



Araştırma/Research

Sıçanlarda Yaşa Bağlı Olarak Timus ve Periferal Kan Dokusunda bulunan Lenfositlerin Histokimyasal ve Histometrik İncelenmesi

Alper YALÇIN¹, Mehmet KANTER²

¹Adıyaman Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı.

²Emekli

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, sıçanlarda yaşa bağlı olarak timus ve periferal kan dokusunda bulunan lenfositlerin histokimyasal ve histometrik incelenmesi amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 60 *Wistar Albino* sıçan kullanıldı. Farklı yaş grubundaki sıçanlar dekapite edilerek timus ve kan dokuları uzaklaştırıldı. Timus dokuları sırasıyla formol-sukroz ve Holtz solüsyonunda tespit edildi. Kan dokuları ise heparinli tüplere alındı. Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) pozitif lenfositleri belirlemek amacıyla kriyostatta timus dokusundan alınan kesitler, pH 5,8'de 5 dakika, kan dokusundan yapılan frotiler ise pH 5,8 'de 3 saat süre ile inkübasyon solüsyonunda boyandı.

Bulgular: Timusta her dönem için korteks ve medullada bulunan toplam ANAE (+) lenfosit dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde en fazla puberte, en az ergin dönemde bulunduğu; prepuberte döneminde ise ergin döneme göre bu sayının anlamlı bir şekilde fazla olduğu saptandı. Kan dokusunda ise ANAE pozitif lenfosit sayılarının prepuberte döneminde oldukça az, puberte döneminde en fazla, ergin dönemde ise puberteye göre az ancak prepuberte dönemine göre fazla olduğu saptandı. Kan dokusunda ANAE negatif lenfositler B lenfosit olarak değerlendirildi.

Sonuç: Kan örneklerinde ANAE (+) lenfositlerin oranı prepuberte ve puberte dönemlerinde timustaki dağılımla paralellik gösterirken, sadece ergin dönemde periferal kandaki pozitiflik oranının timusa göre oldukça yüksek çıkması timustaki involusyona bağlanabileceği gibi, periferdeki bellek T hücrelerinin sürekli olarak proliferasyonu sonucu da bu artışın olabileceği kanaatindeyiz

Anahtar Sözcükler: ANAE, histokimya, lenfosit, sıçan, yaş.

Yazışmadan Sorumlu Yazar

Alper Yalçın

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji
Anabilim Dalı.

Tel : +90 05435828463

Email: alperyalcin0171@hotmail.com

DOI: 10.30569/adiyamansaglik. 441354

Geliş Tarihi: 06.07.2018

Kabul Tarihi: 14.07.2018

Investigation of Histochemical and Histometric Distribution of Lymphocytes in Thymus and Blood Tissues Due to Rats Age

ABSTRACT

Objective: This study was performed to investigate the histochemical and histometric distribution of lymphocytes in thymus and blood tissues of the rats depending on their different age stages

Material and Method: In the study, 60 Wistar albino rats were used. Thymus and blood tissue samples were taken following decapitation. Thymus tissues were firstly placed in formal-sucrose and then Holtz solutions for fixation. Blood samples were put into the heparinized tubes. To determine the alpha napyhl acetate esterase (ANAE) positive lymphocytes from the both tissues, thymus tissue sections cut into 10 μ thickness by cryostat microtome and smears made from blood samples were stained in the incubation solutions for 5 minutes and 3 hours at pH 5.8 respectively.

Results: When the ANAE (+) positive lymphocytes existence in cortical and medullar parts of the thymic tissue were evaluated for each stage statistically; the most numbers in puberty and the least in adult stage were found respectively whereas the pre-puberty stage were found to have much more positive lymphocytes compared with the adult stage. In the blood tissue samples, the numbers of ANAE positive lymphocytes were found to be very few in pre-puberty stage, the most in the puberty stage; however, the numbers of the cells in the adult stage were fewer than puberty but more than pre-puberty stages. The ANAE negative lymphocytes in the blood tissue samples were regarded as B lymphocytes

Conclusion: While the rate of lymphocytes in pre-puberty and puberty stages in blood samples paralleled with their distribution in the thymic tissue, the rate of positive lymphocytes in peripheral blood was much more higher than thymus tissue only in the adult stage, which it could be postulated that abundant numbers might have been because of thymus involution or constant proliferation of the memory T cells in periphery.

Key Words: Age, ANAE, histochemistry, lymphocytes, rat.

GİRİŞ

Memelilerde bağışıklık sisteminin ana görevi doku hemostazını izlemek, vücudu invazyonlara ve enfeksiyöz patojenlere karşı korunak ve zarar görmüş hücreleri ortadan kaldırmaktır (1).

İmmun sistem, yabancı antijenlere karşı hızlı ve etkili bir şekilde hücrel proliferasyonla cevap verir (2).

Bu sistemin primer lenfoid organlarından birisi olan timus immün sistemin gelişim ve devamlılığında önemli rol oynar. Timus aynı zamanda T hücre farklılaşmasının gerçekleştiği bir organdır (3). İmmün komponentlerden birinin kaybı ya da azalması, immün cevapta görevli olan bütün basamakları da etkiler. Bu nedenle kanser ya da enfeksiyöz etkenleri gibi yabancı uyarıcılara karşı cevap verme yeteneği azalır. Bazı durumlarda, kendi antijenlerini yabancı kabul ederek, otoimmün reaksiyonlarda artışa sebep olabilir (2).

İnsan ve hayvan modellerinde immün fonksiyonların yaşla beraber azaldığı bilinmektedir (4,5). Yaşa ilişkin immün yetenek kaybı hem hücrel ve hem de humoral bağışıklıkta ortaya çıkmaktadır. Bu durum, hayatın erken aşamalarında ortaya çıkan timusun involusyonu ile ilgilidir (6). Timus olgun lenfositlerin devamından sorumlu en önemli organ olduğu için, ilerleyen yaşla beraber erken involusyonunun görülmesi, immün sistemin gerilemesinin ana nedeni olarak kabul edilmektedir (7). İnsanlarda involüsyon olgusunda lenfoid doku adipoz doku ile yer değiştirir. Bu değişime bağlı olarak timusun büyüklüğünde belirgin değişim olmamasına rağmen lenfosit oranında belirgin değişimler ortaya çıkmaktadır (8).

İnvolüsyona bağlı olarak yardımcı T lenfositlerinin, baskılayıcı T lenfosit alt tiplerine göre oranlarının değiştiği, immün sistemin hücrel ve sıvısal tepkilerinin azaldığı ve oto immün aktivitenin arttığı bildirilmiştir. Normal T hücre fonksiyonlarının yaşa bağlı olarak azalmasının, timik lenfatik dokunun, özellikle korteks atrofisinin bir sonucu olduğu kabul edilmektedir (9). Timusun T hücrelerini üretme işleminin, yeni doğanlarda oldukça sınırlı ve

timusun involüsyonundan dolayı erişkinlerde ise azalan oranlarda olması, T hücrelerinin yaşlanmaya karşı hassas olduğunu gösteren bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (10). Antikor üreten immunkompeten birimlerin sayısının yaşla azaldığı ve bu durumun T ve B hücre proliferasyonlarındaki azalma, hücreler arası etkileşimin bozulması ve/veya uygun olmayan T/B lenfosit oranından dolayı olduğu bildirilmiştir (8).

Bu bağlamda, yaşa bağlı immun yetersizlik sonucu, enfeksiyon ve kanser vakalarında, özellikle 65 yaş üstü (11) insidans ve prevalans artmaktadır (12).

Lenfositleri ayırt etmek için enzimler üzerinde çalışan araştırmacılar ANAE adı verilen enzimin T lenfositlerde bulunduğunu, B lenfositlerde ise bulunmadığını bildirmişlerdir (13,14,15). Elektron mikroskopik incelemelerde ANAE' nin lizozomal bir enzim olduğu ve tek bir zar tarafından sarılan vezikül benzeri organellerin içerisinde bulunduğu bildirilmiştir (16). Memeli dokularındaki esteraz aktivitesinin, jel elektroforesiz tekniği ile ayrt edilebilen izoenzimler dolayısıyla olduğu rapor edilmiştir (17) ANAE boyama tekniğinde, enzim reaksiyonu, enzimin, inkübasyon solüsyonundaki substratı olan alfa naftil asetatı hidrolize ederek, alfa naftili serbest bırakması esasına dayanmaktadır. ANAE boyama tekniği, gerek smear ve gerekse doku kesitlerine uygulanabilmektedir. Bu boyama tekniğinin önemli avantajlarından birisinin, aynı dokunun immunofloresan boyama metodundan daha iyi bir şekilde ve detaylı olarak incelenebilmesine imkân vermesidir (18). Enzim reaksiyonu basit ışık mikroskobunda kolaylıkla gözlenebilmektedir (19). Metotta kullanılan kimyasallar ucuzdur, reaksiyon ürünü oldukça kromojeniktir, preparatlar uzun süreli olarak korunabilmekte ve defalarca incelenebilmektedir (20).

Yukarıda bahsedilen bilgiler ışığında, lenfositlerin yaşa bağlı olarak timus ve kan dokusundaki varlığının belirlenmesi ile, memelilerde timus ve kan dokusunun yaşa bağlı olarak lenfositlerle ilişkisini gösteren bilgilere yeni bir ışık tutulacağı düşünülmektedir.

Bundan dolayı, bu çalışmada, sıçanlarda, yaşa bağlı olarak timus ve kan dokusunda dokusunda bulunan lenfositlerin histokimyasal ve histometrik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, ağırlıkları 75-250 gr arasında değişen toplam 60 adet dişi *Wistar Albino* sıçan kullanıldı. Hayvanlar 20'şerli 3 gruba ayrıldı. Gruplar prepuberte (1 ay), puberte (2,5 ay) ve ergin (12 ay) olacak şekilde düzenlendi. Ayrı kafeslerde gruplar halinde barındırılan hayvanlar, standart pelet sıçan yemi ve su ile ad libitum olarak beslendi. Biyolojik ritimlerinin düzenliliğini sağlamak için 12 saat yapay ışık ve 12 saat karanlık uygulandı.

Çalışma grubunu oluşturan hayvanlar, eter inhalasyonu ile anesteziye alındı ve dekapite edildi. Hayvanların timus dokuları alınarak alfa naftil asetat esteraz (ANAE) pozitif hücreleri belirlemek için, pH' sı 6.8 olan önceden soğutulmuş tamponlu formol-sukroz solüsyonunda +4 °C'de 22 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra +4 °C'de Holtz solüsyonunda 22 saat tutularak (18) 10 mikron kalınlığında kriyostat (Shandon AS 620, London) kesitleri alındı ve önceden formol jelatin ile kaplanmış lamlara transfer edildi. Preperatlar oda sıcaklığında bir saat kurumaya bırakıldı. ANAE pozitif hücrelerin belirlenmesi için kesitler, Mueller ve arkadaşları (18)'na göre hazırlanan inkübasyon solüsyonunda 5 dakika süreyle boyandı. ANAE enzim boyaması yapıldıktan sonra yıkanan kesitlere, pH'sı 4.2 alan asetat tamponunda çözdürülen % 1'lik metil-green ile 5 dakika çekirdek boyaması uygulandı. Hazırlanan preparatlar, dereceli alkollerden geçirilerek suyu uzaklaştırıldı ve ksilolle parlatıldıktan sonra entellanla kapatıldı. Boyama sonunda hücre zarına yakın veya bitişik olan bir veya birden fazla kırmızı kahverengi granüle sahip hücreler, ANAE pozitif T lenfosit olarak kabul edildi.

Timus dokusundaki ANAE pozitif lenfositlerin değerlendirilmesi

Timustan hazırlanan preparatlar, Nikon Optiphot-2 model araştırma mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi. Timositlerin korteks ve medulladaki sayısal dağılımını saptamak için yapılan hücre sayımlarında 100 kare oküler mikrometre (eyepiece graticule) kullanıldı. Her bir kesit için korteks ve medulla bölgelerinden rastgele seçilen 5 bölgede 40'luk objektif büyütmesinde 100 kare içerisine düşen birim alandaki hücrelerin toplam sayıları belirlendi. Daha sonra belirlenen pozitif hücrelerin sayısı toplam hücre sayısına orantılanarak pozitif hücrelerin yüzde değerleri bulundu (21).

Kan dokusundaki ANAE pozitif lenfositlerin değerlendirilmesi

Bütün dönemlerdeki sıçanların, periferik kan numuneleri, histokimyasal olarak alfa naftil asetat esteraz boyaması için heparinli tüplere alındı. Bu örneklerden hazırlanan preparatlar doku kesitlerine uygulanan inkübasyon solüsyonunda ANEA enzim boyama yöntemine göre, 3 saat süreyle bekletildi.

Kan dokusunun ANAE enzim boyanmasıyla pozitif hücrelerinin, hücre zarına yakın veya bitişik olan kırmızı renkli bir veya birden çok sayıda granül taşıdığı gözlenirken; sitoplazmasında bu tür pozitif reaksiyon vermeyen karakteristik iri çekirdekli hücreler ise B lenfosit olarak kabul edildi.

Kan preparatlarından her grup için toplam 1000 adet lenfosit sayılarak pozitif hücrelerin oranı belirlendi. Timus ve kan dokusundan hazırlanan preparatlar, Nikon Optiphot-2 model araştırma mikroskopunda incelendi ve gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları çekildi.

İstatiksel analizler

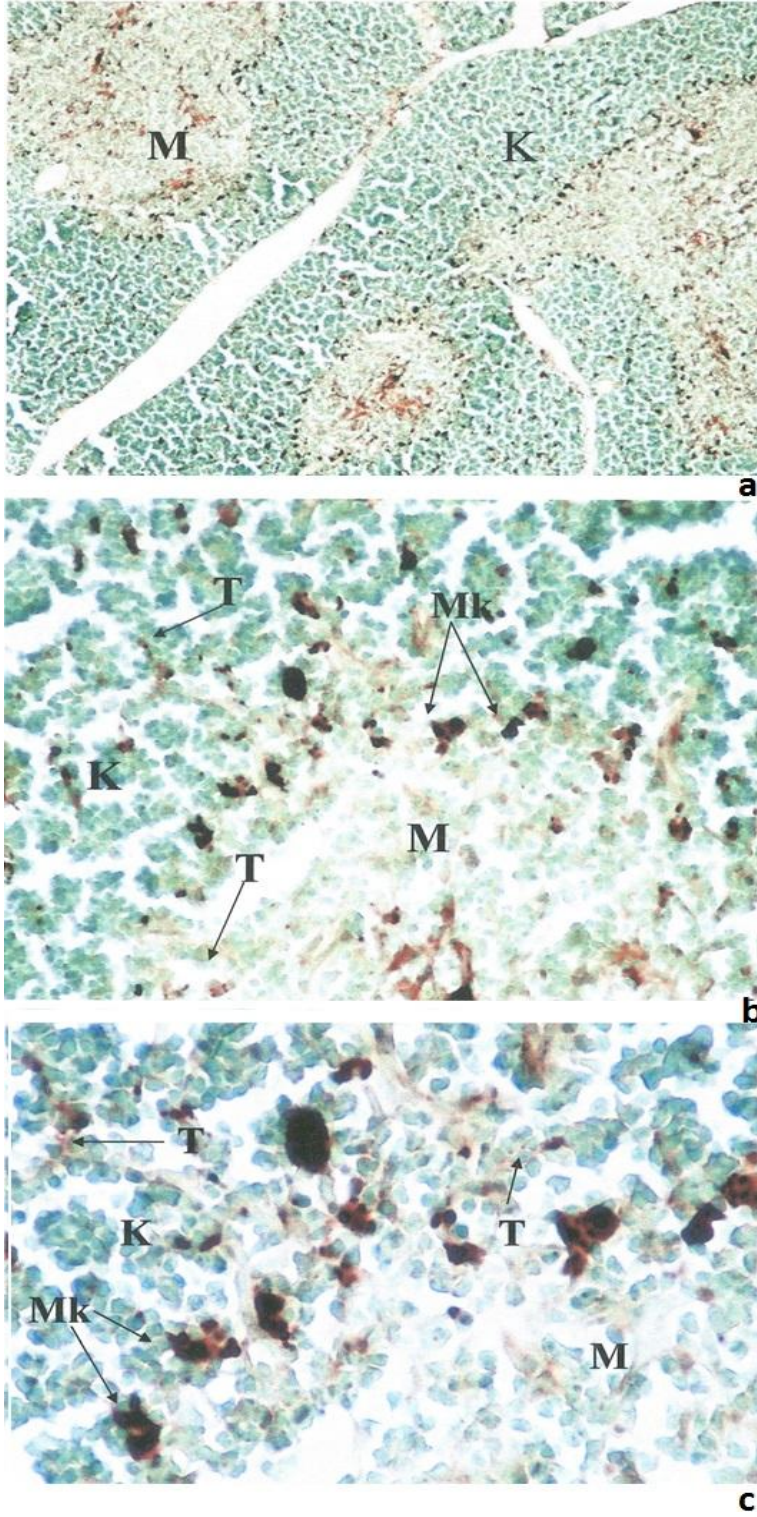
İstatistiksel analizler SPSS (12.0) paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları ortaya koymak için nonparametrik test olan Kruskal Wallis testi, her gruba ait

korteks ve medulla karşılaştırmasında ise Student t testi kullanıldı. Sonuçlar; ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Ayrıca $p<0.05$ değeri anlamlı olarak değerlendirildi (22).

BULGULAR

Timus Bulguları

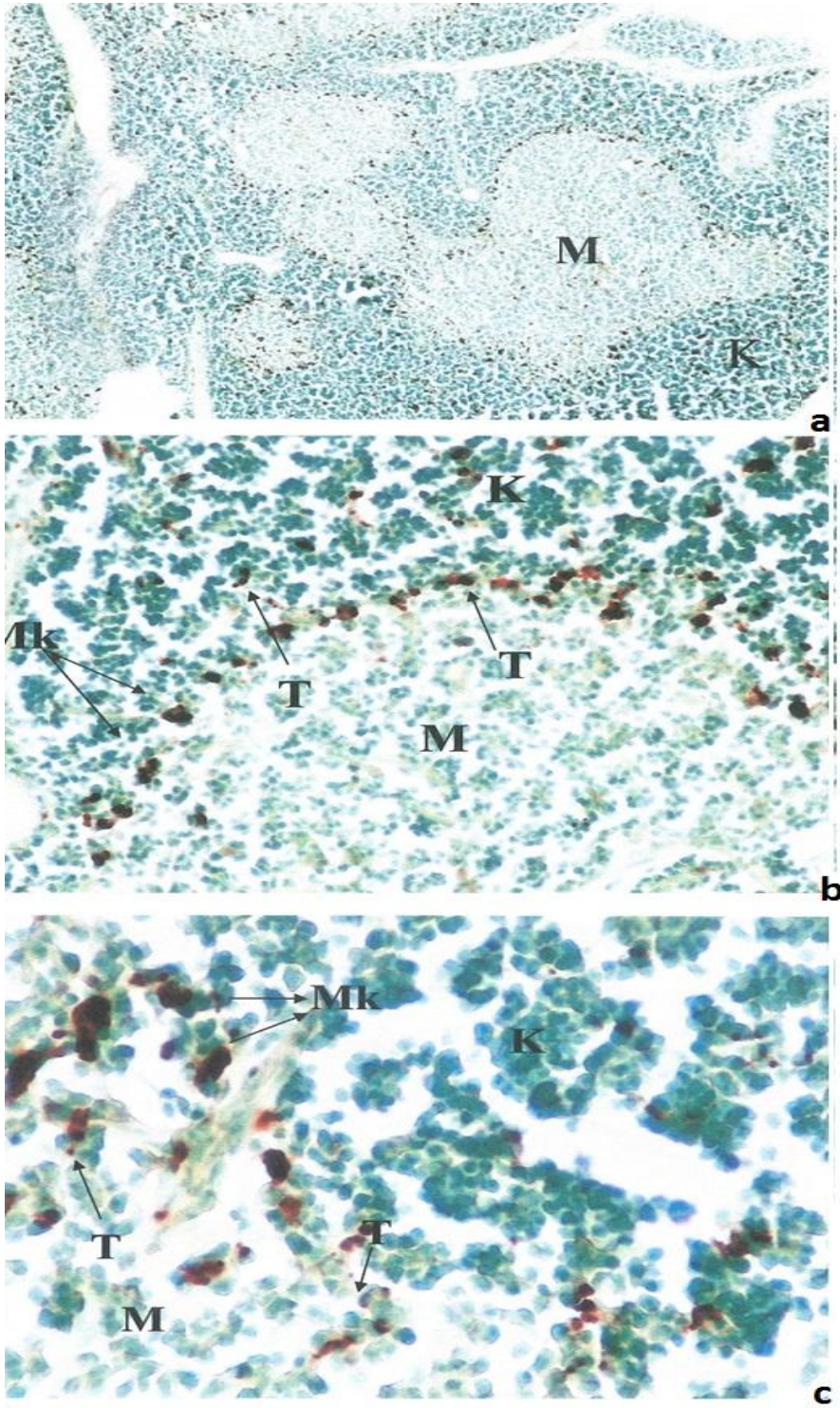
Prepuberte dönemi: Hayvanların timuslarında histolojik olarak korteks medulla ayrımının kolaylıkla belirlendiği, korteksin medullaya göre daha yoğun hücre içerdiği ve buna bağlı olarak daha koyu boyandığı gözlemlendi. Pozitif lenfositlerin sitoplazmalarının bir tarafında kırmızıdan kahverengiye kadar değişen renklerde, hücre zarına bitişik, tek ya da çift nokta tarzında boyama gözlemlendi. Yapılan incelemede ANAE pozitif lenfositlerin korteks ve medullada eşit bir dağılım göstermediği belirlendi. ANAE pozitif lenfositlerin dış korteks bölgesinde seyrek görüldüğü, ancak korteksin kortikomedullar kesişim bölgesine yakın kısımlarında ise bu sayının arttığı gözlemlendi. Medullada ise ANAE pozitif lenfosit sayısı kortekse göre fazla olduğu bulundu. Timusun ANAE enzim boyamasında, korteks ve medulladaki ANAE pozitif lenfositler heterokromatik çekirdekli olup az bir sitoplazmaya sahip olduğu bulundu. Makrofaj benzeri hücreler ise daha çok kortikomedullar kesişim bölgesinde olduğu belirlendi. İrili ufaklı granüllere sahip olan ve oldukça koyu boyanan bu hücreler, kortekste düzensiz dağılım gösterirken, kortiko-medullar kesişim bölgesinde düzenli bir dizilim göstermekteydiler (**Şekil 1**). Prepuberte dönemindeki hayvanlardan hazırlanan timus doku kesitlerinde ANAE pozitif lenfosit sayımlarında kortekste hücrelerin oranı 7.11 ± 0.78 iken, medullada ise bu oran 26.47 ± 2.89 olarak saptandı.



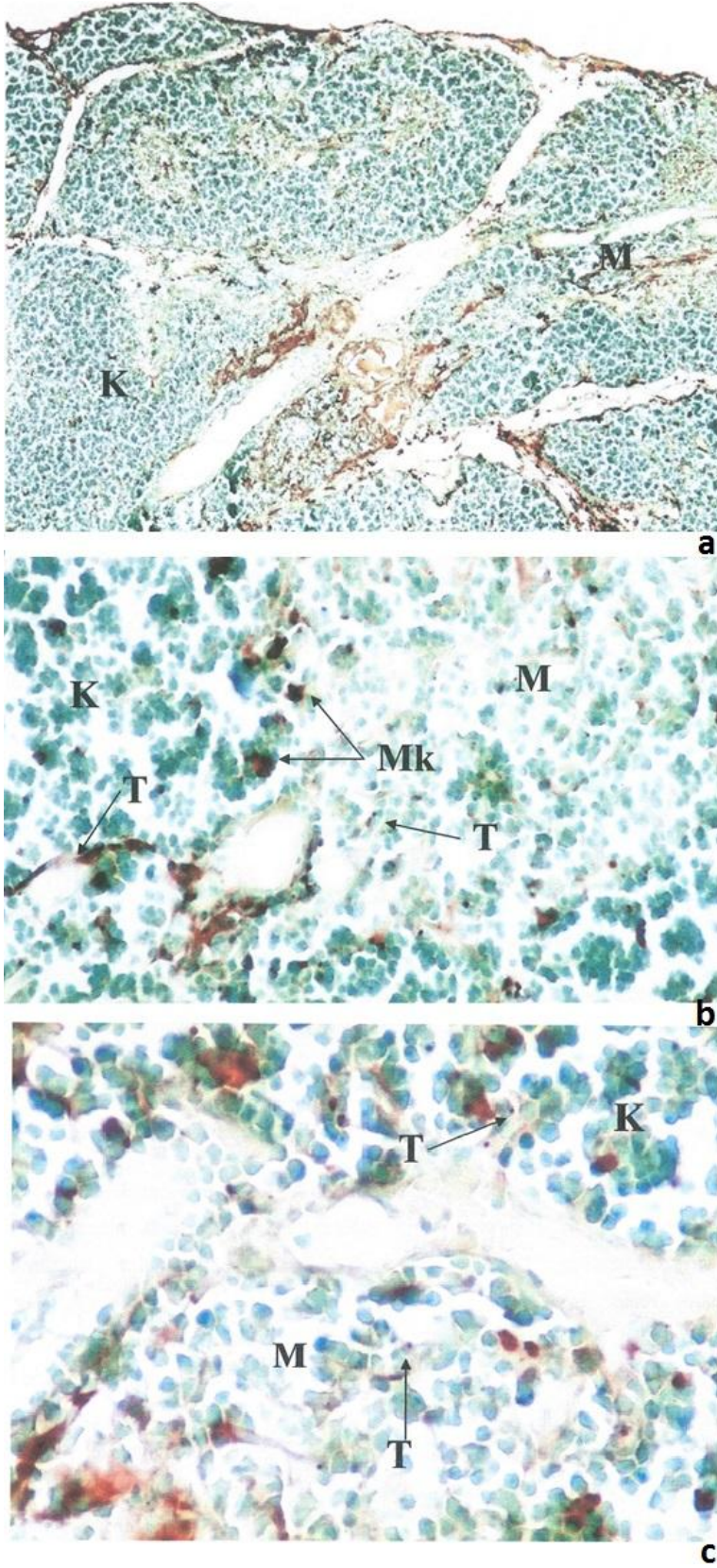
Şekil 1. a) Prepuberte dönemindeki timusun genel görüntüsü., ANAE X 90. b) ANAE X 240, c) ANAE X 420. K: Korteks, M: Medulla, T: Pozitif lenfositler, Mk: Makrofaj benzeri hücre.

Puberte dönemi: Timus dokusunun loblanması ve korteks medulla ayrımı prepuberte dönemine benzer olduğu gözlemlendi. Korteks, timosit sayısındaki yoğunluk sebebiyle medullaya göre daha koyu olarak boyandı. Makrofaj benzeri hücrelerin lokalizasyonu prepuberte döneminde olduğu gibiydi. Bu dönemde korteks ve medulladaki ANAE pozitif lenfosit sayısında prepuberte dönemine kıyasla belirgin bir artış vardı. ANAE pozitif lenfositlerin yerleşim bölgelerinin prepuberte dönemi ile benzerlik gösterdiği bulundu (**Şekil 2**). Puberte dönemindeki hayvanlardan hazırlanan timus dokusu kesitlerinde ANAE pozitif lenfosit sayımlarında kortekste hücrelerin oranı 20.77 ± 2.06 iken, medullada ise bu oran 65.16 ± 5.57 olarak belirlendi.

Ergin dönem: Hem korteks hem de medullada hücre yoğunluğunun önemli derecede azaldığı belirlendi. Bu dönemde kortiko-medullar sınırdaki makrofaj benzeri hücrelerin oldukça azaldıkları gözlemlendi (**Şekil 3**). Ergin dönemdeki hayvanlardan hazırlanan timus dokusu kesitlerinde ANAE pozitif lenfosit sayımlarında kortekste hücrelerin oranı 5.1 ± 0.44 iken, medullada 12.5 ± 1.33 oranında olduğu bulundu.



Şekil 2. a) Puberte dönemindeki timusun genel görünümü, ANAE X 90. b) ANAE X 220, c) ANAE X 420. K: Korteks, M: Medulla, T: Pozitif lenfositler, Mk: Makrofaj benzeri hücre.



Şekil 3. a) Ergin dönemindeki timusun genel görünümü, ANAE X 90. b) ANAE X 240, c) ANAE X 420. K: Korteks, M: Medulla, T: Pozitif lenfositler, Mk: Makrofaj benzeri hücre.

Timusta korteks ve medullada bulunan toplam ANAE pozitif lenfosit dağılımı prepuberte döneminde %33.58±3.67, puberte döneminde %85.93±7.63 ve ergin dönemde %17.60± 1.77 olarak belirlendi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde ANAE pozitif lenfositlerin en fazla puberte, en az ergin dönemde bulunduğu; prepuberte döneminde ise ergin döneme göre bu sayının anlamlı bir şekilde fazla olduğu saptandı. Bu dağılım medulla için de benzerdi. Yapılan hücre sayımlarında, timus dokusunda korteks ve medullada ANAE pozitif reaksiyon vermeyen toplam lenfositlerin dağılımı prepuberte, puberte ve ergin dönem için sırası ile % 66.5±5.34, % 14.03± 1.12 ve % 82.63±5.57 olarak belirlendi (**Tablo 1**).

Tablo 1. Prepuberte, puberte ve ergin dönemlere ait timus dokusundaki korteks ve medullada bulunan ANAE pozitif lenfositlerin dağılımı

DÖNEMLER	KORTEKS (ANAE+) (n=20) (Student t-test, ortalama ± SD olarak değerlendirildi)	MEDULLA (ANAE+) (n=20) (Student t-test, ortalama ± SD olarak değerlendirildi)	KORTEKS+MEDULLA(ANAE+) (n=20) (Kruskal-Wallis test, ortalama ± SD olarak değerlendirildi)
Prepuberte	% 7.11 ± 0.78 ^a	% 26.47 ± 2.89 ^b	% 33.58 ± 3.67 ^g
Puberte	% 20.77 ± 2.06 ^c	% 65.16 ± 5.57 ^d	% 85.93 ± 7.63 ^h
Ergin	% 5.1 ± 0.44 ^e	% 12.5 ± 1.33 ^f	% 17.60 ± 1.77 ¹

^a p<0,01 prepubertal korteks ile medulla ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında

^c p<0,01 pubertal medulla ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında

^e p<0,05 ergin medulla ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında

^g p<0,01 prepubertal korteks ile prepubertal korteks + medulla ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında

^h p<0,001 puberte korteks ile puberte korteks + medulla ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında

¹ p<0,05 ergin korteks ile ergin korteks+medulla ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında

Kan Froti Bulguları

Kan dokusunda yapılan sayımlarda ANAE pozitif lenfositlerin prepubertedeki oranı %29±3.23 bulunurken, pubertedeki bu oran %73±5.67 idi. Ancak ergin dönemde bu oran %52±3.78'e gerilemişti. ANAE pozitif lenfosit sayılarının prepuberte döneminde oldukça az, puberte döneminde en fazla, ergin dönemde ise puberteye göre az ancak prepuberte dönemine göre fazla olduğu saptandı. ANAE negatif lenfositlerin prepubertedeki oranı %71±4.77

bulunurken, pubertedeki bu oran 27 ± 2.78 idi. Ergin dönemde ise bu oran 48 ± 3.44 'e yükselmişti. ANAE negatif lenfosit sayılarının puberte döneminde oldukça az, prepuberte döneminde en fazla, ergin dönemde ise prepuberteye göre az ancak puberteye göre fazla olduğu saptandı (**Tablo 2**).

Tablo 2. Kan dokusunda prepuberte, puberte ve ergin dönemlerde ANAE pozitif ve ANAE negatif lenfositlerin dağılımı

DÖNEMLER	ANAE(+): (Kruskal-Wallis test, ortalama \pm SD olarak değerlendirildi)	ANAE (-):(Kruskal-Wallis test, ortalama \pm SD olarak değerlendirildi)
Prepuberte	29 ± 3.23 ^a	71 ± 4.77 ^d
Puberte	73 ± 5.67 ^b	27 ± 2.78 ^c
Ergin	52 ± 3.78 ^c	48 ± 3.44 ^f

Bu istatistiksel analiz için Kruskal -Wallis testi uygulandı. Bulgular ortalama \pm SD olarak değerlendirildi. n = Her grup için 20 adet sıçan içermektedir.

^a **p < 0,01 pubertal ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında**

^b **p < 0,05 ergin ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında**

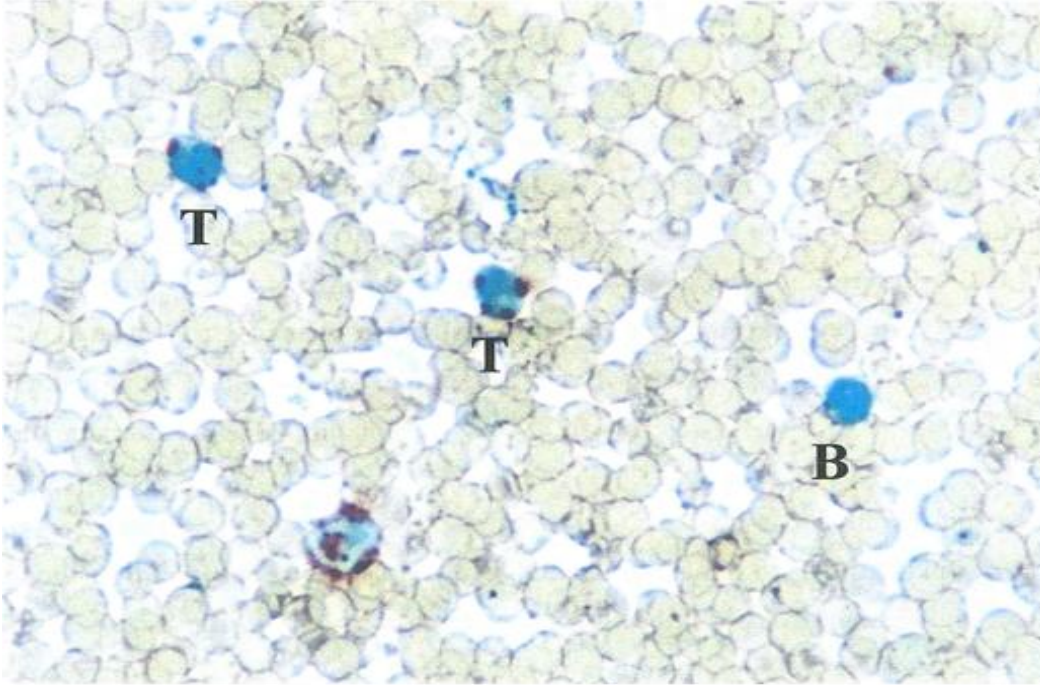
^c **p < 0,05 prepubertal ANAE (+) lenfositler ile karşılaştırıldığında**

^d **p < 0,01 pubertal ANAE (-) lenfositler ile karşılaştırıldığında**

^e **p < 0,05 ergin ANAE (-) lenfositler ile karşılaştırıldığında**

^f **p < 0,05 prepubertal ANAE (-) lenfositler ile karşılaştırıldığında**

ANAE pozitif lenfositlerin hücre zarına yakın veya bitişik, kırmızı renkli, bir veya birden çok sayıda granül taşıdığı gözlemlendi. Pozitif reaksiyon vermeyen karakteristik iri çekirdekli lenfositler de B lenfosit olarak değerlendirildi (**Şekil 4**).



Şekil 4. Kan dokusundaki lenfositler. T: Pozitif lenfositler , B:Negatif lenfosit.

TARTIŞMA

Bu çalışma, sıçanlarda yaşa bağlı olarak timus ve perifer kan dokusunda bulunan lenfositlerin histokimyasal ve histometrik yöntemlerle belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

ANAE ile yapılan boyamalarda insan (21,23) ve farelerde (18) timus lenfositlerinin sitoplazmalarında kırmızıdan kahverengiye kadar değişen renkte, granüler görünümdeki pozitifreaksiyon, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik sergilemektedir.

Prepuberte ve puberte dönemindeki farelerde yapılan bir çalışmada, timus medullasındaki yoğun boyanmaların korteks medulla sınırına doğru giderek azaldığı, dış kortekste ise boyanma olmadığı bildirilmiştir (18). İnsanlarda yapılan bir çalışmada medullada pozitif kortekste ise negatif ANAE reaksiyonu bildirilmiştir (24). İmmunohistokimyasal olarak incelenen domuz ve sığır timuslarında, medullada yoğunlaşan immunpozitifliğin korteks bölgesinde daha az olduğu rapor edilmiştir (25, 26). İnsanlarda

fetal dönemden ergin döneme kadar devam eden bir çalışmada (21), timusta ANAE pozitif lenfositlerin, kortiko-medullar kesişim bölgesi ve medullada dağılım gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Knowles ve ark ergin insan timusunda, kortikal yerleşimli olgunlaşmamış timositlerin çoğunlukla ANAE negatif, medulladaki olgun timositlerin ise ANAE pozitif reaksiyon verdiğini ortaya koymuşlar ve olgun olmayan insan timositlerinin ANAE aktivitesini olgunlaşma sırasında kazanıldığını ileri sürmüşlerdir (27). Basso ve ark. ise insanlarda, T lenfositlerin enzim aktivitesinde olgunlaşmaları sırasında kademeli bir artış olduğunu saptamışlar ve olgun olmayan timositlerdeki ANAE ile negatif, olgunlaşma ilerledikçe ANAE ile pozitif reaksiyon verdiğini belirlemişlerdir (14). İnsanlarda neoplastik lenfoid dokulardaki olgunlaşmamış lenfositlerin ANAE aktivitesini olgunlaşma sırasında kazandıkları, blast transformasyon sırada ise bu aktivitelerini kaybettikleri bildirilmiştir (27) . Bu çalışmada prepuberte, puberte ve ergin dönemlerin tamamında timustaki ANAE reaksiyonlarının korteksin dış kısmında çoğunlukla negatif, kortikomedullar sınıra yakın korteks bölgesinde ve medullada ise çoğunlukla pozitif olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular, mevcut tüm literatür bulguları ile örtüşmektedir. Ancak, korteksin dış kısmında saptadığımız nadir ANAE pozitif reaksiyonlar sadece Knowles ve Halper'in insanlarda bu bölgelerde negatif olarak bildirdikleri sonuçlar ile uyuşmamaktadır (24). Bulgularımızın literatür bulguları ile benzerliği, korteksteki ANAE negatif hücrelerin olgunlaşmamış oldukları, ancak diğer bölgelerdeki ANAE pozitif lenfositlerin ise olgunlaşmış hücreler oldukları görüşünü desteklemektedir.

İnsanlarla sıçanlar arasındaki yaşam süresi ve yaşam dönemleri farkından dolayı prepuberte, puberte ve ergin dönemlerin insan ve sıçanlar arasında yorumlanması gerekir. İnsanlar için prepuberte dönemi 0-12 yaş, puberte dönemi 13-19 ve ergin dönem ise 20-60 yaş arası kabul edildiğinden (28) gelişim devreleri ile ilgili yapılan kıyaslamalarda buna dikkat edilmiştir.

İnsanlarda prepubertal dönemde yapılan çalışmalarda, Basso ve ark.(14) timus hücre süspansiyonlarında toplam ANAE pozitif lenfosit oranını korteks ve medulla toplamı şeklinde % 34,5 Knowlwe ve Halper (24) ise % 9.5 olarak bildirmiştir.

Bu çalışmada ise prepuberte döneminde sıçan timus dokusu kesitlerinde ANAE pozitif lenfositlerin oranı kortekste % 7.11 ± 0.78 , medullada % 26.47 ± 2.89 iken, toplam olarak değerlendirildiğinde ise % 33.58 ± 3.67 olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımız Basso ve ark (14). ile uyumlu iken, Knowlwe ve Halper'e göre düşüktür (24).

İnsanlarda puberte döneminde kortekste ANAE pozitif hücre oranını % 10, medullada ise %29 olarak bildirilmiştir (21). Genç maymunlarda ise hücre süspansiyonlarında toplam ANAE pozitif lenfosit oranını % 91 olarak bildirilmiştir (29). Bizim çalışmamızda puberte dönemindeki hayvanlarda ANAE pozitif T lenfositler kortekste % 20.77 ± 2.06 , medullada ise % 65.16 ± 5.57 ve toplam olarak da % 85.93 ± 7.63 oranında bulunmuştur. Sonuçlarımız maymunlarda bildirilen değerlere (29) yakın iken, insanlar için bildirilen değerlere (21) göre ise yüksektir. Bu durum büyük bir olasılıkla insan ve hayvanların farklı devrelerde savunma mekanizmalarının da farklı olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

İnsanlarda ergen dönemde Pinkus ve ark. (30) kortekste % 4, medullada % 16 oranında ANAE pozitiflik bildirirken, hücre süspansiyonu şeklinde yapılan çalışmalarda toplam ANAE pozitiflik oranları, Knowles ve Halper (24) ve Knowles ve ark. (27) tarafından sırasıyla % 22.22 ve % 25 olarak kaydedilmiştir. Ranki ve ark. (31) ergin farelerin hücre süspansiyonlarda toplam ANAE pozitiflik oranını % 35 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızdaki ergen döneme ilişkin ANAE pozitiflik oranı kortekste % 5.1 ± 0.44 , medullada % 12.5 ± 1.33 ve toplamda da % 17.6 ± 1.77 olarak bulundu. Bu oranlar Pinkus ve ark. (30) 'nın verdiği oranlara çok yakın olarak bulunurken, süspansiyonlar ile kıyaslanacak olursa toplam oranlarımızın Knowles ve Halper (24) 'in verilerine yakın, Knowles ve ark. (27) 'nın

ve Ranki ve ark. (31)'nin bulgularına göre ise düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılığın olası nedenleri yaş, tür ve sığıncıların farklı evrelerde olması olabilir.

Kan dokusu

İnsanlarda (13,20) ve sığıncılarda (32) perifer kan dokusuna ilişkin ANAE boyamalarda pozitif T lenfositlerin 1-2 adet, kedilerde (33) ise çoğunlukla 1-3 adet arası kırmızı renkli granül taşıdığı bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda (20,23) insanlarda kırmızı kahverengi renkte tek bir granülden de bahsedilmektedir. Bizim çalışmamızdaki granüllerle ilgili bulgular yukarıdaki literatür verileriyle uyumludur.

İnsanlarda, yeni doğanlarda periferik kan örneklerinde ANAE pozitif lenfositlerin oranı % 27.8± 10.5, 2-12 aylık dönemdeki bebeklerde ise % 48.4± 12.1 olarak bildirilmiştir (34). Yeni doğan sığıncılarda periferik kan örneklerinde bu oran % 60 olarak bildirilirken, 7 günlük yavrualarda % 38 gibi düşük bir rakam ifade edilmiştir (35).

Sunulan bu çalışmada, sığıncılarda prepuberte dönemine ilişkin olarak %29 ±3,23 olarak bulunan ANAE pozitif lenfosit oranının, yukarıda bahsedilen Wado ve ark.(34)'nın yeni doğan bebeklerde ve Aştı ve ark.(35)'nin 7 günlük buzağılarda bulmuş oldukları sonuçlar ile uyumlu olduğu; 2-12 aylık insan (34) ve yeni doğan buzağılarda (35) belirtilen oranlara göre ise oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda puberte dönemindeki sığıncılarda %73±5.67 olarak bulunan oran, kedilerde %83±4.93 olarak bildirilen oranlar ile uyum gösterirken (33), sığıncılarda %1.75 olarak bildirilen oran ile uyumlu olmadığı tespit edilmiştir (35). Bu uyumsuzluğun olası nedeni olarak hayvan cinsleri ve yaş dönemlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir.

Periferik kan dokusunda ANAE pozitif lenfosit oranları ergin insanlarda %54.2 ± 10.5 (34), %52.7±6.2 (36) ve %80 (37); ergin sığıncılarda ise %47.7 (38), %68 (39), %64.2±4.9 (40),

%51±2.8 (41), %65.47 (35); ergin kurbağalarda %61.77 (42) olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ergin sıçanlarda %52±4.78 olarak saptanan oranlar Wado ve ark. (34) ile Otis ve ark. (36)'nın insanlarda, Çelik ve ark.(41)'nın ise sığırlarda yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri bulgular ile uyumlu iken, Bergroth ve ark.(37) 'nın insanlarda, Paul ve ark. (39), Yang ve ark. (40) ve Aştı ve ark. (35)'nın sığırlarda ve Klempou ve Cooper (42)'nin kurbağalardaki bulguları ile farklılık göstermektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada timusta prepuberte, puberte ve ergen dönem için korteks ve medullada bulunan toplam ANAE pozitif lenfosit dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde en fazla puberte, daha sonra prepuberte ve en az da ergin dönemde bulunduğu tespit edilmiştir. Kan örneklerinde ise puberte döneminde en fazla olan ANAE pozitif lenfosit sayısının ergen dönemde azaldığı ve en az da prepuberte döneminde olduğu saptanmıştır.

Timus olgun lenfositlerin devamından sorumlu en önemli organ olduğu için, ilerleyen yaşla beraber erken involusyonunun görülmesi, immun sistemin gerilemesinin ana nedeni olarak kabul edilmektedir (7). Timusun T hücrelerini üretme işleminin, yeni doğanlarda oldukça sınırlı ve timusun involüsyonundan dolayı erişkinlerde ise azalan oranlarda olması, T hücrelerinin yaşlanmaya karşı hassas olduğunu gösteren bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (10). Bu çalışma sonunda elde ettiğimiz bulgulara göre, bu T hücre popülasyonlarında yaşlanma sonucu belirgin bir azalma olduğu dikkati çekmiştir. İmmun komponentlerden birinin kaybı ya da azalması, immun cevapta görevli olan bütün basamakları da etkiler. Bu nedenle kanser ya da enfeksiyöz etkenleri gibi yabancı uyarıcılara karşı cevap verme yeteneği azalır. Bazı durumlarda, kendi antijenlerini yabancı kabul ederek, otoimmun reaksiyonlarda artışa sebep olabilir (2).

Bu konuda yapılacak çalışmaların timus dokusunun involusyon mekanizmalarına ve özellikle de bu sürecin tersine çevrilmesine yoğunlaşması, elde edilecek başarılar doğrultusunda kan dolaşımına olgun lenfosit verilme döneminin uzatılabilmesi, potansiyel yaşlı bireylerde bağışıklık fonksiyonunu artırmak için etkin tedavi yöntemlerinin ortaya çıkabileceği yönünde kanaat oluşmuştur.

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi (2005) Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Doktora tezi olarak yapılan çalışmanın verilerinden elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Karin E. de Visser, Alexandra Eichten, Lisa M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Coussens Nature Reviews Cancer* volume 2006;6:24–37.
2. Kay BMM. The thymus : Clock of immunologic aging?. *J Invest Dermatol* 1979;73,29-38.
3. Gillis S, Kozak R, Durante M. Immunological studies of aging Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. *J.Clin. Invest* 1981;67,937.
4. Utsuyama M, Hirokawa K, Kurashima C et all. Differential age-change of CD4 + CD45RA + and CD4 + CD29+ T cells subsets in human peripheral blood. *Mech Ageing Dev* 1992;10:57–68.
5. Hirokawa K, Utsuyama M, Makinodan T. Immunity and ageing. In: *Principles and Practice of Geriatric Medicine*. 4. Pathy MSJ, Sinclair AJ, Morley JE, editor. John Wiley and Sons, 2006:19–36.
6. Scholz JL, Diaz A, Riley RL et all. *Curr Opin Immunol: A comparative review of aging and B cell function in mice and humans*. *Epub* 2013;4:504-510.
7. Fabris N. *Immunology and Aging*. *Experientia*, 1981;37:1041-1043
8. Sigal HL, Ron Y. *Immunology Inflammation*, McGraw-Hill, Inc, USA 1994.
9. Nociari MM, Telford Wand Russo C. Postthymic development of CD28 CD8+ T cellsubset: Age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype. *J Immunol* 1999; 162:6,3327-3335.
10. Hirokawa K. Understanding the mechanism of the age-related decline in immune function. *Nutr Rev* 1992; 50(12):361-366.
11. Caruso C, Lio D, Cavallone L et all. Aging, longevity, inflammation and cancer. *Ann NY Acad Sci* 2004;1028:1-13.
12. Hurme M. Immunity in the elderly. Article in *Finnish, Duodecim* 2013;18:1878-1885.
13. Higgy EK, Bums FG, Hayhoe JGF. Discrimination of B, T and null lymphocytes by esrerase cytochemistry. *Scand J Haematol* 1977;18:437-448.

14. Basso G, Cocito GM, Semenzato G et all. Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol* 1980; 44: 577- 582.
1. 15.Yang TJ, Patricia JA, Williams LF. Acid alpha naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. *Immunology* 1979;38:85-92.
15. Monahan AR, Dvorak FH and Dvorak MA. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes, *Blood*, 1981;58: 6.
16. Li CY, Lam W and Yam LT. Esrereses in leucocytes, *J Histochem Cytochem*, 1973;21:1-12.
17. Mueller G, Buerki H, Keller HWM and Cottier H . Nonspecific acid esterase activity. A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes, *Eur J Immunol.* 1975;5;:270-274.
18. Hovmark A. Acid a. naphthyl acetate esterase staining of T lymphocytes in human skin, *Acta Derm Venereal*, 1977;57:497-502.
19. Knowles MD and Holck S. Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alfa naphthyl acetate esterase, *Lab Invest*, 1978;39(1):70-76.
20. Palestra G, Valente G, Micca BV et all. Detection and distribution of alfa-naphthyl acetate esterase activity in thymocytes of normal myasthenic thymus and thymoma. *VirchowsArch B C ell Pathol* 1980; 35: 33-43.
21. Özdamar, K. Spss ile Biyoistatistik, Yenilenmiş 5. baskı, Ankara: Kazan Kitapevi, 2003.
22. Kulenkumh J, Janossy G, Greaves MF. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: A marker for T lymphocytes. *Br J Haematol* 1977;36:231-240.
23. Knowles MD, Halper PJ. Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid a. naphthyl acetate esterase (ANAE) activity. *J Immunol* 1980; 6:2823-2825.
24. Bianchi ATJ, Zwart RJ, Jeurissen SHM et all. Development of the B and T cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life: An immunohistological approach. *Vet Immunol Jmmunopathol* 1992;33:201-221.
25. Djilali S, Dacosta B, Kessler JL et all. Preparation and characterization of a monoclonal antibody against bovine CDS lymphocyte surface antigen. *Comp Immun Microhiol Infect Dis* 1991;3:257-263.
26. Knowles MD, Halper PJ, Machin AG et all. Acid a. naphthyl acetate esterase activity in human neoplastic lymphoid cells. *Am J Pathol* 1979;1:257-270.
27. Demir R. İnsanın Gelişimi implantasyon Biyolojisi. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 1995.
28. Kato S, Kurihara K. Nonspecific esterase activity in monkey lymphocytes: Study of distribution in lymphocyte subpopulation,. *Experientia* 1981 37:1026-1027.
29. Pinkus SG, Hargreaves KH, McLeod AJ et all. A naphthyl acetate esterase activity: A cytochemical marker for T lymphocytes. *Am JPathol* 1979; 97: 17-42.
30. Ranki A, Totterman TH, Hayry P. Identification of mouse T and B lymphocytes from cytocentrifuged cell smears. *Clin Exp Immunol* 1976; 26: 632.
31. Kajikawa O, Koyama H, Yoshikawa T et all. Use of apha-naphtyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am J VetRes* 1982; 8: 1549-1552.

32. Yörük M, Aştı NR, Kurtdere N et all. Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of the peripheral blood T lymphocytes in Van Cats. *Anat Histol Embryol* 1998; 27:289-292.
33. Wada N, Prieur AM, Griscelli C. Nonspecific alpha naphthyl acetate esterase activity of T lymphocytes: Study in healthy newborn and children, in immune deficiencies and juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatr Res* 1981; 15: 1266- 1270.
34. Aştı NR, Çelik İ, Kadak R ve ark. Farklı yaşlardaki sığırların kan T lenfosit oranlarında görülen değişiklikler. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 1993;3:2.
35. Otis LL, Larsen AE. Identification of T lymphocytes by a histochemical stain for alpha naphthyl acetate esterase activity. *Am J Med Technol* 1982;5: 367-370.
36. Bergroth V, Konttinen YT, Rettamo S. A method for the identification of human peripheral blood T lymphocytes by sequential immunogold and esterase double staining. *J Histochem Cytochem* 1983; 6: 837-839.
37. Windmill FK, Meade BJ, Lee KWV. Effect of prepubertal gonadectomy and sex steroid treatment on the growth and lymphocyte populations of the rat thymus. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 73-81.
38. Paul PS, Senogles DR, Muscoplat CC et all. Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytic cattle. *Clin Exp Immunol* 1979; 35: 306-316.
39. Yang TJ, Patricia JA, Williams LF. Acid alpha naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. *Immunology* 1979; 38: 85-92.
40. Çelik İ, Vural Ö, Dönmez H ve ark. Determination of percentages in peripheral blood and tissue localization of T-lymphocytes in fetal and adult lymphoid tissues of cattle by the histochemical demonstration of alpha-naphthyl acetate esterase. *Veterinarianum* 1993;1:10-17.
41. Klempau EA, Cooper LE. T-lymphocytes and B lymphocytes in Anuran Amphibians: T-lymphocytes proportions, distribution and ontogeny, as measured by E-rosetting, nylon wool adherence, postmetamorphic thymectomy and non specific esterase staining. *Dev Comp Immunol* 1983;7:99-110.