

بررسی ایمونوهیستوشیمیایی تیموس‌های آپلاستیک از نظر مارکرهای اپی‌تلیالی، لنفوسیتی و آپوپتوز و مقایسه آن با تیموس‌های نرمال

چکیده

فاطمه محجوب*

محمود حقیقت‌نژاد^۱

مسعود موحدی^۲

۱- گروه پاتولوژی

۲- گروه ایمونولوژی، آسم و آلرژی،

مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

زمینه و هدف: امروزه نقص ایمنی در جرگه مهمترین علل مرگ و میر در جهان قرار گرفته است. در بین اختلالات اولیه نقص ایمنی، در بیماری‌هایی نظیر سندرم دی ژرژ و سندروم نقص ایمنی مختلط شدید (Combined Severe Immunodeficiency Syndrome)، تیموس آپلاستیک مشاهده می‌شود. هدف شناسایی بیشتر ساختار این تیموس‌ها و بررسی نقش آپوپتوز، مطالعه را بر روی دو گروه تیموس طبیعی و آپلاستیک انجام دادیم. **روش بررسی:** ۱۲ بیمار با تیموس آپلاستیک (گروه مورد) و ۱۱ بیمار با تیموس طبیعی (گروه شاهد) که در بین سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۲ به بیمارستان مرکز طبی کودکان مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. تشخیص تیموس آپلاستیک بر مبنای کاهش شدید تیموسیت‌ها و فقدان اجسام هاسال داده شده است. دو گروه از نظر سن، جنس، نسبت فامیلی بین والدین، وزن تیموس و میزان بروز مارکرهای CD3، CD8، CD20، CD30، CD45RO، CD68، CD79a، EMA، P53، Bcl2 با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی مقایسه شدند. اطلاعات بالینی از پرونده بیماران استخراج و آزمایش‌ها نیز بر روی بلوک‌های پارافینه تیموس این بیماران در بخش پاتولوژی بیمارستان شریعتی انجام شد. **یافته‌ها:** مبتلایان به نقص ایمنی با تیموس آپلاستیک محدوده سنی بین هفت روز تا ۱۸ ماه با میانگین ۴/۵۰ ماه داشتند. ۵۴/۵ درصد افراد گروه شاهد و ۵۸/۳٪ افراد گروه مورد مونث بودند. ۴۵/۵٪ افراد گروه مورد و ۹/۱٪ افراد گروه شاهد والدین منسوب داشتند که از نظر آماری معنی دار بود. میانگین وزن تیموس در گروه شاهد ۱۲/۳۵ گرم و در گروه مورد ۱/۹۲ گرم بود که اختلاف معنی دار بود. Bcl2 به طور معنی داری در گروه مورد کمتر از گروه شاهد بروز پیدا کرده بود ($p=0/038$). میانگین درصد سلول‌های CD8+ در گروه مورد کمتر از گروه شاهد بود ($p=0/051$). میانگین درصد سلول‌های اپی‌تلیالی در تیموس‌های آپلاستیک بیشتر از گروه شاهد است ($p=0/004$). میانگین درصد هیستوسیت‌ها در تیموس‌های آپلاستیک بیشتر از تیموس‌های نرمال است ($p=0/006$). تفاوت معنی داری بین دو گروه در بروز مارکرهای CD3، CD02، CD30، CD45RO، CD79a، P53 یافت نشد. **نتیجه‌گیری:** افزایش آپوپتوز و خورده شدن سلول‌های تیموسیت توسط هیستوسیت‌ها می‌تواند در بروز آپلازی تیموس نقش داشته و با مهار آپوپتوز می‌توان از بروز این روند جلوگیری نمود.

کلمات کلیدی: تیموس آپلاستیک، مارکرهای لنفوسیتی و اپی‌تلیالی و آپوپتوز، ایمونوهیستوشیمی.

*نویسنده مسئول، تهران- بیمارستان مرکز طبی اطفال -
بخش پاتولوژی
تلفن: ۶۶۹۳۷۵۶۵
email: fmahjoub@sina.tums.ac.ir

مقدمه

غده تیموس (Thymus gland) از اجزایی از هر سه لایه جنینی منشاء می‌گیرد. این اجزاء شامل آندودرم سومین کیسه حلقی، اکتودرم سومین شکاف پرونکیال و عناصر مزانشیمی می‌باشند.^۱ در حدود هفته دهم سلول‌های لنفویید کوچک منشا گرفته از کبد و مغز استخوان در تیموس تجمع می‌یابند و دو قسمت کورتکس و مدولا را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها مارکرهای مختلفی را بروز می‌دهند.^۲ تیموس

به‌طور پیش‌رونده تا زمان بلوغ بزرگ می‌شود و بعد از آن شروع به تحلیل کرده و در سنین بالا در وضعیت آتروفیک می‌ماند.^۳ دیسپلازی یا آپلازی تیموس به مواردی اطلاق می‌شود که در آنها وزن تیموس بسیار کم شده و از نظر میکروسکوپی کاهش تیموسیت‌ها، فقدان اجسام هاسال و از بین رفتن تمایز کورتکس و مدولا مشهود است.^۴ در بین اختلالات اولیه نقص ایمنی، در بیماری‌هایی نظیر سندروم دی ژرژ، رتیکلار دیس ژنزی، سندروم نقص ایمنی مختلط شدید و

عفونت‌های مکرر وجود نداشت و در اتوپسی، تیموس‌ها طبیعی بودند. اطلاعات بالینی مربوط به هر گروه را با مراجعه به پرونده بیماران استخراج کردیم. در مرحله بعد بلوکهای پارافینه مربوط به تیموس این بیماران از بایگانی استخراج شد و در بخش پاتولوژی بیمارستان شریعی از این بلوک‌ها برش تهیه شده و برش‌ها هم به روش H&E و هم به روش IHC برای مارکرهای CD3, CD8, CD20, CD68, CD79a, EMA, p53, Bcl2, CD30, CD45RO رنگ شدند. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از پروتوکل استراپتاویدین-بیوتین انجام شد. سپس لام‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و درصد مثبت بودن هر مارکر با شمارش حداقل هزار سلول در هر اسلاید با استفاده از گرید تعیین شد و اطلاعات به دست آمده در جداول جداگانه برای هر گروه درج شد. آنالیز آماری اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با به کارگیری آزمون t-test انجام شد. از نظر آماری یافته‌هایی با $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی گردیدند.

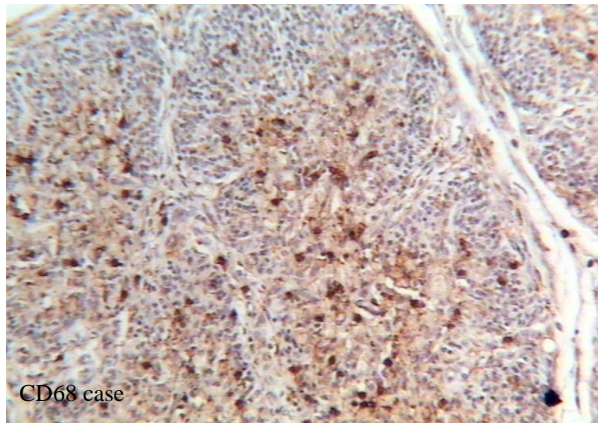
یافته‌ها

گروه مورد شامل پنج مذکر و هفت مونث با محدوده سنی هفت روز تا ۱۸ ماه با میانگین ۴/۵ ماه و انحراف معیار ۴/۷۵ و گروه شاهد پنج مذکر و شش مونث با محدوده سنی یک روز تا ۹ ماه با میانگین ۲/۳۶ ماه و انحراف معیار ۳/۵۲ بودند. تیموس‌ها در گروه مورد دارای وزنی از غیر قابل اندازه‌گیری تا ۳/۵ گرم با میانگین ۱/۹۲ گرم و انحراف معیار ۰/۸۶ و در گروه شاهد وزنی بین ۳/۱۴ تا ۲۴/۴ گرم با میانگین ۱۲/۳۵ گرم و انحراف معیار ۶/۹۹ داشتند که این اختلاف معنی‌دار بود. در گروه مورد ۴۱/۷٪ والدین منسوب، ۳۳/۳٪ والدین غیرمنسوب داشتند و در ۲۵٪ باقیمانده نسبت فامیلی مشخص نبود. ۹/۱٪ افراد گروه شاهد والدین منسوب و ۴۵/۵٪ والدین غیرمنسوب داشتند و در بقیه موارد نسبت فامیلی مشخص نبود که به هر حال این اختلاف معنی‌دار نبود. در بررسی IHC در گروه مورد مارکر Bcl2 به صورت سیتوپلاسمی در بین یک تا ۱۰ درصد سلول‌ها با میانگین ۳/۳۰٪ و انحراف معیار ۲/۹۸ مثبت شد. در گروه شاهد در یک تا ۲۰٪ سلول‌ها با میانگین ۹/۹۱٪ و انحراف معیار ۷/۲۹ واکنش مثبت وجود داشت که اختلاف معنی‌دار بود ($p=0/038$). هم چنین CD68 در بین سه تا ۴۰٪ سلول‌های گروه مورد مثبت بود. میانگین و انحراف معیار به دست آمده برای این گروه به ترتیب ۱۴/۲۵٪ و ۱۱/۴۶ بود.

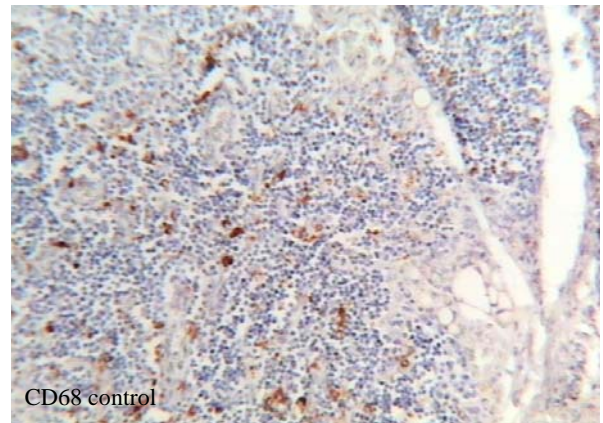
آتاکسی تانژکتازیا، تیموس آپلاستیک مشاهده می‌شود. در چند سال اخیر در بین مراجعین به بیمارستان مرکز طبی اطفال موارد متعددی وجود داشته‌اند که به علت عفونت‌های مکرر مراجعه کرده و متأسفانه تعداد قابل توجهی از این بیماران فوت شده‌اند. یافته‌های اتوپسی در گروهی از این بیماران، علاوه بر شواهد مربوط به عفونت‌های شدید ارگانهای مختلف، نشانگر وجود تیموس‌های بسیار کوچک و مدفون در لابه‌لای بافت فیروهمبندی چربی بوده که در میکروسکوپی کاهش شدید تیموسیت‌ها و فقدان اجسام هاسال را نشان می‌دادند. در منابع مختلف پاتولوژی و در بین مقالات موجود اطلاعات کمی در مورد خصوصیات هیستولوژیک و ایمونوهیستوشیمیایی این تیموسها در دسترس می‌باشد. در بررسی که Holly Zhou انجام دادند. بروز آنتی‌ژن‌های وابسته به آپوپتوز شامل Mib-1 و P53, Bcl2, Fas proliferation Index در تیموس‌های هیپوپلاستیک بیماران مبتلا به سندروم دی‌ژرژ بررسی شد. در این مطالعه به علت تعداد کم نمونه تفاوت معنی‌داری بین دو گروه از نظر مارکرهای فوق یافت نشد. با توجه به کمبود اطلاعات در مورد ماهیت این تیموس‌ها در منابع مختلف پاتولوژی، لزوم مطالعات پایه‌ای بیشتر در این زمینه احساس می‌شود. ما با بررسی ایمونوهیستوشیمیایی (IHC) این تیموس‌ها از نظر مارکرهای اپی‌تلیالی و لنفوسیتی و آپوپتوز و مقایسه آن با تیموس‌های طبیعی، ضمن شناسایی بیشتر ساختمان این تیموس‌ها، خواسته‌ایم نقش آپوپتوز را در بروز این اختلال نشان دهیم.

روش بررسی

این مطالعه بر روی ۱۲ بیمار (پنج مذکر و هفت مونث) با تیموس آپلاستیک (گروه مورد) و ۱۱ بیمار (پنج مذکر و شش مونث) با تیموس نرمال (گروه شاهد) انجام شد. گروه مورد سنی بین هفت روز تا ۱۸ ماه و گروه شاهد سنی بین یک روز تا ۹ ماه داشتند. گروه مورد بیمارانی بودند که در بین سال‌های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۲ به علت عفونت‌های مکرر به بیمارستان مرکز طبی اطفال مراجعه کرده و در اثر این بیماری فوت شده بودند. در اتوپسی این بیماران علت مرگ، نقص ایمنی ناشی از آپلازی تیموس گزارش شده بود. تشخیص آپلازی (دیسپلازی) تیموس بر اساس وزن بسیار کم، کاهش شدید تیموسیت‌ها و فقدان اجسام هاسال داده شده بود. گروه شاهد کودکان فوت شده در همین فاصله زمانی بودند ولی در این گروه سابقه



شکل - ۲: CD68 در تیموس های آپلاستیک



شکل - ۱: CD68 در تیموس های طبیعی

جدول - ۱: یافته های رنگ آمیزی IHC در تیموس های آپلاستیک و طبیعی

	میانگین		انحراف معیار		ارزش آماری
	مورد	شاهد	مورد	شاهد	
CD3	۲۶/۷۱	۶۵	۲۰/۸۳۰	۱۴/۱۴۲	۰/۱۰۰
CD45RO	۵۵/۵۰	۷۲/۷۸	۲۴/۵۴۶	۱۲/۲۳۰	۰/۳۴۴
CD20	۲/۳۰	۷/۰۹	۳/۴۶۶	۲/۹۴۸	۰/۴۴۳
CD79a	۱/۲۵	۲/۸۲	۱/۲۸۸	۱/۹۴۰	۰/۱۲۴
CD68	۱۴/۲۵	۵/۷۳	۱۱/۴۵۸	۳/۱۰۱	۰/۰۰۶
CD30	۸/۱۴	۴/۰۰	۵/۵۲۱	۳/۴۲۳	۰/۶۹۶
CD8	۸/۱۷	۱۹/۴۰	۸/۱۳۴	۳۲/۲۰۵	۰/۰۵۱
EMA	۵/۸۳	۲/۱۸	۴/۲۶۰	۱/۰۷۹	۰/۰۰۴
Bcl2	۳/۳۰	۹/۹۱	۲/۹۸۳	۷/۲۸۶	۰/۰۳۸

موارد وجود داشت که اختلاف معنی دار نبود. در گروه مورد CD3 در بین ۵ تا ۵۰٪ سلولها مثبت شد. میانگین و انحراف معیار محاسبه شده به ترتیب ۲۶/۷۳٪ و ۲۰/۸۳ بود. در گروه شاهد واکنش مثبت ۴۰ تا ۸۰٪ سلولها با میانگین ۶۵٪ و انحراف معیار ۱۴/۱۴ دیده شد که معنی دار نبود ($p=0/100$). CD45RO در بین ۱۰ تا ۸۰٪ سلولهای گروه مورد با میانگین ۵۵/۵۰٪ و انحراف معیار ۲۴/۵۵ مثبت شد. واکنش مثبت در گروه شاهد در بین ۵۰ تا ۹۰٪ سلولها دیده شد. میانگین و انحراف معیار برای این گروه به ترتیب ۷۲/۷۸٪ و ۱۵/۲۳ بود که معنی دار نبود ($p=0/344$). سه تا ۲۰٪ سلولهای گروه مورد CD30 مثبت بودند. میانگین و انحراف معیار در این گروه به ترتیب ۸/۱۴ و ۵/۵۲ بود. واکنش مثبت در بین یک تا ۸٪ سلولهای گروه شاهد با میانگین ۴٪ و انحراف معیار ۳/۴۲ دیده شد که اختلاف معنی دار نبود ($p=0/696$). CD20 در بین یک تا ۱۲٪ سلولهای گروه مورد مثبت شد. میانگین سلولهای مثبت در این گروه ۲/۳۰ و انحراف معیار ۳/۴۷ بود. در گروه شاهد دو تا ۱۰٪ سلولها با میانگین ۷/۰۹٪ و انحراف معیار ۲/۹۵، CD20 مثبت بودند که اختلاف معنی دار نبود ($p=0/443$) و در نهایت CD79a در بین صفر تا چهار درصد سلولهای گروه مورد مثبت بود. میانگین و انحراف معیار در این گروه به ترتیب ۱/۲۵٪ و ۱/۲۸۸ بود. در گروه شاهد یک تا هفت درصد سلولها با میانگین ۲/۸۲٪ و انحراف معیار ۱/۹۴، CD79a مثبت بودند که اختلاف معنی دار نبود ($p=0/124$).

بحث

مطالعات پاتولوژی تیموس در بیماران با نقائص ایمنی بسیار محدود بوده و تنها مطالعه، مربوط به Zhou می باشد، مطالعه ما به

در حالی که در گروه شاهد یک تا ۱۰٪ سلولها با میانگین ۵/۷۳٪ و انحراف معیار ۳/۱۰ واکنش مثبت داشتند که اختلاف معنی داری به دست آمد ($p=0/006$) (شکل ۱ و ۲). در گروه مورد ۱ تا ۲۰٪ سلولها CD8 مثبت بودند. میانگین سلولهای مثبت در این گروه ۸/۱۷٪ و انحراف معیار ۸/۱۳ بود. در گروه شاهد یک تا ۸۰٪ سلولها با میانگین ۱۹/۴۰٪ و انحراف معیار ۳۲/۲۰، CD8 مثبت بودند که اختلاف دو گروه معنی دار بود ($p=0/051$). EMA در بین یک تا ۱۵٪ سلولهای گروه مورد با میانگین ۵/۸۳٪ مثبت بود. انحراف معیار برای این گروه ۴/۲۶ به دست آمد. در حالی که یک تا ۴٪ سلولهای گروه شاهد با میانگین ۲/۱۸٪ و انحراف معیار ۱/۰۷۹، EMA مثبت بودند که اختلاف معنی دار است ($p=0/004$). در تمام موارد گروه شاهد P53 در کمتر از ۱٪ سلولها واکنش مثبت نشان داد. در گروه مورد نیز در تمام موارد به غیر از یک نفر واکنش مثبت در کمتر از یک درصد

به طور معنی داری بیشتر از این میانگین در گروه شاهد (۵/۷۳٪) بود ($p=0/006$) این یافته بیانگر این مطلب است که درصد هیستوسیت‌ها نیز در تیموس‌های آپلاستیک بیشتر از تیموس‌های نرمال می‌باشد و احتمالاً مربوط به فاگوسیتوز بیش از حد سلول‌های ایمنی توسط هیستوسیت‌ها می‌باشد. همچنین در بررسی ما مشخص شد که درصد سلول‌های لنفوسیت T سیتوتوکسیک (CD8+) در تیموس‌های آپلاستیک (میانگین ۸/۱۷٪ در گروه مورد) به طور معنی داری کمتر از تیموس‌های نرمال (میانگین ۱۹/۴۰٪ در گروه شاهد) می‌باشد ($p=0/051$) که یافته قابل انتظاری است. در بررسی ما مشخص شد که علی‌رغم کاهش شدید تیموسیت‌ها در تیموس‌های آپلاستیک، اختلاف معنی داری بین درصد لنفوسیت‌های B و T در دو گروه وجود ندارد. زیرا اختلاف‌های به دست آمده بین دو گروه از نظر مارکرهای CD3، CD45Ro، CD20 و CD79a از نظر آماری معنی دار نبود ($p<0/5$). همچنین تفاوت معنی داری بین درصد بروز P53 در دو بین دو گروه مشاهده نشد. با توجه به عدم وجود مطالعات بیشتر در این زمینه برای اثبات یافته‌های فوق به مطالعات تکمیلی بر روی تعداد بیشتری نمونه نیاز است. سپاسگزاری: بدینوسیله از خانم‌ها پری‌سیما عظیمی در بیمارستان شریعتی و سعیده ظروفچی و زهرا امیدی در مرکز طبی کودکان که ما را در این تحقیق یاری دادند قدردانی می‌شود. این تحقیق با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است.

References

1. Stiehm ER, Ochs HD. Immunologic disorders in infants and children. 5th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005.
2. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. 3rd ed. St Louis: Mosby; 2003.
3. Sternberg S. Histology for pathologists. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott, Williams & Wilkins; 2004.
4. Dehner LP, Stocker TJ. Pediatric Pathology. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott, Williams & Wilkins; 2001.
5. Gilbert-Barnes E. Potter's Pathology of the Fetus, Infant and Child. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott, Williams & Wilkins; 1997.
6. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 9th ed. St. Louis: Mosby; 2004.
7. Zhou H, Perkins SL, Tripp S, Hussong JW, Coffin CM. Expression of apoptosis-related antigens, Fas, bcl-2, and p53, and Mib-1 proliferation index in the hypoplastic thymus of DiGeorge syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 2002; 5: 465-71.

عنوان دومین تحقیق در این زمینه می‌باشد. دو گروه مورد و شاهد اختلاف معنی داری از نظر سن و جنس نداشتند. میانگین وزن تیموس در گروه مورد (۱/۹۲ گرم) در مقایسه با میانگین وزن تیموس در گروه شاهد (۱۲/۳۵ گرم) به طور معنی داری کمتر است. در برخی از منابع پاتولوژی وزن کمتر از پنج گرم را جزء معیارهای تشخیصی تیموس‌های آپلاستیک قرار داده‌اند که یافته‌های ما نیز با این موضوع مطابقت دارد. بررسی نسبت فامیلی بین والدین در گروه مورد نشان داد که ۴۱/۷٪ افراد این گروه والدین منسوب داشتند ولی در گروه شاهد ۹/۱٪ افراد والدین منسوب داشتند که اختلاف دو گروه معنی دار نبود. بررسی ما نشان داد که میانگین بروز Bcl2 در گروه مورد (۳/۳۰٪) به طور معنی داری کمتر از گروه شاهد (۹/۹۱٪) می‌باشد ($p=0/038$). از آنجایی که Bcl2 یک مارکر مهارکننده آپوپتوز به شمار می‌رود، چنین نتیجه گرفته می‌شود آپوپتوز می‌تواند در بروز آپلازی تیموس نقش داشته باشد. این یافته‌ها بر خلاف نتایجی است که Zhou به دست آوردند. یافته دیگر ما این بود که در تیموس‌های آپلاستیک در صد سلول‌های اپی‌تلیالی به طور معنی داری بیشتر از تیموس‌های نرمال می‌باشد زیرا اختلاف میان میانگین بروز EMA در گروه مورد (۵/۸۳٪) در مقایسه با بروز این مارکر در گروه شاهد (۲/۱۸٪) از نظر آماری معنی دار است ($p=0/004$) که توجیه خاصی برای این یافته نداریم. میانگین بروز CD68 در گروه مورد (۱۴/۲۵٪)

A comparative immunohistochemical study of aplastic thymuses for lymphocytic, epithelial, proliferative and apoptotic indices

Abstract

Mahjoub F.^{1*}
Haghighatnejad, M.¹
Movaheddi, M.²

1- Department of Pathology,
Markaze Tebbi Koodakan
(Children Hospital Related to
Tehran University of Medical
Sciences)

2- Department of Asthma,
Immunology and Allergy
(Markaze Tebbi Koodakan)

Background: Immune deficiency is one of the major causes of morbidity and mortality in the modern world. Primary immunodeficiency comprises a wide range of disorders that mainly manifest in early childhood as devastating infections with opportunistic organisms. Thymic aplasia is found on autopsy of some patients afflicted with immune deficiency disorders, such as DiGeorge syndrome and severe combined immunodeficiency (SCID). After a thorough search of the literature, we found little information on the cellular characteristics of these thymuses. Our study aims to elucidate role of apoptosis in the pathogenesis of thymic aplasia and compare various lymphocytic and epithelial markers in normal and aplastic thymuses.

Methods: We selected 12 subjects who died of severe infections with aplastic thymus found on autopsy, and 11 control subjects who died of unrelated causes, such as congenital heart disease. The presence of several markers, including Bcl2, P53, lymphocytic markers, and CD68, was examined using immunohistochemical methods on paraffin-embedded thymus sections. Positively-stained cells were counted per 1000 cells and the results stated as percentage of positive cells.

Results: The mean age of the control group was between 7 days to 18 months (mean: 4.5 months). Parental consanguinity was present in 45.5% and 9.1% of the control and case groups, respectively; however, this was not statistically significant. We found significantly lower expression of Bcl2 in the case group (p value: 0.038). Furthermore, expression of CD68 was significantly higher in the case group. Epithelial markers were significantly higher in case subjects, although CD8 expression was higher in the control group. The presence of other markers was not significantly different between the two groups.

Conclusions: Increase in apoptosis has a role in aplastic thymuses and prevention of apoptosis may halt this process. Also high CD68 expression denotes increased phagocytic activity in aplastic thymuses.

Keywords: Aplastic thymus, epithelial, lymphocytic and apoptotic markers, immunohistochemistry.

* Corresponding author: Pathology
Department. Markaze Tebbi
Koodakan Children Hospital.,
Tehran University of Medical
Sciences. End of Keshavarz
Boulevard. Tehran
Tel: +98-21-66937565
email: fmahjoub@sina.tums.ac.ir