

## Ankara Tav Anında Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku

Alev Gürol Bayraktaroğlu<sup>1</sup> Emel Ergün<sup>2</sup> Feyzullah Beyaz<sup>3</sup> Tuğrul Ertuğrul<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD, Ankara-TÜRK YE

<sup>2</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji ABD, Kırıkkale-TÜRK YE

<sup>3</sup> Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji ABD, Kayseri-TÜRK YE

**Özet:** Bu çalışmada, Ankara tav anında konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokunun (Conjunctiva-associated lymphoid tissue, CALT) yapısı ışık ve elektron mikroskopik olarak incelendi. Araştırmada özel yetiştiricilerden sağlanan 10 adet sağlıklı, erişkin Ankara tav anı kullanıldı. Asetik asit ile yapılan incelemede konjunktivanın lenfoid ve non-lenfoid bölgeler içerdiği gözlemlendi. Agregat lenf folliküllerinin nazolakrimal punktum çevresinde kümelenmesi belirlendi. Histolojik olarak agregat lenf folliküllerinin epitele yakınlığı ve folikül ile ilişkili epiteli (Follicle-associated epithelium, FAE) olduğu görüldü. Bu foliküller germinal merkez, korona, subepitelyal dom bölgesi ve interfoliküler alanlardan oluşmaktaydı. Dom bölgesini örten FAE, kadeh hücresi içermeyen tek katlı yassı epitelde meydana gelirken; lenfoid yapı içermeyen bölge yapısında kadeh hücreleri bulunan yalnızca çok katlı prizmatik epitel ile örtülüydü. Interfoliküler alanlarda ve folliküllerin dip kısımlarında yüksek endotelial venüllere rastlandı. Doku yapısında, FAE'de elektron yoğun, ince ve dar bir sitoplazmaya sahip olan membranöz hücreler (M hücreleri) görüldü. Bu hücreler apikal membranında kısa ve düzensiz mikrovollular, sitoplazmasında vezikül ve vakuoller ile karakterizedydi. M hücrelerinin bazolateralinde ise lenfositler ve makrofajlar görüldü. Sonuç olarak, Ankara tav anında CALT'ın, mukoza ile ilişkili lenfoid dokuların karakteristik özelliklerine sahip olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Ankara tav anı, CALT, FAE, HEV.

### Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in the Angora Rabbit

**Summary:** In this study; the structure of the conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) of the Angora rabbit was analyzed by using light and electron microscope. Ten healthy adult Angora rabbits were used for this study, provided from private breeders. The examination performed using acetic acid revealed the presence of lymphoid and non-lymphoid regions in the conjunctiva. The aggregated lymphoid follicles were determined to be clustered around nasolacrimal punctum. Histologically, the aggregated lymphoid follicles were seen to become closely associated with epithelium and compose the follicle-associated epithelium (FAE). These follicles were formed by germinal center, corona, subepithelial dome region and interfollicular region. The FAE covered by the dome region was consisted by the single layered squamous epithelium without goblet cells, whereas non-lymphoid region was lined by pseudostratified columnar epithelium with goblet cells. In the region of interfollicular and at the bottom of follicles, high endothelial venules were founded. Ultrastructurally, in the FAE, the membranous cells (M cells) were observed with thin and narrow electron dense cytoplasm. M cells were characterized by short and irregular microfolds in the apical membrane and their cytoplasm contained vesicles and vacuoles. At the basolateral surface of the M cells, lymphocytes and macrophages were seen. As a result, it was determined that CALT of the Angora rabbit possess the characteristic features of mucosa-associated lymphoid tissues

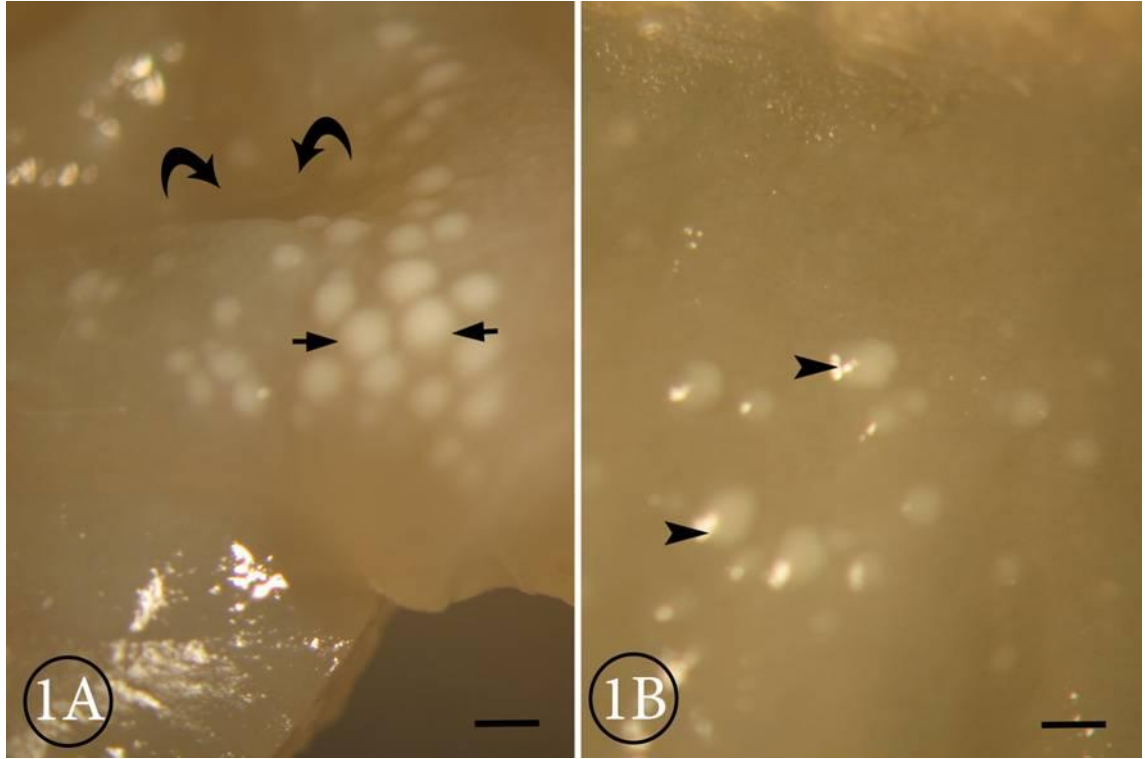
**Key Words:** Angora rabbit, CALT, FAE, HEV.

### Giriş

Mukozalardaki ortamla bağlantılı yüzeyler oldukları için birçok antijen ile karşılaşmaya gelirler (3, 26). Mukoza ile ilişkili lenfoid dokular (Mucosa-associated lymphoid tissues, MALT) de diğer dokularda yerleşen ve bulunduğu mukozadaki antijenlere karşı spesifik yanıt ve/veya toleransın oluşturulmasına yardımcı olarak, "yüksek endotelial venüller" (High endothelial venules, HEV) gibi sahip oldukları bazı karakteristik özellikleriyle lenfosit infiltrasyonlarından ayrılır (19). MALT'taki agregat ve soliter lenf foliküllerinde germinal merkez, dom, korona ve interfoliküler bölgeler bulunmaktadır. Bu

foliküllerin epitel ile yakın ilişkisi içinde olmaları aktif çalışmaları için bir MALT için önemlidir (24).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, MALT'ın özellikle lokal uyarıcı bölgeler (Organized-mucosa associated lymphoid tissues, O-MALT) ve yaygın efektör bölgelerden (Diffuse-mucosa associated lymphoid tissues, D-MALT) oluştuğu görülmüştür (17, 20, 24, 28). O-MALT'ın tipik olarak sindirim ve solunum sistemi gibi kritik antijen giriş bölgelerine yerleştiği bildirilmektedir. Antijenlerin alınması ve sunulmasını takiben O-MALT'ta oluşan lokal immün yanıt sonucu ekilenen bellek hücreleri, kan yoluyla diğer mukozalardaki D-MALT'a giderek yerleşir (11, 15, 20, 25). Farklı mukozalar arasındaki hücre trafiği, bu hücrelerin doku spesifik göç yapmalarına bağlıdır ki; bu da interfoliküler



**ekil 1 A-B.** Asetik asit uygulandıktan sonra konjunktivalarda CALT'ın makroskopik görünümü: A- Agregat lenf folikülleri (oklar), nazolakrimal punktum (e ri oklar); B- Soliter lenf folikülleri (ok ba ları), Bar: 300 µm.

alanlarda ve foliküllerin dip kısımlarında yerle mi olan yüksek endotel hücrelerine sahip özel damarlar HEV'ler sayesinde olmaktadır (7, 14, 22). Böylelikle ortak mukozal ba ı ıklık reaksiyonu ekilenmi olmaktadır (11).

Bazı ara tırmaçılar (2, 5, 12, 13) konjunktiva ile ili kili lenfoid dokunun (Conjunctiva-associated lymphoid tissue, CALT), yerle imi, epiteliyal ve vasküler özellikleri bakımından, MALT'ın organize olarak kabul edildi i ba ırsak ve bron larla ili kili lenfoid dokuları ile benzerlikler gösterdi ini bildirmi tir. CALT, hayvan türlerine göre konjunktivanın farklı bölgelerinde, de i ik yo unluklarda yerle en lenfoid dokulardır. Konjunktival lenf foliküllerinin sayısı ve da ılımının gözün sa lıklı olması, ya ve bireysel farklılıklar gibi faktörlerden etkilenebildi inden söz edilmektedir (16).

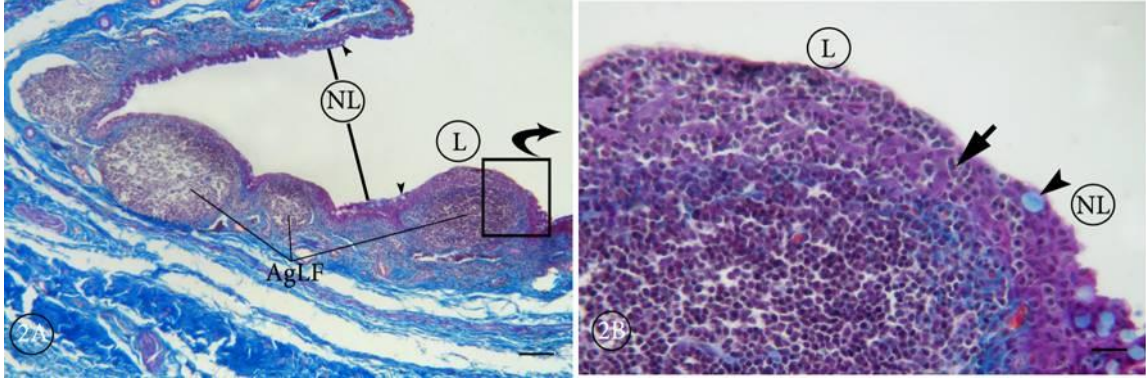
CALT, soliter ve agregat lenf folikülleri ile bu foliküllerin üzerini örten, kadeh hücresi içermeyen ve antijenlerin alınması için özelle mi membranöz epitel hücreleri (M cells, M hücreleri) de içeren FAE (Follicle-associated epithelium)'den olu maktadır (3, 4, 24). Konjunktival M hücreleri ilk kez Latkovic (23) tarafından kobayda tanımlandıktan

sonra, maymun (27), tav an (22), köpek (16) ve sı ırda (5) da incelenmi tir.

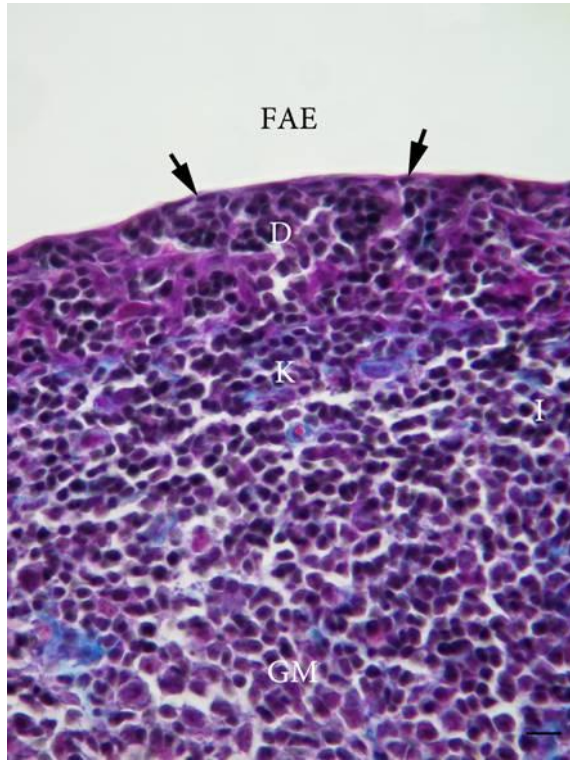
mmun sistemin bir parçası olan CALT, hem gözde meydana gelebilecek hastalıklara kar ı tepkinin verilmesinde hem de bazı hastalıkların (korneal transplant reddi, oküler alerji, kuru göz hastalı ı gibi) tanınmasında önemli rol oynamaktadır (22). Sunulan ara tırmanın amacı, ülkemize özgü bir ırk olan Ankara tav anının konjunktivasında yerle en CALT'ın yapısını inceleyerek, karakteristik mukoza ile ili kili lenfoid doku özellikleri ta ıyıp ta ımadı ını belirlemektir.

### Gereç ve Yöntem

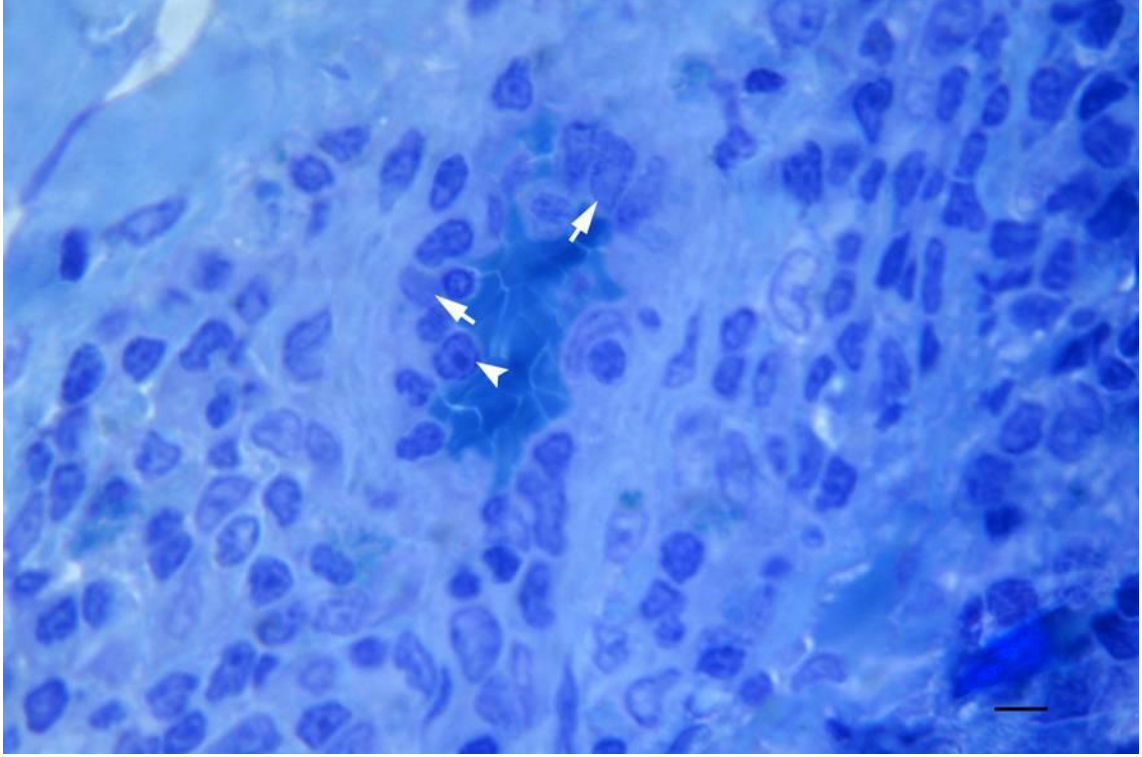
Çalı mada materyal olarak, özel yeti tiricilerden elde edilen 10 adet, sa lıklı, eri kin, erkek Ankara tav anları etik ilke ve kurallara (No: 07/04) uygun olarak kullanıldı. Tav anlar, 0,1 ml/kg sodyum pentobarbütalin damar içi uygulanmasıyla ötenazi edildi. Alınan doku materyalinin bir kısmı, makroskopik olarak lenf foliküllerinin dokudaki da ılımını ortaya çıkarmak amacıyla %3'lük asetik asitte 24 saat tutuldu (13). İ lk mikroskopik incele-



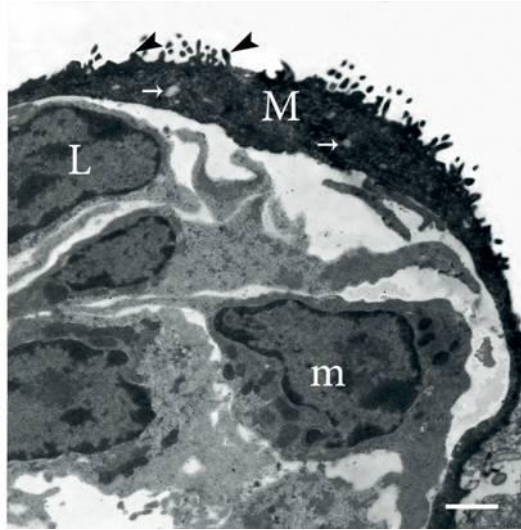
**ekil 2 A-B.** Konjunktiva epiteli: A- Kadeh hücreleri (ok ba ları) içeren yalancı çok katlı prizmatik epitelli non-lymfoid bölge (NL), lenfoid bölgeleri (L) olu turan agregat lenf folikülleri (AgLF), Triple, Bar: 80 µm; B- Lenfoid bölge (L), nonlenfoid-lenfoid bölge geçi i (ok), kadeh hücresi (ok ba ı), Triple, Bar: 20 µm.



**ekil 3.** Lenf folikülünü olu turan 4 bölge: Tek katlı yassı FAE'nin (oklar) hemen altında yerle en, subepiteliyal dom (D) bölgesi, germinal merkez (GM), korona (K), ve interfoliküler alan (I), Triple, Bar: 30 µm.



**ekil 4.** Foliküllerin dip kısımlarında yerleşen HEV: Endotel hücreleri (oklar) ile lenfositlerin (ok başları) yakınındaki kısımları, Yarı-ince kesit, Toluidine blue, Bar: 10 µm.



**ekil 5.** FAE'nin elektron mikroskopik görünümü: Elektron yoğun ince bir sitoplazmaya sahip M hücresi (M), apikalinde kısa ve düzensiz mikrovilli (ok başları) ile veziküller ve vakuoller (oklar); bazolateralinde ise EL (L) ve makrofaj (m), Bar: 3 µm.

meler için alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu nötral formolde tespit edildikten ve rutin ı k mikroskopu takibi uygulandıktan sonra paraplastla bloklandı. Bloklardan alınan 5 µm kalınlı ındaki kesitlere genel yapının incelenmesi amacıyla Crossmon (10) tarafından modifiye edilen Mallory'nin üçlü boyaması uygulandı.

Elektron mikroskopik incelemeler için, alınan doku örnekleri Karnovsky (18) yöntemine göre glutaraldehid-paraformaldehit tespit solüsyonunda (pH; 7,4) ön tespitleri yapıldıktan sonra, %1'lik ozmik asit solüsyonunda iki saat süreyle ikinci kez tespit edildi. kinci tespitten sonra dokular dereceli alkollerden geçirilerek %1'lik uranil asetat solüsyonunda iki saat muamele edildi. Daha sonra alkol ve propilen oksitten geçirilerek Araldit M'de bloklandı. Bloklardan alınan 1 µm'lik yarı ince kesitlere toluidine blue boyama yöntemi uygulandı ve kesitlerde istenilen bölgeler i aretlendikten sonra 300-400 Angstrom kalınlı ında ince kesitler alındı. Gridlere alınan kesitlere Veneable ve Coggeshall (31) yöntemine göre kontrast boyama yapıldı. Doku örnekleri Carl Zeiss EM 9S-2 (Zeiss Oberkochen, Germany) model transmisyon elektron mikroskopta incelendi.

## Bulgular

### Makroskopik Bulgular

Asetik asitte bekletilen dokuların makroskopik incelemelerinde konjunktivanın lenfoid ve non-lenfoid bölgeler içerdi i saptandı. Buna göre yuvarlak ekilli, agregatlar halindeki lenf foliküllerinin nazolakrimal punktum ve çevresinde kümeleni i, ( ekil 1A) alt ve üst konjunktivadaki foliküllerin ise soliter tarzda da ılım gösterdi i belirlendi ( ekil 1B).

### İ k Mikroskopik Bulgular

Parafin ve yarı ince kesitleri alınan konjunktivaların histokimyasal boyamalarında non-lenfoid bölgelerin kadeh hücreleri içeren yalancı çok katlı prizmatik epitelden ( ekil 2A), lenfoid bölgelerin ise agregat lenf foliküllerinden olu tu u görülürken foliküllerin epitele do ru çıkıntılı arak dom yapısı meydana getirdi i tespit edildi ( ekil 2B). Bu foliküllerin germinal merkez, korona, subepitelial dom bölgesi ve interfoliküler alanlardan olu tu u saptandı. Dom bölgelerini, kadeh hücresi içermeyen tek katlı yassı epitelin (FAE) örttü ü de belirlendi ( ekil 3). Ayrıca, yarı ince kesitlerde sekonder lenf folikülleri arasında ve foliküllerin dip kısmında HEV'lerin bulundu u saptandı ( ekil 4).

### Elektron Mikroskopik Bulgular

Elektron mikroskopik incelemelerde FAE'in, elektron yo un, ince dar bir sitoplazmaya sahip ve bazolateral yüzü intraepitelial lenfositler (Intra Epithelial Lymphocytes, IEL) ve makrofaj içeren M hücrelerinden olu tu u belirlendi ( ekil 5). Bu hücrelerin apikal yüzeyinde kısa mikrofildar ile sitoplazmasında vezikül ve vakuollerin bulundu u görüldü ( ekil 5).

### Tartı ma ve Sonuç

Oküler immun sistemde önemli rol oynayan CALT'ın, MALT'ın bir parçası olarak de erlendirilebilmesi için bazı karakteristik özellikler ta ınması gerekmektedir. Buna göre, lenfoid dokuyu soliter ve/veya agregat lenf folikülleri olu turmalı; bu foliküller, dom, germinal merkez, korona ve interfoliküler alanlar içermeli; foliküllerin üzerini M hücrelerini de içeren FAE örtmelidir (5, 24). Sunulan çalı mada, Ankara tav anında konjunktival lenf foliküllerinin, hücre kompozisyonları ve kompartmanlarının tam olarak ekilenmesiyle lenfosit infiltrasyonlarından ayrıldı ı ve tipik MALT özellikleri ta ı ı belirlenmi tir.

Konjunktival lenf foliküllerinin yerle imi türler arasında farklılıklar göstermektedir. Sı ır, koyun ve domuzda palpebral konjunktivada (9), köpek (16) ve farede (29) palpebra niktisans'ta yerle en lenf foliküllerinin, tav anda (14, 22) alt konjunktivanın nazal açısında lakrimal punktuma yakın bölgelerde, hindide (12) ise nazal açıda bulundu u bildirilmektedir. Lenf foliküllerinin makroskopik görünü -leri de türler arasında farklılıklar gösterebilmektedir. Örne in; insanda lenf folikülleri disk ekinde, tav an, maymun ve di er türlerde ise daha çok yuvarlak biçimde tanımlanmı tir (21). Ankara tav anında da yuvarlak ekilli CALT foliküllerinin gözya ının uzakla tırıldı ı nazolakrimal punktum çevresinde kümeleni i dikkati çekti. Duru pozisyonu göz önüne alındı ında nazal açıda do ru lenf folikülü sayının artması gözya ının buralarda birikmesi ile ili kilendirilebilir.

Günümüze kadar yapılan çalı malarda CALT, insan (21, 32), tav an (14, 22), kobay (23), fare (29), tavuk (13), hindi (12), koyun (8, 24), keçi (3, 4), sı ır (5), deve (30), domuz (8), maymun (27) ve babunda (1) tanımlanmı tir. Tav anda CALT soliter ve/veya agregat lenf foliküllerinden olu -maktadır. Bu foliküllerin üzerini kadeh hücresi içermeyen tek katlı yassı epitelin dö edi i bildirilmektedir. Yapılan çalı mada Ankara tav anında CALT'ın yukarıda belirtilen özellikleri ta ı ı belirlenmi tir.



FAE hücreleri arasında antijen sunan M hücrelerinin yer alması, immun yanıtın ve/veya toleransın oluşmasında ilk ve önemli basamaktır (6, 26). İnce yapı düzeyinde MALT'a ait diğer dokulardaki M hücreleri ile benzerlikler gösterdiği bildirilen CALT M hücrelerinin ince dar bir sitoplazmaya sahip oldukları, apikal yüzeyinde kısa ve düzensiz mikrovellüler ile çok sayıda vezikül ve vakuoller içerdikleri, bazolateralinde ise EL'in yerleştiği gösterilmiştir (2, 22). Tipik M hücresi özellikleri taşıyan hücrelerin Ankara tav anının CALT FAE'sindeki varlığı, bu hücrelerin gözyağındaki antijenleri alarak altlarındaki immun sistem hücrelerine aktardığını göstermektedir.

İmmün yanıtın diğer mukozalardaki MALT yapılarına aktarılması, interfolliküler alanlarda yerleşen ve lenfositlerin doku spesifik göçlerinde rol oynayan HEV'ler sayesinde olmaktadır (7, 14, 22). Yapılan çalışmada da interfolliküler alanlarda ve folliküllerin dip kısımlarında HEV'lere rastlanmıştır.

Sunulan çalışmada, Ankara tav anında CALT'in mukoza ile ilişkili lenfoid doku özellikleri tanımlanmış ve gözün immün korunmasında etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

#### Kaynaklar

- Astley RA, Kennedy RC, Chodosh J, 2003. Structural and cellular architecture of conjunctival lymphoid follicles in the baboon (*Papio anubis*). *Exp Eye Res*, 76: 685-694.
- Astley RA, Chodosh J, 2005. Selective uptake of iron oxide by rabbit conjunctival lymphoid follicles. *Cornea*, 24: 334-336.
- Aktın RN, Kurtkede N, Altunay H, Özen A, 2000. Electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in Angora goats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 107: 196-198.
- Aktın RN, Kurtkede N, Altunay H, Özen A, 2000. Ankara keçilerinin konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokusu (CALT) üzerinde ışık mikroskopik çalışmaları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47: 31-37.
- Bayraktarolu AG, Aktın RN, 2009. Light and electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in cattle. *Revue Med Vet*, 160(5): 252-257.
- Beyaz F, 2004. M hücreleri: membranöz epitel hücreleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 1: 133-138.
- Cain C, Phillips TE, 2008. Developmental changes in conjunctiva-associated lymphoid tissue of the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49: 644-649.
- Chodosh J, Nordquist RE, Kennedy RC, 1998. Anatomy of mammalian conjunctival lymphoepithelium. *Adv Exp Med Biol*, 438: 557-565.
- Chodosh J, Nordquist RE, Kennedy RC, 1998. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Dev Comp Immunol*, 22, 621-630.
- Crossmon G, 1937. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, 69: 33-88.
- Elson CO, 1997. Advances in mucosal immunity. *Drugs Suppl*, 1: 13-14.
- Fix AS, Arp LH, 1989. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in normal and *Bordetella avium*-infected turkeys. *Vet Pathol*, 26: 222-230.
- Fix AS, Arp LH, 1991. Morphologic characterization of conjunctiva-associated lymphoid tissue in chickens. *Am J Vet Res*, 52: 1852-1859.
- Franklin RM, Remus LE, 1984. Conjunctiva-associated lymphoid tissue: evidence a role in the secretory immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 25: 181-187.
- Gebert A, Rothkotter HJ, Pabst R, 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol*, 167, 91-159.
- Guiliano EA, Moore CP, Phillips TE, 2002. Morphological evidence of M cells in healthy canine conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240: 220-226.
- Hannant D, 2002. Mucosal immunology: overview and potential in the Veterinary species. *Vet Immunol Immunopathol*, 87: 265-267.
- Karnovsky MJ, 1965. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 27: 137-138.

19. Kelsall BL, Leon F, Smythies LE, Smith PD, 2004. Antigen handling and presentation by mucosal dendritic cells and macrophages. Mestecky J. Lamm ME. Strober W. Bienenstock J. Mcghee JR. Mayeln L. eds. *Mucosal Immunology*. London: J Academic Press, pp.105.
20. Knop E, Knop N, 2003. Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system. *Ophthalmologe*, 11: 929- 942.
21. Knop N, Knop E, 2000. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41: 1270- 1279.
22. Knop N, Knop E, 2005. Ultrastructural anatomy of CALT follicles in the rabbit reveals characteristics of M-cells, germinal centres and high endothelial venules. *J Anat*, 207: 409-426.
23. Latkovic S, 1989. Ultrastructure of M cells in the conjunctival epithelium of the guinea pig. *Curr Eye Res*, 8: 751-755.
24. Liebler-Tenorio E, Pabst R, 2006. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res*, 37: 257-280.
25. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP, 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol*, 14: 275-300.
26. Neutra MR, Kraehenbuhl JP, 2004. Cellular and molecular basis for antigen transport across epithelial barriers. Mestecky J. Lamm ME. Strober W. Bienenstock J. Mcghee JR. Mayeln L. eds. *Mucosal Immunology*. London: Academic Press, pp.155.
27. Ruskell GL, 1995. Organization and cytology of lymphoid in the cynomolgus monkey conjunctiva. *Anat Rec*, 243: 153-164.
28. Russell MW, Martin MH, Wu H, Hollingshead SK, Moldoveanu Z, Mestecky J, 2000. Strategies immunization againts mucosal infections. *Vaccines*, 19: 122-127.
29. Sakimoto T, Shoji J, Inada N, Saito K, Iwasaki Y, Sawa M, 2002. Histological study of conjunctiva-associated lymphoid tissue in mouse. *Japanese J Ophthalmol*, 46: 364-369.
30. Sandıkçı M, Eren Ü, Kum S, 2005. Alpha-naphthyl acetate esterase activity in the spleen, lymph nodes and conjunctiva-associated lymphoid tissues of camels (*Camelus dro-medarius*). *Revue Med Vet*, 156: 99-103.
31. Veneable JH, Coggeshall R, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 25: 407-408.
32. Wotherspoon AC, Hardman-Lea S, Isaacson PG, 1994. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva. *J Pathol*, 174: 33-37.

#### Yazı ma Adresi

Dr. Alev Gürol BAYRAKTARO LU  
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı,  
06110 Dı kapı / Ankara  
Tel.: 0 312- 3170315 / 259  
Fax: 0 312- 3164472  
E:mail: dralevgurol@gmail.com /  
alevgurol@hotmail.com