

Egy új, kloákához-asszociált csirke nyirokszövet (kloáka tonsilla) karakterizálása és ontogenezise

TDK dolgozat

Készítette:

Farkas Ábel Húr, III. éves hallgató

Témavezető:

Prof. Dr. Nagy Nándor

Semmelweis Egyetem, Anatómia, Szövet-, és Fejlődéstani Intézet,

Össejtes és Kísérletes Embriológia Laboratórium

Belső konzulens:

Dr. habil. Heinzlmann Andrea, egyetemi docens

Állatorvostudományi Egyetem, Anatómiai és Szövettani Tanszék

Állatorvostudományi Egyetem

Budapest, 2024

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke.....	3
3. Bevezetés	4
4. Irodalmi áttekintés.....	5
4.1 A bursa Fabricii felfedezésének rövid története.....	5
4.2 Kloáka-asszociált nyirokszervek előfordulása a gerincesekben	7
4.2.1 Hüllők.....	7
4.2.2 Emlősök.....	7
4.2.3 Madarak.....	9
5. Célkitűzések	10
6. Anyag és módszer.....	11
6.1 Kísérleti állatok	11
6.2 Minták szövettani feldolgozása	11
6.2.1 Zselatin-szacharózisos fagyasztott blokk készítése	11
6.2.2 Metszetek készítése	12
6.3 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia.....	12
6.3.1 Immunhisztokémia	12
6.3.2 Egyszeres immunfluoreszcens festés	13
6.3.3 Kettős immunfluoreszcens festés.....	14
6.4 Felhasznált ellenanyagok	15
7. Eredmények	17
7.1 A kloákaredő lymphoid szövetének jellemzése immuncitokémiai módszerekkel ..	19
7.2 A kloákaredő tonsillaris egységét alkotó lymphomyeloid sejtek kimutatása	22
7.3 A kloákaredő lymphoid szövetének ontogenezise	22
8. Eredmények megbeszélése.....	26
9. Következtetések	29
10. Összefoglaló.....	30
11. Summary	31
12. Hivatkozások.....	32

2. Rövidítések jegyzéke

- ABC - avidin-biotin peroxidáz komplex
- ABS - avidin-biotin complex
- BAFFR - B-cell activator of the TNF- α family receptor
- BM – basalis membrán (alaphártya)
- CD3 - cluster of differentiation 3
- CD4 - cluster of differentiation 4
- CD45 - cluster of differentiation 45
- CD8 - cluster of differentiation 8
- ChB6 - csirke B-limfocita allotípusos marker
- CSF1R - colony stimulating factor 1 tirozin kináz receptort
- DAPI - 4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride
- DAPI - 4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride
- DIA – diffusely infiltrated area
- E-cadherin – epithélium cadherin
- FAE – follikulus asszociált epithelium
- FAE - follikulus-asszociált hám
- GALT – Gut-associated lymphoid tissue/ madarak bélhez-asszociált szervei
- GC – centrum germinatívum/csíracentrum
- PBS - foszfáttal pufferelt sóoldat
- PFA - pufferelt paraformaldehid oldat
- SPF - Specific Pathogen Free
- TIM4 - T cell Ig and mucin domain-containing 4

3. Bevezetés

Az elmúlt 50 évben óriási mértékű fellendülés tapasztalható a világ baromfitartásában, mert a baromfitermékek egyre fontosabb szerepet töltenek be az élelmezésben. A magyar baromfiipar hangsúlyozott fontosságú a nemzetgazdaságban, döntő szerepet játszik a tojás- és hústermelésben egyaránt. A legnagyobb éves tojástermelés Kínára, míg a legnagyobb baromfi hús fogyasztás az USA-ra jellemző. Magyarországon, a 2021-es adatokat figyelembe véve, azt tapasztaljuk, hogy az évi tojástermelés 125 ezer tonna volt [1], ezzel egy időben a baromfihús termelés elérte az évi 552 ezer tonnát, és mindkét esetben az adatok növekvő tendenciát mutatnak [2].

A baromfiállományokat veszélyeztető vírusfertőzések napjainkban kiemelt odafigyelést igényelnek. Az immunszuppresszív vírusos betegségek súlyos mortalitást, gazdasági termelésekiesést okozva fenyegetik a baromfiipart. Sajnálatos módon nem lehet biztos pontossággal állítani, hogy ismerjük a madarak immunrendszerét, a nyirokszövetek karakterizálása nem teljes, s nem rendelkezünk tökéletes védelemmel a kórokozókkal szemben sem. Napjaink leginkább károsító vírusfertőzése például a Gumboro betegség, más néven csirkék fertőző bursitise, első lépésben súlyos elváltozásokat okoz a kloákához-asszociált bursa Fabriciiben, (madarakra jellemző primer nyirokszerv, ami a B sejtek éréséért és az antigénspecifikus ellenanyagrepertoár kialakulásáért felelős), majd immunszuppressziót okoz és következményesen, jelentős pusztítást eredményez a csirkeállományokban.

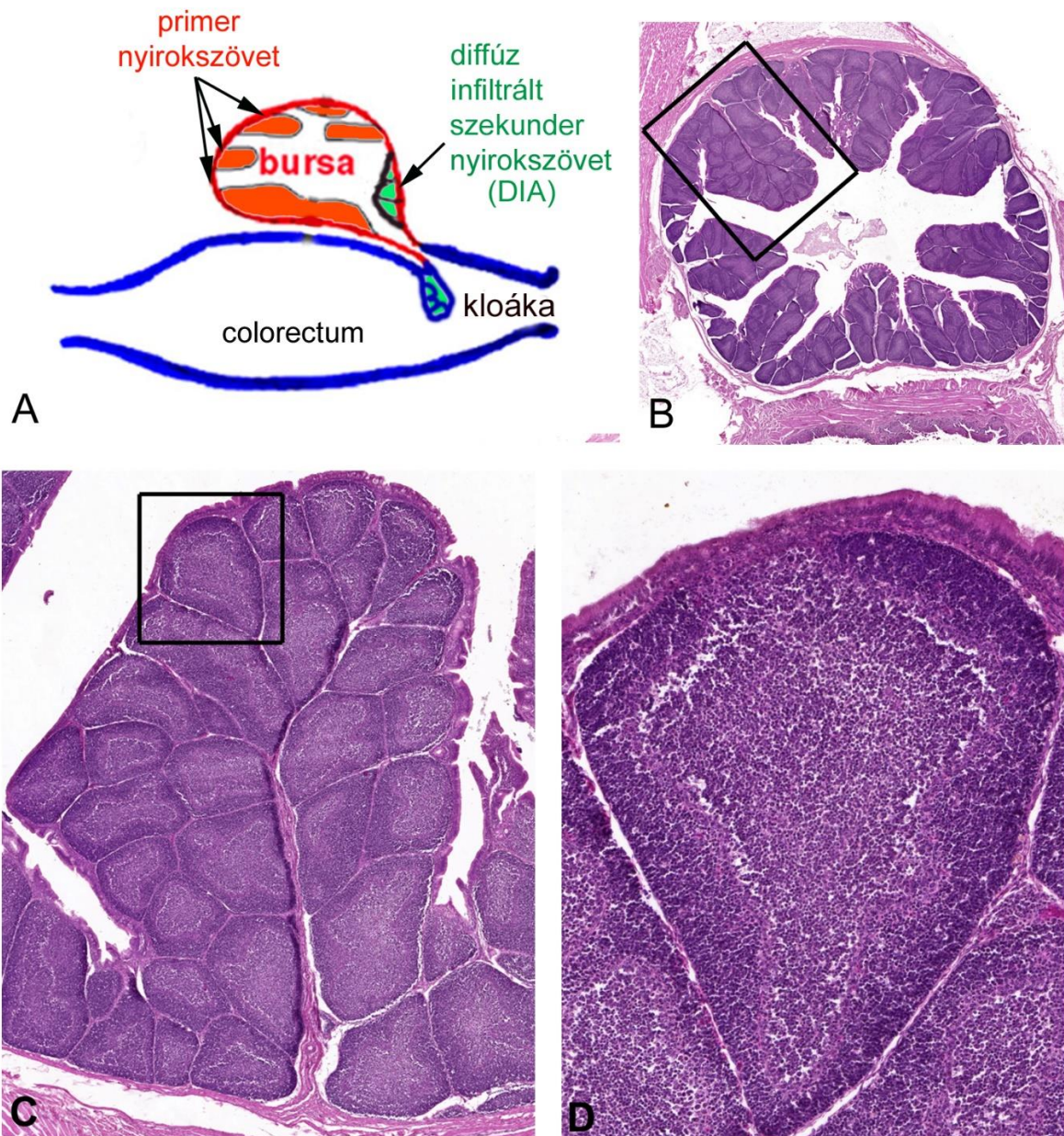
A baromfiipar fellendülésével egyidőben a csirke embriókat és a felnőtt házityúkot széles körben kezdték alkalmazni fejlődéstani, morfológiai és immunológiai kérdések tanulmányozására, mint például a hemo- és lymphopoiesis, a nyirokszervek organogenezise, vagy a normál és patológiás immunválasz kialakulásának vizsgálatára. A házityúk viszonylag olcsó és kísérleti célra könnyen hozzáférhető állat, ezért általánosan elfogadott, hogy a csirkék a szövettani, fejlődési és immunológiai vizsgálatok középpontjában állnak és elterjedté vált, hogy a „madár” immunológia és fejlődésbiológia a „csirke” fejlődésimmunológiát jelenti. Csirkékben a bursa Fabricii részletesen karakterizált primer nyirokszövet, de nincs megbízható szövettani és embriológiai adat a kloákában előforduló, antigénspecifikus immunválaszra képes szekunder nyirokszövetre. Dolgozatom kiemelt célja a kloákában kialakult nyirokszövetek bemutatása, morfológiai vizsgálata, részletes szövettani és immuncitokémiai karakterizálása.

4. Irodalmi áttekintés

4.1 A bursa Fabricii felfedezésének rövid története

A bursa Fabricii a madarakra jellemző nyirokszerv; fontos szerepe van a B sejtek érésében. Nevét felfedezőjéről, Hieronymus Fabricius-ról kapta. Hieronymus Fabricius, aki Girolamo Fabrici d'Acquapendente néven is ismert, 1533-1619 között élt Olaszországban, Padovában, ahol az ottani egyetemen az anatómia és sebészet professzoraként oktatott. Halála után, 1621-ben jelent meg részletes anatómiai és fejlődéstani műve, a „*De Formatione Ovi et Pulli*”. Ebben a könyvben olvashatunk először arról a szervről, amit később róla neveztek el, s amire csak úgy hivatkozik, mint a madarakra jellemző, kloáka üregével kapcsolatban álló zsákszerű szerv [3]. Fabricius úgy vélte, hogy ez a különös szerv a spermium tárolására szolgál, de tényleges funkciójára csak a 20. században derült fény. 1956-ban egy immunológiai laborgyakorlaton végzett kísérlet során Bruce Glick állatorvos sebészileg bursectomizált madarakat használt *Salmonella spp. O* antigén elleni ellenanyag termelés kísérletes bemutatására, amikor teljesen véletlenszerűen kiderült, hogy azon egyedek, amelyekből a bursát előzetesen eltávolították, nem képesek antigén-specifikus ellenanyagtermelésre [4]. Ezt követte Warner és Szenberg javaslata 1962-ben, miszerint a csirke immunrendszere funkcionálisan két részre különíthető el: thymus-, és a bursa Fabricii-vezérelt rendszerre. Ez a megállapítás hozta létre az immunitás disszociációs elméletét: a sejtközvetített immunválaszt a T (thymus eredetű) lymphocyták, az ellenanyag közvetítette immunválaszt pedig a B (bursa eredetű) lymphocyták végzik.

A csirke bursát ektodermális eredetű hengeres hám béleli, 8-10 hetes korban éri el maximális méretét, alakja dióra hasonlít. Az emlős thymushoz hasonlóan a csirke bursa Fabricii 6-7 hónapos korban involúción megy keresztül. A szervet kívül vékony simaizomréteg veszi körül. A bursa lument 15-20 hosszirányú redő tagolja, felszínét hengerhám borítja. Az egyes redők lamina propriaját folliculusok töltik ki, közöttük kötőszövetes septum húzódik, benne artériák, vénák, és nyirokrendszerek ágaznak el [5]. Az erek a folliculusok kéregállományában is előfordulnak (*1. ábra*).



1.ábra. Csirke kloáka, colorectum és bursa hossz-, illetve keresztmetszete. (A) Sémás rajz: A colorectum, kloáka és a bursa hosszmetsetének sémás rajza. (B) Hematoxylin-eozin festés: Bursa keresztmetszete: a lument 12-15 redő tagolja. (C) A bursa Fabricii egy teljes redőjekinagyítva a B kép bekeretezett területéről. A redőket follikulusok töltik ki. (D) Lymphoid follikulus kinagyítva a C kép bekeretezett területéről. A bursa follikulusokban, a kéreg és a velőállomány jól elkülöníthető. A follikulusokat interfollikuláris kötőszövetes septum választja el egymástól. Saját rajz és felvétel.

A bursa Fabricii funkciójának felfedezése elindította a bursa-ekvivalens szervek kutatását emlősökben [6]. Hisztológia és immunológia célú vizsgálatokkal a kutatók olyan szerveket kerestek, ahol B sejt korai érése zajlik. Így sikerül azonosítani a nyúl appendixét, juhokban az ilealis Peyer plakk-ot, valamint az emberben és a többi emlősben található csontvelőt, mint B sejtek érésében primer szerepet játszó szervek. Az intenzív kutatások azonban nem hoztak egyértelmű eredményt, az ekvivalens szervek csak részben egyeztek a bursával, legtöbb esetben a B sejtek korai differenciálódása nem izoláltan történik, mint a bursa Fabricii epithelium eredetű follikulusaiban, hanem a mesenchymális eredetű szöveti mikrokörnyezetben, a B sejtek érése egyidőben zajlik más lympho-myeloid sejtcsoportok mellett. A bélhez-asszociált nyirokszövetek karakterizálása során olyan szervek felfedezésére is sor került, amelyek a bursához hasonlóan a kloákához-asszociáltan fordulnak elő.

4.2 Kloáka-asszociált nyirokszervek előfordulása a gerincesekben

4.2.1 Hüllők

Részletesen hisztológiai adatok igazolták, hogy a hüllőknél is előfordul nyirokszövet a kloákában. A **Kaszpi víziteknős** (*Mauremys capsica*) esetében például a proctodeum lamina propria-ja jelentős lymphoid infiltrációt mutat, amely a bazális membrán közelében sűrűségét tekintve igen növekedett nyirokszöveti állománnyal rendelkezik. A lymphoid aggregátumok a kéreg és a medulla kötőszöveti területek között egyenletesen oszlottak el [7]. Az **Aligátor teknősre** (*Chelydra serpentina*) szintén jellemző a csirke bursájára hasonlító kloakális nyirokszerv előfordulása, amit először 1972-ben írtak le, mint a teknős kloákájának lamina propria területén számos, kis lymphocytából felépülő összesűrűsödés, ami gyakran annyira hangsúlyos volt, hogy a lamina propria duzzanatát okozta [8].

4.2.2 Emlősök

Emlős állatokban is találunk kloákához-asszociált nyirokszervekről említést. Az egyik ilyen emlős faj a **távol-keleti pézsmacickány** (*Suncus murinus*), ahol a madarakkal ellentétben nem vehetőek ki az elkülönült lymphoid follikulusok és interfollikuláris terek. Hasonló nehézséget

okoz a csíracentrumok elkülönítése is. Analis tonsilláknak nevezték el ezt a lymphoid aggregációt, mely jellemzően felnőtt állatokban található meg, lymphoid aggregátumokból és a lamina propria kötőszövetébe nyúló lympho-epitheliális kriptákból áll [9]. Egy másik emlős faj, ahol szintén leírtak kloakális nyirokszövet, a **palackorrú delfin** (*Tursiops truncatus*). A cickányokhoz hasonlóan a delfinek ezen csoportjában is fellelhető a lamina propriába nyúló mély epithelialis kripták. A nyirokszövet elnevezésére itt is az analis tonsilla megnevezést használták, úgy mint a távol-keleti pénzmacickányt vizsgáló tanulmányban. Az epithelialis kripták rendszerét sűrű lymphocita aggregáció határolja, amely igen hasonlított a szájüregi tonsillák szerkezetére is [10]; **(1.táblázat)**.

Állatfaj	Megjelenés formája	Leírója, felfedezés éve	Cikk
Kaszipi víziteknős (<i>Mauremys capsica</i>)	Lymphoid infiltráció a proctodeum lamina propriájában, közel a BM-hoz.	Zapata A, Solas MT, 1979	Gut-associated lymphoid tissue (GALT) in reptilia: structure of mucosal accumulations (p. 478)
Aligátorteknős (<i>Chelydra serpentina</i>)	Kloáka környékén számos kis lymphocytából álló aggregátum található a lamina propriában.	Borysenko M, Cooper EL, 1972	Lymphoid tissue in the snapping turtle, <i>Chelydra serpentina</i> (p. 489, fig. 14)
Távol-keleti pézsmacickány (<i>Suncus murinus</i>)	Analís tonsillák a felnőtt állatokban mély kriptákat és lymphoid csomókat tartalmaznak. Nem lehet jól elkülöníteni a folliculusokat, az interfollikuláris teret és a csíracentrumokat.	Kazuyoshi Sakai, Genzoh Isomura, Masanori Shinzato, Hideki Imada, Keiki Yamada, 2011	The Distribution of T Lymphocytes, B Lymphocytes, and Dendritic-Like Cells of the Anal Tonsil in the Laboratory Shrew, <i>Suncus Murinus</i> (p. 822)
Palackorrú delfin (<i>Tursiops truncatus</i>)	Analís tonsilla. A kriptákat sűrű lymphocytákkal állomány veszi körül. Tipikusan a szájpaddalási tonsilla sajátosságait hordozza.	Cowan DF, Smith TL, 1999	Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, <i>Tursiops truncatus</i> (p. 509)

1.táblázat. Kloáka-asszociált nyirokszervek előfordulása a gerincesekben. Állatfajok melyekben a szakirodalom említést tesz a kloákához asszociált lymphoid nyirokszövetről. Ezen állatfajok mindegyikében megtalálható a csirkéhez hasonló kloáka vagy annak egy változata és egy ahhoz társult, immunológiai szereppel bíró lymphoid szövet.

4.2.3 Madarak

A bursa Fabricii funkcionális alegysége a B lymphocytákkal feltöltött folliculusok jelenléte. Ez a szerv állandó összeköttetésben van a kloáka proctodeumával egy kivezetőcsövön keresztül

[11, 12]. 1979-ben Odend'hal & Breazile felfedezték, hogy a bursa Fabricii dorzális redőjében, közel a bursa kivezető csatornához a lamina propria nem tartalmaz primer bursa follikulusokat, hanem homogén szerkezetű lymphoid infiltrációt mutat. Erre a másodlagos nyirokszövetre emlékeztető területre a bursa Fabricii-vel ellentétben, nem jellemző az involúció, hanem amikor a bursa eltűnik, jellemzően a csirke 6 hónapos korában, az egységes szervet alkotó nyirokszövet egyesül a kloáka urodeális részével, s ezzel a későbbiekben egy egységes dorsalis lymphoid régiót képez a kloáka felszínén. Mivel a tunica propria kötőszövetét benépesítő limfociták nem rendeződnek follikulusokban ezt a területet diffúz lymphoid infiltrált területnek (DIA) nevezték el. A DIA csirkékben a kikelés után jelenik meg, és immuncitokémiai adatok szerint felvetődött az az elképzelés, hogy a DIA a madár bursa T-sejt-függő területe, mert primer follikulusokat nem tartalmaz, sok CD3 sejt fordul elő és a lamina propria kötőszövetébe beágyazódva csíracentrumok találhatók [13]. A DIA folytatásaként egy másik elkülönült szekunder lymphoid szövetet írtak le a bursa Fabricii dorsális redőjében. Ez a szövet a „perifériás redő” elnevezést kapta. Ebben a közleményben arról is beszámoltak, hogy a bursa Fabriciinek ez a területe is T-lymphocytákkal diffúzan infiltrált régiót tartalmaz.

5. Célkitűzések

A felnőtt csirke rectum-kloáka-bursa Fabricii régió paraffinos sorozatmetszésein előzetesen megfigyeltük, hogy a DIA-n és a perifériás redőn kívül, a bursa kivezető járatának ventrális része, specifikusan a colorectum felé tekintő kloákaredő is egy lymphoid szövetben gazdagon infiltrált terület. Ezt a hisztológiai képet korábban nem írták le, ezért a tudományos diákköri munkám kiemelt célja a kloákaredőben található nyirokszövet morfológiai (hisztológia, immuncitokémia, konfokális-, és elektronmikroszkópia) karakterizálása és ontogenezisének vizsgálata.

1. Munkám célja volt immuncitokémiai módszerekkel tanulmányozni a csirke kloákában található, lympho-myeloid sejtekkel gazdagon infiltrált terület részletes megismerése.
2. Ezen régióban található, különböző sejtek lokalizációja az adott szervben belül.
3. Feltárni azon kérdést, hogy ez a bizonyos lymphoid szövet ez kikelést követően, külső antigén hatásra alakul ki, vagy genetikailag determinált, vagyis minden kikelt csirkében előfordul, külső antigén hatástól függetlenül.

6. Anyag és módszer

6.1 Kísérleti állatok

Kísérleteim során SPF (Specific Pathogen Free) tojásból keltetett csirke embriókat és felnőtt állatokat használtam. Kísérleteinkhez White Leghorn típusú csirkéket kereskedelmi tenyésztőtől (Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.) szereztük be. A tojásokat laboratóriumi keltetőgépben (Heka Brutgerate, TS-7000C) inkubáltuk 21 napig, 37,7 °C-on. A kikelt madarakat a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet által fenntartott madárházban tartottuk.

6.2 Minták szövettani feldolgozása

6.2.1 Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése

A felnőtt állatokból (2-3 hónapos) és embriókból (14, 15, 16 napos embrió) a kloáka-bursa Fabricii szervkomplex együtt történő kipreparálást követően, a szerveket 4%-os puffertelt paraformaldehid oldatban (PFA) 3 órán keresztül fixáltam, majd ezt követte a háromszor 5 percre foszfáttal puffertelt sóoldatban (PBS; pH-7,2) való mosás. Ezt követő lépésben éjszaka, 4°C-on tartott, 15%-os szacharóz PBS oldatos áztatás következett. Másnap, a beágyazást megelőzően 1 órán keresztül tartó, 15% szacharózt és 7,5% zselatint tartalmazó PBS-ben inkubáltam a szerveket. Ez idő alatt a 37°C-os hőfokra melegített zselatint kis, műanyag tálkákba öntöttem. Miután szobahőn megdermedt a zselatin, a fixált szerveket, a zselatin felszínére helyeztem, néhány percre vártam, hogy a szervek megfelelően a zselatin ágyhoz tapadjanak, majd felöntöttem az egészet zselatinnal, annyira, hogy a szervek felszínét egységesen befedje. Ezek után 5 percre hagytam szilárdulni. 15-20 perc elteltével a zselatinos szövetblokkot 1x1 cm-es kockákra vágtam, amiket a feliratozott kartonpapírra helyeztem. Ezt követte a blokk lefagyasztása, mely folyékony nitrogénnel, -60°C-ra lehűtött izopentánban történt. A kész szövetblokkokat a felhasználásig -80°C-on tároltam.

6.2.2 Metszetek készítése

A szövetblokkok metszésére Shandon gyártmányú kriótómot használtam. A metszésre kész blokkok a kartonpapírról leválasztása után a kriótóban található metszettartóra ragasztottam Shandon Cryomatrix használatával. A zselatinos blokkok metszése -28°C-os munkahőmérsékleten történt. A metszés során a mintákból 12 µm vastag metszeteket készítettem, a metszeteket poly-L-lysine-el bevont tárgylemezre vettem fel. A kriometszeteket, mélyhűtőben, -20°C-on tároltam a felhasználásig.

6.3 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

6.3.1 Immunhisztokémia

A laboratóriumban általánosan használt lépéseknek megfelelően a kiválasztott, előzőekben fagyasztott zselatinos metszeteket első lépésként 10 percig rehidráltam 37°C-ra felmelegített PBS oldatban, hogy a zselatint kioldjam. Ezt követően a rehidrált metszeteket körültöröltem egy papírvattával, ezzel megakadályozva a következő lépésben felkerülő ellenanyagok keveredését. Emellett javasolt a metszeteket körbekarcolni egy erre alkalmas gyémántceruzával is, ezzel szintén megakadályozzuk az ellenanyagok keveredését, mivel egy tárgylemezen jellemzően 2-3 minta is található, ezzel megelőzzük a hibás, esetenként értelmetlen eredmények létrejöttét. A következő lépésben rámértem a metszetekre a primer ellenanyagot (50-80 µl/metszet), mely vagy előzetesen betitrált hígítású ellenanyagoldat, vagy egy monoklonális ellenanyagot tartalmazó, hígítatlan sejttenyészet felülúszója volt. Ennek megfelelően a kívánt hígításokat 1%-os BSA-t tartalmazó PBS-ben (PBS-BSA) oldatban végeztem. A primer ellenanyaggal fedett metszeteket 45 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, nedves kamrában, amelyet (3x5 perc) PBS-ben való mosás követett. A követő lépésben a PBS-BSA-ban (1:200 arányban) kihígított, biotinilált, a primer ellenanyagnak megfelelő állatfajú és izotípusú szekunder ellenanyagot vittem fel a metszetekre, és tovább inkubáltam a metszeteket 45 percig (nedves kamrában és szobahőmérsékleten). Az inkubálást 3x5 perc PBS-ben való mosás követte. Ezután következett a metszetek PBS-el 3%-ra

hígított H_2O_2 -ba (Molar Chemicals, 03650-101-340) helyezése 10 percre, ezzel hozzájárulva a szöveti endogén peroxidáz blokkolásához. A reakcióidő eltelte után a lemezeket 3x5 perc PBS-ben mostam. A kellő mosás elvégezte után az előzőekben összeállított, 1:200 arányú PBS-ben hígított, majd fél órát állni hagyott avidin-biotin peroxidáz komplexet (ABC; Vectastain Elite PK-6100; Vector Laboratories) pipettáztam a metszetekre, és így fél órát inkubáltam a lemezeket a nedves kamrában szobahőmérsékleten. Ezzel egyidejűleg összeállítottam a kloronaftol törzsoldatot: 100 μl kloronaftol törzsoldat 100 ml PBS-ben oldva, majd ezt sötétben, mágneses keverőn legalább fél órát kevertettem. Felhasználás előtt az elkészült oldatot szűrőpapíron átszűrtem és 3%-os H_2O_2 (500 μl) oldatot (Sigma, 88597-100ML-F) adtam hozzá. Az avidin-biotin komplex ABC-vel történő inkubációs idő elteltével újból PBS-ben mostam. A háromszori PBS mosás után, az előhívás kloronaftolos oldat segítségével (30 percen át, sötétben történő, szövettani küvettába helyezve) történt. Ez idő alatt a peroxidáz enzim katalizáló hatására sötétkék kromogén csapadék képződik az ellenanyag kötődésének helyén. Végezetül az utolsó mosást (PBS-ben 3x5 perc) követően a metszeteket vízdékony lefedőanyaggal (Mowiol, Sigma, 81381-250G) fedtem le, majd 4°C -on tároltam a felhasználásig.

6.3.2 Egyszeres immunfluoreszcens festés

A folyamat a metszetek rehidráálásával történik, hasonlóan a fent leírtakhoz. Első lépésként 10 percig meleg PBS-t tartalmazó szövettani küvettába helyeztem a metszeteket. Ezt követte a primer ellenanyag, mely 1 órán keresztül fejtette ki a hatását a nedves kamrában szobahőmérsékleten. A 3x5 perc mosást követte az előzőekben kihígított szekunder ellenanyag (50-80 μl /metszet) mérése a metszetekre; ez lehetett biotinilált vagy közvetlenül fluorokrommal konjugált antitest. Az inkubálás 45 percig, szobahőn, fénytől védett, nedves kamrában történt. A továbbiakban újból 3x5 perc mosáson estek át a metszetek, majd a sejtmagok kimutatására DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride) reagenst használtam, 15 perces inkubálási idővel. Végezetül pedig az utolsó 3x5 perces PBS mosást követően a metszeteimet vízdékony lefedővel (Mowiol) fedtem le és a felhasználásig a metszeteket sötétben 4°C -on tároltam.

6.3.3 Kettős immunfluoreszcens festés

Kettős immunfluoreszcens festést akkor alkalmazunk, ha szeretnénk összehasonlítani a különböző molekulák expressziójának mértékét ugyanazon a szövettani metszeten. A kettős immuncitokémiai festés alapja, hogy két különböző állatfajú és/vagy izotípusú primer ellenanyagot használok (**2.táblázat**), és a primer ellenanyagnak megfelelő állatfajú és izotípusú, fluorokrommal konjugált szekunder ellenanyaggal hívom elő (**3.táblázat**). Hasonlóan az immunhisztokémiai festésnél leírtaknál, itt is a kezdő lépés a metszetek rehidrálása megfelelő hőfokra felmelegített PBS-ban (3x5 perc). Ezután primer ellenanyagot mértem a metszetekre, mérettől függően, más és más mennyiségben (50-80 µl/metszet), majd 1 órát hagytam inkubálódni a metszeteket, nedves kamrában, szobahőmérsékleten. A primer ellenanyagot PBS-BSA-ban hígítottam. Az inkubációs idő eltelte után a metszetek újból 3x5 perces PBS-ben mostam, majd rámértem a primer ellenanyagnak megfelelő izotípusú és állatfajú fluorokrommal konjugált szekunder ellenanyagot, melyet 1:200 arányban hígítottam PBS-ben. Így inkubáltam további 45 percet nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Az inkubálás után PBS-ben mostam (3x5 perc). Ezután vittem fel a második primer ellenanyagot a metszetekre, amellyel újból 1 órát hagytam inkubálódni a metszeteket, majd ezt követte a 3x5 perc PBS-ben való mosás. A második szekunder ellenanyag ráhelyezésénél figyelni kellett arra, hogy a második primernek megfelelő állatfajú és izotípusú legyen, de ugyanakkor arra is figyelni kellett, hogy az adott szekunder ellenanyag eltérjen az előzőekben használt szekunder ellenanyagtól. Az inkubációs idő, hasonlóan az előzőhöz, itt is 45 perc volt, amit szintén 3x5 perc PBS-ben való mosás követett. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride) reagenst használtam, 15 perces inkubálási idővel, szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Mosás után (PBS-ben, 3x5 perc) a metszeteket vízzoldékony lefedővel (Mowiol) fedtem le, majd hűtőben 4°C-on tároltam, annak felhasználásáig.

6.4 Felhasznált ellenanyagok

2.táblázat. Felhasznált primer ellenanyagok listája

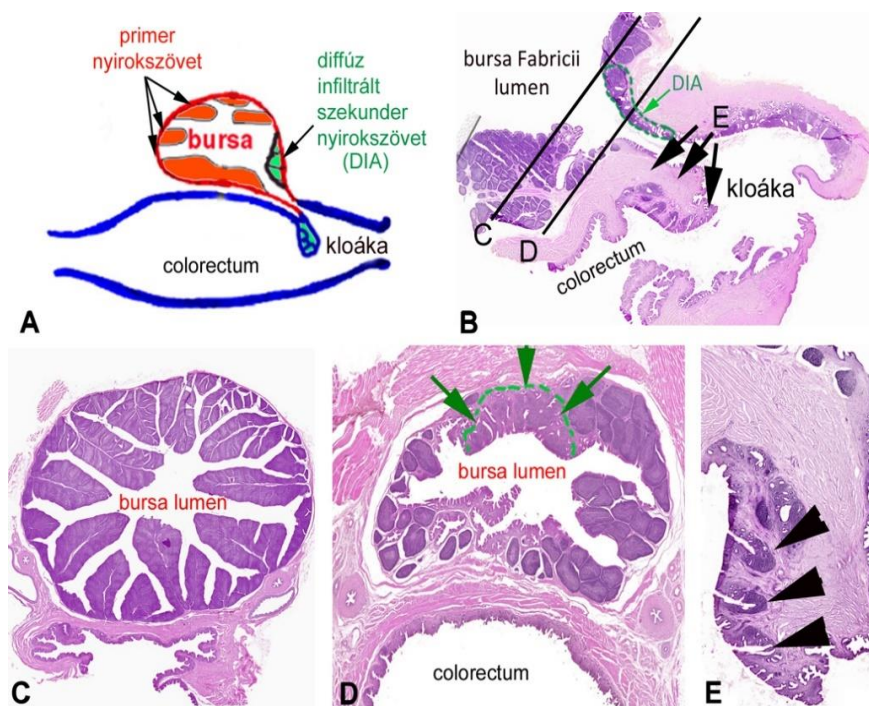
Primer ellenanyagok	Klón neve	Hígítás	Cég/ Származás	Izotípus
CD45	Hisc7	1:200	Pronics	egér IgG _{2A}
chB6	BoA1	felülúszó	Igyarto és mtsai, 2008	egér IgG ₁
CSF1R	ROS-AV170	1:50	Roslin Institute, UK, Bio-Rad	egér IgG ₁
TIM4	ROS-JH9	1:1000	Roslin Institute, UK, Bio-Rad	egér IgG ₁
E-cadherin	36	1:30	BD Bioscience	egér IgG _{2a}
CD4	CT4	1:2	Dr Sonja Hartle, München, Bio-Rad	egér IgG _{2a}
Kollagén III	3B2	1:10	DSHB, Iowa, USA	egér IgG ₁
BAFFR	2C4	1:100	Dr Sonja Hartle, München, Bio-Rad	egér IgG ₁

3.táblázat. Felhasznált szekunder ellenanyagok listája

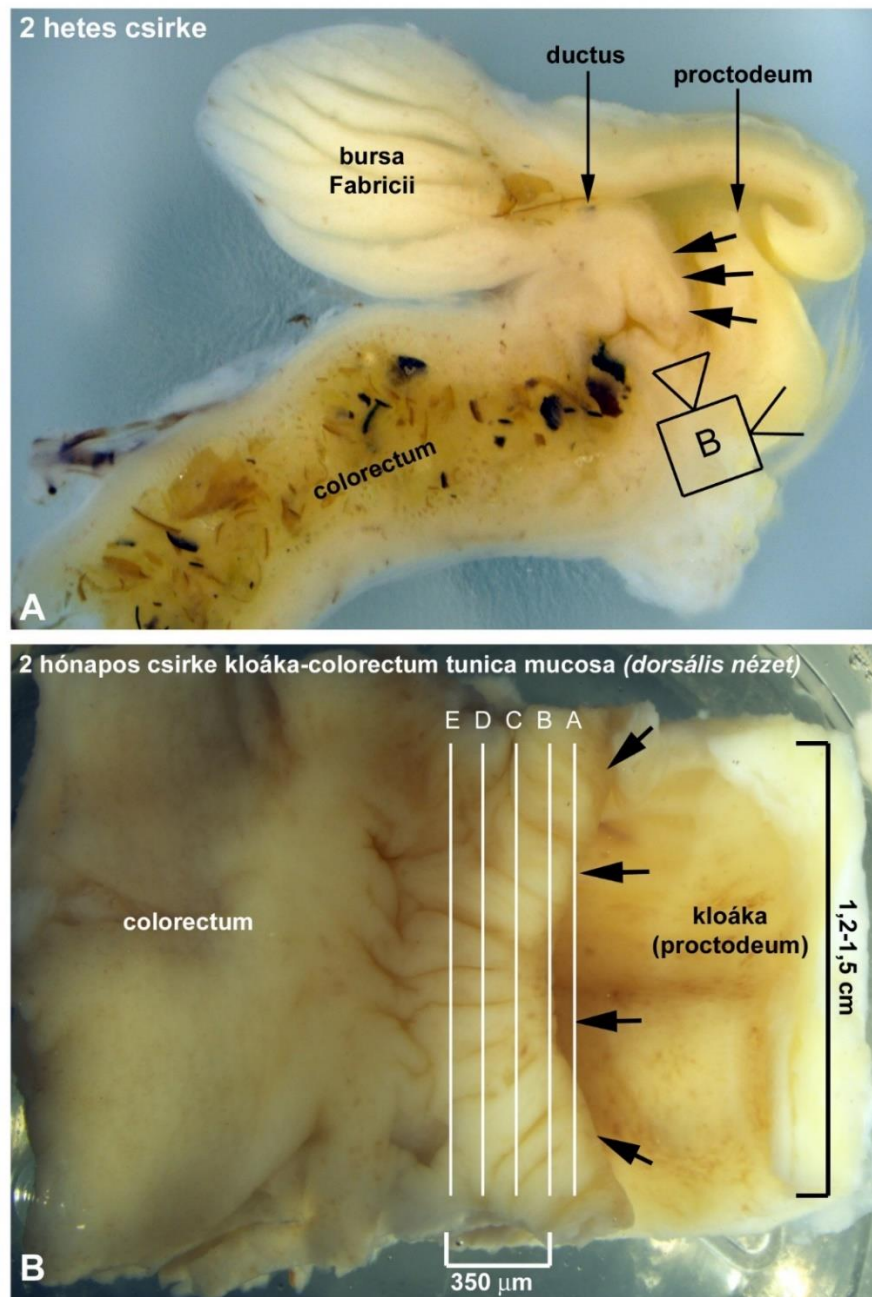
Szekunder ellenanyag	Cég/Származás	Katalógusszám
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG ₁	Invitrogen	A21121
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG _{2A}	Invitrogen	A21131
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG	Invitrogen	A21202
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG	Invitrogen	A11005
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG ₁	Invitrogen	A21125
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG _{2A}	Invitrogen	A21135
biotinilált anti-egér IgG (H+L)	Vector	BA-9200

7. Eredmények

Kísérletes munkám első lépésében a felnőtt, 3 hónapos csirke kloáka régiójának sagittális és keresztmetszéseit végeztem el (**2. ábra**), hogy az általános szöveti felépítést hematoxylin-eozin festett metszeteken megvizsgáljam. Sagittális metszeteken a bursa Fabricii, a kivezetőcső, a kloáka ürege és a colorectum distalis szakasza látható (**2.B ábra**). A nyilakkal jelölt terület a kivezetőcső kloáka felé néző részét jelöli. A bursa Fabricii lumenét redők tagolják, a redőket primer lymphoid follikulusok töltik ki amelyek kéreg és velőállományból állnak (**2.C ábra**) [14]. A bursa Fabricii kivezetőcsöve a kloákával közlekedik. Keresztmetszetében kirajzolódik a dorzális helyzetű szekunder nyirokszövet, a diffúz lymphoid szövettel infiltrált terület (DIA). A 2D ábra metszési magasságát a 2B ábrán D-vel jelölt vonal mutatja. A DIA területét nyilak és szaggatott vonal emelik ki. A colorectum és a kloáka határán nyálkahártyaredőt figyelhetünk meg (**2.E ábra; 3.A ábra**). Ennek a redőnek a colorectum felé tekintő oldalán másodlagos nyirokszervre jellemző szövet látható. Nyílhegyek 3 kifejezett kriptát mutatnak, ami körül lymphoid szövet koncentrálnodik. Két-három hónapos csirkében a kloáka lumenébe behajló bursa kivezető csövéhez tartozó 1,2-1,5 cm széles redő közel 350-400 micron magasságú (**3.B ábra**).



2. ábra. Csirke kloáka, colorectum és bursa hossz-, illetve keresztmetszete. (A) A colorectum, kloáka és bursa hosszmetztetének sémás rajza. (B) Sagittális metszet. Hematoxylin-eozin festés: a zöld nyilak a kivezetőcső kloákába nyíló részét jelölik. (C) Bursa Fabricii keresztmetszet. (D) Szekunder nyirokszövet a bursa kivezető járatától dorzálisan (DIA, zöld nyilak). (E) Szekunder nyirokszövet a bursa kivezető járatától ventrális helyzetű nyálkahártyaredőben (fekete nyílhegyek). A fekete nyílhegyek a redő lymphoid szövetét mutatják. (saját rajz és felvétel).

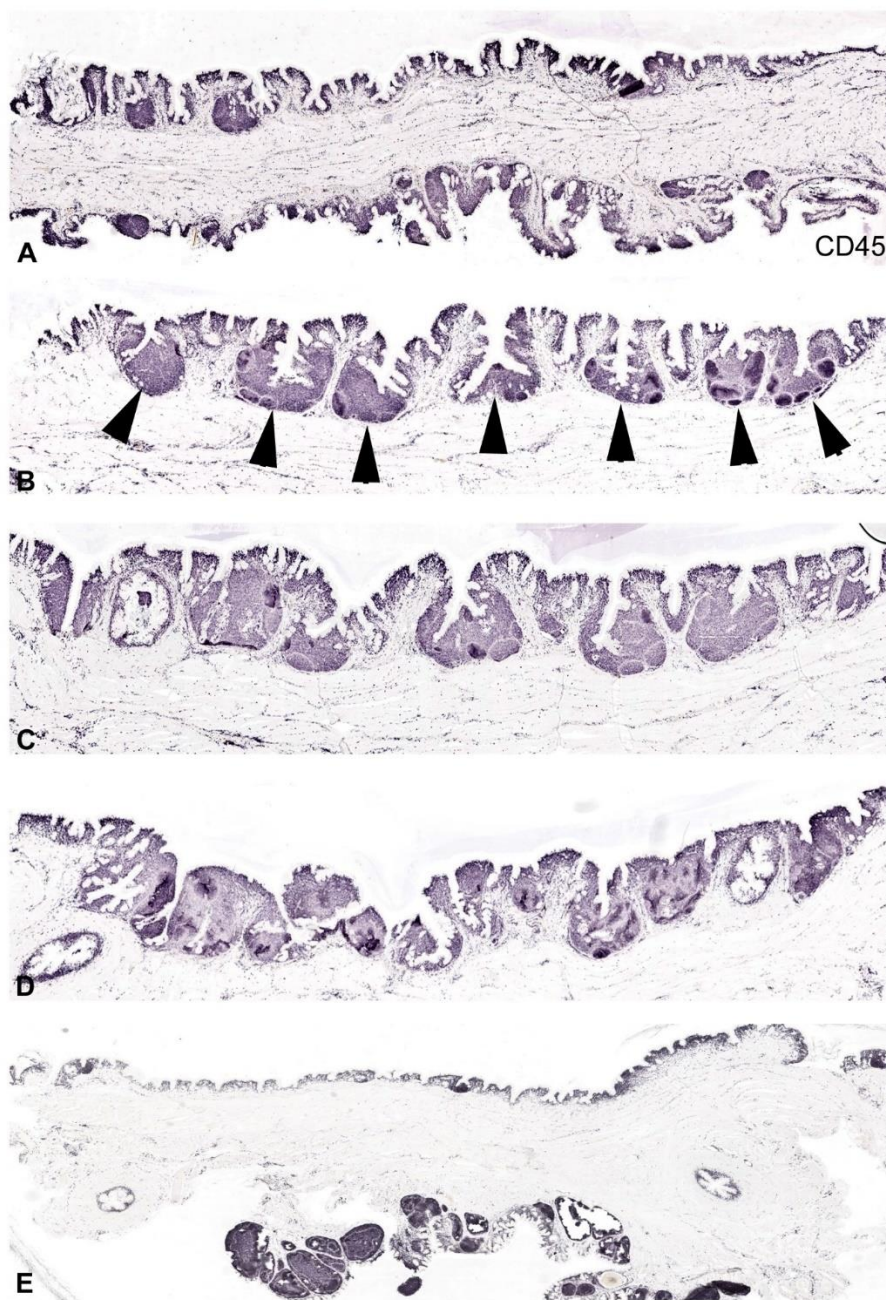


3. ábra. Csirke kloáka, colorectum és bursa hossz-, illetve horizontális síkban metszett sztereomikroszkópos képe. (A) 2 hetes csirke colorectum, kloáka és bursa hosszmetasztetének sztereomikroszkópos képe. Jól látszik a proctodeumba nyíló kivezetőcső (ductus bursalis), mely a bursa lumenével létesít kapcsolatot. A colorectum és proctodeum határát képző redőt nyilak jelzik. A „B” betűvel jelzett kamerát ábrázoló sémás szimbólum a B képen 2 hónapos csirkében hasonló terület kinagyított felvételét mutatja. (B) Csirke kloáka horizontális metszete, ventrális nézetből, a bursa eltávolítása után. A nyilak a colorectum és kloáka proctodeum szakaszának határán található redőt mutatják. Fehér vonalak a sorozatmetszetek szintjét jelölik, amelyek a 4.Ábrán láthatók.

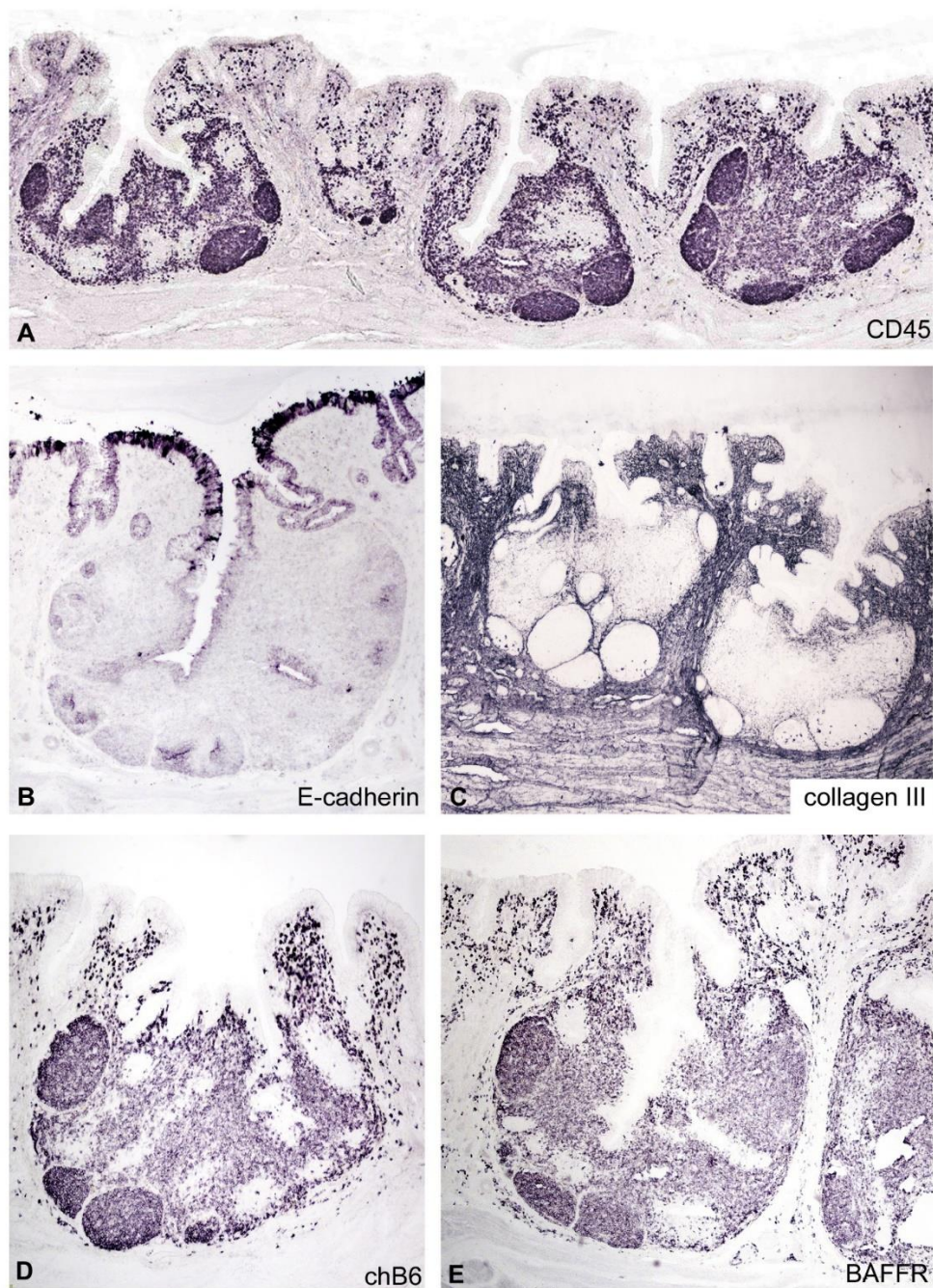
7.1 A kloákaredő lymphoid szövetének jellemzése immuncitokémiai módszerekkel

A kloákaredő nyirokszövetének jellemzését közös leukocyta marker (CD45), B sejt, T sejt, makrofág és dendritikus sejtekre specifikus ellenanyagokkal, immuncitokémiai módszerekkel karakterizáltam. Az immunfestéseket sorozatmetszeteken végeztem el. A kloáka redő apikális síkjában készült metszetben kevés CD45+ sejt fordul elő (**4.A ábra**). A mélyebb rétegek felé haladva egyre hangsúlyosabb a CD45+ sejtek jelenléte (**4.B, C, D ábra**). A felszíni hám a lamina propria mélyebb rétegeibe nyúlik, a CD45+ sejtek pedig az epitheliális kripták körül csoportosulnak. A kripták főképp a redő apikális és középső részére jellemzőek, a basalis régióban már nem találjuk ezt az elrendeződést, elszórta. Az apikális régióhoz hasonlóan itt is kevés CD45+ sejt fordul elő a hám alatti kötőszövetes térben (**4.E ábra**). A CD45+ sejtek csoportosulása tonsilláris egységekre hasonlító morfológiát mutatnak (**5.A ábra**) és számos kisebb-, nagyobb csíracentrumot tartalmaznak. A metszési síktól függően változó nagyságú és alakú csíracentrumok állományában egy sötétebb, sejtdúsabb, lymphocytákban gazdag (**5. ábra**) perifériás rész (köpeny) és egy világosabb, sejtsegegysebb, elsősorban lymphoblastokat tartalmazó centrális rész (centrum germinatívum) különíthető el. Az E-cadherin expresszió a luminális felszínt és a tonsilláris egységbe benövő hámsejtekre jellemző, mely a felszínről a mélyebb rétegekbe hatolva rajzolja ki az epithelium kriptás elrendeződést. E-cadherin a hámsejtek membránját jelöli, a felszínt borító folliculus-asszociált hám (FAE) erőteljesebb megjelenést mutat (**5.B ábra**). A tonsilláris egységeket kötőszövetes septumok választják el, melyek I-es és III. típusú kollagénben gazdag extracelluláris mátrixból állnak (**5.C ábra**).

B-lymphocyták szelektív kimutatására szintén immuncitokémiai festést alkalmaztam, ahol csirke B sejtmembrán molekuláira specifikus monoklonális ellenanyagokat (anti-BAFFR, anti-chB6) használtam. BAFFR (B-cell activator of the TNF- α family receptor) túlélést szabályozó fehérje és jellemzően a B-lymphocyták felszínén található meg [15]. Továbbá, a közelmúltban azonosították az emlős B sejt aktivátor (BAFF) csirke homológját (chBAFF) is, melyről bizonyított, hogy fontos szerepet játszik a madarak B-sejt fejlődésében [16]. A csíracentrumok közötti területen, az ún. parafollikuláris zónában, a retikuláris váz hézagaiban nagy számban B-lymphocyták csoportosulnak, de kiemelten a centrum germinatívumban vannak chB6 és BAFFR+ sejtek (**5.D, E ábra**).



4. ábra. A kloákaredő sorozatmetszetének CD45 immunfestése. A 3. Ábra mutatja a metszetek síkját és magasságát. (A) A redő apikális részében diffúz CD45 immunreaktivitás figyelhető meg. Középen simaizom található, felső széle a colorectum felé tekintő oldalt mutatja, alsó széle a bursa kivezetőcsövét határolja ventrálisan. (B) A redő felső negyedéből készült metszet kifejezett szekunder nyirokszövetre jellemző szerkezetet mutat. A felszíni hámból 7-8 kripta nyomul a kötőszövet irányába és tonsillaris egységekre (nyílhegyek) tagolja a lamina propriat. (C,D), Tonsillaris egységek a redő középső és alsó negyedében is jelen vannak. (E) A redő basalis részéből hiányzik a nyirokszövet.



5.ábra. Csirke kloakaredőjét alkotó nyirokszövet karakterizálása (A) A kloákaredőt alkotó 3 follikuláris egységről készített nagyított felvétel. CD45 immuncitokémia. A kripta epitheliuma elágazik, körülötte diffúz és csíracentrumokba gyűlt leukocyták csoportosulnak. (B) E-cadherin a hámsejteket jelöli. A nyirokszövetbe benyúló hám gyengébb immunreakciót mutat. (C) A tonsillaris egységeket III-as típusú collagénben gazdag kötőszövetes septumok választják el egymástól. (D, E) chB6 és BAFFR specifikus ellenanyagok a differenciált B sejteket jelölik. B sejtek többsége a csíracentrumokban koncentrálódik.

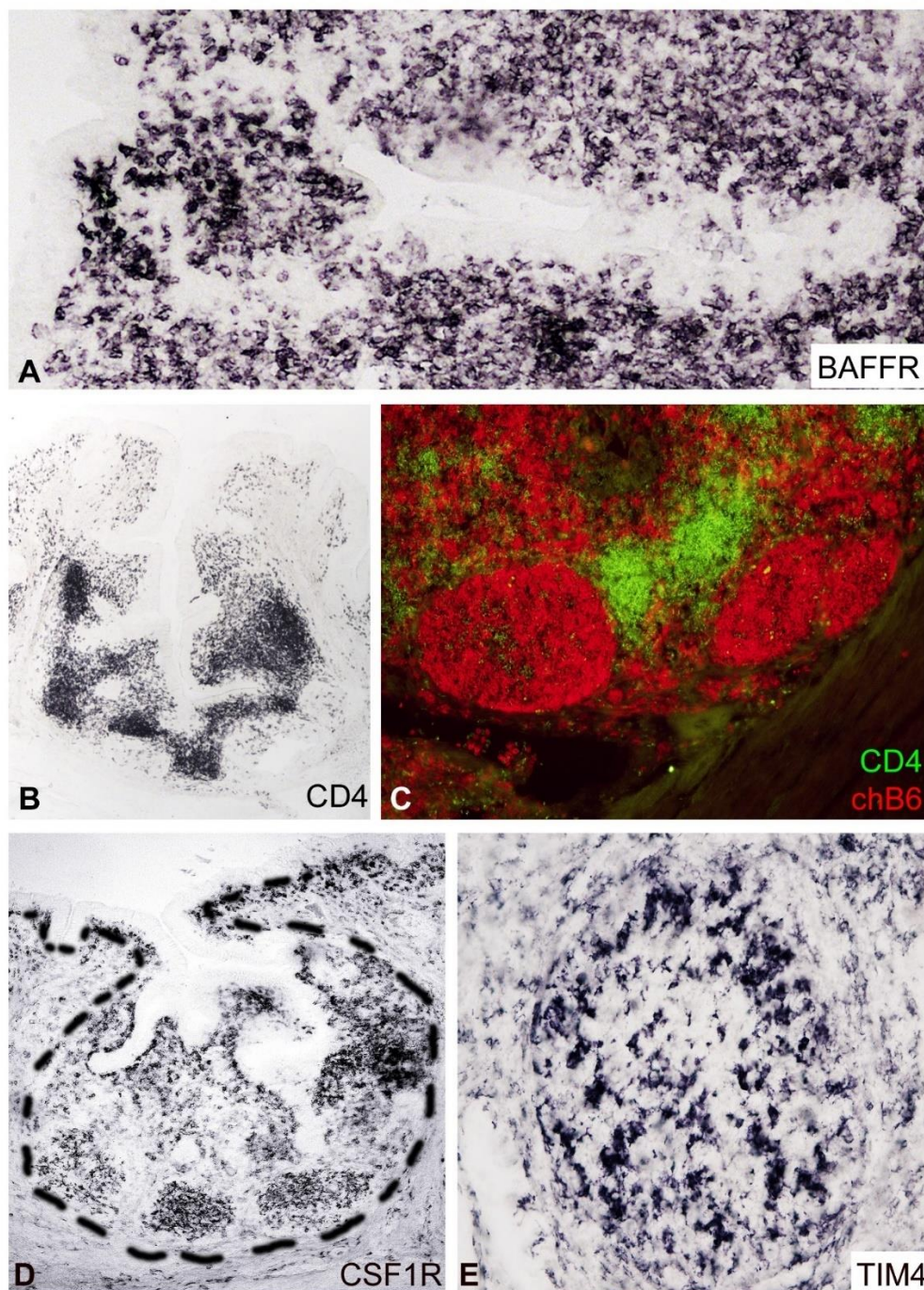
7.2 A kloákaredő tonsillaris egységét alkotó lympho-myeloid sejtek kimutatása

BAFFR+ B sejtek nemcsak a csíracentrumokban, hanem nagy számban a felszíni epitheliumban is előfordulnak, ahol az infiltrált hámot lympho-epithelialis szövetté alakítják (**6.A ábra**). Madarakban az emlősökhöz hasonlóan a T lymphocytaikat CD3, CD4, CD8 immunfestésük alapján tudjuk megkülönböztetni. A CD4 (cluster of differentiation 4), mely a helper T-sejtek felszínén található csíracentrumok között elterülő az interfollikuláris teret töltik ki (**6.B, C ábra**). Lymphoid sejtek mellett, TIM4 (T cell Ig and mucin domain-containing 4) – foszfatidilszerin receptort kifejező makrofágok és CSF1R (colony stimulating factor 1 tirozin kináz receptort) immunreaktív dendritikus sejtek (**6.D, E ábra**) jellemzik a csíracentrumokat [17]. Makrofágok a csíracentrumokon kívül, a kötőszövetben elszórtan is előfordulnak. A csíracentrumok alapvázát dezmin és vimentin pozitív retikulum sejtek alkotják (**7.A, B ábra**). A vimentin intermediér filamentum az IgY immunreaktív follikuláris dendritikus sejtekben is kifejeződik (**7.B ábra**).

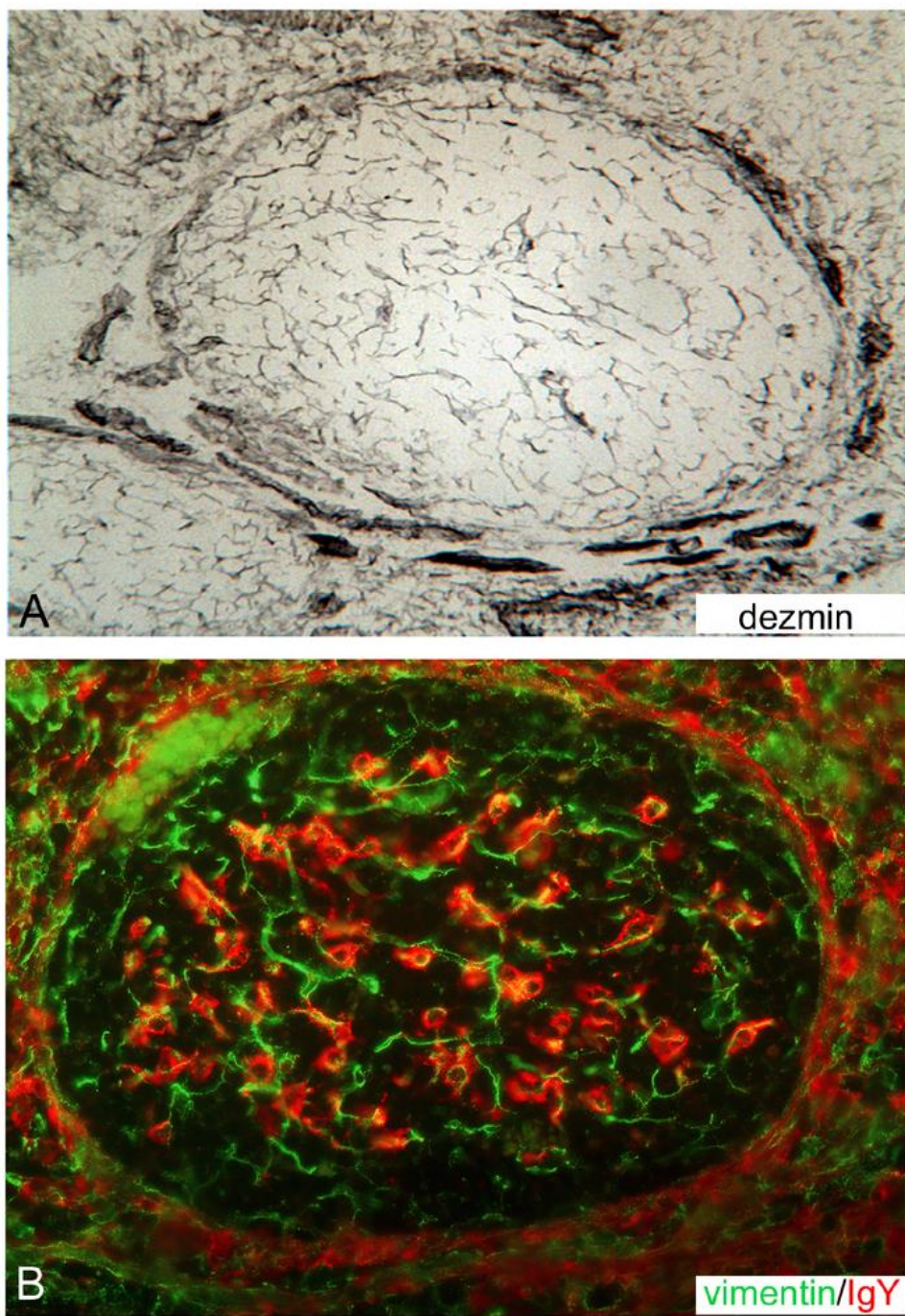
7.3 A kloákaredő lymphoid szövetének ontogenezise

A különböző lymphoid szerveket, mint például: bursa Fabricii, thymus, vagy a másodlagos nyirokszervek: csontvelő, lép, nyirokcsomók kezdeményét eltérő fejlődési időpontokban myeloid és lymphoid prekursor sejtek kolonizálják. A bevándorló prekursorok a dorsalis mesenteriumban megjelenő, úgynevezett para-aortikus vérképző (hemopoetikus) sejtekből származnak [18].

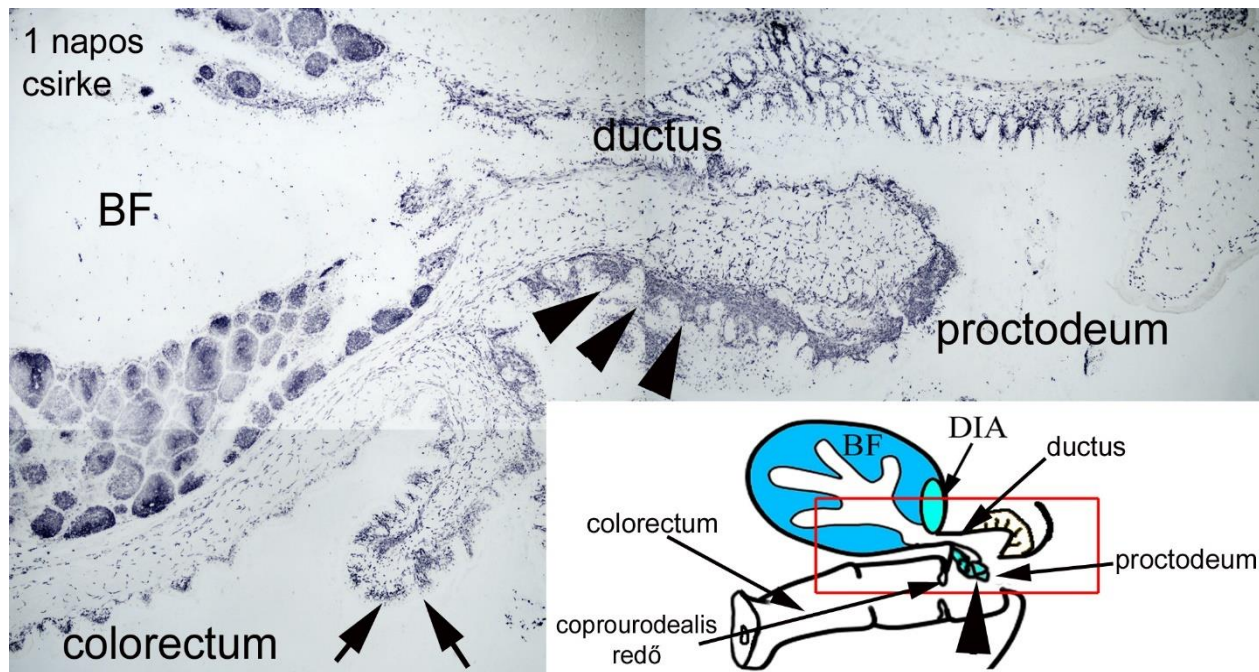
Kísérletes munkám második részében a kloákaredő embryonális fejlődése és a már kikelt csirke közötti stádiumot vizsgáltam. A bursa Fabricii primer telepének megjelenése az embryonális fejlődés 5-7. napján veszi kezdetét. A szerv legfőbb sejtípusa a B-lymphocyta, amely az aorta vérképző helyeiről érkezik és a teljes sejtes állomány 98%-át alkotja. Kloáka redő hemopoetikus és lymphoid infiltrációját a 18 napos embrióban figyeltük meg először. Három nappal később, a 0 napos csirke (kikelt állat) kloáka sagittális metszetén jól kivehető a nagyszámú CD45 immunreaktív sejt polarizált akkumulációja a redő colorectum felé tekintő felének lamina propria szövetében (**8. ábra**).



6.ábra. lympho-myeloid sejtek a kloákaredő tonsillaris egységeiben. (A) BAFF-R⁺ B sejtek a kripták epitheliumot intenzíven infiltrálják. (B) CD4⁺ T sejtek eloszlása az interfollikuláris területen. (C) CD4/chB6 kettős immunfluoreszcencia a B és T sejtek eloszlási mintázatát mutatják. (D) Szaggatott vonal a tonsillaris egység határát jelöli. CSF1R⁺ dendritikus sejtek és makrofágok a csíracentrumokban és az interfollikuláris térben egyaránt nagy számban előfordulnak. (E) TIM4 immunreaktivitás a csíracentrumok makrofágjait emeli ki.



7.ábra. Retikulum sejtek a csíracentrumban. (A) dezmin+ retikulum sejtek a csíracentrum alapvázát képezik. (B) A retikulum sejtek vimentint expresszálnak (zöld). Szintén a vimentin fejeződik ki a follikuláris dendritikus sejtekben, amelyek felszínén IgY kötődik meg (piros).



8.ábra. 1 napos csirke bursa-kloáka komplexének sagittális metszete. CD45 immunfestés. A jobb alsó sarokban látható sémás rajz bekeretezett része (piros keret) az immunfestett metszet struktúráit szemlélteti. A proctodeumba nyíló bursa kivezető járatától ventrálisan találjuk a kloakális redőt, melynek a colorectum fele tekintő részében az embrionálisan megjelent lymphomyeloid infiltrációt mutatja (nyílhegyek).

8. Eredmények megbeszélése

A madarak bélhez-asszociált nyirokszövede diffúzan elszórt lymphoid infiltráció vagy csíracentrumokat is tartalmazó nyirokszervekből áll. Ez utóbbihoz olyan szervek tartoznak, mint az esophagus tonsilla, pylorus tonsilla, Meckel divertikulum, Peyer plakk vagy a coecalis tonsilla[19]. Tudományos diákkörös munkám legfőbb eredménye egy új bélhez-asszociált nyirokszerv leírása, amit kloáka tonsillának nevezünk el. Ezt a szervet korábban nem tanulmányozták. Feltételezem, hogy a korábbi publikációk, ahol a kloáka lymphoid állományát vizsgálták azért nem tulajdonítottak jelentőséget a bursa Fabricii kivezetőcsövének ventrális, kloáka felé tekintő redőjében elforduló nyirokszövetnek, mert vagy nem megfelelő sorozatmetszetekben tanulmányozták, vagy kicsi, változó, jelentéktelen lymphoid szövetnek gondolták. Ennek a lymphoid szövetnek a helye azonban nemcsak anatómiailag jól meghatározott, hanem már az embriogenezis késői stádiumában idején fejlődésnek indul; ezért egy olyan állandó nyirokszövet, mint az esophagus-, vagy a coecalis tonsilla, amit mi a kloákában való jelenléte miatt, kloáka tonsillának nevezünk el.

A tonsillák és a Peyer plakkok a bélhez-asszociált nyirokszervek (GALT, gut-associated lymphoid tissue) a béltraktus jellegzetes szekunder nyirokszervei, amelyek között jelentős hisztológiai különbségek, eltérő sejtes felépítés figyelhető meg. Lokalizációját tekintve a tonsillák a garat régióban helyezkednek el és részt vesznek a Waldeyer-féle lymphatikus gyűrű képzésében, ide tartoznak a szájpadi tonsillák, a fülkürti tonsillák, a tonsilla pharyngea, illetve a tonsilla lingualis, amely a nyelv gyökénél található. A tonsillák többszörös lymphoid follikulussal rendelkeznek, amik csíracentrumból és azt körülvevő diffúz lymphoid szövetből állnak. A tonsillák felszínét többrétegű laphám fedi, vagy többmagsoros csillós hengerhám borítja. Továbbá, felszínükön mély epitheliális behúzóadásokat találunk, amelyeket kriptáknak neveznek. A csíracentrumok kiemelten B lymphocytákból állnak, a T lymphocyták viszont az interfollikuláris részen jellemzőek. Makrofágok, dendritikus sejtek és más antigen prezentáló sejtek szintén megtalálhatók és segítik az immunválasz kialakulását. A funkciójukat tekintve a tonsillák az elsődleges védelmi vonalat képviselik a szervezetbe bejutó kórokozókkal szemben és részt vesznek mind a helyi, mind az egész szervezetet érintő immunválasz kialakításában [20].

A tonsillákkal ellentétben, a Peyer plakkok a vékonybélben (ileum szakasz) a mucosában, illetve a submucosában találhatók. Szöveti struktúráját tekintve itt jellemző a follikuláris felépítés,

de a tonsilláktól eltérően, a Peyer plakkok egy speciális hengerhám borítással rendelkeznek, amik M sejtekből állnak, kripták nélkül. A Peyer plakkok folliculusai gazdagon átszőtt B lymphocytákból állnak, amelyek különösen a csíracentrumban helyezkednek el, és az azt körülvevő interfollikuláris teret kitöltő T lymphocytákból állnak. Hisztológiai és immuncitokémiai tulajdonságai alapján a kloákaredőben azonosított nyirokszövet a tonsillák szövettani szerkezetét (kötőszövetes egységek, epitheliális kripa) mutatja.

Korábban laboratóriumunk leírt két tonsillát madarakban, egyiket a mirigyes gyomor (proventriculus) előtt (esophagus tonsilla; [21]) és másikat a zúzógyomor után (pylorus tonsilla; [22]). A kloáka tonsillával együtt ez azt sugallja, hogy a madarak bélrendszerének cranialis és caudalis vége egyaránt immunológiai szempontból egy privilegizált terület lehet. Fontos megjegyezni, hogy emlősökkel ellentétben, a madarak pharyngealis régiójában nincsenek elkülönült lingualis, pharyngealis vagy szájpad tonsillák. Ritka kivételt képeznek ez alól az emuk és a struccok, ahol leírtak pharyngealis tonsillákat [23], illetve a pulykák esetében a tonsilla tubalis, ahol a torus tubarius közelében, az infundibulum falában azonosítottak kiterjedt lymphoid szövetet, ami tonsilláris egységekből áll [24].

A madarak kloákája sajátos immunológiai jelentőséggel bír. Itt található a bursa Fabricii, ami egy jellegzetes primer nyirokszerv, ahol a B lymphocyták érése, differenciálódása zajlik. Felnőtt és embryonális korban kimutatták [25, 26, 27], hogy ha különféle oldatot cseppentenek a csirkék anális nyílására, szívómozgások indukálódnak, amiket gyors perisztaltikus mozgások követnek és az oldott anyagok a kloákába, onnan a bursa Fabricii lumenébe, majd a bursa lymphoid folliculusokba kerülnek. A *per anum* bejutatott antigénfelvétel biológiájának megértése alapvető fontosságú a gerincesek bélnyálkahártya immunválaszának vizsgálata során. Amikor a csirkéket az anális nyíláson és a kloákán keresztül immunizálták [25, 26] antigén specifikus ellenanyagok termelését mutatták ki. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a *per anum* bejutatott antigénekre adott immunológiai válasz nemcsak a bursa B-sejtek differenciálásban betöltött induktív szerepére korlátozódik, hanem azok a bursa és a kloáka területén elforduló perifériás nyirokszervek is részt vesznek a folyamatban, amelyek felveszik a belső és külső antigéneket és a lymphoid sejtekhez juttatják. A harmincas években felmerült a kloákán keresztül történő vakcináció ötlete [28], majd később számos patogénről be is igazolódott (pl. madár fertőző bronchitis vírus, Mycoplasma, fertőző bursitis vírus), hogy kloákába juttatva hatékony immunválaszt indukált csirkékben és

pulykákban [29, 30, 31]. Uenaka kutatócsoportja (1998) fogalmazta meg azt a hipotézist, hogy a kloakán keresztül bejutott bronchitis vírus gyorsabban eljut a csirkék veséjébe, mint amikor tracheán keresztül történik a fertőzés, ezért hatékonyabb út a vakcinafejlesztésre, tesztelésre.

9. Következtetések

1. Hisztológiai és immuncitokémiai módszerekkel egy új lympho-epitheliális szervet karakterizáltunk embrionális és kikelt csirkékben.
2. Mivel a nyirokszövet specifikusan a kloáka mucosalis-submucosalis rétegéhez asszociáltan fordul elő a madarak bélhez-asszociált szervei (GALT) közé soroljuk.
3. A nyirokszervet kloáka tonsillának neveztük el, mert következetesen megtalálható a csirke kloáka falában és a részletes immunhisztokémiai vizsgálat igazolja, hogy a kloáka tonsilla egységei a pylorus-, és a coecalis tonsillákhoz hasonlítanak.
4. A tonsilláris egységek csíracentrumait chB6+/BAFFR+ B lymphocyták, az interfollikuláris területeket CD4+ T lymphocyták alkotják. A myeloid sejtek elszórtan a csíracentrumokban és az interfollikuláris területen is előfordulnak, dendritikus sejt és makrofág markereket expresszálnak.

10. Összefoglaló

Madarakban a bélhez-asszociált lymphoid szövet (GALT) nagyszámú nyirokszervet tartalmaz, amelyek a béltraktus cranio-caudalis tengelyén haladva elszórtan helyezkednek el. Ide tartozik az esophagus-, pylorus-, és coecalis tonsillák, a Peyer-plakkok, vagy a B sejtek éréséért felelős bursa Fabricii. A nagyobb nyirokszerveken kívül, számos kisebb, elszórtan csíracentrumot tartalmazó nyirokszövet (bursa Fabricii perifériás redő, dorsalis diffúz infiltrált terület (DIA)) is tartozik a GALT-hoz. A kloákához-asszociált nyirokszövetek sajátos anatómiai helyzete felveti annak a lehetőségét, hogy a szervezetbe bejutó külvilágból származó antigéneknek és fertőző ágenseknek egyik lehetséges útvonala a kloákán keresztül vezet.

Tudományos diákköri munkám kiemelt célja a kloákában található nyirokszövetek morfológiai (hisztológia, immuncitokémia, konfokális-, és elektronmikroszkópia) karakterizálása és ontogenezisének vizsgálata. Előzetes megfigyelésünk szerint a felnőtt csirke rectum-kloákabursa Fabricii régió paraffinos sorozatmetszésein a DIA-n és a perifériás redőn kívül, a bursa kivezető járatának ventrális része, specifikusan a colorectum felé tekintő kloákaredőben, egy lymphoid szövettel gazdagon infiltrált terület figyelhető meg, amit korábban nem írtak le a szakirodalomban.

Immuncitokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy a bursa kivezető csövének kloáka felé tekintő részében kiterjedt nyirokszövet található. A kloáka nyirokszövege a DIA-hoz képest ventrálisan helyezkedik el. CD45 expresszió szerint nagyszámú lympho-myeloid sejt koncentrálódik a lamina propriában. Igazoltuk, hogy a lymphoid szövet a felszíni hámhoz kapcsolódik, és B-, valamint T-dependens régiókba szerveződik. A B sejtek csíracentrumokban (GC) tömörülnek, amelyek a CSF1R+/74.3+/vimentin+ dendritikus sejteket és TIM4+ makrofágokat tartalmaznak. A GC-k között T sejtekben gazdag interfollikuláris lymphoid szövet található. A nyirokszövet különálló tonsillaris egységekből áll, amelyeket kollagénben gazdag kötőszövet izolál a környező szövetektől, illetve a szomszédos tonsillaris egységektől.

Hisztológiai és immuncitokémiai módszerekkel egy új lympho-epitheliális szervet karakterizáltunk, amely a kloákához asszociáltan a GALT-hoz tartozik. A nyirokszervet kloáka tonsillának neveztük el, mert következetesen megtalálható a csirke kloáka falában. Részletes immunhisztokémiai vizsgálat igazolja, hogy a kloáka tonsilla egységei a pylorus-, és a coecalis tonsillákhoz hasonlítanak, mint morfológiai, mint funkcionális szempontból.

11. Summary

In birds, the gut-associated lymphoid tissue (GALT) contains a large number of lymphatic organs, which are scattered along the cranio-caudal axis of the intestinal tract. These include the esophageal-, pyloric-, and coecal tonsils, Peyer's patches, or the bursa Fabricii, a peculiar organ responsible for the avian B cell development. In addition to the larger lymphatic organs, many smaller lymphatic tissues with scattered germinal centers (bursa Fabricii peripheral fold, dorsal diffuse infiltrated area (DIA)) also belong to the GALT. The specific anatomical position of the lymphatic tissues associated with the cloaca raises the chance that one of the possible routes of external antigens and infectious agents entering the body leads through the cloaca.

The main objective of my student research work is the morphological (histology, immunocytochemistry, confocal, and electron microscopy) characterization and ontogenesis of the cloacal lymphatic tissues. According to our preliminary observation, using the serial paraffin sections of the rectum-cloacal-bursa Fabricii region of the adult chicken, in addition to the DIA and the peripheral fold, the ventral part of the bursa duct, specifically in the mucosal fold facing to the colorectum, is rich in lymphoid tissue, which has not been described before.

Using immunocytochemistry, we confirmed that there is extensive lymphatic tissue in the ventral fold of the bursa duct opening to the cloaca. This lymphatic tissue is located ventral to the DIA. According to CD45 immunoreactivity, numerous lympho-myeloid cells are concentrated in the lamina propria. With double immunofluorescence, we demonstrated that the lymphoid tissue is connected to the surface cloacal epithelium and is organized into B- and T-dependent regions. B cells cluster in germinal centers (GCs), which contain CSF1R⁺/74.3⁺/vimentin⁺ dendritic cells and TIM4⁺ macrophages, respectively, while the interfollicular lymphoid tissue, located between the GCs, is rich in T cells. Lymphatic tissue of the bursa duct consists of individual tonsillar units separated in the lamina propria by collagen-rich connective tissue septum.

In conclusion, using histological and immunocytochemical methods, we describe a novel lympho-epithelial organ associated to the duct of the bursa of Fabricius. Detailed immunocytochemical characterization confirms that this lymphoid organ is consistently found in the cloaca of the chicken and consists of tonsillar units identical to the pyloric and coecal tonsils. We named this lymphoid tissue as the cloacal tonsil.

12. Hivatkozások

1. Gergely O (2022) Store Insider - Évről-évre jelentősen növekszik a világ tojástermelése. In: Store Insid. <https://storeinsider.hu/cikk/evrol-evre-jelentosen-novekszik-a-vilag-tojastermelese>. Accessed 16 Aug 2024
2. 19.1.1.53. Baromfihúsmérleg. https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/mez0054.html. Accessed 16 Aug 2024
3. Ribatti D, Porzionato A, Emmi A, De Caro R (2020) The bursa of Hieronymus Fabricius ab Aquapendente: from original iconography to most recent research. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol* 61:583–585. <https://doi.org/10.47162/RJME.61.2.31>
4. Glick B, Chang TS, Jaap RG (1956) The Bursa of Fabricius and Antibody Production. *Poult Sci* 35:224–225. <https://doi.org/10.3382/ps.0350224>
5. Oláh I, Nagy N, Vervelde L (2014) Chapter 2 - Structure of the Avian Lymphoid System. In: Schat KA, Kaspers B, Kaiser P (eds) *Avian Immunology (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp 11–44
6. Cooper MD, Perey DY, McKneally MF, Gabrielsen AE, Sutherland DE, Good RA (1966) A mammalian equivalent of the avian bursa of Fabricius. *Lancet Lond Engl* 1:1388–1391. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)90300-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)90300-x)
7. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) in reptilla: structure of mucosal accumulations - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/510658/>. Accessed 13 Aug 2024
8. Borysenko M, Cooper EL (1972) Lymphoid tissue in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *J Morphol* 138:487–497. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051380408>
9. Sakai K, Isomura G, Shinzato M, Imada H, Yamada K (2011) The distribution of T lymphocytes, B lymphocytes, and dendritic-like cells of the anal tonsil in the laboratory shrew, *Suncus murinus*. *Microsc Res Tech* 74:819–824. <https://doi.org/10.1002/jemt.20961>
10. Cowan DF, Smith TL (1999) Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *J Anat* 194 (Pt 4):505–517. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19440505.x>
11. The development of the cloaca in birds, with special reference to the origin of the bursa of Fabricius, the formation of a urodaeal sinus, and the regular occurrence of a cloacal fenestra. https://www.researchgate.net/publication/229747275_The_development_of_the_cloaca_in_birds_with_special_reference_to_the_origin_of_the_bursa_of_Fabricius_the_formation_of_a_urodaeal_sinus_and_the_regular_occurrence_of_a_cloacal_fenestra. Accessed 13 Aug 2024
12. Oláh I, Glick B, Törö I (1986) Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. *Poult Sci* 65:574–588. <https://doi.org/10.3382/ps.0650574>
13. Dolfi A, Lupetti M, Bianchi F, Michelucci S (1988) Diffusely infiltrated lymphoid areas of the bursa of Fabricius (DIA) and of the cloaca: an embryological study with morphological analogies. *J Anat* 156:17–26

14. Pearse G (2006) Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* 34:504–514. <https://doi.org/10.1080/01926230600865549>
15. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131:959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
16. Kothlow S, Morgenroth I, Graef Y, Schneider K, Riehl I, Staeheli P, Schneider P, Kaspers B (2007) Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken. *Int Immunol* 19:203–215. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl137>
17. Tregaskes CA, Bumstead N, Davison TF, Young JR (1996) Chicken B-cell marker chB6 (Bu-1) is a highly glycosylated protein of unique structure. *Immunogenetics* 44:212–217. <https://doi.org/10.1007/BF02602587>
18. Dunon D, Allioli N, Vainio O, Ody C, Imhof BA (1999) Quantification of T-cell progenitors during ontogeny: thymus colonization depends on blood delivery of progenitors. *Blood* 93:2234–2243
19. Nagy N, Oláh I, Vervelde L (2022) Chapter 2 - Structure of the avian lymphoid system. In: Kaspers B, Schat KA, Göbel TW, Vervelde L (eds) *Avian Immunology* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp 11–44
20. Casteleyn C, Breugelmans S, Simoens P, Van den Broeck W (2011) The tonsils revisited: review of the anatomical localization and histological characteristics of the tonsils of domestic and laboratory animals. *Clin Dev Immunol* 2011:472460. <https://doi.org/10.1155/2011/472460>
21. Nagy N, Igyártó B, Magyar A, Gazdag E, Palya V, Oláh I (2005) Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta Vet Hung* 53:173–188. <https://doi.org/10.1556/AVet.53.2005.2.3>
22. Nagy N, Oláh I (2007) Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *J Anat* 211:407–411. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00766.x>
23. Crole MR, Soley JT (2012) Evidence of a true pharyngeal tonsil in birds: a novel lymphoid organ in *Dromaius novaehollandiae* and *Struthio camelus* (Palaeognathae). *Front Zool* 9:21. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-9-21>
24. Schlink GT, Olson LD (1998) Scanning electron microscopic view of auditory tonsil in turkey. *Avian Dis* 42:796–801
25. Sorvari T, Sorvari R, Ruotsalainen P, Toivanen A, Toivanen P (1975) Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius. *Nature* 253:217–219. <https://doi.org/10.1038/253217a0>
26. Sorvari R, Sorvari TE (1978) Bursal fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance. *Immunology* 32:499–505
27. Balic A, Chintoan-Uta C, Vohra P, Sutton KM, Cassady-Cain RL, Hu T, Donaldson DS, Stevens MP, Mabbott NA, Hume DA, Sang HM, Vervelde L (2019) Antigen Sampling CSF1R-Expressing Epithelial Cells Are the Functional Equivalents of Mammalian M Cells in the Avian

Follicle-Associated Epithelium. *Front Immunol* 10:2495.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02495>

28. Hudson CB, Beaudette FR (1932) INFECTION OF THE CLOACA WITH THE VIRUS OF INFECTIOUS BRONCHITIS. *Science* 76:34. <https://doi.org/10.1126/science.76.1958.34-a>

29. Burns RB (1980) Cloacal immunisation of the turkey using a soluble antigen. *Br Poult Sci* 21:249–252. <https://doi.org/10.1080/00071668008416665>

30. Lucio B, Fabricant J (1990) Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34:865–870

31. Uenaka T, Kishimoto I, Uemura T, Ito T, Umemura T, Otsuki K (1998) Cloacal inoculation with the Connecticut strain of avian infectious bronchitis virus: an attempt to produce nephropathogenic virus by in vivo passage using cloacal inoculation. *J Vet Med Sci* 60:495–502. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.495>