



## ERCIYES ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University

Araştırma Makalesi / Research Article  
16(1), 8-15, 2019  
DOI:10.32707/ercivet.538030

### Kuluçka Sonrası İlk İki Haftada Lipopolisakkarit Uygulanan ve Uygulanmayan Broyleyler Civcivlerde Dalağın Histolojik Gelişimi\*

Ebru AKA<sup>1</sup>, Ülker EREN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın-TÜRKİYE

\*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Ülker EREN; E-mail: ueren@adu.edu.tr; ORCID: 0000-0002-2451-8512

Atıf yapmak için: Aka E, Eren Ü. Kuluçka sonrası ilk iki haftada lipopolisakkarit uygulanan ve uygulanmayan broyleyler civcivlerde dalağın histolojik gelişimi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 8-15.

**Özet:** Civcivlerde aşılama, adaptif immunitenin geliştirilmesini amaçlar. Dalak, lenf düğümü olmayan tavuklarda, adaptif immunité açısından oldukça önemli role sahiptir. Sunulan çalışmada, broyleyler civcivlerde dalağın gelişiminin, antijenle uyarılmış ve uyarılmamış gruplarda araştırılması amaçlandı. Materyal olarak 225 adet Ross 308 ticari broyleyler civciv kullanıldı. Civcivler 1, 4, 7, 10, 14 günlük olmak üzere her biri 45'er adet civciv içeren beş ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde kontrol, lipopolisakkarit (LPS) ve PBS solüsyonu uygulanan olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Antijenik uyarım LPS'nin intra-abdominal uygulaması ile gerçekleştirildi. Uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra üçer hayvandan dalak örneği alındı. Örnekler üçlü boyama, Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu ve orsein-Giemsas yöntemleriyle boyandı. Dalağın stroma ve parenşim kısımlarının gelişimi incelendi. Peri-ellipsoidal lenfoid doku (PEL) bölgelerinin, bir günlük civcivlerde gelişmemiş olduğu gözlemlendi. PEL'de dört günlük örneklerde tek tük lenfosit görülürken, ancak yedi günden itibaren lenfosit kümeleri ayırt edildi. Literatürden farklı olarak, subcapsular lenfoid doku (SCL) alanları tespit edildi. Periarteriolar lymphoid tissue (PAL), perivenous lenfoid doku (PVL) ve SCL kısımlarının lenfosit içerdiklerinin PEL'den daha yoğun olduğu görüldü. Germinal merkez (GC) yapısının bir günlükten itibaren taslak halinde olduğu, dördüncü günden itibaren retikulum iplikleri ile sınırlandırıldığı ve iki haftanın sonunda gelişimini tamamladığı belirlendi. GC'nin de dalağın beyaz pulpasına ait sabit bir yapı olduğu düşünüldü. Granulopoezis en yoğun olarak bir günlük civcivlerde belirlendi. Antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan örneklerde, beyaz ve kırmızı pulpa açısından histolojik bir farklılık gözlemlenmedi. Araştırma sonunda, broyleyler dalağında adaptif immunité görev alan kısımların, iki haftadan önce histolojik gelişimini tamamlamamış olduğu tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** Broyleyler civciv, dalak gelişimi, kuluçka sonrası

#### The Histological Development of the Spleen in Broiler Chicks Treated with and without Lipopolysaccharide in the First Two Weeks of the Post-Hatch Period

**Summary:** The vaccination procedure for chicks aims to develop adaptive immunity. The spleen has an important role in adaptive immunity in chickens without lymph nodes. It was aimed to investigate the development of spleen tissue in broiler chicks in antigen-stimulated and non-stimulated groups. A total of 225 Ross-308 commercial broiler chicks were used. The chicks were divided into five main groups (age: 1, 4, 7, 10 and 14 days), each containing 45 chicks. Each group was divided into three subgroups which included control, phosphate buffered saline (PBS) and lipopolysaccharide (LPS)-injected. Antigenic stimulation was carried out through the intra-abdominal administration of LPS. Spleen samples were collected separately at 1, 3, 6, 12, and 24h after injections. Tissue sections were stained using triple staining, Gordon and Sweet's silver staining and orsein-Giemsas methods. The development of the stroma and parenchyma of the spleen was studied. It was seen that the peri-ellipsoidal lymphoid tissue (PEL) regions were not developed in one-day-old chicks. In PEL, only a few lymphocytes were observed in four-day-old samples, but lymphocyte clusters were distinguished in seven days old samples. Subcapsular lymphoid tissue (SCL) focuses were detected, unlike those found in the literature. Periarteriolar lymphoid tissue (PAL), perivenous lymphoid tissue (PVL) and SCL had more lymphocyte than PEL. The germinal center (GC) was found to be in draft form beginning from the first day, to be restricted by reticular fibers from the fourth day, and to be completed at the end of two weeks. GC was also thought to be a constant structure of white pulp of the spleen. Granulopoiesis was found most severe in one-day-old chicks. No histological difference was observed between the white and red pulp areas with and without antigenic stimulation. At the end of the research, it was seen that the parts involved in adaptive immunization sites did not complete histological maturation in the spleen of broiler chicks before the age of two weeks.

**Key words:** Broiler chick, post-hatch, spleen development

Geliş Tarihi/Submission Date : 13.03.2018

Kabul Tarihi/Accepted Date : 18.05.2018

\*İlk isim yazarın, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, VTF-14020 numaralı proje ile desteklenmiş olan Yüksek Lisans Tezinin bir kısmından hazırlanmıştır.

#### Giriş

Kanatlı türlerinin bir çoğunda lenf düğümü bulunmadığından dalak sekonder lenfoid organ olarak önemli bir yere sahiptir. Dalak, kuluçka döneminde lenfoid ve

non-lenfoid hücreler arasındaki etkileşim için vazgeçilmez bir mikroçevre sağlayan sekonder lenfoid organ olarak gelişmeye başlar (31). Kuluçkadan sonraki ilk altı hafta boyunca hızlı bir şekilde büyür ve 10. haftada maksimum büyüklüğe ulaşır (18,28).

Dalak parenşimi, beyaz pulpa ve kırmızı pulpadan oluşmaktadır (9). Dalak, kanatlılarda histolojik yapı bakımından memelilerden farklı özelliklere sahiptir. Kollagen ve retiküler iplik içeren ince bir kapsüle sahip olan kanatlı dalağında (28) belirgin trabekül yapısı gözlenmezken (1,9), kırmızı pulpa oranı daha azdır (14), marjinal zone bulunmaz (25) ve kapalı dolaşıma sahiptir (23). Ayrıca lenfoid dokuda bulunan GC kapsülle sarılı olup (28), koyu ve açık bölgeler içermez (34). Kanatlılarda dalak arterinin kolları, bağdokusu çok az olan trabeküllerde ilerler ve pulpaya girince sentral arter olarak devam eder. Sentral arter, ince kas tabakası olan arteriyollere ayrılır, daha sonra arteriyoller kas tabakası bulunmayan penisillar kapillar olarak dallanırlar. Penisillar kapillarlar venöz sinüslerle bağlantı halindedir. Venöz sinüsler toplayıcı venlere açılır, devamında trabeküler venler oluşur ve venöz kan dalaktan ayrılır (28).

Tavuk dalağında beyaz pulpa, arteriyol çevresi lenfoid doku (periarterioler lymphoid tissue/PAL veya peri-arteriyolar lymphoid sheath/ PALS), vena çevresi lenfoid doku (perivenous lymphoid tissue /PVL), elipsoid çevresi lenfoid doku (perielipsoidal lymphoid tissue/PEL veya PELT) ve germinal merkez (germinal center /GC) olmak üzere dört farklı kısım tarafından oluşturulur (24).

PAL, sentral arter çevresinde bulunur ve T lenfositlerden oluşan yoğun bir katman ile az sayıda B lenfositlerden oluşmuştur (22,23,28). PAL'da interdijital dendritik hücreler (interdijital dendritic cells/IDC) T hücreleri arasında dağılmışlardır ve KUL-01<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>dirler (19).

Penisillar kapillarlar elipsoid yapısına katılırlar. Elipsoid, endotel hücreleri kalın bir bazal membran üzerine oturmuş halde bulunan penisillar kapillarlar birlikte çevresindeki retikulum hücrelerinin yani elipsoid ilişkili hücrelerin (elipsoid associated cells /EAC) oluşturduğu yapı olarak tanımlanmaktadır (8,11,26). Elipsoid ilk kez kanatlı dalağında Billroth tarafından keşfedilmiş ve Schweigger-Seidel, bu kısmın filtre aparatı olduğundan bahsetmiştir (8). Olah ve ark. (26) elipsoid yerine Schweigger-Seidel Sheath tanımlamasının daha doğru olacağını ileri sürmektedirler. Elipsoidin hücreleri, dış taraftan kesintili bir kapsülle çevrelenmiştir, bu kısımda bağdoku elemanlarının bulunduğu gözlenmiş ve bu kısma Schweigger-Seidel kapsülü (Capsule of Schweigger-Seidel/ CSS) adı verilmiştir (8,23). PEL, elipsoid çevresi beyaz pulpa (perielipsoidal white pulp/PWP) olarak da tanımlanmaktadır (25,28). PEL, B lenfositlerden oluşan yoğun bir katmandan oluşur (20,22). PEL'in etrafında makrofaj

halkası bulunur (12,19). Elipsoid ilişkili makrofajlar T bağımlı bölgelere göç ederek, antijenleri T lenfositlere sunarlar (13).

Tavuk dalağında GC'lerin pulpa arterinin yakınında, PAL'ın başladığı yerde, pulpa arteri ile penisillar arteriyol arasında, arterlerin çatallanma kısmında yerleştiği bildirilmiştir (7,28). Ogata ve ark. (24) ise PVL'de GC'ye rastladıklarını bildirmişlerdir. Tavuklarda PEL, GC ve plazma hücre hattındaki hücreler, bursa Fabricius (BF) bağımlı bölgelerdir (8,10,12,22). PEL ve GC'de az miktarda T lenfosit bulunduğu da kaydedilmiştir (10). Kırmızı pulpada hem lenfoid hem de non-lenfoid hücreler bulunur (27). Sinüslerde T hücreleri daha baskındır (33).

Tavuklarda adaptif immunité için, sekonder lenfoid doku olarak sindirim sisteminde bulunan GALT (gut associated lymphoid tissue), organ olarak da dalak görev alır. Tavuklarda lenf düğümü olmadığından dalak, immunitenin sağlanmasında önemli bir yer tutmaktadır. Civcivler, immun yeterliliklerini kuluçkadan sonraki dönemde kazanırlar (5). Civcivlerde immun mekanizmaların gelişiminin kontrolü ve güçlendirilmesi amacıyla besleme çalışmaları veya antijen uygulamaları gibi denemeler yapılmaktadır (2,16,30). Civcivlere yapılan aşılama ise doğrudan adaptif immunitenin oluşumunu hedeflemektedir. Dolayısıyla aşılamalara verilen yanıt da immun sistemin gelişimi ile doğru orantılı olmaktadır (20).

Broyerlerin ticari nedenlerle ömrü kısa olduğundan savunma mekanizmalarının gelişimi önemli bir konu oluşturmaktadır. Sunulan çalışmada broyler civcivlerde, kuluçkadan sonraki ilk iki haftalık dönemde, antijenik uyarımla yapılan ve yapılmayan gruplarda dalağın histolojik gelişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Araştırmada materyal olarak toplam 225 adet Ross 308 ticari etlik civciv kullanıldı. Ticari bir işletmeden (Egetav), kuluçkadan yeni çıkmış ve aşılanmamış olarak sağlanan civcivler; Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde, izole bir ortamda barındırıldı. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Bütün prosedür etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi (Etik Kurul Onay Karar No: 2010/106)

İki haftalık süreçte civcivler 1, 4, 7, 10, 14 günlük olmak üzere her biri 45'er adet civciv içeren beş ana gruba ayrıldı. Her grup on beşer hayvan içeren üç alt gruba ayrıldı. Bir alt gruba, dalağın gelişiminde farklılık oluşturabileceği düşünülerek LPS (lipopolisakkarit) uygulandı. Bakteriyel LPS'nin (Purifiye *E.coli* 011:B4 lipopolisakkaridi) fosfat tampon solusyonu (Phosphat Buffer Saline/PBS)'de hazırlanmış solusyonu intra abdominal yolla, 1mg/kg dozda (17,29), bir kez enjekte edildi. İkinci alt gruba (çözgen grubu) aynı miktarda PBS intra abdominal olarak enjekte edildi. Üçüncü alt gruba (kontrol) ise herhangi bir uygulama yapılmadı.

LPS ve PBS uygulanan alt gruplardan, uygulamadan 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra üçer hayvandan dalak örnekleri alındı. Aynı saatlerde, kontrol alt grubundan da üçer hayvandan doku örneği alındı.

#### **Dokuların hazırlanması ve boyama metotları**

Hayvanlar belirtilen zamanlarda dekapitasyon yöntemi ile öldürülerek dalakları çıkarıldı ve 18-24 saat % 10'luk tamponlu nötral formalinde tespit edildi. Tespit edilen dokular, rutin doku takip işleminden sonra parafinde bloklandılar. Parafin bloklardan 60 µm arayla 6 µm kalınlığında seri kesit alındı. Parafin kesitlere, genel dalak histolojisinin incelenmesi amacıyla üçlü boyama yöntemi (3), retikulum ipliklerinin belirlenmesi için Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu (6), elastik iplikler için orcein-Giemsma boyama metodu (4) uygulandı.

#### **Doku kesitlerinin incelenmesi ve değerlendirilmesi**

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Leica DMLB) incelendi. Görüntüler video kamera (Leica DC200) ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Araştırma mikroskobu ve görüntü analiz programı (Lecia Q win standart) kullanılarak, her grubun üçüncü saat örneklerinde, 20'lik objektifte, 0,145 mm<sup>2</sup>lik alanda görülen granülopoezis oranı belirlendi. Bu amaçla, kapsül altından başladıktan sonra bir görüntü alanı arayla, her kesitte toplam beş görüntü alanında ölçüm yapıldı. İnteraktif olarak granülopoetik hücrelerin bulunduğu bölgeler sınırlandırıldı ve kapladıkları alan ölçüldü. Her hayvandan üç adet kesitte toplamda 15 görüntü alanında granülopoetik hücrelerin kapladığı alan belirlendi. Daha sonra 1, 4 ve 7 günlük civcivlerde 0,145 mm<sup>2</sup>de kaydedilen veriler 1 mm<sup>2</sup> alanda olacak şekilde dönüştürülerek istatistiki incelemesi yapıldı. On ve 14 günlük örneklerde granülopoezis görülmediği için değerlendirme yapılmadı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Version 11,5) paket programı kullanıldı. Granülopoezis için, aynı gün içinde gruplar arası farklılıklar ve aynı grup içinde günler arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile farkların önem kontrolü ise Duncan testi ile yapıldı (32).

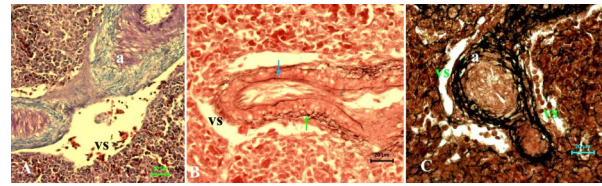
#### **Bulgular**

Broyler civcivlerde ilk iki haftalık dönemde LPS uygulanan, sham kontrol ve kontrol gruplarında dalağın histolojik yapısı stroma ve parenşim açısından incelendi.

Bütün gruplara ait örneklerde, bir günlükten on dört günlüğe doğru fibröz bağdokudan oluşan kapsülün kalınlığının arttığı gözlemlendi. Kapsülde kollagen ipliklerinin yanında, elastik iplik ve retikulum iplikleri de tespit edildi. Elastik iplik yoğunluğunun gittikçe arttığı dikkati çekti. Retikulum ipliklerinin oranının değişmediği gözlemlendi. Kapsülün parenşime yakın kısımlarında daha

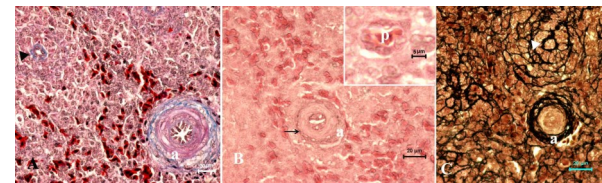
yoğun olmak üzere düz kas hücrelerine rastlandı, ilerleyen günlerde sayılarının arttığı gözlemlendi. Kapsülde arter, vena ve çok sayıda lenf kapilları belirlendi. Organ kapsülünden parenşime doğru düzenli bir trabekül girişine rastlanmadı. Parenşimde trabeküler bağ dokuya, özellikle arterlerin etrafında daha belirgin olarak rastlandı.

Trabeküllerde ve parenşimde bulunan arter ve arteriyol duvarları incelendi. Orta çaplı arterlerin duvarında elastik ipliklerinin oluşturduğu laminalar yanında, retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu dikkati çekti (Şekil 1).



**Şekil 1.** Trabeküler arterin görünümü (A) ve duvarında elastik iplik (B) ve retikulum ipliklerinin (C) organizasyonu. a: Arter, vs: venöz sinus, lamina elastika interna (mavi ok) ve lamina elastika eksterna (yeşil ok). Sırasıyla üçlü boyama, orcein-Giemsma ve Gordon ve Sweet'in gümüşleme metotları

Bir günlük örneklerden itibaren dalak kesitlerinde arteriyollerin duvarında bir miktar düz kas hücrelerinin bulunduğu görüldü. Arteriyollerin dallanarak penisilar kapilları (elipsoid kapillar) oluşturdukları gözlemlendi. Elipsoid kapillarların duvarında düz kas hücrelerinin kalmadığı fakat çok az miktarda bağ doku elemanının varlığı dikkati çekti (Şekil 2A). Arteriyollerin yapısında az miktarda elastik iplik, daha çok oranda retikulum ipliği bulunduğu gözlemlendi (Şekil 2B, C). Penisilar kapillarların etrafında elastik iplik bulunmazken (Şekil 2B) retikulum ipliklerinin varlığını sürdürdüğü dikkati çekti (Şekil 2C).

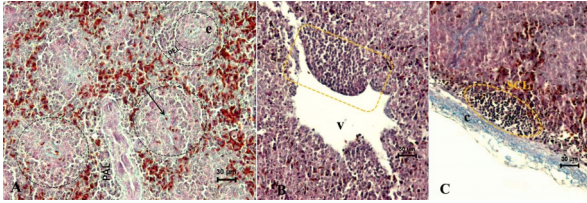


**Şekil 2.** A: Parenşimde arteriyol (a) ve penisilar kapillaların görünümü (ok başı). Üçlü boyama. B: Arteriyol duvarında elastik iplik görünümü (ok) ve penisilar kapillar (p). Orcein-Giemsma Boyama Yöntemi. C: Arteriyol duvarında retikulum ipliklerinin görünümü (a) penisilar kapillar (ok başı). Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu

Histolojik kesitlerde venöz sinuslar, pulpa venleri ve vena trabekularisler ayırt edildi. Venöz sinus görüntülerine kırmızı pulpa kısımlarında, trabeküler arterlerin yakınılarında ve kapsül altında rastlandı. Bir günlükten itibaren, kapsül altında venöz sinusların varlığı dikkati çekti. Venöz sinusların duvarında az miktarda retiku-

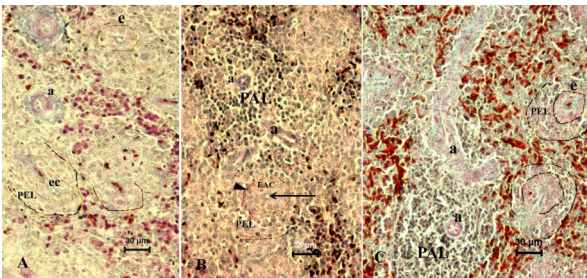
lum ipliği bulunmasına rağmen elastik ipliklere rastlanmadı. Dalak parenşiminde ve trabeküllerde bulunan venalarda az miktarda da olsa elastik iplik görüldü. Retikulum ipliklerinin elastik ipliklere göre daha yoğun olduğu dikkati çekti.

Dalağın beyaz pulpa kısmında PAL, PEL (Şekil 3A), PVL (Şekil 3B) ve GC'nin yanında, kapsülün altında yerleşmiş olan lenfoid doku alanları da (Sub-kapsular lenfoid doku / SCL) (Şekil 3C) gözlemlendi. Beyaz pulpanın gelişimi bu bölgeler göz önüne alınarak incelendi. PAL, PVL ve SCL bir gün üç saatlik örneklerden itibaren görülmeye başlandı. Her üç kısım da başlangıçta taslak halinde görülürken, günler ilerledikçe hücre yoğunluğunun arttığı fark edildi.



**Şekil 3.** Beyaz pulpayı oluşturan kısımların görünümü. Üçlü boyama. **A.** On dört günlük örnekte arteriyol çevresinde lenfoid doku (PAL) ve elipsoid (e) çevresi lenfoid dokunun (PEL) görünümü. Ok: Elipsoid kapilllar. **B.** Dört günlük örnekte vena çevresinde lenfoid dokunun (PVL) görünümü (kesik çizgiyle sınırlanmış alan), vena (v). **C.** On dört günlük örnekte kapsülaltı lenfoid dokunun (SCL) görünümü (kesik çizgiyle sınırlanmış alan), kapsül (c)

Elipsoid kapilllar ile çevrelerindeki EAC'lerin birlikte oluşturdukları ellipsoidler görüldü. Başlangıçta PEL'deki hücrelerin sitoplazmalarının açık renkte ve çekirdeklerinin ökratik olduğu, hücre sınırlarının çok net olmadığı gözlemlendi (Şekil 4A). Dördüncü günden itibaren retikulum hücreleri arasında lenfositler ayrıldı (Şekil 4B).

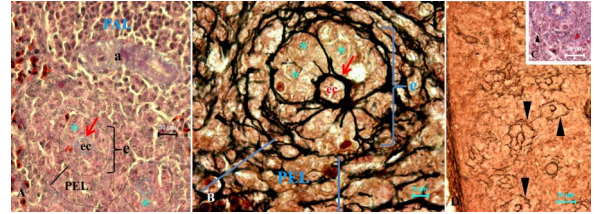


**Şekil 4.** Elipsoid çevresi lenfoid dokuyu (PEL) oluşturan hücrelerin görünümü. Üçlü boyama. **A.** Bir günlük örnekte PEL hücreleri. a: Arteriyol, ec: elipsoid kapilllar, e: elipsoid. **B.** Dört günlük örnekte PEL hücreleri. a: Arteriyol, PAL: arteriyol çevresi lenfoid doku, ok başı: elipsoid, EAC: elipsoid ilişkili hücreler, ok: elipsoid kapilllar. **C.** On dört günlük örnekte PAL ve PEL'in görünümü. a: arteriyol, e: elipsoid

Yedinci günden itibaren PEL bölgesindeki hücrelerin daha belirgin oldukları, lenfositlerin kümelendiği dikkati çekti. Bununla birlikte on dört günlük örneklerde dahi lenfositlerin elipsoidin etrafında tam bir halka oluşturmadıkları gözlemlendi (Şekil 3A, 4C). PAL, PVL ve SCL kısımlarının lenfosit içeriklerinin PEL'den daha yoğun olduğu dikkati çekti. PAL, PEL, SCL ve PVL kısımları açısından, antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan gruplar arasında fark gözlemlendi.

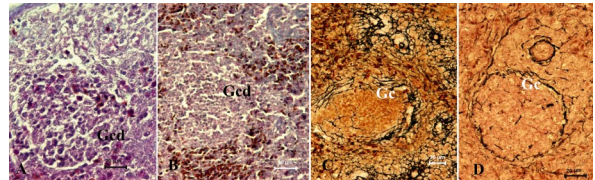
Elipsoid kapilllarını çevreleyen bağdokunun belirgin olduğu (Şekil 5A), kapilları çevreleyen EAC'lerin aralarında retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi (Şekil 5B). Ayrıca EAC'nin dış kısmında yer alan (Şekil 5C) ve kapilllar endotele doğru ince kollar gönderen Schweigger-Seidel kapsülünün oluşumuna retikulum ipliklerinin katkı verdiği görüldü (Şekil 5C, D).

Kapsülsüz olan GC taslakları birinci günden itibaren görülsede retikulum ipliklerinin dört günlükten sonraki örneklerde GC'yi sınırlayan kapsülü oluşturmaya başladığı dikkati çekti. Yedi günden itibaren GC etrafında retikulum ipliklerinin net olarak ayrıldı



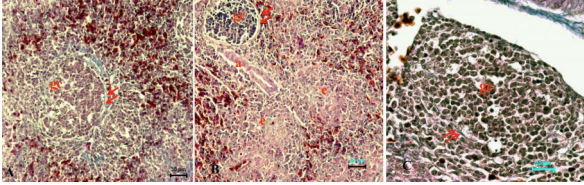
**Şekil 5.A.** Elipsoid (e) ve elipsoid kapilları çevreleyen bağ dokunun görünümü (ok). ec: Elipsoid kapilllar, \*: elipsoid ilişkili hücreler, e: elipsoid, PEL: elipsoid çevresi lenfoid doku, a: arteriyol, PAL: arteriyol çevresi lenfoid doku. Üçlü boyama. **B.** Elipsoid (e) ve çevresinde retiküler ipliklerin görünümü. ec: Elipsoid kapilllar, ok: elipsoid kapilllar çevresinde retikulum ipliği, \*: elipsoid ilişkili hücreler, PEL: elipsoid çevresi lenfoid doku. Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu. **C.** Schweigger-Seidel kapsülünün (CSS) görünümü (ok başı) Üçlü boyama. **D.** CSS'de retikulum ipliklerinin görünümü (ok başları). Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu

görüldü. Devamında on ve on dört günlük civcivlerin dalağında GC'lerin bağ dokudan bir kapsülle çevrelenmiş olduğu ve bu kapsülün retikulum ipliklerini içerdiği (Şekil 6) gözlemlendi.



**Şekil 6.** Germinal merkezin görünümü. **A-B:** Sırasıyla bir ve dört günlük örneklerde germinal merkez taslağının (Gcd) görünümü. Üçlü boyama. **C-D:** Sırasıyla yedi ve on dört günlük örneklerde germinal merkez (Gc) çevresinde retikulum ipliklerinin görünümü. Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu

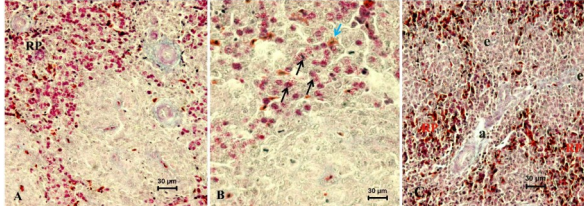
Kapsülle çevrelenmiş GC'ye parenşimin herhangi bir yerinde, arteriyol yakınında, kapsüle yakın veya PVL içinde rastlandı (Şekil 7).



**Şekil 7.** On dört günlük örneklerde parenşimde (A), arteriyol yakınında (B), ve PVL içinde (C) germinal merkezin görünümü. Gc: Germinal merkez, a: arteriyol, e: elipsoid kapillar, çift ok: germinal merkezin kapsülü. Üçlü boyama

GC'in on dört günlük örneklerde en net haliyle görülebildiği dikkati çekti. Antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan gruplar arasında GC açısından farklılık gözlenmedi.

Beyaz pulpa ve trabeküller dışında kalan kısım olan venöz sinuslar ve kırmızı pulpa alanları, kırmızı pulpa olarak değerlendirildi. Venöz sinuslara kapsül altında, trabeküler arterlerin çevresinde, parenşimde rastlandı. Kontrol, PBS ve LPS grupları arasında kırmızı pulpa açısından, histolojik herhangi bir farklılık dikkat çekmedi.



**Şekil 8.** Bir ve on dört günlük örneklerde kırmızı pulpanın görünümü. Üçlü boyama. A. Bir günlük kontrol grubunda 1. saat örneklerinde kırmızı pulpada (RP) granuler hücreler, B. Granülositler (siyah oklar) ve eritrositlerin (mavi ok) görünümü. C. On dört günlük PBS grubunda kırmızı pulpada (RP) eritrositlerin görünümü. a: Arteriyol, e: elipsoid kapillar

Kırmızı pulpa alanlarında, birinci günde en yoğun olmak üzere, granülopoezis gözlemlendi (Şekil 8A, B). Granülopoetik hücreler gittikçe azalarak on günlükten itibaren yerlerini eritrositlere bıraktılar (Şekil 8C).

Granülopoezisin yoğunluğu istatistiksel olarak değerlendirildi. Aynı grup içerisinde günler arası farklara bakıldığında, granülopoezisin yoğunluğunun her üç alt gruba ait, bir günlük örneklerde en fazla olduğu görüldü ( $P<0.001$ ) (Tablo 1).

Granülopoezisin yoğunluğunda dört ve yedinci günlerde büyük bir azalma belirlendi. On günlük örneklerde tek tük rastlanan granülopoetik topluluklar on dördüncü günde gözlenmedi. Bir ve yedinci günlerde uygulama grupları arasındaki granülosit yoğunluğu değerlerinde dalgalanmalar olduğu ve bunun anlamlı olmadığı tespit edildi. Dördüncü günde PBS grubunda granülositlerin daha az olduğu ( $P<0.001$ ) görüldü.

### Tartışma

Sunulan çalışmada, broyler civcivlerin kuluçka sonrası iki haftalık döneminde dalağın histolojik gelişimi incelendi. Dalak kapsülünün içeriği ile ilgili elde edilen bulgular araştırmacıların (1,9,15,18) bildirdikleriyle uyumludur. Bunun yanında; yapılan çalışmada parenşime yakın kısımda daha yoğun olan düz kas hücrelerinin, ilerleyen günlerde sayılarının arttığı gözlenmiştir. Kollagen ipliklerin yanında elastik ipliklerin yoğunluğunun da giderek arttığı fakat retikulum ipliklerinin miktarının değişmediği dikkati çekmiştir.

Araştırmacıların (14,28) bildirdiği şekilde sentral arter, sentral arteriyol ve penisilar kapillarlar ayırt edildi. Duvarlarında elastik iplik, retikulum ipliği ve düz kas hücrelerinin organizasyonları kaydedildi. Broyler civcivlerde (1) ve bildiricilerde (18) sentral arter, arteriyol ve penisilar kapillar duvarında retikulum ipliklerinin varlığı bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada, venöz sinusların duvarında az miktarda retikulum ipliği bulunmasına rağmen elastik ipliklere rastlanmadı. Venalarda az miktarda elastik

**Tablo 1.** Civcivlerin dalağında birim alanda ( $1 \text{ mm}^2$ ) granülopoezis yoğunluğu ( $\text{mm}^2$ )

	1 gün ( $X \pm S_x$ )	4 gün ( $X \pm S_x$ )	7 gün ( $X \pm S_x$ )	P
<b>Kontrol</b>	0.279 <sup>a</sup> ±0.015 (n=40)	0.042 <sup>b,A</sup> ±0.003 (n=45)	0.007 <sup>c</sup> ±0.001 (n=45)	0.000 ***
<b>PBS</b>	0.268 <sup>a</sup> ±0.017 (n=40)	0.021 <sup>b,B</sup> ±0.001 (n=45)	0.013 <sup>b</sup> ±0.002 (n=45)	0.000 ***
<b>LPS</b>	0.244 <sup>a</sup> ±0.013 (n=45)	0.054 <sup>b,A</sup> ±0.007 (n=45)	0.013 <sup>c</sup> ±0.002 (n=45)	0.000 ***
<b>P</b>	0.232 ÖD	0.000 ***	0.073 ÖD	

<sup>a, b, c</sup>: Aynı satırda farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir ( $P<0.05$ );

<sup>A, B</sup>: Aynı sütundaki farklı harf ile gösterilen grup ortalamaları arası farklar önemlidir ( $P<0.05$ );

ÖD: Önemli değil, \*\*\*:  $P<0.001$

iplik, daha fazla miktarda olmak üzere retikulum ipliklerinin olduğu dikkati çekti. Dalakta venöz sinuslar ve venaların duvarında bulunan bağdokusu iplikleri ile ilgili herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

Ogata ve ark. (24) tavuk dalağında beyaz pulpanın; PAL, PVL, PEL ve GC olmak üzere dört farklı kısımdan oluştuğunu bildirmişlerdir. Belirtilen beyaz pulpa kısımlarına ilaveten sunulan araştırmada SCL tanımlandı ve farklı günlerde alınan doku örneklerinde pulpanın gelişimi bu bölgeler göz önüne alınarak incelendi. Yapılan literatür taramasında dalakta SCL tanımlanmasına rastlanamadı.

Ogata ve ark. (24) PAL oluşumunu iki günlükken bir adet civcivde (White Leghorn Babcock B 300), dört günlükten itibaren bütün civcivlerde gözlemişlerdir. Kuluçkadan çıktığı gün bir civcivde lenfosit birikimi olarak PVL gördüklerini, iki günden sonra bütün civcivlerde PVL'nin bulunduğu dikkat çekmişlerdir. Sunulan çalışmada ise PAL, PVL ve SCL bir gün üç saatlik örneklerden itibaren bütün kesitlerde görülme-ye başlamıştır.

Yapılan araştırmada elipsoid ve kapsül (CSS) incelendi. Penisillar kapillerleri oluşturan endotelin ve EAC'in etrafında retikulum ipliklerinin yoğun olarak bulunduğu görüldü. Ayrıca Schweigger-Seidel kapsülünün oluşumuna retikulum ipliklerinin katkı verdiği ayırt edildi. Elde edilen bulgular, araştırmacıların (23,25,26) bulguları ile uyumludur. Gumati ve ark. (8) beç tavuğunda yaptıkları çalışmada ise penisillar endotel çevresinde ve PWP'de kollagen tip III'ün (retikulum ipliğinin) bulunmadığını fakat PAL'da görüldüğünü bildirmişlerdir.

Araştırmacıların (18,22) bildirdiği şekilde, elipsoid çevresindeki PEL hücrelerinin sitoplazmalarının açık renkte ve çekirdeklerinin ökromatik olduğu, hücre sınırlarının çok net olmadığı gözlemlendi. Ogata ve ark. (24) PEL'in lenfosit birikimleri halinde ilk kez altıncı günde görüldüğünü, ikinci haftadan sonra PEL'de bulunan lenfositlerde artış olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mishra ve ark. (21) da gelişimin onuncu gününde beyaz pulpa ve kırmızı pulpanın düzenlenmesinin daha da belirginleştiğini bildirmişlerdir. Mori ve Hoshi (22) iki haftanın sonunda perielipsoidal lenfoid dokunun tanımlanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Sunulan araştırmada dördüncü günden itibaren retikulum hücreleri arasında lenfositler ayırt edildi. Yedinci günden itibaren PEL bölgesindeki hücrelerin daha belirgin oldukları, lenfositlerin kümelenildiği dikkati çekti. Bununla birlikte on dört günlük örneklerde dahi lenfositlerin elipsoidin etrafında tam bir halka oluşturmadıkları gözlemlendi. PAL, PVL ve SCL kısımlarının lenfosit içerdiklerinin PEL'den daha yoğun olduğu dikkati çekti.

Tavuklarda lenfoid dokuda bulunan GC'nin kapsülle sarılı olup (28), koyu ve açık bölgeler içermediği bildirilmiştir (34). Sunulan çalışmada, GC'ler kapsülsüz

olarak taslak halinde bütün gruplarda birinci günden itibaren görülebilirken, etrafındaki retikulum iplikleri dört günlükten sonraki örneklerde görülmeye başlamıştır. Yedi günden itibaren retikulum ipliklerinin net olarak ayırt edilirken, on ve on dört günlük civcivlerde GC'lerin belirgin bir kapsülle çevrelediği dikkati çekmiştir. Yerleşim olarak GC'ye araştırmacıların (7,24,28) bildirdiği şekilde parenşim dokusunun farklı yerlerinde rastlanmıştır. Sunulan çalışmada GC on dört günlük örneklerde en net haliyle görülebilmştir. Nitekim adaptive immunité ile ilgili olarak Mast ve Goddeers (20) broyler civcivlerde antikor oluşturabilecek şekilde immun yeterliliğinin, kuluçka sonrası dönemde 12. günden itibaren oluştuğunu bildirmişlerdir.

Olah ve Vervelde (28) kuşlarda kuluçkadan çıktıktan hemen sonraki 24 saat içerisinde lenfosit ve monosit gelişimini takiben dalakta heterofillerin uzaklaştığını, kuluçka sonrası 48 saat içerisinde lenfositlerin organın dominant hücreleri haline geldiğini belirtmiştir. Sunulan çalışmada ise granülopoezisin yoğunluğunun, her üç alt gruba ait bir günlük örneklerde, en fazla olduğu görüldü ( $P<0.001$ ). Granülopoezisin yoğunluğunda dört ve yedinci günlerde büyük bir azalma belirlendi. Dördüncü günde PBS grubunda granülositlerin daha az olmasının ( $P<0.001$ ), bulaşma olması durumunda granülositleri artırması beklendiğinden, bireysel farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. On günlük örneklerde tek tük rastlanan granülopoetik topluluklar on dördüncü günde gözlenmedi. Alt gruplar arası değerler incelendiğinde antijenik uyarımın granülopoezisi etkilemediği dikkati çekti. Bildiricilerde ise bir-iki günlük örneklerde granülosit adacıklarının kaybolduğu bildirilmiştir (18).

Sonuç olarak, literatürden farklı olmak üzere SCL kısmı tanımlandı. Dalağın, özellikle B lenfositlerin yoğun olduğu PEL bölgelerinin, bir günlük civcivlerde gelişmemiş olduğu gözlemlendi. Dördüncü günde tek tük lenfosit görülürken, ancak yedi günlüklerden itibaren bu bölgelerde lenfosit kümeleri ayırt edildi. On dört günlük örneklerde dahi lenfositlerin elipsoidin etrafında tam bir halka oluşturmadıkları gözlemlendi. PAL, PVL ve SCL kısımlarının lenfosit içerdiklerinin PEL'den daha yoğun olduğu dikkati çekti. GC yapısının bir günlükten itibaren taslak halinde var olduğu, iki haftanın sonunda gelişimini tamamladığı belirlendi. GC'nin PAL ve PEL, PVL ve SCL gibi dalağın beyaz pulpasına ait sabit bir yapı olduğu düşünüldü. Granülopoezis en yoğun olarak bir günlük civcivlerde belirlendi. Onuncu günden itibaren granülopoezis görülmedi. Antijenik uyarım yapılan ve yapılmayan kısımlar arasında beyaz ve kırmızı pulpa açısından histolojik bir farklılık gözlenmedi. Çalışma sonunda, broyler dalağında adaptif immunité görev yapacak kısımların iki haftadan önce histolojik gelişimini tamamlamadığı tespit edildi.

**Kaynaklar**

1. Akter S, Khan MZI, Jahan MR, Karim MR, Islam MR. Histomorphological study of the lymphoid tissues of broiler chickens. *Bangl J Vet Med* 2006; 4(2): 87-92.
2. Barr Shira E, Sklan D, Friedman A. Impaired immune responses in broiler hatchling hindgut following delayed access to feed. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 105(1): 33-45.
3. Crossmon GA. Modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937; 69(1): 33-8.
4. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. *Cellular Pathology and Technique*. Fourth Edition. London: Butterworths, 1985; p: 176.
5. Erf GF, Bottje WG, Bersi TK. CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathology* 1998; 62(4): 339-48.
6. Gordon, H and Sweet, HH. A simple method for the silver impregnation of reticulin. *Am J Pathol* 1936; 12(4): 545.
7. Graczyk S, Kuryszko J, Madej J. Reactivity of spleen germinal centres in immunized and ACTH-treated chickens. *Acta Vet Brno* 2003; 72(4): 523-31.
8. Gumati MK, Magyar A, Nagy N, Kurucz E, Felföldi B, Olah I. Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell Tissue Res* 2003; 312(3): 333-43.
9. Hodges RD. *The Histology of The Fowl*. London: Academic Press, 1974; pp. 221-5.
10. Hoffmann-Fezer G, Rodt H, Götze D, Thierfelder S. Anatomical distribution of T and B lymphocytes identified by immunohistochemistry in the chicken spleen. *Int Arch Allergy Immunol* 1977; 55(1-6): 86-95.
11. Igyarto BZ, Magyar A, Olah I. Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen. *Cell Tissue Res* 2007; 327(1): 83-92.
12. Jeurissen SHM, Claassen E, Janse EM. Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology* 1992; 77(1): 75-80.
13. Jeurissen SHM. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen specific humoral response. *Immunology* 1993; 80(1): 29-33.
14. John JL. The avian spleen: a neglected organ. *Q Rev Biol* 1994; 69(3): 327-51.
15. Kannan TA, Ramesh G, Ushakumari S, Dhinakarraj G, Vairamuthu S. Electron microscopic studies of spleen in chicken (*Gallus domesticus*). *IJAVST* 2015; 4(1): 160-5.
16. Klasing KC. Nutrition and the immune system. *Br Poult Sci* 2007; 48(5): 525-37.
17. Koutsos EA, Klasing KC. The acute phase response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comp Biochem Physiol Part C* 2001; 128(2): 255-63.
18. Liman N, Bayram GK. Structure of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) spleen during pre-and post-hatching periods. *Rev Med Vet* 2011; 162(1): 25-33.
19. Mast J, Goddeeris BM. CD57, a marker for B-cell activation and splenic ellipsoid-associated reticular cells of the chicken. *Cell Tissue Res* 1998; 291(1): 107-15.
20. Mast J, Goddeeris BM. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70(3): 245-56.
21. Mishra UK, Singh GK, Chauhan RS. Histomorphological development of lymphoid organs in chicken: II. spleen and caecum. *J Immunol Immunopathol* 2010; 12(2): 106-13.
22. Mori T, Hoshi H. The periellipsoid lymphoid tissue in chick spleen: A bursa-dependent area of the white pulp. *Tohoku J Exp Med* 1971; 104(2): 201-2.
23. Nagy N, Biro E, Takacs A, Polos M, Magyar A, Olah I. Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev Dynamics* 2005; 232(1): 55-66.
24. Ogata K, Sugimura M, Kudo N. Developmental studies on embryonic and posthatching spleens in chickens with special reference to development of white pulp. *Jpn J Vet Res* 1977; 25(3-4): 83-92.
25. Olah I, Glick B. Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. *Am J Anat* 1982; 165(4): 445-80.
26. Olah I, Kupper A, Ducz P. Schweigger-Seidel sheath or ellipsoid in the spleen of guinea hen. *Acta Biol Hung* 1994; 45(2-4): 375-86.
27. Olah I, Nagy N, Vervelde L. Structure of the avian lymphoid system. Schat KA, Kaspers B, Kaiser P. eds. In: *Avian Immunology*. London: Academic Press, 2012; pp: 24-9.

28. Olah I, Vervelde L. Structure of the avian lymphoid system. Davison F, Kaspers B, Schat K., eds. In: *Avian Immunology*. London: Academic Press, 2008; pp: 42-7.
29. Ozoe A, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of toll-like receptors (TLRs) and TLR4 response to lipopolysaccharide in hen oviduct. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127(3-4): 259-68.
30. Panda AK, Bhanja SK, Sunder GS. Early post hatch nutrition on immune system development and function in broiler chickens. *Worlds Poult Sci J* 2015; 71(2): 285-96.
31. Rajput IR, Wu BB, Li LY, Xu X, Cui ZW, Yu DY, Li WF. Establishment of optimal culturing method and biological activity analysis of chicken bone marrow dendritic cells using Chi-rGM-CSF. *IJAB* 2013; 15: 401-9.
32. Tekin ME. Örneklerle Bilgisayarda İstatistik. Konya: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, 2003; pp: 65-80.
33. Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E, Chen CL, Ratcliffe MJ, Davison TF, Young JR. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154 (9): 4485-94.
34. Yasuda M, Taura Y, Yokomizo Y, Ekino S. A comparative study of germinal center: fowls and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21(3): 179-89.