

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

115713

ET TİPİ TAVUKLARDAKİ ASİTES SENDROMUNUN OLUŞUMUNDA  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARININ  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

115713

M. Özgür ÖZYİĞİT

( DOKTORA TEZİ )

BURSA-2002



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

\*

**ET TİPİ TAVUKLARDAKİ ASİTES SENDROMUNUN OLUŞUMUNDA  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARININ  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**M. Özgür ÖZYİĞİT**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Danışman : Doç. Dr. Gürsel SÖNMEZ**

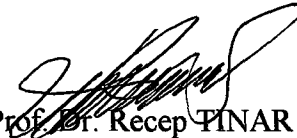
**BURSA-2002**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu tez, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Gürsel SÖNMEZ	
Üye	Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN	
Üye	Prof. Dr. M. Münir KIRAN	
Üye	Prof. Dr. S. Deniz MISIRLIOĞLU	
Üye	Doç. Dr. Mustafa EREN	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun .....16.07.2002.....  
tarih, ..2002/17..... sayılı toplantısında alınan 2002/15 numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Recep TİNAR  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET .....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
BULGULAR.....	23
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	55
TEŞEKKÜR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	61

## ÖZET

Bu çalışmada, deneysel olarak tuz (NaCl) ile oluşturulan Asites Sendromu'nda immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, MMP-2 (matriks metalloproteinaz-2), MMP-9, matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1 (TIMP-1) ve TIMP-2 aktivitelerinin hastalığın oluşumundaki rollerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada 1 günlük, erkek, "Avian Farm 43" hattı, 80 adet et tipi civciv ile 1 günlük, erkek, "Lohman LSL" hattı, 80 adet yumurtacı civciv olmak üzere toplam 160 hayvan kullanıldı. Et tipi ve yumurtacı civcivler kendi aralarında deneme ve kontrol olmak üzere 2'şer gruba ayrılarak toplam 4 grup oluşturuldu. Asites oluşturmak amacı ile broyler ve yumurtacı gruplardan ilk ikisinin sularına sekizinci günden itibaren %0,6'lık NaCl eklendi. Bu grupların kontrolü olan grupların sularına herhangi bir uygulama yapılmadı.

Klinik olarak asites sadece tuz uygulanan broylerlerde rastlandı. Makroskopik olarak asites oluşan hayvanların karın boşluğunda saman sarısı renkte, bazen fibrin pıhtıları da içeren sıvı birikimi dikkati çekti. Akciğer, karaciğer, böbrek ve kalpte çeşitli makroskopik ve mikroskopik lezyonlara rastlandı.

Ticari olarak hazırlanmış monoklonal primer antikolar kullanılarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile akciğer, karaciğer, böbrek ve beyindeki MMP-2 ve 9 ile TIMP-1 ve 2 aktiviteleri değerlendirildi. İmmunohistokimyasal boyamaların skorlanmasında, boyanmanın dağılımı, yoğunluğu ve boyanan hücre tipleri göz önüne alınarak yarı kantitatif bir değerlendirme yapıldı. MMP-2 ve MMP-9 enzim aktivitesinin normal ve asitesli hayvanlarda yaşın artışı ile birlikte belirli bir düşüş gösterdiği, ancak bu düşüşün asitesli hayvanlarda normal hayvanlara göre daha yavaş olduğu gözlemlendi. TIMP-2 aktivitesinin asitesli hayvanlarda normal hayvanlara göre daha yüksek olduğu görüldü. MMP-9 aktivitesinin TIMP-1 aktivitesini baskıladığı belirlendi. Sonuç olarak, et tipi tavuklarda tuzla oluşturulan deneysel Asites Sendromu'nda MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin kapillar damar bazal membranlarının tahribinde rolü olabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Asites, Matriks Metalloproteinaz, İmmunohistokimya, Tavuk.

## SUMMARY

### **An Investigation on the Activities of Matrix Metalloproteinases in the Formation of Ascites Syndrome in Meat Type Chickens**

The aim of this study was to investigate the roles of MMP-2 (matrix metalloproteinase-2), MMP-9, TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1) and TIMP-2 in the formation of Ascites Syndrome in a salt (NaCl) induced experimental model. 80 male, day-old, Avian Farm 43 line, meat type chicks and 80 male, day-old, Lohman LSL line, egg type chicks were used. Meat type and egg type chicks were divided into two subgroups as experimental group and the control group, each. In order to induce ascites 0.6% NaCl was added into the drinking water of one subgroup of both meat and egg types beginning by day 8. The control groups were given normal water.

Clinically ascites was observed only in the NaCl given meat type chickens. Macroscopically yellowish fluid accumulation, sometimes with fibrin clumps, was seen in the abdominal cavity of ascitic chickens. Various macroscopical and microscopical lesions were seen in the lungs, liver, kidneys and heart.

The MMP-2, -9 and TIMP-1, -2 activities in the lungs, liver, kidneys and brain were evaluated with Streptavidin-Biotin-Peroxidase method using commercially available primary monoclonal antibodies. A semi-quantitative evaluation was done according to the staining of the cell types, and the distribution and intensity of the staining for immunohistochemical scoring. A decrease was seen in the MMP-2 and MMP-9 enzyme activities with the increasing age both in normal and ascitic chickens, however, the decrease in ascitic chickens was relatively slower than that in the normal chickens. TIMP-2 enzyme activity was found higher in ascitic chickens than in normal chickens. MMP-9 enzyme activity was found to suppress the TIMP-1 enzyme activity. As a conclusion, it was suggested that MMP-2 and MMP-9 enzymes may have a role in the destruction of the basal membranes of the capillaries in the NaCl induced experimental Ascites Syndrome in meat type chickens.

**Key Words:** Ascites, Matrix metalloproteinase, Immunohistochemistry, Chicken.

## GİRİŞ

Tavuk eti fiyatının uygun olması, sunum çeşitliliğinin çokluğu, her mevsimde bulunabilme avantajı ve kırmızı ete göre daha sağlıklı olması özellikleriyle gerek dünyada, gerekse ülkemizde rağbet edilen bir et çeşididir. Sığırlarda gözlenen ve insanlara da bulaşabilen Deli Dana (Bovine Spongiform Encephalopathy-BSE) gibi hastalıkların kamuoyunda ciddi bir endişeye yol açması da, son yıllarda beyaz etin kırmızı ete tercih edilmesinde önemli bir etken olmuştur. Ülkemizde artan talebin bir sonucu olarak 1990'lı yıllarda 4 kg olan kişi başına tavuk eti tüketimi, 2000 yılında 12 kg'a kadar çıkmıştır (1).

Gerek artan talebin karşılanabilmesi, gerekse piyasada mevcut rekabet şartlarında iyi bir yer elde edinilebilmesi amacıyla tavukçuluk sektöründe son yıllarda önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Hayvanların bakım ve beslenme şartlarında yapılan önemli değişikliklerin yanısıra, hayvanlar daha fazla yem tüketecek ve bu yemden daha fazla canlı ağırlık artışı sağlayacak şekilde bir genetik seleksiyona tabi tutulmuşlardır. Ancak belirli yönlerden yapılan bu genetik seleksiyon birçok problemi de beraberinde getirmiştir. Bu problemlerden tavuklarda en sık olarak görülenleri "Ani Ölüm Sendromu", "Tibial Diskondroplazi" ve "Pulmoner Hipertansiyon Sendromuna bağlı Asites"tir (2, 3).

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, sulu karın, endoteliozis, hidroperikardiyal 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.

Hastalık metabolik bir bozukluk olarak sadece broylerlerde görülmektedir. Hastalığın etiolojisinde bir çok sebep rol oynar. Hastalığın en önemli sebebi, genetik olarak her yıl geliştirilen kas kitlesi ile orantılı olarak bu gelişime uyum sağlayamayan kardiyovasküler sistem ve bunun sonucu olarak gelişen hipoksidir (7-10). Ayrıca yüksek rakım (6, 7, 11-13), yüksek metabolik enerjili yemlerin kullanımı, yem alımına bağlı olarak artan metabolik oksijen ihtiyacı (4, 14), soğuk stresi (5, 12, 13, 15-18), kümeslerdeki sürekli ışık uygulaması (13, 15, 19), yemin pelet şeklinde olması (13), metrekaireye konan hayvan sayısı (6, 13), su ve yemdeki sodyum miktarının fazlalığı (20-22), dioksin maddesinin yeme fazla miktarda konması (3, 4, 11), temizlikte kullanılan formaldehit ve

dezenfektanlar ile yeme katılan furazolidon ve monensin gibi ilaçların yüksek dozu (4, 11), bazı enfeksiyöz etkenler (3, 5, 12) ve kardiyak problemler asitesin oluşmasında rol oynayan diğer faktörlerdir (4, 9). Hastalık erkek hayvanlarda (11, 15, 23) ve göğüs bölgesindeki kas kitlesinin gelişiminin fazla olduğu ırklarda (23) daha fazla görülmektedir.

Hastalık saha koşullarında genellikle yumurta çıkışını takiben 3. haftadan sonra görülür (14). Etkilenen hayvanlarda gelişme geriliği, solunum güçlüğü ve asites nedeni ile gergin karın duvarı en önemli belirtilerdir (3-5, 11, 24).

Nekropside, deri ve bacaklarda konjesyon (4), but, karın ve göğüs bölgesi deri altında ödem görülür (14). Karın boşluğunda 40-500 ml, berrak, sarı renkte, fibrinli bir sıvı bulunur (3-5, 11, 24). Akciğerler konjesyonlu ve ödemlidir (3-5, 14, 25). Karaciğer şişkin, yüzeyi düzensiz ve kapsülası kalınlaşmış olup, kapsüle üzerinde fibrin kitlesi görülebilir (3-5, 11, 24, 25). Perikard içerisinde 1-25 ml miktarında sıvı birikimine rastlanır (hidroperikardiyum) ve bazen perikardın kalbin yüzeyine yapışmış olduğu görülebilir (3, 4, 11). Böbreklerin şişkin, soluk renkli ve kanamalı olduğu belirtilmiştir (5). Histopatolojik olarak, araştırmacılar özellikle akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek gibi organlarda çeşitli patolojik bozukluklarla beraber ödem, yangısel hücre infiltrasyonları ve bağ doku artışını bildirmişlerdir (4, 5, 8, 24, 26, 27).

Gerek kemik anormalliklerinde matriks yapım ve yıkımı ile yeniden şekillendirilmesi ve gerekse asiteste damar geçirgenliğinin, bazal membranın bütünlüğünün bozularak, artmış olabileceği göz önüne alındığında, damar oluşumu, kemik oluşumu ve organların şekillenmesinde önemli yer tutan matriks proteinleri ve bunların metabolizmasında rol oynayan metalloproteinazların rolü olabileceği düşünülmüştür (2, 28). MMP (Matriks metalloproteinazlar) çinko taşıyan endopeptidazlardır ve vücutta fizyolojik koşullarda, tümör gelişimi sırasında aktif hale gelmektedirler. Kesin olarak MMP'lerin nasıl stimule edildiği bilinmemekle beraber, hücre yüzeyine etkiyen kimyasal maddeler, sıcak şoku gibi fiziksel etkenler, sitokinler ve büyüme faktörleri, viral transformasyon, onkojenler, östrojen gibi reperasyon yapan faktörler etkili olmaktadır (28). MMP'ler fibroblastlar, kondrositler, epitel hücreleri, damar endotel hücreleri (2, 29, 30), kemik hücreleri (30), astrositler, mikroglialar (29), mezotel hücreleri (31), T hücreleri (32), monositler, makrofajlar ve aktive olmuş nötrofiller tarafından (30, 33) salgılanmaktadır. Kanatlılarda memeli nötrofil lökositlerinin karşılığı olan heterofil lökositlerde de MMP'lerin varlığı gösterilmiştir (34). Asitesli broylerlerin kalplerinde MMP-2 düzeyi, sağlıklı broyler ve yumurtacı tavuklara göre daha yüksek bulunmuştur (35). MMP'lerden MMP-2 ve MMP-9 çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen beyin ödemi sırasında da artış göstermektedir (29,



36). Bunlardan her ikisi de bazal laminanın yapısında bulunan kollajen tip IV ve laminin gibi proteinleri parçalayıcı özelliğe sahiptir (28). MMP'lerin pulmoner kapillar bazal membranı ve tip IV kollajenden zengin ESM (ekstrasellüler matriks)'i parçalayıp, permeabiliteyi artırarak ödeme yol açtığı bildirilmiştir (33). Çeşitli araştırmalarda (37, 38), hipoksinin MMP ve kollajen metabolizması üzerine etkisinin olduğu belirtilmiştir. Memeli hayvanlarda monensine bağlı olarak zehirlenmelerde ölüm genellikle hipoksi, akciğer ödemi ve asites sonucu oluşmaktadır (39, 40). Broylerlerde çeşitli oranlarda yeme katılan ve gelişmeyi artırdığı bilinen monensinin farklı kaynaklarda diskondroplazi (2) ve asitese (41) neden olduğu bildirilmiştir. Monensin, membran tip matriks metalloproteinazları aktive etmek suretiyle bu enzimlerin aktivitesinde artışa neden olmaktadır (42).

Asites et tipi tavuklarda halen kesin nedeni ortaya konmamış bir sendromdur. Yangısel hücre infiltrasyonlarından ve vücuttaki hücrelerden salgılanan MMP'lerin asites sırasındaki rollerini sorgulayan bir araştırma yapılmamıştır. Anabilim Dalı'mızda bu konu ile ilgili olarak yapılan ön çalışmada, "Avian farm" hattı broylerlerde içme suyuna %0,6 oranında tuz (NaCl) katılarak hayvanların %57'sinde asites oluşturulmuştur. Bu hayvanlara ait doku örneklerinde çeşitli firmalara (Calbiochem, Dako ve Neomarkers) ait ticari monoklonal antikolar kullanılarak immunohistokimyasal boyamalar denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada, deneysel olarak NaCl ile oluşturulan asites sendromunda immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1) ve TIMP-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2) aktivitelerinin yarı kantitatif olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### Tanım

Asites, hızlı büyüyen et tipi tavuklarda (broylar) görülen sağ ventriküler hipertrofi ve karın boşluğunda sıvı birikimi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (3, 4). Hastalığı belirtmek için alimenter toksemi, miyokarditis, tavuk ödem hastalığı, endoteliozis, hidroperikardiyal hastalık, ödem, toksik hepatit, sulu karın, avian ödem, konjestif kalp yetmezliği, toksik kalp hastalığı, toksik lipidozis ve yüksek rakım hastalığı gibi ifadeler kullanılmıştır (5). Hastalık bütün dünyada yaygındır. Maxwell ve Robertson (6), dünyadaki insidensin % 4,2 olduğunu ve bunun yıllık olarak yaklaşık 1 milyar Amerikan Doları civarında ekonomik zarara neden olduğunu bildirmişlerdir.

### Etiyoloji

Hastalığın etiyojisinde birçok sebep rol oynamaktadır:

**İrk-Hat-Cinsiyet:** Hastalık et tipi tavuklarda görülmektedir. Genetik olarak her yıl geliştirilen kas kitlesi ile orantılı olarak, bu gelişime uyum sağlayamayan kardiyovasküler sistem, hipoksiye sebep olmaktadır (4, 13, 43). Hunton (44), broylarların 1970'li yıllarda ortalama olarak günde 50 gram aldıklarını 1990'lı yıllarda ise bu artışın günde 65 grama çıktığını bildirmektedir. Hastalık yumurtacı ırk hatlarında görülmemektedir (4, 20, 41). Asitese duyarlılıkta broylar hatları arasında da bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Bains (15) ile Lubritz ve arkadaşları (23) çabuk gelişen ve kas kitlesi fazla olan hatlarda asitesin daha çok oluştuğunu söylemektedirler. Erkek hayvanlar daha fazla yem tükettikleri ve daha fazla metabolik enerjiye ihtiyaç duyduklarından asitese daha duyarlıdır (5, 15).

**Yükseklik ve Oksijen İhtiyacı:** Hastalığın ilk görüldüğü yıllarda yüksek rakımlarda oluşması, hastalığın oksijen azlığından ileri geldiğini göstermektedir. Daha sonra yapılan denemelerde asites oluşturmada yüksek rakımlardaki şartları sağlayan düşük basınçlı odalar kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (45, 46). Witzel ve arkadaşları (45), 2896 metreye karşılık gelen düşük basınçlı odalarda yaptıkları denemelerde, kronik hipoksinin %80 oranında asitese neden olduğunu saptamışlardır. Deneysel olarak pulmoner artere (47) ve ekstrapulmoner bronşlara klamp konulması (48, 49) sonrasında da hipoksiye bağlı olarak asites meydana getirilmiştir. Yumurtacı tavuklar broylarlara göre

yüksek rakıma daha dayanıklıdır ve 2500 metre yükseklikte hemoglobini (Hb) oksijen ile tam olarak doyurulabilirler (4). Deniz seviyesinde yetiştirilen broylerlerde havadaki oksijen miktarı normal olmasına karşın, hayvanlarda hipoksi görülmesi, bazal metabolizmanın yüksek olmasına, hızlı büyümelerine ve geniş kas kitlesine sahip olmalarına bağlanmıştır (4, 50). Ayrıca bazı yazarlar (13, 50), kuluçkadan çıkış sırasındaki oksijen azlığının asitesi tetikleyebileceğini bildirmişlerdir.

**Soğuk hava:** Çevre ısısındaki ani değişimler asitesi artıran sebepler arasında yer almaktadır. Bu süreç kuluçkadan çıkış ve hayvanların kümeslere taşınmasındaki soğuğa maruz kalma sırasında başlayabileceği gibi (15), yetiştiriciliğin herhangi bir döneminde de olmaktadır. Maxwell ve Robertson (6) ile Yaman ve Çevik (51), asitese bağlı ölümlerin en çok kış aylarında gerçekleştiğini ve ölüm oranlarının %10 ile %20 arasında değiştiğini kaydetmişlerdir. Shlosberg ve arkadaşları (43), düşük ısının hematokrit değeri yükselterek asitese neden olduğunu bildirmişlerdir. Wideman ve arkadaşları (17, 18), çevre ısısının 10-15 °C civarında tutulduğunda hayvanlarda pulmoner hipertansiyona bağlı asites geliştiğini bildirmişlerdir. Soğuk havada hayvanların vücut ısılarını dengelemek için fazla yem tüketmeleri ve bu yemi metabolize etmek için daha fazla metabolik oksijene ihtiyaç duymaları hayvanları hipoksiye sokar (4, 13).

**Diyet:** Metabolik enerji ve protein oranları yüksek olan yemler asitesi artırır (4, 13, 14). Ateşoğlu ve Erer (14)'in yapmış oldukları bir çalışmada, yüksek enerjili rasyon uygulanan grupta normal enerjili rasyon uygulanan gruba göre daha fazla asitese rastlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca pelet yem kolay alındığından ve daha fazla sindirildiğinden asites insidensini artırır (13).

**Kümeadaki hayvan sayısı:** Broylerlerin rahat hareket ettikleri ortamlarda asitese daha sık rastlanmaktadır. Maxwell ve Robertson (6) tarafından yapılan bir araştırmada, metrekareye 15-18 hayvan ile metrekareye 18-24 hayvanın konulması durumunda, metrekarede az hayvan olan kümeslerde asites insidensinin arttığı saptanmıştır. Julian (13) da hava kesesi yangısından sonra asitesteki artışı, hayvanlara diğer hayvanların ölümünden sonra daha fazla hareket imkanı verilmiş olmasına bağlamıştır.

**Işık:** Sürekli ışık uygulaması, artan yem alımına bağlı olarak asites insidensinde bir artışa neden olur (13,15,19). Buys ve arkadaşlarının (19) yapmış olduğu çalışmada, sürekli

ışık uygulamasının (23 saat aydınlık, 1 saat karanlık) aralıklı ışık uygulanmasından (1 saat aydınlık, 3 saat karanlık) daha fazla asitese sebep olduğu bildirilmiştir.

**Tiroid hormonu:** Plazma tiroid hormonlarının artışı (hipertiroidizm) vücut ağırlığında azalmaya ve asitese neden olur (50, 52). Scheele ve arkadaşları (53) T<sub>3</sub>'ün (3,3<sup>1</sup>, 5-triiodotironin) metabolik oranını artırdığını ve asitese duyarlı hatların duyarlı olmayanlara göre 3. haftadaki T<sub>3</sub> seviyelerinin 2 kat daha fazla olduğunu belirtmektedirler. Gonzales ve arkadaşları da (54) büyüme hormonunun T<sub>3</sub> seviyesini yükselterek dolaylı olarak asitesi artırdığını bildirmişlerdir.

**Dioksin:** Poliklorlu bifenil bileşikler içeren dioksin yeme eklendiğinde ödem ve asitese sebep olur (25). 1960'lı yıllarda gözlenen asitesteki artış dioksin kaynaklanmış, bu durumu tanımlamak için tavuk ödem faktörü ve toksik yağ sendromu gibi ifadeler kullanılmıştır (4,11). Dioksin parankimal organları ve damar endotelini etkileyerek ödem ve asitese neden olmaktadır (4, 11, 25).

**Kimyasal dezenfektanlar:** Kümes temizliği ve dezenfeksiyonlarında kullanılan formaldehit buharı, hekzanlar ve katranlı dezenfektanlar asites oluşumuna katkıda bulunurlar (4, 11).

**Monensin:** Yüksek dozda monensin kullanımı gerek memelilerde (39, 40) gerekse kanatlılarda (55) kardiyovasküler sistemi etkilemektedir. Memelilerde monensin zehirlenmeleri sonucunda hipoksi, akciğer ödemi, hidrotoraks ve asites oluşmaktadır (39, 40). Hanrahan ve arkadaşları (55), yüksek dozlarda monensin verilen kanatlılarda konjesyon, miyokardiyal genişleme ve hidroperikardiyum görmüşlerdir. Monensinin kalp kası hücrelerine girerek sodyuma (Na<sup>+</sup>) affinite gösterdiği ve sodyumun dışarı çıkıp, kalsiyumun (Ca<sup>2+</sup>) hücre içerisine girmesi ile kas kontraksiyonunun arttığı bildirilmiştir (41).

**Tuz (Sodyum Klorür, NaCl):** Yüksek miktarda alınan tuz da kan hacmini artırır ve pulmoner hipertansiyona (PH) sebep olarak asites oluşturur (4, 20, 21). Yıllardır tuzun sebep olduğu asitesin doku ve plazma arasındaki ozmotik farklılıktan ileri geldiği düşünülüyordu. Ancak, son yıllarda yapılan modern araştırmalar tuzla oluşturulan asitesin ana sebebini PH olarak göstermektedir (20). Memeliler için güvenli olan dozların,

kanatlılarda genel venöz durgunluk, periton ve perikard boşluklarında sıvı birikimi ve sağ ventrikülde dilatasyona yol açtığı bildirilmiştir (20, 21). Fields ve arkadaşları (56) ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, %1 NaCl verilen hayvanlarda sol ventrikülde hacim artışına rastlamışlardır. Oysa bazı araştırmacılar (20, 21), broylerlerde % 0.5'lik NaCl uygulamasının sağ ventrikülde dilatasyon ve asitese yol açtığını ifade etmişlerdir. Tuzla oluşturulan asitesteki klinik ve patolojik değişikliklerin yüksek rakımda ve doğal olarak oluşan asitesteki lezyonlara benzer olduğu bildirilmiştir (21). Eröksüz'ün (57) yapmış olduğu çalışmada litreye 6 gram tuz konan broylerlerde %25 ve litreye 12 gram tuz konan broylerlerde ise %75'e varan ölümlere rastlanmıştır. Kanatlılar arasında da tuza duyarlılıkta farklılıklar bulunmaktadır. Mirsalimi ve arkadaşlarının (20) yapmış olduğu bir çalışmada, içme suları ile yüksek miktarda (5 gr/lit) tuz verilen yumurtacı civcivlerde kan sodyum miktarında bir artış meydana gelmesine karşın, pulmoner hipertansiyona bağlı asitese rastlanmamıştır. Julian (4) ve Mirsalimi ve Julian (21), tuzla oluşturulan asiteste yaşın önemli bir faktör olduğunu, küçük hayvanların büyük hayvanlara kıyasla aynı miktardaki tuza karşı daha hassas olduklarını belirtmişlerdir. Bununla beraber yem veya sudaki tuz, büyüme ile birlikte azar azar artırıldığında hayvanların yüksek miktardaki tuza adapte olabildiği görülmüştür. Bu adaptasyon kalp, üriner ve kardiyovasküler sistemdeki gelişmeye bağlanmıştır (4, 20, 21). Yüksek konsantrasyondaki tuz hindilerde de broylerlerdekine benzer semptomlar oluşturmaktadır (58).

**Enfeksiyöz etkenler:** Asites sendromu metabolik bir hastalık olarak kabul edilmesine rağmen, Julian (4), Aspergillozis'in pulmoner hipertansiyona sebep olan tek doğal hastalık olduğunu ve broylerlerde hipoksik hipoksemi meydana getirerek pulmoner hipertansiyon ve asitese neden olduğunu bildirmiştir. Julian (4), aynı etkenin hindilerde de hava keselerinde yangı sonrası sağ kalpte hipertrofiye neden olduğunu belirtmiştir. *Clostridium perfringens*'in neden olduğu kolangiyohepatitis, karaciğerde hasar meydana getirerek asitese neden olmaktadır (3, 4). Sağ atriyoventriküler kapakta *Staphylococcus spp.* ve diğer enfeksiyonların neden olduğu endokarditisler sonucu da asites gelişmektedir (4). Huchzermeyer ve arkadaşları (12), deneysel olarak *Aegyptianella pullorum* ile anemi meydana getirerek hipoksik reaksiyon sonucu asites oluşturmuşlardır. Maxwell ve arkadaşları (26) yaptıkları elektron mikroskopik çalışmada, ortalama 100 nm boyunda zarflı, morfolojik olarak elektron yoğun nükleoidlere sahip intrasitoplazmik ve intersitisyel yerleşimli virusların varlığını belirtmiş ve bunun avian tumor virus olabileceğini ifade etmişlerdir. Bains (15), enfeksiyöz bronşitis virusunun bütün ticari kümeslerde yaygın

olduğunu, virusun hedef organ olarak trahea, akciğer ve böbrekleri seçerek asitese neden olabileceğini belirtmiştir.

**Primer Kalp ve Kalp Kapağı Hastalıkları:** Konjenital kalp hastalığı, sağ atrioventriküler kapak lezyonları ve dejeneratif kardiyomiyopati gibi problemlerin hastalığın oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir (4). Olkowski ve arkadaşları (9), asitesli hayvanların % 15–20'sinde sağ atrioventriküler kapakta lezyonlar görmüşlerdir. Sağ atrioventriküler kapaktaki endokarditisler valvüler yetersizliğe sebep olarak asitese neden olmaktadır (4).

### **Patojenez**

Broylerlerde asitesin oluşumundaki temel mekanizma, sağ ventriküler yetmezliğe bağlı olarak gelişen kronik pasif konjesyondur. Kronik pasif konjesyonun oluşumunda ise aşağıda incelenen çeşitli faktörler rol oynamaktadır.

Hayvanların soğuk ortamlarda (4) veya yüksek rakımlı yerlerde tutulmaları (4, 20-22), hipertiroidizm (50, 52-54), hızlı büyüme oranı gibi durumlar vücutta oksijene olan ihtiyacı artırır. Vücutta oksijen ihtiyacının artmasına bağlı olarak ilk aşamada kalp atım sayısında bir artış gözlenir (4, 22). Yem ve sudaki sodyum fazlalığı (4, 20-22), primer kalp ve kalp kapağı hastalıkları (9), anemi (12) ile akciğerleri etkileyen hastalıklar da vücutta oksijen ihtiyacına ve kalp atım sayısının artmasına neden olur. Sodyum fazlalığı özellikle genç hayvanlarda gelişmemiş böbrek yapısına ve düşük plazma ozmolaritesine bağlı olarak dolaşım yükünün artmasına yol açarak kalbin daha fazla çalışmasına sebep olur (20, 22).

Kalp atım sayısının artmasına bağlı olarak pulmoner arteriyel basınçta artış ve kalbin sağ ventrikülünde hipertrofi ve dilatasyon şekillenir (4, 20, 21). Pulmoner arteriyel basınçta artış, hipervolemi yada hipoksemiye bağlı olarak kan dolaşımındaki akışın artışına bağlı olabileceği gibi, kan damarlarındaki direncin artmasına da bağlı olabilir (4, 20-22, 50). Eritrositlerin deformasyonu (fazla miktarda sodyum ve hipoksiye maruz kalan eritrositlerin sertleşmesi) yada soğuğa bağlı olarak eritropoietin hormonunun etkisi ile artan eritrosit sayısı (4, 22, 50) ve çapı da (4, 22) kan damarlarındaki direnci artırabilir. Hipertrofi, kassel yapıda olan sağ kalp kapakçığında da gözlenir (4, 50).

Sağ ventrikülde ve kalp kapakçığında gelişen hipertrofi ve sağ ventriküler dilatasyon zamanla sağ ventriküler yetmezliğe yol açar (4, 22, 50). Sağ kalpteki büyüme ile pulmoner hipertansiyon arasında direkt bir ilişki olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (4, 20-22). Julian (22), normal bir broylerde sağ ventrikülün toplam ventriküle oranının 0,25'ten

küçük olması gerektiğini, bu oranın aşıldığı durumlarda ventriküler hipertrofi ve pulmoner hipertansiyondan bahsedilebileceğini bildirmektedir. Sağ kalp yetmezliğinde, ventriküler sistol sırasında ventrikülden atriyuma akış olur (4, 50). Sağ ventriküler yetmezliğe bağlı olarak meydana gelen kan dinamiğindeki basınç dengesizliği karaciğer ve venöz sistemdeki basıncı artırır (4, 20-22, 50, 59). 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 kapsülasından karın boşluğuna sızarak asitese neden olur (59).

### **Klinik Belirtiler ve Nekropsi Bulguları**

Klinik olarak hastalık broylerlerde genellikle 3. haftadan sonra görülür (3, 14, 51). Hayvanlarda baş ve vücut derisi siyanotiktir (4, 5, 25, 51). Deri altı venalar dilate olmuş (3, 4), ve tüyler karışmıştır (3-5). Karın boşluğu asites sıvısı nedeni ile gergindir (3-5, 24, 51, 60). Hayvanlarda solunum sayısı oldukça artar, hatta hayvanlar yakalanmaya çalışıldıklarında ölebilirler (3, 4). Asitesli hayvanların diğer hayvanlara göre büyümelerinde gecikme görülür (4, 5, 24, 45). Maxwell ve Robertson (5), hastalığa dişilere kıyasla daha çok erkek hayvanlarda rastlandığını bildirmişlerdir.

Nekropside deri ve bacaklarda konjesyon (4), but, karın ve göğüs bölgesi deri altında ödem görülür (5, 14, 51). Karın boşluğunda 40-500 ml, berrak, sarı renkte, fibrinli bir sıvı bulunur (3-5, 14, 24, 25, 51). Ateşoğlu ve Erer (14), normal enerjili yem ve %0,6 tuzlu su verilen broylerlerde karın boşluğunda 80-130 ml asites sıvısı gördüklerini, buna karşın yüksek enerjili yem ve %0,6 oranında tuzlu su ile beslenen hayvanlarda ise sıvı miktarının arttığını ve 100-250 ml arasında değiştiğini vurgulamışlardır. Maxwell ve Robertson (5), asitesli hayvanların karın boşluğundan aldıkları sıvıda, eritrosit, lenfosit ve makrofajların bulunduğunu bildirmişlerdir. Karaciğer şişkin, ödemli, yüzeyi düzensiz ve kenarları kütleleşmiş olup, kapsülası gri-beyaz renkte, kalınlaşmış olup, yüzeyine yapışmış halde fibrin bulunur. (3-5, 14, 24, 25, 51). Ateşoğlu ve Erer (14), karaciğer yüzeyinde 1 cm çapına kadar varan değişen büyüklükte, sarımsı-gri renkte nodüller ile gri-beyaz renkte odaklar gördüklerini bildirmişlerdir. Asitesli broylerlerde hidroperikardiyuma rastlanır (3, 4, 11, 14, 50), perikarddaki sıvının miktarı 6-7 ml arasında değişebilir (51). Bazen perikardın kalbin yüzeyine yapışmış olduğu gözlenir (3, 4). Sağ atriyoventriküler kapakta kalınlaşmalar (25) ve yangı (3) görülebilir. Sol atriyoventriküler kapakta ve çevre dokularda da çeşitli nodüllere rastlanabilir (9). Sağ ventrikülde hipertrofi

ve dilatasyon görülür (4, 14, 18, 40, 41, 51, 55, 57). Vena kavanın oldukça genişlediği dikkati çeker (4, 54). Akciğerde konjesyon ve ödem görülür (4, 14, 18, 40, 51, 53, 57). Böbreklerin şişkin, soluk renkli ve kanamalı olduğu belirtilmiştir (53, 57).

### **Histopatolojik Bulgular**

Asitesten etkilenen hayvanların akciğerlerinde yaygın ödem (4, 24, 51), parabronşlarda ve hava kapıllarlarında aşırı genişleme, değişen derecelerde konjesyon ve kanamalar görülür (5, 26, 51). Bazı parabronşlarda fibröz kalınlaşma (4) ve epitel hücrelerinde proliferasyon dikkati çeker (5, 26). Ayrıca parabronşiyal düz kaslarda hipertrofi (14, 24), atriyum ve hava kapıllarlarında kollaps gözlenir (24). Parabronşiyal matrikste yaygın lenfosit infiltrasyonu görülür (5, 14). Asitesten etkilenen hayvanların akciğerlerinde hiyalini, fibröz, kemiksel ve kıkırdaksal tipte nodüllere rastlanır (4, 5, 7, 24, 27). Küçük ve orta çaplı pulmoner arteriyollerde mediyal hipertrofi saptanabilir (8, 61). Kapıllar ve arteriyol endotellerinin hipertrofik olduğu, elektron mikroskopik muayenede ise endotellerin zayıfladığı ve dejenere olarak kabarcıklar içerdiği, bunun sonucunda damarların hassas hale gelerek kanamalara sebep olduğu bildirilmiştir (61).

Perikardiyumda fibröz kalınlaşma ve miyokardiyumdaki hücrelerde hipertrofi dikkati çeker (4, 5, 24). Kas fibrilleri arasında fokal kanama alanları ile heterofil ve eozinofil lökosit infiltrasyonları gözlenir (5, 24). Nadir olarak ödem (51), lenfosit infiltrasyonları, zayıf bağ doku artışı ve atriyumdaki endokarda fibrozis görülür (4, 14, 24). Olkowski ve arkadaşları (35) Taramalı Elektron Mikroskopunda yaptıkları çalışmalarında preasitik ve asitesli hayvanlarda kollajen miktarının giderek azaldığını görmüşlerdir.

Karaciğerdeki sinuzoidlerin dilate olduğu, kapsülünün ödem ve fibrozis sebebi ile kalınlaştığı (4, 5, 14, 24) ve kapsüldeki lenfatik damarların genişlediği gözlenmiştir (24). Portal bölgede de lenfosit ve heterofil lökositlerde artış görülmüştür (5, 14, 24). Bunun yanı sıra az miktarda da olsa hepatositlerde vakuoller (4, 14, 24, 51) ve kolangiyollerde safra gözlenmiştir (24). Ateşoğlu ve Erer (14), karaciğerde multifokal koagülasyon nekrozu, portal bölgede bağ doku artışı ile Remark kordonlarında ayrılma tespit etmişlerdir.

Böbreklerde glomeruluslarda ve damarlarda konjesyon (5, 14), bazal membranlarında kalınlaşma görülür (5). Toplayıcı tubul lümenlerinde ürat kristalleri (5), tubul epitel hücrelerinde bulanık şişme (14), nekroz (24) ve intersitisyel dokuda fokal lenfosit infiltrasyonları bildirilmiştir (5, 14). Ayrıca organ kapsülündeki fibröz bağ dokunun arttığı da kaydedilmiştir (14, 24).



Kırk yıla yakın bir süreden beri, yüksek oranda yemden faydalanma ve bunun ete çevrilmesi yönünden sürdürülen genetik çalışmalar hayvanlarda yüksek kas kitlesi, buna karşın aynı oranda gelişmeyen kardiyovasküler sistem ve zayıf kemik gelişimini meydana getirmiştir (2). Bu bozukluklar sonucunda broylerlerde Ani Ölüm Sendromu, Tibial Diskondroplazi ve Pulmoner Hipertansiyon Sendromu'na bağlı Asites gibi hastalıklar ortaya çıkmıştır (2, 3). Gerek kemik anormalliklerinde matriks yapım ve yıkımı ile yeniden şekillendirilmesi ve gerekse asiteste damar geçirgenliğinin, bazal membranın bütünlüğünün bozularak, artması gözönüne alındığında; damar oluşumu, kemik oluşumu ve organların şekillenmesinde önemli yer tutan matriks proteinleri ve bunların metabolizmasında rol oynayan metalloproteinazlar önem kazanmaktadır (2, 28).

Matriks metalloproteinazlar, normal ve patolojik bir çok olayda görev alan enzimlerdir. Normal ve invaziv tümör hücreleri tarafından sentezlenen (28, 62, 63), çinko ve kalsiyum (64) taşıyan endopeptidazlar ailesinden olup, ESM'nin parçalanması ve yeniden modellenmesinden (remodelling) sorumludurlar (28, 31, 63, 65).

ESM, kollajen, proteoglikan, glikozaminoglikan, glikoprotein (fibronektin, kondronektin, laminin) ve bazı dokularda elastin içeren kompleks bir yapıdır (66, 67). Kolaylık açısından 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 (bazal membran) tarafından ESM'den ayrılır (67). ESM hücrelerin göçü, çoğalması, farklılaşması (68) ve damarların oluşması süresince bağ dokunun yeniden modellenmesinde (2) önemli rol oynar. MMP'ler ESM'i oluşturan çapraz bağlı, erimeyen, farklı kollajen tiplerini, elastini, laminini ve proteoglikanları parçalarlar (28, 35, 62, 64, 68). Bu yüzden embriyo morfogenezisi, blastosist implantasyonu, yeni damar oluşumu (angiogenesis), dokunun yeniden modellenmesi (remodelling), tümör invazyonu ve metastazi (28, 29, 35, 65, 68) yara iyileşmesi (28, 63), periodontal hastalıklar, yangısel durumlar (28, 66) gibi bir çok fizyolojik ve patolojik olayda görev almaktadırlar. Li ve arkadaşları (62) patolojik bozukluklarda aktif enzim ile inhibitörler (TIMP) arasındaki dengelerin değiştiğini bildirmişlerdir.

MMP ailesi 14 farklı izoformdan oluşmakta ve önemli yapısal benzerliğe sahip bulunmaktadır. Bununla beraber her MMP, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda fonksiyonel olarak farklılık sergiler (31). 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) MT-MMP (Membran tip MMP)'lerdir (62, 69). Bu enzimler şu özellikleri taşırlar:

- 1) Endopeptidazdırlar (31, 63, 65).
- 2) Kalsiyum (30, 63) ve Çinko (28, 32, 62-65, 68) ile bağıdırlar ve şelatör ajanlarca (62) inhibe edilirler.
- 3) Bütün MMP'ler propeptid ve katalitik alan olmak üzere iki bölgeye sahiptirler. Bu katalitik bölge aktivitesi için çinkoya ihtiyaç duyarlar (28, 65).
- 4) Nötral pH'da aktivite gösterirler (63, 65).
- 5) Yüksek korunma derecesine sahiptirler (62).
- 6) Latent formda (Pro-MMP) veya inaktif olarak ESM'e salgılanırlar ve fizyolojik olarak yaklaşık 10 kDa'luk bir peptidin ayrılmasından sonra aktive edilebilirler (28, 30, 62, 63, 65, 66). Aktivasyonları onkojenler, tümör promotörleri, büyüme faktörleri, nötrofil ve monositlerden salgılanan serin proteaz (32) ve reaktif oksijen metabolitleri (HOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH) tarafından "Sistein Switch Mekanizması" ile tetiklenir (28, 30, 33, 64).
- 7) Endojen olarak spesifik matriks doku inhibitörleri (TIMP) (28, 30, 61-64, 66) ve alfa-2 makroglobulinin inaktivasyonu (30) ile inhibe edilirler. Ekzojen olarak inhibisyonda taşıdıkları çinkonun şelasyonu esastır. Örneğin tetrasiklinler aktif olan çinko bölgesi ile birleşirler (70).

MMP'ler fibroblastlar, kondrositler, epitel hücreleri, damar endotel hücreleri (2, 28-30), kemik hücreleri (30), astrositler (pro-Jelatinaz A), mikroglialar (Jelatinaz B) (29), plöral mezotel hücreleri (31), mezenşimal, epiteliyal ve endotelyal kökenli tümör hücrelerinden (28), T hücreleri (32), monositler, makrofajlar ve aktive olmuş nötrofiller tarafından (30, 33) salgılanmaktadır. Rath ve arkadaşları (34), kanatlılarda memeli nötrofil lökositlerin karşılığı olan heterofil lökositlerde de MMP'lerin varlığını bildirmişlerdir.

MMP'lerin aktiviteleri transkripsiyon, translasyon ve sekresyon aşamalarında düzenlenebilir (62, 69). Örneğin transkripsiyon aşamasında MMP'ler sitokinlere, büyüme faktörlerine ve hormonlara cevap verirler (62). Hücrelerden salgılandıktan sonra özellikle MMP-2 ve MMP-9, TIMP'ler ile birleşerek kompleksler oluşturur ve stabil olarak kalırlar. MMP-2 ile TIMP-2, MMP-9 ile de TIMP-1 kompleks oluşturur (62, 63). Ayrıca Stefanson ve arkadaşları (63) kanatlılarda bulunan ve yeni bir TIMP üyesi olan 21 kDa'luk ChIMP-3 (chicken inhibitor of matrix metalloproteinase-3)'ün MMP-2 ile kompleks oluşturduğunu

ve kanatlı MMP-2 aktivitesinin bu inhibitör (ChIMP-3) tarafından düzenlendiğini bildirmektedir.

MT-MMP'lerin MMP'leri aktive ettikleri bilinmektedir (68). Pro-MMP ve TIMP kompleksi, aktive olmuş MT-MMP'ye bağlanır ve bu bağlanma MMP'lerin aktivasyonu ile sonuçlanır (61, 68). Bazı inhibitörler ise enzimin hem latent, hemde aktif formlarının aktivitesini engileyerek iki aşamalı bir rol oynamaktadır (63).

Stefanson ve arkadaşları (63), hücre kültürü ortamında Rous Sarcoma virus ile transforme edilmiş tavuk embriyo fibroblast'larının 70 kDa'luk MMP (Progelatinaz, MMP-2) sentezlediklerini belirtmişlerdir. Staskus ve arkadaşları (71) da TIMP-2'nin tavuk embriyo fibroblast kültüründe varlığını göstermişlerdir. İnsan MMP'leri ve kanatlı MMP'leri arasında homolojinin varlığı Aimes ve arkadaşları (65) tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacılar insan ve kanatlı pro-MMP'leri arasında %84'e varan homoloji tespit etmişlerdir. Bu homoloji propeptid ve katalitik bölgelerde %88'e ulaşmaktadır (65).

Olkowski ve arkadaşları (35) yaptıkları çalışmada, asitesli broylerlerin kalplerinde MMP-2 düzeyini, sağlıklı broyler ve yumurtacı tavuklara göre daha yüksek bulurlarken, MMP-9'a hemen hemen hiç rastlamamışlardır. Aynı araştırmacılar MMP-2 düzeyindeki artışın, oluşan kalp yetmezliğindeki kalp kası dokusunun patolojik olarak yeniden modellenmesine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Akciğerlerde MMP'ler toplam kollajen kitlesinin %10'undan fazlasını bir gün içinde değiştirebilecek kapasiteye sahiptir (31). Patolojik durumlar söz konusu olmadığı sürece MMP ve TIMP'ler arasında çok hassas bir denge vardır (29, 31, 36). Bu denge şiddetli akciğer yangılarında, tümör metastazlarında, akciğer amfizeminde, bronşiyektazi, kistik fibrozis, hepatik fibrozis (69) ve ARDS (Yetişkin Solunum Stresi Sendromu) sırasında oluşan akciğer ödemi gibi patolojik durumlarda MMP artışı yönünde bozulur (33).

MMP'ye karşı oluşan TIMP'ler proteolitik hasarın süresi ve yayılması konusunda bilgi verir (36). Carney ve arkadaşları (33), ARDS sırasında nötrofil aracılı alveoler kapiller yüzey tahribinde, nötrofillerden salınan oksijen radikalleri, serin proteazlar ve MMP'lerin pulmoner kapillar bazal membranı ve tip IV kollajenden zengin ESM'yi parçalayıp permeabiliteyi artırarak ödeme yol açtığını bildirmiştir. Aynı şekilde 72 kDa'luk tip IV kollajenaz veya menigitis yapan bakteriler (72) intraserebral olarak verildiğinde kan-beyin bariyerini yıkımlayarak ödeme yol açar (29, 32, 36). Rossenberg ve Navratil (36), beyin ödemi sırasında da normalde beyinde görülmeyen MMP-9'un artış göstererek, kan-beyin bariyerindeki damarlarda bulunan tip IV kollajeni parçaladığını bildirmişlerdir.

Corbel ve arkadaşları (73), deneysel olarak oluşturdukları akciğer fibrozisinde BAL

(bronkoalveoler sıvı)'da MMP-2 ve MMP-9'un arttığını ve BAL içerisindeki total hücre ve nötrofil sayısı ile MMP-9 aktivitesi arasında bir paralellik olduğunu belirtmişlerdir. Zeng ve arkadaşları (68), 23 kolorektal kanserli hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kolon mukozası bazal membranındaki tip IV kollajenin tüm hastalarda yıkılmaları immunohistokimyasal boyamalarda negatif sonuç verdiğini ve bu alanlarda MMP-9'un boyanma özelliğinin şiddetle artmış olduğunu göstermişlerdir. Eickelberg ve arkadaşları (31), 88 plöral effüzyonlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, tüm hastaların plöral sıvısında MMP-2 ve TIMP-1'in varlığını göstermişlerdir. Ayrıca, TIMP-2 eksikliğinin MMP-2 aktivitesini artırdığını vurgulamışlardır. MMP-9'a ise sadece eksudatlı hastalarda rastladıklarını ve MMP-9'un yangısel durumlarda arttığını bildirmişlerdir. Yangısel durumlarda, yangı hücreleri damar dışına çıkarken, damar endotellerini ve ESM'i geçerler. ESM'i geçmek için bu yapıyı oluşturan komponentleri parçalamaya ihtiyaç duyarlar (62). Li ve arkadaşları (62), akut mastitislerde meme alveol lümenlerine infiltre olan nötrofil lökositlerde MMP-9 üretiminin arttığını, buna karşın MMP-2'nin bulunmadığını saptamışlar ve yangısel olaylarda nötrofil lökositlerin MMP-9 salgılayarak bazal membranı parçaladıklarını bildirmişlerdir. Aimes ve arkadaşları (65) ile Zeng ve arkadaşları (68), tümör hücrelerinden salgılanan MMP-2 ve MMP-9'un damar bazal membranı parçaladığını belirtmişlerdir. Ayrıca, Saed ve arkadaşları (37), fare embriyo fibroblast kültürüne uyguladıkları hipoksi sonrasında MMP-9 aktivitesinde %64 oranında azalma görürken, MMP-2 aktivitesinde herhangi bir değişime rastlamadıklarını ve hipoksinin MMP-9'un düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir.

MMP'lerin dokular üzerindeki varlığının belirlenmesinde kullanılan İH (immunohistokimya), dokularda bulunan protein, karbonhidrat veya lipid moleküllerinin (antijen) enzim ile işaretlenmiş bir antikor yardımı ile reaksiyona girmesi sonucuna dayalı bir tekniktir (74). İmmunohistokimyasal 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 (75). İndirekt olarak kullanılan Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yönteminde sekonder antikor biotinle işaretlenmiş olup, daha sonra Streptavidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi ile birleşir (75). İH'de bir antijenin konsantrasyonu, boyandığı kromojenin görünen yoğunluğu ile kolayca değerlendirilir. Bu değerlendirme daha çok bağıl olarak yapılmaktadır. Antikorum etkinliğinin kıyaslanmasında yarı kantitatif metod

etkilidir. Sonuçlar tipik olarak 1+, 2+, gibi değerlendirilerek 3 veya 4'e kadar numaralandırma yapılır (74).



## GEREÇ VE YÖNTEM

### GEREÇ

#### Hayvan Materyali

Çalışmada 1 günlük, erkek, “Avian Farm 43” hattı<sup>1</sup> 80 adet et tipi civciv ile 1 günlük, erkek, “Lohman LSL” hattı<sup>2</sup> 80 adet yumurtacı civciv olmak üzere toplam 160 hayvan kullanıldı.

#### Deneyisel Gruplandırma

Et tipi ve yumurtacı hatlar kendi aralarında 2 gruba ayrılarak toplam 4 grup oluşturuldu. İçme suyuna tuz konan broyler grup TB (Tuzlu Broyler), tuz uygulaması yapılmayan broyler grup NB (Normal Broyler), içme suyuna tuz konan yumurtacı grup TY (Tuzlu Yumurtacı) ve tuz uygulaması yapılmayan yumurtacı grup NY (Normal Yumurtacı) olarak kodlandı. Her grupta 40 civcivin bulunduğu hayvanlar tel ile çevrilmiş 1'er m<sup>2</sup>'lik 4 bölme konuldu.

#### Deneyisel Ortam

Daha önceden dezenfeksiyonu yapılan ve 33 °C'ye ısıtılan kümeste sıcaklık ilk hafta birer santigrad derece, sonraki 4 hafta ikişer santigrad derece azaltıldı. Kümesin ısıtılması 1 adet LPG'li radyan soba ile sağlandı. Kümeste ışık kaynağı olarak sürekli yanan ve sarı ışık veren, iki adet 60 Watt'lık ampul kullanıldı.

#### Aşılamalar

Aşılamalarda kullanılan tüm aşilar ticari bir firmadan<sup>3</sup> sağlandı. Hayvanlara ilk gün Newcastle aşısının B1 suşu kullanılarak (Hipraviar-B1) gaga daldırma yöntemi ile aşılama yapıldı. Daha sonra hayvanlar 16. günde Gumboro Hastalığına karşı (Hipragumboro-

<sup>1</sup> Özsoylar A.Ş., Bandırma, Türkiye.

<sup>2</sup> Hastavuk A.Ş., Bursa, Türkiye.

<sup>3</sup> Gürtav Tavukçuluk ve Tarım Ürünleri Ticaret ve San. Ltd. Şti., Bursa, Türkiye.

CH/80) ve 21. günde Gumboro Hastalığına, Newcastle Hastalığının B1 suşuna ve Infeksiyöz Bronşitis Hastalığının H-120 suşuna (Hipragumboro- CH/80, Hipraviar-B1, Hipraviar-B1/ H120) karşı aşılandılar.

### **Mikroskop**

Tüm incelemeler Nikon marka (YS2-H, Japonya) ışık mikroskopunda gerçekleştirildi.

### **Tartım**

Deney boyunca tüm tartım işlemleri Sartorius marka (BP 110S, Almanya) hassas terazi ile gerçekleştirildi

### **Beslenme**

Civcivler kümese getirildiklerinde ilk 4 saat boyunca %5 şekerli su ile beslendi. Daha sonra bütün gruptaki hayvanlara ilk 7 gün için en az %22 ham protein ve 3100 Kcal/kg metabolik enerji içeren broyler başlangıç yemi kullanıldı. 8-19'uncu günler arası hayvanlara en az %20 ham proteinli ve 3050 Kcal/kg metabolik enerjili broyler büyütme yemi ve 20-42'inci günler arası da en az %18 ham proteinli ve 3100 Kcal/kg metabolik enerji içeren broyler bitirme yemi verildi. Çalışma sırasında hayvanlara verilen yemler C.P. Yem Ltd. Şti.'den (Bursa, Türkiye) sağlandı.

### **Tuz (NaCl) Uygulaması**

İlk 7 gün bütün gruplara normal su verildi. 8. günden itibaren TB ve TY gruplarına %0.6'lık NaCl içeren (1000 ml suya 6 gr tuz) su uygulamasına başlandı ve deneyin son günü olan 42. güne kadar bu uygulama devam etti. Bu grupların kontrolü olan NB ve NY gruplarının sularına herhangi bir uygulama yapılmadı.

### **Sakrifikasyon**

Sekizinci ve 16. günlerde 4 gruptan 5'er adet hayvan sakrifiye edildi. Ayrıca deney süresince tuz uygulanan broyler grubunda (TB) ölüm meydana gelen günlerde, kontrol

amacı ile diğer gruplardaki (NB, TY, NY) hayvanlardan da 1'er adet sakrifiye edilip nekropsileri yapıldı. Deneyin son günü olan 42. günde kalan tüm hayvanlar sakrifiye edilerek nekropsileri yapıldı.

### **Histopatolojik Preparatların Hazırlanması**

Nekropsi sonrası alınan dokular %10'luk tamponlu formalin içerisine kondu. Dokuları alkol ve ksilol serisinden geçirmek için ototeknikon (Histokinette, Type E-7326, İngiltere) cihazı kullanıldı. Bloklanmış dokular rotari mikrotomda (American Optical Company, Model 820, A.B.D.) kesildi.

### **İmmunohistokimyasal Boyamalar**

İmmunohistokimyasal boyamalar sırasında Neomarkers firmasına (A.B.D.) ait MS-806-P Ab-4 kodlu matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MS-820-P Ab-8 kodlu MMP-9, MS-608-R7 Ab-2 kodlu tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) ve MS-1154-R7 Ab-4 kodlu TIMP-2 primer antikorları kullanıldı. Primer antikorların sulandırması Large Volume UltraAb Diluent (Labvision Cat.No: TA-125-UD, AB.D.) ile yapıldı. Sekonder antikor olarak Labvision firmasına ait (Cat. No: TM-60-BN) biotinli goat-anti mouse sekonder antikor kullanıldı. Sekonder antikora bağlanmak üzere Labvision firmasına ait streptavidin peroksidaz (TS-60-HR) kullanıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için Labvision firmasına ait hidrojen peroksit bloklama solüsyonu (Cat.No: TA-125-HP) kullanıldı. Zemin boyanmasının maskelenmesi için Labvision firmasına ait protein bloklama solüsyonu (Cat.No: TA-60-UB) kullanıldı. AEC kromojen olarak Labvision firmasına ait (TA-002-HAC) kromojen ile AEC substrat (Labvision Cat. No: TA-015-HAS) kullanıldı. Phosphat buffer Saline (PBS) olarak Labvision firmasına ait (Cat. No: TA – 125-PB) solüsyon kullanıldı.

Hedef organ olarak belirlenen akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin aynı lama çekildi ve bunun için Menzel Glaser® (Almanya) firmasına ait SuperFrost Plus® polilizinli lamalar kullanıldı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için Bosch (HMT 812 B, Almanya) marka mikrodalga fırın kullanıldı. Antikorların ve kullanılan diğer solüsyonların dağılmaması için Dako (Danimarka) firmasına ait hidrofobik kalem (pen for immunohistochemistry, Code No: S 2002) kullanıldı. Dokular üzerine damlatılan solüsyonların kurumalarını önlemek için cam malzemedeki yapıtılan nemli bir ortam (nemlendirme kutusu) kullanıldı.



## **YÖNTEM**

### **Aşılama**

İlk gün uygulanan aşılama gaga daldırma metodu ile tüm hayvanlara uygulandı. Diğer aşılamalarda her grupta aşılamadan 1 saat önce suluklar kaldırıldı ve toz halindeki aşılarda suda eritilerek, 50 gr süt tozu katılmış 500 ml ılık su içerisinde boşaltılarak hayvanların içmeleri sağlandı.

### **Sakrifikasyon ve Nekropsi**

Sakrifikasyon, boyunun her iki tarafında bulunan arteria carotis communis ile vena jugularislerin kesilmeleri sureti ile gerçekleştirildi. Hayvanların öncelikle karın boşluğu açıldı. Karın boşluğu içerisindeki sıvının miktarı ve özellikleri kaydedildi. Çalışma sonuçlarının incelenmesi için hedef organ olarak beyin, akciğer, karaciğer ve böbrek seçildi. Bir örnekliliği sağlamak bakımından beynin talamus ve medulla oblongata bölgelerinden, akciğerin sol lobu, karaciğerin sağ lobu ile böbreğin sağ kranial lobu histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için alındı. Diğer organlardan da histopatolojik inceleme için dalak, ince bağırsak (duodenum), bursa Fabricius ve kalbin sağ ventrikülü seçildi.

### **Kalp İndeksi**

Kalp indeksini bulmak amacı ile bütün gruplardaki hayvanların kalpleri alınarak kalbin bazisinde yer alan büyük damarlar ve atriyum kesilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra sağ ventrikül kalpten kesilerek ayrıldı ve hassas terazi ile tartıldı. Bu değer, tartılan sağ ventrikül, sol ventrikül ve interventriküler septal dokuların toplam değerine oranlandı. Birden fazla hayvana ait indeks değerlerinin hesaplanmasında ortalama değer alındı.

### **Histopatolojik İnceleme**

Nekropsi sonrası alınan dokular %10'luk tamponlu formaldehit içerisinde alındı. Trimi yapılan ve hedef organ seçilen dokulardan akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin bir kasete, dalak, ince bağırsak (duodenum), bursa Fabricius ve kalbin sağ ventrikülü de ayrı bir

kasete alınarak 48 saat tespitite kaldıktan sonra alkol ve ksilol serisi içeren Ototeknikon cihazına alındı. Daha sonra bloklanan dokular rotari mikrotomda 5 mikrometre kalınlığında kesildi. Alınan kesitlerin tümü HE (Hematoksilen-Eosin), ayrıca gerekli görülenler van Gieson, von Kossa, PTAH (Fosfotungustik asit-Hematoksilen), Masson'un trikrom boyası (76) ve hedef organ olarak seçilen akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin kesitleri Streptavidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (StreptABCComplex) yöntemi ile boyanarak (74, 75) ışık mikroskopunda incelendi.

### **İmmunohistokimyasal Boyama**

Konsantre halde 1 ml'de 200 µg bulunan MMP-2 ve 9 antikorları, her bir preparat için 2 µg/100 µl olacak şekilde 1/10 oranında sulandırıldı. TIMP-1 ve TIMP-2 boyamaları için kullanıma hazır halde gönderilen primer antikorlar dokular üzerini kapatacak şekilde doğrudan uygulandı. İmmunohistokimyasal boyamada indirekt streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanıldı.

- Bu yöntem ile aynı lama alınan beyin, akciğer, karaciğer ve böbreğe ait dokular, 5 mikron kalınlığında kesilerek polilizinli lamlara çekildi.

- Polilizinli lama çekilen dokular 70 °C'lik etüvde 60 dakika kurutuldu.

- Deparafinizasyon işlemi için dokular ksilole alındı (2x5 dakika).

- Dokular %70'lik alkol solusyonundan geçirildi (2x5 dakika).

- Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için tamponlu sitrat solusyonu içerisine alınan kesitler, 700 Watt'lık enerji kullanılarak mikrodalg fırında 5'er dakikalık 4 ısıtma işlemine tabi tutuldu. Isıtma işlemleri arasında buharlaşarak kaybolan tamponlu sitrat miktarının telafisi için yeni tampon eklendi.

- Bu işlem bittikten sonra kesitler, tamponlu sitrat içerisnde 20 dakika bekletildi.

-Tamponlu sitrat buffer solusyonundan çıkarılan dokuların etrafi hidrofobik kalem ile çizildi.

- Bu işlemden sonra distile su içerisnde 5 dakika yıkanan dokular PBS içerisine alınarak 5 dakika yıkandı.

- Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla dokular üzerine hidrojen peroksit solusyonu dökülerek 5 dakika bekletildi.

- Dokular PBS içerisnde 5 dakika yıkandı.

- Zemin boyanmasının maskelenmesi için dokular üzerine otomatik pipet yardımı ile protein bloke edici solusyon damlatılarak 10 dakika beklendi.

- Dokular yıkanmadan primer antikorlar damlatılarak (100 µl) 1 saat nemlendirme kutusunda laboratuvar sıcaklığında inkübe edildi.
- Takiben dokular PBS solusyonunda yıkanarak, üzerlerine biotinli sekonder antikor ilave edilip kapalı ve nemli ortamda 10 dakika bekletildi.
- PBS içerisinde yıkanan dokular üzerine streptavidin peroksidaz damlatılarak 10 dakika beklendi.
- Hazırlanmış olan AEC kromojen ve AEC substrat karışımı (50 µl AEC kromojen + 1ml AEC substrat) dokular üzerini kapatacak şekilde lamlara damlatılarak 15 dakika beklendi.
- PBS ile yıkanan dokular Mayer hematoksilen ile karşı boyama yapılarak, akar suda 5 dakika yıkandı ve gliserin jel damlatılarak lamel ile kapatıldı.

### **İmmunohistokimyasal Değerlendirme**

Akciğerde plöradaki mezotel hücreleri, parabronşiyal epiteller, damar endotel hücreleri ve damarlar etrafındaki yangı hücreleri; karaciğerde kapsüla, epitel hücreleri (hepatosit), damar endotel hücreleri, damarlar etrafındaki portal bölgede yer alan yangı hücreleri, bağ doku hücreleri ve safra kanalı epitelleri; böbrekte kapsüla, tubul epitelleri, damar endotel hücreleri, damarlar etrafındaki yangı hücreleri ve bağ doku hücreleri; beyinde meninks, damar endotel hücreleri ile nöron ve ependim hücrelerinin boyanma özellikleri değerlendirildi. İmmunohistokimyasal skorlamada boyanmanın dağılımı, yoğunluğu ve boyanan hücre tipleri göz önüne alınarak, 0: boyanmayan, 1 (+): zayıf boyanan, 2 (+): orta derecede boyanan, 3 (+): güçlü boyanan ve 4 (+): çok güçlü boyanan kesitler olmak üzere bir skala kullanıldı.

### **İstatiksel Değerlendirmeler**

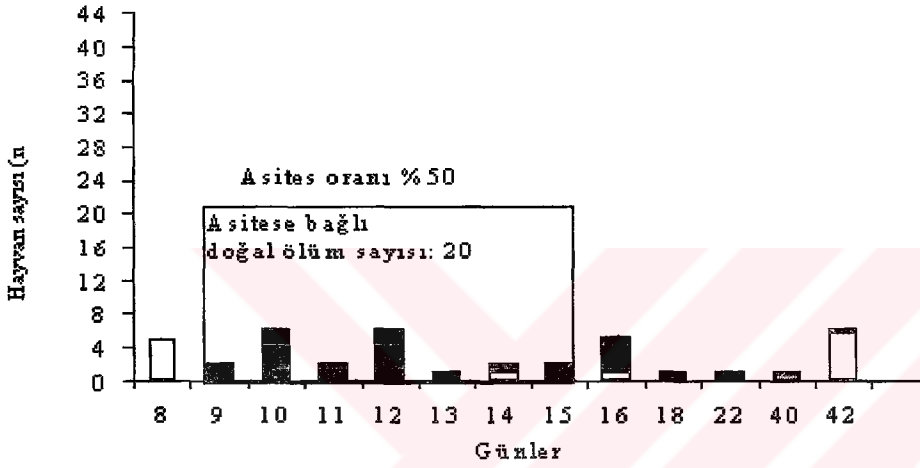
İstatistiksel değerlendirmeler yapılırken deneyin başlangıç günü olan 8. gün, asitese bağlı ölümlerin en çok gözlendiği 9-15. günler ve ölümlerin daha seyrek gözlendiği 16-42. günler göz önüne alınarak, 3 grup oluşturuldu. Tuzlu ve normal broylerler, enzimler ve organlar düzeyinde bu gün grupları ile kendi içerisinde ve birbirleriyle karşılaştırıldı. Bağımsız grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında Non- Parametrik testlerden Kruskal-Wallis Testi uygulandı. Bu test sonrası anlamlı çıkan gruplarda Mann-Whitney Test'i ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Bağımlı grupların karşılaştırılmasında Non Parametrik

testlerden Wilcoxon Signed Ranks Test'i uygulandı. Gruplara göre kalp indeksi ortalama değerleri Korelasyon Analizi Testi ile karşılaştırıldı (77).



## BULGULAR

Çalışmada tuz uygulanan 40 broylerden 28'inde (%70) asites görülürken, tuz uygulanan yumurtacı grup ve kontrol gruplarında asitese rastlanmadı. Ölümün en yoğun olarak gerçekleştiği 9 ile 15. günler arasında ölen hayvanların sayısı toplam hayvan sayısının %50'sini (20 adet) oluşturdu (Şekil 1). Ölen ve sakrifiye edilen hayvanlarda asites oranlarının günlere göre dağılımı Tablo-1'de gösterilmiştir. Deneyin son günü olan 42. günde tuz uygulanan broyler grubunda kalan 6 adet broylerin nekropsisinde sadece bir hayvanda asitese rastlandı.



Şekil-1 Ölen ve sakrifiye edilen (8., 16. ve 42.günlerde) TB grubu hayvan sayılarının günlere göre dağılımı. (□): Doğal veya sakrifikasyona bağlı ölümler, (■): Asitese bağlı ölüm sayısı.

Tablo-1 Ölen ve sakrifiye edilen hayvanlarda asites oranlarının günlere göre dağılımı (Asites / Ölüm [doğal veya sakrifiye])

Gruplar	8. gün	9. gün	10. gün	11. gün	12. gün	13. gün	14. gün	15. gün	16. gün	18. gün	22. gün	40. gün	42. gün
TB	0/5	2/2	6/6	2/2	6/6	1/1	1/2	2/2	4/5	1/1	1/1	1/1	1/6
NB	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5	0/1	0/1	0/1	0/20
TY	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5	0/1	0/1	0/1	0/20
NY	0/5	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5	0/1	0/1	0/1	0/20

### Klinik Bulgular

Klinik olarak muayene edilen hayvanların ilk birkaç gün hiçbir klinik bulgu göstermeden ölmelerine karşın, daha sonraki günlerde asitesli hayvanlarda karın duvarının şişkin olduğu

ve hayvanların hareket etmek istemedikleri dikkati çekti. Genellikle dispnö problemleri olduğu gözlenen asitesli hayvanlarda derinin siyanotik olduğu görüldü (Şekil-2). Asitesli grupta dışkı daha sulu ve altlıklar daha nemli idi. Hayvanların tüyleri karışmış ve sulu dışkının bulaşmasından dolayı kirlenmişti. Asitesli hayvanlarda, NB grubuna kıyasla vücut gelişimi daha yavaştı. NB, TY ve NY gruplarında herhangi bir klinik bulguya rastlanmadı.

### Makroskobik Bulgular

Özellikle ilk günlerde ölen hayvanlarda daha şiddetli olmak üzere deri altı bağ dokusunda ödem dikkati çekti (Şekil-3). Asitesli hayvanların karın boşluğu açıldığında, miktarı 3 ile 50 ml arasında, açık saman renginden koyu sarıya kadar değişen renkte ve bazen fibrin pıhtıları da içeren sıvıya rastlandı. Karaciğer kapsülünün matlaşmış ve kalınlaştığı, üzerinde fibrin kitlelerinin olduğu dikkati çekti (Şekil-4). Perikard sıvısının artmış olduğu gözlemlendi (hidroperikardiyum). Akciğerler konjesyone ve ödemliydi (Şekil-5). Kalbin oldukça büyüdüğü ve kesit yapıldığında sağ ventrikülün hipertrofiye ve dilate olduğu gözlemlendi (Şekil-6, 7, 8, 9). Kalp indeksi ile ilgili rakamsal değerler ile TB-NB ve TB-TY gruplarının ortalamalarının karşılaştırılmasına ait istatistiksel veriler Tablo-2, 3 ve 4'de gösterilmiştir. Asitesli hayvanların böbreklerinde konjesyon ve büyüme saptandı. Sakrifiye edilen NB, NY ve TY grubu hayvanlarda herhangi bir makroskobik bulguya rastlanmadı (Şekil-10, 11).

**Tablo-2** Gruplarda kalp indeksi ortalama değerlerinin günlere göre dağılımı (%)

Günler	TB	NB	TY	NY
8. gün	0,200	0,186	0,186	0,198
9. gün	0,280	0,140	0,130	0,200
10. gün	0,250	0,210	0,160	0,160
11. gün	0,285	0,230	0,200	0,200
12. gün	0,290	0,210	0,150	0,180
13. gün	0,330	0,220	0,230	0,230
14. gün	0,335	0,210	0,220	0,220
15. gün	0,330	0,170	0,240	0,200
16. gün	0,240	0,220	0,210	0,210
18. gün	0,360	0,250	0,250	0,230
22. gün	0,440	0,250	0,240	0,230
40.gün	0,380	0,250	0,210	0,190
42.gün	0,330	0,290	0,225	0,217

**Tablo- 3** TB ve NB gruplarında kalp indeksi değerlerinin istatistiksel verileri

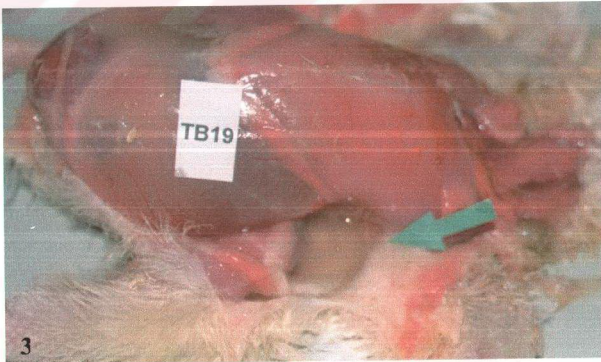
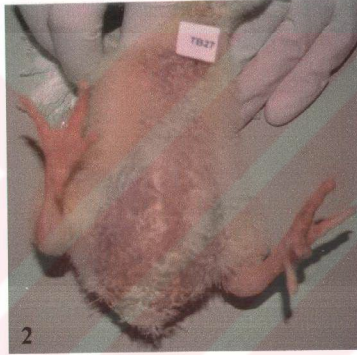
Grup	N	Ortalama	Median	Ortalama Std. Sapma	Minimum	Maksimum	Anlamlılık
TB	13	0,311	0,330	0,018	0,200	0,440	P<0,001
NB	13	0,218	0,220	0,011	0,140	0,290	

N: Tablo 2'deki gün grubu değerleri sayısı

**Tablo-4** TB ve TY gruplarında kalp indeksi değerlerinin istatistiksel verileri

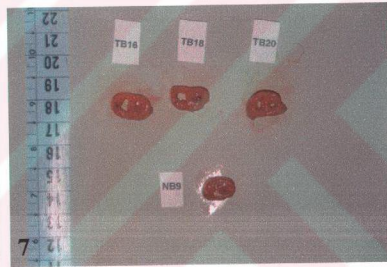
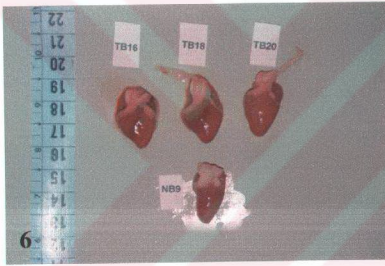
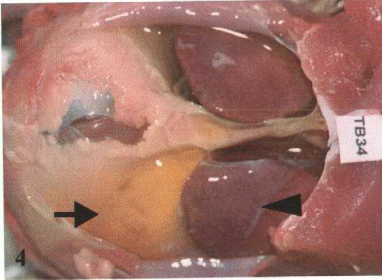
Grup	N	Ortalama	Median	Ortalama Std. Sapma	Minimum	Maksimum	Anlamlılık
TB	13	0,311	0,330	0,017	0,200	0,440	P<0,001
TY	13	0,203	0,210	0,010	0,130	0,259	

N: Tablo 2'deki gün grubu değerleri sayısı



**Şekil-2** Karın duvarında siyanotik görünüm, (TB27, 15. gün).

**Şekil-3** Deri altı bağ dokusunda belirgin ödem (ok), (TB19, 12. gün).



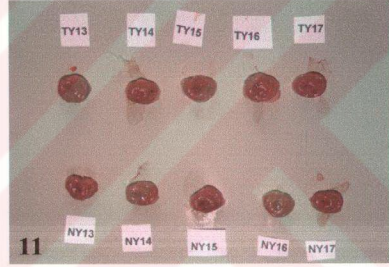
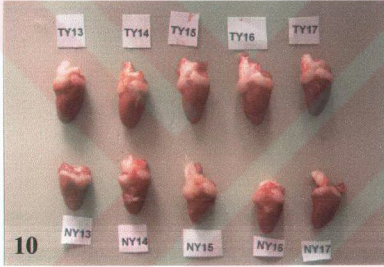
**Şekil-4** Karın boşluğunda sıvı birikimi (ok) ve karaciğer üzerinde ince fibrin tabakası (ok başı), (TB 34, 40. gün).

**Şekil-5** Asitesli hayvanlarda akciğerlerde konjesyon ve ödem, TB: Asites, NB: Kontrol (10. gün).

**Şekil-6** Asitesli hayvanlarda kalpte hipertrofi, TB: Asites, NB: Kontrol (12. gün).

**Şekil-7** Asitesli hayvanlarda sağ ventrikülde dilatasyon, kalbin transversal kesiti. TB: Asites, NB: Kontrol (12. gün).





**Şekil-8** Asitesli hayvanda kalpte hipertrofi, TB: Asites, NB: Kontrol (18. gün).

**Şekil-9** Asitesli hayvanda sağ ventrikülde dilatasyon, kalbin transversal kesiti, TB: Asites, NB: Kontrol (22. gün).

**Şekil-10** Tuz uygulaması yapılan (TY) ve tuz uygulanmayan (NY) yumurtacılara ait kalplerin normal görünümü (16. gün).

**Şekil-11** Tuz uygulaması yapılan (TY) ve tuz uygulanmayan (NY) yumurtacılara ait kalplerin normal görünümü, transversal kesit (16. gün).

## **Mikroskopik Bulgular**

Hedef organlara ait histopatolojik bulgular aşağıda detaylı olarak verilmiş ve Tablo-5' de özetlenmiştir.

### **Akciğer**

TB grubunda yer alan ve asites görülen hayvanların akciğer kesitlerinin hemen hepsinde parabrönşiyal matrikste ki kapillar damarlar ve interparabrönşiyal bağ dokuda yer alan damarlarda şiddetli hiperemi gözlemlendi. TB grubundaki hayvanların büyük çoğunluğunda ve az da olsa diğer gruplarda arteriyollerin etrafında yer alan adventisyal tabakadaki bağ doku hücrelerinin seyrek bir görünüm aldığı (ödem) dikkati çekti (Şekil-12). Özellikle TB grubu hayvanlarda arteriyollerdeki kas tabakasında hipertrofi görüldü. Ayrıca TB grubunda daha fazla olmak üzere damarlar etrafında çoğunluğunu lenfosit ve makrofajların oluşturduğu değişen derecelerde mononükleer hücre infiltrasyonlarına rastlandı (Şekil-13). Hemen hemen bütün gruplardaki hayvanlarda parabrönşiyal matriksi oluşturan hava kapillarlarının yer yer kollabe olduğu ve TB grubunda daha şiddetli olmak üzere bütün gruplardaki hayvanlarda parabrönşiyal matrikste değişen şiddette fokal veya diffüz mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize interstisyel pnömoni görüldü. Özellikle NB grubundaki hayvanlarda daha fazla olmak üzere, bütün gruplarda parabrönşiyal matriks içerisinde yuvarlak, çoğunlukla sınırları belirgin, van Kossa ile siyah renkte boyanan, osseöz/kartilagenöz nodüllere rastlandı (Şekil-14). TB grubundaki hayvanlarda parabrönşiyal düz kaslarda belirgin hipertrofi gözlemlendi.

### **Karaciğer**

Karaciğer kapsülasını oluşturan bağ doku hücrelerinin TB grubuna ait hayvanların bazılarında artmış olduğu (fibrozis) gözlemlendi. Van Gieson boyamasında bu bölgede pembe renkte, Masson'un üçlü boyamasında ise mavi renkte boyanan kollajen ipliklerine rastlandı. Yapılan PTAH boyamasında karaciğer kapsülası üzerinde ayrıca homojen mavi renkte boyanan fibrin iplikleri gözlemlendi (Şekil-15). Bağ doku aktivitesi artışına bu grupta yer yer karaciğer parankiminde, özellikle de portal bölgede rastlandı. TB grubundakine benzer bağ doku artışına diğer gruplarda rastlanmadı. Portal bölgedeki lenf damarlarının TB grubunda genişlemiş olduğu dikkati çekti. Yine bu grupta sinuzoidlerin yer yer genişleyerek Remark kordon yapısını bozduğu (dissosiasyon) görüldü. Hepatositlerde keskin sınırlı ve yuvarlak vakuollere yumurtacı gruplarda hafif şiddette rastlanırken, broylerlerde bu lezyon daha şiddetliydi ve TB grubunda koagülasyon nekrozuna kadar varan değişiklikler gözlemlendi (Şekil-16). TB, TY ve NY grubundaki hayvanların çoğunda, buna karşın NB grubundaki

hayvanların sadece ikisinde portal bölgede mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil-17).

### Böbrek

Böbrek kapsülasyonu oluşturan bağ dokunun, TB grubunda yer alan hayvanların bazılarında arttığı (fibrozis) dikkati çekti. Bu gruptaki hayvanların çoğunda kortekste ve medülladaki damarlarda şiddetli konjesyon gözlemlendi. Arteriyoller ve tubuller etrafında, çoğunlukla TB ve TY gruplarında, aralarında tek tük heterofil lökositlerin de bulunduğu mononükleer hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Şekil-18). Bütün gruplarda, bazı hayvanlarda proksimal ve distal tubullerde hafiften şiddetliye kadar değişen derecelerde bulanık şişme ve koagülasyon nekrozuna rastlandı (Şekil-19).

### Beyin

Beyinde hiperemiden başka patolojik bir bulguya rastlanmadı.

**Tablo-5** İç organlarda gözlenen mikroskopik bulguların gruplara göre dağılımı

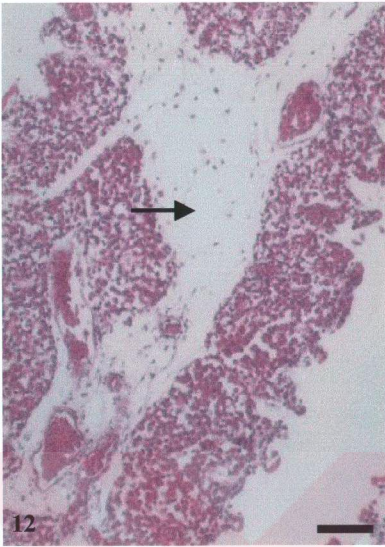
	TB	NB	TY	NY
<b>Akciğer</b>				
Ödem	34/40	4/40	15/40	11/40
Arterioller etrafında infiltrasyon	29/40	15/40	14/40	21/40
İntersitsiyel pnömoni	21/40	13/40	15/40	25/40
Osseo/ kartilagenöz nodül	12/40	21/40	4/40	3/40
<b>Karaciğer</b>				
Kapsülada fibrozis	7/40	0/40	0/40	0/40
Parankimde bağ doku artışı	9/40	0/40	0/40	0/40
Lenfatiklerde genişleme	16/40	0/40	0/40	0/40
Sinuzoidlerde genişleme	26/40	0/40	0/40	0/40
Hepatositlerde vakuolizasyon	32/40	30/40	22/40	6/40
Portal bölgede hücre infiltrasyonu	19/40	2/40	14/40	20/40
<b>Böbrek</b>				
Kapsülada fibrozis	13/40	6/40	1/40	1/40
İntersitsiyel nefritis	14/40	6/40	16/40	7/40
Tubullerde dejenerasyon	26/40	20/40	10/40	10/40
<b>Kalp</b>				
Ödem	23/40	0/40	2/40	0/40
Miyokarditis	19/40	4/40	5/40	11/40

### Diğer Organlar

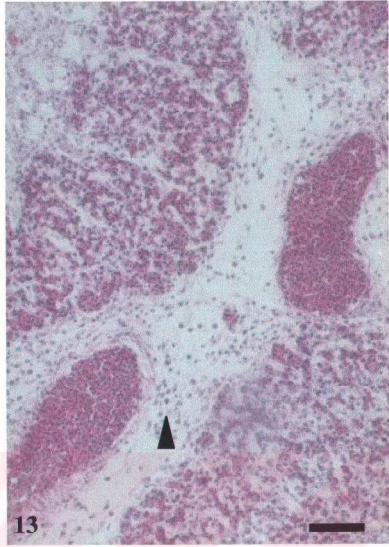
Kalpte TB grubunda asitesten ölen 28 hayvanın 23'ünde ve TY grubuna ait iki hayvanda miyokardiyumda ödem gözlemlendi. Çoğunlukla TB grubu hayvanlarda olmak üzere tüm gruplardaki hayvanlarda miyokardiyumda hafif şiddette mononükleer hücre ve heterofil

lökosit infiltrasyonlarına rastlandı (Şekil-20). TB grubundaki hayvanların kas tellerinde sitoplazmanın ve çekirdeklerin soluk renk alarak büyüdüğü (hipertrofi) gözlemlendi.

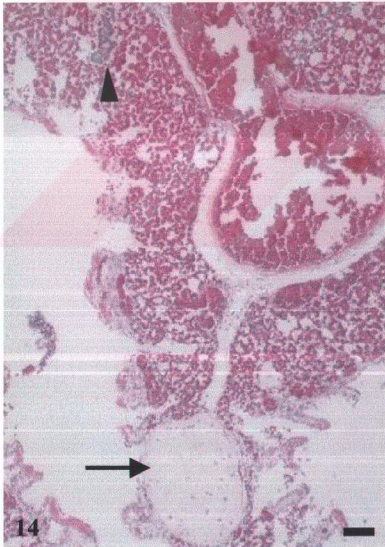
Mikroskopik incelenmesi yapılan dalak, ince bağırsak ve bursa Fabricius'ta hiperemi dışında patolojik bir bulguya rastlanmadı.



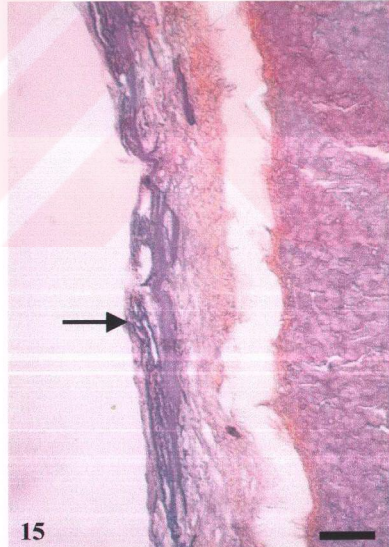
12



13



14



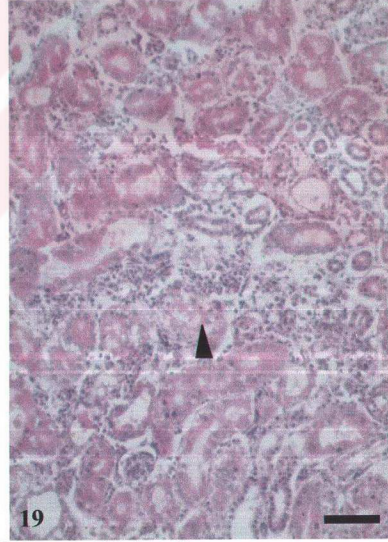
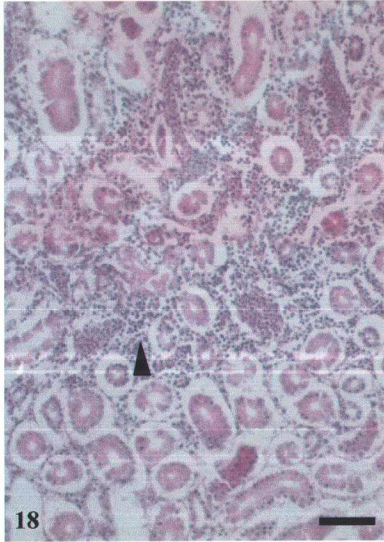
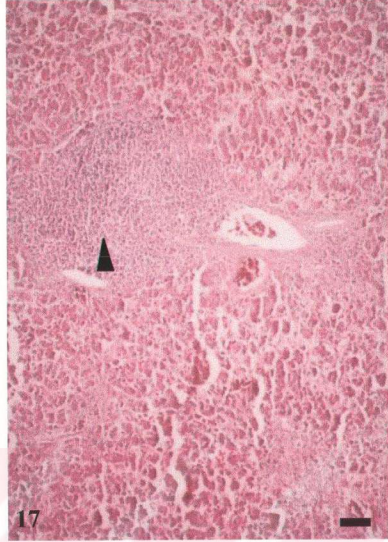
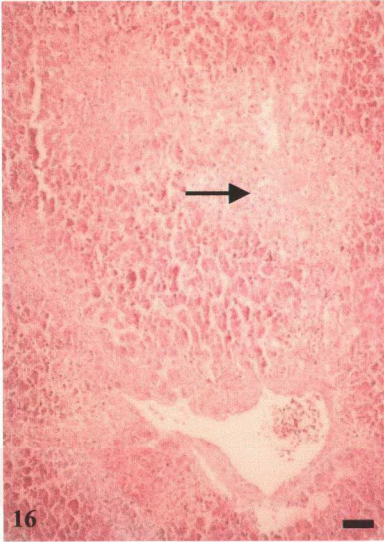
15

**Şekil-12** İnterparabronşiyal matrikste ödem (ok), (TB21, 12. gün), H.E., bar=50 µm

**Şekil-13** İnterparabronşiyal matrikste mononükleer hücre infiltrasyonu (ok başı), (TB21, 12. gün), H.E., bar=50 µm

**Şekil-14** Akciğerde osseöz (ok başı) ve kartilagenöz (ok) nodüller, (TB34, 40. gün), H.E., bar=50 µm

**Şekil-15** Karaciğer kapsülası üzerinde fibrin (ok), (TB 27, 15. gün), PTAH., bar=50 µm



Şekil-16 Karaciğerde koagülasyon nekrozu (ok), (TB 38, 42. gün), H.E., bar=50 µm

Şekil-17 Karaciğerde portal bölgede mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başı), (TB 38, 42. gün), H.E., bar=50 µm

Şekil-18 Böbrekte intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başı), (TB 14, 11. gün), H.E., bar=50 µm

Şekil-19 Böbrekte tubullerde parankim dejenerasyonu (ok başı), (TB 15, 11. gün), H.E., bar=50 µm

## **A- İmmunohistokimyasal Bulgular (Kalitatif)**

İmmunohistokimyasal olarak MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 primer antikorları ile boyanan akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin preparatlarının boyandıkları alanlar ve hücresel düzeyde boyanma özelliklerine göre dağılım Tablo-6, 7, 8 ve 9'da verilmiştir.

### **MMP-2 antikoruna ile yapılan boyamalar**

Akciğerlerde plöral mezotel hücreleri, bronşiyollerdeki epitel hücreleri, damar endotel hücreleri ve arteriyoller etrafında bulunan bağ doku hücrelerinin bu antikor ile pozitif reaksiyon verdikleri gözlemlendi (Şekil-21). Yine tüm gruplarda hafif şiddette pnömoni gözlenen hayvanlarda damarlar etrafında ve intersitisyel dokuda özellikle yangı hücrelerinde (makrofajlarda) pozitif reaksiyonlara rastlandı (Şekil-22). Ayrıca bazı osteokartilagenöz nodüllerde de pozitif reaksiyon gözlemlendi.

Karaciğer kesitlerinin MMP-2 antikoruna ile boyanmasında kapsülada yer alan bağ doku hücreleri, hepatositler, safra epitelleri, portal bölgedeki bağ doku hücreleri ve damar endotel hücrelerinde pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil-23). Yangısel hücre infiltrasyonlarının gözlemlendiği alanlarda yangı hücrelerinin de (özellikle makrofajlar) pozitif olarak boyandıkları görüldü.

MMP-2 antikoruna ile yapılan böbrek kesiti boyamalarında kapsülada ve intersitisyel dokuda yer alan bağ doku hücreleri, tubul epitelleri, damar endotelleri ve yangısel hücrelerin (çoğunlukla plazma hücreleri ve makrofajlar) pozitif reaksiyon verdikleri gözlemlendi (Şekil - 24, 25).

Beyinde meninkste ve beyin parankiminde yer alan damar endotellerinde, nöronlarda ve yer yer de epindim hücrelerinde MMP-2 ile pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil-26).

### **MMP-9 antikoruna ile yapılan boyamalar**

Bu antikor ile yapılan boyamada akciğerlerde MMP-2'ye benzer şekilde plörada bulunan mezotel hücreleri ve bronşiyollerdeki epitel hücrelerinin pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi (Şekil-27). Endotel hücrelerindeki pozitif reaksiyonun sınırlı kaldığı, arteriyoller etrafında bulunan bağ doku hücrelerinin ise boyanmadığı görüldü. Yer yer gözlenen yangı hücrelerinin (makrofajlar) bu antikor ile boyandıkları dikkati çekti (Şekil-28). Ayrıca damar adventisiasının ve osteokartilagenöz yapıların sınırlı boyandığı gözlemlendi.

Karaciğer kesitlerinin MMP-9 antikoruna ile yapılan boyamalarında kapsüladaki bağ doku hücrelerinin, hepatositlerin, safra epitellerinin ve damar endotellerinin tüm kesitlerde boyandığı, portal bölgede yer alan bağ doku hücrelerinin ise az sayıda hayvanda ve sınırlı

olarak boyandığı gözlemlendi (Şekil-29). Yer yer rastlanan mononükleer yangı hücrelerinin pozitif boyandıkları görüldü.

MMP-9 antikoruna ile yapılan böbrek dokusu boyamalarında tubul epitellerinin boyandığı, buna karşın kapsüladaki bağ doku hücrelerinin, damar endotelinin ve yangısel hücrelerin boyanmasının birkaç hayvan ile sınırlı kaldığı gözlemlendi (Şekil-30).

Beyinde genellikle nöron ve meninkslerin boyandığı, damar endotelinde ve ependim hücrelerinde ise boyanmanın sınırlı kaldığı, buna karşın damar adventisiasının boyanmadığı görüldü.

#### **TIMP-1 antikoruna ile yapılan boyamalar**

TIMP-1 antikoruna ile yapılan boyamalarda akciğerlerde mezotel hücreleri ve bronşiyol epitellerinin pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi. Damar endotel hücrelerinde ve arteriyoller etrafında bulunan bağ doku hücrelerinde de pozitif reaksiyon görüldü (Şekil-31). Yer yer gözlenen yangı hücrelerinin bu antikor ile belirgin olarak boyandıkları dikkati çekti. Osteokartilagenöz yapıların da yer yer pozitif olarak boyandıkları görüldü.

Karaciğerde hepatositlerin, portal bölgedeki damar adventisiasının, yangı hücrelerinin ve kısmen de kapsülünün kuvvetli boyandığı görüldü. Damar endotelleri, portal bölgedeki bağ doku hücreleri ve safra epitellerinin ise sınırlı olarak boyandığı dikkati çekti (Şekil-32).

Bu antikorla yapılan böbrek boyamalarında kapsüle, damar adventisiası ve tubul epitellerinin pozitif olarak boyandıkları görüldü. Bunlardan özellikle damar adventisiasının belirgin olarak boyandığı dikkati çekti (Şekil-33). Damar endotelleri, mononükleer hücreler ve bağ doku hücrelerinin ise sınırlı boyandıkları gözlemlendi.

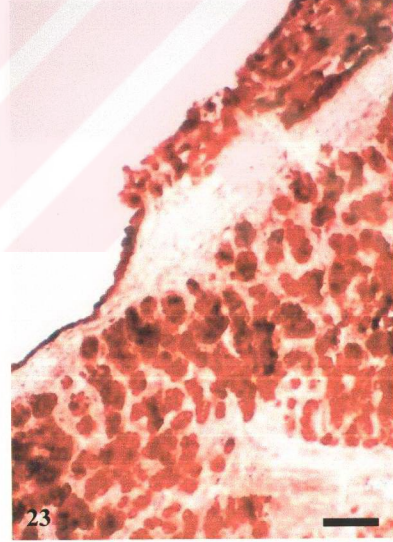
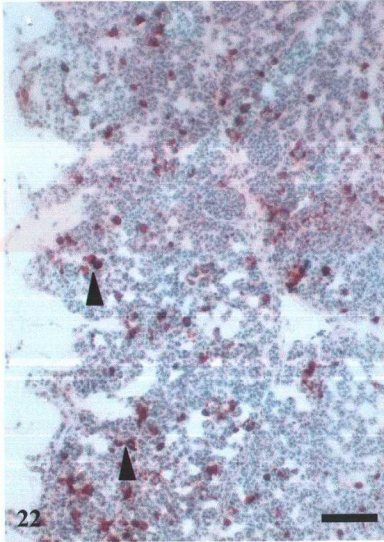
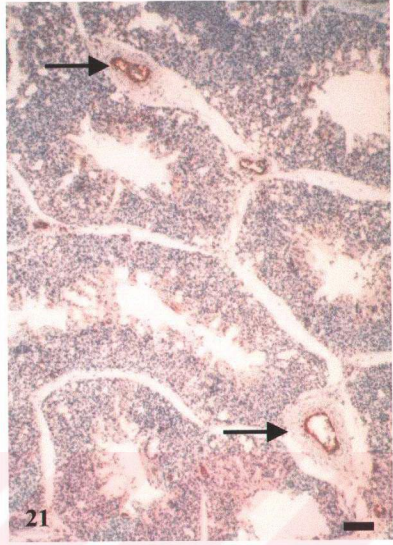
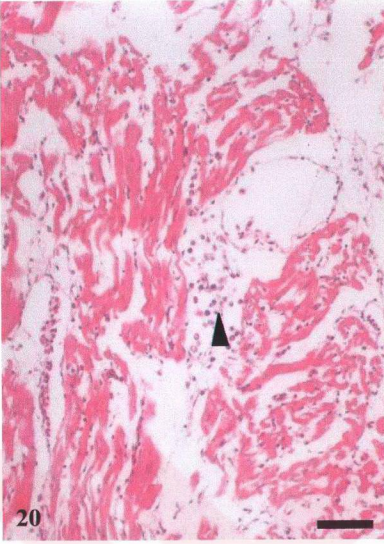
Beyin kesitlerinin boyamalarında meninksler, nöronlar ve damar adventisiasının çoğu hayvanda pozitif reaksiyon gösterdiği, damar endotelleri ve ependim hücrelerinin daha sınırlı boyandığı dikkati çekti (Şekil-34).

#### **TIMP-2 antikoruna ile yapılan boyamalar**

Akciğer kesitlerinin TIMP-2 antikoruna ile yapılan boyamalarında mezotel hücreleri, bronş epitelleri, damar endotelleri ve az sayıda yangı hücrelerinin pozitif boyandığı dikkati çekti. Damar adventisiası, damar etrafındaki bağ doku ve osteokartilagenöz yapıların ise boyanmadığı görüldü (Şekil-35).

Karaciğerde çoğunlukla hepatositlerin boyandığı, kapsüle, damar endotelleri, safra epitelleri ve yangı hücrelerinin bazı kesitlerde boyandığı, damar adventisiası ve portal bölgedeki bağ doku hücrelerinin ise boyanmadığı gözlemlendi (Şekil-36).



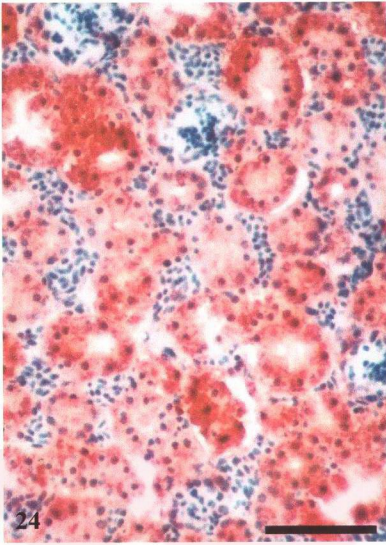


**Şekil-20** Myokardiyumda yangısel hücre infiltrasyonu (ok başı), (TB23, 14. gün), H.E., bar=50 µm

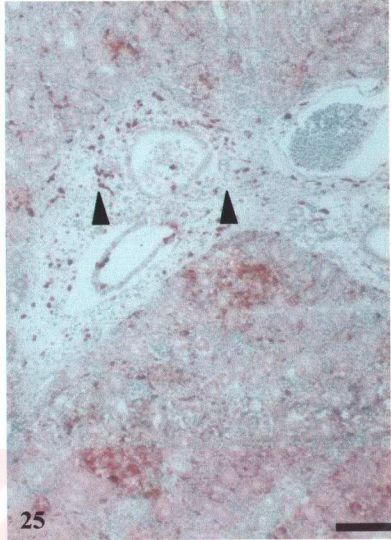
**Şekil-21** Endotel hücrelerinde MMP-2 immün peroksidaz pozitif reaksiyon (oklar), Akciğer, (NB7, 10. gün), Streptavidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks boyama (StreptABC), Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-22** Akciğerlerde makrofajlarda MMP-2 pozitif boyanma (ok başları), (TB33, 22. gün), StreptABC, Skor: 4+, bar=50µm

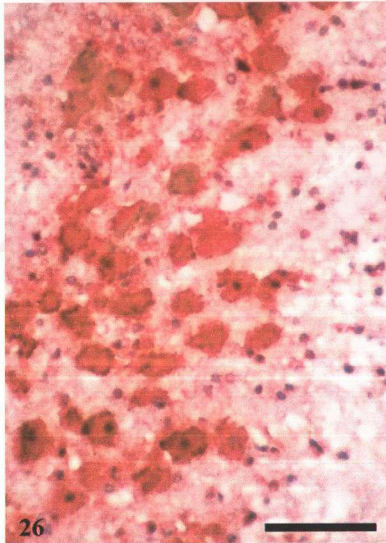
**Şekil-23** Hepatositlerde MMP-2 pozitif reaksiyon (TB38, 42. gün), StreptABC, Skor: 4+, bar=50 µm



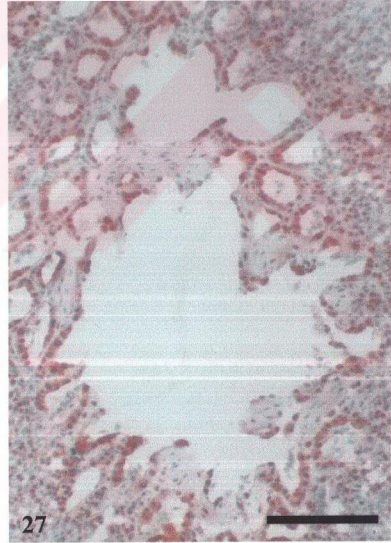
24



25



26

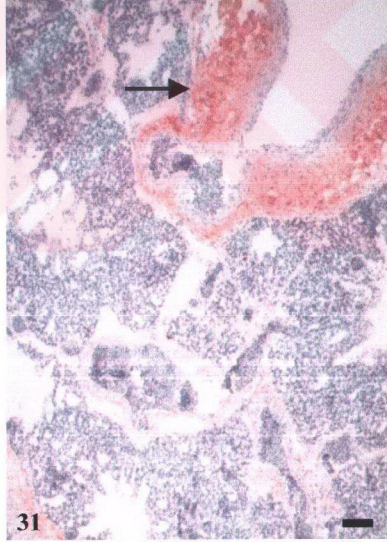
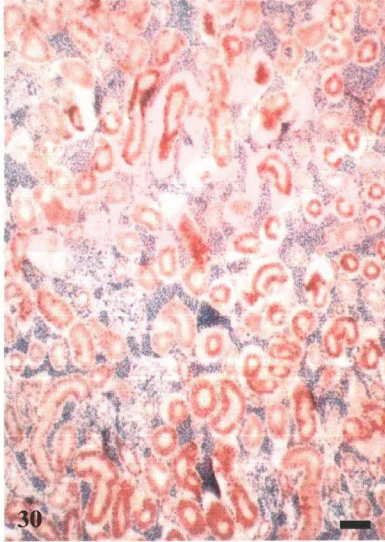
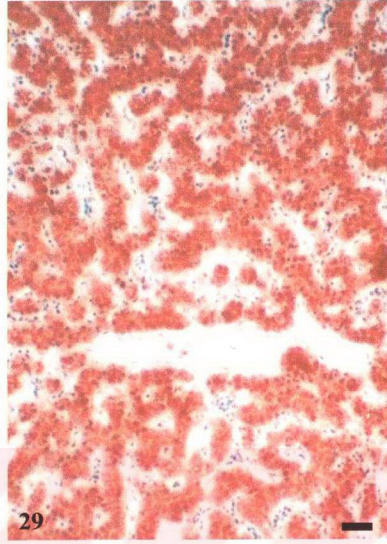
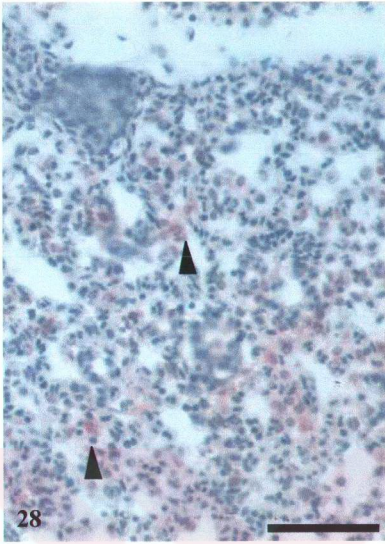


27

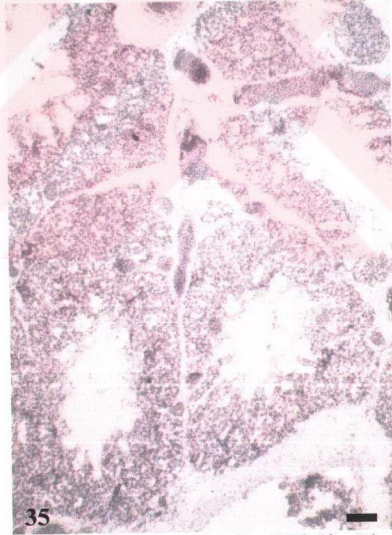
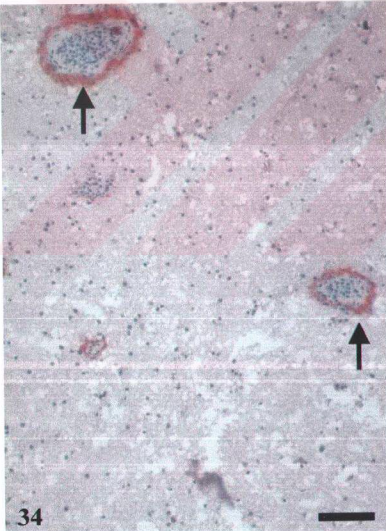
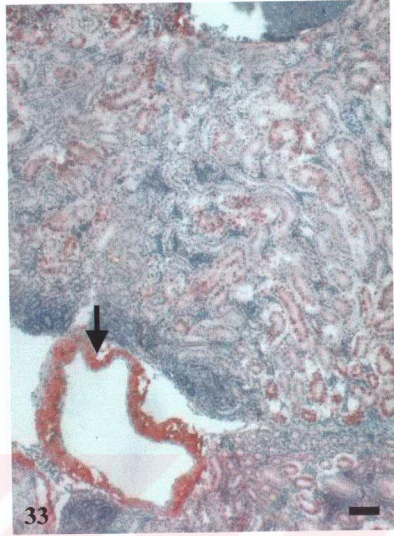
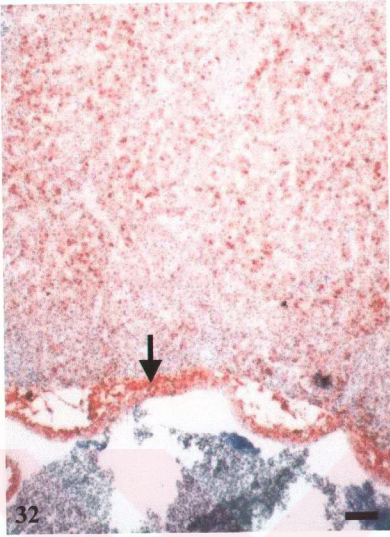
**Şekil-24** Tubul epitellerinde MMP-2 pozitif reaksiyon, (TB18, 12. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm  
**Şekil-25** Böbrekte yangı hücrelerinde MMP-2 pozitif boyanma (ok başları), (TB15, 11. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-26** Nöronlarda MMP-2 pozitif reaksiyon, (TB18, 12. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-27** Bronşiyol epitellerinde MMP-9 pozitif boyanma, (NB5, 8. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm



**Şekil-28** Akciğerde yeni hücrelerinde MMP-9 pozitif boyanma (ok başları), (TB15, 11. gün), StreptABC, Skor: 1+, bar=50 µm  
**Şekil-29** Hepatositlerde MMP-9 pozitif boyanma, (TB12, 10. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm  
**Şekil-30** Tubul epitellerinde MMP-9 pozitif reaksiyon, (TB12, 10. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm  
**Şekil-31** Damar adventisiasında TIMP-1 pozitif reaksiyon (ok), Akciğer (TB8, 10. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

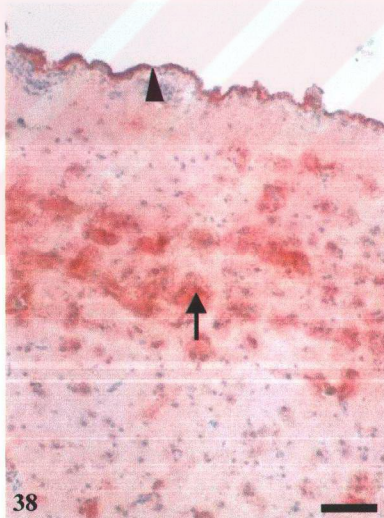
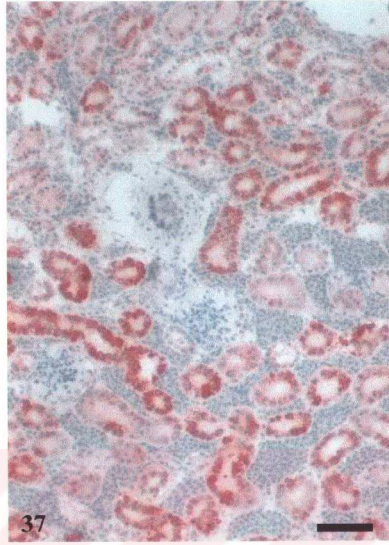
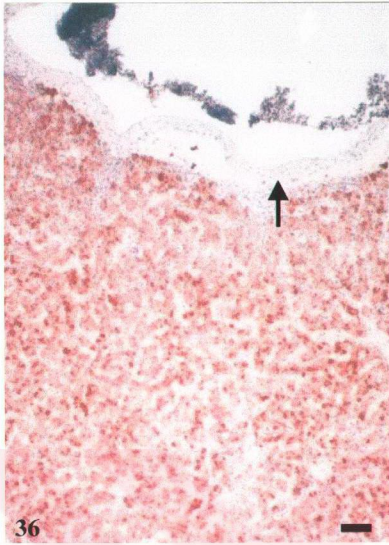


**Şekil-32** Hepatositlerde ve damar adventisiasında (ok) TIMP-1 pozitif reaksiyon, Karaciğer (TB8, 10. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-33** Böbrekte damar adventisiasında TIMP-1 pozitif reaksiyon (ok), (TB10, 10. gün), StreptABC, Skor: 2+, bar=50 µm

**Şekil-34** Beyinde damar adventisiasında TIMP-1 pozitif reaksiyon (oklar), (TB16, 12. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-35** Akciğerde TIMP-2 negatif boyanma, (TB8, 10. gün), StreptABC, Skor: 0, bar=50 µm



**Şekil-36** Hepatositlerde TIMP-2 pozitif ve damar adventisiasında negatif reaksiyon (ok), (TB8, 10. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-37** Böbrekte tubul epitellerinde TIMP-2 pozitif reaksiyon (TB18, 12. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

**Şekil-38** Meninks (ok başı) ve nöronlarda (ok) TIMP-2 pozitif reaksiyon, (TB21, 12. gün), StreptABC, Skor: 3+, bar=50 µm

Böbrek boyamalarında kapsülanın ve özellikle de tubul epitellerinin pozitif olarak boyandıkları gözlemlendi (Şekil-37). Damar endotellerinin sadece bir hayvanda boyanmış olduğu, damar adventisyalı, kortikomedüller bölgede damarlar çevresinde yer alan bağ doku ve yangı hücrelerinin ise hiçbir kesitte boyanmadığı görüldü.

TIMP-2 antikoru ile beyin kesitlerinin boyanmasında meninksler ve nöronların damar endotelleri ve epindim hücrelerinden daha fazla boyandıkları görüldü (Şekil-38). Damar adventisyalının ise boyanmadığı dikkati çekti.

**Tablo-6** Akciğer kesitlerinde immunohistokimyasal olarak pozitif boyanan yapıların gruplara göre dağılımı

Akciğer	MMP-2		MMP-9		TIMP-1		TIMP-2	
	Kontrol*	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites
Mezotel hücresi	18/33**	9/23	3/28	3/23	13/37	7/23	1/37	2/23
Bronşiyol epiteli	23/33	10/23	18/28	12/23	10/37	4/23	5/37	1/23
Damar endoteli	30/33	18/23	16/28	4/23	10/37	2/23	1/37	1/23
Damar adventisyası	3/33	0/23	1/28	0/23	15/37	17/23	0/37	0/23
Yangı hücreleri	15/33	17/23	10/28	11/23	6/37	6/23	3/37	5/23
Osteokartilagenöz Yapılar	1/33	0/23	0/28	2/23	3/37	3/23	0/37	0/23
Damar etrafındaki bağ doku	2/33	1/23	9/28	0/23	1/37	0/23	0/37	0/23

\* NB, NY ve TY

\*\*Boyanan preparat sayısı/ Toplam preparat sayısı

**Tablo-7** Karaciğer kesitlerinde immunohistokimyasal olarak pozitif boyanan yapıların gruplara göre dağılımı

Karaciğer	MMP-2		MMP-9		TIMP-1		TIMP-2	
	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites
Kapsüla	15/34	15/23	11/28	3/23	8/36	9/23	2/34	0/23
Hepatositler	28/34	21/23	23/28	21/23	29/36	19/23	30/34	19/23
Damar endoteli	15/34	12/23	12/28	4/23	2/36	1/23	5/34	0/23
Damar adventisyası	0/34	0/23	0/28	0/23	13/36	12/23	0/34	0/23
Safra epiteli	9/34	1/23	2/28	1/23	1/36	0/23	1/34	0/23
Portal bölgedeki yangı hücreleri	1/34	11/23	0/28	3/23	1/36	5/23	0/34	4/23
Portal bölgedeki bağ doku hücreleri	1/34	4/23	1/28	2/23	0/36	1/23	0/34	0/23

**Tablo-8** Böbrek kesitlerinde immunohistokimyasal olarak pozitif boyanan yapıların gruplara göre dağılımı

Böbrek	MMP-2		MMP-9		TIMP-1		TIMP-2	
	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites
Kapsüla	3/32	10/23	4/27	4/23	4/36	7/23	1/35	5/23
Tubul epiteli	24/32	10/23	21/27	19/23	26/36	19/23	23/35	12/23
Damar endoteli	16/32	8/23	3/27	0/23	2/36	0/23	1/35	0/23
Damar adventisiası	0/32	0/23	0/27	0/23	11/36	10/23	0/35	0/23
Yangı hücreleri	1/32	9/23	0/27	3/23	0/36	1/23	0/35	0/23
Bağ doku hücreleri	4/32	5/23	1/27	0/23	0/36	1/23	0/35	0/23

**Tablo-9** Beyin kesitlerinde immunohistokimyasal olarak pozitif boyanan yapıların gruplara göre dağılımı

Beyin	MMP-2		MMP-9		TIMP-1		TIMP-2	
	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites	Kontrol	Asites
Meninks	22/33	6/22	16/26	13/21	28/36	19/23	19/32	10/23
Nöron	27/33	6/22	18/26	17/21	14/36	8/23	20/32	13/23
Damar endoteli	15/33	2/22	8/26	6/21	5/36	0/23	9/32	1/23
Ependim hücreleri	3/33	0/22	2/26	1/21	1/36	0/23	2/32	0/23
Damar adventisiası	0/33	0/22	0/26	0/21	5/36	13/23	0/32	0/23

### B- İmmunohistokimyasal Skorumları (Yarı Kantitatif)

Organların boyanmaları sonucu elde edilen genel ve organlara göre skor değerlerinin ortalaması Tablo-10,11 ve Şekil-39'da verilmiştir. Buna göre, 8. günde tuz verilmemiş broylerde 4 enzime ait genel ortalama değer, 9-15. günler ve 16-42. günler arasındaki asitesli ve normal broylerden yüksek bulundu (Şekil-39). Bu farklar istatistik olarak MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2'de önemli çıkarken (Mann-Whitney U Test,  $p < 0,05$ ) TIMP-1 enziminde anlamlı farka rastlanmadı. 9-15. günler arasındaki asitesli ve normal broylerler kıyaslandığında istatistik açıdan fark olmasa da 4 enzimde de tuz alan hayvanların ortalama değerinin normal hayvanlara göre yüksek olduğu görüldü (Şekil-39). 16-42. günler arası değerlendirildiğinde MMP-9 ve TIMP-2 enzimlerinde asitesli hayvanlarda normallere kıyasla hafif bir yükselme görülürken, MMP-2 ve TIMP-1 enzimlerinin ise normal hayvanlarda asitesli hayvanlara göre yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil-39).

Tablo-10 NB ve TB (asitesli) grubu hayvanlara ait immunohistokimyasal skor ortalamaları

Günler	NB/TB		NB/TB		TB/TB		NB/NB		NB/NB		NB/NB	
	8	9-15	8	16-42	9-15	16-42	8	9-15	8	16-42	9-15	16-42
Genel MMP-2	3,3*	2,62*	3,3*	1,9*	2,62*	1,9*	3,3	2,48	3,3*	2,2*	2,48	2,2
Genel MMP-9	2,9*	1,87*	2,9*	1,5*	1,87	1,5	2,9*	1,16*	2,9*	1,41*	1,16	1,41
Genel TIMP-1	2,2	2,15	2,2	1,75	2,15	1,75	2,2	2	2,2	1,95	2	1,95
Genel TIMP-2	2,55*	1,92*	2,55*	1,4*	1,92	1,4	2,55*	1,47*	2,55*	1,37*	1,47	1,37
Akciğer MMP-2	4*	2,88*	4	2	2,88	2	4	3	4	3,2	3	3,2
Karaciğer MMP-2	2,8	2,5	2,8	2,4	2,5	2,4	2,8	2,14	2,8	1,8	2,14	1,8
Böbrek MMP-2	2,8	2,55	2,8	1,8	2,55	1,8	2,8	2	2,8	1,6	2	1,6
Beyin MMP-2	3,6*	2,55*	3,6*	2*	2,55	2	3,6	2,83	3,6	3,2	2,83	3,2
Akciğer MMP-9	2,8*	1,05*	2,8	1,4	1,05	1,4	2,8*	0,33*	2,8*	1,33*	0,33	1,33
Karaciğer MMP-9	3	2,27	3	2	2,27	2	3	1,66	3	2	1,66	2
Böbrek MMP-9	3*	2*	3*	1,2*	2	1,2	3*	1*	3*	1,66*	1	1,66
Beyin MMP-9	2,8	2,17	2,8	1,4	2,17	1,4	2,8	1,66	2,8	0,66	1,66	0,66
Akciğer TIMP-1	2,4	2,44	2,4	1,6	2,4	1,6	2,4	2,5	2,4	2	2,5	2
Karaciğer TIMP-1	2	2,44	2	2,2	2,44	2,2	2	1,75	2	2,2	1,75	2,2
Böbrek TIMP-1	2	1,88	2	2	1,88	2	2	2	2	2	2	2
Beyin TIMP-1	2,4	1,83	2,4	1,2	1,83	1,2	2,4	1,75	2,4	1,6	1,75	1,6
Akciğer TIMP-2	0,8	0,66	0,8	0,8	1,66	0,8	0,8	0	0,8	0,5	0	0,5
Karaciğer TIMP-2	3,4	2,72	3,4	2	2,72	2	3,4	2,5	3,4	2,25	2,5	2,25
Böbrek TIMP-2	3	2,33	3	2	2,33	2	3	1,66	3	1,75	1,66	1,75
Beyin TIMP-2	3	2	3*	0,8*	2	0,8	3	1,75	3	1	1,75	1

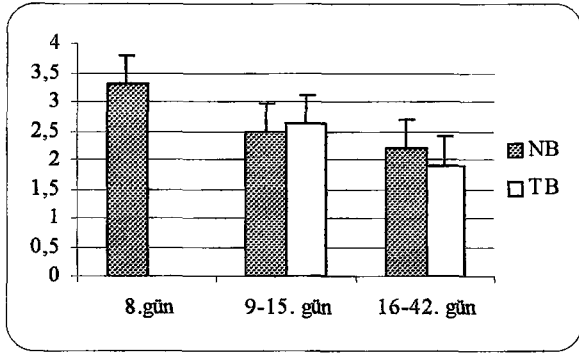
\*Aynı sütunda iki değer arasındaki fark önemlidir (p<0,05)

Tablo-11 NY ve TY grubu hayvanlara ait immunohistokimyasal skor ortalamaları

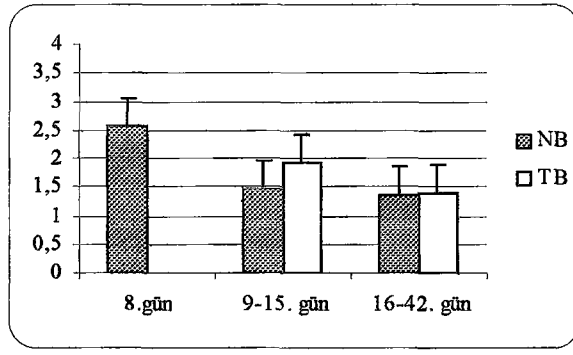
Günler	NY/TY		NY/TY		TY/TY		NY/NY		NY/NY		NY/NY	
	8	9-15	8	16-42	9-15	16-42	8	9-15	8	16-42	9-15	16-42
Genel MMP-2	2,35	2	2,35*	1,41*	2	1,41	2,35	2	2,35	1,63	2	1,63
Genel MMP-9	2,6*	1,41*	2,6*	1*	1,41	1	2,6*	1,54*	2,6*	1,5*	1,54	1,5
Genel TIMP-1	2,1	1,8	2,1	1,9	1,8	1,9	2,1	1,85	2,1	1,6	1,85	1,6
Genel TIMP-2	2,2*	1,08*	2,2*	1,18*	1,08	1,18	2,2	1,66	2,2*	1,25*	1,66	1,25
Akciğer MMP-2	2,4	2,33	2,4	1,66	2,33	1,66	2,4	2,33	2,4	2	2,33	2
Karaciğer MMP-2	2,4	2	2,4	1,66	2	1,66	2,4	1,66	2,4	1,66	1,66	1,66
Böbrek MMP-2	1,6	1,33	1,6	1,33	1,33	1,33	1,6	1,33	1,6	2	1,33	2
Beyin MMP-2	3	2,33	3*	1*	2,33	1	3	3	3*	1*	3*	1*
Akciğer MMP-9	2,8*	0,33*	2,8*	0,33*	0,33	0,33	2,8	1,66	2,8	1,33	1,66	1,33
Karaciğer MMP-9	2,4	1,66	2,4	1,66	1,66	1,66	2,4	1,66	2,4	2	1,66	2
Böbrek MMP-9	2,4	1,66	2,4	1	1,66	1	2,4	1,5	2,4	1	1,5	1
Beyin MMP-9	2,8	2	2,8	1	2	1	2,8	1,33	2,8	1,66	1,33	1,66
Akciğer TIMP-1	2	2,25	2	1,8	2,25	1,8	2	1,75	2	1,8	1,75	1,8
Karaciğer TIMP-1	2,2	1,66	2,2	2,4	1,66	2,4	2,2	1,75	2,2	1,6	1,75	1,6
Böbrek TIMP-1	2	1,75	2	2	1,75	2	2	2	2	1,8	2	1,8
Beyin TIMP-1	2,2	1,5	2,2	1,4	1,5	1,4	2,2	2	2,2	1,2	2	1,2
Akciğer TIMP-2	0,6	0	0,6	0,5	0	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5
Karaciğer TIMP-2	2,8	2,33	2,8	2	2,33	2	2,8	2,5	2,8	2	2,5	2
Böbrek TIMP-2	2,4	0,75	2,4	1,5	0,75	1,5	2,4	2	2,4	1,75	2	1,75
Beyin TIMP-2	3*	1,25*	3*	0,75*	1,25	0,75	3*	1,66*	3*	0,5*	1,66	0,5

\*Aynı sütunda iki değer arasındaki fark önemlidir (p<0,05)

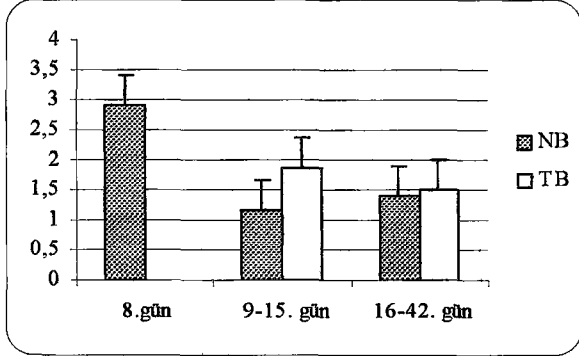




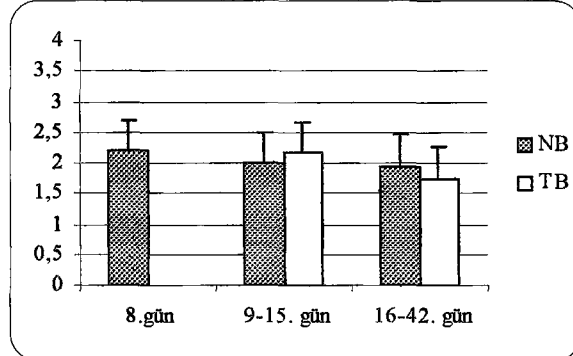
Şekil- 39a MMP-2'ye ait değerlerin ortalaması



Şekil- 39b TIMP-2'ye ait değerlerin ortalaması



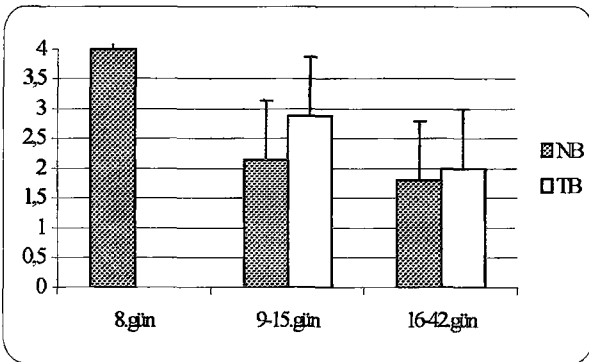
Şekil- 39c MMP-9'a ait değerlerin ortalaması



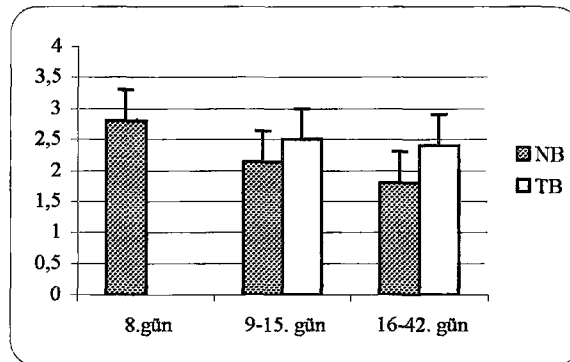
Şekil- 39d TIMP-1'e ait değerlerin ortalaması

Şekil-39 Tuzlu ve normal broylerlerde günlere göre genel skor değerlerinin ortalaması

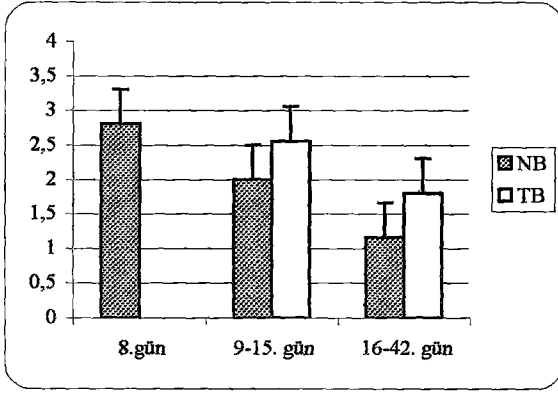
Organlar düzeyinde incelendiğinde ise MMP-2 enziminin 8. gündeki değerinin ortalaması, bütün organlar düzeyinde, 9-15. ve 16-42. günlerdekinden daha yüksekti (Şekil-40). 9-15. ve 16-42. günler kendi aralarında değerlendirildiğinde akciğer, karaciğer ve böbrekler düzeyinde tuz alan broylerlerin normallere göre enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülürken, beyinde ise her iki gün grubunda normal hayvanlarda tuz alan hayvanlardan yüksek olduğu dikkati çekti (Şekil-40d).



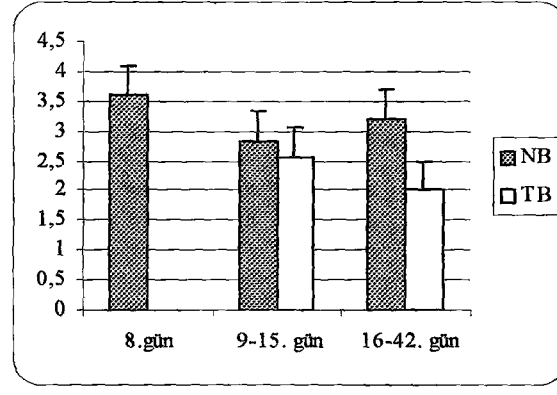
Şekil-40a MMP-2 Akciğer skor değerlerinin ortalaması



Şekil-40b MMP-2 Karaciğer skor değerlerinin ortalaması



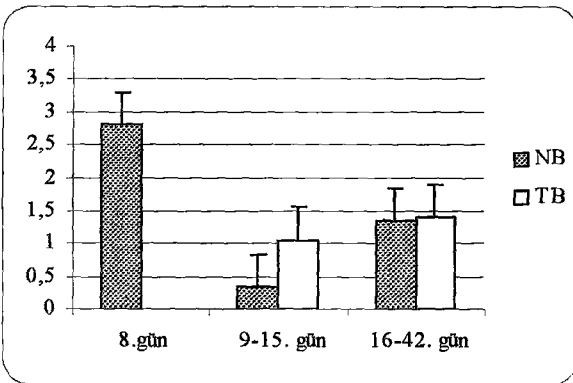
Şekil-40c MMP-2 Böbrek skor değerlerinin ortalaması



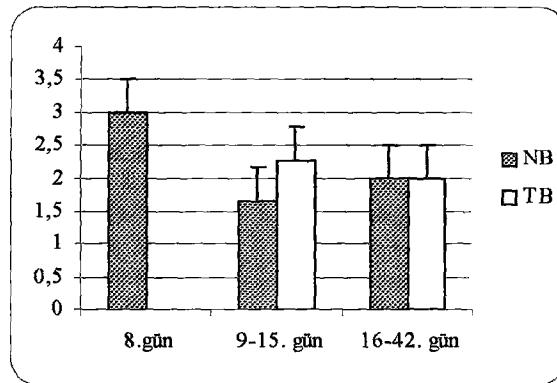
Şekil-40d MMP-2 Beyin skor değerlerinin ortalaması

Şekil-40 Normal ve asitesli broylerlerde MMP-2'nin günlere göre skor değerlerinin ortalaması.

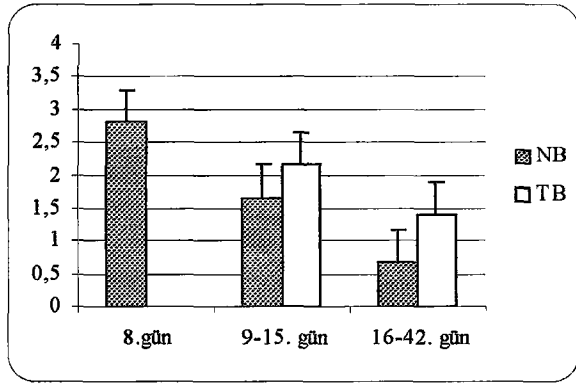
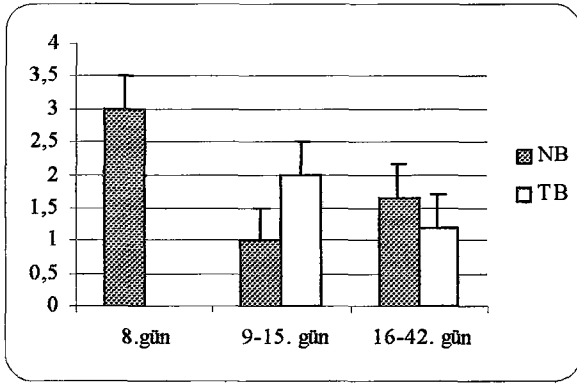
MMP-9 ile yapılan boyamalar sonucunda 8. gün ortalama değeri, MMP-2'de olduğu gibi, diğer gruplardan daha yüksek bulundu (Şekil-41). Gün gruplarının kendi içlerinde karşılaştırılmasında ise 9-15. günlerde tuz uygulanan hayvanların akciğer, karaciğer, böbrek ve beyin MMP-9 aktivitesi ortalaması normal broylerlerinkine göre yüksek bulundu. 9-15. günler arası genel ortalamalar karşılaştırıldığında, asitesli broylerler ile normal broyler arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulundu (Mann-Whitney U Test=1,87-1,16  $P<0,05$ ). 16-42. günler arasında ise tuz uygulanan broylerlerde akciğer ve beyindeki MMP-9 aktivitesi normal broylerlere göre yüksek iken, karaciğerde eşit ve böbrekte ise düşüktü (Şekil-41).



Şekil-41a MMP-9 Akciğer skor değerlerinin ortalaması



Şekil-41b MMP-9 Karaciğer skor değerlerinin ortalaması

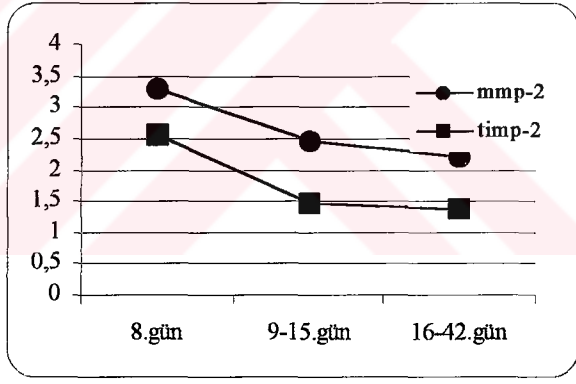
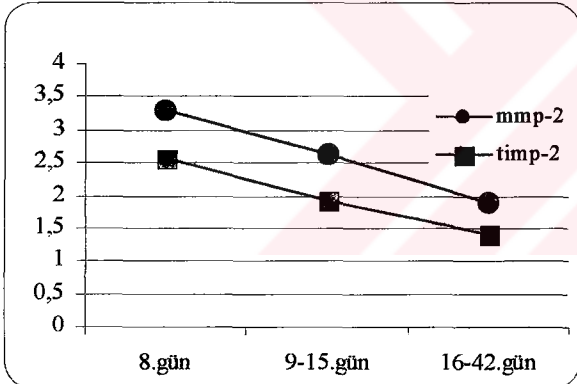


Şekil-41c MMP-9 Böbrek skor değerlerinin ortalaması

Şekil-41d MMP-9 Beyin skor değerlerinin ortalaması

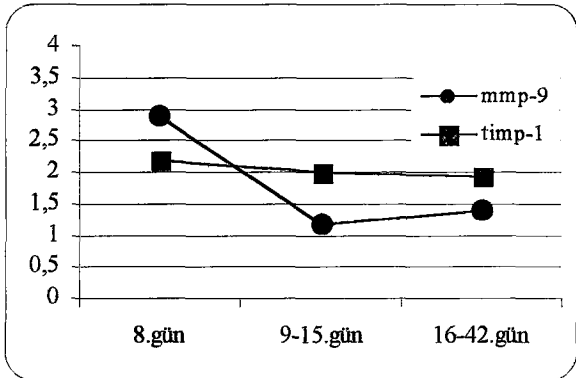
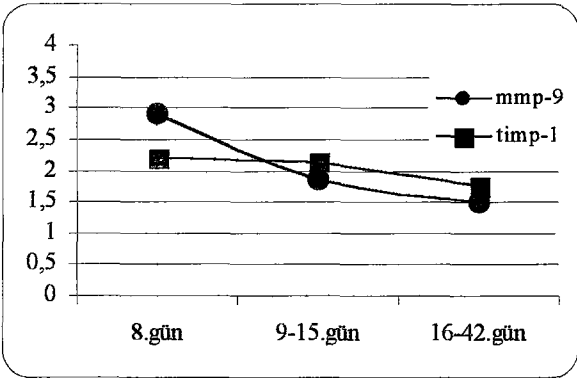
Şekil-41 Normal ve tuz grubu (asitesli) broylerlerde MMP-9'un günlere göre skor değerlerinin ortalaması.

Asitesli ve normal broylerlerde enzim ile inhibitörleri arasındaki ilişki Şekil-42'de gösterilmiştir. Buna göre, normal ve asitesli hayvanlarda yaş arttıkça TIMP-2 aktivitesinde bir düşme gözlemlendi. 9-15. günler arasındaki TIMP-2 aktivitesinin asitesli broylerlerde normal broylerlere göre yüksek olduğu belirlendi (Şekil-42a, b). Asitesli hayvanlarda TIMP-1 aktivitesi normal broylerlere göre 9-15. günler arasında yüksek iken, 16-42. günler arasında daha düşük bulundu.



Şekil-42a Asitesli broylerler.

Şekil-42b Normal broylerler.



Şekil-42c Asitesli broylerler.

Şekil-42d Normal broylerler.

Şekil-42: Asitesli ve normal broylerlerde enzim (MMP-2,9) ile inhibitör (TIMP-1,2) arasındaki ilişki.

Asitesli ve normal broylerlerin enzim ve inhibitörlerine ait oranlar Tablo-12 ve 13’de gösterilmiştir. Tablo-12 incelendiğinde, MMP-2 aktivitesi sabit tutulduğunda 9-15. ve 16-42. günlerde asitesli broylerlerde TIMP-2 aktivitesinin normal broylerlere kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı durum MMP-9 için düşünüldüğünde, her iki gün grubunda da asitesli hayvanlarda TIMP-1 aktivitesinin normal broylerlere göre düşük olduğu dikkati çekmektedir (Tablo-13).

**Tablo-12** Normal ve asitesli hayvanlara ait TIMP-2/ MMP-2 oranı

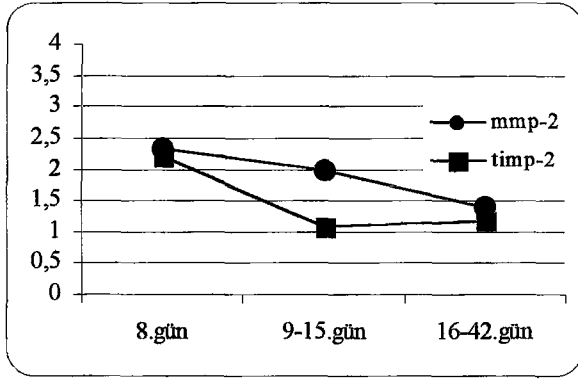
Günler	NB		TB	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
8	1	0,77	1	0,77
9-15	1	0,59	1	0,73
16-42	1	0,62	1	0,73

**Tablo-13** Normal ve Asitesli hayvanlara ait TIMP-1/MMP-9 oranı

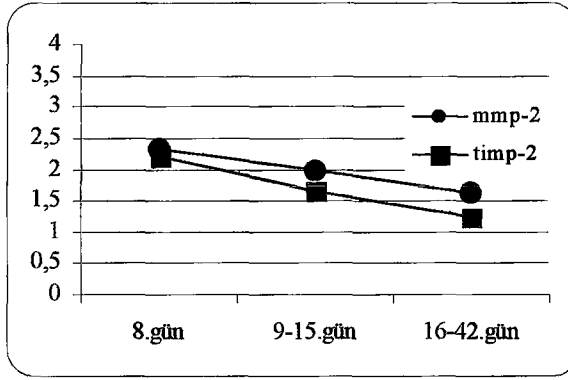
Günler	NB		TB	
	MMP-9	TIMP-1	MMP-9	TIMP-1
8	1	0,75	1	0,75
9-15	1	1,72	1	1,14
16-42	1	1,38	1	1,16

Tuz alan ve normal yumurtacılarda enzim ile inhibitörleri arasındaki ilişki Şekil-43’de gösterilmiştir. Normal ile tuz uygulaması yapılan yumurtacılarda 9-15. günler arasında MMP-2 enzim aktivitesi aynı seviyede iken (2-2), TIMP-2’nin tuz alan hayvanlarda daha düşük olduğu gözlemlendi (1,08-1,66). Tuz alan hayvanlarda 16-42. günler arasında, MMP-2 (1,41-1,63) ve TIMP-2 aktivitesinin (1,18-1,25) normal yumurtacılara kıyasla düşük olduğu görüldü (Şekil-43a, b).

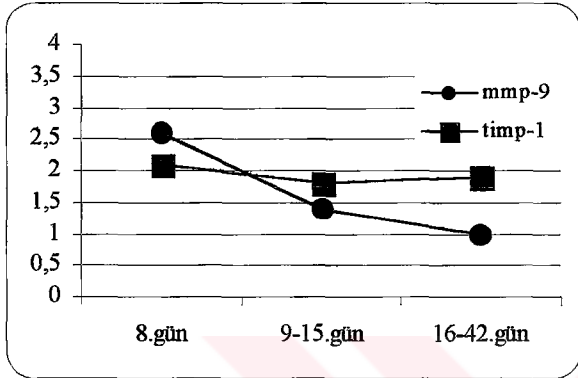
MMP-9 aktivitesi, MMP-2’de olduğu gibi zamana bağlı olarak gerek tuz alan, gerekse normal yumurtacılarda azalma gösterdi (Şekil-43c, d). Bu gruptaki hayvanlarda, TIMP-1 aktiviteleri 9-15. günler arasında hemen hemen aynı olmasına rağmen tuz alan yumurtacılarda normallere göre MMP-9 aktivitesi daha düşüktü (1,41-1,54). 16-42. günler arasında MMP-9 aktivitesi, tuz alan hayvanlarda normal yumurtacılara göre düşük (1-1,5), TIMP-1 aktivitesi ise yüksek (1,9-1,6) bulundu.



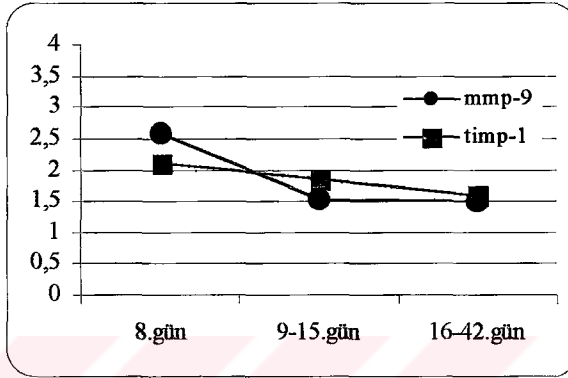
Şekil-43a Tuz alan yumurtacılar.



Şekil-43b Normal yumurtacılar.



Şekil-43c Tuz alan yumurtacılar.



Şekil-43d Normal yumurtacılar.

Şekil-43 Tuz alan ve normal yumurtacılarda enzim (MMP-2, 9) ile inhibitör (TIMP-1, 2) arasındaki ilişki.

Tuz alan ve normal yumurtacıların enzim ve inhibitörlerine ait oranlar Tablo-14 ve 15'de gösterilmiştir. Normal yumurtacılarda yaşın artışı ile birlikte TIMP-2 aktivitesinde bir azalma gözlenirken tuzlu yumurtacılarda 9-15. günler arasında TIMP-2 seviyesinde belirgin bir düşme, 16-42. günlerde ise yükselme görüldü (Tablo-14). TIMP-1/MMP-9 oranında özellikle tuzlu yumurtacılarda yaşla birlikte belirgin artış olduğu dikkati çektii (Tablo-15).

Tablo-14 Normal ve tuz alan hayvanlara ait TIMP-2/MMP-2 oranı

Günler	NY		TY	
	MMP-2	TIMP-2	MMP-2	TIMP-2
8	1	0,93	1	0,93
9-15	1	0,83	1	0,54
16-42	1	0,76	1	0,83

**Tablo-15** Normal ve Tuz alan hayvanlara ait TIMP-1/MMP-9 oranı

Günler	NY		TY	
	MMP-9	TIMP-1	MMP-9	TIMP-1
8	1	0,80	1	0,80
9-15	1	1,20	1	1,27
16-42	1	1,06	1	1,90

Broylerlerde deneyin başlangıcı olan 8. günde genel enzim aktiviteleri (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, ve TIMP-2) yumurtacılar ile karşılaştırıldığında, 4 enzim aktivitesinin de broylerlerde yüksek olduğu ve değerler arasındaki farkın MMP-2 düzeyinde istatistiksel açıdan önemli olduğu (Wilcoxon Signet Ranks Test= 3,3-2,35  $p<0,001$ ) bulundu.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Asites Sendromu dünyanın hemen her yerinde sık olarak gözlenen ve önemli ekonomik kayıplara sebep olan bir hastalıktır. Hastalığın oluşumunda dolaşım yetmezliğine bağlı olarak karın boşluğunda sıvı birikimi (asites) ve organlarda pasif konjesyon ile ödem önemli bir yer tutar. Beyin ödemi, Yetişkin Solunum Stresi Sendromu'na bağlı akciğer ödemi ve akciğer fibrozisi gibi çeşitli hastalıklar sırasında MMP'lerin kollagen metabolizmasını dolayısıyla bazal membranı tahrip ederek ödeme yol açtığı bilinmektedir (29, 32, 33, 37, 74). Damar geçirgenliğinin artmasına bağlı asites oluşumu ve MMP'ler arasındaki ilişkiyi sorgulayan herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada hastalık deneysel olarak oluşturularak, MMP ve TIMP'lerin hastalığın patogeneziindeki olası rollerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Kümeslerde, asitese yumurtadan çıkışı takiben 3. haftada rastlanmaktadır (3, 52). Deneysel olarak ve özellikle NaCl ile yapılan çalışmalarda Ateşoğlu ve Erer (14) litresine 6 gram NaCl uyguladıkları hayvanlarda ilk ölümlere 4. haftada, Eröksüz (57) ise litresine 12 gram NaCl uyguladığı hayvanlarda ilk ölümlere 5. haftada rastladıklarını bildirmektedirler. Bununla beraber Mirsalimi ve arkadaşları (20), 7 günlük normal beslemeden sonra litresine 5 gram tuz uygulaması yaptıkları broylerlerde %50 oranında asitesin oluştuğunu ve asitesli hayvanların %76'sının uygulamayı takiben ilk 5 gün içerisinde öldüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise asites oranı %70 olarak bulunmuş ve hayvanların %71'inin tuz uygulamasını takiben ilk 8 gün (2. hafta) içerisinde asitesten öldüğü saptanmıştır.

Hızlı gelişme ve büyüme özelliğine sahip broylerler ile yumurtacı tavuklar arasında tuza duyarlılıkta farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir (20, 21). Mirsalimi ve arkadaşları (20) yapmış oldukları bir araştırmada, tuzlu su (5 gr/lt) verdikleri yumurtacı civcivlerde asitese rastlamamışlardır. Sunulan bu çalışmada da içme suyu içerisinde (6 gr/lt) tuz uygulanan yumurtacı civcivlerde asites görülmemiştir.

Araştırmacılar (20-22), broylerlerde tuzla oluşturulan asiteste yaşın önemli bir faktör olduğunu, küçük hayvanların büyük hayvanlara kıyasla aynı miktardaki tuza karşı daha hassas olduklarını belirtmişlerdir. Bununla beraber yem veya sudaki tuz, büyüme ile birlikte azar azar artırıldığında hayvanların yüksek miktardaki tuza adapte olabildiği görülmüştür. Bu adaptasyon kalp, üriner ve kardiyovasküler sistemdeki gelişmeye bağlanmıştır. Yapılan bu çalışmada, asitesten ölümlerin ilk haftada, sonraki haftalara göre

daha yoğun olması bu görüşü desteklemektedir. Ancak, deney süresince sudaki tuz miktarının hep aynı düzeyde kalmasına karşın, 5 hayvanda asitesin şekillenmemesi, bu hayvanların tuza adaptasyonu ile açıklanabilir.

Asites Sendromu'nda klinik olarak hayvanların baş ve vücut derisinin siyanotik olduğu belirtilmiştir (4, 5, 25, 51). Bu çalışmada asites gözlenen hayvanlarda dispnö ve hipoksiye bağlı olarak deride siyanoz tespit edilmiştir. Bir çok araştırmacı tarafından belirtilen solunum sayısında artma (3, 4), büyümede gecikme (4, 5, 24, 45) ve tüylerin karışık bir durum alması gibi bulgulara bu çalışmada da rastlanmıştır.

Araştırmacılar (3-5, 24, 51, 60) karın boşluğunda sıvı birikimi nedeni ile karın duvarının gergin olduğunu ve berrak, sarı renkte, fibrin içeren bu sıvının 40-500ml. arasında değiştiğini, (3-5, 14, 24, 25, 51) bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise benzer özellikteki sıvı miktarının 3 ile 50 ml arasında değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca karaciğer kapsülünün matlaşıp kalınlaştığı ve üzerinde fibrin kitlesinin bulunduğu dikkati çekmiştir. Bu bulgu bir çok araştırmacının (3, 5, 14, 24, 25, 51) bulguları ile benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan Ateşoğlu ve Erer (14), karaciğer yüzeyinde 1 cm çapına varan, değişik büyüklükte, sarımsı-gri renkte nodüller ile gri-beyaz renkte odaklar gördüklerini ve bunların fokal nekrozlar ile mononükleer hücre ve heterofil lökosit infiltrasyonu sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise asitesli hayvanların hiç birinde bu yönde bir bulguya rastlanmamıştır.

Asitesli broylerlerde hidroperikardiyuma sık olarak rastlandığı bildirilmektedir (3, 4, 11, 14, 51). Bu çalışmada da benzer şekilde hemen hemen bütün hayvanlarda hidroperikardiyum dikkati çekmiştir. Araştırmacılar (4, 18, 40, 51, 55, 57) asitesli hayvanlarda özellikle sağ ventriküler hipertrofi ve dilatasyon şekillendiğini bildirmişlerdir. Oluşan hipertrofi  $Na^+$  alımına bağlı olarak dolaşım yükünün artması ve kalbin buna tepkisi olarak yorumlanmıştır (20, 21). Bu çalışmada da ölen tüm asitesli hayvanlarda sağ ventrikülünde hipertrofi ve dilatasyon tespit edilmiştir. Julian (22), normal bir broylerde sağ ventrikülün toplam ventriküle oranının 0,25'ten küçük olması gerektiğini, bu oranın aşıldığı durumlarda pulmoner hipertansiyon ve ventriküler hipertrofidan bahsedilebileceğini bildirmektedir. Çalışma sırasında tuz uygulanmayan broylerler ile tuz uygulanan ve uygulanmayan yumurtacılarda bu oranın 0,25'ten küçük olması, sadece tuz uygulanmayan gruptaki normal broylerlerde 42. günde asites görülmemesine rağmen kalp indeksi ortalamasının yüksek (0,29) olması bu hayvanların pulmoner hipertansiyona girmiş olabileceğini düşündürmüştür. Bununla beraber sunulan bu çalışmadaki bulgulardan farklı olarak, bazen perikard ile kalp arasında yapışma (3, 4), sağ atriyoventriküler kapakta



kalinlaşma (25) ve yangı (3) görüldüğü, sol atriyoventriküler kapakta ve çevre dokularda nodüllere rastlandığı bildirilmiştir (9).

Sunulan çalışmada asitesli hayvanların akciğerlerinde tesbit edilen konjesyon ve ödem bir çok araştırmacı (4, 14, 18, 40, 51, 53, 57) tarafından da bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda (53, 57) belirtilen şişkin ve soluk renkli böbrekler sunulan bu çalışmada da dikkati çekmiştir.

Asitesten etkilenen hayvanların akciğerlerinde mikroskopik incelemede gözlenen şiddetli hiperemi, ödem, hava kapillarlarında kollaps, parabronşiyal düz kaslarda hipertrofi, parabronşiyal matrikste ve damarlar etrafında lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları araştırmacıların (5, 14, 24, 26, 51) bulguları ile benzer bulunmuştur. Sunulan bu çalışmada yangısel hücre infiltrasyonlarına asitesli broylerlerde daha belirgin olmak üzere diğer gruplardaki hayvanlarda da rastlanmıştır. Asitesli hayvanlar dışındaki hayvanlarda da yangısel hücre infiltrasyonlarının görülmesi, bu hayvanların SPF (Specific Pathogen Free) olmamaları, deneyin kışın gerçekleştirilmesi dolayısı ile deneysel ortamın yeterince havalandırılmaması, ortamdaki toz partikülleri ve nem gibi olumsuz kümes şartlarının bu duruma neden olabileceğini akla getirmiştir. Araştırmacılar (4, 5, 7, 24, 27) asitesten etkilenen hayvanların akciğerlerinde hiyalin, fibröz, kemiksel ve kırık daksal tipte nodüllere rastladıklarını bildirmişler ve bunun hipoksinin bir sonucu olarak fibroblastlar tarafından üretilen kollajen artışına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, bu nodüllerin oluşumunda ırk farklılığı veya bakım besleme şartlarının rolü olduğu ileri sürülmüştür (8). Bu çalışmada da osseokartilagenöz nodüllerin gerek broyler ve gerekse yumurtacı hayvanlarda gözlenmesi, bunun sadece asitese özgü bir lezyon olmadığını düşündürmüştür.

Asitesli broylerlerde kalpte görülen ödem, heterofil lökosit ve mononükleer hücre infiltrasyonları, kas tellerinde hipertrofi araştırmacıların (5, 14, 24) bulguları ile benzerlik göstermiştir.

Karaciğerin histopatolojisinde, bir çok araştırmacının (4, 5, 14, 24) asitesli hayvanlarda rastladığı sinuzoidlerdeki genişleme, ödem ve fibrozis sebebi ile kapsüler kalınlaşma, portal bölgede yangısel hücre infiltrasyonları, karaciğer parankiminde bağ doku artışı, portal bölgedeki lenf damarlarında genişleme, sinuzoidlerde genişleme sonu Remark kordon yapısının bozulması (dissosiasyon) bu çalışmadaki bulgular ile paralellik göstermiştir. Sunulan çalışmada değişen oranlarda olmak üzere gerek broyler ve gerekse yumurtacı piliçlerde hepatositlerde vakuolizasyon görülmüştür. Benzer bulgular bazı araştırmacılar (14, 24, 51) tarafından da asitesli broylerlerde tesbit edilmiştir. Wilson ve

arkadaşları (24) tarafından belirtilen safra ile dolu kolangiyollere bu çalışmada rastlanmamıştır.

Asitesli hayvanlarda gözlenen böbrek kapsülasında fibrozis, korteks ve medüller bölgede yer alan damarlarda şiddetli konjesyon, kortekste yer alan tubuller ve arteriyoller etrafındaki hücre infiltrasyonları, proksimal ve distal tubullerde dejenerasyon ve nekroz araştırmacıların (5, 14, 24) bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Ekstrasellüler matriksi parçalayan MMP'lerin fibroblastlar, kondrositler, epitel hücreleri, damar endotel hücreleri (2, 28-30), kemik hücreleri (30), astrositler (pro-Jelatinaz A), mikroglialar (Jelatinaz B) (29), plöral mezotel hücreleri (31), mezenşimal, epiteliyal ve endoteliyal kökenli tümör hücreleri (28), T hücreleri (32), monositler, makrofajlar ve aktive olmuş nötrofiller tarafından (30, 33) salgılandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada akciğer, karaciğer böbrek ve beyin örneklerinin immunohistokimyasal boyamalarında bağ doku hücreleri, mezotel hücreleri, bronşiyol epitelleri, hepatositler, safra epitelleri, tubul epitelleri, ependim hücreleri, damar endotelleri, damar adventisyası ve mononükleer yangı hücreleri yanı sıra nöronların da pozitif boyandıkları gözlenmiştir.

Genel MMP-2 ortalamalarında 8. gündeki enzim aktivitesinin yüksek olduğu (3,3), sonraki günlerde aktivitenin giderek azaldığı görülmüştür (2,48-2,20). Ölümünün en çok görüldüğü 9-15. günler arasında ise asitesli hayvanlarda MMP-2 aktivitesinin normal broylerlerinkinden yüksek olduğu (2,62-2,48) gözlenmiştir. Normal ve asitesli hayvanlarda yaş arttıkça TIMP-2 aktivitesinde bir düşme saptanmıştır (Şekil-39b). 9-15. günler arasındaki TIMP-2 aktivitesinin asitesli broylerlerde normal broylerlere göre yüksek olduğu görülmüştür (Şekil-39b). Bununla beraber, 9-15. günler arasında MMP-2 aktivitesinin asitesli hayvanlarda normal hayvanlara göre daha yüksek olduğu (2,62-2,48) göz önüne alındığında, asitesli hayvanlardaki TIMP-2 aktivitesinin normal broylerlere göre yükselmesi, bu hayvanlardaki yüksek MMP-2 aktivitesinin dengelenmesi için TIMP-2'nin daha fazla salgılandığını düşündürmektedir.

MMP-2 enzim aktivitesi organlar düzeyinde incelediğinde, normal broylerlerde akciğer, karaciğer ve böbrekte enzim aktivitesinin deney süresince giderek azaldığı görülmüştür (Şekil-40a, b, c). Ölümünün en çok görüldüğü 9-15. günler arasında asitesli hayvanların bu organlardaki enzim aktivitelerinin normal hayvanlara göre yüksek olması, asites oluşan hayvanlarda enzimin normal düşüş seyirinden uzaklaşarak, yüksek aktivitede kaldığını göstermektedir. 9-15. günler arasında, akciğer ve böbrekte, 16-42. günler arasında ise karaciğer ve böbrekte MMP-2 aktivitesinde, normal ile asitesli broylerler arasındaki farkın daha belirgin olduğu dikkati çekmiştir (Şekil-40a, b, c). Carney ve

arkadaşları (33), ARDS (Yetişkin Solunum Stresi Sendromu) sırasında nötrofil aracılı alveoler kapiller yüzey tahribinde, nötrofillerden salınan oksijen radikalleri, serin proteazlar ve MMP'lerin pulmoner kapiller bazal membranı ve tip IV kollajenden zengin ESM'yi parçalayıp permeabiliteyi artırarak ödeme yol açtığını bildirmiştir. Bu çalışmada, normal broylerlere kıyasla asitesli hayvanların akciğerlerinde MMP-2 aktivitesinin yüksek bulunması, bu enzimin asites sendromunda görülen akciğer ödeminin patojenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde MMP-2 aktivitesinin karaciğerde yüksek olması, bu enzimin lenf sıvısının karaciğer kapsulasındaki lenfatik pleksuslardan karın boşluğuna sızmasında etkili olabileceğini akla getirmektedir. Olkowski ve arkadaşları (35) asitesli broylerlerin kalplerindeki MMP-2 düzeyinin sağlıklı broyler ve yumurtacı tavuklarda gözlenenenden daha yüksek olduğunu ve etkilenen hayvanlarda bu enzim aktivitesindeki artışın kalp yetmezliği ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

MMP-9'un normal broylerlerde 8. günde aktivitesinin yüksek olduğu (2,9), 9-15. günler arası düşüş gösterdiği (1,16) ve 16-42. günler arasında tekrar yükselişe geçtiği (1,41) gözlenmiştir. Ölümlerin fazla olduğu akut dönemde, asitesli hayvanların MMP-9 aktivitelerinin aynı gün grubundaki normal broylerlere göre daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir (1,87-1,16). Bu farkın, 16-42. günler arasında da azalarak devam ettiği belirlenmiştir (1,5-1,41). TIMP-1 aktivitesi normal broylerlerde 8. günden itibaren bir düşüş göstermiştir (2,2-2-1,95). Asitesli broylerlerde 9-15. günler arasındaki TIMP-1 aktivitesinin normal broylerlere kıyasla yüksek olduğu görülmüştür (2,15-2). TIMP-1 ile MMP-9 etkileşiminde, asitesli hayvanlarda her iki gün grubunda da MMP-9 enzim aktivitesi artış göstermiştir. Asitesli hayvanlarda 9-15. günler arasındaki TIMP-1 aktivitesindeki artış normal broylerlere göre yüksek iken, 16-42. günler arasında daha düşük kalmıştır. Asitesli hayvanların MMP-9 aktivitesinin 16-42. günler arasındaki normal broylerlere göre yüksek seyretmesi ve bu gün grubundaki TIMP-1 aktivitesinin normal TIMP-1 aktivitesinin altında bulunması asitesli hayvanlarda MMP-9'un TIMP-1'i baskılayarak asitese yol açmış olabileceğini düşündürmüştür.

MMP-9 aktivitesi ödem ve yangısel olaylarda artış göstermektedir. Rosenberg ve Navratil (36), beyin ödemi sırasında MMP-9 aktivitesinin artarak, kan-beyin bariyerindeki damarlarda bulunan tip IV kollajeni parçaladığını bildirmişlerdir. Corbel ve arkadaşları (73), deneysel olarak farelerde oluşturdukları akciğer fibrozisinde BAL (bronko-alveoler sıvı)'da MMP-9'un arttığını ve BAL içerisindeki total hücre ve nötrofil sayısı ile MMP-9 aktivitesi arasında bir paralellik olduğunu belirtmişlerdir. Seksen sekiz plöral effüzyonlu hasta üzerinde yapılan bir çalışmada (31), eksudatlı hastalarda MMP-9 aktivitesinin arttığı

bildirilmiştir. Li ve arkadaşları (62), akut mastitislerde meme alveol lümenlerine infiltrasyon olan nötrofil lökositlerde MMP-9 üretiminin arttığını ve yangısel olaylarda nötrofil lökositlerin MMP-9 salgılayarak bazal membranı parçaladıklarını belirtmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da asitesli hayvanlarda gerek hedef organlarda ve gerekse bu organlara infiltrasyon olan makrofajlarda MMP-9 aktivitesinin yüksek bulunması bu enzimin asites sendromunun oluşumunda rolü olabileceği kanısını uyandırmıştır.

MMP-2 ve MMP-9 enzim aktivitesi, normal ve asitesli hayvanlarda günler bazında belirli bir düşüş göstermiştir. Bu seyir içerisinde asites gelişen hayvanlar ile normal broylerler kıyaslandığında, asitesli hayvanlarda enzim aktivitesinin (MMP-2, MMP-9) yüksek seyrettiği gözlenmiştir. Diğer bir deyişle asitesli hayvanlarda enzim aktivitesinin düşmesi bir şekilde engellenmiştir. Bu aktivitenin yüksek kalması asitese neden olan etkilerin (tuz, hipoksi, vs.) bir veya birkaçının bir araya gelmesi sonucu oluşabilir. Her iki enzimde de (MMP-2, MMP-9) akut dönem olarak belirtilen 9-15. günler arasında, asites gelişen hayvanlarda akciğer ve böbrekteki enzim aktivitelerinin normal broylerlere göre yüksek olması bu organların akut dönemde daha çok etkilendiğini düşündürmüştür.

Tuz alan yumurtacılar normal yumurtacılar ile kıyaslandığında, MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 aktivitesi düşük bulunmuştur. TIMP-1 enzimi ise 9-15. günler arasında benzerlik göstermesine karşın, 16-42. günler arası tuzlu yumurtacılarıdaki düzeyi normallere göre daha yüksek seyretmiştir. MMP-9 aktivitesi zamana bağlı olarak gerek tuz alan, gerekse normal yumurtacılar azalma göstermiştir (Şekil-43c, d). 16-42. günler arasında MMP-9 aktivitesi, tuz alan hayvanlarda normal yumurtacılar göre düşük (1-1,5), TIMP-1 aktivitesi ise yüksek (1,9-1,6) bulunmuştur. Tuz uygulaması yapılan yumurtacı hayvanlarda broylerlerdekinin aksine, TIMP-1 aktivitesinin yükselerek MMP-9 aktivitesinin baskılanması, asitesin yumurtacılar oluşmamasının sebeplerinden biri olarak düşünülebilir.

Yumurtacı piliçler broylerler ile kıyaslandığında, yumurtacı piliçlerde başlangıç enzim düzeyinin düşük olması ve deney boyunca da düşük seyretmesi (Tablo-11, Şekil-43) bu hayvanların genetik olarak hızlı büyüme ve gelişme özelliğine sahip olmamasına bağlanabilir.

Sonuç olarak, et tipi tavukların asites sendromunda MMP-2 ve MMP-9 ile bu enzimlerin inhibitörleri olan TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinde değişimler meydana geldiği tespit edilmiş ve bu değişimlerin kapillar bazal membranı tahrip ederek hastalığın patojenezinde rol oynayabileceği kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. AKMAN MK. Tavukçuluk sektöründe son durum, Performans, 39: 4-8, 2001.
2. RATH NC, HUFF WE, BALOG JM, BAYYARI GR, REDDY RP. Matrix metalloproteinase activities in avian tibial dyschondroplasia. Poultry Science, 76: 501-505, 1997.
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. KIRAN MM. Broilerlerde asites sendromu. Veterinarium, 1: 21-24, 1990.
12. HUCHZERMEYER FW, CILLIERS JA, DIAZ LAVIGNE CD, BARTKOWIAK RA. Broiler hypertension syndrome, I. 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. Broilerlerde 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, ISMAIL M, KIRBY YK, BOTTJE WG, MOORE RW, VARDEMAN RC. Furosemide reduces the incidence of pulmonary hypertension syndrome (ascites) in broilers exposed to cool environmental temperatures. Poultry Science, 74: 314-322, 1995.
18. WIDEMAN RF, KIRBY YK, ISMAIL M, BOTTJE WG, MOORE W, VARDEMAN RC. Supplemental L-arginin attenuates pulmonary hypertension syndrome (ascites) in male and female broilers. Poultry Science, 74: 323-330, 1995.
19. 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.

20. 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.
21. 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 Journal of Veterinary Research*, 34: 413-417, 1993.
22. 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.
23. 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.
24. WILSON JB, JULIAN RJ, BARKER IK. Lesion of right heart failure and ascites in broiler chickens. *Avian Diseases*, 32: 246-261, 1988.
25. 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.
26. MAXWELL MH, ROBERTSON GW, SPENCE S. Studies on an ascitic syndrome in young broilers 2. Ultrastructure. *Avian Pathology*, 15: 525-538, 1986.
27. MAXWELL MH, ANDERSON IA, DICK LA. The incidence of ectopic cartilaginous and osseous lung nodules in young broiler fowls with ascites and various other diseases. *Avian Pathology* 17, 487-493, 1988.
28. WOESSNER JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB Journal*, 5: 2145-2154, 1991.
29. 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.
30. 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.
31. 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 Respiration and Critical Care Medicine*, 156: 1987-1992, 1997.
32. WEBB AA, MUIR GD. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *Veterinary Internal Medicine*, 14: 399-411, 2000.
33. 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.
34. RATH NC, HUFF GR, BALOG JM, HUFF WE. Fluorescein isothiocyanate staining and characterization of avian heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64: 83-95, 1998.
35. 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.
36. ROSENBERG GA, NAVRATIL M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*, 48: 921-926, 1997.

37. SAED GM, ZHANG W, DIAMOND M. 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.
38. HIMELSTEIN BP, KOCH CJ. Studies of IV collagenase regulation by hypoxia. *Cancer Letters*, 124: 127-133, 1998.
39. GEOR RJ, ROBINSON WF. Suspected monensin toxicosis in feedlot cattle. *Australian Veterinary Journal*, 62: 130-131, 1985.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. SHLOSBERG A, BELLACHE M, ZEITLIN G, YA'ACOBI M, CAHANER A. Hematocrit values and mortality from ascites in cold-stressed broilers from parents selected by hematocrit. *Poultry Science*, 75: 1-5, 1996.
44. HUNTON P. The potential of genetics to combat ascites. *World Poultry*, 10: 64-66, 1998.
45. WITZEL DA, HUFF WE, KUBENA LF, HARVEY RB, ELISSALDE MH. Ascites in growing broilers: A research model. *Poultry Science*, 69: 741-745, 1990.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. CURRIE RJW. Ascites in poultry: Recent investigations. *Avian Pathology*, 28: 313-326, 1999.
51. YAMAN İ, ÇEVİK A. Broiler piliçlerde sağ ventriküler hipertrofi ve asites. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15: 9-14, 2001.
52. HASSANZADEH-LADMAKHI M, BUYS N, VAN DER POOTEN 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.
53. 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.
54. 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.
55. HANRAHAN LA, CORRIER DE, NAGI SA. Monensin toxicosis in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, 5: 665-671, 1981.

56. FIELDS NG, YUAN B, LEEN FHH. Sodium-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 68: 745-755, 1991.
57. ERÖKSÜZ H. Broyler piliçlerde deneysel sodyum toksikasyonunda patomorfolojik ve biyokimyasal incelemeler. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23 (Ek sayı 3): 609-616, 1999.
58. SWAYNE DE, SHLOSBERG A, DAVIS RB. Salt poisoning in turkey poult. *Avian Diseases*, 3: 847-852, 1986.
59. 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.
60. RITCHE WB, HARRISON GJ, HARRISON LR. *Avian Medicine: Principles and Application*, Winger Publishing, Florida, USA, page 515-518, 1994.
61. ZHAO D, HE C, LIANG L. Pathogenesis of broiler ascites: Effect of low temperature and high energy diet. *Veterinary Pathology*, 35: 421, 1998.
62. LI X, ZHAO X, MA S. Secretion of 92 kDa gelatinase (MMP-9) by bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 67: 247-258, 1999.
63. 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.
64. BORKAKOTI N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *Journal of Molecular Medicine*, 78: 261-268, 2000.
65. 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.
66. 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.
67. SLAUSON DO, COOPER BJ. *Mechanisms of Disease*, 2<sup>nd</sup> edition, Williams and Wilkins, Baltimore, ABD, page 149-153, 1990.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. STASKUS PW, MASIARZ FR, PALLANCK LJ, HAWKES SP. The 21-kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 449-451, 1991.
72. 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.
73. CORBEL M, THERET N, CAULET-MAUGENDRE S, GERMAIN N, LAGENTE V, CLEMENT B, BOICHOT E. Repeated endotoxin exposure induces interstitial fibrosis



- associated with enhanced gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity. *Inflammation Research*, 50: 129-135, 2001.
74. TRUE LD. Principles of immunohistochemistry. Editor: TRUE LD. Atlas of Diagnostic Immunohistopathology. New York, USA, pages 1.1-1.31, 1990.
75. JACKSON P, BLYTHE D. Immunolabelling techniques for light microscopy. Editor BEESLEY JE, Immunocytochemistry, Oxford University Press, New York, USA, pages 15-43, 1993.
76. LUNA LG. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 8<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill Book Company, New York, USA, page 38-176, 1968.
77. KAN İ. Biyoistatistik, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, sayfa 152-167, 1991.



## TEŞEKKÜR

Doktora tezimin konusunun seçilmesi, planlanması, gerçekleştirilmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyerek destek olan Anabilim Dalımız Başkanı Sayın Prof. Dr. M.Müfit KAHRAMAN'a ve danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gürsel SÖNMEZ'e teşekkür ederim. Çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan U.Ü. Araştırma Fonu Başkanlığına ve tezim sırasında bana her türlü yardımlarından dolayı Sayın Doç.Dr. Deniz MISIRLIOĞLU'na, Sayın Dr. İ. Taci CANGÜL'e, Sayın Araş. Gör. Alper SEVİMLİ'ye, Sayın Araş Gör. Ahmet AKKOÇ'a, Sayın Tekniker M.Ali KARAHAN'a, ayrıca civciv temini için Özsoylar A.Ş. Canlı Faaliyetleri Müdürü Sayın Veteriner Hekim Tahsin GÜMÜŞ'e ve Has Tavuk A.Ş'den Sayın Veteriner Hekim Çiğdem CİNDEMİR'e, hayvanların aşılama aşamasında aşı temininde bulunan Gürtav Tavukçuluk ve Tarım Ürünleri Tic. ve San. Ltd. Şti.'nden Sayın Veteriner Hekim Göknil ERİŞ'e, istatistik hesaplarının yapılmasında yardımcı olan Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent EDİZ'e ve Sayın Araş. Gör. E. Özgür ÜNLÜ'ye, U.Ü. Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği idareci ve hizmetlileri ile çalışmam sırasında emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, hayatım boyunca bana olan güven ve destekleri için anneme, babama, eşim Gülsüm'e ve kızım Eda Elif'e teşekkürlerimi sunuyorum.

## ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Tarsus'ta doğdum. İlk öğretimimi Cumhuriyet İlkokulu'nda, orta öğretimimi Tarsus Cengiz Topel Lisesi'nde tamamladım. 1990 yılında eğitime başladığım Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1995 yılında mezun oldum. 1996 yılı Haziran ayında Araştırma Görevlisi olarak girdiğim Patoloji Anabilim Dalı'nda aynı yılın Eylül ayında doktora eğitimine başladım. Halen aynı Anabilim Dalında görevime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.