda bağırsakta çok sayıda etken (oklar), HE, Bar= 20µm.



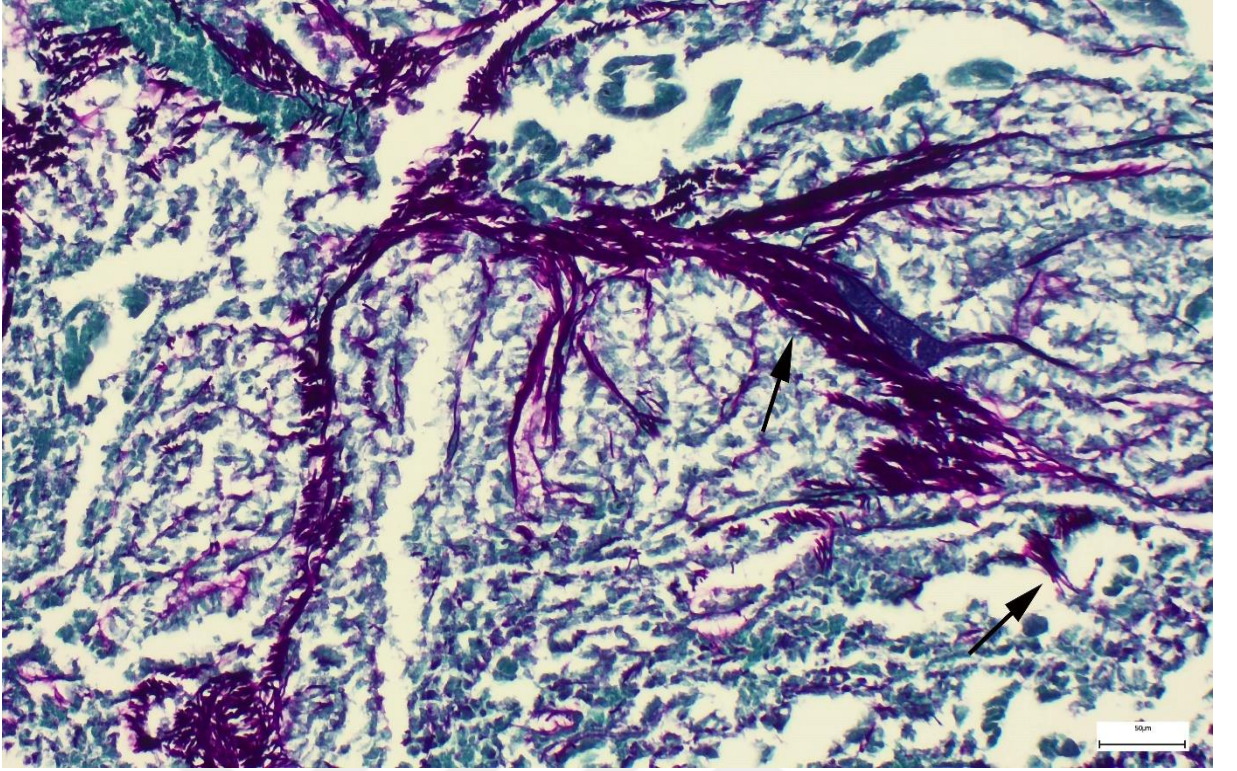
Şekil 4.14. Bir muhabbet kuşunda bağırsaklarda etkenlerin görünümü, HE, Bar= 20µm.

4.4. PAS Bulguları

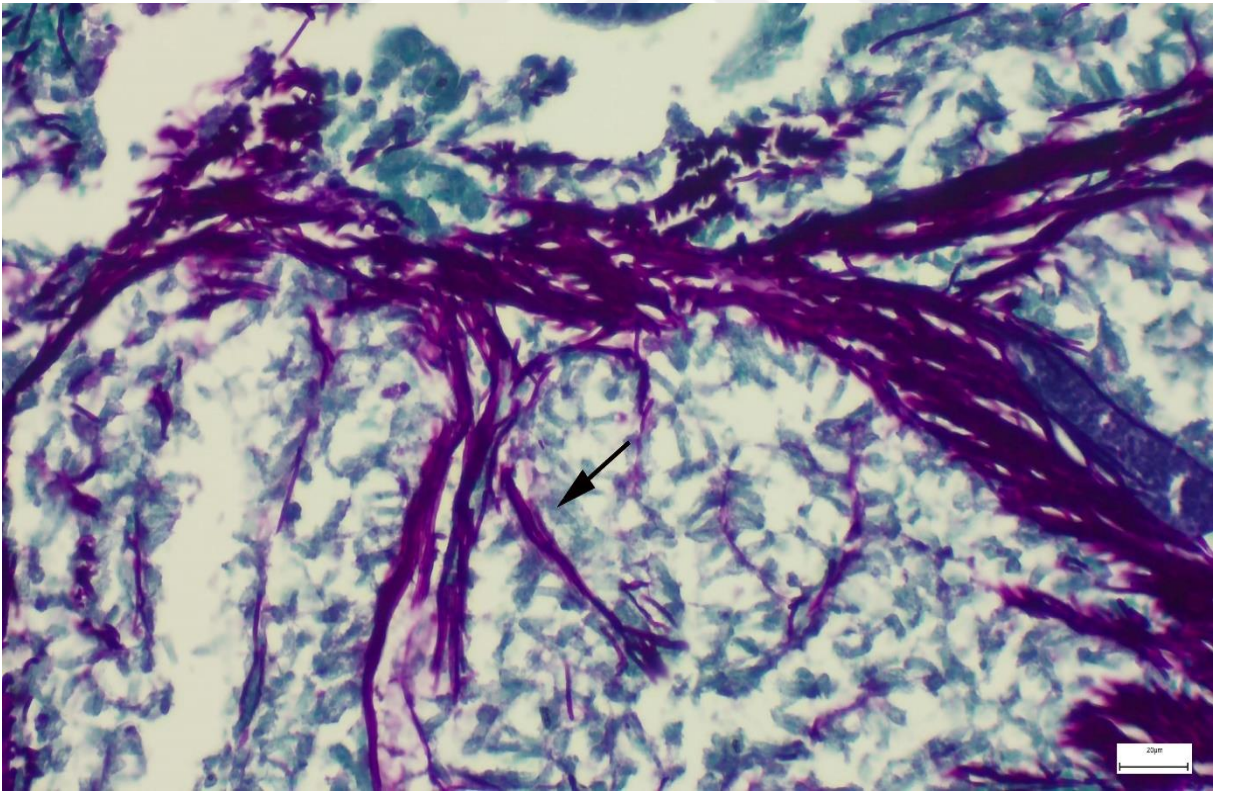
PAS boyamasında incelenen tüm kuşların proventrikuluslarında kırmızı renkli yoğunluğu değişen şekilde *Macrorhabdus ornitogaster* etkenlerine rastlandı. Etkenler uzun ve ince büyük çomaklar halindeydi (Şekil 4.15- 4.18).



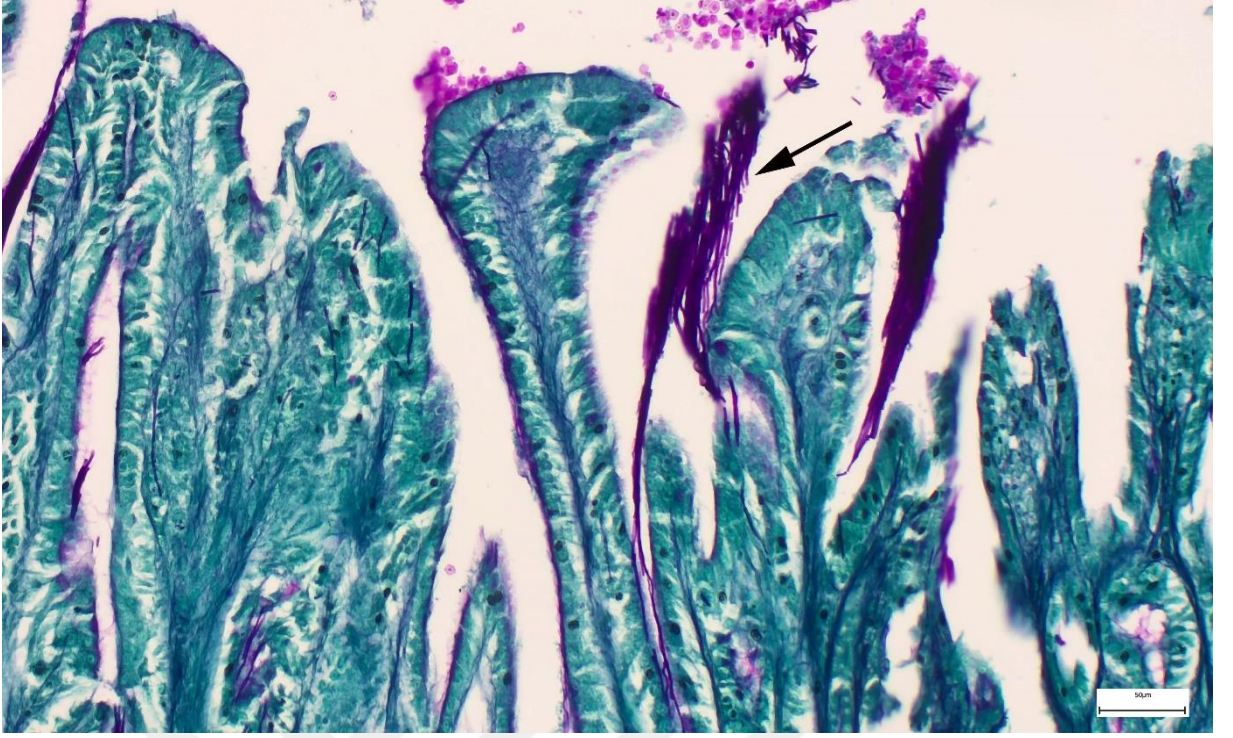
Şekil 4.15. Bir kuşun proventrikülüsünde yoğun şekilde *Macrorhabdus ornitogaster* etkenleri (ok), PAS, Bar= 200µm.



Şekil 4.16. Yukarıdaki olgudaki etkenlerin (ok) yakından görünümü, PAS, Bar= 50µm.



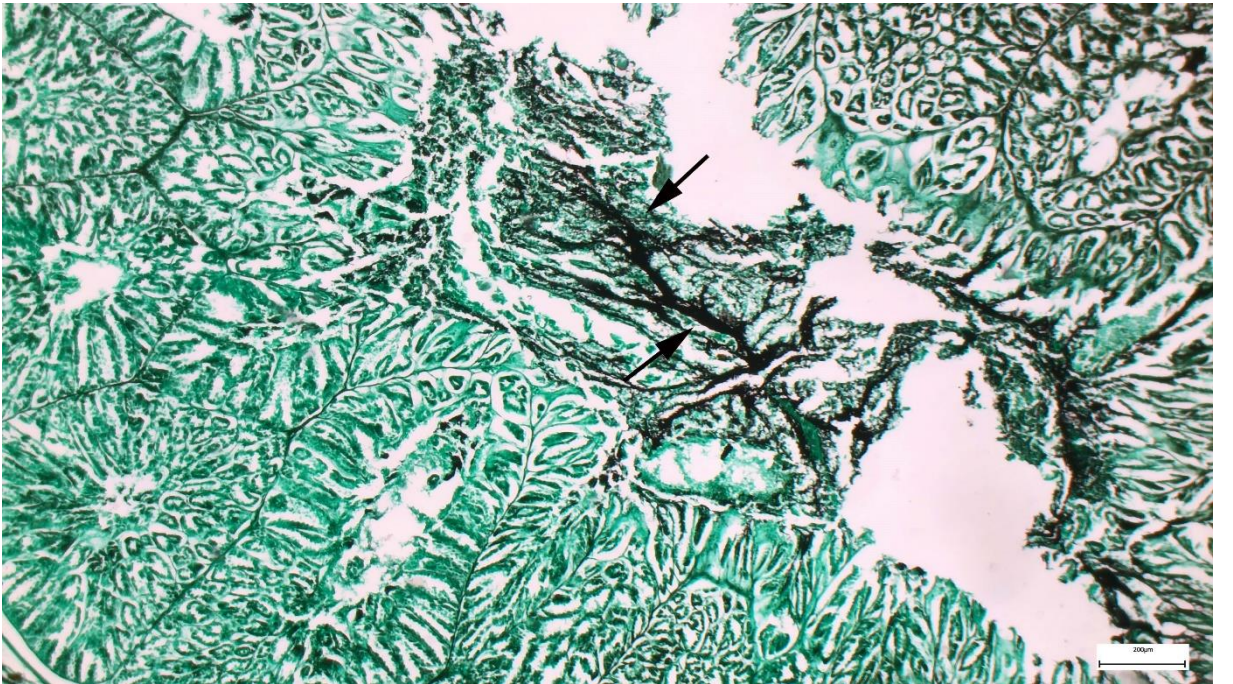
Şekil 4.17. Etkenlerin (ok) daha büyük büyütmedeki görünümü, PAS, Bar= 20µm.



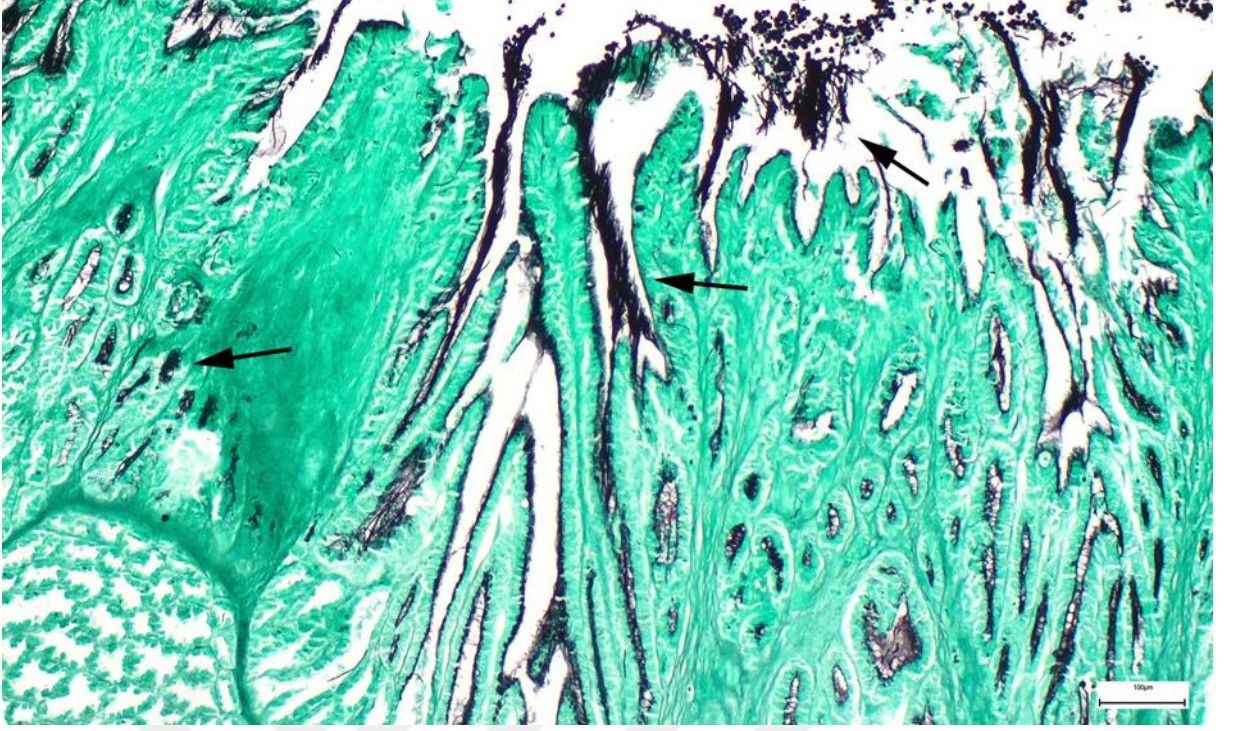
Şekil 4.18. Bir başka kuşun proventrikülüsünde etkenlerin (ok) görünümü, PAS, Bar= 50µm.

4.5. *Gomori Methanamine Silver (GMS) Boyaması Bulguları*

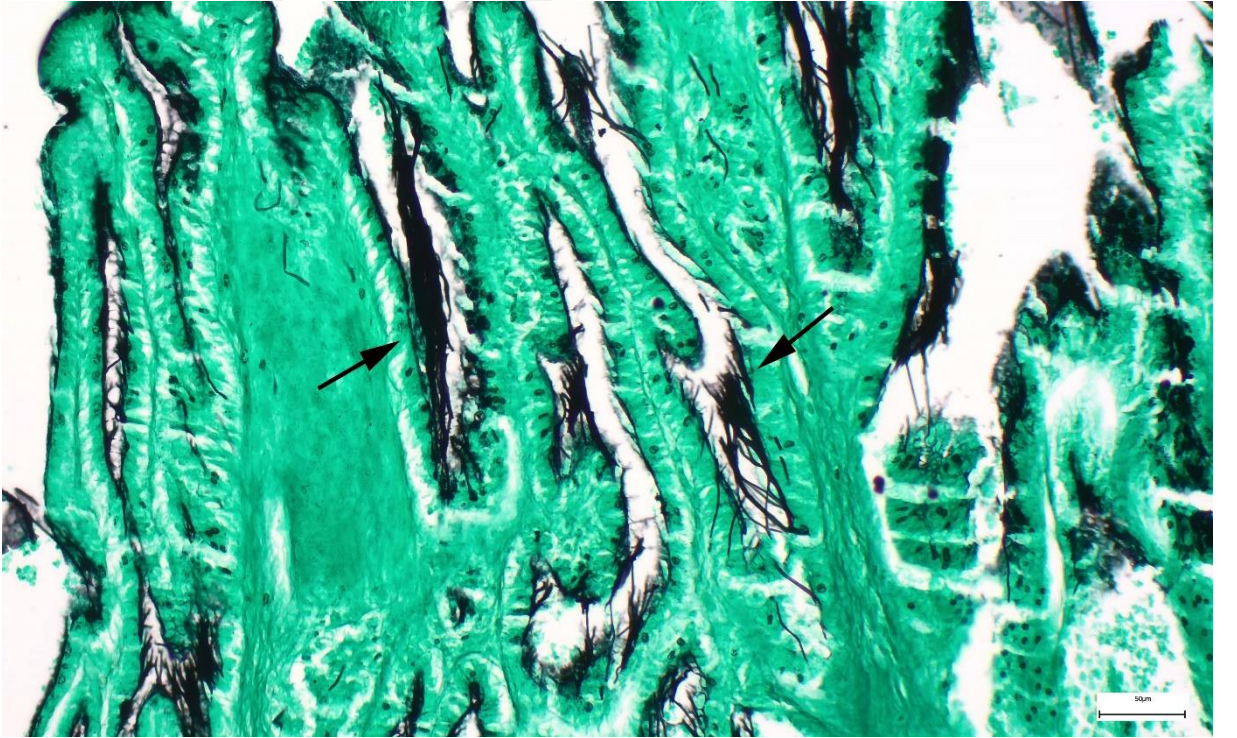
GMS boyamasında tüm çalışmaya dahil edilen tüm kuşlarda siyah renkli etkenler saptandı (Şekil 4.19-4.21).



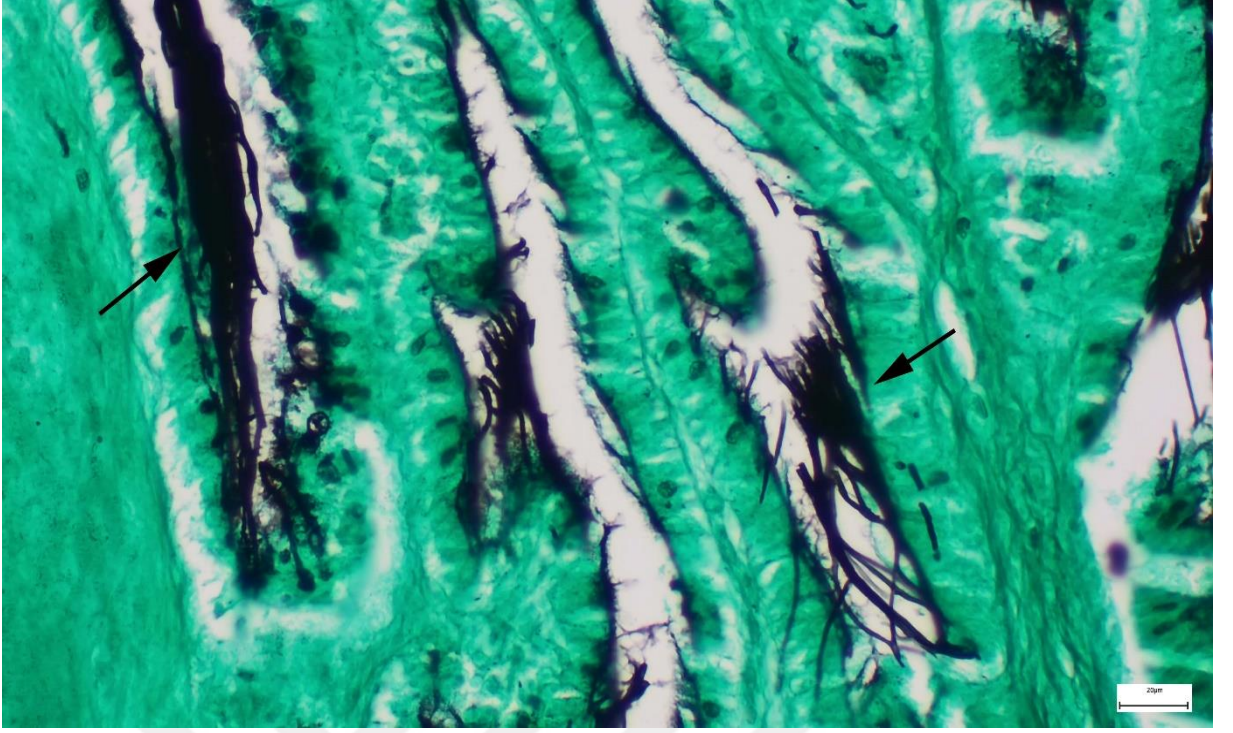
Şekil 4.19. Bir kuşun proventrikülüsünde siyah renkte boyanmış etkenler (ok), GMS, Bar= 200µm.



Şekil 4.20. Bir başka kuşun proventrikülüsündeki etkenler (ok), GMS, Bar= 100µm.



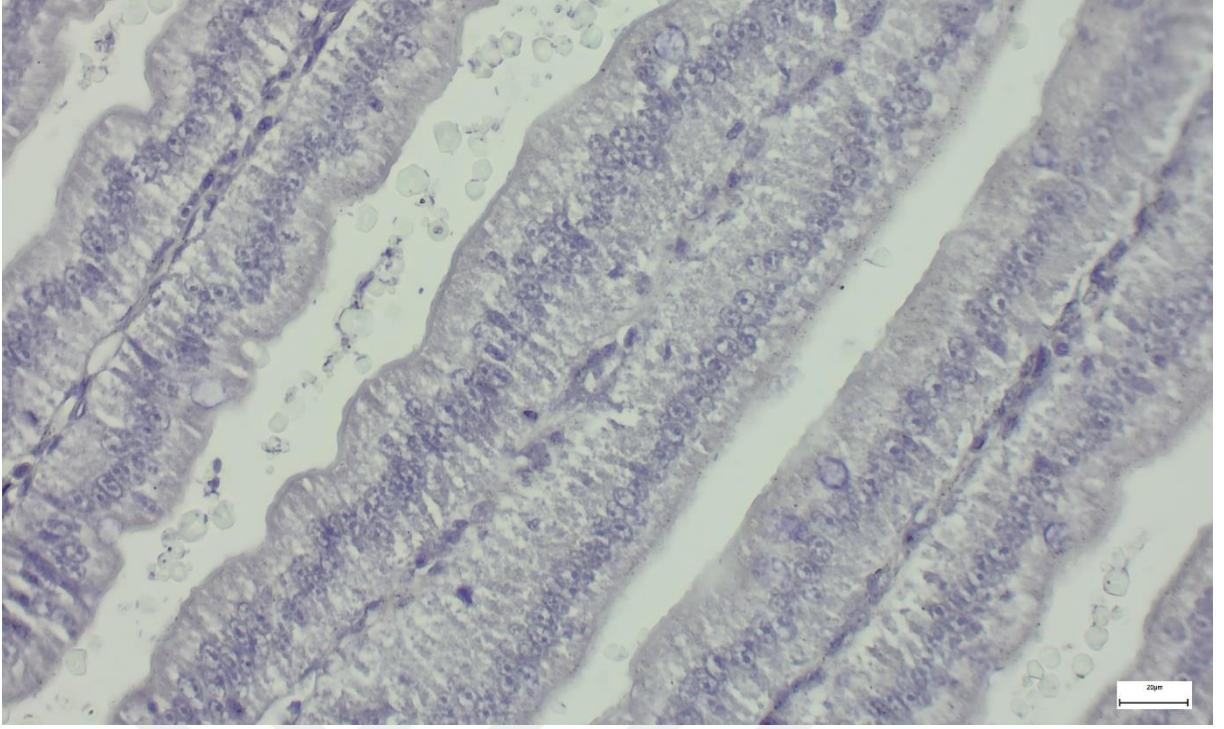
Şekil 4.21. Yukarıdaki resmin büyütülmüş görünümü ve etkenler (ok), GMS, Bar= 50µm.



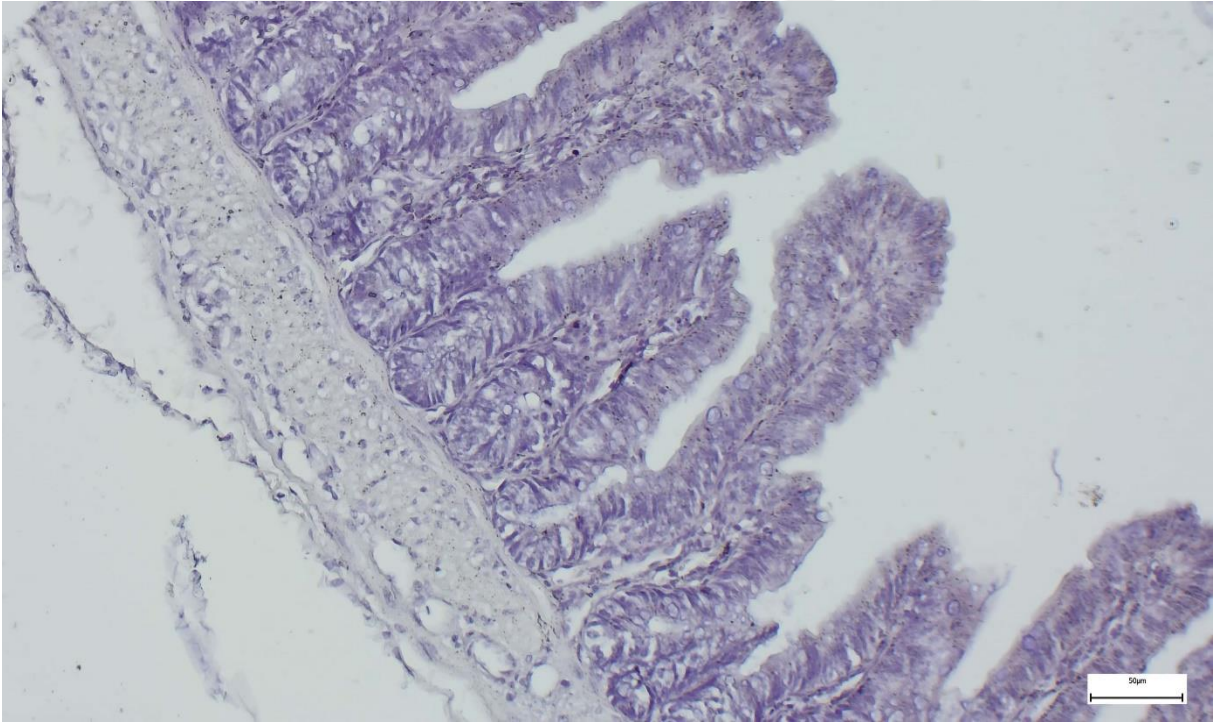
Şekil 4. 22. Etkenlerin büyük büyütmedeki görünümü, GMS, Bar= 20µm.

4.6. *TNF- α* İmmunohistokimyasal Bulguları

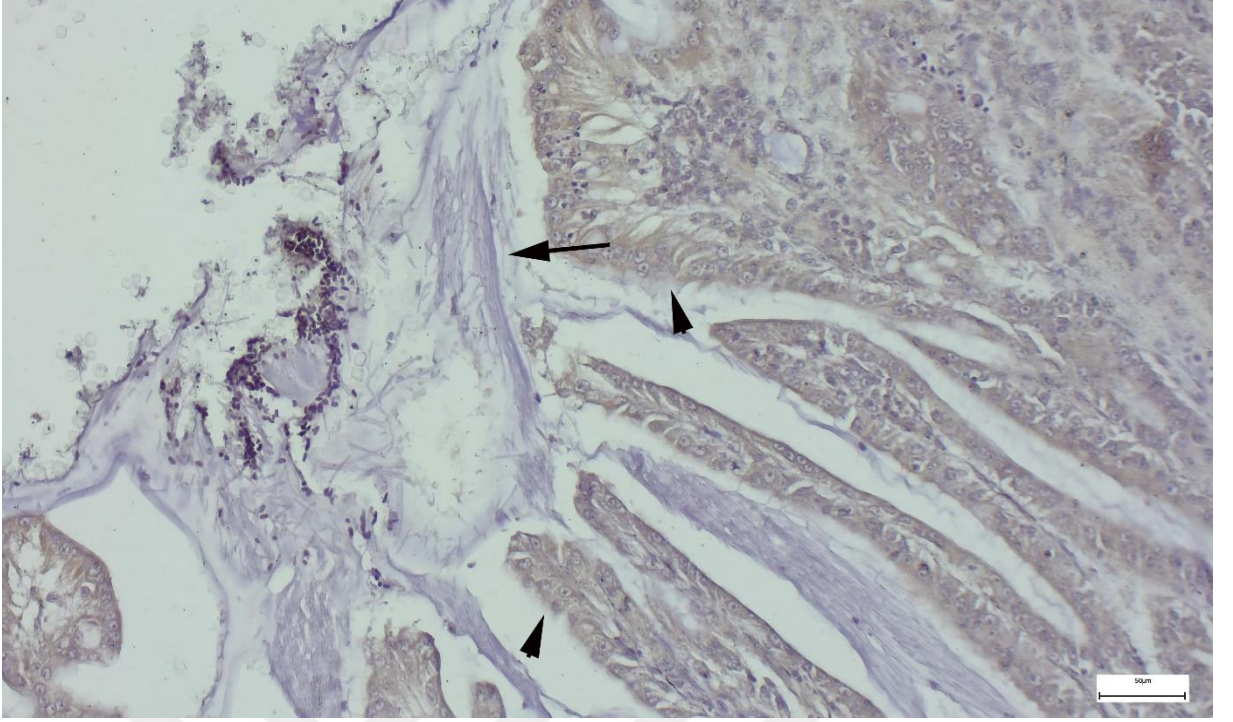
TNF- α ile immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde etkenin bulunmadığı mide bağırsak kesimlerinde negatif veya çok hafifi olan ekspresyonların etkenlerin bulunduğu kesitlerde arttığı dikkati çekti. Pozitif reaksiyonların özellikle epitel hücrelerinde belirgin olduğu ancak propria mukozadaki mezenkimal hücrelerde de ekspresyonlarda artış bulunduğu görüldü. Ekspresyonlara ayrıca infiltre olan yangısal hücrelerde de rastlandı (Şekil 4.22- 4.25).



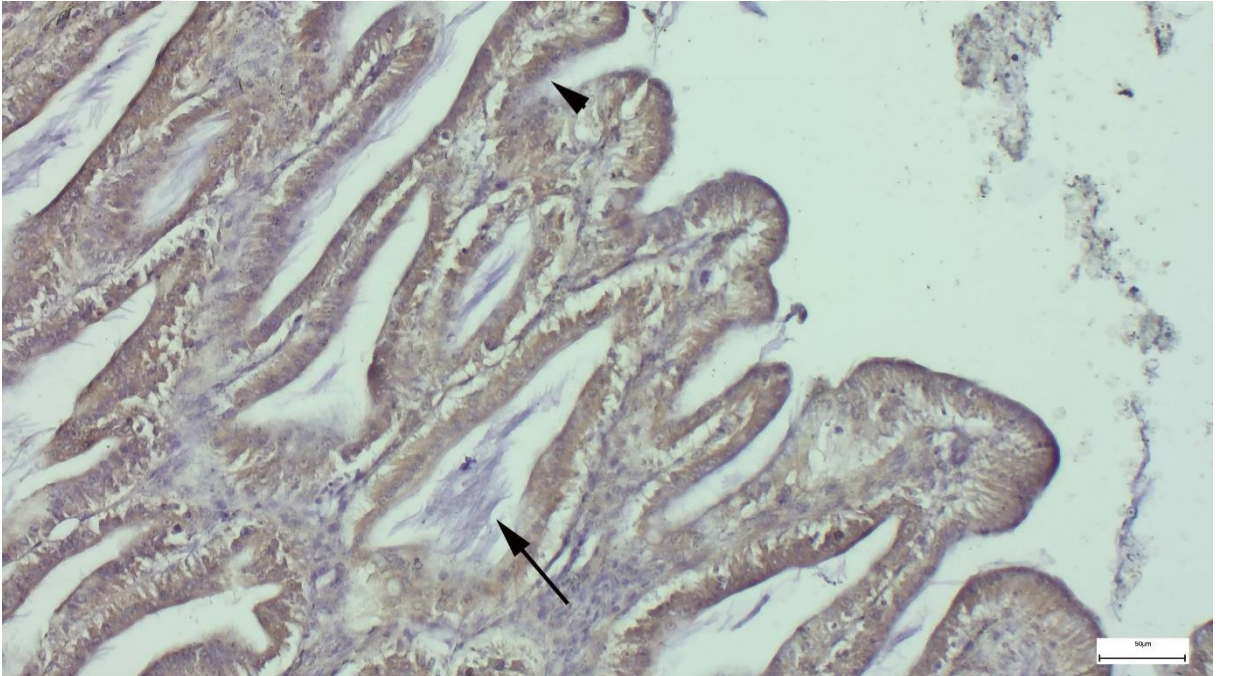
Şekil 4.23. Kontrol kuşlarında bağırsaklarda negatif TNF- α ekspresyonu, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=20µm.



Şekil 4.24. Bir başka kontrol kuşunda bağırsaklarda negatif TNF- α ekspresyonu, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=50µm.



Şekil 4.25. Makrorabdozisli bir kuşun bağırsağında yoğun etkenler (ok) ve artmış TNF- α ekspresyonu (ok başı), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=20 μ m.



Şekil 4.26. Makrorabdozisli bir başka kuşun bağırsağında yoğun etkenler (ok) ve artmış TNF- α ekspresyonu (ok başı), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Bar=20 μ m.

Bu çalışmanın bulguları *Macrorabdus ornitogaster* etkenlerinin yerleştikleri alanlarda yangısal reaksiyona yol açtığı ve TNF- α ekspresyonlarında artışa neden olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Makrorabdozis, muhabbet kuşlarında sıklıkla ölümcül seyredebilen ve gastrointestinal sistemde önemli patolojik değişikliklere yol açan şiddetli bir enfeksiyondur. Bu çalışmada, hastalığın klinik, sitolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak TNF- α ekspresyon bulguları detaylı olarak incelenmiştir. Nekropsi sırasında gözlenen şiddetli zayıflama ve ishal bulguları, hastalığın hem sistemik hemde mide ve bağırsak sistemine özgü belirgin patolojik bulguları ortaya koymuştur. Proventrikulus ve ventrikulus bölgelerinde tespit edilen ülserler, hemoraji ve mukozal değişiklikler, hastalığın gastrointestinal sistem üzerindeki yıkımlayıcı etkilerinin bulgularını göstermektedir. Ayrıca, gerek hematoksilen-eozin gerekse Gomori Methanamine Silver ve PAS boyamaları ile saptanan *Macrorabodus ornitogaster* etkenlerinin yoğunluğu ile mukozal hasar arasında güçlü bir ilişki olduğu görülmüştür. TNF- α ekspresyonunun, etkenin olduğu bölgelerde belirgin şekilde artış göstermesi, hastalığın patogeneğinde inflamatuvar süreçlerin önemli bir rol oynadığını desteklemektedir. Bu bulgular, makrorabdoziste hem doğrudan etkenin neden olduğu patolojik değişiklikleri hem de konak immun yanıtının rolünü ortaya koymak açısından bilgiler vermiştir.

Nekropside dış bakıda makroskobik olarak kuşların proventrikülüslerinin genellikle boş olduğu, bazılarında ise sindirilmemiş gıda ve beyazımsı-pembe renkte yapışkan bir içerik görülmüştür. Ayrıca midelerde genişleme, kanama ve mide duvarlarında ödem, mukozal yüzeylerde mukus artışı ve erozyon, hiperemi, peteşiyel kanama, barsaklarda sulu içerik, dalakta büyüme, peritonitis, bazı hayvanlarda böbreklerde ürat kristalleri, hava kesesi yangısı, kalp kası ve yağ dokusunda dejenerasyon gibi önemlibulgular saptanmıştır. Bazı şiddetli vakalarda ise kanamaya bağlı olarak barsak içeriğinin kırmızı-siyah bir renk aldığı görülmüştür. Bu bulgular daha önceki yayınlarda ifade edilen bulgularla örtüşmektedir (Baker 1985; Schulze ve Heidrich 2001; Phalen ve Moore 2003; Martins ve ark. 2006; Jansson ve ark. 2008). Sağlıklı kuşlarda kaslı midede koilin tabakası düzenli kıvrımlı bir görünümdeyken, makrorabdozisli hayvanlarda bu yapının bozulduğu bildirilmiştir. Koilin tabakasındaki bu bozulmaya, mide pH'sındaki değişikliklerin yol açtığı rapor edilmiştir. pH'daki değişikliğin dokularda proteinkarbonhidrat yapısının bozulmasına neden olduğu belirtilmiştir (Gerlach 2001). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve nekropsi notları incelendiğinde belirgin bulguların proventrikülste olduğu kaslı midenin nispeten daha az etkilendiği bilgilerine ulaşılmıştır.

Önceki çalışmalarda hem *Melopsittacus undulatus* hem de *Nymphaticus hollandicus* kuşlarında pektoral kas atrofisi, proventrikulus ve ventrikulusta hiperemi ve bazen kanama, ventrikulus kas duvarının kalınlaşma, proventriküler mukozada erozyon ve ülserler sıklıkla ve hastalık için karakteristik olarak rapor edilmiştir. Bazı kuşlarda ise ayrıca mukozal hiperplaziler hatta tümörler bildirilmiştir.

(Power ve ark., 2019; Snyder ve ark., 2014). Proventriküler rupturlar da bazı çalışmalarda hastalığa bağlı ölüm nedeni olarak gösterilmiştir. Ayrıca proventrikülüs mukozasının aşırı kalınlaşması bağlı tıkanıklıklar, şiddetli gastritis ve proventriküler ve ventriküler mukozanın ülserasyonları olası ölüm nedenleri olarak sıralanmıştır (Blagojević ve ark., 2024). Bu çalışmada hiçbir kuştta tümöral bir gelişim saptanmamıştır. Ancak provenrikülüs ve ventrikülüste hiperemi, ödem ve kanamalar sıklıkla gözlenmiştir. Ayrıca hastalığın karakteristik özelliklerinden sayılan göğüs kaslarında atrofi ve aşırı zayıflama incelenen tüm kuşlarda rapor edilmiştir. İlaveten aşırı salivasyon, yemlerin kusulması ve ishal gibi semptomlar sıklıkla gözlenmiştir.

Hastalık, taze dışkının mikroskopik incelemesiyle teşhis edilebilir. Ölü kuşlarda, mikroorganizma doğrudan istmusun tuşe preparasyonu ile saptanabilir. MO, 20-80 µm uzunluğunda ve 2-3 µm genişliğinde, mikroaerofilik, ince, düz çubuklar şeklinde olup yuvarlak uçlara sahiptir. Mikroskop altında ıslak preparasyonlar doğrudan incelendiğinde, organizma içinde düzenli aralıklarla küçük, dikdörtgen şekilli, ışık kırıcı çekirdekler bulunduğu gözlenir (Dorrestein ve ark., 1980; Phalen, 2005). PAS ve Gram pozitifdir, hematoksilen ve eozin boyasıyla kristal şeklinde görünürler. Giemsa boyasıyla mikroorganizmalar kırmızımsı-mor renkte boyanırken Gram boyası sadece sitoplazmayı boyar (Baker, 1992; Ozmen ve ark., 2013; Phalen, 2006; Scanlan ve Graham, 1990; Schmidt ve ark., 2024; Tomaszewski ve ark., 2003). Etken floresan mikroskopta Kalkoflor beyaz M2R boyasıyla tespit edilebilir. Bu boyayla kitini ve selülozu boyar bu sebeple tipik hücre duvarı gözlemlenebilir (Tomaszewski ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda da kuşların proventrikülüslerinden alınan ve Giemsa ile boyanan sitolojik preparatların incelenmesinde çok sayıda kümeler ve demetler halinde mavi boyalı etkenlere rastlanmıştır. Büyük büyütmelerde etkenin segmentli yapısı net olarak gözlenmiştir. Ayrıca hem HE, hemde PAS ve Gomori Methenamine Silver boyamalarında proventrikülüs başta olmak üzere bağırsaklarda da etkenler tespit edilmiştir. Etkenlerin özellikle proventrikülüsün istmus bölgesine lokalize oldukları saptanmış ve bu bulgular klasik bilgilerle uyum sergilemiştir.

Hastalık şüpheli mide-bağırsak örnekleri %10 formol içinde fikse edilerek, Mayer's hematoksilen-eozin, PAS, gümüşleme ve kalkofluor white M2R gibi yöntemleriyle boyanmaktadır. Özellikle PAS ve GMS yöntemleriyle yapılan boyamalarda, mideye ait mukoid içerik de dahil olmak üzere özellikle kaslı ve bezli mideden hazırlanan preparatlarda çomak şeklinde, 1.5–3 x 20-60 µm büyüklüğünde mikroorganizmaların görülmesi, teşhis bakımından önem arz etmektedir. Etkene sindirim sistemine ait doku ve organların derin kısımlarında da rastlanmaktadır. Mide dokularının histopatolojik incelemesinde, mide duvarının 2-3 kat kalınlaştığı ve kanlı bir tabaka ile kaplandığı bildirilmektedir (Baker 1985; Gerlach 2001; Ozmen ve ark., 2013; Phalen 2005; Martins ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda da benzer bulgular elde edilmiş, çalışmaya dahil edilen tüm kuşlarda HE ile nispeten soluk

boyanan etkenlerin PAS ile koyu kırmızı ve GMS ile siyah renkli etkenler net ve belirgin olarak saptanmıştır. Literatürle uygun şekilde hem mukozanın üzerinde hem lümeninde mukus içinde hemde organ duvarlarının derin kısımlarında yoğunluğu değişen şekillerde etkenlere rastlanmıştır.

TNF- α , moleküler ağırlığı 55 ve 75 kDa olan iki benzer reseptöre bağlanır (Loetscher ve ark., 1991b). Bu reseptörler, hücre dışı bölgede çok sınırlı bir homolojiye sahiptir. TNF reseptör üst ailesi, tekrarlayan sistein kümelerinin varlığıyla tanımlanır. Proteinlerin hücre içi bölgelerinde hiçbir homoloji görülmez (Beutler ve Bazzoni, 1998). Hücre içi bölgelerde homolojinin olmaması, iki reseptörün farklı sinyal yollarını aktive ettiğini düşündürmektedir. TNF- α reseptörleri, eritrositler ve uyarılmamış T lenfositler gibi birkaç istisna dışında, bilinen hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunur. Reseptör yoğunluğu hücre başına 200-10.000 arasındadır. Bir hücrede bulunan reseptör sayısı ile TNF- α 'nin neden olduğu yanıtın büyüklüğü veya yönü arasında bir korelasyon yok gibi görünmektedir (Beyaert ve Fiers, 1994). TNF- α birçok hastalık olayına katılır ve bazen hastalıkların daha şiddetlenmesinde etkilidir. İnsan hastalıklarında çok daha sık çalışılmış olmasına rağmen hayvan hastalıklarındaki durumu çok daha az incelenmiştir. Yapmış olduğumuz literatür taramasında TNF- α ekspresyonlarının makrorabdozisteki durumu ile ilgili bir çalışma bulunamamıştır. Bu sebeple bu çalışma bu alandaki bilgilerin artırılması için planlanmıştır. Bizim çalışmamızın sonuçları TNF- α ile immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde etkenin bulunmadığı mide bağırsak kesimlerinde negatif veya çok hafifi olan ekspresyonların etkenlerin bulunduğu kesitlerde arttığını göstermiştir. Pozitif reaksiyonların özellikle epitel hücrelerinde belirgin olduğu ancak propria mukozadaki mezenkimal hücrelerde de ekspresyonlarda artış bulunduğu görüldüğü saptanmıştır. Ekspresyonlara ayrıca infiltre olan yangısal hücrelerde de ekspresyonlara rastlanmıştır. Bu bulgular TNF- α 'nın makrorabdozis patojenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca tedavisi oldukça zor olan bu hastalığa karşı TNF- α inhibisyonunun da bir tedavi seçeneği olarak düşünülebileceği değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Makrorabdozis kuşlarda, özellikle psittasin ve paserin türlerinde, mide ve bağırsaklarda patolojik lezyonlara neden olan önemli ve bulaşıcı bir hastalıktır. Tedavisi oldukça güç ve genellikle başarısızdır, bu da ciddi kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle, hastalığın tedavisinde çeşitli yöntemler denenmektedir. TNF- α , birçok hastalıkta ekspresyonu artan bir sitokin olarak bilinir ve bu sitokinin inhibisyonunun farklı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, megabakteriyozis tanısı almış muhabbet kuşlarının mide ve bağırsak sistemlerinde TNF- α ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Bulgular, TNF- α 'nın hastalığın patogenezinde kritik bir rol oynadığını ve bu sitokinin inflamatuvar süreçleri yönlendirebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, TNF- α antagonistleri veya inhibitörlerinin tedavi amaçlı kullanımının değerlendirilmesi, hastalığın yönetiminde yeni bir yaklaşım sunabilir.

Öneri olarak, gelecekte yapılacak çalışmaların, TNF- α inhibisyonunun klinik etkilerini ve tedaviye yönelik etkinliğini belirlemek amacıyla in vivo modeller üzerinde gerçekleştirilmesi önemlidir. Ayrıca, bu tür çalışmaların yalnızca TNF- α 'yı değil, hastalık sürecinde rol oynayabilecek diğer inflamatuvar sitokinleri de değerlendirmesi faydalı olacaktır. Megabakteriyozisli kuşlar üzerinde yapılacak kapsamlı tedavi araştırmaları, bu önemli hastalığın kontrol altına alınmasına ve tedavi başarısının artırılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKÇA

- Acosta-Felquer ML, Rosa J, Soriano ER. (2016).** An evidence-based review of certolizumab pegol in the treatment of active psoriatic arthritis: place in therapy. *Open Access Rheumatol.*, **8**, 37-44. doi: 10.2147/OARRR.S56837.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH (2012).** Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.*, **119**(3), 651-665. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225.
- Amer MM, Mekky HM (2020).** Avian gastric yeast (AGY) infection (macrorhabdiosis or megabacteriosis). *Bulg. J. Vet. Med.*, **23**(4), 397-410. doi: 10.15547/bjvm.2019-0035.
- Arijs I, De Hertogh G, Machiels K, Van Steen K, Lemaire K, Schraenen A, Van Lommel L, Quintens R, Van Assche G, Vermeire S, Schuit F, Rutgeerts P (2011).** Mucosal gene expression of cell adhesion molecules, chemokines, and chemokine receptors in patients with inflammatory bowel disease before and after infliximab treatment. *Am. J. Gastroenterol.*, **106**(4), 748-761. doi: 10.1038/ajg.2011.27.
- Armitage RJ (1994).** Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol.*, **6**(3), 407-413. doi: 10.1016/0952-7915(94)90119-8.
- Azevedo VF, Galli N, Kleinfelder A, D'Ippolito J, Urbano PC (2015).** Etanercept biosimilars. *Rheumatol Int.*, **35**(2), 197-209. doi: 10.1007/s00296-014-3080-5.
- Baker JR (1985).** Clinical and pathological aspects of going light'in exhibition budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Rec.*, **116**(15), 406-408. doi: 10.1136/vr.116.15.406.
- Baker JR (1992).** Megabacteriosis in exhibition budgerigars. *Vet Rec.*, **131**(1),12-14. doi: 10.1136/vr.131.1.12.
- Baker JR (1997).** Megabacteria in diseased and healthy budgerigars. *Vet. Rec.* **140**(24):627. doi: 10.1136/vr.140.24.627.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W (1993).** Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.*, **73**(3), 431-445. doi: 10.1016/0092-8674(93)90132-a.
- Bazzoni F, Beutler B (1996).** The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.*, **334**(26), 1717-1725. doi: 10.1056/NEJM199606273342607.

- Behnke EL, Fletcher OJ (2011).** *Macrorhabdus ornithogaster* (Megabacterium) infection in adult hobby chickens in North America. *Avian Dis.*, **55**(2), 331-334. doi: 10.1637/9569-100710-Case.1.
- Beutler B, Bazzoni F (1998).** TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread?. *Blood Cells Mol Dis.*, **24**(2), 216-230. doi: 10.1006/bcmd.1998.0187.
- Beyaert R, Fiers W (1994).** Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity: what we do understand and what we do not. *FEBS lett.*, **340**(1-2), 9-16. doi: 10.1016/0014-5793(94)80163-0.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997).** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*, **385**(6618), 729-733. doi: 10.1038/385729a0.
- Blagojević B, Davidov I, Galfi Vukomanović A, Tekić D, Došenović Marinković M, Vidović V (2024).** Occurrence of *Macrorhabdus ornithogaster* in exotic birds. *Pol. J. Vet. Sci.*, **20**(1), 139-142. doi: 10.24425/pjvs.2024.149335.
- Borrelli L, Dipineto L, Rinaldi L, Romano V, Noviello E, Menna LF, Cringoli G, Fioretti A (2015).** New diagnostic insights for *Macrorhabdus ornithogaster* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **53**(11), 3448-3450. doi: 10.1128/JCM.01564-15.
- Bradley JR (2008).** TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.*, **214**(2), 149-160. doi: 10.1002/path.2287.
- Brandão J, Beaufrère H (2013).** Clinical update and treatment of selected infectious gastrointestinal diseases in avian species. *J. Exot. Pet Med.*, **22**(2), 101-117. doi:10.1053/j.jepm.2013.05.003.
- Brenner D, Blaser H, Mak TW (2015).** Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol.*, **15**(6), 362-374. doi: 10.1038/nri3834.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975).** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**(9), 3666-3670. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- Chatzantoni K, Mouzaki A (2006).** Anti-TNF- α antibody therapies in autoimmune diseases. *Curr Top Med Chem.*, **6**(16), 1707-1714. doi: 10.2174/156802606778194217.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK (2009).** Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, **137**(6), 1112-1123. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.037.

Chu WM (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.*, **328**(2), 222-225. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.014.

Coley WB (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Clin Orthop Relat Res.*, 2623-11.

Curtis JR, Mariette X, Gaujoux-Viala C, Blauvelt A, Kvien TK, Sandborn WJ, Winthrop K, de Longueville M, Huybrechts I, Bykerk VP (2019). Long-term safety of certolizumab pegol in rheumatoid arthritis, axial spondyloarthritis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease: a pooled analysis of 11 317 patients across clinical trials. *RMD. Open.*, 5(1), e000942. doi: 10.1136/rmdopen-2019-000942.

Danese S (2008). Mechanisms of action of infliximab in inflammatory bowel disease: an anti-inflammatory multitasker. *Dig. Liver Dis.*, 40, S225-S228. doi: 10.1016/S1590-8658(08)60530-7.

Darnay BG, Aggarwal BB (1999). Signal transduction by tumour necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann. Rheum. Dis.*, **58**(suppl 1), I2-I13. doi: 10.1136/ard.58.2008.i2.

De Herdt P, Ducatelle R, Devriese L, Haesebrouck F, Vanrobaeys M (1997). Megabacterium infections of the proventriculus in passerine and psittacine birds: practice experiences in Belgium. In *Proceedings 4th Conference of the European Committee of the Association of Avian Veterinarians, London, England*, pp. 123-127.

Denbow DM (2022). Gastrointestinal anatomy and physiology. In Scanes CGi Dridi S (Eds) *Sturkie's avian physiology*, Academic Press., pp. 337-366.

Desai RJ, Hansen RA, Rao JK, Wilkins TM, Harden EA, Yuen A, Jonas DE, Roubey R, Jonas B, Gartlehner G, Lux L, Donahue KE (2012). Mixed treatment comparison of the treatment discontinuations of biologic disease-modifying antirheumatic drugs in adults with rheumatoid arthritis. *Ann. Pharmacother.*, **46**(11), 1491-1505. doi: 10.1345/aph.1R203.

Dorrestein GM, Zwart P, Buitelaar MN (1980). Problems arising from disease during the periods of breeding and rearing canaries and other aviary birds (author's transl). *Tijdschr. Diergeneesk.*, 105(13), 535-543.

Fiers W (1991). Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.*, **285**(2), 199-212. doi: 10.1016/0014-5793(91)80803-b.

Filippich LJ, Hendrikz JK (1998). Prevalence of megabacteria in budgerigar colonies. *Aust Vet J.*, **76**(2), 92-95. doi: 10.1111/j.1751-0813.1998.tb14533.x.

Filippich LJ, Parker MG (1994). Megabacteria and proventricular/ventricular disease in psittacines and passerines. *In Proc Annu Conf Assoc Avian Vet*, Reno, Nevada, USA, pp. 287-293.

Filippich LJ, O'Boyle DA, Webb R, Fuerst JA (1993). Megabacteria in birds in Australia. *Aust. Vet. Prac.*, 23(2), 72-76.

Gerlach B, Cordier SM, Schmukle AC, Emmerich CH, Rieser E, Haas TL, Webb AI, Rickard JA, Anderton H, Wong WW, Nachbur U, Gangoda L, Warnken U, Purcell AW, Silke J, Walczak H (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 471(7340), 591-596. doi: 10.1038/nature09816.

Gerlach H (2001). Megabacteriosis. *Semin. Avian Exotic Pet. Med.*, 10(1), 12-19.

Goldfeld AE, Tsai EY (1996). TNF- α and genetic susceptibility to parasitic disease. *Exp. Parasitol.*, 84(2), 300-303. doi: 10.1006/expr.1996.0117.

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, et al., (1984). Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, 312(5996), 721-724. doi: 10.1038/312721a0.

Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5), 793-802. doi: 10.1016/0092-8674(95)90192-2.

Gruss HJ, Dower SK (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood.*, 85(12):3378-404.

Guo Y, Lu N, Bai A (2013). Clinical use and mechanisms of Infliximab treatment on inflammatory bowel disease: A recent update. *Biomed. Res. Int.* 2013:581631. doi: 10.1155/2013/581631.

Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B, Schmukle AC, Cordier SM, Rieser E, Feltham R, Vince J, Warnken U, Wenger T, Koschny R, Komander D, Silke J, Walczak H (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol. Cell*, 36(5), 831-844. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.013.

Hadley TL (2005). Disorders of the psittacine gastrointestinal tract. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.*, 8(2), 329-349. doi: 10.1016/j.cvex.2005.01.001.

- Hanka K, Koehler K, Kaleta EF, Sommer D, Burkhardt E (2010).** *Macrorhabdus ornithogaster*: detection in companion birds, poultry and pigeons, morphological characterisation and examination of in vitro cultivation. *Prakt Tierarzt.*, **91**, 390-395.
- Hannafusa Y, Bradley A, Tomaszewski EE, Libal MC, Phalen DN (2007).** Growth and metabolic characterization of *Macrorhabdus ornithogaster*. *J Vet Diagn Invest.*, **19**(3), 256-265. doi: 10.1177/104063870701900305.
- Hargreaves RC (1981).** A fungus commonly found in the proventriculus of small pet birds. In *30th Western Poultry Disease Conference and 15th Poultry Health Symposium*, University of California at Davis. March 9–13, 1981. p. 75-76.
- Henderson GM, Gulland FM, Hawkey CM (1988).** Haematological findings in budgerigars with megabacterium and *Trichomonas* infections associated with 'going light'. *Vet. Rec.*, **123**(19), 492-494. doi: 10.1136/vr.123.19.492.
- Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M (2019).** Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000 Res.*, **8**, F1000 Faculty Rev-111. doi: 10.12688/f1000research.17023.1.
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (2010).** Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*, **49**(7), 1215-1228. doi: 10.1093/rheumatology/keq031.
- Idriss H (2000).** Do TNF α insensitive cancer cells escape α -tubulin nitro-tyrosinylation? *Nitric Oxide* **4**(1), 1–3. doi: 10.1006/niox.1999.0264.
- Idriss HT, Naismith JH (2000).** TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.*, **50**(3):184-195. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
- Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH (2021).** The role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(5), 2719. doi: 10.3390/ijms22052719.
- Jiang Y, Yu M, Hu X, Han L, Yang K, Ba H, Zhang Z, Yin B, Yang XP, Li Z, Wang J (2017).** STAT1 mediates transmembrane TNF- α -induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. *Cell Death Differ.*, **24**(4), 660-671. doi: 10.1038/cdd.2016.162.
- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. (2016).** TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.*, **12**(1), 49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.

- Keystone E, Heijde Dv, Mason D Jr, Landewé R, Vollenhoven RV, Combe B, Emery P, Strand V, Mease P, Desai C, Pavelka K (2008).** Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum.*, **58**(11), 3319-3329. doi: 10.1002/art.23964.
- Kheirandish R, Salehi M (2011).** Megabacteriosis in budgerigars: diagnosis and treatment. *Comp. Clin. Pathol.*, **20**(5), 501-505. doi: 10.1007/s00580-010-1026-1
- Klasing KC (1999).** Avian gastrointestinal anatomy and physiology. *Semin. Avian Exotic Pet Med.*, **8**(2), 42-50.
- Kobayashi T, Yokoyama T, Ito S, Kobayashi D, Yamagata A, Okada M, Oofusa K, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H (2014).** Periodontal and serum protein profiles in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitor adalimumab. *J. Periodontol.*, **85**(11), 1480-1488. doi: 10.1902/jop.2014.140194.
- Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi, J (1998).** Sleep: A Physiologic Role for IL-1 β and TNF- α . *Ann N Y Acad Sci.*, **856**(1), 148-159. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08323.x.
- LaMattina KC, Goldstein DA (2017).** Adalimumab for the treatment of uveitis. *Expert Rev Clin Immunol.*, **13**(3), 181-188. doi: 10.1080/1744666X.2017.1288097.
- Lanzarot P, Blanco JL, Alvarez-Perez S, Abad C, Cutuli MT, Garcia ME (2013).** Prolonged fecal shedding of ‘megabacteria’(*Macrorhabdus ornithogaster*) by clinically healthy canaries (Serinus canaria). *Med Mycol.*, **51**(8), 888-891. doi: 10.3109/13693786.2013.813652.
- Lim H, Lee SH, Lee HT, Lee JU, Son JY, Shin W, Heo YS (2018).** Structural biology of the TNF α antagonists used in the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.*, **19**(3), 768. doi: 10.3390/ijms19030768.
- Loetscher H, Gentz R, Zulauf M, Lustig A, Tabuchi H, Schlaeger EJ, Brockhaus M, Gallati H, Manneberg M, Lesslauer W (1991).** Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *J Biol Chem.*, **266**(27), 18324-18329.
- Loetscher H, Steinmetz M, Lesslauer W (1991).** Tumor necrosis factor: receptors and inhibitors. *Cancer cells.*, **3**(6), 221-226.

Martínez A, López J, Sesma P (2000). The nervous system of the chicken proventriculus: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Histochem J.*, **32**(1), 63-70. doi: 10.1023/a:1003962413417.

Martins NRS, Horta AC, Siqueira AM, Lopes SQ, Resende JS, Jorge MA, Assis RA, Martins NE, Fernandes AA, Barrios PR, CostaTJR, Guimarães LMC (2006). Macrorhabdus ornithogaster in ostrich, rhea, canary, zebra finch, free range chicken, turkey, guinea-fowl, columbina pigeon, toucan, chuckar partridge and experimental infection in chicken, japanese quail and mice. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **58**, 291-298. doi:10.1590/S0102-09352006000300001

Mazumdar S, Greenwald D (2009). Golimumab. *MAbs.*, 1(5), 422-431. doi: 10.4161/mabs.1.5.9286. McGovern JL, Nguyen DX, Notley CA, Mauri C, Isenberg DA, Ehrenstein MR (2012). Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy. *Arthritis Rheum.*, **64**(10), 3129-3138. doi: 10.1002/art.34565.

McLelland J (1975). *Aves digestive system*. In: Getty R. (Ed.), Sisson and Grossman's the Anatomy of the Domestic Animals, vol. 2. Saunders, Philadelphia, pp. 1857–1882.

McLelland J (1979). Digestive system. In: King AS, McLelland J. (Eds.), Form and Function in Birds. Academic Press, London, pp. 69–181.

Mease PJ (2007). Adalimumab in the treatment of arthritis. *Ther Clin Risk Manag.*, 3(1), 133-148. doi: 10.2147/tcrm.2007.3.1.133.

Melsheimer R, Geldhof A, Apaolaza I, Schaible T (2019). Remicade®(infliximab): 20 years of contributions to science and medicine. *Biologics*, **13**,139-178. doi: 10.2147/BTT.S207246.

Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M (2015). Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int. Immuno.*, **27**(1), 55-62. doi: 10.1093/intimm/dxu102.

Moore RP, Snowden KF, Phalen DN (2001). A method of preventing transmission of so-called “megabacteria” in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J. Avian Med. Surg.*, **15**(4), 283-287.

Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, Weaver AL, Keystone EC, Furst DE, Mease PJ, Ruderman EM, Horwitz DA, Arkfeld DG, Garrison L, Burge DJ, Bloch CM, Lange ML, McDonnell ND, Weinblatt ME (1999). Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, **130**(6), 478-486. doi: 10.7326/0003-4819-130-6-199903160-00004.

Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi Y, Arinobu Y, Otsuka T, Sawabe T, Harashima S, Nagasawa K, Niho Y (2001). Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis. *Arthritis Rheum.*, **44**(12), 2819-2827. doi: 10.1002/1529-0131(200112)44:12<2819::aid-art469>3.0.co;2-2.

Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, **386**(6618), 733-736. doi: 10.1038/385733a0.

Mulé F. (1991). The avian oesophageal motor function and its nervous control: some physiological, pharmacological and comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* **99**(4), 491-498. doi: 10.1016/0300-9629(91)90121-r.

Mutlu OF, Seçkin S, Ravelhofer K, Hildebrand RA, Grimm F. (1997). Proventriculitis in domestic fowl (*Gallus gallus* var. dom. L., 1758) caused by megabacteria. *Tierarztl. Prax. Ausg. G Grosstiere Nutztiere*, **25**(5), 460-462.

Oldfield V, Plosker GL (2009). Golimumab: in the treatment of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *BioDrugs.*, **23**(2), 125-135. doi: 10.2165/00063030-200923020-00005.

Ozmen O, Aydogan A, Haligur M, Adanir R, Kose O, Sahinduran, S (2013). The pathology of *Macrorhabdus ornithogaster* and *Eimeria dunsingi* (Farr, 1960) infections in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Isr. J. Vet. Med.*, **68**(4).

Pasparakis M, Vandenabeele P (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, **517**(7534), 311-320. doi: 10.1038/nature14191.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, **312**(5996), 724-729. doi: 10.1038/312724a0.

Phalen D (2005). Diagnosis and management of *Macrorhabdus ornithogaster* (formerly megabacteria). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.*, **8**(2), 299-306. doi: 10.1016/j.cvex.2004.12.002.

Phalen DN (2006). *Implications of Macrorhabdus in clinical disorders*. In: Harrison GJ, Lightfoot TL (Eds.) *Clinical Avian Medicine*. Vol II. Palm Beach, FL: Spix Publishing, Inc; 705-709.

Phalen DN (2014). Update on the diagnosis and management of *Macrorhabdus ornithogaster* (formerly megabacteria) in avian patients. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, **17**(2), 203-210. doi: 10.1016/j.cvex.2014.01.005.

Phalen DN, Tomaszewski E, Davis A (2002). Investigation into the detection, treatment, and pathogenicity of avian gastric yeast. In: *Proceedings of the 23rd Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, Monterey, USA*, pp. 49–51.

Pobezinskaya YL, Liu Z (2012). The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*, **11**(5), 871-876. doi: 10.4161/cc.11.5.19300.

Powers LV, Mitchell MA, Garner MM (2019). *Macrorhabdus ornithogaster* infection and spontaneous proventricular adenocarcinoma in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet. Pathol.*, **56**(3), 486-493. doi: 10.1177/0300985818823773.

Probert L (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, **302**, 2-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.038.

Ramael S, Van Hoorick B, Tiessen R, van Iersel T, Moschetti V, Lang B, Sonderegger I, Wiebe S, Liedert B, Jayadeva G (2018). Similar pharmacokinetics of the Adalimumab (Humira®) Biosimilar BI 695501 whether administered via subcutaneous autoinjector or prefilled syringe (VOLTAIRE®-AI and VOLTAIRE®-TAI): Phase 1, Randomized, Open-Label, Parallel-Group Trials. *Rheumatol Ther.*, **5**(2), 403-421. doi: 10.1007/s40744-018-0119-1.

Rau R (2002). Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials. *Ann Rheum Dis.*, **61**(suppl 2), ii70-ii73. doi: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii70.

Ravelhofer K, Rotheneder R, Gareis M (1998). Megabacteriosis in different bird species. *DVG Tag Vogelkr*, **9**, 95-104.

Rivkin A (2009). Certolizumab pegol for the management of Crohn's disease in adults. *Clin. Ther.*, **31**(6), 1158-1176.

Robino P, Ferrocino I, Rossi G, Dogliero A, Alessandria V, Grosso L, Galosi L, Tramuta C, Cocolin L, Nebbia P (2019). Changes in gut bacterial communities in canaries infected by *Macrorhabdus ornithogaster*. *Avian Pathol.*, **48**(2), 111-120.

Scanlan CM, Graham DL (1990). Characterization of a gram-positive bacterium from the proventriculus of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Dis.*, **34**(3), 779-786.

Schoenfeld HJ, Poeschl B, Frey JR, Loetscher H, Hunziker W, Lustig A, Zulauf M (1991). Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from *Escherichia coli* yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem.*, **266**(6), 3863-3869.

Shealy DJ, Cai A, Staquet K, Baker A, Lacy ER, Johns L, Vafa O, Gunn G 3rd, Tam S, Sague S, Wang D, Brigham-Burke M, Dalmonte P, Emmell E, Pikounis B, Bugelski PJ, Zhou H, Scallon BJ, Giles-Komar J (2010). Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor α . *MAbs.*, **2**(4) 428-439.

Sidor I (2024). *Gastrointestinal System and Pancreas*. In: Schmidt RE, Struthers JD, Phalen DN. (Eds), *Pathology of pet and aviary birds*. John Wiley & Sons.p:143-196. <https://doi.org/10.1002/9781119650522.ch4>

Snyder JM, Treuting PM (2014). Pathology in practice. Adenocarcinoma of the proventriculus with liver metastasis and marked, diffuse chronic-active proventriculitis and ventriculitis with moderate *M. ornithogaster* infection in a budgerigar. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **244**(6), 667-669. doi: 10.2460/javma.244.6.667.

Speer B, Phalen D N, Powers LV, Filippich LJ, Antinoff N (2004). Diagnosis and treatment options for megabacteria (*Macrorhabdus ornithogaster*). *J. Avian Med.Surg.*, **18**(3), 189-195. <http://www.jstor.org/stable/27823381>.

Tan JK, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Gottlieb AB (2007). Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **12**(1), 38-45.

Thornberry N A, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**(5381), 1312-1316. doi: 10.1126/science.281.5381.

Tomaszewski EK, Logan KS, Snowden KF, Kurtzman CP, Phalen DN (2003). Phylogenetic analysis identifies the ‘megabacterium’ of birds as a novel anamorphic ascomycetous yeast, *Macrorhabdus ornithogaster* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **53**(4), 1201-1205. doi: 10.1099/ijs.0.02514-0.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, **117**(2), 244-279. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.10.001.

Tsai SS, Park JH, Hirai K, Itakura C (1992). Catarrhal proventriculitis associated with a filamentous organism in pet birds. *Jpn J Vet Res.*, **40**(4), 143-148.

- Tseng WY, Huang YS, Lin HH, Luo SF, McCann F, McNamee K, Clanchy F, Williams R (2018).** TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine*, **101**, 19-25. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.027.
- Tuschak N, Hafez HM, Heil G (1990).** Vorkommen von megabakterien-infektion (“Leichtwerden”) bei Wellensittichen und anderen Ziervögeln. *Tierarztl Prax*, **10**, 24-30.
- Van Herck H, Duijser T, Zwart P, Dorrestein GM, Buitelaar M, Van Der Hage MH (1984).** A bacterial proventriculitis in canaries (*Serinus canaria*). *Avian Pathol.*, **13**(3), 561-572. doi: 10.1080/03079458408418555.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995).** Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.*, **5**(10), 392-399. doi: 10.1016/s0962-8924(00)89088-1.
- Vergara P, Ferrando C, Jiménez M, Fernández E, Goñalons E (1989).** Factors determining gastkointestinal transit time of several markers in the domestic fowl. *Q. J. Exp. Physiol.*, **74**(6), 867-874. doi: 10.1113/expphysiol.1989.sp003357.
- Vilcek J (2008).** First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease. *J. Immunol.*, **181**(1), 5-6. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.5.
- Vilcek J, Lee TH (1991).** Tumor necrosis factor: new insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem.*, **266**(12), 7313-7316.
- Wang L, Du F, Wang X (2008).** TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.*, **133**(4), 693-703. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.036.
- Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A (2009).** Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.*, **10**(4), 348-355. doi: 10.1038/ni.1714.
- Wolf O (2000).** *Untersuchung zu Vorkommen, Bedeutung und Eigenschaften von sogenannten Megabakterien bei verschiedenen Vogelspezies* (Doctoral dissertation, Uitgever niet vastgesteld).
- Wride MA, Sanders EJ (1995).** Potential roles for tumour necrosis factor α during embryonic development. *Anat Embryol (Berl)*. **191**(1), 1-10. doi: 10.1007/BF00215292.
- Yehia N, Salem HM, Mahmmoud Y, Said D, Samir M, Mawgod SA, Sorour HK, AbdelRahman MAA, Selim S, Saad AM, El-Saadony MT, El-Meihy RM, Abd El-Hack ME, El-Tarabily KA, Zanaty AM (2023).** Common viral and bacterial avian respiratory infections: an updated review. *Poult. Sci.*, **102**(5), 102553. doi: 10.1016/j.psj.2023.102553.
- Zhou H, Jang H, Fleischmann RM, Bouman-Thio E, Xu Z, Marini JC, Pendley C, Jiao Q, Shankar G, Marciniak SJ, Cohen SB, Rahman MU, Baker D, Mascelli MA, Davis HM, Everitt DE (2007).**

Pharmacokinetics and safety of golimumab, a fully human anti-TNF- α monoclonal antibody, in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharmacol.*, **47**(3), 383-396. doi: 10.1177/0091270006298188.

