

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖPEKLERİN KONJUNKTİVASINDA BULUNAN MAST  
HÜCRELERİNİN HİSTOKİMYASAL, ENZİM  
HİSTOKİMYASAL  
VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

**Tezi Hazırlayan  
Derya AKGÖZ**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Narin LİMAN**

**Veteriner Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2006  
KAYSERİ**

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖPEKLERİN KONJUNKTİVASINDA BULUNAN MAST  
HÜCRELERİNİN HİSTOKİMYASAL, ENZİM  
HİSTOKİMYASAL  
VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

**Tezi Hazırlayan  
Derya AKGÖZ**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Narin LİMAN**

**Veteriner Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından EÜBAP-SBY-05-11  
nolu  
proje ile desteklenmiştir**

**Temmuz 2006  
KAYSERİ**

**Prof.Dr.Narin LİMAN** danışmanlığında **Derya AKGÖZ** tarafından hazırlanan “**Köpeklerin Konjunktivasında Bulunan Mast Hücrelerinin Histokimyasal, Enzim Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Özellikleri**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**26.07.2006**

**JÜRİ :**

**İmza**

**Üye : Prof.Dr.Narin LİMAN (Danışman)**

**Üye : Doç.Dr.Güner KÜÇÜK BAYRAM**

**Üye : Yrd.Doç.Dr.Nazmi ÇETİN**

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Enstitü Müdürü**  
**Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın her aőamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof.Dr.Narin LİMAN'a, önerileri ile beni yönlendiren değerli hocalarım Doç.Dr.Güner KÜÇÜK BAYRAM'a, Yrd.Doç.Dr. Feyzullah BEYAZ' a, tez süresince her konuda desteklerini esirgemeyen aileme ve değerli arkadaşlarım Arő.Gör.Hakan SAĞSÖZ, Arő.Gör.Serkan ERDOĞAN, Veteriner Hekim Emel BABÜR ve bu araştırmanın materyalini sağlayan Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ile bu araştırmanın projelendirilmesini sağlayan ve maddi destekte bulunan Erciyes Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teőekkürlerimi sunarım.

### III

## KÖPEKLERİN KONJUNKTİVASINDA BULUNAN MAST HÜCRELERİNİN HİSTOKİMYASAL, ENZİM HİSTOKİMYASAL VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

### ÖZET

Gözün biyolojik zırhı olan konjunktiva hem fiziksel bir bariyer olarak tozların, yabancı cisimlerin, mikroorganizmaların göz küresinin arka kısımlarına ulaşarak yangı oluşturmasını engeller, hem de taşıdığı müköz salgı yapan kadeh hücreleri, bezler ve aköz salgı yapan yardımcı gözyaşı bezleri ile göz yaşı filminin mukusunun üretilmesini, korneanın şeffaflığını ve ıslaklığını sağlar. İçerdiği mukozayla ilişkili lenfoid doku ile de yabancı mikroorganizmaları etkisiz hale getirerek immunolojik savunmada önemli rol oynar. Konjunktivanın hücresel kompozisyonunu gözün immünitesinde önemli rol oynayan lenfositler, mast hücreleri ve Langerhans hücreleri, diğer dentritik hücreler ile makrofajlar gibi antijen sunan hücreler oluşturur. Mast hücreleri de esas olarak mikroorganizmaların vücuda girebildikleri yerlerde bulunduğu için patojenlerle direkt temas kuran ilk yangı hücrelerinden biri olarak değerlendirilebilir. Bu çalışma köpeklerin konjunktivasında bulunan mast hücrelerinin histokimyasal, enzim histokimyasal özellikleri ile proteaz aktivitelerini belirleyerek fizyolojik koşullarda mast hücre popülasyonunun heterojenitesini ortaya koymak amacıyla yapılan bu çalışma 10 adet gözleri sağlıklı köpek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Köpeklerde normal konjunktivadaki mast hücrelerinin formalin duyarlılıklarına göre formalin duyarlı ve dirençli olmak üzere iki alt tipe ayrıldıkları ve metokromazi gösterdikleri saptanmıştır. Alcian blue-safranin O katyonik boya kombinasyonunda mast hücrelerinin alcian blue pozitif, safranin O pozitif ve alcian blue-safranin O pozitif olmak üzere üç tip granül içerdiği belirlenmiştir. Mast hücreleri granüllerindeki proteoglikanlarının kritik elektrolit konsantrasyonlarına göre de iki alt tipe ayrılmıştır (CEC 0.2/0.3 molar ve 0.7/0.8 molar). Mast hücrelerinin proteoglikan ve proteaz içeriklerinin bir arada gösterilmesinin mümkün olabileceği düşüncesinden yola çıkarak Naphtol AS-D chloroasetate esterase boyama tekniği ardından da proteoglikanları belirlemek için 0.2/0.3 M'lık CEC veya 0.7/0.8 M'lık CEC boyama tekniği ilk kez bu çalışmada uygulanmıştır. NASDCA-CEC boyamasında sadece kimaz içeren (NASDCA pozitif) hücreler, kimaz ile proteoglikanları birlikte içeren mikst hücreler ve sadece proteoglikan içeren (CEC pozitif) hücreler olmak üzere üç mast hücresi alt tipi ayırt edilmiştir.

Proteaz içeriklerine göre de kimaz pozitif ve triptaz pozitif olmak üzere iki hücre tipi tanımlanmıştır. Triptaz hariç tüm boyamaların formalin tespitinden etkilendiği, yani Carnoy solüsyonunun granüllerdeki proteoglikan ve proteaz içeriğini koruyarak mast hücrelerinin boyanma özelliklerini bozmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak köpeğin konjunktivasında bulunan mast hücreleri formalin duyarlılığına, katyonik boya ile boyanma özelliklerine, granüllerindeki proteoglikanlara ve proteazlara göre farklılıklar gösteren heterojen nitelikli hücreler olduğu belirlenmiştir. Bu özellikleri de özellikle konjunktival hastalıkların patogenezinin belirlenmesinde bir kriter olarak kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Köpek, Konjunktiva, Mast Hücreleri, Histokimya, Enzimhistokimya, İmmunohistokimya

**HISTOCHEMICAL, ENZYME HISTOCHEMICAL AND  
IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF  
MAST CELLS IN DOG'S CONJUNCTIVA**

**ABSTRACT**

The conjunctiva that is a biological armor for eye is both prevent to foreign matters to be inflammation to eye ball's backside as a barrier and produce the mucin, to manufacture mucus of tear film of eye or to provide transparency and wetness of cornea with its goblet cell to be produced mucous secretion, the glands and the accessory tear glands to be made aqueous secretion. It also play a important role for immunological defence with its contain mucosa associated lymphoid tissue, deactivating the foreign microorganisms. The cellular composition of eye consist of lymphocytes, mast cells, Langerhan's cells and antigen presenting cells such as other dendritic cells and like macrophages, playing a important role for immunity of eye. It is evaluated that mast cells are first inflammation cells which could be directly contacted to pathogens where it is located place, entering microorganisms to body.

This study was carried out to manifest the heterogeneity of mast cells populations in physiological conditions, determining the properties of histochemical and enzyme histochemical and activity of protease, using ten dogs which has healthy eyes. In dogs, the mast cells in normal conjunctiva were found to be formaline sensitive and formaline resistant as sensitivity of formaline and that it were shown the metachromasie. In cationic stains combination of alcian blue-safranin O, it was determined that the mast cells have three types granules as alcian blue positive, safranin O positive and alcian blue-safranin O positive. The mast cells were divided two subunits according to critical electrolit concentrations of proteoglycans in its granules (CEC 0.2/0.3 molar and 0.7/0.8 molar). We thought that it is possible that proteoglycans and protease contents of the mast cells were demonstrated together. Thus, in study we carried out firstly to determine the proteoglycans for CEC 0.2/0.3 molar or 0.7/0.8 molar CEC stains after Naphtol AS-D chloroasetate staining method. In NASDCA-CEC staining, it was determined that mast cells had three subunits as the cells only contained chymase (NASDCA cells), the mix cells contained chymase and proteoglycans together and the cells only contained proteoglycans (CEC positive cells).

According to protease contents two cells types were described as chymase positive and tryptase positive. Except for tryptase staining, other staining were effected by formaline fixation, that is, it was determined that the Carnoy fixation was not damaged to staining properties of mast cells, protecting the contents of proteoglycans and protease in its granules.

Consequently, the mast cells in conjunctiva of dogs were cells heterogenic qualified shown to disparity according to the sensitivity of formaline, the staining properties with cationic dyes and proteoglycans and proteases in its granules. Those properties might utilize to determine the pathogenesis of conjunctival diseases as a criteriaon.

**Key words:** Dog, Conjunktiva, Mast Cells, Histochemistry, Enzym Histochemistry, Immunohistochemistry.

**İÇİNDEKİLER**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
İÇ KAPAK .....	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİL LİSTESİ .....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	20
4. BULGULAR .....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	52
6. KAYNAKLAR .....	60
ÖZGEÇMİŞ	

**KISALTMALAR**

AB	: Alcian Blue
AKC	: Atopik Keratokonjunktivitis
APC	: Antijen Sunan Hücre
CALT	: Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku
CEC	: Kritik Elektrolit Konsantrasyonu
CLPC	: Kontak Lens İlişkili Papillar Konjunktivitis
COA	: Kontak Okuler Allerji
CPA	: Karboksipeptidaz A
CTMC	: Bağ Doku Mast Hücre
FAE	: Folikül ile İlişkili Epitel
GAG	: Glikozaminoglikan
GPC	: Giant Papillar Konjunktivitis
IgE	: Immunglobulin E
IL	: İnterlöykin
LT	: Lökotrien
MC <sub>C</sub>	: Mast Hücre Kimaz
MC <sub>T</sub>	: Mast Hücre Triptaz
MC <sub>TC</sub>	: Mast Hücre Triptaz-Kimaz
MMC	: Mukozal Mast Hücre
NASDCA	: Naftol AS-D Klorasetat Esteraz
NO	: Nitrik Oksit
PAC	: Perennial Alerjik Konjunktivitis
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
PBS	: Fosfat Buffer Solüsyon
PGD	: Prostaglandin
PMN	: Polimorf Nükleer Lökosit
RMCP	: Rat Mast Hücre Proteaz
SAC	: Mevsimsel Alerjik Konjunktivitis
SJS	: Steven-Johnson Sendromu
SMCP	: Koyun Mast Hücre Proteazı
SO	: Safranin O
T	: Triptaz



## VII

TC	: Triptaz-Kimaz
TNF	: Tumor Nekrotik Faktör
TLR	: Toll-like Reseptörleri
VIP	: Vazoaktif İntestinal Peptit
VKC	: Vernal Keratokonjunktivitis

## VIII

### ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<u>no</u>	
Şekil 4.1.	Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, üçlü boyama X 20 ..... 24
Şekil 4.2.	Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, üçlü boyama X 20 ..... 24
Şekil 4.3.	Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, üçlü boyama X 20 ..... 25
Şekil 4.4.	Forniks, üçlü boyama X 10 ..... 26
Şekil 4.5.	Bulbar konjunktiva, üçlü boyama X 20 ..... 26
Şekil 4.6.	Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, formaldehit tespiti, kısa süreli toluidine blue X 10 ..... 28
Şekil 4.7.	Forniks, Carnoy tespiti, kısa süreli toluidine blue X 20 ..... 28
Şekil 4.8.	Forniks, formaldehit tespiti, uzun süreli toluidine blue X 10 ..... 29
Şekil 4.9.	Forniks, formaldehit tespiti, kısa süreli toluidine blue X 10 ..... 30
Şekil 4.10.	Forniks, Carnoy tespiti, AB-SO X 20 ..... 31
Şekil 4.11.	Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, formaldehit tespiti, mikst hücre, AB-SO X 100 ..... 31
Şekil 4.12.	Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, Carnoy tespiti, intraepitelial hücre, AB-SO X 100 ..... 32
Şekil 4.13.	Forniks konjunktiva, Carnoy tespiti, SO (+) hücre, AB-SO X 100 ..... 33
Şekil 4.14.	Forniks konjunktiva, Carnoy tespiti, AB (+) hücreler, AB-SO X 20 ..... 34
Şekil 4.15.	Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, berberin sülfat X 100 35
Şekil 4.16.	Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, berberin sülfat X 100 ..... 36
Şekil 4.17.	Bulbar konjunktiva, Carnoy tespiti, berberin sülfat X 20 ..... 36
Şekil 4.18.	Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, NASDCA-CEC 0,7-0,8 X 100 ..... 37
Şekil 4.19.	Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, NASDCA-CEC 0,7-0,8 X 100 ..... 38
Şekil 4.20.	Bulbar konjunktiva, Carnoy tespiti, NASDCA-CEC 0,7-0,8 X 20 ..... 38
Şekil 4.21.	Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20 ..... 39
Şekil 4.22.	Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, Carnoy tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20 ..... 40
Şekil 4.23.	Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, Carnoy tespiti, 0,2-0,7 M'lık CEC X 20 ..... 40
Şekil 4.24.	Forniks, Carnoy tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20 ..... 41

	<u>Sayfa no</u>
<b>Şekil 4.25.</b> Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC 20.....	41
<b>Şekil 4.26.</b> Forniks, formaldehit tespiti, NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 20 .....	42
<b>Şekil 4.27.</b> Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 20 .....	43
<b>Şekil 4.28.</b> Forniks, Carnoy tespiti, intraepiteliyal kimaz pozitif hücre, NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 100 .....	44
<b>Şekil 4.29.</b> Forniks, formaldehit tespiti, kimaz pozitif ve mikst hücreler NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 100.....	44
<b>Şekil 4.30.</b> Palpebral konjunktiva, Carnoy tespiti, CEC pozitif hücreler NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 100.....	45
<b>Şekil 4.31.</b> Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, kimaz pozitif hücreler NASDCA/0,7-0,8M'lık CEC X 100.....	45
<b>Şekil 4.32.</b> Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, kimaz pozitif ve mikst hücreler NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 100.....	46
<b>Şekil 4.33.</b> Forniks konjunktiva, Carnoy tespiti, CEC pozitif hücreler NASDCA/0, 7-0,8 M'lık CEC X 100.....	47
<b>Şekil 4.34.</b> Forniks, Carnoy tespiti, NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 100 .....	48
<b>Şekil 4.35.</b> Forniks, Carnoy tespiti, NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 100 .....	48
<b>Şekil 4.36.</b> Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, formaldehit tespiti, Triptaz X 20.....	49
<b>Şekil 4.37.</b> Forniks, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler X 20.....	50
<b>Şekil 4.38.</b> Forniks, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler X 20.....	50
<b>Şekil 4.39.</b> Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler X 20 .....	51
<b>Şekil 4.40.</b> Köpek bağırsağı, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler X 20.....	51

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çevreye direkt teması nedeniyle göz, alerjik hastalıklara daha sık meyil gösteren bir organ olup, alerjik göz hastalıkları insan ve hayvanların yaşamını olumsuz yönde etkileyen yaygın klinik bir problemdir. Oküler alerjiler, gözün yüzey dokularında (göz kapağı derisi ve konjunktiva) meydana gelir. Oküler alerjilerde, gözde yanma, batma, kaşıntı, çapaklanma, kızarıklık, sulanma, ışığa karşı hassasiyet ve görme bozukluğu şekillenir. Tüm bu semptomlara mast hücreleri tarafından salınan histamin, proteazlar, sitokinler ve diğer mediyatörler neden olur. Mast hücre türevli mediyatörler oküler yüzeyde bulunan yangı hücrelerinin (nötrofiller, eozinofiller ve lenfositler) infiltrasyon ve migrasyonunda görev alırlar ve oküler yüzeyde immunoregülasyonu sağlarlar.

Oküler alerjilerin iki önemli bulgusu; konjunktival mast hücre aktivasyonu ve oküler yüzeydeki eozinofillerin sayısındaki artıştır. Oküler yüzeyde mast hücre sayısı alerjik konjunktivitisin bütün formlarında artar. Vernal keratokonjunktivitis ve alerjik konjunktivitiste mast hücre mediyatörleri olan triptaz ve kimaz miktarının arttığı saptanmıştır. Bugüne değin konjunktivada mast hücrelerinin yerleşimi, histokimyasal ve enzim histokimyasal özelliklerine ilişkin çalışmalar gerek sağlıklı gerekse alerjik konjunktivitli insanlarda ve laboratuvar hayvanlarından da sıklıkla yoğunlaşmıştır. Köpeklerde klinik olarak konjunktivitislere sık rastlanması normal konjunktivada mast hücrelerinin yerleşimlerinin ve alt tiplerinin belirlenmesinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma sağlıklı köpeklerde konjunktivadaki mast hücrelerinin histokimyasal ve enzim histokimyasal özelliklerini ve bu bağlamda mast hücrelerinin alt tiplerini ortaya koymak ve konjunktival hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalara ışık tutmak amacıyla planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

İlk olarak 1876 yılında Paul Ehrlich tarafından keşfedilen mast hücreleri; tüm organlarının bağ dokusu içinde, en başta deri, solunum ve sindirim sisteminin mukozası ve submukozası olmak üzere, miyokardın intersitisyumunda, vücut boşluklarını saran seröz membranlarda, timüs ve kemik iliği gibi lenfoid dokularda ve birçok organın kapsülünde bulunurlar (1, 2). Buralarda akut yangısal reaksiyonlarda önemli rol oynarlar. İnsanlarda vücutta çok yaygın olarak bulunan mast hücreleri özellikle dermiste, sindirim ve solunum yollarında bol miktardadırlar. Farklı boyalar ve sayım teknikleri kullanılarak insanda yaklaşık  $\text{mm}^3$  başına 7.000 ila 10.000 arasında mast hücresi olduğu, bunların %0.2 ile %0.7 sinin alandaki dermal mast hücrelerine karşılık geldiği bildirilmektedir (3). Mast hücreleri kemik iliğindeki multipotent CD34+ prekürsör hücrelerinden köken alırlar ve agranüler monositik hücreler olarak dolaşıma katılırlar. Güçlü inflamatuvar mediyatörleri içeren mast hücreleri doku mononükleer hücreleridir. Normal durumda olgun mast hücreleri periferel dolaşımda bulunmaz. Mast hücrelerinin, dolaşımdaki bazofillerin dokudaki karşılığı olduğu düşünülmektedir. Olgunlaşmamış mast hücreleri dokulara göçten sonra tipik granüllerle donanırlar (3-8).

Mast hücreleri yerleşimlerine göre yuvarlak, oval veya mekik şeklinde ortalama 15-30  $\mu\text{m}$  büyüklüğünde olan, sitoplazması metakromatik granüllerle dolu, küçük çekirdekli iri hücrelerdir (1, 7, 9). Bu hücreler hematoksilen-eosin ile boyanmış kesitlerde spesifik olarak tanımlanamazlar. Sitoplazmik granüller Romanowsky boyası için yüksek affiniteye sahiptirler.

Bu granüller, uygun olmayan fizyasyonda boyanmayabilir veya Diff-Quik gibi su bazlı boyalarda eriyebilirler. Geleneksel Romanowsky boyaları (Wright, Giemsa veya Leishman gibi) mast hücrelerinin görülebilmesi için en ideal boyalardır (3, 5, 9-11) ; ancak Toluidine blue, Azur A, Bismarck Brown ve Thionin gibi metakromatik boyalarla ve Alcian blue gibi granül spesifik boyalarla da boyanırlar (1-3, 7, 12, 13). Işık mikroskopik incelemelerde çoğu zaman granüller yoğun boyandığından tek tek seçilemezken bazı hücrelerde de çekirdeğin granüller tarafından tamamen örtüldüğü görülür. Elektron mikroskopik incelemelerde mast hücrelerinin membranının mikrovillus benzeri sitoplazmik uzantılar taşıdığı gözlenir. Sitoplazma iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, az sayıda granüler endoplazmik retikulum (grER), bağımsız ribozom ve mitokondriyonlar içerir (1). Bazı hücrelerde sitoplazma içinde yağ damlacıklarına da rastlanır. Merkezi veya eksentrik konumda olan çekirdek bazı hücrelerde derin invaginasyonlar ve çentiklenme göstermesine karşılık genellikle segmentsiz olarak gözlenir. Çekirdekteki heterokromatin daha çok çekirdek membranı boyunca kümeler halindedir. Sitoplazmada çok sayıda bulunan granüller ya hücrede homojen olarak dağılmış ya da olgunlaşmalarına bağlı olarak hücre membranına yakın olarak yerleşmiştir. Ayırt edilmesi güç perigranüler bir membranla çevrili olan bu granüller, hayvan türlerine göre değişen sayı, şekil, büyüklük ve iç yapı gösterir (7, 9-11). Ratta bunlar diğer türlere göre daha fazla sayıdadırlar (ortalama 500 adet/hücre) ve ince taneciklerden oluşan granül matriksi homojen, elektron yoğun bir iç yapı gösterir. Koyunda ve keçide elektron yoğun ve elektron açık görünümdeki granüller yanında, az sayıda kafes görünümündeki lameller içeren granüller ve elektron yoğun granüllerde kare veya dikdörtgen şekilli yoğun kitlelere rastlanır (14). Kobayda ise bu granüller, kesitleri bal peteği görünümünü andıran 14 nm'lik boşluklardan oluşan kristal benzeri kafesleri içerir (2). Kedilerdeki granüller iki farklı tiptedirler. Orta derecede yoğun granüllerin yanında, içlerinde elektron yoğun iplik veya ağ benzeri yapılar bulunan granül tipi de söz konusudur (15, 16). Köpektaki granüller elektron yoğun yapıdadır. Granül matriksini homojen dağılmış tanecikler şekillendirir (4,17). Sığırdaki durum farklıdır. Bunlar üç tip granül içerirler: Birincisi farklı derecelerde elektron yoğun granül tipidir. İkinci tip granüller içeriklerinin partiküler görünümüyle ayırt edilirken, üçüncü tip granüller ise yapılarındaki inklüzyonlarla karakterizedir (18, 19). İnsanda mast hücreleri farklı büyüklükte iki tip granül içerirler. Bunlardan küçük olan granüllerin matriksinde kısa, silindirik, yığın benzeri inklüzyonlarla karakterizedirler.

İkinci tip granüller, birbirine paralel kordonların oluşturduğu kafes görünümünde iç yapı gösterirler. Bu granüllerde merkezdeki soluk renkli bölgeyi yoğun bir matriks çevreler (1, 20).

Mast hücrelerinin birçok ortak özelliği bulunduğu halde doku ve türe bağlı farklılıklar taşınması nedeniyle heterojenite gösterirler. Histokimyasal olarak iki ayrı mast hücresi tipinin bulunduğu ilk defa Enerbacke tarafından kemiricilerde keşfedilmiştir. Çeşitli araştırmalarda kemirici mast hücrelerinin morfolojik ve fonksiyonel farklılıklara sahip olduğu belirtilmiştir. Bu farklılıklar, hücrelerin büyüklüğü ve içerdikleri granüllerin yoğunluğu, T-hücre bağımlılığı, içerdiği granül proteazları, salgılatıcı ajanlara verdikleri yanıtlar ile içerdikleri proteoglikanların yapı ve içeriği olarak sıralanabilir (10, 21).

Kemirici mast hücreleri histokimyasal kriterlere göre alt tiplere ayrılırken (2, 17), kedi (15, 16), sığır (18, 19), köpek (4, 17) ve insan (22, 23) mast hücreleri içerdikleri proteazlara göre sınıflandırılırlar (18). Kemiricilerde mast hücreleri formole duyarlı; alcian blue-safranin O (AB-SO) kombine boyama metodunda AB (+) granüller içeren mukozal mast hücreleri (MMC) ile formole dirençli ve AB-SO boyamasında SO (+) granüller içeren bağ dokusu mast hücreleri (CTMC) olmak üzere iki tiptir (2, 17, 24-26). Alcian Blue hem kondrotin sülfatlı proteoglikanları içeren mukozal mast hücre tiplerini, hem de heparin ve kondroitin sülfat proteoglikanlarını içeren bağ doku mast hücre tiplerini tanımlamaktadır. Safranin sadece yüksek miktardaki sülfatlı heparin proteoglikanlarını boyar ve seçici olarak bağ doku mast hücre tiplerini boyar, ancak bu mast hücrelerinin sadece bir bölümü safranin pozitifdir. Çünkü olgun olmayan bağ doku mast hücreleri AB ile kuvvetli boyanmasına karşılık, SO ile zayıf boyanır (27).

MMC'leri küçük hücreler olup (5-10µm), Carnoy veya bazik kurşun asetat fiksasyonundan sonra kolaylıkla görülebildikleri halde, standart formalin veya aldehite dayanan fiksatiflerle fiksasyonu takiben boyanma özelliklerinin bazılarını kaybederler. CTMC'leri ise daha büyük hücreler olup (10-20µm), formaldehit tespitinden etkilenmezler. Bununla birlikte formalinle tespitten sonra uzun süreli toluidine blue boyama tekniği ile MMC'lerin boyanabildiği gösterilmiştir (7, 28).

İnsanlarda mast hücrelerinin tümü heparin içerdiğinden mukozal ve bağ doku tipi mast hücreleri şeklinde bir sınıflandırması mümkün değildir. İnsanlarda (22, 23, 29, 30) ve evcil hayvanlarda (3, 4, 15-17, 31, 32) mast hücrelerinin tiplendirilmesinde granüllerindeki spesifik proteazlar olan kimaz ve triptaz içerikleri kriter alınmaktadır (3,

4, 7, 15-19, 22, 23, 31, 33-37). Bazı çalışmalarda (27, 29, 30, 34, 35, 37-39), insan mast hücreleri granüllerinin proteaz (kimaz, triptaz, karboksi peptidaz) içeriğine göre sadece triptaz içerenler ve kimaz/triptaz içerenler olmak üzere iki tipinin bulunduğu, bazısında (40) ise mast hücre granüllerinin proteaz ve avidine bağlanmalarına göre üç farklı tipinin bulunduğu belirtilmektedir. Bunlar triptaz içerenler (T), kimaz içerenler ve triptaz/kimaz içerenler (TC) olarak adlandırılmaktadır. Kimaz pozitif olanlar avidine bağlanırlar ve karboksipeptidaz içerirler. Meme derisi ile pirenşiminde ve aksillar lenf düğümlerinde mast hücrelerinin %95'den fazlası triptaz ve kimaz içerirler, sadece triptaz veya kimaz içerenler ise çok azdır. Akciğer alveollerindeki mast hücrelerinin %91'i triptaz, %8'si triptaz/kimaz, %1'i sadece kimaz içerir. Bağırsak mukozasındaki mast hücrelerinin ise %58'i triptaz, %35'i triptaz/kimaz, %7'si ise sadece kimaz içerir. Oysa bağırsak submukozasındaki mast hücrelerinin %83'ü triptaz/kimaz, %17'si kimaz içerir (40). İnsanlarda; akciğerlerde ve bağırsak mukozasında yerleşen ve sadece triptaz içeren mast hücreleri mukozal mast hücrelerinin, deride ve intestinal submukozadakiler ise kimazı ve karboksipeptidazı da içerdiğinden bağdokü mast hücrelerinin karşılığı olarak düşünülür (27, 34, 35, 37).

Köpeklerde de yalnız triptaz ( $MC_T$ ), yalnız kimaz ( $MC_C$ ) ve her ikisini içeren ( $MC_{TC}$ ) mast hücreleri olmak üzere üç farklı mast hücre alt tipi bulunmaktadır (17). Yine sığır (18, 19), koyun (14) ve kedilerde (15, 16) de mast hücreleri, mast hücre spesifik proteazları olan kimaz ve triptaz içerikleri kriter alınarak yalnız triptaz ( $MC_T$ ), yalnız kimaz ( $MC_C$ ) ve her ikisini içeren ( $MC_{TC}$ ) mast hücreleri olmak üzere üç farklı gruba ayrılmıştır (15, 18, 41, 42). Kedilerde triptaz pozitif mast hücreleri organların birçoğunda görülürken, kimaz içeren mast hücreleri özellikle kulak derisi, dil, dalakta, mide ve rektum submukozasında yoğundur. Buna karşın kalp, duodenum, jejunum, ileum veya rektumun seroza ya da mukozasında bulunmamaktadır. Ayrıca kedilerde buna ek olarak hem triptaz hem de kimaz içeren mast hücrelerinin kulak derisinde, dilde, dalakta ve rektumun submukozası içinde yerleştikleri bildirilmektedir (15).

Kemirici mast hücre alt tipleri farklı kimaz izoformlarını depolar. Rat mast hücrelerinde bulunan kimazlar, kimotripsin benzeri serin proteaz I ve II (Rat Mast Cell Proteaz I ve Rat Mast Cell Proteaz II) (43) olarak isimlendirilir (44). Ratta MMC'nin granüllerinde kondroitin sülfat ve RMCP II bulunduğu ve alcian blue (+) reaksiyon verdikleri, CTMC'nin granüllerinde ise heparin ve RMCP I bulunduğu ve safranin (+) reaksiyon



verdikleri bildirilmiştir (28). Farede de mast hücreleri dokudaki lokalizasyonlarına, proteaz ve proteoglikan içeriklerine göre bağdoku ve mukozal mast hücreleri olarak tiplendirilir. Deride ve peritonda yerleşen CTMC'leri kimaz, triptaz, karboksipeptidaz A (CPA), heparin proteoglikanı ve yüksek oranda histamin içerir. Bağırsakların ve hava yollarının mukozasında yerleşen MMC'ler ise kimaz, kondroitin sülfat proteoglikanı ve düşük oranda histamin içerir. Farede CTMC'lerde bulunan kimaz mMCP-4 ve mMCP-5, MMC'lerde bulunan kimaz ise mMCP-1, mMCP-2, mMCP-9'dur (45, 46, 101). Buna karşın insanda sadece tek bir kimaz tanımlanmıştır ve mast hücreleri bu kimazın varlığına ya da göreceli yokluğuna göre sınıflandırılmaktadır. Farklı araştırmalar kimaz negatif mast hücrelerinin kimaz pozitif mast hücrelerinden oldukça farklı özelliklere sahip olduğu göstermiştir. Proteazlardan triptaz insan mast hücrelerinin çoğunda ya da hepsinde bulunur. Fakat kemiricilerde özellikle bağ dokusundaki mast hücrelerinde yerleşmiştir, mukozal mast hücreleri bu enzimden yoksundur (2, 26).

Mast hücre heterojenitesi sitokin içeren faktörlerin sayısı ile düzenlenir, bu faktörler mast hücrelerinin olgunlaşması, farklılaşması ve proliferasyonunda etkilidirler (15). Mast hücreleri, salgıladıkları biyolojik mediyatörlerin lokal ve sistemik etkilerini kullanırlar. Bu mediyatörlerden bir çoğu sitoplazmik granüllerin içinde (önceden şekillenmiş mediyatörler) depo edilirler, diğerleri (yeni şekillenmiş mediyatörler) ise mast hücreleri uyarıldığı zaman üretilirler. Aktivasyondan sonra mast hücreleri hızlı bir şekilde granül ilişkili mediyatörlerini salarlar (3, 7, 8, 21 ,47).

Mast hücreleri tarafından salınan mediyatörler ile sitokinler ve onların etkileri şöyledir (3, 7, 8, 37, 47, 56):

### **1. Önceden Şekillenmiş Mast Hücre Mediyatörleri**

**Histamin:** İnsanlarda akut alerjik yangının bir mediyatörü olarak tanımlanmış olan histamin mast hücreleriyle ilişkili olan ilk kimyasal substanzlardan biridir. B-imidazoletilen aminden ilk olarak 1907'de sentezlenmiş ve hayvan dokularında da bulunmasından dolayı daha sonra histamin olarak adlandırılmıştır. Duyarlı hayvanlara antijenik enjeksiyonlar sonunda histaminin tekrar üretilmesi, akut alerjik olgularda humoral bir mediyatör olabileceğini düşündürmektedir. Histamin mast hücrelerinde golgi aygıtında, bazofillerde ise dekarboksilasyon yoluyla histidin dekarboksilaz etkisi altında prekürsör amino asit histidinden sentezlenmektedir. Başlangıçta şekillenen amin, heparin ya da proteoglikanlarla ilişkili glikozaminoglikan yan zincirlerinin asidik

rezidüleri ile iyonik ilişkide bulunur. Histamin mast hücreleri yoluyla düşük düzeyde spontan olarak salgılanmaktadır. Histaminin  $H_1$ - $H_4$  kadar değişen dört farklı reseptörünün etkisi altında değişik biyolojik etkiler oluşmaktadır. Alerjik reaksiyonlarda histamin üzerinde  $H_1$  reseptörünün etkisi vardır.  $H_2$  reseptörünün mide asit sekresyonunu artırdığı düşünülmektedir.  $H_3$  reseptörü; sinir telleri üzerindeki histamin için presinaptik bir reseptör olarak görev yapar.  $H_4$  reseptörünün ise immun sistemin düzenlenmesinde bir rolü olduğu gibi, kemik iliği hücreleri, periferal kandaki mononükleer hücreler ve eozinofillerle de bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir (37, 48). Histamin vazopermeabiliteyi artırır ( $H_1$  ve  $H_2$ ), düz kasların kasılmasını sağlar ( $H_1$ ), prostoglandin üretimini yükseltir ( $H_1$ ), PMN hücre kemokinlerini, eozinofil C3b reseptörlerini ( $H_1$ ), fibroblast ve endotelial hücre gelişimini artırır, baskılayıcı T-lenfositleri uyarır, bazofil histamin salınımını azaltır ( $H_2$ ), lenfokin salınımını azaltır ( $H_2$ ), PMN göçünü azaltır ( $H_2$ ), mide asiti üretimini ve mukus üretimini artırır ( $H_1$  ve  $H_2$ ), nöronları uyarır ( $H_1$  ve  $H_2$ ) (18, 47, 49). Reseptöre bağlanan histamin, hücre içi olayları başlatır. Endotel hücrelerinde büzüşmeye yol açar ve hücreler arasından civar dokulara plazma geçişi olur. Histaminin bir başka etkisi, endotel hücrelerden prostasiklin ve nitrik oksit (NO) sentezine yol açmasıdır. Bunlar damar düz kaslarını gevşetici etki yaparak, vazodilatasyona yol açarlar (50, 51). Aynı zamanda beyindeki ağrı merkezlerinin aktive olması sonucunda kaşıntı, tıkanıklık gibi hislerle göz yaşı ve tükürük salgısı gibi sistemik refleksler görülebilmektedir (47). İnsanda mast hücreleri yalnızca histamin içerirken; kemiriciler gibi bazı türlerin mast hücrelerinde serotonin de vardır. Histamin dakikalar içinde metabolize olduğu için, etkisi salgılandığı yerde veya yakınında olur (1).

**Proteoglikanlar:** Mast hücre granüllerinin esansiyel bileşenleri olan proteoglikanlar, bir protein kor ile glikozaminoglikan (GAG) yan zincirlerinden oluşurlar. Mast hücrelerindeki protein kor serglisin (52) olduğu halde mast hücrelerinin alt tiplerinde GAG zincirleri farklıdır. Kemirici CTMC'leri proteoglikanı heparin, MMC'lerinki ise kondroitin sülfattır. İnsanda mast hücrelerinin tümü heparin içermektedir. Bununla birlikte kemiricilerde heparin bağ doku ve serozadaki mast hücrelerinde bulunurken, mukozadaki mast hücrelerinde bulunmamaktadır. Heparinin mast hücrelerindeki biosentezi granüllü endoplazmik retikulumun polipeptit korlarının formasyonu ile başlar. Heparin, sülfatlı proteoglikandır, güçlü bir antikoagülan olduğu bilinmektedir (37). Heparin, antitrombin III ve platelet faktör IV'e bağlıdır, komplementlerin

aktivasyonunu azaltır, fibroblast büyüme faktörlerine bağlanır, plazminojen aktivatörüdür, fosfolipaz A ve trigliseridlerin salınımını artırır, kollagen bağlı fibronektini yükseltir, triptazın, kimazın ve nötrofil elastazın aktivitelerini düzenler (3).

**Kemotaktik Faktörler:** Eozinofil ve nötrofilleri çekerler, C3a'yı inaktive ederler (3).

**Proteazlar:** Normal dokuların homeostazisinde mast hücreleri önemli bir rol oynar. Bu hücrelerce üretilen serin proteazlar (triptaz ve kimaz) özellikle inflammatuar savunmada direk etkilidirler.

**a) Triptaz:** İnsan mast hücrelerinin toplam hücre proteinlerinin %20 sini oluşturur. Serin proteazlarını içeren alt ünitelerden meydana gelmiştir. İlk olarak Glenner ve Cohen (53) histokimyasal yolla insan mast hücrelerinde tripsin benzeri aktiviteyi bulmuşlardır. Bugünlerde bu aktivite triptaz olarak tanımlanmaktadır. Kedi (15, 16), sığır (18, 19), köpek (4, 17), sıçan (54), kobay (89), fare (46) mast hücrelerinde triptazın varlığı ortaya konmuştur. Sıçan triptazı hariç bütün triptazlar heparin ya da diğer proteoglikanlar ile bağlı olarak tanımlanırlar. Hem köpek, hem de insan triptazı fibroblastlar için güçlü mitojendir ve düşük düzeylerde diğer büyüme faktörleri için potansiyel proliferatif uyarıcıdır. Triptaz hava yollarındaki düz kas hücreleri ve epitel hücreleri için de büyüme faktörüdür (37). İnsan triptazı, prostromelyisini (metalloproteinaz III) aktifleştirir ve fibrinojeni inaktive eder. Oysaki köpeklerdeki triptaz, vazoaktif intestinal peptidi (VIP) inaktifleştirir ve fibroblast proliferasyonunu uyarır. Nekropsisi sırasında serumdaki triptazın yükselmiş seviyesi mast hücre aktivasyonunu gösterir. Triptaz salınımı allerjenlere doğrudan doğruya cevap süresince ortaya çıkar. İnsan mast hücre triptazı fibroblastlar ile proliferasyon, migrasyon ve tip I kollajen sentezine sebep olur. Fibrinojenin yıkımında, bazı nöropeptidlerin hidrolize edilmesinde, nötrofillerin, eozinofillerin ve diğer inflammatuar hücrelerin toplanmasını uyarmada etkilidir (55).

**b) Kimaz:** İnsan mast hücrelerinin büyük alt popülasyonundaki kimotriptik serin proteazıdır. İnsan kimazı, MC<sub>TC</sub> mast hücre popülasyonları için sınırlıdır. Deride, solunum ve sindirim kanalının submukozal dokusunda oldukça fazladır. Bunlar triptazı da içerir. Fakat triptazdan farklı olarak karboksipeptidazlar ve proteoglikanlar makromoleküler bir kompleksten yani mast hücrelerinden salınır. Triptaza benzer olarak kimazda da granüllerde yıkımlayıcı bir aktivite mevcuttur. Ancak asidik durumlarda aktivite düşüktür. Anjiyotensin I, Anjiyotensin II' ye kimaz yoluyla

hidrolize olur. Reaksiyon anjiyotensini örten enzimden çok daha etkili olarak katalizlenir. Kimaz nörotensinleri de indirgeyebilir. Doku yıkımlanmalarında kimazın rolü büyüktür. Köpek kimazı kültüre edilen hava yollarının submukozal bez hücrelerinde mukus salınmasını uyarabilir. Bu astım ve rinitiste salgı artışıyla ilişkilendirilebilir (37). Substant P ile bradikinini azaltır, tümör hücre sitotoksitesine neden olur, keratinosit ve fibroblast gelişimini azaltır.

Yapılan birçok çalışmada her iki mast hücre proteazının yangıda önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır. Triptazın nötrofil ve eozinofiller için kritik bir rol oynadığı belirlenmiştir. Kimazın da alerjik yangılarda gerekli olduğu belirlenmiştir (16). Triptaz içeren mast hücreleri ( $MC_T$ ) yabancı ajanlara karşı immun sistem ilişkili mast hücreleri olarak görev yaparlar ve mukozal yüzeylere yerleşirler. Bunların sayıları T-lenfosit infiltrasyon bölgelerinde ve alerjik hastalıklarda artmaktadır. İmmun yetersizlik durumlarında ve kronik immun savunma sendromlarında sayıları azalmaktadır. Buna karşın, triptaz/kimaz içeren mast hücrelerinin ( $MC_{TC}$ ) primer fonksiyonu non-immun sistemle ilişkili olmalarıdır. Bu hücreler submukoza ve bağdokusunda baskın olarak bulunurlar, yoğun lenfosit infiltrasyon bölgelerinde sayıları artmaz ve immun savunma sendromlarında sayıları azalmaz (37). Mast hücreleri tarafından sentezlenen kimaz ve triptazın ölçümleri mast hücre fonksiyonunda proteazların önemini gösterir ve vurgular. Mast hücrelerindeki triptaz ve kimazın biyolojik aktiviteleri karşılaştırıldığında bazı aktiviteleri paylaştıkları görülür. Triptazın bir özelliği de yangı öncesi mast hücre fonksiyonunda rol almasıdır. Oysaki kimazın yangı reaksiyonlarında daha fazla yer aldığı görülür (31).  $MC_T$ 'ın T-lenfosit fonksiyonuyla bağlantılı olabileceği öne sürülmüştür,  $MC_T$  alt popülasyonu mevsimsel alerjik rinitis, atopik dermatitis, vernal konjunktivitis ve scleroderma gibi durumlarla ilişkilidir.  $MC_{TC}$  hücrelerinin büyük salgı ürünlerinden biri olan kimaz interlöykin-1 $\beta$  aktivasyonu ile sitokin varlığını değiştirebilir. IL-4, membran bağımlı kök hücrelerini ve kan akışını kontrol edebilir (36).

**c) Karboksipeptidazlar:** Kemirici ve insan mast hücrelerinden ilk olarak saflaştırılmıştır. Kimaz ve triptaz kadar yoğun çalışılmamışlardır. Karboksipeptidazlar fare ve sıçanların serozal ve bağ doku tipi mast hücrelerinde yerleşmektedir. İnsanda karboksipeptidazlar kimaz ile birlikte  $MC_{TC}$ 'lerde birlikte bulunur (37).

## 2. Yeni Şekillenen Mast Hücre Mediyatörleri (3, 8)

**Prostoglandinler ve Lökotrienler :** Prostoglandinler ve lökotrienler ortak bir prekürsör olan araşidonik asitten köken alan lipid mediyatörleridir. Araşidonik asit sitosolik fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin etkisiyle plazma membranından salınır. Lökotrienler, LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> ile sisteinil lökotrienler olan LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> ve LTE<sub>4</sub>'den oluşur. Nötrofillerde LTB<sub>4</sub>, mast hücreleri, bazofil ve eozinofillerde ise LTC<sub>4</sub> baskındır. LTC<sub>4</sub> vazodilatasyonu ve düz kasların kasılmasını sağlar. Histamin hem mast hücreleri, hem de bazofiller tarafından üretilmesine rağmen prostoglandin sadece mast hücrelerinden salınmaktadır. Bundan dolayı da histamin ile birlikte prostoglandinin varlığı ya da yokluğu akut alerjik yangılarda mast hücrelerinin bazofillerden ayırt edilmesini sağlar (37). Prostoglandinlerden PGD<sub>2</sub> vazodilatasyonu sağlar, damar geçirgenliğini artırır, düz kasların kasılmasını sağlar, bronş konstriksiyonunu sağlar, nötrofil kemotaksisini artırır, platelet agregasyonunu azaltır (3).

**PAF (Platelet Aktive edici Faktor):** Vazokonstriksiyonu sağlar, damar geçirgenliğini artırır, PMN hücre kemotaksisini artırır (3).

## 3.Mast Hücre Sitokinleri (3, 56)

Mast hücrelerindeki aktivasyon sitokinlerin ve kemokinlerin sentezi yoluyla da izlenebilir. Saatler sonra başlayan sitokin ve kimokin sekresyonu kronik yangıyı destekleyebilir (21, 47). Son yıllarda insan mast hücrelerinin aynı zamanda çeşitli sitokinlerin de kaynağı olduğu belirtilmiştir. Mast hücre türevli sitokinlerin hastalıklardaki önemi kesin değilken, onlar hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda önemli bir rol oynayabilirler (3, 21).

**TNF- $\alpha$ :** Alerjik yangı olgularında önemli bir sitokindir. 1980'lerde antitümör etkileri kemirici mast hücrelerinde incelenirken TNF- $\alpha$  ile olan ilişkileri bulunmuştur. İlk olarak fare peritoneal mast hücrelerinde mast hücre TNF- $\alpha$  direkt olarak elde edilmiştir. TNF- $\alpha$  immunoreaktif hücrelerin sayısı, astımdan ölmüş kişilerin akciğer dokusunda özellikle artmaktadır. TNF- $\alpha$  akciğer mast hücrelerinde önceden şekillendirilerek depo edilir ve alerjik olgularda triptazla paralel olarak salınır. Makrofaj ve lenfositlerde de fazla miktarda üretilmesine rağmen depolama kapasitesi mast hücrelerine göre çok azdır ya da yoktur (37). Fibroblast gelişimi ile kemotaksisi artırır, PGE<sub>2</sub> ile kollagenlerin üretimini, PMN hücre kemotaksisini, fagositozu ve süperoksit üretimini artırır, T-hücre sınıf II antijenini ve IL-2 reseptor ekspresyonunu artırır, histamin ve triptaz salınımını

arttırır, Langerhas hücreleri ile endoteliyal hücrelerde adezyon molekül ekspresyonuna, tümör hücre sitotoksitesine neden olur, eozinofil sitotoksitesini artırır (3).

**İnterlöykin 4 (IL-4):** Fibroblast proliferasyonunu, kemotaksis ve matris proteini üretimini, IgE üretimini, B-hücre proliferasyonunu, B-hücre IL-6 üretimini, T- hücre proliferasyonunu artırır, makrofaj ölümü ve sitokin üretimini azaltır (57).

**İnterlöykin 5 (IL-5):** Eozinofil kemotaksisini, gelişimini ve canlılığını artırır. İmmunohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yoluyla yaklaşık olarak mast hücrelerinin %10'unu oluşturdukları görülür. IL-5, MC<sub>T</sub>'lerin sınırlandırılmasında, parasiter enfestasyonlarda ve kronik alerjik yangı olaylarında görülmektedir (37, 57).

**İnterlöykin 6 (IL-6):** IgE üretimini artırır, solunum yollarındaki mukus üretimini artırır. İnsan mast hücrelerinde bulunan interlöykin 6 hem bronşial hem de nazal mukozada MC<sub>T</sub>'leri sınırlandırır. Mast hücrelerinde boyanan IL-6 özellikle müköz bezlerin çevresindeki submukozal dokuda baskın olarak bulunur (37, 57).

**İnterlöykin 8 (IL-8):** İnsan mast hücreleriyle ilişkili olan İnterlöykin 8, PMN hücre kemotaksisini artırır. Özellikle Ig-E bağımlı deri mast hücrelerinin stimülasyonunda sitoplazmik membran boyunca ve intraselüler granüllerde IL-8 ortaya konulmuştur (37).

**İnterlöykin 13 (IL-13):** IL-4 ile birlikte mevsimsel alerjik konjunktivitisi hastaların konjunktival biyopsilerinde mast hücreleriyle ilişkili olarak ortaya konulmuşlardır (37).

Mast hücreleri, sentez aktivitelerinin miktar ve tipindeki değişimlerle ani çevresel değişikliklere uyum sağlayabilen heterojen bir popülasyondur. Bu uyum çeşitli mast hücreleri aktivatörlerine karşı gelişen bir durumdur. Bu aktivatörler immunolojik ve nonimmunolojik olarak iki grupta incelenir (20, 58).

İmmunolojik aktivatörlerin başlıcası IgE/antijen birleşmesi, histamin salgılatıcı faktörler, interlöykinler (IL) ve sitokinlerdir. Mast hücre aktivasyonunda en iyi anlaşılan uyarı IgE/antijen birleşmesidir. Mast hücrelerinin membranlarında, plazma hücreleri tarafından salgılanan immunoglobulin E (IgE) için spesifik reseptörler bulunur. Vücuda bir allerjen (antijen) girdiğinde, plazma hücrelerinde bu antijene karşı spesifik olan IgE sentezlenir. Sentezlenen bu IgE'ler mast hücrelerinin yüzey reseptörlerine bağlanır. Aynı antijen vücuda ikinci defa girdiğinde mast hücre yüzeyindeki bu IgE'lere bağlanır (antijen-antikor reaksiyonu), bu olay birkaç dakika içinde mast hücre granüllerinin

degranülasyonunu başlatır. Sonuçta histamin boşalımı ile yerel cevap (ürtiker) ya da yaygın cevap (anafilaktik şok) ortaya çıkabilir (58).

Son yıllardaki çalışmalar mast hücrelerinin Ig'lerin aracılığı olmadan da aktive olabileceğini göstermiştir. İnsan ve fare mast hücresindeki Toll-like reseptörlerin (TLR), çeşitli bakteriyel, viral ve fungal molekülleri tanımak suretiyle sitokin yapımını ve iltihabi cevabı uyardığı bildirilmiştir (55).

Nöropeptidler (substanz P, somatostatin, vazoaaktif intestinal peptid, nörotensin vb.), bazı temel bileşikler (48/80 bileşiği, polymyxin B vb.), kompleman anafilatoksinleri (C3a, C4a, C5a), sitokinler (IL-1, IL-3) ile bazı ilaçlar gibi nonimmünolojik uyarılar da mast hücrelerini aktive edebilirler. İmmünolojik veya nonimmünolojik uyarılarla oluşan degranülasyon morfolojik olarak benzer görülmele birlikte mediyatör salınımına neden olan biyokimyasal olaylar farklı olabilir (55).

Alerjik reaksiyonların aksine, otoimmun veya yangısal olaylar sırasında mast hücrelerinin degranüle olduğu nadiren görülmüştür. Elektron mikroskopik düzeyde yapılan çalışmalar; belirgin bir degranülasyon olmaksızın, mast hücresi granüllerinin elektron yoğun yapısında değişiklikler oluştuğunu göstermiştir. Bu değişiklikler degranülasyon olmaksızın bazı maddelerin salgılandığını düşündürmektedir (55).

Mast hücrelerinde aktivasyon, üç önemli biyokimyasal reaksiyonu başlatır. Öncelikle mediyatör-sitokin sentezi için hücre çekirdeği uyarılarak gen düzeyinde bir reorganizasyon şekillenir. Bu şekilde yeni mediyatörler için mRNA transkriptlerinde artma meydana gelir. İkinci olarak lipid metabolizması ve lipid metabolitlerinin sentezinde artış görülür. Bunların en önemlisi araşidonik asit metabolizmasıdır. Araşidonik asit ve türevleri hücre membranında sentez edilen doymamış yağ asitleridir. Bu substans iki yoldan metabolize olur. Bunlardan siklooksijenaz yolu prostoglandinlerin sentezine, 5-lipooksijenaz yolu ise lökotrienlerin (LT-B<sub>4</sub>, -C<sub>4</sub>, -D<sub>4</sub>, -E<sub>4</sub>) oluşmasına yol açar. Mast hücreleri hangi tip proteoglikanı içeriyorsa ona göre belirli araşidonik asit ve metabolitini salgılar. Heparin içeren hücreler PGD<sub>2</sub> salgılamaktan sorumlu iken, kondritin sülfat içerenler lökotrienleri salgırlar. Üçüncü biyokimyasal reaksiyon ise mast hücrelerinin degranülasyonudur. Mast hücreleri aktive olduklarında granüller hücre yüzeyine doğru hareket ederler ve "lokal ekzositoz" olarak adlandırılan bir yöntemle içeriklerini boşaltırlar. Bu aşamada mikrotubuluslar, Ca<sup>++</sup> ve enerji gereklidir. Bu enerji hücre içinde aerobik ve anaerobik glikolizle elde edilir.

Salgılanma sırasında granüller bir diğeriyle kaynaşır ve bu şekilde hızlı salgılanma için hücre yüzeyine doğru kanallar oluşur. Ekzositozda, hücre membranıyla granül membranının kaynaşması sonucunda fazlalaşan hücre membranı, karakteristik mast hücre yüzey kıvrımlarını şekillendirir (20, 21).

Mast hücreleri; anjiogenez, kemik dokusunun yeniden şekillenmesi, parazit öldürülmesi ve alerjik inflamasyon gibi farklı görevlerde, değişik homeostatik ve patolojik şartlarda kritik etkileri olan hücrelerdir. Yakın zamanda T hücrelerine antijen sundukları ve ko-sitimülasyon sağladıkları, B hücrelerine de differensiyasyon ve proliferasyon sinyallerini ulaştırdıkları gösterilmiştir. Bu çeşitlilik, fenotip olarak heterojen hücrelerden, hem önceden oluşturulan (histamin), hem de yeni sentezlenen (TNF) mediyatörlerin salınmasına bağlıdır. Son bulgular, mast hücrelerinin, nitrik oksit sentaz ürettiğini ve endojen nitrik oksitin bir kaynağı olduğunu göstermektedir (48, 50).

Mast hücreleri esas olarak mikroorganizmaların vücuda girebildikleri yerlerde bulunduğu için patojenlerle direkt temas kuran ilk yangı hücrelerinden biri olarak değerlendirilebilir. Mast hücrelerinin enfeksiyon bölgesine TNF- $\alpha$  salgıladığı, bunun dolaşımdaki nötrofiller gibi bakterisidal özellikleri olan lökositleri enfeksiyon bölgesine topladığı gösterilmiştir (55).

Mast hücreleri allerjik ve yangısal reaksiyonlarda merkezi bir rol oynarlar (42, 59-64). Mast hücreleri depoladıkları kimyasal mediyatörlerin serbest kalmasıyla hipersensititive (aşırı duyarlılık) reaksiyonları adı verilen allerjik reaksiyonlara sebep olurlar, IgE ye yüksek affinitesi olan Fc reseptörlerine sahip oldukları için de allerjen temasına çabuk yanıt verirler (6, 9, 61, 65-67).

Mast hücrelerinin erken fazdaki klasik rollerini bir tarafa bırakacak olursak, alerjide geç ve kronik evrelerde de önemli bir işleve sahiptirler. Bu evrelerde mast hücreleri; eozinofil granülositler, lenfositler gibi infiltre olmuş hücreler vasıtasıyla aktive olabilirler ve bu hücrelerle etkileşebilirler. Aktive olmuş mast hücreleri eozinofillerin kemotaksisi, aktivasyonu ve yaşamasına yardım eden mediyatörler salgırlar. Mast hücreleri, makrofajları ve epitel hücrelerini de lenfosit ve eozinofiller için kemotaktik maddeler oluşturmaları konusunda uyarırlar (55).



Allerjik hastalıklar tipik olarak eksternal vücut yüzeylerini (deri ve mukoza) etkilerler ve herhangi bir lezyona yol açmayan çevresel antijenlere karşı aşırı duyarlılık reaksiyonunun bir göstergesidirler. Aşırı duyarlılık, IgE antikorlarının üretilmesi ile başlar. IgE antikorları; dokudaki mast hücrelerine ve dolaşımdaki bazofillere bağlanır. Allergen ile temas sonrası bu hücrelerin degranülasyonunu tetikler. Böylece vazoaaktif ve proinflamator mediyatörleri hızla salınır (11, 33, 34,37, 42, 49, 59, 61, 68).

Duyu organları içinde en önemli organ olarak sayabileceğimiz göz, hastalıklara ve dış etkenlere karşı oldukça duyarlıdır. Sinir sistemi aracılığı ile direk görme işlevi dışında su, şeker metabolizması ve seksüel dürtüler ile de ilgisi vardır. Gözü dış etkenlerden ve fazla ışıktan koruyan göz kapakları, dış kısımları kıl follikülleri ile ter ( Zeiss ve Moll bezleri) ve yağ (Meibom) bezlerini içeren deri, iç kısımları ise, konjunktiva adı verilen özelleşmiş bir mukoza ile örtülü oluşumlar olup, alt (palpebra inferior) ve üst (palpebra superior) olmak üzere ikiye ayrılır (1, 69-71). Domuzların her iki göz kapağında ter ve yağ bezleri çok gelişmiştir. Kedi hariç bütün türlerde, üst göz kapağının kenarında ter ve yağ bezleriyle ilişkili, kirpik adı verilen çok sayıda kıl bulunur. Alt göz kapağında geniş getirenler ve atlarda az sayıda bulunan kirpiklere kedi, köpek ve domuzda rastlanmaz. Bazen alt göz kapağının kenarında sinus kılları da yer alabilir. Bu kıllar ya çok küçüktür ya da kedi ve köpekte olduğu gibi bulunmayabilir. Göz kapaklarının orta bölümünü orbitadan gelen tendinöz bir bağdoku olan göz kapağı fasiyası oluşturur. Bu bağdoku göz kapaklarının kenarına doğru, kollagen ipliklerin keçe şeklinde dizilmesi sonucu, göz kapaklarını sertleştiren bir yapıya dönüşür. Bu kısım tarsus adını alır ve tarsus inferior, tarsus superior olmak üzere iki bölüme ayrılır. Göz kapaklarında bulunan Meibom bezleri (glandulae tarsales) multilobular modifiye yağ bezleridir. Üst göz kapağında alttakinden daha gelişmiş olup merkezi bir kanalla göz kapaklarının kenarlarına açılan bu bezler, kedide ileri derece, domuzda ise zayıf gelişmiştir (1, 69).

Konjunktiva kelime kökeni bakımından “bağlayan” doku anlamına gelir. Gözün biyolojik zırhı olarak kabul edebileceğimiz konjunktiva aslında ince saydam bir zarıdır. Bu çok kaygan özel zar, gözün hareketinde, kornea ve skleranın göz kapaklarından hasar görmemesini, gözün iç kısmının dış dünyadan ayrılmasını ve izole olmasını sağlar. Fiziksel bir bariyer görevi yaparak tozların, yabancı cisimlerin, mikroorganizmaların göz küresinin arka kısımlarına ulaşarak yangı oluşturmasını engeller. Taşıdığı müköz sekresyon yapan kadeh hücreleri, bezler (Henle ve Manz

bezleri) ve aköz sekresyon yapan yardımcı gözyaşı bezleri (Krause ve Wolfring bezleri) ile göz yaşı filminin mukusunun üretilmesinden ve korneanın şeffaflığının sağlanmasından sorumludur. Ayrıca kadeh hücrelerinin içerdiği jel mütin aköz göz yaşı tabakası ve hidrofobik kornea epitel arasında hidrofilik bir ara yüzey oluşturarak korneayı ıslatıcı ajan olarak hizmet görür ve epitel hücrelerinin düzensiz yüzeyini doldurarak kornea yüzeyinin optik olarak düzgün olmasını sağlar. İçerdiği mukozayla ilişkili lenfoid doku CALT (conjunctiva associated lymphoid tissue) ile de yabancı mikroorganizmaları etkisiz hale getirerek immunolojik savunmada önemli rol oynar (1, 33, 69-71, 79).

Konjunktiva korneanın periferinden başlar, skleranın ön yüzeyini kaplar ve oradan kıvrılarak kirpiklere kadar göz kapağının içini sararak örter. Üst kapakta yukarı, alt kapakta aşağıya doğru uzanır ve kendi üzerinde kıvrılarak üst ve alt forniksi oluşturur (1, 33, 69-71, 79).

Konjunktiva topografik olarak 3 bölgeye ayrılır (1, 58, 69-72):

1. Palpebral (tarsal) konjunktiva (göz kapaklarının posteriyör yüzünü örter)
2. Bulbar konjunktiva ( göz küresinin anteriyör bölümünü örter)
3. Forniks (göz kapaklarının posteriyörü ve göz küresi arasında bağlantıyı sağlayan geçit bölgesidir).

Göz kapaklarının dış yüzünü örten deri, kapakların kenarında kutan mukozadan oluşan bir membrana dönüşür ki buna palpebral veya tarsal konjunktiva (conjunctiva palpebralis) adı verilir. Palpebral konjunktiva, forniks konjunktiva (fornix conjunctiva) adı verilen geçitten sonra bulbus okulinin üzerine geçerek bulbar konjunktiva (conjunctiva bulbi) adını alır (1, 69, 71).

Bütün müköz membranlarda olduğu gibi konjunktiva da histolojik olarak epitel ve stroma (substantia propria) olmak üzere iki katmandan oluşur (1, 69-72).

Palpebral konjunktiva marjinal, tarsal ve orbital olmak üzere üç bölgeye ayrılır. Genelde palpebral konjunktivada epitel çok katlı, non-keratinize özelliktedir. Marjinal bölge deri ve konjunktiva arasındaki geçit bölgesidir ve göz kapağının kenarında minimum düzeyde keratinizasyon gösterir. Tarsal bölümde ise epitel oldukça yassıdır. Orbital bölgedeki epitel çok sayıda kadeh hücresi içerir ve altındaki bağdokuya gevşek olarak bağlanır. Üst göz kapağında 5-6, alt göz kapağında 3-4 hücre sırasından oluşan epitelde

bazal hücreler kübik, üstteki hücreler ise yassılaşılarak poliedral bir şekil kazanmıştır. Kübik hücreler tonofilamanlar, granüllü ER, zayıf gelişmiş Golgi aygıtı, mitokondriyonlar ile çok sayıda veziküler cisimcikler içerir. Birbirlerine dezmozomlar, tight junctionlar ile bağlanmış olan üst sıradaki hücrelerin apikal yüzeylerinde birbirine paralel seyreden mikrovilluslar bulunur (73, 74). Bulbar konjunktiva ise, az sayıda kadeh hücreleri içeren çok katlı yassı keratinleşmemiş epitel ile örtülüdür. Forniks palpebral konjunktivaya benzer özellikler gösterir; ancak daha çok sayıda kadeh hücresi taşır (1, 58, 69, 70, 72).

Tüm konjunktivada epitel tabakasında bazal hücreler arasında melanositler ve Langerhans hücreleri bulunur. Özellikle palpebral konjunktiva ve inferonazal bulbar konjunktivada müsin salgılayan kadeh hücreleri daha yoğundur (70-72). Konjunktiva epitelinin kök hücrelerinin kaynağı belirsizdir. Forniksin konjunktiva epitelindeki kadeh hücrelerinin, bulbar ve palpebral konjunktivalara kıyasla proliferasyon yeteneklerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (72).

Konjunktivanın stroma tabakası, damardan zengin bağ dokusu yapısında olup bazal membranın altında uzanır. Stromanın hücresel kompozisyonu bireylerde yaşa bağlı olarak değişebilir. Stromanın yüzeysel kısmı gözün immünesinde önemli rol oynayan lenfositler, mast hücrelerini ve Langerhans hücreleri, diğer dentritik hücreler ile makrofajlar gibi antijen sunan hücreleri (APC) içerir. Stromanın derin katmanı fibröz yapıda olup konjunktivanın kan ve lenf damarları ile sınırlarını içerir. Konjunktivanın kan damarlarını, lakrimal ve nazal arterlerin kolları ile anteryör siliyer arter oluşturur. Sınırları ise lacrimal / supraorbital / supratrocheal/ infratrocheal/ infraorbital sınırlardır. Bunların çoğu miyelinsiz sinir sonlanmaları şeklindedir. Subepiteliyal pleksuslar stromanın süperfisiyel bölümünde intraepiteliyal pleksusular ise hücrelerin bazal kısımları etrafında yerleşir. Ayrıca konjunktivada lakrimal bez (gözyaşı bezi) ile aynı yapıya sahip olan Krause ve Wolfring yardımcı göz yaşı bezleri de bulunmaktadır. Wolfring bezleri Krause bezlerinden daha büyüktür. Krause bezleri stromada daha derinde yerleşir (8, 33, 70-72).

Çevreye direkt teması nedeniyle göz, alerjik hastalıklara daha sık meyil gösteren bir organdır (1, 33, 47, 69). Alerjik göz hastalıkları insan ve hayvanların yaşamını olumsuz yönde etkileyen yaygın klinik bir problemdir (68). Oküler alerjiler, gözün yüzey dokularında (göz kapağı derisi ve konjunktivada) meydana gelir (1, 49). Oküler alerjilerde, gözde yanma, batma, kaşıntı, çapaklanma, kızarıklık, sulanma, ışığa karşı

hassasiyet ve görme bozukluğu şekillenir (1, 8, 33, 47, 49, 60, 68, 69). Oküler alerjik inflamasyon, konjunktival dokudaki IgE aracılı mast hücre aktivasyonu ile ilişkilidir (33, 34, 68) ve tüm bu semptomlara mast hücreleri tarafından salınan histamin, proteazlar, sitokinler ve diğer mediyatörler neden olur (60). Mast hücre türevli mediyatörler oküler yüzey inflamatuvar lökositlerin (nötrofiller, eozinofiller ve lenfositler) infiltrasyon ve migrasyonunda görev alırlar (8, 33, 34, 61, 62) ve oküler yüzeyde immunoregülasyonu sağlarlar (42).

İnsan gözünün oküler ve adneksal dokularında yaklaşık olarak 50 milyon mast hücrenin bulunduğu bildirilmektedir (49). Ratlarda da mast hücrelerinin en fazla göz kapağında bunu takiben limbusta, seyrek olarak da konjunktivanın geri kalan parçasında yerleştiği; göz kapağındaki mast hücrelerinin büyük bir kısmının Alcian Blue pozitifken, fornikte Safranin pozitiflerin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Limbusta ise mast hücrelerinin baskın tipinin ya safranin pozitif ya da mikst granüller içerdiğinden söz edilmektedir (28).

Konjunktiva immunolojik olarak eksternal gözün en aktif dokusudur. Polenler, toz, böcek partikülleri, hayvan tüyleri ve diğer proteinler olmak üzere çok sayıda allerjenle karşı karşıya kalır. Konjunktiva göz yaşı filminin mukus içeriklerini üretir. İmmun cevap başlamadan önce mukozal sistem tehlikeli ve tehlikesiz ajanları ayırt edebilir. Alerjik göz hastalıkları genetik ve çevresel faktörlerin sonucu olarak meydana gelebilir, ilk olarak mukozal bariyer fonksiyonunu bozar ve antijenler allerjenler ve mitojenlerle immun cevabı artırır. Konjunktivanın cevabı hiperemi, kaşıntı, kızarıklık, yaşarma, kimosis ve mukus salgısında artışı içerir (70).

Konjunktivada değişik derecelerde hiperemi, şişkinlik, göz yaşı akıntısı ile karakterize duruma konjunktivitis adı verilmektedir. Bilateral ya da unilateral göz yaşı akıntısı müköz, seröz veya mukopurulent olabilir. Köpek, kedi, koyun, sığır ve keçilerde konjunktivitislerin birçok nedeni bulunmaktadır. Bunlar arasında da en önemlileri travmatik nedenler, ilaçlara bağlı nedenler, cerrahi operasyonlara bağlı nedenler, fiziksel ve kimyasal nedenler ile immunolojik durumlardır (75). Oküler allerjinin yaygın olan formları şöyledir (1, 8, 33, 49, 69):

- Mevsimsel Alerjik Konjunktivitis (SAC)
- Perennial Alerjik Konjunktivitis (PAC)
- Atopik Keratokonjunktivitis (AKC)

- Vernal Keratokonjunktivitis (VKC)
- Giant Papillar Konjunktivitis (GPC)
- Kontak Lens İlişkili Papillar Konjunktivitis (CLPC)
- Kontak Okuler Alerji (COA)

Oküler allerjilerinin iki yaygın patolojik bulgusu; konjunktival mast hücre aktivasyonu ve okuler yüzeydeki eozinofillerin sayısındaki artıştır (8, 33). Oküler yüzeyde mast hücre sayısı allerjik konjunktivitisin bütün formlarında artar (13, 42, 76). Konjunktival mast hücreleri, konjunktivadaki allerjik inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynar ve aktif hastalık boyunca salınan IL-4 ve multifonksiyonel sitokinleri büyük oranda depolayabilir (57). Vernal keratokonjunktivitis ve allerjik konjunktivitiste mast hücre mediyatörleri olan triptaz ve kimaz miktarının arttığı saptanmıştır (22, 77, 78). Özellikle köpeklerde görülen keratokonjunktivitis olgularında otoimmün nedenlerin hastalığın ortaya çıkmasında en önemli neden olduğu belirlenmiştir Bunlar dışında koyun ve keçilerin enfeksiyöz keratokonjunktiviti, kedilerin kataral özellikteki keratokonjunktiviti ile enfeksiyöz özellikteki konjunktivitisleri ve özel nitelikte olan birçok türde görülen konjunktivitisler de bulunmaktadır (75).

Irani ve arkadaşları (23), allerjik konjunktivitisli hastalarda konjunktival dokuda var olan mast hücrelerinin %100 TC olduğunu immunohistokimyasal boyamalar yoluyla göstermişlerdir. Sekretojenöz insan konjunktival mast hücrelerinin fonksiyonel tepkisi TC ya da bağ doku tipi mast hücresi olarak sınıflandırılmasına neden olur (34, 79). Serozal ve perenial allerjik konjunktivitte, konjunktivada mast hücrelerinde artma vardır (1). Vernal konjunktivitte de konjunktival mast hücrelerinin sayısında artma ve bunların epitelde varlığı gösterilmiştir. Epitel mast hücrelerinin aktivasyonu göz yaşındaki triptaz düzeyinde bir artışa sebep olur. Burdaki birçok hücre triptaz pozitif, kimaz negatif mast hücreleridir. Hücrelerde ayrıca granül sayısı da fazladır (78). Vernal konjunktivitislerde epitel kattaki mast hücrelerinin sayısı substansiya propriyada yerleşen mast hücrelerinden daha fazla sayıdadır (1, 22, 23, 34, 69, 77, 80). İnsanlardaki atopik keratokonjunktivitiste mast hücrelerinin sayısında önemli bir artış olur. Özellikle bağ doku mast hücrelerinden triptaz, kimaz, katepsi-G ve karboksipeptidaz-A içerikleri salgılanır. Oysaki mukozal mast hücrelerinin içerikleri sadece triptazdır (81).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

**Hayvanlar :** Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında okutulan Nekropsi dersinde öğrenci uygulamaları için ötenazi edilen erişkin 10 adet erkek veya dişi köpeklere ait gözlerin konjunktivaları materyal olarak kullanıldı.

Alt ve üst göz kapaklarına ait konjunktivalar horizontal olarak üç bölüme (palpepraltarsal, forniks ve bulbar konjunktiva), bu bölümler de vertikal olarak nazal, orta ve temporal parçalara ayrıldı. Sonuçta her bir hayvanın bir gözünün alt ve üst konjunktivalarına ait 9' ar bölüm olmak üzere 18 adet, toplamda 360 doku örneği kullanıldı.

**Tespit :** Ötenazi edilen 10 köpeğin sağ ve sol gözleri her bir tespit solüsyonu için 5' er adet olmak üzere Carnoy ve %10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Carnoy solüsyonunda +4°C de 30 dakika ve takiben oda ısında 2 saat, %10' luk formaldehitte ise 24 saat süreyle bekletilen dokular, dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirildikten sonra paraplastta bloklandı.

Her bir bloktan 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitlerden birincisi birinci lama, ikincisi ikinci lama, üçüncüsü üçüncü lama, ..... olmak üzere toplam 10 lam üzerine yerleştirildi. Bu işlemler sağ ve sol gözlerin alt ve üst konjunktivalarının tüm bölümleri için uygulandı. Köpeklerden konjunktivalarının yanı sıra test amaçlı olmak üzere deri ve bağırsak (ileum) örnekleri de alınarak bloklandı. Ayrıca karşılaştırma amaçlı olarak bir rata ait elimizdeki bağırsak ve deriye ait örnekler de kullanıldı. Bloklardan alınan kesitler konjunktiva örnekleri ile aynı lamlara alınarak mast hücrelerine özgün boyama yöntemleri ile boyandı.

**Boyama Yöntemleri:** Elde edilen kesitlere aşağıdaki boyama yöntemleri uygulandı:

### **1. Kısa ve Uzun Süreli Toluidin Blue Boyama Yöntemi**

Mast hücrelerinin dokudaki dağılımını ve kullanılan tespit solüsyonuna duyarlılığını belirlemek için seri olarak alınan kesitlerin ilk serisi %0.5'lik toluidin blue (pH 4) ile 30 dakika (kısa süreli toluidin blue boyaması), ikinci serisi 0.5 N HCl'de hazırlanan %0.5'lik toluidin blue (pH 0.5) ile 7 gün (uzun süreli toluidin blue boyaması) ile boyandı (1, 12).

### **2. Alcian Blue-Safranin O Boyama Yöntemi**

Mast hücrelerinin mukoza ve bağdoku mast hücresi alt tipini belirleyebilmek için 3. grup seri kesitlere alcian blue/safranin O kombine boya yöntemi uygulandı (1, 12 ).

### **3. Berberin Sülfat Boyama Yöntemi**

Mast hücrelerin içerdiği heparinin demonstrasyonu için 4. grup kesitler berberin sülfat boyama tekniği ile boyandı. Deparafinize edilip suya kadar getirilen kesitler 100 ml deiyonize suda çözdürülen 0.02 g berberin sülfat solüsyonunda 10 dakika bekletildi ve daha sonra sitrik asit ile pH'sı 4'e düşürülmüş deiyonize suda 5 dakika yıkandı. Gliserol ile kapatılan kesitler floresan mikroskopta incelendi (1).

### **4. Kritik Elektrolit Konsantrasyonu (CEC)**

Mast hücrelerinin proteoglikan içeriğini belirlemek amacıyla 5. ve 6. grup kesitler MgCl<sub>2</sub>'ün farklı konsantrasyonlarını içeren % 0.05 lik Alcian blue (0.2/0.3 ve 0.7/0.8 M) solüsyonunda 24 saat boyandı (1).

### **5. Enzim Histokimyasal Boyamalar**

Mast hücrelerinin kimaz aktivitesini belirlemek için 7. kesite Naphtol AS-D chloroasetate esterase (NASDCA) enzim boyama tekniği uygulandı. Deparafinize edilen ve suya kadar getirilen kesitler, 30 dakika oda sıcaklığında süzölmüş taze boyada bekletildi. Reaksiyon gerçekleşikten sonra kesitler suda yıkandı ve Mayer'in hematoksileni ile 5 dakika boyandı. Suda yıkanıp alkollerde dehidre edilen kesitler ksilol'den geçirilip entellan ile kapatıldı (4).

## **6. Naphtol AS-D chloroasetate esterase (NASDCA)- Kritik Elektrolit Konsantrasyonu (CEC)**

Mast hücrelerinin kimaz aktivitesini ve proteoglikan içeriğini beraber belirlemek için 8. kesite önce Naphtol AS-D chloroasetate esterase (NASDCA) enzim boyama tekniği uygulandı. Daha sonra da MgCl<sub>2</sub>'ün farklı konsantrasyonlarını içeren % 0.05 lik Alcian blue (0.2/0.3 ve 0.7/0.8 M) solüsyonunda (pH 5.8) 24 saat boyandı (4, 12).

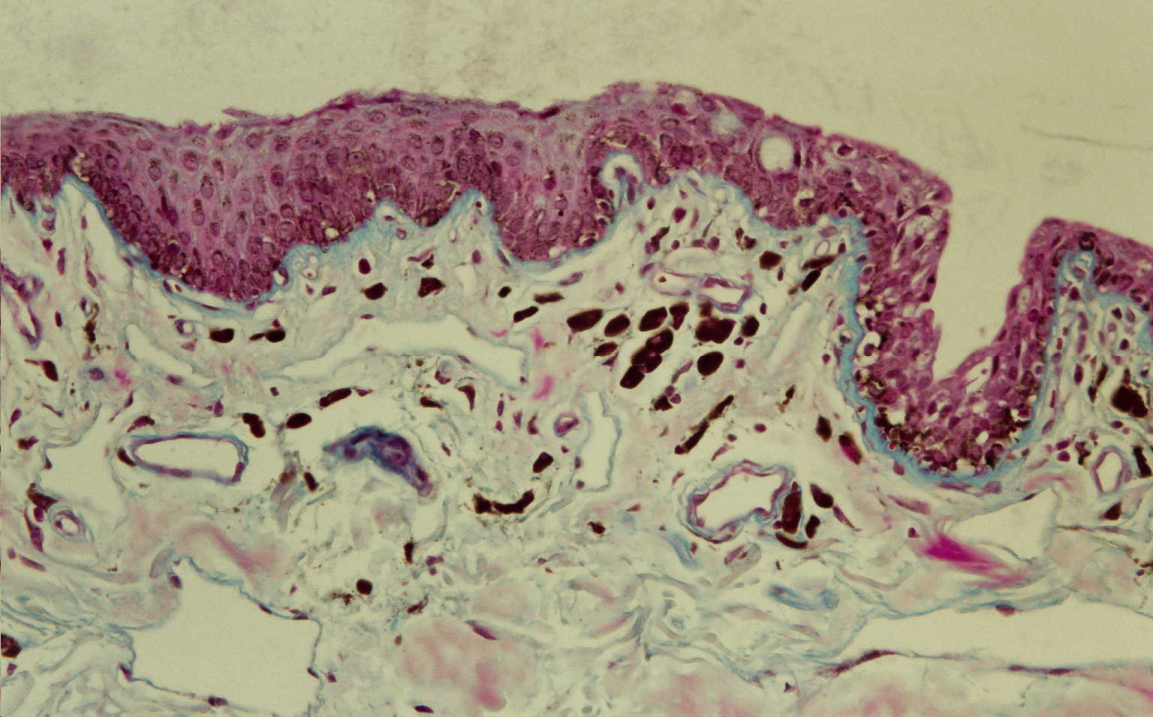
## **7. İmmunohistokimyasal Yöntemler**

Mast hücrelerinde triptaz aktivitesini belirlemek için adhesivli lamalar üzerine alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler 37°C'lik etüvde 1 gün süre ile kurutulup, 3x5 dakika ksilol serileri ve daha sonra, 3'er dakika 100°, 96°, 80°, 70°'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Dokuda endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için, kesitler %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra, PBS (phosphate buffer solution) ile 2 kez 5'er dakika yıkandı. Antijenin yeniden kazanımı için 95°C'ye kadar ısıtılmış 0,01 M sitrat buffer'da 25 dakika bekletildi. Daha sonra oda ısısında aynı tampon içinde 20 dakika soğutuldu. Dört kez bufferda yıkanan kesitler nonspesifik zemin boyanmalarını gidermek için bloking solüsyonu ile 5 dakika nemli kamarada inkube edildi. Bu işlemde sonra, kesitlerin üzerine primer antikor (mast cell tryptase) 1'er damla damlatılıp 1 saat inkübe edildi ve daha sonra PBS içinde 4 kez 5'er dakika yıkandı. Bu işlemi takiben kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor ile 10 dakika oda ısısında inkube edilip, 4 kez PBS ile yıkanıp, enzim konjugatlı strepavidinle 10 dakika muamele edildi. Tekrar 4 kez PBS ile yıkandıktan sonra 12 dakika AEC kromojen solusyonunda bekletildi. Gill'in Hematoksileninde 5 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda 10-15 dakika yıkandı ve üzerine yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatılarak ışık mikroskopta incelendi (12).

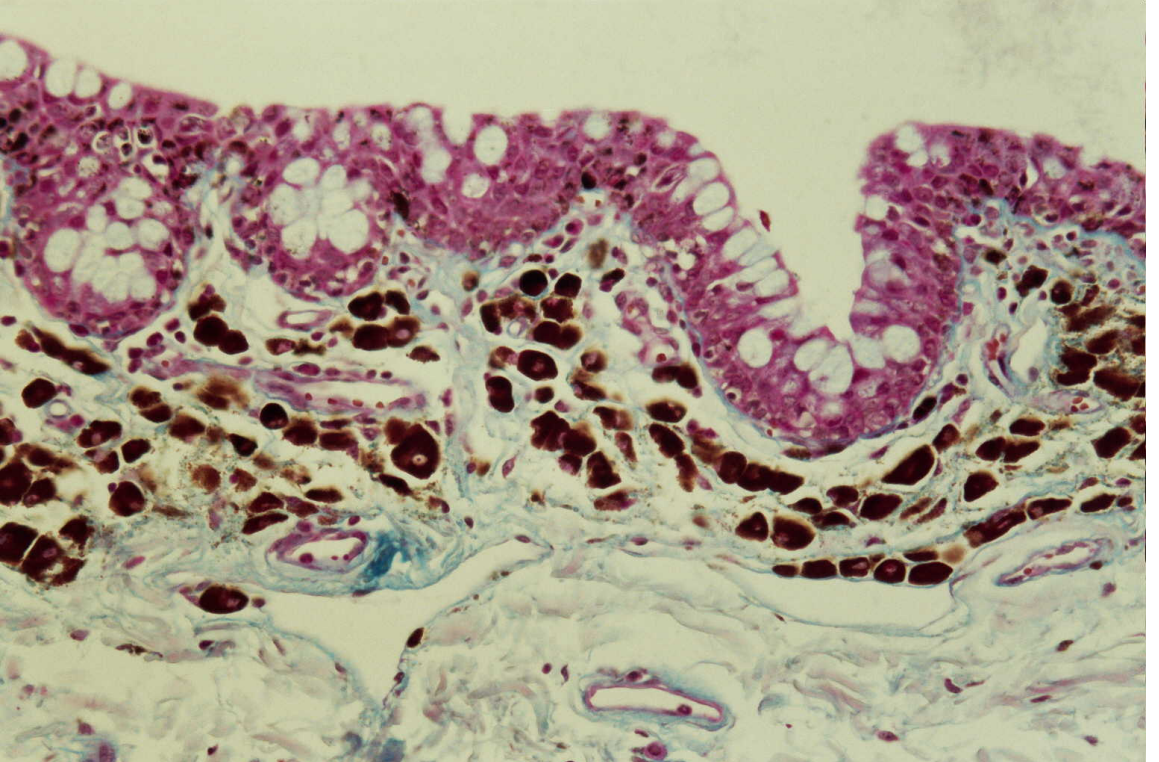


## 4. BULGULAR

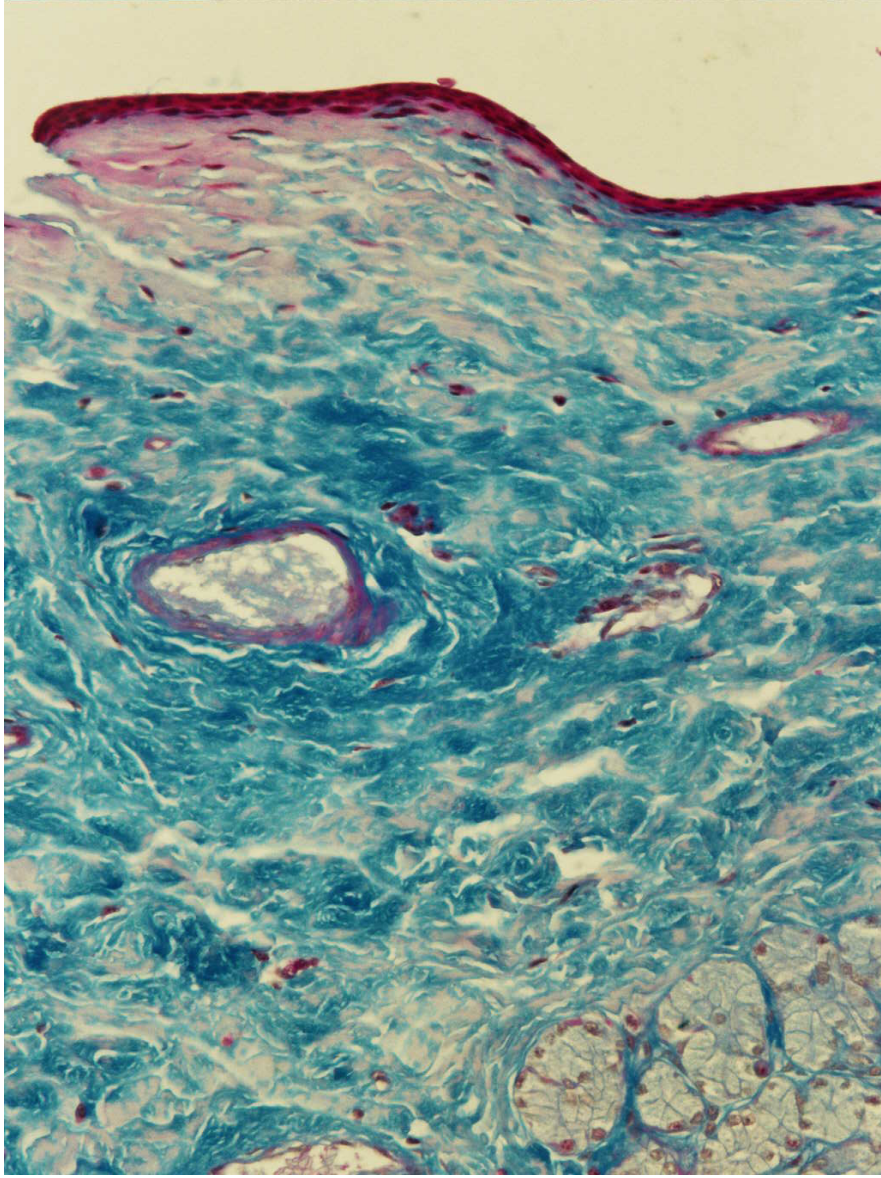
**Konjunktivanın Genel Yapısı :** Göz kapaklarının serbest kenarlarından kıvrılarak bunların iç yüzünü döşeyen konjunktivanın ince ve transparan bir müköz membran olduğu görüldü. Özelleşmiş bir mukozaya sahip olan konjunktiva anatomik olarak üç bölüme ayrıldı. Bunlardan göz kapaklarının iç yüzünü örten bölümü palpebral konjunktiva, geçit bölgesini oluşturan forniks ve göz küresinin üzerini örten ise bulbar konjunktiva olarak adlandırıldı. Konjunktiva epitel ve stroma (substansiya propriya) olmak üzere iki katmandan oluşmuştu. Göz kapaklarının kenarından itibaren içeriye derinin kıvrılarak kutan mukozaya dönüşmesi sonucunda oluşan palpebral konjunktiva epitelinin özelliğine göre marjinal, tarsal ve orbital olmak üzere üç bölüme ayrıldı. Marjinal bölüm, genelde çok katlı yassı non-keratinize, tarsal bölüme yaklaştıkça çok katlı kübik özellikteydi (Şekil 4.1). Orbital bölümde ise epitel çok katlı prizmatik olup içerisinde kadeh hücreleri bulunmaktaydı (Şekil 4.2). Tarsal konjunktivada epitel oldukça incelmış olup iki katlı kübik özellik göstermekteydi (Şekil 4.3). Fornikste ise epitel çok katlı yüksek prizmatikti ve aralarında oldukça yoğun bir yerleşim gösteren kadeh hücrelerine rastlandı (Şekil 4.4). Bulbar konjunktiva ise, az sayıda kadeh hücreleri içeren çok katlı yassı nonkeratinize ince bir epitel ile örtülmüştü (Şekil 4.5).



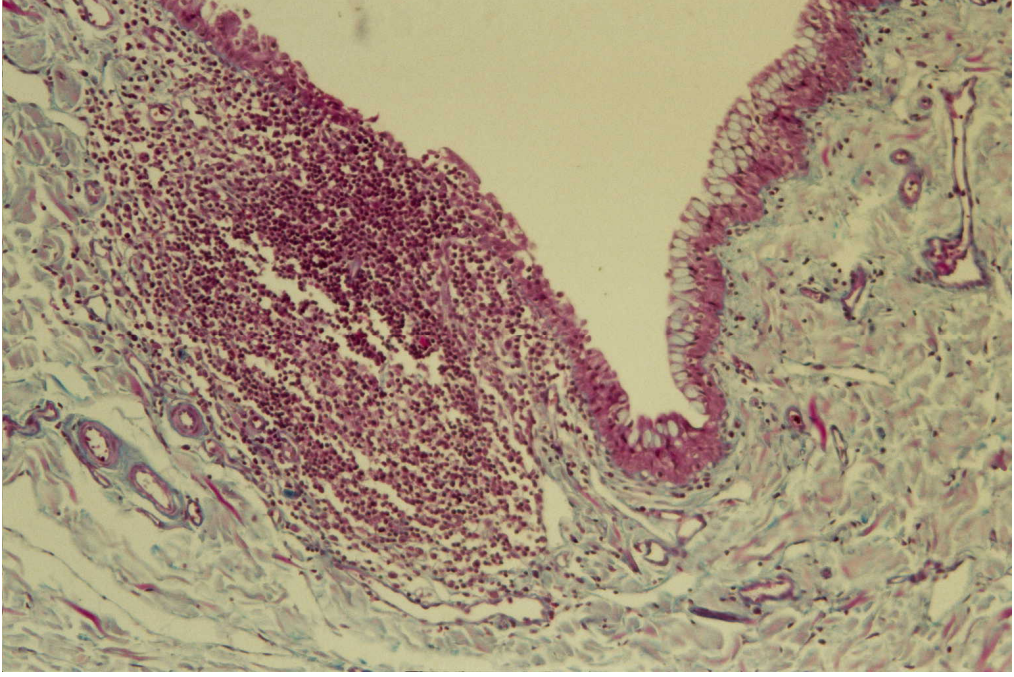
Şekil 4.1. Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, üçlü boyama X 20



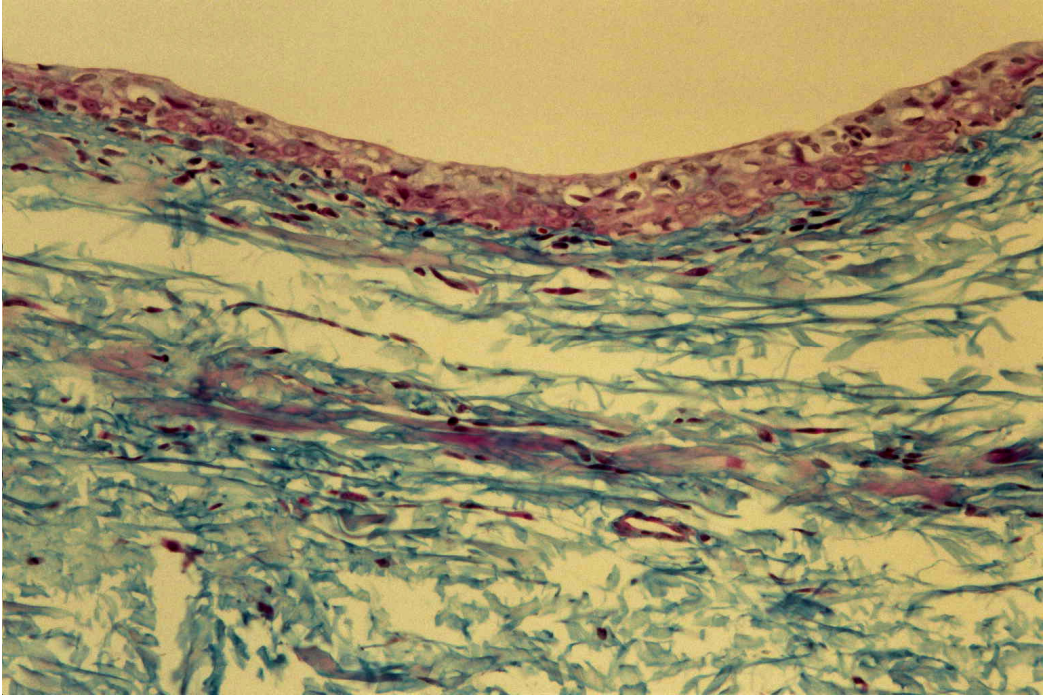
Şekil 4.2. Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, üçlü boyama X 20



Şekil 4.3. Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, üçlü boyama X 20



Şekil 4.4. Forniks, üçlü boyama X 10

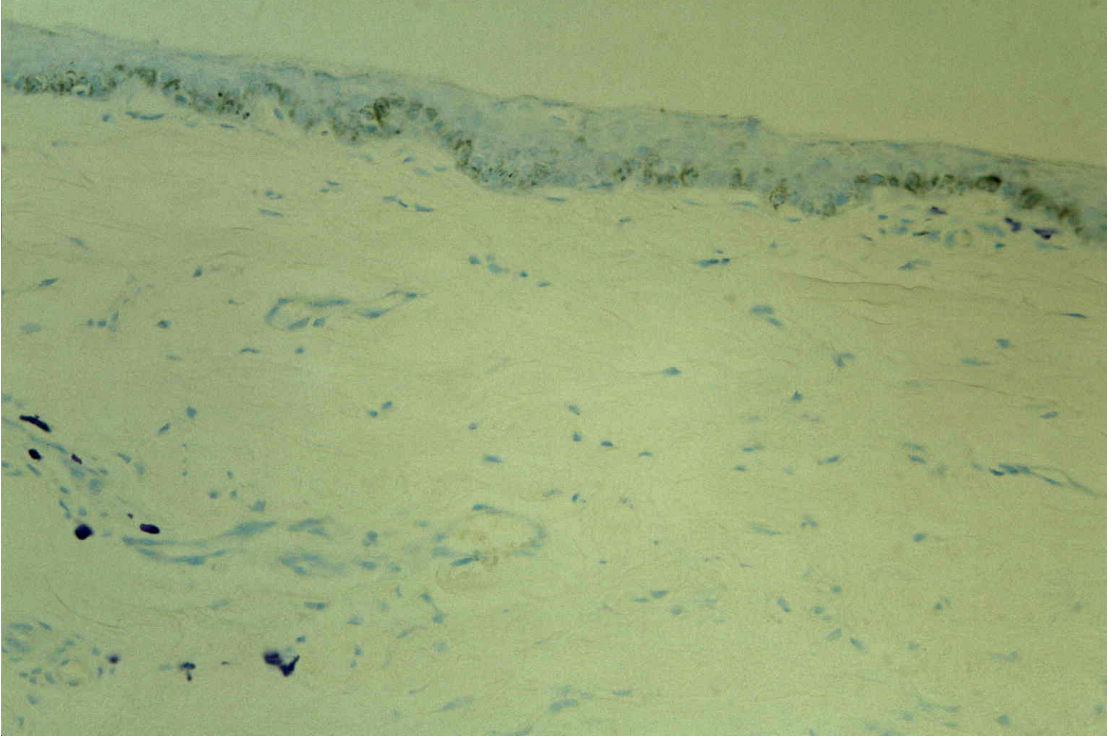


Şekil 4.5. Bulbar konjunktiva, üçlü boyama X 20

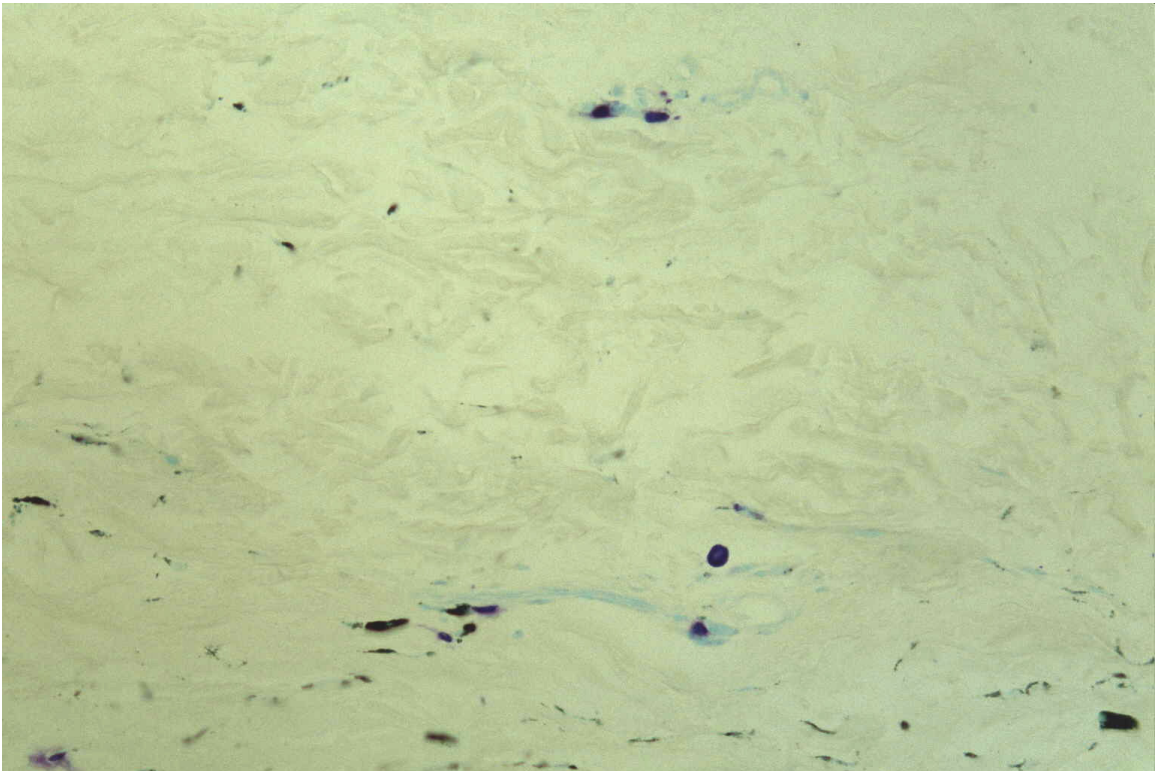
Stroma sıkı bağ dokusu özelliğinde olup değişik büyüklüklerde damarlar içermekteydi. Özellikle kapillar damarlar lamina epitelyalisin hemen altındaki süperfisiyal bağ doku içine yerleşmişti. Süperfisiyal stroma içinde soliter karakterde lenf folikülleri görüldü.

Bunlar konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku (Conjunctiva Associated Lymphoid Tissue, CALT) olarak tanımlandı (Şekil 4.4). Bu lenf foliküllerinin tarsal bölümden itibaren şekillenmeye başladığı görüldü Lenf foliküllerinin yerleştiği bölgelerde epitelin ince bir çizgi şeklinde follikül ile ilişkili epitel (FAE) oluşturduğu dikkati çekti. Palpebral konjunktivanın marjinal bölümünün stromasında yağ bezleri (Meibom –tarsal- ve Zeis bezleri) ile ter (Moll bezleri) bezlerine rastlandı. Alt ve üst göz kapağının tarsal bölümünden fornixe kadar uzanan seröz özellikte olan aksesuar gözyaşı bezlerinin (Krause ve Wolfring) korpus glanduleleri ile akıtıcı kanalları gözlendi. Wolfring bezleri daha büyük bezlerdi. Stroma, forniks ve palpebral konjunktivalarda benzer özellikler göstermesine karşılık, bulbar konjunktivada lenf foliküllerine rastlanmadı.

**Mast Hücrelerinin Histokimyasal Özellikleri :** Mast hücrelerinin dokudaki dağılımlarını ve tespitlere karşı duyarlılıklarını belirlemek için kısa ve uzun süreli toluidine blue boyama metodu kullanıldı. Formolde tespit edilmiş dokular kısa süreli toluidin blue ile boyandığında az sayıda hücrenin boyandığı ve metakromazi gösterdikleri (Şekil 4.6), Carnoyda tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin tamamının boyandığı ve hücrelerin metakromatik özelliklerinin kaybolmadığı tespit edildi (Şekil 4.7).

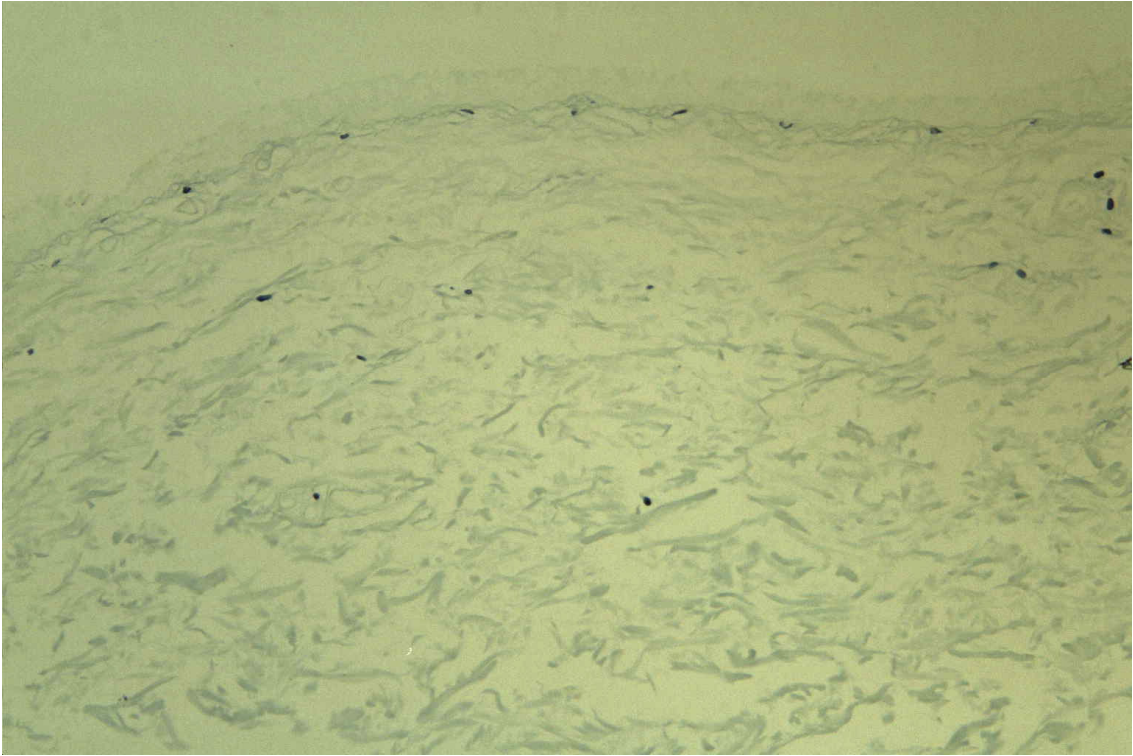


Şekil 4.6. Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, formaldehit tespiti, kısa süreli Toluidine blue X 20

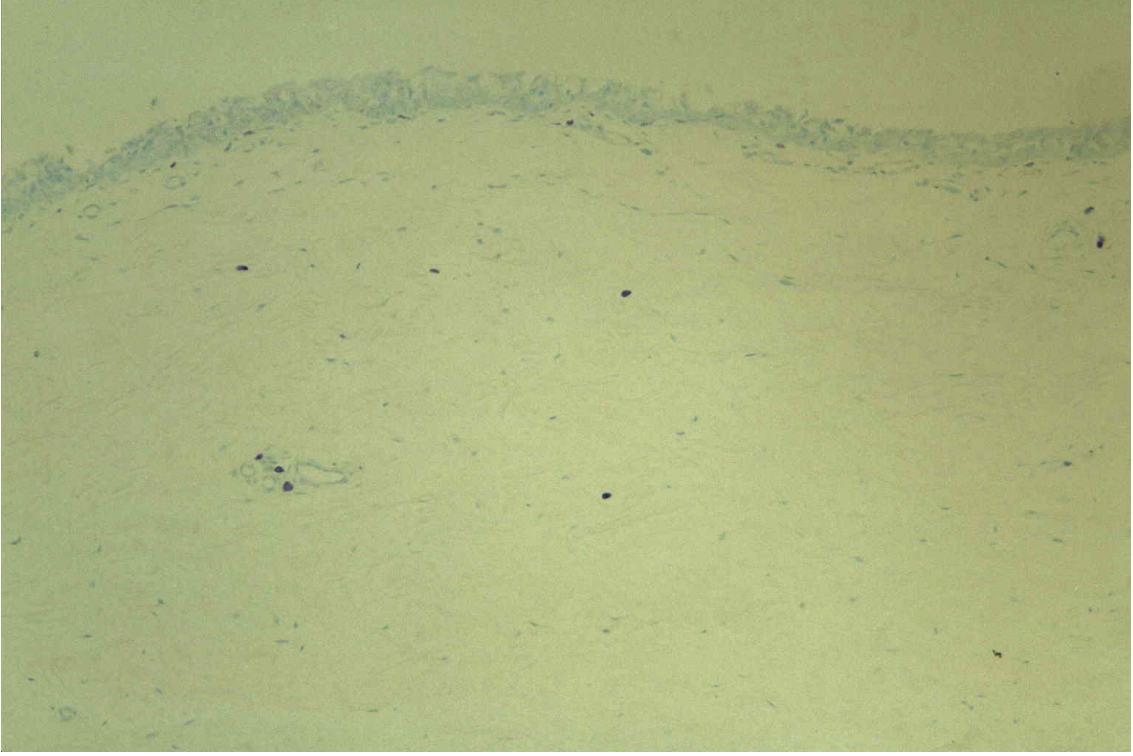


Şekil 4.7. Forniks, Carnoy tespiti, kısa süreli Toluidine blue X 20

Uzun süreli toluidin blue boyasında ise formol tespitli dokulardaki mast hücrelerinin tamamının koyu mavi renkte boyandığı ancak metakromazi göstermedikleri belirlendi. Ardışık kesitlere uygulanmış olan kısa ve uzun süreli toluidin blue boyamaları karşılaştırıldığında formaline duyarlı olan hücrelerin epitelin hemen altında yerleşmiş olduğu saptandı (Şekil 4.8-9). Carnoy'la tespit edilen doku kesitlerinde hem uzun, hem de kısa süreli toluidine blue boyamalarında mast hücrelerinin aynı yoğunlukta oldukları görüldü. Mast hücrelerinin dağılımı açısından bölümler arasında belirgin bir farklılık yoktu. Ancak palpebral ve forniks bölmünde bulbara göre daha fazla mast hücrelerine raslandı. Epitel içinde ve epitelin hemen altında az sayıda ,stromadaki kapillar damarlar, bezler ve bezlerin akıtıcı kanalları etrafında daha fazla sayıda mast hücresi görüldü. Palpebral ve forniks bölümleri içerisinde yerleşmiş olan soliter karakterdeki lenf folikülleri içinde de mast hücreleri bulunmaktaydı. Ancak her üç bölümün temporal ve orta parçalarına göre nasal parçasında mast hücrelerinin az olduğu dikkati çaktı.



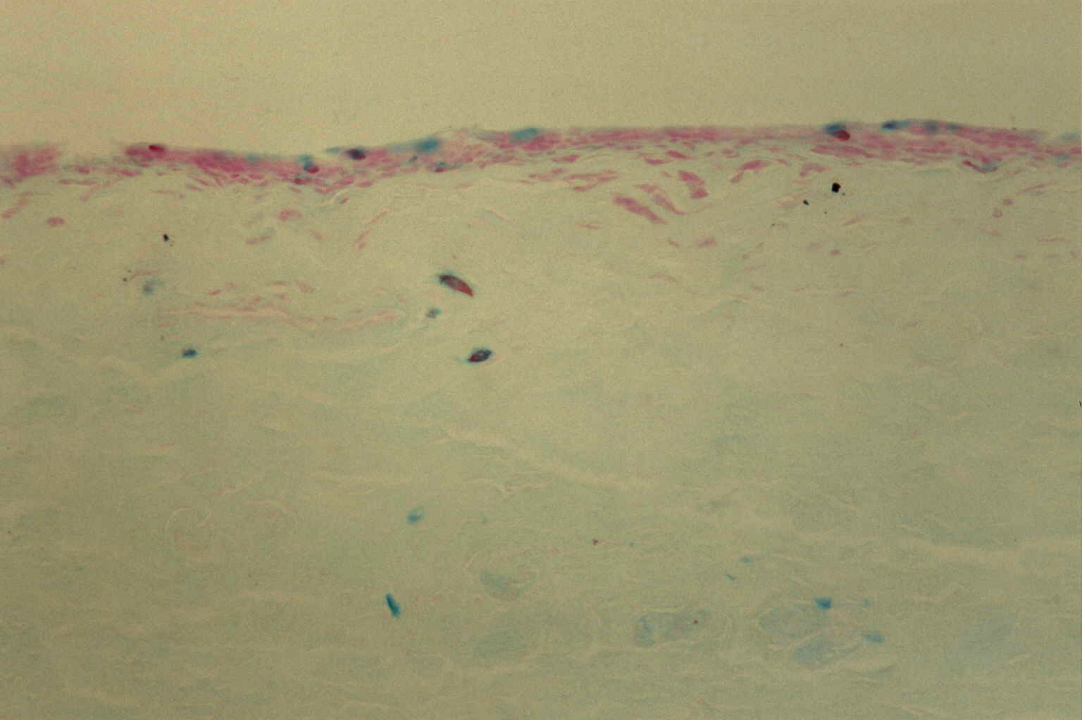
**Şekil 4.8.** Forniks, formaldehit tespiti, uzun süreli Toluidine blue X 10



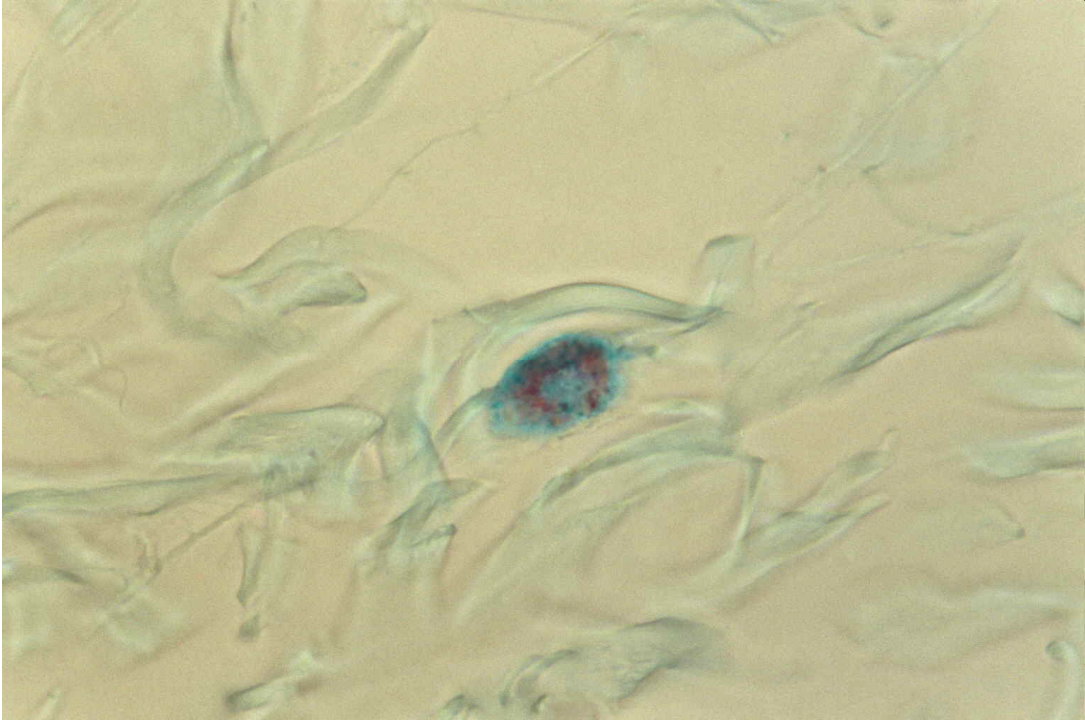
**Şekil 4.9.** Forniks , formaldehit tespiti, kısa süreli Toluidine blue X 10

Mast hücrelerinin mukoza ve bağdoku mast hücresi alt tiplerini belirleyebilmek için yapılan alcian blue/safranin O (AB-SO) kombine boyasında; AB pozitifler mavi (Şekil 4.14), AB-SO pozitifler mavi-mor (Şekil 4.10-11) ve SO pozitifler kırmızı olarak (Şekil 4.13) görüldü. Tüm bölümlerde AB pozitif boyanan hücrelerin çoğunlukta oldukları, ikinci sırada AB/SO pozitif boyanan mikst özellikteki hücrelerin, üçüncü sırada ise SO pozitif boyanan hücrelerin olduğu tespit edildi. SO pozitif mast hücreleri epitelin içerisinde tek tük veya hemen altında az sayıda gözlenirken, AB pozitif ve AB-SO pozitif mast hücrelerinin, epitelin hemen altındaki bağdokuda, stromanın derin katmanı içerisinde, kapillar damarlar etrafında yerleştikleri tespit edildi.

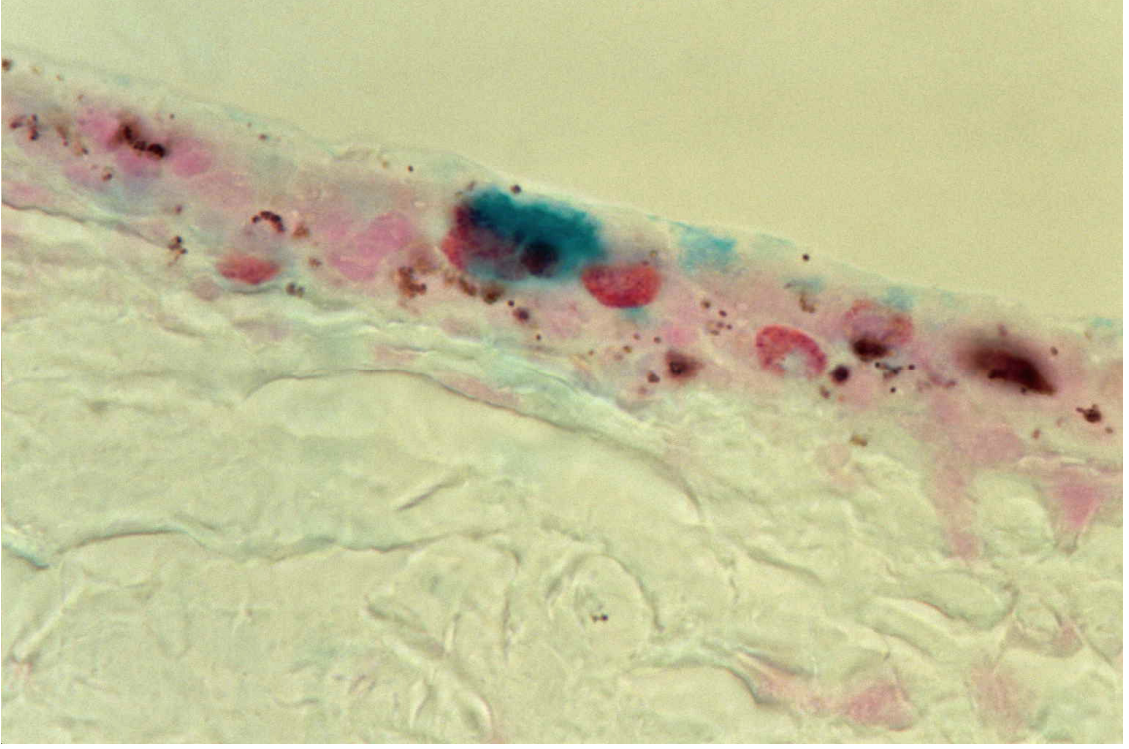




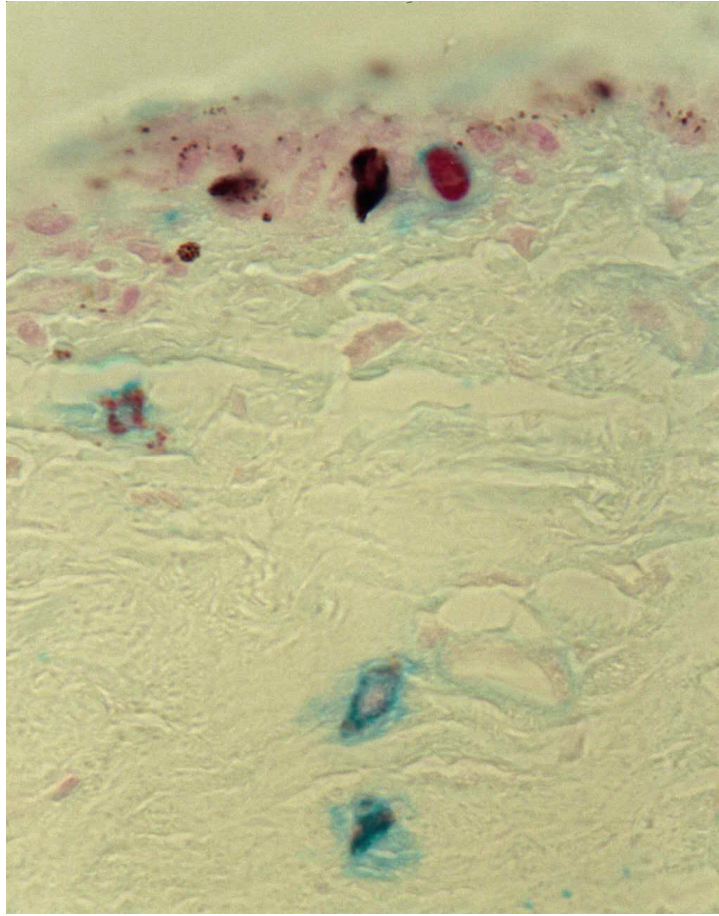
**Şekil 4.10.** Forniks, Carnoy tespiti, AB-SO X 20



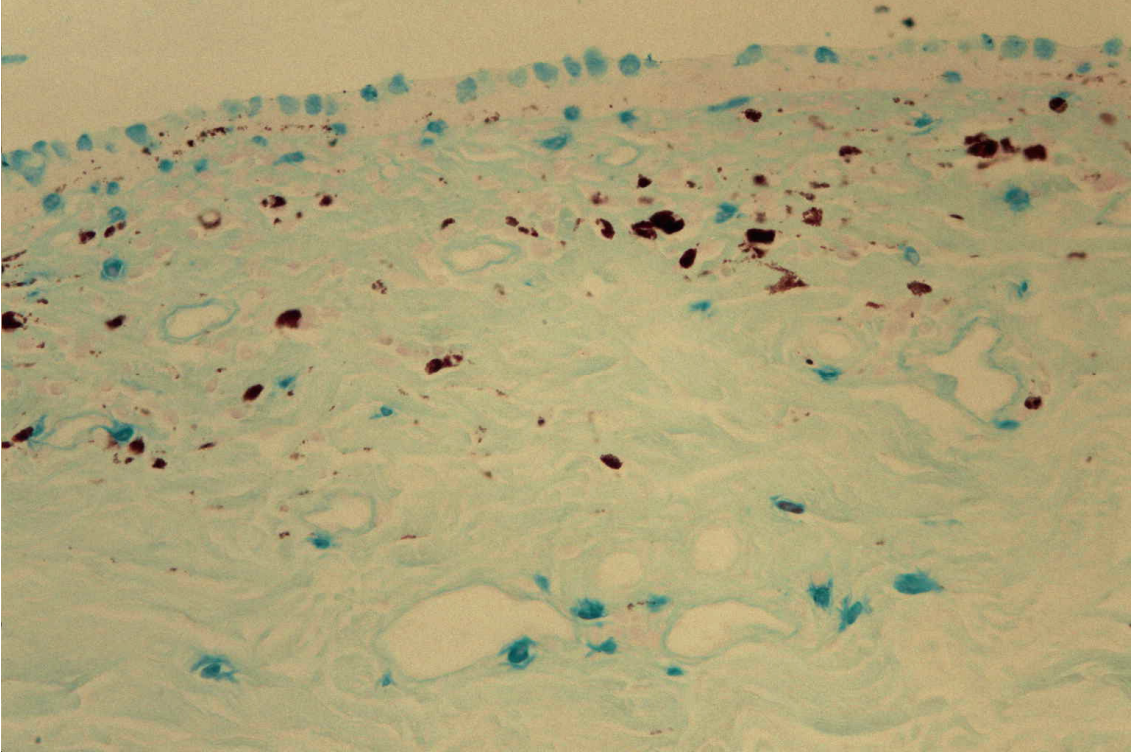
**Şekil 4.11.** Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, formaldehit tespiti, mikst hücre, AB-SO X 100



**Şekil 4.12.** Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, Carnoy tespiti, intraepiteliyal hücre, AB-SO X 100



**Şekil 4.13.** Forniks, Carnoy tespiti, SO(+) hücre, AB-SO X 100

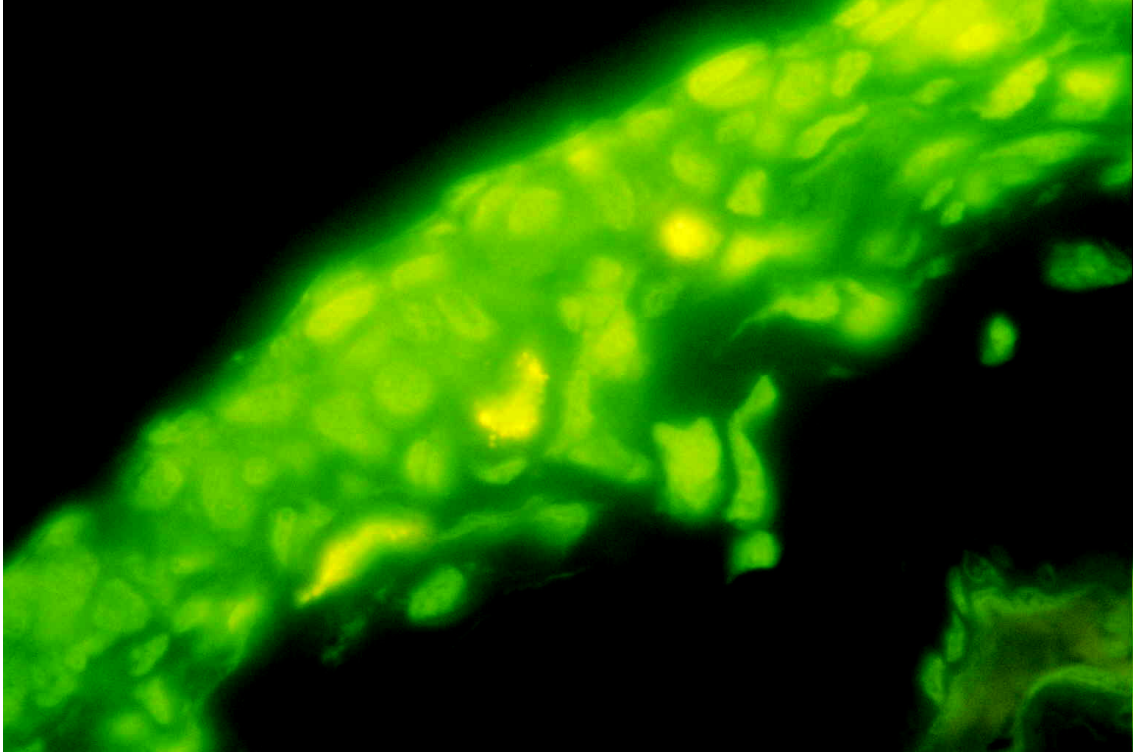


**Şekil 4.14.** Forniks, Carnoy tespiti, AB(+) hücreler, AB-SO X 20

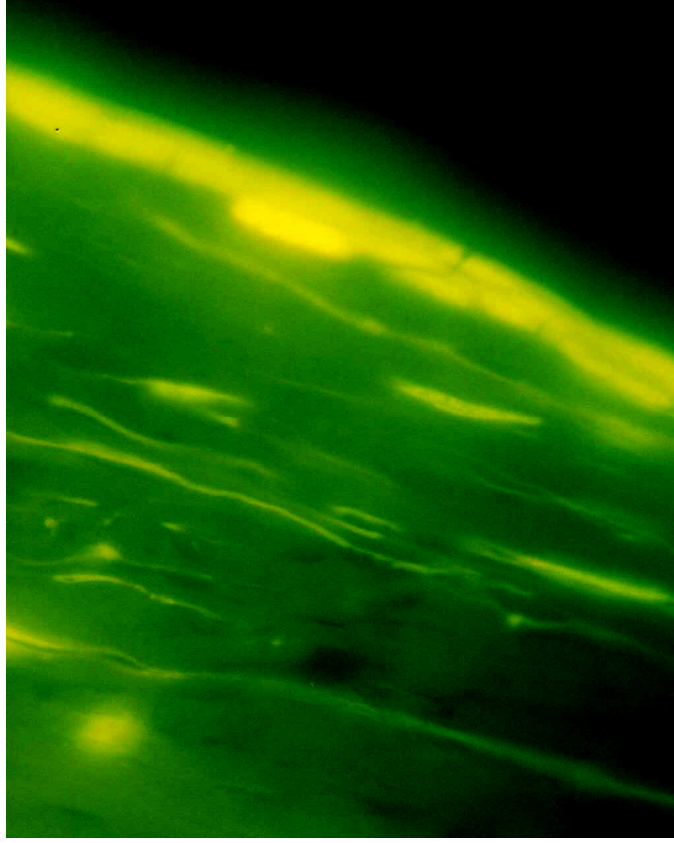
Palpebral konjunktivanın marjinal bölümünde Meibom ve Zeiss bezleri etrafında, tarsal bölümünde ise Wolfring ve Krause bezleri ile bezlerin akıtıcı kanalları etrafında bol miktarda oldukları görüldü. Orbital bölümünde ise Henle'nin yalancı tubuler bezleri etrafındaki bağdokuda özellikle AB pozitif olan mast hücrelerine rastlandı. Palpebral konjunktivanın tarsal ve orbital bölümleri ile forniksde yerleşmiş bulunan konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokuya (CALT) ait olan lenf folikülleri etrafında ve içindeki mast hücreleri AB pozitif boyanma özelliği göstermekteydi. Fornikste epitelin hemen altında ve stromanın yüzeysel katmanında AB pozitifler çoğunlukta iken, SO pozitif olanlar çok çok azdı. Stromanın derin katmanlarında ise AB pozitiflerle birlikte mikst boyanma özelliğindeki mast hücreleri görülmekteydi. Bulbar konjunktiva sayısal yoğunluk bakımından en az mast hücresi içeren bölüm idi. Burada epitel içinde mast hücresine raslanmadı. Burada da AB pozitif hücreler diğerlerinden daha çoktu. Daha az olmakla birlikte mikst özellikte olan mast hücreleri, ender olarak da SO pozitif mast hücreleri görülmekteydi. Carnoy ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin gerek sayısal yoğunluklarının, gerekse AB ve SO ile boyanma yoğunluklarının formolle tespit edilen dokulardaki mast hücrelerine göre daha iyi olduğu belirlendi. Ayrıca formolde tespit edilen örneklerde safranin pozitif hücreye çok ender rastlanırken Carnoy'da tespit

edilenlerde safranin ile boyanma daha spesifikti. Ancak formaldehit ile tespit edilen dokularda mikst özellikteki hücrelerin varlığı dikkati çekti.

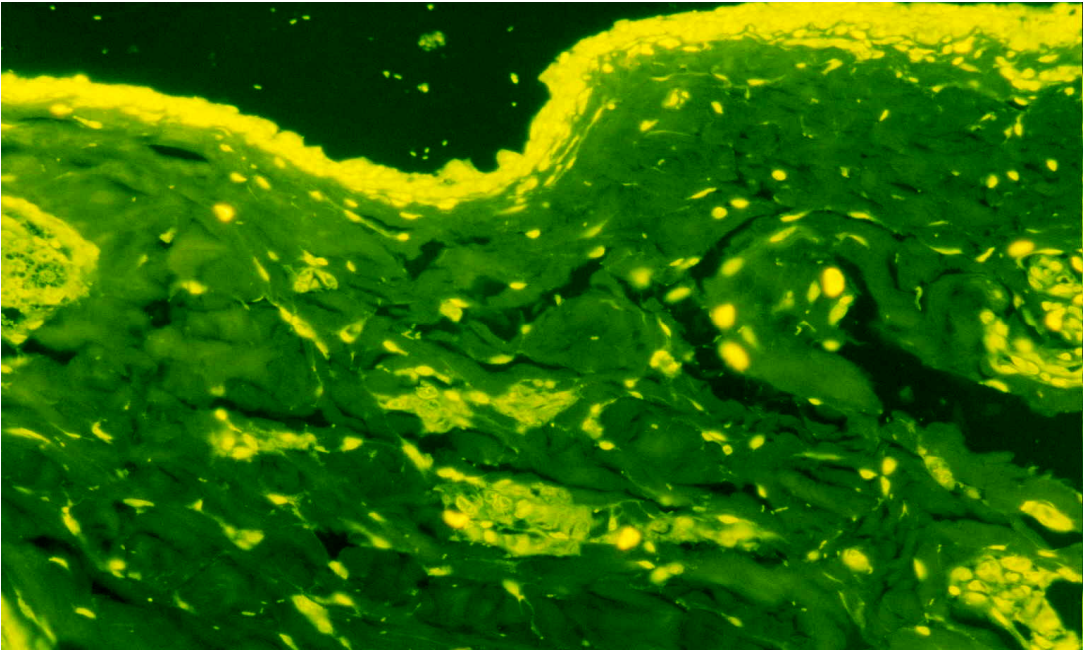
Berberin sülfat kullanılarak konjunktivada bulunan mast hücrelerinde heparinin varlığı doğrulandı. Mast hücrelerinin heparin miktarına göre farklı yoğunlukta kuvvetli ve zayıf olarak parlak sarı floresan verdikleri görüldü (Şekil 4.15). Konjunktivanın incelenen tüm bölümlerinde az sayıda berberin sülfat pozitif mast hücrelerine rastlanırken, bölümler arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Doku örneklerinde Carnoy ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin formolle tespit edilen dokulardaki mast hücrelerine göre daha belirgin floresan verdikleri tespit edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.15. Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, berberin sülfat X 100

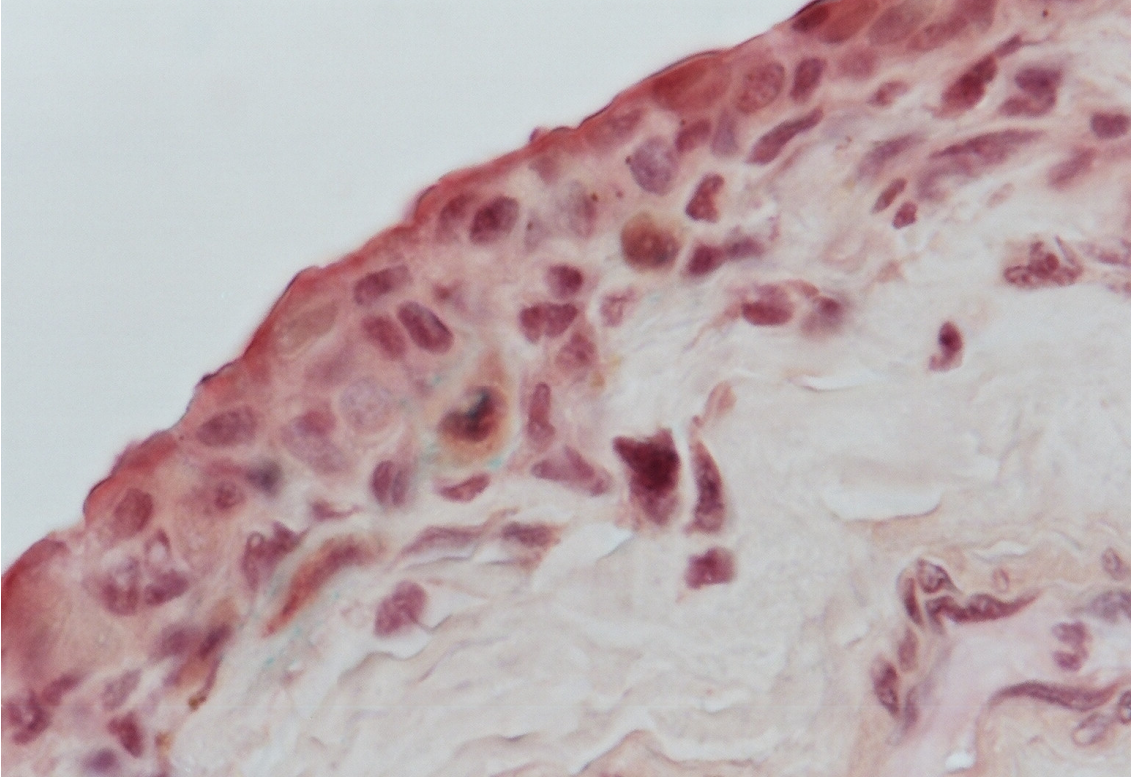


Şekil 4.16. Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, berberin sülfat X 100

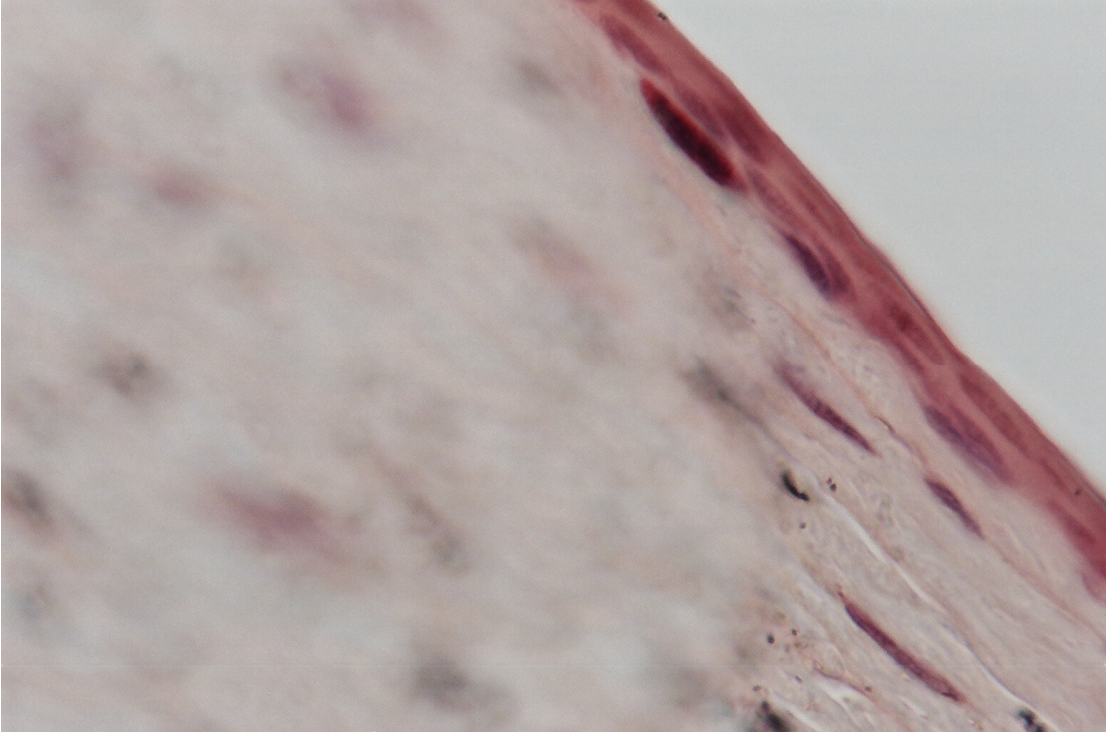


Şekil 4.17. Bulbar konjunktiva, Carnoy tespiti, berberin sülfat X 20

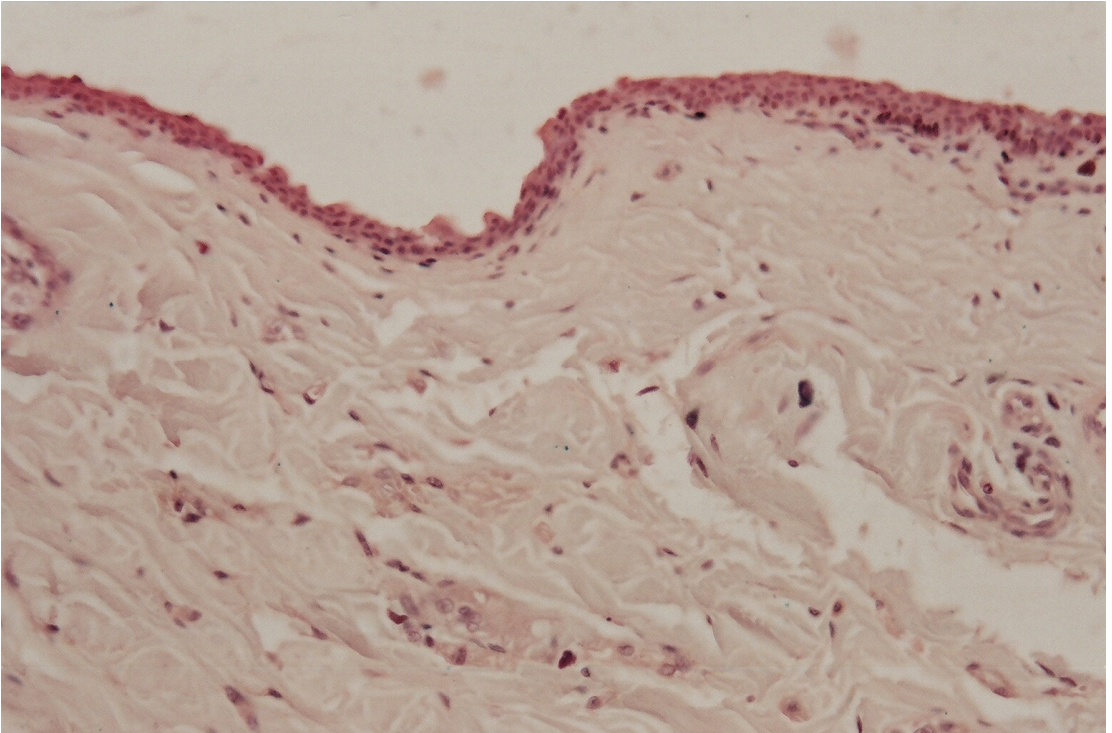
Berberin sülfat ile boyanan kesitler yıkandıktan sonra NASDCA-0.7/0.8 M'lık CEC ile boyanarak heparinin varlığı doğrulandı (Şekil 4.15-18).



Şekil 4.18. Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, NASDCA-CEC 0,7-0,8 X 100

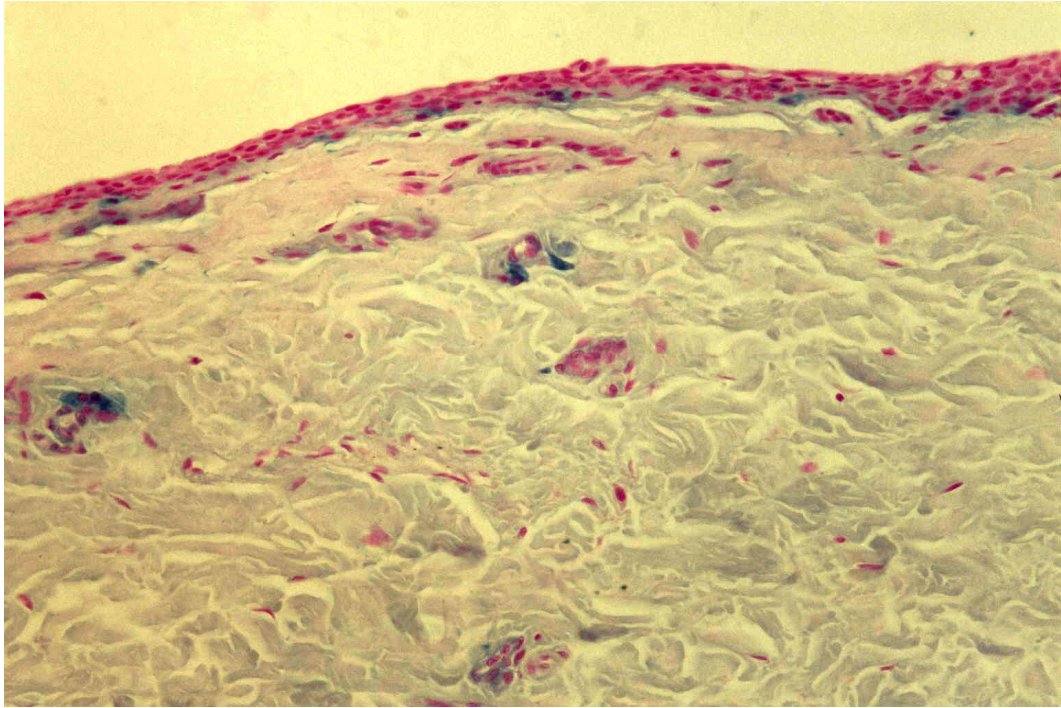


**Şekil 4.19.** Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, NASDCA-CEC 0,7-0,8 X 100



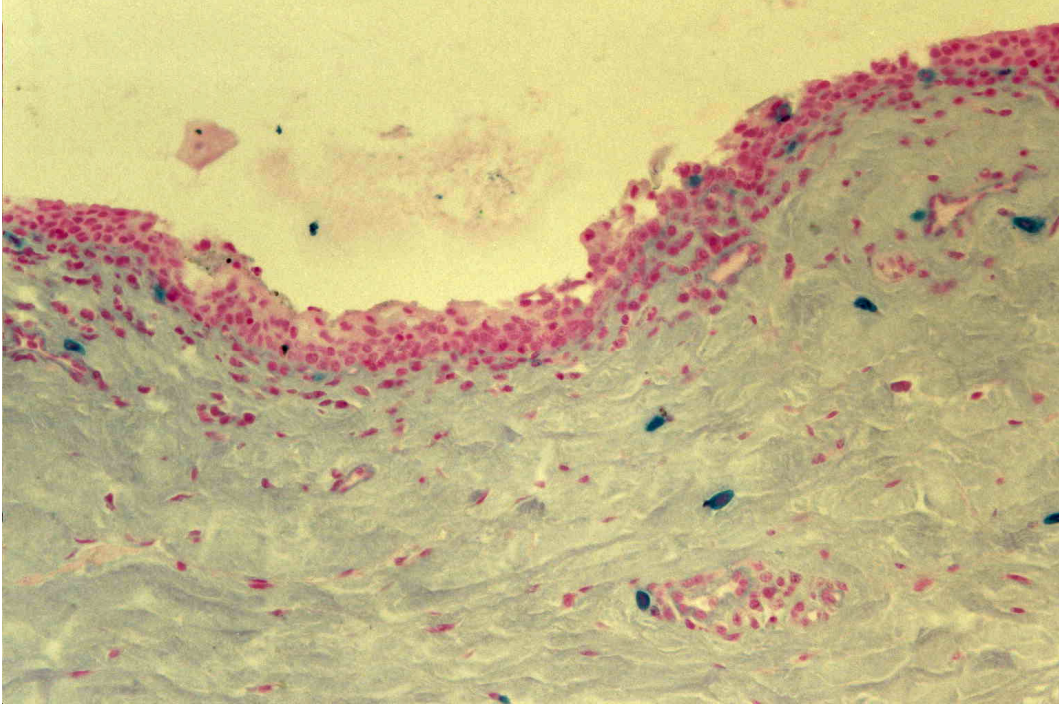
**Şekil 4.20.** Bulbar konjunktiva, Carnoy tespiti, NASDCA-CEC 0,7-0,8 X 20

AB-SO ile boyanan kesitlerin ardışığı olan kesitler, mast hücrelerindeki glikozaminoglikanları belirlemek için 0.2/0.3 M'lık CEC ile boyandığında, tüm mast hücreleri soluk mavi zemin üzerinde mavi granüllü olarak izlendi (Şekil 4.21). Mast hücreleri boyanma yoğunluklarının granül içeriğinde proteglikanların miktarına göre soluk maviden koyu maviye kadar değiştii belirlendi. Genelde epitelin hemen altında bulunan mast hücreleri küçük ve soluk mavi sitoplazmalı, stromanın derin katmanlarında yerleşen mast hücreleri ise daha iri ve koyu mavi sitoplazmaları ile dikkati çekti (Şekil 4.22).

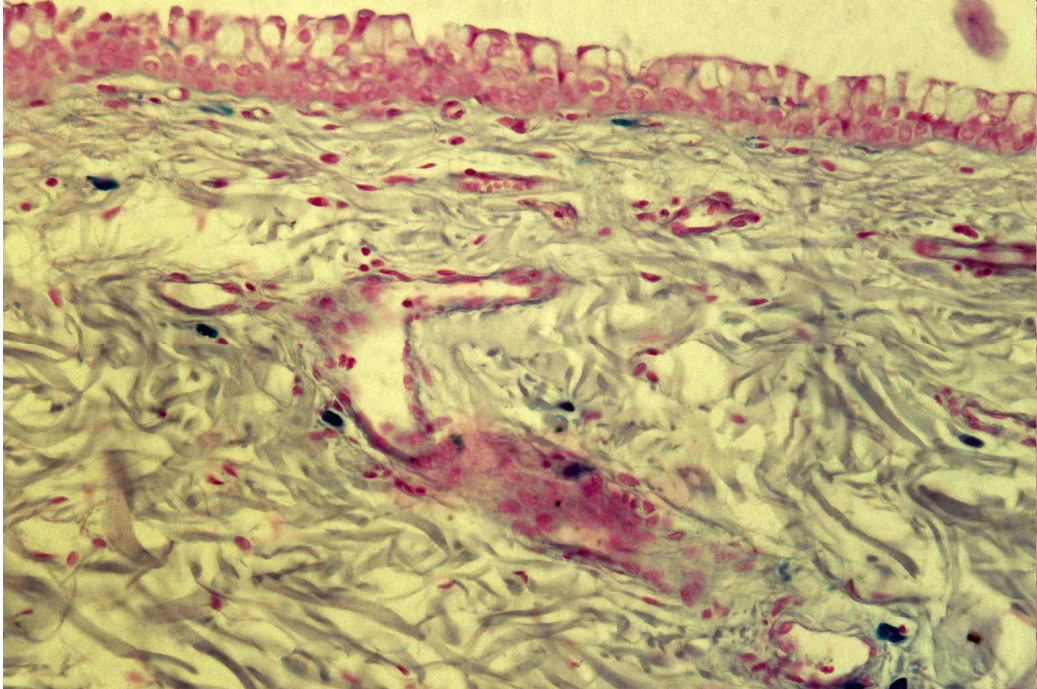


**Şekil 4.21.** Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20

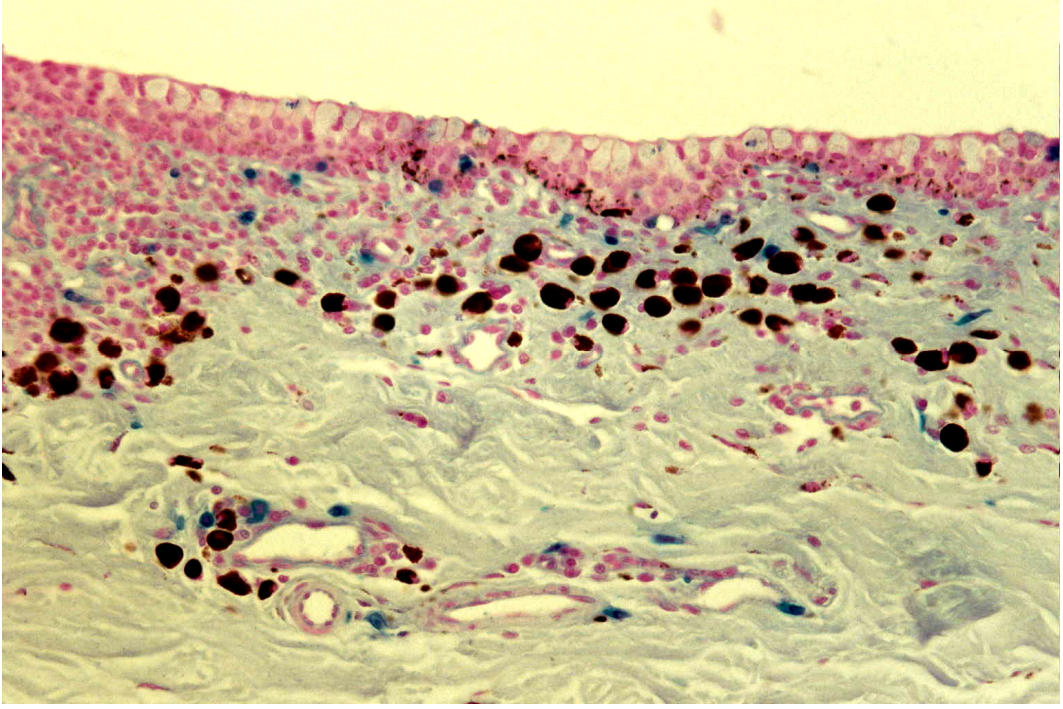




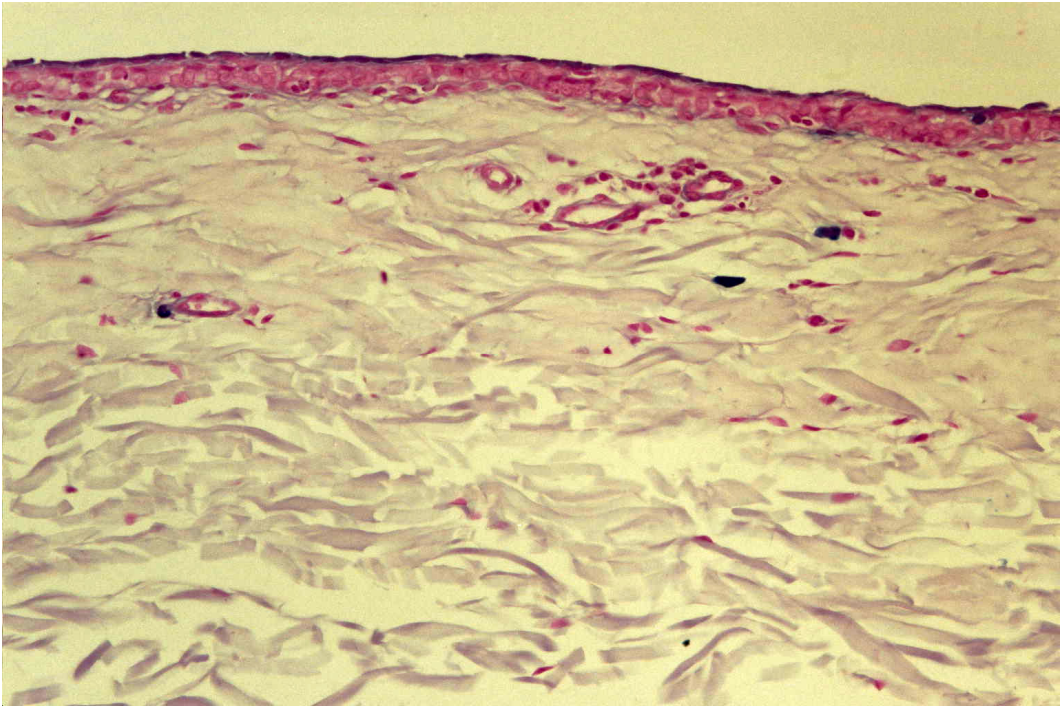
Şekil 4.22. Palpebral konjunktivanın marjinal bölümü, Carnoy tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20



Şekil 4.23. Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, Carnoy tespiti, 0,2-0,7 M'lık CEC X 20

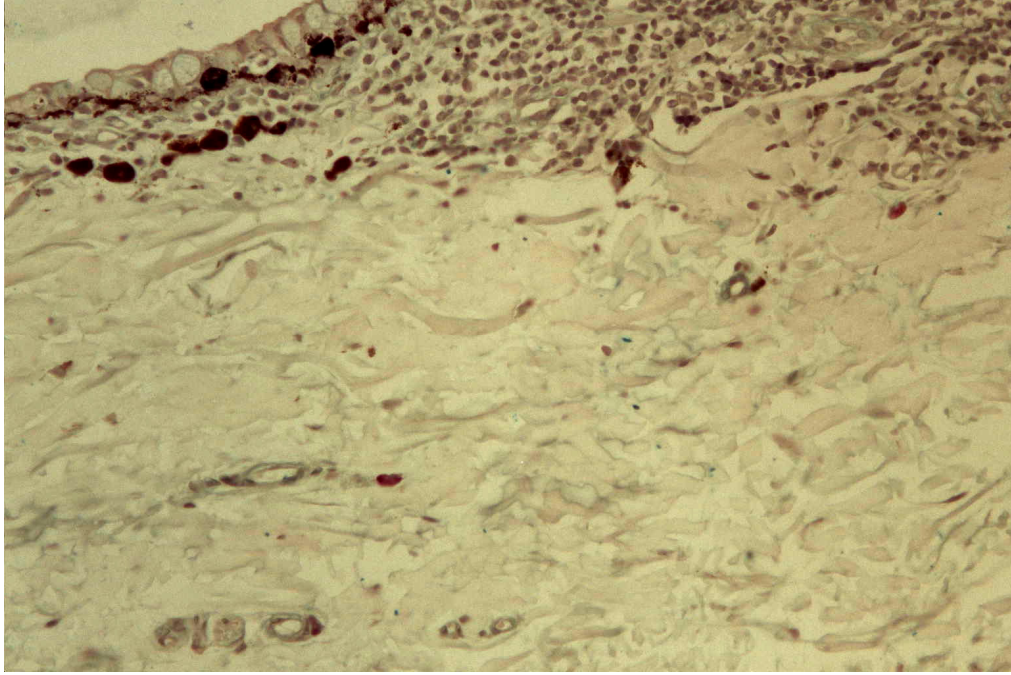


Şekil 4.24. Forniks ,Carnoy tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20

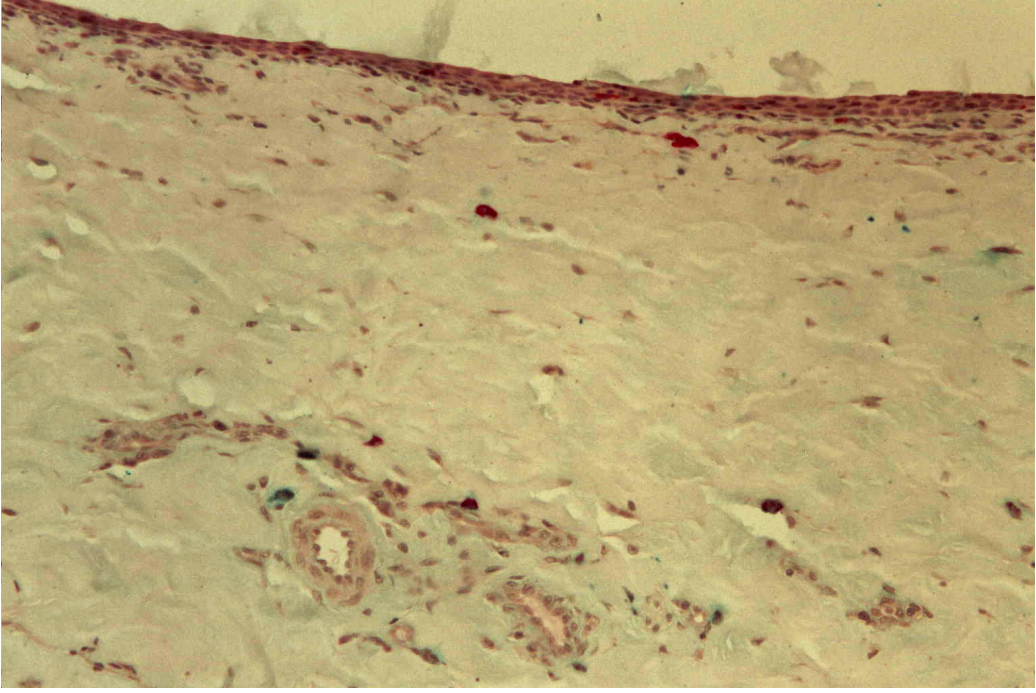


Şekil 4.25. Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, 0,2-0,3 M'lık CEC X 20

**Mast Hücrelerinin Enzim Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Özellikleri:** Köpeklerin konjunktivasında bulunan kimaz içeren mast hücrelerini belirlemek için Naphtol AS-D chloroasetate esterase boyama tekniği kullanıldı. Kimaz içeren mast hücrelerinin epitel içinde ve epitelin hemen altında, stroma içerisinde, kapillar damarlar, bezler ve bezlerin akıtıcı kanalları etrafında az sayıda buldukları belirlendi (Şekil 4.26). Epitel içindeki ve altındaki hücreler genelde daha yassı oval bir görünüme sahiptiler. Carnoy ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin koyu kırmızı olarak (Şekil 4.27), formolle tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin ise daha soluk kırmızı olarak boyandığı tespit edildi. Forniks ve bulbar konjuntiva bölümlerinde palpebral konjunktivaya göre kimaz pozitif mast hücrelerinin daha az olduğu görüldü.

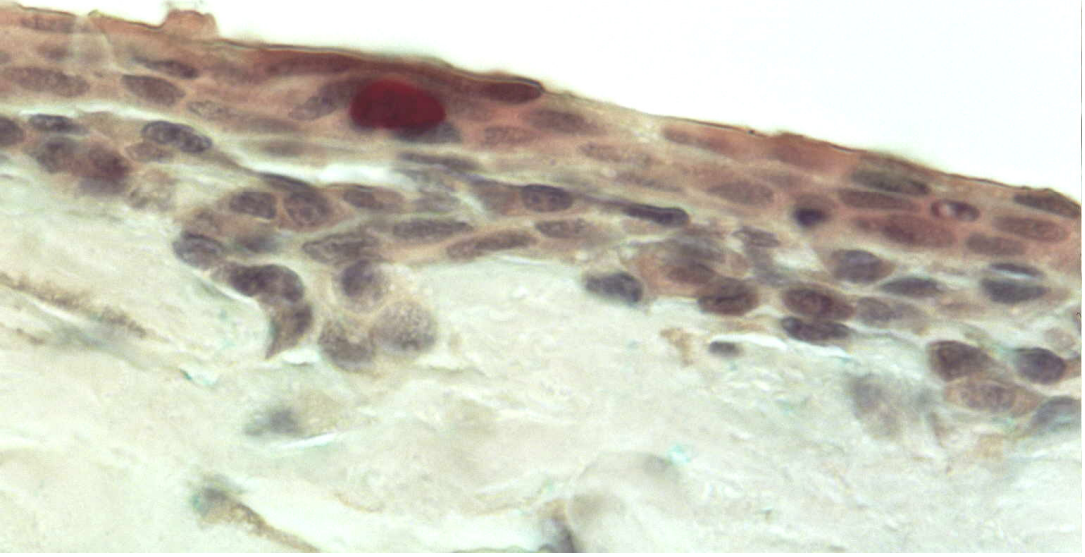


**Şekil 4.26.** Forniks, formaldehit tespiti, NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 20

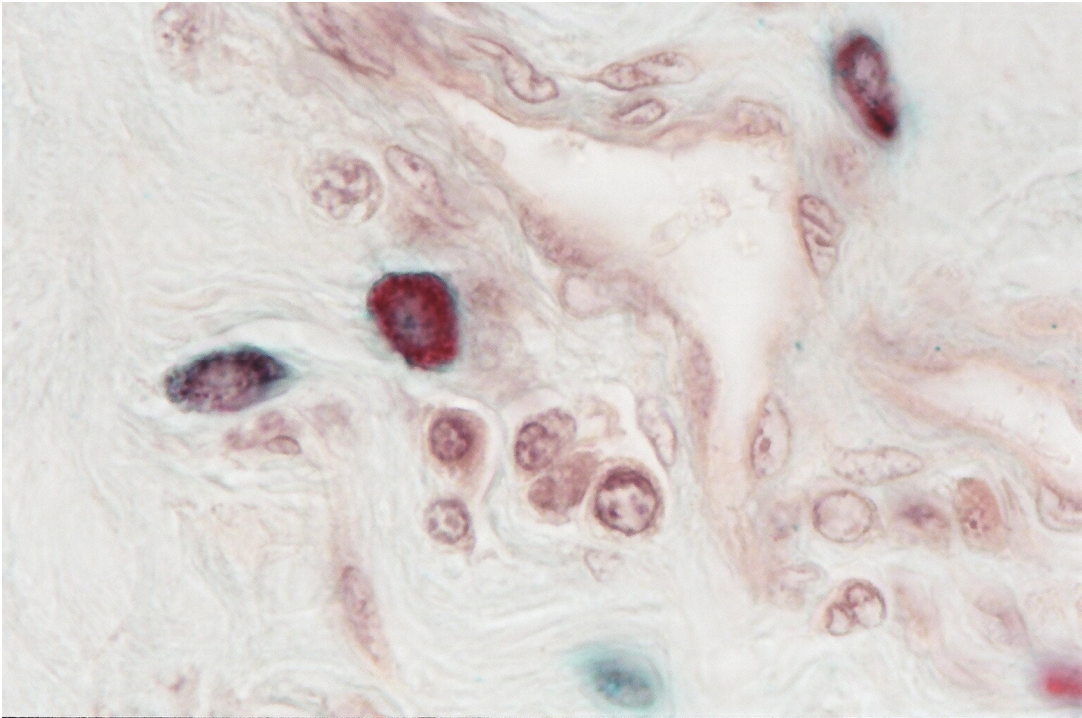


**Şekil 4.27.** Palpebral konjunktivasının tarsal bölümü, Carnoy tespiti, NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 20

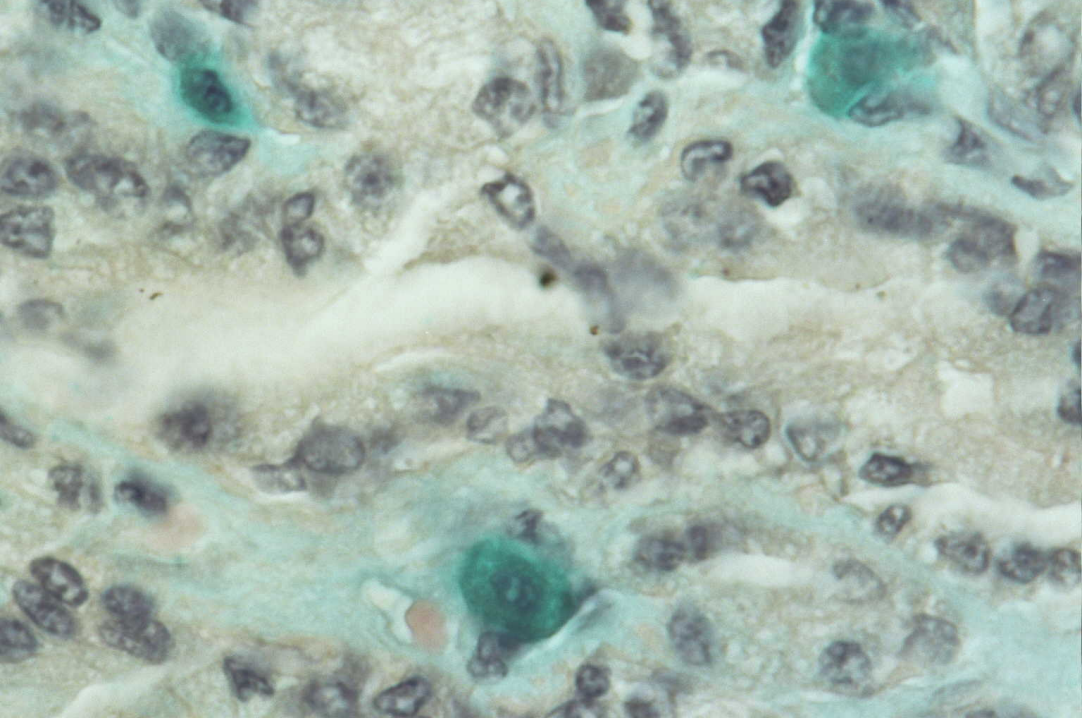
Mast hücrelerinin proteoglikan ve proteaz içeriklerinin bir arada gösterilmesinin mümkün olabileceği düşüncesinden yola çıkarak alınan doku örnekleri öncelikle kimaz aktivitesini belirlemek için Naphtol AS-D chloroasetate esterase boyama tekniği ardından da proteoglikanları belirlemek için 0.2/0.3 M'lık CEC veya 0.7/0.8 M'lık CEC boyama tekniği ile boyanarak enzim histokimya-histokimya yöntemleri ardışık olarak uygulandı. Bu teknikte formol tespitinin gerek enzim ve gerekse proteoglikan içeriğini yeterince koruyamadığı ve dolayısıyla boyanan hücre sayısının Carnoy tespitindeki göre az olduğu görüldü. Naphtol AS-D chloroasetate esterase boyama tekniği tek başına uygulandığında sadece kimaz pozitif hücreler saptanabilirken, NASDCA-CEC uygulanan örneklerde hem NASDCA pozitif hücreler daha belirgin kırmızı olarak boyanmıştı ve hem de tüm mast hücreleri gözlenebilmekteydi. NASDCA-CEC boyamasında başlıca kırmızı boyanan kimaz pozitif (NASDCA pozitif) hücreler (Şekil 4.28), kırmızı- mavi (koyu mor-kahverengi) boyanan mikst hücreler (Şekil 4.29) ve mavi boyanan proteoglikan içeren (CEC pozitif) hücreler (Şekil 4.30) olmak üzere üç hücre tipi tespit edilmesine karşın, hücrelerin turuncudan kahverengine kadar ve hatta açık maviden turkuaz mavisine kadar değişen bir renk yelpazesinde boyandığı dikkati (Şekil 4.31-32-33).



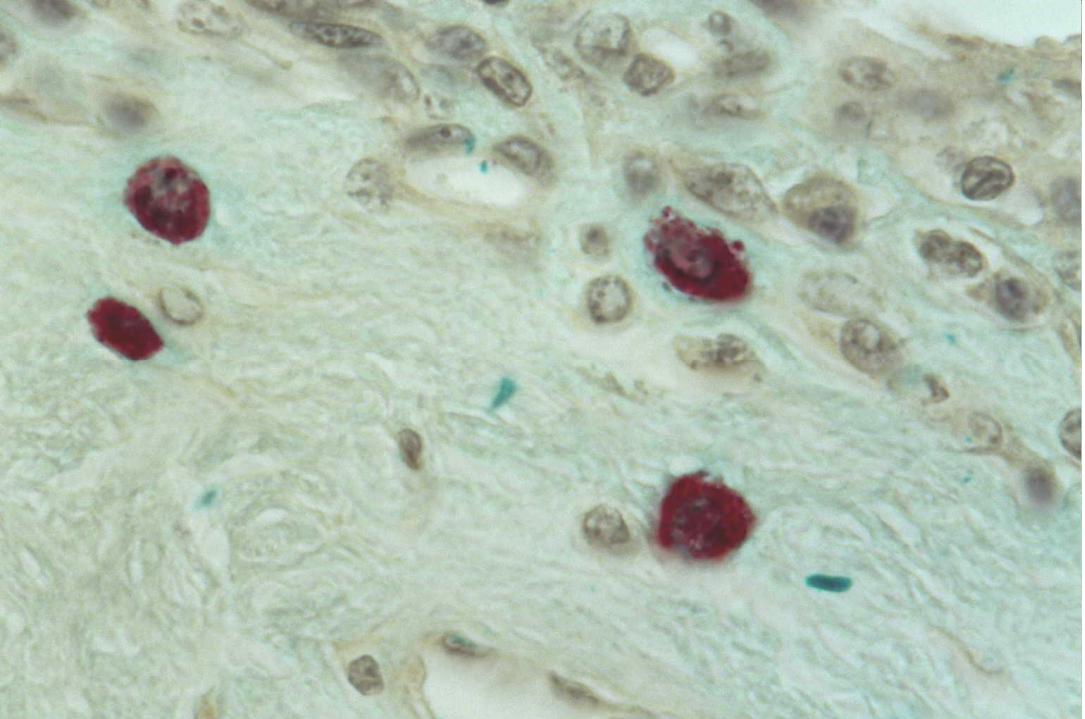
**Şekil 4.28.** Forniks, Carnoy tespiti, intraepitelyal kimaz pozitif hücre,  
NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 100



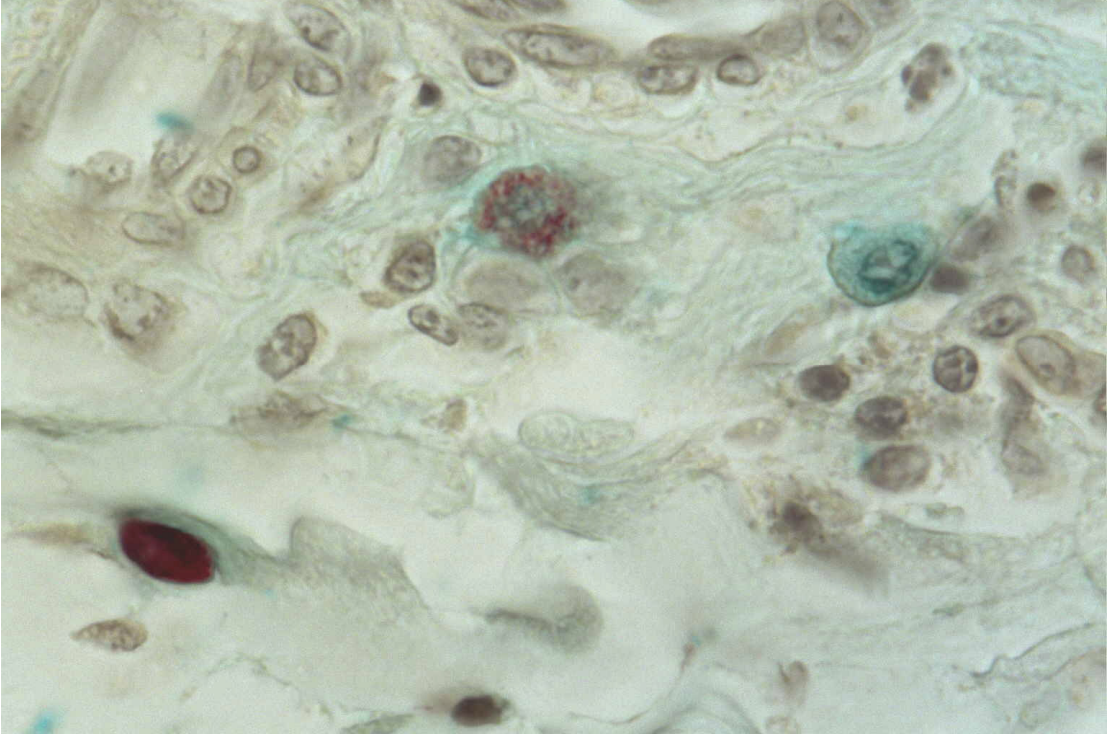
**Şekil 4.29.** Forniks, formaldehit tespiti, kimaz pozitif ve mikst hücreler NASDCA/0,2-0,3 M'lık  
CEC X 100



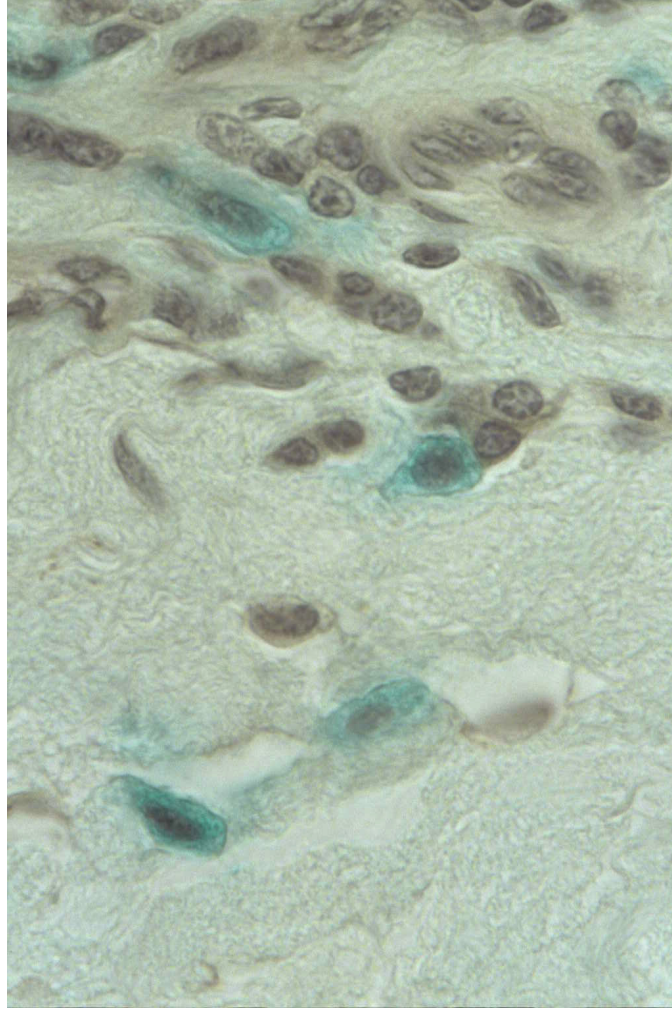
**Şekil 4.30.** Palpebral konjunktiva, Carnoy tespiti, CEC pozitif hücreler NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 100



**Şekil 4.31.** Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, kimaz pozitif hücreler NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 100



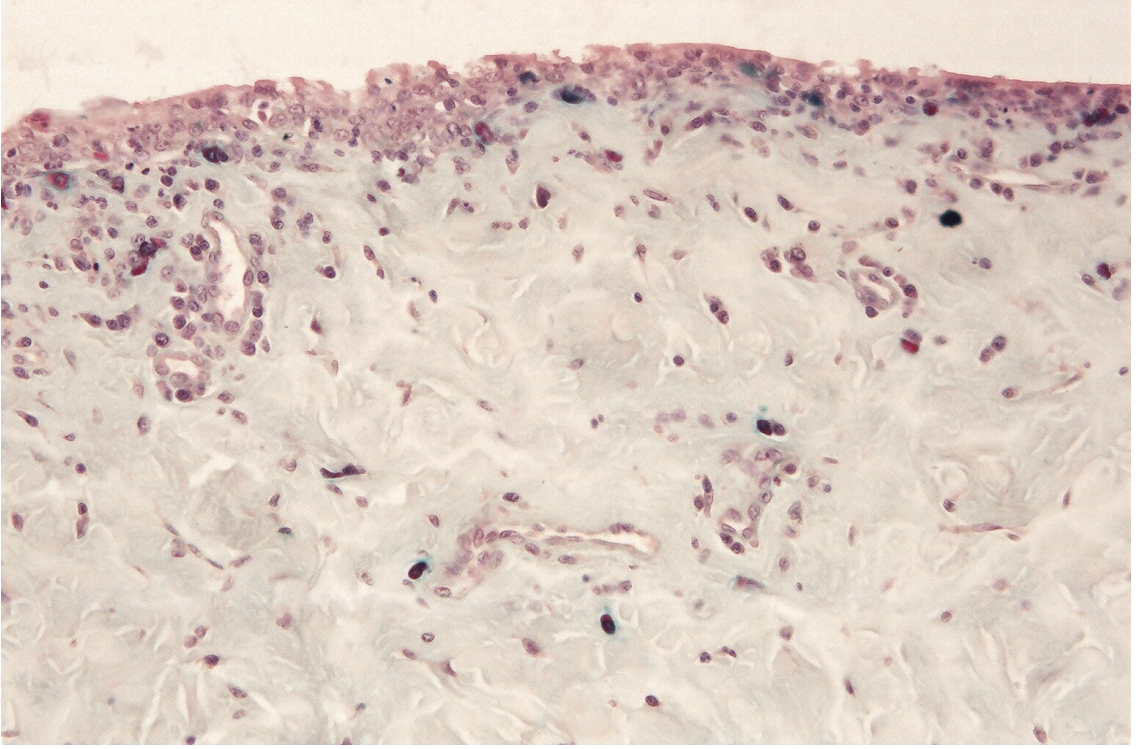
**Şekil 4.32.** Palpebral konjunktivanın tarsal bölümü, Carnoy tespiti, kimaz pozitif ve mikst hücreler  
NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 100



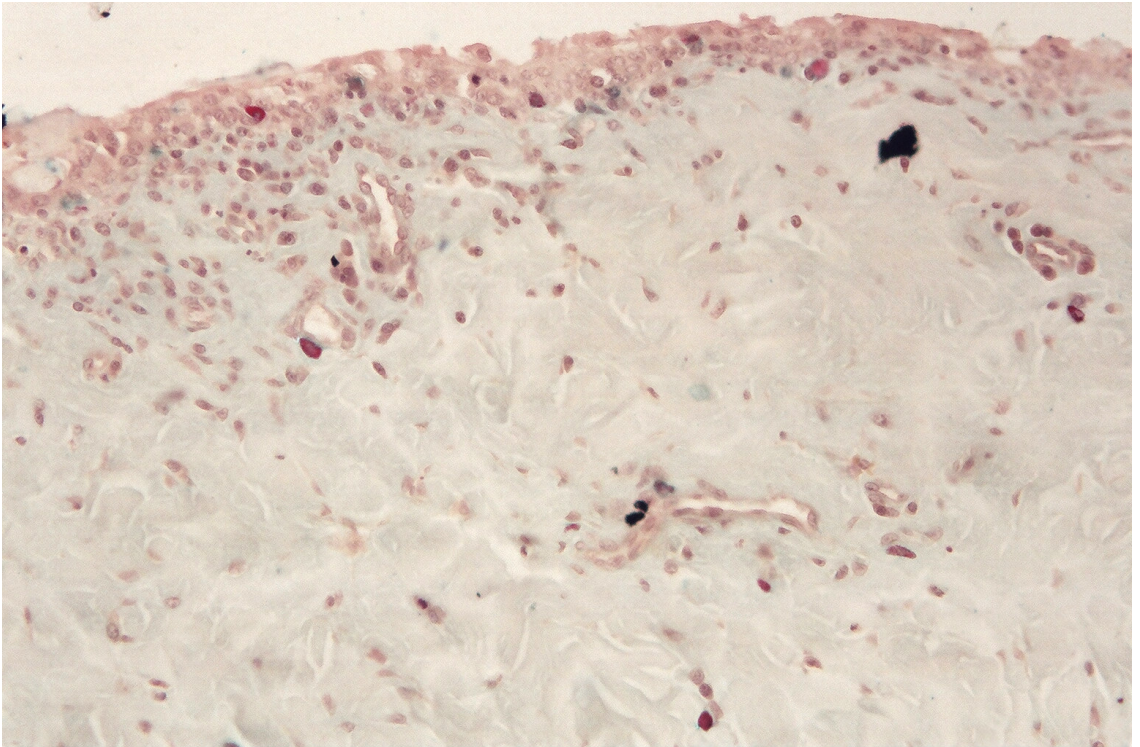
**Şekil 4.33.** Forniks, Carnoy tespiti, CEC pozitif hücreler NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 100

NASDCA-0.2/0.3 M'lık CEC ile NASDCA-0.7/0.8 M'lık CEC boyama tekniklerinin karşılaştırılması ardışık iki kesitte de gözlenebilen hücreler üzerinde yapıldı. Genelde NASDCA pozitif boyanan hücreler her iki boyamada aynı özeliği gösterirken (Şekil 4.34-35), sadece CEC pozitif olanlarda 0.2/0.3 M'lık CEC ile boyananların daha koyu mavi boyandığı görüldü (Şekil 4.34). NASDCA-0.7/0.8 M'lık CEC boyama yönteminde heparin içermeyen hücrelerin heparan sülfatın varlığından dolayı sadece hücre membranlarının boyandığı oysa NASDCA-0.2/0.3 M'lık CEC ile hücrelerin sitoplazmalarının boyanmış olduğu gözlemlendi.



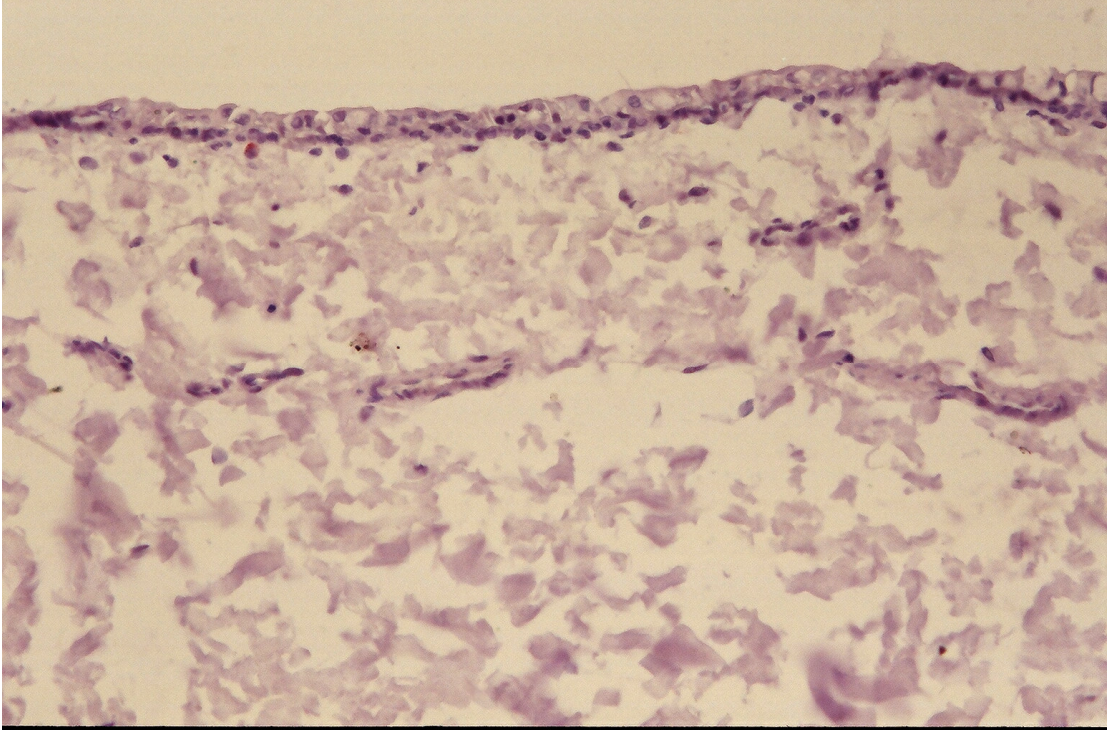


Şekil 4.34. Forniks, Carnoy tespiti, NASDCA/0,2-0,3 M'lık CEC X 20

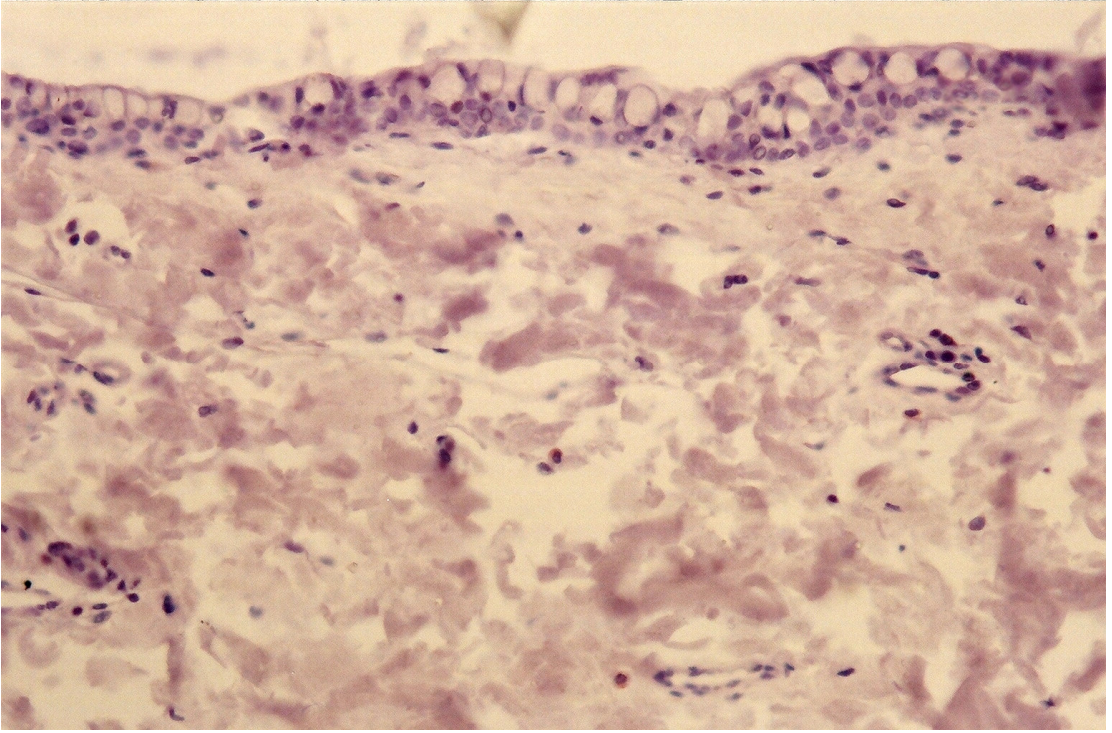


Şekil 4.35. Forniks, Carnoy tespiti, NASDCA/0,7-0,8 M'lık CEC X 20

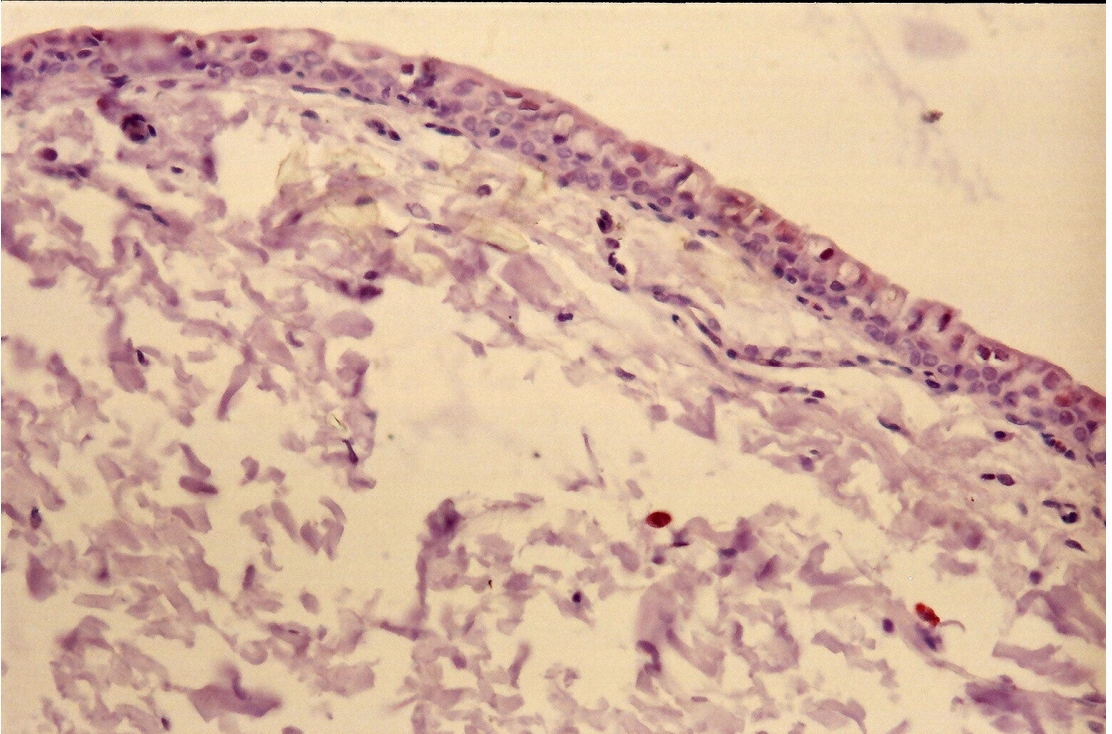
Triptaz içeren mast hücrelerinin konjunktivanın bütün bölümlerinde genelde az sayıda bulunduğu, epitelin hemen altında, stromanın yüzlek ve derin katmanlarında yerleştiği dikkati çekti (Şekil 4.36). Bu hücreler genelde küçük oval biçimli hücreler olup boyanma reaksiyonları bağırsak mukozasında bulunan mast hücrelerinininkine kıyasla daha soluk boyandıkları görüldü (Şekil 4.37-40).



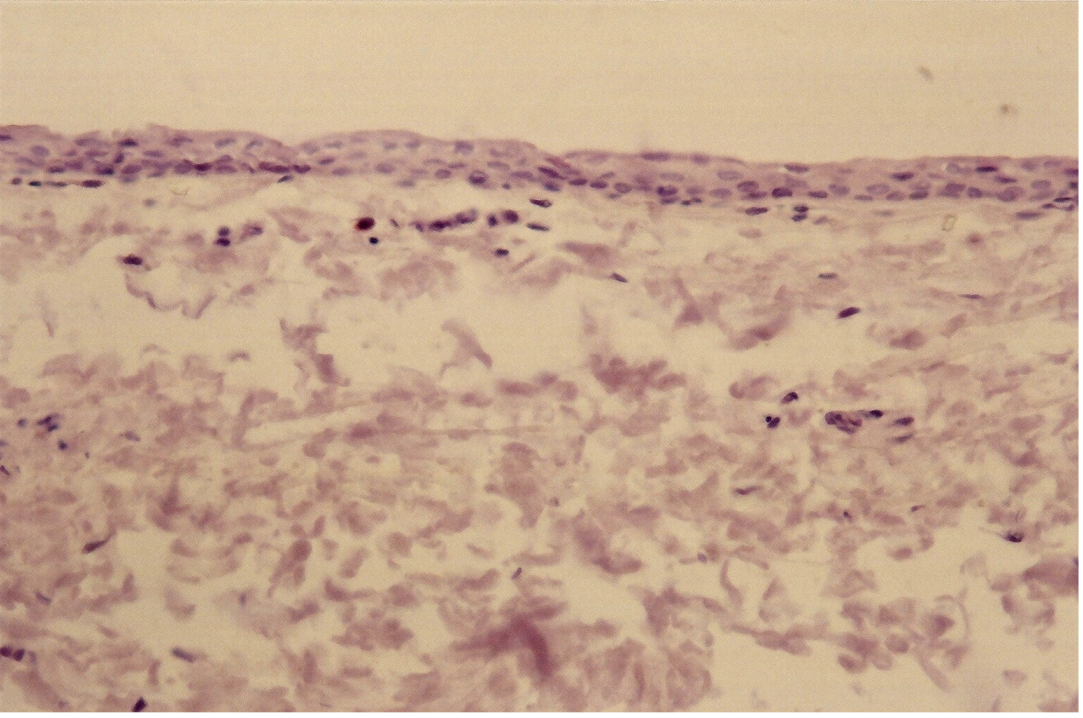
**Şekil 4.36.** Palpebral konjunktivanın orbital bölümü, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler (kırmızı) X 20



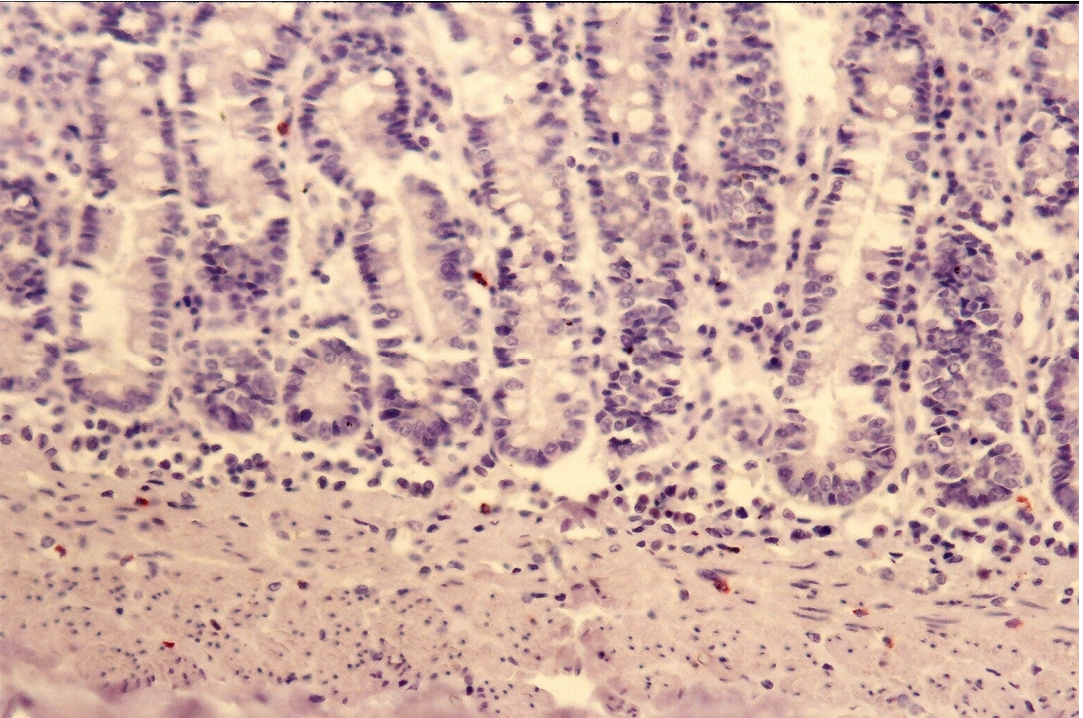
Şekil 4.37. Forniks, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler (kırmızı) X 20



Şekil 4.38. Forniks, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler (kırmızı) X 20



Şekil 4.39. Bulbar konjunktiva, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler (kırmızı) X 20



Şekil 4.40. Köpek bağırsağı, formaldehit tespiti, Triptaz pozitif hücreler(kırmızı) X 20

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevreye direkt teması nedeniyle göz, alerjik hastalıklara daha sık meyil gösteren bir organdır (1, 33, 47, 69). Alerjik göz hastalıkları, insan ve hayvanların yaşamını olumsuz yönde etkileyen yaygın klinik bir problemdir (68). Oküler alerjiler, gözün yüzey dokularında (göz kapağı derisi ve konjunktivada) meydana gelir (1, 69). Oküler alerjik inflamasyon, konjunktival dokudaki IgE aracılı mast hücre aktivasyonu ile ilişkilidir (33, 34, 68) ve tüm bu semptomlara mast hücreleri tarafından salınan histamin, proteazlar, sitokinler ve diğer mediyatörler neden olur (60). Mast hücre türevli mediyatörler oküler yüzey inflamatuvar lökositlerin (nötrofiller, eozinofiller ve lenfositler) infiltrasyon ve migrasyonunda görev alırlar (8, 33, 34, 61, 62) ve oküler yüzeyde immunoregülasyonu sağlarlar (42).

Bu çalışma sağlıklı köpeklerin konjunktivasında bulunan mast hücrelerinin histokimyasal, enzim histokimyasal özellikleri ile proteaz aktivitelerini belirleyerek fizyolojik koşullarda mast hücre popülasyonunun heterojenitesini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada formalin ve Carnoy olmak üzere iki farklı tespit solüsyonu kullanılmış ve bunlardan alınan kesitler kısa süreli toluidine blue ile boyandığında Carnoy'da tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin sayısının formalinde gözlenenenden daha fazla olduğu, dolayısıyla köpeğin konjunktivasındaki mast hücrelerinin insan (83-86), domuz (87), sığır (18, 88), kedi (15), köpek (17, 32), sıçan (54), kobay (89, 90) ve tavuğun (91) çeşitli dokularında olduğu gibi formaline duyarlı ve dirençli olmak üzere iki alt tipinin bulunduğu tespit edilmiştir. Formalin

dirençli mast hücrelerinde ve Carnoy tespitli dokulardaki mast hücrelerinde metakromazi saptanmıştır. Mast hücre granüllerindeki protein ve glikozaminoglikanların uzaysal dizilimleri farklı olduğu bilindiğinden, bu çalışmada formaldehit solüsyonunda tespit edilmiş dokulardaki mast hücrelerinin gösterimi için mukozal ve bağdoku mast hücrelerini eşit oranda koruyan (92) uzun süreli toluidin blue boyaması yapılmıştır. Ardışık kesitlere uygulanmış olan kısa ve uzun süreli toluidin blue (7,28) boyamaları karşılaştırılmış ve konjunktivanın tüm bölümlerinde, özellikle epitelin hemen altında yerleşmiş bulunan mast hücrelerinin kısa süreli toluidin blue ile boyanmadığı, ancak uzun süreli toluidin blue ile boyandığı görülmüş ve dolayısıyla bu hücreler formaline duyarlı olarak tanımlanmıştır.

Mast hücreleri büyüklük, granüllerinin yoğunluğu, granül içeriklerindeki proteoglikanların bileşimi, granül proteazları, T-hücre bağımlılığı, salgılatıcı ajanlara verdikleri yanıtlar gibi morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel farklılıklara bağlı olarak tiplendirilmektedir (10, 21).

Kemirici mast hücrelerinin alt tiplere ayrılmasında içerdikleri proteoglikanların histokimyasal boyanma özellikleri dikkate alınmaktadır. Sıçanda mast hücrelerinin mukozal mast hücreleri (MMC) ve bağdoku mast hücreleri (CTMC) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. MMC'nin proteoglikan içeriği kondroitin sülfat, CTMC'lerinki ise heparindir (94). Alcian blue-safranin O (AB-SO) kombine boyama metodunda AB (+) granüller içeren ve formole duyarlı olanlar mukozal mast hücreleri, SO (+) granüller içeren ve formole dirençli olanlar da bağ dokusu mast hücreleridir. (2, 17, 24-26, 93). Her ne kadar köpeklerde mast hücrelerinin tiplendirilmesinde granüllerin proteaz içerikleri göz özüne alınsa da (17, 32), bu çalışmada köpeklerin konjunktiva örnekleri de Alcian blue-SO gibi bazik katyonik boya kombinasyonu ile boyanmış ve sıçan (88, 92-97), kedi (15), köpek (17, 32) ve tavuğun (91) değişik doku örneklerindeki gibi mast hücrelerinin alcian blue pozitif, safranin O pozitif ve alcian blue-safranin O pozitif olmak üzere üç tip granül içerdiği ve bu nedenle heterojenite gösterdiği belirlenmiştir. Carnoy ile tespit edilen konjunktiva örnekleri Alcian blue-SO kombinasyonu ile boyandığında mast hücrelerinin formalin ile tespit edilen örneklere göre daha yoğun boyandığı, özellikle safranin pozitiflerin Carnoy tespiti ile daha iyi korunduğu görülmüş ve bu durum Carnoy tespitinin asidik olması nedeniyle mast hücre granüllerindeki

proteoglikanlar ve bazik katyonik boyalar arasındaki iyonik bağlantıyı kolaylaştırabilmesine bağlanmıştır (15, 17, 18, 98).

Alcian Blue hem kondrotin sülfatlı proteoglikanları içeren mukozal mast hücre tiplerini, hem de heparin ve kondroitin sülfat proteoglikanlarını içeren bağ doku mast hücre tiplerini tanımlamaktadır. Safranin sadece yüksek miktardaki sülfatlı heparin proteoglikanlarını ve seçici olarak bağ doku mast hücre tiplerini boyar, ancak bu mast hücrelerinin sadece bir bölümü safranin pozitifdir. Çünkü olgun olmayan bağ doku mast hücreleri AB ile kuvvetli boyanmasına karşılık, SO ile zayıf boyanır (27). Köpeğin konjunktivasında safranin pozitif boyanan mast hücrelerinin AB pozitif boyananlara kıyasla daha az sayıda görülmesi konjunktivadaki mast hücrelerinin çoğunluğunun olgun olmadığına göstergesidir denilebilir.

Sıçanlarda mukozal mast hücrelerinin glikozaminoglikan içeriği bağdoku mast hücrelerinin heparin içeriğinden daha fazla eriyebilir özelliktedir. Bağdoku mast hücrelerindeki heparin berberine bağlanarak kuvvetli floresan verir. Mukozal mast hücrelerinde heparin bulunmaz, ancak kondroitin sülfat proteoglikanı bulunur (92). İnsanlarda ise bütün mast hücreleri heparin içerir (99). Noviana ve arkadaşlarının köpeğin çeşitli dokularında tespit ettiği (4) gibi, bu çalışmada köpeklerin konjunktivasındaki mast hücrelerinin de heparin miktarına göre berberin sülfat ile farklı yoğunlukta kuvvetli ve zayıf olarak parlak sarı floresan verdikleri görülmüştür. Konjunktivanın incelenen tüm bölümlerinde epitelin hemen altı ile stromadaki kan damarları etrafında yerleşmiş az sayıda berberin sülfat pozitif mast hücrelerine rastlanırken, hücre miktarı açısından bölümler arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Carnoy ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin formolle tespit edilen dokulardaki mast hücrelerine göre daha belirgin floresan verdikleri tespit edilmiştir. İnsandakinden (99) farklı olarak köpeğin konjunktivasındaki tüm mast hücrelerinde heparinin bulunmadığı görülmüştür.

Mast hücrelerinin tiplendirilmesinde granüllerindeki proteoglikan türlerine dayalı histokimyasal boyama yöntemleri arasında CEC'de bulunmaktadır. Noviana ve arkadaşları (4) dil, akciğer, mezenterik lenf düğümleri, deri gibi pek çok organın bağdokusu ve bağırsakların submukozası, kas katmanı ve serozası içindeki mast hücrelerinin kritik elektrolit konsantrasyonlarının (CEC) 1.0 molardan daha büyük olduğunu dolayısıyla bunların heparin içerdiğini, oysa bağırsakların mukozasındaki

mast hücrelerinin CEC'nin daha düşük olduğunu ve bunların granüllerindeki proteoglikanların düşük molekül ağırlığa sahip olduklarını bildirmektedirler. Bu çalışmada da tüm sülfatlı proteoglikanları belirlemek amacıyla 0.2/0.3 M'lık CEC, heparan sülfat ve heparini belirlemek amacıyla da 0.7/0.8 M'lık CEC uygulanmıştır. Her iki boyamanın formalin tespitinden etkilendiği, yani carnoy solüsyonunun proteoglikan içeriğini koruduğu gözlenmiştir. 0.2/0.3 M'lık CEC boyama yöntemi tüm mast hücrelerini boyarken, 0.7/0.8 M'lık CEC, heparin içeren mast hücreleri ile hücre membranındaki heparan sülfatı boyamıştır. Bu nedenle köpeğin konjunktivasındaki mast hücreleri, köpeğin diğer organlarındaki mast hücreleri gibi (4) granüllerindeki proteoglikanlarının kritik elektrolit konsantrasyonlarına göre iki alt tipe ayrılmıştır.

Naphthol-AS-D-chloroacetate esterase enzimi, normal ve patolojik durumlarda laboratuvar hayvanları ve insan dokularının mast hücrelerinin histokimyasal demonstrasyonu için Leder (1964) tarafından kullanılmıştır (12). Bouin, Carnoy, formaldehit ve dondurma kesitleri üzerinde metod uygulandığında tespit tipinin histokimyasal reaksiyonu ve lokalizasyonu etkilemediği görülmüştür (100). Evcil hayvanlardan köpek (4), kedi (15) ve sığırdan (19) Naphthol-AS-D-chloroacetate esterase enzimi mast hücrelerindeki proteazlardan kimazı belirlemek üzere kullanılan bir enzim olup, bu çalışmada da konjunktivadaki mast hücre kimazını göstermek amacıyla uygulanmıştır. Kimaz içeren mast hücrelerinin epitel içinde ve epitelin hemen altında, stroma içerisinde, kapillar damarlar, bezler ve bezlerin akıtıcı kanalları etrafında az sayıda buldukları belirlenmiştir. Epitel içindeki ve hemen altındaki hücrelerin genelde daha yassı oval bir görünüme sahip olduğu tespit edilmiştir. Forniks ve bulbar konjunktiva bölümlerinde palpebral konjunktivaya göre kimaz pozitif mast hücrelerine daha az raslanmıştır. Tespit tipinden reaksiyonun etkilenmesine ilişkin karşıt (17, 29, 100) görüşler bulunmasına karşılık, Carnoy ile tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin koyu kırmızı olarak, formolle tespit edilen dokulardaki mast hücrelerinin ise daha soluk kırmızı olarak boyandığı görülmüş ve Carnoy'un histokimyasal reaksiyonu artırdığı saptanmıştır (17, 29).

Sunulan araştırmada mast hücrelerinin proteoglikan ve proteaz içeriklerinin bir arada gösterilmesinin mümkün olabileceği düşüncesinden yola çıkarak alınan doku örnekleri öncelikle kimaz aktivitesini belirlemek için Naphtol AS-D chloroasetate esterase boyama tekniği ardından da proteoglikanları belirlemek için 0.2/0.3 M'lık CEC veya



0.7/0.8 M'lık CEC boyama tekniği ile boyanarak enzim histokimya-histokimya yöntemleri ardışık olarak uygulanmıştır. İlk kez uygulanan bu teknikte formol tespitinin gerek enzim ve gerekse proteoglikan içeriğini yeterince koruyamadığı ve dolayısıyla boyanan hücre sayısının Carnoy tespitindekiine göre az olduğu görülmüştür. Naphtol AS-D chloroasetate esterase boyama tekniği tek başına uygulandığında sadece kimaz pozitif hücreler saptanabilirken, NASDCA-CEC uygulanan örneklerde hem NASDCA pozitif hücreler daha belirgin kırmızı olarak boyanmış ve hem de tüm mast hücreleri gözlenebilmiştir. NASDCA-CEC boyamasında sadece kimaz içeren (NASDCA pozitif) hücreler, kimaz ile proteoglikanları birlikte içeren mikst hücreler ve sadece proteoglikan içeren (CEC pozitif) hücreler olmak üzere üç mast hücresi alt tipi ayırt edilmiştir.

İnsanlarda mast hücrelerinin tümü heparin içerdiğinden mukozal ve bağ doku tipi mast hücreleri şeklinde bir sınıflandırması mümkün değildir. İnsanlarda (22, 23, 29, 30) ve evcil hayvanlarda (3, 4, 15-17, 31, 32) mast hücre alt tipleri için mast hücresi granüllerinin spesifik proteazları olan kimaz ve triptaz içerikleri kriter alınmaktadır (3, 4, 7, 15-19, 22, 23, 31, 33-37). Bazı çalışmalarda (27, 29, 30, 34, 35, 37-39), insan mast hücreleri granüllerinin proteaz (kimaz, triptaz, karboksi peptidaz) içeriğine göre sadece triptaz içerenler ve kimaz/triptaz içerenler olmak üzere iki tipinin bulunduğu, bazısında (40) ise mast hücre granüllerinin proteaz ve avidine bağlanmalarına göre üç farklı tipinin bulunduğu belirtilmektedir. Bunlar triptaz içerenler (T), kimaz içerenler ve triptaz/kimaz içerenler (TC) olarak adlandırılmaktadır. Kimaz pozitif olanlar avidine bağlanırlar ve karboksipeptidaz içerirler. İnsanlarda; akciğerlerde ve bağırsak mukozasında yerleşen ve sadece triptaz içeren mast hücreleri mukozal mast hücreleri, deride ve intestinal submukozadakiler ise kimazı ve karboksipeptidazı da içerirdiğinden bağdoku mast hücrelerinin karşılığı olarak düşünülür (27, 34, 35, 37).

Kemirici mast hücre alt tipleri farklı kimaz izoformlarını depolar. Rat mast hücrelerinde bulunan kimazlar, kimotripsin benzeri serin proteaz I ve II (Rat Mast Cell Proteaz I ve Rat Mast Cell Proteaz II) olarak isimlendirilir (43, 44). Ratta MMC'nin granüllerinde kondroitin sülfat ve RMCP II bulunduğu ve alcian blue (+) reaksiyon verdikleri, CTMC'nin granüllerinde ise heparin ve RMCP I bulunduğu ve safranin (+) reaksiyon verdikleri bildirilmektedir (28, 95). Farede de mast hücreleri dokudaki lokalizasyonlarına, proteaz ve proteoglikan içeriklerine göre bağdoku ve mukozal mast

hücreleri olarak tiplendirilir. Deride ve peritonda yerleşen CTMC ler kimaz, triptaz, karboksipeptidaz A (CPA) heparin proteoglikanı ve yüksek oranda histamin içerir. Bağırsakların ve hava yollarının mukozasında yerleşen MMC'ler ise kimaz, kondroitin sülfat proteoglikanı ve düşük oranda histamin içerir. Farede CTMC lerde bulunan kimaz mMCP-4 ve mMCP-5, MMC'lerde bulunan kimaz ise mMCP-1, mMCP-2, mMCP-9'dur (45,46,101). Buna karşın insanda sadece tek bir kimaz tanımlanmıştır ve mast hücreleri bu kimazın varlığına ya da göreceli yokluğuna göre sınıflandırılmaktadır. Farklı araştırmalar kimaz negatif mast hücrelerinin kimaz pozitif mast hücrelerinden oldukça farklı özelliklere sahip olduğu göstermiştir. Proteazlardan triptaz insan mast hücrelerinin çoğunda ya da hepsinde bulunur. Fakat kemiricilerde özellikle bağ dokusundaki mast hücrelerinde yerleşmiştir, mukozal mast hücreleri bu enzimden yoksundur. (2, 27). Domuzlarda bütün mast hücreleri insan triptazı için kullanılan enzim histokimyasal metod kullanıldığında pozitif reaksiyon verirken, kimaz için reaksiyon vermez (87). Koyun mast hücresi proteinazı (SMCP) olan kimazın trakeya, bronş, bronşiyal lenf düğümü, akciğer timus dalak, karaciğer, deri, abomazum, duodenum, jejunum, ileum, kolon ve mezenterik lenf düğümlerinde bulunduğu ve SMCP aktivitesine göre sindirim sisteminde bulunan mast hücreleri mukozal mast hücrelerinin, deride bulunanlar ise bağdoku mast hücre tipinin analogu olduğu bildirilmektedir (41).

Köpeklerde gerek enzim histokimyasal (4, 32) ve gerekse immunohistokimyasal çalışmalar (17), çeşitli dokularda yalnız triptaz ( $MC_T$ ), yalnız kimaz ( $MC_C$ ) ve her ikisini içeren ( $MC_{TC}$ ) mast hücreleri olmak üzere üç farklı mast hücre alt tipinin bulunduğunu göstermektedir. Yine sığır (18, 19), koyun (14) ve kedilerde (16, 17) de mast hücreleri, mast hücre spesifik proteazları olan kimaz ve triptaz içerikleri ölçü alınarak yalnız triptaz ( $MC_T$ ), yalnız kimaz ( $MC_C$ ) ve her ikisini içeren ( $MC_{TC}$ ) mast hücreleri olmak üzere üç farklı gruba ayrılmaktadır (15, 18, 41, 42). Sunulan çalışmada köpeklerin konjunktivasında triptaz içeren mast hücrelerinin belirlenmesinde immunohistokimyasal teknik kullanılmıştır. Konjunktivanın bütün bölümlerinde genelde çok az sayıda bulunan, epitelin hemen altında, stromanın yüzlek ve derin katmanlarında yerleşen bu hücreler, küçük oval biçimli olup, boyanma reaksiyonlarının bağırsak mukozasında bulunan mast hücrelerinininkine kıyasla daha zayıf olduğu görülmüştür.

Nötral bir endoproteaz olan triptaz insan dokularında aktive olmuş mast hücreleri tarafından salgılanır. Çeşitli vücut sıvılarında triptaz düzeyleri mast hücre aktivasyonunun bir indikatörü olarak kullanılır. Triptaz düzeyleri aktif oküler allerjisi olan hastalarda yükselmektedir. Bu nedenle gözyaşı sıvısındaki triptaz düzeyi oküler allerjik hastalıklara karışan mast hücrelerinin aktivasyonunda spesifik, klinik bir indikatör olarak kullanılır (22, 102). Normal, allerjik konjunktivitli (AC) ve vernal konjunktivitli (VKC) çocuklarda, konjunktival epitel hücre süspansiyonunda histamin ve triptaz düzeyleri ölçüldüğünde VKC’te histamin ve triptaz düzeyleri kontrollerden daha yüksek olduğu ve konjunktiva epitelinde histamin ve triptaz düzeylerinin analizinin oküler yüzey alerjilerinin değerlendirilmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir (22). Konjunktiva hastalıklarında intraepitelial mast hücrelerinde triptaz dışındaki diğer proteazların ekspresyonundaki azalma da bir kriterdir. AKC ve ABC’de bulbar stromadaki mast hücrelerinde triptazdan ziyade kimaz ekspresyonunda önemli bir azalma olduğu ve allerjik göz hastalıklarının alt tiplerinde mast hücrelerinin dağılımında spesifik değişimler ortaya çıktığı bildirilmektedir (81). Atopik keratokonjunktivitis (AKC)’li insanlarda epitel içerisinde kimaz içeren mast hücreleri ( $MC_C$ ) bulunurken triptaz içeren ( $MC_T$ ) veya triptaz/kimaz ( $MC_{TC}$ ) içeren hücrelere rastlanmaz. Atopik keratokonjunktivitis (AKC), Oküler sikatrikal pemfigoid (OCP) ve Stevens-Johnson sendrom (SJS)’lu hastaların konjunktivalarında MCC, MCT ve MCTC olmak üzere üç tip mast hücresi bulunmaktadır. Bu hastaların konjunktivalarındaki üç mast hücresi alt tipinin sayı ve dağılımları normal konjunktivaya kıyasla oldukça fazladır. Konjunktivitli hastalarda özellikle de AKC’li hastalarda kimaz içeren mast hücreleri (MCC) baskındır. Baddeley ve ark. (81) normal ve mevsimsel atopik konjunktivitis (SAC), perennial atopik konjunktivitis (PAC), atopik keratokonjunktivitis (AKC) ve blefarokonjunktivitis (ABC)’de mast hücrelerinin dağılımı ile proteaz içeriklerini incelemişlerdir. Normal bulbar ve palpebral konjunktiva epitelleri içinde mast hücrelerinin bulunmadığını, SAC, AKC ve ABC’de bulbar stromadaki, ABC ve AKC’de palpebral substansiya propriyadaki mast hücre yoğunluğunun arttığını saptamışlardır. Vernal keratokonjunktivitis (VKC)’de  $MC_{TC}$  ve  $MC_T$  alt tiplerinin sayı ile gözyaşındaki kimaz aktivitesinin de VKC’nin şiddetinin belirleyicisi olduğu bildirilmektedir (103). Sağlıklı insanlarda konjunktival mast hücrelerinin triptaz/kimaz içeren ( $MC_{TC}$ ) içeren hücreler olduğu ve substansiya propriyada yerleştikleri ifade edilmektedir (13, 23). Yapılan çalışmada ise köpeklerin konjunktivasında kimaz pozitif

hücelere epitel içinde epitelin hemen altında ve stromada rastlanmış, ancak triptaz pozitif mast hücreleri ise epitelin altındaki bağdokuda az sayıda gözlenmiştir. Bu çalışmada triptaz ve kimaz aktivitesini belirlemek için enzim histokimya ve immunohistokimya ardışık olarak uygulanmadığından triptaz/kimaz içeren (MC<sub>TC</sub>) mast hücresi alt tipi belirlenememiştir. Köpeklerin normal konjunktiva bölümlerinde mast hücrelerinin iki proteaz tipini içermesi ve kimaz pozitif hücrelerin triptaz pozitiflerden daha fazla miktarda bulunması, konjunktival hastalıkların tanısında triptaz pozitif mast hücrelerindeki veya gözyaşındaki triptaz içeriğindeki bir artışın (22) ve kimaz pozitif mast hücrelerindeki azalışın (81) veya artışın (103) konjunktival hastalıkların tiplendirilmesinde veya tanısında birer kriter olarak kullanılmasının nedenini açıklayıcı niteliktedir.

Sonuç olarak köpeğin konjunktivasında bulunan mast hücreleri formalin duyarlılığına, katyonik boyalarla boyanma özelliklerine, granüllerindeki proteoglikanlara ve proteazlara göre farklılıklar gösteren heterojen nitelikli hücrelerdir. Bu özellikleri de özellikle konjunktival hastalıkların patogenesisinin belirlenmesinde kriter olarak kullanılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone. First Ed. 1990; pp. 91-106
2. Beil WJ, Schuiz M, Wefelmeyer U. Mast Cell Granule Composition and Tissue Location Close Correlation. *Histol Histopathol.* 2000; 15(3):937-46.
3. Tharp MD. Mast Cells and Their Mediators. American Academy of Dermatology. 2003
4. Noviana D, Mamba K, Makimura S, Horii Y. Distribution, Histochemical and Enzyme Histochemical Characterization of Mast Cells in Dog. *Journal of molecular Histology.* 2004; 35:123-132.
5. Dahm RL, Latimer KS. Mast Cell Disease in Dogs and Cats: An Overview. College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, 2001; Athens.
6. Siebert R. And Stirling J. Mast Cells. Woods and Ellis. 2000
7. Pennissi AB, Rudolph MI, Piezzi RS. Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense. *Biocell* 2003; 27(2): 163-172.
8. Slomin CB, Boone R. The Ocular Allergic Response : A Pharmacotherapeutic Review. *Formulary* 2004; 39:213-222.
9. Junquera LC, Carnerio J, Kelley RO. Mast Hücreleri. *Temel Histoloji.* Barış Kitabevi. 1993; İstanbul.
10. Koçak Harem M. Tavuklarda Alt Solunum Yollarındaki Mast Hücreleri Üzerinde Histolojik Çalışmalar. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. Ankara. 2001; s.7-9.

11. Gray's Anatomy Body Part- Mast Cell. 2004.
12. Bancroft JD, Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone. Third Ed. 1990; pp. 167- 638.
13. Morgan SJ, Williams JH, Walls AF, Church MK, Holgate ST, McGill JI. Mast Cell Numbers and Staining Characteristics in The Normal and Allergic Human Conjunctiva. J Allergy Clin Immunol. 1991; 87(1 Pt 1):111-6.
14. Huntley JF, Newlands G, Gibson S, Ferguson A, Miller H. Histochemical demonstration of chymotrypsin like serine esterases in mucosal mast cells in four species including man. J Clin Pathol. 1985; 38: 375-384.
15. Noviana D, Kono F, Nagakui Y, Shimizu H, Mamba K, Makimura S, Horii Y. Distribution and Enzyme Histochemical Characterisation of Mast Cells in Cats. Histochem J. 2001; 33(11-12):597-603.
16. Noli C, Welle M, Scarpella F. And Abramo F. Quantitative Analysis of Tryptase- and Chymase-containing Mast Cells in Eosinophilic Conditions of Cats. Vet Pathol 2003;40:219-221.
17. Kube P, Audige L, Künther K, Welle M. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. Histochem Cell Biol 1998; 110:129-135.
18. Künther K, Audige L, Kube P, Welle M. Bovine mast cells: distribution, heterogeneity density, and influence of fixation techniques. Cell Tissue Res. 1998;293:111-119.
19. Jolly S, Coignoul F, Gabriel A. And Desmecht D. Detection of Tryptase in Bovine Mast Cells: Comparison of Enzyme- and Immunohistochemistry. J. Comp. Path. 1999 Vol.120,269-279
20. Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of maturing human T and TC mast cells in situ. Lab Invest. 1989; 60(1): 147-57.
21. Metcalfe DD, Baram D, and Mekori YA. Mast Cells. Physiological Reviews. 1997; 77(10):1033-1079.
22. Fukagawa K, Saito H, Azuma N, Tsubota K, Likura Y, Oguchi Y. Histamine and Tryptase Levels in Allergic Conjunctivitis and Vernal Keratokeratitis. Cornea. 1994; 13(4):345-8.

23. Irani AM, Butrus SI, Tabbara KF, Schwartz LB. Human Conjunctival Mast Cells: Distribution of MCT and MCTC in Vernal Conjunctivitis and Giant Papillary Conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86(1):34-40.
24. Dumitrascu D. Mast Cells as Potent Inflammatory Cells. *Rom J Intern Med.* 1996; 34(3-4):159-72.
25. Jianlong D. China's Major Breakthroughs in Mast Cell. *China Science and Technology Newsletter* 1999. No.74.
26. Oliani S, Freymüller E, Takahashi H. And Straus A. Immunocytochemical Localization of Heparin in Secretory Granules of Rat Peritoneal Mast Cells Using a Monoclonal Anti-heparin Antibody (ST-1). *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1997 ; Vol. 45(2):231-235.
27. Chen Z, Irani AA, Bradford TR, Craig SS, Newlands G, Miller H, Huff T, Simmons H. And Schwartz LB. Localization of Rat Tryptase to a Subset of the Connective Tissue Type of Mast Cell. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1993; Vol. 41, No. 7, pp.961-969.
28. McMenamin PG, Morrison SM, MCmenamin C. Immunomorphologic Studies of Mast Cell Heterogeneity, Location, and Distribution in The Rat Conjunctiva. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 97(6):1375-86
29. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, Deblois G. And Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Immunology.* 1986. Vol.83, pp. 4464-4468.
30. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell:an overview. *Methods Mol Biol.* 2006;315:13-34.
31. Welle M. Development, Significance, and Heterogeneity of Mast Cells with Particular regard to The Mast Cell-Specific Proteases Chymase and Tryptase. *J Leukoc Biol.* 1997; 61(3):233-45.
32. Frangogiannis NG, Burns Ar, Michael LH, Entman ML. Histochemical and morphological characteristics of canine cardiac mast cells. *Histochem J.* 1999;31(4): 221-9.
33. James L. Stahl, PhD, Ellen B. Cook, BS, Neal P. Barney MD, and Frank M. Graziano, MD, PhD Pathophysiology of Ocular Allergy: The Roles of Conjunctival Mast Cells and Epithelial Cells. *Current Science, Inc.* ISSN 2002; 2:332-339.
34. Palmares J, Delgado L. Ocular Allergy. *Medisa Ltd.* 2002; 100.361/96.

35. Welle M. Mast cell heterogeneity in domestic animals and the involvement of mast cells subtypes in disease. Habilitation Veterinary Pathology. 2002.
36. Bucley MG, Mceuen AR. And Walls AF. The Detection of Mast Cell Subpopulation in Formalin-Fixed Human Tissues Using a New Monoclonal Antibody Specific for Chymase. *Journal of Pathology* 1999;189: 138-143.
37. Church MK, Shute JK. And Sampson AP. Mast Cell-Derived Mediators. Section a Immunology Chapter 13 2003; 186-209.
38. Aldenborg F, Enerback L. The immunohistochemical demonstration of chymase and tryptase in human intestinal mast cells. *Histochem J.* 1994; 26(7): 587-96.
39. Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest.* 1988; 58(5): 682-91.
40. Weidner N, Austen KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract* 1993; 189(2): 156-62.
41. Sture GH, Huntley JF, MacKellar A, Miller HR. Ovine Mast Cell Heterogeneity is Defined by The Distribution of Sheep Mast Cell Proteinase. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 48(3-4):275-85.
42. Leonardi A. The Central Role of Conjunctival Mast Cells in the Pathogenesis of Ocular Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports.* 2002; 2: 325-331.
43. Powers JC, Tanaka T, et al. Mammalian chymotrypsin-like enzymes. Comparative reactivities of rat mast cell proteases, human and dog skin chymases, and human cathepsin G with peptide 4-nitroanilide substrates and with peptide chloromethyl ketone and sulfonyl fluoride inhibitors. *Biochemistry.* 1985; 24(8):2048-58.
44. Muramatu M, Itoh T, Takei M, Endo K. Tryptase in rat mast cells : properties and inhibition by various inhibitors in comparison with chymase. *Biol Chem Hoppe seyler.* 1988; 369(7): 617-25.
45. Hunt JE, friend SS, et all. Mouse Mast Cell Protease 9, a Novel Member of the Chromosome 14 Family of Serin Protease that is Selectively Expressed in Uterine Mast Cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997 vol.272, No. 46, pp.29158-29166.
46. Kamen P, Valchanov and Gordon B. Enzyme Histochemistry of Tryptase in Stomach Mucosal Mast Cells of the Mouse. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1999 Vol. 47(5): 617-622.



47. Epstein B, and Yanni J. Recent developments in understanding and treating allergy make the atopic patient more treatable. Jobson Publishing. 2005.
48. Norrby K. Mast cells and angiogenesis. *Apmis* 2002, 110:355-71.
49. Naidoo K. Ocular Allergy: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. CPD Article. 2000; vol.13, no.3.
50. Mccauley SD, Gilchrist M, Befus AD. Nitric oxide: a major determinant of mast cell phenotype and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Vol.100:11-14.
51. Jackson M. Et al. Expression of nitric oxide synthase III (eNOS) mRNA by human skin cells: melanocytes but not keratinocytes express eNOS mRNA. *Arch Dermatol Res.* 1998,290:350-352.
52. Lundequist A. Biological Functions and Regulation of Serglycin-dependent Mast cell Proteases Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2006.
53. Glenner GG, Hopsu VK, Cohen LA. New substrates of trypsin and some trypsin-like enzymes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1964.
54. Katunuma N, Fukusen N, Kido H. Biological functions of serine proteases in the granules of rat mast cells. *Adv Enzyme Regul.* 1986; 25: 241-55.
55. Gurish MF. And Austen KF. The Diverse Roles of Mast cells. *Immunology.* 2001; Vol. 194, No.1.
56. McGill J. Conjunctival cytokines in ocular allergy. *Clinical and Experimental Allergy.* 2000, Vol.30, pp.1355-1357.
57. Macleod JD, Anderson DF, Baddeley SM, Holgate ST, McGill JI, Roche WR. Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy.* 1997; 27(1): 1328-34.
58. Sağlam M, Aşti R, Özer A. Genel Histoloji, Yorum Matbaacılık, Ankara, 2001; s. 158-160.
59. Cook EB, Stahl JL, Barney NP, Graziano FM. Mechanisms of Antihistamines and Mast Cell Stabilizers in Ocular Allergic Inflammation. *Medicinal Chemistry Reviews,* 2004; vol.1, no. 3, pp. 333-347.
60. American College of Allergy, Asthma & Immunology The Eyes of Texas: Advances in the Research of Ocular Allergy Agents. 2001.
61. Mussoline J. MD Dry Eye: Awareness, Diagnosis, and Management. *Women's Health in Primary Care.* 2004; Vol.7, no.2, pp. 97-103.

62. Anderson DF. Management of Seasonal Allergic Conjunctivitis (SAC):Current Therapeutic Strategies. *Clinical & Experimental Allergy*. 2001; Vol.31, no.6, pp.823.
63. Stahl JL, Cook EB, Graziano FM, Barney NP. Human Conjunctival Mast Cells. *Arch Ophthalmol*. 1999; Vol.117, no.4, pp.493-497.
64. Wingren U, Enerback L. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan. *Histochem J*. 1983; 15(6): 571-82.
65. Cook EB, Stahl JL, Barney NP, Graziano FM. Ocular Mast Cells. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2001; Vol.20, no.2, pp.243-268.
66. Arslan O. Allerji ve Göz. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Alerji-Astım Sempozyumu. İstanbul 1998; s.67-76.
67. Allansmith MR, Greiner JV, Baird RS. Number of İnflammatory Cells in The Normal Conjunctiva. *Arch Ophthalmol*. 1978; 86(2):250-9.
68. Graziano FM, Stahl JL, Cook EB, Barney NP. Conjunctival Mast Cells in Ocular Allergic Disease. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2001; 22(3): 121-126.
69. Banks WJ. *Applied of Veterinary Histology*. 1993; pp. 499.
70. Pehlivan KD. Bimatoprost, Travoprost, lavanoprost'un Gözyaşı İşlevi ve Göz Yüzeyi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 1.Göz Kliniği Uzmanlık Tezi. 2005 İstanbul.
71. Drs. Foster& Smith. *Eye Anatomy and Function*. 2005.
72. Kocamış Ö. Primer Pterjium Cerrehi Tedavisinde Serbest Konjunktival Ototogreft. T.C. Sağlık bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Kliniği Uzmanlık Tezi. 2005 İstanbul.
73. Malaty R, Nichols B, Schacter J, Tongni B. And Dawson C. Stimulation of Peroxidase by Chlamydial Infection : Cytochemistry of Guinea Pig Conjunctival Epithelium. *Infection and Immunity* 1979,Vol.25, No.1, pp.417-426.
74. Leonardi A, Secchi AG, Briggs R, Allansmith MR. Conjunctival mast cells and allergic late phase reaction. *Ophthalmic Res*. 1992; 24(4):234-42.
75. Akın F, Samsar E. Göz Hastalıkları, Özkan Matbaacılık, Ankara, 2001; s. 79-91.
76. Yao L, Baltatzis S, Zafirakis P, Charalampos LR, Voudouri A, Markomichelakis N, Zhao T, Foster CS. Human Mast Cell Subtypes in Conjunctiva of Patients with Atopic

- Keratoconjunctivitis, Ocular Cicatricial Pemphigoid and Stevens-Johnson Syndrome. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2003; Vol.11, no.3, pp.211-222.
77. Tabbara KF. Tear Tryptase in Vernal Keratokonjunctivitis. *Arch Ophthalmol*. 2001; 119(3):338-42.
  78. Henriquez AS, Keyon KR, Allansmith MR. Mast Cell Ultrastructure. Comparison in Contact Lens-Associated Giant Papillary Conjunctivitis and Vernal Keratokonjunctivitis. *Arch Ophthalmol*. 1981; 99(7):1266-72.
  79. Yani JM, Sharif NA, Gamache DA, Miller ST, Weimer LK, Spellman JM. A Current Appreciation of Sites for Pharmacological Intervention in Allergic Conjunctivitis: Effects of New Topical Ocular Drugs. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*. 1999; 228:33-7.
  80. Tsubota K, Takamura E, Hasegawa T, Kobayashi T. Detection by Brush Cytology of Mast Cells and Eozinophils in Allergic and Vernal Conjunctivitis. *Cornea*. 1991; 10(6): 525-31.
  81. Baddeley SM, Bacon AS, McGill JI, Lightman SL, Holgate ST, Roche WR. Mast Cell Distribution and Neutral Protease Expression in Acute and Chronic Allergic Conjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 1995; 25(1):41-50.
  82. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of Histological Techniques*. Longman Group UK Limited. 1984; pp.410.
  83. Marshall JS, Ford GP, Bell EB. Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis. *Br J Dermatol*. 1987; 117(1):29-36.
  84. Markey AC, Churchill LJ, McDonald DM. Human cutaneous mast cells- a study of fixative and staining reactions in normal skin. *Br J Dermatol*. 1989;120(5): 625-31.
  85. Strobel S, Miller H, Ferguson A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol*. 1981;34: 851-858.
  86. Shanahan F, MacNiven I, Dyck N, Denburg JA, Bienenstock J, Befus AD. Human lung mast cells: distribution and abundance of histochemically distinct subpopulations. *Int Arct Allergy Appl Immunol*. 1987;83(3): 329-31.
  87. Xu LR, Carr MM, Bland AP, Hall GA. Histochemistry and morphology of porcine mast cells. *Histochem J*. 1993; 25(7): 516-22.
  88. Becker AB., Chung KF., McDonald DM., Lazarus SC., Frick OL., Gold WM. Mast cell heterogeneity in dog skin. *Anat Rec*. 1985;213(4): 477-80.

89. Stock EL, Hill RA, Boyle –Vavra S, Roth S. eosinophils and mast cell homogeneity of guinea pig ayalid skin, conjunctiva, and ileum. *Am J Anat.* 1989;186(4): 359-68.
90. Ghanem NS, Assem ES, Leung KB, Pearce FL. Guinea pig mast cells: comparative study on morphology, fixation and staining properties. *Int Arct Allergy Appl Immunol.* 1988; 85(3): 351-7.
91. Wang T. Mast cells in the chick digestive tract. II. Fixation, distribution, histochemistry and ultrastructure. *Tokai J Exp Clin Med.* 1991; 16(1): 27-32.
92. Wingren U, Enerback L. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan. *Histochem J.* 1983; 15(6): 571-82.
93. Bachelet CM, Bernaudin JF, Fleury-Feith J. Distribution and histochemical characterization of pulmonary mast cells in the rat and guinea pig. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1988;87(3): 225-9.
94. Aldenborg F, Enerback L. Histochemical heterogeneity of dermal mast cells in athymic and normal rats. *Histochem J.* 1988;20(1): 19-28.
95. Gibson S., Mackeller A, Newlands GF, Miller HR. Phenotypic expression of mast cell granule proteinases. Distribution of mast cell proteinases I and II in the rat digestive system. *Immunology.* 1987; 62(4): 621-7.
96. Miyata K, Takaya K. Effects of strong electrolytes on the iron alum—Alcian Blue—Safranin staining of mast cell granules of the rat. *Histochem. J.* 1980; 12(5): 565-75.
97. Michaloudi HC, Papadopoulos GC. Mast cells in the sheep, hedgehog and rat forebrain. *J Anat.* 1999; 195(4): 577-86.
98. Xu L, Ou D. And Gao D. Characterization of Mast Cells in Chicken. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2003; 2 (1):38-43.
99. Craig SS, Irani AM, Metcalfe DD, Schwartz LB. Ultrastructural localization of heparin to human mast cells of the MCTC and MCT types by labelling with antithrombin III-gold. *Lab Invest.* 1993; 69(5): 552-61.
100. Hahn von Dorsche H, Stiller D, Pambor M, Schwesinger G, Sodemann S, Stolp A. Occurrence of naphthol-AS-D-chloracetate-esterase-activity in mast cells with special references to cutaneous mastocytoses. *Acta Histochem.* 1981; 69(1): 23-30.

101. Reynolds DS, Stevens RL. et al. Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990 Vol.87, pp.3230-3234.
102. Butrus SI, Ochsner KI, Abelson MB, Schwartz LB. The level of tryptase in human tears. An indicator of activation of conjunctival mast cells. Ophthalmology. 1990; 97(12): 1678-83.
103. Elbihara N, Funaki T, Takai S, Miyazaki M, Fujiki K. And Murakami A. Tear chymase in vernal keratoconjunctivitis. Current Eye Research. 2004;28(6): 417-420.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında İstanbul' da doğdu. İlk ve orta öğrenimini MustafapaŐa İlköğretim okulunda, lise eğitimini de Ürgüp Lisesinde tamamladı. 1998 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2002 yılında buradan mezun oldu. 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.