



**LİPOPOLİSAKKARİT (LPS) İLE  
İNDÜKLENEN TAVUK EMBRİYO  
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE SERUM  
AMİLOİD A ÜRETİMİ ÜZERİNE İMMUN  
SİSTEMİN VE A VİTAMİNİN ROLLERİNİN  
MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE  
ARAŞTIRILMASI**

Belma DAYI  
Doktora Tezi  
Danışman: Prof. Dr. Alper SEVİMLİ  
Tez No: 2023-014  
Eylül, 2023  
Afyonkarahisar

T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
PATOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

LİPOPOLİSAKKARİT (LPS) İLE İNDÜKLENEN TAVUK EMBRİYO  
FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE SERUM AMİLOİD A ÜRETİMİ  
ÜZERİNE İMMUN SİSTEMİN VE A VİTAMİNİNİN ROLLERİNİN  
MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan  
Belma DAYI

Danışman  
Prof. Dr. Alper SEVİMLİ

Tez No: 2023-014

AFYONKARAHİSAR

2023

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları  
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: "20.SAĞ.BİL.36"

**T.C.**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**  
**ENSTİTÜ ONAYI**

<b>Öğrencinin</b>	<b>Adı- Soyadı</b>	Belma DAYI
	<b>Numarası</b>	183335001
	<b>Anabilim Dalı</b>	Veterinerlik Patolojisi
	<b>Programı</b>	Doktora
	<b>Program Düzeyi</b>	<input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora
<b>Tezin Başlığı</b>	Lipopolisakkarit (LPS) ile İndüklenen Tavuk Embriyo Fibroblast Hücre Kültüründe Serum Amiloid A Üretimi Üzerine İmmun Sistemin ve A Vitamininin Rollerinin Moleküler Teknikler ile Araştırılması	
<b>Tez Savunma Sınav Tarihi</b>	15.09.2023	
<b>Tez Savunma Sınav Saati</b>	10:00	

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... / ..... / ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

***e-imzalıdır***

**Prof. Dr. Esmâ KOZAN**  
**Enstitü Müdürü**

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

15/09/2023

Belma DAYI

## ÖZET

### LİPOLİSAKKARİT (LPS) İLE İNDÜKLENEN TAVUK EMBRİYO FİBROBLAST HÜCRE KÜLTÜRÜNDE SERUM AMİLOİD A ÜRETİMİ ÜZERİNE İMMUN SİSTEMİN VE A VİTAMİNİNİN ROLLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLER İLE ARAŞTIRILMASI

Kanatlılarda bacak hastalıkları çeşitli sağlık problemlerine sebep olarak, hayvan refahını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu bacak hastalıklarından biri olan amiloid artropati, kahverengi yumurtacı tavukların bacak eklemlerinde amiloid A (AA) protein birikimi ve AA proteinin prekürsör maddesi olan serum amiloid A'nın (SAA) kalıcı amiloid fibrillerini oluşturması ile meydana gelen patolojik bir olgudur. Bu tez çalışmasının amacı tavuk embriyonik sinoviyal fibroblastların (TESF) farklı dozlarda lipopolisakkarit (LPS), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve A vitamini ile indüklenmesi sonucunda 24. ve 48. saatlerdeki SAA üretimini, kültür ortamında enzim bağlı immunosorbent testi (ELISA) ve gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile moleküler düzeyde değerlendirmektir. Çalışmada ilk kez, kahverengi yumurtacı tavuk embriyolarından izole edilen TESF'lerde primer kültür, pasajlama ve karakterizasyon gibi uygun bir hücre kültürü sistemi oluşturulmuş, izole edilen TESF'lerin karakterizasyonunda immunositokimya, hemakolor boyama ve karbon fagositoz testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, A vitamini ile 48 saat boyunca indüklenen deney grubu haricindeki tüm gruplarda qPCR ile SAA mRNA ekspresyonunda istatistiki açıdan anlamlı bir artış gözlenirken, ELISA ile kültür ortamındaki SAA seviyesinde anlamlı bir artış saptanamamıştır. Elde edilen bulgular TESF'lerdeki SAA ekspresyonunun özellikle LPS konsantrasyonuna bağlı olduğunu, IL-1 $\beta$  ve A vitaminin SAA ekspresyonu üzerine tek başına etkilerinin daha az olduğunu göstermiştir. Ayrıca kahverengi yumurtacı tavuk embriyolarından elde edilen TESF'lerin, amiloid artropati için uygun bir çalışma modelini temsil ettiği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** A vitamini, amiloidozis, hücre kültürü, immun sistem, lipopolisakkarit, serum amiloid A, tavuk embriyonik fibroblast hücresi.

## SUMMARY

### RESEARCH OF IMMUNE SYSTEM AND VITAMIN A ROLE ON SERUM AMYLOID A PRODUCTION IN CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST CELL CULTURE INDUCED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS) BY MOLECULAR TECHNIQUES

Leg diseases in poultry cause various health problems and adversely affect animal welfare. Amyloid arthropathy, one of these leg diseases, is a pathological phenomenon that occurs when amyloid A (AA) protein accumulates in the leg joints of brown layer hens and serum amyloid A (SAA), the precursor of AA protein, forms permanent amyloid fibrils. The aim of this thesis study was to evaluate the production of precursor protein SAA at 24 and 48 hours by enzyme-linked immunosorbent test (ELISA) and real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after the induction of chicken embryonic synovial fibroblasts (CESF) with different doses of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and vitamin A. In the study, for the first time, a suitable cell culture system such as primary culture, passage and characterization of CESFs isolated from brown layer hen embryos was created, and immunocytochemistry, hemacolor staining and carbon phagocytosis test were used to characterize the isolated CESFs. According to the results, a statistically significant increase was observed in SAA mRNA expression with qPCR in all groups except the group induced with vitamin A for 48 hours, while no significant increase was found in the SAA level in the culture medium with ELISA. Our findings have shown that SAA expression in CESFs is particularly dependent on LPS concentration, with IL-1 $\beta$  and vitamin A having less effect on SAA expression. It has also been observed that CESFs from brown layer hen embryos represent a suitable study model for amyloid arthropathy.

**Keywords:** Amyloidosis, cell culture, chicken embryonic fibroblast cell, immune system, lipopolysaccharide, serum amyloid A, vitamin A.

## ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, akademik ve bilimsel olarak yetişmemde değerli görüşleri ve deneyimleri ile bana yol gösteren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Alper SEVİMLİ'ye en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Beni her koşulda destekleyen ve yanımda olan, sadece doktora eğitimim boyunca değil hayatın her alanında beni cesaretlendiren ve motive eden, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Sonay PATAR, sevgili abim Alaaddin DAYI, sevgili babam Nadir DAYI ve sevgili yengem Esra DAYI'ya sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmamda, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı altyapısını tüm imkanları ile açan ve çalışmamın tüm aşamalarında tecrübe ve bilgisi ile bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Ahmet AKKOÇ'a çok teşekkür ederim. Çalışmamda moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında bana yardımcı olup yol gösteren sayın Prof. Dr. Abdullah YALÇIN ve sevgili doktora öğrencisi Aybike SARIOĞLU BOZKURT'a teşekkürlerimi sunarım. Deneysel aşamalarda benimle birlikte özveri ile çalışıp, emek harcayan sevgili doktora öğrencisi Ezgi YUMUŞAK, sevgili Dr. Ayşe Meriç MUTLU ve sevgili Dr. Özkan YAVAŞ'a çok teşekkür ederim. Doktora eğitimimde, bilimsel ve manevi anlamda bana destek olan sayın Doç. Dr. İ. Taci CANGÜL ve sayın Prof. Dr. M. Özgür ÖZYİĞİT'e en içten samimiyetleri için teşekkürlerimi sunarım. Lisans dönemimin en başından itibaren akademik olarak ilerlemek istediğim Patoloji Anabilim Dalı'nı seçmemde büyük rol oynayan ve her koşulda bana destek olan İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamda kullanılan yumurtaların teminini sağlayan Güres Yumurta A.Ş'ye teşekkür ederim. Tezimi 20.SAĞ.BİL.36 nolu proje kapsamında destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Belma DAYI

Afyonkarahisar-2023

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
<b>ÖZET</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>ÖNSÖZ SAYFASI</b>	<b>III</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>IV</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>IX</b>
<b>ÇİZELGELER</b>	<b>X</b>
<b>RESİMLER</b>	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	5
1.1.1. Tanım ve Tarihçe	5
1.1.2. Amiloidin Yapısı	6
1.1.3. Amiloid ve Amiloidozisin Sınıflandırılması	7
1.1.4. Etiyoloji	9
1.2. Kanatlılarda Amiloidozis	10
1.3. Amiloid Artropati	11
1.4. Patojenez	13
1.4.1. Prekürsör Protein ve AFY'nin Rolü	14
1.4.2. Amiloid Arttırıcı Faktör (AEF) ve Fibrillojenezin Rolü	15
1.4.3. Proinflamatuvar Sitokinlerin Rolü	18
1.4.4. İnfeksiyöz ve Noninfeksiyöz Ajanların Rolü	19
1.4.5. SF Hücrelerinin Rolü	20
1.4.6. Amiloid İçerisindeki Diğer Komponentlerin Rolü	22
1.5. Makroskopik ve Histopatolojik Bulgular	23
1.6. Teşhis	24
1.7. Korunma ve Tedavi	24
<b>2. MATERYAL ve METOT</b>	<b>26</b>
2.1. Materyal	26
2.1.1. Hayvan Materyali	26

2.1.2. Deney Ortamı	26
2.1.3. Teknik Aletler	26
2.1.4. Kimyasallar ve Solüsyonlar	31
2.1.5. qPCR Kiti	33
2.1.6. ELISA Kiti	34
2.1.7. Boyamalarda Kullanılan Kitler ve Solüsyonlar	35
2.1.8. Plastik Gereçler	35
2.2. Metot	37
2.2.1. Yumurtalarda Embriyo Kontrolü	37
2.2.2. TESH'lerin İzolasyonu	37
2.2.3. Pasajlamalar	40
2.2.4. Hücre Sayımı	41
2.2.5. Hücrelerin Karakterizasyonu	42
2.2.5.1. İmmünotokimyasal Boyama	43
2.2.5.2. Hemakolor Boyama	44
2.2.5.3. Karbon Fagositoz Testi	44
2.2.6. Deneylerin Yapılışı	44
2.2.7. qPCR	47
2.2.7.1. RNA Ekstraksiyonu ve Kantitasyonu	47
2.2.7.2. cDNA Sentezi	48
2.2.7.3. qPCR Analizi	48
2.2.8. ELISA	51
2.2.8.1. Örneklerin Hazırlanması	51
2.2.8.2. Test Solüsyonlarının ve Standart Kuyucukların Hazırlanması	52
2.2.8.3. Test Prosedürü	52
2.2.8.4. SAA Miktarının Hesaplanması	54
2.2.9. İstatistiksel Değerlendirme	55
<b>3. BULGULAR</b>	<b>56</b>
3.1. Hücre Kültürü Bulguları	56
3.2. İmmünotokimya ve Hemakolor Boyama Bulguları	59
3.3. Karbon Fagositoz Testi Sonuçları	62

3.4. qPCR Bulguları	62
3.4.1. SAA mRNA Ekspresyon Değerleri, 24 s Deney Grupları	64
3.4.2. SAA mRNA Ekspresyon Değerleri, 48 s Deney Grupları	66
3.5. ELISA Bulguları	69
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>70</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>79</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>80</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AA:** Amiloid A  
**ABD:** Amerika Birleşik Devletleri  
**ACas:** Amiloid kazein protein  
**AEF:** Amiloid arttırıcı faktör  
**AFP:** Akut faz protein  
**AFY:** Akut faz yanıt  
**AIns:** Amiloid insülin protein  
**AL:** Hafif zincirli amiloid protein  
**Apo:** Apolipoprotein  
**APrP:** Amiloid prion protein  
**A $\beta$ :** Amiloid beta protein  
**Ca:** Kalsiyum  
**cDNA:** Komplementer DNA  
**cm:** Santimetre  
**Ct:** Döngü eşiği  
**CuSO<sub>4</sub>:** Bakır sülfat  
**Da:** Dalton  
**DAB:** 3,3-diaminobenzidin  
**dk:** Dakika  
**DNA:** Deoksiribonükleik asit  
**DNaz:** Deoksiribonükleaz  
**dNTP:** Deoksinükleotriphosfat  
**DPBS:** Dulbecco'nun fosfat tamponlu salin solüsyonu  
**ELISA:** Enzim bağlı immunosorbent testi  
**ESM:** Ekstrasellüler matriks  
**FBS:** Fötal sığır serumu  
**g:** Gram  
**GAG:** Glikozaminoglikan  
**GAP:** Glikoprotein amiloid P  
**GAPDH:** Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz  
**HDL:** Yüksek yoğunluklu lipoprotein

**IL-1:** İnterlökin-1

**IL-1 $\beta$ :** İnterlökin-1 $\beta$

**IL-6:** İnterlökin-6

**L:** Litre

**LPS:** Lipopolisakkarit

**mg:** Miligram

**ml:** Mililitre

**MMP-1:** Matriks metalloproteinaz-1

**MMP-3:** Matriks metalloproteinaz-3

**NaHCO<sub>3</sub>:** Sodyum bikarbonat

**ng:** Nanogram

**nm:** Nanometre

**PG:** Prostaglandin

**RNA:** Ribonükleik asit

**RNaz:** Ribonükleaz

**RPM:** Dakikadaki devir sayısı

**RT:** Ters Transkripsiyon

**qPCR:** Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

**s:** Saat

**SAA:** Serum amiloid A

**SAP:** Serum amiloid P

**SF:** Sinoviyal fibroblast

**sn:** Saniye

**TESF:** Tavuk embriyonik sinoviyal fibroblast

**TNF- $\alpha$ :** Tümör nekroz faktörü- $\alpha$

**U:** Ünite

**UV:** Ultraviyole

**UV-VIS Spektrofotometri:** Ultraviyole görünür ışık spektrofotometri

**$\mu$ g:** Mikrogram

**$\mu$ l:** Mikrolitre

## ŞEKİLLER

	SAYFA
<b>Şekil 1.1:</b> Amiloid artropati patojenezinin şematize edilmiş görünümü	16
<b>Şekil 2.1:</b> TESH'lerin izole edildiği tibio-metatarsal eklem bölgesinin şematize edilmiş görünümü	39
<b>Şekil 2.2:</b> Hemositometrede canlı hücrelerin sayıldığı karelerin şematize edilmiş görünümü	42
<b>Şekil 2.3:</b> qPCR analizinin gerçekleştirildiği 96 kuyucuklu tabağın şematize edilmiş görünümü	51
<b>Şekil 2.4:</b> Standart stok solüsyonunun hazırlanma aşamasının şematize edilmiş görünümü	53
<b>Şekil 2.5:</b> ELISA ile SAA ölçümünün gerçekleştirildiği 96 kuyucuklu tabağın şematize edilmiş görünümü	54
<b>Şekil 3.1:</b> SAA mRNA ekspresyonu, 24 s deney grupları	65
<b>Şekil 3.2:</b> SAA mRNA ekspresyonu, 48 s deney grupları	68
<b>Şekil 3.3:</b> ELISA standart absorban değerleri ile standart eğri ve formülü	69

## ÇİZELGELER

	<b>SAYFA</b>
<b>Çizelge 1.1:</b> Amiloid araştırma tarihindeki önemli başlıklar	<b>6</b>
<b>Çizelge 1.2:</b> Hayvanlarda tanımlanan bazı amiloid fibril proteinleri ve onların prekürsör proteinleri	<b>8</b>
<b>Çizelge 2.1:</b> RNA izolasyon kit içeriği	<b>33</b>
<b>Çizelge 2.2:</b> cDNA sentez kit içeriği	<b>34</b>
<b>Çizelge 2.3:</b> Deney gruplarına uygulanan indükleyici maddeler ve dozları	<b>46</b>
<b>Çizelge 2.4:</b> Deney gruplarında (24 s) izole edilen RNA ortalama değerleri ile her bir cDNA reaksiyon miksi için eklenen örnek ve su miktarı	<b>49</b>
<b>Çizelge 2.5:</b> Deney gruplarında (48 s) izole edilen RNA ortalama değerleri ile her bir cDNA reaksiyon miksi için eklenen örnek ve su miktarı	<b>50</b>
<b>Çizelge 3.1:</b> SAA mRNA ekspresyon değerleri, 24 s deney grupları	<b>64</b>
<b>Çizelge 3.2:</b> SAA mRNA ekspresyon değerleri, 48 s deney grupları	<b>67</b>

## RESİMLER

	SAYFA
<b>Resim 2.1:</b> Kuluçka makinesi, 37,5 °C'lik sıcaklık ve % 57 nem koşulları	27
<b>Resim 2.2:</b> İnkübatör, 37 °C'lik sıcaklık ve % 5 CO <sub>2</sub> koşulları	27
<b>Resim 2.3:</b> Sınıf II biyogüvenlik kabini	28
<b>Resim 2.4:</b> Soğutmalı santrifüj cihazı	29
<b>Resim 2.5:</b> Termal döngü cihazı	30
<b>Resim 2.6:</b> qPCR cihazı	30
<b>Resim 2.7:</b> 11 günlük embriyo bulunan döllü yumurta	38
<b>Resim 2.8:</b> Embriyo bulunmayan dölsüz yumurta	38
<b>Resim 2.9:</b> Kahverengi yumurtacı tavuk ırkına ait 11 günlük embriyo	38
<b>Resim 2.10:</b> Hücre sayımında kullanılan hemositometre	41
<b>Resim 2.11:</b> İmmünotokimya, hemakolor boyama ve karbon fagositoz testinin gerçekleştirildiği 24 kuyucuklu hücre kültür tabağı	43
<b>Resim 2.12:</b> Deney gruplarının bulunduğu 6 kuyucuklu hücre kültürü tabakları	45
<b>Resim 3.1:</b> Tibio-metatarsal eklem bölgesi sinoviyal doku eksplantından (E) ilk hücre çıkışları, invert mikroskop görüntüsü	56
<b>Resim 3.2:</b> TESH hücreleri, invert mikroskop görüntüsü	57
<b>Resim 3.3:</b> Sinoviyal doku eksplantından (E) ilk hücre çıkışları, 3.gün, invert mikroskop görüntüsü	57

<b>Resim 3.4:</b> Sinoviyal doku eksplantından (E) dışarı doğru hücre çıkışları, 4. gün, invert mikroskop görüntüsü	<b>58</b>
<b>Resim 3.5:</b> Sinoviyal doku eksplantından (E) dışarı doğru hücre çıkışları, 5. gün, invert mikroskop görüntüsü	<b>58</b>
<b>Resim 3.6:</b> Primer sinoviyal fibroblastlar, 7. gün, invert mikroskop görüntüsü	<b>59</b>
<b>Resim 3.7:</b> Primer sinoviyal fibroblastlar, vimentin pozitif immun boyanma, DAB, x200 büyütme	<b>60</b>
<b>Resim 3.8:</b> Primer sinoviyal fibroblastlar, vimentin pozitif immun boyanma, DAB, x400 büyütme	<b>60</b>
<b>Resim 3.9:</b> Primer sinoviyal fibroblastlar, sitokeratin negatif immun boyanma, DAB, x100 büyütme	<b>61</b>
<b>Resim 3.10:</b> Primer sinoviyal fibroblastlar, Hemakolor boyama, x100 büyütme	<b>61</b>
<b>Resim 3.11:</b> Primer sinoviyal fibroblastlar, Hemakolor boyama, x400 büyütme	<b>62</b>
<b>Resim 3.12:</b> Karbon fagositoz testi, primer sinoviyal fibroblastlar arasında fagosite edilmemiş karbon partikülleri, invert mikroskop görüntüsü	<b>63</b>
<b>Resim 3.13:</b> Karbon fagositoz testi, rat peritoneal makrofaj hücresi tarafından fagosite edilmiş karbon partikülleri (oklar), invert mikroskop görüntüsü	<b>63</b>

## 1. GİRİŞ

Çeşitli sağlık problemlerine sebep olarak, kanatlı endüstrisini önemli ölçüde etkileyen bacak hastalıkları, tüm dünyada hayvan refahını olumsuz yönde etkilemektedir (Bradshaw vd., 2002). Hastalıklar, ticari olarak yetiştirilen ve hızla büyüyen kanatlılarda gelişim bozuklukları, lokomotor problemlere bağlı topallıklar, karkas kalitesinde bozulma ve mortalite artışı gibi sebeplerden dolayı üreticiler için de büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Braga vd., 2016). Yapılan bazı araştırmalarda (Edwards, 2000; McNamee ve Smyth, 2000), Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yetiştirilen tavuk sürülerinde bacak hastalıklarının, yıllık yaklaşık 80-120 milyon dolar ekonomik kayba neden olduğu bildirilmiştir.

Kanatlı yetiştiriciliğinde önemli bacak hastalıklarından biri olan amiloid artropatinin, Avrupa'da birçok ülkede giderek artan bir öneme sahip olduğu bildirilmekte, Hollanda ve Fransa'da yetiştirilen tavuk sürülerinin %61'inde görülen topallığın temel sebebinin, amiloid artropati olduğu düşünülmektedir (Landman vd., 1994). Bacak eklemlerinde amiloid A (AA) protein birikimi ve şişliklerle karakterize seyreden amiloid artropati olgularına, özellikle kahverengi yumurtacı tavuklarda yaygın olarak rastlanılmaktadır (Landman vd., 1994; Ovelgonne vd., 2001). Bu olgular, ticari bir sürünün yaklaşık %20-30'unda topallığın yanı sıra, yumurta veriminde düşüş ve büyüme geriliği gibi problemlere de neden olmaktadır (Landman vd., 1994; Ovelgonne vd., 2001; Petersen vd., 2009). Türkiye'de kanatlı endüstrisinin ülke ekonomisindeki önemi göz önüne alındığında, kanatlı bacak hastalıkları ve bu hastalıklardan biri olan amiloid artropati olgularına yönelik az sayıda araştırma olduğu bilinmektedir (Mısırlıoğlu vd., 2001; Dayı ve Sevimli, 2022). Amiloid artropatinin, Türkiye'de kanatlı sektöründe sebep olduğu ekonomik kaybına yönelik ise yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Dayı ve Sevimli, 2022).

Amiloid artropati AA proteinin eklemlerde birikimi ile şekillenen ve amiloidozisin özel formu olan patolojik bir olgudur (Landman vd., 1994). Doku ve organlarda ekstrasellüler olarak meydana gelen amiloid birikimine amiloidozis denilmektedir (Glennner, 1980). Proteolitik enzimlerle eritemeyen ve anormal

yapıda bir protein olan amiloid, dokularda biriktikten sonra, kalıcı fibriler bir yapıya dönüştüğü için, hücrelerde atrofi ve nekroza sebep olarak fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır (Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014).

Amiloidozis, amiloid maddesinin ana bileşeni olan amiloid fibril proteinine göre sınıflandırılmaktadır (Husby vd., 1993). İnsanlarda ve hayvanlarda lokal ve sistemik olmak üzere farklı amiloidozis tipleri gözlenmektedir. Sistemik amiloidozis, hafif zincirli amiloid (AL) protein ya da AA protein birikimine bağlı olarak şekillenir. İnsanlarda tüberküloz (Erk vd., 1995), diyabet (Oskarsson vd., 2015) Alzheimer (Nakamura vd., 2018), multiple skleroz (Schröder vd., 2000) ve romatoid artrit (Georgin-Lavialle vd., 2023) ile hayvanlarda amiloid artropati (Landman vd., 1996), Alzheimer (Tucker vd., 2008) ve böbrek yetmezliği (Schulte vd., 2022; Brunet vd., 2023) gibi çeşitli sebeplere bağlı olarak amiloidozis olgularına rastlanılmaktadır. İmmunglobulin yapısında olmayan AA protein, hayvanlarda en yaygın gözlenen amiloid proteindir (Landman vd., 1994). Bu amiloid proteinin dokularda birikmesiyle sekonder amiloidozis meydana gelmektedir (Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014; Miller ve Zachary, 2017). Kronik hastalıklar, yangısal reaksiyonlar ve akut faz yanıt (AFY) gibi predispoze faktörler sekonder amiloidozisin patojenezinde önemli rol oynamaktadır (Levin vd., 1973; Husebeek vd., 1985).

Sekonder amiloidozisin patojenezine ilişkin yapılan araştırmaların çoğunda amiloid oluşumunun fibrillojenez aşamasına odaklanılmıştır. Özellikle AA proteinin prekürsör maddesi olduğu bilinen ve AFY sırasında artış gösteren serum amiloid A proteini (SAA), proteolitik sindirime dirençli olan amiloid fibrillerinin oluşumunda etkin rol oynamaktadır (Yamada vd., 1996; Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014). Kalıcı bir AFY'nin, SAA'nın yıkımı sonucunda oluşan fibriler prekürsör proteinin üretilmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle AFY'nin oluşmadığı ve plazmada yüksek seviyede SAA bulunmadığı durumlarda ise amiloidozisin şekillenmediği bildirilmiş (Upragarin vd., 2005a), ancak amiloid birikimi için tek başına artmış bir SAA üretiminin yeterli olmadığı kaydedilmiştir (Migita vd., 1996; Kumar vd., 2014). Yapılan bazı çalışmalarda (Rosenthal ve

Sullivan, 1978; Skogen vd., 1980; Zekerias vd., 2000; Sevimli vd., 2005), nötrofil lökositlerin ve makrofajların amiloid fibrillerinin oluşumunda etkin rol oynadığı öne sürülmüştür.

Serum amiloid A, temel olarak karaciğerden (Benditt ve Eriksen, 1977), ayrıca dalak (Hardardottir vd., 1997), böbrek (Dieter vd., 2019), meme (Sadek vd., 2017), kondrosit (Zerega vd., 2004) ve sinoviyal hücrelerden (Stack vd., 2019) sentezlendiği bilinen bir akut faz proteindir (AFP). Bu AFP'nin sentezi interlökin-6 (IL-6), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ve tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenmektedir (Betts vd., 1993; Gruys vd., 1994; Kumar vd., 2014). Mitchell vd. (1991), interlökin-1 (IL-1) ile indükledikleri tavşan sinoviyal fibroblast (SF) hücrelerinden SAA ekspresyonunun olduğunu gözlemlemiştir. Benzer şekilde, atların SF hücreleri ve kondrositlerinde IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'nın SAA sentezi üzerine etkileri araştırılmış, özellikle IL-1 $\beta$ 'nin bu hücrelerde SAA sentezini indüklediği bildirilmiştir (Jacobsen vd., 2016). Proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra, lipopolisakkarit (LPS) (Morrow vd., 1981; Zhou vd., 2023) ve A vitamininin de (Sevimli vd., 2005) SAA'nın önemli indükleyicileri olduğu kaydedilmiştir.

Kanatlılarda bildirilen tüm amiloidozis olgularının, AA protein birikimine bağlı olarak şekillenen, sekonder amiloidozis olduğu dikkati çekmektedir (Landman vd., 1996; Landman vd., 1998a). Sistemik sekonder amiloidozis gözlenen kanatlılarda en çok etkilenen organların karaciğer, dalak, böbrek ve ince bağırsaklar olduğu bildirilmiştir (Hoffman ve Leighton, 1985; Brayton, 1992). Tavuklarda en sık karşılaşılan amiloidozis olgularının ise amiloid artropati olduğu kaydedilmiştir (Landman vd., 1994; Steentjes vd., 2002). Tavuklar amiloid artropati gelişimine yatkın oluşları nedeniyle, birçok deneysel çalışmada (Landman vd., 1996; Peperkamp vd., 1997; Ovelgonne vd., 2001; Steentjes vd., 2002; Upragarin vd., 2005b; Alasonyalılar vd., 2006; Sevimli vd., 2008; Petersen vd., 2010; Falker-Gieske vd., 2022) model olarak kullanılmıştır.

Hayvan deneyleri, hastalıkların patojenezini araştıran bilimsel çalışmalarda önemli bir rol oynamakla birlikte, süre gelen etik tartişmaların da konusu olmuştur (Freshney, 2010). Bu nedenle, birçok evcil hayvanda olduğu gibi, tavuklarda da *in vitro* yöntemler, etik kaygıları en aza indirmek için iyi bir alternatif olarak kabul edilmektedir (Freshney, 2010; Akkoc ve Kahraman, 2012). Kullanımı kolay ve ekonomik olan tavuk embriyonik hücreleri (Urja vd., 2018), uygun hücre kültürü ortamında, hızlı ve sürekli büyümeye kolaylıkla uyum sağlayabildikleri için *in vitro* alışmalarda kullanılmak üzere özellikle tercih edilmektedir (Rubin, 1966).

Amiloid artropati oluşumunda, sinoviyal membranın intima katmanında bulunan SF'lerin de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Upragarin vd., 2005b; Blanco vd., 2016). Sinoviyal hücrelerin yaklaşık üçte ikisini oluşturan bu hücreler, fibroblastlardan köken alan mezenkimal hücrelerdir (Ghadially ve Roy, 1967; Bartok ve Firestein, 2010). Zhao vd. (2016), eklem hastalıkları ile ilgili olarak yaptıkları *in vitro* bir çalışmada, SF hücrelerinin kullanılmasının, sinoviyal dokuların hastalıklardaki rolünü tespit etmek için daha etkili bir yöntem olabileceğini öne sürmüşlerdir. Aynı araştırmada (Zhao vd., 2016), SF'lerin hastalıklardaki öneminin iyi bilinmesinin, eklem hastalıklarına yönelik terapötik yaklaşımların geliştirilmesini de sağlayabileceği kaydedilmiştir.

Yapılan kapsamlı literatür taramaları, hayvan refahı üzerinde büyük etkisi olan amiloid artropati araştırmalarının çoğunlukla *in vivo* koşullarda olduğunu göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla, ergin tavuk SF'lerinden SAA salınımının *in vitro* koşullarda araştırılmasına yönelik yapılmış yalnızca bir çalışma bulunmaktadır (Upragarin vd., 2005b). Ancak, tavuk embriyolarına ait SF'lerden SAA salınımının *in vitro* koşullarda araştırılmasına yönelik yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Amiloid artropatinin ekonomik önemi göz önüne alındığında, patojenez hakkında detaylı bilgiye ulaşmak ve sekonder amiloidozisin, kümes hayvanlarında neden olduğu ekonomik kayıpları azaltmak için, daha kapsamlı *in vivo* ve *in vitro* alışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasındaki hipotezimiz, sinoviyal membranın intima katmanında bulunan SF'lerin eklem hastalıklarında önemli rol oynadığı ve bu hücrelerin kullanılmasının amiloid artropatideki rolünü

tespit etmek için etkili bir yöntem olabileceği yönündedir. Ayrıca tavukların amiloid artropati gelişimine yatkın oluşu ve patojenezde rol oynayan prekürsör protein SAA'nın *in vitro* koşullarda farklı ajanlarla TESH'lerden sentezinin indüklenebileceğidir. Bu hipotezimize yönelik amacımız ise ilk kez primer TESH hücrelerinin izole edilmesi ile birlikte LPS, IL-1 $\beta$  ve A vitamini ile indüklenen TESH'lerde, SAA sentezininin moleküler tekniklerle ölçülebileceği *in vitro* deney modelinin ilk defa oluşturulmasıdır. Bir diğer hipotezimiz de farklı ajanlarla indüklenen SF'lerin, SAA sentezindeki etkisinin doz ve süre açısından değerlendirilmesinin amiloid artropati patojenezine yönelik teşhis ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesini sağlayabileceğidir. Bu hipoteze yönelik amacımız ise farklı dozlarda, farklı ajanlarla indüklenen TESH'lerde SAA'nın 24. ve 48. saatlerdeki üretiminin, enzim bağlı immunosorbent testi (ELISA) ve gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile moleküler düzeyde değerlendirilmesidir.

## **1.1. Genel Bilgiler**

### **1.1.1. Tanım ve Tarihçe**

Amiloid, proteolitik enzimlerle eritemeyen ve çözünemeyen, anormal yapıda bir proteindir. Bu maddenin insan ve hayvanların çeşitli organ ve dokularında, hücreler arasında kalıcı olarak birikmesine amiloidozis denir (Glennner, 1980; Bochsler ve Slauson, 2002). Amiloidozis terimi, amiloid fibril proteininin birikimi sonucunda şekillenen patolojik olguları ifade etmektedir (Bochsler ve Slauson, 2002; Blanco vd., 2016).

Glisson, ilk kez 1654 yılında, dokularda amiloid birikimlerini gözlemlemiştir (Glisson, 1654). Daha sonrasında, kronik yangısal hastalıklar nedeniyle ölen insanların organ ve dokularında, iodin ile pozitif reaksiyon veren, mumsu yapıda nişasta benzeri<sup>1</sup> bir maddenin biriktiği saptanmış ve ilk kez 1854 yılında Virchow tarafından amiloid terimi kullanılmıştır. Amiloid birikintileri içerisinde bulunan

---

<sup>1</sup> (nişasta=amilum, nişasta benzeri=amiloid)

karbonhidrat yapının iyot ve sülfürik asit ile nişasta benzeri reaksiyondan sorumlu olduğu belirtilmiştir (Virchow, 1854). Çizelge 1.1.'de, amiloid araştırmalarının kronolojik sıralamasına göre önemli başlıklar verilmiştir.

**Çizelge 1.1:** Amiloid araştırma tarihindeki önemli başlıklar\*, (Janssen, 1985)'den modifiye edildi.

Konu	Yazar
• Dokularda ilk kez amiloid birikiminin gözlenmesi	Glisson, 1654
• Amiloid teriminin ilk defa kullanılması	Virchow, 1854
• Amiloidin protein yapısında bir madde olduğunun tespit edilmesi	Friedreich ve Kekule, 1859
• Amiloidin kongo kırmızısı ile boyanması	Bennhold, 1922
• Amiloidin fibriler yapıda bir protein olduğunun saptanması	Cohen ve Calkins, 1959
• Amiloid fibrillerinin izolasyonu	Pras vd., 1968
• $\beta$ -kırımlı amiloid fibril yapılarının saptanması	Eanes ve Glenner, 1968
• AL proteinin amino asit dizisinin saptanması	Glenner vd., 1970
• AA proteininin amino asit dizisinin saptanması	Benditt vd., 1971
• <i>İn vitro</i> koşullarda amiloid fibril oluşumunun gözlenmesi	Glenner vd., 1971
• SAA'nın identifikasyonu	Levin vd., 1973
• SAA'nın sekonder amiloidoziste prekürsör protein olduğunun saptanması	Husebekk vd., 1985

\*AL: Hafif zincirli amiloid protein, AA: Amiloid A protein, SAA: Serum amiloid A.

### 1.1.2. Amiloidin Yapısı

Amiloid maddesi, bilinmeyen etkiler altında proteinlerin katlanmasındaki değişiklikler sonucunda şekillenen anormal bir proteindir. Doku ve organlarda

çözünemeyen, fibriler bir formda birikim göstermektedir (Husby vd., 1985). Cohen ve Calkins (1959), elektron mikroskobu kullanarak amiloidin fibriler yapısını ilk kez ortaya koymuştur. Eanes ve Glenner (1968), ise  $\beta$ -kırımlı amiloid fibrillerinin moleküler yapısını, X-ışını kırılım analizi ve kızılötesi ışınlar kullanarak tanımlamıştır.

Amiloid fibril proteinlerinin 3000-30.000 Da arasında değişen moleküler ağırlığa sahip olduğu düşünülmektedir. Bu proteinler, 7-10 nm çapında ve uzunluğunda, ultrastrüktürel olarak dallanma göstermeyen bir yapıdadır (Glenner, 1980; van Andel vd., 1986).

### **1.1.3. Amiloid ve Amiloidozisin Sınıflandırılması**

Amiloidozis, amiloid birikiminin dokulardaki dağılımına göre lokal veya sistemik ya da mevcut bir hastalığın bulunup bulunmamasına göre primer veya sekonder amiloidozis olarak sınıflandırılmaktadır. Benditt ve Eriksen (1964), ilk kez amiloid maddesinin heterojen yapıda olabileceğini öne sürerek, 'Amiloid A' ve 'Amiloid B' terimlerini kullanmıştır. Daha sonraki yıllarda bu sınıflandırma, amiloid fibril protein yapısına göre AL (Glenner vd., 1970) ve AA protein olarak değiştirilmiştir (Benditt vd.,1971).

Plazma hücrelerinden köken aldığı bilinen ve immunglobulin hafif zincirlerinden oluşan AL proteinin, dokularda birikmesi sonucunda şekillenen amiloidozis 'atipik, primer ya da AL' amiloidozis olarak tanımlanır. Çoğunlukla insanlarda rastlanılan, bozuk immunglobulin üretimi sonucunda şekillenen ve herhangi bir hastalıkla ilişkisi olmayan AL amiloidozis (Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014; Miller ve Zachary, 2017) hayvanlarda kedi (Liepnieks vd., 1996; Tamura vd., 2020), köpek (Platz vd., 1997; Kadota vd., 2020), sığır (Taniyama vd., 2000; Kameyama vd., 2003) ve atlarda (Niewold vd., 1996; Kim vd., 2005) bildirilmiştir.

İmmunglobulin yapısında olmayan AA proteinin dokularda birikimine bağlı olarak şekillenen amiloidozis ‘reaktif, sekonder ya da AA amiloidozis’ olarak tanımlanmaktadır (Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014; Miller ve Zachary, 2017). Hayvanlarda en sık karşılaşılan bu amiloidozis türü, yangısal reaksiyonlar ve kronik hastalıkların ciddi bir komplikasyonu olarak şekillenmektedir (Glennner, 1980; Landman vd., 1994; Bochsler ve Slauson, 2002).

Amiloidozisin sınıflandırılması amiloid fibril proteininin çeşidine göre de yapılmaktadır (Sipe vd., 2014). Amiloid fibril proteinlerinin karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında, içerdiği primer amino asit dizisi kullanılmaktadır (Husby, 1994). Uluslararası Amiloidozis Derneği Adlandırma Komitesi’ne göre primer amino asit dizisinde farklılık gösteren 31 adet ekstrasellüler fibril proteini olduğu ve bunlardan 10 tanesinin hayvanlarda tanımlandığı bilinmektedir (Sipe vd., 2014). Hayvanlarda tanımlanan bazı amiloid fibril proteinleri ve onların prekürsörleri Çizelge 1.2.’de verilmiştir.

**Çizelge 1.2:** Hayvanlarda tanımlanan bazı amiloid fibril proteinleri ve onların prekürsör proteinleri\*, (Janssen, 1985; Westermarck vd., 2007; Sipe vd., 2014)’den modifiye edildi.

Hayvan Türü	Fibril Protein	Prekürsör Protein
Hindi, inek, kedi, ördek, tavuk	AA	(Apo) SAA (S)
At, kedi, sığır,	AL	İmmunglobulin hafif zinciri (L+S)
Köpek	AApoAI	Apolipoprotein AI (S)
Fare	AApoAII	Apolipoprotein AII (S)
Ayı, koyun, köpek, maymun	A $\beta$	A $\beta$ prekürsör protein (L)
İnek	ACas	$\alpha$ -S2C kazein (L)
İnek, koyun,	APrP	Prion protein (L)
Sıçan	AIns	İnsülin (L)

\*Apo: Apolipoprotein, A $\beta$ : Amiloid beta protein, ACas: Amiloid kazein protein, APrP: Amiloid prion protein, AIns: Amiloid insülin protein, L: Lokal, S: Sistemik.

#### 1.1.4. Etiyoloji

Amiloidozis, çeşitli yangısal reaksiyonlar ve hastalıklar sonucunda ortaya çıkmaktadır (Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014). İnsanlarda romatoid artrit (Teilum ve Lindahl, 1954; Dhillon vd., 1989; Koivuniemi vd., 2008; Kuroda vd., 2012; Jung vd., 2021; Georgin-Lavialle vd., 2023), tüberküloz (Erk vd., 1995; Georgin-Lavialle vd., 2023), lepra (Ozaki ve Furuta, 1975; Nakayama vd., 2001), ailesel Akdeniz ateşi (Zemer vd., 1986; Goto vd., 2023), Alzheimer (Wong vd., 1985; Liang vd., 1997; Chung vd., 2000; Oskarsson vd., 2015; Nakamura vd., 2018; Perneczky vd., 2023), multiple skleroz (Schröder vd., 2000) ve diyabet (Lorenzo ve Yankner, 1996; Oskarsson vd., 2015) gibi hastalıklarda amiloid birikimi bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda (Simms vd., 1994; Landman vd., 1998a), insanlarda ve hayvanlarda en yaygın gözlenen amiloidozis formunun sekonder amiloidozis olduğu rapor edilmiştir. İnsanlarda gözlenen sekonder amiloidozis olgularının prevalansının % 0,5-0,86 olduğu ve buna sebep olan en yaygın durumun ise romatoid artrit olduğu kaydedilmiştir (Hazenbergh ve Rijswijk, 1994; Simms vd., 1994).

İnsanlarda gözlenen vakaların yanı sıra, kedilerde rastlantısal olgularda (van der Linde-Sipman vd., 1997; Niewold vd., 1999; Beatty vd., 2002), hepatomegali (Neo-Suzuki vd., 2017) ve kronik böbrek yetmezliği (Tei vd., 2018; Schulte vd., 2022) gibi durumlarda, köpeklerde hepatit (Loeven, 1994), böbrek yetmezliği (Slauson vd., 1970; DiBartola vd., 1990; Segev vd., 2012; Loewen vd., 2018) ve akut böbrek hasarında (Brunet vd., 2023), sığırlarda rastlantısal olgularda (Gruys, 1977; Niewold vd., 1991; Tojo vd., 2005; Senturk ve Ozyigit, 2006; Yoshida vd., 2009; Murakami vd., 2012), koyunlarda ürolitiazis (Fernandez vd., 2003), renal fibrozis (Jarad vd., 2020), rastlantısal olgular (Mensua vd., 2003) ve deneysel olarak indüklenen vakalarda (Biescas vd., 2009), keçilerde rastlantısal olgular (Farnsworth ve Miller, 1985; Mensua vd., 2003) ile endometrit ve abort (Gaffney vd., 2015) gibi durumlarda, ceylanlarda rastlantısal olgularda (Linke vd., 1986; Ceribasi vd., 2009), atlarda gastroenteropati (Hayden vd., 1988), üveit (Ostevik vd., 2014), bullöz

hastalıklar (Fussel vd., 2021) ve rastlantısal olgularda (Abdelkader vd., 1991; Portela vd., 2012) sekonder amiloidozis tespit edilmiştir.

Tavuklarda hem rastlantısal olarak gözlenen hem de deneysel olarak indüklenen olgularda (Landman vd., 1994; Landman vd., 1999b; Ovelgonne vd., 2001; Kapakin vd., 2007; Sevimli vd., 2008; Murakami vd., 2013a; Falker-Gieske vd., 2022; Lopes vd., 2022), ördeklerde rastlantısal (Guo vd., 1996) ve deneysel olgular (Lings, 1992) ile kanatlı löykozu (Stepanets vd., 2001) ve tüberkülozunda (Chen vd., 2019), bıldırcınlarda rastlantısal olgular (Nakamura vd., 1998) ve deneysel olarak indüklenen vakalar (Nakayama vd., 2017; Miyoshi vd., 2019) ile devekuşunda da benzer şekilde rastlantısal olarak (Akkoç vd., 2009), sekonder amiloidozis vakası rapor edilmiştir. Ayrıca birçok deneysel çalışmada fare (Takahashi vd., 1989; Ganowiak vd., 1994; Lundmark vd., 2005; Maeda vd., 2016; Yang vd., 2018), rat (Beems vd., 1978; Yu vd., 2000) ve tavşanlarda da (Hinton, 1981; Horiuchi vd., 2008; Murakami vd., 2011) amiloidozis olguları bildirilmiştir.

## **1.2. Kanatlılarda Amiloidozis**

Çeşitli kanatlı türlerini etkileyebilen amiloidozis olguları, özellikle su kuşlarında iyi bilinen patolojik bir bozukluktur. Amiloidozis insidansı kronik hastalıklar, yaş ve stres faktörlerine bağlı olarak artış göstermektedir (Sato vd., 1981; Schneider vd., 1988). Landman vd. (1998a), doğada serbest halde bulunan kanatlılarda amiloidoze hiç rastlanmadığını, sadece kafese alınmış olan kanatlılarda bu olgular ile karşılaştığını öne sürmüşlerdir. Amiloidozisin kronik yangısal reaksiyonların ciddi bir komplikasyonu olduğu ve kanatlılarda gözlenen olguların % 60'ının kronik hastalıklarla, % 40'ının ise idiyopatik sebeplerle ilişkili olabileceği rapor edilmiştir.

Yapılan araştırmalar (Landman vd., 1996; Landman vd., 1998a) sonucunda, kanatlılarda bildirilen tüm amiloidozis vakalarının, sekonder amiloidozis olduğu dikkati çekmektedir. Kanatlılarda sistemik sekonder amiloidozis olgularında en çok etkilenen organların karaciğer, dalak, böbrek ve ince bağırsaklar olduğu kaydedilmiştir (Hoffman ve Leighton, 1985; Brayton, 1992; Landman vd., 1994).

*Enterococcus faecalis* (Landman vd., 1997; Landman vd., 2001; Ovelgonne vd., 2001; Petersen vd., 2008; Ciftci ve Diker, 2009; Petersen vd., 2010), *Staphylococcus aureus* (Maximow, 1898; Dias ve Montali, 1994) ve *Salmonella pullorum* (Wang ve Di, 1992) gibi etkenlerin kanatlılarda karaciğer, dalak, böbrek, bağırsak ve eklem bölgelerinde amiloid birikimine neden olduğu rapor edilmiştir. Tavuklarda ise en sık karşılaşılan amiloidozis olgularının amiloid artropati olduğu dikkati çekmekte ve amiloid birikimi için bacak eklemlerinin predispoze bölgeler olduğu öne sürülmektedir (Landman vd., 1994; Landman vd., 1997; Landman vd., 1998a; Ovelgonne vd., 2001; Sevimli vd., 2004; Kapakin vd., 2007; Petersen vd., 2010; Sevimli vd., 2013).

### **1.3. Amiloid Artropati**

Kanatlılarda özellikle eklem bölgesini kapsayan bacak hastalıkları, önemli lokomotor problemlere sebep olarak hayvan refahını olumsuz yönde etkilemektedir (Bradshaw vd., 2002). Bu hastalıklar ticari olarak yetiştirilen ve hızla büyüyen kanatlılarda gelişim bozuklukları, lokomotor problemlere bağlı topallıklar, karkas kalitesinde bozulma ve mortalite artışı gibi sebeplerden dolayı üreticiler için büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Braga vd., 2016).

Yapılan bazı araştırmalar (Edwards, 2000; McNamee ve Smyth, 2000), ABD’de yetiştirilen tavuk sürülerinde, bacak hastalıklarının yılda yaklaşık 80-120 milyon dolar ekonomik kayba neden olduğunu göstermektedir. Avrupa’da birçok ülkede giderek artan bir öneme sahip amiloid artropatinin, Hollanda ve Fransa’da yetiştirilen tavuk sürülerinin % 61’inde, topallığın temel sebebi olduğu düşünülmektedir (Landman vd., 1994). Türkiye’de ise, kanatlı endüstrisinin ülke ekonomisindeki önemi göz önüne alındığında, amiloid artropati olgularına yönelik yapılan araştırmaların az sayıda olduğu dikkati çekmekte (Mısırlıoğlu vd., 2001; Dayı ve Sevimli, 2022) ve amiloid artropatinin Türkiye’de kanatlı sektöründe sebep olduğu ekonomik kayba yönelik yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Dayı ve Sevimli, 2022).

Tavuklarda gözlenen eklem lezyonlarının *Mycoplasma* spp. (Calnek vd., 1991; Landman ve Feberwee, 2001; Gentle vd., 2003; Dijkman vd., 2013; Tawfik vd., 2016; Amer vd., 2019; Yan vd., 2023), *Staphylococcus* spp. (Daum vd., 1990; Calnek vd., 1991; Landman vd., 1998b; Chamanza vd., 1999; Mısırlıoğlu vd., 2001; Rasheed, 2011; Tawfik vd., 2016; Marcon vd., 2019; Amer vd., 2019), *Streptococcus* spp. (Calnek vd., 1991; Landman vd., 1994), *Salmonella* spp., (Calnek vd., 1991; Oh vd., 2010; Tawfik vd., 2016; Guo vd., 2019). *Escherichia coli* (Calnek vd., 1991; Landman vd., 1998b; Mısırlıoğlu vd., 2001; Tawfik vd., 2016; Amer vd., 2019; Hameed vd., 2022). *Enterococcus* spp. (Landman vd., 1997; Landman vd., 1998b; Landman vd., 1999b; Landman vd., 2000; Landman vd., 2001; Mısırlıoğlu vd., 2001; Landman vd., 2003; Petersen vd., 2008; Ciftci ve Diker, 2009; Petersen vd., 2010; Stalker vd., 2010) ve reovirus (Jones vd., 1981; Calnek vd., 1991; Landman vd., 1994; Zhang vd., 2019) gibi etkenler sebebiyle ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu lezyonlar, eklemlerde veya tendon kılıflarında yangısal değişikliklerle karakterize olup, artritise veya tenosinovitise sebep olmaktadır (Calnek vd., 1991; Landman vd., 1999b; Mısırlıoğlu vd., 2001; Rasheed, 2011; Zhang vd., 2019).

Maestrini ve Pascucci (1970), kanatlılarda ilk kez Beç tavuğu sürüsünün bacak eklemlerinde amiloid birikintilerini tanımlamış ve sürüde % 5 oranında topallık ile birlikte, gelişim geriliği olduğunu gözlemlemişlerdir. Landman vd. (1998a), tavuklarda amiloid prekürsör proteininin eklemlerde birikmesinin, eklem kıkırdağı vaskülarizasyonunun iyi olmasına bağlı olarak şekillendiğini öne sürmüşlerdir. Peperkamp vd. (1997)'e göre, eklem kıkırdağını besleyen damarlar ve sinoviyum, amiloid birikiminin meydana geldiği önemli predispoze bölgelerdir. Tavuklar bu sebeplerden dolayı amiloid artropati gelişimine yatkın olmaları nedeniyle, amiloid fibrillerinin oluşumunu araştırmak için birçok deneysel çalışmada model olarak tercih edilmektedir (Landman vd., 1994; Landman vd., 1996; Peperkamp vd., 1997; Landman vd., 1999b; Landman ve Feberwee, 2001; Ovelgonne vd., 2001; Sevimli vd., 2005; Alasonyalılar vd., 2006; Kapakin vd., 2007; Petersen vd., 2009; Sevimli vd., 2013; Falker-Gieske vd., 2022).

Ticari bir sürünün yaklaşık % 20-30'unda yumurta veriminde düşüş ve büyüme geriliği gibi problemlere neden olan ve bacak eklemlerinde AA protein birikimi ile karakterize şişliklerle seyreden amiloid artropati, ilk olarak kahverengi yumurtacı tavuk ırklarında tanımlanmıştır (Landman vd., 1994). Amiloid artropati olgularına beyaz yumurtacı tavuklar ve broyler ırkı tavuklara oranla, kahverengi yumurtacı tavuk ırklarında daha sık rastlanılmaktadır (Landman vd., 1994; Landman vd., 1998a; Steentjes vd., 2002). Ovelgonne vd. (2001), deneysel olarak yaptıkları bir çalışmada kahverengi ve beyaz yumurtacı tavuklar ile broyler ırkı tavuklara aynı dozda, intravenöz yol ile *E. faecalis* etkeni inokule etmiş, ancak sadece kahverengi yumurtacı tavuklarda amiloid artropatinin şekillendiğini gözlemlemişlerdir. Kahverengi yumurtacı tavuklarda humoral bir antikor yanıt gözlenirken, beyaz yumurtacı tavuklarda ise hücre aracılı bir yanıt gözlemlendiği ve amiloid artropatiye karşı duyarlılık farkının bu duruma bağlı olduğu öne sürülmüş (Landman vd., 1998a), ancak beyaz yumurtacı tavuklarda ve broyler ırkı tavuklarda hastalığa karşı oluşan direncin altında yatan ana sebeplerin ne olduğu henüz tam olarak saptanamamıştır (Falker-Gieske vd., 2022). Broyler ırkı tavuklarda ise amiloid birikimlerinin gözlenmemesindeki muhtemel nedenin yaklaşık 7 haftalık bir yaşam süresi sonunda kesime sevk edilmeleri ve kısa bir ömüre sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Ovelgonne vd., 2001).

#### **1.4. Patojenez**

Amiloidozis, patomorfolojisi ve epidemiyolojisi hakkında yapılan kapsamlı araştırmalar olmasına rağmen, patojenezi henüz tam olarak bilinmeyen ve iyi anlaşılabilen kompleks bir olgudur (Landman vd., 1998a). Bu konuda yapılan araştırmalar sonucunda kronik enfeksiyonlar, yangısal reaksiyonlar veya tümörlerin yanı sıra AFY ve SAA, proinflamatuvar sitokinler, infeksiyöz ve noninfeksiyöz ajanlar ile SF'lerin amiloid oluşumunda etkin rol oynayan predispoze edici faktörler olduğu bilinmektedir (Landman vd., 1998a; Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014; De Buck vd., 2016).

### 1.4.1. Prekürsör Protein ve AFY'nin Rolü

Doku hasarı, enfeksiyon, neoplazi ve immünolojik bozukluklar gibi durumlarda organizmanın verdiği cevap AFY olarak bilinmektedir. Bu yanıt sırasında sentezlenen ve önemli AFP'lerden biri olan SAA, AA proteinin prekürsör maddesidir. Ayrıca SAA'nın proteolitik sindirime dirençli olan amiloid fibrillerinin oluşumunda etkin rol oynadığı düşünülmektedir (Landman vd., 1994; Yamada vd., 1996). Molekül ağırlığı 15 kDa olan SAA, AFY sırasında plazma konsantrasyon seviyesi 10-100 kat artış gösteren pozitif bir AFP'dir (Ceron vd., 2005). İlk kez Husby ve Natvig (1974), tarafından sekonder amiloidozis olgularında amiloid birikintilerinden izole edilen AA proteinine karşı çapraz reaksiyon göstermesi sonucunda serumda tanımlanmıştır. Benditt ve Eriksen (1977), SAA'nın amino asit dizisinde bulunan N-terminal bölgesi ile AA proteinin amino asit dizisinin aynı olduğunu belirtmişlerdir.

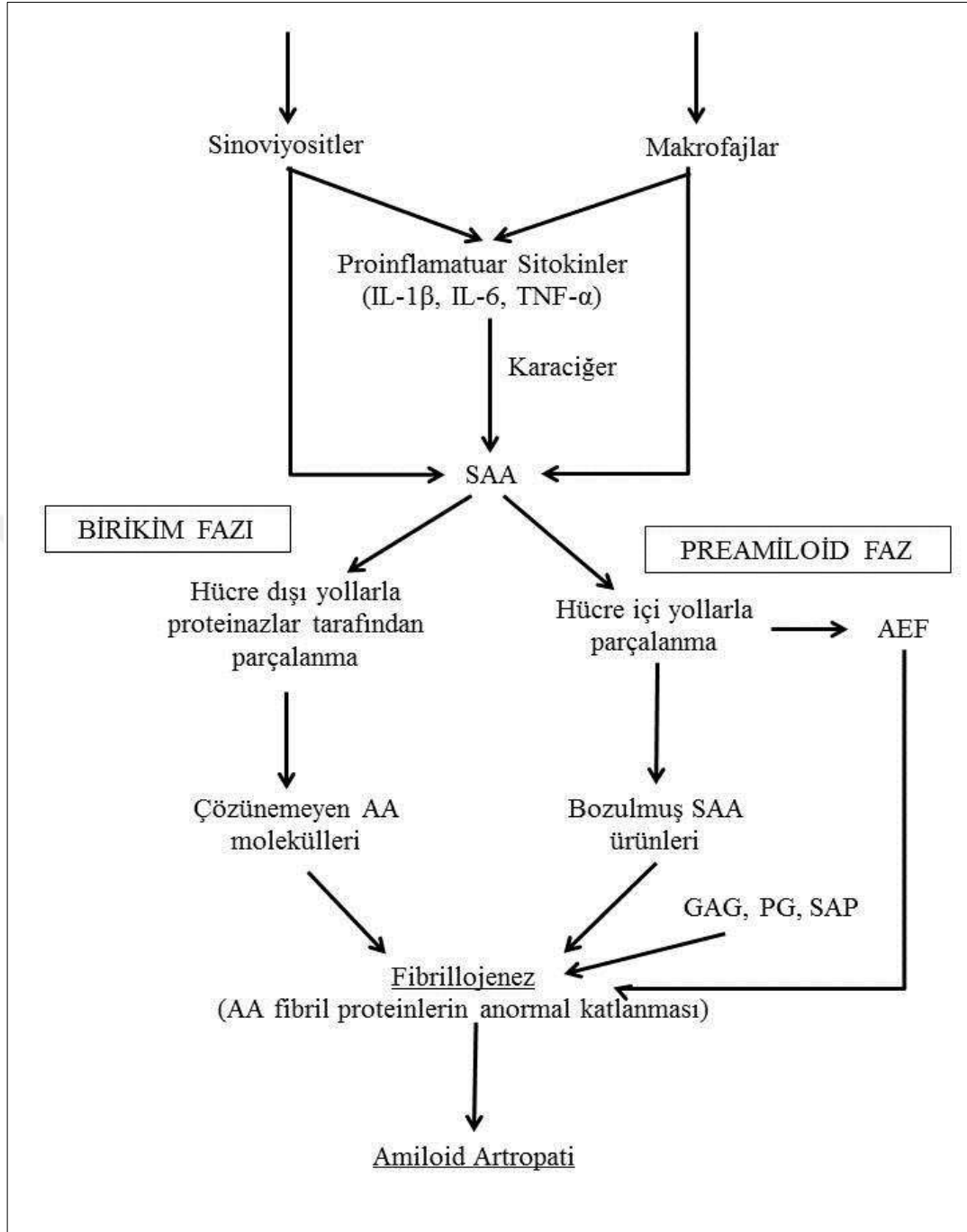
Akut faz yanıt sırasında temel olarak karaciğerde üretilip sentezlenen SAA'nın (Benditt ve Eriksen 1977; Kalmovarin vd., 1991; Uklar ve Whitehead, 1999; Migita vd., 2004; Konstandi vd., 2019; You vd., 2023) ayrıca beyin (Meek ve Benditt, 1986; Liang vd., 1997; Tucker ve Sack Jr, 2001; Soriano vd., 2020), akciğer ve kalp (Ramadori vd., 1985a; Meek ve Benditt, 1986; Webb vd., 1989; Hardardottir vd., 1997), dalak (Baumal vd., 1978; Webb vd., 1989; Meek vd., 1992; Hardardottir vd., 1997), böbrek (Ramadori vd., 1985a; Webb vd., 1989; Meek vd., 1992; Marhaug vd., 1997; Dieter vd., 2019), lenf yumrusu (Meek vd., 1992), mide ve bağırsaklar (Meek ve Benditt, 1986; Hardardottir vd., 1997), meme (Eckersall vd., 2001; Sadek vd., 2017), adiposit (Meek vd., 1994; Lin vd., 2001), kondrosit (Vallon vd., 2001; Zerega vd., 2004; Jacobsen vd., 2016), sinoviyal hücre (Mitchell vd., 1991; Mitchell ve Brinckerhoff, 1995; Ray vd., 1999; O'Hara vd., 2000; Ovelgonne vd., 2001; Upragarin vd., 2005b; Berg vd., 2011; Jacobsen vd., 2016; Stack vd., 2019), nötrofil lökosit (Rosenthal ve Sullivan, 1978; Linke vd., 1991) ve makrofajlardan da (Ramadori vd., 1985a; Rokita vd., 1987; Takahashi vd., 1989; Meek vd., 1994; Yamada vd., 2000; Jumeau vd., 2019) ekstrahepatik sentezinin olduğu bilinmektedir.

Serum amiloid A, AFY reaktanı olarak lipid metabolizmasında ve taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Bu AFP, karaciğerde sentezlendikten sonra, apolipoprotein SAA (apoSAA) olarak seruma verilir ve serumda taşınırken yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL<sub>3</sub>) ile kompleks halde bulunur. Akut faz reaksiyonuna yanıt olarak, SAA'nın kalıcı ve aşırı üretimi sonucunda, bozulmuş katabolizmaya bağlı olarak, kısmen bozulmuş N-terminal fragmanın, proteaza dirençli fibriller halinde toplanmasına yol açtığına inanılmaktadır. Eriyebilir yapıda olan bu prekürsör protein, hedef dokularda proteolitik sindirime dirençli spesifik amiloid fibrillerine dönüşerek dokularda birikim gösterir (Yamada vd., 1996). Husebck vd. (1985), farelerde *in vitro* koşullarda yaptıkları bir çalışmada, apoSAA maddesinin amiloid fibrillerine dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Serum amiloid A'nın yıkımlanması sonucunda açığa çıkan fibril proteinlerin proteolitik sindirime karşı dirençli olması nedeniyle amiloidozis olgularının dokularda kalıcı ve geri dönüşümsüz bir seyri olduğu bilinmektedir (Husby vd., 1985; Bochsler ve Slauson, 2002; Miller ve Zachary, 2017). Vücutta herhangi bir doku veya organda fibril proteinlerin oluşturduğu amiloid birikimleri hücrelerde atrofi ve nekroza sebep olarak normal yapı ve fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır (De Beer vd., 1982; Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014).

#### **1.4.2. Amiloid Arttırıcı Faktör (AEF) ve Fibrillojenezin Rolü**

Teilum (1964), tarafından yapılan bir çalışmada, amiloid oluşumunun yavaş gelişen bir preamiloid faz ile başladığı ve bunu daha hızlı gelişen bir birikim fazının izlediği öne sürülmüştür (Şekil 1.1.). Hücre içi yollarla, SAA'nın parçalanması sonucunda oluşan fibriler yapıdaki prekürsör protein, AEF olarak hareket etmektedir (Upragarin vd., 2005a). Bunun sonucunda AEF'nin yavaş birikimi ile birlikte preamiloid faz meydana gelir (Teilum, 1964). Amiloid fibrillerinden köken alan AEF, amiloidin dokularda birikimini hızlandıran bir faktör olarak tanımlanmaktadır (Axelrad vd., 1975; Liu vd., 2007). Bu faktörün içerisinde bulunan  $\beta$ -kıvrımlı materyalin, AA amiloidozis olgularında amiloid fibril kristalizasyonu için bir çekirdek görevi üstlendiği düşünülmektedir (Niewold vd., 1987).



**Şekil 1.1:** Amiloid artropati patojenezinin şematize edilmiş görünümü (Upragarin vd., 2005b; Blanco vd., 2016)'dan modifiye edildi\*.

\* IL-1β: Interlökin-1β, IL-6: Interlökin-6, TNF-α: Tümör nekrozis faktör-α, AEF: Amiloid arttırıcı faktör, GAG: Glikozaminoglikan, PG: Prostaglandin, SAP: Serum amiloid P.

Birikim fazı, SAA'nın hücre dışı yollarla proteinazlar tarafından parçalanması sonucunda meydana gelir (Teilum, 1964). Bu aşamada SAA molekül yapısının bozulması ile çözünemeyen ve proteolitik enzimlerle eritemeyen fibriller yapıdaki prekürsör protein oluşur (Kumar vd., 2014). Birikim fazı aşamasında SAA proteini nötrofil lökositlerin azurofil granüllerinde ve monosit kökenli hücrelerin dış yüzeyinde parçalanmaktadır (Skogen vd., 1980; Yamada vd., 1996; Zekerias vd., 2000). Yamada vd. (1996), oluşan amiloid fibril proteinlerinin lökositlerin fagolizozomları içerisine alınarak proteazlar ile etkileşim gösterdiğini ve bu nedenle erken fibril formasyonunun lizozomlar içerisinde şekillendiğini öne sürmektedir.

Amiloidojenezde önemli bir adım olan proteolizis, proteolitik sindirime dirençli amiloid fibrillerinin oluşumunda rol oynayan fibrillojenik bir olay olarak kabul edilmektedir (Landman vd., 1998a). Bu olay amiloidojenik bir prekürsör proteinin anormal katlanması sonucunda başlar. Prekürsör proteindeki yanlış katlanmalar, eksik bir proteolitik bölünme, aminoasitlerin yer değiştirmesi ya da AFY sırasında serum konsantrasyonunda artış gözlenen SAA'nın aşırı üretimi ve anormal SAA katabolizmasının fibrillojenez için önemli faktörler olduğu düşünülmektedir (Dember, 2005).

Landman vd. (1996), amiloid artropati gözlenen tavukların eklemlerinde, amiloid birikimi içerisinde SAA proteininin varlığını saptamış ve proteolizis ile AA protein oluşmadan önce amiloid fibrillerinde SAA polimerizasyonunun meydana geldiğini öne sürmüşlerdir. Ancak, amiloid birikiminin şekillenmesi için tek başına artmış bir SAA üretimi yeterli değildir (Migita vd., 1996; Kumar vd., 2014). Bazı çalışmalarda araştırmacılar (Skogen vd., 1980; Linke vd., 1991; Zekerias vd., 2000; Sevimli vd., 2005) nötrofil lökositler ve makrofajlardan salınan lizozomal enzimler ile birlikte matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1, kollejanaz) ve matriks metalloproteinaz-3'ün (MMP-3, stromelisin), amiloid fibrillerinin oluşumunda etkin rol oynadığını tespit etmişlerdir (Mitchell vd., 1993).

Woldemeskel (2012), prekürsör proteinde meydana gelen anormal katlanmalar sonucunda ortaya çıkan amiloid fibrillerinin ‘ $\beta$ -kıvrımlı yaprak’ yapısında şekillendiğini ve amiloid fibrillerini oluşturmak üzere reorganize olduğunu öne sürmüştür. Ayrıca bazı türlerde, AA amiloidozisin patojenezine katkıda bulunduğu düşünülen diğer önemli bir faktörün, yani amiloid fibrillerini oluşturmaya eğilimli olan apoSAA izotiplerinin varlığı olduğu bilinmektedir (Landman vd., 1998a).

### 1.4.3. Proinflamatuvar Sitokinlerin Rolü

Amiloid fibrillerinin oluşumunda etkin rol oynayan SAA’nın sentezi IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenmektedir (Betts vd., 1993; Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014). Bu sitokinler, aktive olmuş monosit-makrofaj, endotel hücreleri, fibroblast ve sinoviyositler gibi birçok hücre tarafından üretilmektedir (Kumar vd., 2014; Blanco vd., 2016). Serum amiloid A’nın gen promotör bölgesi ile gen bağlanma bölgesinin spesifik DNA dizileri insanlarda, farelerde, ratlarda ve tavşanlarda tanımlanmıştır. Proinflamatuvar sitokinlerin doku özgüllüğü kazandıran ve yüksek oranda SAA transkripsiyonuna izin veren bu promotör bağlanma elemanları yoluyla SAA gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülmektedir (Li ve Liao, 1992).

Amiloid artropati olgularında proinflamatuvar sitokinlerin rolü ile ilgili az sayıda literatür bulunmaktadır (Blanco vd., 2016). Mitchell vd. (1991), tavşanlarda *in vitro* koşullarda yaptığı bir çalışmada, IL-1 ile indüklenen SF’lerde, SAA-3 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Atlarda *in vitro* koşullarda yapılan bir çalışmada (Jacobsen vd., 2016), IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ ’nın SF’lerde ve kondrositlerde SAA sentezi üzerine etkileri araştırılmış ve özellikle IL-1 $\beta$ ’nın, bu hücrelerde SAA sentezinin önemli bir indükleyicisi olduğu bildirilmiştir. Deneysel olarak Freund’s adjuvant ile amiloid artropati oluşturulan tavuklarda, SAA seviyesi ile IL-1 $\beta$  arasında pozitif bir korrelasyon gözlenmiş, IL-1 $\beta$ ’nin, kanatlılarda AA amiloidoziste tek başına ve TNF- $\alpha$  ile birlikte önemli etkilerinin olduğu tespit

edilmiştir (Sevimli vd., 2008). Ancak IL-6'nın rolü hala tam olarak bilinmemektedir (Blanco vd., 2016).

#### 1.4.4. İnfeksiyöz ve Noninfeksiyöz Ajanların Rolü

Amiloidozis oluşumunda farklı etiyolojik ajanlar rol oynamaktadır (Blanco vd., 2016; Miller ve Zachary, 2017). Yapılan bazı çalışmalarda araştırmacılar amiloid artropati olgularının *E. faecalis* (Landman vd., 1994; Peperkamp vd., 1997; Landman vd., 1998b; Landman vd., 1999b; Ovelgonne vd., 2001; Steentjes vd., 2002; Landman vd., 2003; Sevimli vd., 2004; Alasonyalılar vd., 2006; Petersen vd., 2008; Ciftci ve Diker, 2009; Gregersen vd., 2010; Falker-Gieske vd., 2022), *S. aureus* (Landman vd., 1998b; Chamanza vd., 1999; Steentjes vd., 2002), *M. synoviae* (Calnek vd., 1991; Landman ve Feberwee, 2001; Liu vd., 2020), *M. gallisepticum* (Murakami vd., 2013a), *E. coli*, *S. enteritidis* ve reovirus (Calnek vd., 1991; Landman vd., 1998b) gibi infeksiyöz ajanlar tarafından indüklendiğini gözlemlemişlerdir.

Liu vd. (2020), *M. synoviae* ile enfekte edilen tavuk SF'lerinde SAA mRNA ekspresyonunda artış olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca LPS (Morrow vd., 1981; Hardardottir vd., 1997; Lehtolainen vd., 2004; Upragarin vd., 2005b; Jacobsen vd., 2006; De Beer vd., 2010; Murakami vd., 2013b; Liu vd., 2016; Ludwig vd., 2016; Cheng vd., 2018; Zhou vd., 2023), Freund's adjuvant (Hol vd., 1987; Sevimli vd., 2008; Sevimli vd., 2013) ve A vitamini (Sevimli vd., 2005) gibi maddelerin de SAA'nın önemli indükleyicileri olduğu bildirilmiştir. Ancak bu etkenlerin amiloid artropati oluşumundaki primer rolleri hala tartışmalıdır (Landman vd., 1998a).

Gram negatif bakterilerin dış zarlarında bulunan ve konakçı üzerinde çeşitli etkilere sahip olan LPS, özellikle immun sistemin güçlü bir biyoaktivatörü olarak kabul edilmektedir (Kent vd., 1998). Prekürsör protein olan SAA'nın, kanda yüksek seviyeye ulaşmasına neden olarak uzun süreli bir inflamatuvar etki ortaya çıkardığı ve bu şekilde etkili olduğu düşünülmektedir (Upragarin vd., 2005b; Jacobsen vd., 2006).

Yapılan bazı çalışmalarda (Landman vd., 1994; Landman vd., 1998b; Peperkamp vd., 1997; Landman ve Feberwee, 2001; Sevimli vd., 2004; Kapakin vd., 2007; Petersen vd., 2008), amiloid artropati gözlenen tavuklarda sinoviyal membranın fibröz dokusunda, turuncu renkte protein içerikli amiloid birikimine rastlandığı bildirilmiştir. Bu turuncu renk oluşumunun, yemlerde bulunan karotenoid pigmentlerin birikiminden kaynaklı olabileceği düşünülmekte ve A vitamininin dokulara geçerek, amiloid oluşumunda rol oynadığı ileri sürülmektedir (Landman vd., 1994; Sevimli vd., 2004). Sevimli vd. (2005), Freund adjuvant ile amiloid artropati oluşturulan civcivlerde, yüksek A vitamini katkılı beslenmenin amiloid artropatinin şiddetini arttırdığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca tavuklarda yapılan başka çalışmalarda (Sevimli vd., 2004; Alasonyalılar vd., 2006), benzer şekilde A vitamininin, *E. faecalis* etkeni ile indüklenen amiloid artropatinin şiddetini arttırdığı ve benzer şekilde etkilenen eklemelerde turuncu renkte amiloid birikimlerinin olduğu bildirilmiştir.

A vitamini ve ilgili retinoidlerin, lökosit fonksiyonları üzerine etkili olduğu ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyardığı bilinmektedir (Turpin vd., 1990). Bazı araştırmacılar (Derebe vd., 2014; He vd., 2020), SAA'nın A vitaminin moleküler bileşeni olan, retinolün taşınmasında rol oynayan, retinol bağlayıcı proteinlerden biri olduğunu tespit etmiş ve retinolü özellikle immun sistem hücrelerine taşıdığını belirtmişlerdir. Ayrıca retinoidlerin, amiloid fibrillerinin SAA'ya dönüşümünde etkili olduğu bilinen makrofajların sayısını ve aktivasyonunu arttırdığı da düşünülmektedir (Katz vd., 1987). Kedilerde yapılan bir çalışmada ise, hipervitaminozis A'nın sebep olduğu immun sistem hücrelerindeki aşırı aktivasyonun, sekonder amiloidozise yol açtığı bildirilmiştir (Clark ve Seawright, 1969).

#### **1.4.5. SF Hücrelerinin Rolü**

Sinoviyal hücrelerin yaklaşık üçte ikisini oluşturan SF'ler, fibroblastlardan köken alan mezenkimal hücrelerdir (Ghadially ve Roy, 1967; Bartok ve Firestein, 2010). Tip B sinoviyositler olarak da bilinen bu hücreler (Lever ve Ford, 1958; Barland vd.,

1962; Ghadially ve Roy, 1967) tip IV-V kolajen, vimentin ve CD90 ekspresyonu dahil olmak üzere fibroblastların birçok özelliğini taşımaktadır (Bartok ve Firestein, 2010).

Sinoviyal membranın intima katmanında bulunan SF'ler, proliferatif ve invaziv özellikleri bulunan hücrelerdir (Falconer vd., 2018). Bu hücreler zararlı uyarıların etkisi sonucunda proinflamatuvar mediatörleri serbest bırakarak sürekli yangıya neden olmaktadır (Ritchlin, 2000; Yoshitomi, 2019). Konak savunma mekanizmalarının bozulması ile birlikte sinoviyumda şekillenen sürekli yangının, eklem boşluğuna ve eklem kıkırdağına zarar verdiği belirtilmiştir (Yoshitomi, 2019). Benzer şekilde bazı araştırmacılar (Upragarin vd., 2005b; Blanco vd., 2016), SF'lerden lokal olarak sentezlenen sitokinlerin ve SAA'nın, amiloid artropati oluşumunda etkin rol oynadığına dikkat çekmişlerdir. Romatoid artrit gözlenen insanlarda (O'Hara vd., 2000), artrit gözlenen tavşanlarda (Vallon vd., 2001) ve amiloid artropati gözlenen tavuklarda (Ovelgonne vd., 2001; Upragarin vd., 2005b) sinoviyal dokudan SAA sentezinin olduğu bildirilmiştir.

Ovelgonne vd. (2001), beyaz yumurtacı tavuklara kıyasla kahverengi yumurtacı tavukların bacak eklemlerinde sinoviyal membranın geniş yapıda olması ve bu sebeple eklem bölgesinde yeterli miktarda kan akımının oluşması, ayrıca yangısal reaksiyonlarda etkilenen eklem bölgesindeki SF'lerin proliferasyonunun da iyi olmasından dolayı amiloid artropatiye daha duyarlı olduklarını öne sürmüşlerdir. Amiloid artropatili tavuklarda yapılan çalışmalarda (Landman vd., 1997; Ovelgonne vd., 2001; Sevimli vd., 2004; Alasonyalılar vd., 2006; Sevimli vd., 2008), sinoviyal membran, kollagen lifler ve damarlar etrafında amiloid birikimi ile bu birikime bağlı olarak, bağ doku tabakasının kalınlaştığı ve sinoviyal hücrelerde hiperplazi ve hipertrofi şekillendiği vurgulanmıştır.

Zhao vd. (2016), sinoviyal dokular ile ilgili yapılacak olan fizyolojik ve patolojik araştırmalarda, SF'lerin *in vitro* koşullarda kullanılmasının, bu hücrelerin hastalıklardaki rolünü tespit etmek için etkili bir yöntem olacağını öne sürmektedir. Ayrıca, SF'lerin hastalıklardaki önemini iyi bilinmesi, özellikle eklem hastalıklarına

yönelik terapötik yaklaşımların geliştirilmesini de sağlayabileceği düşünülmektedir (Zhao vd., 2016). Mitchell vd. (1991), tavşanlarda IL-1; Sack ve Zink (1992), koyunlarda retroviral artrit; Jacobsen vd. (2016), atlarda IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ , Upragarin vd. (2005b), tavuklarda LPS ve Liu vd. (2020), tavuklarda *M. synoviae* ile *in vitro* ortamda indüklenen SF'lerde SAA salınımı olduğunu gözlemlemişlerdir. Landman vd. (1998a), amiloid artropati gözlenen kahvrenge yumurtacı tavuklarda SAA'nın sinoviyal hücrelerden sentezlendiğini rapor etmiş, ayrıca eklem kıkırdağının vaskularizasyonunun iyi olması nedeniyle SAA'nın karaciğerde sentezlendikten sonra kan dolaşımı yoluyla eklem bölgesine taşınabildiğini ileri sürmüşlerdir.

#### **1.4.6. Amiloid İçerisindeki Diğer Komponentlerin Rolü**

Amiloid birikimleri içerisinde fibril proteinlerinin yanı sıra karbonhidrat kısmını oluşturan proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar (GAG) ve serum amiloid P (SAP) komponentinden köken alan glikoprotein amiloid P (GAP) gibi bileşenler bulunmaktadır (McCubbin vd., 1988; Dember, 2005). Amiloid fibril proteinleri üzerinde GAG'ların düzenleyici ve indükleyici olarak rol oynadığı düşünülmektedir (McCubbin vd., 1988). Peperkamp vd. (1997), tavuklarda yaptıkları bir çalışmada, bacak eklemlerinde şekillenen AA amiloid fibril birikimi içerisinde yüksek oranda sülfatlanmış GAG'lerin varlığını göstermişlerdir. Nonfibriler yapıda olan GAP ise, GAG'lere yüksek affinite duyan ve bu nedenle amiloid birikimleri içerisinde bulunduğu öne sürülen bileşenlerdir (Landman vd., 1998a). Bu bileşenlerin amiloid fibrillerine bağlanması Ca<sup>2+</sup> iyonu ile ilişkilidir (Pepys vd., 1979). Ayrıca Ca<sup>2+</sup> iyonunun, AEF'nin etkisini arttırdığı bildirilmiştir (Alizadeh-Khiavi vd., 1992).

Amiloid birikimleri içerisinde lipoprotein mekanizmasında etkin rol oynadığı düşünülen apolipoprotein E ile laminin, fibronektin, kolajen IV ve vitronektin gibi ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinin varlığı da saptanmıştır (Landman vd., 1994). Laminin SAA'ya yüksek affinite gösteren bir bileşendir ve çinko varlığında bu affinitede artış gözlenmektedir. Amiloid birikimleri içerisinde ESM proteininin bulunmasının bazal membranda şekillenen bir bozukluk ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (Ancsin ve Kisilevsky, 1997). Fibronektin de laminin gibi SAA'ya

affinite gösteren ve büyük fibrillerin oluşmasını sağlayan bir ESM proteindir. Amiloidozis oluşumunda SAA ve monosit kökenli hücrelerin yüzeyleri arasında bağlayıcı bir protein olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Skogen vd., 1980).

### **1.5. Makroskopik ve Histopatolojik Bulgular**

Amiloidozisin şiddeti amiloid birikimlerinin doku lokalizasyonu ve organda meydana gelen fonksiyon bozukluğunun derecesine bağlı olduğu için, tanıda biyopsi ya da nekropside makroskopik muayene ile birlikte histopatolojik incelemenin yapılması büyük önem taşımaktadır (Landman vd., 1998a). Kanatlılarda gözlenen amiloid artropati olgularında makroskopik bulgu olarak femora-tibial ya da tibio-metatarsal eklemlerde şişlikler ve bu eklemlerde sinoviyal sıvıda artış gözlenebilir (Landman vd., 1994; Peperkamp vd., 1997; Sevimli vd., 2004). Ovelgonne vd. (2001), bu bölgelere ek olarak kalça eklemine de şişliklerle karşılaştığını rapor etmişlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda (Landman vd., 1994; Landman vd., 1997; Alasonyalılar vd., 2006), etkilenen eklem bölgelerindeki kemik epifizlerinin normale göre yaklaşık 1-1,5 kat genişleyebildiği ve kırıkdayak yüzeylerinde aşınmaların olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar (Landman vd., 1994; Landman vd., 1996; Peperkamp vd., 1997; Landman ve Feberwee, 2001; Ovelgonne vd., 2001; Sevimli vd., 2004; Sevimli vd., 2005; Kapakin vd., 2007; Petersen vd., 2008), amiloid artropati gözlenen tavuklarda etkilenen eklemlerin kapsulası içerisinde, turuncu renkte amiloid birikimlerinin olduğunu kaydetmişlerdir.

Mikroskopik bulgu olarak amiloid fibrilleri genellikle etkilenen eklemlerin sinoviyal membranı, eklem kırıkdağının süperfisyel tabakası, intrakartilaginöz damarların intima katmanı, menisküs ve periartiküler fibröz dokularda birikim göstermektedir (Peperkamp vd., 1997; Ovelgonne vd., 2001; Petersen vd., 2008). Ayrıca sinoviyal membranlarda heterofil lökosit, lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonları ile birlikte SF'lerde proliferasyonlar gözlenebilmektedir (Peperkamp vd., 1997; Landman vd., 1998a; Ovelgonne vd., 2001; Alasonyalılar vd., 2006). Amiloid birikimleri rutin boyamalar dışında Kongo kırmızısı ile boyanan kesitlerde sinoviyal hücreler ile sinoviyal boşlukta, sinoviyal membrandaki damarlar çevresinde

ve kondrositlerde eozinofilik-pembe renkte gözlenmektedir. Bu birikimler mikroskopta polarize filtre ile sarı-yeşil renkte, şekilsiz amorf yapıda yansımalar vermektedir (Brayton, 1992; Peperkamp vd., 1997; Chiti vd., 1999; Landman ve Feberwee, 2001; Sevimli vd., 2004).

## **1.6. Teşhis**

Amiloidozis teşhisinde semptomlar genellikle spesifik olmadığı için, tanı çoğunlukla postmortem muayene ile yapılmaktadır. Makroskobik teşhiste genellikle lugol testi kullanılmaktadır. Bu amaçla dokulardan alınan örnekler tespit solüsyonuna konulmadan önce yüzeyine lugol solüsyonu dökülür. Amiloid bulunan sahalarda koyu kahve renk değişikliği meydana gelir. Daha sonra bu alanlara % 1'lik sülfirik asit eklenerek amiloid içeren dokularda menekşe renginde sahalarda gözlenir (Hoffman ve Leighton, 1985).

Amiloid maddesinin histopatolojik olarak saptanmasında preparatların Kongo kırmızısı ile boyanması ve mikroskop altında polarize filtre ile incelenmesi tercih edilmektedir (Landman vd., 1997; Landman vd., 1998b; Sevimli vd., 2012) Ek olarak amiloid proteinlerine karşı spesifik immunohistokimyasal boyamalar da kullanılabilir (Peperkamp vd., 1997; Landman vd., 1998b; O'Hara vd., 2000). Ayrıca, AA amiloidozisin patojenezinde etkili olan SAA'nın doku, kan ve hücre kültürü medyumundan ELISA (Landman vd., 1999b; Upragarin vd., 2005b; Sevimli vd., 2008; Sevimli vd., 2013), PCR (O'Hara vd., 2000; Ovelgonne vd., 2001; Upragarin vd., 2005b; Jacobsen vd., 2016) ve Western blot (Mitchell vd., 1991; Upragarin vd., 2005b) gibi moleküler analiz yöntemleri ile ölçülmesi amiloidozisin teşhisinde önemli rol oynamaktadır.

## **1.7. Korunma ve Tedavi**

Amiloidozis kanatlılarda ve diğer türlerde gözlenebilen ilerleyici, patolojik bir durumdur. Kötü prognoza sahip olan bu olgular için uygun bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Benditt ve Eriksen, 1977; Landman vd., 1998a). Dokularda

amiloid birikimi başladıktan sonra ortadan kaldırılması mümkün olmadığı için, amiloid oluşumunu engelleyebilmek amacıyla mevcut yangısal aktiviteyi durdurmak gerekmektedir. Serumdaki SAA konsantrasyonu ile AA amiloidozis ilişkisi göz önüne alındığında, prekürsör protein yükünün azaltılmasının ve fibrillojenez ile amiloid oluşumunu önlemenin en iyi yolunun, yangısal aktivitenin durdurularak, AFY'nin baskılanması olduğu düşünülmektedir (Landman vd., 1998a; Cunnane 2001).

Şiddetli AFY'nin ortaya çıkmasına sebep olan patofizyolojik süreçler serum SAA seviyesinin yükselmesine ve buna bağlı olarak kalıcı bir amiloid birikimine neden olmaktadır (Hawkins ve Pepys, 1990). Tedavide SAA artışına neden olan etkenlerin ortadan kaldırılması serum SAA seviyesinin azalması ve amiloidozis şekillenme riskinin en aza indirilmesinde etkili olmaktadır (Landman vd., 1998a). Ayrıca Alsemgeest vd. (1995), fiziksel stresin de plazma SAA konsantrasyon seviyesinde önemli artışlara sebep olduğunu ve bu nedenle stres oluşturabilecek durumlardan kaçınmanın amiloidozisin önlenmesinde etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Laufer vd. (1968), preamiloid faz aşamasında ya da amiloid oluşumunun erken evrelerinde kortizon uygulamasının sonucunda retiküloendotelial sistemde immunsupresif etki göstererek amiloid oluşumunu engellediğini öne sürmüşlerdir.

İnsanlarda ve bazı deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, kolşisin ve dimetil sülfoksit gibi bazı anti-inflamatuar ilaçların amiloid birikimini önlediği rapor edilmiştir (Kisilevsky vd., 1995; Soto vd., 1996). Shtasburg vd. (2012), siklofosfamid ve klorambusil gibi alkilleyici ajanların farelerde amiloidojenezin önlenmesinde en güçlü inhibitörler olduğunu öne sürmüşlerdir. Sevimli vd. (2005), ise Freund's adjuvant ile amiloid artropati oluşturulan kahverengi yumurtacı tavuklarda intramuskuler olarak metilprednizolon ve pentoksifilin uygulamış ve bu iki preparatın yangısal aktiviteyi azaltarak amiloid birikimini baskıladığını saptamışlardır.

## **2. MATERYAL ve METOT**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Hayvan Materyali**

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 02/11/2020 tarihinde onaylanmıştır (AKUHADYEK-313). Çalışma için kahverengi yumurtacı tavuk ırkına (ISA Brown) ait, spesifik patojen içermeyen 15 adet dömlü yumurta ticari bir kuluçkahane sürüsünden temin edilmiş (Güres Yumurta A.Ş., Manisa, Türkiye) ve deneylerde bu embriyolara ait TESH'ler kullanılmıştır.

#### **2.1.2. Deney Ortamı**

Çalışmanın deneysel aşamaları Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çalışma boyunca laboratuvar ısı 25 °C'de sabit tutuldu. Laboratuvarın sterilizasyonu için, UV sterilizasyon lambaları ve laboratuvarın aydınlatılmasında floresan lambalar kullanıldı. Ayrıca qPCR analiz aşamaları Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

#### **2.1.3. Teknik Aletler**

##### **Kuluçka Makinesi**

Yumurtalar laboratuvara nakledildikten sonra Cimuka marka (PD60, Türkiye) kuluçka makinesine (Resim 2.1.) yerleştirilerek, % 57 nem ve 37,5 °C'lik sıcaklık koşullarında 11 gün boyunca gelişimleri sağlandı.

## Karbondioksitli İnkübatör

İzole edilen hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren Jouan marka (IGO 150, Fransa) inkübatörde 37 °C'lik sıcaklık koşullarında inkübe edildi (Resim 2.2).



**Resim 2.1:** Kuluçka makinesi, 37,5 °C'lik sıcaklık ve % 57 nem koşulları.



**Resim 2.2:** İnkübatör, 37 °C'lik sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub> koşulları.

## Biyogüvenlik Kabini

Deneylerde steril ortam gerektiren aşamalar Jouan marka (BioSafety Cabinet, MSC 12 Type II A2, Fransa) laminar akımlı kabin içerisinde gerçekleştirildi (Resim 2.3.).

## Sterilizatör

Çalışmada cam malzemelerin sterilizasyonu için Nüve marka (Dry Air Sterilizer, FN 120, Türkiye) kuru hava sterilizatörü kullanıldı.

## Otoklav

Deneylerde kullanılan bazı solüsyonların sterilizasyonu için Nüve marka (Table Top Steam Sterilizer, OT 012, Türkiye) buharlı otoklav kullanıldı.



**Resim 2.3.** Sınıf II biyogüvenlik kabini.

### **Su Banyosu**

Deneyleerde kullanılan donmuş solüsyonların eritilmesi ve ısıtılması için Witeg Wisd marka (WiseBath, WB 11, Almanya) su banyosu kullanıldı. Isı koşulları 37 °C'ye ayarlanan su banyosu içerisine, 10 L distile su + 1 L CuSO<sub>4</sub>-EDTA solüsyonu konuldu.

### **Vorteks**

Çalışmada kullanılan bazı solüsyonların, içinde buldukları şişenin duvarlarından çöktürülmesi için Fisher Scientific marka (Vorteks Mixer, Topmix, FB15012, ABD) vorteks kullanıldı.

### **Santrifüj**

Çalışma sırasında Jouan marka (Refrigerated Centrifuge, BR4i, Fransa) soğutmalı santrifüj kullanıldı (Resim 2.4.).



**Resim 2.4.** Soğutmalı santrifüj cihazı.

### **İnvert Mikroskop**

Deneyley boyunca doku eksplantları ve izole edilen hücreler Olympus marka (CKX41, Japonya) fotoğraf makinesi ataçmanlı invert mikroskop ile incelendi.

### **Işık Mikroskobu**

Çalışmada immunositokimya ve hemakolor boyamaları yapılan preparatlar Nikon marka (YS2-H, Japonya) ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

### **Tartı**

Çalışmada A&D marka (Compact Balance, EK 300i, ABD) kompakt terazi ile Sartorius marka (Precision Balance, BP 110S, Almanya) hassas terazi kullanıldı.

### **Spektrofotometre**

Çalışmada hücre kültürü ortamındaki SAA düzeyinin, her bir ELISA kuyucuğundaki absorbans değeri Thermo Fisher Scientific marka (Multiskan FC, 51119000, ABD)

spektrofotometre cihazı ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Ayrıca qPCR analizi için RNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen RNA konsantrasyonu, BioTek marka (Epoch Microplate, ABD) UV-VIS spektrofotometri cihazı ile 250 nm dalga boyunda ölçüldü.

### **Termal Döngü Cihazı**

Çalışmada elde edilen RNA örneklerinden, cDNA sentezlenmesi aşamasında Bioneer marka (96 Thermal Block, MyGenie, Kore) termal döngü cihazı (Resim 2.5.) kullanılarak, örnekler sırasıyla 25 °C'lik ısıda 10 dk, 37 °C'lik ısıda 120 dk ve 85 °C'lik ısıda 5 dk inkube edildi.

### **qPCR Cihazı**

Çalışmada qPCR analizi için Applied Biosystems marka (StepOnePlus, Thermal Cycler, ABD) qPCR cihazı kullanıldı (Resim 2.6.).



**Resim 2.5:** Termal döngü cihazı.



**Resim 2.6:** qPCR cihazı.

#### **2.1.4. Kimyasallar ve Solüsyonlar**

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar ilgili literatürler (Freshney, 2010; Akkoc ve Kahraman, 2012) ve üretici firmaların talimatlarına göre hazırlandı.

#### **Hücre Kültürü Medyumu**

Deneyley boyunca izole edilen hücrelerin beslenmesinde Sigma Aldrich marka (M3769, ABD) M199 hücre kültürü medyumu kullanıldı. Toz halinde bulunan medyumu hazırlamak için cam erlenmayer içerisine 1 L distile su ve hücre kültürü medyumunun tamamı (9,8 g) eklendi. Ayrıca medyumun içerisine 2,2 g NaHCO<sub>3</sub> + 0,5 g L-glutamin ilave edildi. Ardından filtrasyon ünitesi ve vakum pompası kullanılarak sterilize edilen medyum filtrasyon ünitesinin toplayıcı şişesinde ağzı kapalı şekilde toplandı.

#### **Fötal Sığır Serumu (FBS)**

Çalışma sırasında hücrelerin beslenmesinde kullanılan medyum içerisine Sigma Aldrich marka (F2442, ABD) % 20 FBS eklendi.

#### **Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salin Solüsyonu (DPBS)**

Deneyley boyunca içerisinde 2X antibiyotik solüsyonu bulunan Sigma Aldrich marka (D5652, ABD) DPBS solüsyonu kullanıldı. Toz halinde bulunan 9,6 g'lık preparat 1 L distile su içerisinde çözdürüldü.

#### **Antibiyotik Solüsyonu**

Deneyley boyunca izole edilen hücrelerin beslenmesi için kullanılan hücre kültürü medyumunu içerisine sıvı halde bulunan Sigma Aldrich marka (P4333-100 ml, ABD) penisilin + streptomisin (10.000 U penisilin + 10 mg streptomisin) eklendi.

## **LPS**

Deneşlerde TESH'lerin indüklenmesinde Sigma Aldrich marka (L4516, *E. coli* O127:B8, ABD) LPS kullanıldı. Toz halinde bulunan 1 mg'lık preparat 10 ml M199 içerisinde çözdürüldü.

## **IL-1 $\beta$**

Deneşlerde TESH'lerin indüklenmesinde Lifespan BioSciences firmasına ait (LS-G37646, 50 $\mu$ g-0.25mg/ml, ABD) IL-1 $\beta$  kullanıldı.

## **A Vitamini**

Deneşlerde TESH'lerin indüklenmesinde Sigma Aldrich marka (R0635, ABD) retinil asetat preparatı kullanıldı. Toz halinde bulunan 5 mg'lık preparat 10 ml M199 içerisinde çözdürüldü.

## **Tripsin-EDTA Solüsyonu**

Tripsinizasyon aşamalarında hücrelerin kültür tabakları yüzeyinden ayrılmasını sağlamak için Biological Industries marka (1109199, 100 ml, İsrail) % 0,25'lik tripsin-EDTA solüsyonu kullanıldı.

## **Merkaptoetanol**

Deneşlerde elde edilen TESH'lerin RNA ekstraksiyonu için RNA izolasyon kitinde bulunan lizis solüsyonu içerisinde Sigma Aldrich marka (m3148, ABD) merkaptoetanol eklendi.

## **Etanol**

Deneyleerde elde edilen TESF'lerin RNA ekstraksiyonu için RNA izolasyon kitinde bulunan yıkama solüsyonları içerisinde Merck marka (100983, ABD) etanol eklendi.

## **Tripan Mavisi Solüsyonu**

Rutin tripsinizasyon işlemlerinden sonra elde edilen hücre süspansiyonundaki hücrelerin sayımı için Sigma Aldrich marka (T-8154, ABD) % 0,4 tripan mavisi solüsyonu kullanıldı.

## **Karbon Tozu**

Kültüre edilmiş TESF'lerin fagositik kapasitesini değerlendirmek için yapılan karbon fagositoz testinde Sigma Aldrich marka (05105, ABD) karbon tozu kullanıldı.

## **2.1.5. qPCR Kiti**

### **RNA İzolasyon Kiti**

Çalışmada izole edilen TESF'lerin RNA ekstraksiyonu için Thermo Fisher Scientific marka (K0732, GeneJet RNA Purification Kit, ABD) kit kullanıldı. RNA izolasyon kit içeriği Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1:** RNA izolasyon kit içeriği.

<b>Madde</b>	<b>Miktar</b>
RNA izolasyon kolonları	50 adet
1,5 ml'lik toplayıcı tüpler	50 adet
2 ml'lik toplayıcı tüpler	50 adet
Yıkama solüsyonu-I	200 ml
Yıkama solüsyonu-II	170 ml
Lizis solüsyonu	200 ml
Nükleaz içermeyen su	125 ml

## **cDNA Sentez Kiti**

İzole edilen RNA örneklerinden RT yöntemiyle cDNA sentezi için Thermo Fisher Scientific marka (4368814, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ABD) kit kullanıldı. cDNA sentez kit içeriği Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2:** cDNA sentez kit içeriği.

<b>Madde</b>
RT buffer (10X)
RT random primer (10X)
dNTP mix (25X)
Reverse transkriptaz enzimi
RNaz inhibitörü

## **Master Mix**

Çalışmanın qPCR analiz aşamasında amplifikasyon için Thermo Fisher Scientific marka (4369016, TaqMan Gene Expression Master Mix, ABD) kullanıldı.

## **TaqMan Prob**

Çalışmada qPCR reaksiyonu için Thermo Fisher Scientific marka (4448892, Gg07164124\_m1 Chicken SAA, TaqMan Gene Expression Assays) SAA TaqMan probu kullanıldı. İnternal kontrol geni olarak, Thermo Fisher Scientific marka (4453320, Gg03346982\_m1 GAPDH, TaqMan Gene Expression Assays) GAPDH TaqMan probu tercih edildi.

## **2.1.6. ELISA Kiti**

İzole edilen TESH'lerin kültür medyumundaki SAA konsantrasyon seviyesi Lifespan BioSciences marka (LS-F31849, ABD) tavuk SAA ELISA kiti kullanılarak ölçüldü.

### **2.1.7. Boyamalarda Kullanılan Kitler ve Solüsyonlar**

Çalışmada TESH'lerin fiksasyonu için Merck marka (106009, ABD) soğutulmuş (-20 °C) metanol kullanıldı. Boyamalar sonunda lameller, Merck Millipore marka (107961, Almanya) entellan ile lam üzerine yapıştırıldı.

### **İmmunositokimyasal Boyama**

Sinoviyal fibroblast kültürlerinin sitolojik fenotipini karakterize etmek için, hücreler ticari olarak satın alınan Thermo Fisher Scientific marka (UltraVision ONE Detection System, HRP polymer & DAB Plus chromogen, Anti-Polyvalent, TP-015-HDJ, ABD) kit kullanılarak immunositokimyasal olarak boyandı. Primer antikor olarak Dako/Agilent Technology firmasına ait anti-vimentin (mouse anti-human, 1:500, M0725, ABD) ve Santa Cruz Biotechnology firmasına anti-sitokeratin (mouse anti-human, 1:200, Sc-57004, ABD) kullanıldı. Lamalar karşı boyama için Sigma Aldrich marka (SLCC1848, ABD) Harris hematoksilen solüsyonunda inkube edildi ve Merck marka (1.07961, Almanya) entellan ile yapıştırıldı.

### **Hemakolor Boyama**

Hemakolor boyama için Merck marka kırmızı (1.11956.2500, Almanya) ve mavi (1.11957.2500, Almanya) reaktif boya kullanıldı.

### **2.1.8. Plastik Gereçler**

#### **Petri Tabakları**

Çalışma sırasında embriyolar Corning marka (TC-treated Culture Dish, 430167, ABD) 100 mm'lik steril petri tabaklarına konuldu.

### **Hücre Kültürü Tabakları**

Çalışmada embriyolardan alınan doku eksplantları TPP marka (Techno Plastic Products, 92006, İsviçre) 6 kuyucuklu hücre kültürü tabakları içerisine konuldu. İmmunositokimya ve hemakolor boyama için BD Falcon marka (Becton Dickinson and Company, Multiwell-24 Well Tissue Culture Plate, 353047, ABD) 24 kuyucuklu hücre kültürü tabağı kullanıldı.

### **Hücre Kültürü Flaskları**

Deneyleer boyunca TEF hücre kültürünün hazırlanması ve pasajlanması aşamalarında Corning marka (430372, ABD) 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskları ile BD Falcon marka (Becton Dickinson and Company, ABD) 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flaskları kullanıldı.

### **Filtrasyon Ünitesi**

İzole edilen hücrelerin beslenmesinde kullanılan medyumunun sterilizasyonu için Nalgene marka (158-0020, ABD) filtrasyon ünitesi kullanıldı.

### **Santrifüj Tüpleri**

Çalışmada santrifüj işlemleri sırasında, Corning marka (430766, ABD) 15 ml'lik steril santrifüj tüpleri kullanıldı. Deneyleer boyunca hücre kültüründe kullanılan medyumların ve solüsyonların ayrılmasında, TPP marka (91050, İsviçre) 50 ml'lik steril santrifüj tüpleri kullanıldı.

### **Pipetler**

Deneyleer boyunca Corning marka (Stripettor Plus, ABD) otomatik pipet, TPP marka (Techno Plastic Products, 94005, 94010, İsviçre) 5 ml ve 10 ml'lik steril pipetler ile

Thermo Scientific marka (Nunc Brand Products, 170357, ABD) 25 ml'lik steril pipet kullanıldı.

### **Hücre Kazıyıcı**

Tripsinizasyon aşamasında hücreler flaskların yüzeyinden tam ayrılmadığı için Corning marka (Cell scraper, 3010, ABD) hücre kazıyıcıları kullanılarak yüzeyden ayrılmaları sağlandı.

### **96 Kuyucuklu Tabak**

Çalışmada qPCR için Thermo Fisher Scientific marka (4346907, MicroAmp Fast Optical 96 Well Reaction Plate, 0,1 ml) 96 kuyucuklu tabaklar kullanıldı.

## **2.2. Metot**

### **2.2.1. Yumurtalarda Embriyo Kontrolü**

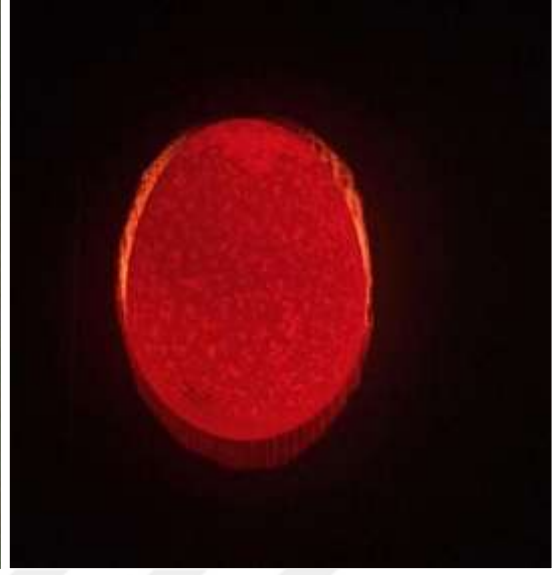
Çalışmada kullanılan yumurtaların 11. gün sonunda embriyo kontrolü yapıldı. Karanlık bir ortamda, içerisinde sarı ışık bulunan kutuda muayenesi yapılan dolu ve boş yumurtaların görüntüleri Resim 2.7. ve 2.8'de verilmiştir.

### **2.2.2. TESH'lerin İzolasyonu**

Brown Üniversitesi Kurumsal Hayvan Bakımı ve Kuş Embriyolarının Kullanım Komitesi Politikası'nda (Brown University, Institutional Animal Care and Use Committee Policy for Use of Avian Embryos) belirtildiği gibi 11. günden sonra embriyolar ağrıyı hissedebileceğinden dolayı çalışmada 11 günlük embriyolara ait TESH'ler izole edildi. Ötenazi için dekapitasyon yöntemi uygulandı (IACUC, 2016). İnkubasyon süresi bitiminde % 70'lik alkol ile dezenfekte edilen yumurtalar, hava kesesinin olduğu kısımdan açılarak embriyoya ulaşıldı. Embriyolar, 100 mm çapa sahip steril petri tabaklarına alındıktan sonra (Resim 2.9.), steril cerrahi aletler kullanılarak dekapite edildi.



**Resim 2.7:** İçerisinde 11 günlük embriyo bulunan döllü yumurta.

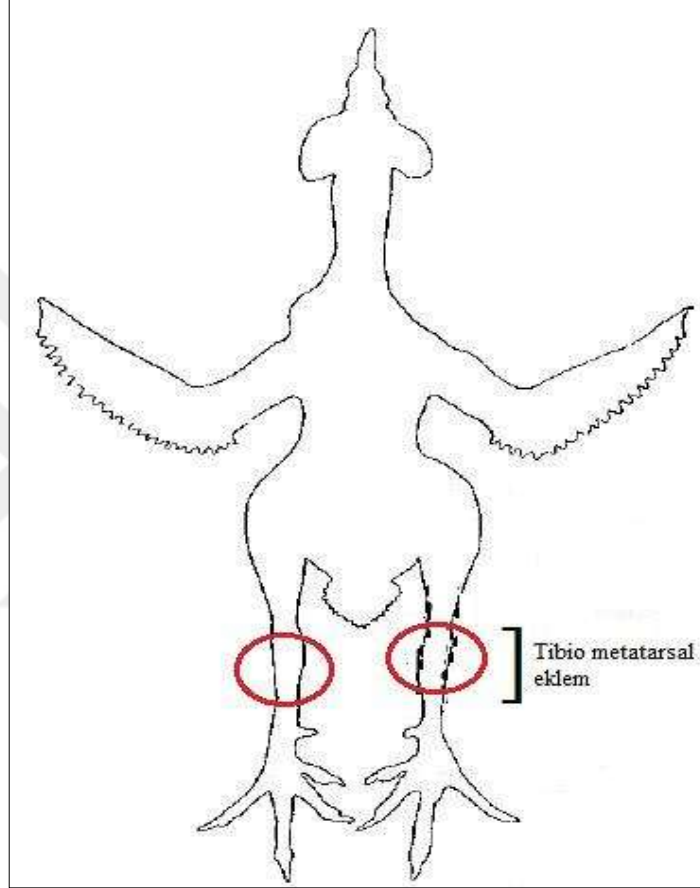


**Resim 2.8:** İçerisinde embriyo bulunmayan dölsüz yumurta.



**Resim 2.9:** Kahverengi yumurtacı tavuk ırkına ait 11 günlük embriyo.

Ötenazi sonrasında TESF'ler sağlıklı kahverengi yumurtacı tavuk embriyolarının tibio-metatarsal eklem bölgesinden izole edildi (Şekil 2.1.). Bu amaçla steril cerrahi makaslar yardımıyla eklem bölgesini de alacak şekilde 0,5 x 0,5 cm boyutlarında örnekler alınarak, içerisinde 2X penisilin-streptomisin içeren 50 ml DPBS bulunan steril petri tabaklarına aktarıldı.



**Şekil 2.1:** TESF'lerin izole edildiği tibio-metatarsal eklem bölgesinin şematize edilmiş görünümü, (Steentjes vd., 2002)'den modifiye edildi.

Biyogüvenlik kabini içerisinde, bölge derisi ve tüm yumuşak dokular disseke edildi. Sinoviyal membran, steril bistüri uçları ile yaklaşık 1 x 1 mm boyutlarında eksplantlara ayrıldı. Doku eksplantlarının, 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarının zeminlerine kolayca tutunmasını sağlamak için, steril bir bistüri ucu yardımı ile her bir kuyucuk zemininde çok derin olmayan çizikler oluşturularak, bir adet doku eksplantı yerleştirildi.

Ardından 6 kuyucuklu hücre kültürü tabakları 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda, 10 dk inkübe edilerek eksplantların zemine iyice tutunması sağlandı. Süre bitiminde her bir kuyucuk içerisine doku eksplantlarının üzerini kaplayacak miktarda FBS eklendi ve 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bir gece boyunca bekletildi (Freshney, 2010; Akkoc ve Kahraman, 2012). Daha sonra 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarındaki FBS, vakum pompası ve steril cam pastör pipetleri yardımıyla uzaklaştırıldı. Takiben eksplantların üzerine % 20 FBS ve 2X penisilin-streptomisin içeren 2 ml M199 medyumunu eklenerek 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48 s bekletildi (Freshney, 2010; Akkoc ve Kahraman, 2012). Gün aşırı hücrelerin genel morfolojisi ve büyümesi invert mikroskop ile düzenli olarak takip edildi.

### **2.2.3. Pasajlamalar**

Primer hücre kültüründe hücreler ekildikten 7 gün sonra, % 80 konfluense ulaştığında pasajlandı. Hücre kültürü tabaklarındaki besleme medyumunu, vakum pompası ve steril cam pastör pipetleri yardımıyla uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk, önceden 37 °C'ye ısıtılmış olan 5 ml DPBS ile 5 dk boyunca yıkandı. Daha sonra yıkama solüsyonu uzaklaştırılarak kuyucuklar içerisine, önceden 37 °C'ye ısıtılmış olan 0,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 37 °C'de 2 dk boyunca inkübe edildi. Süre sonunda invert mikroskop ile hücrelerin kültür tabakları tabanından tamamen kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Henüz kalkmamış olan hücreler için 1 dk daha beklendi. Ardından kuyucuklar içerisine 2X penisilin-streptomisin ve % 20 FBS içeren 2 ml M199 medyumundan eklenerek tripsin aktivitesi durduruldu. Elde edilen hücre süspansiyonu 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara aktarıldı. Takiben üzerine 3 ml daha M199 eklenen flasklar, 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre yerleştirildi (Freshney, 2010).

Düzenli aralıklarla beslenen hücreler invert mikroskop altında değerlendirildi. Hücreler 12. günde % 80 konfluense ulaştığında, 2. pasajlama yapıldı. Flasklar içerisine 0,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2 dk boyunca inkübe edildi. Süre sonunda flasklar içerisine 2X penisilin-streptomisin ve % 20 FBS içeren 5 ml M199 ilave edildi. İntert mikroskop ile

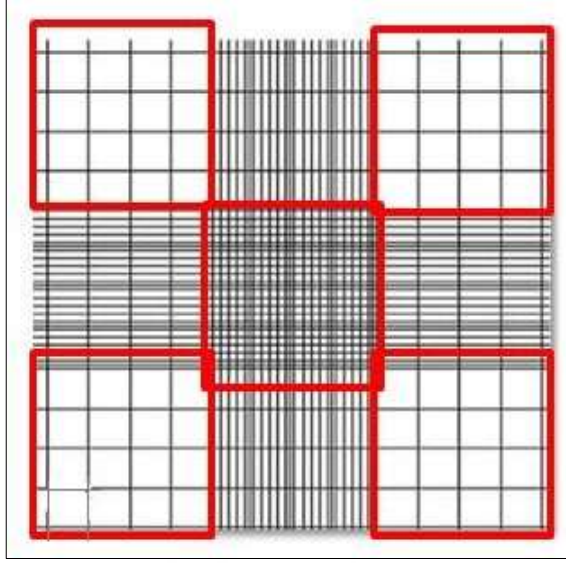
incelenen hücreler, flaskların yüzeyinden tam ayrılmadığı için, hücre kazıyıcıları kullanılarak yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Daha sonra, elde edilen hücre süspansiyonu 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara aktarıldı ve üzerine 10 ml daha M199 eklenerek 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre yerleştirildi. Hücreler % 80 konfluense ulaştığında hücre süspansiyonu 2 adet 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara aktarılarak ekildi (Freshney, 2010).

#### 2.2.4. Hücre Sayımı

Tripsinizasyondan sonra, hücre süspansiyonu 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne konuldu ve oda sıcaklığında 3000 rpmde 1 dk boyunca santrifüjlendi. Elde edilen pelet, 9 ml kültür medyumu ile yeniden süspansiyon edilerek, 10 ml'lik hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak bir Eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine aynı miktarda tripan mavisi eklenerek karıştırıldı (Freshney, 2010). Önceden temizlenen lamel ıslatılarak hemositometreye yerleştirildi. Otomatik pipet yardımı ile hücre süspansiyonundan lam ve lamel arasında yükleme yapıldı (Resim 2.10.). Hücre sayımında tripan mavisi üretici firmanın talimatında belirtildiği gibi, hemositometrede 1 mm<sup>2</sup>'lik 4 adet dış kare ve ortadaki 1 adet merkez karesi üzerindeki canlı hücreler sayıldı (Şekil 2.2.).



**Resim 2.10:** Hücre sayımında kullanılan hemositometre.

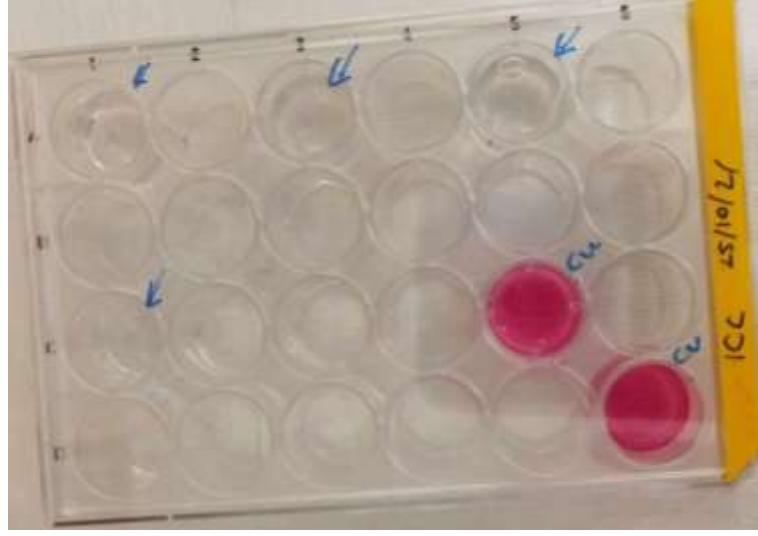


**Şekil 2.2:** Hemositometrede canlı hücrelerin sayıldığı karelerin şematize edilmiş görünümü.

### 2.2.5. Hücrelerin Karakterizasyonu

Hücrelerin karakterizasyonu için, invert mikroskop altında hücrelerin morfolojisi incelendi. Elde edilen hücreler, 8. pasajlama sırasında, morfolojik değerlendirme amacıyla Hemakolor ile boyandı. Ayrıca hücreler monoklonal anti-vimentin ve anti-sitokeratin antikoları kullanılarak immunositokimyasal olarak boyandı. Bu amaçla, 24 kuyucuklu hücre kültürü tabakları içerisine yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine, hücre süspansiyonundan 100  $\mu$ l ( $98 \times 10^3$  hücre) eklendi ve 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 1 gece boyunca bekletildi.

Hücreler % 80 konfluense ulaştıktan sonra boyamalar yapıldı. Ek olarak, 24 kuyucuklu hücre kültürü tabakları içerisine, hücre süspansiyonundan 100  $\mu$ l eklenerek, alınan doku örneklerinde makrofajların bulunmadığını göstermek amacıyla karbon fagositoz testi yapıldı (Resim 2.11.).



**Resim 2.11:** İmmunositokimya, hemakolor boyama ve karbon fagositoz testinin gerçekleştirildiği 24 kuyucuklu hücre kültür tabağı.

#### 2.2.5.1. İmmunositokimyasal Boyama

Hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü tabakları içerisinde bulunan lameller üzerine ekilerek, ticari olarak satın alınan bir kit ile immunositokimyasal olarak boyandı. Kuyucuklar PBS ile 5 dk yıkandıktan sonra hücreler üzerine 0,5 ml kadar soğutulmuş (-20 °C) metanol eklendi ve hücrelerin tespit olması için 5 dk beklendi. Ardından kuyucuklar içerisindeki metanol boşaltılarak kuyucuklar PBS ile iki kez 5 dk yıkandı. Takiben 10 dk boyunca protein bloklama solüsyonu oda ısısında uygulandı. Bu aşamadan sonra, kuyucuklara lamellerin üzeri kapanacak kadar anti-vimentin ve anti-sitokeratin primer antikoları eklendi ve tabaklar 1 s oda ısısında inkübe edildi. Takiben hücreler iki kez 5 dk PBS ile yıkandı ve ardından sekonder antikor ile oda ısısında 30 dk inkübe edildi. Daha sonra üç kez 5 dk PBS ile yıkanan lameller üzerine kromojen olarak 3,3 diaminobenzidin (DAB) (40 µl DAB kromojen solüsyonu + 2 ml DAB substrat solüsyonu) eklenerek 2 dk muamele edildi. Takiben DAB uzaklaştırıldıktan sonra, Harris hematoksilen ile 1 dk karşıt boyama yapıldı ve lameller kuyucuklar içerisinde çıkarılıp, entellan ile yapıştırıldı.

### **2.2.5.2. Hemakolor Boyama**

Yirmi dört kuyucuklu hücre kültürü tabakları içerisinde bulunan lameller üzerine ekilen hücreler PBS ile 5 dk yıkandı. Ardından hücreler üzerine yaklaşık 0,5 ml kadar soğutulmuş (-20 °C) metanol eklendi ve hücreler 5 dk boyunca tespit edildi. Daha sonra kuyucuklar içerisindeki metanol boşaltılarak, hücreler PBS ile iki kez 5 dk yıkandı. Takiben sırasıyla beş kez 1 dk reaktif kırmızı ve sonra beş kez 1 dk reaktif mavi ile boyandı. Lameller kuyucuklar içerisinde çıkarılıp entellan ile yapıştırıldı.

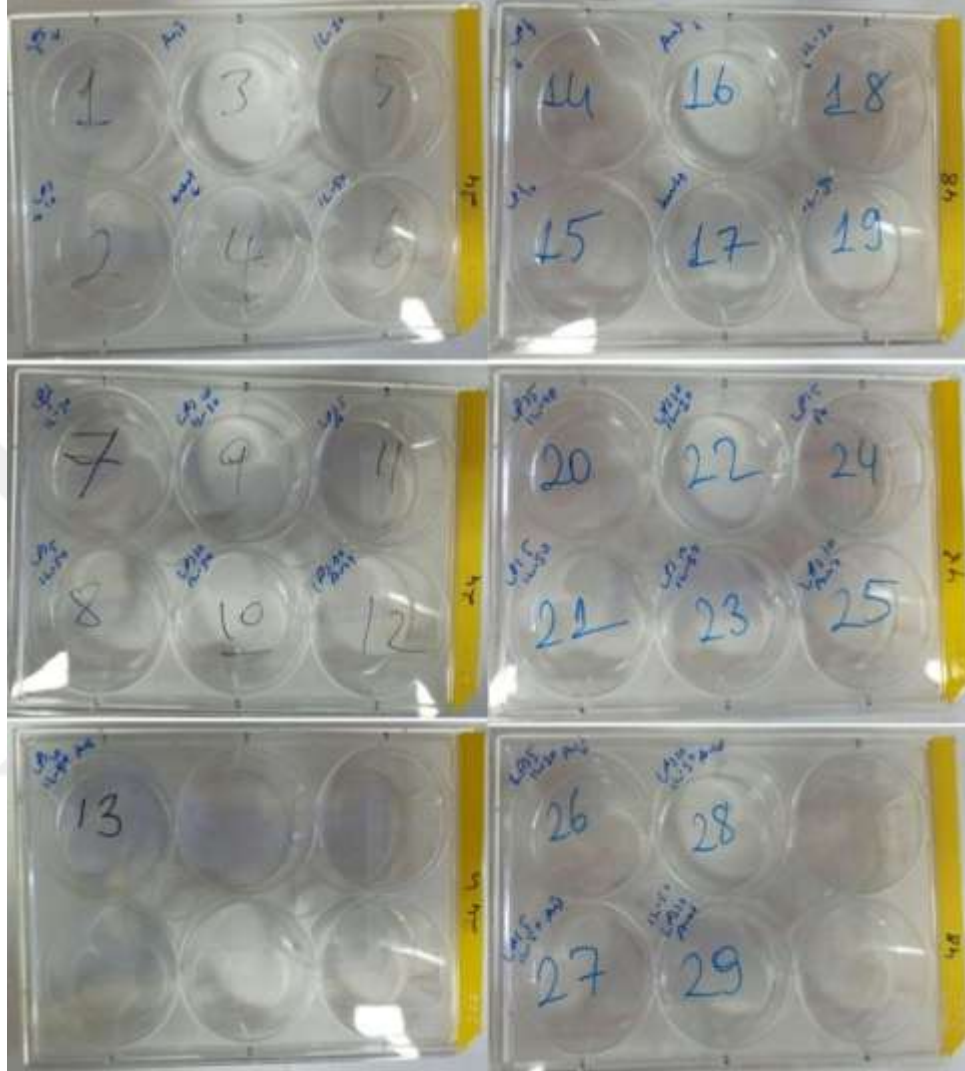
### **2.2.5.3. Karbon Fagositoz Testi**

Kültüre edilmiş TESHF'lerin fagositik kapasitesi ve makrofaj hücreleri ile kontamine olup olmadığı, karbon fagositoz testi ile değerlendirildi (Upragarin vd., 2005b). Bir gece boyunca 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilen 24 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarında üreyen hücrelerin üzerlerine 50 µg/ml karbon tozu süspansiyonu eklendi ve tabaklar etüvde 40 °C'de 30 dk boyunca inkübe edildi. Süre sonunda beş kez 1 dk PBS ile yıkanan hücre kültürü tabakları, invert mikroskop altında incelendi. Çalışmamızda tavuk makrofaj hücreleri izole edilmediği için pozitif kontrol olarak, başka bir çalışmanın kontrol grubunda bulunan rata ait peritoneal makrofaj hücreleri kullanıldı. Ratin abdomen bölgesine 10 ml PBS enjekte edildikten sonra peritoneal makrofaj hücreleri toplandı ve aynı işlemler uygulanarak karbon fagositoz testi yapıldı.

### **2.2.6. Deneylerin Yapılışı**

Kahverengi yumurtacı tavuklara ait 11 günlük embriyoların, tibio-metatarsal eklem bölgesindeki dokulardan, eksplant hücre kültürü yöntemi ile üretilen primer sinoviyal fibroblastlar, 8. pasajdan sonra deneylerde kullanıldı. Deneyden bir gün önce flasklarda her 1 ml'de son hücre sayısı  $98 \times 10^4$  olarak tespit edildi. İzole edilen hücreler 6 kuyucuklu hücre tabaklarına ekildi (Resim 2.12). Takiben 37 °C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bir gece bekletildi. Deney gününde, önceden üzerlerine

deney grupları yazılmış olan 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarına ekilen hücrelere sırasıyla solüsyonlar uygulandı.



**Resim 2.12:** Deney gruplarının bulunduğu 6 kuyucuklu hücre kültürü tabakları.

Deneyler temelde 7 grup olacak şekilde tasarlandı. Bu gruplar doza ve süreye bağlı olarak alt gruplara ayrıldı (Çizelge 2.3.). Tavuk embriyonik sinoviyal fibroblast hücreleri üzerinde SAA indükleyicisi olarak bilinen LPS grubu pozitif kontrol olarak kullanılırken, hiçbir uygulama yapılmayan TESH'ler ise negatif kontrol grubu olarak belirlendi.

**Çizelge 2.3:** Deney gruplarına uygulanan indükleyici maddeler ve dozları.

<b>Gruplar</b>	<b>İndükleyici Maddeler-24 s</b>	<b>İndükleyici Maddeler-48 s</b>
Negatif Kontrol	-	-
LPS (Pozitif kontrol)	LPS (5µg/ml) LPS (10µg/ml)	LPS (5µg/ml) LPS (10µg/ml)
A vitamini	A vitamini (7µg/ml)	A vitamini (7µg/ml)
Sitokin	IL-1β (30ng/ml) IL-1β (50ng/ml)	IL-1β (30ng/ml) IL-1β (50ng/ml)
LPS + sitokin	LPS (5µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) LPS (5µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) LPS (10µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml)	LPS (5µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) LPS (5µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) LPS (10µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml)
LPS + A vitamini	LPS (5µg/ml) + A vitamini (7µg/ml) LPS (10µg/ml) + A vitamini (7µg/ml)	LPS (5µg/ml) + A vitamini (7µg/ml) LPS (10µg/ml) + A vitamini (7µg/ml)
Kombine	- - - LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)	LPS (5µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) + A vitamini (7µg/ml) LPS (5µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) + A vitamini (7µg/ml) LPS (10µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) + A vitamini (7µg/ml) LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)

Deney grupları oluşturulurken alt grupların belirlenmesinde 24 saatlik kombine grupta yalnızca bir adet alt grup oluşturulabildi. Bunun sebebi, ELISA analizinde kullanılan 96 kuyucuklu tabakta yeterli alan bulunmaması ve çalışma bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle ikinci bir kitin alınamamasıydı.

### **2.2.7. qPCR**

Deney gruplarındaki SAA mRNA ekspresyonu, 24 s ve 48 s sonunda qPCR tekniği ile ölçüldü.

#### **2.2.7.1. RNA Ekstraksiyonu ve Kantitasyonu**

İzolasyon kitinde bulunan lizis solüsyonu içerisine 20 µl merkaptoetanol, yıkama solüsyonu-I içerisine 50 ml etanol (% 100) ve yıkama solüsyonu-II içerisine 170 ml etanol (% 100) eklenerek hazırlık aşaması tamamlandı.

Deney gruplarının bulunduğu 6 kuyucuklu hücre kültürü tabaklarındaki medyumlar, vakum pompası ve steril cam pastör pipetleri yardımıyla toplandı. Hücreler DPBS ile 5 dk boyunca yıkandı. Daha sonra hücre kültürü tabaklarının her bir kuyucuğuna 600 µl lizis solüsyonu eklendi ve hücreler pipetlenerek tamamen lize edildi. Lizat üzerine 360 µl etanol eklenerek birkaç kez pipetlendi. Ardından lizat + etanol karışımı kit içerisinde bulunan izolasyon kolonlarına ilk aşamada 500 µl ve 2. aşamada 460 µl olacak şekilde yüklenerek, 12.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlendi.

Toplama haznesindeki filtrat döküldü ve kolona 700 µl yıkama solüsyonu-I eklenerek, 12.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlendi. Ardından filtrat döküldü ve kolona 600 µl yıkama solüsyonu-II eklenerek, 12.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlendi. Daha sonra filtrat uzaklaştırıldıktan sonra tekrar 250 µl yıkama solüsyonu-II eklenerek 12.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlendi. Bu aşamadan sonra filtrat atıldı ve kolon yeni bir santrifüj tüpü içerisine yerleştirildi. Kolona 40 µl nükleaz içermeyen su eklenerek, 14.000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlenerek RNA

toplandı. Toplam RNA miktarı ve saflığı nanodrop Epoch cihazında spektrofotometrik olarak 250 nm dalga boyunda belirlendi. Elde edilen RNA örnekleri analizin yapılacağı güne kadar -80 °C’de saklandı.

### **2.2.7.2. cDNA sentezi**

İzole edilen RNA örneklerinden RT yöntemiyle cDNA sentezi sağlandı. Başlangıçta her bir örnek için tüplere cDNA sentez kiti içerisinde bulunan 3,2 µl nükleaz içermeyen su + 0,8 µl dNTP + 2 µl RT buffer + 2 µl RT primer + 1 µl RNaz inhibitörü + 1 µl reverse transkriptaz enzimi içeren reaksiyon miksi eklenerek iyice pipetlendi.

Önceden hesaplanan su miktarları izole edilen RNA örnekleri üzerine eklendi ve iyice pipetlendi. Daha sonra her bir tüpe 10 µl reaksiyon miksi + 10 µl RNA örnek karışımı eklendi. Örnekler, PCR termal döngü cihazında 25 °C’de 10 dk, 37 °C’de 120 dk, 85 °C’de 5 dk boyunca inkübe edildi. İzole edilen RNA örneklerinin ortalama değerleri Çizelge 2.4. ve 2.5.’de verilmiştir.

### **2.2.7.3. qPCR Analizi**

Amplifikasyon için TaqMan ekspresyon kiti kullanıldı. Başlangıçta her bir örnek için tüplere 5 µl master miks solüsyonu + 0,5 µl TaqMan probu + 3,5 µl nükleaz içermeyen su eklenerek reaksiyon miksi hazırlandı. Ardından, 96 kuyucuklu tabaklara 1:10 oranında dilüe edilen 1 µl cDNA + 9 µl reaksiyon miksi triplike olarak eklendi.

Analiz, üretici firmanın önerdiği protokole göre yapıldı ve 50 °C’de 2 dk, 95 °C’de 10 dk, 95 °C’de 15 sn, 60 °C’de 1 dk olarak 40 kez tekrar edecek şekilde ayarlandı.

**Çizelge 2.4:** Deney gruplarında (24 s) izole edilen RNA ortalama değerleri ile her bir cDNA reaksiyon miksi için eklenen örnek ve su miktarı.

<b>Deney Grupları 24 s</b>	<b>Ortalama Değer (ng/µl)</b>	<b>Örnek ve Su Miktarı</b>
Kontrol	48,24	5,1 µl örnek + 4,9 µl su
LPS (5µg/ml)	64,07	3,9 µl örnek + 6,1 µl su
LPS (10µg/ml)	36,69	6,8 µl örnek + 3,2 µl su
A vitamini (7µg/ml)	61,29	4 µl örnek + 6 µl su
IL-1β (30ng/ml)	51,92	4,8 µl örnek + 5,2 µl su
IL-1β (50ng/ml)	42,50	5,8 µl örnek + 4,2 µl su
LPS (5µg/ml) + IL-1β (30ng/ml)	55,56	4,5 µl örnek + 5,5 µl su
LPS (5µg/ml) + IL-1β (50ng/ml)	72,71	3,4 µl örnek + 6,6 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (30ng/ml)	67,85	3,6 µl örnek + 6,4 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml)	68,82	3,6 µl örnek + 6,4 µl su
LPS (5µg/ml) + A vitamini (7µg/ml)	53,98	4,6 µl örnek + 5,4 µl su
LPS (10µg/ml) + A vitamini (7µg/ml)	55,38	4,5 µl örnek + 5,5 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)	49,30	5 µl örnek + 5 µl su

mRNA ekspresyon düzeyindeki değişim, Ct değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoduna göre hesaplandı ve internal kontrol geni olarak GAPDH kullanıldı. 96 kuyucuklu tabaklara eklenen 24 s ve 48 s deney gruplarının şematize edilmiş görünümü Şekil 2.3’de verilmiştir.

**Çizelge 2.5:** Deney gruplarında (48 s) izole edilen RNA ortalama değerleri ile her bir cDNA reaksiyon miksi için eklenen örnek ve su miktarı.

<b>Deney Grupları 48s</b>	<b>Ortalama Değer (ng/ µl)</b>	<b>Örnek ve Su Miktarı</b>
Kontrol	74,45	3,3 µl örnek + 6,7 µl su
LPS (5µg/ml)	84,06	2,9 µl örnek + 7,1 µl su
LPS (10µg/ml)	108,90	2,3 µl örnek + 7,7 µl su
A vitamini (7µg/ml)	78,54	3,1 µl örnek + 6,9 µl su
IL-1β (30ng/ml)	53,98	4,6 µl örnek + 5,4 µl su
IL-1β (50ng/ml)	77,07	3,2 µl örnek + 6,8 µl su
LPS (5µg/ml) + IL-1β (30ng/ml)	60,44	4,1 µl örnek + 5,9 µl su
LPS (5µg/ml) + IL-1β (50ng/ml)	78,18	3,2 µl örnek + 6,8 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (30ng/ml)	66,83	3,7 µl örnek + 6,3 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml)	72,56	3,4 µl örnek + 6,6 µl su
LPS (5µg/ml) + A vitamini (7µg/ml)	75,78	3,3 µl örnek + 6,7 µl su
LPS (10µg/ml) + A vitamini (7µg/ml)	70,47	3,5 µl örnek + 6,5 µl su
LPS (5µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)	67,41	3,7 µl örnek + 6,3 µl su
LPS (5µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)	81,68	3 µl örnek + 7 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (30ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)	78,29	3,2 µl örnek + 6,8 µl su
LPS (10µg/ml) + IL-1β (50ng/ml) + A vitamini (7µg/ml)	81,68	3,5 µl örnek + 6,5 µl su

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LPS 5	LPS 5	LPS 5	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5	LPS 5	LPS 5	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50
B	LPS 10	LPS 10	LPS 10	LPS 5 A vit	LPS 5 A vit	LPS 5 A vit	LPS 10	LPS 10	LPS 10	LPS 5 A vit	LPS 5 A vit	LPS 5 A vit
C	IL-1 $\beta$ 30	IL-1 $\beta$ 30	IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 A vit	LPS 10 A vit	LPS 10 A vit	IL-1 $\beta$ 30	IL-1 $\beta$ 30	IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 A vit	LPS 10 A vit	LPS 10 A vit
D	IL-1 $\beta$ 50	IL-1 $\beta$ 50	IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	IL-1 $\beta$ 50	IL-1 $\beta$ 50	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30 A vit
E	A vit	A vit	A vit	Kontrol	Kontrol	Kontrol	A vit	A vit	A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50 A vit
F	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30				LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30 A vit
G	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50				LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit
H	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30				LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	Kontrol	Kontrol	Kontrol
	24s	24s	24s	24s	24s	24s	48s	48s	48s	48s	48s	48s

**Şekil 2.3:** qPCR analizinin gerçekleştirildiği 96 kuyucuklu tabağın şematize edilmiş görünümü.

## 2.2.8. ELISA

Deney gruplarının 24 s ve 48 s sonunda kültür medyumlarındaki SAA protein düzeyinin ölçümü, ticari olarak satın alınan ELISA kiti kullanılarak, üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi.

### 2.2.8.1. Örneklerin Hazırlanması

Hücre kültürü tabaklarındaki medyumlar 24 s ve 48 s sonunda otomatik pipet ile steril pipet uçları kullanılarak, önceden üzeri etiketlenmiş olan Eppendorf tüpleri içerisine konuldu. Testin yapılacağı zamana kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

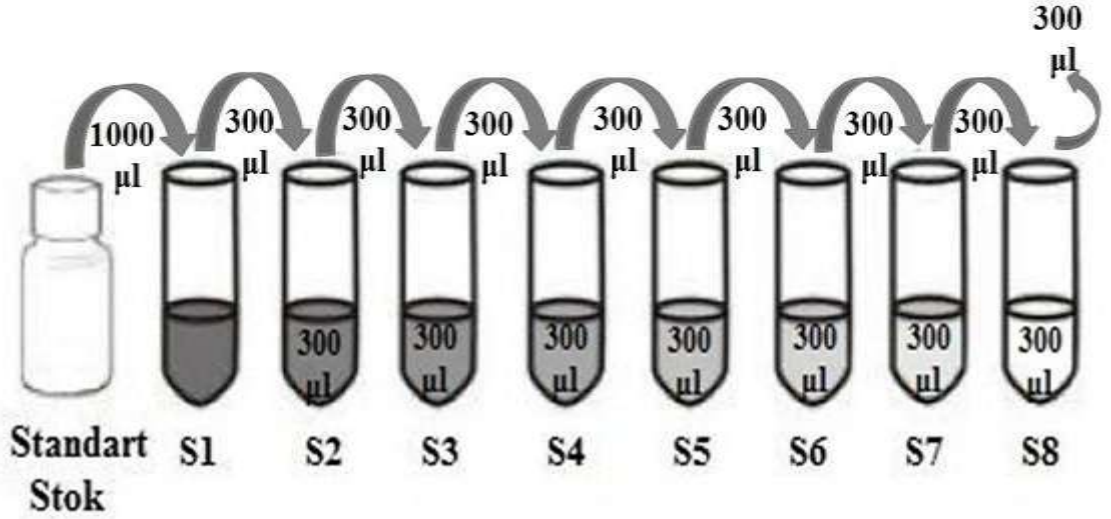
### **2.2.8.2. Test Solüsyonlarının ve Standart Kuyucuklarının Hazırlanması**

Test hazırlık aşamasında kit içerisinde bulunan solüsyonlar ve standartlar hazırlandı. 30 ml yıkama solüsyonu üzerine 720 ml distile su eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. Biotin ile işaretli antikor, 1:100 oranında antikor sulandırıcı ile sulandırıldı. Aynı şekilde HRP-streptavidin konjugatı, HRP sulandırıcı ile 1:100 oranında sulandırıldı. Standart stok solüsyonun hazırlanması için liyofilize halde bulunan standart tüpünün içerisine 1000 µl örnek sulandırıcı eklendi.

Standart solüsyonların hazırlanmasında Eppendorf tüpleri birden sekize kadar (S1-S8) numaralandırıldı. S1 tüpü içerisine 1000 µl standart stok solüsyonu (10 ng/ml) eklendi. S2-S8 tüplerinin her birinin içerisine, 300 µl örnek sulandırıcı eklendi. Ardından mikropipet ile S1 tüpünden alınan 300 µl standart stok solüsyonu, S2 tüpüne aktarılarak pipetlendi. Aynı şekilde S2 tüpü içerisinden alınan 300 µl solüsyon S3 tüpüne aktarılarak pipetlendi ve bu işlem S8 tüpüne kadar devam etti. Daha sonra S8 tüpü içerisinden 300 µl solüsyon uzaklaştırıldı. Bu şekilde standart stok solüsyonun 2 kat seri dilüsyonu hazırlandı. Standart stok solüsyonunun hazırlanma aşamasının şematize edilmiş görünümü Şekil 2.4'de verilmiştir.

### **2.2.8.3. Test Prosedürü**

1. 96 kuyucuklu tabak iki kez 1 dk yıkama solüsyonu ile yıkandı ve kurutma kağıdı üzerine hafifçe vurularak kuyucuklar içerisindeki fazla solüsyon uzaklaştırıldı.
2. Her bir standart kuyucuğun içerisine, Eppendorf tüplerindeki standart solüsyonlardan (S1-S8) 100 µl eklendi. Ardından test kuyucukları içerisine kültür medyumundan elde edilen örneklerden 100 µl triplike olarak eklendi (Şekil 2.5.). Daha sonra 96 kuyucuklu tabağın üzeri koruyucu film ile kapatılarak 37 °C'lik etüvde 90 dk boyunca inkube edildi. Süre bitiminde kuyucuklar iki kez 1dk yıkama solüsyonu ile yıkandı.



Şekil 2.4: Standart stok solüsyonunun hazırlanma aşamasının şematize edilmiş görünümü.

3. Her bir kuyucuk içerisine 100 µl biotin ile işaretli antikor eklendi ve tabak 37 °C'lik etüvde 60 dk boyunca inkube edildi. Takiben kuyucuklar üç kez 1 dk yıkama solüsyonu ile yıkandı.

4. Kuyucuklar içerisine 100 µl HRP-streptavidin konjugatı eklendi ve 37 °C'lik etüvde 30 dk boyunca inkube edildi. Süre bitiminde beş kez 1dk yıkama solüsyonu ile yıkandı.

5. Her kuyucuk içerisine 90 µl TMB substratı eklendi ve 37 °C'de karanlık bir ortamda 30 dk boyunca inkube edildi. Ardından yıkama yapılmaksızın her bir kuyucuk içerisine 50 µl reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi ve kuyucuklar içerisindeki sıvının sarı renk aldığı gözlemlendi.

6. 96 kuyucuklu tabak da her bir kuyucuğun sahip olduğu absorbands değeri ELISA mikropılaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	Kontrol	LPS 10	A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 A vit	Kontrol	LPS 10	A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50 A vit
B	S2	Kontrol	IL-1 $\beta$ 30	A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 A vit	Kontrol	IL-1 $\beta$ 30	A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50 A vit
C	S3	Kontrol	IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 A vit	Kontrol	IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30 A vit
D	S4	LPS 5	IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 A vit	LPS 5	IL-1 $\beta$ 30	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30 A vit
E	S5	LPS 5	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 5	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 30 A vit
F	S6	LPS 5	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 5	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit
G	S7	LPS 10	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 10	IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 30 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit
H	S8	LPS 10	A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 A vit		LPS 10	A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50	LPS 5 A vit	LPS 5 IL-1 $\beta$ 50 A vit	LPS 10 IL-1 $\beta$ 50 A vit
		24 s	24 s	24 s	24 s	24 s	48 s	48 s	48 s	48 s	48 s	48 s

Şekil 2.5: ELISA ile SAA ölçümünün gerçekleştirildiği 96 kuyucuklu tabağın şematize edilmiş görünümü.

#### 2.2.8.4. SAA Miktarının Hesaplanması

Tabağın her bir kuyucuğunda okunan absorbands değerleri, Microsoft Excel programına aktarılarak, örnek ve standartların kuyucuklarında okunan absorbands değerlerinden, boş kuyucukta ölçülen absorbands değeri çıkarıldı. Standartların bulunduğu kuyucuklarda okunan absorbands değerleri ile çizgisel bir grafik oluşturularak, grafik ile ilişkili eğilim çizgisi denklemi ve  $R^2$  değeri hesaplandı (Şekil 2.6.). Eğilim çizgisi denklemi kullanılarak, tüm kuyucuklarda okunan absorbands değerlerinin normalizasyonu gerçekleştirildi ve standart kuyucuklarda okunan absorbands değerlerine karşılık gelen SAA miktarı hesaplandı.

### 2.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

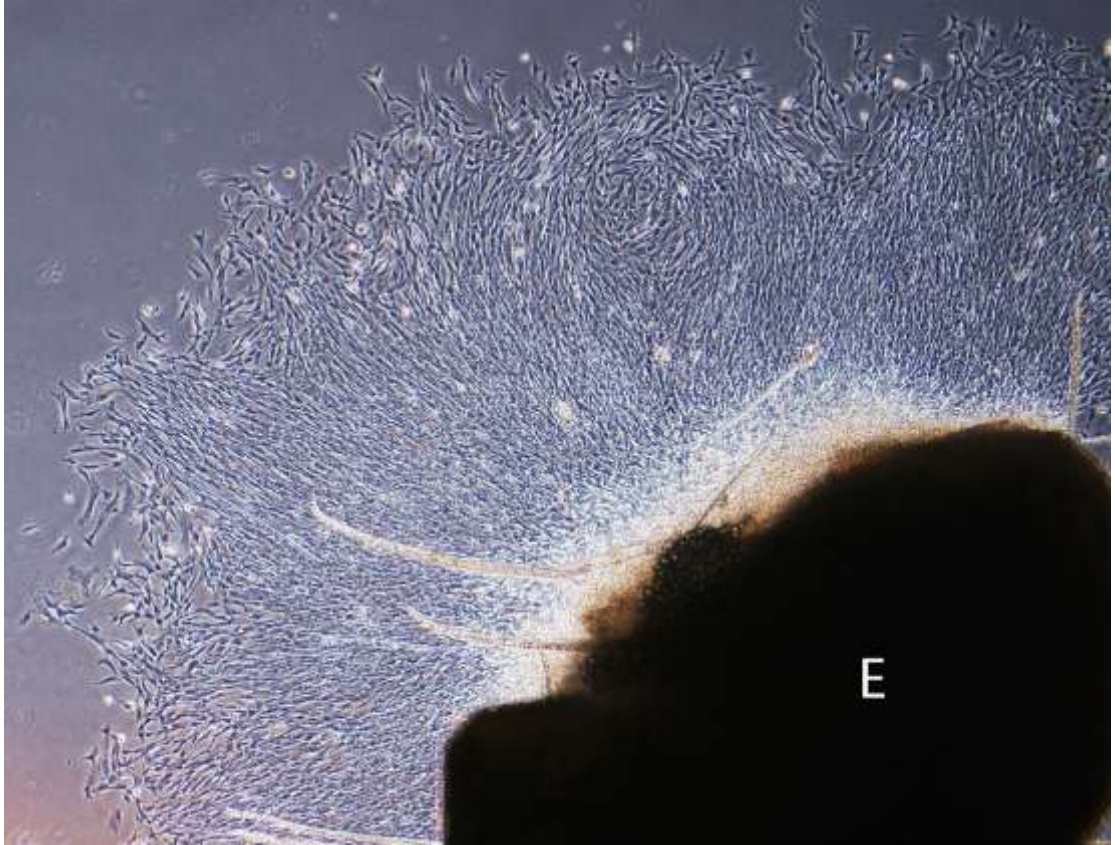
Çalışmada, TESH'lerdeki SAA mRNA ekspresyon seviyeleri ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri) verilerini analiz etmek için, tek yönlü varyans analizi ANOVA kullanıldı. Farklı olan grupların belirlenmesinde ve kontrol grubu ile diğer deney gruplarının çoklu karşılaştırması için Post Hoc Multiple Comparisons Dunnet testi yapıldı. İstatistiki değerlerin saptanmasında SPSS 20.0 for Windows (Release 20.0, Copyright SPSS Inc, The Apache Software Foundation, 1989-2004) programı kullanıldı. Serum amiloid A mRNA ekspresyon değerleri ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde gösterildi.



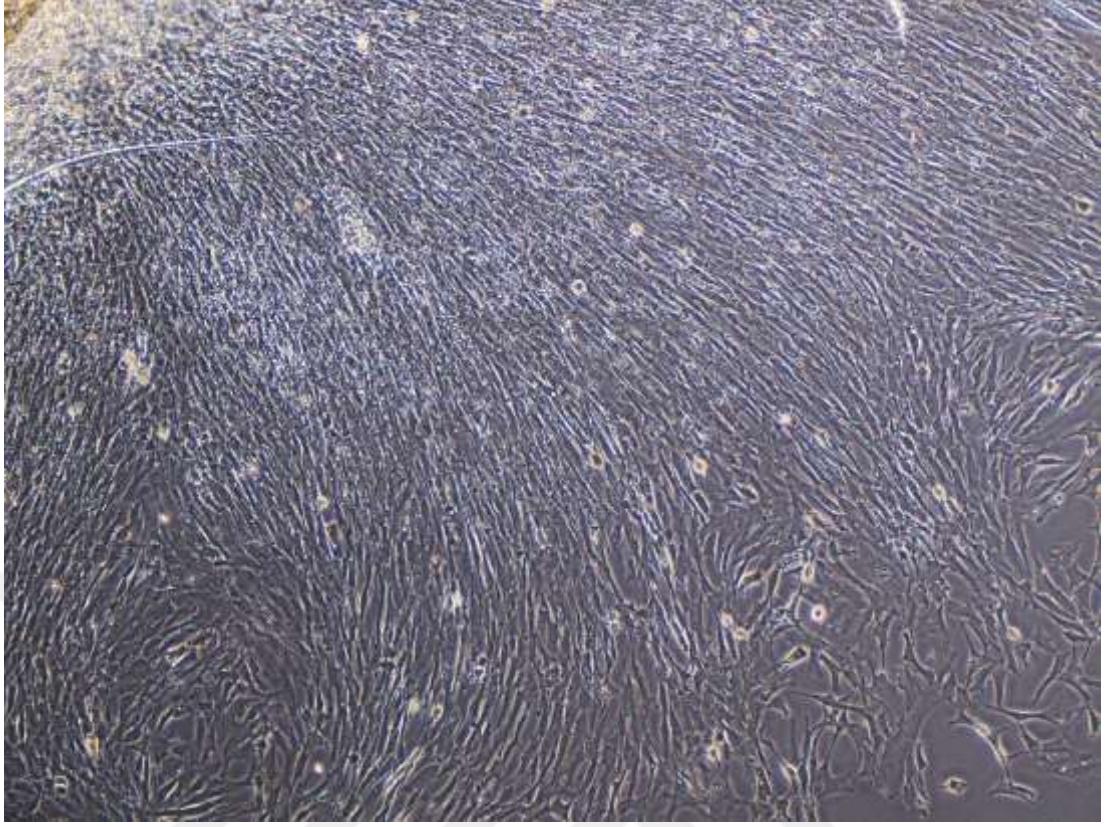
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hücre Kültürü Bulguları

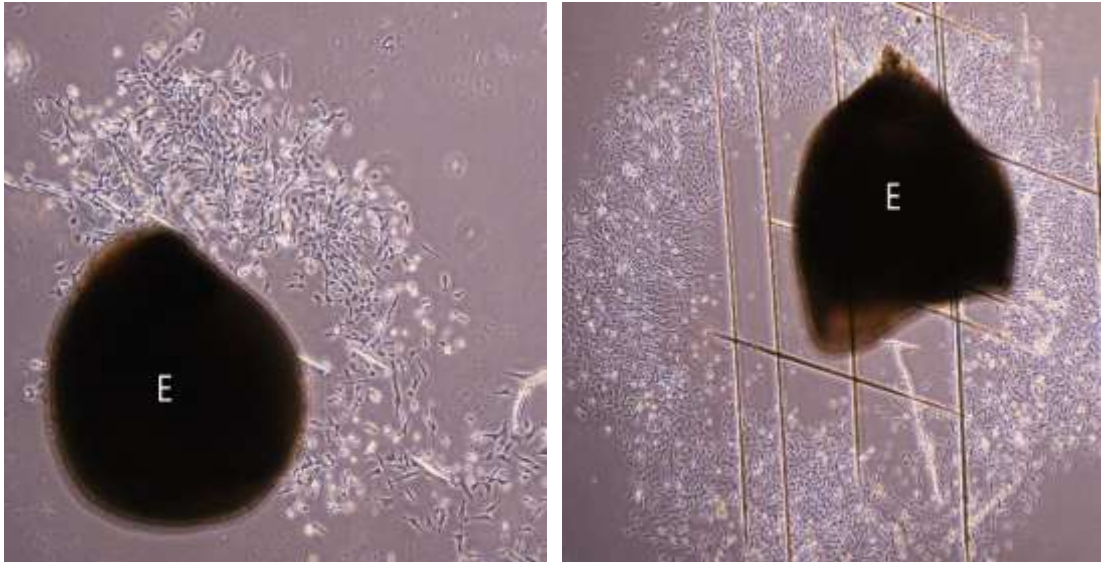
Hücre kültürü tabaklarının her bir kuyucuğuna bir adet olacak şekilde yerleştirilen doku eksplantlarında ilk üremenin hücrelerin ekiminden sonraki 3. günden itibaren başladığı gözlemlendi (Resim 3.1.-3.3.). İğ şekilli hücrelerin, doku eksplantları etrafından dışarı doğru üremeye başladığı tespit edildi. Daha sonraki günlerde hücrelerin proliferasyonunun hızla devam ettiği ve kültür tabağı kuyucuklarının tabanını doldurduğu gözlemlendi (Resim 3.4., 3.5.).



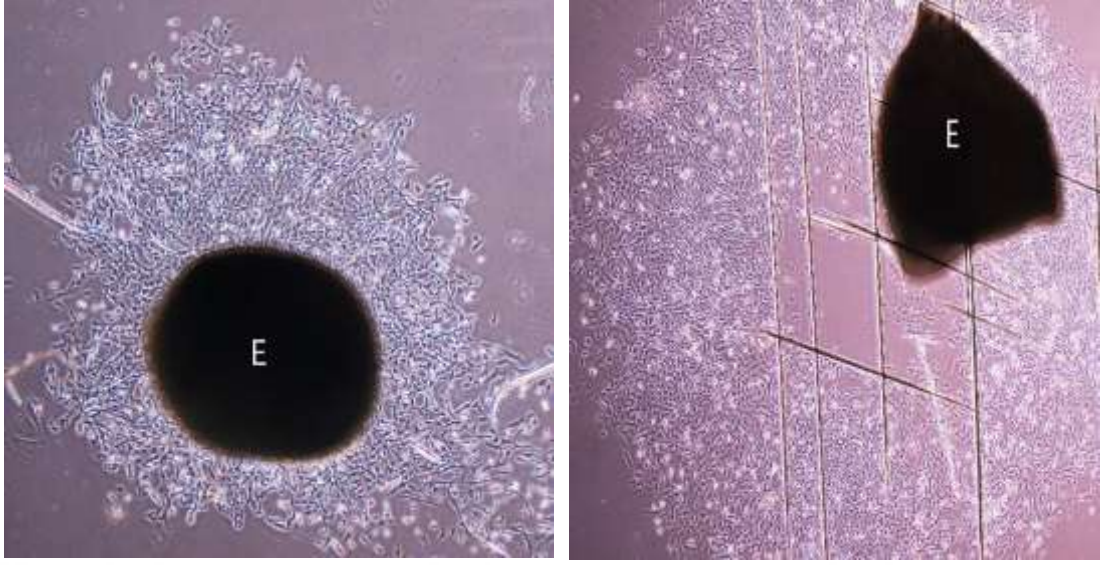
**Resim 3.1:** Tibio-metatarsal eklem bölgesi sinoviyal doku eksplantından (E) ilk hücre çıkışları, 3. gün, invert mikroskop görüntüsü.



**Resim 3.2:** TESCO hücreleri, 3.gün, invert mikroskop görüntüsü.



**Resim 3.3:** Sinoviyal doku eksplantından (E) ilk hücre  kikiflari, 3. gün, invert mikroskop görüntüsü.

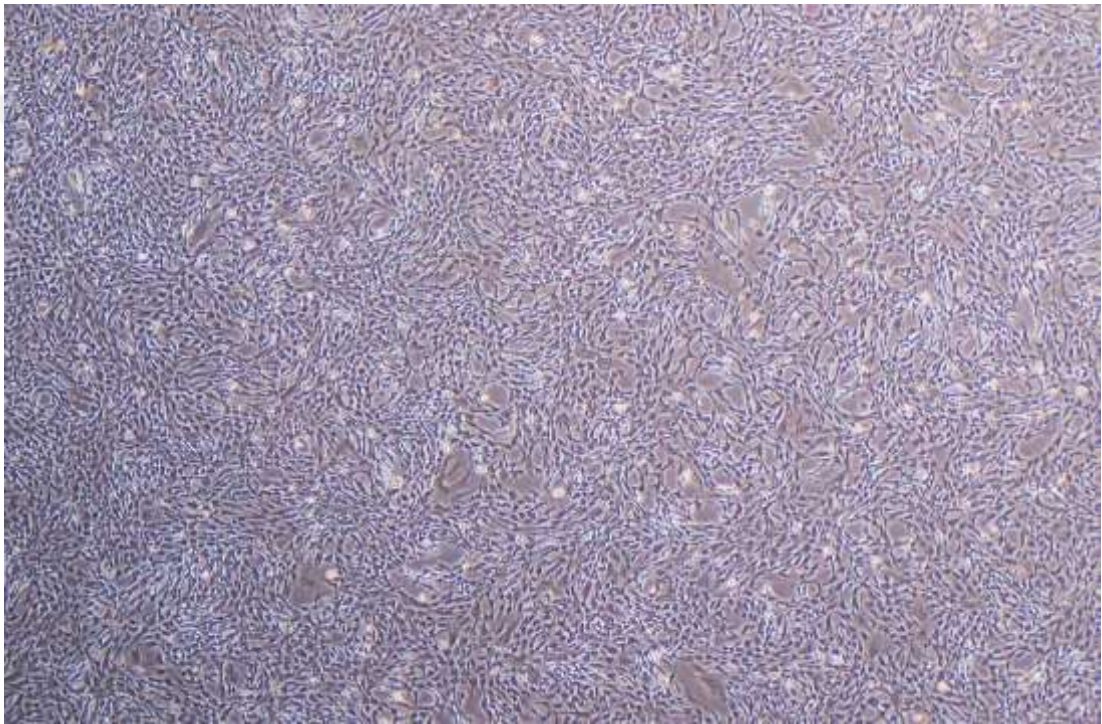


**Resim 3.4:** Sinoviyal doku eksplantından (E) dışarı doğru hücre çıkışları, 4.gün, invert mikroskop görüntüsü.



**Resim 3.5:** Sinoviyal doku eksplantından (E) dışarı doğru hücre çıkışları, 5.gün, invert mikroskop görüntüsü.

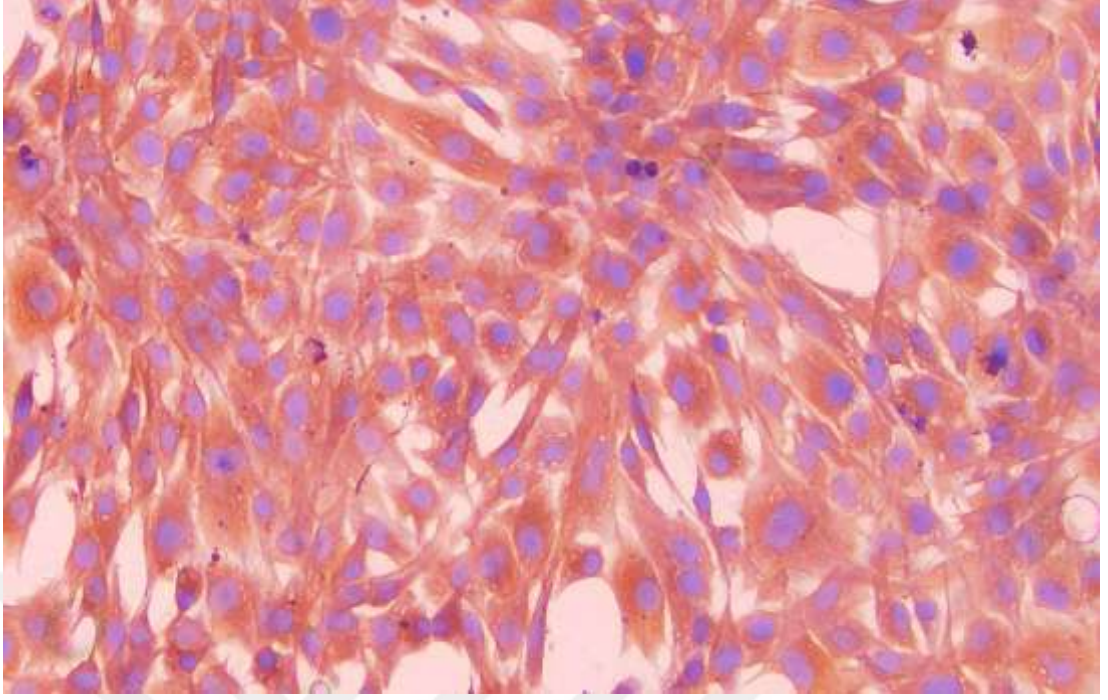
Tripsinizasyon ile doku eksplantlarından elde edilen hücreler, 1. pasaj için, ekimden sonraki 7. günde 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara aktarıldı. Daha sonraki pasajlarda ise 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara aktarıldı. Bu hücreler morfolojik olarak homojendi ve fibroblast benzeri hücre görünümüne sahipti. Yedi gün içerisinde istenilen konfluense ulaşan hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekildi (Resim 3.6.). Hücreler ikinci pasajlama aşamasında 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara aktarıldı. Düzenli aralıklarla beslenen hücreler gün aşırı takip edildi. Hücrelerin normal yapıda olduğu ve dejenere olmadığı gözlemlendi. Hücreler istenilen konfluense eriştiklerinde pasajlamaya devam edildi.



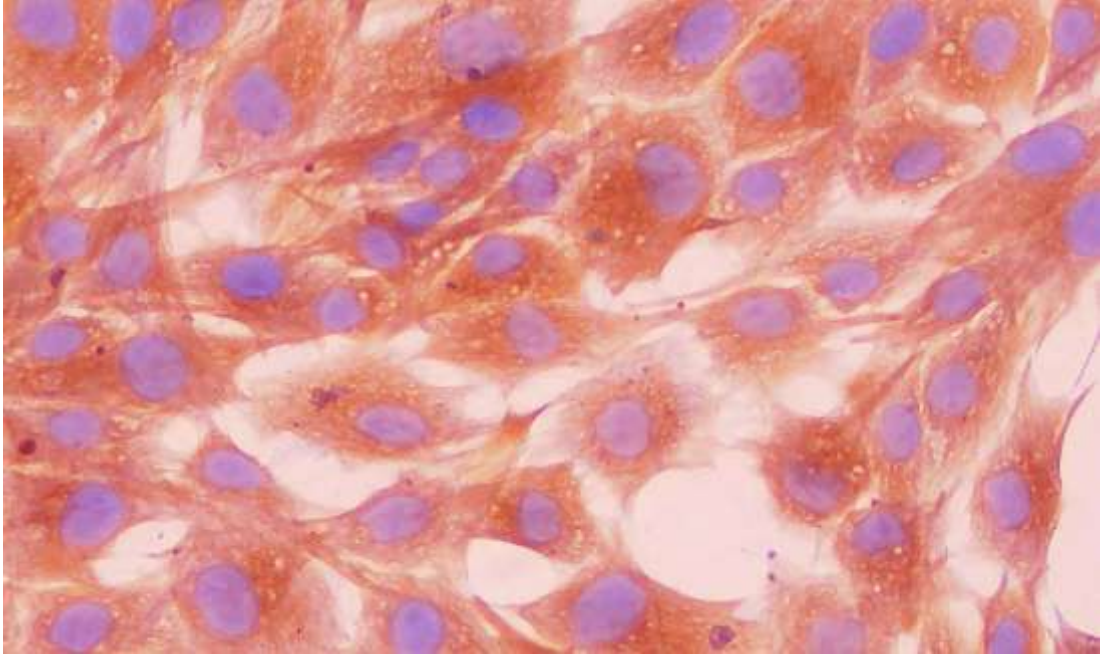
**Resim 3.6:** Primer sinoviyal fibroblastlar, 7.gün, invert mikroskop görüntüsü.

### **3.2. İmmünositokimya ve Hemakolor Boyama Bulguları**

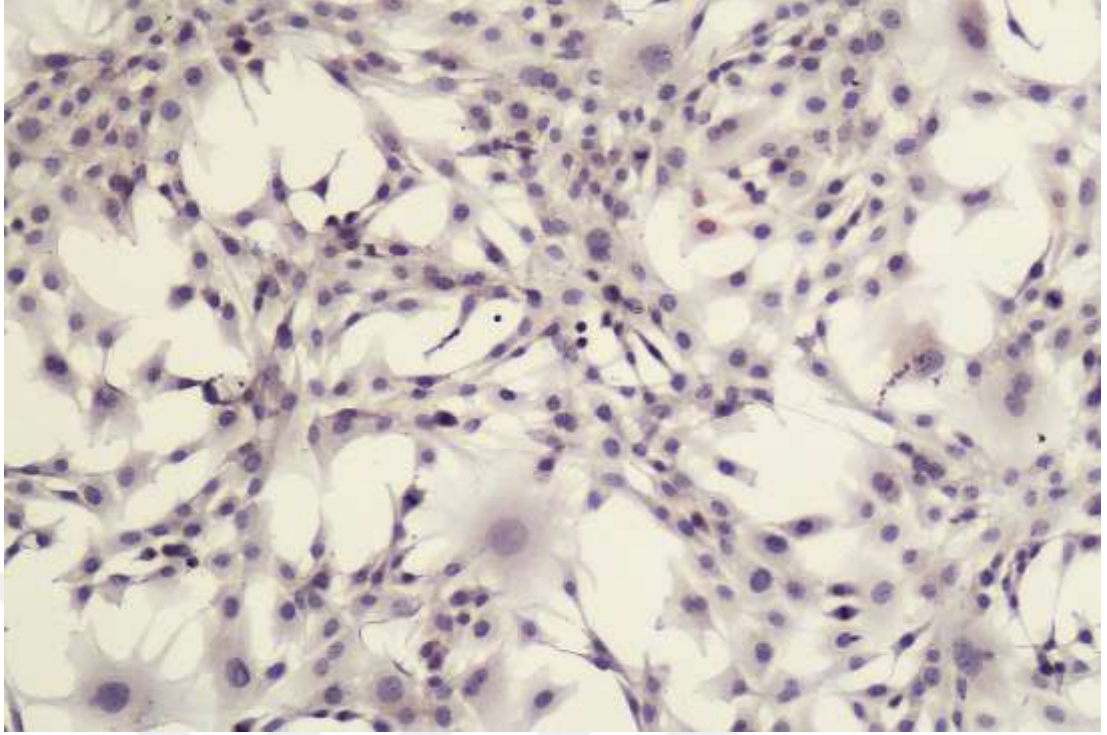
Sekizinci pasajda hücreler güçlü bir şekilde vimentin proteinini eksprese ederken (Resim 3.7., 3.8.), sitokeratin ekspresyonu gözlenmedi (Resim 3.9.). Hemakolor boyama sonucunda çok sayıda iğ şekilli, yuvarlak-oval bazofilik renkte çekirdeği bulunan, fibroblast benzeri morfolojiye sahip hücreler gözlemlendi (Resim 3.10., 3.11.). Bu sonuçlar, hücrelerin sinoviyal fibroblast hücreleri (tip B sinoviyosit) olduğunu gösterdi.



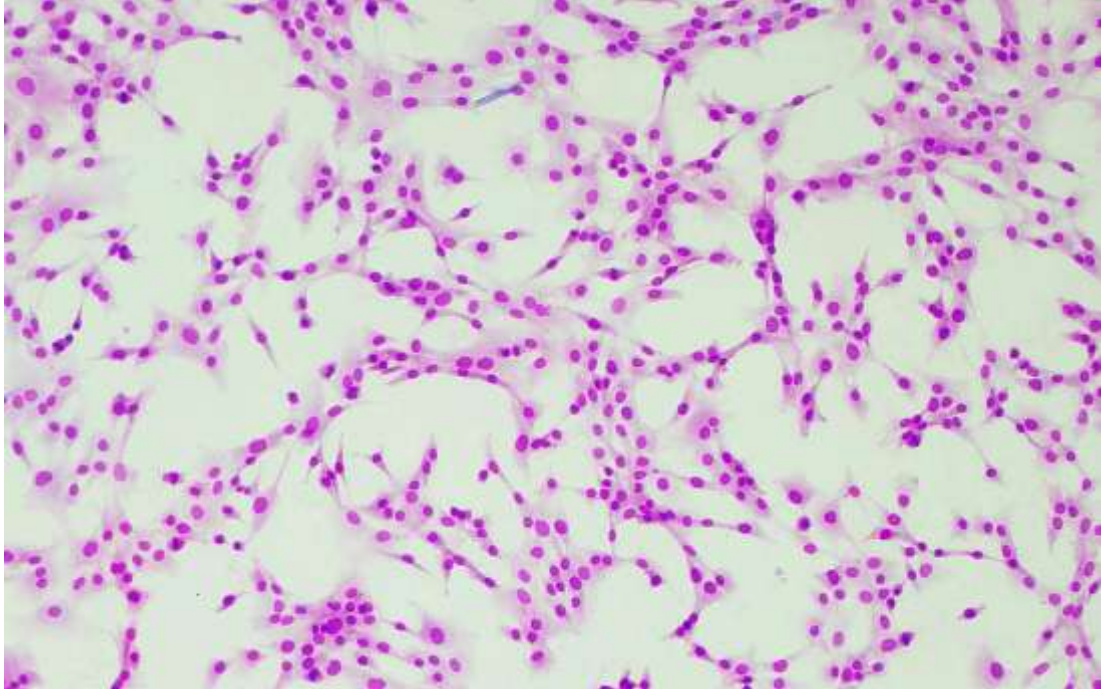
**Resim 3.7:** Primer sinoviyal fibroblastlar, vimentin pozitif immun boyanma, DAB, x200 büyütme.



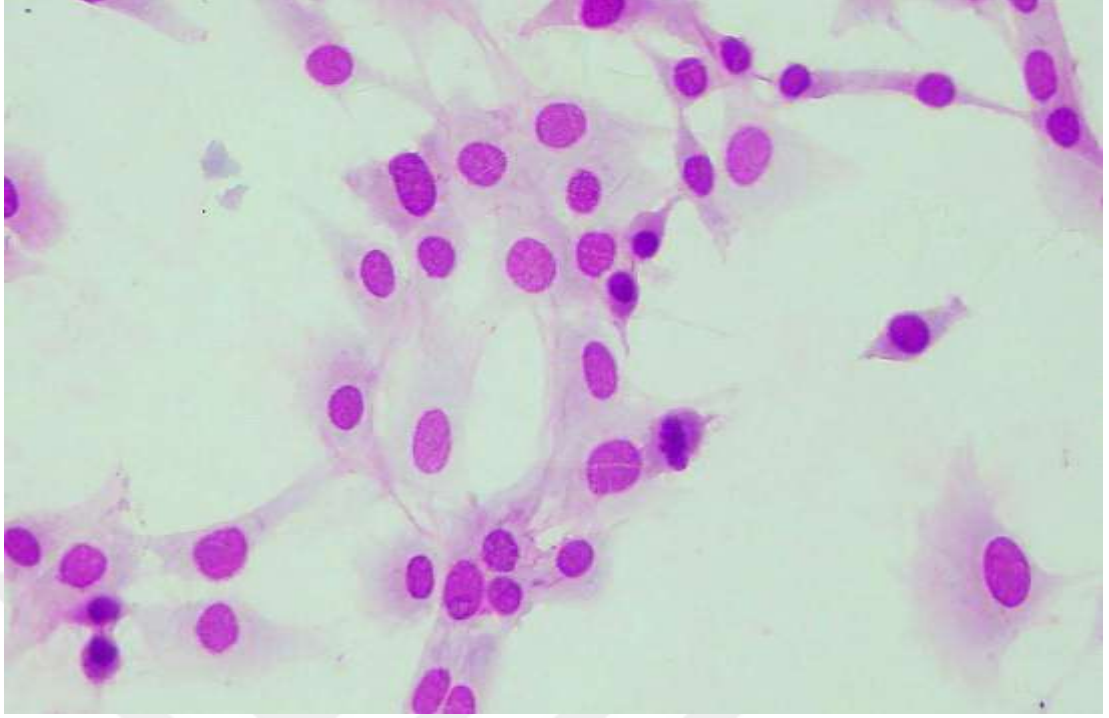
**Resim 3.8:** Primer sinoviyal fibroblastlar, vimentin pozitif immun boyanma, DAB, x400 büyütme.



**Resim 3.9:** Primer sinoviyal fibroblastlar, sitokeratin negatif immun boyanma, DAB, x100 büyütm.



**Resim 3.10:** Primer sinoviyal fibroblastlar, Hemakolor boyama, x100 büyütm.



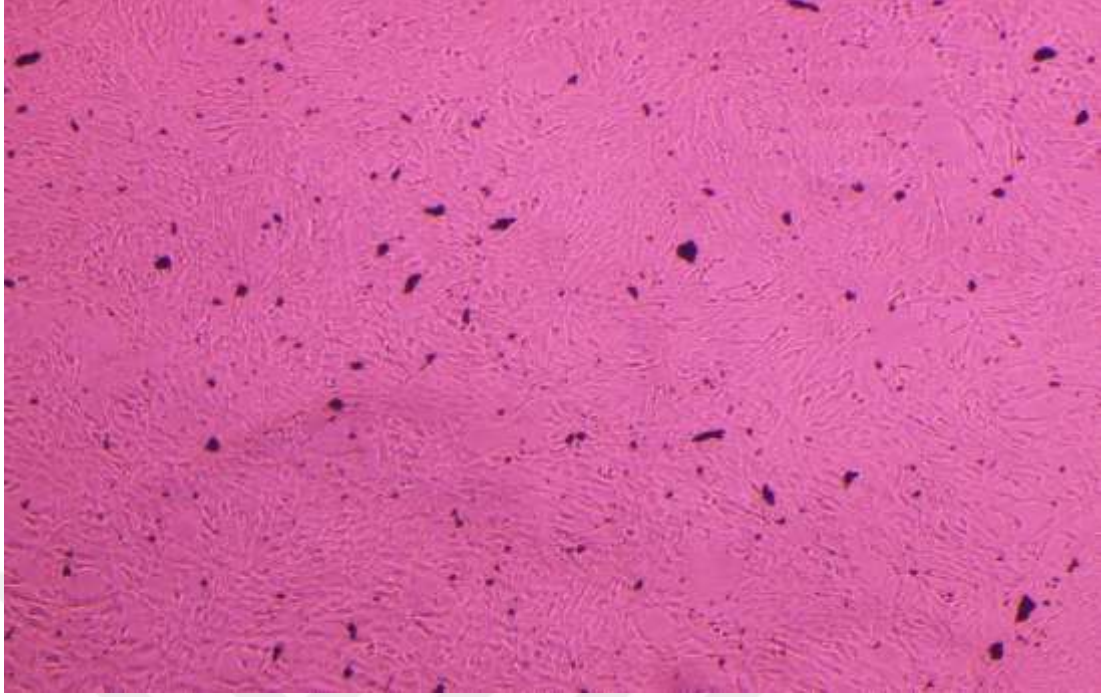
**Resim 3.11:** Primer sinoviyal fibroblastlar, Hemakolor boyama, x400 büyütme.

### **3.3. Karbon Fagositoz Testi Sonuçları**

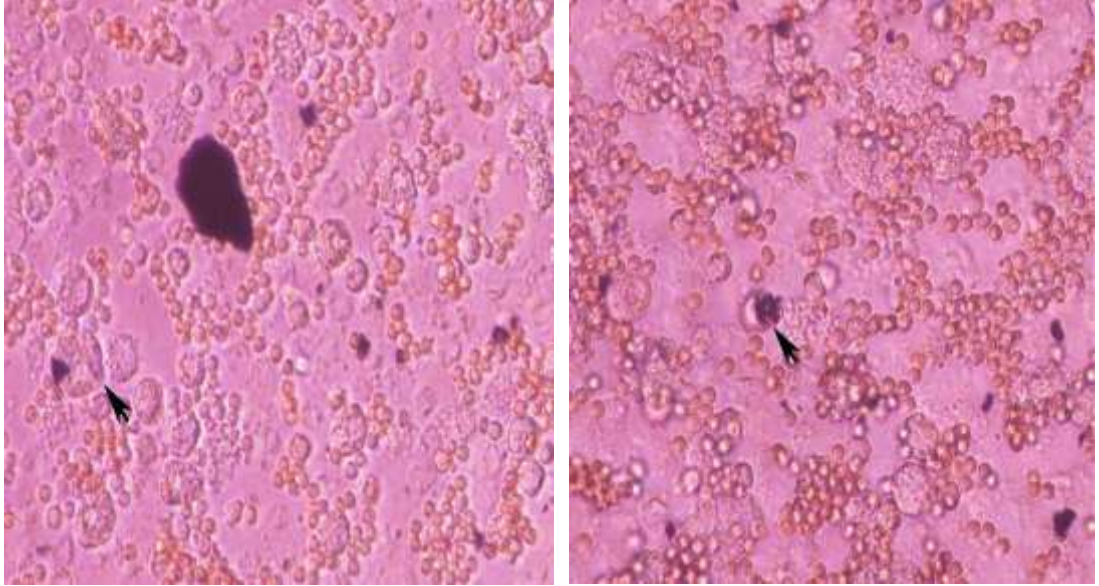
Karbon fagositoz testinde, izole edilen hücrelerin karbon partiküllerini fagosite etmediği ve makrofaj hücreleri olmadığı tespit edildi (Resim 3.12). Bunun yanı sıra, pozitif kontrol için ratın abdomen bölgesinden toplanan makrofaj hücrelerinin, karbon partiküllerini fagosite ettiği dikkati çekti (Resim 3.13.).

### **3.4. qPCR Bulguları**

Serum amiloid A gen ekspresyonundaki değişimler, qPCR ile yarıkantitatif olarak hesaplandı. Ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri, hiçbir madde inokule edilmeyen negatif kontrol grubu baz alınarak hesaplandı.



**Resim 3.12:** Karbon fagositoz testi, primer sinoviyal fibroblastlar arasında fagosite edilmemiş karbon partikülleri, invert mikroskop görüntüsü.



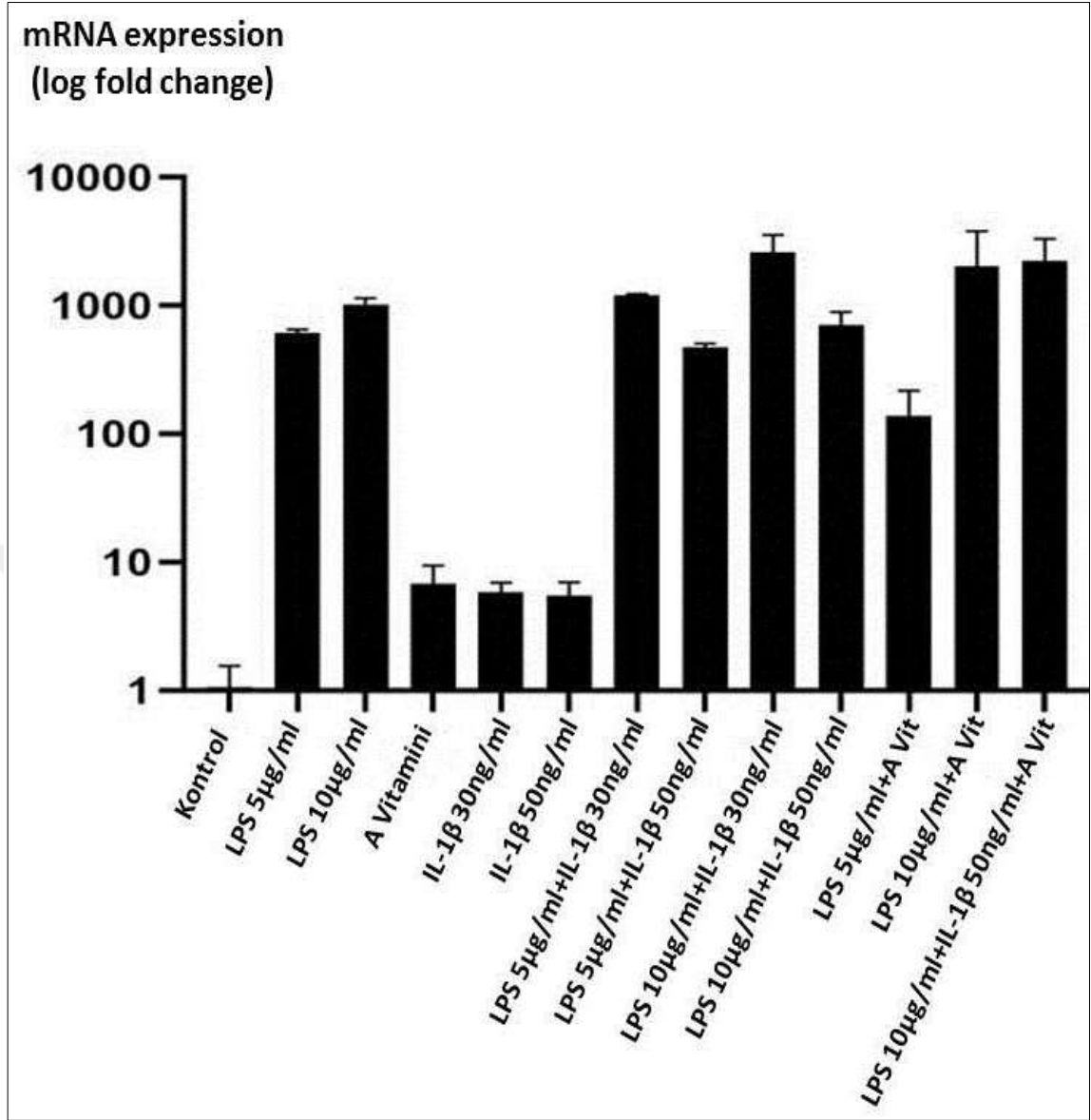
**Resim 3.13:** Karbon fagositoz testi, rat peritoneal makrofaj hücresi tarafından fagosite edilmiş karbon partikülleri (oklar), invert mikroskop görüntüsü.

### 3.4.1. SAA mRNA Ekspresyon Değerleri 24 s Deney Grupları

Yapılan değerlendirmeler sonucunda, tüm deney grupları negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında, hedef gen ekspresyon değerlerinin negatif kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). Tüm grupların SAA mRNA ekspresyon değerleri Çizelge 3.1. ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1:** SAA mRNA ekspresyon değerleri, 24 s deney grupları, (n=3).

Gruplar (24 s)	İndükleyici Maddeler	SAA mRNA Ekspresyon Değeri (kat değişim)	P
Negatif kontrol	-	1,1 ± 0,3	
LPS (Pozitif kontrol)	LPS (5µg/ml)	612,2 ± 39	
	LPS (10µg/ml)	1029,9 ± 112,6	
Sitokin	IL-1β (30ng/ml)	5,9 ± 1,1	
	IL-1β (50ng/ml)	5,5 ± 1,5	
A vitamini	A vitamini (7µg/ml)	6,8 ± 0,9	
LPS + sitokin	LPS (5µg/ml)+IL-1β (30ng/ml)	1212,4 ± 19,1	<b>p&lt;0,001</b>
	LPS (5µg/ml)+IL-1β (50ng/ml)	476,6 ± 31,6	
	LPS (10µg/ml)+IL-1β (30ng/ml)	2604,5 ± 476	
	LPS (10µg/ml)+IL-1β (50ng/ml)	712,9 ± 184,1	
LPS + A vitamini	LPS (5µg/ml)+A vitamini (7µg/ml)	139,4 ± 21,6	
	LPS (10µg/ml)+A vitamini (7µg/ml)	2040,7 ± 268	
Kombine	LPS (10µg/ml)+IL-1β (50ng/ml)+A vitamini (7 g/ml)	2246,8 ± 297,2	



Şekil 3.1: SAA mRNA ekspresyonu, 24 s deney grupları, (y aksisi logaritmik olarak gösterilmiştir).

Lipopolisakkarit inokule edilen pozitif kontrol grubunda, 5 µg/ml ile stimülasyon sonucunda SAA mRNA seviyesi, yaklaşık 610 kat ( $p < 0,001$ ) ve 10 µg/ml stimülasyon sonucunda ise yaklaşık 1000 kat artış gösterdi ( $p < 0,001$ ). Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitokin grubunda 30 ng/ml stimülasyon sonucunda, SAA mRNA ekspresyon seviyesindeki artışın yaklaşık 5,8 kat ( $p < 0,001$ ) ve 50 ng/ml stimülasyon sonucunda yaklaşık 5,5 kat ( $p < 0,001$ ), A vitamini grubunda yaklaşık 6,7 kat olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ).

Negatif kontrol grubuna kıyasla LPS + sitokin grubunda, 5 µg/ml LPS ve 30 ng/ml IL-1β ile indüklenen hücrelerde SAA mRNA ekspresyon seviyesinin yaklaşık 1200 kat ( $p<0,001$ ), aynı miktarda LPS ve 50 ng/ml IL-1β ile indüklenen hücrelerde 470 kat arttığı belirlendi ( $p<0,001$ ). Tüm deney grupları arasında en yüksek artış 10 µg/ml LPS ve 30 ng/ml IL-1β ile stimülasyon sonucunda elde edildi. Bu grupta hedef gen ekspresyonunun yaklaşık 2600 kat arttığı belirlendi ( $p<0,001$ ). Bunun yanı sıra aynı miktarda LPS ile birlikte 50 ng/ml sitokin uygulanan hücrelerde yaklaşık 710 kat artış gözlemlendi ( $p<0,001$ ).

Lipopolisakkarit + A vitamini grubunda, A vitamini ile birlikte 5 µg/ml LPS uygulanan hücrelerde SAA mRNA ekspresyon artışı yaklaşık 130 kat ( $p<0,001$ ) olarak kaydedilirken, 10 µg/ml LPS uygulanan hücrelerde yaklaşık 2000 kat olarak belirlendi ( $p<0,001$ ). Hedef gen ekspresyonu 10 µg/ml LPS ve 50 ng/ml IL-1β ile birlikte A vitamini kullanılan kombine grupta artış yaklaşık 2200 kat olarak gözlemlendi ( $p<0,001$ ).

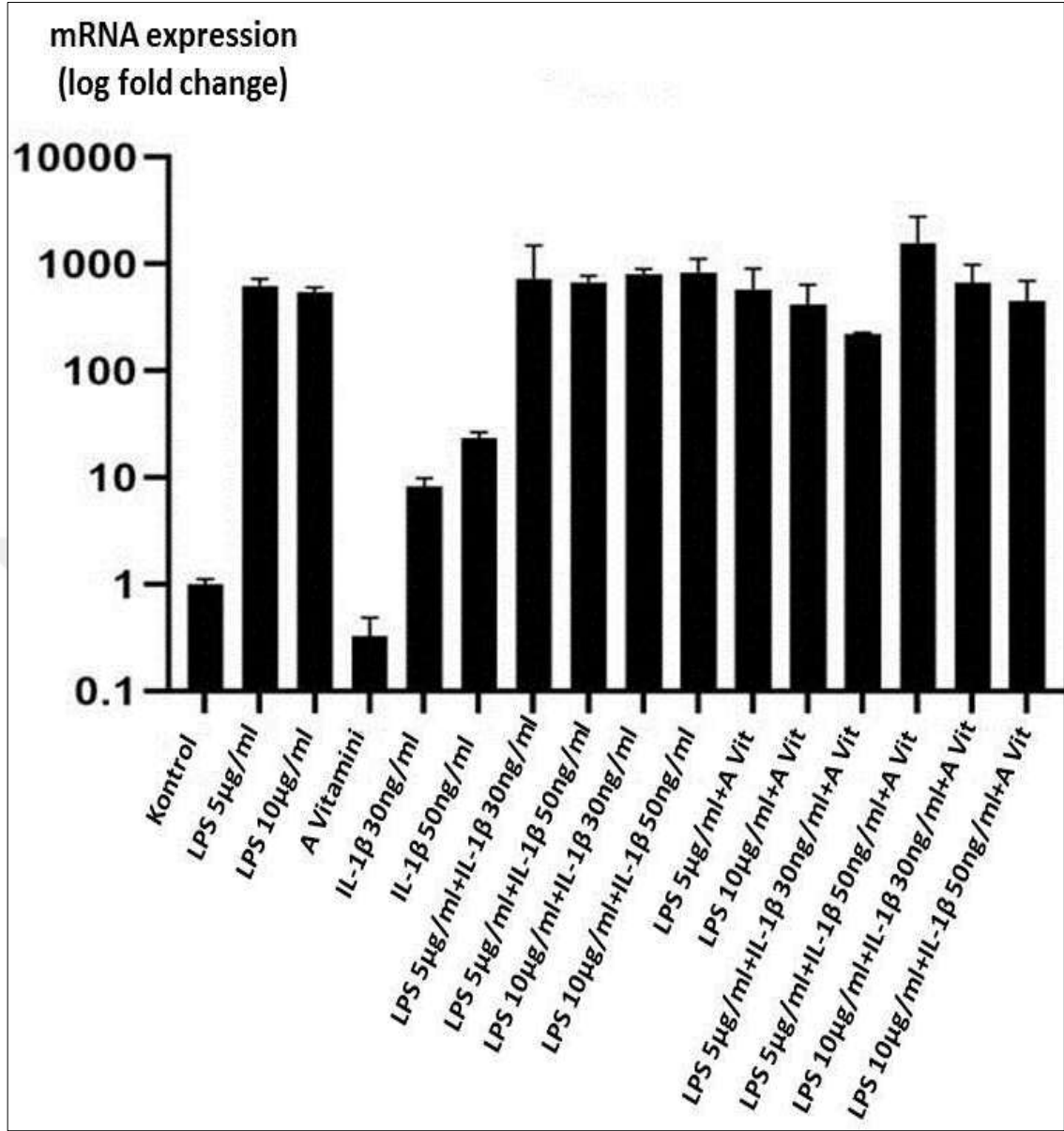
### **3.4.2. SAA mRNA Ekspresyon Değerleri 48 s Deney Grupları**

A vitamini grubu hariç diğer tüm 48 s deney gruplarında, negatif kontrol grubuna göre hedef gen ekspresyon değerlerinin önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ). Tüm grupların hedef gen ekspresyon değerleri Çizelge 3.2. ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

Pozitif kontrol grubunda, 5 µg/ml LPS ile indüklenen hücrelerde SAA mRNA ekspresyonu yaklaşık 620 kat ( $p<0,001$ ) ve 10 µg/ml LPS ile indüklenen hücrelerde yaklaşık 540 kat artış gösterdi ( $p<0,001$ ). Sitokin grubunda 30 ng/ml IL-1β ile stimülasyon sonucunda mRNA ekspresyonu yaklaşık 8 kat ( $p<0,001$ ) ve 50 ng/ml IL-1β ile stimülasyon sonucunda ise yaklaşık 23 kat artış olduğu saptandı ( $p<0,001$ ). Negatif kontrol grubuna kıyasla A vitamini grubunda mRNA ekspresyonunun yaklaşık % 75 azaldığı ( $0,33 \pm 0,08$ ) gözlemlendi.

**Çizelge 3.2:** SAA mRNA ekspresyon değerleri, 48 s deney grupları, (n=3).

<b>Gruplar (48 s)</b>	<b>İndükleyici Maddeler</b>	<b>SAA mRNA Ekspresyon Değeri (kat değişim)</b>	<b>P</b>
<b>Negatif kontrol</b>	-	1 ± 0,1	
<b>LPS (Pozitif kontrol)</b>	LPS (5 µg/ml)	625,4 ± 98,4	
	LPS (10 µg/ml)	546,2 ± 56,5	
<b>Sitokin</b>	IL-1β (30 ng/ml)	8,3 ± 1,1	
	IL-1β (50 ng/ml)	23,4 ± 2,8	
<b>A vitamini</b>	A vitamini (7 µg/ml)	0,3 ± 0,1	
<b>LPS + sitokin</b>	LPS (5 µg/ml) + IL-1β (30 ng/ml)	734,6 ± 102,8	<b>p&lt;0,001</b>
	LPS (5 µg/ml) + IL-1β (50 ng/ml)	680,3 ± 97,6	
	LPS (10 µg/ml) + IL-1β (30 ng/ml)	805,4 ± 89,2	
	LPS (10 µg/ml) + IL-1β (50 ng/ml)	833,8 ± 94,7	
<b>LPS + A vitamini</b>	LPS (5 µg/ml) + A vitamini (7 µg/ml)	582,6 ± 119,5	
	LPS (10 µg/ml) + A vitamini(7 µg/ml)	419,4 ± 219,3	
<b>Kombine</b>	LPS (5 µg/ml) + IL-1β (30 ng/ml) + A vitamini (7 µg/ml)	223,4 ± 4,3	
	LPS (5 µg/ml) + IL-1β (50 ng/ml) + A vitamini (7 µg/ml)	1577,4 ± 326,4	
	LPS (10 µg/ml) + IL-1β (30 ng/ml) + A vitamini (7 µg/ml)	672,7 ± 71,6	
	LPS (10 µg/ml) + IL-1β (50 ng/ml) + A vitamini (7 µg/ml)	453,6 ± 77,7	



Şekil 3.2: SAA mRNA ekspresyonu, log kat değerleri, 48 s deney grupları, (y aksisi logaritmik olarak gösterilmiştir).

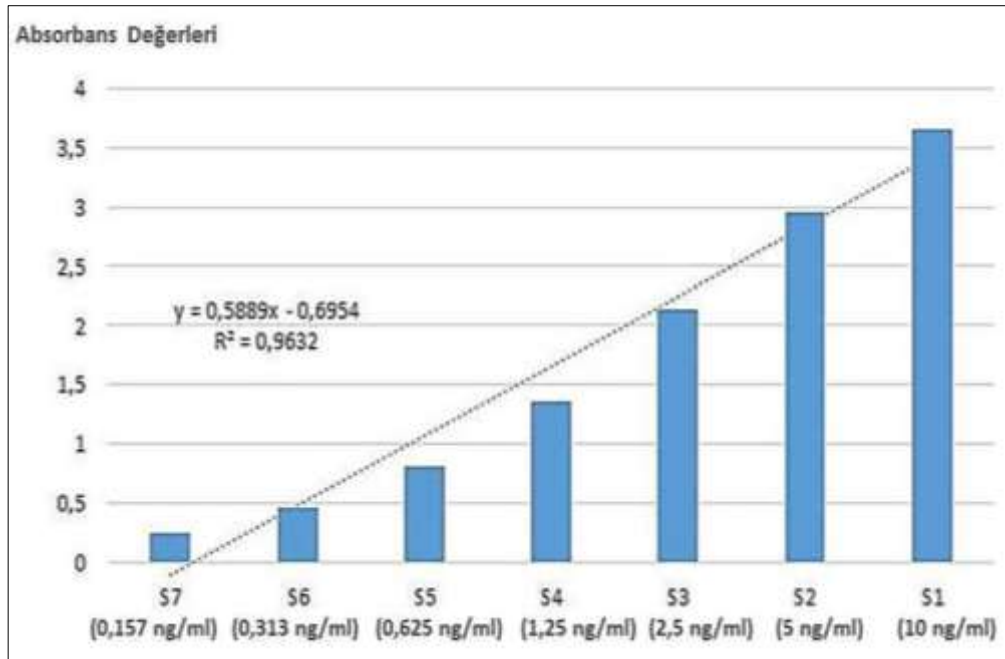
Lipopolisakkarit + sitokin grubunda, 5 μg/ml LPS ve 30 ng/ml IL-1β ile indüklenen hücrelerde ekspresyonun yaklaşık 730 kat ( $p < 0,001$ ), aynı miktarda LPS ve 50 ng/ml IL-1β ile indüklenen hücrelerde ise yaklaşık 680 kat artış gösterdiği belirlendi ( $p < 0,001$ ). 10 μg/ml LPS ve 30 ng/ml IL-1β ile stimülasyon sonucunda elde edilen ekspresyonun yaklaşık 800 kat artış gösterdiği gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Bunun yanı sıra aynı miktarda LPS ile birlikte 50 ng/ml sitokin uygulanan hücrelerde artış yaklaşık 830 kat olarak gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). LPS + A vitamini grubunda, A vitamini

ile birlikte 5 µg/ml LPS uygulanan hücrelerde SAA değerinin yaklaşık 580 kat arttığı kaydedilirken ( $p<0,001$ ), 10 µg/ml LPS uygulanan hücrelerde ekspresyon değeri yaklaşık 410 kat artış gösterdi ( $p<0,001$ ).

Kombine grupta 5 µg/ml LPS, 30 ng/ml IL-1 $\beta$  ve A vitamini ile indüklenen hücrelerde mRNA ekspresyon artışı yaklaşık 220 kat olarak tespit edildi ( $p<0,001$ ). Aynı miktarda LPS, 50 ng/ml IL-1 $\beta$  ve A vitamini ile stimülasyon sonucunda tüm deney grupları arasında en yüksek oranda artışa rastlandı. Elde edilen artış, yaklaşık 1500 kat olarak kaydedildi ( $p<0,001$ ). Hedef gen ekspresyonu 10 µg/ml LPS ve 30 ng/ml IL-1 $\beta$  ile birlikte A vitamini kullanılan gruptaki artış, yaklaşık 670 kat olarak gözlenirken ( $p<0,001$ ) aynı miktarda LPS ve 50 ng/ml IL-1 $\beta$  ile birlikte A vitamini kullanılan grupta yaklaşık 450 kat artış saptandı ( $p<0,001$ ).

### 3.5. ELISA Bulguları

Sitokin, LPS ve A vitamini ile uyarılan TESH'lerin kültür ortamında SAA seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmedi.



Şekil 3.3: ELISA standart absorbans değerleri ile standart eğri ve formülü.

#### 4. TARTIŞMA

Kanatlı hayvan endüstrisi, Türkiye ekonomisi için önemli bir yeri olan yumurta ve beyaz et ihtiyacının karşılanmasında büyük rol oynamaktadır (Mısırlıoğlu vd., 2001). Paylaşılan verilere göre, Türkiye’de 2022 yılında 2,4 milyon ton kanatlı eti ve 19,8 milyar adet yumurta üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2022). Ayrıca Türkiye genelinde yaklaşık 12 bin adet kanatlı işletmesi bulunmakta ve sektör her yıl ortalama % 8 oranında büyüme göstermektedir (TEPGE,2022). Kanatlı üretim potansiyelindeki bu artışlar, geniş kontrol önlemleri bulunmasına rağmen, çok sayıda sağlık sorununun ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Singh vd., 2020). Ciddi sağlık problemlerine yol açan bacak hastalıkları özellikle ticari olarak yetiştirilen kanatlılarda, karkas kalitesinde bozulma ve yumurta verimindeki düşüş sebebiyle üreticiler için ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Bradshaw vd., 2002; Braga vd., 2016). Türkiye’de kanatlı sektöründe karşılaşılan bacak hastalıklarına yönelik az sayıda çalışma olduğu bilinmektedir (Mısırlıoğlu vd., 2001). Kümes hayvanları yetiştiriciliğini önemli ölçüde etkileyen amiloid artropatinin büyük ekonomik kayıplara neden olduğu göz önüne alındığında, patojenez hakkında detaylı bilgiye ulaşmak ve AA amiloidozisin sebep olduğu ekonomik kayıpları azaltmak için, daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Braga vd., 2016).

Yumurtacı tavuklar, SAA’nın bacak eklemlerinde birikimi sonucunda şekillenen amiloid artropati gelişimine yatkın oluşu nedeniyle, deneysel çalışmalarda model olarak kullanılmaktadır (Landman, 1999a). Landman vd. (2003), *in vivo* koşullarda yapmış oldukları bir çalışmada SAA geninin ve gen promotörünün, broyler ve beyaz yumurtacı tavuk ırklarında farklı olması nedeniyle amiloid artropatiye daha duyarlı olan kahverengi yumurtacı tavuk ırklarını kullanmışlardır. Günümüzde de amiloid artropatide rol oynayan SAA’nın intraartiküler sentezine yönelik yapılan araştırmalar devam etmektedir (Blanco vd., 2016). Kapsamlı literatür taramaları sonucunda tavuklardaki amiloid artropati araştırmalarının çoğunun *in vivo* koşullarda yapıldığı görülmüş ve tavuk SF hücrelerinden SAA salınımının *in vitro* koşullarda araştırılmasına yönelik yapılmış olan sadece bir tane çalışmanın (Upragarin vd., 2005b) bulunduğu tespit edilmiştir. Upragarin vd. (2005b), yapmış oldukları bu çalışmada, SF’lerden SAA sentezini araştırmak ve ırklar arasındaki

farklılıkları belirlemek için 14 haftalık kahverengi ve beyaz yumurtacı tavuklardan elde ettikleri SF'leri kullanmış, kahverengi yumurtacı tavuklara ait SF'lerden SAA sentezinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Mitchell vd. (1991), ise 5 haftalık tavşanlarda 3. pasajda izole edilen SF'lerde, SAA sentezinin 16. pasajda izole edilen hücrelere göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumu hücrelerin yaşına bağlı olarak değişim gösterdiğini ve olgun hücrelerde bu yeteneğin önemli ölçüde azaldığı şeklinde yorumlamışlardır. Daha önce yapılan çalışmalarda (Mitchell vd., 1991; Landman vd., 2003; Upragarin vd., 2005b) elde edilen verilere dayanarak bu tez çalışmasında, deneylerde kullanılmak üzere 11 günlük kahverengi yumurtacı tavuk embriyolarına ait TESH hücreleri izole edilmiş ve literatürlerdeki bulgular ile uyumlu bir şekilde, bu hücrelerde SAA sentezinin olduğu tespit edilmiştir.

İnsanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde sinoviyal dokular ile ilgili yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda SF hücrelerinin, özellikle metakarpo-falangeal eklem (Zimmermann vd., 2001; Jacobsen vd., 2016) ve femora-tibial eklem (Mitchell ve Brinckerhoff, 1995; O'Hara vd., 2000; Vallon vd., 2001; Zimmermann vd., 2001; Upragarin vd., 2005b; Zhao vd., 2016; Fanqi vd., 2022) bölgesinden izole edildiği bildirilmiştir. Tavuklarda amiloid artropati ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalarda ise; özellikle femora-tibial eklem (Landman vd., 1994; Landman vd., 1997; Landman vd., 1999b;) ve tibio-metatarsal eklem (Landman vd., 1994; Landman ve Feberwee, 2001; Sevimli vd., 2004; Alasonyalılar vd., 2006; Kapakin vd., 2007; Sevimli vd., 2012) bölgelerinin etkilendiği gözlenmiştir. Atlarda SAA sentezine yönelik yapılan *in vitro* bir çalışmada (Jacobsen vd., 2016), SF'lerin beslenmesinde DMEM hücre kültürü medyumunu kullanılırken, tavuk SF'lerinde yapılan bir çalışmada (Upragarin vd., 2005b), RPMI 1640 kültür medyumunu tercih edilmiştir. Ayrıca, Akkoc ve Kahraman (2012), tavuklardan izole ettikleri akciğer fibroblastlarının beslenmesinde, M199 medyumunu kullanmışlardır. Jacobsen vd. (2016), izole ettikleri at SF hücrelerinin 3. pasajdan sonra, Upragarin vd. (2005b) ise tavuk SF hücrelerinin 4. ve 7. pasajlar arasında deneylerde kullanıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise tibio-metatarsal eklem bölgesinden izole edilen TESH'lerin beslenmesinde amino asit ve vitamin açısından daha zengin içeriği olan M199 kültür medyumunu tercih edilerek, hücreler 8. pasaj sırasında deneylerde kullanılmıştır.

Sıklıkla SF'lerin bir belirteci olarak kullanılan vimentin, mezenkimal hücrelerden eksprese edilen ara filament proteinidir (Yocum vd., 1988; Zhao vd., 2016). Tavuk (Upragarin vd., 2005b; Liu vd., 2020), rat (Yocum vd., 1988), fare (Zhao vd., 2016) ve insan (Xue vd., 1997; Fanqi vd., 2022) SF hücrelerinin izole edildiği çalışmalarda, mezenkimal orijinlerinin doğrulanması amacı ile yapılan immunositokimyasal boyamalarda, vimentin antikoruna karşı pozitif reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiş olup, bu tez çalışmasında da vimentin ekspresyonu, literatürlerdeki sonuçlar ile benzerlik göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada sitokeratin antikoruna karşı TESH'lerde bir reaksiyon meydana gelmemiş ve boyanma gözlenmemiştir. Upragarin vd. (2005b), immunositokimyasal boyamaların yanı sıra, hücrelerin karakterizasyonu için ilk kez karbon fagositoz testini uygulamış ve kültüre edilmiş hücreler arasında makrofajların bulunmadığını saptamışlardır. Benzer şekilde bu çalışmada da TESH'lerin karakterizasyonu için karbon fagositoz testi yapılarak, izole edilen hücrelerin tip B hücreler (SF) olduğu ve deneylerde kullanılan kültürde tip A hücrelerinin (makrofaj) bulunmadığı tespit edilmiştir.

Yapılan deneysel araştırmalarda (Landman vd., 1994; Ovelgonne vd., 2001; Sevimli vd., 2005), tavuklarda amiloid artropati oluşumunda birçok faktörün rol oynadığı ve buna bağlı olarak SAA salınımının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda (Upragarin vd., 2005b; Jacobsen vd., 2016), negatif kontrol gruplarında da normal SF hücrelerinde SAA ekspresyonunun olduğu dikkati çekmekte ve bu durum, SAA'nın ekstrahepatik olarak SF'lerden lokal sentezi ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan bu çalışmada benzer şekilde negatif kontrol grubunda SAA ekspresyonunun saptanması, literatürlerdeki (Upragarin vd., 2005b; Jacobsen vd., 2016) sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.

Serum amiloid A'nın hepatosit, makrofaj ve SF hücreleri gibi birçok hücreden sentezlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, LPS (Upragarin vd., 2005b; Williams vd., 2009; Teles vd., 2011; Gonçaves vd., 2012), IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi proinflatuar sitokinler (Jorgensen vd., 2000; Kumar vd., 2014), kazein (Hebert ve Gervais, 1990), Freund's adjuvant (Sevimli vd., 2012) ve A vitamini (Sevimli vd., 2005; Abdelhamid vd., 2017) gibi faktörler kullanılarak indüklendiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise, TESH hücrelerinde SAA salınımının indüklenmesinde farklı doz ve sürelerdeki LPS (*E. coli* O127:B8) ile birlikte IL-1 $\beta$  ve A vitamini kullanılmıştır.

Gram negatif bakterilerin hücre duvarından elde edilen LPS, immun sistemin güçlü bir biyoaktivatörü olarak kabul edilmekte ve yangısal reaksiyonlarda AFP'ler ile proinflamatuvar sitokinlerin salınımında önemli bir indükleyici olarak tercih edilmektedir (Li vd., 2015). Bu tez çalışmasında, pozitif kontrol grubunda SAA mRNA ekspresyonu 5  $\mu$ g/ml LPS uygulaması ile, 24 s sonunda yaklaşık 610 kat ve 48 s sonunda ise 620 kat artış gösterirken, 10  $\mu$ g/ml dozda LPS uygulaması ile 24 s sonunda 1000 kat ve 48 s sonunda 540 kat artış göstermiştir ( $p < 0,001$ ). Upragarin vd. (2005b), LPS (*E. coli* O127:B8) ile indükledikleri SF'lerde, 5  $\mu$ g/ml doz ile 6 s stimülasyondan sonra, SAA mRNA ekspresyonunda yaklaşık 35 kat artış gözlemlendiğini, 10  $\mu$ g/ml doz uygulanmasında ise 40 kat artış olduğunu tespit etmişlerdir. Zerega vd. (2004), tavuk embriyonik kondrositlerinde, 10  $\mu$ g/ml LPS (*E. coli*) uygulamasından 16s sonra SAA mRNA ekspresyonunda yaklaşık 7 kat artış olduğunu bildirmişlerdir. Jorgensen vd. (2000), yaptıkları bir çalışmada, balıklardan elde ettikleri hepatosit hücrelerini 48 s boyunca 10, 50 ve 100  $\mu$ g/ml LPS (*E. coli* O111:B4) ile indüklemişler ve SAA mRNA seviyesinin doza bağımlı olarak arttığını tespit etmişlerdir. Deneysel olarak *in vivo* ortamda yapılmış bir çalışmada (Singh vd., 2020), *S. gallinarum* ile oral olarak enfekte edilmiş tavukların karaciğer dokularındaki SAA ekspresyonunun, 12 s sonunda kontrol grubuna göre 17 kat ve 24 s sonunda, 22 kat artış göstererek maksimum değere ulaştığı kaydedilmiştir. Balıklarda yapılmış olan *in vivo* bir çalışmada (Gonçalves vd., 2012), 10  $\mu$ g/ml LPS (*E. coli* O55:B5) uygulaması ile SAA ekspresyonunun 6 s içerisinde artmaya başladığı ve 12 s içerisinde yükselmeye devam ettiği, 24 s sonunda ise, maksimum seviyeye ulaşarak, 48 s içerisinde düştüğü gözlenmiştir. Atlarda yapılan *in vivo* bir çalışmada (Anderson vd., 2020), intravenöz LPS (*E. coli* O111:B4) uygulamasından 24 s sonra, ineklerde yapılan başka bir *in vivo* çalışmada ise (Vernay vd., 2012), meme içi LPS (*E. coli* O26:B6) uygulamasından 48 s sonra, SAA gen ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ilgili literatürlerdeki (Jorgensen vd., 2000; Zerega vd., 2004; Upragarin vd., 2005b; Gonçalves vd., 2012; Vernay vd., 2012; Anderson vd., 2020; Singh vd., 2020)

sonuçlar ile karşılaştırıldığında, farklı dozlarda LPS ile indüklenen SF'lerde AFY'nin 6 s içerisinde şekillenmeye başladığı, 12 s sonunda bu artışın devam ettiği, 24 s içerisinde ise en yüksek seviyeye ulaştığını ve doza bağlı olarak 48 s içerisinde kısmen azalmaya başladığı gürülmüştür. Ayrıca bu çalışmadaki sonuçlar, AFY esnasında SAA konsantrasyonunun zararlı uyarının etkisinin erken safhalarında dramatik bir şekilde arttığı ve birkaç gün içerisinde fizyolojik seviyelere geri döndüğünü belirten diğer çalışmalar ile (Murakami vd., 2013a; O'Reilly vd., 2013) uyumlu bulunmuştur.

Proinflamatuvar sitokinlerin SAA sentezinde önemli roller oynadığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Bochsler ve Slauson, 2002; Kumar vd., 2014). Yangı bölgesinde aktive edilmiş hücrelerden sentezlenen proinflamatuvar sitokinlerin, AFY'ye aracılık ettiği bilinmektedir (Jensen ve Whitehead, 1998). Bu sitokinlerden IL-1 $\beta$ 'nin, artiküler dokularda kıkırdak ve SF hücreleri üzerinde doğrudan katabolik etkilerinin bulunmasının yanı sıra, yangısal reaksiyonların düzenlenmesi yoluyla artrit patojenezinde önemli rollerinin olduğu kaydedilmiştir (Goldring, 2000). Jacobsen vd. (2016), atlarda proinflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1 $\beta$ 'nin, SF'lerde ve kondrositlerde SAA sentezinin en etkili indükleyicisi olduğunu bildirmişlerdir. Blanco vd. (2016), IL-6'nın SAA sentezi üzerinde tek başına çok az etkisi olduğunu, Jensen ve Whitehead (1998) ise, IL-1 $\beta$  ile sinerji oluşturduğunu kaydetmişlerdir. Sevimli vd. (2008), SAA'nın indüksiyonunda TNF- $\alpha$ 'ya göre, IL-1 $\beta$ 'nin büyük ölçüde etkili olduğunu ve birlikte de önemli etkiler oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Jacobsen vd. (2016), 50 ng/ml IL-1 $\beta$  ile 12 s boyunca indüklenen at SF hücrelerinde, SAA mRNA ekspresyonunda yaklaşık 30 kat artış tespit ederken, 24 s sonunda 130 kat ve 48 s sonunda 20 kat artış gözlemlemişlerdir. Aynı araştırmada (Jacobsen vd., 2016), SF hücrelerinde SAA ekspresyonundaki artışın 12 saatlik uygulamada başlayıp, 24 s içerisinde maksimum seviyeye ulaştığını ve 48 saatlik uygulamada ise en düşük seviyede gürüldüğünü bildirmişlerdir. Ramadori vd. (1985b), fare hepatositlerine IL-1 $\beta$  uygulaması sonucunda 2 s içerisinde SAA seviyesinde artış olduğunu, 4 s içerisinde maksimum seviyeye ulaştığını ve 12 s içerisinde düştüğünü kaydetmişlerdir. Jorgensen vd. (2000) ise, balıklardan elde ettikleri hepatosit hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada 48 s boyunca 25 ng/ml IL-1 $\beta$

uygulamış ve SAA mRNA seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise, SAA sentezi üzerinde tek başına kullanıldığında en efektif etkili olduğu düşünülen proinflamatuvar sitokin IL-1 $\beta$  tercih edilmiş ve daha önce yapılmış olan çalışmalarda (Ramadori vd., 1985b; Jorgensen vd., 2000; Jacobsen vd., 2016) belirtilen sonuçlardan farklı olarak TEF'lerde 48 s içerisindeki stimülasyonun, 24 saatlik stimülasyona göre daha yüksek bir artış olduğu tespit edilmiştir. Gözlenen bu farklılığın tavuklarda SAA sentezi üzerine IL-1 $\beta$  etkisinin, uygulanan doz, süre ve hayvanlar arasındaki tür farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Amiloidozis oluşumunda A vitamini, retinol ve aktif metaboliti olan retinoik asidin rolleri konusunda yapılmış çalışmalar (Sevimli vd., 2005; Derebe vd., 2014; De Buck vd., 2016), bulunmaktadır. De Buck vd. (2016), farelerde yapmış oldukları çalışmada, SAA gen ekspresyonunun şekillenebilmesi için, A vitamininin gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir. Derebe vd. (2014), A vitamini yönünden eksik bir diyetle beslenen farelerde, SAA transkripsiyonunun azaldığını göstermiş ve SAA'nın enfeksiyonlar esnasında retinolün taşınmasında aracılık eden bir retinol bağlayıcı protein olduğunu kaydetmişlerdir. Dolayısıyla SAA retinol taşınımı ile enfeksiyonlara verilen fizyolojik yanıtın önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (Derebe vd., 2014). Lökositlerin işlevleri ve sitokinlerin ekspresyonu olmak üzere bağışıklık üzerinde etkili olduğu düşünülen A vitaminin, bu açıdan amiloid oluşumunda da etkili olduğu öne sürülmektedir (Dillehay vd., 1988; Turpin vd., 1990; Göttgens ve Green, 1995). Sevimli vd. (2005), Freund's adjuvant ile deneysel olarak amiloid artropati oluşturduğu tavuklarda en şiddetli SAA salınımını A vitamini grubunda gözlemlemişlerdir. Paredes vd. (2002), romatoid artrit gözlenen insanların serumunda A vitamini seviyesinde azalmanın olduğunu ve kronik yangısal hastalıkların, serumdaki antioksidan vitamin düzeylerini etkilediğini bildirmişlerdir. Rosales vd. (1996), ratlarda artan retinol gereksinimine rağmen, serum retinol değerlerinin mikrobiyal uyarımın ardından belirgin şekilde azalması ile retinolün dokulara taşındığını vurgulamışlardır. Sevimli vd. (2005), tavuklarda yapmış oldukları çalışmada, serum retinol ve SAA seviyesi ile dokularda amiloid birikimi arasında negatif bir korrelasyon olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar (Sevimli vd., 2005), bu durumun beslenme ile alınan A vitaminin dokulara geçerek,

amiloidin yapısına karıştığını ve bu nedenle serum retinol seviyesinin düşük olduğunu öne sürmüşlerdir. Spencer vd. (2014), A vitamininin canlılarda hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasında da önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada 24 s boyunca 7 µg/ml dozda A vitamini uygulanan grupta SAA ekspresyon artışı, yaklaşık 7 kat gözlenirken ( $p<0,001$ ), 48 s boyunca uygulanan hücrelerde, negatif kontrol grubuna göre yaklaşık %75 azalma gözlenmiştir. Bu veriye göre; çalışmada izole edilen TESH'lerin, kültür ortamındaki beslenme ve gelişimleri açısından A vitaminine ihtiyaç duymalarını ve bunun sonucunda kültür ortamına uygulanan A vitaminini kullanmış olabileceklerini düşündürmektedir.

Eklem hastalıklarının patojenezinde önemli rol oynayan sitokinlerin sinyal ağı çok karmaşıktır. Bu nedenle sitokinlerin tek başına incelenmesi hastalık sürecinde yer alan tüm uyarıların etkileşimlerini tam olarak yansıtamamaktadır. Yalnızca sitokin etkilerinin incelendiği durumlarda eklem hastalıklarının sürecinde yer alan tüm biyoaktif bileşiklerin, karmaşık etkileşimlerinin yeteri kadar tespit edilemeyeceği bildirilmiştir (Jacobsen vd., 2016). Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerin eklem hastalıklarında SF'lerden sentezlenerek yangının başlatılması ve devam etmesine büyük ölçüde katkıda bulunduğu kaydedilmiştir (Sevimli vd., 2008; Bartok ve Firestein, 2010). Bu tez çalışmasında, IL-1 $\beta$ 'nin AFY üzerine tek başına etkileri haricinde, güçlü SAA indükleyicisi olan LPS ve A vitamini ile birlikte kombinasyonları da incelenmiştir. Genel olarak bakıldığında, tüm çalışma grupları arasında en yüksek SAA mRNA ekspresyonuna, 24 s boyunca LPS + sitokin uygulanan grupta rastlanılmıştır. 10 µg/ml LPS + 30ng/ml IL-1 $\beta$ 'ya 24 s boyunca maruz kalan TESH'lerde ekspresyon artışı yaklaşık 2600 kat olarak en yüksek değeri göstermiştir ( $p<0,001$ ). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, deneysel olarak artrit oluşturulan tavşanlarda (Vallon vd., 2001) ve artrit gözlenen insanlardan elde edilen sinoviyal dokularda (Connolly vd., 2010) SAA ekspresyonunda önemli orandaki artışları ortaya koyan literatürler ile uyumlu bulunmuştur. Jorgensen vd. (2000), balıklarda LPS ve IL-1 $\beta$  ile ayrı ayrı indüklediği hücrelerde SAA sentezine ek olarak, IL-1 $\beta$  sentezinin de olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde He vd. (2020), farelerde yapmış olduğu *in vivo* bir çalışmada, LPS uygulaması sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunda artış tespit etmişlerdir. Bu durum

AFY'nin tetiklenmesi sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin de ortama salındığını göstermektedir. Bu çalışmada belirtilen literatürlerle (Vallon vd., 2001; Connolly vd., 2010; Jorgensen vd., 2000) uyumlu olarak, en yüksek SAA sentezinin LPS + sitokin uygulanan grupta olduğu saptanmıştır.

Sevimli vd. (2004), deneysel olarak amiloid artropati oluşturdukları tavuklarda, en şiddetli SAA salınımını *E. faecalis* ile birlikte A vitamini uygulanan grupta olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, LPS + A vitamini uygulanan gruplar arasında en yüksek artış, 24 s boyunca 10 µg/ml LPS ile birlikte A vitamini uygulanan grupta tespit edilmiştir (p<0,001). Elde edilen verilere göre, 24 s'lik uygulamada AFY'nin maksimum seviyede olmasına ve 48 s içerisinde AFY seviyesinin azalmasına bağlı olarak şekillendiği kanaatine varılmıştır. Abdelhamid vd. (2017), at periferel mononükleer kan hücrelerine, LPS ve LPS + retinoik asit uygulayarak, SAA salınımını incelemişler, LPS + retinoik asit ile indüklenen grupta, yalnızca LPS uygulanan gruba göre hücrelerden SAA sentezinin azaldığı tespit etmişlerdir. Abdelhamid vd. (2017), bu durumu retinoik asidin, hücreler üzerinde immunmodulatör etki oluşturması ile açıklamışlardır.

Tez çalışmasında kombine gruplarda, 24 saatlik dönemde SAA ekspresyonuna yalnızca bir grupta bakılırken, 48 saatlik dönemde ise dört farklı grupta incelenmiştir. Bu gruplarda gözlenen değerlerin negatif kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (p<0,001). Kombine gruplar arasında 10 µg/ml LPS + 50 ng/ml IL-1β + 7 µg/ml A vitamini ile 24 s boyunca indüklenen TESH'lerde SAA ekspresyon artışı 2200 kat olarak en yüksek değerde gözlenmiştir. Abdelhamid vd. (2017), atlarda yapılan *in vitro* bir çalışmada periferel mononükleer kan hücrelerine, LPS + retinoik asit uygulanan gruptaki hücrelerden IL-1β sentezinin, yalnızca LPS uygulanan gruba göre düştüğüne dikkat çekmişlerdir. He vd. (2020), farelerde yapmış olduğu *in vivo* bir çalışmada, A vitamini uygulamasından sonra proinflamatuvar sitokin ekspresyonunun düştüğünü tespit etmişlerdir. Konakçı üzerinde çeşitli etkilere sahip olan LPS'nin, AFY'yi başlatarak zararlı uyaran etkisi ile hücreleri proinflamatuvar sitokin üretmesi için indüklediği bildirilmiştir (Kent vd., 1998). Ancak A vitamini, hücrelerde proinflamatuvar etkilerin

kaybolmasına ve immunmodulator etkinin oluşmasına neden olarak sitokin sentezini azaltmaktadır (Abdelhamid vd., 2017). Bu çalışmada kombine gruplarda A vitamininin aynı etkiler oluşturarak, IL-1 $\beta$  sentezini azaltması sonucunda, SAA ekspresyonunun LPS ya da LPS + IL-1 $\beta$  uygulanan gruplara göre daha düşük gözlenmesi, literatürlerdeki bildirilen sonuçlar ile açıklanabilir. Bu çalışmadaki bulgulara göre, TESH'lerdeki SAA ekspresyonunun özellikle LPS konsantrasyonuna bağlı olduğunu, IL-1 $\beta$  ve A vitamininin SAA ekspresyonu üzerine tek başına uygulamalarda daha az etkileri olduğunu göstermiştir. Kombine gruplarda gözlenen SAA ekspresyonu memelilerde (Kent vd., 1998; Abdelhamid vd., 2017; He vd., 2020) ve balıklarda (Jorgensen vd., 2000; Gonçaves vd., 2012) açıklanan mekanizmaya benzer şekilde, özellikle LPS'nin dozuna bağımlı olarak, AFY'nin indüklenmesinde erken dönemde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Upragarin vd. (2005b), ergin yumurtacı tavuklarda, farklı konsantrasyonda LPS ile uyarılan SF'lerin kültür ortamındaki SAA protein konsantrasyonunu, ELISA ile ölçmüşler, 12 saatlik inkubasyon sonucunda, SAA düzeyinde 100 ng/ml, 24 saatlik inkubasyon sonucunda 200 ng/ml ve 48 saatlik inkubasyon sonucunda ise 400 ng/ml artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada ELISA ile yapılan 24 s ve 48 s ölçümlerinde, tüm deney gruplarının kültür ortamında, SAA protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, TESH'lerin kültür ortamında, ELISA analiz sistemi ile saptanamayan bir seviyede SAA proteini ürettiğini ya da çalışmada kullanılan izole edilmiş hücrelerin embriyonel döneme ait olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Günümüzde, SAA'nın intraartiküler sentezine yönelik yapılan *in vivo* ve *in vitro* araştırmalar devam etmektedir. Bunun yanı sıra, bildiğimiz kadarıyla tavuk embriyolarına ait SF'lerden SAA salınımının, *in vitro* koşullarda araştırılmasına yönelik yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile ilk kez TESH'lerde primer kültür, pasajlama ve karakterizasyon gibi uygun bir hücre kültürü sistemi oluşturularak, SAA'nın salınımı moleküler düzeyde değerlendirilmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Genel olarak bakıldığında, bu çalışmada elde edilen mevcut bulgular LPS ile uyarılan TESH hücrelerinde SAA üretimi üzerine immun sistemin ve A vitamininin de olumlu yönde etkisinin olduğunu göstermektedir. Amiloid artropatiye duyarlı olan kahverengi yumurtacı tavuk embriyolarından elde edilen TESH'ler AA amiloidozis için uygun bir çalışma modelini temsil etmektedir. Embriyolarda bacak eklemlerinden izole edilen SF'lerin *in vitro* kültür modeli olarak kullanılmasının, kanatlı endüstrisinde önemli sağlık sorunları ve ekonomik kayıplara yol açan bacak hastalıklarının patojenezinin araştırılmasında önemli katkılar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca sonuçlar, SF'lerin patolojik süreçleri yönlendiren anahtar hücreler olduğunu öne süren ve kanatlı sağlığının izlenmesinde güvenilir bir parametre olduğu düşünülen SAA'nın, mRNA ekspresyonundaki artışının amiloid artropati oluşumunda önemli bir rolü olduğunu bildiren çalışmaları desteklemiş ve kanatlılarda amiloidozis oluşumundaki önemini vurgulamıştır.

İleride tavuklarda AA amiloidozis gelişimi ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda SAA konsantrasyonunun patojenezdeki rollerini tam olarak belirleyebilmek için SAA seviyesinin moleküler yöntemler ile daha sık ölçülmesi önerilmektedir. Ayrıca yapılacak olan çalışmalarda uygulanan ajanlara ve doza bağlı olarak akut ve kronik dönemdeki SAA sentezinin daha detaylı olarak incelenmesinin uygun olacağı kanısına varılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdelhamid, L., Hussein, H., Ghanem, M., Eissa, N. (2017). Retinoic acid-mediated anti-inflammatory responses in equine immune cells stimulated by LPS and allogeneic mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*, 114:225-232.
- Abdelkader, S.V., Gudding, R., Nordstoga, K. (1991). Clinical chemical constituents in relation to liver amyloidosis in serum producing horses. *J Comp Pathol*, 105:203-211.
- Akkoc, A., Kahraman, M.M. (2012). Matrix metalloproteinase expression in primary lung fibroblasts of layer type chickens. *Biotech Histochem*, 87:201-207.
- Akkoç, A., Yılmaz, R., Cangül, İ.T., Özyiğit, M.Ö. (2009). Pulmonary aspergillosis and amyloid accumulation in an ostrich (*Struthio camelus*). *Turk J Vet Anim Sci*, 33:157-160.
- Alasonyalılar, A., Sevimli, A., Mısırlıoğlu, D., Uğuz, C. (2006). Chronic amyloid arthropathy and increased serum amyloid levels in brown layers. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50:557-560.
- Alizadeh-Khiavi, K., Normand, J., Chronopoulos, S., Ali, A., Ali-Khan, Z. (1992). Amyloid enhancing factor activity is associated with ubiquitin. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 420:139-148.
- Alsemgeest, S.P., Lambooy, I.E., Wierenga, H.K., Dieleman, S.J., Meerkerk, B., Van Ederen, A.M., Niewold, T.A. (1995). Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves. *Vet Q*, 17:9-12.
- Amer, M.M., Mekky, H.M., Fedawy, H.S. (2019). Molecular identification of *Mycoplasma synoviae* from breeder chicken flock showing arthritis in Egypt. *Vet World*, 12:535-541.
- Ancsin, J.B., Kisilevsky, R. (1997). Characterization of high affinity binding between laminin and the acute-phase protein, serum amyloid A. *J Biol Chem*, 272:406-413.
- Anderson, M.J., Ibrahim, A.S., Cooper, B.R., Woolcock, A.D., Moore, G.E., Taylor, S.D. (2020). Effects of administration of ascorbic acid and low-dose hydrocortisone after infusion of sublethal doses of lipopolysaccharide to horses. *J Vet Intern Med*, 34:2710-2718.
- Axelrad, M., Kisilevsky, R., Beswetherick, S. (1975). Acceleration of amyloidosis by syngeneic spleen cells from normal donors. *Am J Pathol*, 78:277-284.
- Barland, P., Novikoff, A.B., Hamerman, D. (1962). Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol*, 14:207-220.
- Bartok, B., Firestein, G.S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, 233:233-255.

- Baumal, R., Sklar, S., Wilson, B., Laskov, R. (1978). Casein-induced murine amyloidosis: amyloidogenesis in vitro by monolayer spleen explants of casein injected mice. *Lab Invest*, 39:632-639.
- Beatty, J.A., Barrs, V.R., Martin, P.A., Nicoll, R.G., France, M.P., Foster, S.F., Lamb, W.A., Malik, R. (2002). Spontaneous hepatic rupture in six cats with systemic amyloidosis. *J Small Anim Pract*, 43:355-363.
- Beems, R.B., Gruys, E., Spit, B.J. (1978). Amyloid in the corpora amyloacea of the rat mammary gland. *Vet Pathol*, 15:347-352.
- Benditt, E.P., Eriksen, N. (1964). Starch gel electrophoretic analysis of some proteins extracted from amyloid. *Arch Pathol*, 78:325-330.
- Benditt, E.P., Eriksen, N. (1977). Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:4025-4028.
- Benditt, E.P., Eriksen, N., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H. (1971). The major proteins of human and monkey amyloid substance: common properties including unusual N-terminal amino acid sequences. *FEBS Lett*, 19:169-173.
- Bennhold, H. (1922). Eine spezifische amyloidfärbung mit kongorot. *Muench Med Wochenschr*, 2:1537-1538.
- Berg, L.C., Thomsen, P.D., Andersen, P.H., Jensen, H.E., Jacobsen, S. (2011). Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 144:155-159.
- Betts, J.C., Cheshire, J.K., Akira, S., Kishimoto, T., Woo, P. (1993). The role of NF-kappa B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *J Biol Chem*, 268:25624-25631.
- Biescas, E., Jiron, W., Climent, S., Fernandez, A., Perez, M., Weiss, D.T., Solomon, A., Lujan, L. (2009). AA amyloidosis induced in sheep principally affects the gastrointestinal tract. *J Comp Pathol*, 140:238-246.
- Blanco, A.E., Barz, M., Icken, W., Cavero, D., Mazaheri, A., Voss, M., Schmutz, M., Preisinger, R. (2016). Twenty years of amyloid arthropathy research in chickens. *Worlds Poult Sci J*, 72:495-508.
- Bochsler, P.N., Slauson, D.O. (2002). Inflammation and Repair of Tissue. In: Mechanism of Disease. A Textbook of Comparative General Pathology. Eds: Slauson, D.O., Cooper, B.J., Mosby, St Louis, USA, p:223-225.
- Bradshaw, R.H., Kirkden, R.D., Broom, D.M. (2002). A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. *Avian Poult Biol Rev*, 13:45-103.

- Braga, J.F.V., Chanteloup, N.K., Trotureau, A., Baucheron, S., Guabiraba, R., Ecco, R., Schouler, C. (2016). Diversity of *Escherichia coli* strains involved in vertebral osteomyelitis and arthritis in broilers in Brazil. *BMC Vet Res*, 12:1-12.
- Brayton, C. (1992). Amyloidosis, hemochromatosis, and atherosclerosis in a roseate flamingo (*Phoenicopterus ruber*). *Ann N Y Acad Sci*, 653:184-190.
- Brunet, A., Combet-Curt, J., Ayoub, J.Y., Pouzot-Nevoret, C. (2023). A case of suspected amyloid storm in a dog. *Rev Vet Clin*, 227:1-6.
- Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Yoder, H.W. (1991). Diseases of Poultry. 9<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press, Ames.
- Ceribasi, A.O., Eroksuz, Y., Ceribasi, S., Ozer, H. (2009). Generalized AA amyloidosis and fibrino-hemorrhagic pancreatitis in a *Gazelle subgutturosa*: a case report. *Vet Med*, 54:340-344.
- Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Martynez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats; current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*, 34:85-99.
- Chamanza, R., Toussaint, M.J., Van Ederen, A.M., Van Veen, L., Hulskamp-Koch, C., Fabri, T.H. (1999). Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet Q*, 21:158-162.
- Chen, H., Zhu, D., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Liu, Y., Zhang, L., Yu, Y., Chen, X., Cheng, A. (2019). Amyloid A amyloidosis secondary to avian tuberculosis in naturally infected domestic pekin ducks (*Anas platyrhynchos domestica*). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 63:136-141.
- Cheng, N., Liang, Y., Du, X., Ye, R.D. (2018). Serum amyloid A promotes LPS clearance and suppresses LPS-induced inflammation and tissue injury. *EMBO Rep*, 19:e45517.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., Dobson, C.M. (1999). Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:3590-3594.
- Chung, T.F., Sipe, J.D., McKee, A., Fine, R.E., Schreiber, B.M., Liang, J.S., Johnson, R.J. (2000). Serum amyloid A in Alzheimer's disease brain is predominantly localized to myelin sheaths and axonal membrane. *Amyloid*, 7:105-110.
- Clark, L., Seawright, A.A. (1969). Generalised amyloidosis in seven cats. *Path Vet*, 6:117-134.

- Ciftci, A., Diker, K.S. (2009) The role of enterococcal virulence factors on experimental amyloid arthropathy in chickens. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15:903-908.
- Cohen, A.S., Calkins, E. (1959). Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, 183:1202-1203.
- Connolly, M., Marrelli, A., Blades, M., McCornick, J., Maderna, P., Godson, C., Mullan, R., FitzGerald, O., Bresnihan, B., Pitzalis, C., Veale, D.J., Fearon, U. (2010). Acute serum amyloid A induces migration, angiogenesis, and inflammation in synovial cells in vitro and in a human rheumatoid arthritis/SCID mouse chimera model. *J Immunol*, 184:6427-6437.
- Cunnane, G. (2001). Amyloid precursors and amyloidosis in inflammatory arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 13:67-73.
- Daum, R.S., Davis, W.H., Farris, K.B., Campeau, R.J., Mulvihill, D.M., Shane, S.M. (1990). A model of *Staphylococcus aureus* bacteremia, septic arthritis, and osteomyelitis in chickens. *J Orthop Res*, 8:804-813.
- Dayı, B., Sevimli, A. (2022). Approach to acute phase reactions in the aspects of pathology and general situation in Turkey. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 11:132-138.
- De Beer, F.C., Mallya, R.K., Fagan, E.A., Lanham, J.G., Hughes, G.R., Pepys, M.B. (1982). Serum amyloid-A protein concentration in inflammatory diseases and its relationship to the incidence of reactive systemic amyloidosis. *Lancet*, 2:231-234.
- De Beer, M.C., Webb, N.R., Wroblewski, J.M., Noffsinger, V.P., Rateri, D.L., Ji, A., Van Der Westhuyzen, D.R., De Beer, F.C. (2010). Impact of serum amyloid A on high density lipoprotein composition and levels. *J Lipid Res*, 51:3117-3125.
- De Buck, M., Gouwy, M., Wang, J.M., Van Snick J., Proost, P., Struyf, S., Van Damme, J. (2016). The cytokine-serum amyloid A-chemokine network. *Cytokine Growth Factor Rev*, 30:55-69.
- Dember, L.M. (2005). Emerging treatment approaches for the systemic amyloidosis. *Kidney Int*, 68:1377-1390.
- Derebe, M.G., Zlatkov, C.M., Gattu, S., Ruhn, K.A., Vaishnava, S., Diehl, G.E., MacMillan, J.B., Williams, N.S., Hooper, L.V. (2014). Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection. *Elife*, 3:e03206.
- Dhillon, V., Woo, P., Isenberg, D. (1989). Amyloidosis in the rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 48:696-701.
- Dias, J.L., Montau, R.J. (1994). Staphylococcosis in captive exotic waterfowl. *Avian Pathol*, 23:659-669.

- DiBartola, S.P., Tarr, M.J., Webb, D.M., Giger, U. (1990). Familial renal amyloidosis in Chinese Shar Pei dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 15:483-487.
- Dieter, B.P., Meek, R.L., Anderberg, R.J., Cooney, S.K., Bergin, J.L., Zhang, H., Nair, V., Kretzler, M., Brosius, F.C., Tuttle, K.R. (2019). Serum amyloid A and Janus kinase 2 in a mouse model of diabetic kidney disease. *PloS One*, 14:e0211555.
- Dijkman, R., Feberwee, A., Landman, W.J.M. (2013). Validation of a previously developed quantitative polymerase chain reaction for the detection and quantification of *Mycoplasma synoviae* in chicken joint specimens. *Avian Pathol*, 42:100-107.
- Dillehay, D.L., Walia, A.S., Lamon, E.W. (1988). Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *J Leukoc Biol*, 44:353-360.
- Eanes, E.D., Glenner, G.G. (1968). X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem*, 16:673-677.
- Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L. (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec*, 148:35-41.
- Edwards, H.M.Jr. (2000). Nutrition and skeletal problems in poultry. *Poult Sci*, 79:1018-1023.
- Erk, O., Turfanda, T., Uysal, V. (1995). Frequency of renal amyloidosis secondary to tuberculosis. *Nephron*, 71:367.
- Falconer, J., Murphy, A.N., Young, S., Clark, A.R., Tiziani, S., Guma, M., Buckley, C.D. (2018). Synovial cell metabolism and chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 70:984-999.
- Falker-Gieske, C., Nora-Fabienne, P., Spourita, M., Gilthorpe, J.D., Gustmann, K., Tetens, J. (2022). Resistance to chicken amyloid arthropathy is associated with a dysfunctional mutation in serum amyloid A. *FASEB J*, 37:e22700.
- Fanqi, Z., Baoying, L., Kaitao, W., Quanquan, T., Chenxia, Y., Jing, L. (2022). Isolation and identification of fibroblast-like synoviocytes from tree shrews and establishment of TLR8 pathway related molecular detection methods. *Chinese J Tissue Eng Res*, 26:3721-3727.
- Farnsworth, G.A., Miller, S. (1985). An unusual morphologic form of hepatic amyloidosis in a goat. *Vet Pathol*, 22:184-186.
- Fernandez, A., Mensua, C., Biescas, E., Lujan, L. (2003). Clinicopathological features in ovine AA amyloidosis. *Res Vet Sci*, 75:203-208.
- Freshney, R.I. (2010). Culture of Animal Cells. A Manual of Basics Technique and Specialized Applications. Wiley-Blackwell, New Jersey.

- Friedreich, N., Kekule, A. (1859). Zur amyloidfrage. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol*, 16:50-65.
- Fussel, D., Bizikova, P., Breuhaus, B., Harris, R.A., Moore, A.R., Chen, L., Linder, K.E. (2021). Bullous amyloidosis in a horse: first description in veterinary medicine. *Vet Dermatol*, 32:374-378.
- Gaffney, P.M., Barr, B., Rowe, J.D., Bett, C., Drygiannakis, I. Giannitti, F., Trejo, M., Ghassemian, M., Martin, P., Masliyah, E., Sigurdson, C.J. (2015). Protein profiling of isolated uterine AA amyloidosis causing fetal death in goats. *FASEB J*, 29:911-919.
- Ganowiak, K., Hultman, P., Engström, U., Gustavsson, A., Westermark, P. (1994). Fibrils from synthetic amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice. *BBRC*, 199:306-312.
- Gentle, M.J., Bradbury, J.M., Wilson, S. (2003). Sensory properties of articular afferents following Mycoplasma arthritis in the chicken. *Brain Res*, 968:26-34.
- Georgin-Lavialle, S.G., Savey, L., Buob, D., Bastard, J.P., Fellahi, S., Karras, A., Boffa, J.J., Grateau, G., Collaborators. (2023). French practical guidelines for the diagnosis and management of AA amyloidosis. *Rev Med Interne*, 44:62-71.
- Ghadially, F.N., Roy, S. (1967). Ultrastructure of synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 26:426-443.
- Glenner, G.G. (1980). Amyloid deposits and amyloidosis. The  $\beta$  fibrilloses. *NEJM*, 302:1283-1292.
- Glenner, G.G., Harbaugh, J., Ohma, J.I., Harada, M., Cuatrecasas, P. (1970). An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. *BBRC*, 41:1287-1289.
- Glenner, G.G., Ein, D., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Terry, W., Page, D.L. (1971). Creation of amyloid fibrils from Bence Jones proteins *in vitro*. *Science*, 174:712-714.
- Glisson, F. (1654). Anatomia Hepatis: Cui Praemittuntur Quaedam Ad Rem Anatomicam Universe Spectantia. Et Ad Calcem Operis Subjiciuntur Nonnulla de Lymphae-ductibus Nuper Repertis, London.
- Goldring, M.B. (2000). The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43:1916-1926.
- Gonçalves, A.F., Pascoa, I., Neves, J.V., Coimbra, J., Vjayan, M.M., Rodrigues, P., Wilson, J.M. (2012). The inhibitory effect of environmental ammonia on *Danio rerio* LPS induced acute phase response. *DCI*, 36:279-288.

- Goto, T., Miyazaki, Y., Nakayamada, S., Shiraishi, N., Yoshinaga, T., Tanaka, Y., Nakamura, T. (2023). Down-regulated Th17 cells in a patient with familial Mediterranean fever associated with amyloid A amyloidosis in the treatment of canakinumab. *Mod Rheumatol Case Rep*, 7:237-242.
- Göttgens, B., Green, A.R. (1995). Retinoic acid and the differentiation of lymphohaemopoietic stem cells. *Bioessays*, 17:187-189.
- Gregersen, R.H., Petersen, A., Christensen, H., Bisgaard, M. (2010). Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolates demonstrating different lesion types in broiler breeders. *Avian Pathol*, 39:435-440.
- Gruys, E. (1977). Amyloidosis in the bovine kidney. *Vet Sci Commun*, 1:265-276.
- Gruys, E., Obwolo, M.J., Toussaint, M.J.M. (1994). Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull*, 64:1009-1018.
- Guo, J.T., Aldirch, C.E., Mason, W.J., Pugh, J.C. (1996). Characterization of serum amyloid A protein mRNA expression and secondary amyloidosis in the domestic duck. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:14548-14553.
- Guo, R., Li, Z., Zhou, X., Huang, C., Hu, Y., Geng, S., Chen, X., Li, Q., Pan, Z., Jiao, X. (2019). Induction of arthritis in chickens by infection with novel virulent *Salmonella pullorum* strains. *Vet Microbiol*, 228: 165-172.
- Hameed, S.S., Ulaiwi, A.H., Hamad, S.M. (2022). Diagnosis of *E. coli* isolated from arthritis in chickens by vitek and molecular methods. *Iraqi J Agric Sci*, 53:141-146.
- Hardardottir, I., Sipe, J., Moser, A.H., Fielding, C.J., Feingold, K.R., Grünfeld, C. (1997). LPS and cytokines regulate extra hepatic mRNA levels of apolipoproteins during the acute phase response in Syrian hamsters. *Biochim Biophys Acta*, 1344:210-220.
- Hawkins, P.N., Pepys, M.B. (1990). A primed state exists *in vivo* following histological regression of amyloidosis. *Clin Exp Immunol*, 81:325-328.
- Hayden, D.W., Johnson, K.H., Wolf, C.B., Westermarck, P. (1988). AA amyloid-associated gastroenteropathy in a horse. *J Comp Pathol*, 98:195-204.
- Hazenbergh, B.P., Van Rijswijk, M.H. (1994). Clinical and therapeutic aspects of AA amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol*, 8:661-690.
- He, C., Hu, X., Xiao, D., Wu, J., Zhou, S., Deng, J., Xu, S., Huang, Y., Peng, M., Yang, X. (2020). Vitamin A prevents lipopolysaccharide-induced injury on tight junctions in mice. *Food Sci Nutr*, 8:1942-1948.
- Hebert, L., Gervais, F. (1990). Apo-SAA1/apo-SAA2 isotype ratios during casein- and amyloid-enhancing-factor-induced secondary amyloidosis in A/J and C57BL/6J mice. *Scand J Immunol*, 31:167-173.

- Hinton, M. (1981). Kidney disease in the rabbit: a histological survey. *Lab Anim*, 15:263-265.
- Hoffman, A.M., Leighton, F.A. (1985). Hemograms and microscopic lesions of herring gulls during captivity. *J Am Vet Med Assoc*, 187:1125-1128.
- Hol, P.R., Snel, F.W.J.J., Draaijer, M., Gruys, E. (1987). The serum amyloid A stimulating factor (SAASF) in the hamster. *J Comp Pathol*, 97:677-685.
- Horiuchi, N., Kotani, Y., Koga, M., Yamada, M., Kobayashi, Y., Matsui, T. (2008). Experimental induction of amyloidosis by bovine amyloid fibrils in Sore Hock rabbits. *Amyloid*, 15:84-88.
- Husby, G. (1985). Amyloidosis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 3:173-180.
- Husby, G. (1994). Classification on amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol*, 8:503-511.
- Husby, G., Natvig, J.B. (1974). A serum component related to nonimmunoglobulin amyloid protein AS, a possible precursor of the fibrils. *J Clin Invest*, 53:1054-1061.
- Husby, G., Araki, S., Benditt, E.P., Benson, M.D., Cohen, A.S., Frangione, B., Glenner, G.G., Natvig, J.B., Westermarck, P. (1993). Nomenclature of amyloid and amyloidosis. *Bull World Health Organ*, 71:105-112.
- Husebekk, A., Skogen, B., Husby, G., Marhaug, G. (1985). Transformation of amyloid precursor SAA to protein AA and incorporation in amyloid fibrils *in vivo*. *Scand J Immunol*, 21:283-287.
- IACUC, (2016). Policy for Use of Avian Embryos. Erişim [<https://www.brown.edu/research/sites/research/files/policies/avian-embryo-use-policy-and-notification-form.pdf>]. Erişim Tarihi: 04.11.2022.
- Jacobsen, S., Niewold, T.A., Halling-Thomsen, M., Nanni, S., Olsen, E., Lindegaard, C., Andersen, P.H. (2006). Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet Immunol Immunopathol*, 110:325-330.
- Jacobsen, S., Ladefoged, S., Berg, L.C. (2016). Production of serum amyloid A in equine articular chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes treated with proinflammatory cytokines and its effects on the two cell types in culture. *Am J Vet Res*, 77:50-58.
- Janssen, S. (1985). Clinical and diagnostic features of amyloidosis. University of Groningen, PhD thesis, Netherlands.
- Jarad, A.S., Al-Kubaisi, S.M.A., Abdulkhaliq, R.J., Hasan, M.S. (2020). Bacteriological and pathological study on kidneys of slaughtered sheep in Fallujah city. *Indian J Forensic Med Toxicol*, 14: 716-722.

- Jensen, L.E., Whitehead, A.S. (1998). Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J*, 334:489-503.
- Jones, R.C., Guneratne, J.R.M., Georgiou, K. (1981). Isolation of viruses from outbreaks of suspected tenosynovitis (viral arthritis) in chickens. *Res Vet Sci*, 31:100-103.
- Jorgensen, J.B., Lunde, H., Jensen, L., Whitehead, A.S., Robertsen, B. (2000). Serum amyloid A transcription in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) hepatocytes is enhanced by stimulation with macrophage factors, recombinant human IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  or bacterial lipopolysaccharide. *Dev Comp Immunol*, 24:553-563.
- Jumeau, C., Awad, F., Assrawi, E., Cobret, L., Duquesnoy, P., Giurgea, I., Valeyre, D., Grateau, G., Amselem, S., Bernaudin, J.F., Karabina, S.A. (2019). Expression of SAA1, SAA2 and SAA4 genes in human primary monocytes and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 14:e0217005.
- Jung, J.Y., Kim, Y.B., Kim, J.W., Suh, C.H., Kim, H.A. (2021). Biologic therapy for amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis treated with interleukin 6 therapy. *Medicine*, 32:e26843.
- Kadota, A., Iwaide, S., Miyazaki, S., Mitsui, I., Machida, N., Murakami, T. (2020). Pathology and proteomics-based diagnosis of localized light-chain amyloidosis in dogs and cats. *Vet Pathol*, 57:658-665.
- Kalmovarin, N., Friedrichs, W.E., O'Brien, H.V., Linehan, L.A., Bowman, B.H., Yang, F. (1991). Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. *Inflammation*, 15:369-379.
- Kameyama, M., Ishikawa, Y., Shibahara, T., Kadota, K. (2003). Plasma cell myeloma producing IgG, IgM, and IgA immunoglobulins in a cow. *J Vet Diagn Invest*, 15:166-169.
- Kapakin, K.A.T., Kapakin, S., Kutsal, O. (2007). Investigation of experimental *Enterococcus faecalis* amyloid arthropathy in chickens. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51:525-529.
- Katz, D.R., Dryzmala, M., Turton, J.A. (1987). Regulation of accessory cell function by retinoids in murine immune responses. *Br J Exp Pathol*, 68:343-350.
- Kent, L.W., Rahemtulla, F., Hockett, R.D., Gilleland, R.C., Michalek, S.M. (1998). Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. *Infect Immun*, 66:608-614.
- Kim, D.Y., Taylor, H.W., Eades, S.C., Cho, D.Y. (2005). Systemic AL amyloidosis associated with multiple myeloma in a horse. *Vet Pathol*, 42:81-84.

- Kisilevsky, R., Lemieux, L.J., Fraser, P.E., Kong, X., Hultin, P.G., Szarek, W.A. (1995). Arresting amyloidosis *in vivo* using small-molecule anionic sulphonates or sulphates: implications for Alzheimer's disease. *Nat Med*, 1:143-148.
- Koivuniemi, R., Paimela, L., Suomalainen, R., Tornroth, T., Leirisalo-Repo, M. (2008). Amyloidosis is frequently undetected in patients with rheumatoid arthritis. *Amyloid*, 15:262-268.
- Konstandi, M., Sotiropoulos, I., Matsubara, T., Malliou, F., Katsogridaki, A., Andriopoulou, C.E., Gonzalez, F.J. (2019). Adrenoceptor-stimulated inflammatory response in stress-induced serum amyloid A synthesis. *Psychopharmacology (Berl)*, 236:1687-1699.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. (2014). Robbins Basic Pathology. 9<sup>th</sup> ed., Elsevier, Philadelphia.
- Kuroda, T., Tanabe, N., Kobayashi, D., Sato, H., Wada, Y., Murakami, S., Saeki, T., Nakano, M., Narita, I. (2012). Treatment with biologic agents improves the prognosis of patients with rheumatoid arthritis and amyloidosis. *J Rheumatol*, 39:1348-1354.
- Landman, W.J.M. (1999a). Amyloid arthropathy in chickens. *Vet Quart*, 21:78-82.
- Landman, W.J.M., Feberwee, A. (2001). Field studies on the association between amyloid arthropathy and *Mycoplasma synoviae* infection, and experimental reproduction of the condition in brown layers. *Avian Pathol*, 30:629-639.
- Landman, W.J.M., Gruys, E., Dwars, R.M. (1994). A syndrome associated with growth depression and amyloid arthropathy in layers: a preliminary report. *Avian Pathol*, 23:461-470.
- Landman, W.J.M., Gruys, E., Gielkens, A.L.J. (1998a). Avian amyloidosis. *Avian Pathol*, 27:437-449.
- Landman, W.J.M., Sletten, K., Koch, C.A.M., Tooten, P.C.J., Gruys, E. (1996). Chicken joint amyloid protein is of the AA-type. Characterization of the amyloid protein. *Scand J Immunol*, 43:210-218.
- Landman, W.J.M., Peperkamp, N.H.M.T., Koch, C.A.M., Tooten, P.C.J., Crauwels, P.A.P., Gruys, E. (1997). Induction of amyloid arthropathy in chickens. *Amyloid*, 4:87-97.
- Landman, W.J.M., vd Bogaard, A.E.J.M., Doornenbal, P., Tooten, P.C.J., Elbers, A.R.W., Gruys, E. (1998b). The role of various agents in chicken amyloid arthropathy. *Amyloid*, 5:266-278.
- Landman, W.J.M., Mekkes, D.R., Chamanza, R., Doornenbal, P., Gruys, E. (1999b). Arthropathic and amyloidogenic *Enterococcus faecalis* infections in brown layers: a study on infection routes. *Avian Pathol*, 28:545-557.

- Landman, W.J.M., Veldman, K.T., Mevius, D.J., Doornenbal, P. (2000). Contamination of Marek's disease vaccine suspensions with *Enterococcus faecalis* and its possible role in amyloid arthropathy. *Avian Pathol*, 29:21-25.
- Landman, W.J.M., Feberwee, A., Veldman, K.T., Mevius, D.J. (2001). Epidemiology: study on the vertical transmission of arthropathic and amyloidogenic *Enterococcus faecalis* in a flock of brown layer chickens. *Vet Q*, 23:88-91.
- Landman, W.J.M., Veldman, K.T., Mevius, D.J., van Eck, J.H.H. (2003). Investigations of *Enterococcus faecalis*-induced bacteraemia in brown layer pullets through different inoculation routes in relation to the production of arthritis. *Avian Pathol*, 32:463-471.
- Laufer, A., Tal, C., Kolander, N. (1968). Experimental amyloidosis and the effect of cortisone treatment. *Path Microbiol*, 31: 85-92.
- Lehtolainen, T., Rontved, C., Pyörala, S. (2004). Serum amyloid A and TNF- $\alpha$  in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. *Vet Res*, 35:651-659.
- Lever, J.D., Ford, E.H. (1958). Histological, histochemical and electron microscopic observations on synovial membrane. *Anat Rec*, 132:525-539.
- Levin, M., Pras, M., Franklin, E.C. (1973). Immunologic studies of the major nonimmunoglobulin protein of the amyloid. Identification and partial characterization of a related serum component. *J Exp Med*, 138:373-380.
- Li, X., Liao, W.S.L. (1992). Cooperative effects of C/EBP-like and NF kappa B-like bindings sites on rat serum amyloid A1 gene expression in liver cells. *Nucleic Acids Res*, 20:4765-4772.
- Li, K.C., Ho, Y.L., Hsieh, W.T., Huang, S.S., Chang, Y.S., Huang, G.J. (2015). Apigenin-7-glycoside prevents LPS-induced acute lung injury via downregulation of oxidative enzyme expression and protein activation through inhibition of MAPK phosphorylation. *Int J Mol Sci*, 16:1736-1754.
- Liang, J.S., Sloane, J.A., Wells, J.M., Abraham, C.R., Fine, R.E., Sipe, J.D. (1997). Evidence for local production of acute phase response apolipoprotein serum amyloid A in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett*, 225:73-76.
- Liepnieks, J.J., Dibartola, S.P., Benson, M.D. (1996). Systemic immunoglobulin (AL) amyloidosis in a cat: complete primary structure of a feline lambda light chain. *Amyloid*, 3:177-182.
- Lin, Y., Rajala, M.W., Berger, J.P., Moller, D.E., Barzilai, N., Scherer, P.E. (2001). Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. *J Biol Chem*, 276:42077-42083.
- Lings, Y.D. (1992). Experimental production of amyloidosis in ducks. *Avian Pathol*, 21:141-145.

- Linke, R.P., Hol, P.R., Geisel, O. (1986). Immunohistochemical identification of generalized AA-amyloidosis in a mountain gazelle (*Gazella gazella*). (1986). *Vet Pathol*, 23:63-67.
- Linke, R.P., Bock, V., Valet, G., Rothe, G. (1991). Inhibition of the oxidative burst response of N-formyl peptide-stimulated neutrophils by serum amyloid-A protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 176:1100-1105.
- Liu, Y., Cui, D., Hoshii, Y., Kawano, H., Une, Y., Gondo, T., Ishihara, T. (2007). Induction of murine AA amyloidosis by various homogeneous amyloid fibrils and amyloid-like synthetic peptides. *Scand J Immunol*, 66:495-500.
- Liu, J., Wang, D., Li, S.Q., Yu, Y., Ye, R.D. (2016). Suppression of LPS-induced tau hyperphosphorylation by serum amyloid A. *J Neuroinflammation*, 13:28.
- Liu, R., Xu, B., Yu, S., Zhang, J., Sun, H., Liu, C., Lu, F., Pan, Q., Zhang, X. (2020). Integrated Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Interaction Between Chicken Synovial Fibroblasts and *Mycoplasma synoviae*. *Front Microbiol*, 11:576.
- Loeven, K.O. (1994). Hepatic amyloidosis in two Chinese Shar Pei dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 204:1212-1216.
- Loewen, J.M., Cianciolo, R.E., Zhang, L., Yaeger, M., Ward, J.L., Smith, J.D., Levine, D.N. (2018). Concurrent renal amyloidosis and thymoma resulting in a fatal ventricular thrombus in a dog. *J Vet Intern Med*, 32:1160-1165.
- Lopes, M.C., Neto, O.C.F., Amaral, C.I., Lacerda, M.S.C., Fonseca, C.S., Martins, N.R.S., Ecco, R. (2022). Hepatic changes in *Gallus gallus domesticus* in Brazil. *Pesq Vet Bras*, 42:e07078.
- Lorenzo, A., Yankner, B. A. (1996). Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 777:89-95.
- Ludwig, E.K., Wiese, R.B., Graham, M.R., Tyler, A.J., Settlege, J.M., Were, S.R., Petersson-Wolfe, C.S., Kanevsky-Mullarky, I., Dahlgren, L.A. (2016). Serum and synovial fluid serum amyloid A response in equine models of synovitis and septic arthritis. *Vet Surg*, 45:859-867.
- Lundmark, K., Westermark, G.T., Olsen, A., Westermark, P. (2005). Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: cross-seeding as a disease mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:6098-6102.
- Maeda, M., Murakami, T., Muhammad, N., Inoshima, Y., Ishiguro, N. (2016). Experimental transmission of systemic AA amyloidosis in autoimmune disease and type 2 diabetes mellitus model mice. *Exp Anim*, 65:427-436.
- Maestrini, N., Pascucci, S. (1970). Amyloidosis in guinea fowl. *Atti Soc Ital Sci Vet*, 24:485-486.

- Marcon, A.V., De Oliveira, G.F., Caldara, F.R., Garcia, R.G., Matins, R.A., Marcon, A., Crone, C., Assuncion, A.S.A. (2019). Bacteriological and histopathological evaluation of articulations of chickens diagnosed with arthritis. *Braz J Poult Sci*, 21:1-4.
- Marhaug, G., Hackett, B., Dowton, S.B. (1997). Serum amyloid A gene expression in rabbit, mink and mouse. *Clin Exp Immunol*, 107:425-434.
- Maximow, A. (1898). Ueber die experimentell hervorgerufene amyloid-entartung der leber. *Virchows Arch*, 153:353-400.
- McCubbin, W.D., Kay, C.M., Narindrasorasak, S., Kisilevsky, R. (1988). Circular-dichroism studies on two murine serum amyloid A proteins. *Biochem J*, 256:775-783.
- McNamee, P.T., Smyth, J.A. (2000). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (femoral head necrosis) of broiler chickens: a review. *Avian Pathol*, 29:253-270.
- Meek, R.L., Benditt, E.P. (1986). Amyloid A gene family expression in different mouse tissues. *J Exp Med*, 164:2006-2017.
- Meek, R.L., Eriksen, N., Benditt, E. P. (1992). Murine serum amyloid A3 is a high density apolipoprotein and is secreted by macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:7949-7952.
- Meek, R.L., Urieli-Shoval, S., Benditt, E.P. (1994). Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:3186-3190.
- Mensua, C., Carrasco, L., Bautista, M.J., Biescas, E., Fernandez, A., Murphy, C.L., Weiss, D.T., Solomon, A., Lujan, L. (2003). Pathology of AA amyloidosis in domestic sheep and goats. *Vet Pathol*, 40:71-80.
- Mısırlıoğlu, D., Çarlı, K.T., Sevimli, A., Petek, M. (2001). Broyler piliçlerde bacak problemlerine patolojik bakteriyolojik ve serolojik bir yaklaşım. *Vet Bil Derg*, 17:101-108.
- Migita, K., Eguchi, K., Tsukada, T., Kawabe, Y., Takashima, H., Mine, M., Aoyagi, T., Ichinose, Y., Nagataki, S. (1996). Increased circulating serum amyloid A protein derivatives in rheumatoid arthritis patients with secondary amyloidosis. *Lab Invest*, 75:371-375.
- Migita, K., Abiru, S., Nakamura, M., Komori, A., Yoshida, Y., Yokoyama, T., Daikoku, M., Ueki, T., Takii, Y., Yano, K., Yastuhashi, H., Eguchi, K., Ishibashi, H. (2004). Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. *FEBS Lett*, 569:235-239.

- Miller, M.A., Zachary, J.F. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. Ed: Zachary, J.F., St Louis, Missouri, Elsevier, p:30-31.
- Mitchell, T.I., Brinckerhoff, C.E. (1995). Saturable, high affinity binding of serum amyloid A (SAA3) to rabbit fibroblasts. *Amyloid: Int J Exp Clin Investt*, 2:83-91.
- Mitchell, T.I., Coon, C.I., Brinckerhoff, C.E. (1991). Serum amyloid A (SAA3) produced by rabbit synovial fibroblasts treated with phorbol esters or interleukin-1 induces synthesis of collagenase and is neutralized with specific antiserum. *J Clin Invest*, 87:1177-1185.
- Mitchell, T.I., Jeffrey, J.J., Palmiter, R.D., Brinckerhoff, C.E. (1993). The acute phase reactant serum amyloid A (SAA3) is a novel substrate for degradation by the metalloproteinases collagenase and stromelysin. *Biochim Biophys Acta*, 1156:245-254.
- Miyoshi, T., Ono, A., Shimada, K., Murakami, T. (2019). Experimental model of oral transmissible AA amyloidosis in quails. *Avian Pathol*, 48:521-527.
- Morrow, J.F., Stearman, R.S., Peltzman, C.G., Potter, D.A. (1981). Induction of hepatic synthesis of serum amyloid A protein and actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:4718-4722.
- Murakami, T., Inoshima, Y., Watanabe, K.I., Kobayashi, Y., Matsui, T., Kurazono, H., Ishiguro, N. (2011). Pathogenesis of experimental amyloid protein A amyloidosis in sore hocks-affected rabbits. *Amyloid*, 18:112-118.
- Murakami, T., Inoshima, Y., Kobayashi, Y., Matsui, T., Inokuma, H. Ishiguro, N. (2012). Atypical AA amyloid deposits in bovine AA amyloidosis. *Amyloid*, 19:15-20.
- Murakami, T., Inoshima, Y., Sakamoto, E., Fukushi, H., Sakai, H., Yanai, T., Ishiguro, N. (2013a). AA amyloidosis in vaccinated growing chickens. *J Comp Pathol*, 149:291-297.
- Murakami, T., Muhammad, N., Inoshima, Y., Yanai, T., Goryo, M., Ishiguro, N. (2013b). Experimental induction and oral transmission of avian AA amyloidosis in vaccinated white hens. *Amyloid*, 20:80-85.
- Nakamura, K., Tanaka, H., Kodama, Y., Kubo, M., Shibahara, T. (1998). Systemic amyloidosis in laying Japanese quail. *Avian Dis*, 42:209-214.
- Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V.L., Kato, T., Doecke, J., Dore, V., Fowler, C., Li, Q.X., Martins, R., Rowe, C., Tomita, T., Matsuzaki, K., Ishii, K., Ishii, K., Arahata, Y., Iwamoto, S., Ito, K., Tanaka, K., Masters, C.L., Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 554:249-254.

- Nakayama, E.E., Ura, S., Fleury, R.N., Soares, V. (2001). Renal lesions in leprosy: a retrospective study of 199 autopsies. *Am J Kidney Dis*, 38:26-30.
- Nakayama, Y., Kamiie, J., Watanabe, G., Suzuki, K., Murakami, T. (2017). Spontaneous, experimentally induced, and transmissible AA amyloidosis in Japanese quail. *Vet Pathol*, 54:912-921.
- Neo-Suzuki, S., Mineshige, T., Kamiie, J., Kayanuma, H., Mochizuki, Y., Hisasue, M., Tsuchiya, R., Shirota, K. (2017). Hepatic AA amyloidosis in a cat: cytologic and histologic identification of AA amyloid in macrophages. *Vet Clin Pathol*, 46:331-336.
- Niewold, T.A., Hol, P.R., Van Andel, A.C.J., Lutz, E.T.G., Gruys, E. (1987). Enhancement of amyloid induction by amyloid fibril fragments in hamster. *Lab Invest*, 56:544-549.
- Niewold, T.A., Landeira, J.M.F., Van Den Heuvel, L.P.W.J., Ultee, A., Tooten, P.C.J., Veerkamp, J.H. (1991). Characterization of proteoglycans and glycosaminoglycans in bovine renal AA-type amyloidosis. *Virchows Arch B*, 60:321-328.
- Niewold, T.A., Murphy, C., Gruys, E., Weiss, D.T., Solomon, A. (1996). Equine light-chain associated amyloidosis. *Amyloid*, 3:183-186.
- Niewold, T.A., Van Der Linde-Sipman, J.S., Murphy, C., Tooten, P.C., Gruys, E. (1999). Familial amyloidosis in cats: Siamese and Abyssinian AA proteins differ in primary sequence and pattern of deposition. *Amyloid*, 6:205-209.
- Oh, J.Y., Kang, M.S., An, B.K., Song, E.A., Kwon, J.H., Kwon, Y.K. (2010). Occurrence of purulent arthritis broilers vertically infected with *Salmonella enterica* serovar enteritidis in Korea. *Poult Sci*, 89:2116-2122.
- O'Hara, R., Murphy, E.P., Whitehead, A.S., Fitzgerald, O., Bresnihan, B. (2000). Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res*, 2:142-144.
- O'Reilly, E.L., Burchmore, R.J., Sandilands, V., Sparks, N.H., Walls, C., Eckersall, P.D. (2013). The plasma proteome and acute phase proteins of broiler chickens with gait abnormalities. In: *Farm Anim Proteomics*. Eds: Rodrigues, P., Eckersall, D., De Almeida, A., Wageningen, p:177-180.
- Oskarsson, M.E., Paulsson, J.F., Schultz, S.W., Ingelsson, M., Westermarck, P., Westermarck, G.T. (2015). *In vivo* seeding and cross-seeding of localized amyloidosis: a molecular link between type 2 diabetes and Alzheimer disease. *Am J Pathol*, 185:834-846.
- Ostevik, L., De Souza, G.A., Wien, T.N., Gunnes, G., Sorby, R. (2014). Characterization of amyloid in equine recurrent uveitis as AA amyloid. *J Comp Pathol*, 151:228-233.

- Ovelgonne, J.H., Landman, W.J.M., Gruys, E. Gielkens, A.L.J., Peeters, B.P.H. (2001). Identical amyloid precursor proteins in two breeds of chickens which differ in susceptibility to develop amyloid arthropathy. *Amyloid*, 8:41-51.
- Ozaki, M., Furuta, M. (1975). Amyloidosis in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 43:116-124.
- Paredes, S., Girona, J., Hurt-Camejo, E., Vallve, J.C., Olive, S., Heras, M., Benito, P., Masana, L. (2002). Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers. *J Rheumatol*, 29:2271-2277.
- Peperkamp, N.H.M.T., Landman, W.J.M., Tooten, P.C.J., Ultee, A., Voorhout, W.F., Gruys, E. (1997). Light microscopic, immunohistochemical, and electron microscopic features of amyloid arthropathy in chickens. *Vet Pathol*, 34:271-278.
- Pepys, M.B., Dyck, R.F., DeBeer, F.C., Skinner, M., Cohen, A.S. (1979). Binding of serum amyloid P-component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin Exp Immunol*, 38:284-293.
- Perneckzy, R., Jessen, F., Grimmer, T., Levin, J., Flöel, A., Peters, O., Froelich, L. (2023). Anti-amyloid antibody therapies in Alzheimer's disease. *Brain*, 146:842-849.
- Petersen, A., Chadfield, M.S., Christensen, J.P., Christensen, H., Bisgaard, M. (2008). Characterization of small-colony variants of *Enterococcus faecalis* isolated from chickens with AA. *J Clin Microbiol*, 46 (8): 2686-2691.
- Petersen, A., Christensen, H., Philipp, H.C., Bisgaard, M. (2009). Clonality of *Enterococcus faecalis* associated with amyloid arthropathy in chickens evaluated by multilocus sequence typing (MLST). *Vet Microbiol*, 134:392-395.
- Petersen, A., Bisgaard, M., Christensen, H. (2010). Real-time PCR detection of *Enterococcus faecalis* associated with amyloid arthropathy. *Lett Appl Microbiol*, 51:61-64.
- Platz, S.J., Breuer, W., Geisel, O., Linke, R.P., Hermanns, W. (1997). Identification of  $\lambda$  light chain amyloid in eight canine and two feline extramedullary plasmacytomas. *J Comp Path*, 116:45-54.
- Portela, R.A., Dantas, A.F.M., De Melo, D.B., Marinho, J.M., Neto, P.I.N., Riet-Correa, F. (2012). Nasal amyloidosis in a horse. *BJVP*, 5:86-88.
- Pras, M., Schubert, M., Zucker-Franklin, D., Rimon, A., Franklin, E.C. (1968). The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest*, 47:924-933.

- Ramadori, G., Sipe, J.D., Colten, H.R. (1985a). Expression and regulation of the murine serum amyloid A (SAA) gene in extrahepatic sites. *J Immunol*, 135:3645-3647.
- Ramadori, G., Sipe, J.D., Dinarello, C.A., Mizel, S.B., Colten, H.R. (1985b). Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1. *J Exp Med*, 162:930-942.
- Rasheed, B.Y. (2011). Isolation and identification of bacteria causing arthritis in chickens. *IJVS*, 25:93-95.
- Ray, A., Schatten, H., Ray, B.K. (1999). Activation of Sp1 and its functional co-operation with serum amyloid A-activating sequence binding factor in synoviocyte cells trigger synergistic action of interleukin-1 and interleukin-6 in serum amyloid A gene expression. *J Biol Chem*, 274:4300-4308.
- Ritchlin, C. (2000). Fibroblast biology: effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res*, 2:356-360.
- Rokita, H., Shirahama, T., Cohen, A.S., Meek, R.L., Benditt, E.P., Sipe, J.D. (1987). Differential expression of the amyloid SAA 3 gene in liver and peritoneal macrophages of mice undergoing dissimilar inflammatory episodes. *J Immunol*, 139:3849-3853.
- Rosales, F.J., Ritter, S.J., Zolfaghari, R., Smith, J.E., Ross, A.C. (1996). Effects of acute inflammation on plasma retinol, retinol-binding protein, and its mRNA in the liver and kidneys of vitamin A-sufficient rats. *J Lipid Res*, 37:962-971.
- Rosenthal, C.J., Sullivan, L. (1978). Serum amyloid A: evidence for its origin in polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*, 62:1181-1186.
- Rubin, H. (1966). A substance in conditioned medium which enhances the growth of small numbers of chick embryo cells. *Exp Cell Res*, 41:138-148.
- Sack, G.H., Zink, M.C. (1992). Serum amyloid A gene transcription in synovial cells during retroviral arthritis. *Am J Pathol*, 141:525-529.
- Sadek, K., Saleh, E., Ayoub, M. (2017). Selective, reliable blood and milk biomarkers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Trop Anim Health Prod*, 49:431-437.
- Sato, A., Koga, T., Inoue, M., Goto, N. (1981). Pathological observations of amyloidosis in swans and other Anatidae. *Jpn J Vet Res*, 43:509-519.
- Schneider, R.R., Hunter, D.B., Waltner-Toews, D., Barker, I.K. (1988). A descriptive study of mortality at the Kortright Waterfowl Park:1982-1986. *Can Vet J*, 29:911-914.

- Schröder, R., Nennesmo, I., Linke, R.P. (2000). Amyloid in a multiple sclerosis lesion is clearly type. *Acta Neuropathol*, 100:709-711.
- Schulte, T., Chaves-Sanjuan, A., Mazzini, G., Speranzini, V., Lavatelli, F., Ferri, F., Palizzotto, C., Mazza, M., Milani, P., Nuvolone, M., Vogt, A.C., Vogel, M., Palladini, G., Merlini, G., Bolognesi, M., Ferro, S., Zini, E., Ricagno, S. (2022). Cryo-EM structure of ex vivo fibrils associated with extreme AA amyloidosis prevalence in a cat shelter. *Nat Commun*, 13:7041.
- Segev, G., Cowgill, L.D., Jessen, S., Berkowitz, A., Mohr, C.F., Aroch, I. (2012). Renal amyloidosis in dogs: a retrospective study of 91 cases with comparison of the disease between Shar-Pei and non Shar-Pei dogs. *J Vet Intern Med*, 26:259-268.
- Senturk, S., Ozyigit, O. (2006). Renal AA amyloidosis in a dairy cow in Turkey. *Vet Rec*, 158:448-449.
- Sevimli, A., Mısırlıoğlu, D., Özakın, C. (2004). *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen yumurtacı piliçlerde A vitamininin amiloid artropati oluşumunu arttırıcı etkisi. *Turk J Vet Anim Sci*, 28:131-138.
- Sevimli, A., Mısırlıoğlu, D., Polat, Ü., Yalçın, M., Akkoç, A., Uğuz, C. (2005). The effects of vitamin A, pentoxifylline and methylprednisolone on experimentally induced amyloid arthropathy in brown layer chicks. *Avian Pathol*, 34:143-149.
- Sevimli, A., Mısırlıoğlu, D., Yağcı, A., Bülbül, A., Yılmaztepe, A., Altunbaş, K. (2008). The role of chicken IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the occurrence of amyloid arthropathy. *Vet Res Commun*, 32:499-508.
- Sevimli, A., Yalcin, M., Cangul, I.T., Aydin, S. (2012). Investigation of serum amino acid and serum amyloid A concentrations in chickens with amyloid arthropathy. *Vet Q*, 32:17-23.
- Sevimli, A., Bülbül, T., Bülbül, A., Yağcı, A. (2013). Chicken amyloid arthropathy: serum amyloid A, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, tumour necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide profile in acute phase (12<sup>th</sup> hour). *Pol J Vet Sci*, 16:241-247.
- Shtrasburg, S., Pras, M., Rabinovich, E., Gal, R., Livneh, A., Lidar, M. (2012). Attempts at suppression of amyloidogenesis in a mouse model by a variety of anti-inflammatory agents. *Autoimmun Rev*, 12:18-21.
- Simms, R.W., Prout, M.N., Cohen, A.S. (1994). The epidemiology of AL and AA amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol*, 8:627-634.
- Singh, P.P., Singh, S., Kumar, B.V.S., Sethi, R.S., Verma, R. (2020). Serum amyloid A (SAA) mRNA expression in chicken and quails in response to bacterial stress. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 69:101421.

- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S.I., Merlini, G., Saraiva, M.J.M., Westermark, P. (2014). Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. *Amyloid*, 21:221-224.
- Skogen, B., Thorsteinsson, L., Natwig, J.B. (1980). Degradation of protein SAA to an AA-like fragment by enzymes of monocytic origin. *Scand J Immunol*, 11:533-540.
- Slauson, D.O., Gribble, D.H., Russell, S.W. (1970). A clinicopathological study of renal amyloidosis in dogs. *J Comp Pathol*, 80:335-342.
- Soto, C., Kindy, M.S., Baumann, M., Frangione, B. (1996). Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent  $\beta$ -sheet conformation. *BBRC*, 226:672-680.
- Soriano, S., Moffet, B., Wicker, E., Villapol, S. (2020). Serum amyloid A is expressed in the brain after traumatic brain injury in a sex-dependent manner. *Cell Mol Neurobiol*, 40:1199-1211.
- Spencer, S.P., Wilhelm, C., Yang, Q., Hall, J.A., Bouladoux, N., Boyd, A., Nutman, T.B., Urban, J.F., Wang, J., Ramalingam, T.R., Bhandoola, A., Wynn, T.A., Belkaid, Y. (2014). Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science*, 343:432-47.
- Stack, J.D., Coutsy, M., Steele, E., Handel, I., Lechartier, A., Vinardell, T., David, F. (2019). Comparison of serum amyloid A measurements in equine synovial fluid with routine diagnostic methods to detect synovial infection in a clinical environment. *Front Vet Sci*, 6:325.
- Stalker, M.J., Brash, M.L., Weisz, A., Ouckama, R.M., Slavic, D. (2010). Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *J Vet Diagn Invest*, 22:643-645.
- Stentjes, A., Veldman, K.T., Mevius, D.J., Landman, W.J.M. (2002). Molecular epidemiology of unilateral amyloid arthropathy in broiler breeders associated with *Enterococcus faecalis*. *Avian Pathol*, 31:31-39.
- Stepanets, V., Vernerova, Z., Vilhelmova, M., Geryk, J., Hejnar, J., Svoboda, J. (2001). Amyloid A amyloidosis in non-infected and avian leucosis virus-C persistently infected inbred ducks. *Avian pathol*, 30:33-42.
- Takahashi, M., Yokota, T., Kawano, H., Gondo, T., Ishihara, T., Uchino, F. (1989). Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 415:411-419.
- Tamura, Y., Chambers, J.K., Neo, S., Koshino, Y.G., Takagi, S., Uneyama, M., Uchida, K., Hisasue, M. (2020). Primary duodenal plasmacytoma with associated primary (amyloid light-chain) amyloidosis in a cat. *J Feline Med Surg Open Rep*, 21:1-7.

- Taniyama, H., Yamata, S., Sako, T., Hirayama, K., Higuchi, H., Nagahata, H. (2000). Systemic kappa AL amyloidosis associated with bovine leucocyte adhesion deficiency. *Vet Pathol*, 37:98-100.
- Tawfik, R.G., Khalil, S.A., Ellakany, H.F., Torkey, H.A. (2016). *Mycoplasma synoviae* and other associated bacteria causing arthritis in chicken. *AJVS*, 49:163-169.
- Tei, M., Uchida, K., Chambers, J.K., Watanabe, K.I., Tamamoto, T., Ohno, K., Nakayama, H. (2018). Variation of amino acid sequences of serum amyloid A (SAA) and immunohistochemical analysis of amyloid A (AA) in Japanese domestic cats. *J Vet Med Sci*, 80:164-172.
- Teilmann, G. (1964). The two phase cellular theory of local secretion. *APMIS*, 61:21-45.
- Teilmann, G., Lindahl, A. (1954). Frequency and significance of amyloid changes in rheumatoid arthritis. *Acta Med Scand*, 149:449-455.
- Teles, M., Mackenzie, S., Boltana, S., Callol, A., Tort, L. (2011). Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*, 30:340-346.
- TEPGE, (2022). Durum ve Tahmin Kumes Hayvancılığı. Erişim [<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Menu/36/Durum-Ve-Tahmin-Raporlari>]. Erişim Tarihi:17.05.2023.
- Tojo, K., Tokuda, T., Hoshii, Y., Fu, X., Higuchi, K., Matsui, T., Kametani, F., Ikeda, S.I. (2005). Unexpectedly high incidence of visceral AA-amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *Amyloid*, 12:103-108.
- Tucker, P.C., Sack Jr, G.H. (2001). Expression of serum amyloid A genes in mouse brain: unprecedented response to inflammatory mediators. *FASEB J*, 15:2241-2246.
- Tucker, S.M.F., Borchelt, D.R., Troncoso, J.C. (2008). Limited clearance of pre-existing amyloid plaques after intracerebral injection of A $\beta$  antibodies in two mouse models of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67:30-40.
- Turpin, J., Mehta, K., Blick, M., Hester, J.P., Berestein, G.L. (1990). Effects of retinoids on the release and gene expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol*, 48:444-450.
- TÜİK, (2022). Kumes Hayvancılığı Üretimi. Erişim [<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kumes-Hayvanciligi-Uretimi-Aralik-2022-49417>]. Erişim Tarihi:17.05.2023
- Uhlar, C.M., Whitehead, A.S. (1999). Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*, 265:501-523.

- Upragarin, N., Landman, W.J.M., Gaastra, W., Gruys, E. (2005a). Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A. *Histol Histopathol*, 20:1295-1307.
- Upragarin, N., VanAsten, A.J.A.M., Tooten, P.C.J., Landman, W.J.M., Gruys, E. (2005b). Serum amyloid A production by chicken fibroblast-like synoviocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 106:39-51.
- Urja, V., Khaire, K., Balakrishnan, S., Uggini, G.K. (2018). Chick embryonic cells as a source for generating in vitro model of muscle cell dystrophy. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 54:756-769.
- Vallon, R., Freuler, F., Tsedu, N.D., Robeva, A., Dawson, J., Wenner, P., Engelhardt, P., Boes, L., Schnyder, J., Tschopp, C., Urfer, R., Baumann, G. (2001). Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *J Immunol*, 166:2801-2807.
- Van Andel, A.C.J., Niewold, T.A., Lutz, E.T.G., Van Der Maas, J.H., Limburg, P., Gruys, E. (1986). Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Air-Dried and Heavy Water Suspended AA and AL Amyloid Fibril Preparations of Different Species. In: Amyloid and Amyloidosis. Eds: Isobe, T., Araki, S., Uchino, F., Kito, S., Tsubura, E., Plenum Press, New York, p: 45-50.
- Van Der Linde-Sipman, J.S., Niewold, T.A., Tooten, P.C.J., Backer, M.de N., Gruys, E. (1997). Generalized AA-amyloidosis in Siamese and Oriental cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 56:1-10.
- Vernay, M.C.M.B., Wellnitz, O., Kreipe, L., van Dorland, H.A., Bruckmaier, R.M. (2012). Local and systemic response to intramammary lipopolysaccharide challenge during long-term manipulated plasma glucose and insulin concentrations in dairy cows. *J Dairy Sci*, 95:2540-2549.
- Virchow, R. (1854). Ueber eine imgehirn und rückenmark des menschen aufgefundenene substanz mit der chemischen reaction der cellulose. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med*, 6:135-138.
- Wang, D.H., Di, B.X. (1992). Pathological study on amyloidosis in chickens. *Acta Vet Zootech Sinica*, 23:256-261.
- Webb, C.F., Tucker, P.W., Dowton, S.B. (1989). Expression and sequence analyses of serum amyloid A in the Syrian hamster. *Biochem*, 28:4785-4790.
- Westermarck, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C.L., Merlini, G., Saraiva, M.J., Sipe, J.D. (2007). A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid*, 14:179-183.
- Williams, P.N., Collier, C.T., Carroll, J.A., Welsh Jr, T.H., Laurenz, J.C. (2009). Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domest Anim Endocrinol*, 37:139-147.

- Woldemeskel, M. (2012). A concise review of amyloidosis in animals. *Vet Med Int*, DOI: 10.1155/2012/427296.
- Wong, C.W., Quaranta, V., Glenner, G.G.(1985). Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2:8729-8732.
- Xue, C., Takahashi, M., Hasunuma, T., Aono, H., Yamamoto, K., Yoshino, S., Sumida, T., Nishioka, K. (1997). Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes. *Ann Rheum Dis*, 56:262-267.
- Yamada, T., Liepnikes, J., Benson, M.D., Kluge, V., Beckerman, B. (1996). Accelerated amyloid deposition in mice treated with the aspartic protease inhibitor, pepstain. *J Immunol*, 157:901-907.
- Yamada, T., Wada, A., Itoh, K., Igari, J. (2000). Serum amyloid A secretion from monocytic leukaemia cell line THP-1 and cultured human peripheral monocytes. *Scand J Immunol*, 52:7-12.
- Yan, X., Liu, J., Jia, Y., Yao, Z., Zhou, M., Song, S., Yuan, S., Zhang, D., Zhang, N. (2023). The pharmacokinetics of tilmicosin in plasma and joint dialysate in an experimentally *Mycoplasma synoviae* infection model. *Poult Sci*, 102:102572.
- Yang, M., Liu, Y., Dai, J., Li, L., Ding, X., Xu, Z., Mori, M., Miyahara, H., Sawashita, J., Higuchi, K. (2018). Apolipoprotein A-II induces acute-phase response associated AA amyloidosis in mice through conformational changes of plasma lipoprotein structure. *Sci Rep*, 8:5620.
- Yocum, D.E., Lafyatis, R., Remmers, E.F., Schumacher, H.R., Wilder, R.L. (1988). Hyperplastic synoviocytes from rats with streptococcal cell wall-induced arthritis exhibit a transformed phenotype that is thymic-dependent and retinoid inhibitable. *Am J Pathol*, 132:38-48.
- Yoshida, T., Zhang, P., Fu, X., Higuchi, K., Ikeda, S.I. (2009). Slaughtered aged cattle might be one dietary source exhibiting amyloid enhancing factor activity. *Amyloid*, 74:25-31.
- Yoshitomi, H. (2019). Regulation of immune responses and chronic inflammation by fibroblast-like synoviocytes. *Front Immunol*, 10:1395.
- You, K., Wang, Y., Chen, X., Yang, Z., Chen, Y., Tan, S., Tao, J., Getachew, A., Pan, T., Xu, Y., Zhuang, Y., Yang, F., Lin, X., Li, Y. (2023). Neutralizing serum amyloid a protects against sinusoidal endothelial cell damage and platelet aggregation during acetaminophen-induced liver injury. *BBRC*, 639: 20-28.
- Yu, J., Guo, J.T., Zhu, H., Kindy, M.S. (2000). Amyloid formation in the rat: adenoviral expression of Mouse serum amyloid A proteins. *Amyloid*, 7:32-40.

- Zekerias, B., Landman, W.J.M., Tooten, P.C.J., Gruys, E. (2000). Leukocyte responses in two breeds of layers chicken that differ in susceptibility to induced amyloid arthropathy. *Vet Immunol Immunopathol*, 77:55-69.
- Zemer, D., Pras, M., Sohar, E., Modan, M., Cabili, S., Gafni, J. (1986). Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med*, 314:1001-1005.
- Zerega, B., Pagano, A., Pianezzi, A., Ulivi, V., Camardella, L., Cancedda, R., Cancedda, F.D. (2004). Expression of serum amyloid A in chondrocytes and myoblasts differentiation and inflammation: possible role in cholesterol homeostasis. *Matrix Biol*, 23:35-46.
- Zhang, X., Lei, X., Ma, L., Wu, J., Bao, E. (2019). Genetic and pathogenic characteristics of newly emerging avian reovirus from infected chickens with clinical arthritis in China. *Poult Sci*, 98:5321-5329.
- Zhao, J., Ouyang, Q., Hu, Z., Huang, Q., Wu, J., Wang, R., Yang, M. (2016). A protocol for the culture and isolation of murine synovial fibroblasts. *Biomed Rep*, 5:171-175.
- Zhou, G., Shen, P., Sun, Y., Zhang, X., Yan, C., Yu, J., Liu, F., Yang, D., Deng, L., Xu, E., Wang, Y., Liu, L., Tong, C., Sun, T., Wang, X. (2023). Transcriptome profiling of bovine endometrial epithelial cells induced by lipopolysaccharides *in vitro*. *Anim Biotechnol*, 9:1-12.
- Zimmermann, T., Kunisch, E., Pfeiffer, R., Hirth, A., Stahl, H.D., Sack, U., Laube, A., Liesaus, E., Roth, A., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., Kinne, R.W. (2001). Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture-primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res*, 3:72-76.