Vet. Bil. Derg. (1998), 14, 1 : 119-132

ERKEN EMBRİYONAL DÖNEMDE YUMURTAYA VERİLEN TESTOSTERON PROPİYONAT'IN TAVUK BURSA FABRİCİİ'Sİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ*

Hasan Hüseyin Dönmez[1] İlhami Çelik[2]

Effects of in Ovo Administrated Testosterone Propionate at Early Embryonic Period on Chicken Bursa Fabricii

Summary: The aim of this study was to investigate the effects of in ovo administrated testosterone propionate (TP) on the embryonic development of bursa of Fabricius and also to determine the histological changes occuring at post-hathcing period. In the study, totally 350 fertilized eggs of a hybrid breed, B55 were used. The eggs were divided into two groups. First-group eggs were served as controls, in the second group-eggs, which were treated with testosterone propionate, constituted experimentals. Light microscopic observations have showed that in ovo hormonal bursectomy adversely affected lymphoid follicle development via blocking the epithelial bud formation. Nevertheless, TP-treatment did not completely prevented follicle formation in the organ; atrophic and degenerated follicfes with cysts were also seen, although they were in small numbers. In TP-treated group, the organ was smaller than those of controls and most of the lymphoid follicles have not completed their development. At the first week of post-hatching period lymphoid infiltration areas and cysts were observed in the lamina propria of the organ. At the 8th week of post-hatching period, a rudiment of the organ which was mainly constituted of the connective tissue containing diffuse lymphoid infiltration areas was observed.

Key Words: Chick, Bursa of Fabricius, Bursectomy, Histological Changes

Özet: Bu çalışmada, erken embriyonaf dönemde yumurtaya verilen testosteron propiyonatın (TP), tavuklarda bursa Fabricii'nin embriyonal gelişimi üzerindeki etkileri ile kuluçkadan çıkıştan sonra bu organda ofuşan histolojik değişiklikterin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada B55 yerli hibrit anaçlardan elde edilen 350 adet döllü yumurta kullanıldı. Bu yumurtaların yarısı kontrol grubu olarak kullanılırken; diğer yarısı da TP'nin bursa Fabricii üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Yapılan ışık mikroskopik inceleme sonuçları, kuluçkanın 36. saatinde yumurtaya verilen TP'nin, bursa Fabricii taslağındaki lenf foliküllerinin embriyonal gelişiminde ilk aşama olan epitel tomurcuklarının şekillenmesini engellemek suretiyle, bu yapıların gelişimini önemli oranda baskıladığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte TP uygulaması, bursa Fabricii'deki foliküler gelişmeyi tamamen bloke etmemekte ve organda az sayıda da olsa, atrofik durumdaki ve kistik yapıları da içeren fofiküllere rastlanmaktadır. Kuluçkadan çıkıştan sonra ise bu hayvanların çoğunda organ oldukça küçük olup; çoğunlukla, organa özgü lenf folikülleri gelişmemiş durumdadır. Kuluçkadan çıkışın ifk haftasında, organın lamina propriyasında lenfosit infiltrasyon alanları ile kistik yapılara rastlanmakta; sekizinci haftasında ve takibeden dönemlerde ise organın yerinde bağ dokusu ve lenfosit infiltrasyon alanlarından oluşan bir rudiment gözlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tavuk, Bursa Fabricii, Bursektomi, Histolojik Değişiklikfer

Giriş

Hieronymus Fabricius tarafından tanımlanan ve bu araştırıcının adına izafeten bursa Fabricii olarak da isimlendirilen kanatlıların kloakal bursası, endo-mezodermal kökenli bir organdır (Le Douarin ve ark., 1984; Le Douarin, 1986). Bu organ, kloakanın proktodeum bölgesinden dorsale doğru uzanan bir kese şeklindedir (Ackerman ve Knouff, 1959; Bockman ve Cooper, 1973; Hodges, 1974; Le Douarin ve ark., 1984; Weill ve Reynaud, 1987; Glick, 1988). Bursa Fabricii, köken hücrelerin buraya gelerek, B-lenfositlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini kazandıkları; takiben de sekonder len-

Geliş Tarihi : 22.01.1998
*Bu çalışma aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.
1. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, VAN.
2. S.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, KONYA.

foid doku ve organlara göç ettikleri tipik bir primer lenfoid organdır (Le Douarin ve ark., 1984; Ratcliffe, 1985; Shiojiri ve Takahashi, 1991).

Tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere üç katmandan oluşan organ duvarının iç katmanını, organa özgü yapıya sahip olan lenf foliküllerinin lokalize olduğu ve sayıları 12 ile 15 arasında değişen boyuna kıvrımları (plikaları) şekillendiren tunika mukoza oluşturur. Bursa Fabricii dar bir kanalla kloakaya açılır (Ackerman ve Knouff, 1959; Hodges, 1974; Glick ve Olah, 1981; Ratcliffe, 1985). Mukozanın epitel örtüsü, foliküller arası bölgede (interfoliküler epitel, İFE) yalancı çok katlı pirizmatik iken, foliküllerin lümene bakan yüzlerinde bazal membranı bulunmayan ve lenfositleri de içeren özelleşmiş bir epitel örtüsüne dönüşür (Lupetti ve ark., 1983). Foliküllerin üzerini örten bu özelleşmiş epitel, folikül bağımlı epitel (FAE) olarak isimlendirilmiştir (Bockman ve Cooper, 1973; Hodges, 1974; Glick ve Olah, 1981; Lupetti ve ark., 1983).

Bursa Fabricii'deki lenf folikülleri, organ taslağının mezenkimine gelen köken hücrelerin, epitelin bazal yüzüne göç etmeleriyle başlayan folikül şekillenmesini takip eden olaylar serisi sonucunda, hem epitel ve hem de mezenkimal hücrelerin katılımıyla oluşmaktadırlar (Glick, 1988; Lupetti ve ark., 1990; Shiojiri ve Takahashi, 1991; Kocaöz ve ark., 1997a).

Tavuklarda kuluçkadan çıkışta histolojik gelişmesini hemen hemen tamamlamış olan bursa Fabricii, kuluçka sonrası 12. haftadan itibaren invole olmaya başlamaktadır (Romppanen, 1982; Naukkarinen ve Sorvari, 1984; Kocaöz ve ark., 1997b).

Testosteron propiyonat (TP)'ın yumurta içine erken embriyonal dönemde enjeksiyonu, organın gelişimini ya tamamen baskılamakla (Le Douarin ve ark., 1980) ya da epitel hücrelerinde hipertrofiye neden olması ve lenfopoezisi inhibe etmesi sonucu organ normal büyüklüğüne ulaşamamaktadır (Glick ve McDuffie, 1975). Embriyonal dönemin 3. gününde, yumurtaların % 2'lik TP solüsyonuna batırılması suretiyle in ovo hormonal bursektomi gerçekleştirilen bir çalışmada ise (Hirota ve ark., 1976), organda lenf folikülü oluşumunun büyük ölçüde engellendiği ve şekillenen foliküllerin atrofik oldukları, folikül gelişmesi gözlenmeyen bölgelerdeki organ bölümlerinin ise yoğun bir lenfoid hücre infiltrasyonuna maruz kaldığı ve yine bazı foliküllerin kısmi epitelizasyonla dejenere oldukları bildirilmiştir. Erken embriyonal dönemde TP verilen tavuklarda, kuluçkadan çıkıştan sonra bursa Fabricii' de oluşan histolojik değişiklikler hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, kuluçkanın 36. saatinde yumurtaya verilen TP'nin, embriyonal gelişme evresinde ve kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde tavukların bursa Fabricii'si üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Konya Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen ve Ankara Tavukçuluk Enstitüsü'nce geliştirilmiş olan "B55 yerli hibrit" anaçlardan elde edilen 350 adet döllü yumurta materyal olarak kullanıldı. Bu yumurtaların yarısı kontrol grubu olarak kullanılırken; diğer yarısı da hormonal bursektominin gerçekleştirildiği uygulama grubunu oluşturdu.

Hem kontrol ve hem de uygulama grubundaki yumurtalar "Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneme ve Uygulama Ünitesi"nde bulunan kuluçka makinasında optimum şartlarda inkübe edildi. Uygulama grubundaki (TP-grubu) yumurtalar, 36 saatlik inkübasyondan sonra % 96'lık alkolde çözdürülen % 2' lik testosteron propiyonat (TP)* solusyonunda 5'er saniye süreyle tutulmak suretiyle in ovo hormonal bursektomi işlemi gerçekleştirildi (Glick ve Olah, 1984). Bu işlemi takiben yumurtalar makinaya yerleştirilerek, kontrol grubunu oluşturan yumurtalarla birlikle inkübasyona devam edildi.

Kloaka bölgesinin dorsalinde, epitel tomurcuğu halindeki belirgin bursa Fabricii taslağının, kuluçkanın 3-5. günleri arasında gelişmeye başladığı ve tek boşluklu kese şeklindeki organ taslağının ise 6-8. günler arasında şekillendiği dikkate alınarak, embriyonal dönemde materyal alımına 6. günden iti-

* Testosteron propiyonat Organon Firmasından, toz formunda temin edilmiştir.

baren başlandı. İnkübasyonun 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ve 18. günlerinde hem kontrol ve hem de in ovo bursektomi işlemi uygulanan yumurtalardan 5'er tane açılarak, erken embriyonal dönemde embriyolar bütünüyle; geç dönemde ise bursa Fabricii tek başına alınarak +4 °C'deki tamponlu formol-sükroz tespit sıvısında yeterli süreyle tespit edildiler.

Kuluçkadan çıkıştan sonra ise hem kontrol ve hem de uygulama gruplarından 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ve 26. haftalarda 5'er hayvandan bursa Fabricii örnekleri alınarak, tamponlu formol-sükroz tespit sıvısında uygun süreyle tespit edildi. Tespiti takiben doku örnekleri bilinen histolojik tekniklerle yıkama, dehidrasyon ve parlatma işlemlerini takiben parafinde bioklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler üçlü boyama (Culling ve ark., 1985), hematoksilen-eozin (Culling ve ark., 1985), Unna-Pappenheim'ın panoptik boyaması (Konuk, 1981), Periodic acid-Schiff reaksiyonu (Cook, 1990) ile Gordon ve Sweets'in retiküler iplik boyaması (Bradbury ve Gordon, 1990) yöntemleriyle boyandı.

Hazırlanan preparatlar, Leitz Laborlux-12 model laboratuvar mikroskobunda incelendi ve gerekli görülen bölgelerin foloğrafları Leitz Ortholux-II model araştırma mikroskobuyla çekildi.

Kuluçkadan çıkışın 2. Haftasında, her iki gruptaki hayvanlar New Castle (NC) aşısıyla aşılandı. Dördüncü ayda da ikinci NC aşısı uygulandı. Her iki aşılamadan 25 gün sonra her gruptaki 6 hayvandan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlara Hemaglutinasyon-İnhibisyon testi (Erganiş ve İstanbulluoğlu, 1993) uygulanarak antikor titreleri tespit edildi.

Bulgular

Hem kontrol ve hem de testosteron propiyonat'la hormonal bursektomi uygulanan grupta (TP-grubu), bursa Fabricii'nin embriyonal gelişiminin, kuluçkanın onikinci gününe kadar ortak bir seyir izlediği gözlendi. Aralarında az sayıda vakuolün bulunduğu epitel hücrelerinden oluşan organ taslağı kuluçkanın altıncı gününde gözlendi. Yedinci günde ise intersellüler vakuoller genişlemiş ve sayıları da azalmıştı. Sekizinci günde organ taslağında merkezi lümen şekillenmiş durumdaydı (Şekil 1).

İri, bazofilik sitoplazmalı köken hücreler en erken, kuluçkanın sekizinci gününde, organ taslağının derin mezenkiminde gözlendi. Dokuzuncu günde ise bu hücrelere, epitele yakın bölgelerde sıklıkla rastlandı (Şekil 2). Onuncu günde, plikaların şekillenmeye başladığı ve onikinci günde bu yapıların oluşumlarının tamamlandığı tespit edildi.

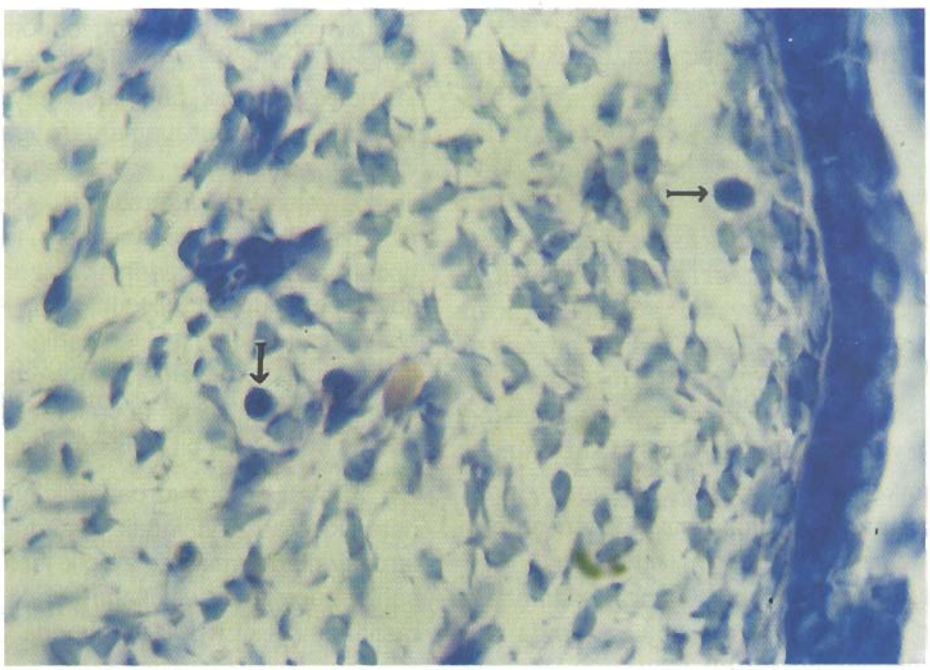
Onbirinci günde, bazofilik köken hücrelerin yüzey epiteli altında gruplar oluşturdukları (Şekil 3); bu hücre topluluklarının TP-grubunda daha az sayıda şekillendiği ve topluluklardaki hücre sayısının da kontrol grubundakilerden oldukça düşük olduğu dikkati çekti.

Onikinci günde, kontrol grubunun organ taslağında epitel altındaki bazofilik sitoplazmalı köken hücrelerin hızla çoğalarak yüzey epiteline yaptıkları basınç sonucu epitel tomurcuklarının şekillenmiş olduğu tespit edildi. TP-grubunda ise bu dönemde epitel tomurcuklarının şekillenmemiş olduğu dikkati çekti. Bu grupta epitel altındaki köken hücre sayısında da önemli bir artış gözlenmedi.

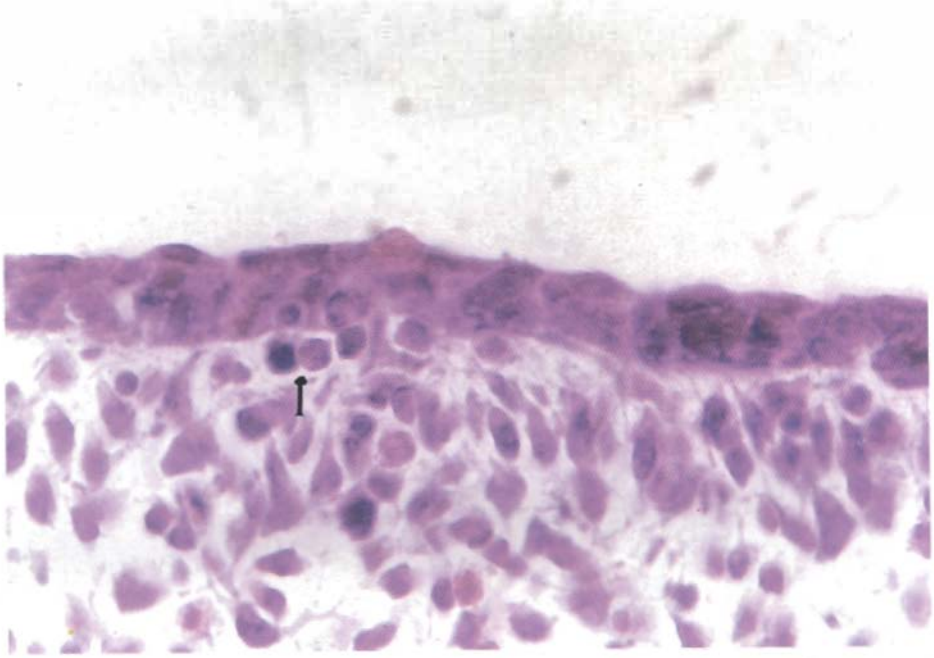
Onüçüncü günde, kontrol grubundaki epitel tomurcuklarının irileştikleri ve tomurcuk organizasyonunun başladığı; ondördüncü günde ise ilerlemiş olduğu tespit edildi. Tomurcuğun ortasındaki bazofilik hücrelerin sayısı artmış; hücre topluluğu, alttan ve yanlardan yüzey epitelinin devamı olan subnodüler epitel hücreleri katmanı (Sne) ile çevrelenmiş durumdaydı. Ortaya çıkan gerilmenin etkisi ile köken hücre topluluğunun üzerindeki epitel hücrelerinin dejenere oldukları ve soluk boyandıklan dikkati çekti. TP-grubunda ise epitel tomurcukları şekillenmediğinden, epitel örtüsü düzgün bir seyir izlemekteydi. Aynı grupta epitel altındaki bazofilik köken hücrelerin sayılarında, bu dönemde de belirgin bir artış gözlenmedi.

Kontrol grubunun bazofilik hücre topluluğunda heterokromatik, yuvarlak çekirdekleri ve az miktardaki sitoplazmaları ile tipik lenfosit morfolojisine sahip hücrelere kuluçkanın ondördüncü gününde rastlandı (Şekil 4). TP-grubunda ise lenfosit morfolojisine sahip hücrelere bu dönemde rastlanmadı. Bu gruptaki az sayıda hayvanın bursa Fabricii kesitinde, oldukça az sayıda epitel tomurcuğu göz-

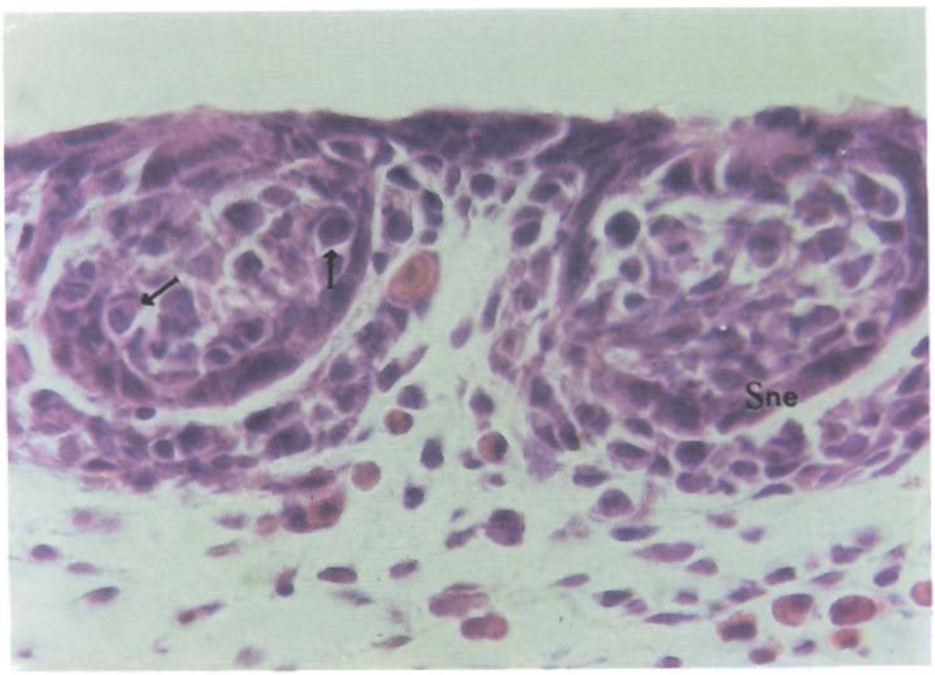
Şekil 1. Organın merkezi lümeninin (L) şekillenmesi hemen hemen tamamlanmış durumda. Geniş bir vakuol (v) ile organın kanal kısmı (k) görülmekte. Üçlü boyama, X 170.



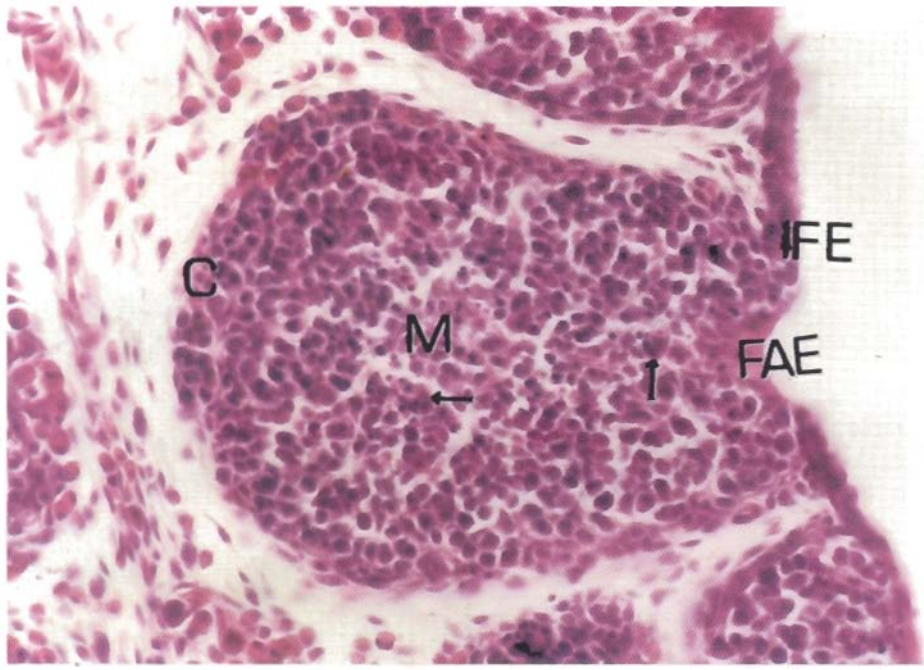
Şekil 2. İnkübasyonun 9. gününde bursa Fabricii kesiti. Mezenkimde iri, bazofilik sitoplazmalı hücreler (oklar) görülmekte. Pappenheim'ın panoptik boyaması, X600.



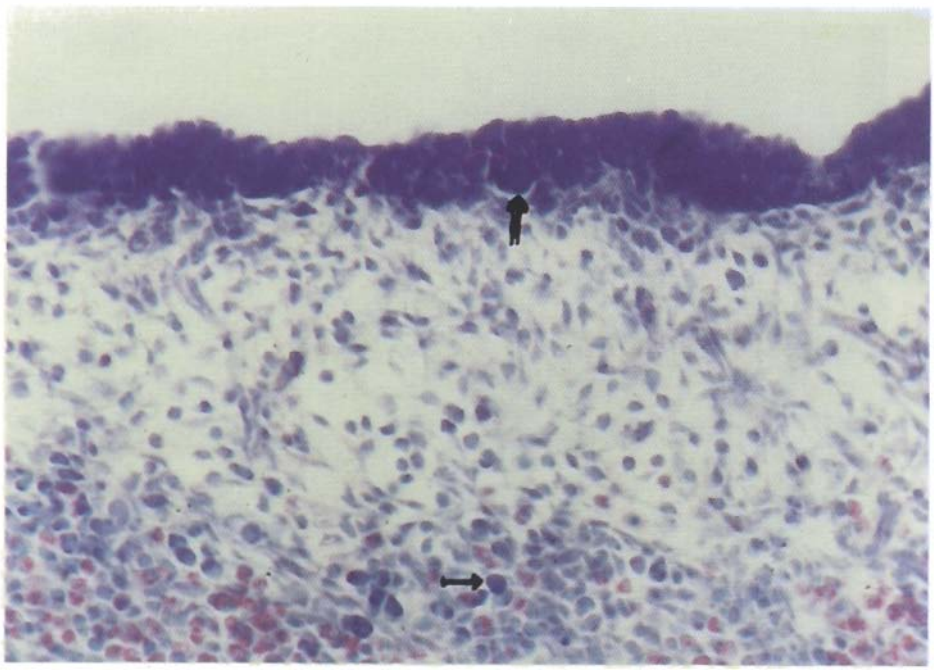
Şekil 3. İnkübasyonun 11. gününde bursa Fabricii kesiti. Epitel altında az sayıdaki iri bazofilik sitoplazmalı hücrenin oluşturduğu hücre topluluğu (ok) görülmekte. H.E, X770.



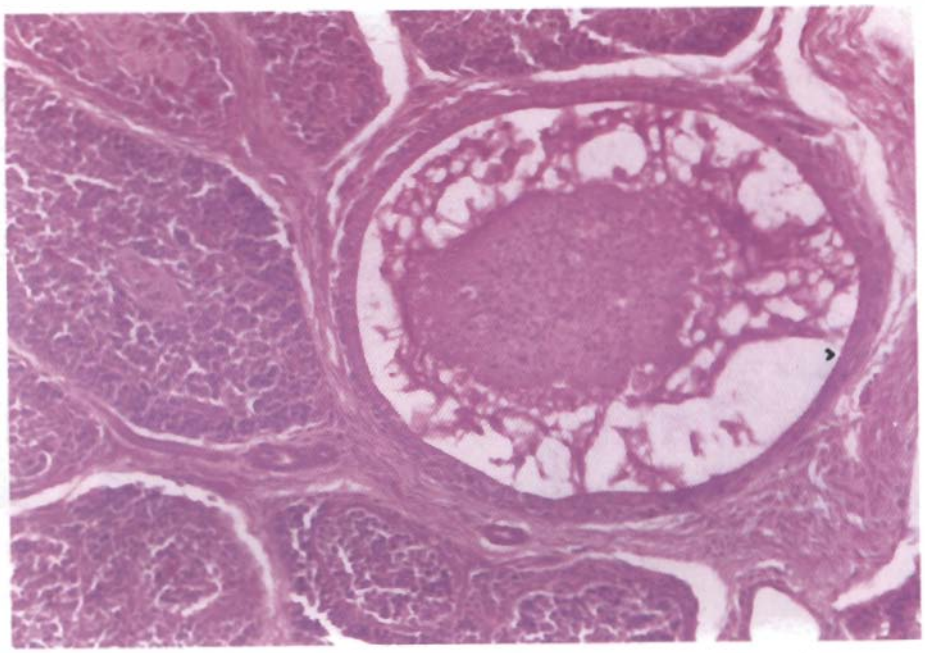
Şekil 4. İnkübasyonun 14. gününde bursa Fabricii kesiti. Tipik lenfosit morfolojisine sahip hücreler (oklar) ve epitel tomurcuklarını çepeçevre saran subnodüler epitel (Sne) görülmekte. H.E, X686.



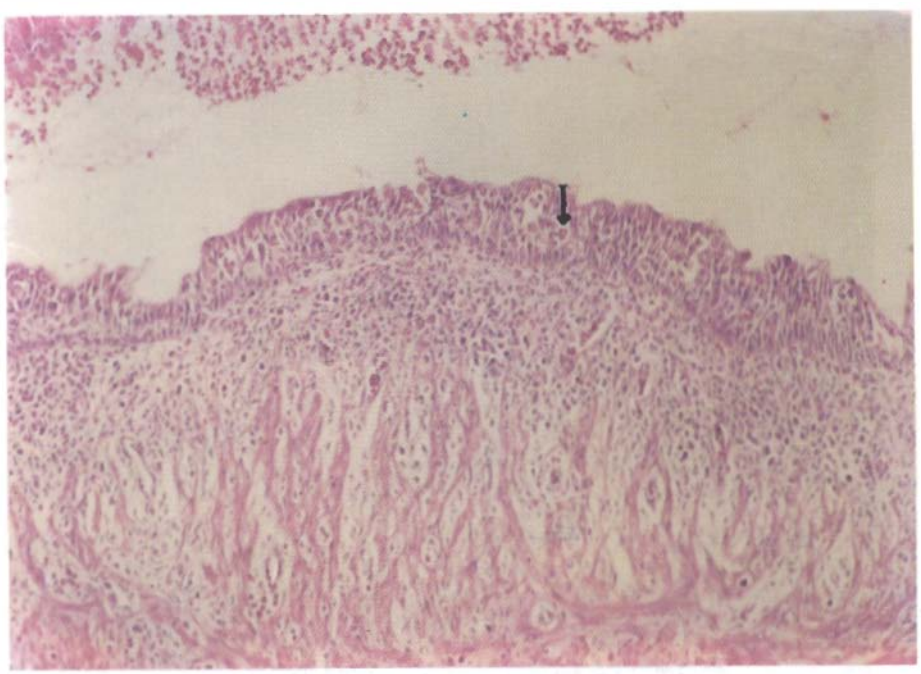
Şekil 5. İnkübasyonun 17. gününde bursa Fabricii kesiti. Geniş medullası ve dar bir bölge halindeki korteksi ile gelişmesi hemen hemen tamamlanmış olan bir lenf folikülü görülmekte. C: korteks, M: medulla, Oklar: dejenere olan lenfoid hücre artıklarını fagosite etmiş makrofajlar, FAE: Folikül ilişkili epitel, İFE: İnterfoliküler epitel. H.E, X380.



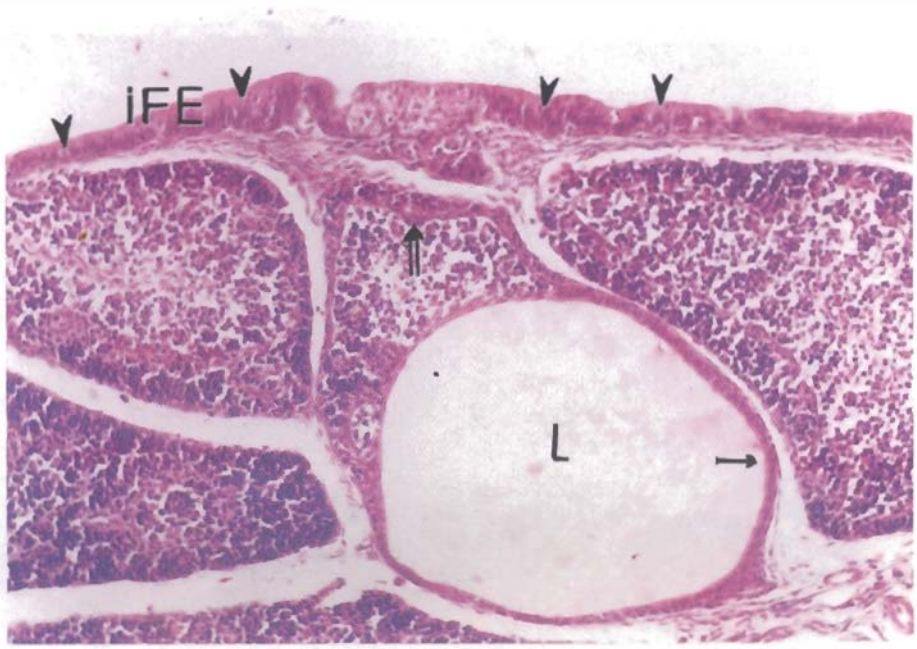
Şekil 6. İnkübasyonun 17. gününde TP uygulanan gruptan alınan bursa Fabricii kesiti. Mezenkimde ve epitel altında az sayıda bazofilik hücrenin (ok) bulunduğu ve az gelişmiş epitel tomurcukları (çift ok) görülmekte. Pappenheim'ın panoptik boyaması, X395.



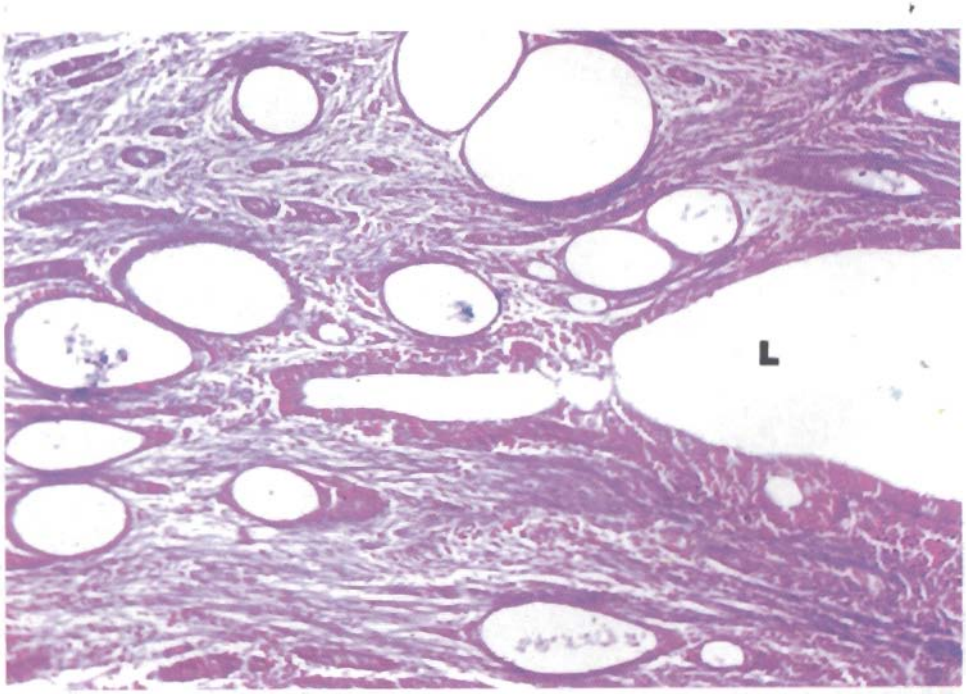
Şekil 7 Kuluçka sonrası sekizinci haftada bursa Fabricii kesiti. Bir lenf folikülünün medullasını tamamen kaplamış olan, duvarı tek katlı epitelle örtülü ve tümeni kan hücrelerini de içeren mukoid bir madde ile dolu olan bir kist görülmekte. Folikülün korteks bölümü tamamen ortadan kalkmış durumda. PAS, X170.



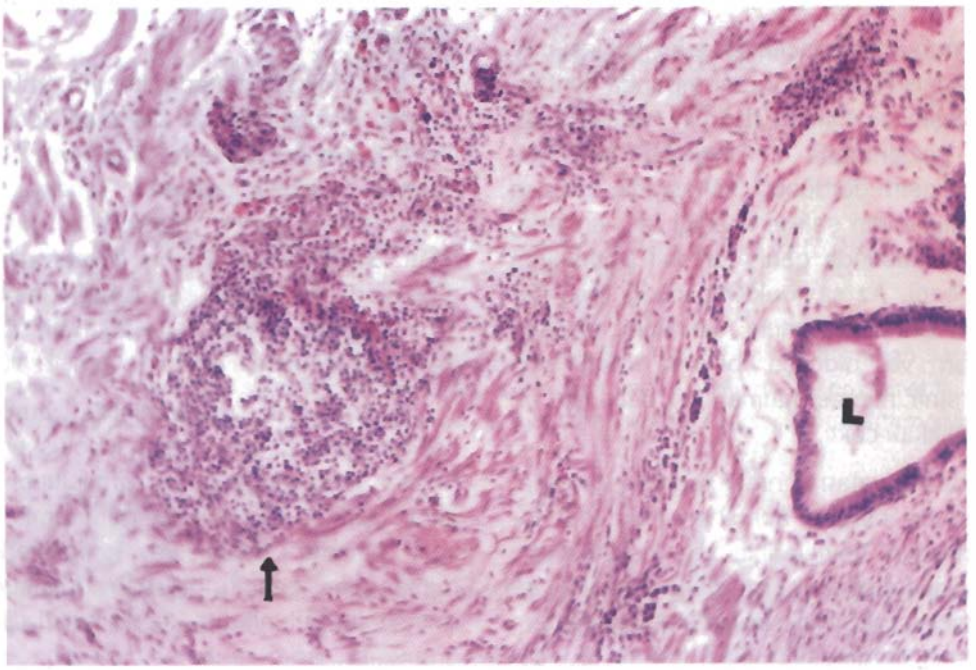
Şekil 8. Kuluçka sonrası 8. haftada TP uygulanan gruptan alınan bursa Fabricii kesiti. Organda tipik lenfoid foliküllerin gelişiminin gerçekleşmemiş olduğu görülmekte. Epitel içinde çok sayıda granülositik hücrenin (ok) bulunduğu dikkati çekmekte. H.E, X110.



Şekil 9. Kuluçka sonrası 12. haftada bursa Fabricii kesiti. Medullar kistlerin genişleyerek bu bölgenin büyük bir kısmını kapladıklan ve kist lümenin boş olduğu görülmekte. Foliküllerin korteks bölgelerinin de hemen hemen ortadan kalkmış olduğu, İFF'de kadeh hücrelerinin (ok başları) sayısının artmış olduğu dikkati çekmekte. L: kist lümeni, ok: kist epiteli, çift ok: kortikomedullar sınır hücreleri, İFE: İnterfoliküler epitel, ok başlan : kadeh hücreleri, H.E, X150.



Şekil 10. Kuluçka sonrası 26. haftada bursa Fabricii kesiti. Organın involüsyonu tamamlanmış ve organ multitubuler yapı kazanmış durumda. L: merkezi lümen. H.E, X110.



Şekil 11. Kuluçka sonrası 26. haftada TP uygulanan gruptan alınan bursa Fabriçii kesiti. Lamina propriyada lenfosit infiltrasyon alanları (ok) ve bölge bağ dokusundaki artış görülmekte. L: merkezi lümen. H.E, X146.

lendi. Ancak bu yapılar, kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında oldukça küçüktü.

Kuluçkanın onyedinci gününde, lenf foliküllerinin gelişmeleri oldukça ilerlemiş ve medulla bölümünü saran subnodüler epitelin (Sne) dışında bir iki sıra lenfositten oluşan korteks bölgesinin gelişmesi başlamış durumdaydı. Bu dönemden itibaren Sne, kortikomedullar sınır hücreleri katmanı halindeydi. Foliküllerin lümene bakan yüzlerini, soluk sitoplazmalı hücrelerden oluşan, düğme benzeri folikül ilişkili epitel (FAE) örterken; foliküller arası bölgeyi, kadeh hücrelerini de içeren interfoliküler epitel (İFE) örtmekleydi. Folikül medullasında çok sayıda apoptotik cisimcikle, bunları fagosite etmiş olan iri makrofajlara rastlandı (Şekil 5). Bu dönemde lenfositlere, organın derin submukozal bölgeleri ile buralardaki kan damarlarının lumenlerinde de sıklıkla rastlandı. Aynı dönemde TP-grubunda ise az sayıdaki hayvanda rudimenter haldeki plikalarla, bu plikalarda oldukça küçük olan epitel tomurcuklarına rastlandı. Plikaların ve epitel tomurcuklarının şekillenmediği bölgelerde epitel düzgün bir seyir takip etmekte ve epitel altında fibroblastların yoğun olduğu dar bir bağ doku bölgesi ayırt edilmekteydi. Bu bölgede yer yer eritropoetik ve granülopoetik odaklara da rastlandı (Şekil 6). Bu grupta lenfositlere, az sayıdaki hayvanda şekillenmiş olan küçük lenf foliküllerinin medulla bölgelerinde ve bu yapıların çevre bağ dokusunda nadiren rastlandı.

Kuluçkadan çıkışın birinci haftasında, kontrol grubundaki hayvanların bursa Fabricii'lerinin histolojik gelişimlerinin tamamlanmış olduğu ve organdaki lenf foliküllerinin irileştikleri gözlendi. Foliküllerin kortikomedullar sınır hücreleri, yoğun lenfosit infiltrasyonu nedeniyle belirgin biçimde ayırt edilemedi. Foliküllerin medulla kısımlarında yoğun bir lenfopoezis dikkati çekti. TP-grubundaki hayvanların çoğunluğunda ise organın, merkezi lümene sahip olan;ancak plikaları ve organa özgü lenf foliküllerini içermeyen bir rudiment halinde olduğu tespit edildi. Az sayıdaki hayvanda ise organda, histolojik gelişmeleri tamamlanmış ve oldukça küçük olan lenf foliküllerine rastlandı. Bu grupta, organın lamina propriyasında sıklıkla lenfosit infiltrasyon odakları ile kistik yapılara da rastlandı. Organ mukozası oldukça dar bir bölge halindeydi. Epitelde,

derin invaginasyonlar sonucu şekillenmiş olan tubuler yapılar da sıklıkla gözlendi.

Kontrol grubunda kuluçkadan çıkışın ikinci haftasından sekizinci haftasına kadar organda lenf foliküllerinin irileşmesi dışında belirgin histolojik değişiklikler gözlenmedi. TP-grubunda ise kuluçkadan çıkışın dördüncü haftasında, organa özgü lenf foliküllerinin şekillenmediği hayvanlarda, organın bağ dokusunda geniş lenfosit infiltrasyon odakları gözlendi. Az sayıdaki hayvanda ise şekillenmiş olan lenf foliküllerinin hücreden oldukça fakir oldukları ve oldukça belirgin olan kortikomedullar sınır hücresi katmanının düzensiz bir seyir izlediği dikkati çekti.

Kuluçkadan çıkıştan sonraki sekizinci haftada, kontrol grubunun bursa Fabricii'lerindeki lenf foliküllerinin medulla bölgelerinin dip kısımlarında, granülositik hücrelerin oluşturduğu geniş infiltrasyon odakları gözlendi. Bölgede makrofajların sayısı da artmış durumdaydı. Bazı foliküllerde, şekillenmiş olan granülositik hücre infiltrasyonu alanları folikülün medullasını tamamen kaplamış durumdaydı. Az sayıdaki folikülde intramedullar kistlere de rastlandı (Şekil 7). TP-grubunda ise, şekillenmiş olan organa özgü, tipik lenfoid foliküllerin medulla bölümlerinin önemli oranda yıkımlanmış olduğu ve organın lümeninin kan hücrelerini de içeren mukoid bir maddeyle dolu olduğu dikkati çekti. Yüzey epiteli çok katlı özellikte olup; granülositik hücreler yoğun biçimde infiltre olmuş durumdaydı (Şekil 8). Hem kontrol ve hem de TP-grubunda, organın lamina propriyasında çok sayıda plazma hücresine de rastlandı.

Onuncu haftada, şekillenmiş olan intramedullar kistler, foliküllerin medulla bölümlerini tamamen kaplamış durumdaydı. Henüz kistlerin şekillenmediği foliküllerin medulla bölümlerinde, lenfositlerde belirgin bir azalmanın oluştuğu dikkati çekti. TP-grubunda ise organın histolojik yapısı sekizinci haftadakine büyük benzerlik göstermekteydi.

Onikinci haftada, organdaki lenf foliküllerinin büyük çoğunluğunun medulla kısımlarının geniş kistlerle kaplı olduğu ve bazı kistlerin içeriklerinin, dejenere olan FAE bölgesinden organın merkezi lümenine boşalmış olduğu tespit edildi. İFE'deki kadeh hücrelerinin sayısında belirgin artışlar oluşmuştu (Şekil 9). TP-grubunda ise organın histolojik yapısında, önceki dönemdekinden farklı özellikler gözlenmedi.

Ondördüncü haftada, kontrol grubu hayvanların bursa Fabricii'lerinde bulunan lenf foliküflerinin hemen hemen tamamı dejenere olmuş ve şekillenen medullar kistlerin lümene açılması sonucu,merkezi lümen multitubuler bir görünüm almıştı. Bu dönemde İFE'nin hemen altındaki lamina propriyada çok sayıda kan damarı kesitine rastlandı. TP uygulanan grupta ise organın bu dönemdeki histolojik yapısı önceki dönemle aynı özelliklere sahipti.

Kontrol grubu hayvanlarda, yirminci haftadan sonraki dönemlerde organın involüsyonunun hemen hemen tamamlandığı ve yirmialtıncı haftada, organın yerinde multitubuler görünümlü, dar bir merkezi lümene sahip ve lenfositlerle kan damarlarından zengin bir bağ dokusundan oluşan rudimentin bulunduğu tespit edildi (Şekil 10). TP-grubunda ise organda yoğun bir bağ dokusu artışı gözlendi. Bu grupta, organın embriyonal gelişmesi aşamasında az sayıdaki hayvanda nadiren organa özgü yapıya sahip lenf folikülleri oluştuğundan; merkezi lümen multitubuler bir görünüme sahip değildi ve düzgün bir seyir takip etmekteydi. Yirmialtıncı haftada, organın yerinde duvarı düzgün seyreden bir epitel katmanından oluşan geniş bir lümen ile lenfoid hücrelerden zengin bir bağ dokusundan oluşan organ rudimenti bulunmaktaydı (Şekil 11).

Tablo I. HI testi ile kontrol ve deney grubu hayvanların serumlarında tespit edilen NC-spesifik antikor titrelerinin

	Kontrol	TP
1. Aşı	6,5 0±034	1.17±0.30***
2. Aşı	7.50±0.50	2.00± 0.58

*** : P<0.001

HI-test Sonuçları: İlk ve ikinci aşılamadan 25'er gün sonra yapılan HI testleri ile belirlenen serum antikor titreleri tablo I'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi kontrol grubundaki hayvanların serum antikor düzeyleri, her iki dönemde de TP-grubundaki hayvanlardan önemli oranda (P<0.001) daha yüksektir (Tablo I). Kontrol grubu hay-

vanlarda, ikinci aşılamayı takiben serum antikor düzeylerinde oluşan artış oldukça belirgindir. TP-grubunda ise her iki aşılamadan sonra da serum antikor düzeylerinde önemli bir artış gözlenmemiştir.

Tartışma ve Sonuç

Bursa Fabricii'nin embriyonal gelişimi üzerinde yapılan çalışmalarda (Hodges, 1974; Lupetti ve ark., 1990; Shiojiri ve Takakashi, 1991), organın proktodeuma açılan kanal kısmının ektodermden, asıl kese kısmı ile boyun kısmını döşeyen lamina epitelyalisin son barsak endoderminden, geri kalan kısımlarının ise mezenkimden köken aldığı ortaya konmuştur.

Lupetti ve ark. (1990), bursa Fabricii'nin lamina propriyasında lokalize olan organa özgü histolojik yapıya sahip lenf foliküllerinin histolojik gelişmelerinin dört evrede tamamlandığını bildirmişlerdir. Bunlar; epitel tomurcuklarının şekillenmesi evresi, tomurcukların organizasyonu evresi, foliküllerin medulla bölümlerinin histogenezinin tamamlandığı evre ve folikül korteksinin şekillenmesinin tamamlandığı evredir. Bu çalışmada, kontrol grubu embriyolar üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, bursa Fabricii'nin embriyonal gelişmesinin, önceki araştırıcıların (Olah ve ark., 1986; Lupetti ve ark., 1990; Shiojiri ve Takahishi, 1991; Kocaöz ve ark., 1997a) bildirimlerine uygun bir seyir izleyerek tamamlandığı tespit edildi. Ackerman ve Knouff (1959), kuluçkanın 12. gününde organ taslağının yüzey epitelinde şekillenen epitel tomurcuklarının, endodermal epitel hücrelerinin diferensiyasyonuyla şekillendiklerini ileri sürmüşlerdir. Ancak son yıllarda yapılan çalışma sonuçları (Olah ve ark., 1986; Lupetti ve ark., 1990; Shiojiri ve Takahishi, 1991; Kocaöz ve ark., 1997a) organdaki lenf foliküllerinin gelişimlerinin başlangıç aşaması olan epitel tomurcukları oluşumunun, intraembriyonik mezenkimden köken alan iri bazofilik kökenli hücrelerle endodermal epitel hücrelerinin etkileşimi sonucu şekillendiğini ortaya koymuştur. Foliküllerdeki lenfoid hücreler ve FAE, bazofilik köken hücrelerinin diferensiyasyonu ile oluşurken; İFE ve bunun devamı olan kortikomedullar sınır hücreleri ise endodermal epitel hücrelerinden köken almaktadır (Glick, 1985; Lupetti ve ark., 1990; Shiojiri ve Takahishi, 1991; Kocaöz ve ark., 1997a)

Kuluçkanın 12. Gününde kontrol grubunun bursa Fabricii'leri üzerinde yapılan incelemelerde, epitel tomurcuklarının şekillenmiş oldukları; 15. günde ise tomurcukların histolojik organizasyonunun devam ettiği gözlendi. Kocaöz ve ark. (1997a)'nın bildirdiği lenfosit morfolojisine sahip olan hücrelere, 14. günde, foliküllerin merkezi bölgelerinde rastlanmıştır. Organizasyon sonucunda, lümene bakan yüzlerinden FAE, yanlardan ve alttan da subnodüler sınır epitel hücreleri ile çepeçevre çevrilen folikül medullası şekillenmektedir. Kuluçkanın 17.gününde ise önceki dönemlerde subnodüler epitel olarak tanımlanan hücre sırası dışında 1-2 sıra lenfoid hücreden oluşan korteks bölümü de şekillenmiş olduğundan, bu epitel, kortikomedullar sınır hücreleri olarak isimlendirilmektedir (Kocaöz ve ark., 1997a). Kortikomedullar sınır hücrelerinin kan ile foliküler medulla arasında kan-bursa bariyeri fonksiyonu gördüğü ileri sürülmektedir (Ackerman ve Knouff, 1959; Bockman ve Cooper, 1973; Mercer-Oltjen ve Woodard, 1987; Lupetti ve ark.,1990).

Bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin histolojik gelişimi, intraembriyonik mezenkimden köken alan iri; bazofilik sitoplazmalı köken hücrelerin, organ taslağının lümenini örten epitelin altına ulaşmalarını takiben epitel tomurcuklarının şekillenmesi ile başlamaktadır (Lupetti ve ark., 1990; Ratcliffe, 1985; Le Douarin ve ark., 1984). Köken hücreler organ taslağına, kuluçkanın yaklaşık 7-14. günleri arasındaki reseptif periyodda gerçekleşen göç dalgaları halinde ulaşmaktadırlar (Le Douarin, 1986). Kuluçkanın 8. gününden itibaren organın derin mezenkimal bölgelerinde görülmeye başlanan bu hücreleri Kocaöz ve ark. (1997a) kuluçkanın 9-15.günleri arasında tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırıcılar arasında gözlenen bu dönem farklılıkları muhtemelen, embriyoların fizyolojik yaş farkına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Köken hücrelerin epitele ulaşmasında, epitel hücrelerinden salınan bazı kemotaksik faktörler (Le Douarin, 1986) yanında köken hücrelerindeki bazı reseptörler (Le Douarin ve ark., 1984; Glick, 1985) ile kollagen tipteki bağ dokusu iplikleri de önemli roller oynamaktadır.

Erken embriyonal dönemde yumurtaya verilen

TP, bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin gelişimini önemli oranda baskılamaktadır. Bu nedenle organ taslağının gelişimi, kuluçkanın 12. gününe kadar hem kontrol ve hem de TP- grubunda ortak bir seyir izlemektedir (Olah ve ark., 1986). Bununla birlikte bu dönemde, TP-grubunda organ taslağı kontrol grubundakinden biraz daha küçüktür. TP'nin, organdaki lenf folikülü gelişimini hangi mekanizma ile engellediği henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte; bu madde, muhtemelen epitel hücreleri ile bazofilik sitoplazmalı köken hücrelerin etkileşimini bozmaktadır. Çünkü TP uygulaması köken hücrelerinin intraembriyonik mezenkimal bölgelerdeki oluşum ve organ taslağına göçlerini önlemekten çok, bu hücrelerle endodermal epitel hücrelerinin karşılıklı etkileşimi sonucu oluşan, epitel tomurcuklarının şekillenmesini engellemektedir (Jankoviç ve ark., 1976; Hirota ve ark.,1976; Le Douarin ve ark., 1980; Olah ve ark., 1986). TP uygulaması bütün bireylerde foliküler gelişmeyi tamamen bloke etmemekle birlikte; gelişen foliküller organa özgü histolojik yapı özelliklerine sahip değildir. Böyle foliküller atrofik olup; bazıları ise dejenere tiplerdir. TP uygulanan hayvanlarda organın lümeni mukoid bir madde ile dolu ve epiteli de çok katlıdır (Olah ve ark., 1986). Bu histolojik bulgular, TP uygulamasıyla tavuklarda primer antikor yanıtı önemli oranda baskılanmış olan hayvanların elde edilebileceği görüşünü desteklemektedir (Jankoviç ve ark., 1976). HI- testi bulguları da TP uygulanan hayvanlarda spesifik antikor yanıtının zayıf geliştiğini (Tablo 1).
işlemin serumdaki antikorları tamamen ortadan kaldırmadığını göstermektedir. Bu durum kanatlılarda bursa Fabricii'nin fonksiyonlarına benzer fonk
gören başka organ ya da lenfoid doku bulunabileceğini akla getirmektedir. Nitekim Glick (1985), hem bursa Fabricii ve hem de dalakta "sekretorik hücre" olarak adlandırdıkları ve köken hücrelerin B-lenfositlerine diferensiyasyonunda rol oynayan bir hücre tipi tanımlamışlardır. Bu hücre muhtemelen, TP ile bursektomize edilen hayvanlarda dalakta kısmi bir B-hücresi farklılaşmasına imkan sağlamaktadır (Jankovic ve ark., 1976; Glick, 1985). Ayrıca, bazofilik sitoplazmalı köken hücrelerin organ taslağına, embriyonal dönemin 7. günü ile 14. günleri arasındaki reseptif periyotta gerçekleşen göç dalgaları halinde gelmeleri de TP uygulamasının serumdaki antikorları niçin tamamen ortadan kaldırmadığının açıklanmasında yararlı olabilir. Erken embriyonal dönemde TP ile muamele, muhtemelen erken dönemdeki göç dalgaları ile gelen hücrelerin epitel tomurcuklarını oluşturmasını engellerken; daha geç evrelerde gelenlerin tomurcuk oluşturmalarını ise kısmen baskılamaktadır. Nitekim bu çalışmada TP-grubunda küçük lenf foliküllerine bazı hayvanlarda rastlanmış olması, bu düşünceyi desteklemektedir.

Bu çalışmada kontrol grubu hayvanlarda organın involüsyonunun başladığını ortaya koyan intraepiteliyal ve intramedullar kistlere ilk kez kuluçkadan sonraki 8. haftada rastlandı. Dönemin ilerlemesiyle birlikte genişleyen kistler foliküllerin medulla bölgesini tamamen kaplamakta ve dejenere olan FAE bölgesinden kist içeriği organın merkezi lümenine boşalmaktadır (Romppanen, 1982; Naukkarinen ve Sorvari, 1984; Kocaöz ve ark., 1997b). Bazı araştırıcılar (Hoffman-Fezer ve Lade, 1972; Naukkarinen ve Sorvari, 1984) bursa Fabricii'nin involüsyonunun erken involüsyon, geç involüsyon ve rezidüel evre olmak üzere 3 evrede gerçekleştiğini bildirmişlerse de, bu evreler arasında kesin sınırlar yoktur. Ancak çoğu hayvanda kuluçkadan çıkışın 26. haftasında organ, duvarı tek katlı pirizmatik epitelle örtülen; kan damarları ile yağ hücrelerini ve lenfosit infiltrasyon alanlarını da içeren bir rudimente dönüşmekte ve bir süre daha varlığını sürdürmektedir. Hem bireyler ve hem de aynı bireyin bursa Fabricii'sindeki foliküller arasında involüsyonun aşamaları bakımından belirgin farklar gözlenmektedir. Aynı durum, foliküllerin embriyonal gelişmeleri aşamasında da söz konusudur (Kocaöz ve ark., 1997a) ve bu durum muhtemelen bazofilik sitoplazmalı köken hücrelerin organa kuluçkanın 7-14. günleri arasında göç dalgaları halinde gelmelerinden kaynaklanmaktadır (Le Douarin, 1986).

TP-grubunda ise kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde organın oldukça küçük, lamina propriya ve submukozasının oldukça dar, plikalarının az sayıda olduğu tespit edildi. İnvolüsyonun histolojik bulgularına bu gruptaki küçük lenf foliküllerinde de rastlandı. Organın lamina propriyasında çok sayıda plazma hücresinin bulunması, TP uygulamasının

hayvanın antijenik uyarımlara karşı oluşturduğu antikor cevabını önemli oranda baskılamakla birlikte, tamamen ortadan kaldıramadığı görüşünü desteklemektedir (Jankoviç ve ark., 1976; Le Douarin ve ark., 1980).

Sonuç olarak; tavuk yumurtalarının TP ile erken embriyonal dönemde (kuluçkanın ilk 36.saatinde) muamele edilmesi suretiyle, humoral immun sistemleri kalıcı olarak baskılanmış olan hayvanlar elde edilebilmekte ve bu hayvanlar NC antijenine karşı önemli derecede düşük primer antikor yanıtı oluşturmaktadırlar. TP etkisini, muhtemelen bazofilik sitoplazmalı köken hücrelerle epitel hücrelerinin interaksiyonunu bozmak suretiyle göstermektedir. Her ne kadar bu işlem serumdaki antikorların tamamen ortadan kalkmasını sağlamamakla birlikte; ucuz ve pratik olması yanında çok erken dönemlerde uygulanabilmesi nedeniyle diğer bursektomi yöntemlerine önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Özellikle kanatlı immun sistemi ve B-lenfosit fonksiyonlarının zayıflatılması ya da ortadan kaldırılması çalışmalarında TP ile gerçekleştirilen in ovo hormonal bursektomi, başarıyla uygulanabilecek olan bir yöntemdir.

Kaynaklar

Ackerman, G.A. and Knouff, R.A. (1959). Lymphocytopoiesis in the bursa of Fabricius. Am. J. Anat. 104(2), 163-205.

Bockman, D.E. and Cooper, M.D. (1973). Pinocytosis by the epithelium associated with lymphoid follicles. in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. Am. J. Anat. 136, 455-478.

Bradbury, P. and Gordon, K.C. (1990). Connective tissues and stains. In "The theory and practice of histological techniques\rdblquote Bancroft JD, Stevens A, 3th ed, The Bath Press, Avon.

Cook, H.C. (1990). Carbohydrates. In "The theory and practice of histological techniques. 3th ed, The Bath Press, Avon.

Culling, C.F.A., Allison, R.T. and Barr, W.T. (1985). Cellular pathology technique. Butterworths and Co Ltd , London.

Erganiş, O. ve İstanbulluoğlu, E. (1993). İmmunoloji, 161-162. Mimoza Basım, Yayım Dağıtım AŞ, Konya.

Glick, B. (1985). The ontogeny and microenvironment of the avian thymus and bursa of Fabricius: Contribution of specialized cells to the avian immune response. Adv. in Vet. Sci. and Comp. Med. 30, 67-90.

Glick, B. (1988). Bursa of Fabricius: Development, growth, modulation, and endocrine function. CRC Criticat Rev. in Poult. Biol. 1,2, 107-132.

Glick, B. and McDuffie, F.C. (1975). Immunoglobulin and the bursa of Fabricius. Journal of the Reticuloendoth Soci. 17,2, 119-125.

Glick, B. and Olah, I. (1981). Gut-associated-lymphoid tissue of the chicken. Scan. Elect. Microsc. 3, 99-108.

Glick, B. and Olah, I. (1984). Methods of bursectomy. Methods in Enzymol. 108, 3-10.

Hirota, Y., Suzuki, T., Chazano, Y. and Bito, Y. (1976). Humoral immune responses characteristic of testosterone-propionate-treated chickens. Immunol. 30, 341-348.

Hoffman-Fezer, G. and Lade, R. (1972). Postembryonale entwicklung und involution der bursa Fabricii heim haushuhn (Gallus domesticus). Z. Zellforsch. 124, 406-415.

Hodges, R.D. (1974). The histology of the fowl. Academic Press Inc Ltd, London.

Jankoviç, B.D., İsakoviç, K., Markoviç, B.M., Rajçeviç, M. and Knezeviç, Z. (1976). Nonbursal origin of humoral immunity: Immune capacity and cytomorpfiological changes in chickens bursectomized as 52- to 64-hour-old embryos. Exp. Hemat. 4, 246-255.

Kocaöz, N., Çelik, İ., Ünsal, S. (1997a). Tavuk bursa Fabricii'sinin embriyonal gelişmesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. S. Ü. Vet. Bil. Derg. 13, 1, 43-51.

Kocaöz, N., Çelik, İ., Ünsal, S. (1997b). Kuluçkadan çıkıştan sonra tavuk bursa Fabricii'sinde oluşan histolojik değişiklikler. S. Ü. Vet. Bil. Derg. 13, 1, 77-84.

Konuk, T. (1981). Pratik fizyoloji. A Ü Vet Fak Yayınları 378, A Ü Basımevi, Ankara.

Le Douarin, N.M. (1986). The microenvironment of T and B lymphocyte differentiation in avian embryos. Current Topics Develop. Biol. 20,291-313.

Le Douarin, N.M., Michel, G. and Baulieu, E.E. (1980). Studies of testosterone-induced involution ol the bursa of

Fabricius. Develop. Biol., 75,288-302.

Le Douarin, N.M., Dieterlen-Lievre, F. and Oliver, P.D. (1984). Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. Am. J. Anat., 170,261-299.

Lupetti, M., Dolfi, A. and Michelucci, S. (1983). The behavior of bursal lymphoid follicle-associated cells after treatment with testosterone. Anat. Rec., 205,177-183.

Lupetti, M., Dolfi, A., Giannessi, F., Bianchi, F. and Michelucci, S. (1990). Reappraisal of histogenesis in the bursal lymphoid follicle of the chicken. Am. J. Anat., 187,287-302.

Mercer-Oltjen, S.L. and Woodard, A.E. (1987). Development of the bursa of Fabricius in the partridge and pheasant. Poult. Sci. 66,418-421.

Naukkarinen, A. and Sorvari, T.E. (1984). Involution of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic study with special reference to transport of colloidal carbon in the involuting bursa. J. Leukocyte Biol. 35,281-290.

Olah, I., Glick, B. and Törö, I. (1986). Bursal development in normal and testoterone-treated chick embryos. Poult. Sci. 65,574-588.

Ratcliffe, M.J.H. (1985). The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius. Immunol. Today 6, 7, 223-227.

Romppanen, T. (1982). Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: A light microscopic histoquantitative study. Poult. Sci. 61,2261-2270.

Shiojiri, N. and Takahashi, M. (1991). Lymphoid follicle formation in the bursa of Fabricius of the chick embryo. J. Anat. 175,237-249.

Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (1987). The chicken B cell compartment. Science 238,1094-1098.