

# **HİPOKSİNİN, DOĞUMSAL KALP HASTALIKLI ÇOCUKLARIN TİMUS DOKULARINDAKİ ETKİLERİNİN, APOPTOZ, KÖK HÜCRELER VE ANJİOGENEZ İLE OLAN İLİŞKİLERİ: Morfolojik ve immünohistokimyasal çalışma.**

**A. Bahar Ceyran, Serkan Şenol, Füsun Güzelmeriç,  
Eylem Tunçer, Aybala Tongut, Babürhan Özbek,  
Ömer Şavluk, Abdullah Aydın, Hakan Ceyran**

**İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğt. Araş. Hastanesi Patoloji A.B.D.  
İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas EAH. Pedyatrik Kalp Cerrahisi Kliniği.**

# GİRİŞ

- Timus, T lenfosit maturasyonunu sağlayan ve ön mediastende yer alan lenfoepitelial bir organdır.
- Korteks ve medulla alanlarını içerir.
- Endoderm kökenli epitelial hücreler ve kemik iliği kökenli lenfositler iki ana hücre komponentini oluşturur. Ayrıca, karakteristik Hassal cisimciklerini içerir.
- Fetal periyot sonunda en büyük boyuttadır ve puberteye kadar da bir miktar büyüyerek 30-40 gr. ağırlığa ulaşır. Yaşla birlikte yavaş yavaş küçülür.

- Yeni doğanların ortalama % 0.4 ile 1.2 kadarında orta derecede veya Őiddetli doğumsal kalp hastalığı (DKH) görülür.
- DKH etyolojik olarak heterojen olup, genetik ve çevresel faktörler rol oynar.
- En sık asiyanotik doğumsal defekt ventriküler septal defekt, en sık siyanotik doğumsal defekt ise Fallot tetralojisidir.

- Doğumsal kalp hastalıkları, çocukluk çağı periyodunda, hipoksi, pulmoner hipertansiyon, tekrarlayan akciğer enfeksiyonları, malnutrisyon ve büyüme geriliğine yol açar.
- Çeşitli stres durumları ise timusun involusyonunu hızlandırır ve glandın histolojik yapısında değişikliklere neden olur.

- Tümöral dokularda hipoksik strese bağlı HIF-1 alfa aktivasyonunun kötü prognozla ilişkisinin olduğu yönünde araştırmalar mevcuttur.
- Bunun yanısıra, HIF-1 alfanın inaktive edilmesinin, progresyonu durdurucu ve prognozu iyileştirici etkisi olduğu düşünölmektedir.
- Bu çalışmada, siyanotik ve asiyanotik DKH lı çocukların, cerrahi kardiyak düzeltme operasyonları esnasında çıkarılan timus dokuları histomorfolojik ve immunohistokimyasal (İHK) olarak değerlendirilmiştir.

# AMAÇ

- Çalışmanın amacı, tümöral dokudaki hipoksik strese benzer şekilde DKH'ı zemininde oluşan timusdaki hipoksinin HIF-1 alfa ekspresyonu, apoptoz, regülätör T hücreleri, kök hücreler ve anjiogenez ile olan ilişkisinin araştırılmasıdır.

# MATERYAL METOT

- Çalışmaya, 2013-2015 yılları arasında İstanbul Kartal Koşuyolu Eğitim ve Araştırma Hastanesinde, DKH ı nedeniyle opere edilmiş olan toplam 76 hastaya ait timus dokuları dahil edildi.
- Bunlardan 38 tanesinin kan oksijen saturasyonları % 85 in altında olup siyanotik DKH ı olan hipoksi grubudur. Diğer 38 hasta ise asiyanotik DKH ı olan, kan oksijen saturasyonu % 95 in üstündeki normal gruptur.





- Cerrahi kardiyak düzeltme operasyonları esnasında subtotal veya total çıkarılan timus dokuları % 10 luk formalin içinde 24 saat fikse edilmiştir.
- Timus parçaları rutin otomatik takip (Leica otomatik takip cihazı) sonrasında parafin bloklara gömülmüş ve 4-5 mikron kalınlıktaki kesitler H.E. ile boyanmıştır.

- H.E. boyalı kesitler, önce mikroskopik morfolojik bulgular yönünden niteliksel olarak değerlendirildi.
- Ayrıca İHK olarak HIF-1 alfa, FoxP3, CD44, Bcl-2 ve CD34 boyamaları ile nükleer veya sitoplazmik membranöz boyanma özelliğine göre, ışık mikroskopunda semikantitatif değerlendirme yapıldı.
- Her belirteç için boyanma yoğunluk ve oranına göre 1,2 ve 3 pozitif skorlar verildi.

# Tablo 1: İHK belirteçlerin boyanma, sayısı, yoğunluk ve yerleri (özellikleri):

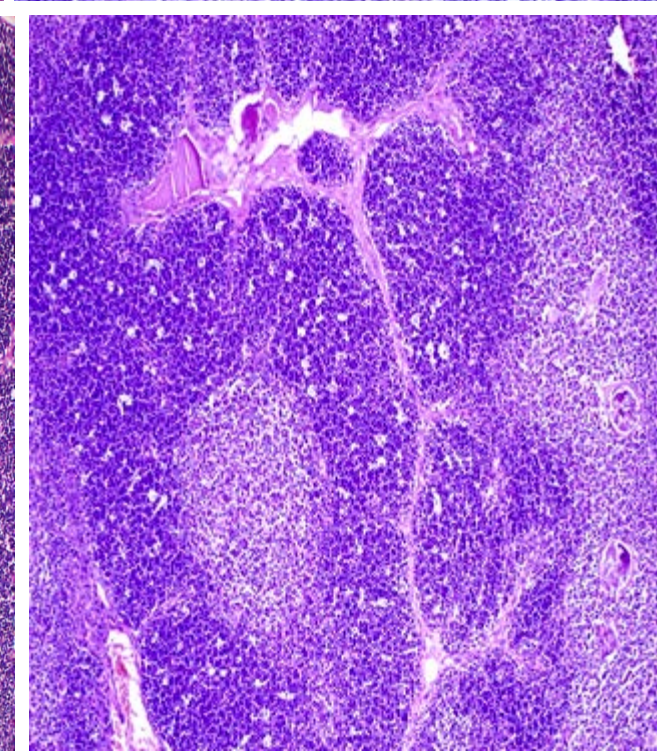
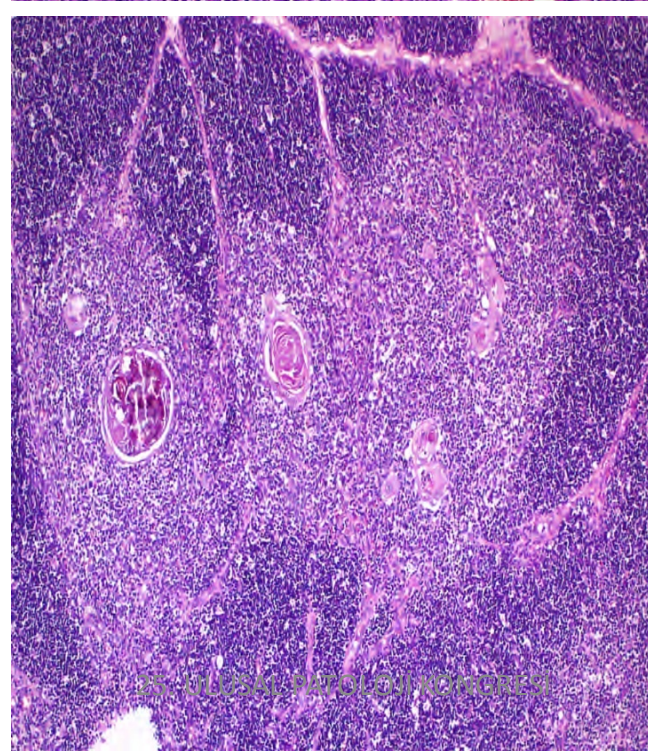
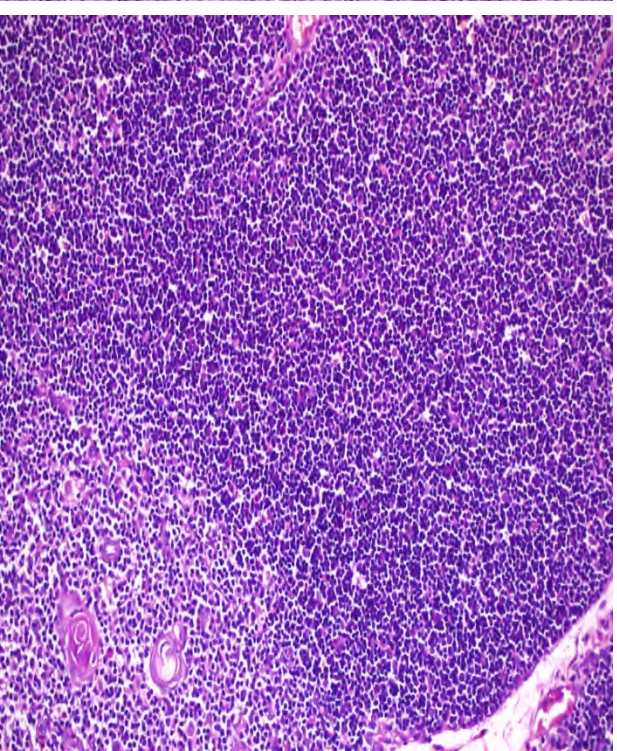
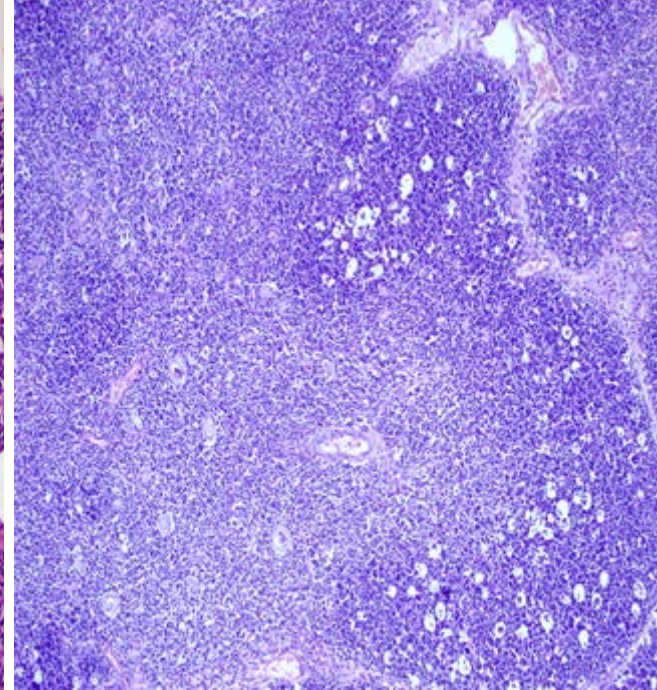
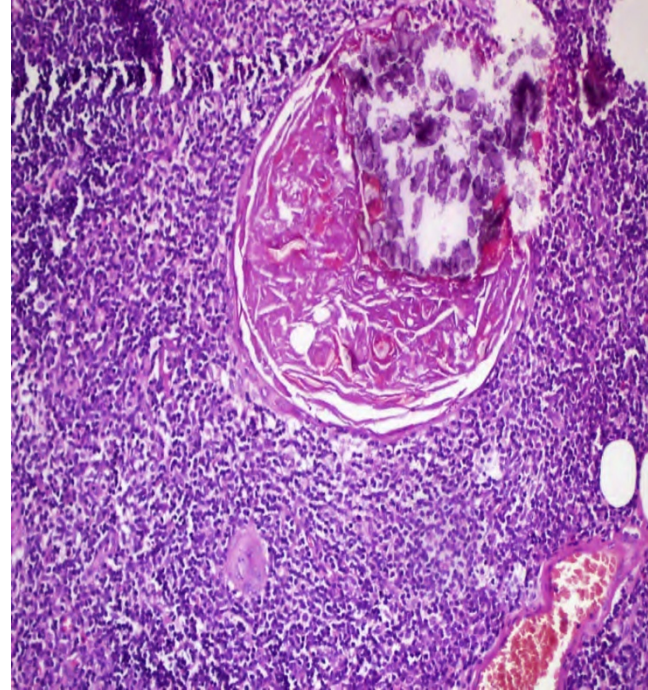
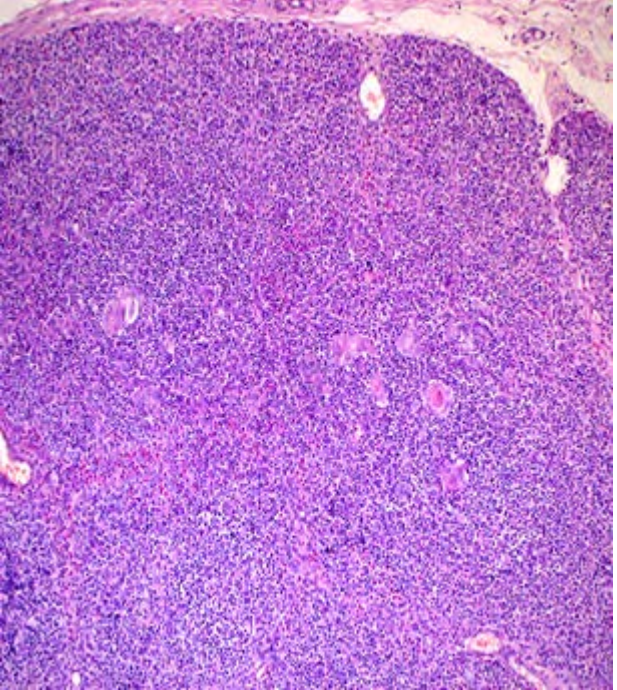
IHK Marker	Boyanma sayısı ve oranları			Boyanma yoğunluğu ve yeri
	1 +	2 +	3 +	
HIF-1 $\alpha$	$\leq 5$	5-10	$>10$	Kuvvetli nükleer pozitiflik (10 BBA ortalaması)
Fox P3	$\leq 5$	5-10	$>10$	Orta/kuvvetli nükleer pozitiflik ( 10 BBA ortalaması)
CD 44	$\leq 40\%$	$40\%-70\%$	$>70\%$	Kuvvetli sitoplazmik membranöz pozitiflik yüzdesi
Bcl2	$\leq 40\%$	$40\%-70\%$	$>70\%$	Orta/kuvvetli sitoplazmik membranöz pozitiflik
CD 34	$\leq 10$	10-25	$>25$	Sitoplazmik kuvvetli boyanma gösteren lümenli damar sayısı  (ortalama 5 BBA)

# HİSTOMORFOLOJİK BULGULAR:

- 1: Korteksde incelme, medullada genişleme, korteks/medulla oranında azalma (korteks/medulla $<1/2$ ) yönünden hipoksi grubu ve normal grup arasında anlamlı fark izlendi. Hipoksi grubunda, medullanın kortekse göre genişlediği, korteksin belirgin olarak incelendiği, kortikomedüller bileşkenin belirsizleştiği dikkati çekti.
- 2: Kortikal yıldızlı gök görünümünü yönünden hipoksi grubu ve normal grup arasında anlamlı bir fark izlenmedi.
- 3: Hassal cisimciklerinin özellikleri yönünden hipoksi grubu ve normal grup arasında anlamlı fark izlenmedi.

# Tablo 3: Histomorfolojik Bulgulara Göre Hasta Sayı ve Oranları

Histomorfolojik Bulgular	Tüm Olgular		Hipoksi Grubu		Normal Grup	
	N:76	%	N: 38	%	N:38	%
Korteks / Medulla oranı ( $\leq 1/2$ ) ve kortikomedüller bileşke belirsizleşmesi	48	63.2	36	94.7	12	31.6
Yıldızlı gök görünümü	45	59.2	24	63.2	21	55.3
Hassal cisimciklerinde genişleme, kistik dejenerasyon, kalsifikasyon	72	94.7	38	100	34	89.5



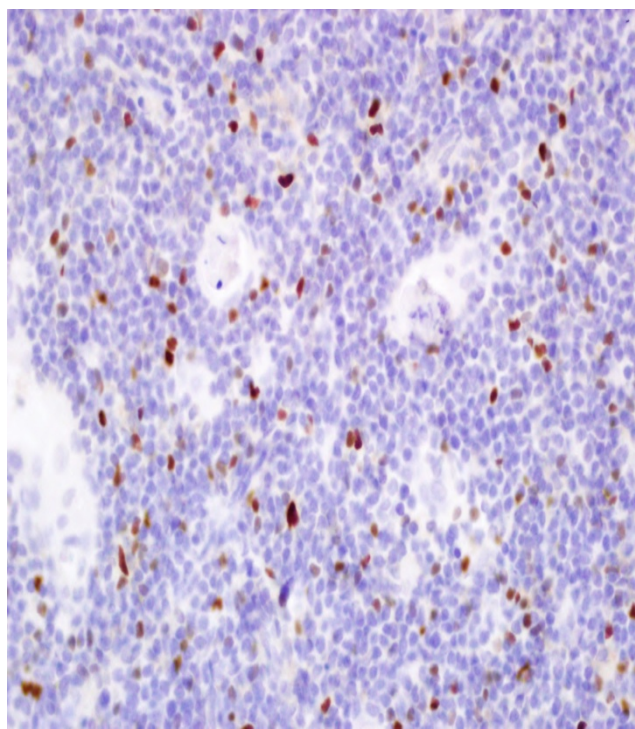
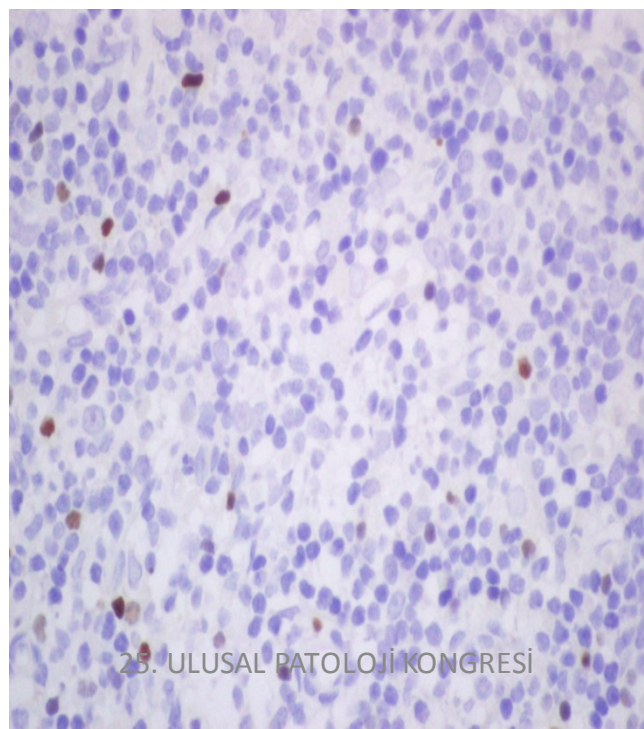
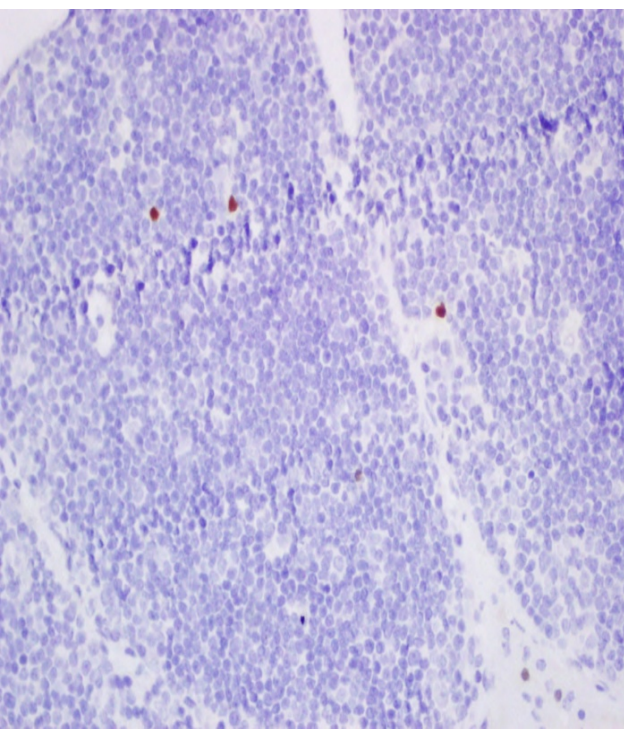
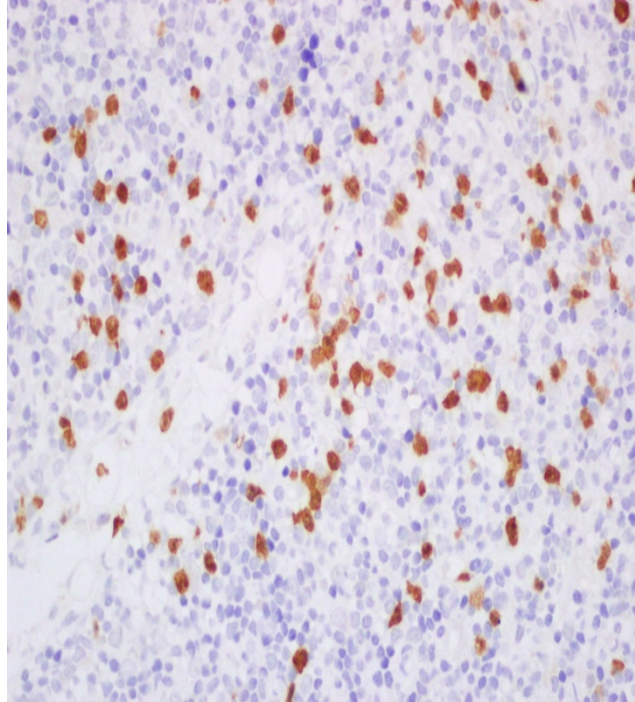
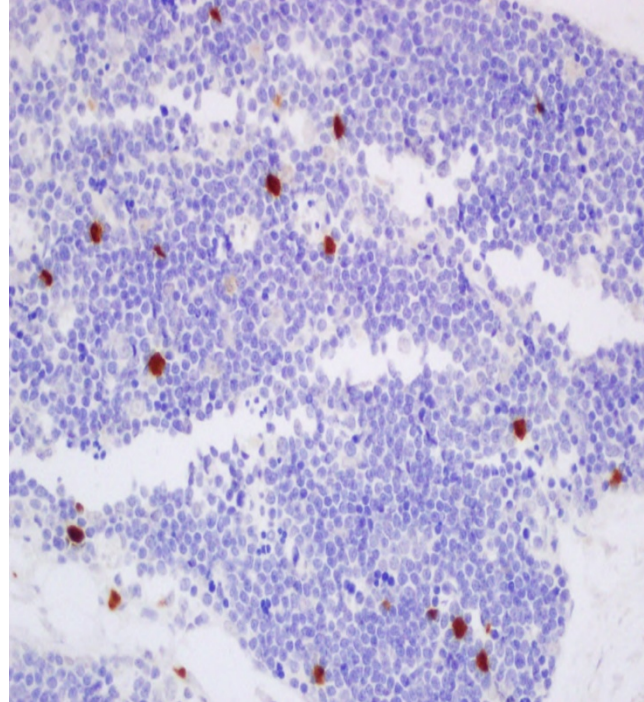
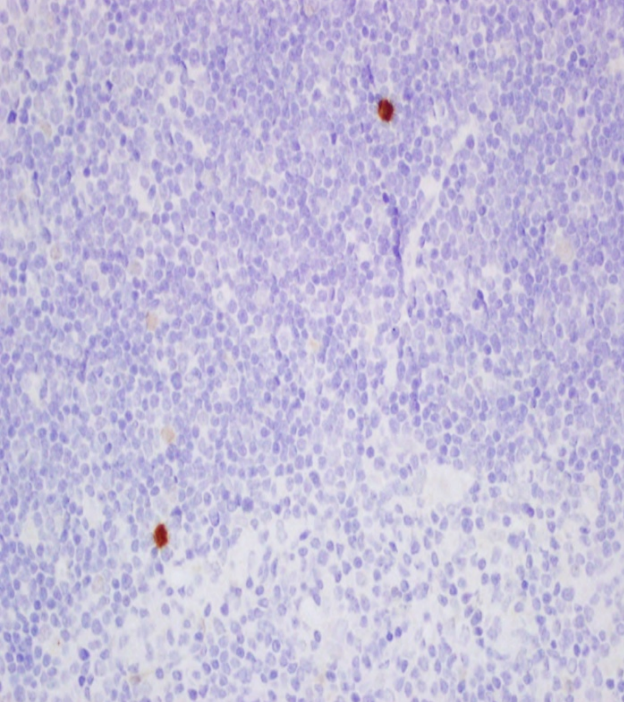
# İHK BULGULARI:

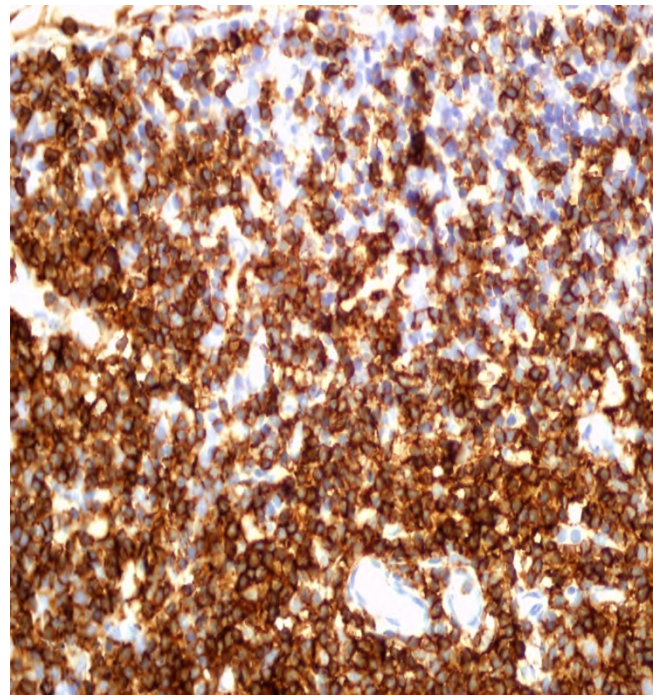
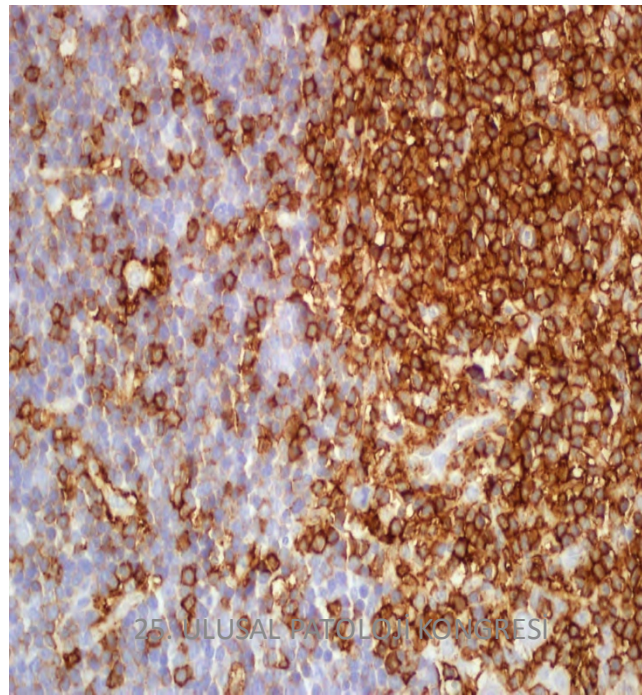
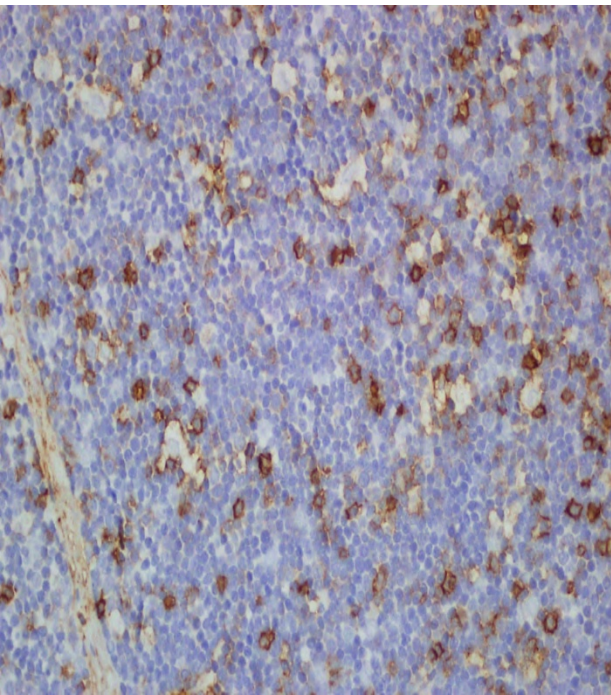
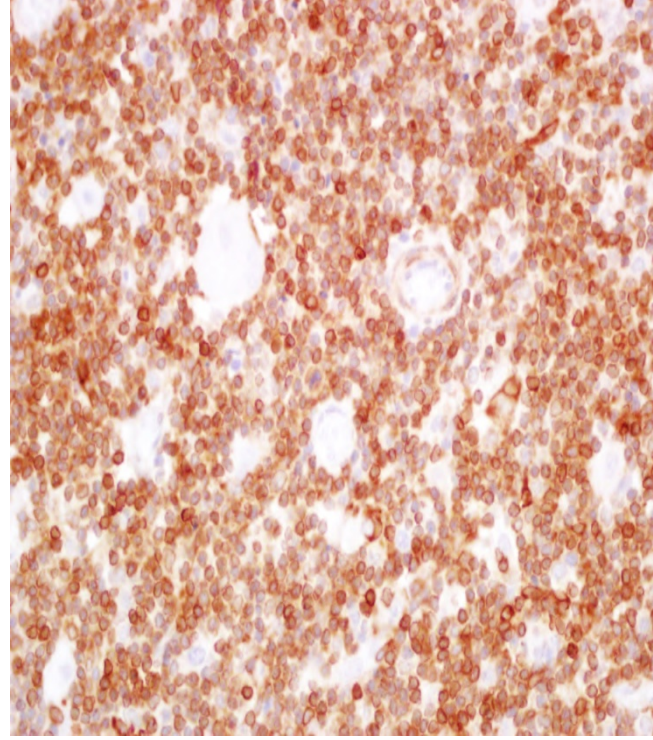
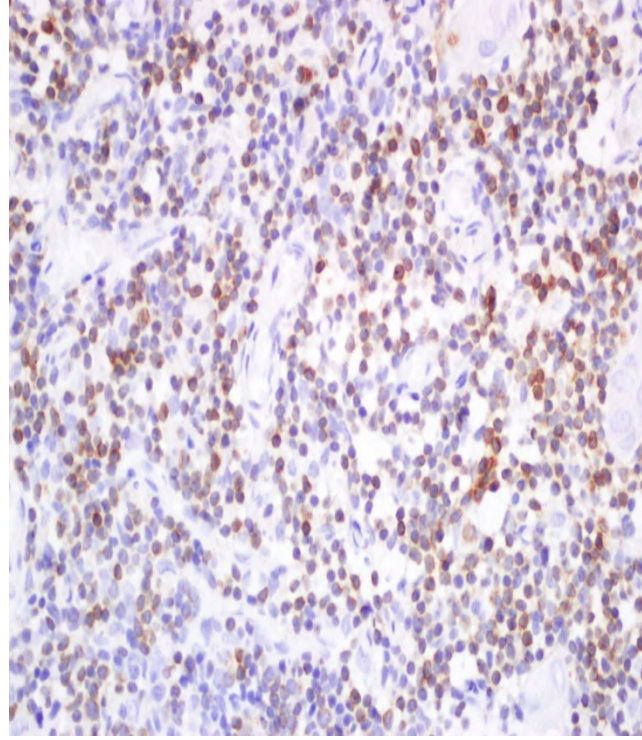
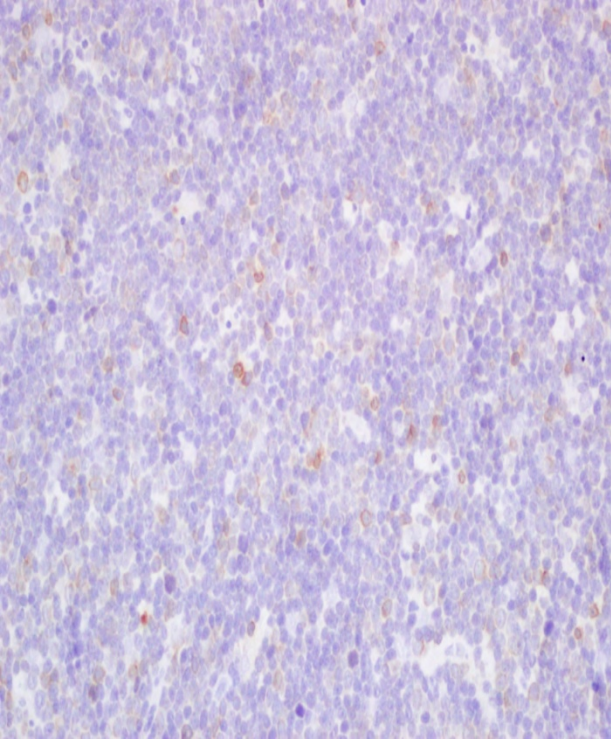
- 1-HIF-1 alfa ile boyanma hipoksik grupta normal gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ( $p<0.005$ )
- 2-Fox-P3 ile boyanma hipoksik grupta normal gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ( $p<0.05$ )
- 3-CD 44 ile boyanma hipoksik grupta normal gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ( $p<0.05$ )
- 4-Bcl2 ile boyanma hipoksik grupta normal gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ( $p<0.05$ )
- 5-CD 34 ile izlenen mikrodamar yoğunluğu hipoksik grupta normal gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazladır ( $p<0.05$ )
- **İHK boyamaların tümü, hastaların kan oksijen saturasyonlarına göre karşılaştırıldığında hipoksi grubundaki hastalarda, normal gruba göre 5 belirteç için de istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık gösteriyordu. Kan oksijen saturasyonu düştükçe boyanma oranları artıyordu.**

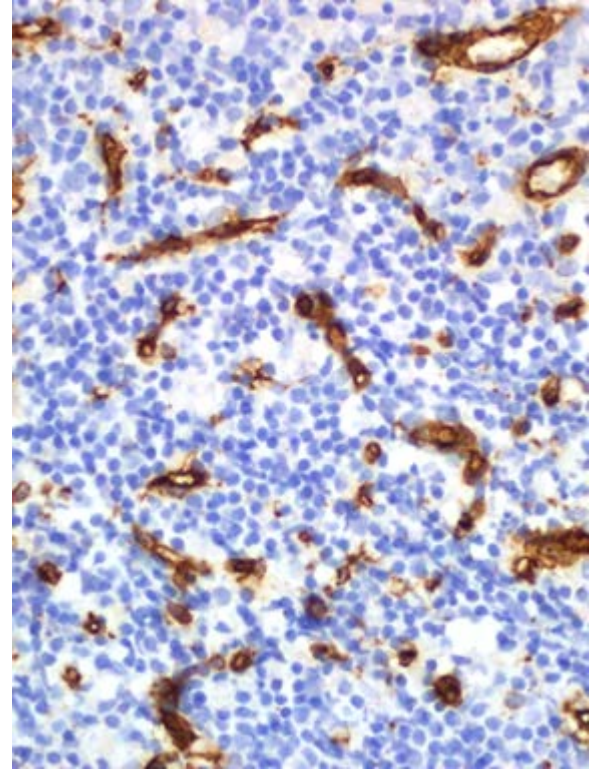
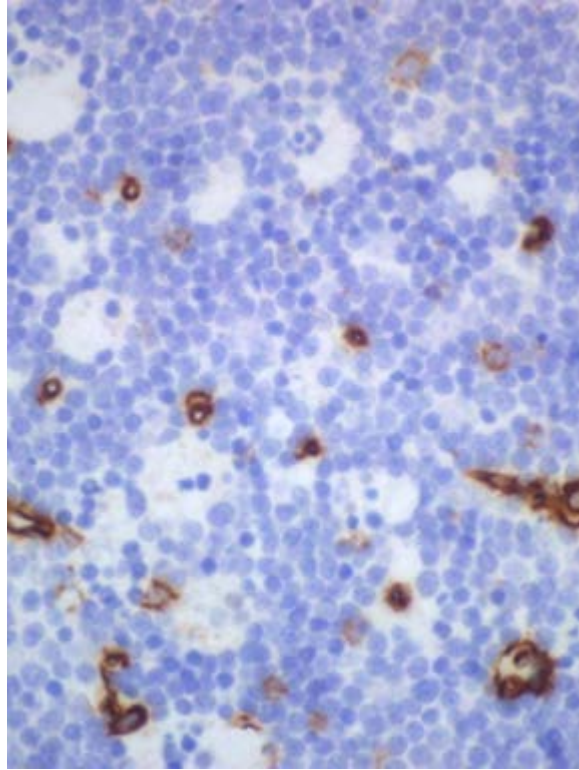
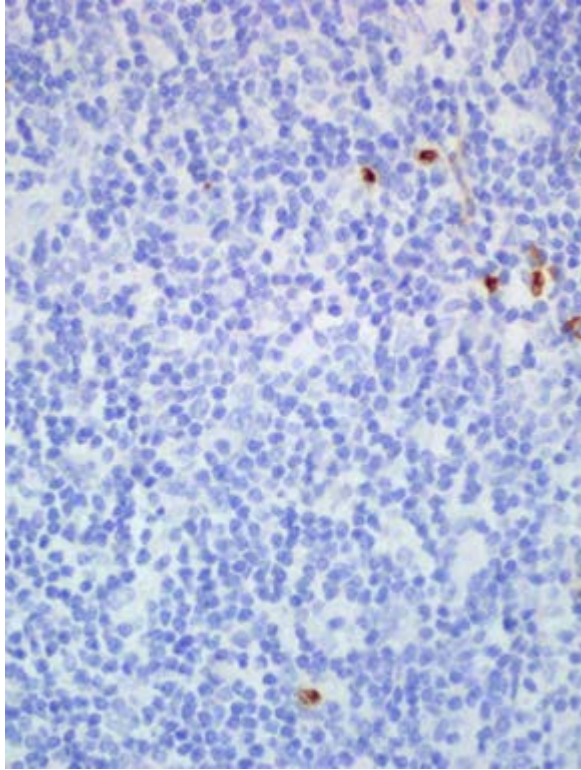
## Tablo 4: İHK belirteçlerin boyanma ve yoğunluk oranlarına göre hasta sayıları ve yüzdeleri

İHK belirteç	n	Hipoksik Grup						Hipoksik olmayan grup					
		1+		2+		3+		1+		2+		3+	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HIF 1 alfa	38	0	0	10	26.3	28	73.7	36	94.7	2	5.3	0	0
Fox P3	38	0	0	12	31.6	26	68.4	35	92.1	3	7.9	0	0
CD 44	38	0	0	4	10.5	34	89.5	31	81.6	7	18.4	0	0
Bcl2	38	0	0	7	18.4	31	81.6	32	84.2	6	15.8	0	0
CD 34	38	0	0	10	26.3	28	73.7	35	92.1	3	7.9	0	0









# TARTIŐMA

- Literatür gözden geçirildiğinde, DKH lı çocukların timus dokularında en çok izlenen Hassal korpüsküllerindeki histomorfolojik değişikliklerdir.  
Çalışmamızda, bu değişiklikler açısından hipoksik ve normal gruptaki hastalar arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu.
- Benzer şekilde, kortikal yıldızlı gök görüntüsü yönünden de her iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu.
- Biz bunun, hipoksi gelişmemiş olsa bile DKH larına çoğu zaman timik morfolojik ve fonksiyonel bozuklukların da eşlik etmesinden veya bu olgularda, timik involusyonel değişikliklerin erken gelişmesinden kaynaklandığını düşünöyoruz.

- Sadece timik meduller alanın kortekse göre genişlemesi ve kortikomeduller bileşkenin belirsizleşmesi yönünden hipoksi grubu ve normal grup arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmıştır.
- Bu sonucun hipoksinin neden olduğu kortikal timosit kaybı ile kortikal ve meduller damarlanma artışı nedeniyle oluştuğunu düşünüyoruz.
- Özellikle kortikomeduller bileşkede damar ağı daha belirgin olduğu için bu alandan kortekse doğru artan damarlanma nedeniyle bileşkede silinme de ortaya çıkar.
- **Çalışmamızdaki İHK bulgularımız da bunu desteklemektedir.**

- İHK boyamalarda 5 belirteç için de boyanma yoğunluk ve oranları kan oksijen saturasyonları düştükçe artıyordu.
- Hipoksiye maruziyet, HIF-1 alfa'yı aktive ederek doku oksijen alımını artırmak veya hücre sel yaşayabilirliği sağlamak için birçok gen ekspresyon değişikliklerine neden olur.
- Çalışmamızda oksijen saturasyonları düştükçe HIF-1 alfa boyanmalarının artması oksijen homeostasisini sağlayabilmek için HIF-1 alfa'nın aktive olması ile açıklanabilir.

- Hipoksinin tetiklediği apoptosisi önlemek için HIF-1 alfa bağımlı Bcl2 ekspresyonunun artığı gösterilmiştir.
- Çalışmamızda da oksijen saturasyonu düştükçe HIF-1alfa artışı ile ilişkili olarak kortikal timositlerde Bcl2 boyanma yoğunluk ve oranı anlamlı derecede artmaktadır.
- Histomorfolojik olarak gösterilen korteksdeki incelme, kortikal timositlerdeki artmış apoptozisle açıklanabilir.

- Daha önceki çalışmalar hipoksi ve HIF-1 alfanın, T hücrelerinin gelişimi, proliferasyonu, yaşayabilirliği ve sitokin üretimi üzerinde düzenleyici rol oynayabileceğini göstermiştir.
- Fox-P3, regülâtör T hücre differansiyasyonu için hipoksi tarafından kuvvetle indüklenen anahtar transkripsiyon faktörüdür.
- Çalışmamızda oksijen saturasyonunun azalması ve HIF-1 alfa artışı ile ilişkili olarak Fox-P3 boyanma yoğunluk ve oranının artması literatürle uyumludur.



- CD 44, bir kök hücre ve kanser kök hücre belirteçidir. Her iki hücre tipinde de çok sayıda önemli fonksiyonlara sahiptir. Timik stroma ile progenitör hematopoetik hücreler arasında etkileşimi sağlayarak timosit gelişimini uyarır.
- Çalışmamızda, hipoksik grupta oksijen saturasyonu düştükçe CD 44 boyanma yoğunluk ve oranının belirgin olarak artması, hipoksinin ve HIF-1 alfa ekspresyonunun kök hücreler (hematopoetik progenitor) üzerinde uyarıcı etkisi olduğunu düşündürür.

- CD 34, bir kapiller endotelial hücre belirtecidir.
- Hipoksik grupta normal gruba göre mikrodamar yoğunluğu belirgin derecede istatistiksel anlamlı olarak artmıştır.
- Oksijen saturasyonu düştükçe HIF-1 alfa artışı ile paralel olarak mikrodamar yoğunluğu artar. Mikrodamar yoğunluk artışı, damarlanmanın belirgin olduğu meduller alanda genişlemeye ve kortekse ilerleyen damar proliferasyonu nedeniyle korteks-medulla hattının belirsizleşmesine neden olur.
- Daha önceki çalışmalarda da hipoksik durumlarda, HIF-1 alfa overekspresyonunun mezenşimal kök hücreler ile VEGF sekresyonu ve c-MET protein ekspresyonu yoluyla angiogenezi artırdığı bildirilmiştir.

# SONUÇ:

- Hipoksik koşullarda, HIF-1 $\alpha$  aktivasyonunun, apoptoz, regülätör T hücre differansiyasyonu, kök hücrelerin uyarılması ve anjiogenez üzerinde artırıcı etkisi olduğunu düşünüyörüz.
- **Tümör oluşumunun dokuda hipoksik bir süreç oluşturduğu da bilinmektedir.** Özellikle apoptozun önlenmesi, kök hücrelerin artışı ve anjiogenezi artırıcı etkisi nedeniyle tümöral dokuda aktive olan HIF-1 alfanın tümör progresyonunu artırıcı ve prognozu kötüleştirici etkisi olduğu sonucuna varılabilir.
- **Tümöral dokularda HIF-1 alfaı inaktive eden ilaç tedavilerinin yararlı olabileceğini düşünüyörüz.**
- İleride, çeşitli organlara ait tümörlü dokulardaki HIF-1 alfa aktivasyonunun kötü prognozla ilişkisinin araştırılmasını planlamaktayız.

- Teşekkür ederiz...