

PUBERTEYE KADAR FARKLI YAŞ GRUPLARINDA ÇEŞİTLİ CD MOLEKÜLLERİNİN TİMUSTAKİ TUTULUMLARININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BELİRLENMESİ

Çiğdem ELMAS, Deniz ERDOĞAN, Candan ÖZOĞUL, S. Gülşen GİRAY

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada doğumdan puberteye kadar olan evrede, insan timusunda, CD3, CD4 ve CD8 antijenlerinin immünohistokimyasal dağılımları ve yaşa bağlı timik yapısal değişimlerin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Timus doku örnekleri, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalında çeşitli nedenlerle ameliyat olan ve yaşları 11 aylıktan, 11 yaşına kadar değişen 8 hastadan elde edildi. Farklı yaş gruplarından alınan timus dokularında, CD3, CD4 ve CD8 moleküllerinin dağılımlarını tanımlamak için, dokuların tamamına parafin, bir grubuna da dondurma-kesit immünohistokimyası uygulandı.

Bulgular: Bütün yaş gruplarında, timusun korteks ve medulla bölgelerinin timositlerle dolu olduğu ve timositlerde belirgin bir apoptozis gözlenmemiştir. İmmünohistokimyasal bulgularda, erken dönemlerde, korteks lenfositlerindeki tutulumun yoğun membranöz ve sitoplazmik olduğu, buna karşın ilerleyen dönemlerde bu tutulumun kuvvetliden ortaya değiştiği izlendi. Ayrıca, medulladaki reaktif hücre sayısının ise CD3'e oranla oldukça az olduğunu saptandı. CD8 antikoruna ile boyanan grupların, korteksindeki timositlerde yaygın membranöz tutulum saptandı.

Sonuç: Çalışmanın sonucunda CD4 ve CD8'in benzer dağılım gösterdiği saptandı. Reaktivite korteks timositlerinin büyük çoğunluğunu, meduller timositlerin ise küçük bir grubunu, kuvvetli membranöz ve orta dereceli sitoplazmik olarak kapsamaktaydı. CD3 reaksiyonu ise korteks ve medulla timositlerinde yaklaşık benzer dağılım gösterdi. Bulgular timustaki T lenfosit farklanma aşamalarıyla uyumlu olarak değerlendirildi. Ekspresyon açısından yaşa bağlı önemli değişim saptanmadı. Timusun yaşa bağlı olarak involusyona uğramasına karşın timositlerin işlevlerini aynı etkinlikte sürdürdükleri kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Timus, T Lenfosit, CD3, CD4, CD8, İmmünohistokimya.

IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF VARIOUS CD MOLECULES ON THYMUS FROM BIRTH TO PUBERTY IN DIFERENT AGE GROUPS

ABSTRACT

Purpose: Immunohistochemical expression of CD3, CD4, and CD8 antigens in the thymus from birth to puberty was investigated in this study. We analyzed the histologic changes that occur in the thymus with age and the distribution of cells that react with these antigens.

Methods: Tissue samples were obtained from patients of Gazi University Faculty of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery. Age of the patients ranged from 11 months to 11 years old. Three of them were boys and five of them were girls. Both paraffin and cryo sections were taken and immunostaining was performed.

Results: Thymocytes were seen in the cortex and medulla of all age groups. Definite apoptosis was not seen in the thymocytes. Immunohistochemical findings show that although strongly positive membranous and cytoplasmic staining was seen in the cortex thymocytes of early age groups, this staining seems to change from strongly positive to mild with age in thymus samples. The most positive reaction was seen with CD3 in the medulla of all age groups. CD8 immunoreactivity in the cortex was seen mostly in membranous staining.

Conclusion: We observed that CD4 and CD8 had similar immunoreactions in the thymus. Reactive thymocytes include most of the cortex thymocytes and small amounts of medullar thymocytes. This reactivity was strongly membranous and mild cytoplasmic. In addition, CD3 reactivity was similar in the cortex and medulla of all age groups. Findings were well-matched with the changing structure of the aging thymus. Major changes were not seen in different age groups. We estimated that the thymus involutes with age but thymocytes work with the same activity and efficiency.

Key Words: Thymus, T Lymphocytes, CD3, CD4, CD8, Immunohistochemistry.

GİRİŞ

Timus, T lenfositlerin olgunlaşarak dolaşıma geçtikleri organıdır. Timusta yaşla birlikte değişiklikler gözlemlenir. Bunlar; yağ dokusundaki artış, kortekste belirgin kayıp, epitelyal hücrelerdeki dejeneratif değişiklikler ve histolojik kesitlerde korteks ve medullanın belirgin sınırlarla ayırılma edilmemeleridir. Ayrıca lenfosit sayısında da önemli ölçüde düşüş olur. İnsanda T lenfosit işlevindeki düşüşe koşut olarak, dolaşımdaki timik-bağlantı faktörlerinde de belirgin bir azalma gözlemlenir. Bunlarla birlikte, timosin, timulin ve plazma timik hormon aktivitesinde de azalmalar belirgindir. Tüm bu değişimlere karşın, ileri yaşlarda da az bir timik doku bulunur ve bu doku T lenfosit yapımını sürdürür.^{1,2,3}

Timusta gerçekleşen T lenfosit olgunlaşması sırasında, timositler farklı yüzey antijenleri içerirler. Bu yüzey antijenlerine bakılarak gelişim aşamaları kolaylıkla ayırılabilir.^{3,4} T lenfositleri tanımlayabilmemizi sağlayan yüzey işaretleyici gruplardan en özgün olanları küme farklanma (Cluster of Differentiation = CD) molekülleri ailesidir. CD molekülleri esasında membran glikoproteinleridir ve immün yanıtın denetimi ve aktivasyonu açısından çok önemlidir. Bu moleküller, antijenler için reseptör görevini üstlenerek lenfositlerin aktivasyonunu sağlarlar. Ayrıca sinyal iletiminde de görev alırlar. Günümüzde 200'ü aşkın CD molekülü tanımlanmıştır.^{5,6} Bu geniş CD ailesi içinde, timosit farklanma aşamalarının belirlenmesinde en sık kullanılanları CD 3, 4 ve 8'dir.^{3,4,5,7}

CD3 molekülü, T lenfosit için doğru sinyal iletiminden sorumludur. Antijeni tanıyarak, bu haberi T lenfositin sitoplazma ve çekirdeğine ileten moleküldür. CD3 antijeni erken dönem, olgunlaşmamış T lenfositlerin yüzeyinde bulunur. Kortikal timositlerde CD3 tutulumu intrasitoplazmik iken, medulladaki timositlerde CD3 ekspresyonu hücre zarındadır. Bu antijen normal ve neoplastik T lenfositlerin tanımlanması açısından da oldukça özeldir.^{7,8,9}

CD4 membran glikoproteinini, periferik kan lenfositlerinin %45'ini oluşturan yardımcı T lenfositlerin, yüzeyinde bulunur. Ayrıca timositlerin %80'i ve az olarakta monositler bu antijeni eksprese ederler. Yetişkin T lenfosit lösemi ve lenfomada genellikle CD4 pozitif boyanır.^{1,4,6, 10,11}

Baskılayıcı ve sitotoksik T lenfosit işaretleyicisi olan CD8 antijeni ise NK hücrelerinin yüzeyinde az olarak eksprese olur. Bunların TCR'leri, major histokompatibilite kompleksi (MHC-I) olarak bilinen moleküllere sıkıca bağlanır. CD4 molekülü ise MHC-II'lere tutunur. İnsan immün yetmezlik virüsü-2 (HIV-2) glikoproteinini de CD8'in alfa zincirine bağlanır.^{4,5,11, 12,13, 14, 15}

Timositler erken gelişim aşamalarında CD3 molekülü içerirler. Bu molekül TCR ile sıkıca kenetlenmiş durumdadır. Daha sonra bu TCR+CD3 karmaşığına, CD4 veya CD8 molekülü bağlanır. Bu bağlanma TCR+CD3 karmaşığının aktivasyonunu sağlar. CD3 si-

toplazmaya geçerek, hücreye yeni bağlanan molekül hakkında bilgi verir. Bu bağlanma sonucunda TCR+CD3+CD4 olanlar, yardımcı yada indükleyici T lenfositlere, TCR+CD3+CD8 olanlar, sitotoksik yada baskılayıcı T lenfositlere farklılıklar. 3, 8, 13, 14, 15

Bu çalışmada doğumdan sonra, puberteye kadar olan evrede, insan timusunda, CD3, CD4 ve CD8 antijenlerinin immünohistokimyasal dağılımlarını incelemek amaçlandı. Bu yol ile hem timusun yaşa bağlı değişimleri, hem de bu antikorların işaretlediği hücrelerin dağılımları ortaya konulmaya çalışıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Doğumdan puberteye kadar olan dönemde, farklı yaş gruplarındaki timus dokularında CD3, CD4 ve CD8 moleküllerinin dağılımlarını tanımlamak amacıyla, tüm timus dokusu örnekleri, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalında çeşitli nedenlerle ameliyat olan 8 hastadan elde edildi. Bu hastaların 3 tanesi erkek, 5 tanesi de kızdı. Hastaların yaşları 11 aylıktan, 11 yaşına kadar değişmekteydi. Alınan dokuların tamamına parafin, bir grubuna da dondurma-kesit immünohistokimyası uygulandı.

Çalışmada kullanılan primer antikorlar Human Leukocyte Differentiation Antigens-VI 1996 konferansından sağlandı (Tablo 1.1) Bu antikorlar önerilen oranlarda (1/100) PBS-BSA karışımı ile sulandırılarak kullanıldılar. Sekonder antikor olarak antimouse IgG-Peroksidaz (Sigma), reaksiyonu görüntülemek için 3.3'-diaminobenzidin tetraklorür (K.N. D 5637, Sigma) ve PBS-BSA, normal insanserumu kullanıldı. Kesitler Olympus BH2 ışık mikroskobunda incelenip fotoğraflandı.

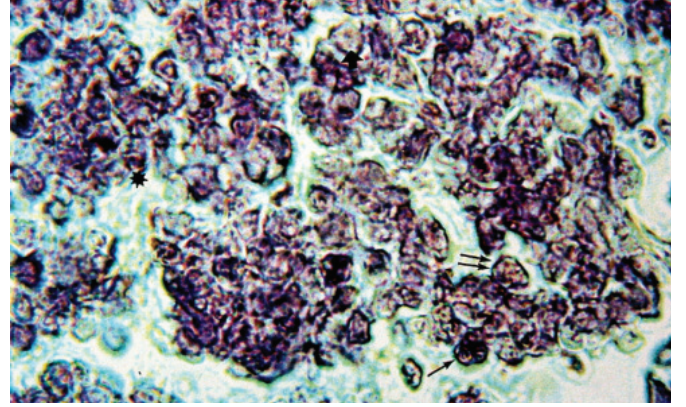
Tablo 1.1: Kullanılan primer antikorların, özgüllüğü, klon adı, kaynağı ve izotipleri tabloda belirtilmiştir.

Özgüllül	Klon adı	Kaynağı	İzotipi
CD3	131-F26	Geneted/Martin	m-IgG1
CD4	Anti-CD4	Ping	m-IgG1
CD8	Ip 48	Bensussan	m-IgG1

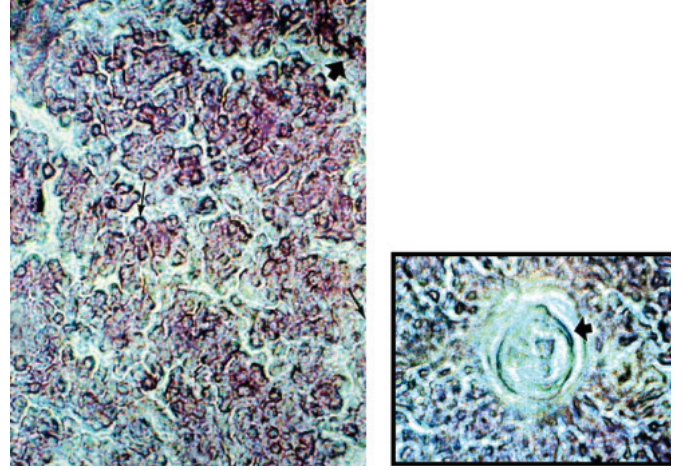
Parafin kesitlerde CD3 ve CD4 moleküllerinin dağılımları, indirekt immünperoksidaz yöntemi ile boyandı. İmmünoreaksiyonu incelemek amacıyla yarı kantitatif bir değerlendirme sistemi kullanıldı. Kesitler Olympus BH2 ışık mikroskobunda incelenip fotoğraflandı.

BULGULAR

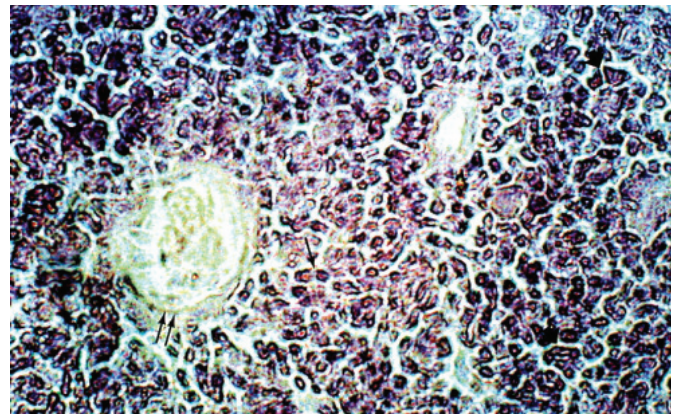
İncelenen bütün yaş gruplarında, timusun bilinen klasik lenfoit dokusu ayırt edilmiştir. Yağ dokusunun 7. yaş timusundan başlayarak ilerleyen yaşlarda arttığı saptanmıştır (Res 12). Medulla büyük ve küçük tip timositlerle doluydu, arada Hassal cisimcikleri izleniyordu. Bu cisimciklerin yaşa koşut sayılarının arttığı, büyüklüklerinin belirginleştiği saptandı (Res.4b, 11b).



Resim 1: 11 aylık kız hastaya ait timus dokusunda CD3 tutulumu. Lenfositler (→). Küçük tip lenfositler (*). Büyük tip lenfositler (⇨). Bazı lenfositlerde orta dereceli tutulum (çift ok). (İndirekt immüno-peroksidaz (İ), Hematoksilin (He), X1000).

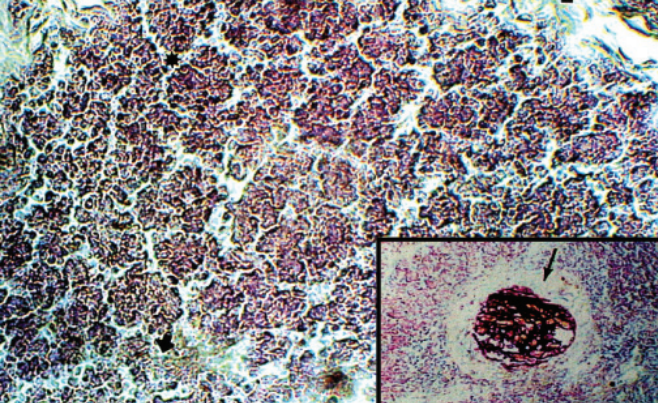


Resim 2: 22 aylık kız hastaya ait timus dokusunda CD3 tutulumu. Korteks lenfositleri (⇨). Medulladaki lenfositler (→) (Resim 2a). Medullada Hassal cisimcikleri (⇨) (Resim 2b). (İ, He, X400).

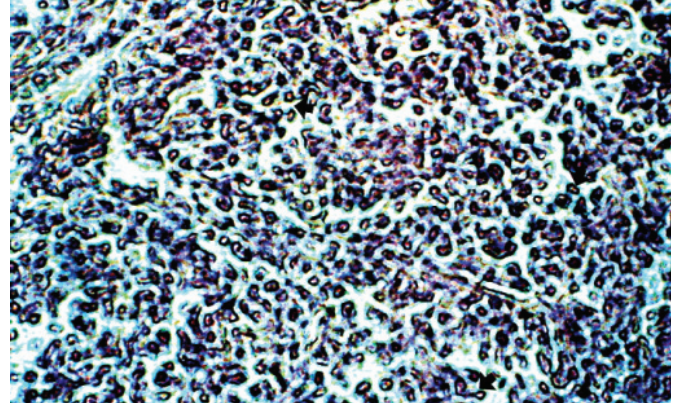


Resim 3: 4 yaşındaki kız çocuğuna ait timus kesitinde kortekste yoğun membranöz CD3 tutulumu (⇨), medullada orta dereceli tutulum (→). Medullada Hassal cisimciği (çift ok). (İ, He, X400).

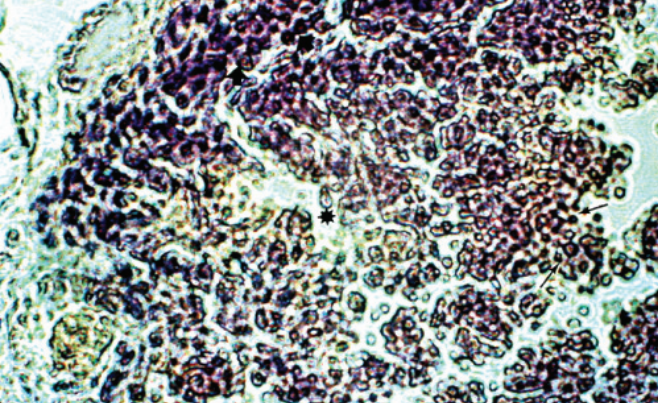
Erken dönem T lenfositleri belirlemeye yönelik CD3 monoklonal antikorunu ile yapılan indirekt immünboya yönteminde 11 aylık kız hastaya ait timus dokusunda, korteks timositlerinin oldukça kuvvetli membranöz tutulum gösterdiği,



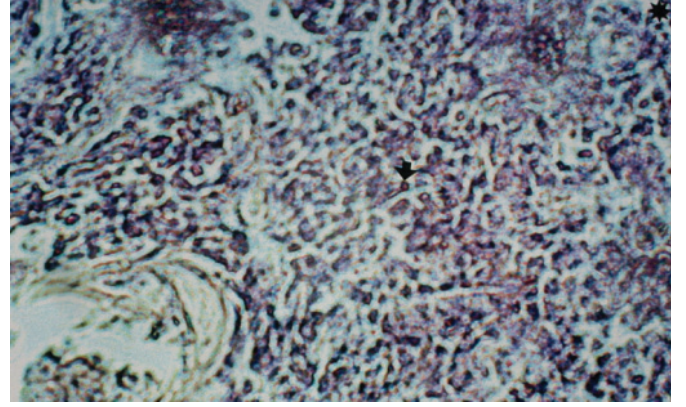
Resim 4: 6 yaşındaki kız çocuğuna ait timus kesitinde, kortekste kuvvetli membranöz (*), medullada da orta dereceli sitoplazmik (→) CD3 tutulumu. (Resim a) (İ, He, X200) Medullada Hassal cisimcikler (→) (Resim b) (İ, He, X40)



Resim 6: 8 yaşındaki erkek çocuğuna ait timus kesitinde CD3 reaksiyonu. Küçük lenfositler (→). (İ, He, X400).



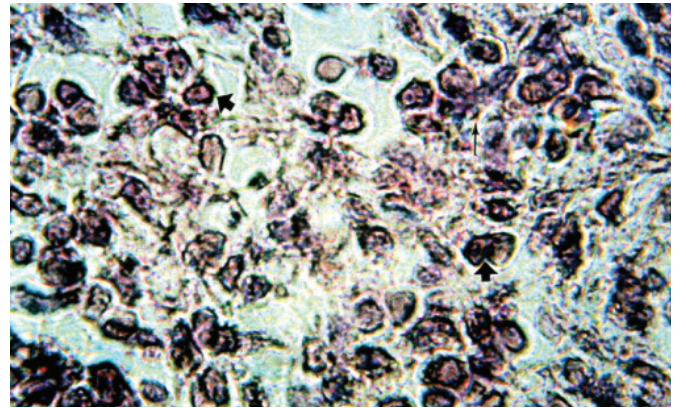
Resim 5: 7 yaşındaki kız çocuğuna ait timus bezinin, korteks bölgesindeki lenfositlerin CD3 tutulumu (→). Korteks medulla geçiş bölgesindeki lenfositler (*). Medullada küçük (→). (İ, He, X400).



Resim 7: 10 yaşındaki erkek hastaya ait timus bezi kesitinde CD3 tutulumu, korteks lenfositleri (*). Medulladaki küçük lenfositler (→). (İ, He, X400).

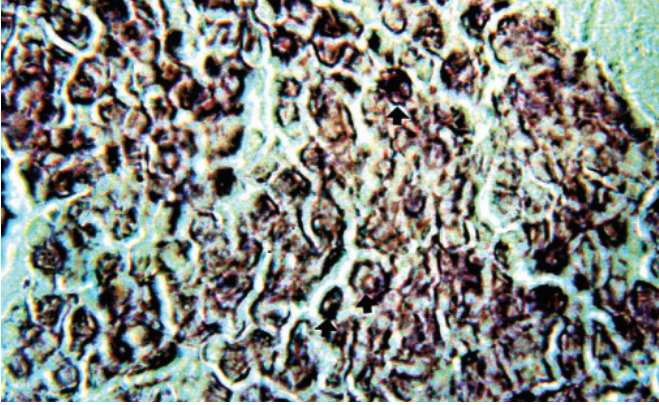
sitoplazmik tutulumlarının ise membrandaki kadar olmamakla birlikte, kuvvetli olduğu saptandı. Büyük tip lenfositlerde ise sitoplazmada zayıf, zar yapısında da orta dereceli tutulum olduğu ayırt edildi (Resim 1). 22 aylık kız hastaya ait timus dokusunda ise korteks lenfositlerindeki zar tutulumunun daha kuvvetli olduğu ve reaktif lenfositlerin sayıca fazla oldukları izlendi. Medullaya doğru zar tutulumunun azaldığı, orta dereceli sitoplazmik tutulumun yaygınlaştığı dikkati çekti (Resim 2a). Hassal cisimciklerinin konsantrik halkalarında zayıf membranöz tutulum olduğu izlendi (Resim 2b).

4 yaşındaki bir başka hastanın timusundaki CD3 reaksiyonu korteks ve medullada yaygın ve eşit dağılımda izlendi. Korteks timositlerindeki tutulumun kuvvetli membranöz, medullada ise orta dereceli sitoplazmik olduğu görüldü (Resim 3). 6 yaşındaki kız çocuğuna ait timus dokusunda da diğer gruplarda olduğu gibi korteksde kuvvetli membranöz tutulum yaygındı. Medulladaki timositlerin de orta dereceli sitoplazmik tutulumları belirgindi (Resim 4a). Medulladaki Hassal cisimciklerinin özellikle öz bölgelerinin zemin boyasıyla boyandıkları, ancak dış konsantrik halkaların belirgin bir reaktivite göstermediği saptandı (Resim 4b). 7 yaşındaki kız çocuğuna

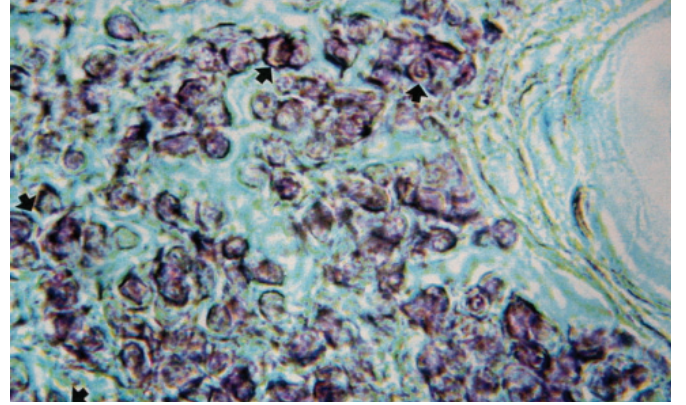


Resim 8: 11 aylık kız hastaya ait timus kesitindeki lenfositlerde CD4 reaktivitesi (→). Epitelyal retikulum hücreleri (→). (İ, He, X1000).

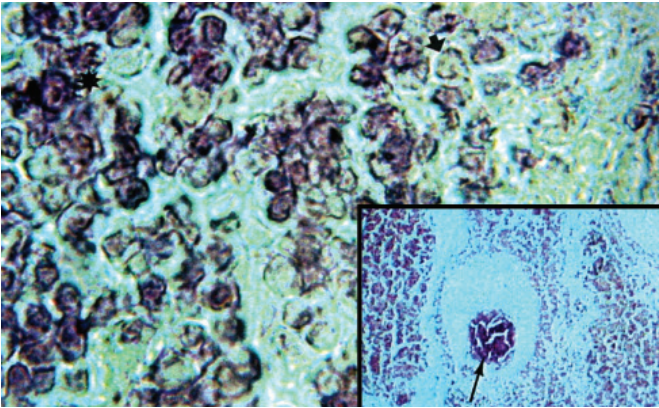
ait timus bezinde, korteks lenfositlerinin CD3 ile oldukça kuvvetli membranöz ancak orta derecede sitoplazmik reaksiyon verdikleri izlendi. Bu grupta CD3 reaktif lenfositlerin medullar bölgede sayıca daha çok oldukları saptandı (Resim 5). CD3 ile yapılan diğer yaş gruplarında tüm lenfositlerde özellikle



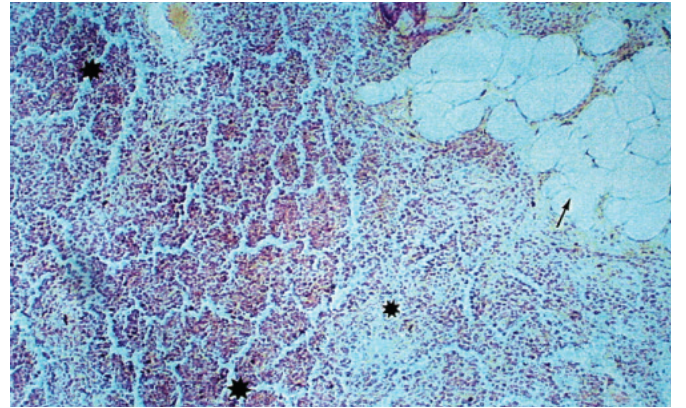
Resim 9: 22 aylık kız hastaya ait timus kesitlerinde, lenfositler (→). (İ, He, X1000).



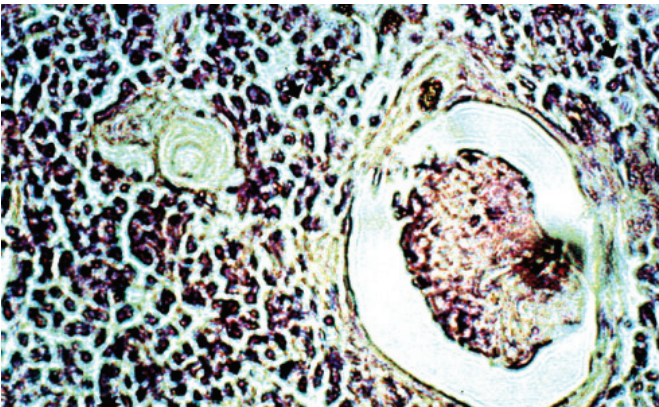
Resim 10: 4 yaşındaki kız hastanın timusunda, korteks ve medulla lenfositlerinde aynı CD4 tutulum özellikleri (→). (İ, He, X1000).



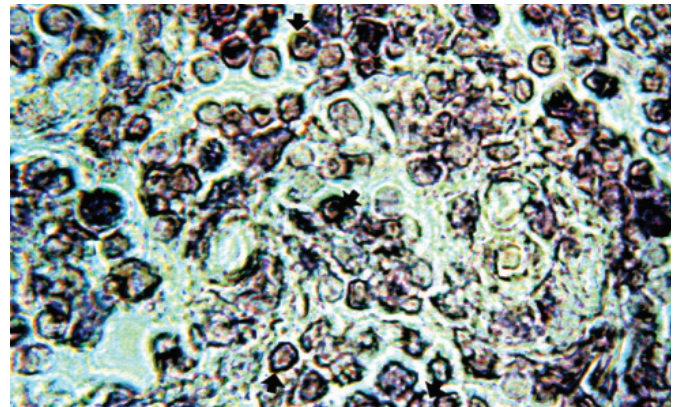
Resim 11: 6 yaşındaki kız hastanın timusunda, korteksindeki lenfositler (*) (Resim a) (İ, He, X1000). Medullada Hassall cisimcikleri (→). (Resim b) (İ, He, X200).



Resim 12: 7 yaşındaki kız hastaya ait timus kesitinde, parankimadaki yağ dokusu (→). Korteksteki lenfositler (*), medulladaki lenfositler (*). (İ, He, X200).



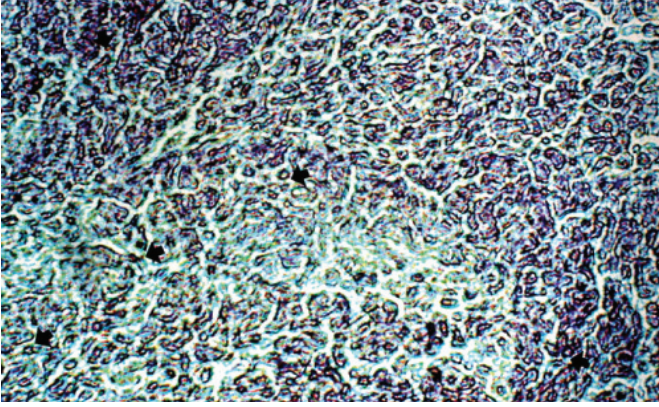
Resim 13: 8 yaşındaki erkek çocuğuna ait timus kesitinde CD4 tutulumu. Kortekste küçük tip lenfositler (*). Medulladaki lenfositler (→). (İ, He, X400).



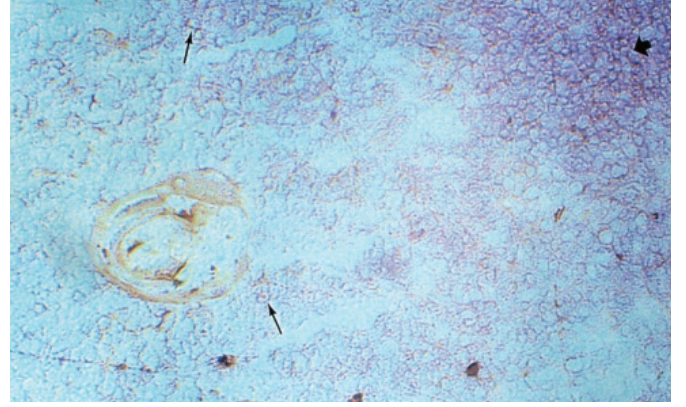
Resim 14: 10 yaşındaki erkek hastanın timusundaki lenfositlerde CD4 tutulumu (→). (İ, He, X1000).

de küçük tip lenfositlerde kuvvetli membranöz, orta dereceli sitoplazmik tutulum saptandı (Resim 6-7). Yardımcı T lenfositleri göstermeye yönelik CD4 monoklonal antikorunu kullanarak uygulanan timus dokularında reaktivite hem korteks hem de medullada izlendi. 11 ve 22 aylık kız hastaların timuslarında CD4 ile reaktif olan timositlerdeki tutulum membran- da oldukça kuvvetli ve sitoplazmada da neredeyse buna yakın

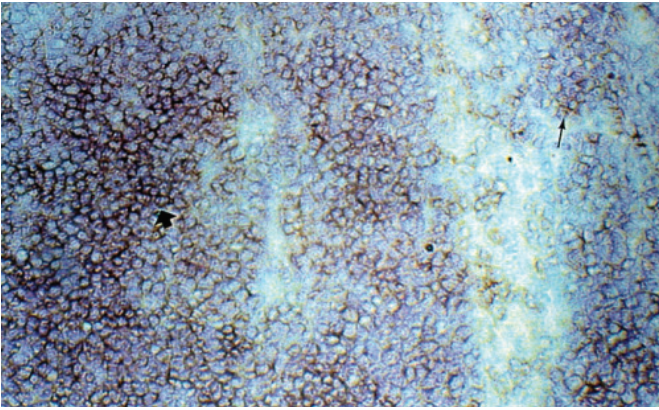
olarak izlendi. Epitelyal retikulum hücrelerinde ise reaktivite saptanmadı (Resim 8-9). 4 yaşındaki kız çocuğuna ait timus bezinde ise, CD4 pozitif timositlerin membranlarındaki tutulum, önceki iki gruba oranla orta dereceli iken sitoplazmik tutulum daha zayıftı (Resim 10). 6 yaşındaki kız hastanın timusunda ise, tutulum özellikleri diğer gruplarla aynı olmakla birlikte medulladaki reaktif hücrelerin sayıca daha az olduğu



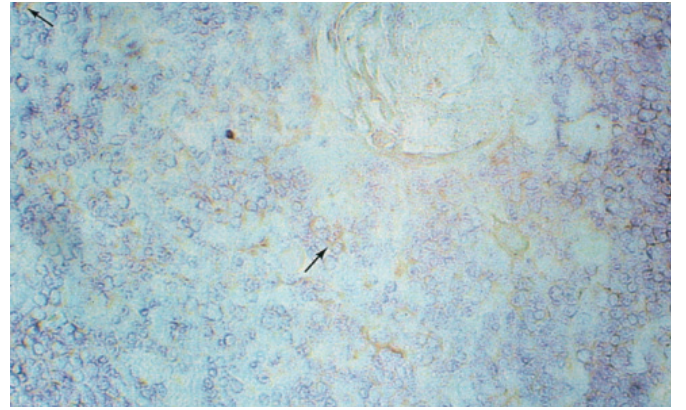
Resim 15: 11 yaşındaki erkek hastanın timusundaki CD4 pozitif lenfositler (→). (İ, He, X400).



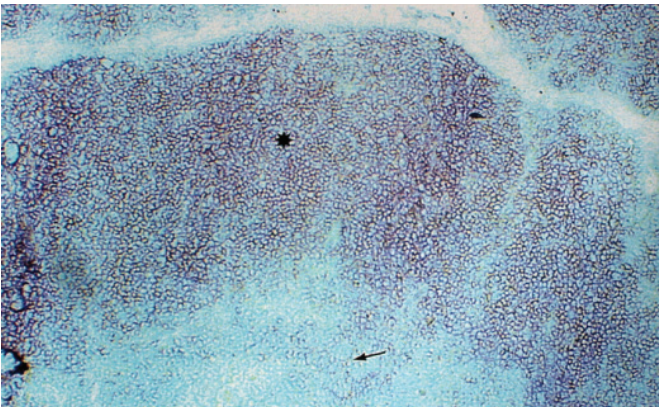
Resim 16: 22 aylık kız hastanın timus bezinin kriyostat kesitinde, korteks lenfositlerinde CD8 reaktivitesi (→), meduller lenfositler (→). (İ, He, X200).



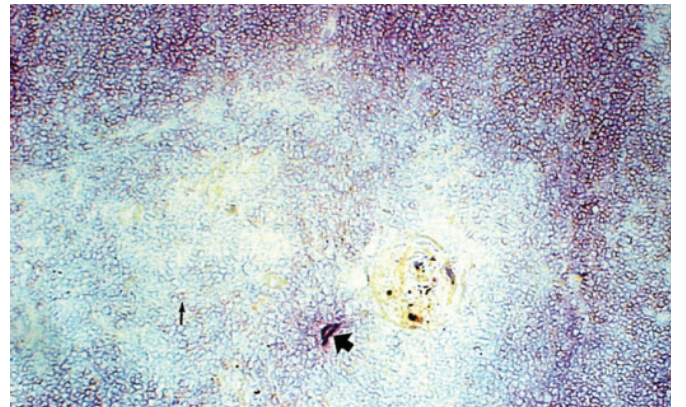
Resim 17: 4 yaşındaki kız hastanın timusunun, hem korteks (→) hem de medullasındaki lenfositlerde (→) CD8 reaktivitesi (İ, He, X200).



Resim 18: 6 yaşındaki hastanın timus medullasındaki T lenfositlerde CD8 immunoreaksiyonu (→). (İ, He, X200).



Resim 19: 10 yaşındaki erkek hastanın timus bezinde, kortekste lenfositlerinde CD8 tutulumu (*). Medulladaki reaktif hücreler (→). (İ, He, X100).



Resim 20: 10 yaşındaki erkek hastanın timus bezinde medulladaki CD8 reaktif hücreler (→). Kan damarları (→). (İ, He, X100).

saptandı. Hassal cisimcikleri belirgin sayısal ve hacimsel artış gösterdi. Öz bölgeleri gene zemin boyasıyla boyanmıştı (Resim 11a, 11b). Diğer bütün yaş gruplarının CD4 antikoruna ile yapılan immünboyamalarında, timositlerin kuvvetli membranöz ve sitoplazmik tutulumlarının olduğu saptandı. Medulladaki reaktif hücre sayısının az olduğu izlendi (Resim 12-15).

Sitotoksik T lenfositleri belirlemek amacıyla yapılan bu immünboyama, kriyostat kesitlerde gerçekleştirildi. Genel olarak CD8 reaksiyonunun CD4 reaksiyonuna benzediği saptandı. Bütün gruplardaki tutulum kortekste kuvvetli medullada ise orta dereceli membranöz olarak değerlendirildi. Reaktif hücreler sayıca kortekste oldukça fazlaydı. Medullada ise bu hücrelerin sayısı çok azdı (Resim 16-20).

TARTIŞMA

Timusta gerçekleşen T lenfosit farklanmasını ve bu farklanmanın aşamalarını gözlemleyebilmek için, bu hücrelerin özel yüzey işaretleyicilerini tanımlamak gerekmektedir. Gelişimin farklı aşamalarındaki timositler farklı yüzey işaretleyicilerini içerirler. Bunlardan en çok kullanılanlar, sitokinler (lenfokin, monokin) ve CD (Cluster of Differentiation) molekülleri olarak bilinen farklanma molekülleridir. Bugüne kadar ikiyüzyü aşkın CD molekülü tanımlanmıştır.¹

Timus gelişimi sürecinde, insanda ve bazı hayvanlarda CD moleküllerinin timositler ve timusa ait diğer hücrelerdeki dağılımı birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Yardımcı ve sitotoksik T lenfosit farklanması için önemle üzerinde durulması gerekenler CD3, CD4 ve CD8 molekülleridir. CD3 erken evre T lenfosit işaretleyicisidir. Kortikal timositlerde intrasitoplazmik, meduller timositlerde ise membranöz tutulum gösterir. CD4, yardımcı T lenfositlerin yüzey işaretleyicisidir. Kortikal timositlerde oldukça kuvvetli tepkime verir. CD8 ise sitotoksik ve baskılayıcı T lenfositlerin tanınmasını sağlar.^{4,5, 13}

Ramos-Vera 1994 yılında poliklonal antikor kullanılarak, çeşitli hayvan türlerinin (kedi, koyun, keçi, sıçan, fare ve insan), çeşitli lenfoit dokularına (lenf düğümü, dalak, Peyer plakları ve timus) peroksidaz-antiperoksidaz tekniği uygulamışlar. Çalışmanın sonucunda ise, CD3'ün, bütün türlerde ve en kuvvetli tutulum nedeniyle de insanda, T lenfositleri özel olarak tanımlamaya yarayan bir işaretleyici olduğunu ve bu türlerdeki fizyolojik ve patolojik durumların saptanmasında da etkili olabileceği kanısına varmışlardır.⁹

Biz de monoklonal CD3 antikorunu kullanarak yaptığımız indirekt immünboyamada, timus dokusunda korteks timositlerinin kuvvetli membranöz tutulum gösterdiğini, medulladaki ise kuvvetli membranöz tutulumun yanısıra orta dereceli sitoplazmik tutulum sergilediğini belirledik. Kortikomedullar bölgede T lenfositlerdeki tutulumun orta dereceli hücre zarı, ve zayıf sitoplazmik olduğunu gördük. Tutulumun yerleşimi olarak korteks ve medulladaki CD3 reaktif hücre sayısında bir farklılık saptamadık. Ancak bazı yaş gruplarında medulladaki reaktivitenin korteksdekinden fazla olduğunu saptadık. Membranöz tutulumun en kuvvetli olarak küçük tip T lenfositlerde eksprese olduğunu saptadık.

CD4 antikorunu ile yapılan çalışmaların çoğunda bu molekül ile MHC-II'nin ilişkisi araştırılmıştır. Bilindiği gibi CD4, T lenfositlerin hücre zarında MHC-II ile bağlanır. Bu iki molekül koreseptör bağımlı T lenfosit aktivasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bir çalışmada, dinlenme durumundaki CD4 pozitif T lenfositlerden MHC-II'lerin mutant olanlarının normallere karşı çok daha fazla apoptozisse uğradıkları saptanmıştır. Bu şekilde periferik immün sistem dengesinin korunduğunu belirten araştırmacılar, timustan göç eden T lenfositlerin periferde koreseptörlerinin sürekli test edilmesi yo-

luyla, potansiyel olarak otoreaktif olan T lenfositlerin elimine edilmelerinin de olası olduğunu belirtmişlerdir.^{10, 14, 15}

Biz de çalışmamızda yardımcı T lenfositleri belirlemeye yönelik CD4 monoklonal antikorunu kullanarak, timositler üzerindeki dağılımlarını gözlemledik. Erken dönemlerde, korteks lenfositlerindeki tutulumun yoğun membranöz ve sitoplazmik olduğunu, buna karşın ilerleyen dönemlerde bu tutulumun kuvvetliden ortaya değiştiğini izledik. Buna ek olarak medulladaki reaktif hücre sayısının ise CD3'e oranla oldukça az olduğunu saptadık.

Bir çok çalışmada CD4 ve CD8 birlikte araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birinde sıçan timusunda yaşa bağlı olarak geçirdiği değişimler immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Yaşa koşut olarak, timus ağırlığında önemli ölçüde düşüş ve histolojik yapısında bozulmalar saptanmıştır. Ancak yaşlı hayvanlara mekanik ya da Luteinize hormonu salgılatıcı hormonun (LHRH) eşdeşi olan Goserelin ile yapılan kimyasal kastrasyon işleminden sonra, timus ağırlığında belirgin bir artış görmüşlerdir. Bu deneklerin, timuslarının korteks ve medullalarının da düzgün bir şekilde yeniden yapılandığını belirtmişlerdir. Kastrasyon öncesinde, yaşlı hayvanların timuslarında az sayıda CD4 ve CD8 pozitif lenfosit olduğunu söyleyen araştırmacılar, bu sayının kastrasyondan sonra oldukça arttığını bildirmişlerdir.^{13, 14, 16}

Sonuç olarak çalışmamızın bütün yaş gruplarında yapılan immün boyamaları sonucunda, bulgular antikorların işlevlerine uygun olduğunu gösterdi. Erken dönem T lenfosit işaretleyicisi olan CD3'ün hem korteks hem de medullada yaygın reaktivite göstermesi, büyük olasılıkla bu antikorun, timusun her iki bölgesindeki timositlerin yüzeyinde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Korteksdeki öncelikle CD3 eksprese etmeye başlayan timositler daha sonra ya CD3+CD4+TCR yada CD3+CD8+TCR karmaşığını taşıyor duruma geçerler. CD3+CD4+TCR grubu yardımcı, CD3+CD8+TCR grubu da sitotoksik T lenfositlere farklanır. Bunları sadece çok az bir grubu medullaya geçebilirken, CD3 her iki gruptaki timositlerle birlikte medullaya geçmektedir. Bu nedenle reaktivitesinin medullada da, neredeyse korteksdeki kadar çok timositde izlenmesi doğal bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu mekanizmanın işleyişi nedeniyle medulladaki CD4 ve CD8 reaktif hücre sayısındaki düşüş normal bulunmuştur. Farklı gruplardaki genç ve yaşlı timusların parankimalarında reaktivite olarak belirgin bir ayırım saptanmamıştır. Sonuç olarak bu durum timusun yaşam boyu işlev gören bir organ olması gerçeği ile uyumlu bulunmuştur.

Yazışma Adresi

Çiğdem ELMAS

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

06500 Beşevler / ANKARA

Tlf: 0 312 202 6965

Fax: 0 312 212 4647

KAYNAKLAR

1. Fagoaga OR, Yellon SM, Nehlsen-Cannarella SL: Maturation of lymphocyte immunophenotypes and memory T helper cell differentiation during development in mice, *Dev Immunol.* 2000; 8: 47-60.
2. Haeryfar SM, Berczi I: The thymus and acute phase response, *Cellular and Molecular Biology*, 2001; 47: 145-156.
3. Pearse G: Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic Pathology*, 2006, 34: 504-514.
4. Bosselut R, Feigenbaum L, Sharrow SO, Singer A: Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes, *Immunity.* 2001; 14: 483-94.
5. Barbier E, Cazenav PA, Grassi F: A role for CD8 in limiting degeneracy of thymocyte selection, *Cell Mol Biol.* 2001; 47: 129-133.
6. Cho EY, Bae Y, Lee DS, Park SH: T-T interaction during thymic selection, *Cellular and Molecular Biology*, 2001; 47: 135-143.
7. Tatsumi Y, Kumanogoh A, Saitoh M, Mizushima Y, Kimura K, Suzuki S, Yagi H, Horiuchi A, Ogata M, Hamaoka T: Differentiation of thymocytes from CD3-CD4⁻CD8⁻ through CD3-CD4-CD8⁺ into more mature stages induced by a thymic stromal cell clone, *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 2750-2754.
8. Ward JM, Erexson CR, Faucette LJ, Foley JF, Dijkstra C, Cattoreeti G: Immunohistochemical markers for the rodent immune system. *Toxicologic Pathology* 2006 34: 616-630.
9. Havran WL, Poenic M, Kimura J, Tsien R, Weiss A, Allison JP: Expression and function of the CD3-antigen receptor on murine CD4⁺8⁺ thymocytes, *Nature*, 1987; 330: 170-173.
10. Ramos-Vara JA, Miller MA, Lopez E, Prats N, Brevik L: Reactivity of polyclonal human CD3 antiserum in lymphoid tissues of cattle, sheep, goats, rats and mice, *Am J. Vet. Res.* 1994; 55: 63-66.
11. Yamazaki H, Tateyama H, Asai K, Fukai I, Fujii Y, Tada T, Eimoto T: Glia maturation factor-b is produced by thymoma and may promote intratumoral T-cell differentiation. *Histopathology* 2005, 47, 292-302.
12. Gilfillan S, Shen X, Konig R: Selection and function of CD4⁺ lymphocytes in transgenic mice expressing mutant MHC class II molecules deficient in their interaction with CD4, *J Immunol.* 1998; 161: 6629-6637.
13. Chan S, Margarida CN, Dierich A, Benoist C, Mathis D: Visualization of CD4/CD8 T cell commitment, *J Exp Med* 1998; 12: 2321-2333.
14. Maroto R, Shen X, Konig R.: Requirement for efficient interactions between CD4 and MHC class II molecules for survival of resting CD4⁺ T lymphocytes in vivo and for activation-induced cell death, *J Immunol.* 1999: 162: 5973-5980.
15. Hue S, Monteiro RC, Berrih-Aknin S, Caillat-Zucman S: Potential Role of NKG2D/MHC Class I-Related Chain A Interaction in Intrathymic Maturation of Single-Positive CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* 2003; 171-1909-1917.
16. MacDonald HR, Budd RC, Howe RC: A CD3⁻ subset of CD4⁺8⁺ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4⁺8⁺ cells, *Eur J Immunol.* 1988; 18: 519-523.