

## GİRİŞ

Son yıllarda kanatlı orijinli beyaz et ve et ürünlerinin tüketimi ülkemizde oldukça artmıştır. Bunun sebebi olarak fiyatının uygunluğu, yıl boyunca tüketilme imkanının bulunması ve kırmızı et ve et ürünlerine göre kalp ve damar sağlığı açısından daha güvenli olması gösterilebilir. Ayrıca, ilk çıktığı 1987 yılında sadece İngiltere’de hayvan ve insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturan ve ardından hayvan hareketleri ve hasta hayvanlardan elde edilen et ve kemik unu gibi yem katkılarının diğer ruminantların beslenmesinde kullanılmasıyla küresel önem kazanan Deli Dana (Bovine Spongiform Encephalopathy-BSE) Hastalığı da tavuk etine olan talebin artışında etkin bir rol almıştır. Ülkemizde artan talebin bir sonucu olarak 1990’lı yıllarda 4 kg olan kişi başına tavuk eti tüketimi, 2000’li yıllarda 12 kg’a kadar çıkmıştır (1). Tarım Bakanlığının son verilerine göre memleketimizde beyaz et üretimi 1991 yılında 216 bin ton civarında iken bu rakam 2002 yılında 700 bin tona ulaşmıştır (2).

Artan beyaz et talebinin karşılanması için tavukçuluk sektöründe gerek teknolojik gerekse hayvan yetiştirmede önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Et tipi tavuklar (broyler) genetik olarak iyileştirilerek, daha kısa zamanda büyüme ve tüketilen yemi daha verimli olarak kas kitlesine çevirme yönünde seleksiyona zorlanmışlardır. Eş zamanlı olarak yürütülen bakım ve besleme şartlarındaki iyileştirmelerde bu seleksiyona yardımcı öğeler olarak kullanılmıştır. Yapılan bu tek yönlü genetik çalışmalar ve çevresel değişiklikler beraberinde kanatlı sektöründe sık karşılaşılan “Ani Ölüm Sendromu”, “Tibial Diskondroplazi (TD)” ve “Pulmoner Hipertansiyon Sendromuna bağlı Asites” gibi çok sayıda problemi gündeme getirmiştir (3, 4).

Asites, hızlı büyüyen et tipi tavuklarda (broyler) görülen, sağ ventriküler hipertrofi ve karın boşluğunda sıvı birikimi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (4). Hastalığı ifade etmek için alimenter toksemi, toksik hepatit, toksik lipidozis, tavuk ödem hastalığı, endoteliozis, hidroprikardiyal hastalık, myokarditis, konjestif kalp yetmezliği, toksik kalp hastalığı ve yüksek rakım hastalığı gibi ifadeler de kullanılmıştır (5). Hastalık bütün dünyada yaygındır. Maxwell ve Robertson (6) dünyadaki insidensin % 4,2 olduğunu ve bunun da dünya çapında yaklaşık olarak yıllık 1 milyar Amerikan Doları civarında ekonomik kayba neden olduğunu bildirmişlerdir.

Etiyolojisinde birçok sebebin rol oynadığı asites metabolik bir bozukluk olup sadece broylerlerde görülür. Genetik seleksiyon sonucu, süratle artan kas kitlesinin ihtiyaç duyduğu oksijen talebinin, kas kitlesinin gelişim hızına ayak uyduramayan kardiyovasküler

sistem tarafından karşılanamaması (hipoksi) en önemli sebep olarak kabul edilir (7–11). Hastalığın oluşumunda, yüksek rakım (3, 6, 7, 11- 13), broylerlerin beslenmesinde kullanılan yüksek enerjili yemler, yem alımına bağlı olarak artan metabolik oksijen ihtiyacı (4, 14), soğuk stresi (5, 12, 13, 15–17), kümeslerdeki sürekli ışık uygulaması (13, 15, 18), yemin pelet şeklinde olması (13), metrekaareye konan hayvan sayısı (6, 13), su ve yemdeki sodyum miktarının fazlalığı (19–22), dioksin maddesinin yeme fazla miktarda konması (3, 4), temizlikte kullanılan formaldehit ve dezenfektanlar ile yeme katılan furazolidon ve monensin gibi ilaçların yüksek dozu (4, 23), bazı enfeksiyöz etkenler (3, 5, 12) ve kardiyak problemler asitesin oluşmasında rol oynayan diğer faktörlerdir (4, 9, 24). Hastalık erkek hayvanlarda (15, 23, 25) ve göğüs bölgesindeki kas kitlesinin gelişiminin fazla olduğu ırklarda (25) daha fazla görülmektedir.

Klinik olarak hastalık saha koşullarında genellikle yumurta çıkışını takiben 3. haftadan itibaren görülür (14) ve etkilenen hayvanlarda gelişme geriliği, solunum güçlüğü ve asites sıvısı nedeni ile gergin karın duvarı en önemli belirtilerdir (3–5, 26). Nekropsi bulguları arasında akciğer dokusunun şiddetli konjesyone ve ödemli olduğu bildirilmiştir (11, 22, 23). Hastalığın akut formunda klinik bulgular şekillenmeksizin hayvanların solunum güçlüğü ve şiddetli akciğer ödemi nedeniyle öldükleri bilinir (11).

MMP'ler (matriks metalloproteinazlar) çinko taşıyan endopeptidazlardır (27). Şu ana kadar değişik yöntemler kullanılarak MMP ailesinin 23 farklı üyesi ortaya konmuştur (28). Fibroblastlar, kondrositler, epitel hücreleri, damar endotel hücreleri (29–31) astrositler, mikrogliyalı (30), plöral mezotel hücreleri (32), T hücreleri (33), monositler, makrofajlar, B hücreleri, plazma hücreleri (34) ve aktive olmuş nötrofiller (31, 35) tarafından sentezlenirler. Ayrıca memeli nötrofil lökositlerin kanatlılardaki karşılığı olan heterofil lökositlerde de bu enzimlerin varlığı gösterilmiştir (29). Et tipi ve yumurta tipi tavuklarda; beyin, kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek dokusunda, bu enzimlerin ve bu enzimlere ait doku inhibitörlerinin varlığı ve yerleşimleri immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (22). Bu ailenin stromelizin, kollajenaz ve jelatinaz gibi üyeleri embriyonik büyüme, yara iyileşmesi ve anjiogenez gibi fizyolojik durumlarda önemli roller üstlenirler (27). Ayrıca enzimlerin tümör metastazları (36–38), kan damarlarındaki bazal membran hasarına bağlı olarak şekillenen beyin kanaması ve beyin ödemi gibi patolojik olaylarda da etkili oldukları gösterilmiştir (39, 40). Kanatlılarda TD sendromunun oluşumunda matriks yapım ve yıkımı ile yeniden şekillendirilmesinde MMP aktivitesindeki değişiklikler incelenmiştir (29). Kesin olarak MMP'lerin nasıl stimule edildiği bilinmemektedir. Ancak, hücre yüzeyine etkiyen kimyasal maddelerin, sıcak şoku gibi fiziksel etkenlerin,

sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin, viral transformasyonun, onkojenlerin, östrojen gibi hormonların etkili olduğu bildirilmiştir (27). MMP'lerden MMP-2 ve MMP-9 çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen beyin ödemi sırasında serumda ve beyin dokusunda artış göstermektedir (30, 40). Bunlardan her ikisi de bazal membranın yapısında bulunan kollajen tip IV ve laminin gibi proteinleri parçalayıcı özelliğe sahiptir (27). MMP'lerin pulmoner kapillar bazal membranı ve tip IV kollajenden zengin ESM (ekstrasellüler matriks)'i parçalayıp, permeabilityyi artırarak ödeme yol açtığı bildirilmiştir (35). Özyiğit ve arkadaşları (22) tuz ile indüklenen asites modelinde broylerlerde, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 enzimlerinde meydana gelen değişikliklerin kan damarlarında permeabilite artışına yol açarak hastalığın patojenezinde rol oynayabileceklerini işaret etmişlerdir. Ayrıca asitesli broylerlerin kalplerinde MMP-2 düzeyinin sağlıklı broyler ve yumurtacı tavuklara göre daha yüksek bulunduğu Olkowski ve arkadaşları (41) tarafından gösterilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalar hipoksinin MMP ve kollajen metabolizması üzerinde etkileri olduğunu göstermiştir (42-44). Asites sendromunun temelinde de, hızla büyüyen doku ve organların talep ettikleri oksijenin, kardiyovasküler sistem tarafından temin edilememesine bağlı hipoksi olduğu düşünüldüğünde, MMP'lerin hipoksi ile etkileşimlerinin sendromun patojenezinde etkili olup olamayacağı sorusu akla gelir. İskemik böbrek hasarı sırasında, deneysel olarak oluşturulan hipoksi ve anoksinin böbrek dokusunda yol açtığı lezyonlar ve şekillenen doku ödeminin patojenezinde lokal olarak artan MMP'lerin kan damarı bazal membran tahribatı ve endoteller arası bağlantıları hasara uğratarak katkıda buldukları gösterilmiştir (44). Gelişmeyi hızlandırdığı bilinen monensinin broyler rasyonlarına katılmasının TD (29) ve asites sendromuna (45) yol açtığı bildirilmiştir. Membran tipteki matriks metalloproteinazları aktive ettiği bilinen monensinin memelilerde yol açtığı zehirlenmelerde ölümün sebebi, şekillenen sistemik hipoksi ve şiddetli akciğer ödemidir (46-48). Ayrıca yapılan *in vitro* bir çalışmada monensinin hücrelerde MMP sentezini tetiklediği gösterilmiştir (34). Metastaz kabiliyeti yüksek olan solid tümörlerde, kanser hücrelerinin ESM'i parçalayarak kan damarlarına ya da lenf damarlarına ulaştıkları, bu damarların bazal membranı parçalayarak sistemik dolaşıma dahil oldukları ve uzak organlara metastaz yaptıkları ortaya konmuştur (37, 38, 49). *In vitro* koşullarda da birçok kanser tipinde enzimlerin hücrelerin metastaz potansiyelinde etkili oldukları gösterilmiştir (43).

Broylelerde, hipoksinin sendromun oluşumundaki rolünü inceleyebilmek için bazı araştırıcılar kümesleri oksijen basıncının düşük olduğu yüksek rakımlı bölgelerde kurmuşlar ya da hipoksik odalarda civcivleri yetiştirme yoluna gitmişlerdir (13, 50).

Çeşitli araştırmalarda, sendromu laboratuvar şartlarında deneysel olarak oluşturulabilmek için broyle tavukların içme suyuna belirli oranlarda tuz (NaCl) katılmıştır (19, 20, 22). Tuz ile tetiklenen asites modellerinde, tavuklarda gözlenen makroskobik ve mikroskobik lezyonların saha şartlarında ve yüksek rakımda gözlenen asites olgularındaki lezyonlar ile uyumlu olduğu da bildirilmiştir (19, 22, 51). *In vivo ve in vitro* koşullarda, çeşitli hastalıkların patojenezine yönelik yapılan çalışmalarda NaCl ve MMP'ler arasındaki ilişkiyi vurgulayan çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, uygulanan tuzun dozuna bağlı olarak MMP'lerin sentez ve salınmasında önemli artışların olduğu gösterilmiştir (52, 53). Yine NaCl ile oluşturulmuş hiperozmotik stresin, MMP gen ekspresyonuna ve bu enzimlerin salınmasına yol açtığı bilinen çeşitli proinflamatuvar sitokinleri stimüle ettiği *in vitro* olarak gösterilmiştir (54).

şu ana kadar yapılan çalışmalarda sendromunun etiyo-patojenezinde hipoksi ve kardiyovasküler sistem ön plana ıkrsa da kesin neden tam olarak ortaya konamamıştır. Anabilim Dalımızda tamamlanan bir doktora tezinde (62) ve bu tezin ürünü olan bilimsel makalede (22) MMP'lerin broylelerde asites sendromunun oluşumundaki rolleri *in vivo* olarak sorgulanmış ve enzimlerin kan damarı bazal membranlarında hasar oluşturarak sendromun patojenezine katkıda bulunabilecekleri gösterilmiştir. Sunulan bu çalışmada da, asites sendromunun akut formunda, klinik belirtiler oluşmadan, şiddetli akciğer ödemeine bağlı olarak şekillenen tavuk ölümlerinde, akciğer fibroblastları tarafından salgılanan MMP'lerin ve TIMP'lerin akciğer ödemi oluşumuna katkılarının olup olmadığı *in vitro* olarak test edilmiştir. Bu amaçla broyle ve yumurtacı tavuklardan, primer olarak akciğer dokusundan izole edilen fibroblastlar hipoksik ve hiperozmotik strese maruz bırakılarak, hücrelerdeki MMP-2, -9 ve TIMP-1,-2 enzim aktiviteleri immunositokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

## GENEL BİLGİLER

### Tanım

Asites, hızlı büyüyen et tipi tavuklarda (broyler) görülen sağ ventriküler hipertrofi ve karın boşluğunda sıvı birikimi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (3, 4). Bu hastalığı belirtmek için alimenter toksemi, myokarditis, tavuk ödem hastalığı, endoteliozis, hidroperikardiyal hastalık, ödem, toksik hepatit, sulu karın, kanatlı ödemi, konjestif kalp yetmezliği, toksik kalp hastalığı, toksik lipidozis ve yüksek rakım hastalığı gibi ifadeler kullanılmıştır (5). Dünya genelinde gözlenebilen bu sendrom her yıl artan rakamlarla ve ekonomik kayıplarla kanatlı yetiştiriciliğinde önemini korumaktadır. İyi yönetilen kümeslerde bile görülme sıklığı az olarak rapor edilse de bu rakam % 4,7' ye ulaşabilmektedir. Dünya genelinde, bir yıl içinde, anaç tavuklar hesaba katılmaksızın, insan tüketimi için 40 milyar broyler tavuk yetiştirildiği düşünüldüğünde % 4,7 rakamının hiç de küçümsenemeyecek olduğu ortadadır (6).

### Etiyoloji

Etiyolojik açıdan sendromun oluşumunda çok sayıda neden söz konusu olsa da, primer etkinin hipoksi tarafından oluşturulduğu, gerek oksijen basıncının düşük olduğu yüksek rakıma sahip bölgelerdeki kümeslerde sendromun görülme sıklığının fazlalığı ve gerekse normal rakımlarda deneysel olarak sendromun hipobarik (düşük oksijen basıncına sahip) odalarda kolayca oluşturulabilmesi ile söylenebilir.

**İrk-Hat-Cinsiyet:** Hastalık et tipi tavuklarda görülmektedir. Belli ırklarda genetik seleksiyona tabi tutularak artırılmaya çalışılan kas kitlesi ve bu artan kas kitlesinin metabolik olarak talep ettiği yüksek oksijenin, kardiyovasküler sistem tarafından tam olarak sağlanamaması, hayvanlarda sendroma zemin oluşturmaktadır (4, 13). Hunton (55), broylerlerin 1970'li yıllarda ortalama olarak günde 50 gram canlı ağırlık kazandıkları 1990'lı yıllarda ise bu artışın günde 65 grama çıktığını, başka bir deyişle yüzyılın başında et tipi broylerlerin kesim ağırlığına ulaşması için 84 gün gerekirken bu sürenin 47 gün kısaldığını bildirmiştir. Sendrom yumurtacı ırk hatlarında görülmemektedir (4, 19, 20). Broiler hatları arasında da hızlı gelişen ve daha fazla göğüs kasına sahip olanların sendroma daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (15, 25). Horozların dişilere oranla daha fazla yem tüketmeleri ve tükettikleri yemden faydalanmak için daha fazla oksijene ihtiyaç duymaları cinsiyetin sendrom oluşumunda predispoze kılıcı rolü olarak düşünülmüştür (6,

15). Bu tez çalışmasında da erkek hayvanlar tercih edilmiş ve bu hayvanlardan hücre izolasyonları yapılmıştır.

**Yükseklik ve Oksijen İhtiyacı:** Sendromun ilk olarak yüksek rakımlı bölgelerde kurulan kümeslerde görülmesi ve halen de bu bölgelerde oluşma sıklığının deniz seviyesine göre fazla olması sendromun patojenezinde düşük oksijen basıncı yani hipoksinin önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir (11, 13). Benzer şekilde düşük oksijen basıncı ortam özelliği gösterebilen hipobarik odaların, sendromun deneysel olarak oluşturulmasında başarı ile kullanılması da hipoksinin önemini vurgulamaktadır (50, 56). Witzel ve arkadaşları (50), yaptıkları deneysel bir çalışmada 2896 metredeki oksijen basıncına karşı gelen hipobarik ortamda hayvanların % 80'inde asites sendromunun oluştuğunu göstermişlerdir. Broiler tavuklarda hipoksi oluşumunu sağlamak için, ekstrapulmoner bronş (57, 58) ve pulmoner artere (59) klamp koyulması gibi deneysel çalışmalar başarılı sonuçlar vermiş ve hayvanlarda önce hipoksi ardından da asites oluşumu gözlenmiştir. Böylece hipoksinin sendromun patojenezinde ne derece önemli olduğu gösterilmiştir. Hassanzadeh ve arkadaşları (60), yaptıkları bir çalışmada hızlı büyüyen broiler tavuklar ile yumurtacı tavukların yumurtadan çıkım gününden itibaren broilerlerin kesim ağırlıklarına ulaştıkları 6. haftaya kadar olan dönemde belli aralıklarla kazandıkları vücut ağırlıkları ile hayvanların sahip olduğu, kalp ve akciğer dokularının ağırlık ve hacimlerini ölçmüşlerdir. Bu inceleme neticesinde yumurtacı tavukların 42. gündeki vücut ağırlıklarının, yumurtadan çıkım günündeki vücut ağırlıklarının 13 katı olduğunu, buna karşın aynı rakamın broiler tavuklarda 52 kata ulaştığını bulmuşlar ve broiler tavuklarda artan kas kitlesi (vücut ağırlığı) ile akciğer ve kalp dokusunun gelişimi arasındaki dengesizliğe işaret etmişlerdir. Bunun sonucu olarak broiler tavuklarda çıkım günündeki kalp ve akciğer ağırlıkları ile bu organların sahip oldukları hacimlerin vücut ağırlığına göre, yumurtacı tavuklardakinin aksine negatif yönde azaldığını ve bu durumun hayvanları hipoksiye sürüklediğini göstermişlerdir.

Yumurtacı tavuklar broilerlerden farklı olarak yüksek rakıma daha dayanıklıdır ve 2500 metre yükseklikte bile hemoglobini (Hb) oksijen ile tam olarak doyurulabilirler (4). Bazı yazarlar (13, 61), kuluçkadan çıkış sırasındaki oksijen azlığının asites tetikleyebileceğini bildirmişlerdir.

### **Tuz (Sodyum Klorür, NaCl)**

Deneysel olarak içme suyuna değişik oranlarda ilave edilen tuz broyler tavuklarda sendromu oluşturabilmek için kullanılmıştır (19, 20, 22). İçme suyu ile alınan yüksek miktardaki tuzun dokular ile plazma arasında ozmotik basınç farklılığı oluşturarak asitese yol açtığı düşünülmüş ancak son yapılan çalışmalar ile tuzun pulmoner hipertansiyona (PH) sebep olarak da asites oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (4, 19, 20, 22). Tuz ile oluşturulan asites modellerinde gözlenen makroskobik ve mikroskobik lezyonların, yüksek rakımda ya da doğal olarak meydana gelen asites olgularında şekillenen lezyonlar ile önemli benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir (20, 22). Kanatlılar arasında içme suyu ile verilen tuza karşı duyarlılıkta farklılıklar bildirilmiştir. İçme sularına sırasıyla % 0,5 ve % 0,6 oranında ilave edilen tuzun broyler tavuklarda asitese yol açtığı ancak yumurtacı tavuklarda asitesin şekillenmediği rapor edilmiştir (19, 20, 22).

### **Matriks Metalloproteinazlar (MMP) ve MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP)**

MMP'ler ekstraselüler matriksi parçalayan endopeptidazlardır (27). Fizyolojik ve patolojik birçok olay sırasında bu enzimlerin ve inhibitörlerinin rolleri incelenmiştir. Angiyogenesis, organogenesis, ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda, tümör metastazları ve değişik organlarda şekillenen ödem oluşumu gibi patolojik durumlarda enzimlerin rolleri özellikle kan damarlarının bütünlüğünün bozulmasına yönelik incelenmiştir (27, 37, 39). Enzimlerin broyler ve yumurtacı tavuklara ait, beyin, akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki yerleşimi immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (22, 62). Broyler asites sendromunun patojenezine yönelik yapılan çalışmalarda, tuz ile oluşturulan asites modelinde, MMP'lerin ve onların doku inhibitörleri olan TIMP'lerin rolleri *in vivo* olarak ve immunohistokimyal boyama tekniği kullanılarak sorgulanmıştır. Asitese sahip olan broylerlerin kalp dokularındaki MMP-2'nin sağlıklı broyler ve yumurtacı tavuklardan daha yüksek olduğu ve sendrom sırasında kalpte meydana gelen değişikliklerin oluşumunda bu enzimin rolünün olabileceği zimografik olarak gösterilmiştir (41). Özyiğit ve arkadaşları (22) broyler tavukların içme suyuna tuz ilave ederek deneysel olarak oluşturdukları asites modelinde MMP'lerin ve TIMP'lerin aktivitelerinde meydana gelen değişikliklerin kapillar damarlarda bazal membran hasarı yaparak asites oluşumuna katkıda bulunabileceklerini immunohistokimyasal olarak ileri sürmüşlerdir.

**Monensin:** Rasyonlarda yüksek dozda monensin kullanımının gerek memelilerde (46, 47) ve gerekse kanatlılarda (63) kardiyovasküler sistemi etkilediği bilinmektedir. Memelilerde monensin zehirlenmeleri sonucunda hipoksi, akciğer ödemi, hidrotoraks ve asites oluşmaktadır (46, 47). Hanrahan ve arkadaşları (63), yüksek dozlarda monensin verilen kanatlılarda konjesyon, miyokardiyal genişleme ve hidroperikardiyum görmüşlerdir. *In vitro* olarak yapılan bazı çalışmalarda monensinin farklı hücre tiplerinde MMP'ler üzerindeki aktive edici etkilerinden söz edilmiştir (34)

Kısaca açıklanan bu primer etiyolojik etmenlerin yanında, soğuk havanın (4), diyetdeki metabolik enerji fazlalığının (13, 14), kümeslerdeki aydınlatma sürelerinin (18), tiroid hormonlarının (64, 65), yem içerisine dioksin katılmasının (66) ve bazı enfeksiyöz ajanların (4, 12) ve primer kalp ya da kalp kapağı hastalıklarının (9, 24) asites oluşumunda etkili oldukları gösterilmiştir.

### **Patogenez**

Broyler tavuklarda asitesin oluşumundaki temel mekanizma pulmoner hipertansiyona bağlı olarak şekillenen kalpteki sağ ventriküler yetmezlik ve bunu takip eden kronik pasif konjesyondur. Pulmoner hipertansiyon ile sağ kalpteki büyüme arasında doğrudan bir ilişki olduğu ortaya konmuştur (4, 19, 21). Sağlıklı bir broylerde sağ ventrikül ağırlığının toplam ventrikül ağırlığına oranının 0,25'ten küçük olması gerektiği, bu oranın aşıldığı durumlarda pulmoner hipertansiyon ve buna bağlı ventriküler hipertrofi den bahsedilebileceği vurgulanmıştır. Pulmoner hipertansiyonun şekillenmesinde hipoksi önemli bir rol oynar (4, 21). Solunan havadaki oksijen azlığı yani hipoksi ve hayvanlarda hipoksi oluşumuna katkıda bulunabilecek başlıca faktörler Tablo-1'de özetlenmeye çalışılmıştır.

**Tablo-1** Broyler tavuklarda asitesin nedenleri ve hipoksi oluşumuna katkıları.

	Hipoksi
Hızlı büyüme	Artan kas kitlesinin artan oksijen talebi (3)
Yüksek rakım	Solunan havadaki oksijen azlığı (4)
Yem ve İçme suyundaki tuz	Eritrosit deformabilitesi, fragilitede artış, elastisite kaybı ve kapillar damarlardan kan akımının zorlanması ve dolaylı olarak hipoksi oluşumu (19)
Soğuk stresi	Daha fazla yem tüketimi ve tüketilen yemin metabolize edilmesi için artan oksijen talebi (4)
Anemi	Hızla büyüyen dokuların ihtiyaç duyduğu oksijeni karşılayamama (12)
Yüksek enerjili yemler	Metabolizmaları için artan oksijen talebi (14)
Hipertiroidizm	Artan metabolik faaliyetler ve oksijen talebi (67)
Kümes ışıklandırma programı	Yem tüketiminde ve metabolik oksijen ihtiyacında artış (18)
Primer kalp kapağı ve kalp hastalıkları	Büyük ve küçük dolaşımdaki aksamalar (9)



Pulmoner hipertansiyon sırasında, akciğer dokusuna ait kapillar damarlarda ve pulmoner arterde artan basınç kan dolaşımında güçlükler sebeptir. Kalp, akciğere kan pompalayabilmek için kasılma gücünü ve atım sayısını artırır, yetişemediği durumlarda ise sağ ventrikülde hipertrofi ve dilatasyon şekillenir. Sağ ventriküler yetmezliğe bağlı olarak meydana gelen kan dinamiğindeki basınç dengesizliği karaciğer ve venöz sistemdeki basıncı artırır (4, 19, 20, 68). Venöz kan basıncındaki yükselme karaciğer konjesyonuna ve hepatik lenf akışında artışa neden olur. Venöz dolaşımdaki durgunluktan dolayı lenf sıvısının hepsi uzaklaştırılmaz ve proteinden zengin olan bu sıvı lenfatik pleksusların yoğun olduğu karaciğerin kapsülünden karın boşluğuna sızarak asitese neden olur (68). Klinik olarak asitesli broylerlerde lokal ve sistemik hipoksi halini belgeleyecek tarzda solunum güçlüğü, baş ve vücut derisinde siyanoz ve deri altı venalarda dolgunluk gözlenir. Hayvanlarda solunum sayısı oldukça artar; hatta hayvanlar yakalanmaya çalışıldıklarında ölebilirler. Tipik olarak, karın boşluğu şekillenen asites sıvısından dolayı oldukça gergindir. Nekropsi sırasında şiddetli akciğer ödemi ve konjesyonu dikkati çeker. Histopatolojik olarak da akciğer dokusunda intersitisyel yaygın ödem, hava kapillarlarında genişleme ve kan damarlarında dolgunluk dikkat çekicidir (4, 11, 14, 22, 51)

Dünyada artan beyaz et talebinin karşılanması için tavukçuluk sektöründe gerek teknolojik gerekse hayvan yetiştirmede önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Et tipi tavuklar genetik olarak iyileştirilerek, daha kısa zamanda büyüme ve tüketilen yemi daha verimli bir şekilde kas kitlesine çevirme yönünde seleksiyona zorlanmışlardır. Bu seleksiyona eş zamanlı olarak yürütülen bakım ve besleme şartlarındaki iyileştirmelere rağmen seleksiyona ayak uyduramayan kardiyovasküler sistem ve kemik doku ile ilgili “Ani Ölüm Sendromu”, “Tibial Diskondroplazi (TD)” ve “Pulmoner Hipertansiyon Sendromuna bağlı Asites” gibi kanatlı sektöründe sık karşılaşılan problemler ortaya çıkmıştır (3, 4).

Kemik anormalliklerindeki matriks yapım ve yıkımı ile yeniden şekillendirilmesinde, yeni damar oluşumlarında, organların şekillenmesi gibi durumlarda ve kötü huylu tümörlerin metastazları sırasında, kan damarlarının bazal membranlarının yıkınlanmasında önemli yer tutan matriks proteinleri ve bunların metabolizmasında rol oynayan MMP’ler asites sendromu gibi damarlardan sıvı çıkışının önemli olduğu bir durumda önem kazanmaktadır (22, 27, 29).

MMP’ler fizyolojik ve patolojik birçok olayda görev alan enzimlerdir. Normal hücreler ve tümör hücreleri tarafından sentezlenen (22, 62, 69, 70), çinko ve kalsiyum (71) taşıyan endopeptidazlar ailesinden olup, ESM’in parçalanması ve yeniden modellenmesinden (remodelling) sorumludurlar (27, 32, 72). Memelilerde ve kanatlılarda enzimlerin değişik dokulardaki lokalizasyonu farklı metotlarla gösterilmiştir (22, 62, 73, 74).

ESM, kollajen, proteoglikan, glikozaminoglikan, glikoprotein (fibronektin, kondronektin, laminin) ve bazı dokularda elastin içeren kompleks bir yapıdır (27, 72, 75). Pratik olarak ESM çözülmeyen fibröz faz (kollajen, fibronektin, elastin ve glikoproteinler) ve çözülen jel faz (protein polisakkarit veya proteoglikanlar) olmak üzere iki kısma ayrılabilir. ESM içerisinde yer alan bu maddeler matriks içerisine gömülmüş fibroblastlar tarafından sentezlenir. Epitelial, endotelial ve kas hücreleri özelleşmiş bir ESM olan bazal lamina (basement membrane) tarafından ESM’den ayrılır (76). ESM hücrelerin göçü, çoğalması, farklılaşması (37) ve damarların oluşması süresince bağ dokunun yeniden modellenmesinde (29) önemli rol oynar. MMP’ler ESM’i oluşturan çapraz bağlı, erimeyen, farklı kollajen tiplerini, elastini, laminini ve proteoglikanları parçalarlar (27, 41, 71, 77). Bu yüzden embriyo morfogenezisi, blastosist implantasyonu, yeni damar oluşumu (angiogenesis)(78), dokunun yeniden modellenmesi, tümör invazyonu ve metastazı (27, 30, 36–38, 41, 79, 80) yara iyileşmesi (27, 81, 82), periodontal hastalıklar, yangısal durumlar (27, 40) gibi birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev almaktadırlar. Mannello

ve arkadaşları (69) patolojik bozukluklarda aktif enzim ile inhibitörler (TIMP) arasındaki dengelerin değiştiğini bildirmişlerdir.

MMP ailesi 23 farklı izoformdan oluşur ve birbirleri ile önemli yapısal benzerliğe sahiptirler (83). Bununla beraber her MMP, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda fonksiyonel olarak farklılık gösterir (32). Bundan dolayı MMP'ler 4 grupta sınıflandırılırlar: 1- Kollajenazlar: Bunlar kollajen fibrillerini spesifik bir bölgeden parçalarlar. Oluşan bu yeni parçalara diğer MMP gruplarından jelatinazlar etki ederler. 2- Jelatinazlar: Bunlar Jelatinaz A (72 kDa Collagenase IV, MMP-2) ve Jelatinaz B (92 kDa Collagenase IV, MMP-9)'dir. 3- Stromelisin ve 4- Membran tip MMP (MT-MMP)'lerdir (72, 80, 84, 85). Bu enzimler şu özellikleri taşırlar:

- 1) Endopeptidazdırlar (32, 80).
- 2) Kalsiyum (31) ve çinko (27, 37, 71, 72, 80) ile bağlıdırlar ve şelatör ajanlarca (70) inhibe edilirler.
- 3) Bütün MMP'ler propeptid ve katalitik alan olmak üzere iki bölgeye sahiptirler. Bu katalitik bölge aktivitesi için çinkoya ihtiyaç duyarlar (27, 72).
- 4) Nötral pH'da aktivite gösterirler (34, 70 ).
- 5) Latent formda (Pro-MMP) veya inaktif olarak ESM'e salgılanırlar ve fizyolojik olarak yaklaşık 10 kDa'luk bir peptidin ayrılmasından sonra aktive edilebilirler (27, 34, 69, 72). Aktivasyonları onkojenler, tümör promotörleri, büyüme faktörleri, sitokinler, nötrofil ve monositlerden salgılanan serin proteaz (33) ve reaktif oksijen metabolitleri (HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>) tarafından "Sistein Anahtar Mekanizması" ile tetiklenir (27, 35, 40, 71, 72).
- 6) Endojen olarak spesifik matriks doku inhibitörleri (TIMP) (27, 31, 71, 72) ve alfa-2 makroglobulinin inaktivasyonu (31) ile inhibe edilirler. Ekzojen olarak inhibisyonda taşıdıkları çinkonun şelasyonu esastır. Örneğin tetrasiklinler aktif olan çinko bölgesi ile birleşirler (44, 86).

MMP'ler fibroblastlar, epitel hücreleri, damar endotel hücreleri (22, 27, 31), kondrositler, kemik hücreleri (31), astrositler, mikroglialar (22, 30), plöral mezotel hücreleri (22, 32, 35), mezenşimal, epitelial ve endotelyal kökenli tümör hücrelerinden (27), T hücreleri (33), monositler, makrofajlar, aktive olmuş nötrofiller (31, 35) ve plazma hücreleri (34) tarafından salgılanmaktadır. Rath ve arkadaşları (29), kanatlılarda memeli nötrofil lökositlerin karşılığı olan heterofil lökositlerde de MMP'lerin varlığını bildirmişlerdir. Enzimlerin kanatlılarda beyin dokusunda meninkslerde, nöronlarda, damar endotelinde, ependim hücrelerinde ve damar adventisiasında; akciğer dokusunda,

mezotel hücrelerinde, bronş epitellerinde, damar endotellerinde ve bağ doku hücrelerinde; karaciğer dokusunda, hepatositlerde, safra epitellerinde, kapsüler ve portal alandaki bağ doku hücrelerinde; böbrek dokusunda, damar endotelinde, tubul epitellerinde, intersitisyel bağ doku hücrelerinde, kalp dokusunda ise damar endotellerinde, damar adventisyasında, epikard ve endokard dokusunda yerleşimleri immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir (22).

MMP'lerin aktiviteleri transkripsiyon, translasyon ve sekresyon aşamalarında düzenlenebilir (69, 72, 84). Örneğin transkripsiyon aşamasında MMP'ler sitokinlere (27), büyüme faktörlerine ve hormonlara cevap verirler (69). Membran tipi-MMP'lerin (MT-MMP) diğer MMP'leri aktive ettikleri bilinmektedir. Pro-MMP ve TIMP kompleksi, aktive olmuş MT-MMP'ye bağlanır ve bu bağlanma MMP'lerin aktivasyonu ile sonuçlanır (37). Hücrelerden salgılandıktan sonra MMP'lerin inhibisyonundan TIMP'ler sorumludurlar. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda 4 adet TIMP'in (TIMP-1, -2, -3, -4) varlığı gösterilmiştir. Bu enzimler 1:1 oranında MMP'lere bağlanıp stabil kompleksler oluşturarak onların aktivitelerini inhibe ederler. Spesifik olarak MMP-2 ile TIMP-2, MMP-9 ile de TIMP-1 stabil kompleksler oluşturur (27, 69, 72, 78). Bazı inhibitörler ise enzimin hem latent, hemde aktif formlarının aktivitesini engelleyerek iki aşamalı bir rol oynamaktadır (71).

Stefanson ve arkadaşları (71), hücre kültürü ortamında Rous Sarcoma virus ile transforme edilmiş tavuk embriyo fibroblastlarının (RSVCEF) 70 kDa'luk MMP (Progelatinaz, MMP-2) sentezlediklerini belirtmişlerdir. Aimes ve arkadaşları (36), insan MMP'leri ile kanatlı MMP'leri arasında protein diziliminde % 84'e varan bir homolojinin olduğunu bu homolojinin propeptid ve katalitik bölgelerde % 88'e ulaştığını bildirmiştir.

Enzimlerin memelilerde kan damarlarının tahribatıyla birlikte seyreden yangısal durumlar ve ödem oluşumu gibi birçok olaydaki rolleri sorgulanmaya çalışılmıştır. Doğrudan tip IV kollajenazın ya da kollajenaz ürettikleri bilinen bakterilerin intraserebral olarak verilmeleri ile parankimal damarlara ait tip IV kollajenden zengin bazal membranın yıkımlanarak beyin dokuda şiddetli ödem oluşumunda enzimlerin rolleri gösterilmiştir (30, 39, 87). Kan damarlarının, kollajen ve diğer ekstraselüler matriks proteinlerinden oluşan bazal membranlarının, invazif özelliğe sahip tümör hücreleri tarafından uzak organ metastazları oluşturabilmek için parçalamaları gereken son hedef oldukları vurgulanmıştır (27, 72, 80). Zeng ve arkadaşları (37), 23 kolorektal kanserli hastada kolon mukozası bazal membranındaki tip IV kollajenin yıkımlanmış olduğunu ve bu alanlarda matriks yıkımlayıcı enzimlerinin immunohistokimyasal boyanma özelliğinin şiddetle arttığını

bildirmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada pleural efüzyona sahip 88 hastaya ait transudat ve eksudat örneklerinde MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1'in varlığı gösterilerek efüzyon oluşumu sırasında enzimlerin rolleri vurgulanmıştır. Aynı çalışmada eksudat örneklerindeki MMP-9 yoğunluğunun şiddetle artmış olması da bu enzimin daha çok yangı hücreleri tarafından üretilmesine atfedilmiştir (32). Benzer şekilde Li ve arkadaşları (77), akut mastitislerde meme alveol lümenlerine infiltrate olan nötrofil lökositlerde MMP-9 üretiminin arttığını, buna karşın MMP-2'nin bulunmadığını saptamışlar ve yangısal olaylarda nötrofil lökositlerin MMP-9 salgılayarak bazal membranı parçaladıklarını bildirmişlerdir. Akciğerlerde MMP'ler toplam kollajen kitlesinin %10'undan fazlasını bir gün içinde değiştirebilecek kapasiteye sahiptir (32). Patolojik durumlar söz konusu olmadığı sürece MMP ve TIMP'ler arasında çok hassas bir denge vardır (30, 32, 39). Bu denge şiddetli akciğer yangılarında, tümör metastazlarında, akciğer amfizeminde, bronşiyektazi, kistik fibrozis, ve Yetişkin Solunum Stresi Sendromu (ARDS) sırasında oluşan akciğer ödemi gibi patolojik durumlarda MMP artışı yönünde bozulur (35).

Broyler asites sendromunun akut formunda tavuklar klinik belirti göstermeksizin şekillenen şiddetli akciğer ödemeine bağlı olarak ölürlere (4, 11). Hastalığın klasik formunda da asitesten ölen hayvanların hemen hepsinde nekropsisi bulgusu olarak şiddetli akciğer ödemi ve konjesyonundan bahsedilmiştir (4, 14, 21, 22). Bazı araştırmacılar tarafından MMP'lerin broyler asites sendromunun oluşumundaki olası rolleri sorgulanmıştır. Olkowski ve arkadaşları (41), asitesli broyler tavukların kalplerinde sağlıklı broyler ve yumurtacı tavuklara göre MMP-2'nin daha fazla olduğunu göstererek dokuda artan MMP-2'nin kalp dokusunun geçirmiş olduğu yeniden modellenme sürecinde etkili bir rol üstlendiğini vurgulamışlardır. Özyiğit ve arkadaşları (22), sendromun oluşumu sırasında enzimlerin farklı organlardaki kan damarlarının bazal membranlarını tahrip ederek etkili olabileceklerini göstermişlerdir.

Miserrochi ve arkadaşları (88), *in vivo* olarak hipoksiye maruz bırakılan tavşan akciğerlerinde intersitisyel dokuda ödem oluştuğunu bildirerek bu ödemin deney sırasında hücrelerce salınan matriks yıkımlayan enzimlerin dokudaki artışı ile birlikte kan damarlarını hasara uğratmalarından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Sutton ve arkadaşları (44), iskemik böbrek hasarı sırasında oluşan lokal doku ödeminde MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinin böbreklerde arttığını ayrıca MMP inhibitörü olan minosiklinin uygulandığı gruplarda ödem oluşumunun ve enzim seviyelerinin azaldığından bahsetmişlerdir. Ottino ve arkadaşları (89), retinal endotel hücrelerini *in vitro* koşullarda hipoksiye maruz bıraktıklarında, hipoksinin selektif olarak MMP-2 gen ekspresyonunu 2 kat, medyumda da

MMP-2 miktarını 10 kat arttırdığını göstermişlerdir. Dermal fibroblastlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise hipoksinin MMP-1 mRNA ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (90). Bazı çalışmalarda, invazif özellikteki tümör hücrelerinin MMP sentezlediklerini ve bu enzimler aracılığı ile ekstraselüler matriksi parçalayarak en yakın kan damarına ulaşmaya çalıştıkları gösterilmiştir (38, 91). Osinsky ve arkadaşları (49), Lewis akciğer karsinomlarında spektroskopik olarak tümöral kitlenin farklı bölgelerindeki oksijen ve MMP seviyesini ölçerek tümörün invazyon kapasitesinde MMP'lerin rollerini incelemişlerdir. Bu çalışmada oksijen seviyesinin düştüğü alanlarda enzim aktivitesinin giderek arttığını bulmuşlar ve hipoksinin tümör hücrelerinde MMP artışına yol açarak invazyonu kolaylaştırdığını tespit etmişlerdir. *In vitro* koşullarda da iki farklı osteosarkom hücre hattından daha agresif olanın diğerine oranla daha fazla MMP salgıladığı gösterilmiştir (38). Ridgway ve arkadaşları (79), *in vitro* olarak hipoksiye maruz bıraktıkları kolon (SW1222), meme (MDA-MB231) ve pankreatik (PSN-1) kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada akciğer dokusundan izole edilen bağ doku hücreleri hipoksiye maruz bırakıldığında pro-MMP-2 sekresyonunun arttığı gösterilmiştir (74). Diyabet hastalığına bağlı kronik kapanmayan deri yaralarında ve ülserlerinde doku oksijenizasyonun az olduğu bilinir (92). Bu yara ve ülserlerin oluşumları sırasında MMP'lerin rollerini incelemek için diyabetik ve travmatik yara biyopsilerinde MMP-1, MMP-2, MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak diyabetik yaralarda travmatik yaralara oranla MMP-1'in 64 kat, MMP-2'nin 6 kat, MMP-8'in 2 kat ve MMP-9'un 14 kat daha fazla olduğu görülmüştür.

Asitesle ilgili olarak yapılan çalışmalarda, deneysel olarak sendromu oluşturabilmek için tuz başarı ile kullanılmıştır (14, 19, 20, 22). Özyiğit ve arkadaşları (22), içme suyuna tuz ilave ederek oluşturdukları asites modelinde MMP'lerin ve TIMP'lerin aktivasyonlarını inceleyerek asitesin şekillendiği broylerlerde, kontrol gruplarına nazaran, enzimlerin tüm çalışma boyunca dokulardaki yoğun boyanma özelliklerini koruduklarını gözlemlemişlerdir. Hiperozmotik stresin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda enzimler üzerindeki etkileri bazı araştırmalarda ortaya konmuştur. Kültüre edilmiş korneal epitel hücreleri hiperosmolar NaCl çözeltisine maruz bırakıldıklarında MMP-1, -2, -3, -9 üretiminin bu hücrelerde arttığı tespit edilmiştir (53). Woessner (27) ve Nagase ve Woessner (72) MMP'lerin aktivasyonunda sitokinlerin özellikle de IL-1 $\beta$ 'nin önemli rol aldığını vurgulamıştır. Luo ve arkadaşları (52) ise yaptıkları çalışmada farelerin kornealarını hiperosmolar tuz solüsyonunu ile yıkadıklarında gözyaşı örnekleri içerisindeki IL-1 $\beta$

konsantrasyonunun yaklaşık olarak dört kat arttığını göstermişlerdir. *In vivo* ve *in vitro* olarak yapılan bu çalışmalarda hücrelerde morfolojik-sitolojik-histopatolojik olarak herhangi lezyon bildirilmemiştir.

MMP'lerin dokular ve hücreler üzerindeki varlığının belirlenmesinde kullanılan immuno-histokimya, -sitokimya (İH), dokular ve hücrelerde bulunan protein, karbonhidrat veya lipid moleküllerinin (antijen) enzim ile işaretlenmiş bir antikor yardımı ile reaksiyona girmesi sonucuna dayalı bir tekniktir (93). İmmun boyamalarda kullanılan antikorlar poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki çeşittir ve yine direkt ve indirekt olmak üzere iki metod kullanılabilir. Metodun direkt veya indirekt olmasına göre, primer veya sekonder antikora bir enzim bağlanır. Bu enzim daha sonra substratla (kromojen) reaksiyona girerek renkli bir görünüm verir. İndirekt olarak kullanılan Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yönteminde sekonder antikor biotinle işaretlenmiş olup, daha sonra Streptavidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi ile birleşir (94). İH'de bir antijenin konsantrasyonu, boyandığı kromojenin görünen yoğunluğu ile kolayca değerlendirilir. Bu değerlendirme daha çok bağıl olarak yapılmaktadır. Antikoron etkinliğinin kıyaslanmasında yarı kantitatif metot etkilidir. Sonuçlar tipik olarak 1+, 2+, gibi değerlendirilerek 3 veya 4'e kadar numaralandırma yapılır (93).

Hücre kültürü ise çalışılan konuda spesifiteyi artıran ve hipotezin test edilebilmesi için hedef hücrelerin saf halde elde edilmesine izin veren bir yöntemdir (95). Hücre kültürü çalışmalarında, hücrenin ve hücrelerin bulunduğu ortamın yönetiminin araştırmacının elinde olması olumsuz bazı faktörlerin eliminasyonunda oldukça önemlidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### GEREÇ

#### Hayvan Materyali

Deneyler boyunca kullanılan akciğer ve deri dokusuna ait bağ doku hücreleri, Has Tavuk A.Ş.'den (Bursa) temin edilen, hiçbir aşı ve ilaç uygulanmamış, 1 günlük, erkek, Avian Ross ırkı broyler ve Lohman LSL ırkı yumurtacı civcivlerden primer olarak izole edildi. Üç farklı hayvandan alınan akciğer dokuları eksplant kültür hazırlamak için kullanıldı ve tüm deneyler sırasında bu üç akciğerden izole edilen hücreler kullanıldı. Bulgular kısmındaki tüm sayısal ifadeler bu 3 farklı hayvana ait hücrelerden elde edilen değerlerin ortalamasıdır.

#### Deneysel Gruplandırma

Broyler ve yumurtacı civcivlerden izole edilen akciğer bağ doku hücreleri kendi içlerinde 0. saat kontrol, 6. saat kontrol, 6 saat hipoksik strese maruz bırakılan, 6 saat hiperozmotik strese maruz bırakılan, 6 saat hipoksik ve hiperozmotik strese maruz bırakılan, 12. saat kontrol ve 12 saat hipoksik strese maruz bırakılan hücreler olmak üzere gruplara ayrıldı. Akciğer dokusundan gelen eksplant dokuların ve izole edilen hücrelerin adlandırılmasında L1, L2, L3, L4 ve L5, deriden gelen eksplant dokuların ve izole edilen hücrelerin adlandırılmasında ise D1, D2, D3, D4 ve D5 terimi kullanıldı.

#### Deneysel Ortam

Çalışma Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi. Laboratuvar ısısı, laboratuvar içerisindeki cihazların optimum koşullarda tam verimle çalışabilmesi için, klima ile 25 °C' de tutuldu. Laboratuvarın sterilizasyonu 6 adet ultraviyole ışık kaynağı sayesinde düzenli olarak gerçekleştirildi. Laboratuvarın aydınlatılmasında beyaz ışık üreten floresan lambalar kullanıldı.



## **Biyolojik Emniyet Kabini (Laminair Flow Hood)**

Çalışma sırasında Jouan marka (MSC 12 type II, Fransa) biyolojik emniyet kabini kullanıldı. Hücrelerin tüm steril ortam gerektiren manipulasyonları bu cihaz içerisinde gerçekleştirildi.

## **İnkübatör**

İzole edilen hücrelerin optimum olarak 37 °C’de ve % 5 CO<sub>2</sub>’li ortamda inkübasyonu için Jouan marka (IGO 150, Fransa) karbondioksitli inkübatör kullanıldı. Cihazın CO<sub>2</sub> ihtiyacı 50 bar basınca sahip 25 litrelik karbondioksit tüpünden silikon borular aracılığı ile sağlandı. Gerekli olduğu zamanlarda gaz ikmali Habaş A.Ş.(Bursa) tarafından gerçekleştirildi. Cihaz içerisinde gerekli nemin temini için cihazın içinde bulunan çelik küvet bakır sülfat-EDTA içeren solüsyon ile dolduruldu.

## **Çalkalayıcı Su Banyosu**

Çalışma boyunca kullanılan tüm solüsyonlarının 37 °C’ ye ısıtılması ve donmuş çözeltilerin eritilmesi için Nüve marka (ST 402, Türkiye) sallayıcılı su banyosu kullanıldı. Cihazın su haznesi 14 litre distile su ve 1 litre bakır sülfat-EDTA solüsyonu ile dolduruldu. Cihazın sallama hızı ve su sıcaklığı dijital olarak programlanarak kullanıldı.

## **Soğutmalı Santrifüj**

Çalışma boyunca tüm santrifüj işlemleri Jouan marka IGO 150 model soğutmalı santrifüj kullanılarak yapıldı.

## **İnvert Mikroskop**

Çalışma boyunca, hücre kültürü ortamındaki eksplant dokuların ve kültüre edilmiş hücrelerin muayenesini yapmak ve fotoğraflarını çekebilmek için fotoğraf makinesi ataçmanlı Olympus marka (CK-2, Japonya) invert mikroskop kullanıldı.

## **Işık Mikroskop**

Boyamalar sonrasındaki tüm incelemeler Nikon marka YS2-H model mikroskopta gerçekleştirildi.

## **Tartım**

Çalışma sırasında tartım gereken her türlü iç Sartorius marka (BP-110S, Almanya) dijital hassas terazide gerçekleştirildi.

## **Sterilizasyon**

Çalışma boyunca kullanılan tüm cam malzemelerin (şişeler, cam pastör pipetleri vs.) ve hazırlanan bazı solüsyonların sterilizasyonu için, 1 atmosfer basınç ve 120 °C ısı üretebilen Nüve marka (OT-12, Türkiye) buharlı otoklav kullanıldı. Isı ile sterilizasyona uygun olmayan tüm alet ve ekipmanın sterilizasyonu için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Sterilizasyon nitesindeki etilen oksit gaz sterilizasyonundan faydalanıldı.

## **İmmunositokimyasal Boyama**

### **Boyamalar sırasında kullanılan primer antikorlar ve diğer kimyasal maddeler**

#### **Aseton**

Ticari olarak satın alınan, Merck firmasına ait, 1.00013.2500 kod numaralı aseton hücrelerin fiksasyonu amacıyla kullanıldı.

#### **Antikor sulandırma solüsyonu**

Primer antikorların istenilen konsantrasyona sulandırılması sırasında Labvision (Clermont, CA) firmasına ait TA-125-UD kod numaralı Large volume UltraAb diluent kullanıldı.

## **Protein Bloklama Solüsyonu**

Ticari olarak satın alınan, Labvision firmasına ait, kullanıma hazır, TA-60-UB kod numaralı solüsyon kullanıldı.

## **Primer Antikorlar**

Bu tez çalışması sırasında Özyiğit (2002) tarafından kullanılan aynı marka, seri ve lottaki antikorlar kullanılmıştır.

## **MMP-2 (Matrix metalloproteinases-2)**

Ticari olarak satın alınan, Neomarkers (California, USA) firmasına ait MS-806-P Ab-4 kod numaralı, monoklonal, mouse anti-human matriks metalloproteinaz-2 antikorunu kullanıldı. Konsantre vaziyetteki (200 mikrogram / 1ml) primer antikor, boyamalar sırasında antikor sulandırma solüsyonu kullanılarak son konsantrasyon 2µg/100µl olacak şekilde seyreltildi.

## **MMP-9 (Matrix metalloproteinases-9)**

Ticari olarak satın alınan, Neomarkers (California, USA) firmasına ait MS-806-P Ab-8 kod numaralı, monoklonal, mouse anti-human matriks metalloproteinaz-9 antikorunu kullanıldı. Konsantre vaziyetteki (200 mikrogram / 1ml) primer antikor, boyamalar sırasında antikor sulandırma solüsyonu kullanılarak son konsantrasyon 2µg/100µl olacak şekilde seyreltildi.

## **TIMP-1 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)**

Ticari olarak satın alınan, Neomarkers (California, USA) firmasına ait MS-608-P kod numaralı, monoklonal, mouse anti-human Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 antikorunu kullanıldı. Konsantre vaziyetteki (200 mikrogram / 1ml) primer antikor, boyamalar sırasında antikor sulandırma solüsyonu kullanılarak son konsantrasyon 2µg/100µl olacak şekilde seyreltildi.

## **TIMP-2 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)**

Ticari olarak satın alınan, Neomarkers (California, USA) firmasına ait MS-832-P kod numaralı, monoklonal, mouse anti-human Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 antikorunu kullanıldı. Konsantre vaziyetteki (200 mikrogram / 1ml) primer antikor, boyamalar sırasında antikor sulandırma solüsyonu kullanılarak son konsantrasyon 2µg/100µl olacak şekilde seyreltilti.

## **Sekonder Antikor**

Ticari olarak satın alınan, Labvision firmasına ait, kullanıma hazır, TM-60-BN kod numaralı biotinli goat anti-mouse antikor kullanıldı.

## **Streptavidin Peroksidaz**

Ticari olarak satın alınan, Labvision firmasına ait, kullanıma hazır, TS-60-HR kod numaralı streptavidin peroksidaz kullanıldı.

## **Kromojen**

Ticari olarak satın alınan, Labvision firmasına ait, TA-002-HAC kod numaralı amino etil karbazol (amino-ethyl carbazole, AEC) ile aynı firmaya ait TA-015-HAS kod numaralı AEC substrat kullanıldı. Bu solüsyon immunositokimyasal boyama sırasında taze olarak, 1 ml AEC substrat içerisine 1 damla AEC kromojen eklenerek hazırlandı ve hazırlandıktan sonra en geç 15 dakika içerisinde kullanıldı.

## **İmmun Yapıştırıcı**

Boyamalar sonrasında kuyucuklardan çıkartılan lameller, temiz bir lam üzerine damlatılmış immunmount (Neomarkers, TA-060-UM) üzerine ters çevrilerek yapıştırıldı.

## **Hücre Kültürü Hazırlanırken Kullanılan Solüsyonlar**

### **Besleme solüsyonu**

Çalışma boyunca kültüre edilen hücrelerin beslenmesi, subkültürlerinin hazırlanması ve bazı kimyasal maddelerin çözündürülmesi için M199 (Sigma, M3769, St. Louise, USA) medyumunu kullanıldı. Bir litrelik cam erlenmayer içerisinde yaklaşık 200 ml bidistile su konularak üzerine toz halindeki besleme medyumunun tamamı (9,8 gr) boşaltılıp magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtılmadan çözdürüldü. Karışım üzerine ilave olarak 800 ml bidistile su eklendi. Ardından medyum üzerine 0,1 gr L-glutamin (K28024689, Merck, Almanya) ve 2,2 gr sodyum bikarbonat (11810-017, Gibco BRL, İskoçya) eklenerek medyum tümüyle berrak hale gelene kadar karıştırılmaya devam edildi. Besleme solüsyonunun pH'sı 1N NaOH ve/veya 1N HCl kullanılarak 7,4'e ayarlandı. Karıştırma işlemi takiben erlenmayer biyolojik emniyet kabinine nakledildi. Filtrasyon ünitesi (Nalgene, 158-0020, A.B.D.) kullanılarak, vakum pompası yardımıyla filtrelenerek sterilize edildi. Sterilize edilmiş medyum filtrasyon ünitesinin toplayıcı şişesinde ağzı kapalı bir şekilde toplandı. Genel olarak çalışma sırasında, medyumun 500 ml'lik kısmı steril bir cam şişeye aktarılıp 2X antibiyotik ve antimikotik eklendikten sonra uygun hacimlere bölüştürülerek +4 °C'de saklandı.

### **Fötal Sığır Serumı**

Hücrelerin beslenmeleri sırasında medyum içerisinde steril olarak %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Fötal Sığır Serumı, Sigma, F4135) eklendi. Donmuş vaziyetteki serum, içerisinde oda sıcaklığında çeşme suyu bulunan beher içerisinde alınarak çözdürüldü. Biyolojik emniyet kabini içerisine alındıktan sonra ağzı açılarak, 50 ml'lik santrifüj tüplerine uygun hacimlerde bölüştürüldü. Tüpler etiketlendikten sonra -20 °C'de saklandı.

### **Antibiyotik ve Antimikotik Solüsyonları**

Çalışma sırasında hücrelerin beslenmesi için kullanılan besleme medyumunu içerisine antibiyotik olarak penisilin-streptomisin kombinasyonu (1X, 200.000 IU/litre) (Sigma, P3559) ve antimikotik olarak da amfoterisin B (1X, 10 mg/litre) (Bristol-Myers Squibb, Ohio, A.B.D.) ilave edildi.

## **Krebs Ringer Bikarbonat Tampon Solüsyonu**

Çalışma boyunca kültüre edilen hücrelerin beslenmesi, subkültürlerinin hazırlanması ve bazı kimyasal maddelerin çözündürülmesi için Krebs ringer bikarbonat tampon solüsyonu (Sigma, K4002) kullanıldı. Bir litrelik cam erlenmayer içerisine 200 ml bidistile su konularak üzerine toz halindeki tampon solüsyonun tamamı boşaltılarak magnetik karıştırıcı üzerinde ısıtılmadan çözündürüldü. Karışım üzerine 800 ml daha bidistile su eklendi. Ardından solüsyon üzerine 1.26 gr sodyum bikarbonat (Gibco BRL, 11810-017) eklenerek solüsyon tamamıyla berrak hale gelene kadar karıştırılmaya devam edildi. Tampon solüsyonunun pH'sı 1N NaOH ve/veya 1N HCl kullanılarak 7,4'e ayarlandı. Karıştırma işlemini takiben erlenmayer biyolojik emniyet kabinine nakledildi. Tampon solüsyonu filtrasyon ünitesi kullanılarak, vakum pompası yardımıyla filtrelenerek sterilize edildi. Sterilize edilmiş tampon solüsyonu filtrasyon ünitesinin toplayıcı şişesinde ağzı kapalı bir şekilde toplandı. Genel olarak çalışma sırasında, medyumun 500 ml'lik kısmı steril bir cam şişeye aktarılıp 2X antibiyotik ve antimikotik eklendikten sonra uygun hacimlere bölüştürülerek +4 °C'de saklandı.

## **Tripsin Solüsyonu**

Çalışmada pasajlamalar sırasında, hücrelerin kültür tabaklarının yüzeyinden ayrılabilmesi için % 0.04'lük çalışma tripsin solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonu hazırlamak için;

Tripsin: 0,02075 gr

NaCl (Sodyum Klorür, Sigma, S7653): 4 gr

D-glukoz (Merck, K1.08346,1000): 0,5 gr

KCl (Potasyum Klorür) : 0,2 gr

NaHCO<sub>3</sub> (Sodyum Bikarbonat, Gibco BRL) : 0.175 gr

EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)(Sigma, E6758): 0,4 gr tartıldı.

Tartılan kimyasal maddeler 500 ml bidistile su içeren 750 ml'lik erlenmayer içerisine aktarılarak magnetik karıştırıcıda ısıtılmadan çözündürüldü. Solüsyon, biyolojik emniyet kabini içinde, filtrelenerek sterilize edildi. Uygun hacimlerde 50 ml'lik santrifüj tüplerine bölüştürülüp -20 °C'lik derin dondurucuda kullanım zamanına kadar saklandı. Hücre kültürü tabaklarının tripsinlenmesinden önce tripsin solüsyonu derin dondurucudan çıkartılarak içerisinde oda sıcaklığında çeşme suyu bulunan beherde çözündürüldü.

Çözünmenin ardından santrifüj tüpleri sallayıcı su banyosuna alınarak 37 °C’de yaklaşık 15 dakika boyunca ön ısıtma işlemi uygulandı.

### **Enzim Solüsyonu (Kollajenaz-Dispaz)**

Akciğer dokusundan primer fibroblast kültürleri hazırlanırken dokunun enzimatik sindirimi için enzim solüsyonu taze olarak hazırlandı. Bu amaçla; 0,036 gram kollajenaz (Sigma, C6885) 0,038 gram dispaz (Gibco BRL, 17105–032) ve 1,35 gram BSA (Bovine Serum Albumin, Sığır Serum Albümini, Sigma, A9418) hassas terazide tartıldı. Tartılan kimyasallar 50 ml’lik santrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 18 ml Krebs ringer bikarbonat tampon solüsyonu eklendi. Vorteks yardımıyla kimyasalların tamamıyla erimesi sağlandı. Enzim solüsyonu 25 cc’lik enjektöre çekilerek biyolojik emniyet kabini içerisinde şırınga tipi filtreler (Milex-Millipore, H7N83322, Bedford, A.B.D.) yardımıyla steril bir 50 ml’lik santrifüj tüpüne filtrelenerek sterilize edildi (96, 97).

### **Heparin Solüsyonu**

Akciğer dokusundan enzimatik sindirim ile primer hücre kültürü hazırlanırken kullanıldı. Enzimatik sindirim sonrasında birbirlerinden ve ekstraselüler matriksten ayrılan hücrelerin santrifüj işlemi sırasında tekrar kümelenmelerini engellemek için kullanıldı. Bu amaçla, 0,0575 gr heparin (Sigma, H4784) ) tartıldı. Tartılan heparin 50 ml’lik santrifüj tüpü içine aktarıldı ve üzerine 20 ml M199 medyumunu eklendi. Vorteks yardımıyla heparinin tamamıyla erimesi sağlandı. Biyolojik emniyet kabini içinde şırınga tipi filtreler kullanılarak solüsyon sterilize edildi (96, 97).

### **Jelatin Solüsyonu**

Bu solüsyon akciğer ve deri dokusundan izole edilen bağ doku hücrelerinin ilk ekimleri ve sonraki pasajlamaları sırasında ekildikleri kültür tabaklarının yüzeyinin kaplanarak hücrelerin yapışma kapasitelerini artırmak için kullanıldı. Bu amaçla, 0,5 gr jelatin (Sigma, G9391) tartıldı. Tartılan jelatin erlenmayere aktarılıp üzerine 250 ml bidistile su eklenerek eritildi. Erlenmayerin ağzı alüminyum folyo ile sarılarak buharlı otoklava yerleştirildi. 120 °C’de 1 atmosfer basınçta 20 dakika boyunca sterilize edildi.

Sterilizasyonun ardından jelatin solüsyonu biyolojik emniyet kabini içine nakledilerek oda sıcaklığına kadar soğuması beklendi. Ardından steril 50 ml'lik santrifüj tüplerine uygun hacimlerde bölüştürüldü ve -20 °C'de dondurularak saklandı (96).

### **Hücre Dondurma Solüsyonu**

Broyler ve yumurtacı tavuklardan elde edilen hücrelerin bir kısmı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere Sigma C6295 solüsyonu kullanılarak donduruldu ve sıvı nitrojende saklandı.

### **Bakır sülfat-EDTA Solüsyonu**

Sallayıcılı su banyosunun su haznesini ve CO<sub>2</sub>'li inkübatörün nem küvetini doldurmak için hazırlandı. Bu amaçla, 10 gr bakır sülfat (Merck, 1.02790.1000) ve 0,2 gr EDTA (Sigma 6758) tartılarak 1 litre distile su içinde eritildi. Tortusuz çözeltinin üzerine 9 litre daha distile su eklendi. Sallayıcılı su banyosunun haznesine 1 litre bakır sülfat-EDTA solüsyonu konularak üzerine 14 litre distile su eklendi.

### **Alkol-Eter Solüsyonu**

Ön denemeler ve deneyler sırasında kullanılan yuvarlak lamellerin sterilizasyon öncesinde temizliği için 1:1 oranında karıştırılmış alkol-eter solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonda 15 dakika süreyle bekletilen lameller el değirilmeden 10 cm çaplı cam petri tabaklarına yerleştirilerek buharlı otoklavda sterilize edildi.

### **Hücre Kültürü Tabakları ve Diğer Plastik Malzemeler**

#### **Hipoksi Kamaraları**

Ön denemeler ve hipoksi deneyleri sırasında hücreleri hipoksik strese sokmak için 2,5 litrelik özel kamaralar (Oxoid, AG0025, İngiltere) ve kamaralar içerisindeki oksijeni bağlama kapasitesine sahip özel zarflar (Oxoid, AnaeroGen, AN0025) kullanıldı (98–100).



## **Petri Tabakları**

Civcivlerden alınan akciğer ve deri örneklerinin istenilen boyutlara parçalanması sırasında 35 mm ve 60 mm çaplara sahip steril petri tabakları (Corning, 3294, 3295, A.B.D.) kullanıldı.

## **Hücre Kültürü Şişeleri (Flasklar)**

Broyler ve yumurtacı civcivlerden primer hücre kültürlerinin hazırlanması ve pasajlamaları sırasında eğik boyunlu 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup> (Corning, 430168, 430720, TPP, 90025, 90075, İsviçre) hücre kültürü şişeleri (flask) kullanıldı. Kullanılan tüm flasklar % 0,2'lik jelatin ile kaplandı.

## **Pipetler**

Hücre kültürlerinin hazırlanması sırasında, deneylerde ve her türlü kimyasalın aktarımı sırasında 1 ml, 5 ml, 10 ml ve 25 ml'lik steril plastik pipetler (94001, 94005, 94010) kullanıldı.

## **Santrifüj Tüpleri**

Hücre kültüründe kullanılan serum ve medyumlarının bölüştürülmesinde, enzimatik sindirim sırasında ve pasajlamalar sırasındaki santrifüj işlemleri sırasında 15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri (TPP, 91015, 91050) kullanıldı.

## **Yuvarlak Lamel**

Ön denemeler ve deneyler sırasında, hücrelerin ekildiği 24 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarının her bir kuyucuğunun tabanına uygun, 15 mm çaplı yuvarlak lameller (Deckgläser, C911350, Almanya) kullanıldı.

## **Hücre Dondurma Tüpleri (Kriyovial)**

Hücrelerin sıvı azot içerisinde saklanmasında TPP firmasına ait 89012 kod numaralı 1,2 ml hacme sahip kriyovialler kullanıldı.

## YÖNTEM

### Sakrifikasyon

Deneylerde kullanılan civcivlerin ötenazisi için eter inhalasyonu yöntemi kullanıldı. Bu amaçla her bir civcivin içerisine rahatlıkla sığabileceği ve tabanına 1 cm kalınlığında pamuk yerleştirilmiş kapaklı plastik kavanozlar içerisine yeterince eter döküldü ve hayvanlar tek tek bu kavanozlarda ötenazi edildi.

### Hücre İzolasyonu

Ön denemelerde ve deneyler sırasında kullanılan hücrelerin izolasyonunda eksplant kültür ve enzimatik sindirim yöntemi uygulandı. Enzimatik sindirim ile elde edilen hücreler ön denemeler sırasında immunositokimyasal boyamalar için kullanıldı.

Bursa Has Tavuk A.Ş.'den (Bursa, Türkiye) hiçbir aşı ve ilaç uygulanmamış, 5 adet, bir günlük, Avian Ross ırkı broiler ve Lohman LSL ırkı yumurtacı erkek civciv alınarak karton koli içerisinde anabilim dalı laboratuvarına nakledildi. Hayvanların ortama adaptasyonu sağlandı ve yukarıda açıklanan yöntem ile civcivler birer birer ötenazi edildi. Daha sonra karın ve sırt bölge derisi piset yardımıyla %70 alkol ile ıslatılarak tüyler deriye zarar vermeden yolundu. Deri tekrar %70 alkol ile yıkanarak steril makas ve pensler yardımıyla deri ve derialtı dokular kesilerek vücut boşluğu açıldı. Deri ensizyonları yapılırken, eksplant kültür hazırlamak için deriden 1 cm x 1 cm boyutlarında örnekler alındı. Bu örnekler 15 ml'lik santrifüj tüplerinde, oda sıcaklığındaki, 5 ml, 2X antibiyotik-antimikotik içeren Krebs ringer bikarbonat tampon solüsyonu içerisine alındı. Vücut boşluğunun açılmasını takiben organlar 5X antibiyotik-antimikotikli Krebs Ringer bikarbonat tampon solüsyonu ile yıkandı. Süratle akciğer lobları steril makas ve pens yardımıyla çıkartılarak oda sıcaklığındaki, 5 ml, 2X antibiyotik-antimikotik içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Her bir hayvandan alınan deri ve akciğer örnekleri için ayrı ayrı, önceden etiketlenmiş santrifüj tüpleri kullanıldı. Dokular, 5-6 kez santrifüj tüpleri hafifçe ters düz edilerek yıkandı ve +4 °C'de 1 gece boyunca bekletildi. Ertesi gün santrifüj tüpleri buzdolabından alınarak biyolojik emniyet kabini içerisine transfer edildi. Tüpler içerisindeki Krebs ringer bikarbonat tampon solüsyonu steril cam pastör pipetleri ve vakum pompası yardımıyla emildi. Pipet aid ve steril pipetler yardımıyla dokular üzerine oda sıcaklığında, 5 ml, 2X antibiyotik-antimikotikli aynı tampon solusyonundan eklendi.

Bu işlem birkaç kez tekrarlanarak dokuların kandan temizlenmeleri ve oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. Son yıkama işlemi takiben tüpler içerisindeki dokular steril 35 mm ve 60 mm petri tabaklarına alındı. Her bir hayvandan gelen akciğer ve deri örnekleri için ayrı steril petri tabakları kullanıldı. Petri tabakları içerisinde steril bisturi uçları kullanılarak deri örnekleri yaklaşık 3 mm x 3 mm boyutlarında parçalara ayrıldı ve önceden etiketlenerek, yüzeyleri jelatin ile kaplanmış 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına yerleştirildi. Yaklaşık olarak 10 dakika dokuların yüzeye yapışması beklendi. Süre bitiminde tek tek, explant doku üzerine bireysel olarak kendisini kapatacak kadar (yaklaşık 1–2 damla) % 20 FBS, 2X antibiyotik-antimikotik içeren M199 besleme medyumuna eklendi. Dokular 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarında 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüve yerleştirildi (94).

Enzimatik sindirime maruz bırakılan akciğer örnekleri için takip eden protokol uygulandı. Dokular yıkayıp, steril petri tabaklarına aktarıldıktan sonra steril bisturi uçları kullanılarak, mezotel hücrelerinin bulaşmasını engellemek için, pleuranın mümkün olduğunca akciğer loblarından ayrılması sağlandı. Bu işlemi takiben steril bisturi uçlarıyla, akciğer örnekleri petri tabakları içerisinde olabildiğince ince şekilde kıyıldı. Kıyılmış bu dokular steril pipetler yardımıyla, ön ısıtma işlemi uygulanmış 5 ml enzim solüsyonu taşıyan 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 37 °C'deki sallayıcı su banyosunun sepeti içinde 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben tüpler içine enzim solüsyonu (kollajenaz-dispaz) ile eşit hacimde, 37 °C'de heparin solüsyonu eklendi ve hafifçe sallandı. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında, 1000 RPM'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Biyolojik emniyet kabini içerisinde, tüplerdeki süpernatant steril cam pastör pipetleri ve vakum pompası kullanılarak uzaklaştırıldı. Peletler üzerine 5 ml, %20 FBS ve 2X antibiyotik-antimikotik içeren M199 eklenerek daha önceden etiketlenip, yüzeyi jelatin ile kaplanmış 25 cm<sup>2</sup> flasklara ekildi. Flasklar 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve yerleştirilerek inkübasyona bırakıldı. Hücreler konfluensiye (yoğunluğa) ulaşana dek 2 günde 1 % 10 FBS içeren taze M199 medyumuna ile beslendi. Hücreler kültür tabaklarında istenilen yoğunluğa eriştiğinde subkültür-pasaj işlemlerine başlandı (95, 96).

### **Tripsinizasyon-Pasajlamalar**

Tripsinlenecek konfluent haldeki flasklar ya da 6 kuyucuklu hücre kültürü ekim kapları karbondioksitli etüvden çıkartılarak biyolojik emniyet kabinine taşındılar. Flasklar içerisindeki medyum steril cam pastör pipeti ve vakum pompası yardımı ile boşaltıldı.

Flasklara, sallayıcı su banyosu içerisinde ön ısıtma işlemi uygulanmış, yeterli hacimdeki (25 cm<sup>2</sup> flasklara 2 ml, 75 cm<sup>2</sup> flasklara ise 4 ml) Krebs ringer bikarbonat tampon solüsyonu, steril pipet ve otomatik pipet aid yardımıyla ilave edilerek 2 dakika boyunca hafifçe sallanarak yıkandılar. Böylece besleme medyumunu içerisindeki tripsin aktivitesini azaltacak serum ve diğer artık maddelerin uzaklaştırılması sağlandı. Ardından kültür tabakları içerisinde (25 cm<sup>2</sup> flask için 2,5 ml, 75 cm<sup>2</sup> flask için 5 ml) 37 °C'ye ısıtılmış %0.04'lük tripsin çalışma solüsyonu eklendi ve hafifçe sallanarak enzim solüsyonun tüm flask yüzeyine yayılması sağlandı. Flasklar karbondioksitli etüv (%5 CO<sub>2</sub>, 37 °C) içerisinde alındı ve 12–15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre boyunca flasklar, birkaç kez, invert mikroskopta muayene edilerek tripsinizasyonun durumu kontrol edildi. Flask tabanındaki hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben kültür tabakları tekrar biyolojik emniyet kabini içerisinde alındılar. Tripsin aktivitesini sonlandırmak için, enzim solüsyonunun üzerine enzim miktarının 2 katı hacimde %10 FBS içeren taze besleme solüsyonu ilave edildi. Yüzeyden ayrılmanın tam olmadığı flasklarda hücre kazıyıcıları kullanılarak yüzeyden ayrılma sağlandı. Otomatik pipet ve steril pipet uçları kullanılarak, hücre süspansiyonu hücrelerin birbirlerinden tamamen ayrılması için flask içinde pipetlendi. Tripsinizasyon uygulanan kültür tabağı eğer 25 cm<sup>2</sup> flask ise elde edilen hücreler sayım sonrası tek bir 75 cm<sup>2</sup> flaska, eğer tripsinlenen kültür tabağı 75 cm<sup>2</sup> ise elde edilen hücreler, sayım sonrası 2 adet 75 cm<sup>2</sup> flaska aktarıldı ve subkültüre edildi (94).

### **Hücrelerin Dondurulması**

Tripsinizasyon sonrası elde edilen hücre süspansiyonu 1500 RPM'de 10 dakika santrifüj edilerek pelet elde edildi. Supernatant pipetlenerek uzaklaştırıldı. Pelet üzerine her defasında bir damla hücre dondurma solüsyonu damlatıldı ve karıştırılarak son hacim 1 ml'ye tamamlandı. Kriyovial içerisinde alınan hücre süspansiyonu (8 x 10<sup>6</sup> hücre/ml) 5 dakika boyunca ıslak buz üzerinde bekletildi. Ardından bir gece boyunca -85 °C'de donduruldu ve sıvı azot tankına aktarıldı (95).

### **Hücre Sayımı**

Rutin tripsinizasyon işlemi sonrası elde edilen hücre süspansiyonundan 0,2 ml alınarak Eppendorf tüpüne aktarıldı. Süspansiyon üzerine 0,3 ml Krebs solüsyonu ve 0,5 ml % 0,4 tripan mavisi solüsyonu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hemositometreye

önceden temizlenen lameller kenar kısımlarından ıslatılarak yerleştirildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan, otomatik pipet yardımı ile sayım alanından taşmayacak şekilde, sayma lamı ve lameli arasına yükleme yapıldı. Hemositometrenin 1 mm<sup>2</sup>'lik merkez karesi ve ona komşu köşelerde bulunan 1 mm<sup>2</sup>'lik dış karelerdeki canlı hücreler sayıldı. Sayım sırasında karelerin sol ve üst çizgilerine temas eden hücreler sayıma dahil edilirken karelerin sağ ve alt çizgilerine temas eden hücreler sayılmadı. Sayım sırasında tripan mavisinin üreticisi olan firmanın önerdiği protokol takip edildi (95).

### **Hücrelerin Karakterizasyonu**

Akciğer ve deri örneklerinden gerek enzimatik yolla gerekse eksplant kültürler kullanılarak elde edilen hücrelerin ilk pasajla birlikte karakterizasyonu için immunositokimyasal boyama ve morfolojik inceleme yapıldı. İmmunositokimyasal olarak, izole edilen hücreler iki farklı antikor ile boyandı. Bu amaçla anti-vimentin (Dako, M0725, Danimarka) ve anti-sitokeratin (Novocastra, NCL-PAN-CK, İngiltere) antikorları kullanıldı. İmmunositokimya sırasında anti-vimentin boyanırken enzimlerin boyanması sırasında uygulanan protokol takip edildi. Anti-sitokeratin boyamasında üretici firmanın tavsiyeleri göz önüne alınarak primer antikor uygulamadan hemen önce antijen maskelenmesini engellemek için proteinaz K enzimi 10 dakika süreyle uygulandı.

### **Deneylerin Yapılışı**

Deneyler sırasında akciğer dokusundan izole edilen primer fibroblast hücreleri kullanıldı. İlk izolasyondan sonra rutin olarak hücreler pasajlandı. Deneylerde 75 cm<sup>2</sup> flasklardaki 3. ve 6. pasajlar arasında bulunan hücreler kullanıldı. Deney günü flasklar karbondioksitli inkübatörden alınarak emniyet kabini içerisine konuldu. Flasklar içerisindeki medyum steril uzun boy (23 cm) pastör pipetleri ve vakum pompası yardımıyla uzaklaştırıldı. Çalkalayıcı su banyosunda 37 °C'ye ısıtılan Krebs solüsyonundan flasklar içerisine 5 ml aktarılarak hücrelerin 1–2 dakika hafifçe yıkanması sağlandı. Yıkama işlemini takiben yıkama solüsyonu aynı yöntemle pipetlendi. Takiben flasklar içerisine önceden ısıtılmış tripsin solüsyonundan 4 ml eklendi. Flasklar 37 °C'lik karbondioksitli etüvde 10–12 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında, uzun süreli tripsin uygulamasının hücreler üzerinde yaratacağı olumsuz etkileri engellemek için, ara ara flasklar invert mikroskop altında muayene edildi. Hücrelerin hemen hemen tamamının

flask tabanından ayrılmasını takiben flasklar emniyet kabini içerisine alınarak üzerilerine % 10 FBS içeren taze besleme medyumu eklenerek enzim aktivitesi sonlandırıldı. Her flastaki toplam canlı hücre sayısı tripan mavisi ve hemositometre ile belirlendi. Ardından flasklara, 1 ml'de son hücre sayısı  $3 \times 10^4$  olacak şekilde %10 FBS içeren besleme medyumu ilaveleri yapıldı. Önceden üzerileri deney gruplarına göre etiketlenmiş 24 kuyucuklu hücre kültürü ekim tabaklarının kuyucuklarına steril, 1,5 cm çapa sahip yuvarlak lameller yerleştirildi. Lamel yerleştirilmiş kuyucuklar içerisine 0,5 ml steril jelatin solüsyonu konularak 15 dakika boyunca lamellerin üst yüzeylerinin jelatin ile kaplanması beklendi. Süre bitiminde fazlalık jelatin emildi ve lamel yüzeylerinin kuruması sağlandı. Mililitresinde  $3 \times 10^4$  hücre bulunan süspansiyondan her bir kuyucuğa 1 ml ekilerek 37 °C'de karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık olarak 48 saat boyunca hücrelerin lameller üzerinde %80 konfluensiye ulaşmaları beklenerek süre bitiminde deneylere başlandı.

Broyler ve yumurtacı tavuklara ait gruplarda 0. saat kontrol grup hücreleri 48 saat bekleme süresini takiben medyumlar uzaklaştırıldıktan sonra yıkanıp tespit edilerek immunositokimyasal boyamaları yapıldı. Altı ve 12. saat kontrol gruplarındaki hücrelerde ise, 48 saatlik inkübasyonu takiben, hücreler üzerine 1 ml, FBS ve antibiyotik-antimikotik içermeyen medyum ilave edilip 6 ve 12 saat boyunca inkübe edildiler. Süre bitiminde kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılıp, hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tespit ve immunositokimyasal boyamaları yapıldı.

### **Hücrelerin hipoksik strese maruz bırakılması**

Hipoksi grubundaki hücrelerin ekili olduğu 24 kuyucuklu hücre kültürü ekim tabaklarının her bir kuyucuğuna 1 ml, FBS ve antibiyotik-antimikotik içermeyen M199 medyumu konularak 2,5 litrelik özel hipoksi kamaralarına yerleştirildi. Kamaralar içerisine ortamdaki oksijeni bağlayan askorbik asit içeren zarflar ağızları açılarak kondu. Kamaraların ağızları sıkıca kapatıldı ve inkübatöre yerleştirilerek deney süreleri boyunca (6 ve 12 saat) inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon süresinin bitiminde kamaraların kapakları açılarak 24 kuyucuklu hücre kültür tabakları biyolojik emniyet kabini içerisine alındı. Her bir kuyucuktaki deney medyumu steril olarak Eppendorf tüplerinde toplandı ve -20 °C' de donduruldu. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra soğuk aseton ile tespit edilip immunositokimyasal boyamaları yapıldı (98, 99).

## **Hücrelerin hiperozmotik strese maruz bırakılması**

Deney günü, 24 kuyucuklu hücre kültürü kapları içerisindeki lameller üzerine ekilen ve yaklaşık % 80 yoğun hale gelen hücreler inkübatörden alınarak emniyet kabini içerisine nakledildi. Kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 37 °C'ye ısıtılmış Krebs ringer bikarbonat solüsyonu ile 2 dakika boyunca yıkandı. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücrelerin bulunduğu kuyucuklara, antibiyotik-antimikotik ve FBS içermeyen, 1ml, 160 mmol tuz (Sigma, S7653) konsantrasyona sahip M199 medyumunu eklenerek 6 saat boyunca inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresinin bitiminde kültür tabakları emniyet kabinine alındı ve kuyucuklardaki medyumlar steril Eppendorf tüplerde toplanarak -20 °C'de saklandı. Hipoksi ve hiperozmotik stresin birlikte uygulandığı 6 saat grubundaki hücrelerin üzerine, 1 ml 160 mmol tuz konsantrasyonuna sahip M199 medyumunu eklendi ve bu gruptaki hücreler hipoksiye de maruz bırakılmak için özel kamaralara alınarak inkübe edildiler (101).

## **İmmunositokimyasal Boyama**

Ön denemelerde ve deneylerde kullanılan hücrelerin immunositokimyasal boyaması aynı yöntemle, tek bir kişi tarafından (AA) gerçekleştirildi. Deney medyumları biyolojik emniyet kabini içerisinde, steril olarak Eppendorf tüpleri içerisine alındı ve -20 °C'de saklandı. Tüm deneyler sonrasında 24 kuyucuklu hücre kültürü tabakları içerisindeki lameller üzerinde üreyen hücreler monoklonal antikolar kullanılarak Streptavidin biyotin peroksidaz tekniği ile boyandı. Boyamalar için, her bir kuyucuk 37 °C'ye ısıtılmış, 1 ml fosfat tampon tuz solüsyonu (PBS) ile iki kez beş dakika yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar içerisine 0,5 ml, -20 °C'ye soğutulmuş aseton eklenerek -20 °C'de (Derin dondurucu içinde) 10 dakika boyunca tespit edildi. Tespit işlemini takiben kuyucuklardaki aseton pipetlenerek uzaklaştırıldı. Kuyucuk içinde arda kalan asetonun uzaklaştırılması için 24 kuyucuklu hücre kültürü kapları ağzı açık vaziyette oda sıcaklığında 2–3 dakika bekletildi. Bir ml PBS ile kuyucuklar iki kez beş dakika boyunca yıkandı. Takiben kuyucuklar içerisine ticari olarak satılan protein bloklama solüsyonundan lamellerin üzerini kapatacak kadar eklendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Protein bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi yapılmaksızın kuyucuklarda lameller üzerinde üremiş hücrelerin üstüne primer antikor konularak 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu

takiben primer antikor uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 1 ml PBS ile iki kez beş dakika yıkandı. Takiben sekonder antikor kuyucuklara döküldü ve oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildi. Süre bitiminde kuyucuklar 1 ml PBS ile iki kez beş dakika yıkandı. Kuyucuklara streptavidin biyotin kompleks eklenerek yarım saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Kuyucuklar 1 ml PBS ile iki kez beş dakika yıkandı. Lameller üzerine amino etil karbazol (amino-ethyl carbazole, AEC) ilave edildi ve 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde kuyucuklar AEC uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml çeşme suyu ile iki kez beş dakika yıkandı. Kuyucuklara 0,5 ml Mayer Hematoksilen dökülerek 15–20 dakika karşı boyama yapıldı. Lameller kuyucuklardan ucu kıvrılmış insülin enjektörleri ve ince pensler yardımıyla çıkarıldı. Önceden üzerileri etiketlenen temiz lamalar üzerine bir damla immunmount damlatıldı ve kuyucuklardan çıkarılan lameller ters çevrilerek bu lamalar üzerine yapıştırıldı. Bir gece oda sıcaklığında bekletildikten sonra lamellerin etrafları entellan sürülerek lam lamel arasına hava girişi engellendi (102).

### **İmmunositokimyasal Değerlendirme**

Kontrol ve deney gruplarına ait akciğer dokusundan izole edilen fibroblastların, tüm kontrol ve deney gruplarındaki boyanma sonuçları iki farklı araştırmacı tarafından değerlendirildi. İmmunositokimyasal skorlamada boyanmanın dağılımı ve yoğunluğu göz önüne alınarak, 0: negatif, 1(+):zayıf, 2(+): orta, 3(+): iyi ve 4(+) çok iyi arasında değerlendirmeler yapıldı. Her bir gruba ait 3 farklı lamel üzerinde ekilen hücrelerin genel inceleme sonrası, X400 büyütmede rastgele seçilen 10 objektif alanında ve her bir alanda asgari 120 adet hücre muayene edilerek skorlamalar yapıldı. Toplam olarak her bir hayvana ait 3600 adet fibroblast hücresi değerlendirildi. Farklı iki araştırmacı (AA, MÖÖ) tarafından yapılan skorlamaların aritmetik ortalaması alınarak grubun son değerlendirme rakamları olarak kaydedildi (102, 103).

### **İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel analizler bilgisayar tabanlı SPSS (SPSS versiyon 11,5 SPSS Inc., Chicago, A.B.D.) programı kullanarak yapıldı. İstatistiksel analizler için broyler deney gruplarındaki hücreler kendi gruplarındaki ve saat kontrolleriyle, yumurtacı grubundaki hücreler de yine kendi gruplarındaki ve saat kontrolü hücreleri ile karşılaştırıldı. Broyler ve yumurtacı grupların karşılıklı olarak analizlerinde her bir broyler grubu ona eş olan



yumurtacı gruptaki hücreler ile kıyaslandı. Deney gruplarının karşılaştırılabilmesi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi uygulandı.  $P < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama boyanma yoğunluğu (OBY) olarak tablolar ve şekillerde gösterildi (104).

## BULGULAR

### A- Hücre Kültürlerine Ait Bulgular

Deneyler 1 günlük, erkek, hiçbir aşı ve ilaç uygulanmamış, broyler ve yumurtacı civcivlerin akciğer dokularından eksplant hücre kültürü yöntemi ile üretilen primer fibroblastlar üzerinde uygulandı. Eksplant kültür hazırlamak için 3 adet broyler ve 3 adet yumurtacı civciv kullanıldı. Her gruba ait 3'er civcivden alınan akciğer dokuları ve izole edilen hücreler deneylerde kullanıldı. Hücrelerin izolasyonu, pasajlamalar ve deneyler sırasında elde edilen sonuçlar bu üç eksplant kültür örneğinden izole edilip deneylerde kullanılan hücrelerden elde edilen değerlerin ortalaması alınarak Tablo 2 –7' de verilmiştir.

### A1- Broyler Civcivlere Ait Eksplant ve Enzimatik Kültür Bulguları

Büyükükleri 0,3 cm x 0,3 cm olan akciğer ve deri eksplant örnekleri jelatin kaplı 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarının her bir kuyucuğuna bir eksplant gelecek şekilde ekildi. Akciğer örneklerinde, ekim sonrasındaki 2 gün boyunca eksplant etrafında eritrositler ve serumdan oluşan yoğun bir pıhtı tabakası gözlemlendi. Üçüncü günden itibaren bu pıhtı tabakasının alt tarafından iç şekilli hücrelerin eksplant dışına doğru üremeye başladıkları görüldü (Şekil–1). Daha sonraki günlerde kültür tabaklarında görülen üremeler Şekil–2, -3 ve 4'te gösterilmiştir. Üremelerin adaptasyon periyodunun ardından hızla devam ederek 8–11. günlerde kültür tabağının tabanını doldurduğu (konflense-yoğunlaşma) görüldü (Şekil–5, -6).

Deri eksplantlarında ise akciğer örneklerinden farklı olarak eksplant etrafında yoğun serum ve pıhtı oluşumu gözlenmedi. Deri eksplantlarının kültür tabağının tabanına yapışma özelliklerinin akciğer dokusuna ait eksplantların kültür tabağının tabanına yapışma özelliklerinden daha fazla olduğu görüldü. Genel olarak ekim sonrası deri eksplantlarında ilk üremenin 2. günden itibaren başladığı görüldü.

Tablo–2,-4 arasında broyler tavukların akciğer ve deri örneklerinden eksplant ve enzimatik yöntemle elde edilen hücrelerin ilk üreme günleri, konfluense (yoğunlaşma) ulaşma zamanları ve pasajlamalarda elde edilen canlı hücre sayıları verilmiştir.

**Tablo–2** Akciğer ve deri dokusundan hazırlanan eksplant kültürlerde ilk üremelerin görüldüğü gün, yoğunlaşma zamanı, tripsinizasyon günleri.

Hücre Kodları	İlk üremelerin görüldüğü gün	Kuyucuklarda yoğunlaşma günü	İlk tripsinizasyon günü	Elde edilen canlı hücre sayısı (sayı/kuyucuk)
L1, L2, L3	3	8	9	$4,9 \times 10^5$
D1,D2,D3,D4, D5	2	8	8	$5,1 \times 10^5$

Akciğer ve deri eksplantlarından tripsinizasyon ile elde edilen hücreler ilk pasajda yüzeyi jelatin kaplanmış  $25 \text{ cm}^2$  eğik boyunlu hücre kültürü şişelerine 2. ve daha sonraki pasajlarda ise  $75 \text{ cm}^2$  eğik boyunlu hücre kültürü şişelerine ekildi. Standart olarak tüm hücreler %10 FBS ve 2X antibiyotik içeren M199 medyumunu ile gün aşırı beslenerek  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı

**Tablo–3** Broyler akciğer ve deri dokusundan izole edilen bağ doku hücrelerinin P1 ve P2'deki önemli sayısal verileri (P1-  $25 \text{ cm}^2$ , P2-  $75 \text{ cm}^2$  hücre kültürü şişesi için).

	Flasklardaki yoğunlaşma günü	Tripsinizasyon (pasaj) günü	Elde edilen canlı hücre sayısı/flask
L1, L2, L3 (P1)	5	6	$3 \times 10^6$
L1, L2, L3 (P2)	6,5	7	$11 \times 10^6$
D1, D2, D3, D4, D5 (P1)	4,5	5	$3,12 \times 10^6$
D1, D2, D3, D4, D5 (P2)	6	6	$12 \times 10^6$

P: pasaj

Hipoksi ve hiperozmotik stres deneyleri sırasında akciğer dokusuna ait saf kültür haline getirilen 3. ve 6. pasajlar arasındaki fibroblastlar kullanıldı. Deri dokusundan izole edilen bağ doku hücreleri akciğer dokusundan kültüre edilen hücrelerin immunositokimyasal karakterizasyonu sırasında pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Enzimatik sindirim ile hücre izolasyon yöntemi sadece akciğer dokusu için uygulandı ve bu yöntemle elde edilen hücreler ön denemeler sırasında immunositokimyasal boyamalarda kullanıldı.

Eksplant doku kültüründen farklı olarak enzimatik sindirim sonrası elde edilen hücreler ilk pasaj için jelatin kaplı  $25 \text{ cm}^2$  eğik boyunlu hücre kültürü şişelerine ardından 2. pasaj için jelatin ile kaplanmış  $75 \text{ cm}^2$  eğik boyunlu hücre kültürü şişelerine ekilerek inkübe edildi. Hücre kültürü ekim şişeleri ekim sonrası 2 gün boyunca inkübatörde

bekletilerek hücrelerin eğik boyunlu hücre kültürü şişesinin tabanına çökerek yapışmaları sağlandı.

Enzimatik sindirime tabi tutularak elde edilen akciğer dokusuna ait bağ doku hücreleri için yoğunlaşma ve tripsinizasyon günleri ile elde edilen canlı hücre sayıları aşağıda verilmiştir.

**Tablo- 4** Broiler akciğer dokusundan enzimatik yolla elde edilen hücrelere ait sayısal veriler.

	Yoğunlaşma günü	Tripsinizasyon günü	Canlı hücre sayısı/flask
L4, L5 (P1)	4	5	$3 \times 10^6$
L4, L5 (P2)	5	6	$12 \times 10^6$

## A2-Yumurtacı Cıvıcılara Ait Eksplant ve Enzimatik Kültür Bulguları

Yumurtacı tavukların akciğer ve derilerinden hazırlanan eksplant kültürlerde, broiler tavuklar için takip edilen yol izlendi. Yumurtacı tavukların akciğer ve deri dokularından eksplant ve enzimatik sindirim ile elde edilen hücrelere ait sayısal veriler Tablo-5-7 arasında özetlenmiştir.

**Tablo-5** Akciğer dokusundan hazırlanan eksplant kültürlerde ilk üremelerin görüldüğü gün, yoğunlaşma zamanı, tripsinizasyon günleri ve elde edilen canlı hücre sayıları

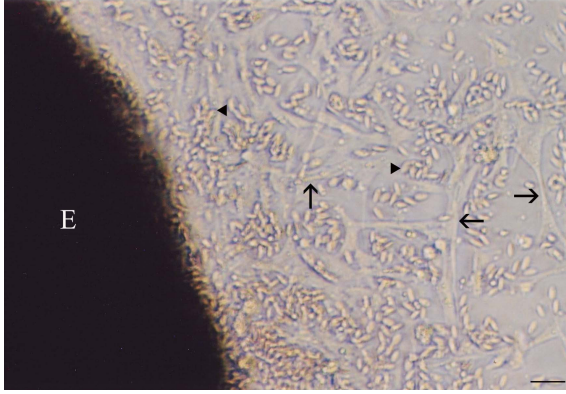
	İlk üremelerin görüldüğü gün	Kuyucuklarda yoğunlaşma günü	İlk tripsinizasyon günü	Elde edilen canlı hücre sayısı (sayı/kuyucuk)
L1, L2, L3	4	10	11	$5 \times 10^5$
D1, D2, D3, D4, D5	3	9	10	$5,2 \times 10^5$

**Tablo-6** Akciğer dokusundan izole edilen bağ doku hücreleri için, P1 ( 25 cm<sup>2</sup> flask için)

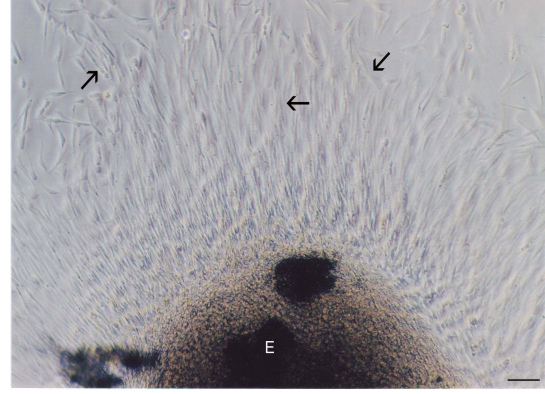
	Yoğunlaşma günü	Tripsinizasyon günü	Canlı hücre sayısı/flask
L1,L2,L3 (P1)	6	7	$3 \times 10^6$
D1, D2, D3, D4, D5 (P1)	6	7	$2,9 \times 10^6$
L1, L2, L3 (P2)	7	8	$10,8 \times 10^6$
D1, D2, D3, D4, D5 (P2)	7	7	$11 \times 10^6$

**Tablo-7** Akciğer dokusundan hazırlanan enzimatik kültür bulguları, P1 (25 cm<sup>2</sup> flask için)

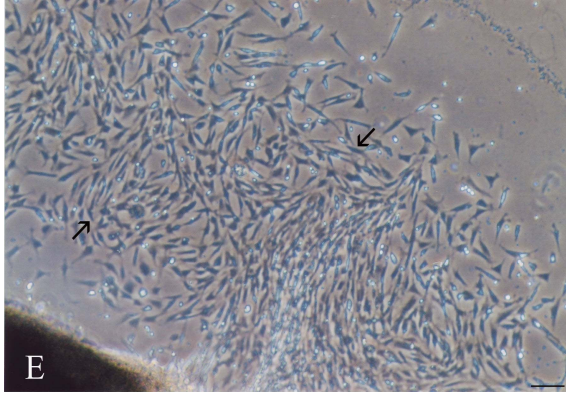
	Yoğunlaşma günü	Tripsinizasyon günü	Canlı hücre sayısı/flask
L4, L5 (P1)	5	5	3,1 x 10 <sup>6</sup>
L4, L5	7	7	11 x 10 <sup>6</sup>



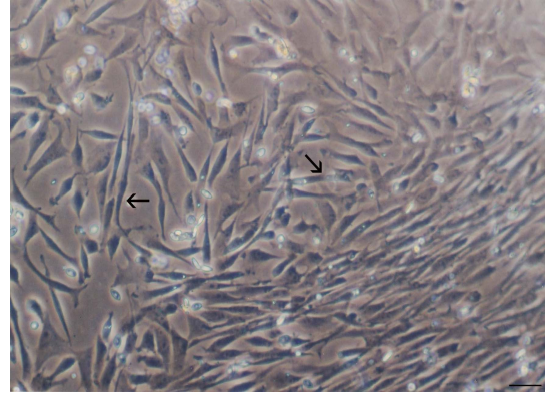
1



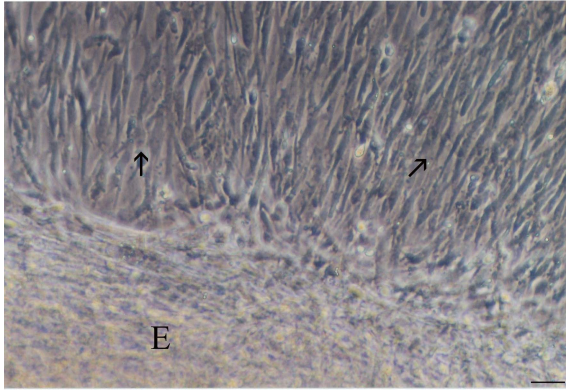
2



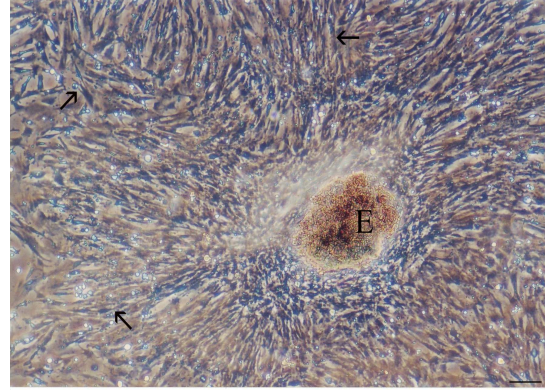
3



4



5



6

**Şekil-1** Akciğer eksplant doku (E) ve ilk üremeler (oklar), eritrositler (ok başı), 3. gün, invert mikroskop görüntüsü. Bar = 60  $\mu$  (L1)

**Şekil-2** Akciğer eksplant doku (E), mekik şekilli primer fibroblastlar (oklar), 5. gün, invert mikroskop görüntüsü. Bar = 15  $\mu$  (L1)

**Şekil-3** Akciğer eksplant doku (E), primer fibroblastlar (oklar), invert mikroskop görüntüsü. Bar = 15 $\mu$  (L2)

**Şekil-4** Primer akciğer fibroblastları (oklar), 7. gün invert mikroskop görüntüsü. Bar = 30  $\mu$  (L3)

**Şekil-5** Deri eksplant doku (E), primer fibroblastlar, 5. gün, invert mikroskop görüntüsü. Bar = 30 $\mu$  (D1)

**Şekil-6** Akciğer eksplant doku (E), primer fibroblastlar (oklar), 8. gün, invert mikroskop görüntüsü. Bar = 15  $\mu$  (L3)

### A3- Ön Deneme Bulguları

Hipoksik ve hiperozmotik stresin hücreler üzerinde yaratabileceği etkileri test edebilmek ve deney sürelerini belirleyebilmek için ön denemeler yapıldı. Akciğer dokusundan elde edilen primer fibroblastlar sırasıyla, 1) Değişen saatlerde hipoksiye, 2) Değişen saatlerde hiperosmozise maruz bırakıldılar.

Akciğer dokusundan izole edilen  $3 \times 10^4$  primer fibroblast, 24 kuyucuklu hücre ekim tabaklarına ekildi. Hücrelerin kültür tabağına yapışmasının ardından 6 ve 12 saat süreyle hipoksiye maruz bırakıldı. On iki saate kadar olan hipoksi uygulamalarında hücrelerin morfolojilerinde, deney öncesi ve deney sonrası sayılarında çok fazla değişiklik olmadığı görüldü. Yapılan ön denemelerde 24 saat hipoksiye maruz bırakılan kuyucuklardaki hücrelerin hemen hepsinin kültür tabağı zeminden ayrılmış oldukları görüldü.

Hiperozmotik stres uygulamalarında ise hücrelerin daha hassas oldukları ve 6 saati aşan stres uygulamalarında kültür tabaklarında çok fazla hücre kaybının olduğu gözlemlendi.

### B- İmmünotokimyasal Boyama Bulguları

#### Hücrelerin Karakterizasyonu

Akciğer dokusundan izole edilen hücrelerin çalışmada kullanılması planlanan fibroblast hücreleri olup olmadıklarını anlamak için anti-sitokeratin ve anti-vimentin gibi 2 farklı antikör ile immünotokimyasal boyamaları yapılmıştır. İmmünotokimyasal boyamalarda pozitif kontrol olarak aynı hayvanlara ait deri eksplantlarından izole edilen fibroblastlar kullanılmıştır. Bu boyamalara ait sonuçlar Tablo-8 özetlenmeye çalışılmıştır.

**Tablo-8** Akciğer ve deri fibroblastlarının anti-sitokeratin ve anti-vimentin ile boyanma sonuçları.

	Anti-sitokeratin	Anti-vimentin
Deri eksplantlarından izole edilen fibroblastlar	-	+
Akciğer dokusundan izole edilen fibroblastlar	-	+

Boyamalar neticesinde deri ve akciğer dokusundan izole edilen hücrelerin sitokeratin negatif (-) ve vimentin pozitif (+) olması, morfolojik özellikler ile birlikte, izole edilen hücrelerin mezenşimal orijinli fibroblastlar olduğunu göstermiştir.

### **Normal hücrelerde MMP–2 antikoruna ile yapılan boyamalar**

Broyler ve yumurtacı tavukların akciğer dokularından izole edilen primer fibroblastlarda MMP–2 enziminin hücrelerde intrasitoplazmik ve kırmızı granüler tarzda boyandığı görüldü.

### **Normal hücrelerde MMP–9 antikoruna ile yapılan boyamalar**

Broyler ve yumurtacı tavukların akciğer dokularından izole edilen primer fibroblastlarda antikor ile pozitif reaksiyona rastlanmadı.

### **Normal hücrelerde TIMP–1 antikoruna ile yapılan boyamalar**

Broyler ve yumurtacı tavukların akciğer dokularından izole edilen primer fibroblastlarda tıpkı MMP–2 enziminde olduğu gibi hücrelerde intrasitoplazmik yerleşimli ve granüler görünümüne pozitif boyanmalara rastlandı.

### **Normal hücrelerde TIMP–2 antikoruna ile yapılan boyamalar**

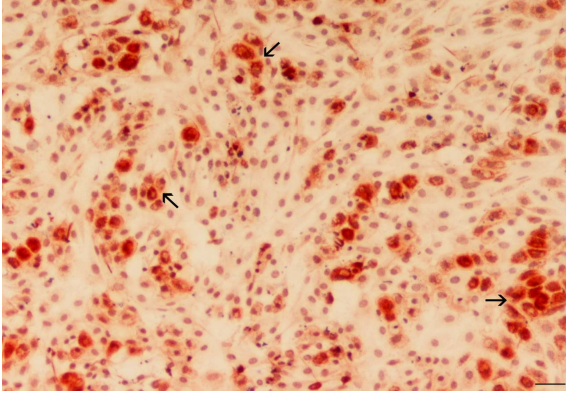
Broyler ve yumurtacı tavukların akciğer dokusundan izole edilen kontrol ve deney gruplarına ait primer fibroblastlarda pozitif reaksiyona rastlanmadı.

### **Deney Gruplarında İmmunositokimyasal Boyamalar**

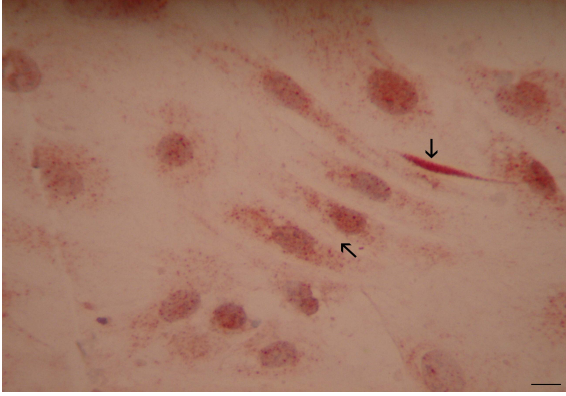
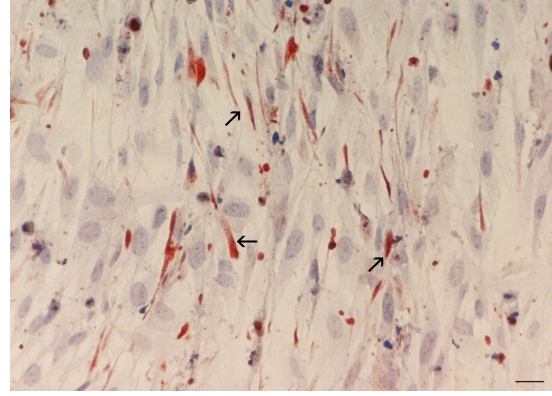
Kontrol gruplarında olduğu gibi deney gruplarındaki hücrelerde de benzer boyanma özellikleri görüldü. MMP–2 ve TIMP–1 kültüre edilmiş akciğer fibroblastlarında pozitif olarak boyanırken MMP–9 ve TIMP–2 ne deney gruplarında ne de kontrol gruplarında pozitif olarak boyandı. İntrasitoplazmik ve granüler tarzda boyanan enzimlerin kontrol gruplarında, hipoksi, hiperomosis ve hipoksi-hiperosmosis deney gruplarında farklı yoğunluk ve dağılımda oldukları görüldü.

Akciğer dokusuna ait normal hücreler ve deney gruplarındaki hücreler ile yapılan immunositokimyasal boyamalara ait resimler Şekil–7, –24 arasında gösterilmiştir.

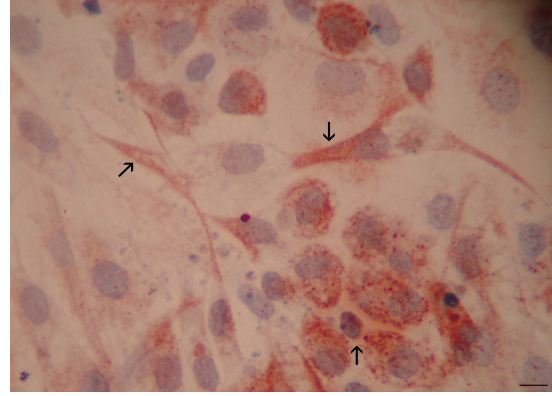




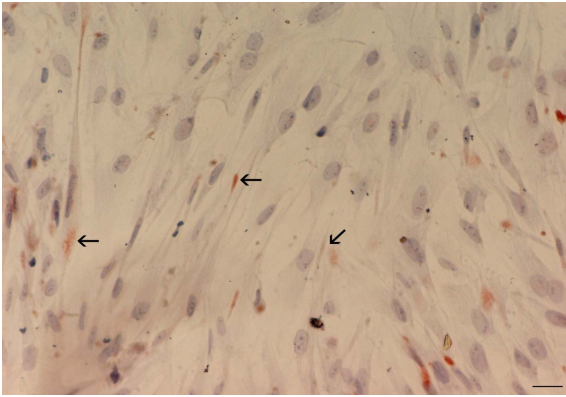
7



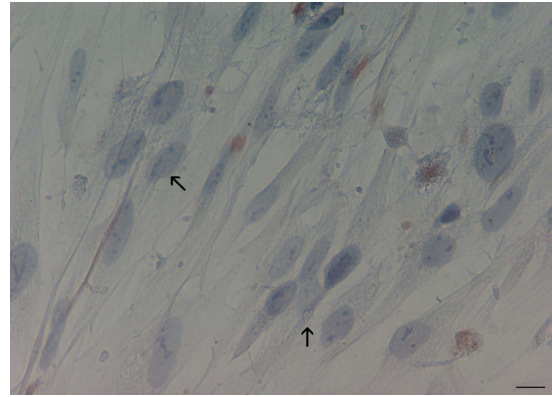
9



10



11



12

**Şekil-7** Broiler, 0. saat kontrol grubu, MMP-2 pozitif boyanma (oklar), Streptavidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (StreptABC), Skor 4+, Bar = 15  $\mu$

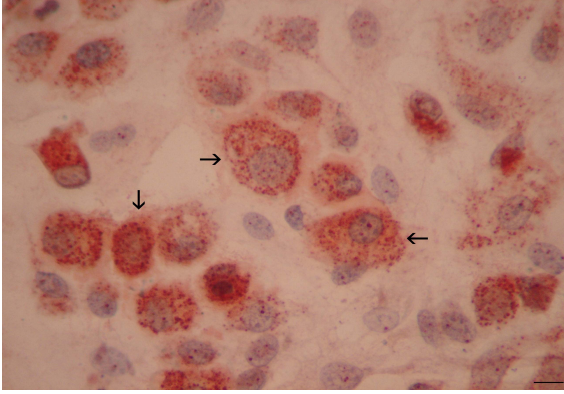
**Şekil-8** Broiler, 6 saat hipoksi, MMP-2 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 2+, Bar = 30  $\mu$

**Şekil-9** Broiler, 6 saat hiperosmosis, MMP-2 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 3+, Bar = 60  $\mu$

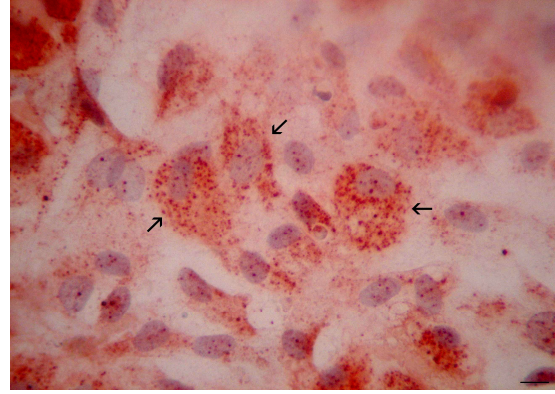
**Şekil-10** Broiler 6 saat kontrol grubu, MMP-2 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 4+, Bar = 60  $\mu$

**Şekil-11** Broiler, 12 saat hipoksi, MMP-2 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 1+, Bar = 30  $\mu$

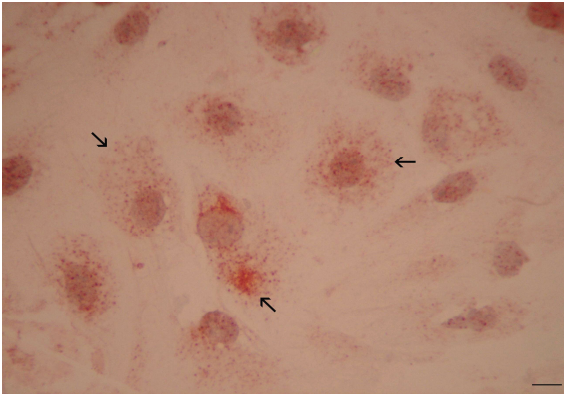
**Şekil-12** Broiler, kontrol grubu, MMP-9 negatif boyanma (oklar), StreptABC, Bar = 60  $\mu$



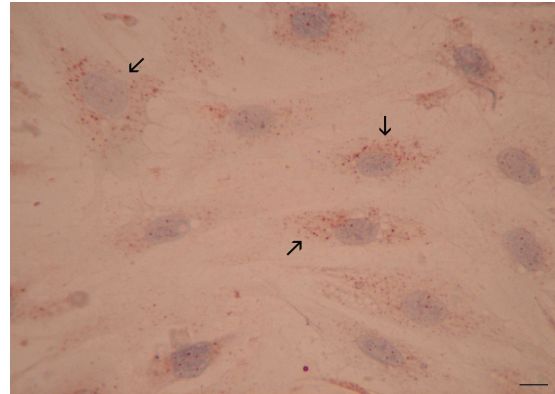
13



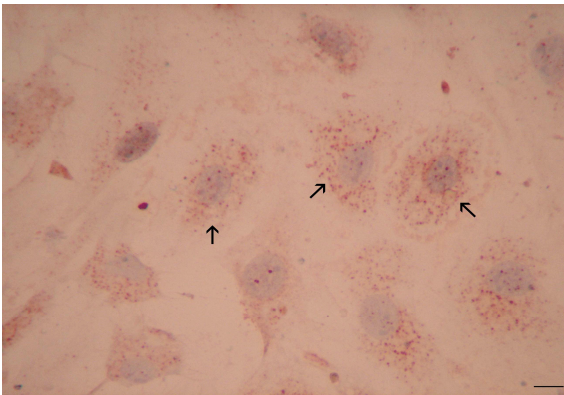
14



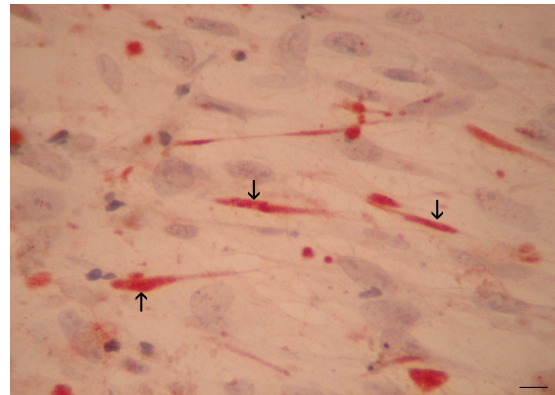
15



16



17



18

**Şekil-13** Yumurtacı, 0. saat kontrol grubu, MMP-2 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 4+, Bar = 60 µ

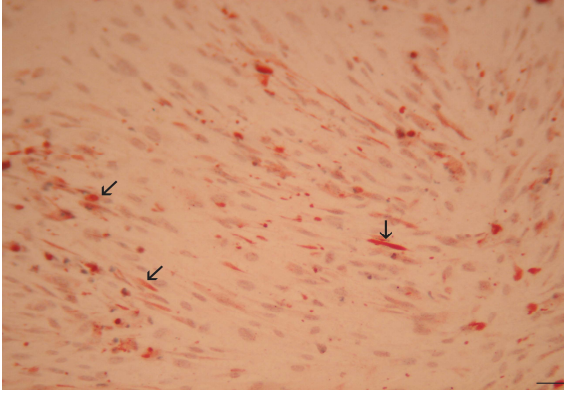
**Şekil-14** Yumurtacı, 0. saat kontrol grubu, MMP-2, pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 3+, Bar = 60 µ

**Şekil-15** Yumurtacı, 6 saat hiperosmosis, MMP-2, pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 2+, Bar = 60 µ

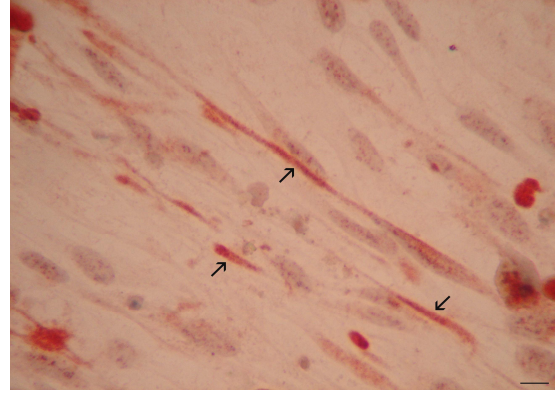
**Şekil-16** Yumurtacı, 12 saat hipoksi, MMP-2, pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 1+, Bar =

**Şekil-17** Yumurtacı, 6 saat hipoksi+hiperosmosis, MMP-2, pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 1+, Bar = 60 µ

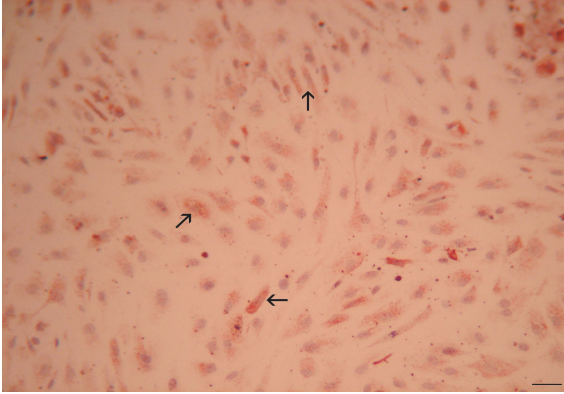
**Şekil-18** Yumurtacı, 6 saat hipoksi, MMP-2, pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 2+, Bar = 60 µ



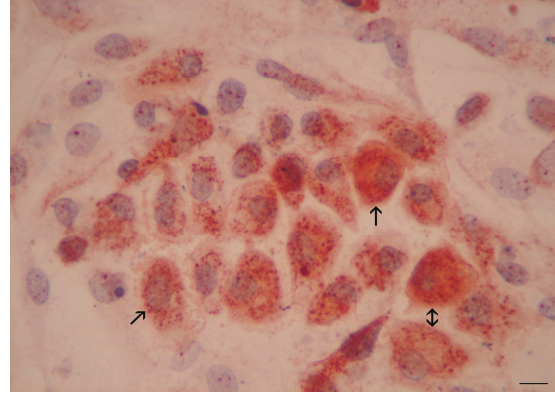
Şekil-19



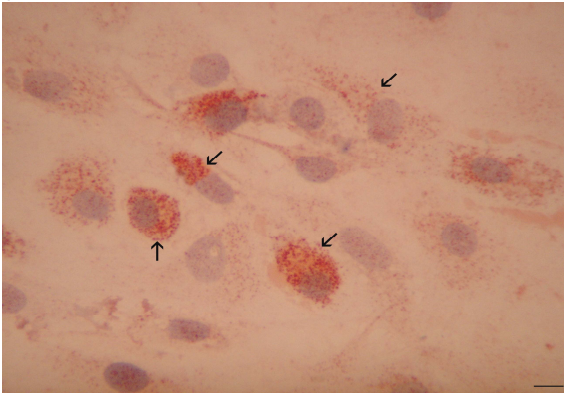
Şekil-20



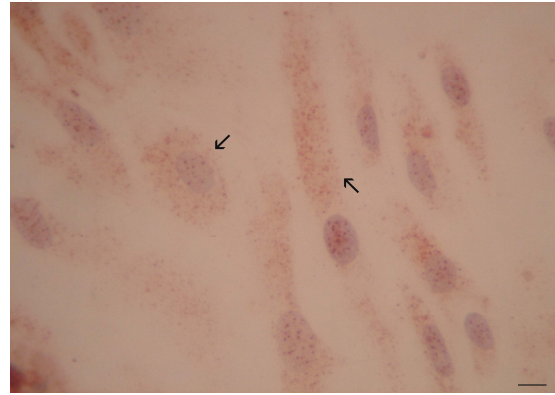
Şekil-21



Şekil-22



Şekil-23



Şekil-24

Şekil-19 Broyler, kontrol grubu, TIMP-1 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 4+, Bar = 15 µ

Şekil-20 Broyler, 6 saat hipoksi+hiperosmosis, TIMP-1 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 3+, Bar = 60 µ

Şekil-21 Broyler, 6 saat hipoksi, TIMP-1 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 2+, Bar = 30 µ

Şekil-22 Broyler, kontrol grubu, TIMP-1 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 4+, Bar = 60 µ

Şekil-23 Yumurtacı, 6 saat hiperosmosis, TIMP-1 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 3+, Bar = 60 µ

Şekil-24 Yumurtacı, 6 saat hipoksi+hiperosmosis, TIMP-1 pozitif boyanma (oklar), StreptABC, Skor 1+, Bar = 60 µ

## C-İmmunositokimyasal Skorlama Sonuçları

Ortalama boyanma yoğunluğunun (OBY) hesaplanması sırasında, 3'er adet broyler ve yumurtacı civcivin akciğer dokusundan kültüre edilen bağ doku hücreleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Broyler grubu ve yumurtacı grubun ortalama boyanma yoğunluğu hesaplanırken, 3 bireyden gelen hücrelerin sahip olduğu değerlerin ortalaması alınarak grubun sahip olduğu değer bulunmuştur. Bu değerler Tablo-9'da verilmiştir.

**Tablo-9a, -b, -c** Broyler ve yumurtacı tavukların kontrol ve deney gruplarındaki akciğer fibroblastlarına ait ortalama boyanma yoğunlukları.

**Tablo-9a**

	0 saat	
	B	Y
<b>MMP-2</b>	2,87	2,7
<b>TIMP-1</b>	1,7	2,65

**B:** Broyler

**Y:** Yumurtacı

**Tablo-9b**

Broyler Yumurtacı	6 saat kontrol		6 saat hipoksi		6 saat tuz		6 saat tuz+hipoksi	
	B	Y	B	Y	B	Y	B	Y
<b>MMP-2</b>	2,62*	2,60	0,9*	1,05	0,84	1,57	0,3***	0,85
<b>TIMP-1</b>	1,27	2,68	0,8***	1,5	0,97	1,16	0,31	0,85

**Tablo-9c**

Broyler Yumurtacı	12 saat kontrol		12 saat hipoksi	
	B	Y	B	Y
<b>MMP-2</b>	1,86*	2,71**	0,25*	0,7**
<b>TIMP-1</b>	1,2	2,55	0,5***	0,96

p<00,5

Bu sonuçlara göre hem broyler hem de yumurtacı tavuklarda, hipoksi, hiperosmosis ve hipoksi-hiperosmosis uygulanmış fibroblastlarda, MMP-2 ve TIMP-1 enzimlerinin ortalama boyanma yoğunluklarının kendi kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca broyler grubuna ait hücrelerin, hipoksik, hiperozmotik ve hipoksik-hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları ortalama boyanma yoğunluklarının yumurtacı gruba ait hücrelerin hipoksik, hiperozmotik ve hipoksik-hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları ortalama boyanma yoğunluklarından daha düşük olduğu görüldü.

## C1- Hipoksik Stres

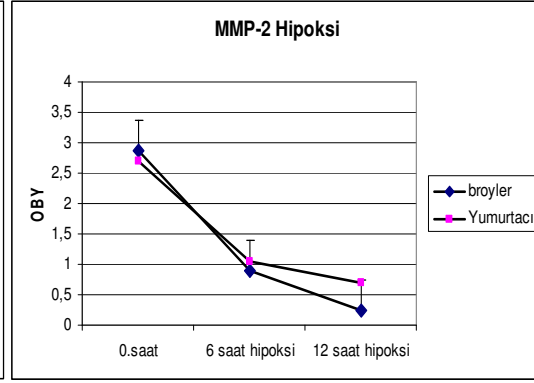
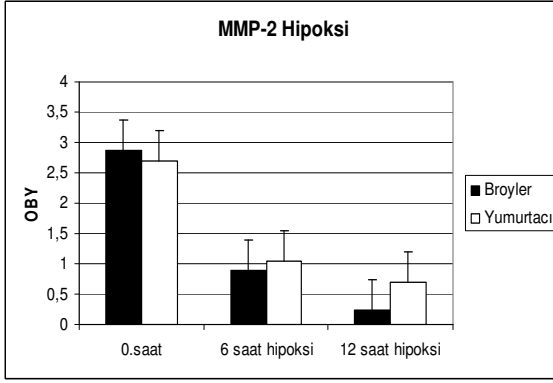
Broyler ve yumurtacı gruplara ait hücreler 6 ve 12 saat süreyle hipoksiye maruz bırakılmışlardır.

Broyler grubundaki hücrelerde, 6 ve 12 saat hipoksi uygulamalarında elde edilen MMP-2 enzimine ait immunositokimyasal ortalama boyanma yoğunlukları kendilerine ait 6 saat ve 12 saat kontrol gruplarındaki hücrelerin sahip olduğu ortalama boyanma yoğunlukları ile karşılaştırıldıklarında ortaya çıkan farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Altı saat hipoksi grubundaki hücrelerin sahip olduğu MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu, 12 saat hipoksi grubundaki hücrelerin sahip olduğu ortalama boyanma yoğunluğu ile kıyaslandığında ortaya çıkan fark istatistiksel öneme sahipti ( $p < 0,05$ ).

Yumurtacı grubunda, 6 ve 12 saat hipoksiye maruz bırakılan hücrelerde ortalama boyanma yoğunlukları, kendi 6 saat kontrol ve 12 saat kontrol gruplarının ortalama boyanma yoğunluklarından daha düşüktü. Broyler grubundan farklı olarak istatistiksel olarak önemli farklılığa sadece 12 saat hipoksi grubu ile bu gruba ait 12 saat kontrol grubu karşılaştırıldığında rastlanmıştır ( $p < 0,05$ ).

Broyler ve yumurtacı gruplarda 6 saat ve 12 saat hipoksik stres sonrası gözlenen ortalama boyanma yoğunlukları birbirleri ile kıyaslandıklarında sadece 12 saat hipoksik stres grupları arasında ortaya çıkan farkın istatistiki öneme sahip olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ).

Broyler ve yumurtacı gruplarda 6 ve 12 saat hipoksik stres sonrası elde edilen ortalama boyanma yoğunlukları ve MMP-2 enziminin boyanma ortalamasındaki zamana bağımlı azalma Şekil-25a ve Şekil-25b'de gösterilmiştir. Şekil-25a,-25b'de görüldüğü gibi yumurtacı tavuklarda MMP-2 enziminin ortalama boyanma yoğunluğu 6 saat ve 12 saat hipoksik stres uygulaması sonrasında, broyler tavuklardaki ortalama boyanma yoğunluğundan daha yüksektir.

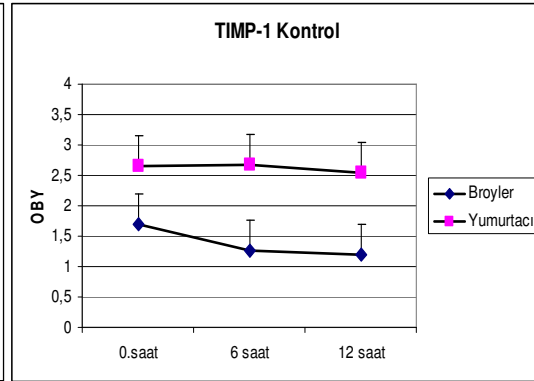
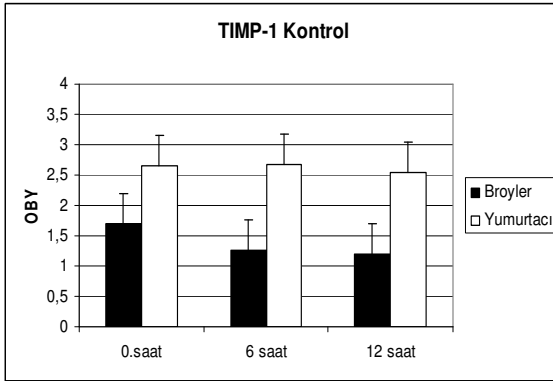


**Şekil-25a**

**Şekil-25b**

**Şekil-25a, b** Broyler ve yumurtacı gruplarda hipoksik stres sonrası MMP-2 enziminin, kontrol ve hipoksi gruplarındaki ortalama boyanma yoğunluğu.

TIMP-1 enziminin genel durumuna bakıldığında, broyler ve yumurtacı gruplarda 0, 6 ve 12 saat kontrol gruplarında, broylerlere ait boyanma skor ortalaması yumurtacılara göre daha düşük bulunmuştur (Şekil-26a, -26b).



**Şekil-26a**

**Şekil-26b**

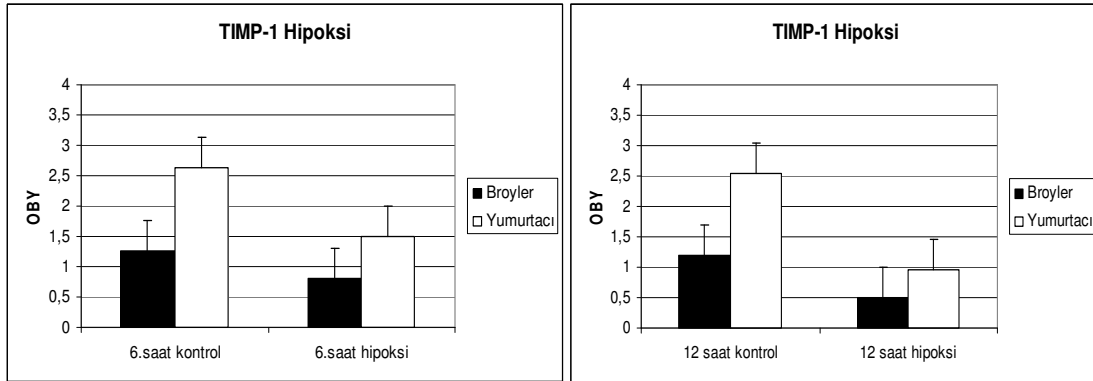
**Şekil-26** TIMP-1, Broyler ve yumurtacı gruplarda ortalama boyanma yoğunlukları.

Hipoksik strese 6 ve 12 saat süreyle maruz bırakılan broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerdeki ortalama boyanma yoğunlukları kendilerine ait 6 ve 12 saat kontrol grupları ile kıyaslandığında belirgin bir azalma görülmüştür (Şekil-27a, -b).

Broyler grubuna ait hücrelerde 6 saat ve 12 saat hipoksik stres uygulamalarından sonra elde edilen TIMP-1 ortalama boyanma yoğunlukları kendilerine ait 6 saat ve 12 saat kontrolleri ile kıyaslandığında istatistiksel önem bulunmazken 6 saat hipoksi ve 12 saat hipoksi grupları birbirleri ile karşılaştırıldıklarında iki grup arasında istatistiksel önem bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Yumurtacı gruba ait hücrelerde 6 saat hipoksi ve 12 saat hipoksik stres sonrası elde edilen TIMP-1 ortalama boyanma yoğunlukları kendilerine ait, 6 saat ve 12 saat kontrol grubu hücrelerin ortalama boyanma yoğunlukları ile kıyaslandığında gözlenen önemli farklılıkların sadece 12 saat hipoksi grubu ile bu gruba ait 12 saat kontrol grubu arasında olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ).

Broyler ve yumurtacı gruplarda 6 ve 12 saat hipoksik stres sonrası elde edilen TIMP-1 ortalama boyanma yoğunlukları karşılıklı olarak birbirleri ile kıyaslandıklarında önemli fark gözlenmemiştir.



Şekil-27a

Şekil-27b

Şekil-27a, -b TIMP-1, Hipoksi ve kontrol gruplarında ortalama boyanma yoğunlukları.

## C2-Hiperozmotik Stres

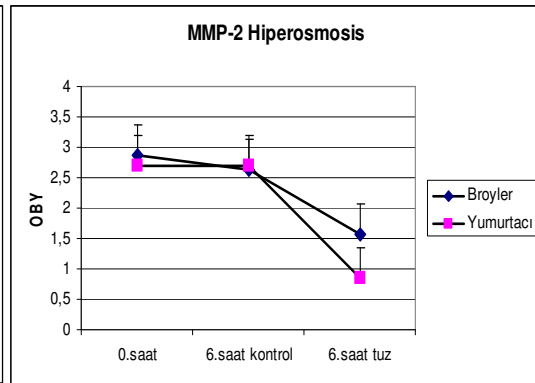
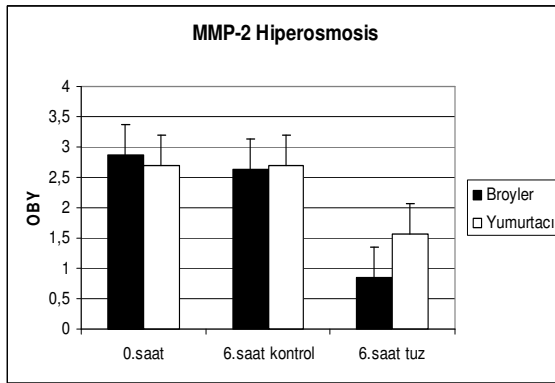
Deneylerde, ön denemelerden elde edilen bilgiler ışığında, hiperozmotik stres broyler ve yumurtacı gruplarda sadece 6 saat boyunca uygulandı. Broyler ve yumurtacı gruplarda, 6 saat hiperozmotik stres sonrası hücrelerde elde edilen ortalama boyanma yoğunlukları her grubun kendisine ait 6 saat kontrol grubunun ortalama boyanma yoğunluğundan daha düşüktü (Şekil-28).

Broyler grubuna ait hücrelerin 6 saat hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu ile kendilerine ait 6 saat kontrol hücrelerinin ortalama boyanma yoğunlukları arasında istatistiki açıdan önemli farklılık bulunmadı.

Yumurtacı gruba ait hücrelerin 6 saat hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu ile kendisine ait 6 saat kontrol grubu hücrelerin sahip oldukları ortalama boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı.

Broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerin 6 saat hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları MMP-2 ortalama boyanma yoğunlukları broyler ve yumurtacı gruplar arasında karşılıklı olarak incelendiğinde gözlenen farklılığın istatistiki öneme sahip olmadığı görüldü.

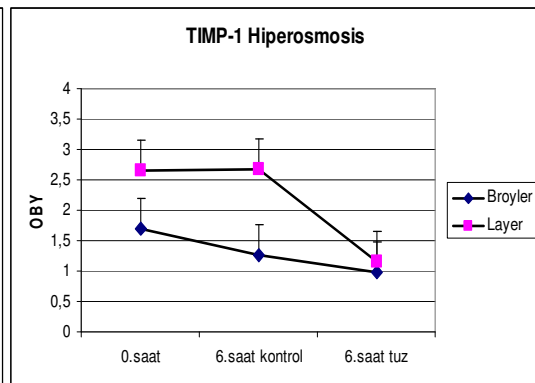
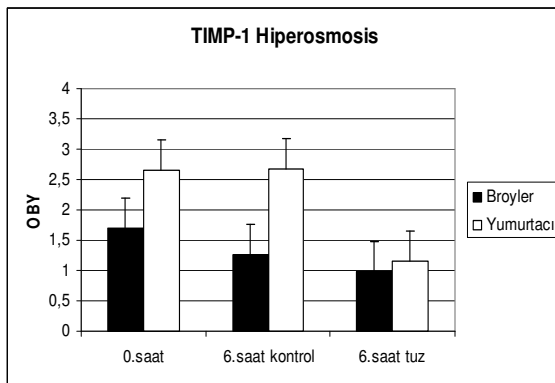
Broyler ve yumurtacı gruba ait hücrelerde TIMP-1 enziminin 6 saat hiperozmotik stres sonrası gösterdiği ortalama boyanma yoğunluğu, broyler ve yumurtacı grupların kendi içlerindeki 6 saat kontrolleriyle kıyaslandıklarında önemli fark bulunamadı. Broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerin 6 saat hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları ortalama boyanma yoğunlukları broyler ve yumurtacı gruplar arasında karşılıklı sorgulandığında önemli farklılıklar görülmemiştir (Şekil-29).



Şekil-28a

Şekil-28b

Şekil-28a, -b MMP-2, deney ve kontrol gruplarındaki ortalama boyanma yoğunlukları.



Şekil-29a

Şekil-29b

Şekil-29a, -b TIMP-1, kontrol ve deney gruplarında ortalama boyanma yoğunlukları.



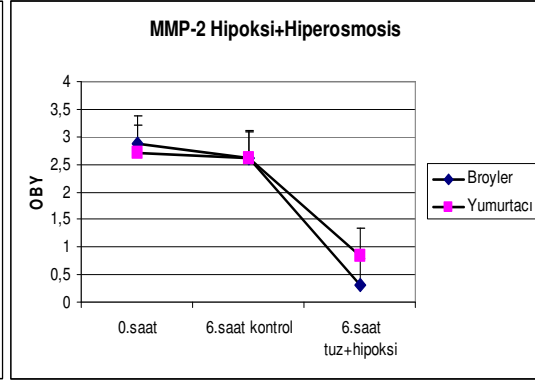
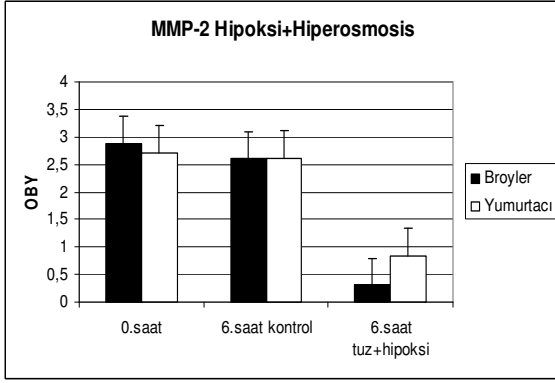
### **B3- Hipoksik + Hiperozmotik Stres**

Broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerde hipoksik ve hiperozmotik stres birlikte 6 saat boyunca uygulandı. Altı saat hipoksik-hiperozmotik stresin uygulandığı hücrelerden elde edilen MMP-2 ve TIMP-1 ortalama boyanma yoğunlukları kendilerine ait 6 saat kontrol gruplarındaki hücrelerin sahip olduğu ortalama boyanma yoğunluğundan daha düşüktü (Şekil-30).

Broyler grubuna ait hücrelerde hipoksik-hiperozmotik stres sonrası elde edilen MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu hem tek başına 6 saat süreyle hipoksik strese hem de tek başına 6 saat süreyle hiperozmotik strese maruz bırakılan hücrelerin sahip olduğu ortalama boyanma yoğunluklarından daha düşüktü. Altı saat hipoksik-hiperozmotik stres grubuna ait hücrelerin sahip olduğu MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu kendi grubuna ait 6 saat kontrol grubundaki hücrelerin sahip olduğu MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu ile kıyaslandığında ortaya çıkan fark istatistiksel öneme sahipti ( $p < 0,05$ ). Broyler grubuna ait hücrelerde hipoksik-hiperozmotik stres sonrası elde edilen MMP-2 boyanma skoru ortalaması, 6 saat hipoksik stres ve 6 saat hiperozmotik stres gruplarıyla teker teker karşılaştırıldığında istatistiksel önem bulunamadı.

Yumurtacı gruba ait hücrelerin 6 saat hipoksi-hiperozmotik stres sonrası sahip olduğu MMP-2 ortalama boyanma yoğunluğu, kendisine ait 6 saat kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmadı. Altı saat hipoksik-hiperozmotik stres sonrası elde edilen ortalama boyanma yoğunluğu, 6 saat hipoksi ve 6 saat hiperozmotik stres sonrası elde edilen ortalama boyanma yoğunlukları ile birebir karşılaştırıldığında da önemli farklılıklar görülmedi.

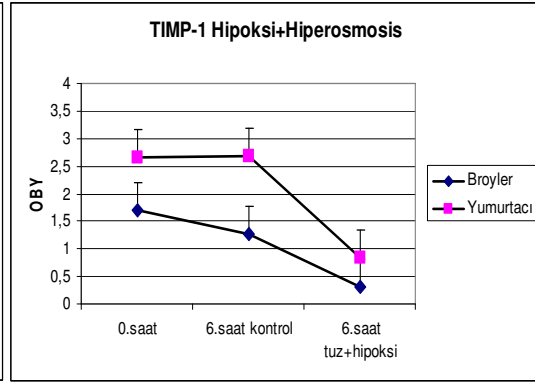
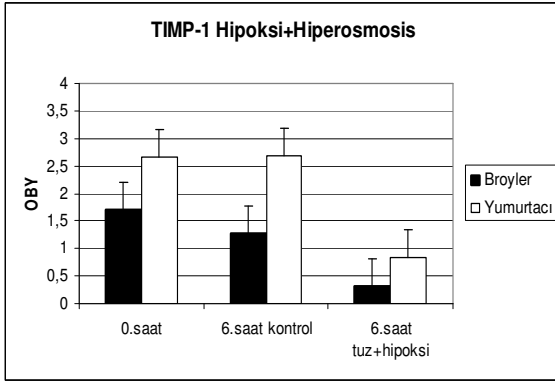
Broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerin 6 saat hipoksi-hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları MMP-2 ve TIMP-1 ortalama boyanma yoğunlukları gruplar arasında karşılıklı olarak kıyaslandığında önemli bir fark saptanmadı. Şekil-31a,-b'de saat hipoksi-hiperozmotik stres sonrası broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerin sahip oldukları TIMP-1 enziminin ortalama boyanma yoğunluklarına ait grafikler verilmiştir.



Şekil-30a

Şekil-30b

Şekil-30a, -b MMP-2, Deney ve kontrol gruplarında ortalama boyanma yoğunlukları.



Şekil-31a

Şekil-31b

Şekil-31a, -b TIMP-1, kontrol ve deney gruplarında ortalama boyanma yoğunlukları.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanatlı sektöründe, dünya genelinde yaygın olarak görülen ve multifaktöriyel etiyojolojiye sahip olan asites sendromunun patojenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Şu ana kadar yapılan deneysel çalışmalarda ve doğal olarak gözlenen asites olgularında, gerek klinik bulgular gerekse de sendromun görüldüğü ülkelerin coğrafi konumu patojenezde hipoksinin ve buna bağılı olarak şekillenen kardiyovasküler sistem yetmezliğinin önemli bir yer tuttuğunu göstermiştir (4, 11, 57, 60). Ancak sendromun patojenezinde sol kalp ya da primer kalp kapağı problemlerinin asıl sebep olduğunu vurgulayan görüşler de vardır (24). Hem doğal olarak şekillenen hem de deneysel oluşturulan asites olgularında akciğer dokusunda şekillenen lezyonlar hastalığın patojenezini aydınlatmaya yönelik dikkat çekici bulgulardır. Asites sendromunun akut evresinde ve karında sıvı birikiminin gözlendiği klasik formunda şiddetli akciğer ödemi ve intersitisyel doku artışı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (4, 14, 21, 22, 51). Memelilerde pulmoner hipertansiyonun oluşumu sırasında, akciğerdeki kan damarlarında görülen yeniden şekillenme (remodelling) olaylarında akciğer dokusuna ait fibroblastların önemli rolleri çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (105, 106). Bu çalışmada, bu nedenlerle hedef organ olarak akciğer ve fibroblastlar seçilmiştir. Toplam akciğer hacminin % 10'unu 24 saat içinde parçalama özelliğine sahip MMP'ler ve onların doku inhibitörleri, akciğer dokusunun şekillenmesi gibi fizyolojik olaylarda önemli rollere sahip oldukları kadar, şiddetli ödem oluşumu, amfizem, kronik obstruktif akciğer hastalığı ve yetişkin solunum stresi sendromu gibi patolojik olaylarda da öneme sahiptirler (32, 35, 88, 107–109).

Özyiğit ve arkadaşları (22), kanatlılarda *in vivo* olarak akciğer dokusunda ilk kez matriks metalloproteinaz enzimlerinin yerleşimlerini göstererek MMP-2 ve TIMP-1'in monoklonal antikorlar ile akciğer fibroblastlarında pozitif olarak boyandığını, MMP-9 ve TIMP-2 boyamalarında ise fibroblastlarda pozitif reaksiyonların gelişmediğini bildirmişlerdir. Agren ve arkadaşları (82), insan derisinde MMP-2'nin fibroblastlar ve epitel hücrelerinde lokalize olduğunu ancak MMP-9'un keratinositlerde boyanırken fibroblastlarda boyanmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da broyler ve yumurtacı tavukların akciğer dokularından izole edilen fibroblastlarda MMP-2 ve TIMP-1 enzimleri immunositokimyasal olarak pozitif boyanırken, MMP-9 ve TIMP-2'de pozitif boyanmalara rastlanmamıştır. Benzer şekilde, Yamanaka ve arkadaşları (110), akciğer dokusunda gözlenen tümörler üzerinde yaptıkları çalışmada MMP-2'nin tümör hücreleri ve stromal fibroblastlarda pozitif boyandığını ancak MMP-9 boyanmalarının yalnızca tümör

hücreleri ile sınırlı kaldığını ve fibroblastlarda pozitif boyanmaların görülmediğini bildirmişlerdir.

MMP'lerin sentez ve salınımı çeşitli yollarla aktive edilebilir. Büyüme faktörleri, çeşitli hormonlar ve sitokinler bu enzimler üzerinde oldukça etkilidirler (27, 72). Ayrıca hipoksik (89) ve hiperozmotik (53) stresin de enzimler üzerindeki tetikleyici etkileri gösterilmiştir (43, 52, 74, 79). Bu çalışmalarda hücrelerin hipoksik ya da hiperozmotik strese maruz bırakıldıklarında sahip oldukları enzimleri buldukları ortama salgıladıkları çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir. Özellikle *in vitro* koşullarda invazif tümör hücreleri üzerinde yapılan transmembran filtre invazyonu çalışmalarında hücrelerin hipoksik stres altında sahip oldukları MMP'leri ortama salgılayarak kendilerini sınırlayan filtreyi tahrip ettikleri ve hareket edebildikleri gösterilmiştir (38). Sunulan çalışmada kontrol gruplarındaki hücrelerin normal boyanma özelliklerini korurken hipoksik ve hiperozmotik strese maruz bırakılan hücrelerde ortalama boyanma yoğunluklarının azalması enzimlerin hücrelerin bulunduğu medyuma salındıkları yönünde değerlendirilmiştir.

Paddenberg ve arkadaşları (111), hipoksinin farelerde pulmoner hipertansiyona sebep olduğunu ve bu olaylar sırasında akciğer dokusunda MMP-2 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, Thakker-Varia ve arkadaşları (112), sıçanlarda pulmoner hipertansiyon sırasında akciğer dokusuna ait damarlarda (pulmoner arteriol ve pulmoner arter) MMP-2 artışının söz konusu olduğunu ve bunun pulmoner hipertansiyon sırasında damarların geçirdiği yeniden biçimlenmede (remodelling) önemli yer tuttuğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada normal hayvanlarda TIMP-1'in çok düşük seviyelerde gözlemlendiğini ve ancak hipoksi sonrası 10. günde miktarında artışlarının olduğunu rapor etmişlerdir. Memelilerde pulmoner hipertansiyonun oluşumunda önemli role sahip olan hipoksi, asites sendromunun patojenezinde de akciğer lezyonlarının gelişiminde önemli rol oynamasından dolayı (4, 11, 13, 60), bu tez çalışmasında *in vitro* olarak hipoksinin MMP'ler üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için kültüre edilen primer akciğer fibroblastları 6 ve 12 saat süreyle hipoksiye maruz bırakıldı. Hipoksik strese maruz bırakılan deney gruplarında yapılan immunositokimyasal boyamalar sonucu elde edilen ortalama boyanma yoğunluklarının kendi kontrol gruplarına göre daha düşük olması, *in vivo* modellerde akciğer dokusunda hipoksi sonrası artan enzim aktivitesi göz önüne alındığında (88) uyumlu bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* koşullarda doğrudan hipoksinin ve hipoksi tarafından tetiklenen bazı sitokinlerin MMP sentez ve salınımı arttırdığı gösterilmiştir. Bar-Eli (113) melanoma hücre hatları üzerinde yaptığı bir çalışmada hipoksinin IL-8'i sentezini artırdığını, IL-8'inde MMP-2 aktivasyonuna yol

açarak tümör hücrelerinin malignitelerinin artmasında önemli rol aldığını bildirmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda (42) hipoksinin MMP-2 üzerinde çok fazla etkisi olmadığına dair bilgilere yer verilmiş olsa da son yıllardaki çalışmalar bunun aksi yönünde verilere sahiptir (74, 79, 89).

Hipoksinin çeşitli adenokarsinom hücrelerinde MMP sentezinin hızlanmasına sebep olduğu Rigdway ve arkadaşları (79) tarafından da bildirilmiştir. Ottino ve arkadaşları (89), kültüre ettikleri retinal endotel hücrelerini hipoksiye maruz bıraktıklarında selektif olarak MMP-2 gen ekspresyonunun 2 kat, hücre kültürü ortamına salınan MMP-2'nin ise 10 kat arttığını göstermişlerdir. Leufgen ve arkadaşları (74), kültüre ettikleri insan akciğer fibroblastlarında MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 sekresyonunun hipoksi ile etkileşimini inceledikleri çalışmalarında, MMP-2 sekresyonunun hipoksi ile tetiklendiğini, MMP-9 ekspresyonunun ise sadece hücreler tip 4 kollajen matriks üzerine ekildiklerinde salgılandığını normal matrikslerde ya da plastik yüzeylerde MMP-9 salınımının olmadığını göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar (74) TIMP-2'nin akciğer fibroblastlarında normal ve hipoksik koşullarda eksprese edilmediğini de rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da literatür bilgileri (22, 74) ile uyumlu bir şekilde kültüre edilmiş fibroblastlarda MMP-2 varlığı gözlenirken MMP-9'a ve TIMP-2'ye rastlanmamıştır.

İçme suyuna ilave edilen tuz şu ana kadar asites sendromunu tavuklarda deneysel olarak oluşturabilmek için başarıyla kullanılmıştır (14, 19, 22). İçme suyu ile verilen tuzun dokularda oluşturduğu hiperozmotik ortamın hücreler üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak test edebilmek için bu çalışmada hücreler 6 saat hiperozmotik strese maruz bırakıldılar. Luo ve arkadaşları (52), kültüre ettikleri korneal epitel hücrelerini hiperozmotik strese maruz bıraktıklarında MMP'lerin hücrelerin bulunduğu ortama salındıklarını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da hiperozmotik strese maruz bırakılan broyler ve yumurtacı gruba ait hücrelerin sergiledikleri ortalama boyanma yoğunluklarının kontrol gruplarına oranla daha düşük oldukları gözlenmiş ve sahip oldukları enzimleri medyuma bıraktıkları düşünülmüştür.

Deneysel sonuçunda, broyler grubuna ait hücrelerin hipoksik, hiperozmotik ve hipoksik-hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları ortalama boyanma yoğunluklarının yumurtacı gruba ait hücrelerin hipoksik, hiperozmotik ve hipoksik-hiperozmotik stres sonrası sahip oldukları ortalama boyanma yoğunluklarından daha düşük olması broylerlere ait hücrelerin yumurtacı gruba ait hücrelere göre stresörlere karşı daha duyarlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Genel olarak hipoksik ve hiperozmotik stresin birlikte uygulandığı broyler ve yumurtacı gruplara ait hücrelerde, elde edilen ortalama boyanma yoğunluğunun, broyler ve yumurtacı tavuklara ait hücrelerde tek başına hipoksik ya da tek başına hiperozmotik stresin sebep olduğu ortalama boyanma yoğunluğundan az olması, stresörlerin birbirlerinin etkileri üzerinde artırıcı etkileri olabileceğini düşündürmüştür.

Hipoksik stres uygulamalarında, broyler tavuklara ait hücrelerde, 6 ve 12 saat hipoksik stres sonrası elde edilen MMP-2 ortalama boyanma yoğunlukları, kendilerine ait 6 ve 12 saat kontrol grubu hücrelerinin sahip olduğu MMP-2 ortalama boyanma yoğunlukları ile kıyaslandıklarında hem 6 saat hem de 12 saat hipoksi gruplarında istatistiksel açıdan önemli farklar gözlenirken, yumurtacı gruba ait hücrelerde istatistiksel farkın yalnızca 12 saat hipoksi ve kendisine ait 12 saat kontrol grubu arasında gözlenmesi yumurtacı tavuklara ait fibroblastların hipoksik strese daha az duyarlı oldukları yönünde yorumlanmıştır. Broyler grubuna ait hücrelerde MMP-2 enziminde 6 saat hipoksi ve 12 saat hipoksi grubundaki hücreler arasında gözlenen istatistiki önem ve 12 saat grubundaki hücrelerin sahip olduğu ortalama boyanma yoğunluğunun 6 saat grubuna göre daha düşük olması broyler tavuklarda uzayan hipoksik stresin enzim salınımını daha da şiddetlendirdiği yönünde değerlendirilmiştir.

İmmunositokimya antijenlerin doku ya da hücrelerdeki varlığının monoklonal ya da poliklonal antikolar kullanılarak gösterilmesi temeline dayanan oldukça hassas bir yöntemdir. Monoklonal antikoların kullanımı ile antijene spesifik epitoplara işaretlenerek hassasiyet oldukça artırılır. Bu çalışmada da ticari olarak elde edilen monoklonal antikolar kullanılarak enzimlerin broyler ve yumurtacı tavukların akciğer dokusundan izole edilen fibroblastlardaki varlığı ve değişik stresler karşısındaki durumları gösterilmiştir.

Hücre kültürü tekniği, araştırmacılara hipotezlerini hücreSEL ve moleküler temelde, *in vivo* diğer etkilerden arınmış ve kontrollü bir şekilde test edebilme imkanı sunan bir yöntemdir.

Çalışmada, broyler tavuklarda hipoksi ya da pulmoner hipertansiyona bağlı olarak akciğer ödeminin oluşumu sırasında, memelilerdekine benzer şekilde (88) akciğer dokusuna ait hücrelerden salınan MMP'lerin ekstraselüler matriksi yıkımlayarak ödem oluşumuna katkıda bulunup bulunmadıkları test edilmeye çalışıldı. Bu amaçla çalışma sırasında, başta pulmoner hipertansiyon olmak üzere akciğerde şekillenen her türlü patolojik duruma erken cevap verdiği bilinen (105, 106) fibroblastlar izole edilerek kullanıldı.

İmmunositokimyasal boyamalar sonrasında hücrelerdeki ortalama boyanma yoğunluğunun hesaplanmasında Chen ve arkadaşlarının (103) ve Freitas ve arkadaşlarının (102) uyguladığı yöntemler modifiye edilerek kullanıldı.

Dibbens ve arkadaşları (100), Desbaillets ve arkadaşları (99), Corpechot ve arkadaşları (98) yaptıkları *in vitro* çalışmalarda hipoksik stresi yaratmak için özel kamaralar kullanmışlardır. Bu çalışmada hipoksik stresi yaratmak için yukarıda bahsi geçen araştırmacıların uyguladıkları yöntem aynen takip edilmiştir. Farklı çalışmalarda % 1'den az (98), % 1 (109) ve % 2 (110) gibi çok farklı konsantrasyonlardaki O<sub>2</sub> hipoksik ortamın oluşturulması için kullanılmıştır. Tez çalışması sırasında kullanılan hipoksik sistemdeki O<sub>2</sub> seviyesi %1'nin altındadır ve üstteki literatürler ile uyum içindedir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda hücreleri hiperozmotik strese sokmak için farklı yöntemler kullanılsa da (Hipertonik glukoz, sukroz yada mannitol gibi) *in vitro* bir yöntem olarak hipertonik NaCl başarıyla kullanılmıştır (101). Tuz *in vivo* olarak asites sendromunu oluşturmak için kullanıldığından dolayı çalışmamızda da hiperozmotik stres ajanı olarak NaCl kullanılmıştır. Çalışma sırasında NaCl diğer literatürlerde olduğu gibi besleme medyumuna içerisine ilave edilmiştir. Gu ve arkadaşları (101) hipertonik NaCl ile oluşturdukları deney modelinde kültüre ettikleri myoblastları 160 mmol NaCl ile strese soktuktan sonra hücrelerde morfolojik olarak olumsuz değişikliklerden bahsetmemişlerdir. Ancak hücre çaplarında, intraselüler protein artışına bağlı olarak, bir artışın olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, stres sonrası farklı konsantrasyonlardaki NaCl'ün hücre sayıları üzerindeki etkilerinden bahsederken de 180 mmol NaCl uygulanan gruplarda % 45'lere varan kayıpların yaşandığını bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada 160 mmol NaCl kullanılmıştır. Yapılan ön denemelerde bu konsantrasyonun, ancak 6 saati aşan uygulamalarında hücre kayıpları görülmüş, süre 12 saate çıkarıldığında hücrelerin tamamıyla kültür tabağı tabanından ayrıldıkları saptanmıştır. Morfolojik olarak 6 saat tuz uygulanan gruplarda ise, Gu ve arkadaşlarının (101) bildirdiği şekilde, yaygın olmamakla beraber bazı hücrelerin irileşerek yuvarlaklaştıkları görülmüştür.

Genel olarak, broyler ve yumurtacı gruplara ait 0. saat, 6 saat ve 12 saat kontrol gruplarında, ortalama boyanma yoğunluklarının 6 saat hipoksik, 6 saat hiperozmotik, 6 saat hipoksik-hiperozmotik ve 12 saat hipoksik deney gruplarındaki ortalama boyanma yoğunluklarından daha yüksek olması, deney gruplarında enzimlerin stres uygulamaları sırasında hücrelerden salındığı yönünde yorumlanmıştır. Bu çalışmada enzimlerin besleme medyumunda varlığı ortaya konmamış olsa da, tavuklarda salınan bu enzimlerin *in vivo* olarak akciğer dokusundaki kan damarlarında bazal membranını oluşturan ekstraselüler

matriks proteinlerini parçalayarak ödem oluşumuna katkıda bulunabilecekleri düşünülmüştür. Yapılacak sonraki çalışmalarda hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak enzimlerin asites sendromunun patojenezindeki olası rollerinin detaylı olarak araştırılmasına devam edilmesinin uygun olacağı fikri benimsenmiştir.



## KAYNAKLAR

1. AKMAN MK. Tavukçuluk sektöründe son durum, Performans, 39: 4-8, 2001.
2. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Resmi İnternet sitesi <http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/haberayrintisi.asp?ay=6&yil=2004&ID=349> (2)
3. JORDAN FTW, PATTISON M. Poultry Diseases, 4<sup>th</sup> edition, W.B. Saunders Company Ltd., London, page 344-374, 1996.
4. JULIAN RJ. Ascites in poultry. Avian Pathology, 22: 419–454, 1993.
5. MAXWELL MH, ROBERTSON GW. Studies on ascitic syndrome in young broilers 1. Haematology and pathology. Avian Pathology, 15: 511–514, 1986.
6. MAXWELL MH, ROBERTSON GW. World broiler ascites survey 1996. Poultry International, April, 16–30, 1997.
7. ENKVETCHAKUL B, BEASLY J, BOTTJE W. Pulmonary arteriole hypertrophy in broilers with pulmonary hypertension syndrome (ascites). Poultry Science, 74: 1676–1682, 1995.
8. OWEN RL, WIDEMAN Jr RF, BARBATO GF, COWEN BS, FORD BC, HATTEL AL. Morphometric and histologic changes in the pulmonary system of broilers raised at simulated high altitude. Avian Pathology, 24: 293–302, 1995.
9. OLKOWSKI AA, CLASSEN HL, KUMOR L. Left atrio-ventricular valve degeneration, left ventricular dilatation and right ventricular failure: A possible association with pulmonary hypertension aetiology of ascites in broiler chickens. Avian Pathology, 27: 51–59, 1998.
10. OWEN RL, WIDEMAN Jr RF, COWEN BS. Changes in pulmonary arterial and femoral arterial blood pressure upon acute exposure to hypobaric hypoxia in broiler chickens. Poultry Science, 74: 708–715, 1995.
11. JULIAN RJ. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry-a review. Veterinary Journal, 169: 350–369, 2005.
12. HUCHZERMEYER FW, CILLIERS JA, DIAZ LAVIGNE CD, BARTKOWIAK RA. Broiler hypertension syndrome, Increased right ventricular mass in broilers experimentally infected with Aegyptianella pullorum. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 54: 113–114, 1987.
13. JULIAN RJ. Physiological management and environmental triggers of the ascites syndrome: A review. Avian Pathology, 29: 519–527, 2000.
14. ATEŞOĞLU EÖ, ERER H. Broylerlerde deneysel asites sendromunda patolojik bulguların incelenmesi. Veterinarium, 2: 64–73, 2000.
15. BAINS BS. How to control ascites in broilers. World Poultry, 12: 55–57, 1996.
16. ACAR N, SIZEMORE G, WIDEMAN RF, OWEN RL, BARBATO GF. Growth of broiler chickens in response to feed restriction regimens to reduce ascites. Poultry Science, 74: 833–843, 1995.
17. WIDEMAN RF, KIRBY YK, ISMAIL M, BOTTJE WG, MOORE W, VARDEMAN RC. Supplemental L-arginine attenuates pulmonary hypertension syndrome (ascites) in male and female broilers. Poultry Science, 74: 323–330, 1995.
18. BUYS N, BUYSE B, HASSANZADEH-LADMAKHI M, DECUYPERE E. Intermittent lighting reduces the incidence of ascites in broilers: An interaction with protein content of feed on performance and the endocrine system. Poultry Science, 77: 54–61, 1998.
19. MIRSALIMI SM, O'BRIEN PJ, JULIAN RJ. Blood volume increase in salt-induced pulmonary hypertension, heart failure and ascites in broiler and white Leghorn chickens. Canadian Journal of Veterinary Research, 57: 110–113, 1992.

20. MIRSALIMI SM, JULIAN RJ. Saline drinking water in broiler and Leghorn chicks and the effect in broilers of increasing levels and age at time of exposure. *Canadian Veterinary Journal*, 34: 413–417, 1993.
21. JULIAN RJ. The effect of increased sodium in the drinking water on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in broiler chickens. *Avian Pathology*, 16: 61–71, 1987.
22. ÖZYİĞİT MÖ, KAHRAMAN MM, SÖNMEZ G. The identification of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in broiler chickens by immunohistochemistry. *Avian Pathology*, 34: 509–516, 2005.
23. KIRAN MM. Broilerlerde asites sendromu. *Veterinarium*, 1: 21–24, 1990.
24. OLKOWSKI AA, ABBOTT JA, CLASSEN HL. Pathogenesis of ascites in broilers raised at low altitude: Aetiological considerations based on echocardiographic findings. *Journal of Veterinary Medicine A*, 52: 166–171, 2005.
25. LUBRITZ DL, SMITH JL, MCPHERSON BN. Heritability of ascites and the ratio of right to total ventricle weight in broiler breeder male lines. *Poultry Science*, 74: 1237–1241, 1995.
26. WILSON JB, JULIAN RJ, BARKER IK. Lesion of right heart failure and ascites in broiler chickens. *Avian Diseases*, 32: 246–261, 1988.
27. WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB Journal*, 5: 2145–2154, 1991.
28. HANDSLEY MM, EDWARDS DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 115: 849–860, 2005.
29. RATH NC, HUFF GR, BALOG JM, HUFF WE. Fluorescein isothiocyanate staining and characterization of avian heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64: 83–95, 1998.
30. ROSENBERG GA, ESTRADA EY, DENCOFF JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*, 29: 2189–2195, 1998.
31. SORSA T, RAMAMURTHY NS, VERNILLO AT, ZHANG X, KONTTINEN YT, RIFKIN BR, GOLUB LM. Functional sites of chemically modified tetracyclines: Inhibition of the oxidative activation of human neutrophil and chicken osteoclast pro-matrix metalloproteinases. *Journal of Rheumatology*, 25: 975–982, 1998.
32. EICKELBERG O, SOMMERFELD CO, WYSER C, TAMM M, REICHENBERGER F, BARDIN PG, SOLER M, ROTH M, PERRUCHOUD AP. MMP and TIMP expression pattern in pleural effusions of different origins. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 156: 1987–1992, 1997.
33. WEBB AA, MUIR GD. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *Veterinary Internal Medicine*, 14: 399–411, 2000.
34. DI GIROLAMO N, TEDLA N, LLOYD A, WAKEFIELD D. Expression of matrix metalloproteinases by human plasma cells and B lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 28: 1773–1784, 1998.
35. CARNEY DE, LUTZ CJ, PICONE AL, GATTO LA, RAMAMURTHY NS, GOLUB LM, SIMON SR, SEARLESS B, PASKANIK A, SNYDER K, FINCK C, SCHILLER HJ, NIEMAN GF. Matrix metalloproteinase inhibitor prevents acute lung injury after cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 100: 400–406, 1999.
36. AIMES RT, FRENCH DL, QUIGLEY JP. Cloning of a 72 kDa matrix metalloproteinase (gelatinase) from chicken embryo fibroblasts using gene family PCR: expression of the gelatinase increases upon malignant transformation. *Biochemical Journal*, 300: 729–736, 1994.

37. ZENG Z, COHEN AM, GUILLEM JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 20: 749–755, 1999.
38. BJORNLAND K, FLATMARK K, PETTERSEN S, AAASEN AO, FODSTAD O, MAELANDSMO GM. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *The Journal of Surgical Research*, 127: 151–156, 2005.
39. ROSENBERG G, NAVRATIL M. Metalloproteinase inhibition blocks oedema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*, 48: 921–926, 1997.
40. MUN-BRYCE S, ROSENBERG GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18: 1163–1172, 1998.
41. OLKOWSKI AA, RATHGEBER BM, SAWICKI G, CLASSEN HL. Ultrastructural and molecular changes in the left and right ventricular myocardium associated with ascites syndrome in broiler chickens raised at low altitude. *Journal of Veterinary Medicine [A] Physiology and Clinical Medicine*, 48: 1–14, 2001.
42. SAED GM, ZHANG W, DIAMOND MP. Effect of hypoxia on stimulatory effect of TGF-beta 1 on MMP-2 and MMP-9 activities in mouse fibroblasts. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 7: 348–354, 2000.
43. HIMELSTEIN BP, KOCH CJ. Studies of IV collagenase regulation by hypoxia. *Cancer Letters*, 124: 127–133, 1998.
44. SUTTON TA, KELLY KJ, MANG HE, PLOTKIN Z, SANDOVAL RM, DAGHER PC. Minocycline reduces renal microvascular leakage in a rat model of ischemic renal injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 288: 91–97, 2005.
45. CHAPMAN ME, CHAPMAN HD, WIDEMAN RF, HUFF WE, HACKER AH, FATH NC, BALOG JM. Does pulmonary hypertension occur frequently in broilers medicated with monensin? *Poultry Science*, 74: 1591–1596, 1995.
46. GEOR RJ, ROBINSON WF. Suspected monensin toxicosis in feedlot cattle. *Australian Veterinary Journal*, 62: 130–131, 1985.
47. SCHWEITZER D, KIMBERLING C, SPRAKER T, STERNER FE, McCHESNEY A. Accidental monensin sodium intoxication of feedlot cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 10: 1273–1276, 1984.
48. LI L, EISEN AZ, STURMAN E, SELTZER JL. Protein tyrosine phosphorylation in signalling pathways leading to the activation of gelatinase A: Activation of gelatinase A by treatment with the protein tyrosine phosphatase inhibitor sodium orthovanadate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1405: 110–120, 1998.
49. OSINSKY SP, GANUSEVICH II, BUBNOVSKAYA LN, VALKOVSKAYA NV, KOVELSKAYA AV, SERGIENKO TK, ZIMINA SV. Hypoxia level and matrix metalloproteinases-2 and -9 activity in Lewis lung carcinoma: correlation with metastasis. *Experimental Oncology*, 27: 202–205, 2005.
50. WITZEL DA, HUFF WE, KUBENA LF, HARVEY RB, ELISSALDE MH. Ascites in growing broilers: A research model. *Poultry Science*, 69: 741–745, 1990.
51. YAMAN İ, ÇEVİK A. Broiler piliçlerde sağ ventriküler hipertrofi ve asites. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15: 9–14, 2001.
52. LUO L, LI DQ, CORRALES RM, PFLUGFELDER SC. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye & Contact Lens*, 31: 186–193, 2005.
53. LI DQ, CHEN Z, SONG XJ, LUO L, PFLUGFELDER SC. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 45: 4302–4311, 2004.

54. SHAPIRO L, DINARELLO CA. Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production. *Experimental Cell Research*, 231: 354–362, 1997.
55. HUNTON P. The potential of genetics to combat ascites. *World Poultry*, 10: 64–66, 1998.
56. BALOG JM, HUFF GR, RATH NC, HUFF WE. Effect of dietary aspirin on ascites in broilers raised in a hypobaric chamber. *Poultry Science*, 79: 1101–1105.
57. WIDEMAN RF, KIRBY YK, OWEN RL, FRENCH H. Chronic unilateral occlusion of an extrapulmonary primary bronchus induces pulmonary hypertension syndrome (ascites) in male and female broilers. *Poultry Science*, 76: 400–404, 1997.
58. KIRBY YK, McNEW W, ANTHONY NB, KIRBY JD, MARSON NE, HUGHES JD, WIDEMAN RF. Electrocardiographic evaluation of broilers following unilateral occlusion of an extrapulmonary primary bronchus. *Poultry Science*, 78: 242–254, 1999.
59. WIDEMAN RF, FRENCH H. Broiler breeder survivors of chronic unilateral pulmonary artery occlusion produce progeny resistant to pulmonary hypertension syndrome (ascites) induced by cool temperatures. *Poultry Science*, 78: 404–411, 1999.
60. HASSANZADEH M, GILANPOUR H, CHARKHKAR S, BUYSE J, DECUYPERE E. Anatomical parameters of cardiopulmonary system in three different lines of chickens: further evidence for involvement in ascites syndrome. *Avian Pathology*, 34: 188–193, 2005.
61. CURRIE RJW. Ascites in poultry: Recent investigations. *Avian Pathology*, 28: 313–326, 1999.
62. ÖZYİĞİT MÖ. Et Tipi Tavuklardaki Asites Sendromunun Oluşumunda Matriks Metalloproteinazlarının Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye. 2002.
63. HANRAHAN LA, CORRIER DE, NAGI SA. Monensin toxicosis in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 5: 665–671, 1981.
64. SCHEELE CW, DECUYPERE E, VEREIJKEN PFG, SCHREURS FJG. Ascites in broilers. 2. Disturbances in the hormonal regulation of metabolic rate and fat metabolism. *Poultry Science*, 71: 1971–1984, 1992.
65. GONZALES E, BUYSE J, SARTORI JR, LODDI MM, DECUYPERE E. Metabolic disturbances in male broilers of different strains. 2. Relationship between the thyroid and somatotrophic axes with growth rate and mortality. *Poultry Science*, 78: 516–521, 1999.
66. RIDDEL C. Developmental, metabolic and other noninfectious disorders. Editors: CALNEK BW, BARNES HJ, BEARD CW, REID WM, YODER HW. *Diseases of Poultry*, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Iowa, page 913–950, 1997.
67. HASSANZADEH M, BUYS N, VANDERPOOTEN A, DECUYPERE E. Myocardial  $\beta$ -adrenergic receptor characteristics in T3- induced ascites and in broiler lines differing in ascites susceptibility. *Avian Pathology*, 26: 293–303, 1997.
68. BARKER IK. The peritoneum and retroperitoneum. Editörler: JUBB KVK, KENNEDY PC, PALMER N. *Pathology of Domestic Animals*, Volume 2, 4<sup>th</sup> edition, Academic Press, California, USA, page 429–430, 1993.
69. MANNELLO F, TONTI G, PAPA S. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Current Cancer Drug Targets*, 5: 285–298, 2005.
70. STEFANSON S, AIMES RT, SEWARD NB, ALEXANDER DS, QUIGLEY JP. Native TIMP-free 70 kDa progelatinase (MMP-2) secreted at elevated levels by RSV transformed fibroblasts. *Journal of Cell Physiology*, 3: 419–428, 1994.

71. BORKAKOTI N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *Journal of Molecular Medicine*, 78: 261–268, 2000.
72. NAGASE H, WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 21491–21494, 1999.
73. HAYASHI T, STETLER-STEVENSON WG, FLEMING MV, FISHBACK N, KOSS MN, LIOTTA LA, FERRANS VJ, TRAVIS WD. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Pathology*, 149: 1241–1256, 1996.
74. LEUFGEN H, BIHL MP, RUDIGER JJ, GAMBAZZI J, PERRUCHOUD AP, TAMM M, ROTH M. Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hypoxia, and nutrition in human lung cells. *Journal of Cellular Physiology*, 204: 146–154, 2005.
75. PAVLOFF N, STASKUS PW, KISHNANI NS, HAWKES SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP–3. A third member of the TIMP family. *Journal of Biological Chemistry*, 24: 17321–17326, 1992.
76. SLAUSON DO, COOPER BJ. *Mechanisms of Disease*, 2<sup>nd</sup> edition, Williams and Wilkins, Baltimore, ABD, page 149–153, 1990.
77. LI X, ZHAO X, MA S. Secretion of 92 kDa gelatinase (MMP–9) by bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 67: 247–258, 1999.
78. RUNDHAUG JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9: 267–285, 2005.
79. RIDGWAY PF, ZIPRIN P, PARASKEVA PA, PECK DH, DARZI AW. Hypoxia augments gelatinase activity in a variety of adenocarcinomas *in vitro*. *Journal of Surgical Research*, 124: 180–186, 2005.
80. VIHINEN P, KAHARI VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *International Journal of Cancer*, 99: 157–166, 2002.
81. MIRASTSCHIJSKI U, IMPOLA U, JAHKOLA T, KARLSMARK T, AGREN MS, SAARIALHO-KERE U. Ectopic localization of matrix metalloproteinase–9 in chronic cutaneous wounds. *Human Pathology*, 33: 355–364, 2002.
82. AGREN MS, MIRASTSCHIJSKI U, KARLSMARK T, SAARIALHO-KERE UK. Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Experimental Dermatology*, 10: 337–348, 2001.
83. HANDSLEY MM, EDWARDS DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 115: 849–860, 2005.
84. KOSSAKOWSKA AE, EDWARDS DR, LEE SS, URBANSKI LS, STABBLER AL, ZHANG CL, PHILLIPS BW, ZHANG Y, URBANSKI SJ. Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *American Journal of Pathology*, 153: 1895–1902, 1998.
85. ELKINGTON PT, O'KANE CM, FRIEDLAND JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 142: 12–20, 2005.
86. CURCI JA, PETRINEC D, LIAO S, GOLUB LM, THOMPSON RW. Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: A comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *Journal of Vascular Surgery*, 28: 1082–1093, 1998.
87. KIESEIER BC, PAUL R, KOEDEL U, SEIFERT T, CLEMENTS JM, GEARING AJ, PFISTER HW, HARTUNG HP. Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain*, 122: 1579–1587, 1999.

88. MISEROCCHI G, PASSI A, NEGRINI D, FABBRO MD, DE LUCA G. Pulmonary interstitial pressure and tissue matrix structure in acute hypoxia. *American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology*, 280: 881–887, 2001.
89. OTTINO P, FINLEY J, ROJO E, OTTLECZ A, LAMBROU GN, BAZAN HEP, BAZAN NG. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroids-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Molecular Vision*, 10: 341–350, 2004.
90. CHA HS, AHN KS, JEON CH, KIM J, SONG YW, KOH EM. Influence of hypoxia on the expression of matrix metalloproteinases–1, -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase–1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clinical Experimental Rheumatology*, 21: 593–598, 2003.
91. KLEINER DE, STETLER-STEVENSON WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43: 42–51, 1999.
92. NIINIKOSKI J. Hyperbaric oxygen therapy of diabetic foot ulcers, transcutaneous oxymetry in clinical decision making. *Wound Repair and Regeneration*, 11: 458–461, 2003.
93. TRUE LD. Principles of immunohistochemistry. Editor: TRUE LD. *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*. New York, USA, pages 1.1-1.31, 1990.
94. JACKSON P, BLYTHE D. Immunolabelling techniques for light microscopy. Editor BEESLEY JE, *Immunocytochemistry*, Oxford University Press, New York, USA, pages 15–43, 1993.
95. FRESHNEY R.I. Disaggregation of the Tissue and Primary Culture. *Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique*. Wiley-Liss Publication Inc. New York, USA, pages 107–126, 1987.
96. TWAL WO, LEACH RM. Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from chicken fat pads. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 32: 403–408, 1996.
97. HEWETT PW, MURRAY JC. Human lung microvessel endothelial cells: Isolation, culture and characterization. *Microvascular Research*, 46: 89–102, 1993.
98. CORPECHOT C, BARBU V, WENDUM D, CHIGNARD N, HOUSSET C, POUPON R, ROSMORDUC O. Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia, a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental Cirrhosis. *American Journal of Pathology*, 160: 613–620, 2002.
99. DESBAILLETS I, DISERENS AC, TRIBOLET N, HAMOU MF, VAN MEIR EG. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 186: 1201–1212, 1997.
100. DIBBENS JA, MILLER DL, DAMERT A, RISAU W, VADAS MA, GOODALL GJ. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Molecular Biology of The Cell*, 10: 907–919, 1999.
101. GU JW, ANAND V, SHEK EW, MOORE MC, BRADY AL, KELLY WC, ADAIR TH. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 31: 1083–1087, 1998.
102. CHEN PS, ZHAI WR, ZHOU XM, ZHANG JS, ZHANG YE, LING YQ, GU YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase–2 in hepatic stellate cells. *World Journal of Gastroenterology*, 7: 647–651, 2001.
103. FREITAS S, MEDURI G, LE NESTOUR E, BAUSERO P, PERROT-APPLANAT M. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human

- endometrium. *Biology of Reproduction*, 61: 1070–1082, 1999.
104. KAN İ. *Biyoistatistik*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, sayfa 152–167, 1991.
  105. STENMARK KR, BOUCHEY D, NEMENOFF R, DEMPSE EC, DAS M. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling: Contribution of the adventitial fibroblasts. *Physiology Research*, 49: 503–517, 2000.
  106. DAS M, DEMPSEY EC, REEVES JT, STENMARK KR. Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 282: 976–986, 2002.
  107. PASSI A, NEGRINI D, ALBERTINI R, MISEROCCHI G, DE LUCA G. The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema. *FEBS Letters*, 456: 93–96, 1999.
  108. MARTIN-CHOULY CA, ASTIER A, JACOB C, PRUNIAUX MP, BERTRAND C, LAGENTE V. Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors. *Life sciences*, 75: 823–840, 2004.
  109. FINLAY GA, O'DRISCOLL LR, RUSSELL KJ, D'ARCY EM, MASTERSON JB, FITZGERALD MX, O'CONNOR CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156: 240–247, 1997.
  110. YAMANAKA M, ISHIKAWA O. Hypoxic conditions decrease the mRNA expression of pro $\alpha$ 1 (I) and (III) collagens and increase matrix metalloproteinases-1 of dermal fibroblasts in three-dimensional cultures. *Journal of Dermatological Science*, 24: 99–104, 2000.
  111. PADDENBERG R, FAULHAMMER P, GOLDENBERG A, KUMMER W. Hypoxia-induced increase of endostatin in murine aorta and lung. *Histochemistry and cell biology*, 8: 1-12, 2006.
  112. THAKKER-VARIA S, TOZZI CA, POIANI GJ, BABIARZ JP, TATEM L, WILSON FJ, RILEY DJ. Expression of matrix-degrading enzymes in pulmonary vascular remodeling in the rat. *American Journal of Physiology*, 275: 398–406, 1998.
  113. BAR-ELI M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology*, 67: 12–18, 1999.