

# ANKARA KEÇİLERİNİN KONJUNKTİVA İLE İLİŞKİLİ LENFOİD DOKUSU (CALT) ÜZERİNDE IŞIK MİKROSKOBİK ÇALIŞMALAR

Reşat Nuri AŞTI<sup>1</sup>  
Hikmet ALTUNAY<sup>2</sup>

Nevin KURTDEDE<sup>2</sup>  
Asuman ÖZEN<sup>3</sup>

*Light microscopic studies on the conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT)  
of Angora goats*

**Summary:** *The purpose of this study was to investigate the light microscopic structure of conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) of Angora goats.*

*The samples tissue taken from lower and upper eyelids of 10 healthy, 5-6 month-old Angora goats were used in this study.*

*The conjunctiva-associated lymphoid tissue of Angora goats was formed by solitary and aggregated lymphoid follicles and follicle-associated epithelium (FAE) which cover this follicles.*

*Alpha-naphthyl asetat esterase (ANAE) positive T lymphocytes were seen in the peripheral region surrounded of germinal center, subepithelial area and FAE. Immunoglobulin (Ig) containing B lymphocytes were found in the germinal center and subepithelial area. Very few T lymphocytes were seen in the B cells region and very few B lymphocytes were seen in the T cells regions.*

**Key words:** *Angora goats, CALT, Conjunctiva*

**Özet:** *Bu çalışma, Ankara keçilerinin konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokusunun (CALT) ışık mikroskopik yapısını incelemek amacıyla yapıldı.*

*Çalışmada 10 adet sağlıklı, 5-6 aylık Ankara keçisinin alt ve üst göz kapaklarından alınan doku örnekleri materyal olarak kullanıldı.*

*Ankara keçilerinin konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokusunun, soliter ya da agregat lenf follikülleri ile bu folliküllerin üzerini örten follikülle ilişkili epitelden (FAE) oluştuğu gözlemlendi.*

*Alfa-naftil asetat esterase (ANAE) pozitif T lenfositler germinal merkezi çevreleyen bölgede, subepitelyal alanda ve FAE'de görüldü. Immunglobulin (Ig) taşıyan B lenfositlere ise germinal merkezde ve subepitelyal alanda rastlandı. T lenfosit bölgelerinde az sayıda B, B lenfosit bölgelerinde de az sayıda T lenfositler gözlemlendi.*

**Anahtar kelimeler:** *Ankara keçisi, CALT, Konjunktiva*

1 Prof. Dr., AÜ Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

2 Doç. Dr., AÜ Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

3 Dr., AÜ Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

## Giriş

Antijenleri alan ve bunları antikor yapımı için sunan hücreleri içeren mukozal lenfoid doku, mukozal yüzeylerin savunmasında önemli rol oynar (6). Barsaklarla ilişkili lenfoid doku (GALT) (11, 13, 30-32) ve bronşlarla ilişkili lenfoid doku (BALT) (2, 8, 9, 12, 17) memeliler ile kanatlılarda incelenmiştir. Konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku (CALT) morfolojik olarak GALT ve BALT'da bildirilen (7, 20) özelliklere benzerlik göstermektedir. Lokalizasyonu, epitel yapısı, hücre kompozisyonu ve vasküler görünümü ile CALT mukozal immunitede önemli role sahiptir (18). CALT, antijenlerle temas bölgesi oluşturarak bu antijenlere karşı antikor yapımında rol oynar (20).

CALT soliter ya da agregat lenf follikülleri ile bu folliküllerin üzerini örten özelleşmiş epitelden oluşur. Bu epitel, follikülle ilişkili epitel (FAE) ya da lenfoepitel olarak isimlendirilir (18-20, 36).

FAE, kadeh hücresi içermeyen yassılaştırmış epitelden meydana gelir (18-20, 34). Non-lenfoid konjunktiva epiteli ise kadeh hücreleri içeren (34) çok katlı yassıdır (22, 34).

FAE altında soliter ya da agregat lenf follikülleri bulunmaktadır (18-20, 26). Lenf folliküllerinin germinal merkezinde B lenfositler (26), blast formunda hücreler, mitotik figürler (18, 19) ve az sayıda T lenfosit (37) bulunmaktadır. Germinal merkezin çevresi ise T lenfositlerce sınırlandırılmıştır (26). Folliküllerin çevresindeki bağdoku içinde plazma hücreleri gözlenmektedir (20, 26, 37).

Bu araştırma, Ankara keçilerinin konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokusunun (CALT) ışık mikroskopik yapısını incelemek amacıyla yapıldı.

## Materyal ve Metot

Çalışmada, Ankara Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan 10 adet sağlıklı 5-6 aylık Ankara keçisinin alt ve üst göz kapaklarından alınan doku örnekleri materyal olarak kullanıldı.

Alınan doku parçalarının bir kısmı genel görünümü incelemek için %10 formol'de tespit edildikten sonra paraplastta bloklandı ve bu bloklardan alınan 7 mikronluk kesitlere triple boya yöntemi uygulandı (14). Alınan doku parçalarının diğer kısmı T lenfositlerin belirlenmesi için, önceden soğutulmuş formol-sukroz solüsyonunda (pH 6,8) +4°C'de 22 saat tespit edildikten sonra, +4°C'deki Holt solüsyonunda 22 saat tutuldu ve kriyostatta alınan 8 mikronluk kesitlere alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) boyama yöntemi (pH 6,4) uygulandı (27).

Alınan doku parçalarının diğer kısmına ise, IgG içeren hücrelerin belirlenmesi için direkt immunperoksidaz yöntemi uygulandı (14). Parçalar sıvı azotta donduruldu ve bunlardan kriyostatta 8 mikronluk kesitler alındı. Bu kesitler iyice kuruduktan sonra, önceden soğutulmuş asetonda 10 dakika tespit edildiler. Kesitlere endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde hazırlanmış % 0,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 dakika uygulandı. Daha sonra kesitler fosfat buffer salin (PBS, pH 7,4) ile yıkandılar ve uygun oranda sulandırılmış anti goat IgG peroksidaz konjugatı (Sigma, A 5420) ile 1 saat inkübe edildiler. Süre sonunda PBS ile iyice yıkanan kesitlere peroksidaz aktivasyonu için, substrat olarak tris buffer salin (pH 7,6) 'de hazırlanan 3, 3' diaminobenzidin (DAB) tetrahidroklorid (Sigma, D 5905) 20 dakika uygulandı. PBS ile iyice yıkanan kesitlerin bazılarında 10 saniye Mayer's hematoksilen (14) ile çekirdek boyası yapılırken, diğer kesitlere çekirdek boyası uygulanmadı.

Alınan doku parçalarının diğer bir kısmı ise plazma hücrelerinin belirlenmesi için, alkol-formol solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra dereceli alkollerden, metilbenzoat ve benzollerden geçirilerek paraplastta bloklandılar. Bu bloklardan alınan 7 mikronluk kesitlere plazma hücresi boyaması olan methylgreen-pyronin uygulandı (10).

## Bulgular

Hazırlanan preparatlarda konjunktivanın lenfoid (Şekil 1 a) ve nonlenfoid bölgeler (b) içerdiği gözlemlendi. Nonlenfoid bölgenin kadeh hücreleri içeren çok katlı yassı epitelden (Şekil

1, 2 ok başı) oluştuğu dikkati çekti. Lenfoid bölge ise soliter ya da agregat lenf follikülleri ile bu folliküllerin üzerini örten ve kadch hücresi içermeyen yassılaştırmış epiteliden (Şekil 1, 2 oklar) oluştuğu görüldü.

ANAE boyama yöntemi uygulanan kesitler incelendiğinde T lenfositlerin çoğunda bir iki adet kırmızı granül şeklinde (Şekil 3 oklar, ok başları), retikulum hücrelerinde ise diffuz reaksiyon (R) gözlemlendi. Lenf folliküllerinin germinal merkezinde (G) ANAE negatif, bunu çevreleyen bölgelerde ise ANAE pozitif lenfositler (oklar) saptandı. Germinal merkezin periferinde az sayıda ANAE pozitif hücreye de rastlandı (ok başları). Ayrıca, ANAE pozitif lenfositler FAE ve subepitelyal bölgede de görüldü (Şekil 4 oklar).

İmmunperoksidaz boyama yöntemi uygulanan preparatlar incelendiğinde immunoglobulin (Ig) taşıyan hücreler (Şekil 5 oklar) germinal merkezde (G) çok, germinal merkezin etrafı ve subepitelyal bölgede (S) az sayıda gözlemlendi.

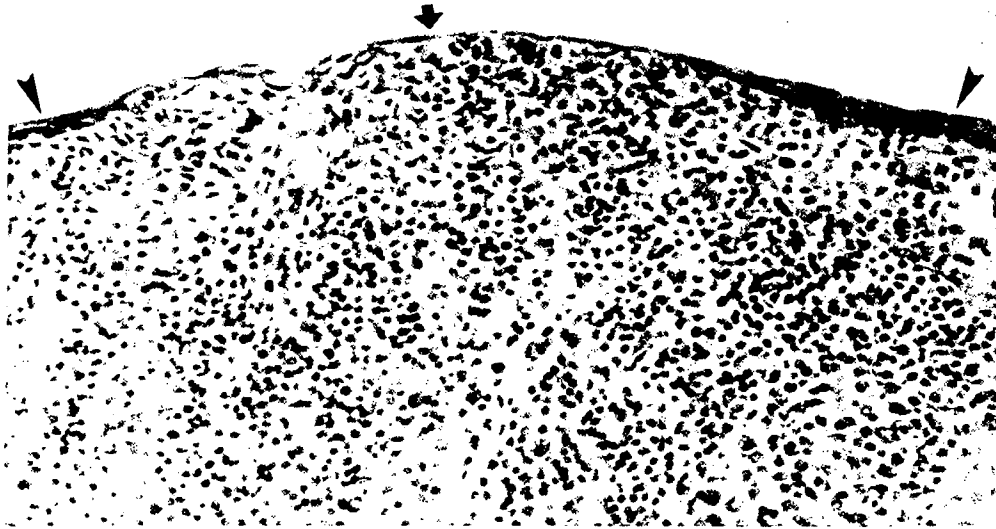
Methylgreen-pyronin ile boyanan preparatlarda germinal merkezde çok sayıda ve de-

ğişik gelişme aşamalarında olan pironinofilik hücre ile mitoz figürlerine rastlandı. Germinal merkezin çevresinde ve subepitelyal bölgede az sayıda pironinofilik hücre gözlemlendi. Folliküllerin çevresindeki bağdoku içerisinde tipik plazma hücreleri görüldü.



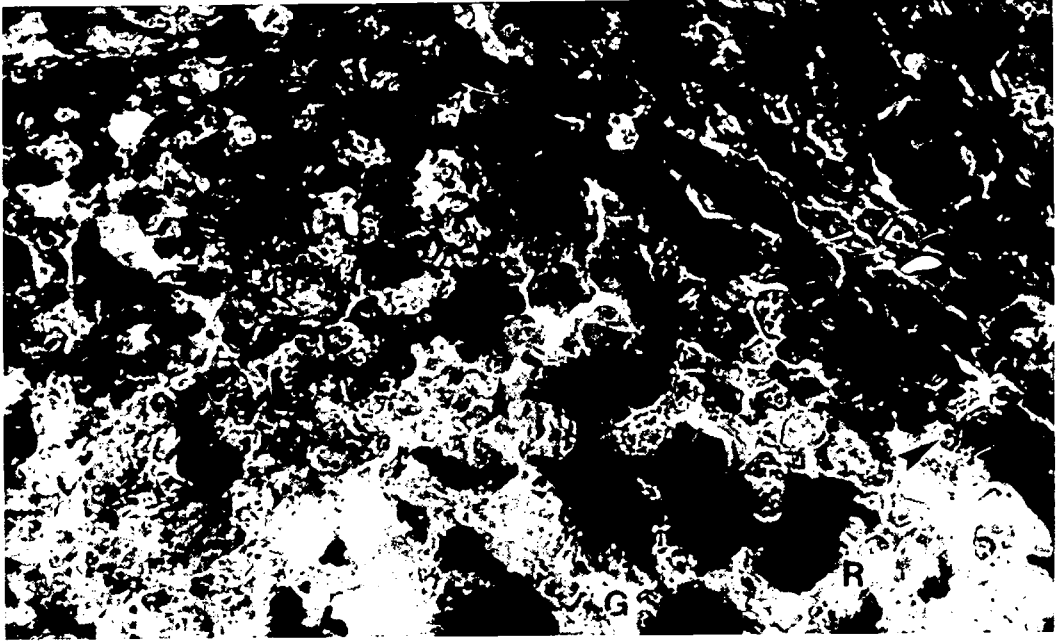
Şekil 1. Konjunktiva'nın lenfoid (a) ve nonlenfoid (b) bölgeleri. ok : lenfoid bölge epiteli, ok başı: nonlenfoid bölge epiteli. Triple. x 110.

Figure 1. Lymphoid (a) and nonlymphoid (b) area of conjunctiva. arrow : lymphoid epithelium. arrow head : nonlymphoid epithelium. Triple. x 110.



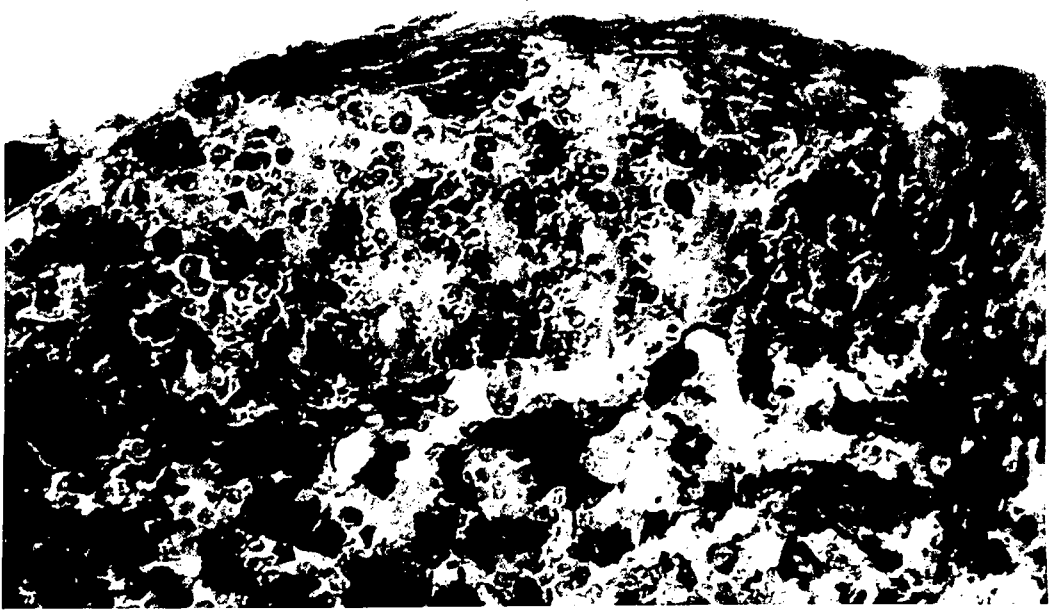
Şekil 2. Konjunktiva'nın lenfoid (ok) ve nonlenfoid (ok başı) bölge epiteli. Triple. x 285.

Figure 2. Conjunctival epithelium from a lymphoid (arrow) and a nonlymphoid (arrow head) area. Triple. x 285.



Şekil 3. Konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku. G : germinal merkez, oklar : germinal merkezin çevresindeki bölgede ANAE pozitif lenfositler, ok başları : germinal merkezin periferindeki ANAE pozitif lenfositler, R : ANAE pozitif retikulum hcreti. ANAE. x 350.

Figure 3. Conjunctiva-associated lymphoid tissue. G : germinal center, arrows : ANAE positive lymphocytes in peripheral area surrounded of germinal center, arrow heads : ANAE positive lymphocytes in peripheral zone of germinal center, R : ANAE positive reticulum cell. ANAE staining. x 350.



Şekil 4. FAE ve subepitelial bölgede ANAE pozitif lenfositler (oklar). ANAE. x 265.

Figure 4. ANAE positive lymphocytes (arrows) in FAE and subepithelial area. ANAE staining. x 265.



Şekil 5. Konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku. G : germinal merkez, S : subepitelyal bölge, oklar : Ig pozitif lenfositler. Immunperoksidaz. x 260.

Figure 5. Conjunctiva-associated lymphoid tissue. G : germinal center, S : subepithelial area, arrows : Ig positive lymphocytes. Immunoperoxidase staining. x 260.

### Tartışma ve Sonuç

CALT'ın soliter veya agregat lenf follikülleri ile folliküllerin üzerini örten özelleşmiş epitelden oluştuğu ve bu epitelin follikülle ilişkili epitel ya da lenfoepitel olarak isimlendirildiği bildirilmiştir (18-20, 36). FAE'nin kadeh hücresi içermeyen yassılaştırmış epitelden meydana geldiği belirtilmektedir (18-20, 34). Nonlenfoid konjunktiva epitelinin ise aralarında kadeh hücreleri bulunan (34) çok katlı yassı epitel (22, 34) karakterinde olduğundan sözü edilmektedir. Çalışmada incelenen preparatlarda konjunktivanın lenfoid ve nonlenfoid bölgeleri içerdiği gözlemlendi. Nonlenfoid bölgenin kadeh hücreleri içeren çok katlı yassı epitelden oluştuğu dikkati çekti. Lenfoid bölge ise soliter ya da agregat lenf follikülleri ile bu folliküllerin üzerini örten ve kadeh hücresi içermeyen yassılaştırmış epitelden oluştuğu görüldü. Çalı-

şmadan elde edilen bulgular araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

FAE altında soliter ya da agregat lenf folliküllerinin yerleştiği belirtilmektedir (18-20, 26). Lenf folliküllerinin germinal merkezinde B lenfositler (26), blast hücreler, mitotik figürler (18, 19) ve az sayıda T-lenfosit (37) bulunduğu bildirilmektedir. Germinal merkezin çevresinin ise T lenfositlerce sınırlandığından sözü edilmektedir (26). Folliküllerin çevresindeki bağdoku içinde plazma hücrelerinin gözlemlendiği belirtilmektedir (20, 26, 37). Çalışmada ANAE boyama yöntemi uygulanan kesitler incelendiğinde lenf folliküllerinin germinal merkezinde ANAE negatif, bunu çevreleyen bölgelerde ise ANAE pozitif lenfositler gözlemlendi. Germinal merkezin periferinde az sayıda ANAE pozitif hücreye rastlandı. Ayrıca, ANAE pozitif lenfositler FAE ve subepitelyal bölgede de görüldü. Immunperoksidaz boyama yöntemi uygulanan preparatlar incelendiğinde immunoglobulin taşıyan hücreler germinal merkezde çok, germinal merkezin çevresinde ve subepitelyal bölgede az sayıda gözlemlendi. Methylgreen-pyronin ile boyanan preparatlarda germinal merkezde çok sayıda ve değişik gelişme aşamalarında olan pironinofilik hücre ile mitoz figürlerine rastlandı. Germinal merkezin çevresinde ve subepitelyal bölgede az sayıda pironinofilik hücre gözlemlendi. Folliküllerin çevresindeki bağdoku içinde tipik plazma hücreleri görüldü. Çalışmadan elde edilen bu veriler, yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile uyum içindedir.

Son yıllarda, nonspesifik esterazlardan olan alfa-naftil asetat esterazın T lenfositlerinde bulunduğu, B lenfositlerde ise bulunmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (3, 24, 25, 29). ANAE pozitif reaksiyonun T hücrelerinde 1-2 adet lokalize granüller şeklinde olduğundan, B lenfositlerin ise ANAE boyanmasına karşı negatif reaksiyon verdiğinden sözü edilmektedir (1, 3, 16, 28). Çalışmada ANAE boyamasıyla T lenfositlerin çoğunda bir iki adet kırmızı granül şeklinde, retikulum hücrelerinde ise diffuz reaksiyon gözlemlendi. Ig boyama yöntemi uygulanan preparatların incelenmesinde ise ANAE negatif alanların Ig pozitif bölgeler olduğu dikkati çekti. Aştı ve

ark. (4) ile Bianchi ve ark. (5) B lenfosit bölgesinde T, T lenfosit bölgesinde ise B lenfositlerin az sayıda bulunduğunu bildirmektedirler. Çalışmada da, yoğun olarak T lenfosit içeren bölgelerde B, B lenfosit içeren bölgelerde T hücreleri az sayıda gözlemlendi. Germinal merkezde T lenfositlere rastlanması, sentrum germinativum reaksiyonunun şekillenmesi için T lenfositlerin işbirliğine gereksinim olmasından dolayıdır (21, 23). Timusu çıkarılan veya T hücreleri baskılanan hayvanlarda, sentrum germinativum reaksiyonu şekillenmemektedir (21, 33). Bu reaksiyonun şekillenmesi için germinal merkezde T lenfositlerin, özellikle de yardımcı T lenfositlerin bulunması gereklidir. Ayrıca, T lenfositlerin yoğun olarak bulunduğu bölgelerde az sayıda B lenfositine rastlanması, T ve B hücrelerinin karşılıklı ilişki kurarak, B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümünün bu bölgede olmasından ileri geldiği bildirilmektedir (15, 35).

Sonuç olarak, Ankara keçilerinin konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokusunun soliter ya da agregat lenf follikülleri ile bu folliküllerin üzerini örten FAE'den oluştuğu saptandı. Alfa-naftil asetat esteraz pozitif T lenfositler germinal merkezi çevreleyen bölgede, subepitelial alanda ve FAE'de görüldü. İmmunglobulin taşıyan B lenfositlere ise germinal merkezde ve subepitelial alanda rastlandı. T lenfosit bölgelerinde az sayıda B, B lenfosit bölgelerinde de az sayıda T lenfositler gözlemlendi.

### Kaynaklar

- Aleksandersen M, Hein WR, Landsverk T, Mclure S (1990) *Distribution of lymphocyte subsets in the large intestinal lymphoid follicles of lambs*. Immunology, **70**, 391-397.
- Anderson ML, Moore PF, Hyde DM, Dungworth DL (1986) *Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle: relationship to age*. Res Vet Sci, **41**, 211-220.
- Aşti RN, Kurtdele N, Ergün L (1993) *Kangal köpeklerinin perifer kan T lenfositleri üzerinde ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar*. A Ü Vet Fak Derg, **40**, 563-576.
- Aşti RN, Tanyolaç A, Kurtdele N, Özen A (1997) *T ve B lenfositlerin Ankara keçilerinin lenfoid dokularındaki dağılımı*. Türk Vet Hay Derg, **21**, 99-105.
- Bianchi ATJ, Zwart RJ, Jeurissen SHM, Moonen-Leusen HWM (1992) *Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life : an immunohistological approach*. Vet Immunol Immunopathol, **33**, 201-221.
- Bienstock J, Befus AD (1980) *Mucosal immunology*. Immunology, **41**, 249-270.
- Bienstock J, Befus AD (1984) *Gut and bronchus associated lymphoid tissue*. Am J Anat, **170**, 437-445.
- Bienstock J, Johnston N (1976) *A morphologic study of rabbit bronchial lymphoid aggregates and lymphoepithelium*. Lab Invest, **35**, 343-348.
- Bienstock J, Johnston N, Perey DYE (1973) *Bronchial lymphoid tissue I. Morphologic characteristics*. Lab Invest, **28**, 686-692.
- Böck P (1989) *Romeis Mikroskopische Technik*. 17. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München, s:561.
- Burns RB (1982) *Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (Gallus domesticus)*. Res Vet Sci, **32**, 359-367.
- Chamberlain DW, Nopajaroonsri C, Simon GT (1973) *Ultrastructure of the pulmonary lymphoid tissue*. Am Rev Respir Dis, **108**, 621-631.
- Chu RM, Liu CH (1984) *Morphological and functional comparisons of Peyer's patches in different parts of the swine small intestine*. Vet Immunol Immunopathol, **6**, 391-403.
- Culling CFA, Allison RT, Bar WT (1985) *Cellular Pathology Technique*. Butterworth, London, 4. edition, ch 5, Pp: 347-365.
- Dobashi M, Terashima K, Imai Y (1982) *Electron microscopic study of differentiation of antibody-producing cell in mouse lymph nodes after immunization with horseradish peroxidase*. J Histochem Cytochem, **30**, 67-74.
- Eikelenboom P, Levenbach MGE, Van den Brink HR, Streefkerk JG (1979) *Development of T and B cells areas in peripheral lymphoid organs of the rat*. Anat Rec, **194**, 523-538.
- Fagerland JA, Arp LH (1990) *A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys*. Am J Anat, **189**, 24-34.
- Fix AS, Arp LH (1989) *Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) 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, **5**, 1852-1859.
- Franklin RM, Remus LE (1984) *Conjunctiva-associated lymphoid tissue: evidence for a role in the secretory immune system*. Inv Ophthalmol Vis Sci, **25**, 181-187.
- Gastkemper NA, Wubbena AS, Bimbrere FJH, De Graff A, Nieuwenhuis P (1981) *Germinal centers and the B cell system. V. Presence of germinal center precursor cells among lymphocytes of the thoracic duct in the rat*. Cell Tissue Res, **219**, 281-289.
- Goller Th, Weyrauch KD (1993) *Das Konjunktivalepithel des Hundes. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen*. Ann Anat, **175**, 127-134.

23. **Gutman GA, Weissman IL** (1972) *Lymphoid tissue architecture. Experimental analysis of the origin and distribution of T cells and B cells.* Immunology, **23**, 465-479.
24. **Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FG** (1977) *Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry.* Scand J Haematol, **18**, 437-448.
25. **Knowles DM, Hoffman T, Ferrarini M, Kunkel HG** (1978) *The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker.* Cell Immun, **35**, 112-123.
26. **Maslak DM, Reynolds DL** (1995) *B cells and T-lymphocyte subsets of the head-associated lymphoid tissues of the chicken.* Avian Dis, **39**, 736-742.
27. **Mueller J, Brundel Re G, Buerki H, Keller HU, Gottier H** (1975) *Nonspecific acid esterase activity : a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes.* Eur J Immunol, **5**, 270-274.
28. **Müller HK, Heusermann U, Stutte HJ** (1974) *Enzyme histochemical observations on the localization and structure of the T cell and B cell regions in the human spleen.* Cell Tissue Res, **154**, 167-179.
29. **Müller J, Keller HU, Hagmann JD, Cornioley RJ, Ruchti C, Gottier H** (1981) *Nonspecific esterase in human lymphocytes.* Int Arch Allergy Appl, **64**, 410-421.
30. **Parsons KR, Bland AP, Hall GA** (1991) *Follicle associated epithelium of the gut associated lymphoid tissue of cattle.* Vet Pathol, **28**, 22-29.
31. **Reynolds JD, Morris B** (1983) *The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep.* Eur J Immunol, **13**, 627-635.
32. **Sminia T, Janse EM, Plesch BEC.** (1983) *Ontogeny of Peyer's patches of the rat.* Anat Rec, **207**, 309-316.
33. **Sousa M, Freitas A, Huber B, Cantor H, Boyse EA** (1979) *Migratory patterns of the ly subsets of T lymphocytes in the mouse.* Adv Exp Med Biol, **114**, 51-54.
34. **Stock EL, Sobut RA, Roth SI** (1987) *The uptake of horseradish peroxidase by the conjunctival epithelium of the guinea-pig.* Exp Eyc Res, **45**, 327-337.
35. **Weldman JE, Keuning FJ, Molenaar I** (1978) *Site of initiation of plasma cell reaction in the rabbit lymph node : Ultrastructural evidence for two distinct antibody forming cell precursors.* Wirschows Arch (Cell Pathol), **28**, 187-202.
36. **Wolf J L, Bye WA** (1984) *The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system.* Ann Rev Med, **35**, 95-112.
37. **Wotherspoon AC, Hardman-Lea S, Isaacson PG** (1994) *Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva.* J Pathol, **174**, 33-37.

**Yazışma adresi:**

Prof. Dr. Reşat Nuri AŞTI  
AÜ Veteriner Fakültesi  
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı  
ANKARA