



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Παναγιώτης Καναβάρος

Ανοσοφαινοτυπική μελέτη της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης του θύμου

Καρατζιάς Γεώργιος
Ιατρός Ωτορινολαρυγγολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Παναγιώτης Καναβάρος

Ανοσοφαινοτυπική μελέτη της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης του θύμου

Καρατζιάς Γεώργιος
Ιατρός Ωτορινολαρυγγολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καρατζιά Γεωργίου: 22-5-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 506^α/10-6-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Νάκος Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-9-2003

«Ανοσοφαινοτυπική μελέτη της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης του θυμού»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 695^α/2-11-2010

Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία - Εμβρυολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Νάκος Γεώργιος	Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαλάνη Βασιλική	Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας -Ιστολογίας -Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιτσούλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Ανατομίας- Ιστολογίας- Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χαρχαντή Αντωνία	Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας -Ιστολογίας -Εμβρυολογίας με έμφαση στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα	Λέκτορας Ανατομίας -Ιστολογίας -Εμβρυολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Παράσκευη Σβεντζούρη
Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ - ΖΩΗ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Καθηγητή κ. **Καναβάρο Παναγιώτη**, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη εργασία, για τον τρόπο που μου έμαθε να προσεγγίζω τα επιστημονικά ζητήματα καθώς και για τις εποικοδομητικές και χρήσιμες συμβουλές του. Η επιστημονική υποστήριξη και καθοδήγησή του ήταν σημαντική καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής κ. **Μπάη Μαρία**, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας για τη σημαντική συνεισφορά της στην εκπόνηση της διατριβής μου και τον κ. **Νάκο Γεώργιο**, Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επιταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. **Γαλάνη Βασιλική**, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, κ. **Κιτσούλη Παναγιώτη**, Επίκουρο Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, κ. **Χαρκαντή Αντωνία** Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και κ. **Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα**, Λέκτορα Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. **Στεφανάκη Καλλιόπη** (Νοσοκομείο Παιδων «Αγία Σοφία» - Παθολογοανατομικό Εργαστήριο) για την πολύτιμη επιστημονική συνεισφορά της και την κ. **Ροντογιάννη Δήμητρα** (Νοσοκομείο «Ο Ευαγγελισμός» - Παθολογοανατομικό Εργαστήριο), για τις χρήσιμες συμβουλές της.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

- ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
- ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1. Γενική εισαγωγή	5
2. Βασικές έννοιες ανατομίας, ιστολογίας και εμβρυολογίας του θύμου.	6
2.1. Ανατομία του θύμου	6
2.2. Ιστολογία του θύμου	8
2.3. Εμβρυολογία του θύμου	12
3. Ανοσοποιητικό σύστημα	20
3.1 Έμφυτη ανοσοποιητική απάντηση	21
3.2. Επίκτηση (προσαρμοζόμενη) ανοσοποιητική απάντηση	22
3.3. Μηχανισμοί ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματος στο θύμο αδένα	28
4. Κυτταρικοί πληθυσμοί του θύμου	30
4.1. Μακροφάγα	30
4.2. Δενδριτικά κύτταρα	30
4.3. Λεμφοκύτταρα	30
4.4. Επιθηλιακά κύτταρα	33
5. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	45
5.1. Εισαγωγή στο σκοπό της εργασίας	45
5.2. Σκοπός της εργασίας	47

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
1. Υλικά	51
2. Μέθοδοι	52
2.1. Ανοσοϊστοχημεία	53
2.2. Μέθοδοι in situ σήμανσης TUNEL	54
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
1. Έκφραση πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα	58
2. Έκφραση των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα	60
3. Έκφραση ισοτύπων β τουμπουλίνης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα	60
4. Έκφραση κερατινών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα	61
5. Έκφραση άλλων δεικτών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα	62
6. Συνδυασμένα πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης, κερατινών και ισοτύπων β-τουμπουλίνης στους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων	62
7. Πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών S100, CD1a, CD207 (ΔΑΓΚΕΡΙΝΗ), CD123 και CD11C	63
8. Έκφραση πρωτεϊνών στα θυμοκύτταρα	65
9. Πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης κερατινών και ισοτύπων β-τουμπουλίνης σε σχέση με την ηλικία	66
10. Πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης κερατινών και ισοτύπων β-τουμπουλίνης σε θύμους με λεμφοζιδιακή υπερπλασία	67
11. Έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και επιθηλιακή διαφοροποίηση.....	67
12. Γενικές συγκρίσεις προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής	68
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	81
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ	87
SUMMARY IN ENGLISH	91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ανθρώπινος οργανισμός αμύνεται εναντίον των παθογόνων παραγόντων μέσω της έμφυτης και της προσαρμοζόμενης ανοσίας. *Κεντρικές δομές* του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας.⁽¹⁻
¹²⁾ *Περιφερικές δομές* αυτού είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας και ο λεμφικός ιστός, που συνοδεύει τους βλεννογόνους.^(1, 2)

Ο θύμος αδένας παίζει κομβικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων. Στη διαδικασία διαφοροποίησης των Τ-κυττάρων βασικό ρόλο παίζει το μικροπεριβάλλον του θύμου αδένου που περιλαμβάνει τα καλούμενα θυμικά στρωματικά κύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα).^(3, 4)

Η λειτουργική διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και η διαμόρφωση της αντιγονικής τους ειδικότητας πραγματοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του θύμου με τη μορφή ενός προγράμματος ωρίμανσης των θυμοκυττάρων (Τ-λεμφοκυττάρων) που περιλαμβάνει πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, εκπαίδευση και απόπτωση δυνητικά αυτοαντιδραστικών Τ-κυττάρων.⁽¹⁻⁴⁾ Το πρόγραμμα ελέγχεται από άμεσες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις τόσο όσο αφορά στη ρύθμιση της θετικής επιλογής (αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Τ-κυττάρων / φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων) όσο και στη ρύθμιση της αρνητικής επιλογής (αλληλεπιδράσεις μεταξύ θυμοκυττάρων / μυελικών θυμικών επιθηλιακών ή και δενδριτικών κυττάρων).^(3, 4) Σε κάθε στάδιο του προγράμματος κυτταρικής διαφοροποίησης στο θύμο, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα ελέγχονται από μόρια προσκόλλησης και από αυξητικούς παράγοντες (κυτταροκίνες, ορμόνες) καθώς επίσης και από τις παρακρινείς και κρυπτοκινείς δράσεις ορμονών.^(3, 4)

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ, ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ

2.1. Ανατομία του Θύμου

Ο θύμος αδένας κατά τη νεογνική περίοδο της ζωής του ανθρώπου, καθώς και κατά την παιδική ηλικία είναι ένας σχηματισμός, που χωρίζεται κατά τη μέση γραμμή και αποτελείται από δύο λοβούς, εντοπιζόμενος στο πρόσθιο τμήμα του άνω μεσοθωρακίου. Φυσιολογικά εκτείνεται από τον 4^ο πλευρικό χόνδρο προς τα πάνω έως και το επίπεδο του θυρεοειδούς αδένου, σε ορισμένες περιπτώσεις. Προς τα κάτω, φθάνει και εφάπτεται στο περικάρδιο και στην πρόσθια και πλάγιες επιφάνειες της τραχείας.

Μπροστά από τον αδένου βρίσκονται από την επιφάνεια προς το βάθος:

1. η λαβή του στέρνου
2. το σώμα του στέρνου
3. ο στερνοϋοειδής μυς
4. ο στερνοθυρεοειδής μυς
5. η προτραχειακή περιτονία.

Πίσω από τον αδένου από πάνω προς τα κάτω βρίσκονται:

1. η τραχεία
2. κλάδοι του αορτικού τόξου
3. η αριστερή βραχιοκεφαλική φλέβα
4. το αορτικό τόξο
5. ινώδες περικάρδιο

Προσθιοπλάγια του αδένου εντοπίζονται:

1. πλευρικοί χόνδροι
2. το μέσο τμήμα της περιτονίας του μεσοθωρακίου

Πλάγια του θύμου παρατηρούνται:

1. η περιτονία του μεσοθωρακίου
2. το φρενικό νεύρο

Ο αδένου μακροσκοπικά είναι ροζ-γκρι χρώματος, μαλακής σύστασης και πολυλοβώδης. Ο κάθε πλευρικός λοβός αποτελείται από λόβια, το μέγεθος των οποίων ποικίλλει από κεφαλή καρφίτσας έως και μικρού μπιζελιού. Το κάθε λόβιο περιέχει εκατοντάδες λοβίδια, τα οποία είναι 1-2 mm σε διάμετρο. Το κάθε λοβίδιο αποτελείται από ένα μυελώδες και ένα φλοιώδες τμήμα. Το τελευταίο περιβάλλεται

από αγγειακό πλέγμα, το οποίο τροφοδοτεί αγγεία μέσα στη μυελώδη μοίρα, καλύπτοντας τις ανάγκες των αναπτυσσόμενων λεμφοκυττάρων.

Κατά τη γέννηση του ανθρώπου ο θύμος έχει μέγεθος περίπου όσο και η γροθιά του νεογέννητου και ζυγίζει περίπου 15gr. Αναπτύσσεται παράλληλα-αναλογικά με το ανθρώπινο σώμα μέχρι την ηλικία των 2-3 ετών, οπότε και ζυγίζει περίπου 20gr. Από το σημείο αυτό και μετά η ανάπτυξη του θύμου αδένου συνεχίζεται παράλληλα, όχι όμως αναλογικά πλέον, με το ανθρώπινο σώμα κατά τη διάρκεια της σχολικής ζωής μέχρι και την εφηβεία, οπότε και ζυγίζει περίπου 35gr. Οι διαστάσεις του πλέον είναι: **μήκος:** 5cm, **πλάτος:** 4cm, **πάχος:** 6mm.

Από την εφηβεία και μετά η ανάπτυξη του θύμου αδένου σταματά και ακολουθεί φθίνουσα πορεία. Σε ηλικία 25 ετών ζυγίζει περίπου 25gr, σε ηλικία 60 ετών ζυγίζει λιγότερο από 15gr, και τέλος στην ηλικία των 70 ετών ζυγίζει περίπου 6gr.

Ανάλογη πορεία χαρακτηρίζει και τη μακροσκοπική εμφάνιση του θύμου αδένου προοίησης της ηλικίας. Η αρχική, πολυλοβώδης, αποπλατυσμένη εμφάνιση του αδένου μεταβάλλεται σταδιακά και παρουσιάζει άλλοτε άλλες ασύμμετρες περιοχές ινολιπώδους ιστού, χρώματος ροζ-καφέ. Περιβάλλεται από συνδετικό ιστό που περιέχει αγγεία, προσαγωγά μόνο λεμφαγγεία και νεύρα. Χαρακτηριστική είναι η απουσία των απαγωγών λεμφαγγείων.

Αρτηριακή κυκλοφορία

Η αρτηριακή αιμάτωση προέρχεται από: την έσω μαστική αρτηρία, την άνω θυρεοειδική αρτηρία και την κάτω θυρεοειδική αρτηρία

Φλεβική κυκλοφορία

Η φλεβική αποχέτευση καταλήγει: στην ανώνυμη φλέβα και στις θυρεοειδικές φλέβες

Νεύρωση

Τα νεύρα που οριοθετούν το νευρικό πλέγμα που αφορά στο θύμο αδένου είναι πολύ λεπτά και προέρχονται από το πνευμονογαστρικό νεύρο και το συμπαθητικό πλέγμα. Κλάδοι από τον κατιόντα κλάδο του υπογλώσσου νεύρου και το φρενικό νεύρο φθάνουν στην κάψα του αδένου, χωρίς όμως να τη διηθούν και να εισέρχονται στο εσωτερικό του.

2.2. Ιστολογία του θύμου

Ο θύμος αδένος περιβάλλεται από ινώδη κάψα από συνδετικό ιστό. Από την τελευταία ξεκινούν διαφράγματα, τα οποία χωρίζουν τον αδένος σε μικρότερους λοβούς.

Ο κάθε λοβός περιέχει περισσότερα λοβίδια, τα οποία σχηματίζονται από διαφραγμάτια, που ξεκινούν από την ινώδη κάψα του αδένος. Τα λοβίδια έχουν διάμετρο 0.5 - 2 mm. Το κάθε λοβίδιο παρουσιάζει τη **φλοιική μοίρα** και τη **μυελική μοίρα** (εικόνες 1-7). Αποτελείται από τους ακόλουθους τύπους κυττάρων:

1. λεμφικά κύτταρα (T και B) (εικόνες 3 και 4)
2. επιθηλιακά κύτταρα (υποκαψικά, φλοιικά, μυελικά, σωματίων του Hassall) (εικόνες 2, 5, 6, 7)
3. μακροφάγα
4. δενδριτικά κύτταρα (εικόνες 5, 6, 7)
5. άλλα υποστηρικτικά κύτταρα (π.χ. ινοβλάστες, ινοκύτταρα).

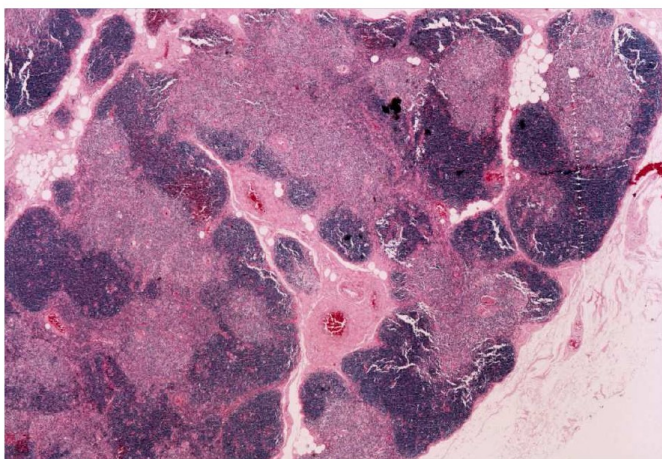
Το επιθήλιο του αδένος αποτελείται από επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα (εικόνες 2, 5, 6, 7), τα οποία προέρχονται από το ενδόδερμα. Αρχικά παρουσιάζουν κυβοειδή εμφάνιση και βρίσκονται σε στενή γειτνίαση μεταξύ τους. Καθώς όμως ο αδένος διηθείται από τα λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα πιέζονται, απομακρύνονται το ένα από το άλλο, και λαμβάνουν, σε άλλοτε άλλο βαθμό σε συνάρτηση με το χρόνο, «αστεροειδή» εμφάνιση, συνδεόμενα μεταξύ τους μόνο με λίγα δεσμοσωμάτια.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία στα διαφορετικά τμήματα του αδένος. Σχηματίζουν μία συνεχή υποκάψια ζώνη, καθώς και ένα δίκτυο στη φλοιική και τη μυελική μοίρα του αδένος. Στο βάθος της μυελικής μοίρας του αδένος συσσωρεύονται, σχηματίζοντας τα σωματίδια του Hassall (εικόνες 5, 6, 7).

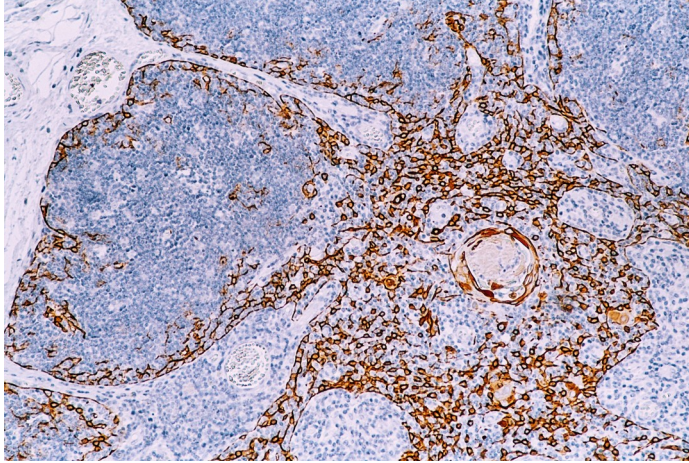
Πιο αναλυτικά, **ο φλοιός του θύμου** περιέχει επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και κυρίως *T-λεμφοκύτταρα*. Τα τελευταία προέρχονται από το μυελό των οστών και πολλαπλασιάζονται και συσσωρεύονται στο θύμο.^(3,7) Ορισμένα από αυτά θα «πεθάνουν» μέσω απόπτωσης στο φλοιό. Αρκετά, όμως θα επιζήσουν και θα μεταναστεύσουν στη μυελική μοίρα, από όπου θα εισέλθουν στην περιφερική κυκλοφορία, για να καταλήξουν σε άλλες *T-εξαρτώμενες* περιοχές του λεμφικού συστήματος (π.χ. παραφλοιική ζώνη των λεμφαδένων, περιαρτηριακά λεμφικά έλυτρα του σπλήνα).^(8, 9, 10)

Στη μυελική μοίρα του αδένου παρατηρούνται επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, *T-λεμφοκύτταρα* και μακροφάγα. Στη μυελική μοίρα ανευρίσκονται **τα σωμάτια του Hassall** (εικόνες 5, 6, 7). Τα σωμάτια αυτά παρουσιάζουν χαρακτηριστική εμφάνιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο «*τυλιγμένης τρίκας μαλλιών*». Αποτελούν ουσιαστικά, άλλοτε άλλο μεγέθους αποπεπλατυσμένα, επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα, σε συγκεντρική διάταξη, τα οποία έχουν εκφυλισθεί, έχοντας υποστεί σε άλλοτε άλλο βαθμό κερατινοποίηση. Η λειτουργία των κυττάρων αυτών δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή.^(8,9,10) Τα αγγεία εισέρχονται στον αδένου από την κάψα του συνδετικού ιστού και τα διαφραγμάτια της. Ο συνδετικός ιστός περιέχει αγγεία, προσαγωγά λεμφαγγεία και φλέβες. Τα αρτηρίδια δίνουν τριχοειδή, που παροχετεύουν στη μυελική μοίρα σε φλεβίδια. Στο φλοιό, τα μικρά αγγεία περιβάλλονται από μία ζώνη από επιθηλιακά δικτυωτά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα λειτουργικό φραγμό θύμου αδένου και αίματος. Ο φραγμός αυτός εμποδίζει την είσοδο μακρομορίων με στόχο την παρεμπόδιση εισόδου αντιγόνων στο φλοιό, όπου αναπτύσσονται τα *T-λεμφοκύτταρα*. Αντίστοιχος φραγμός δεν παρατηρείται στη μυελική μοίρα του αδένου, όπου τα τριχοειδή αγγεία δεν περιβάλλονται από προστατευτική ζώνη επιθηλιακών κυττάρων. Τα παραγόμενα λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία και απομακρύνονται. Η απουσία απαγωγών λεμφαγγείων στο θύμο αδένου δεν επιτρέπει τη διήθηση λέμφου σε αυτόν.

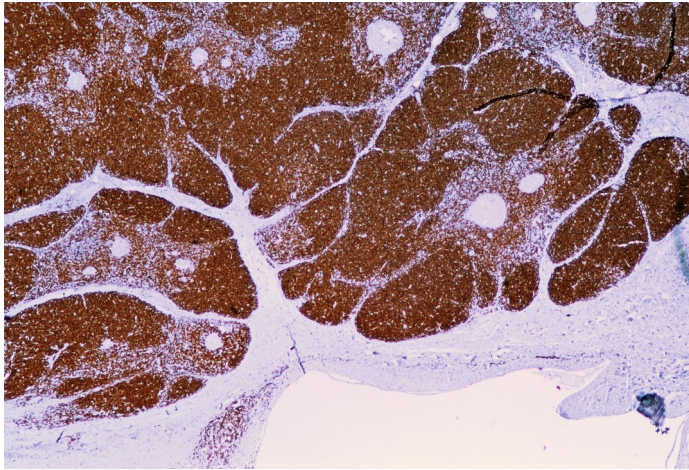
Κατά την ενήλικη ζωή ο αριθμός των *T-λεμφοκυττάρων* και των επιθηλιακών κυττάρων είναι ελαττωμένος.



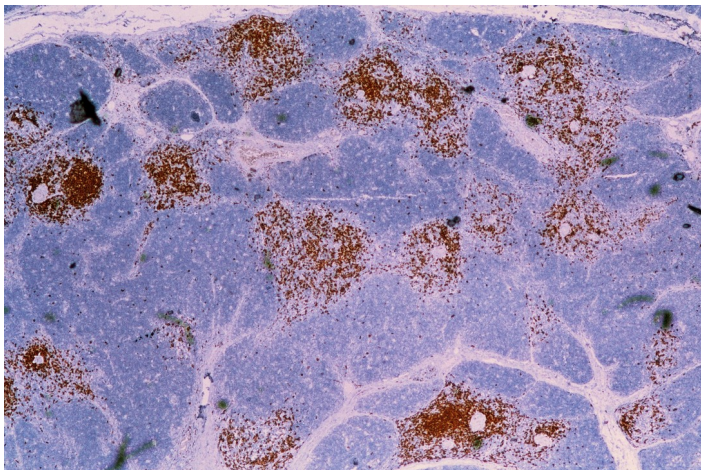
Εικόνα 1: Θύμος:
 Διακρίνονται οι
 αραιοχρωματικές περιοχές του
 μυελού και οι
 σκοτεινοχρωματικές περιοχές
 του φλοιού
 (μεγέθυνση x 100 / χρώση
 αιματοξυλίνης-ηωσίνης).



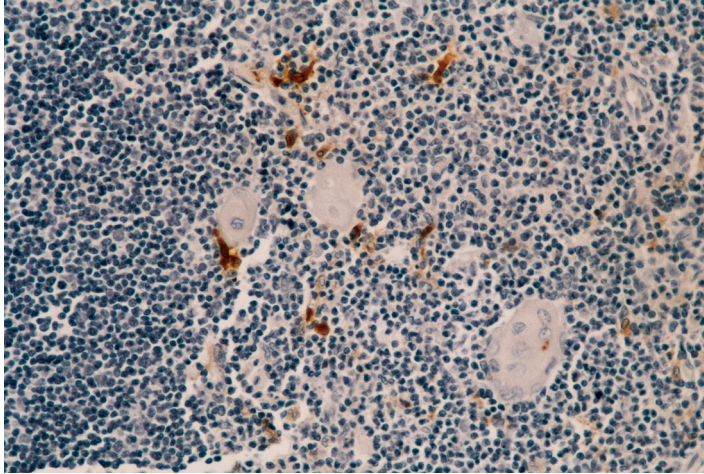
Εικόνα 2: Θύμος:
ανοσοϊστοχημική χρώση για
κερατίνη 19
(μεγέθυνση x 250).
Διακρίνονται ο φλοιός, τα
υποκαψικά επιθηλιακά κύτταρα
και ο μυελός με τα σωματία
Hassall.



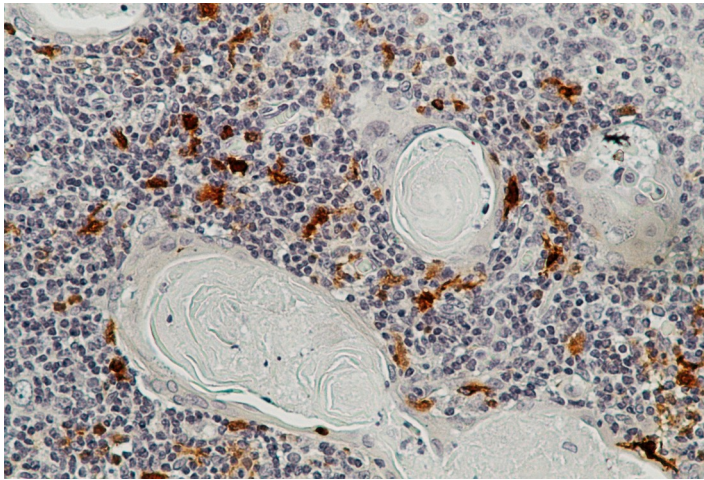
Εικόνα 3: Θύμος:
ανοσοϊστοχημική χρώση
για το δείκτη των
T-λεμφοκυττάρων CD3
(μεγέθυνση x 100).



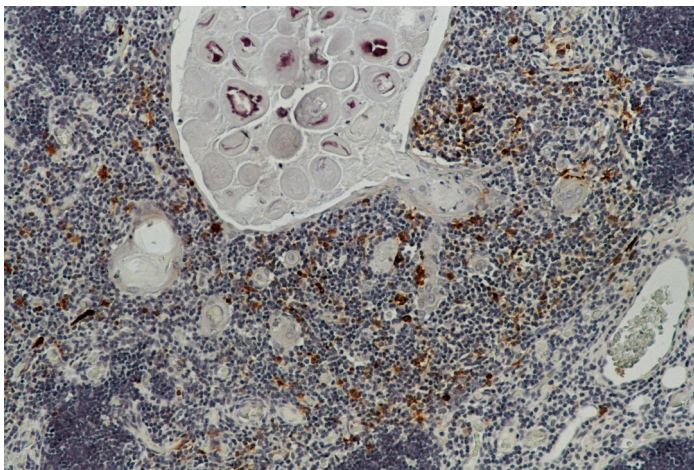
Εικόνα 4: Θύμος:
ανοσοϊστοχημική χρώση για το
δείκτη των
B-λεμφοκυττάρων CD20
(μεγέθυνση x 100).
Θετικότητα εντοπισμένη κυρίως
στο μυελό και γύρω από τα
σωματία Hassall.



Εικόνα 5: Θύμος:
ανοσοϊστοχημική χρώση για την
πρωτεΐνη S100
(μεγέθυνση x 400).
Διακρίνονται νεανικού τύπου και
ανώριμα σωμάτια Hassall στο
μυελό.



Εικόνα 6: Θύμος:
ανοσοϊστοχημική χρώση για την
πρωτεΐνη S100
(μεγέθυνση x 400).
Διακρίνονται ώριμα σωμάτια
Hassall στο μυελό.



Εικόνα 7: Θύμος:
ανοσοϊστοχημική χρώση για την
πρωτεΐνη S100
(μεγέθυνση x 450). Διακρίνονται
ώριμα και εκφυλισμένα σωμάτια
Hassall στο μυελό.

Λειτουργίες του θύμου

Στις κύριες λειτουργίες του θύμου περιλαμβάνονται:⁽⁹⁾

- Η ανάπτυξη ανοσολογικά ώριμων Τ λεμφοκυττάρων από λεμφοκύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών. Αυτό αφορά την διαφοροποίηση των δύο υποκατηγοριών Τ κυττάρων:
 1. τα Τ βοηθητικά (Τβ) και
 2. τα Τ κυτταροτοξικά/κατασταλτικά (Τκυτ/κατ).
- Πολλαπλασιασμός των κλώνων των ώριμων αφελών (naive) Τ κυττάρων προκειμένου να τροφοδοτηθούν η δεξαμενή των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και οι περιφερικοί ιστοί.
- Ανάπτυξη της ανοσολογικής αυτό-ανοχής.
- Έκκριση ορμονών και άλλων διαλυτών παραγόντων που ρυθμίζουν την ωρίμανση, τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των Τ κυττάρων μέσα στο θύμο και στους περιφερικούς ιστούς. Επίσης οι θυμικές ορμόνες ρυθμίζουν την ανάπτυξη των περιφερικών λεμφικών οργάνων και ιστών. Υπάρχουν τουλάχιστον τρία πολυπεπτίδια με ορμονικά χαρακτηριστικά που ονομάζονται θυμουλίνη, θυμοποιητίνη και θυμοσίνη άλφα 1.
- Η αιμοποίηση αποτελεί μία σημαντική θυμική λειτουργία κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης.

2.3. Εμβρυολογία του θύμου

Η αρχέγονη παρουσία του θύμου αδένα αρχίζει από το 3^ο βραγχιακό τόξο. Ξεκινά την 6^η εβδομάδα της κύησης από το κοιλιακό τμήμα του 3^{ου} βραγχιακού τόξου, που μετατοπίζεται ουραία σχηματίζοντας το θυμοφαρυγγικό πόρο. Ο τελευταίος συνενώνεται με το φάρυγγα στο επίπεδο του απιοειδούς κόλπου.^(11, 12) Από το καρδιακό τμήμα του 4^{ου} βραγχιακού τόξου προέρχονται οι κάτω παραθυρεοειδείς αδένες. Αντίθετα, οι άνω παραθυρεοειδείς αδένες σχηματίζονται από το ραχιαίο τμήμα του 4^{ου} βραγχιακού σάκου, το οποίο εκφυλίζεται κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης.

Κατά την 7^η-9^η εβδομάδα της κύησης ο αρχέγονος θύμος αρχίζει να μετακινείται στη μέση γραμμή και να κατέρχεται στο μεσοθωράκιο. Κατά την 10^η

εβδομάδα της κύησης πραγματοποιείται εισβολή από λεμφοκύτταρα, τα οποία προέρχονται από το ήπαρ του εμβρύου και το λεκιθικό ασκό.

Η κάθοδος του θύμου αδένου είναι τυπική για το 3^ο βραγχιακό τόξο. Από τον αποειδή κόλπο, διαπερνά την θυροειδική μεμβράνη, κατέρχεται ανάμεσα στην κοινή καρωτίδα και το πνευμονογαστρικό νεύρο και πορεύεται στη συνέχεια πίσω από το γλωσσοφαρυγγικό νεύρο και πλάγια του θυροειδούς αδένου μέσα στο μεσοθωράκιο.

Οργανογένεση του θύμου

Κύρια λειτουργία του θύμου αδένου αποτελεί η δημιουργία διαφοροποιημένων Τ κυττάρων, τα οποία συμμετέχουν στην ανοσιακή απόκριση και προστασία του οργανισμού από τους ποικίλους παθογόνους παράγοντες. Με τον όρο «**ανάπτυξη του θύμου**» αναφερόμαστε στη διαδικασία ωρίμανσης των Τ κυττάρων στο θύμο κατά την εμβρυική και την ενήλικη ζωή. Σύμφωνα δε με την αναπτυξιακή βιολογία περιγράφουμε *την εμβρυική ανάπτυξη του ίδιου του θύμου αδένου*, η οποία ακολουθεί τους γενικούς κανόνες της διαδικασίας της **οργανογένεσης**.⁽⁴⁾

Η οργανογένεση περιλαμβάνει συγκεκριμένα διακριτά στάδια: την τοποθέτηση, την εγκατάσταση, την ανάπτυξη, το σχεδιασμό και τη διαφοροποίηση.

Τα τρία πρώτα στάδια καταλήγουν στη δημιουργία και την τοποθέτηση στη «σωστή» θέση μέσα στο έμβρυο **του σχηματισμού της βάσης** του οργάνου. Τα επόμενα δύο στάδια, ο σχεδιασμός και η διαφοροποίηση αντανακλούν στη **δημιουργία διαφοροποιήσεων μέσα στο σχηματισμό της βάσης**. Το τελικό προϊόν της οργανογένεσης αποτελεί η **δημιουργία ενός πλήρους ανεπτυγμένου δομικά και λειτουργικά οργάνου**.

Το μοντέλο της οργανογένεσης στο θύμο αδένου μπορεί να διακριθεί για πρακτικούς λόγους σε τρία χρονικά στάδια.^(13, 14, 15)

1. στάδιο I: αρχική οργανογένεση (E9.5-E11)
2. στάδιο II: όψιμη οργανογένεση (E11.5-E15)
3. στάδιο III: όψιμη εμβρυική ανάπτυξη (E15.5 έως και μετά τη γέννηση).

Καθορίζεται δε ρυθμιστικά από τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των κυττάρων, που προέρχονται και από τα τρία βλαστικά δέρματα (embryonic germ layer origin):^(16, 17, 18) τα επιθηλιακά κύτταρα ενδοδερμικής προέλευσης, τα μεσεγχυματικά κύτταρα της νευροεκτοδερμικής προέλευσης

νευρικής ακρολοφίας, τα αιμοποιητικά κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (μεσοδερμικής προέλευσης).

Στάδιο I: Αρχική Οργανογένεση (E9.5-E11)

Τοποθέτηση του σχηματισμού της βάσης

Πειράματα σε αρουραίους κατέδειξαν πως αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων μεταξύ του ενδοδέρματος του 3^{ου} φαρυγγικού θύλακα και του μεσεγχύματος της νευρικής ακρολοφίας από το 3^ο και 4^ο φαρυγγικό τόξο οδηγούν στην έναρξη της δημιουργίας του θύμου. Πρώτα ορατά σημεία της οργανογένεσης περιγράφηκαν περίπου κατά το στάδιο E10.5, ενώ τα αρχικά σημεία μπορεί να εμφανίζονται και νωρίτερα (E9.5). Σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα, το ενδόδερμα είναι αυτό που παρέχει το αρχικό σημείο σηματοδότησης έναρξης της οργανογένεσης του θύμου. Επιπρόσθετα, καταδείχθηκε πως το ενδόδερμα υποστηρίζει επαρκώς την περαιτέρω ανάπτυξη των κύριων επιθηλιακών υποτύπων του θύμου. Αντικρουόμενα δεδομένα υπάρχουν σε ό,τι αφορά στη συμμετοχή του μεσοδέρματος στην έναρξη της οργανογένεσης του θύμου.^(14, 19, 20)

Νευρική ακρολοφία

Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας συνιστούν ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο και μεταβαλλόμενο πληθυσμό κυττάρων, τα οποία, κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης, μεταναστεύουν από το ραχιαίο τμήμα του νευρικού σωλήνα συνεισφέροντας στη δημιουργία ευρέως φάσματος νευρικών και άλλων κυτταρικών τύπων. Πειραματικά δεδομένα κατέδειξαν πως τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας δημιουργούν τη μεσεγχυματική κάψα του θύμου και τον συνδετικό ιστό που περιβάλλει τα αιμοφόρα αγγεία, τα οποία διασχίζουν τα λόβια του αδένου. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα φαίνεται ότι απαιτούνται για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, ευδώνοντας την έκφραση των μορίων MHC τάξης I και II, καθώς και προσφέροντας εκκριτικούς παράγοντες και δομικά συστατικά του μεσοκυττάρου χώρου. Το μεσεγγύμα μοιάζει να ανταποκρίνεται σε μηνύματα από το ενδόδερμα και στη συνέχεια να παράγει σήματα, που υποστηρίζουν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της επιθηλιακής βάσης. Το μοντέλο αμοιβαίας αλληλεπίδρασης ενδοδέρματος-μεσοδέρματος αποτελεί κοινή βάση οργανογένεσης σε όλα τα όργανα.⁽²¹⁻²⁴⁾

Μοριακός έλεγχος

Σύμφωνα με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα προσδιορίστηκε σημαντικός αριθμός μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι με βάση τόσο το πρότυπο έκφρασης τους, όσο και το φαινότυπο που προκύπτει ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων τους, υπεισέρχονται ρυθμιστικά στα αρχικά στάδια της οργανογένεσης του θύμου αδένου.⁽²⁵⁾

Ο **Hoxa3** αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα, μέλος της οικογένειας Hox, οι οποίοι καθορίζουν *την ταυτότητα θέσης* στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Εκφράζεται τόσο στο ενδόδερμα του 3^{ου} φαρυγγικού θυλάκου, όσο και το μεσέγχυμα της νευρικής ακρολοφίας και μπορεί να δρα και στους δύο τύπους κυττάρων. Πειραματικά δεδομένα σε αρουραίους με μετάλλαξη στο γονίδιο, που κωδικοποιεί τον Hoxa3 παράγοντα κατέδειξαν αποτυχία ανάπτυξης του θύμου, ως τμήμα των παρατηρούμενων ποικίλλων ελλειμμάτων στην περιοχή του φάρυγγα.^(26, 27) Ο Hoxa3 υπεισέρχεται, κατά ένα μέρος τουλάχιστο στη διαδικασία της οργανογένεσης, μέσω των μεταγραφικών παραγόντων **Pax1** και **Pax9** στο ενδόδερμα του 3^{ου} φαρυγγικού θυλάκου.^(28, 29, 30) Οι μεταγραφικοί παράγοντες Pax1 και Pax9 παρουσιάζουν στενή λειτουργική συσχέτιση και αποτελούν μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν τα αρχικά στάδια της οργανογένεσης πολλών οργάνων. Μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον Pax9 μεταγραφικό παράγοντα οδηγεί σε πρόωμη αποτυχία οργανογένεσης του θύμου. Μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον Pax1 μεταγραφικό παράγοντα επάγει μικρότερα ελλείμματα, καταλήγοντας σε ένα υποπλαστικό θύμο, ο οποίος είναι ανεπαρκής σε ό,τι αφορά στην ανάπτυξη των θυμοκυττάρων. Σε έμβρυα πειραματόζωα, κατά το στάδιο E10.5, διαπιστώθηκε πως απουσία του Hoxa3 παράγοντα οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης των Pax1 και Pax9 στον 3^ο φαρυγγικό θύλακο. Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός των μεταλλάξεων Hoxa3^{+/-} / Pax1^{-/-} επάγει έκτοπη θέση του θύμου, υποπλασία και καθυστερημένο διαχωρισμό του από τον φάρυγγα.^(4, 31, 32, 33)

Ο **whn (Hjh1)** αποτελεί ένα ακόμη μεταγραφικό παράγοντα, που υπεισέρχεται στη διαδικασία της οργανογένεσης του θύμου και πιο συγκεκριμένα στο στάδιο μετά την αρχική τοποθέτηση και ανάπτυξη του σχηματισμού της βάσης αυτού.^(34, 35)

Το πειραματικό μοντέλο του αρουραίου με μετάλλαξη στον whn (Hjh1) παράγοντα ονομάστηκε «nude mouse» και οδήγησε στην εφαρμογή σειράς πειραματικών πρωτοκόλλων.^(36, 37) Διαπιστώθηκε πως μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον whn οδηγεί στη διαμόρφωση πολλαπλών κυστικών δομών

αποτρέποντας τη φυσιολογική διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων και τον εμπλουτισμό του σχηματισμού της βάσης του θύμου από *Lymphocyte Progenitor Cells, LPCs* – κύτταρα.^(25, 38)

Ο μεταγραφικός παράγοντας **Ikaros** επίσης διαπιστώθηκε πως παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο αρχικό στάδιο της οργανογένεσης επηρεάζοντας την ανάπτυξη των λεμφικών κυττάρων. Αποτελεί χρήσιμο πειραματικό μοντέλο για τη διερεύνηση της πιθανής διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων απουσία των αντίστοιχων λεμφικών. Χρονικά εντοπίστηκε πως εκφράζεται κατά το στάδιο E11.5, παράλληλα με την έναρξη αποικισμού των LPCs κυττάρων.^(39, 40, 41, 42)

Περιγράφηκε ισχυρή αρνητική μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα, οδηγώντας φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται απουσία των απαραίτητων αιμοποιητικής προέλευσης κυττάρων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μικρού σε μέγεθος θύμου, ομοιόμορφου επιθηλιακού οργάνου, το οποίο δεν εμφανίζει τις κυστικές δομές που παρατηρούνται στη βάση του nude mouse.^(43, 44) Με βάση τα παραπάνω, έχει περιγραφεί ένας καταρράκτης γεγονότων εκλυόμενων από μεταγραφικούς παράγοντες, ο οποίος υπεισέρχεται στη διαδικασία της οργανογένεσης. Από την άλλη μεριά, δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα ούτε τα αρχικά μόρια, ούτε τα εναρκτήρια σημεία σηματοδότησης, που υπεισέρχονται στον καθορισμό της θέσης του θύμου. Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factors, FGFs), μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (Bone Morphogenetic proteins, BMPs), και Sonic hedgehog (SHH) αποτελούν παράγοντες οι οποίοι διαπιστώθηκε πως εκφραζόμενοι στο ενδόδερμα κατά το χρονικό διάστημα E9.5-10.5, υπεισέρχονται στην οργανογένεση άλλων οργάνων, χωρίς να καταδειχθεί μέχρι σήμερα κάποιος πιθανός ρυθμιστικά λειτουργικός ρόλος στην οργανογένεση του θύμου αδένου.

Ανάπτυξη της βάσης και διαχωρισμός από το φάρυγγα

Η φάση της ανάπτυξης οδηγεί στη γέννηση αμφίπλευρα δύο επιθηλιακών βάσεων, οι οποίες διαχωρίζονται από το φάρυγγα, μετακινούνται προς τη μέση γραμμή, κοιλιακά και ουραία τελειώνοντας με τη συνένωση τους στη μέση γραμμή πάνω από την καρδιά κατά το διάστημα E12.5 (πειραματικά δεδομένα σε αρουραίους). Η μετανάστευση μοιάζει να είναι ενεργός διαδικασία, που εμφανίζεται ταυτόχρονα με την αρχική ανάπτυξη και τον αποικισμό των LPCs κυττάρων. Πειραματικά δεδομένα υπέδειξαν πως η διαδικασία της μετανάστευσης είναι ανεξάρτητη της διαδικασίας της διαφοροποίησης και πως πιθανά επηρεάζεται από

κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που εκφράζουν τα γονίδια για τον Hox μεταγραφικό παράγοντα.⁽⁴⁵⁾

Στάδιο II: Όψιμη Οργανογένεση (E11.5-E15)

Η περαιτέρω εξέλιξη της οργανογένεσης απαιτεί πλέον τη συμμετοχή και των κυττάρων της αιμοποιητικής σειράς. Κατά το χρονικό διάστημα E11.5-15 ανιχνεύονται τα LPCs κύτταρα, τα οποία μοιάζουν να «διασχίζουν» το πυκνό, στερούμενο αγγείων, μεσεγχυματικό στρώμα και να εισέρχονται στη βάση του θύμου. Πιθανά παράγοντες εκλυόμενοι από το επιθήλιο υποστηρίζουν αυτή την μετακίνηση των LPCs κυττάρων.^(46, 47, 48) Στο σχηματισμό της βάσης δε του θύμου αδένα αρχίζουν να λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μεσεγχύματος και των θυμοκυττάρων με στόχο την περαιτέρω προώθηση της θυμικής επιθηλιακής ανάπτυξης. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα που προέρχονται τόσο από τη νευρική ακρολοφία, όσο και από το μεσόδερμα μεταναστεύουν στους λοβούς του θύμου, συνεισφέροντας ενδοθηλιακά κύτταρα. Αν και η αγγείωση δεν λαμβάνει χώρα πριν το διάστημα E14, τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι απαραίτητα τόσο για τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων, όσο και για την ωρίμανση των θυμοκυττάρων (T-κυττάρων).^(49, 50, 51)

Οι μηχανισμοί που υπεισέρχονται όμως στην περαιτέρω διαφοροποίηση της φλοιικής και μυελικής μοίρας του αδένα δεν έχουν αποσαφηνισθεί. Έχει υποστηριχθεί η άποψη ότι το αρχικό αδιαφοροποίητο κύτταρο λαμβάνει σήματα έναρξης πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης από τα θυμοκύτταρα.

Παρατηρήθηκε *in vitro* πως αναστολή της ανάπτυξης των θυμοκυττάρων ακολουθείται και από αναστολή σε ό,τι αφορά στη διαφοροποίηση του επιθηλίου και το σχηματισμό της φλοιικής και της μυελικής μοίρας του αδένα. Η ολοκλήρωση δε της διαμόρφωσης της φλοιικής μοίρας απαιτεί την παρουσία των λειτουργικών θυμοκυττάρων και της μυελικής μοίρας και την παρουσία ώριμων θυμοκυττάρων που να διαθέτουν *αβ*TCR υποδοχείς. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της οδού του **relB** μεταγραφικού παράγοντα, που ανήκει στο **σύμπλοκο του NF-κΒ**, ο οποίος εκφράζεται σε ένα υποσύνολο από μυελικό επιθήλιο και δενδριτικά κύτταρα. Μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα οδηγεί σε αποτυχία διαμόρφωσης της μυελικής μοίρας του αδένα.^(52, 53, 54, 55, 56)

Επιπρόσθετα, η διαμόρφωση των τμημάτων του αδένα υπόκειται σε χρονικούς περιορισμούς. Η μυελική μοίρα παρουσιάζει μία πλαστικότητα σε ό,τι

αφορά στο σχηματισμό ή και επαναδιαμόρφωση τμημάτων της. Από την άλλη πλευρά, η φλοιική μοίρα χάνει την ικανότητα να επαναδιαμορφωθεί στον ενήλικα θύμιο, παρουσιάζοντας ένα κρίσιμο παράθυρο μετά τη γέννηση πέραν του οποίου δεν επιτρέπεται πλέον η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων.^(57, 58, 59, 60, 61)

Στάδιο III: Όψιμη Εμβρυϊκή Ανάπτυξη

Με βάση όλα τα παραπάνω φαίνεται πως συγκεκριμένες κατά στάδιο αλληλεπιδράσεις μεταξύ θυμοκυττάρων και επιθηλιακών κυττάρων απαιτούνται για την φυσιολογική επιθηλιακή διαφοροποίηση.^(62, 63, 64, 65) Παρά τις σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στη διαδικασία της αιμοποίησης προ και μετά τη γέννηση, πειραματικές μελέτες κατέδειξαν πως τα LPCs κύτταρα τόσο κατά την εμβρυϊκή ζωή όσο και μετά τη γέννηση κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τα εμβρυϊκά επιθηλιακά κύτταρα και να προάγουν φυσιολογικά τη διαδικασία της επιθηλιακής ανάπτυξης. Παρατηρήθηκε αρχικά σημαντική διαφορά σε ό,τι αφορά στην κινητική της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων. Κατά το εμβρυϊκό στάδιο τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, ακολουθώντας συνεχή και προοδευτική ανάπτυξη, αποκτούν την ικανότητα να προωθήσουν τα διάφορα στάδια της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων, ενώ κατά την ενήλικη ζωή απαιτούνται 2-3 μέρες, ώστε να διαφοροποιηθούν και να επιδράσουν στους μηχανισμούς ευόδωσης της ωρίμανσης των θυμοκυττάρων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν ποιοτικές διαφορές σε ό,τι αφορά στις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του θύμιου κατά την εμβρυϊκή και την ενήλικη ζωή και την ικανότητα τους να προάγουν τις διαδικασίες της ωρίμανσης. Πιο συγκεκριμένα, μετά από πειράματα σε πηγά διαπιστώθηκε πως η μετανάστευση των LPCs κυττάρων στο σχηματισμό της βάσης του αδένου λαμβάνει χώρα κατά κύματα.⁽⁶⁶⁾ Αμέσως μετά τη δημιουργία του σχηματισμού της βάσης αυτή καθίσταται επιτρεπτή στη μετανάστευση των βλαστικών κυττάρων για ένα χρονικό διάστημα 36h. Από ένα σημείο όμως και μετά καθίσταται απαγορευτική στο να υποδεχτεί νέα βλαστοκύτταρα, στέλνοντας αποτρεπτικά σημεία σηματοδότησης με την ένδειξη της πλήρους δεξαμενής. Από την άλλη μεριά, σε πειράματα σε αρουραίους διαπιστώθηκε πως η δεξαμενή της βάσης αρχίζει να δέχεται LPCs κύτταρα από περίπου το στάδιο E11.5 και μέχρι και μετά τη γέννηση.⁽⁶⁷⁾ Τα αρχικά μόνο κύτταρα υπόκεινται τις διαδικασίες της διαφοροποίησης κατά την εμβρυϊκή περίοδο, ενώ τα υπόλοιπα, που εισέρχονται μετά το στάδιο E13, παραμένουν σε ανενεργή μορφή μέχρι την πρώτη εβδομάδα μετά τη γέννηση. Μετά το πέρας και της δεύτερης νεογνικής εβδομάδας ο αρχικός πληθυσμός έχει πλέον αντικατασταθεί από τον πληθυσμό που μετανάστευσε σε δεύτερο χρόνο. Αυτή η

καθυστέρηση στην ωρίμανση διαπιστώθηκε και κατά την πειραματική μεταμόσχευση ενήλικων θυμικών λοβών, υποδεικνύοντας αρχικά πως αποτελεί πιθανά έμφυτο χαρακτηριστικό των εμβρυικών επιθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, καταδεικνύεται πως τα εμβρυικά επιθηλιακά κύτταρα δείχνουν να *απαιτούν* ή τουλάχιστο να *προτιμούν* να αλληλεπιδράσουν με μία μόνο ομάδα πληθυσμού LPCs κυττάρων κατά την περίοδο της εμβρυικής ανάπτυξης.^(25, 68, 69, 70) Τέλος, πιθανά διαφαίνεται και η σημαντική διαφορά στη συμπεριφορά εμβρυικών και ενήλικων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.

Τα εμβρυικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα έχουν στόχο την άμεση απόκτηση της ικανότητας επίτευξης των διαδικασιών της ωρίμανσης. Αντίθετα, τα ώριμα πλέον ενήλικα επιθηλιακά κύτταρα μετά την απόκτηση αυτής υπόκεινται σε θετικά και αρνητικά σημεία σηματοδότησης της περαιτέρω συμπεριφοράς τους.^(71, 72)

Παρά τα σημαντικά ερευνητικά βήματα που πραγματοποιήθηκαν σε ό,τι αφορά στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιθηλιακών κυττάρων και θυμοκυττάρων στον ενήλικα θύμο για την παραγωγή δραστικών T-λεμφοκυττάρων και την πυροδότηση ανοσοποιητικής απάντησης υπάρχουν ακόμη πολλά σημεία που απαιτούν διευκρίνιση. Μελλοντική ερευνητική προσπάθεια απαιτείται για τη διαλεύκανση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ωρίμανση του θύμου αδένος και τις περαιτέρω λειτουργίες του.

3. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ο θύμος αδένας αποτελεί κεντρικό όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος.

⁽⁴⁾ Για αυτό το λόγο περιγράφουμε συνοπτικά τη δομή και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.^(12, 73) Το ανοσοποιητικό σύστημα δρα ως μηχανισμός άμυνας του οργανισμού από τους ποικίλους παθογόνους παράγοντες του περιβάλλοντος. Κύρια λειτουργία του αποτελεί η αναγνώριση του παθογόνου αιτίου, η ανάπτυξη αντίδρασης έναντι του κάθε φορά άλλου παθογόνου αιτίου και τέλος η εξάλειψη του παθογόνου αιτίου. Η θέση από όπου ξεκινά μία μόλυνση, ο τύπος του παθογόνου αιτίου, καθώς και ο τρόπος δράσης αυτού, είτε μέσα στο κύτταρο, είτε εξωκυττάρια στους ιστούς ή στις σωματικές κοιλότητες προσανατολίζουν τις ανοσοποιητικές αποκρίσεις.

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προέρχονται από τα «**αυτοανανεούμενα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα**». Αυτά κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής εντοπίζονται στο λεκιθικό ασκό, ήπαρ, σπλήνα, και σε ορισμένες μεσεγχυματικές ομάδες κυττάρων, ενώ μετά τη γέννηση μόνο στο μυελό των οστών, δίνοντας γέννηση σε τέσσερις κύριες κυτταρικές σειρές: ερυθρά σειρά (ερυθροκύτταρα), μεγακαρυοκυτταρική σειρά (αιμοπετάλια), μυελική σειρά (κοκκιοκύτταρα και μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα), λεμφική σειρά (λεμφοκύτταρα).

Τα παραγόμενα κύτταρα και οι διαφορετικές λειτουργίες τους δίνουν γένεση σε δύο μορφές ανοσοποιητικής απάντησης του οργανισμού στους παθογόνους παράγοντες:

1. **την έμφυτη (μη προσαρμοζόμενη) ανοσοποιητική απάντηση**, η οποία αναπτύσσεται στα πρώτα στάδια της μόλυνσης
2. **την προσαρμοζόμενη ανοσοποιητική απάντηση**, η οποία ακολουθεί και διαθέτει τόσο εξειδίκευση, όσο και μνήμη έναντι συγκεκριμένων παθογόνων αιτίων.

3.1. Έμφυτη ανοσοποιητική απάντηση

Με την έννοια εκ γενετής (έμφυτη) ανοσία αναφερόμαστε αρχικά στους φυσιολογικούς φραγμούς του δέρματος, των βλεννογόνων με παχύρρευστη βλέννα (αναπνευστικό, πεπτικό), τις ενεργητικές απωθητικές κινήσεις των τριχών και τον παρμό στο αναπνευστικό σύστημα, μία σειρά παραγόμενων ενζύμων και όξινες εκκρίσεις. Επιπρόσθετα, σημαντικό τμήμα της έμφυτης ανοσίας αποτελούν τα μονοκύτταρα / μακροφάγα και τα κοκκιοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά **είναι η πρώτη γραμμή άμυνας, αποτελώντας φορείς των έμφυτων ανοσοποιητικών απαντήσεων.**⁽⁷³⁾

Μονοκύτταρα (Μακροφάγα)

Προέρχονται από το μυελό των οστών, όπου οι πρόδρομοι τους διαφοροποιούνται σε *προμονοκύτταρα* και στη συνέχεια σε *κυκλοφορούντα μονοκύτταρα*.

Τα μονοκύτταρα απομακρύνονται από την κυκλοφορία και διαμέσου του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων μεταφέρονται σε διάφορα όργανα και μετατρέπονται σε *μακροφάγα*. Τα μονοκύτταρα του αίματος είναι μεγάλα (διάμετρος=10-18 μm), ζουν 6-12 μήνες και ουσιαστικά αποτελούν τη δεξαμενή από την οποία προέρχονται και αναπληρώνονται τα μακροφάγα που εδράζουν στους ιστούς. Τόσο τα μονοκύτταρα όσο και τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν ενεργητικά μικροοργανισμούς ή / και καρκινικά κύτταρα, μετά από προσκόλληση αυτών σε εξειδικευμένους υποδοχείς που διαθέτουν τα μονοκύτταρα και μακροφάγα στην επιφάνεια τους.

Κοκκιοκύτταρα

Διακρίνονται σε τρεις κυτταρικές ομάδες: τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα. Τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα στο περιφερικό αίμα αποτελούνται κυρίως από ουδετερόφιλα (95% των κυκλοφορούντων κοκκιοκυττάρων), παράγονται στο μυελό των οστών (7.000.000/min) και είναι εξαιρετικά βραχύβια (2-3 μέρες). Προσκολλούνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, εξαγγειώνονται δια συμπίεσης και εγκαταλείπουν την κυκλοφορία (διαπήδηση). Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξεία φλεγμονή όπου σε συνεργασία με αντισώματα και το συμπλήρωμα φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Βασεόφιλα και σιτευτικά κύτταρα

Τα βασεόφιλα αντιπροσωπεύουν το 0.2% των λευκών αιμοσφαιρίων στην περιφερική κυκλοφορία. Τα σιτευτικά κύτταρα δεν ανιχνεύονται στην περιφερική κυκλοφορία και διακρίνονται σε δύο τύπους: στα βλεννογονικά, τα οποία σχετίζονται με τους βλεννογόνους και τα σιτευτικά κύτταρα των συνδετικών ιστών. Τα βασεόφιλα και τα σιτευτικά κύτταρα συμμετέχουν στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας (αλλεργίες).

Ηωσινόφιλα

Αντιπροσωπεύουν το 2-5% των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα υγιών, μη αλλεργικών ατόμων. Τα ώριμα ηωσινόφιλα χαρακτηρίζονται από ηωσινόφιλα κοκκία τα οποία περιέχουν ένζυμα.

Τα ηωσινόφιλα υποστηρίζουν την ανοσοποιητική απάντηση του οργανισμού και συμμετέχουν στην άμυνα εναντίον των παρασίτων και στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας (αλλεργίες).

3.2 Επίκτητη (προσαρμοζόμενη) ανοσοποιητική απάντηση

Η επίκτητη (προσαρμοζόμενη) ανοσία αποτελεί τη δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Ενεργοποιείται είτε σε μολύνσεις που διαρκούν περισσότερο χρονικά (τουλάχιστο μερικές μέρες), όπου ο μηχανισμός «πρώτης γραμμής» δεν επαρκεί, είτε σε καταστάσεις επαναμολύνσεων. Γενικά, αφορά στη δημιουργία μιας τάξης πρωτεϊνών, που ονομάζονται ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα) και χαρακτηρίζουν τα Β-λεμφοκύτταρα, καθώς και την παραγωγή Τ λεμφοκυττάρων τα οποία χαρακτηρίζονται από τον Τ-κυτταρικό υποδοχέα (TCRαβ ή TCRγδ).⁽⁷³⁾

Λεμφοκύτταρα

Αντιπροσωπεύουν το 20% περίπου του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων στην περιφερική κυκλοφορία του ενήλικα ανθρώπου. Παράγονται καθημερινά από τα κεντρικά λεμφικά όργανα (θύμος αδένας και μετά τη γέννηση και από το μυελό των οστών), ενώ ορισμένα μεταφέρονται δια της κυκλοφορίας στα περιφερικά λεμφικά όργανα (σπλήνας, λεμφαδένες, βλενογόνο-εξαρτώμενους λεμφικούς ιστούς). Πολλά είναι μακρόβια και μπορεί να παραμείνουν στην κυκλοφορία ως κύτταρα μνήμης.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρατήρησης τους στο οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαχωρίζονται μορφολογικά σε δύο πληθυσμούς:

- *μορφολογικός τύπος I*: μικρά κύτταρα, χωρίς κοκκία, και αυξημένο λόγο πυρήνα / κυτταρόπλασμα
- *μορφολογικός τύπος II*: μεγαλύτερα κύτταρα, τα *μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα* (LGL), τα οποία περιέχουν στο κυτταρόπλασμα τους αζουρόφιλα κοκκία και μικρότερο λόγο πυρήνα / κυτταρόπλασμα.

Τα λεμφοκύτταρα, αποτελούν ένα εξαιρετικά ετερογενή πληθυσμό λευκοκυττάρων. Με βάση την ανοσοϊστολογική τους εικόνα διαιρούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες:

1. **Τα Τ-λεμφοκύτταρα**, τα οποία εκφράζουν τους Τ-κυτταρικούς υποδοχείς (Ταβ ή Τγδ)
2. **Τα Β-λεμφοκύτταρα**, τα οποία εκφράζουν ανοσοσφαιρίνες
3. **Τα ΝΚ-λεμφοκύτταρα**, τα οποία δεν εκφράζουν ούτε ανοσοσφαιρίνες, ούτε Τ-κυτταρικούς υποδοχείς. Εκφράζουν KIR (Killer Inhibitory Receptors).

Τ-λεμφοκύτταρα

Τα Τ λεμφοκύτταρα υπεισέρχονται στην επίτευξη επαρκούς ανοσοποιητικής απάντησης του οργανισμού σε ποικίλα παθογόνα αίτια.

Διαθέτουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν «θραύσματα» αντιγόνων, τα οποία είναι συνδεδεμένα και εκτίθενται από εξειδικευμένα «αντιγόνο-παρουσιαστικά» κύτταρα

Ο όρος «**αντιγόνο**» χαρακτηρίζει κάθε μόριο, που μπορεί να αναγνωρίζεται *ειδικά* από τα Β ή τα Τ λεμφοκύτταρα. Αποτελεί τον παράγοντα πυροδότησης της έναρξης της ανοσοποιητικής απάντησης του οργανισμού σε παθογόνους παράγοντες.

Ο όρος «**αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα**» χαρακτηρίζει έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων με ανοσοδιεγερτικές ικανότητες. Εντοπίζονται στο δέρμα, στους λεμφαδένες, στο σπλήνα και στο θύμο. Παρουσιάζουν αντιγόνα στα Τ-λεμφοκύτταρα.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα, τα οποία εντοπίζονται αρχικά στο εσωτερικό του αντιγόνο-παρουσιαστικού κυττάρου και τα οποία στη συνέχεια

εκτίθενται στην επιφάνεια του κυττάρου ως μικρά πολυπεπτιδικά θραύσματα. Η έκθεση αυτή επιτυγχάνεται από συγκεκριμένη ομάδα μορίων, που κωδικοποιούνται από γονίδια του *μειζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC)*, γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως **μόρια MHC**.^(74, 75, 76, 77, 78) Συνδεόμενο το αντιγόνο με τα μόρια MHC αναγνωρίζεται από τον ειδικό υποδοχέα TCR του T λεμφοκυττάρου, οδηγώντας στην ενεργοποίηση αυτού.

Ο υποδοχέας επί των T-λεμφοκυττάρων, TCR, εντοπίζεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και αποτελεί ένα ετεροδιμερές μόριο, που αποτελείται από δύο αλυσίδες συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό (79, 80, 81, 82).

Έχουν προσδιορισθεί και περιγραφεί δύο υπότυποι του υποδοχέα:

1. **$\alpha\beta$ TCR (90-95%)**, που αποτελείται από μία α (40-50 kDa) και μία β (35-47 kDa) αλυσίδα. Οι αλυσίδες αυτές αναδιπλώνονται σε μία τρισδιάστατη δομή στο χώρο παρόμοια με εκείνη της περιοχής Fab των ανοσοσφαιρινών.
2. **$\gamma\delta$ TCR (5-10%)**, που αποτελείται από μία γ και μία δ αλυσίδα.

Και οι δύο υποδοχείς συνδυάζονται με μία ομάδα πέντε πολυπεπτιδίων, το σύμπλεγμα CD3, και μαζί συνιστούν το «σύμπλεγμα του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων».^(83, 84, 85, 86, 87)

Τα λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνεια τους μεγάλο αριθμό μορίων, τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση διαφόρων λεμφοκυτταρικών υποομάδων. Σήμερα, τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται ως **δείκτες (CD)** (CD: cluster of designation) και αποτελούν τα μόρια που αναγνωρίζονται από συγκεκριμένα αντισώματα με βάση ανοσολογικές τεχνικές. Η κατανομή των δεικτών CD χαρακτηρίζει διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Για παράδειγμα, τα CD2, CD3, CD8 ανευρίσκονται μόνο σε T- λεμφοκύτταρα, το CD4 σε T-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα και το CD79 μόνο σε B-λεμφοκύτταρα.^(88, 89, 90, 91) Τα ανωτέρω μόρια CD, από λειτουργική άποψη αποτελούν διαύλους επικοινωνίας των λεμφοκυττάρων με τον περιβάλλοντα χώρο, υπεισερχόμενοι ρυθμιστικά στην λεμφοκυτταρική κυκλοφορία, προσκόλληση και ενεργοποίηση.

Τα T-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τον υπότυπο $\alpha\beta$ TCR διαφοροποιούνται κυρίως σε δύο πληθυσμούς:

1. **πληθυσμός 1 (T_H)**, που φέρει τον δείκτη CD4 και βοηθά και επάγει ανοσοποιητικές απαντήσεις, αναγνωρίζοντας τα αντιγόνα σε συνδυασμό με τα μόρια MHC της τάξης II.

Ανάλογα με τις κυτταροκίνες που εκκρίνουν διακρίνουμε δύο υποομάδες:

- α. υποομάδα **T_H1**, που εκκρίνει IL2 και IFN γ , με αποτέλεσμα να καταπολεμά ενδοκυττάρια παθογόνα, ιούς, βακτήρια, παράσιτα
 - β. υποομάδα **T_H2**, που εκκρίνει IL4, IL5, IL6, IL10, υπεισερχόμενη αποτελεσματικά στη διέγερση των B λεμφοκυττάρων προς πολλαπλασιασμό και παραγωγή ανοσοσφαιρινών, προσφέροντας προστασία έναντι ελεύθερων μικροοργανισμών (χυμική ανοσία)
2. **πληθυσμός 2 (T_c)**, που φέρει τον δείκτη CD8 και είναι κυρίως κυτταροτοξικός, αναγνωρίζοντας τα αντιγόνα σε συνδυασμό με τα μόρια MHC της τάξης I.
 3. **πληθυσμός 3** (CD4 αρνητικός/CD8 αρνητικός), πολύ μικρό κλάσμα, που δεν φέρει κανένα από τους δύο δείκτες και πιθανά παίζει κάποιο ρυθμιστικό ρόλο.

Από τα T-λεμφοκύτταρα, που εκφράζουν τον υπότυπο $\gamma\delta$ TCR όσα ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα είναι CD4 αρνητικά/CD8 αρνητικά, ενώ όσα εντοπίζονται στους ιστούς είναι συχνά CD8 θετικά.^(92, 93, 94) Το κάθε T-λεμφοκύτταρο διαθέτει είτε το συνδυασμό $\alpha\beta$ είτε το συνδυασμό $\gamma\delta$ αλυσίδων. Η συντριπτική πλειονότητα των T-λεμφοκυττάρων διαθέτει τον $\alpha\beta$ TCR υπότυπο.^(92, 93, 94) Παρά την αριθμητική υπεροχή του $\alpha\beta$ TCR υποτύπου, ο $\gamma\delta$ TCR διαθέτει σημαντική συμμετοχή στην άμυνα του οργανισμού, αντιμετωπίζοντας αφενός κάποιους συγκεκριμένους παθογόνους παράγοντες, και αφετέρου παίζοντας τροποποιητικό ρόλο σε ό,τι αφορά στη δράση του $\alpha\beta$ TCR.^(92, 93, 94) Οι δύο υπότυποι εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία στο ανθρώπινο σώμα. Ο $\alpha\beta$ TCR ανιχνεύθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95% των περιφερικών λεμφοκυττάρων, καθώς και στο μεγαλύτερο αριθμό των θυμοκυττάρων, που εκφράζουν τον TCR. Ο $\gamma\delta$ TCR υπότυπος εντοπίστηκε κυρίως στα διάφορα επιθήλια, όπως η επιδερμίδα στους αρουραίους, στο εντερικό επιθήλιο, τη μήτρα και τη γλώσσα σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο, ενώ ανιχνεύθηκε σε ελάχιστο ποσοστό των T λεμφοκυττάρων στο θύμιο και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα.^(95, 96, 97, 98, 99, 100, 101)

Οι δύο υπότυποι του υποδοχέα κωδικοποιούνται από ένα πολύπλοκο σύστημα γονιδίων. Οι γονδιακοί τόποι α και γ διαθέτουν ομάδες V και J γονιδίων (που είναι ανάλογο με τις ελαφρές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών), ενώ οι γονδιακοί τόποι β και δ έχουν ομάδες V, D και J γονιδίων (που είναι ανάλογο με τις βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών). Διαφορετικοί ανασυνδυασμοί μεταξύ των γονιδίων θα οδηγήσουν στη δημιουργία διαφορετικού υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη

διαφοροποιημένη ενεργοποίηση του Τ-λεμφοκυττάρου και επομένως τη διαφορετική ανοσοποιητική απάντηση του οργανισμού.^(102, 103, 104, 105, 106)

Η διαδικασία επιλογής του υπότυπου, ο οποίος τελικά θα εκφρασθεί στο κάθε κύτταρο καθορίζεται από:^(107,108,109,110) το αντιγόνο, που απαιτείται να αντιμετωπισθεί και τα μόρια του ΜHC, που εκφράζονται στα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα με βάση το γεγονός ότι ο υποδοχέας αναγνωρίζει θραύσματα αντιγόνων προσδεδεμένων στο ΜHC.

Το τελευταίο κωδικοποιεί δύο ομάδες μορίων, **μόρια ΜHC τάξης I** και **μόρια ΜHC τάξης II**, που αποτελούν εξαιρετικά πολυμορφικές δομές της επιφάνειας των κυττάρων. Οι δύο αυτές ομάδες παρουσιάζουν ομοιότητες σε ότι αφορά τη γενική τρισδιάστατη δομή των μορίων, αλλά και διαφορές στο μέγεθος και την οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλύσεων. Η επιλογή επομένως του πεπτιδίου (αντιγόνου), που θα προσδεθεί σε ένα συγκεκριμένο μόριο ΜHC καθορίζεται από τη φύση της πλευρικής αλυσίδας του πεπτιδίου, καθώς και τη συμπληρωματικότητα με την προσδετική αύλακα του μορίου ΜHC. Τα πεπτίδια που προσδέονται σε μόρια ΜHC της τάξης I προέρχονται από πρωτεΐνες που συντίθενται μέσα στο κύτταρο, αποδομούνται και μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα πεπτίδια που προσδέονται σε μόρια ΜHC της τάξης II προέρχονται από πρωτεΐνες που εσωτερικεύθηκαν από ένα κύτταρο και στη συνέχεια αποδομήθηκαν. Οι δύο ομάδες του συστήματος ΜHC παρουσιάζουν διακριτές οδούς επεξεργασίας των διαφόρων αντιγόνων. Η ανοσοποιητική απάντηση είναι το αποτέλεσμα μιας συνεχούς, δυναμικής διαδικασίας, η οποία μεταβάλλεται και εξελίσσεται με στόχο το σχηματισμό της απαιτούμενης κάθε φοράς ανοσοποιητικής δράσης.

Η ενεργοποίηση λοιπόν του Τ-λεμφοκυττάρου αποτελεί αποτέλεσμα συνδυασμού και συνεργασίας πολλών παραγόντων:

1. Συνεργική συσσώρευση ειδικών TCRs και συμπλεγμάτων ΜHC-πεπτιδίων.
2. Επικουρικά μόρια CD4 και CD8, που υπεισέρχονται στη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποδοχέων και των συμπλεγμάτων ΜHC-πεπτιδίων, πυροδοτώντας την έναρξη ενεργοποίησης του λεμφοκυττάρου μέσα από την οδό της φωσφορυλίωσης της κινάσης της τυροσίνης.
3. Χημική συγγένεια του υποδοχέα TCR με το αντιγόνο, το οποίο εκφράζεται στα μόρια του ΜHC και η οποία προσδιορίζει το βαθμό ενεργοποίησης του υποδοχέα.

Παρά την πολυπλοκότητα των μηχανισμών που υπεισέρχονται στη διαμόρφωση της αμυντικής συμπεριφοράς του T λεμφοκυττάρου, η γενετική πολυμορφία των μορίων του MHC, παρέχει τη δυνατότητα στον οργανισμό να επηρεάσει:

1. το επίπεδο ανάπτυξης ανοσοποιητικών απαντήσεων
2. την αντίσταση και την ευαισθησία σε μολύνσεις, αυτοάνοσες παθήσεις, αλλεργίες.

B λεμφοκύτταρα

Αντιπροσωπεύουν το 5-15% του συνόλου των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και προσδιορίζονται από την παρουσία των ανοσοσφαιρινών στην επιφάνεια τους. Οι ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεΐνες, που παράγονται από τα B κύτταρα. Αποτελούν μόρια σχήματος Y, που περιλαμβάνουν δύο όμοιες μακριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Heavy / H-chains) και δύο όμοιες μικρές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Light / L-chains). Έχουν ανιχνευθεί και περιγραφεί πέντε τάξεις ανοσοσφαιρινών και συγκεκριμένα οι IgG, IgA, IgM, IgD και IgE.^(111, 112, 113, 114) Οι ανοσοσφαιρίνες, ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου δρουν ως «ειδικοί υποδοχείς αντιγόνων». Επίσης οι ανοσοσφαιρίνες εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα οργανώνοντας την χυμική ανοσία του οργανισμού στα υγρά του σώματος. Αναγνωρίζουν και συνδέονται με συγκεκριμένα αντιγόνα με ένα τρόπο όμοιο με αυτό της κλειδαριάς-κλειδιού, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Οι ανοσοσφαιρίνες έχουν την ίδια βασική δομή, διαφέροντας στην περιοχική σύνδεση με το αντιγόνο. Κάθε ανοσοσφαιρίνη προσδένεται σε περιορισμένο τμήμα του αντιγόνου, τον **επίτοπο**. Το κάθε αντιγόνο μπορεί να διαθέτει περισσότερους από έναν επιτόπους, ή και επαναλαμβανόμενους επιτόπους. Η ανοσοσφαιρίνη είναι εξειδικευμένη για το περιορισμένο τμήμα του αντιγόνου, παρά για το σύνολο αυτού. Ένα τμήμα του μορίου της ανοσοσφαιρίνης προσδένει το αντιγόνο (τμήμα Fab), ενώ άλλα τμήματα (τμήμα Fc) αλληλεπιδρούν με άλλα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα φαγοκύτταρα, συμμετέχοντας στην έκλυση της ανοσοποιητικής απάντησης σε πολλαπλά επίπεδα ταυτόχρονα. Το 90% των B λεμφοκυττάρων στο ανθρώπινο περιφερικό αίμα εκφράζει τις IgM και IgD ανοσοσφαιρίνες, ενώ λιγότερο από το 10% εκφράζει τις IgA, IgE και IgG. Η ανοσοσφαιρίνη συνδεόμενη με άλλα μόρια στην επιφάνεια του B λεμφοκυττάρου (π.χ. CD 79) σχηματίζει το «σύμπλεγμα του αντιγονικού υποδοχέα του B λεμφοκυττάρου» (BCR).

Η σύνδεση του αντιγόνου με τον υποδοχέα του Β λεμφοκυττάρου οδηγεί στην ενεργοποίηση αυτού, καθώς και στην ωρίμανση πολλών Β λεμφοβλαστών προς ώριμα Β-κύτταρα, τα οποία *in vivo* συνεχίζουν τη διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα (τελική διαφοροποίηση). Τα τελευταία, ενώ είναι άφθονα στο μυελό των οστών, αποτελούν το 0.1% των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και περιορίζονται σε δευτερογενή λεμφικά όργανα και ιστούς. Συνήθως είναι βραχύβια και πεθαίνουν με απόπτωση, ενώ ένα μικρό ποσοστό αυτών επιζούν για μήνες στο μυελό των οστών.

Ένα μέρος των Β-λεμφοκυττάρων φέρει στην επιφάνεια του τον δείκτη CD5. Τα Β-λεμφοκύτταρα αυτά παράγουν κυρίως IgM αλλά και IgA και IgG ανοσοσφαιρίνες. Παρουσιάζουν μικρή τάση για σύνδεση, είναι πολυαντιδρώντα, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας και συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις ιδιοτυπικού δικτύου με το ανοσοποιητικό σύστημα.

3.3 Μηχανισμοί ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματος στο θύμο

Στο θύμο αδένα, τα προ-θυμικά Τ-λεμφοκύτταρα από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, στην περιφέρεια του φλοιού πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν τη διαφοροποίησή τους (73). Εκεί τα κύτταρα αποκτούν πρώτα το CD 4 και μετά το CD 8 σε χαμηλή πυκνότητα (CD: Cluster Designation). Επίσης πραγματοποιείται μια παραγωγική αναδιάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τον TCR (T Cell Receptor: υποδοχέας που εκφράζεται επί των Τ-λεμφοκυττάρων). Τα Τ-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μόνον όταν τους εκτίθενται μαζί με εαυτά μόρια MHC (Major Histocompatibility Complex: μείζων σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας) επάνω σε APCs (Antigen Presenting Cells: αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα). Οι μηχανισμοί επιλογής που λαμβάνουν χώρα στο θύμο αδένα διακρίνονται: στο μηχανισμό της θετικής επιλογής και στο μηχανισμό της αρνητικής επιλογής.

Σε ότι αφορά **στη θετική επιλογή** η οποία ονομάζεται και θυμική εκπαίδευση, εξασφαλίζεται ότι μόνον οι TCRs οι οποίοι εκδηλώνουν μέτρια χημική συγγένεια για τα εαυτά μόρια του MHC επιτρέπεται να συνεχίσουν την πορεία εξέλιξης. Τα Τ-λεμφοκύτταρα των οποίων οι υποδοχείς εμφανίζουν συγγένειες πολύ υψηλές ή πολύ χαμηλές για τα εαυτά μόρια του MHC υφίστανται απόπτωση στο

φλοιό και φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα. Η θετική επιλογή διαμεσολαμβάνεται από θυμικά, επιθηλιακά κύτταρα που λειτουργούν ως APCs.

Σε ότι αφορά **στην αρνητική επιλογή**, υφίστανται απόπτωση και καταστρέφονται από μακροφάγα κύρια στο βάθος του φλοιού όσα από τα ήδη επιλεγμένα στη θετική επιλογή T- λεμφοκύτταρα φέρουν υποδοχείς οι οποίοι αναγνωρίζουν εαυτά συστατικά του ιδίου οργανισμού διαφορετικά όμως από τα εαυτά μόρια MHC. Η αρνητική επιλογή λαμβάνει χώρα στα βαθύτερα στρώματα του φλοιού, τη φλοιομυελική συμβολή και το μυελό κατόπιν αλληλοεπιδράσεων των θυμοκυττάρων με αντιγόνα, με αλληλοδιαπλεκόμενα κύτταρα και μακροφάγα.

Μετά τη διαδικασία αυτή εμφανίζονται μονοθετικά ώριμα λεμφοκύτταρα που εκφράζουν είτε το CD 4 είτε το CD 8 και εξέρχονται προς την περιφέρεια λειτουργώντας ως ώριμα «βοηθητικά» και «κυτταροτοξικά» T-λεμφοκύτταρα αντίστοιχα. Λιγότερο από 5% των θυμοκυττάρων εγκαταλείπουν το θύμο.

Όταν η αρνητική επιλογή δεν είναι πλήρως αποτελεσματική κάποια από τα μη επιτρεπόμενα κύτταρα μπορεί να εισέλθουν στην κυκλοφορία. Εκεί όμως περιφερικοί μηχανισμοί άμυνας τα αδρανοποιούν σε ένα δεύτερο επίπεδο προστασίας του οργανισμού. Εάν και αυτό το επίπεδο προστασίας αποδειχθεί διαβλητό μπορεί να αναπτυχθεί η αυτοανοσία (π.χ. συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ορισμένες περιπτώσεις αρθρίτιδας, διαβήτη τύπου I). Σε εκδήλωση αντιδράσεων υπερευαισθησίας, ουσιαστικά αναπτύσσεται υπερευαισθησία σε αδύναμα αντιγόνα τα οποία δεν προκαλούν απάντηση στους περισσότερους ανθρώπους.

4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΟΥ ΘΥΜΟΥ

Ο θύμος παίζει κομβικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και στην παραγωγή αυτοανεκτικών Τ-κυττάρων. Στη διαδικασία διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων σημαντικό ρόλο παίζουν τα στρωματικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα).⁽¹¹⁵⁻¹⁸⁶⁾

4.1 Μακροφάγα

Εντοπίζονται τόσο στο φλοιό, όσο και στην περιοχή του μυελού. Στο φλοιό γίνονται άμεσα αντιληπτά ξεχωρίζοντας από το πεπλατυσμένο, ωχρό κυτταρόπλασμα τους, πλήρες από φαγοκυττωμένο υλικό. Σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης, με βάση το ωχρό χρώμα του κυτταροπλάσματος τους στο μπλε φόντο του φλοιού δίνουν της εικόνα του «έναστρου ουρανού». Κύρια λειτουργία τους αποτελεί η φαγοκύτωση. Χαρακτηριστικά περιέχουν κυτταρικά υπολείμματα στο κυτταρόπλασμα τους, τα οποία προέρχονται από αποπτωτικά λεμφοκύτταρα. Αυξημένος αριθμός μακροφάγων αντανακλά αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα, όπως σε οξύ stress που επάγεται με κορτικοστεροειδή. Πέρα από τη φαγοκυττάρωση, τα μακροφάγα υπεισέρχονται στην ενδοθυμική ωρίμανση των προγονικών Τ κυττάρων.^(121, 149, 150, 151, 152)

4.2. Δενδριτικά κύτταρα

Ανήκουν στην μονοκυτταρική/μακροφαγική κυτταρική σειρά, αλλά ακολουθούν διαφορετικό πρότυπο διαφοροποίησης. Στη συμβατική ιστολογία αναγνωρίζονται ως μεγάλου μεγέθους κύτταρα, με ακανόνιστο σχήμα, ωχρό κυτταρόπλασμα και έκκεντρο πυρήνα. Υπεισέρχονται κυρίως στη διαδικασία της αρνητικής επιλογής των προδρομικών Τ-κυττάρων.^{(121, 153, 154, 155).}

4.3. Λεμφοκύτταρα

Αποτελούν τον κύριο πληθυσμό διερχομένων κυττάρων από το θύμο αδένα. Η συντριπτική πλειοψηφία των λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένα απαρτίζεται από τα Τ λεμφοκύτταρα. Β λεμφοκύτταρα και μερικά πλασματοκύτταρα εντοπίζονται στον μυελό και μερικές περιαγγειακές περιοχές. Σε αντίθεση με την πρωτογενή

λειτουργία του φλοιού, την ανάπτυξη δηλαδή λεμφοκυττάρων ανεξάρτητα από εξωγενή ερεθίσματα του ανοσοποιητικού συστήματος, ο μυελός θεωρείται πως παίζει δύο ρόλους, υπεισερχόμενος στην πρωτογενή και τη δευτερογενή ανοσολογική λειτουργία.

Ο ανοσοφαινότυπος και η κυτταρική μορφολογία των πρόδρομων T-κυττάρων του θύμου αδένου συσχετίζονται στενά με τη λειτουργικότητα αυτών των κυττάρων.^(156, 157, 158, 159) Τα λεμφοκύτταρα που εντοπίζονται στην υποκαψική ζώνη του φλοιού είναι τα πλέον ανώριμα κύτταρα. Τα μικρού μεγέθους λεμφοκύτταρα του φλοιού αντανakλούν ένα επόμενο εξελικτικά στάδιο ωρίμανσης. Τέλος, τα λεμφοκύτταρα που εντοπίζονται στη μυελική μοίρα αποτελούν τα πλέον ώριμα κύτταρα. Με την ανάπτυξη και την επέκταση της ανοσοϊστοχημείας διαπιστώθηκε πως τα ώριμα λεμφοκύτταρα δεν περιορίζονται μόνο στο μυελό, αλλά ανιχνεύονται διασκορπισμένα και σε όλη τη φλοιική μοίρα του αδένου, ενώ ανώριμα λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται και στο μυελό. Με βάση τα νεότερα δεδομένα, η θετική επιλογή δεν είναι εξαρτώμενη μόνο από τα επιθηλιακά κύτταρα, ούτε η αρνητική επιλογή εξαρτώμενη μόνο από τα δενδριτικά κύτταρα. Η τοπογραφική κατανομή των βοηθητικών συμμετεχόντων κυττάρων, καθώς και η επιφανειακή έκφραση των σχετικών MHC μορίων αντιγόνων με ή χωρίς επεξεργασμένα αυτοαντιγόνα μπορεί να είναι οι πρώτοι παράγοντες στην επιλογή των θυμοκυττάρων, που είναι δεκτικά στη διαδικασία. Η υπόθεση αυτή αποτελεί λογική επαγωγή της επικοινωνίας ανάμεσα στα αναπτυσσόμενα T κύτταρα και τα άλλα μη λεμφικά κύτταρα του στρώματος (επιθηλιακά, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα).

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις των λεμφοκυττάρων με τα επιθηλιακά κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα «επικοινωνούν» και με δομικά συστατικά του εξωκυττάρου χώρου.^(160, 161, 162) Ο τελευταίος απαρτιζόμενος από ίνες κολλαγόνου, δικτυωτές ίνες και γλυκοζαμινογλυκάνες, σχηματίζει ένα πολύπλοκο δικτυωτό πλαίσιο στη μυελική μοίρα του αδένου και σε μικρότερο βαθμό στο φλοιό. Το πολύπλοκο δίκτυο του εξωκυττάρου χώρου υποστηρίζει κυρίως τη μετανάστευση των αναπτυσσόμενων κυττάρων του θύμου (λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα). Πιθανά υπεισέρχεται ρυθμιστικά και στην ανάπτυξη του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων, με την απόδοση των διαλυτών κυτοκινών σε υψηλές, τοπικές συγκεντρώσεις στις απαιτούμενες θέσεις.

Η λειτουργική διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων και η διαμόρφωση της αντιγονικής τους ειδικότητας πραγματοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του θύμου με τη μορφή ενός προγράμματος ωρίμανσης των θυμοκυττάρων (T-λεμφοκυττάρων) που περιλαμβάνει πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, εκπαίδευση και απόπτωση

δυνητικά αυτοαντιδραστικών T-κυττάρων.⁽¹⁶³⁾ Το πρόγραμμα ελέγχεται από άμεσες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις τόσο όσον αφορά τη ρύθμιση της θετικής επιλογής (αλληλεπιδράσεις μεταξύ θυμοκυττάρων / φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων) όσο και τη ρύθμιση της αρνητικής επιλογής (αλληλεπιδράσεις μεταξύ θυμοκυττάρων / μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και/ή θυμοκυττάρων / δενδριτικών κυττάρων, DC).⁽¹⁶⁴⁾ Σε κάθε στάδιο του προγράμματος κυτταρικής διαφοροποίησης στο θύμο, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα ελέγχονται από μόρια προσκόλλησης και από αυξητικούς παράγοντες (κυτταροκίνες, ορμόνες) καθώς επίσης και από τις παρακρινείς και κρυπτοκρινείς δράσεις ορμονών.^(3, 165)

Ένα σημαντικό εύρημα των προσφάτων χρόνων είναι η ανάδειξη των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων θυμοκυττάρων / θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Αυτό το γεγονός που είναι σημαντικό τόσο για τη φυσιολογική οδό διαφοροποίησης όσο και για τη λειτουργία και των δύο ανωτέρω κυτταρικών πληθυσμών, επηρεάζει έμμεσα την αρχιτεκτονική του οργάνου.^(4, 166, 167) Στη δομική οργάνωση του θύμου, αμοιβαίες σχέσεις μεταξύ ποικίλων τύπων λεμφικών και μη λεμφικών κυττάρων αντανακλούνται στην κατανομή τους, σε συγκεκριμένες περιοχές του οργάνου στις οποίες εμφανίζονται με τη μορφή των πολυκυτταρικών συμπλεγμάτων.⁽¹⁶⁸⁾ Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ζωής το θυμικό μικροπεριβάλλον μπορεί να τροποποιηθεί από ορμόνες που εκκρίνονται από τα επινεφρίδια και τις γονάδες και από θυμικές ορμόνες.^(169, 170, 171)

Οι μεταβολές τύπου υποστροφής δεχόμεστε γενικά ότι αρχίζουν στην περίοδο της σεξουαλικής ωριμότητας, όπως φαίνεται από αλλαγές του βάρους του θύμου στην ανθρώπινη ζωή. Σε όλα τα είδη, η μάζα του θύμου μεγαλώνει γρήγορα στην εμβρυϊκή και νεογνική περίοδο φτάνοντας στο μέγιστο απόλυτο μέγεθος την περίοδο της εφηβείας και από εκεί και μετά μικραίνει, γρήγορα στην αρχή και στη συνέχεια προοδευτικά μέχρι την μεγάλη ηλικία. Το λεμφοεπιθηλιακό τμήμα του θύμου υποστρέφεται από περίπου 50% του οργάνου στο τελευταίο στάδιο της εφηβείας στο περίπου 10% στο τέλος της μέσης ηλικίας παρόλο που αλλαγές στα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου θύμου ξεκινούν αμέσως μετά τον πρώτο χρόνο ζωής.⁽¹⁷²⁾ Για παράδειγμα ο φλοιός και ο μυελός παρατηρήθηκε ότι ατροφούν με την ηλικία, αλλά ο φλοιός ατροφεί σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από το μυελό. Μελέτες σε ανθρώπινους θύμους έχουν δείξει διαφορές ανάλογα με το φύλο στην κινητική της υποστροφής του θύμου σε σχέση με την ηλικία, η οποία είναι γραμμική σε άνδρες και διφασική σε γυναίκες, που διακόπτεται από μια προεμμηνοπαυσιακή αύξηση.⁽¹⁷³⁾ Όπως πρότειναν οι συγγραφείς αυτό πρέπει να συνδέεται με την υποδεκτικότητα του φλοιού των γυναικών σε ορμονικές επιρροές.

Οι ανωτέρω διαφορές επιβεβαιώθηκαν και από άλλες μελέτες.⁽¹⁷⁴⁾ Σε μοντέλα ζώων, τα αποτελέσματα των οιστρογόνων, τεστοστερόνης και κορτιζόνης στα φλοιικά TEC τροποποιούνταν ανάλογα με το φύλο και την ηλικία του ζώου.⁽¹⁷⁵⁾

Σε πρόσφατες δημοσιεύσεις με θέμα την εξαρτώμενη από την ηλικία υποτροφή του θύμου, η προσοχή των ερευνητών εστιάστηκε κυρίως στην εκτίμηση των ποιοτικών και ποσοτικών μεταβολών στο λεμφικό πληθυσμό.⁽¹⁷⁶⁾ Σε μια ανάλυση των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για τη δραστική μείωση της παραγωγής θυμοκυττάρων στα τελευταία στάδια της ζωής, βρέθηκαν διαταραχές στις αναδιατάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν την β-αλυσίδα του T-υποδοχέα (TCRaβ), και ένα χαμηλότερο επίπεδο παραγωγής IL-7 και έκφρασης των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (MHC).^(177, 178, 179, 180) Άλλοι συγγραφείς διατυπώνουν την υπόθεση ότι η ατροφία του θύμου συνδέεται με την μικρότερη δεξαμενή των προδρόμων κυττάρων του μυελού των οστών που είναι ικανά να εποίκισουν το θύμο.^(181, 182) Οι περισσότεροι συγγραφείς όμως θεωρούν ότι οι ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές των T-κυττάρων είναι δευτερογενείς, ως αποτέλεσμα της προοδευτικής υποτροφής του θύμου σε σχέση με την ηλικία και συνδέονται με την τροποποιημένη λειτουργία του μικροπεριβάλλοντος του οργάνου.^(183, 184) Από την άλλη πλευρά υπάρχουν παρατηρήσεις ότι ακόμη και εάν το βάρος του θύμου με την πάροδο της ηλικίας ελαττώνεται, τα θυμοκύτταρα λειτουργούν επαρκώς στην ενήλικη ζωή.^(185, 186)

4.4. Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου

Επιθηλιακά κύτταρα - Γενικές έννοιες

Η δομική αρχιτεκτονική του θύμου αδένου είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης του εκτοδέρματος και του ενδοδέρματος. Μόνο η κάψα, τα διαφραγμάτια, τα εκτείνοντα τμήματα και οι περιαγγειακοί σχηματισμοί είναι μεσεγχυματικής προέλευσης. Το βασικό συστατικό της δομής του στρώματος περιλαμβάνει τα **δικτυωτά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (TEC)**, που χαρακτηρίζονται σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο από την παρουσία τονοϊνιδίων και συνδέσεις δεσμοσωματίων.⁽¹¹⁵⁻¹²³⁾

Στη φλοιική μοίρα του θύμου αδένου, τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν **δενδριτική μορφολογία** και εκτείνονται με μακριές αποφύσεις των δενδριτικών κυττάρων στο παρέγχυμα. Στον πλήρως αναπτυγμένο θύμο το διάστημα αυτό

μεταξύ των δενδριτικών αποφύσεων πληρούται με λεμφοκύτταρα. Το κάθε λεμφοκύτταρο μπορεί να βρίσκεται σε μορφή κυστιδίου, περικυκλωμένο πλήρως από τις αποφύσεις του κάθε επιθηλιακού κυττάρου. Τα συμπλέγματα αυτά λεμφικών-επιθηλιακών κυττάρων χαρακτηρίζονται ως **θυμικά τροφικά κύτταρα**, υποδεικνύοντας την άμεση λειτουργική σχέση μεταξύ επιθηλιακού μικροπεριβάλλοντος και ανάπτυξης λεμφοκυττάρων.

Στη μυελική μοίρα του αδένου, τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν ένα πιο κυλινδρικό σχήμα με έκκεντρο πυρήνα. Σε ορισμένα είδη, τοπικό χαρακτηριστικό του μυελού αποτελεί η παρουσία σαν κρεμμύδι στρωματοποιημένων σχηματισμών, τα οποία περιβάλλονται από μεγάλα, ήπια χρωματιζόμενα επιθηλιακά κύτταρα. Οι σχηματισμοί αυτοί αντιπροσωπεύουν καλά διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα με κεντρικά κυτταρικά υπολείμματα, τα σωμάτια του Hassall.

Η πολυμορφία που παρατηρείται στο βασικό ιστολογικό προφίλ των επιθηλιακών κυττάρων του θύμου αδένου παρουσιάζεται και με βάση ανοσοφαινοτυπικές μελέτες με τη χρήση των κάτωθι αντισωμάτων:⁽¹²⁴⁻¹²⁷⁾ αντισώματα μορίων MHC τάξης I και II, αντισώματα έναντι πολυπεπτιδίων της κυτοκερατίνης, αντισώματα έναντι των επιθηλιακών κυττάρων ανθρώπου (cluster of thymic epithelial staining, CTES). Επιπρόσθετα, σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται σε ότι αφορά στην έκκριση μιας σειράς ορμονών. Πιο συγκεκριμένα, τα επιθηλιακά κύτταρα, που εντοπίζονται στην υποκαψική ζώνη της φλοιικής μοίρας του αδένου και στο μυελό αποτελούν κύτταρα που συνθέτουν ορμόνες καθώς παρουσιάζουν έντονη θετικότητα σε αντισώματα έναντι της θυμοσίνης, θυμουλίνης και θυμοποιητίνης.⁽¹²⁸⁻¹³⁰⁾ Επιπλέον, με βάση την έκφραση νευρικών δεικτών παρατηρήθηκε πως τα επιθηλιακά κύτταρα τόσο στην υποκαψική ζώνη / περιαγγειακή περιοχή του φλοιού, όσο και στο μυελό εκκρίνουν νευροπεπτίδια όπως ωκυτοκίνη και βαζοπρεσίνη.^{(131, 132, 133).}

Τα διαφορετικά ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των επιθηλιακών κυττάρων είναι πιθανό να συσχετίζονται με την αναπτυξιακή καταγωγή των κυττάρων αυτών αλλά και με το στάδιο της εξελικτικής τους διαφοροποίησης. Σημαντική επιρροή ασκούν και τα διερχόμενα μεσεγχυματικής προέλευσης λευκοκύτταρα, τα οποία επηρεάζουν τη δομική οργάνωση του «θυμικού» περιβάλλοντος. Σε πειραματικές συνθήκες καταδείχθηκε πως τα T- λεμφοκύτταρα σε καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων προάγουν την φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και την έκφραση δεικτών επιθηλιακών κυττάρων.⁽¹³⁴⁾ Ενδιαφέρον είναι πως αυτή η επιθηλιακή διαφοροποίηση επάγεται όχι μόνο από τα T-λεμφοκύτταρα που

διαθέτουν $\alpha\beta$ T-υποδοχείς (τα οποία αντιπροσωπεύουν και το μεγαλύτερο πληθυσμιακό ποσοστό των T- λεμφοκυττάρων) αλλά και από τα T-λεμφοκύτταρα που διαθέτουν τους γδ T- υποδοχείς.^(134, 135, 136, 137, 138, 139)

Το σύνολο των «σταθμευμένων» και των εισερχομένων και εξερχομένων κυττάρων στο θύμο αδένα απαρτίζει ένα λειτουργικό σύστημα επικοινωνίας. Κυτταροκίνες, ορμόνες της υπόφυσης, νευροπεπτίδια και οι υποδοχείς αυτών συντίθενται από τα θυμοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα και υπεισέρχονται στη συνέχεια στη ρύθμιση της λειτουργίας των επιθηλιακών κυττάρων και στη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ *Πρόδρομα T κύτταρα*, μετά την άφιξη τους στο θύμο, αναδιατάσσουν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν *αλύσους των υποδοχέων των T κυττάρων*. Στη συνέχεια εκθέτουν τους υποδοχείς αυτούς στην επιφάνεια των κυττάρων και εισέρχονται σε μια διαδικασία θετικής-αρνητικής επιλογής. Τέλος, εγκαταλείπουν το θύμο αδένα, συνεισφέροντας στην επαναπλήρωση της περιφερικής δεξαμενής των T-κυττάρων. Τα επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν ένα σημαντικό πληθυσμό κυττάρων ρύθμισης αυτής της διαδικασίας. Πιο συγκεκριμένα, στον φλοιό τα επιθηλιακά κύτταρα εκθέτουν τα αντιγόνα MHC, τάξης I και II και προάγουν **τη θετική επιλογή** των CD8 T-κυττάρων για τα MHC-I και των CD4 T-κυττάρων για τα MHC-II. Επιπλέον τα επιθηλιακά κύτταρα, εκθέτοντας ένα αριθμό από αυτοαντιγόνα, επηρεάζουν **την αρνητική επιλογή** δυνητικά αυτοαντιδραστικών κυττάρων.⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾

Συνολικά, τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν διαφοροποιημένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα διάφορα τμήματα του θύμου αδένα.^(115,120, 134,143-146) Κάθε υποομάδα διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων πιστεύεται πως υποστηρίζει σε διαφορετικά, αλληλένδετα και προοδευτικά βήματα τη διαδικασία ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων. Πειράματα σε πειραματόζωα έχουν αναλύσει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της κάθε υποομάδας που απομονώθηκε μέχρι σήμερα στο θύμο αδένα και επιτρέπουν συσχετισμούς με τους αντίστοιχους πληθυσμούς στον άνθρωπο.^(134, 145, 147, 148)

Προέλευση και δομική / λειτουργική οργάνωση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων

Τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από το επιθήλιο του ενδοδέρματος του 3^{ου} φαρυγγικού θύλακα και η διαφοροποίησή τους σε συγκεκριμένα στάδια ιστογένεσης όπως και στον ενήλικο θύμο μοιάζει να βρίσκεται κάτω από έλεγχο των μεταγραφικών και ρυθμιστικών γονιδίων Hox και Pax.⁽⁴⁾ Η πρωτεΐνη Pax-1 εκφράζεται στα TEC κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέχρι και την ενήλικη ζωή.⁽¹⁸⁷⁾ Στη δημιουργία του αρχέγονου επιθηλίου, η συμμετοχή του εκτοδέρματος και των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας επίσης θεωρείται πολύ πιθανή, ακόμη κι εάν δεν έχει πλήρως αποδειχθεί.^(14,188,189) Τα τελευταία χρόνια, η θεωρία εμπλουτίστηκε με την ανάδειξη της παρουσίας κοινών προγεννητόρων για μυελικά και φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα αλλά η αναπτυξιακή σχέση μεταξύ διαφορετικών υποπληθυσμών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.^(190,191) Επίσης, θεωρείται ότι τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από ένα μόνο προγενήτορα ακόμη κι αν στην ανάπτυξη του μυελού η συμμετοχή από δύο αρχέγονα κύτταρα διακριτών γενετικά φαινοτύπων δεν μπορεί να αποκλεισθεί.^(59, 192, 193)

Σε μελέτες θύμων από ποντικούς, έχει αναγνωρισθεί στη φλοιο-μυελική περιοχή ένας ανανεώσιμος πληθυσμός από φλοιικά κύτταρα.⁽¹⁹⁴⁾ Αυτός περιλαμβάνει ένα χαμηλό αριθμό κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την έκφραση των κυτοκερατινών 8 και 5 (cytokeratins CKs), που διαφοροποιούνται κάτω από την επίδραση σημάτων που προέρχονται από τα προ-θυμοκύτταρα και δρουν στον πληθυσμό των κυττάρων με CK8+CK5- φαινότυπο που κυριαρχεί στην περιοχή. Σε αντίθεση, τα κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά από επιφανειακά θυμικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα υπαινίσσονται ότι η δεξαμενή των κυττάρων που δημιουργεί τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είναι παρούσα στην υποκαψική περιοχή. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν από το φλοιό προς το μυελό υφιστάμενα φαινοτυπικές μεταβολές και συνεισφέρουν στη δημιουργία των σωματιών Hassall (HC) στο τέλος της διαφοροποίησης.⁽¹⁹⁵⁾ Οι ανωτέρω μελέτες έχουν προσφέρει πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό και τη κινητική της διαφοροποίησης των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, την αναπτυξιακή συσχέτιση ανάμεσα σε διαφορετικούς υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, και τον τύπο των αλλαγών που επάγονται στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα με τις μεταβολές της ηλικίας.

Η ευρέως χρησιμοποιούμενη ταξινόμηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων βασίζεται στην τοπογραφική τους κατανομή, επιβεβαιωμένη με μορφολογικά κριτήρια σε σχέση με υπερμικροσκοπικά χαρακτηριστικά, ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά και φυσιολογικές ιδιότητες.^(196,197) Αυτό

επέτρεψε τη διάκριση στο παρέγχυμα του θύμου 4 κυρίων υποτύπων από θυμικά επιθηλιακά κύτταρα τα οποία σε όλα τα είδη δείχνουν παρόμοια ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά με βάση πληροφορίες που δίνουν τα πρότυπα έκφρασης των MHC και των κερατινών:^(119, 198, 199, 200) επιφανειακά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και θυμικά επιθηλιακά κύτταρα σωματίων του Hassal.

Υπότυπος 1: Επιφανειακά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

Ανάλογα με την τοπογραφική τους κατανομή, διακρίνονται σε υποκαψικά, υποδιαφραγματικά και περιαγγειακά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα σχηματίζοντας το έξω επιθηλιακό στρώμα του παρεγχύματος και οι επιμήκεις άξονες τους βρίσκονται σε παράλληλες θέσεις με τα κύτταρα του συνδετικού ιστού.⁽¹¹⁹⁾ Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν αντιγόνα MHC τάξης I, νευροπεπτιδία, νευροφυσίνη, ωκυτοκίνη / βασοπρεσίνη και νευροενδοκρινείς δείκτες^(201,202) Είναι υπεύθυνα για έκκριση των κυτταροκινών IL-1, IL-6 και IL-7 καθώς και για την έκκριση θυμικών ορμονών.^(203,204,205) Η ενδοκρινής λειτουργία των επιφανειακών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και η έκφραση τυπικών δεικτών ρυθμίζεται από ορμόνες και νευροπεπτιδία.^(206,207,208,209)

Υπότυπος 2: Φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

Οργανώνονται κυρίως σε διαπλεκόμενες ομάδες δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο επιθηλιακό δίκτυο. Μορφολογικά αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από διαυγή κενοτόπια με ένα μικρό ποσό υλικού ενδιάμεσης ηλεκτρονικής πυκνότητας που συνδέεται με την εκκριτική τους δραστηριότητα.^(119,210) Τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα διαφέρουν μεταξύ τους στην ηλεκτρονική πυκνότητα του κυτταροπλάσματος τους και στη δομή του πυρήνα του κυττάρου, στοιχεία που παρέχουν τη βάση για τη μορφολογική διαφοροποίηση των υποτύπων αυτών των κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ Παράλληλα, με την αυξημένη πυκνότητα της θεμέλιας ουσίας στο κυτταρόπλασμα τους, οι πυρήνες των κυττάρων τους αποκτούν ένα ακανόνιστο περίγραμμα και παρουσιάζουν μια έντονη συμπύκνωση χρωματίνης. Τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ταυτοποιούνται με βάση την έκφραση των MHC μορίων τάξης I και II, των κερατινών 8,18 και της πρωτεΐνης PGP 9.5.^(145,211) Η PGP 9.5 αντιπροσωπεύει επίσης ένα δείκτη για ένα ειδικό πληθυσμό φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων γνωστό από *in vitro* μελέτες να αντιπροσωπεύει “θυμικά τροφικά κύτταρα” (TNC).⁽²¹²⁾ Εντός του φλοιού, τα TNC διαχωρίζουν μικροπεριοχές στις οποίες επάγεται πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση και

απόπτωση των θυμοκυττάρων^(213,214,215) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ θυμοκυττάρων και θυμικών τροφικών κυττάρων (TNC) παρέχουν ένα παράδειγμα κρυπτοκρινών και παρακρινών αλληλεπιδράσεων. Σε θυμικά τροφικά κύτταρα ποντικών ανευρέθηκαν mRNAs για IL-5, GM-CSF, IFN- γ , PGE2, βασοπρεσίνη και ω κυτοκίνη.⁽²¹⁶⁾

Υπότυπος 3: Μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

Συνήθως υποδιαιρούνται σε δύο υποτύπους που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης τους ή της δραστηριότητάς τους.^(193,217, 218) Κύτταρα του πρώτου υποτύπου χαρακτηρίζονται σαν “αδιαφοροποίητα” και αποτελούν περίπου 1% από το συνολικό μυελικό θυμικών επιθηλιακών κυττάρων πληθυσμό.⁽¹⁹⁶⁾ Αυτά αναγνωρίζονται στη βάση υπερμικροσκοπικών χαρακτηριστικών στην εξωτερική μοίρα του μυελού, σαν μονήρη κύτταρα ή τοποθετημένα σε μικρές ομάδες κυττάρων που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσα από αυτά και του δεύτερου υποπληθυσμού των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.

Τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του υποτύπου 2 είναι πολυγωνικά με πλούσιο κυτταρόπλασμα, πολωμένα με υπερμικροσκοπικά χαρακτηριστικά ενδοκρινών κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ Ανευρίσκονται ως πολυκυτταρικοί σχηματισμοί που κατανέμονται μέσα στο μυελό σε άμεση γειτονία με ενδιάμεσου μεγέθους αγγεία. Τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μια μεγάλη ποικιλία από πεπτιδικές ορμόνες και αρκετά συν-διεγερτικά μόρια όπως τα CD40 και B7.^(203,219,220) Έκφραση ειδικών αυτόλογων αντιγόνων από μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα δείχνει ένα ρόλο κλειδί για τα κύτταρα στους κεντρικούς μηχανισμούς ανοχής των T-κυττάρων και της αυτοανοσίας.^(221, 222)

Υπότυπος 4: Επιθηλιακά κύτταρα σωματίων Hassall

Ο υπότυπος 4 διακρίνεται σαν ένας ξεχωριστός τύπος από μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα λόγω της αντιγονικής ομοιότητας με επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας.⁽²²³⁾ Σχηματισμοί μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων παρέχουν την κύρια μορφολογική δομή των σωματίων Hassall. Είναι τοποθετημένα σε μια συγκεντρωτική ή ελικοειδή μορφή και έχουν φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κοινά με τους άλλους υποτύπους των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ Το επόμενο στάδιο δημιουργίας σωματίων Hassall περιλαμβάνει μια δομή στην οποία διακρίνεται ένα κεντρικό κύτταρο περιβαλλόμενο από ένα ή μερικά τμήματα από επιθηλιακά κύτταρα. Στα εξωτερικά κύτταρα από τα σωματία Hassall μπορούν να ανιχνευθούν θυμικές ορμόνες.⁽²⁰³⁾ Τα κύτταρα από τα οποία αποτελούνται τα

σωμάτια Hassall θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα.
(224, 225)

Επίδραση της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

Συνοψίζουμε τις βασικές μεταβολές που παρατηρούνται στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια της γήρανσης με βάση κυρίως το άρθρο ανασκόπησης της Brelinska.⁽¹¹⁹⁾ Η ατροφία του θύμου σε συνάρτηση με την ηλικία συνηθιζόταν να συνδέεται με το τροποποιημένο μικροπεριβάλλον του οργάνου στο οποίο τον κύριο ρόλο παίζουν τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Υπάρχουν διαφορετικές απόψεις όσον αφορά την κλίμακα χρόνου των υποστροφικών θυμικών αλλαγών και την ακολουθία γεγονότων που σε πειράματα με ζώα δείχνει να παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με το εξεταζόμενο είδος.⁽¹¹⁹⁾ Σε θύμους πειραματόζων σημειώνονται μορφολογικές μεταβολές που σε φωτονικό μικροσκόπιο παρατηρούνται μετά τους 24 μήνες ζωής.⁽¹¹⁹⁾ Μόνον μετά την εισαγωγή των υπερμικροσκοπικών μελετών έγινε δυνατή η αναγνώριση του τύπου των υποστροφικών μεταβολών στο θύμο και της κινητικής τους στα διάφορα τμήματα του θύμου.⁽¹¹⁹⁾

Φλοιός

Οι Nabarra και Adrianarison (1996),⁽²²⁶⁾ στις μελέτες τους σε θύμους ποντικών παρατήρησαν το πρώτο στάδιο των προϊουσών μεταβολών μεταξύ 12^{ου} και 15^{ου} μήνα της ζωής με τη μορφή αλλαγών στην υπερδομή των φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Οι μεταβολές εκδηλώνονται με εκτεταμένα κενοτόπια στο κυτταρόπλασμα, διάταξη του ενδοπλασματικού δικτύου και διήθηση με λιποφουσκίνη. Η δραστική μείωση του αριθμού των θυμοκυττάρων αρχίζει τον 15^ο μήνα και οι ασαφείς μορφολογικές μεταβολές ανάμεσα στο φλοιό και το μυελό, ακολουθούνται από μεταβολές σε όλους τους τύπους των θυμικών κυττάρων. Οι ανωτέρω συγγραφείς,⁽²²⁶⁾ έδειξαν ότι σ' αυτό το στάδιο των προϊουσών μεταβολών, τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα στο φλοιό και το μυελό απώλεσαν τη μορφολογική τους ενδοκυτταροπλασματική διαφοροποίηση, ενώ τα οργανίδια του κυττάρου και τα τυπικά κενοτόπια που παρατηρούνταν στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα καθώς και τα χαρακτηριστικά των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξαφανίστηκαν. Η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών στην περιοχή του θύμου δημιούργησε ένα κυτταροπλασματικό συγκύτιο φτωχό σε οργανίδια που περιέχει

λιποφουσκίνη, έγκλειστα από λιπίδια και ανεξάρτητα θυμοκύτταρα που οδήγησαν σε ολοκληρωτική αποδιοργάνωση του μικροπεριβάλλοντος.

Η αποδιοργάνωση της επιθηλιακής αρχιτεκτονικής σε ποικίλες ομάδες ποντικών επιβεβαιώθηκε με μελέτες του Takeoka και της ερευνητικής του ομάδας (1996),⁽²²⁷⁾ με βάση ανοσοϊστοχημική αναγνώριση υποτύπων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Όμως οι συγγραφείς παρατήρησαν μερικές από τις αλλαγές σε υποτύπους των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων ήδη από τον 6^ο μήνα της ζωής. Οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι οι διαδικασίες των υποστροφικών μεταβολών προχωρούν βαθμιαία με την πρόοδο της ηλικίας σε υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων στον ανθρώπινο θύμο.⁽²²⁷⁾ Μεταβολές στα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά έχουν δειχθεί μέσω έκφρασης κερατινών που εξετάστηκαν σε θύμους αρουραίων.⁽¹¹⁹⁾ Τα αποτελέσματα έχουν επιβεβαιώσει ότι η αύξηση της ηλικίας επηρεάζει τους ποικίλους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια της ζωής και ότι οι μεταβολές είναι διακριτού τύπου στο φλοιό και το μυελό. Αρχίζοντας περίπου στους 6 μήνες, τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα σε αρουραίους προοδευτικά με την ηλικία εμφανίζουν απώλεια έκφρασης των κερατινών 8 και 18 και της παν-κερατίνης. Σε μελέτες σε ανθρώπινους θύμους σε διαφορετικές ηλικίες, εκτός από μία μειούμενη με την ηλικία ανοσοαντιδραστικότητα από τυπικές κερατίνες σε φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, αλλαγές έχουν επίσης δειχθεί και στη σύνθεση πεπτιδίων των κερατινών.⁽²²⁸⁾

Στους ανθρώπινους θύμους όπως σε όλα τα είδη των τρωκτικών, οι πιο πολλοί από τους μέχρι τώρα γνωστούς δείκτες φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εμφανίζουν μια μείωση έκφρασης με την ηλικία. Αυτό αφορά την έκφραση μορίων MHC, μορίων προσκόλλησης όπως και θυμικών ορμονών.^(119, 177, 229, 230) Η τροποποιημένη λειτουργία των φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και η σχέση τους με το φλοιικό θυμοκυτταρικό πληθυσμό μοιάζει επίσης να χαρακτηρίζεται από ηλικιακά εξαρτώμενη μείωση στα λεμφοεπιθηλιακά συμπλέγματα θυμικών τροφικών κυττάρων.⁽²³¹⁾ Ένας παρόμοιος τρόπος μεταβολής βρέθηκε σε θύμους εγκύων αρουραίων με τη μορφή παροδικών υποστροφών του οργάνου δείχνοντας ότι μερικοί πληθυσμοί θυμικών επιθηλιακών κυττάρων πιθανόν εξαλείφονται με απόπτωση.^(232, 233)

Σε σύγκριση με φαινοτυπικές μεταβολές σε φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, οι οποίες σε τρωκτικά αναπτύσσονται περίπου τον 6^ο μήνα της ζωής, ο αριθμός των θυμοκυττάρων μειώνεται δραστικά αρκετά αργότερα, αρχίζοντας περίπου τον 12^ο μήνα της ζωής.⁽²³⁴⁾ Όπως φαίνεται όμως, η διαδικασία εξάντλησης

των θυμοκυττάρων αρχίζει αρκετά νωρίτερα και στην αρχή μπορεί να παρατηρηθεί στην υποκαψική ζώνη ψευδολόβιων του ανθρώπινου θύμου, περιλαμβάνοντας με προοδευτική αύξηση τεράστιες περιοχές του οργάνου.⁽¹¹⁹⁾ Παράλληλα τροποποιείται η κυτταρική σύνθεση του φλοιού με την εμφάνιση των Β λεμφοκυττάρων και πλασματοκυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ Οι παρατηρήσεις δείχνουν σταδιακές μεταβολές στη λειτουργία και βιολογική δραστηριότητα των φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, που προκαλούν ή προηγούνται διαταραγμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και θυμοκυττάρων στο επίπεδο των μοριακών σημάτων και στην έκφραση ελεγκτών μεταγραφής.^(235,236) Μεταβολές αυτού του τύπου μπορεί να ελαττώσουν τον πολλαπλασιασμό και να προκαλέσουν απόπτωση των θυμοκυττάρων με την αύξηση της ηλικίας, επηρεάζοντας την κατεύθυνση διαφοροποίησης των πρόδρομων κυττάρων τα οποία σαν συνέπεια μπορεί να αποδιοργανώνουν την αρχιτεκτονική του φλοιού και του μυελού του θύμου.⁽²³⁷⁾

Μυελός

Οι δομικές μεταβολές στο μυελό έχουν συνδεθεί με την σημαντική αύξηση των περιαγγειακών διαστημάτων (perivascular spaces, PSV) που στα τρωκτικά αρχίζουν περίπου τον 6ο μήνα της ζωής.⁽²³⁸⁾ Τα διατεταμένα περιαγγειακά διαστήματα, περιβαλλόμενα από ένα διακοπτόμενο στρώμα επιθηλίου, περιβάλλονται από ένα χαλαρό δίκτυο ομάδων μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ Σύμφωνα με την ιδέα των Clark και McLennan (1986),⁽²³⁸⁾ τα δύο μυελικά τμήματα, π.χ. ομάδες από μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και περιαγγειακά διαστήματα, υποστρέφονται σε διαφορετικούς χρόνους κατά τη διάρκεια της ζωής. Μέσα στα διατεταμένα περιαγγειακά διαστήματα, που σύμφωνα με τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα των Flores και συνεργατών του (1999),⁽²³⁹⁾ ανήκουν στο περιφερικό ανοσοποιητικό σύστημα, η κυτταρική σύνθεση μεταβάλλεται προοδευτικά με την ηλικία. Εκτός από τα ώριμα (CD4 ή CD8 θετικά) θυμοκύτταρα, στα περιαγγειακά διαστήματα οι συγγραφείς έχουν αναγνωρίσει T-κύτταρα περιφερικής προέλευσης που εκφράζουν TIA-1 κυτταροτοξικό ένζυμο, Β-λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και σιτευτικά κύτταρα (μαστοκύτταρα).⁽²³⁹⁾

Η τυπική φυσιολογική μορφολογία μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων διατηρείται για αρκετό διάστημα και μόνο στα τελευταία στάδια της υποστροφής παρατηρούνται μεταβολές οι οποίες αφορούν σε διαταραχή των κυτταρικών μεμβρανών.⁽¹¹⁹⁾ Στην περίοδο όμως που προηγείται του σταδίου της μορφολογικής αποδιοργάνωσης παρατηρούνται προοδευτικά με την πάροδο της ηλικίας μεταβολές στην υπερμικροσκοπική δομή των μυελικών θυμικών

επιθηλιακών κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾ Σε συγκεκριμένους σχηματισμούς αυτών των κυττάρων, ο αριθμός και το μέγεθος των κενοτοπιών αυξάνεται στο κυτταρόπλασμα και παρατηρούνται διατεταμένες δεξαμενές του τραχέως ενδοπλασματικού δικτύου.⁽¹¹⁹⁾ Σε άλλα κύτταρα παρατηρείται αυξημένη ηλεκτρονική πυκνότητα του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος συνοδευόμενη από αυξημένους αριθμούς ενδιάμεσων νηματιών και από αρκετά κενοτόπια με ηλεκτρονικά πυκνό υλικό.⁽¹¹⁹⁾ Σε κάποιες μελέτες, υποστρόφη της μυελικής περιοχής είχε συνδεθεί με αυξημένους αριθμούς από σωμάτια Hassall, αυξημένο μέγεθος τους και επιτεινόμενη ασβεστοποίηση. Η μορφολογία των σωματιών Hassall παρατηρήθηκε ότι εξαρτάται από την έκφραση του επιπέδου των τυροσινο- φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες που ανευρίσκονται φυσιολογικά σε υψηλά επίπεδα στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα των σωματιών Hassall ελαττώνονται σε υποστραμμένους θύμους από παιδιά και αρουραίους που έχουν υποστεί stress.^(240, 241) Η ελάττωση της σηματοδότησης που σχετίζεται με φωσφορυλίωση τυροσίνης, η οποία παίζει κάποιο ρόλο στην ωρίμανση των μυελικών κυττάρων, έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με μορφολογικές αλλαγές σε σωμάτια Hassall με τη μορφή ελαττωμένου μεγέθους ή ασβεστοποίησης.

Μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων νευρικής προέλευσης, ενδοκρινικής προέλευσης όπως και αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες δρουν με τρόπο ενδοκρινή, παρακρινή ή αυτοκρινή ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.^(242,243,244) Παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας, η τροποποίηση του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της εκκριτικής δραστηριότητας των κυττάρων στόχων μπορεί να παρουσιάζει αυξορύθμιση ή μειορύθμιση ως ανταπόκριση στα ποικίλα σήματα που παρέχονται από το τοπικό τους περιβάλλον. Το παράδειγμα της μειορύθμισης με τη μορφή της αναχαίτισης της διαφοροποίησης παρέχεται από τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διαφοροποίηση του ετερογενούς πληθυσμού των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, ο υπότυπος 1 των κυττάρων αντιπροσωπεύει τις νεότερες μορφές στις οποίες έχουν δειχθεί μεταβολές από τον 6^ο μήνα της ζωής.⁽²²⁷⁾ Στο θύμο αρουραίων, το πρότυπο της διαφοροποίησης των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σχετίζεται με υψηλή έκφραση κερατίνης 16, K167, νευροενδοκρινών δεικτών και σε ανεξάρτητα κύτταρα κερατίνης 10.⁽¹¹⁹⁾ Αρχίζοντας από τον 6^ο μήνα της ζωής, ο κυτταρικός πληθυσμός μειώνεται στο μυελό και σαν αποτέλεσμα τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν κερατίνη 10 ελαττώνονται με την ηλικία.^(119, 245) Το παράδειγμα της αυξορύθμισης που εκφράζεται με διέγερση της πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας, της έκκρισης και της διαφοροποίησης, παρέχεται από επιφανειακά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Η

αυξημένη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των επιφανειακών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, παρατηρούμενη σε όλα τα είδη, έχει σαν αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση της θυμικής αρχιτεκτονικής με δημιουργία κυστικών κοιλοτήτων που περιβάλλονται από φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα.⁽¹¹⁹⁾ Ο αριθμός των κυστικών δομών αυξάνεται με την ηλικία σε σχέση με το μικρό αριθμό τους που παρατηρείται σε νεαρά άτομα/ζώα.⁽¹¹⁹⁾ Η γένεση και η κινητική της ανάπτυξης των κυστικών κοιλοτήτων μπορεί να καταγραφεί καλύτερα σε θύμους θηλυκών αρουραίων.⁽¹¹⁹⁾ Είναι αξιοσημείωτο ότι το επιθήλιο των κυστικών κοιλοτήτων αντιπροσωπεύει μια επέκταση των επιφανειακών επιθηλιακών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται σε γειτονία με τα διαφράγματα, δηλαδή των υποδιαφραγματικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾

Η αυξημένη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των υποδιαφραγματικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων δείχθηκε σε θηλυκούς αρουραίους υπό την επίδραση των οιστρογόνων κύησης. Το επακόλουθο αυτής της ορμονικής δραστηριότητας είναι ο σχηματισμός ενός πολύστιβου επιθηλίου που καλύπτει τις κύστεις, επιθηλιακών χορδών και κυστών γεμάτων με PAS-θετικό υλικό.^(246, 247) Στο πρώτο στάδιο ιστογένεσης οι δομές δείχνουν ψευδοφολιδωτή διαμόρφωση. Ακόμη κι εάν αυτές οι δομές εγκυστωθούν βαθιά στο συνδετικό ιστό των διαφραγμάτων δεν χάνουν τη συνέχεια με το επιφανειακό επιθηλιακό στρώμα. Επίσης η βασική μεμβράνη είναι παρούσα στην επιφάνεια των κυττάρων σε επαφή με συνδετικό ιστό.⁽¹¹⁹⁾ Τόσο σε έγκυα θηλυκά όσο και σε ηλικιωμένα ζώα, οι δομές μοιάζουν να αντικαθιστούν το ατροφικό λεμφικό παρέγχυμα του θύμου. Αξίζει να παρατηρηθεί η μη τυχαία τοποθέτηση των ψευδοφολιδωτών δομών σε άμεση γειτονία με τα υψηλού ενδοθηλίου μετατριχοειδή φλεβίδια. Με την πάροδο της ηλικίας ή λόγω παροδικής εκφύλισης, τα πολλαπλασιαζόμενα υποδιαφραγματικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα δημιουργούν ένα περιαγγειακό επιθηλιακό περίβλημα που εκτείνεται με αγγεία κατά μήκος του φλοιού με κατεύθυνση το μυελό.⁽¹¹⁹⁾

Στο στάδιο δημιουργίας ψευδοφολιδών τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα δείχνουν έντονη έκφραση κερατίνης 16. Σε επόμενα στάδια ψευδοφολιδωτών μορφολογικών μεταβολών, τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα που τις δημιουργούν τροποποιούν το φαινότυπο τους όσον αφορά στην έκφραση κερατίνων. Η επακόλουθη διαφοροποίηση ξεκινά σε κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια της κυστικής δομής, σε διαδοχικά κυτταρικά στρώματα με κατεύθυνση την κοιλότητα όπου ανιχνεύονται κερατίνη 10 και κερατίνη 19.⁽¹¹⁹⁾ Σε θυμικά επιθηλιακά κύτταρα που δημιουργούν ψευδοφολίδες, έχουν ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά νευροενδοκρινείς δείκτες που περιλαμβάνουν χρωμογρανίνη Α

(ChA) και νευρο-ειδική ενολάση (NSE).^(119, 247) Η υπερμικροσκοπική δομή των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων που δημιουργούν ψευδοφολίδες είναι τυπική για ενδοκρινή κύτταρα και το αντιγονικό πρότυπο είναι κοινό για αυτά τα κύτταρα και για τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα που δημιουργούν σωμάτια Hassall.⁽¹¹⁹⁾ Στα τελευταία στάδια υποστροφής, τα πιο πολλά από τα ψευδοφολιδωτά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, μετατρέπονται σε κύστεις που επενδύονται από μονόστιβο επιθήλιο στο οποίο η ανοσοϊστοχημική έκφραση των περισσότερων δεικτών προοδευτικά εξασθενεί ή εξαφανίζεται.

Η δυναμική ανάπτυξη ψευδοφολίδων που ξεκινά τον 6^ο μήνα της ζωής των ζώων παραλληλίζεται με μεταβολές υποστροφής στη δομική και λειτουργική οργάνωση του μυελού του θύμου. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η πορεία της υποστροφής του θύμου, της δημιουργίας ψευδοφολίδων από θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και της εκκριτικής δραστηριότητας αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό που αντισταθμίζει τη λειτουργία των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.⁽¹¹⁹⁾

Συνολικά, η εξαρτώμενη από την ηλικία ατροφία του θύμου πρέπει να κατανοηθεί σαν δομική και λειτουργική τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του θύμου στο οποίο τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα έχουν σημαντικές λειτουργίες.⁽¹¹⁹⁾ Οι μεταβολές στην αρχιτεκτονική του επιθηλιακού στρώματος του θύμου που εμφανίζονται σε διαφορετικές περιόδους της ανθρώπινης ζωής, αναπτύσσονται βαθμιαία με την ηλικία αλλά εκδηλώνουν διαφορετική κινητική στους διαφορετικούς υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων του ανθρώπινου θύμου.⁽¹¹⁹⁾ Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι μηχανισμοί που επάγουν αλλαγές σε περιοχές του ανθρώπινου θύμου είναι διαφορετικοί. Από την άλλη, ο τύπος των από την ηλικία εξαρτημένων αλλαγών σε υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων στον ανθρώπινο θύμο παρέχει αποδείξεις για την πολυπλοκότητα των τοπικά δραστηριοποιημένων παραγόντων.⁽¹¹⁹⁾ Το αποτέλεσμα της δράσης των ποικίλων παραγόντων με τη μορφή της αύξησης ή της μείωσης υποτύπων των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων τροποποιεί εκ νέου την αρχιτεκτονική του οργάνου σε τέτοια μορφή ώστε να θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει μια δομική και λειτουργική προσαρμογή στη γήρανση.⁽¹¹⁹⁾ Αναγνώριση όλων των δεδομένων που συνδέονται με την υποστροφή του θύμου με την πάροδο της ηλικίας είναι σημαντική, λόγω των προσπαθειών να καθυστερήσει ή να αναστραφεί η φυσιολογικά μη επιθυμητή δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη γήρανση ή λόγω της ανοσοκαταστολής που επάγεται από την ακτινοθεραπεία.^(248, 249)

5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

5.1. Εισαγωγή στο σκοπό της εργασίας

Ο θύμος αδένας παίζει κομβικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Τ-κυττάρων και στην παραγωγή αυτό-ανεκτικών Τ-κυττάρων καθώς και Τ-ρυθμιστικών κυττάρων. Στη διαδικασία διαφοροποίησης των Τ-κυττάρων βασικό ρόλο παίζει το μικροπεριβάλλον του θύμου αδένου που περιλαμβάνει τα καλούμενα θυμικά στρωματικά κύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα).⁽⁴²⁾ Τα **θυμικά επιθηλιακά κύτταρα**,^(117,119,145,147) συμβάλουν σημαντικά στη ανάπτυξη και ωρίμανση των θυμοκυττάρων (Τ-κυττάρων) διαμέσου των διακυτταρικών επαφών και της παραγωγής διαλυτών παραγόντων (π.χ. κυτοκινών, ορμονών, αυξητικών παραγόντων, νευροδιαβιβαστών).^(250, 251, 252, 253, 254)

Ο θύμος αδένας είναι ένα σημαντικό όργανο, όπου λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο **ανοσοποιητικό** σύστημα και το **νευροενδοκρινές** σύστημα.^(147,170,202,251) Συνεχώς αυξάνονται τα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι θυμικά επιθηλιακά κύτταρα συμμετέχουν στην εκπαίδευση των θυμοκυττάρων σε νευροενδοκρινείς αρχές εκφράζοντας ένα ευρύ φάσμα από πρωτεΐνες νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης, οι οποίες είναι η πηγή αυτό-αντιγόνων που παρουσιάζονται στα προ Τ-κύτταρα από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC).^(133,255,256) Αυτή η παρουσίαση μπορεί να είναι υπεύθυνη για την εγκαθίδρυση της **κεντρικής ανοχής** στις νευροενδοκρινείς λειτουργίες.^(38,252,257-264) Αυτή η ιδέα υποστηρίζεται από ανοσοϊστολογικές μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι τα ανθρώπινα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα διαθέτουν ένα ιδιαίτερο πρότυπο κυτταρικής διαφοροποίησης εκφράζοντας ένα ευρύ φάσμα από πρωτεΐνες νευρικής και νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης όπως η πρωτεΐνη PGP 9.5, η τυροσινική υδροξυλάση, η χρωμογρανίνη-A, η συναπτοφυσίνη, τα νευροινίδια, η A2B5 (CQ γαγγλιοσίδη), η οξυτοκίνη, η βασοπρεσίνη, το νευροπεπτίδιο Y, η σωματοστατίνη, η ουσία P και η μομπεσίνη^(38, 252, 257-264). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ποντικών και ανθρώπων παίζουν ένα κεντρικό ρόλο στην εγκατάσταση αυτό-ανοχής με την ικανότητά τους να εκφράζουν ένα αξιοσημείωτο φάσμα από αντιγονικά χαρακτηριστικά άλλων ιστών.^(265, 266-268) Πράγματι, με βάση τα πρότυπα της έκφρασης mRNA, μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν ένα ιδιαίτερα μεγάλο και ετερογενές σύνολο γονιδίων το οποίο περιλαμβάνει πολλά ιστό-ειδικά αντιγόνα άλλων ιστών όπως

επίσης και διάφορα αυτοαντιγόνα.⁽²⁶⁵⁻²⁶⁸⁾ Προτάθηκε ότι αυτή η μικτή γονιδιακή έκφραση στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να είναι σημαντική για την κατανόηση των ανθρώπινων αυτοάνοσων παθήσεων και την ανοσοθεραπεία των νεοπλασιών.⁽²⁶⁷⁾

Οι νευροτροφίνες (NT) είναι μια οικογένεια από αυξητικούς παράγοντες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διατήρηση του νευρικού συστήματος των σπονδυλωτών και δρουν σε μη-νευρικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.^(269, 270) Η οικογένεια των νευροτροφινών (NT) αποτελείται από τον αυξητικό παράγοντα νεύρων (NGF), τον εγκεφαλικής προέλευσης νευροτροφικό παράγοντα (BDNF), την νευροτροφίνη-3 (NT-3) και αρκετούς άλλους.^(269, 270) Οι νευροτροφίνες (NT) αλληλεπιδρούν με δύο διαφορετικούς τύπους από επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς, την *trk* οικογένεια των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης και τον χαμηλής συγγένειας *p75* υποδοχέα.⁽²⁶⁹⁻²⁷¹⁾ Οι NT-υποδοχείς συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και ο κυτταρικός κύκλος.⁽²⁶⁹⁻²⁷¹⁾ Ανοσοϊστολογικές μελέτες έδειξαν την παρουσία των NT-υποδοχέων *TrkA* και *p75* σε υποτύπους ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.^(272, 273, 274)

Οι μικροσωληνίσκοι είναι ουσιώδη συστατικά του κυτταροσκελετού και παίζουν ρόλους κλειδιά όπως είναι η δημιουργία της ατράκτου κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η ενδοκυτταρική μεταφορά και η κυτταρική κινητικότητα.⁽²⁷⁵⁾ Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από πολυμερή ετεροδιμερών α και β τουμπουλίνης. Τόσο η α όσο και η β -τουμπουλίνη κωδικοποιούνται από αρκετά γονίδια η κάθε μία και υφίστανται ως πολλαπλοί ισότυποι σε κύτταρα.^(275, 276) Η κατανομή των ιστύπων της β -τουμπουλίνης ποικίλλει σε διάφορους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς.⁽²⁷⁵⁻²⁷⁹⁾ Ο β -I ισότοπος είναι πανταχού παρών, ο β -II συναντάται κύρια στον εγκέφαλο και σε χαμηλότερα επίπεδα σε άλλους σωματικούς ιστούς, ο β -III εκφράζεται σε νευρώνες και κύτταρα Sertoli και ο β -IV σε πολλά κύτταρα και ιστούς (ο β -IVa βρίσκεται κυρίως στον εγκέφαλο και ο β -IVb στους περισσότερους ιστούς).^(275, 276) Με βάση τη βιβλιογραφία, δεν υπάρχει ανοσοϊστολογική μελέτη της έκφρασης των ιστύπων II, III και IV της β -τουμπουλίνης σε ανθρώπινους θύμους.

5.2. Σκοπός της εργασίας

Παρά τις αρκετές σε αριθμό δημοσιεύσεις, το πρότυπο διαφοροποίησης (το πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης) των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων χρήζει περαιτέρω μελέτης. Στη μέχρι τώρα βιβλιογραφία δεν υπάρχει λεπτομερής ανοσοτοπογραφική / ανοσομορφολογική ανάλυση με χρήση διπλής ανοσοϊστοχημικής χρώσης σε τομές παραφίνης (που επιτρέπουν πιο αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση σε σχέση με τις τομές κρυοστάτη) του πρότυπου διαφοροποίησης των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων που εκφράζουν μείζονες νευρικούς και νευροενδοκρινείς δείκτες και τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νευρών (NGF) σε συνδυασμό με την έκφραση ευρέως φάσματος δεικτών επιθηλιακών κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων και μακροφάγων και σε συσχέτιση με την ηλικία. Για το λόγο αυτό αναλύσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή των ανθρώπινων θυμικών κυττάρων που εκφράζουν πρωτεΐνη PGP 9.5 (PGP 9.5), νευροειδική ενολάση (NSE), χρωμογρανίνη-A (CHRA), συναπτοφυσίνη (SYN), τυροσινική υδροξυλάση (TH), νευροινίδια (NF 68kDa, 140-160kDa και 200kDa), όξινη ινιδιακή γλοιακή πρωτεΐνη (GFAP), περιφερίνη, βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP), α-ιντερνεξίνη και τους υποδοχείς του NGF TrKA και p75. Με σκοπό την ταυτοποίηση των κυττάρων που εκφράζουν τις ανωτέρω πρωτεΐνες, χρησιμοποιήσαμε ανοσομορφολογική ανάλυση επί ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση (και σε πολλές περιπτώσεις επίσης με διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση) με δείκτες επιθηλιακών κυττάρων [κερατίνες (CK 1, 4, 7,8, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20)], δενδριτικών κυττάρων [πρωτεΐνη S 100, CD1a, CD207, CD123, CD11c], και μακροφάγων [CD68 και CD163]. Με αυτό τον τρόπο προσπαθήσαμε να καθορίσουμε αν οι πρωτεΐνες νευρικής και νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης και οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νευρών (NGF) εκφράζονται από επιθηλιακά κύτταρα, από δενδριτικά κύτταρα και από μακροφάγα. Επιπλέον μελετήσαμε τα πρότυπα έκφρασης διαφόρων τύπων κερατινών σε σχέση με τις πρωτεΐνες νευρικής και ενδοκρινικής διαφοροποίησης για να διαπιστώσουμε αν συγκεκριμένες πρωτεΐνες νευρικής και νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης συνεκφράζονται με συγκεκριμένους τύπους κερατινών.

Επειδή μία σημαντική κοινή λειτουργία των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων είναι η πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων,^(3, 250, 251) ετέθη το ερώτημα αν κάποιοι υποπληθυσμοί των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εκφράζουν δείκτες διαφοροποίησης δενδριτικών κυττάρων. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήσαμε ανοσομορφολογική ανάλυση επί διαδοχικών

ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση (και σε πολλές περιπτώσεις επίσης με διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση) για τη μελέτη της ανοσοτοπογραφικής κατανομής των κυττάρων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c (δείκτες δενδριτικών κυττάρων) και των κυττάρων που εκφράζουν κερατίνες (δείκτες επιθηλιακών κυττάρων).

Επειδή η ανοσοτοπογραφική κατανομή των ιστύπων της β-τουμπουλίνης διαφέρει ανάλογα με την κυτταρική διαφοροποίηση σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ανθρώπινους ιστούς [π.χ. ορισμένοι ισότυποι β-τουμπουλίνης εκφράζονται κυρίως από νευρικά ή/και επιθηλιακά κύτταρα],⁽²⁷⁵⁻²⁷⁹⁾ και επειδή δεν υπάρχει ανοσοϊστοχημική μελέτη των ιστύπων της β-τουμπουλίνης στον ανθρώπινο θύμο, αναλύσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή των ανθρώπινων θυμικών κυττάρων που εκφράζουν β-τουμπουλίνη II, III και IV με στόχο να διαπιστώσουμε αν διαφορετικοί πληθυσμοί των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εκφράζουν διαφορετικούς ισότυπους β-τουμπουλίνης.

Επειδή αρκετές μελέτες,⁽¹⁸³⁻¹⁹⁷⁾ έχουν προσφέρει πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό και τη κινητική της διαφοροποίησης των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, αλλά μέχρι τώρα δεν έχει πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένη πολυπαραμετρική ανοσοτοπογραφική μελέτη των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με τη διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων αναλύσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου (Ki67 που εκφράζεται σε κύτταρα όλων των φάσεων του κύκλου εκτός της G0 και αναστολές κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21, p27 και p16) σε σχέση με τους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (οι οποίοι εκφράζουν διαφορετικά στάδια της θυμικής επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης) και σε σχέση με την έκφραση των διαφόρων κερατινών. Επιπρόσθετα επειδή η πρωτεΐνη PGP 9.5 και οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF), TrKA και p75 έχουν συσχετιστεί με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου σε αρκετούς τύπους κυττάρων,^(271, 280, 281, 282) η έκφρασή τους αναλύθηκε σε συνδυασμό με την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67.⁽²⁸³⁾

Στην παρούσα εργασία οι ανωτέρω αναλύσεις έγιναν σε θύμους από διάφορες ηλικίες (ενήλικες, έφηβοι, παιδιά και νεογέννητα) και εξετάσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή και το ποσοστό κυτταρικής έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε σχέση με την ηλικία. Σε αυτά τα πλαίσια αξιολογήσαμε τη θυμική υποστροφή με συνδυασμό μορφολογικής μελέτης επί ιστολογικών τομών παραφίνης (που επιτρέπουν πιο αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση σε σχέση με τις τομές κρυοστάτη) χρωσμένων με χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης και

ανοσομορφολογικής ανάλυσης επί ιστολογικών τομών παραφίνης χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση για πρωτεΐνες κυτταρικού κύκλου και τεχνικής TUNEL, η οποία ανιχνεύει κυτταρικό θάνατο (απόπτωση και άλλες μορφές θανάτου).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

Τριάντα δύο θύμοι αδένες από 15 ενήλικες, 3 εφήβους, 8 παιδιά και 6 νεογένητα συλλέχτηκαν από τα Αρχεία των Τμημάτων Παθολογικής Ανατομίας του Νοσοκομείου Παιδων Αθηνών «Αγία Σοφία» και του Νοσοκομείου Αθηνών «Ευαγγελισμός». Σε 7 ενήλικες παρατηρήθηκε ιστολογική εικόνα υποστροφής θύμου και σε 1 έφηβο παρατηρήθηκε ιστολογική εικόνα αρχόμενης υποστροφής θύμου. Σε 9 περιπτώσεις (8 ενήλικες και 1 έφηβος) παρατηρήθηκε εικόνα λεμφοζιδιακής υπερπλασίας του θύμου.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε ιστικές τομές μονιμοποιημένες σε ουδέτερη φορμόλη και εγκλωβισμένες σε παραφίνη με την κλασική μέθοδο Streptavidin-Biotin Peroxidase (LSAB) με τη χρήση του kit LSAB (DAKO).⁽²⁸³⁾ Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε επιπλέον διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με τη χρήση αλκαλικής φωσφατάσης/αντι- αλκαλικής φωσφατάσης (APAAP) και LSAB.⁽²⁸³⁾ Επιπλέον πραγματοποιήθηκε η χρώση TUNEL (TdT-mediated in situ labeling technique)⁽²⁸³⁾ και έγινε μέτρηση των αποπτωτικών κυττάρων με συνεκτίμηση μορφολογίας και χρώσης TUNEL. Τα αντισώματα για τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, οι συγκεντρώσεις τους και οι πηγές προέλευσης τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Μια προεργασία με θέρμανση σε κλίβανο μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκε πριν την επώαση με τα αντισώματα.^(284, 285) Κατάλληλοι θετικοί μάρτυρες από ποικίλους ιστούς συμπεριελήφθησαν σε όλες τις περιπτώσεις. Θετικές αντιδράσεις παρατηρήθηκαν επίσης σε νευρικές ίνες εντός του θύμου παρέχοντας ένα εσωτερικό θετικό μάρτυρα της αντίδρασης νευρικών/νευροενδοκρινών δεικτών όπως νευροειδική ενολάση (NSE), νευροινίδια (NF), τυροσινική υδροξυλάση (TH), πρωτεΐνη S100 και πρωτεΐνη PGP9.5. Αρνητικοί μάρτυρες συμπεριλήφθησαν και αποτελούνταν από χρήση της ίδιας ανοσοϊστοχημικής μεθόδου με παράλειψη του πρωτοταγούς αντισώματος. Για την ημιποσοτική εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης χρησιμοποιήθηκε αντικειμενικός φακός X40 και οι ομάδες της ανοσοθετικότητας εκτιμήθηκαν με τη χρήση επιπέδων έκφρασης ως ακολούθως: σπάνια διάσπαρτα κύτταρα (+/-), λιγότερο από 10% θετικά κύτταρα: χαμηλή έκφραση (+), 10-25% θετικά κύτταρα: ενδιάμεση έκφραση (++) και περισσότερο από 25% θετικά κύτταρα: υψηλή έκφραση (+++).⁽²⁸³⁾ Για να επιτύχουμε καλύτερη αναγνώριση των κυττάρων που εκφράζουν νευρικούς δείκτες, νευροενδοκρινείς δείκτες, τους υποδοχείς TrkA και p75 του NGF και τους ισοτύπους της β-τουμπουλίνης χρησιμοποιήσαμε: α) μορφολογικά κριτήρια (μέγεθος και σχήμα κυττάρου, μέγεθος και σχήμα πυρήνα), β) ανοσοϊστοχημική χρώση σε σειρές διαδοχικών τομών με δείκτες επιθηλιακών κυττάρων (κερατίνες), με δείκτες δενδριτικών κυττάρων [S100 πρωτεΐνη, CD1a, CD207 (Λανγκερίνη), CD123 και CD11c], με δείκτες μονοκυττάρων/μακροφάγων [CD68 και CD163]^(120,273) και με δείκτες λεμφικών κυττάρων [CD45 ή CD3] και γ) σε αρκετές περιπτώσεις διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με χρήση παν-κερατίνης ή CD45 ή CD3 ή S100 ή CD1a ή CD207 ή CD123 ή CD11c ή CD68 ή CD163 με πρωτεΐνη PGP 9.5, συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη, τυροσινική υδροξυλάση, νευροινίδια (NF), TrkA και P75, αντίστοιχα.

2.1. Ανοσοϊστοχημεία

Χρησιμοποιήθηκε η κλασική τεχνική της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAvidin Biotin).

Περιγραφή της μεθόδου LSAB (στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης)

- *Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση:* Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 18 ώρες και κατόπιν στους 56°C για 1 ώρα. Ακολούθως, εμβαπτίσθηκαν σε 3 διαδοχικά δοχεία ξυλόλης από 5' στο κάθε ένα, για να ολοκληρωθεί η αποπαραφίνωση και στη συνέχεια ενυδατώθηκαν σε κατιούσα σειρά οινόπνευμάτων: 3 X 15' σε 100% οινόπνευμα, 3 X 5' σε 96%, 5' σε 80% και 5' σε 70% οινόπνευμα.
- *Τεχνική αποκάλυψης του αντιγόνου:* Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (pH 6,2) και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 X 5' 750W.
- *Προεπάωση:* Τα πλακίδια αφέθηκαν για 15' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, τοποθετήθηκαν σε TBS (Tris Buffer Solution, pH 7,6) για 2 X 5' και επώασθηκαν για 30' σε υγρό θάλαμο με φυσιολογικό ορό σε αραιώση 1:20 σε TBS. Στο στάδιο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικοί αντιγονικοί επίτοποι του ιστού.
- *Επάωση με το πρωτοταγές αντίσωμα:* Στη συνέχεια οι ιστολογικές τομές εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, τοποθετήθηκαν σε TBS (Tris Buffer Solution, pH 7,6) για 2 X 5' και επώαστηκαν με τα πρωτοταγή αντισώματα έναντι των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Σε κάθε ιστολογική τομή τοποθετήθηκαν περίπου 300 μl διαλύματος. Σε όλα τα διαλύματα του πρωτοταγούς (μονοκλωνικού) αντισώματος προστέθηκε 1:100 BSA (Bovine Serum Albumine) προκειμένου να συμπληρωθεί και να ενισχυθεί η δράση του φυσιολογικού ορού, δηλαδή η δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Μετά την επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε TBS για 2 X 5'.
- *Επάωση με το δευτεροταγές αντίσωμα:* Οι ιστολογικές τομές επώαστηκαν με το δευτεροταγές αντίσωμα (DAKO), το οποίο είναι βιοτινιομένο και χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:500 σε TBS, για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση των ιστολογικών τομών σε TBS 2X5'. Στην συνέχεια προστέθηκε το αντίσωμα ABC Complex/HRP (στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με το

σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση) το οποίο και επώασθη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση των ιστολογικών τομών με TBS 2X5' και επώαση με το χρωμογόνο DAB (3,3' τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) (0.1% W/V) (S3000 DAKO) για 1'. Στη συνέχεια έγινε επίχρωση των τομών με αιματοξυλίνη (Harris' hematoxylin). Τέλος οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για 10', αφυδατώθηκαν και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Ακολούθησε η παρατήρηση και ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στο μικροσκόπιο.

2.2. Μέθοδος in situ σήμανσης TUNEL

Προσδιορισμός του αποπτωτικού δείκτη με τη μέθοδο TUNEL

Για το προσδιορισμό του αποπτωτικού δείκτη χρησιμοποιήθηκε το kit Apotag του οίκου Calbiochem (Oncor, Gaithersburg).

Περιγραφή της μεθόδου TUNEL

Η μέθοδος TUNEL στηρίζεται στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξιγενίνη (Dig-dUTP) στο 3'-OH άκρο φραγμάτων DNA με την δράση του ενζύμου TdT (terminal digoxyl transferase). Συγκεκριμένα, μετά από αποπαραφίνωση και ενυδάτωση, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με PBS (phosphate buffer solution). Ακολούθησε πέψη του ιστού με πρωτεΐνάση K (20μg/ml, Oncor) σε PBS για 20' σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την μερική πέψη των πρωτεϊνών του ιστού ώστε τα θραύσματα του DNA του πυρήνα να καταστούν προσιτά στο ένζυμο TdT. Η αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης έγινε με επώαση των ιστολογικών τομών σε διάλυμα 3% H₂O₂ σε PBS για 5', ενώ μετά την εφαρμογή ενός διαλύματος εξισορρόπησης, οι τομές επώασθησαν με διάλυμα που περιείχε το ένζυμο TdT και dUTP-διγοξιγενίνη για 1 ώρα στους 37°C (working-strength TdT enzymes). Η αντίδραση τερματίστηκε μετά από επώαση με προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα (working-strength stop/wash buffer) στους 37°C. Ακολούθησε έκπλυση των τομών με PBS για 5 λεπτά. Για τον εντοπισμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων προστέθηκε αντίσωμα έναντι της διγοξιγενίνης, το οποίο ήταν συζευγμένο με υπεροξειδάση. Σαν χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε η 3-3'-τετραχλωρική-διαμινοβενζιδίνη και ακολούθησε επίχρωση με αιματοξυλίνη (Harris' hematoxylin). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές στις οποίες είχε παραληφθεί το στάδιο της TdT αντίδρασης. Ο αποπτωτικός δείκτης (AI) ορίστηκε ως το εκατοστιαίο ποσοστό των αποπτωτικών

κυττάρων (TUNEL-θετικά κύτταρα και TUNEL-αρνητικά κύτταρα με μορφολογικούς χαρακτήρες απόπτωσης). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μεγεθυντικός φακός X40 και μετρήθηκαν τα αποπτωτικά κύτταρα σε τουλάχιστον 10 τυχαία επιλεγμένα οπτικά πεδία.

Πίνακας 1: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Antibody	Clone	Dilution	Source
Tyrosine hydroxylase	1B5	1:10	Novocastra
CD56	CD564	1:20	Novocastra
S-100	Polyclonal (rabbit)	1:2000	Dako
PGP 9.5	10A1	1:50	Novocastra
NF68	NF68.04 (8A1)	1:200	NeoMarkers
NF140-160	NF160.05 (1B3)	1:100	NeoMarkers
NF200	NF200.06 (2D2)	1:200	NeoMarkers
Peripherin	PJM50	1:50	Novocastra
CD57	NK-1	1:50	Novocastra
Chromogranin A	LK2H10	Ready-to-Use	Bio-Genex
Synaptophysin	Snp88	Ready-to-Use	Bio-Genex
GFAP	Polyclonal (rabbit)	Ready-to-Use	Bio-Genex
NSE	MIG-N3	Ready-to-Use	Bio-Genex
Myelin Basic protein	7H11	1:50	Novocastra
Cytokeratin 16	LL025	1:50	Novocastra
Cytokeratin 17	E3	1:50	Novocastra
Cytokeratin 4	6B10	1:50	Novocastra
Cytokeratin 7	OV-TL 12/30	1:50	Dako
Cytokeratin 8	35βH11	1:50	Dako
Cytokeratin 10	LHP1	1:50	Novocastra
Cytokeratin 13	KS-1A3	1:50	Novocastra
Cytokeratin 14	LL002	1:50	Novocastra
Cytokeratin 18	DC10	1:50	Dako
Cytokeratin 19	BA17	1:50	Dako
Cytokeratin 20	KS20.8	1:50	Dako
Cytokeratin 1	34βB4	1:50	Novocastra
Actin (smooth muscle)	1A4	Ready-to-Use	Bio-Genex
Vimentin	V9	Ready-to-Use	Bio-Genex
Desmin	DE-R-11	1:10	Novocastra
Tryptophane hydroxylase	5C4	1:10	Novocastra
Pan β-tubulin	DM-1B	1:150	Bio-Genex
β-Tubulin II	JDR3B8	1:200	Bio-Genex
β-Tubulin IV	ONS1A6	1:200	Bio-Genex
β-Tubulin III	SDL3D10	1:200	Bio-Genex
CD68	KP1	1:50	Dako
CD1a	MTB1	1:20	Novocastra
CD207(langerin)	12D6	1:100	Novocastra
CD205	11A10	1:20	Novocastra
TrkA	Polyclonal (rabbit) sc-118	1:200	Santa Cruz
P75	NGFR5	1:200	NeoMarkers
CD123	7G3	1:10	Pharmigen
CD205	11A10	1:10	Novocastra
CD163	10D6	1:10	Novocastra
CD11c	NCL-CD11c	1:10	Novocastra
Ki67	MM1	1:10	Novocastra
p21	EA-10	1:50	Calbiochem
p27	1B4	1:50	Novocastra
p16	6H12	1:50	Novocastra

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά οι σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν:

- A. Η ταυτοποίηση των ανθρώπινων θυμικών κυττάρων (επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα) τα οποία εκφράζουν νευρικούς / νευροενδοκρινείς δείκτες [χρωμογρανίνη, συναπτοφουσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, NF (νευροϊνίδια), περιφερίνη, βασική πρωτεΐνη μυελίνης, τρυπτοφανική υδροξυλάση, GFAP (όξινη γλοιακή ινιδιακή πρωτεΐνη), CD56, CD57] και τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) TrKA και p75.
- B. Η ταυτοποίηση των ανθρώπινων θυμικών κυττάρων (επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα) τα οποία εκφράζουν ισοτύπους της β-τουμπουλίνης II, III and IV.
- Γ. Η ανάλυση της ανοσοτοπογραφικής κατανομής θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με την ανοσοτοπογραφική κατανομή θυμικών δενδριτικών κυττάρων.
- Δ. Η περιγραφή του προτύπου έκφρασης πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με τη διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (υποκαψικά, φλοιικά, μυελικά, σωμάτια Hassall).
- E. Η περιγραφή ανοσοτοπογραφικών μεταβολών σε συνάρτηση με την ηλικία θυμικών κυττάρων τα οποία εκφράζουν νευρικούς/νευροενδοκρινείς δείκτες, ισοτύπους της β-τουμπουλίνης II, III και IV, δείκτες επιθηλιακών κυττάρων, δείκτες δενδριτικών κυττάρων και δείκτες μακροφάγων.

Αρχικά έγινε ιστολογική ανάλυση με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και τα σωμάτια Hassall ταξινομήθηκαν μορφολογικά, λαμβάνοντας υπόψη την ταξινόμηση τους από τους Raica και άλλοι, 2006,⁽²⁶²⁾ στις εξής κατηγορίες: α) νεανικού τύπου (Juvenile): όταν δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις παρεγχυματικής υποστροφής, β) ανώριμα (immature): στρογγυλά ή ωοειδή με παρουσία ακανθοκυτταρικής διαφοροποίησης αλλά χωρίς προφανείς εκφυλιστικές αλλοιώσεις (οι υπότυποι α και β είναι τα ενεργά σωμάτια του Hassall), γ) ώριμα (mature): μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους με νεκρωτικές ή κυστικές εκφυλιστικές αλλοιώσεις στην κεντρική περιοχή αλλά με παρουσία επιθηλιακών κυττάρων στην περιφέρεια

και δ) εκφυλισμένα (senescent): μεγάλου μεγέθους χωρίς παρουσία επιθηλιακών κυττάρων, αλλά με παρουσία νέκρωσης, κυστικής εκφύλισης και ασβεστοποίησης. Οι κατηγορίες των ώριμων και εκφυλισμένων σωματίων Hassall παρατηρήθηκαν κυρίως σε θύμους εφήβων και ενηλίκων.

Σε θύμους από 7 ενήλικες παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις υποστρώματος: μείωση της φλοιικής μοίρας και σχετική αύξηση της μυελικής μοίρας, αύξηση ώριμων και εκφυλισμένων σωματίων Hassall, αύξηση λιπώδους ιστού, αύξηση ινοβλαστικών στοιχείων, αύξηση περιαγγειακών διαστημάτων, μείωση σαφούς διαμερισματοποίησης μεταξύ φλοιικής και μυελικής μοίρας, μείωση επιθηλιακού ιστού και μείωση λεμφικού θυμικού ιστού.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η ανοσοϊστοχημική μελέτη και στο στρώμα του θύμου αδένου αναγνωρίστηκαν κύτταρα που εξέφραζαν νευρικούς/νευροενδοκρινείς δείκτες, τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) TrKA και p75 και τους ισotύπους II,III και IV β- τουμπουλίνης (εικόνες 1-11). Ένα μεγάλο μέρος από αυτά τα κύτταρα ήταν θυμικά επιθηλιακά κύτταρα όπως δείχτηκε με συνδυασμό μορφολογικής εκτίμησης (σχήμα και μέγεθος κυττάρου και πυρήνα) και ανοσοϊστοχημικής χρώσης με κερατίνες (επιθηλιακά κύτταρα), CD1a, CD207, CD123, CD11c, S100 (δενδριτικά κύτταρα) CD20, CD3 (λεμφικά κύτταρα), και CD68 και CD163 (μακροφάγα) σε διαδοχικές τομές και σε ορισμένες περιπτώσεις με επιπλέον χρήση διπλής ανοσοϊστοχημικής χρώσης (εικόνες 12-28).

Η ανοσοτοπογραφική κατανομή και τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ποίκιλλαν στους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (υποκαψικά, φλοιικά, μυελικά και σωματίνα Hassall).

Σε αυτή τη βάση τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα:

1. Έκφραση πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (εικόνες 1-7, πίνακας 2)

Στα υποκαψικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για PGP 9.5 και CD57. Στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για NSE (νευροειδική ενολάση) και CD57 και βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης PGP 9.5. Στη φλοιο-μυελική συμβολή σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για PGP 9.5. Όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης, PGP9.5 θετικά κύτταρα παρατηρήθηκαν είτε ως μονήρη κύτταρα είτε

ως μικρές ομάδες θετικών κυττάρων. Σε κάποιες θέσεις ομάδες PGP9.5 θετικών επιθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκε ότι περιβάλλουν φλοιικά λεμφικά κύτταρα και σε αυτά τα φλοιικά λεμφοεπιθηλιακά συμπλέγματα, τα φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να αντιστοιχούν σε φλοιικά θυμικά τροφικά κύτταρα (thymic nurse cells).

Στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για CD56, CD57 και NF (νευροϊνίδια) 140-160kDa και παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση χρωμογρανίνης, συναπτοφυσίνης, τυροσινικής υδροξυλάσης και NSE (νευροειδική ενολάση).

Στα σωματίδια Hassall παρατηρήθηκαν σπάνια διάσπαρτα κύτταρα θετικά για CD56, CD57 και NF (νευροϊνίδια) 140-160 kDa (μόνο στο εξωτερικό τμήμα των σωματίων Hassall), βρέθηκε χαμηλή έκφραση χρωμογρανίνης, συναπτοφυσίνης και τυροσινικής υδροξυλάσης (μόνο στο εξωτερικό τμήμα των σωματίων Hassall) και ανιχνεύτηκαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης NSE (νευροειδικής ενολάσης) (στο σύνολο των σωματίων Hassall). Όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης, η κυτταρική ανοσοθετικότητα για χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, και τυροσινική υδροξυλάση παρατηρήθηκε κυρίως σε μονήρη μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και σπανιότερα (κυρίως στην εξωτερική ζώνη των σωματίων του Hassall) σε μικρές ομάδες επιθηλιακών κυττάρων. Στα σωματίδια Hassall η κυτταρική ανοσοθετικότητα για χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, και τυροσινική υδροξυλάση παρατηρήθηκε σε νεανικού τύπου, ανώριμα και ώριμα σωματίδια Hassall. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, σε διαδοχικές τομές πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινικής υδροξυλάση και NF (νευροϊνίδια) 140-160kDa. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε στα ίδια σωματίδια Hassall όπου είναι δυνατή αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση για να διαπιστωθεί αν τα ίδια κύτταρα συνεκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες νευρικής /νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρωμογρανίνη / συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη / τυροσινική υδροξυλάση, χρωμογρανίνη / NF (νευροϊνίδια) 140-160kDa, συναπτοφυσίνη / τυροσινική υδροξυλάση, συναπτοφυσίνη / NF (νευροϊνίδια) 140-160kDa και τυροσινική υδροξυλάση / NF (νευροϊνίδια) 140-160kDa. Η ανωτέρω συνδυασμένη ανάλυση (σε διαδοχικές τομές και με διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις) έδειξε ότι κάποια κύτταρα στα ίδια σωματίδια Hassall παρουσίαζαν συνέκφραση χρωμογρανίνης / συναπτοφυσίνης.

Δεν ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση περιφερίνης, βασικής πρωτεΐνης μυελίνης, τρυπτοφανικής υδροξυλάσης, GFAP (όξινης γλοιακής ινδιακής πρωτεΐνης), και NF (νευρονιδίων), 68kDa και NF200kDa.

2. Έκφραση των υποδοχέων (TrkA και p75) του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (εικόνες 8,9 / πίνακας 2)

Στα υποκαψικά και φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση TrkA (υψηλής συγγένειας υποδοχέας NGF). Στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ανιχνεύτηκε χαμηλή έκφραση p75 (χαμηλής συγγένειας υποδοχέας NGF) και ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης από TrkA. Όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης η κυτταρική θετικότητα για TrkA και p75 παρατηρήθηκε κυρίως σε μονήρη επιθηλιακά κύτταρα. Στα σωματία Hassall, σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για TrkA και p75 (μόνο στην περιφέρεια των σωματίων). Στα σωματία Hassall η κυτταρική ανοσοθετικότητα παρατηρήθηκε σε νεανικού τύπου, ανώριμα και ώριμα σωματία Hassall.

Πραγματοποιήθηκε σε διαδοχικές τομές σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών TrkA και p75. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε στα ίδια σωματία Hassall όπου είναι δυνατή αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση για να διαπιστωθεί αν τα ίδια κύτταρα συνεκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες TrkA και p75. Η ανωτέρω συνδυασμένη ανάλυση (σε διαδοχικές τομές και με διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις) έδειξε ότι κάποια κύτταρα στα ίδια σωματία Hassall παρουσίαζαν συνέκφραση TrkA και p75.

3. Έκφραση των ισοτύπων β-τουμπουλίνης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα (εικόνες 10,11/ πίνακας 3)

Στα υποκαψικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για β-τουμπουλίνη II και βρέθηκε υψηλή έκφραση β-τουμπουλίνης IV. Στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για β-τουμπουλίνη II και παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση β-τουμπουλίνης IV. Στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, ανιχνεύτηκαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης β-τουμπουλίνης II και β-τουμπουλίνης IV. Στα σωματία Hassall,

βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης β-τουμπουλίνης II και β-τουμπουλίνης IV. Δεν παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση για β-τουμπουλίνη III στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

Συνολικά, τα υποκαψικά και τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης β-τουμπουλίνης IV σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σωματίδια Hassall.

4. Έκφραση κερατινών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

(εικόνες 12-17/πίνακας 4)

Η παν-κερατίνη (Pan-CK) AE1/AE3 και η κερατίνη 19 ανιχνεύθηκαν σε όλους τους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Υπότυποι των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξέφρασαν κερατίνες 7, 8, 13, 14, 16, 17 και 18, ενώ οι κερατίνες 1, 4 και 10 παρατηρήθηκαν μόνο στα σωματίδια Hassall και η κερατίνη 20 ήταν μη ανιχνεύσιμη στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

Πιο συγκεκριμένα, στα υποκαψικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση κερατίνης 14 και βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης για κερατίνες 7 και 19. Στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση της κερατίνης 19 και σπάνια διάσπαρτα κύτταρα ήταν θετικά για κερατίνη 14 και κερατίνη 7.

Στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση των κερατινών CK 7, 8, 13, 14, 16, 17 και 18 και βρέθηκαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης της κερατίνης 19. Τα σωματίδια Hassall (νεανικού τύπου, ανώριμα και ώριμα) παρουσίασαν έκφραση όλων των κερατινών που μελετηθήκαν (1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18 και 19) πλην της κερατίνης 20. Πιο συγκεκριμένα, στα σωματίδια Hassall (νεανικού τύπου, ανώριμα και ώριμα) παρατηρήθηκε χαμηλή έκφραση των κερατινών 4, 16, 17 και 18 και ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης 1, 7, 8, 10, 13, 14, και 19. Τα σωματίδια Hassall (νεανικού τύπου, ανώριμα και ώριμα) παρουσίασαν έκφραση κερατινών που παρατηρούνται σε κερατινοποιημένα πλακώδη επιθήλια (κερατίνη 10), σε μη-κερατινοποιημένα πλακώδη επιθήλια (κερατίνη 4, κερατίνη 13), σε κερατινοποιημένα πλακώδη επιθήλια και μη-κερατινοποιημένα πλακώδη επιθήλια (κερατίνη 1), σε κυλινδρικά επιθήλια (κερατίνη 8, κερατίνη 18, κερατίνη 19), σε μεταβατικό επιθήλιο (κερατίνη 7, κερατίνη 8, κερατίνη 19) και σε βασικά επιθηλιακά κύτταρα (κερατίνη 14).

Συνολικά, τα σωμάτια Hassall (νεανικού τύπου, ανώριμα και ώριμα) παρουσίασαν έκφραση όλων των κερατινών που μελετηθήκαν (1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18 και 19) πλην της κερατίνης 20, ενώ οι υπόλοιποι τύποι επιθηλιακών κυττάρων (υποκαψικά, φλοιικά και μυελικά) παρουσίασαν πιο περιορισμένο πρότυπο έκφρασης κερατινών. Επιπλέον, από όλες τις κερατίνες που μελετήθηκαν (1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18 και 19), η κερατίνη 19 εκφράστηκε σε μεγαλύτερο αριθμό θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε σχέση με τις άλλες.

5. Έκφραση άλλων δεικτών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

Βιμεντίνη εκφράστηκε σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα, δεσμίνη ανιχνεύθηκε στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σωμάτια Hassall ενώ ακτίνη λείων μυϊκών ινών δεν ανιχνεύθηκε στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

6. Συνδυασμένα πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών νευρικής / νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης κερατινών και ισοτύπων β-τουμπουλίνης στους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων

Μεταξύ των υποτύπων των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, η πρωτεΐνη PGP 9.5 εκφράστηκε κυρίως στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ενώ νευροειδική ενολάση (NSE), χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, CD56, και νευροινίδια (NF) 140-160kDa εκφράστηκαν κυρίως στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σωμάτια Hassall. Τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είχαν παρόμοια έκφραση με τα σωμάτια Hassall όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης των νευροειδική ενολάση (NSE), χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, CD56, και νευροινίδια (NF) 140-160kDa ενώ η έκφραση των ανωτέρω πρωτεϊνών ήταν περισσότερο περιορισμένη ή μη ανιχνεύσιμη στα υποκαψικά και τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι κερατίνες CK1, CK10 και CK4 παρατηρήθηκαν μόνο στα σωμάτια Hassall τα οποία παρουσίασαν έκφραση όλων των κερατινών CK 1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18 και 19 (πλην της CK 20), ενώ οι υπόλοιποι τύποι επιθηλιακών κυττάρων (υποκαψικά, φλοιικά και μυελικά) παρουσίασαν πιο περιορισμένο πρότυπο έκφρασης κερατινών. Τα υποκαψικά και τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

εκδήλωσαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από β-τουμπουλίνη IV σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σωματία Hassall.

7. Πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών S100, CD1a, CD207, CD123 CD11c ΚΑΙ CD205

(εικόνες 29-44/πίνακας 5)

Επειδή μία σημαντική κοινή λειτουργία των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων είναι η πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση των αντιγόνων,^(3, 250, 251) μελετήσαμε α) με ανοσομορφολογική ανάλυση επί διαδοχικών ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση και β) με διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυττάρων που εκφράζουν παν-κερατίνη σε σχέση με την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυττάρων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c και CD205 (δείκτες δενδριτικών κυττάρων) και των κυττάρων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες CD68 και CD163 για να εξετάσουμε αν υπάρχουν επιθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν δείκτες δενδριτικών κυττάρων [S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c (CD1a και CD207 είναι δείκτες Langerhans δενδριτικών κυττάρων, CD123 είναι δείκτης πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων)] και δείκτες μακροφάγων (CD68 και CD163). Επειδή οι πρωτεΐνες S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c εντοπίστηκαν κυρίως στο μυελό και στα σωματία Hassall (πίνακας 5), οι ανοσομορφολογικές συγκρίσεις κατ' αρχή πραγματοποιήθηκαν στα ίδια σωματία Hassall όπου είναι δυνατή αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση για να διαπιστωθεί αν τα ίδια κύτταρα συνεκφράζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και κατόπιν με βάση αυτά τα σωματία Hassall οι ανοσομορφολογικές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν στο μυελό.

Σε θύμους από παιδιά και νεογέννητα (εικόνες 29-35, 44) παρατηρήθηκαν S100 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, εγγύς και σπανιότερα εντός των ενεργών σωματίων του Hassall. Παρατηρήθηκαν CD123 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα αλλά όχι εντός των σωματίων του Hassall. Παρατηρήθηκαν επίσης CD1a, CD207 (Λαγκερίνη) και CD11c θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, κυρίως εγγύς και πέριξ των σωματίων Hassall και εντός των ενεργών σωματίων Hassall. Παρατηρήθηκαν CD123 θετικά κύτταρα και CD11c θετικά κύτταρα στη φλοιο-μυελική συμβολή. CD68 και CD163 θετικά κύτταρα παρατηρήθηκαν διάσπαρτα στη φλοιική και μυελική ζώνη. Από τη συγκριτική μελέτη φαίνεται ότι στα σωματία Hassall τα

ποσοστά των CD1a, CD207 και CD11c θετικών κυττάρων ήταν παρόμοια και ότι στη μυελική μοίρα τα ποσοστά των S100 θετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερα από τα ποσοστά των CD1a, CD207 και CD11c θετικών κυττάρων. Ανοσομορφολογική ανάλυση επί διαδοχικών ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση και διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις παν-κερατίνης με S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c, CD68 και CD163 έδειξαν μόνο λίγα κύτταρα με συνέκφραση πανκερατίνης / S100. Ανοσομορφολογική ανάλυση επί διαδοχικών ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση και διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έδειξαν γενικά μη-αλληλοεπικάλυψη στους συνδυασμούς CD1a/CD123, CD207/CD123, CD1a/CD163, CD207/CD163 και CD11c/CD123. Επειδή τα CD1a και CD207 είναι δείκτες Langerhans δενδριτικών κυττάρων το CD123 είναι δείκτης πλασματοκυτταροειδών δενδριτικών κυττάρων και το CD163 είναι δείκτης μακροφάγων αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τα θυμικά Langerhans δενδριτικά κύτταρα είναι γενικά διαφορετικός πληθυσμός από τα θυμικά πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα και τα θυμικά μακροφάγα. Ανοσομορφολογική ανάλυση επί διαδοχικών ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση και διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έδειξαν κύτταρα με διπλή θετικότητα ανοσοϊστοχημικής χρώσης στους συνδυασμούς CD1a/CD207, CD1a/ CD68, CD207/ CD68, CD123/CD68, CD163/CD68, S100/ CD1a, S100/ CD207, S100/ CD68, S100/ CD163, CD11c/CD1a, CD11c/CD207, CD11c/CD68, CD11c/CD163 και CD11c/ S100.

Σε θύμους από ενήλικες (εικόνες 36-43), που παρουσιάζουν ιστολογικές αλλοιώσεις υποστροφής, παρατηρείται μυελική κατανομή των S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c θετικών κυττάρων. Από τη συγκριτική μελέτη φαίνεται ότι τα ποσοστά των S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c θετικών κυττάρων ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά σε θύμους από παιδιά και νεογέννητα. Στη μυελική μοίρα (εγγύς και περίξ σωματίων Hassall) τα S100 θετικά κύτταρα της μυελικής μοίρας ήταν περισσότερα από τα CD1a θετικά, τα CD207 θετικά και τα CD11c θετικά κύτταρα. Στα μη-ενεργά σωματία Hassall δεν παρατηρήθηκαν κύτταρα θετικά για S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c. Παρατηρήθηκαν λίγα CD123 θετικά κύτταρα και λίγα CD11c θετικά κύτταρα στη φλοιο-μυελική συμβολή. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ενώ κύτταρα που εκφράζουν S100, CD1a, CD207 και CD11c παρατηρούνται σε ενεργά σωματία Hassall θύμων από παιδιά και νεογέννητα, δεν παρατηρούνται σε μη ενεργά σωματία Hassall από ενήλικες που παρουσιάζουν ιστολογικές αλλοιώσεις υποστροφής. Επιπλέον, συνολικά τα S100, CD1a, CD207, CD123 και CD11c

θετικά κύτταρα ήταν περισσότερα σε θύμους από παιδιά και νεογέννητα από ότι σε θύμους από ενήλικες. Ανοσομορφολογική ανάλυση σε θύμους από ενήλικες επί διαδοχικών ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση και διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις S100/CD1a, S100/CD207, S100/CD11c έδειξαν την έκφραση CD1a, CD207 και CD11c σε S100 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και στην εξωτερική ζώνη σωματίων Hassall. CD68 και CD163 θετικά κύτταρα παρατηρήθηκαν διάσπαρτα στη φλοιική και μυελική ζώνη. Ανοσομορφολογική ανάλυση επί διαδοχικών ιστολογικών τομών χρωσμένων με ανοσοϊστοχημική χρώση και διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έδειξαν την έκφραση CD68 και CD163 σε S100 θετικά κύτταρα.

Η πρωτεΐνη CD205 (που είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε υποτύπους των δενδριτικών κυττάρων του δέρματος, των λεμφαδένων και του σπλήνα) εκφράστηκε κυρίως στα φλοιικά και πολύ λιγότερο ως καθόλου στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα, αλλά δεν εκφράστηκε σε υποτύπους των θυμικών δενδριτικών κυττάρων. Αυτό δείχτηκε με βάση τα ευρήματα ότι α) τα θυμικά δενδριτικά κύτταρα έχουν κυρίως μυελική εντόπιση (πίνακας 5) ενώ τα CD205 ανοσοθετικά θυμικά κύτταρα έχουν σχεδόν αποκλειστικά φλοιική εντόπιση και β) ότι τα δικτυωτά πρότυπα θετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης για CD205 και για παν-κερατίνη σε διαδοχικές τομές είναι παρόμοια στο φλοιό.

8. Έκφραση πρωτεϊνών στα θυμοκύτταρα (λεμφικά κύτταρα)

Τα περισσότερα φλοιικά και μυελικά θυμοκύτταρα εξέφρασαν βιμεντίνη και παν-β-τουμπουλίνη.

Το CD1a εκφράστηκε στα περισσότερα φλοιικά θυμοκύτταρα. Διάσπαρτα θυμοκύτταρα εξέφρασαν CD57 και CD56 (Τα CD57 θετικά κύτταρα υπερερούσαν αριθμητικά από τα CD56 θετικά κύτταρα). Η ανοσοϊστοχημική χρώση για το δείκτη των Β-λεμφοκυττάρων CD20 έδειξε θετικότητα εντοπισμένη κυρίως στο μυελό και γύρω από τα σωματίνα Hassall. Η ανοσοϊστοχημική χρώση για το δείκτη των Τ-λεμφοκυττάρων CD3 έδειξε θετικότητα εντοπισμένη κυρίως στο φλοιό ενώ σαφώς μικρότερα επίπεδα CD3 θετικότητας παρατηρήθηκαν στο μυελό.

9. Πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών νευρικής/ νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης, κερατινών και ισοτύπων β-τουμπουλίνης σε σχέση με την ηλικία

Σε θύμους από 7 ενήλικες παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις υποστροφής: μείωση της φλοιικής μοίρας και σχετική αύξηση της μυελικής μοίρας, αύξηση ωρίμων και εκφυλισμένων σωματίων Hassall, αύξηση λιπώδους ιστού, αύξηση ινοβλαστικών στοιχείων, αύξηση περιαγγειακών διαστημάτων, μείωση σαφούς διαμερισματοποίησης μεταξύ φλοιικής και μυελικής μοίρας, μείωση επιθηλιακού ιστού και μείωση λεμφικού θυμικού ιστού. Η μείωση σαφούς διαμερισματοποίησης μεταξύ φλοιικής και μυελικής μοίρας ελέγχθηκε με εξέταση της αγγειοβριθούς φλοιομυελικής συμβολής. Η μείωση του επιθηλιακού ιστού ελέγχθηκε με εξέταση της ανοσοτοπογραφικής κατανομής του πρότυπου έκφρασης παν-κερατινών. Επιπλέον, στους 7 θύμους από ενήλικες με αλλοιώσεις υποστροφής παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση ως και απώλεια του δικτυωτού πρότυπου έκφρασης παν-κερατινών που χαρακτηρίζει τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και σταδιακή μείωση ως και απώλεια του δικτυωτού πρότυπου έκφρασης του CD205 που χαρακτηρίζει τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Στους 7 θύμους από ενήλικες με αλλοιώσεις υποστροφής παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των κυττάρων που εξέφραζαν νευρικούς/ νευροενδοκρινείς δείκτες. Αυτή η μείωση μάλλον αποτελεί επακόλουθο της συνολικής μείωσης του αριθμού των επιθηλιακών κυττάρων στα πλαίσια της θυμικής υποστροφής. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από τις παρατηρήσεις ότι α. η ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (εικόνα 45) ήταν μικρότερη στα επιθηλιακά κύτταρα θύμων από τους 3 ενήλικες σε σχέση με τα επιθηλιακά κύτταρα από νεογέννητα και παιδιά και β. τα αποπτωτικά επιθηλιακά κύτταρα ήταν περισσότερα στους 3 θύμους από ενήλικες με αλλοιώσεις υποστροφής από ότι σε θύμους νεογέννητων και παιδιών (τα αποπτωτικά κύτταρα μετρήθηκαν με βάση τη συνεκτίμηση μορφολογικών κριτηρίων και της κυτταρικής θετικότητας για την TUNEL τεχνική) (εικόνα 46).

10. Πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών νευρικής /νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης, κερατινών και ισοτύπων β-τουμπουλίνης σε θύμους με λεμφοζιδιακή υπερπλασία

Σε 9 περιπτώσεις (8 ενήλικοι και 1 έφηβος) παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις λεμφοζιδιακής υπερπλασίας οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ευμεγέθων λεμφοζιδίων με εμφανή ενεργά βλαστικά κέντρα στο κέντρο αυτών των λεμφοζιδιακών σχηματισμών. Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έδειξε την παρουσία CD20 θετικών λεμφικών κυττάρων στους λεμφοζιδιακούς σχηματισμούς και CD21, CD23 και CD35 θετικών λεμφοζιδιακών δενδριτικών κυττάρων στους λεμφοζιδιακούς σχηματισμούς.

11. Έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου και επιθηλιακή διαφοροποίηση

(πίνακας 6)

Η ανοσοτοπογραφική κατανομή των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου παρουσιάζεται στον πίνακα 6 και στην εικόνα 45. Το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων σε κυτταρικό κύκλο είναι μικρό όπως φαίνεται από το ποσοστό έκφρασης του Ki67 (που εκφράζεται σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάσεις G1, S, G2 και M, ενώ δεν εκφράζεται σε κύτταρα που ευρίσκονται σε φάση G₀). Πραγματοποιήθηκαν διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις Ki67/CD3, Ki67/CD20 και Ki67/παν-κερατίνη για πιο αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση των κυττάρων που εκφράζουν Ki67. Είναι αξιοσημείωτο ότι το Ki67 δεν ανιχνεύθηκε στα σωμάτια Hassall. Αντίθετα, υψηλά ποσοστά έκφρασης των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21, p27 και p16 ανιχνεύθηκαν στα σωμάτια Hassall και ικανός αριθμός των υπολοίπων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξέφραζε p21, p27 και p16. Επειδή τα σωμάτια Hassall είναι επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης, τα ανωτέρω δείχνουν σαφή μείωση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε κυτταρικό κύκλο όταν η επιθηλιακή διαφοροποίηση εξελίσσεται προς τα τελικά στάδια.

Ορισμένες μελέτες δείχνουν μια συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση πρωτεΐνης PGP 9.5 και του πολλαπλασιασμού του κυττάρου σε αρκετούς τύπους κυττάρων και υπάρχουν πειραματικά δεδομένα για τη διαμεσολάβηση του TrkA στον επαγόμενο από τον αυξητικό παράγοντα νεύρων (NGF) πολλαπλασιασμό στα επιθηλιακά κύτταρα.^(271, 280, 281, 282, 286, 287) Για το λόγο αυτό, η έκφραση της πρωτεΐνης PGP 9.5 και του TrkA στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα αναλύθηκε σε

διαδοχικές ιστολογικές τομές συγκριτικά με τα πρότυπα έκφρασης της πρωτεΐνης Ki67 (που εκφράζεται σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάσεις G1, S, G2 και M, ενώ δεν εκφράζεται σε κύτταρα που ευρίσκονται σε φάση G0) στα ίδια κύτταρα.⁽²⁸³⁾ Δεν παρατηρήθηκε παράλληλη έκφραση ανάμεσα στη πρωτεΐνη Ki67 και την πρωτεΐνη PGP 9.5 ή τον TrkA διότι χαμηλή έκφραση Ki67 ανιχνεύτηκε στα φλοιικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ενώ η πρωτεΐνη PGP 9.5 εκφράστηκε κατά προτίμηση στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και ο TrkA έδειξε ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και χαμηλή έκφραση στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

12. Γενικές συγκρίσεις προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης με την έκφραση των κερατινών. Συγκεκριμένα, σε διαδοχικές τομές πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των κερατινών 1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17 και 19 με τα Πρότυπα ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση και NF (νευροινίδια) 140-160kDa, CD57 και CD56. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε στα σώματα Hassall όπου είναι δυνατή αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση για να διαπιστωθεί αν τα ίδια κύτταρα συνεκφράζουν μια συγκεκριμένη κερατίνη με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης.

Το συμπέρασμα ήταν ότι δεν παρατηρήθηκε ειδική συσχέτιση ανοσοτοπογραφικών προτύπων κυτταρικής συνέκφρασης κυτταροκερατινών με πρωτεΐνες νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι, ενώ παρατηρήθηκε επιλεκτική ανοσοτοπογραφική κατανομή θυμικών επιθηλιακών κυττάρων τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνες νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης στους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (PGP 9.5 στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, νευροινίδια, νευροειδική ενολάση και CD56 στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σώματα Hassall), (πίνακας 2) και επιλεκτική ανοσοτοπογραφική κατανομή θυμικών κυττάρων τα οποία εκφράζουν δείκτες επιθηλιακών κυττάρων (πίνακας 4), δείκτες δένδριτικών κυττάρων (πίνακας 5) και ισότυπους β-τουμπουλίνης (πίνακας 3) δεν παρατηρήθηκε επιλεκτική ανοσοτοπογραφική

κατανομή των πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης σε σχέση με συγκεκριμένους υπότυπους κερατινών.

Πίνακας 2: Ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης και έκφραση υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα νεύρων στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

	ΥΠΟΚΑΨΙΚΑ	ΦΛΟΠΙΚΑ	ΜΥΕΛΙΚΑ	ΣΩΜΑΤΙΑ ΤΟΥ HASSALL
PGP 9.5	+/-	++	-	-
NSE (Νευροειδική ενολάση)	-	+/-	+	++
Χρωμογρανίνη Α	-	-	+	+
Συναπτοφουσίνη	-	-	+	+
Τυροσινική Υδροξυλάση	-	-	+	+
CD56	-	-	+/-	+/-
CD57	+/-	+/-	+/-	+/-
NF (νευροϊνίδια) 68 kDa	-	-	-	-
NF (νευροϊνίδια) 140-160 kDa	-	-	+/-	+/-
NF (νευροϊνίδια) 200 kDa	-	-	-	-
GFAP (όξινη γλοιακή ινιδιακή πρωτεΐνη)	-	-	-	-
Περιφερίνη	-	-	-	-
Βασική πρωτεΐνη μυελίνης	-	-	-	-
TrKA	+	+	++	+/-
P75	-	-	+	+/-
Βιμεντίνη	+	+	+++	++
Δεσμίνη	-	-	+	+
Ακτίνη	-	-	-	-

Πίνακας 3: Ανοσοϊστοχημική έκφραση ισοτύπων β-τουμπουλίνης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

	ΥΠΟΚΑΨΙΚΑ	ΦΛΟΠΙΚΑ	ΜΥΕΛΙΚΑ	ΣΩΜΑΤΙΑ ΤΟΥ HASSALL
Παν β-τουμπουλίνη	+++	+++	+++	+++
β-τουμπουλίνη -II	-	+/-	++	++
β-τουμπουλίνη -III	-	-	-	-
β-τουμπουλίνη IV	+++	+++	++	++

--	--	--	--	--

Πίνακας 4: Ανοσοϊστοχημική έκφραση κερατινών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

	ΥΠΟΚΑΨΙΚΑ	ΦΛΟΙΠΚΑ	ΜΥΕΛΙΚΑ	ΣΩΜΑΤΙΑ ΤΟΥ HASSALL
CK 1	-	-	-	++
CK4	-	-	-	+
CK7	++	+/-	+	++
CK8	-	-	+	++
CK10	-	-	-	++
CK13	-	-	+	++
CK14	+	+/-	+	++
CK16	-	-	+	+
CK17	-	-	+	+
CK18	-	-	+	+
CK19	++	+	++	++
CK20	-	-	-	-

Πίνακας 5: Ανοσοτοπογραφική κατανομή κυττάρων που εκφράζουν πρωτεΐνες διαφοροποίησης δενδριτικών κυττάρων

	ΥΠΟΚΑΨΙΚΑ	ΦΛΟΙΠΚΑ	ΜΥΕΛΙΚΑ	ΣΩΜΑΤΙΑ ΤΟΥ HASSALL
S100	-	-	++	+/-
CD1α	-	-	+	+/-
CD207	-	-	+	+/-
CD123	-	+/-*	+	-
CD11c	-	+/-*	+	+
CD205	+/++	++	-	-

*φλοιο-μυελική συμβολή

Πίνακας 6: Ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών κυτταρικού κύκλου στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

	ΥΠΟΚΑΨΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	ΦΛΟΙΟΣ	ΜΥΕΛΟΣ	ΣΩΜΑΤΙΑ ΤΟΥ HASSALL
Ki67	+	+	+	-
p27	++	++	++	+++
p16	++	++	++	+++
p21	++	++	++	+++

Πίνακας 7: Συγκριτική ανοσοϊστοχημική έκφραση κερατινών, β-τουμπουλίνης, νευρικών/νευροενδοκρινικών και άλλων πρωτεϊνών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα

	ΥΠΟΚΑΨΙΚΑ	ΦΛΟΙΣΚΑ	ΜΥΕΛΙΚΑ	ΣΩΜΑΤΙΑ ΤΟΥ HASSALL
CK 1	-	-	-	++
CK4	-	-	-	+
CK7	++	+/-	+	++
CK8	-	-	+	++
CK10	-	-	-	++
CK13	-	-	+	++
CK14	+	+/-	+	++
CK16	-	-	+	++
CK17	-	-	+	++
CK18	-	-	+	+
CK19	++	+	++	++
CK20	-	-	-	-
PGP 9.5	+/-	++	-	-
NSE (Νευροειδική ενολάση)	-	+/-	+	++
Χρωμογρανίνη Α	-	-	+	+
Συναπτοφουσίνη	-	-	+	+
Τυροσινική Υδροξυλάση	-	-	+	+
CD56	-	-	+/-	+/-
CD57	-	+/-	+/-	+/-
NF (νευροινίδια) 140-160 kDa	-	-	+/-	+/-
β-τουμπουλίνη -II	-	+/-	++	++
β-τουμπουλίνη -III	-	-	-	-
β-τουμπουλίνη IV	+++	+++	++	++
CD205	++	++	-	-

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε ότι τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και τα σωματία Hassall εκφράζουν πρωτεΐνες νευρικής/νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης όπως νευροειδική ενολάση, χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, νευροινίδια NF 140-160 kDa και CD56 ενώ αυτές οι πρωτεΐνες ήταν μη ανιχνεύσιμες ή σπάνια εκφραζόταν στα υποκαψικά και φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Η ανοσοϊστολογική ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος νευρικών η/και νευροενδοκρινών πρωτεϊνών στα ανθρώπινα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και σωματία Hassall,^(παρούσα μελέτη, 147,251,257-260,263,264) σχετίζεται με την ιδιαίτερη ικανότητα του μυελικού επιθηλίου του θύμου να εκφράζει ένα ευρύ φάσμα από αντιγονικά χαρακτηριστικά άλλων ιστών.^{(265, 266, 267, 268, 288).}

Είναι ενδιαφέρον το ότι η σύγκριση της κατανομής του RNA των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων με τα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα θυμοκύτταρα αποκάλυψε ότι ένας ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός από γονίδια εκφράζονται στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με τους άλλους πληθυσμούς.^(267, 288) Επιπλέον, ανάλυση στο πρωτεϊνικό επίπεδο έδειξε ότι ισχυρή έκφραση συγκεκριμένων ιστικών αντιγόνων περιοριζόταν σε ένα μικρό κλάσμα των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων που ποίκιλε από 1-5% του συνόλου.⁽²⁸⁸⁾ Αυτό ενισχύεται από τα παρόντα ανοσοϊστοχημικά ευρήματά μας που δείχνουν ότι οι περισσότερες νευρικές/νευροενδοκρινικές πρωτεΐνες εκφράζονται σε λιγότερο από 10% των μυελικών κυττάρων. Εν τούτοις, η έκφραση αυτών των νευρικών/νευροενδοκρινικών πρωτεϊνών ήταν έντονη στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, παρότι αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε μικρό ποσοστό αυτών των κυττάρων. Είναι πιθανό ότι η έντονη έκφραση ενός ευρέως φάσματος πρωτεϊνών χαρακτηριστικών άλλων ιστών (εκτός θύμου) σε μικρό ποσοστό των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξασφαλίζει α. τη δυνατότητα να παρουσιάζεται ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών (αντιγόνων) και β. τη δυνατότητα να εκλύεται ένα ισχυρό σήμα αντιγόνο-παρουσίασης στην διαμεσολαβούμενη από τον T-κυτταρικό υποδοχέα (T-cell receptor) ανοσολογική ανοχή (tolerance).

Η διαφορετική ανοσοτοπογραφική κατανομή των ποικίλων νευρικών /νευροενδοκρινικών πρωτεϊνών σε διακριτούς υποτύπους των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (για παράδειγμα: PGP 9.5 σε φλοιικά θυμικά επιθηλιακά

κύτταρα, νευροειδική ενολάση, συναπτοφουσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, νευροϊνίδια NF 140-160kDa και πεπτιδίο συνδεδεμένο με την παραθορμόνη σε μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, ουσία P, μπομπεσίνη και beta-ενδορφίνη σε υποκαψικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, οξυτοκίνη και βασοπρεσίνη σε υποκαψικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα),^(παρούσα μελέτη, 257-261, 263) μπορεί να παρέχει μία βάση για μια ιστογενετική ταξινόμηση των νευροεδοκρινών όγκων του θύμου αδένος.⁽²⁸⁹⁾ Αυτή η πρόταση υποστηρίζεται από ευρήματα που δείχνουν ότι η διαφορετική έκφραση ποικίλων κερατινών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ιστογενετική ταξινόμηση των επιθηλιακών νεοπλασιών του θύμου.⁽²⁹⁰⁾

Η έκφραση ενός ευρέος φάσματος από νευρικούς/νευροενδοκρινικούς δείκτες στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ανθρώπων και τρωκτικών οδήγησε μερικούς ερευνητές στην υπόθεση ότι αυτά τα κύτταρα προέρχονται από την νευρική ακρολοφία.^(189, 254, 291, 292) Όμως, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι το θυμικό επιθήλιο στα ποντίκια προέρχεται από το ενδόδερμα⁽¹⁷⁾ και ότι τα φλοιικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα στα ποντίκια έχουν ένα κοινό προγεννήτορα.^(34, 293) Με βάση αυτά τα πρόσφατα ευρήματα, υποθέτουμε ότι τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από το ενδόδερμα και ορισμένα από αυτά αποκτούν νευρική/νευροενδοκρινή διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της επιθηλιακής κυτταρικής διαφοροποίησης του θύμου αδένος.

Τα παρόντα ευρήματα ότι η πρωτεΐνη PGP 9.5 εκφράζεται στο φλοιό είναι σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα σε ανθρώπινους θύμους,⁽²⁵⁸⁾ ενώ η πρωτεΐνη PGP 9.5 στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα αρουραίων εντοπίζεται κύρια στον έσω φλοιό.⁽²¹¹⁾ Με δεδομένη τη σημασία της αλληλεπίδρασης θυμικών επιθηλιακών κυττάρων -θυμοκυττάρων, αυτή η διαφορά μπορεί να έχει λειτουργική σημασία, καθώς στον έσω φλοιό διπλά αρνητικά θυμοκύτταρα υφίστανται κλωνικό πολλαπλασιασμό ενώ στον έξω φλοιό τα διπλά αρνητικά γίνονται διπλά θετικά θυμοκύτταρα.⁽²⁵⁰⁾

Είναι ενδιαφέρουσα η συσχέτιση που δείχνουν ορισμένες μελέτες ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης PGP 9.5 και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.⁽²⁸⁰⁻²⁸²⁾ Για παράδειγμα, ο Haley και συν. (1997),⁽²⁸¹⁾ παρατήρησαν ότι τα ανοσοαντιδραστικά για την πρωτεΐνη PGP 9.5 κύτταρα σε αναπτυσσόμενο ανθρώπινο πνεύμονα ήταν συνήθως αρνητικά για το πυρηνικό αντιγόνο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA) το οποίο εκφράζεται από ενεργώς διαιρούμενα κύτταρα. Επειδή η πρωτεΐνη PGP 9.5 δρα σαν καρβοξυλική-τελική υδρολάση η οποία απελευθερώνει συνδεδεμένες πρωτεΐνες,⁽²⁹⁴⁾ προτάθηκε ότι η πρωτεΐνη PGP 9.5 δημιουργεί αποσύζευξη αναστολέων κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDK)

προάγοντας με τον τρόπο αυτό τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.⁽²⁸²⁾ Σε αντίθεση, ο Gianbiano και συν. (1991),⁽²⁸⁰⁾ παρατήρησαν την μέγιστη έκφραση της πρωτεΐνης PGP 9.5 κατά τη διάρκεια των φάσεων κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυτταρικών σειρών γλοιώματος. Δεν παρατηρήσαμε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης PGP 9.5 και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς στην παρούσα αλλά και σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας,⁽²⁸³⁾ χαμηλή έκφραση των σχετιζόμενων με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνης A και κυκλίνης B1 ανιχνεύτηκε στα φλοιικά και μυελικά ανθρώπινα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ενώ η πρωτεΐνη PGP 9.5 εκφράστηκε κυρίως στα φλοιικά ανθρώπινα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

Τα παρόντα ευρήματα της έκφρασης της πρωτεΐνης TrkA (υψηλής συγγένειας υποδοχέας NGF) στα υποκαψικά, φλοιικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είναι σε συμφωνία με μια προηγούμενη ανοσοϊστοχημική μελέτη σε φυσιολογικούς ανθρώπινους θύμους εμβρύων και νεογνών.⁽²⁷²⁾ Όμως, σε μια άλλη μελέτη ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του υποδοχέα TrkA παρατηρήθηκε μόνο σε υποκαψικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα σε ανθρώπινους εμβρυικούς θύμους.⁽²⁷³⁾ Σε αυτή τη μελέτη ο υποδοχέας TrkA στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ανιχνεύτηκε ανοσοϊστοχημικά μόνο σε θυμική υπερπλασία σχετιζόμενη με μυασθένεια σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες.⁽²⁷³⁾ Επιπλέον, ο υποδοχέας TrkA δεν ανιχνεύτηκε ανοσοϊστοχημικά σε φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα αρουραίων και ποντικών υπό φυσιολογικές συνθήκες.^(244, 295, 296, 297) Εντούτοις ανοσοϊστοχημική έκφραση του υποδοχέα TrkA σε φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα αρουραίων παρατηρήθηκε κατά την αναγέννηση του θύμου μετά από οξεία υποστροφή που προέκυψε ως αποτέλεσμα δράσης της κυκλοφωσφαμίδης,⁽²⁹⁷⁾ καθώς και μετά την απόπτωση θυμοκυττάρων ως αποτέλεσμα της δράσης των κορτικοστεροειδών.⁽²⁹⁶⁾ Συνδυασμένα, τα ανωτέρω δεδομένα από θύμους ανθρώπων, αρουραίων και ποντικών δείχνουν διαφορές στην έκφραση των υποδοχέων TrkA στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στην εξαρτώμενη από τον κυτταρικό κύκλο έκφραση του υποδοχέα TrkA,⁽²⁷¹⁾ και/ή σε διαλυτούς παράγοντες που ελευθερώνονται από τα θυμοκύτταρα καθώς η εξάλειψη των θυμοκυττάρων σε θύμους αρουραίων είχε ως αποτέλεσμα την μειορύθμιση του υποδοχέα TrkA στα υποκαψικά και μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα ενώ απουσία των θυμοκυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την αυξορύθμιση του υποδοχέα TrkA στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.⁽²⁹⁷⁾

Πολλά δεδομένα δείχνουν ότι υποδοχείς αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση των

επιθηλιακών κυττάρων.^(271,286,287,298) Για παράδειγμα, ο υποδοχέας TrkA μεσολαβεί την υποτροφή που επηρεάζεται από τον αυξητικό παράγοντα νεύρων (NGF) σε καρκινικά κύτταρα μαστού⁽²⁸⁷⁾ και σε επιθηλιακά κύτταρα των τριχοθυλακίων.⁽²⁸⁶⁾ Δεν παρατηρήσαμε συσχέτιση ανάμεσα στον υποδοχέα TrkA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς στην παρούσα και σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας⁽²⁸³⁾ χαμηλή έκφραση του Kι67, κυκλίνης A και κυκλίνης B1 ανιχνεύτηκε στα φλοιικά και μυελικά ανθρώπινα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ο TrkA έδειξε ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης στα μυελικά επιθηλιακά κύτταρα και χαμηλά επίπεδα έκφρασης στα φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη, διαφορετικά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης β-τουμπουλίνης II και IV ανιχνεύτηκαν σε όλους τους υποτύπους των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Στα υποκαψικά και φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της β-τουμπουλίνης IV σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σωματία Hassall. Η ευρεία διασπορά και ετερογένεια στην κατανομή της β-τουμπουλίνης II και IV στα ανθρώπινα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είναι σε συμφωνία με τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα σε άλλα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Πράγματι, οι Roath και συν. (1999),⁽²⁷⁹⁾ παρατήρησαν ανοσοϊστοχημική έκφραση β-τουμπουλίνης II στη κοκκιώδη στιβάδα του δέρματος και πολύ χαμηλά επίπεδα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης β-τουμπουλίνης IV στο δέρμα και στο πάγκρεας. Οι Dozier και συν. (2003),⁽²⁷⁷⁾ ανίχνευσαν ανοσοϊστοχημικά β-τουμπουλίνη II και I+IV (με επικράτηση της β-τουμπουλίνης II) σε φυσιολογικό επιθήλιο μαστού και σε καρκίνωμα μαστού και οι Ranganathan και συν. (1997),⁽²⁹⁹⁾ παρατήρησαν ετερογενή ανοσοϊστοχημική έκφραση β-τουμπουλίνης II και IV σε καλοήγη υπερπλασία προστάτη και καρκίνωμα προστάτη.

Στην παρούσα μελέτη, ανοσοϊστοχημική έκφραση β-τουμπουλίνης III δεν ανιχνεύτηκε στα ανθρώπινα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Αυτό είναι σε συμφωνία με ανοσοϊστοχημικά ευρήματα σε άλλα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Πράγματι, οι Dozier και συν. (2003),⁽²⁷⁷⁾ δεν ανίχνευσαν β-τουμπουλίνη III σε φυσιολογικό επιθήλιο μαστού και καρκίνωμα μαστού και οι Draberova και συν. (1998)⁽²⁷⁸⁾ ανίχνευσαν β-τουμπουλίνη III μόνο σε φυσιολογικά νευρικά κύτταρα του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος αλλά όχι σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα διαφόρων οργάνων (πνεύμονες, παχύ έντερο, σιαλογόνοι αδένες και ουροδόχος κύστη). Όμως, οι Roach και συν. (1998),⁽²⁷⁹⁾ μελέτησαν με ανοσοϊστοχημεία παχύ έντερο, δέρμα, ωαγωγούς και πάγκρεας και ανίχνευσαν

χαμηλά επίπεδα β-τουμπουλίνης III σε κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Επιπλέον, οι Ranganathan και συν. (1997),⁽²⁹⁹⁾ παρατήρησαν ανοσοϊστοχημική έκφραση β-τουμπουλίνης III σε καλοήγη υπερπλασία του προστάτη και καρκίνωμα του προστάτη. Τα ανωτέρω ευρήματα συνδυαζόμενα μεταξύ τους, υποδεικνύουν ότι η έκφραση της β-τουμπουλίνης III είναι πολύ σπάνια σε φυσιολογικά ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αλλά μπορεί να αυξορυθμίζεται σε ορισμένες επιθηλιακές νεοπλασίες.

Είναι δυνατό να υποθεθεί ότι η ετερογένεια της ανοσοτοπογραφικής κατανομής και των επιπέδων έκφρασης των ισοτύπων II, III και IV της β-τουμπουλίνης στους υποτύπους των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων δηλώνει διαφορετικά στάδια της διαφοροποίησης και/ή διαφορετική λειτουργική σημασία. Η τελευταία υπόθεση μπορεί να υποστηριχθεί από το εύρημα ότι αμφιβληστροειδικά ραβδία και κύτταρα της τραχείας εκφράζουν ισοτύπους β-τουμπουλίνης II και IV, αλλά εμφανίζονται να χρησιμοποιούν μόνο β-τουμπουλίνη IV για τους ακτινωτούς αξονηματικούς μικροσωληνίσκους των.⁽³⁰⁰⁾ Επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να διευκρινισθεί η λειτουργική σημασία της διαφορετικής έκφρασης των ισοτύπων της β-τουμπουλίνης στους υποτύπους των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Θα είναι επίσης ενδιαφέρον να εξετασθεί εάν η έκφραση των ισοτύπων της β-τουμπουλίνης σχετίζεται με την βιολογική συμπεριφορά των θυμικών επιθηλιακών νεοπλασιών καθώς και οι Ranganathan και συν. (1997),⁽²⁹⁹⁾ ανέφεραν μια σαφή αύξηση ανοσοϊστοχημικώς θετικών για β-τουμπουλίνη κυττάρων από την καλοήγη προστατική υπερπλασία στο καρκίνωμα σε 77% των ασθενών, υποδηλώνοντας ότι η αυξημένη έκφραση αυτού του ισοτύπου της β-τουμπουλίνης σχετίζεται με κακοήθεια σε νεοπλασίες του προστατικού επιθηλίου.

Στην παρούσα εργασία αναλύσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κερατινών στον ανθρώπινο θύμο. Τα παρόντα ευρήματα, σε συνδυασμό με ευρήματα προηγούμενων μελετών δείχνουν ότι οι υπότυποι των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων παρουσιάζουν ετερογενή έκφραση ενός ευρέως φάσματος κερατινών χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους, ενώ οι κερατίνες 3, 9, 12 και 20 δεν εκφράζονται από τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.^(228, 290, 301, 302) Η συνέκφραση ενός τόσο ευρέως φάσματος κερατινών δεν παρατηρείται σε άλλα φυσιολογικά μη εμβρυικά ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.^(228, 290, 301, 302) Η κερατίνη 19 εκφράζεται από όλους τους υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων ενώ οι κερατίνες 1, 4 και 10 εκφράζονται μόνο από τα σωματία Hassall. Τα σωματία Hassall εκφράζουν τις περισσότερες κερατίνες συγκριτικά με τους υπόλοιπους

τύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων.^(παρούσα μελέτη, 228, 290, 301, 302) Στα σωματία Hassall η συνέκφραση ενός ευρέως φάσματος κερατινών που χαρακτηρίζουν απλά και πολύστιβα επιθήλια όπως επίσης και η έντονη έκφραση της κερατίνης 10 η οποία χαρακτηρίζει το κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο υποδηλώνουν ότι τα σωματία Hassall είναι ένας ιδιαίτερος τύπος τελικής διαφοροποίησης κερατινοποιημένου επιθηλίου. Με βάση το ανοσοτοπογραφικό πρότυπο κατανομής των ισομορφών των κερατινών διατυπώθηκε η υπόθεση,⁽³⁰²⁾ ότι τα θυμικά φλοιικά επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από το ενδόδερμα ενώ τα υποκαψικά, τα περισσότερα μυελικά και τα σωματία Hassall προέρχονται από το εκτόδερμα. Όμως, με βάση πρόσφατες μελέτες,^(17, 34, 293) αυτή η υπόθεση αμφισβητείται, διότι δείχθηκε ότι το θυμικό επιθήλιο στα ποντίκια προέρχεται από το ενδόδερμα και τα φλοιικά και μυελικά επιθηλιακά κύτταρα στα ποντίκια προέρχονται από κοινό προγεννήτορα. Η υπόθεση του κοινού προγεννήτορα στηρίζεται και από το εύρημα ότι το οργανοειδές θύμωμα αναπαράγει τη δομή του φυσιολογικού θύμου με παρουσία όλων των τύπων επιθηλιακών δομών (φλοιική και μυελική).⁽²⁹⁰⁾

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήσαμε συγκριτική ανοσοτοπογραφική ανάλυση των προτύπων έκφρασης των πρωτεϊνών S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c,⁽³⁰³⁻³⁰⁶⁾ Αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε δενδριτικά κύτταρα^(120, 262). Παρατηρήσαμε ότι σε θύμους από παιδιά και νεογέννητα οι πρωτεΐνες S100, CD1a, CD207 και CD11c εκφράζονται σε κύτταρα της μυελικής μοίρας και σε κύτταρα πέριξ και εντός των σωματίων του Hassall. CD123 θετικά κύτταρα παρατηρήθηκαν μόνο στη μυελική μοίρα αλλά όχι εντός των σωματίων Hassall. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με μία προηγούμενη μελέτη,⁽²⁶²⁾ αλλά σε μία άλλη μελέτη,⁽¹²⁰⁾ S100 θετικά κύτταρα δεν παρατηρήθηκαν εντός των σωματίων Hassall. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι σε θύμους ενηλίκων με αλλοιώσεις υποστροφής, κύτταρα θετικά για S100, CD1a, CD207 και CD11c εντοπίστηκαν εντός της μυελικής μοίρας και εγγύς σωματίων Hassall αλλά δεν εντοπίστηκαν εντός των μη- ενεργών σωματίων Hassall αυτών των θύμων. Είναι πιθανό ότι τα S100, CD1a, CD207 και CD11c θετικά αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα εντός των σωματίων Hassall παίζουν σημαντικό ρόλο στην T-κυτταρική διαφοροποίηση σε θύμους νεογέννητων και παιδιών. Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα επιθηλιακά κύτταρα των σωματίων Hassall συμμετέχουν ως διαμεσολαβητές στην αλληλεπίδραση T-κυττάρων και δενδριτικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα στη διαφοροποίηση και ωρίμανση των μυελικών T-κυττάρων.⁽²¹⁸⁾ Σε αυτή τη διαδικασία τα επιθηλιακά κύτταρα των σωματίων Hassall μπορούν να συμμετέχουν μέσω έκφρασης κυτταροκινών και

αυξητικών παραγόντων (π.χ. ιντερλευκίνη-7, stromal-derived factor 1, ligand CD30, TGF α , thymic stromal lymphopoietin - TSLP).^(307, 308) Ιδιαίτερα σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της ανθρώπινης TSLP η οποία εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των σωματίων Hassall και ενεργοποιεί τα CD11c θετικά ανώριμα δενδριτικά κύτταρα.^(309, 310) Μετά την ενεργοποίησή τους τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν MHC-II και την dendritic cell-lysosome associated protein (DC-LAMP). Πρόσφατα δείχθηκε η συνεντόπιση CD11c θετικών / DC-LAMP θετικών δενδριτικών κυττάρων σε TSLP θετικά σωματία Hassall. Επίσης δείχθηκε ότι ώριμα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να αυξήσουν τα ρυθμιστικά CD4⁺ / CD25⁺ T κύτταρα⁽³¹¹⁾ και ότι αυτά τα T κύτταρα εντοπίζονται μόνο στη μυελική μοίρα του θύμου σε επαφή με τα DC-LAMP θετικά ή CD86 θετικά ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα και με σωματία Hassall.⁽³¹²⁾ Με βάση τα ανωτέρω έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι τα σωματία Hassall εκκρίνουν TSLP η οποία ενεργοποιεί τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία μετά την ενεργοποίηση συμμετέχουν στη διαδικασία διαφοροποίησης ρυθμιστικών CD4⁺/CD25⁺ T- κυττάρων.^(311, 312)

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε τη σχέση μεταξύ ανοσοφαινοτυπικού προτύπου του κυτταρικού κύκλου⁽³¹³⁾ και θυμικής επιθηλιακής διαφοροποίησης. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 ήταν χαμηλή στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και μη ανιχνεύσιμη στα σωματία Hassall ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21, p27 και p16 σε ικανό αριθμό επιθηλιακών κυττάρων και κυρίως στα σωματία Hassall. Επειδή τα σωματία Hassall αποτελούν δομές τελικής επιθηλιακής διαφοροποίησης,^(παρούσα εργασία, 314) τα παρόντα ευρήματα δείχνουν σαφή μείωση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε κυτταρικό κύκλο (και πλήρη απουσία επιθηλιακών κυττάρων σε κυτταρικό κύκλο στα σωματία Hassall) όταν η διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξελίσσεται προς τα τελικά στάδια. Επιπλέον τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p21 στα σωματία Hassall είναι συμβατά με το ρόλο του p21 στη διαδικασία τελικής κυτταρικής διαφοροποίησης.⁽³¹⁵⁾ Επιπρόσθετα τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p16 στα σωματία Hassall, τα οποία αποτελούν δομές όπου παρατηρείται κυτταρική γήρανση,⁽³¹⁴⁾ είναι συμβατά με το ρόλο του p16 στην διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης.^(316, 317)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε με ανοσοϊστοχημεία την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυττάρων του θύμου αδένος στον άνθρωπο που εκφράζουν σημαντικούς νευρικούς και νευροενδοκρινείς δείκτες και τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νευρών (NGF) σε συνδυασμό με την έκφραση κερατινών (που εκφράζονται από επιθηλιακά κύτταρα), πρωτεϊνών που εκφράζονται από δενδριτικά κύτταρα (S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c) και πρωτεϊνών που εκφράζονται από μακροφάγα (CD68, CD163). Επιπλέον, επειδή ορισμένοι ισότυποι της β-τουμπουλίνης εκφράζονται κυρίως σε νευρικά κύτταρα, αναλύσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυττάρων του θύμου που εκφράζουν β-τουμπουλίνη II, III και IV. Επίσης μελετήσαμε συγκριτικά τα πρότυπα έκφρασης κερατινών, πρωτεϊνών χαρακτηριστικών των δενδριτικών κυττάρων και των ιστύπων της β-τουμπουλίνης.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) εξέφρασαν πρωτεΐνη PGP 9.5 (PGP 9.5), χρωμογρανίνη-A (CHRA), συναπτοφυσίνη (SYN), νευροειδική ενολάση (NSE), τυροσινική υδροξυλάση (TH), CD56, CD57, νευροινίδια (NF) (140-160 kDa), τους υποδοχείς του NGF (TrKA και p75), τους ισότυπους της β-τουμπουλίνης II και IV και τις κυτοκερατίνες 7, 8, 10, 13, 14, 18 και 19. Η πρωτεΐνη PGP 9.5 εκφράσθηκε κυρίως στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού ενώ οι πρωτεΐνες συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη, νευροειδική ενολάση, τυροσινική υδροξυλάση, CD56 και νευροινίδια 140-160 kDa εκφράσθηκαν κυρίως στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του μυελού και στα σωμάτια Hassall. Τα παρόντα αποτελέσματα παρέχουν επιπλέον ανοσοϊστολογικές αποδείξεις ότι οι νευρικοί και νευροενδοκρινείς παράγοντες είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη και λειτουργία του μικροπεριβάλλοντος του ανθρώπινου θύμου.

Κερατίνη 19 ανιχνεύθηκε σε όλους τους υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Κερατίνες 7, 8, 13, 14, 16, 17 και 18 ανιχνεύθηκαν σε ποικίλους υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, ενώ κερατίνες 1, 10 και 4 ανιχνεύθηκαν μόνο στα σωμάτια Hassall. Κερατίνη 20 δεν ανιχνεύθηκε στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

Σε όλους τους υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκαν ποικίλα επίπεδα έκφρασης από β-τουμπουλίνη II και IV ενώ η β-τουμπουλίνη III ήταν μη ανιχνεύσιμη στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα

υποκαψικά και φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης β-τουμπουλίνης IV σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του μυελού και στα σωματία Hassall.

Η διαφορετική ανοσοτοπογραφική κατανομή και τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των νευρικών/νευροενδοκρινών δεικτών, των υποδοχέων του NGF TrKA και p75, των κυτοκερατινών καθώς και των ισοτύπων της β-τουμπουλίνης II και IV στους διακριτούς υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων μπορεί να αντανάκλα διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες και/ή τα διαφορετικά τους στάδια διαφοροποίησης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ποικίλες νευρικές/νευροενδοκρινικές πρωτεΐνες έδειξαν ισχυρή έκφραση σε ένα μικρό κλάσμα των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (ποσοστό από 1 έως 10%). Το δυνητικό πλεονέκτημα της περιορισμένης παρουσίας ενός συγκεκριμένου ειδικού ιστικού αντιγόνου το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται σε άλλους ιστούς σε μερικά μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να υποδεικνύει πως ένας υψηλότερος συνολικός αριθμός από διαφορετικά αντιγόνα μπορεί να είναι παρόντα και ταυτόχρονα θα μπορούσε να σημαίνει πως μια υψηλή πυκνότητα ενός συγκεκριμένου επιτόπου μπορεί να εμφανίζεται σε μονήρες κυτταρικό επίπεδο, γεγονός το οποίο είναι μια κριτική παράμετρος στην μεταγωγή σήματος διαμέσου T-κυτταρικού υποδοχέα (TCR) (ανοχή).

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε επιπλέον την ανοσοτοπογραφική κατανομή των δενδριτικών κυττάρων σε σχέση με τις επιθηλιακές δομές. Δενδριτικά κύτταρα θετικά για CD123 παρατηρήθηκαν στη μυελική μοίρα αλλά όχι εντός των σωματιών Hassall. Δενδριτικά κύτταρα θετικά για S100, CD1a, CD207 και CD11c παρατηρήθηκαν στη μυελική μοίρα και, σπανιότερα μέσα στα ενεργά σωματία Hassall θύμων από νεογέννητα και παιδιά. Δεν παρατηρήθηκαν κύτταρα θετικά για S100, CD1a, CD207 και CD11c σε μη-ενεργά σωματία Hassall θύμων από ενήλικες με αλλοιώσεις υποσιτροφής. Η ανοσοεντόπιση δενδριτικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στις επιθηλιακές δομές ενεργών σωματιών Hassall θύμων από νεογέννητα και παιδιά υποδηλώνει σημαντικό ρόλο των σωματιών Hassall στη συνεργασία επιθηλιακών και δενδριτικών κυττάρων στη διαδικασία της T-κυτταρικής διαφοροποίησης. Η απουσία S100, CD1a, CD207 και CD11c θετικών κυττάρων στα μη-ενεργά σωματία Hassall θύμων ενηλίκων με ιστολογικές αλλοιώσεις υποσιτροφής σχετίζεται με τη θυμική υποσιτροφή.

Στην παρούσα εργασία αναλύσαμε τη σχέση μεταξύ κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίησης των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Παρατηρήσαμε ότι η

έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 ήταν χαμηλή στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και μη ανιχνεύσιμη στα σωματία Hassall ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτημένων κινασών p21, p27 και p16 σε ικανό αριθμό θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και ιδιαίτερος στα σωματία Hassall. Επειδή τα σωματία Hassall αντιπροσωπεύουν επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης, τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν σαφή μείωση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε κύκλο όταν η διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξελίσσεται προς τα τελικά στάδια. Στην παρούσα μελέτη επίσης αναλύσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης PGP9.5 και των υποδοχέων του NGF, TrKA και p75 σε συνδυασμό με την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67, διότι η πρωτεΐνη PGP9.5 και οι υποδοχείς του NGF βρέθηκαν να συσχετίζονται με τη φάση του κυτταρικού κύκλου σε διάφορους τύπους κυττάρων. Δεν κατορθώσαμε να δείξουμε παράλληλη έκφραση ανάμεσα στη πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου Ki67 και την πρωτεΐνη PGP9.5 ή τους υποδοχείς TrKA και P75.

Πραγματοποιήθηκε επίσης σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης με την έκφραση των κερατινών. Συγκεκριμένα, σε διαδοχικές τομές πραγματοποιήθηκε σύγκριση των προτύπων ανοσοτοπογραφικής κατανομής των κερατινών 1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17 και 19 με τα πρότυπα ανοσοτοπογραφικής κατανομής των πρωτεϊνών χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, CD57, CD56, και NF (νευροινίδια) 140-160kDa. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε στα σωματία Hassall όπου είναι δυνατή αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση για να διαπιστωθεί αν τα ίδια κύτταρα συνεκφράζουν μια συγκεκριμένη κερατίνη με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Το συμπέρασμα ήταν ότι δεν παρατηρήθηκε ειδική συσχέτιση ανοσοτοπογραφικών προτύπων κυτταρικής συνέκφρασης κερατινών με πρωτεΐνες νευρικής / νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Τα ανωτέρω ευρήματα δείχνουν ότι, ενώ παρατηρήθηκε επιλεκτική ανοσοτοπογραφική κατανομή θυμικών επιθηλιακών κυττάρων τα οποία εκφράζουν πρωτεΐνες νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης στους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (PGP 9.5 στα φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, νευροινίδια 140-160kDa, νευροειδική ενολάση, CD56 στα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και στα σωματία Hassall) και επιλεκτική ανοσοτοπογραφική κατανομή θυμικών κυττάρων τα οποία εκφράζουν δείκτες επιθηλιακών κυττάρων και δείκτες δενδριτικών κυττάρων δεν παρατηρήθηκε επιλεκτική ανοσοτοπογραφική κατανομή

των πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης σε σχέση με συγκεκριμένους υπότυπους κερατινών.

Με βάση τα ανωτέρω καταλήγουμε συνοπτικά στα εξής συμπεράσματα:

- Τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν πρωτεΐνες νευρικής / νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης [χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, τυροσινική υδροξυλάση, NF (νευροινίδια) 140-160kDa, CD57, και CD56]. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης σε κύτταρα που εκφράζουν δείκτες δικτυωτών κυττάρων (CD1a, CD207, CD123, CD11c,) και μακροφάγων/ιστιοκυττάρων (CD68 και CD163).
- Στο πληθυσμό των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων κυρίως τα μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και τα σωματίδια Hassal εκφράζουν πρωτεΐνες νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης.
- Η έκφραση των πρωτεϊνών νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης είναι υψηλότερη στα νεανικού τύπου και στα ανώριμα σωματίδια Hassal σε σχέση με τα ώριμα και τα εκφυλισμένα σωματίδια Hassal.
- Τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν δείκτες γλοιακής, λεμφικής και μακροφαγικής διαφοροποίησης, αλλά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα στο μυελό και στα σωματίδια Hassal εκφράζουν δεσμίνη (δείκτης μυϊκής διαφοροποίησης λειών και γραμμωτών μυϊκών ινών εκτός των λειών μυϊκών ινών των αγγείων) και επιπλέον, κάποια θυμικά επιθηλιακά κύτταρα στο μυελό εκφράζουν S100. Ικανός αριθμός φλοιικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εκφράζει CD205 που εκφράζεται επίσης από δενδριτικά κύτταρα
- Η ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυτταροκερατινών παρουσιάζει διαφορές στους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Οι κερατίνες 1, 4 και 10 εκφράζονται μόνο στα σωματίδια Hassall που αποτελούν επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συνέκφραση ενός τόσο ευρέως φάσματος κερατινών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα δεν παρατηρείται σε άλλα φυσιολογικά μη-εμβρυικά ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.
- Τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών ευοδωτικών του κυτταρικού κύκλου Ki67 και ικανά ως υψηλά επίπεδα έκφρασης αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21, p27

και p16, οι οποίοι παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή έκφραση στα σωματίδια Hassall.

- Επειδή κάποια επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν δείκτες δικτυωτών κυττάρων αναλύσαμε συγκριτικά την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυττάρων που εκφράζουν δείκτες δικτυωτών κυττάρων (S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c) και μακροφάγων/ιστιοκυττάρων (CD68 και CD163). Παρατηρήθηκε συνέκφραση S100/CD1a, S100/CD207 και CD1a/CD207. Τα κύτταρα με αυτό τον ανοσοφαινότυπο αντιπροσωπεύουν διαφοροποίηση Langerhans δενδριτικών κυττάρων (S100+/CD1a+, CD207+). Δεν παρατηρήθηκε συνέκφραση CD123/CD1a, CD123/CD207, CD123/CD163 και CD123/CD11c. Τα CD123 θετικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα και είναι διαφορετικός πληθυσμός από τα Langerhans δενδριτικά κύτταρα (CD1a+/CD207+) και μακροφάγα / ιστιοκύτταρα (CD163+) και τα CD11c θετικά δενδριτικά κύτταρα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Συνεχώς αυξάνουν τα δεδομένα που υποδεικνύουν ότι τα βιολογικά δίκτυα αλληλεπίδρασης νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος παίζουν βασικούς ρόλους στην ιστοφυσιολογία και παθολογία του θύμου αδένου. Σημαντικό ρολό σε αυτά τα βιολογικά δίκτυα παίζουν τα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα των οποίων το πρότυπο διαφοροποίησης (το πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης) χρήζει περαιτέρω μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν λίγες ανοσοϊστολογικές μελέτες για το πρότυπο διαφοροποίησης (το πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης) των ανθρώπινων θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε τομές παραφίνης (οι οποίες επιτρέπουν ακριβή ανοσοϊστολογική ανάλυση).

Ειδικότερα, δεν έχει πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική μελέτη με ανοσοϊστοχημεία σε διαδοχικές τομές και με διπλή ανοσοϊστοχημεία σε ιστολογικές τομές παραφίνης ανθρώπινου θύμου (που επιτρέπουν αξιόπιστη μορφολογική ανάλυση): α) της ανοσοτοπογραφικής κατανομής θυμικών κυττάρων που εκφράζουν νευρικούς/νευροενδοκρινείς δείκτες σε συνδυασμό με την έκφραση δεικτών επιθηλιακών κυττάρων, δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων και λεμφοκυττάρων, β) της ανοσοτοπογραφικής κατανομής θυμικών κυττάρων που εκφράζουν τους ισότυπους β-τουμπουλίνης, γ) της ανοσοτοπογραφικής κατανομής θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τη κατανομή δενδριτικών κυττάρων. (Αυτή η πληροφορία είναι σημαντική για την ιστοφυσιολογία του θύμου διότι μια κοινή λειτουργία θυμικών επιθηλιακών και δενδριτικών κυττάρων είναι η πρόσληψη, επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου) και δ) του πρότυπου έκφρασης του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με τους υποτύπους και τη διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (υποκαψικά, φλοιικά, μυελικά, σωματίδια Hassall).

Συνοπτικά οι σκοποί της παρούσας μελέτης ήταν

- A. Η ταυτοποίηση των ανθρώπινων θυμικών κυττάρων (επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα) τα οποία εκφράζουν νευρικούς / νευροενδοκρινείς δείκτες και τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) TrKA και p75,

- B. Η ταυτοποίηση των ανθρώπινων θυμικών κυττάρων (επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα) τα οποία εκφράζουν ισοτύπους της β-τουμπουλίνης II, III και IV,
- Γ) Η ανάλυση της ανοσοτοπογραφικής κατανομής θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε σύγκριση με τη ανοσοτοπογραφική κατανομή θυμικών δενδριτικών κυττάρων,
- Δ) Η περιγραφή του προτύπου έκφρασης του κυτταρικού κύκλου σε σχέση με τη διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (υποκαψικά, φλοιικά, μυελικά, σωματία Hassall),
- Ε) Να περιγράψει ανοσοτοπογραφικές μεταβολές σε συνάρτηση με την ηλικία.

Κατά συνέπεια, αναλύσαμε με ανοσοϊστοχημεία την κατανομή των κυττάρων του ανθρώπινου θύμου αδένου που εκφράζουν νευρικούς/νευροενδοκρινείς δείκτες και τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) σε συνδυασμό με την έκφραση κυτοκερατινών, την έκφραση πρωτεϊνών που εκφράζονται από δενδριτικά κύτταρα (S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c) και πρωτεϊνών που εκφράζονται από μακροφάγα (CD68, CD163). Ο στόχος αυτής της συνδυασμένης ανοσοϊστοχημικής μελέτης ήταν η ακριβής αναγνώριση και ταυτοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν τους δείκτες νευρικής/νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Επιπλέον, επειδή ορισμένοι ισοτύποι της β-τουμπουλίνης εκφράζονται κυρίως σε νευρικά κύτταρα, αναλύσαμε την ανοσοτοπογραφική κατανομή των κυττάρων του θύμου που εκφράζουν β-τουμπουλίνη II, III και IV.

Τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) εξέφρασαν πρωτεΐνη PGP 9.5 (PGP 9.5), χρωμογρανίνη-A (CHRA), συναπτοφυσίνη (SYN), νευροειδική ενολάση (NSE), τυροσίνη υδροξυλάση (TH), CD56, CD 57, νευροινίδια (NF) (140-160 kDa), τους υποδοχείς του NGF (TrKA και p75), τους ισοτύπους της β-τουμπουλίνης II και IV και τις κυτοκερατίνες 1, 4, 7, 8, 10, 13, 14, 18 και 19. Η πρωτεΐνη PGP 9.5 εκφράσθηκε κυρίως στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού ενώ οι πρωτεΐνες συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη, νευροειδική ενολάση, τυροσινική υδροξυλάση, CD56 και νευροινίδια NF 140-160 kDa εκφράσθηκαν κυρίως στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του μυελού και στα σωματία Hassall. Κερατίνη 19 ανιχνεύθηκε σε όλους τους υπότυπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Κερατίνες 7, 8, 13, 14, 16, 17 και 18 ανιχνεύθηκαν σε ποικίλους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων, ενώ κερατίνες 1, 10 και 4 ανιχνεύθηκαν μόνο στα

σωμάτια Hassall. Τέλος κερατίνη 20 δεν ανιχνεύθηκε στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα.

Σε όλους τους υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων παρατηρήθηκαν ποικίλα επίπεδα έκφρασης από β-τουμπουλίνη II και IV ενώ η β-τουμπουλίνη III ήταν μη ανιχνεύσιμη στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα. Τα υποκαψικά και φλοιικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης β-τουμπουλίνης IV και χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης β-τουμπουλίνης II σε σύγκριση με αυτά που παρατηρήθηκαν στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του μυελού και στα σωμάτια Hassall. Η διαφορετική ανοσοτοπογραφική κατανομή και τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των νευρικών και νευροενδοκρινών δεικτών, των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF), TrKA και p75, των ισοτύπων της β-τουμπουλίνης II και IV και των διαφόρων κερατινών στους διακριτούς υποτύπους των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων μπορεί να αντανάκλα διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες και/ή τα διαφορετικά τους στάδια διαφοροποίησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ποικίλες νευρικές και νευροενδοκρινικές πρωτεΐνες έδειξαν ισχυρή έκφραση σε ένα μικρό κλάσμα των μυελικών θυμικών επιθηλιακών κυττάρων (ποσοστό από 1 έως 10%). Το δυνητικό πλεονέκτημα της περιορισμένης παρουσίας ενός συγκεκριμένου ειδικού ιστικού αντιγόνου το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται σε άλλους ιστούς σε μερικά μυελικά θυμικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να υποδεικνύει πως ένας υψηλότερος συνολικός αριθμός από διαφορετικά αντιγόνα μπορεί να είναι παρόντα και ταυτόχρονα θα μπορούσε να σημαίνει πως μια υψηλή πυκνότητα ενός συγκεκριμένου επιτόπου μπορεί να εμφανίζεται σε μονήρες κυτταρικό επίπεδο, γεγονός το οποίο είναι μια κριτική παράμετρος στην μεταγωγή σήματος διαμέσου T-κυτταρικού υποδοχέα (TCR) (ανοχή).

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε επιπλέον την ανοσοτοπογραφική κατανομή των δενδριτικών κυττάρων σε σχέση με τις επιθηλιακές δομές. Δενδριτικά κύτταρα θετικά για CD123 παρατηρήθηκαν στη μυελική μοίρα αλλά όχι εντός των σωματίων Hassall. Δενδριτικά κύτταρα θετικά για S100, CD1a, CD207 και CD11c παρατηρήθηκαν στη μυελική μοίρα και, σπανιότερα μέσα στα ενεργά σωμάτια Hassall θύμων από νεογέννητα και παιδιά. Δεν παρατηρήθηκαν κύτταρα θετικά για S100, CD1a, CD207 και CD11c σε μη-ενεργά σωμάτια Hassall θύμων από ενήλικες με αλλοιώσεις υποστροφής. Η ανοσοεντόπιση δενδριτικών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στις επιθηλιακές δομές ενεργών σωματίων Hassall θύμων από νεογέννητα και παιδιά υποδηλώνει σημαντικό ρόλο των σωματίων Hassall στη συνεργασία επιθηλιακών και δενδριτικών κυττάρων στη διαδικασία της T-κυτταρικής διαφοροποίησης. Η απουσία S100, CD1a, CD207 και

CD11c θετικών κυττάρων στα μη-ενεργά σωματία Hassall θύμων ενηλίκων με ιστολογικές αλλοιώσεις υποστροφής σχετίζεται με τη θυμική υποστροφή. Τα παρόντα αποτελέσματα παρέχουν επιπλέον ανοσοϊστολογικές αποδείξεις ότι οι νευρικοί και νευροενδοκρινείς παράγοντες είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη και λειτουργία του μικροπεριβάλλοντος του ανθρώπινου θύμου.

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε τη σχέση μεταξύ κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίησης των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 ήταν χαμηλή στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα και μη ανιχνεύσιμη στα σωματία Hassall ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτημένων κινασών p21, p27 και p16 σε ικανό αριθμό θυμικών επιθηλιακών κυττάρων και ιδιαίτερος στα σωματία Hassall. Επειδή τα σωματία Hassall αντιπροσωπεύουν επιθηλιακές δομές τελικής διαφοροποίησης, τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν σαφή μείωση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε κύκλο όταν η διαφοροποίηση των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων εξελίσσεται προς τα τελικά στάδια. Στην παρούσα μελέτη επίσης αναλύσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης PGP9.5 και των υποδοχέων του νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGF), TrKA και p75 σε συνδυασμό με την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67 διότι η πρωτεΐνη PGP9.5 και οι υποδοχείς του NGF βρέθηκαν να συσχετίζονται με τη φάση του κυτταρικού κύκλου σε διάφορους τύπους κυττάρων. Δεν παρατηρήσαμε παράλληλη έκφραση ανάμεσα στην πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου Ki67, και την πρωτεΐνη PGP9.5 ή τους υποδοχείς TrKA και P75 του NGF.

SUMMARY IN ENGLISH

The thymus supports the production of self-tolerant T-cells with both competent and regulatory functions. In the process of T-cell differentiation essential role plays the thymic microenvironment which includes the so-called thymic stromal cells (epithelial cells, fibroblasts, macrophages and dendritic cells). Among thymic stromal cells, the thymic epithelial cells (TEC) have been regarded as the main drivers of thymocyte development and maturation through cell to cell contacts and the production of soluble factors (i.e., cytokines, hormones, growth factors, neurotransmitters).

The thymus is a crucial site for cross-talk between the immune and neuroendocrine system and it has been suggested that neuroimmune networks play key roles in the thymic histophysiology and pathology. Growing evidence suggests that TEC are involved in thymocyte education to neuroendocrine principles by expressing a vast repertoire of neuroendocrine-related proteins which are the source of self-antigens presented to pre T-cells by the major histocompatibility complex. This presentation could be responsible for the establishment of central tolerance to neuroendocrine functions. This concept is supported by immunohistological studies which revealed that human TEC express a wide spectrum of neural/neuroendocrine-related proteins. Despite numerous studies, there is paucity of multiparametric immunohistological information regarding the protein expression patterns of TEC in human thymus. In particular, the immunotopographical distribution of human thymic cells expressing major neural/neuroendocrine markers [protein gene product 9.5 (PGP 9.5), chromogranin A (CHRA), synaptophysin (SYN), neuronspecific enolase (NSE), tyrosine hydroxylase (TH), CD56, CD57, neurofilaments (NF)], the NGF receptors (TrKA and p75)}, markers of epithelial cells (cytokeratins), markers of dendritic cells (S100, CD1 α , CD207, CD123, CD11c, CD205), markers of macrophages (CD68, CD163) and beta-tubulin isotypes has not been systematically analyzed by paraffin-section immunohistochemistry (on serial sections and by double immunostaining), which permits accurate morphological analysis of immunostained cells in human thymuses from various ages.

Therefore, we analyzed by paraffin-section immunohistochemistry the topographical distribution of human thymic cells expressing major

neural/neuroendocrine markers and neural growth factor (NGF) receptors (TrKA and p75), in combination with the expression patterns of markers of epithelial cells (cytokeratins), markers of dendritic cells (S100, CD1a, CD207, CD123, CD11c) and markers of macrophages (CD68, CD163). Additionally, since some beta-tubulin isotypes are preferentially expressed in neuronal cells, the immunotopographical distribution of thymic cells expressing β -tubulin II, III and IV was also analyzed.

Thymic epithelial cells (TECs) expressed protein gene product 9.5 (PGP 9.5), chromogranin A (CHRA), synaptophysin (SYN), neuron-specific enolase (NSE), tyrosine hydroxylase (TH), CD56, CD57, neurofilaments (NF) (140-160 kDa), NGF receptors (TrKA and p75), β -tubulin II and IV isotypes and cytokeratin 7, 8, 10, 13, 14, 18 and 19. PGP 9.5 was preferentially expressed in cortical TEC whereas SYN, CHRA, NSE, TH, CD56 and NF 140-160 kDa were preferentially expressed in medullary TECs and Hassall corpuscles. CD57 was detected in all TEC. Cytokeratin 19 was detected in all subtypes of TEC. Cytokeratins 7, 8, 13, 14, 16, 17 and 18 were detected in various subtypes of TEC whereas cytokeratins 1, 10 and 4 were detected only in Hassall corpuscles and cytokeratin 20 was undetectable in TEC. Variable levels of expression of β -tubulin II and IV were observed in all TEC subtypes whereas β -tubulin III was undetectable in TECs. Subcapsular and cortical TECs display higher expression of β -tubulin IV and lower expression of β -tubulin II in comparison to those observed in medullary TEC and Hassall corpuscles. Vimentin was detected in all TEC and Desmin in medullary TEC and Hassall corpuscles. Smooth muscle actin, GFAP, Peripherin and Basic myelin protein were undetectable in TEC.

The diversity of the immunotopographical distribution and the expression levels of neural/ neuroendocrine markers, the NGF receptors TrKA and p75, the various keratins, desmin and vimentin and the β -tubulin II and IV isotypes in the distinct subtypes of TEC may reflect the diversity of their biological functions and/or their different stages of differentiation. In addition, the present results provide further immunohistochemical evidence that numerous neural and neuroendocrine factors are required for the function of the human thymic microenvironment. It is noteworthy that most neural and neuroendocrine proteins showed strong expression in a minor fraction of medullary TEC (less than 10%). The potential advantage of limiting presentation of a particular tissue antigen specific of other tissues to a few medullary TEC may be that a higher total number of different antigens could be presented and at the same

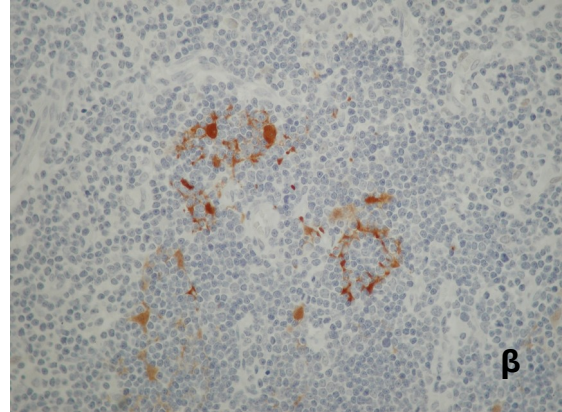
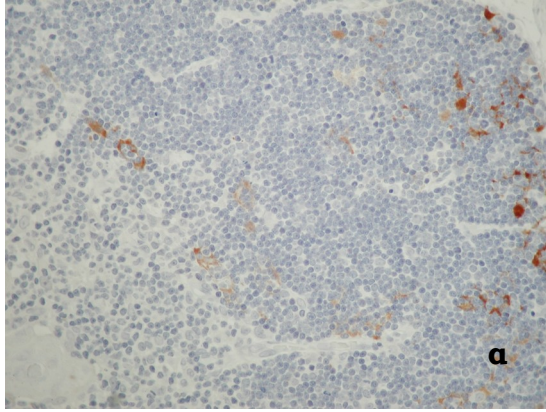
time a high density of a particular epitope can be achieved at the single cell level, a critical parameter in delivering a TCR-mediated (tolerance) signal.

In the present study we have also analyzed the immunotopography of dendritic cells in relation to the epithelial structures because an important function of both dendritic cells and thymic epithelial cells is the uptake and processing of antigen. Dendritic cells positive for S100, CD1a, CD11c, CD207 (Langerin) and CD123 were observed in the thymic medulla. Dendritic cells positive for S100, CD1a, CD207 and CD11c were also found into active (juvenile and immature types) Hassall corpuscles of thymuses from newborns and children but not into non-active (mature and senescent) Hassall corpuscles of thymuses from adults with histological evidence of thymic involution. The immunolocalization of dendritic antigen-presenting cells in juvenile and immature Hassall corpuscles in thymuses from newborns and children may reflect an important role of Hassall corpuscles in the cooperation of epithelial cells and dendritic cells in the process of T cell differentiation. The absence of S100, CD1a, CD207 and CD11c positive dendritic cells into mature and senescent Hassall corpuscles from adults may reflect the age-related thymic involution process.

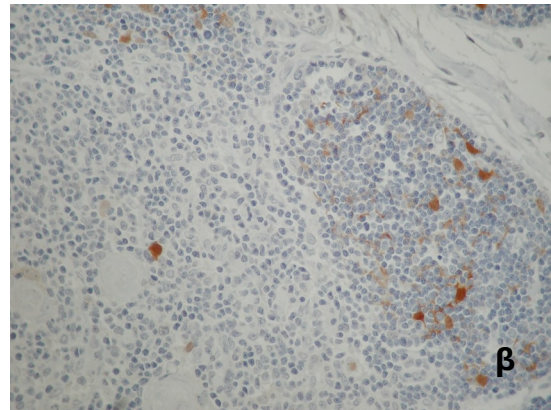
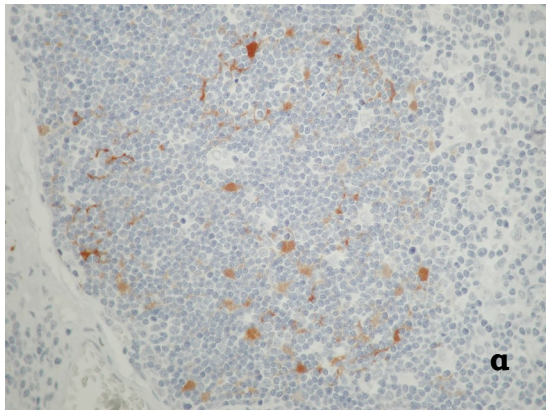
In the present study we have also analyzed the expression of PGP9.5 and NGF-receptors TrKA and p75 in relation with the expression of the cell cycle-associated protein Ki67 since PGP9.5 and NGF-receptors have been related to cell cycle status in various cell types. Parallel expression patterns between cell cycle associated protein Ki67 and PGP9.5 or TrKA and P75 were not demonstrated.

In the present study we have also analyzed the expression of cell cycle proteins Ki67, p16, p21 and p27 in relation to the differentiation of TEC. Ki67 expression was low in TEC and undetectable in Hassall corpuscles whereas the cyclin-dependent kinase inhibitors p16, p21 and p27 were expressed in a substantial proportion of TEC and mainly in Hassall corpuscles. These findings indicate that cell proliferation decreases in parallel with the differentiation of TEC towards Hassall corpuscles. The high expression of p16 in Hassall's corpuscles, which are structures with increased cellular senescence, is in keeping with the suggested role of p16 in cellular senescence. Most of Hassall's corpuscles were p21-positive, consistent with previous evidence that these structures represent end stages of maturation of thymic epithelium and that p21 protein is involved in the process of terminal differentiation.

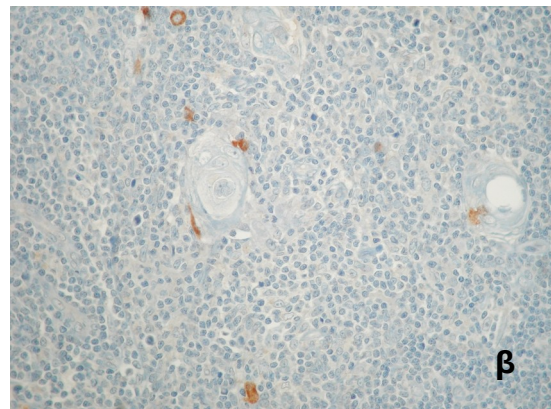
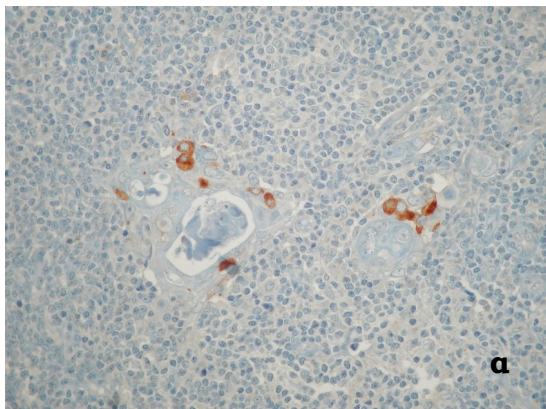
Εικόνες 1-7: Έκφραση πρωτεϊνών νευρικής και νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα



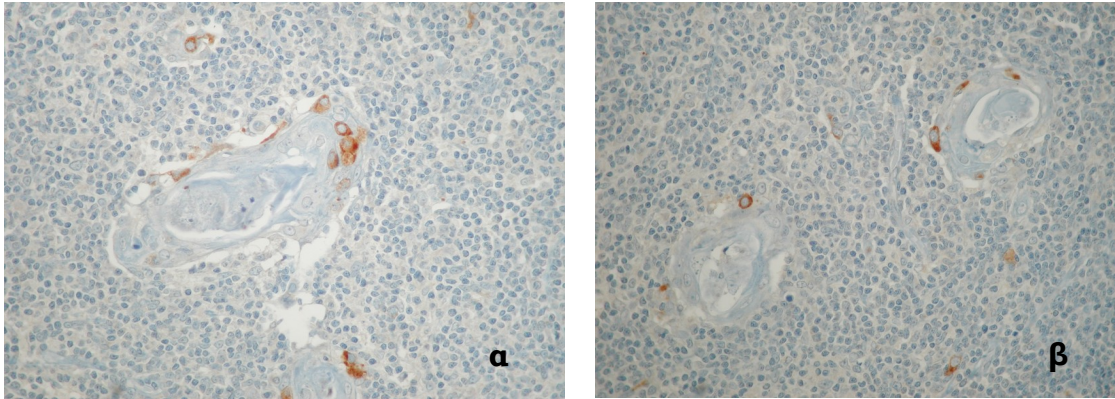
Εικόνα 1-1: Επιθηλιακά κύτταρα φλοικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για PGP 9.5 (μεγέθυνση x 250)



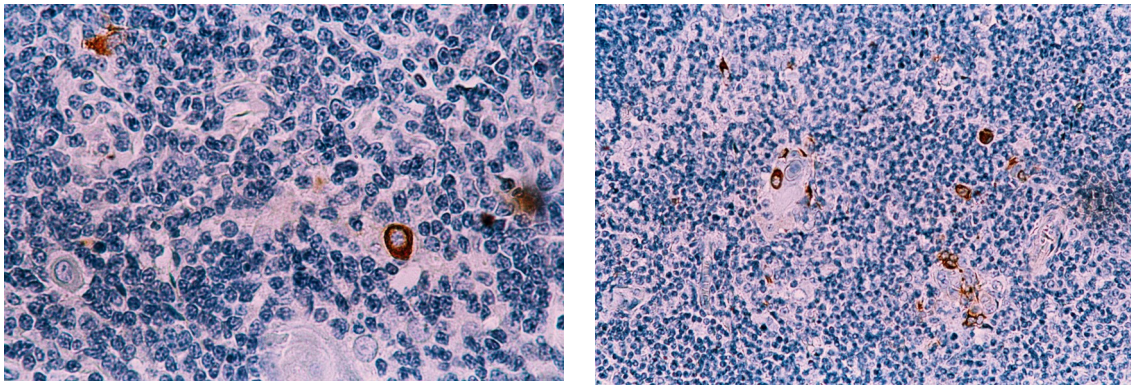
Εικόνα 1-2: Επιθηλιακά κύτταρα φλοικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για PGP 9.5 (μεγέθυνση x 250)



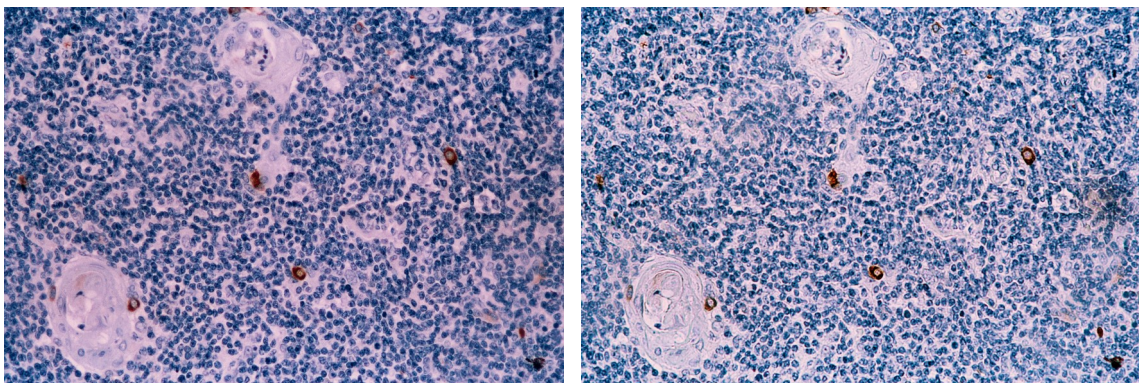
Εικόνα 2-1: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για συναπτοφυσίνη (μεγέθυνση x 400)



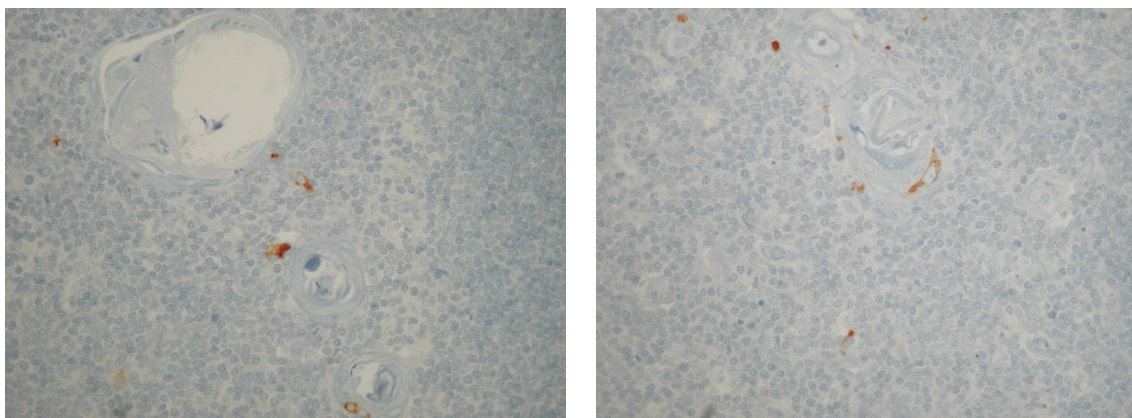
Εικόνα 2-2: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για συναπτοφουσίνη (μεγέθυνση x 400)



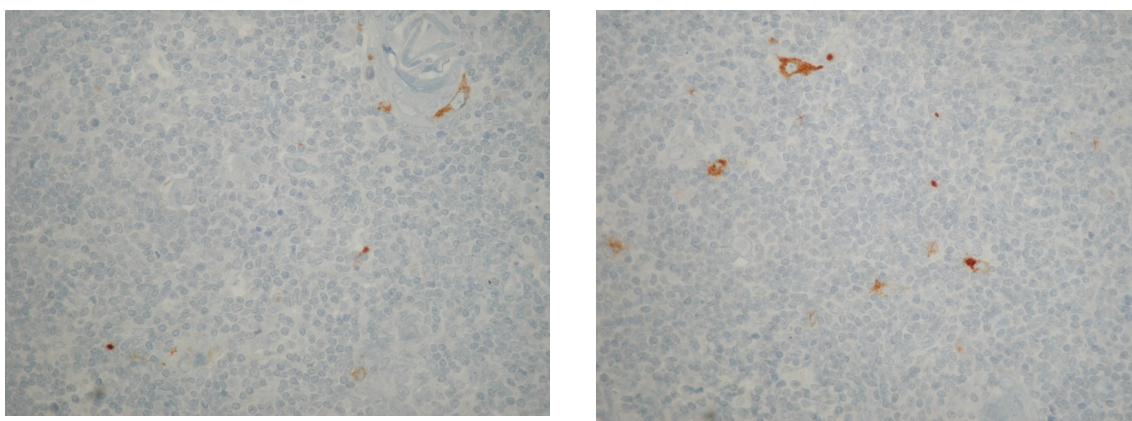
Εικόνα 3-1: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για χρωμογρανίνη Α (μεγέθυνση x 400)



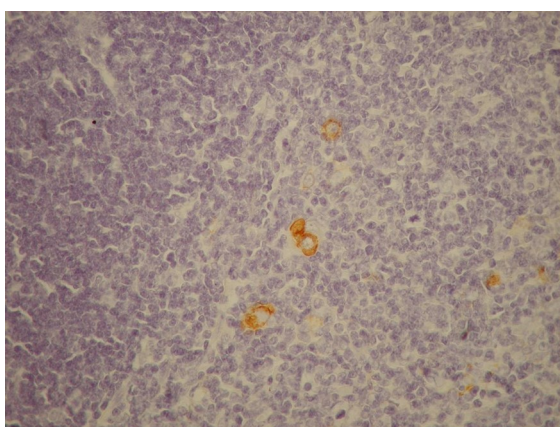
Εικόνα 3-2: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για χρωμογρανίνη Α (μεγέθυνση x 400)



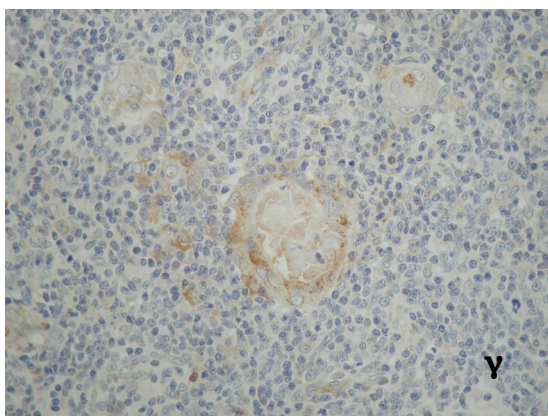
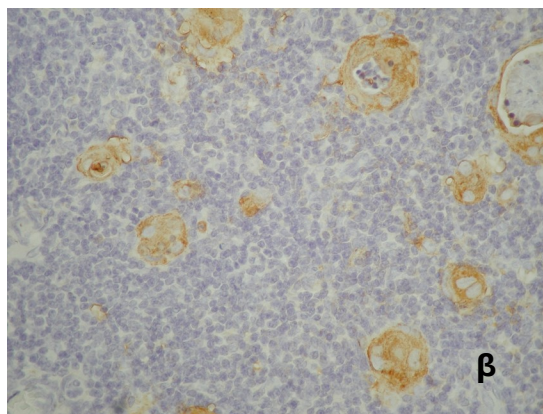
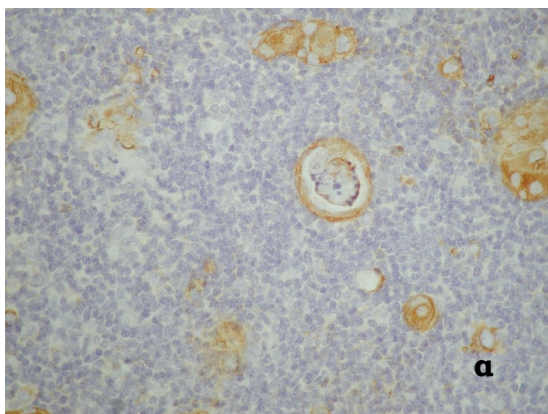
Εικόνα 4-1: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για τυροσινική υδροξυλάση (μεγέθυνση x 400)



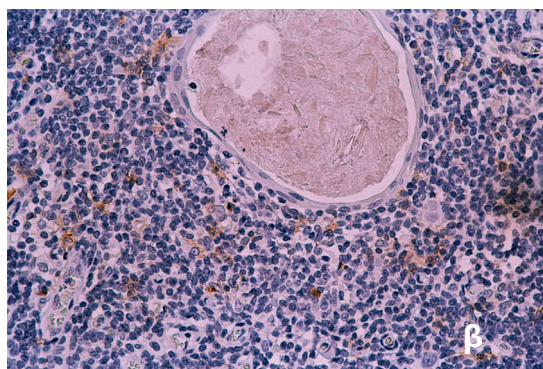
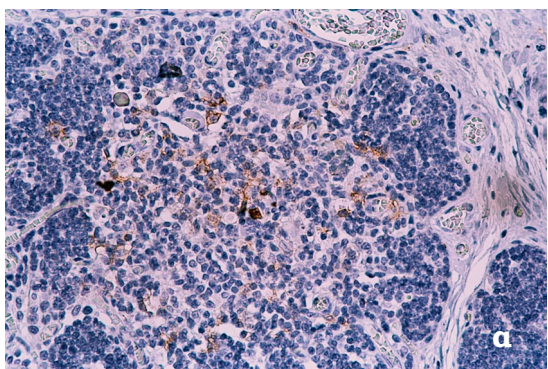
Εικόνα 4-2: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για τυροσινική υδροξυλάση (μεγέθυνση x 400)



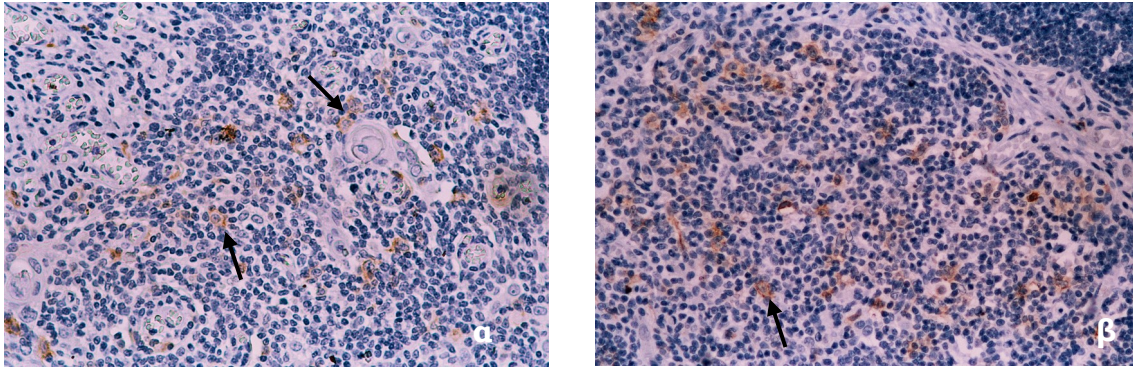
Εικόνα 5: Επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC), θετικά για νευροϊνίδια (MB 140-160 kDa) (μεγέθυνση x 400)



Εικόνα 6: Σωμάτια Hassall και επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου, θετικά για νευρο-ειδική ενολάση (NSE)
(α,β:μεγέθυνση x 250, γ: μεγέθυνση x 400)

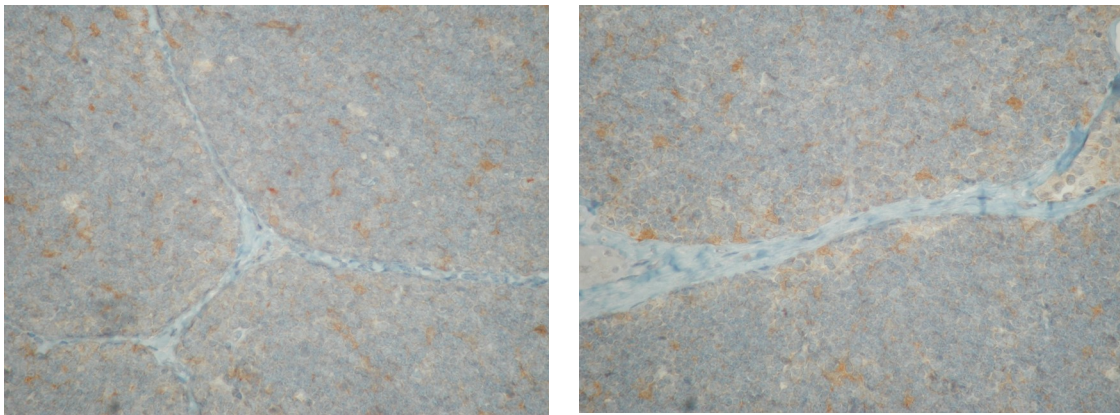


Εικόνα 7-1: Παρατηρούνται λίγα CD56 θετικά επιθηλιακά κύτταρα του θύμου στη μυελική μοίρα
(α: μεγέθυνση x 400; β: μεγέθυνση x 250)

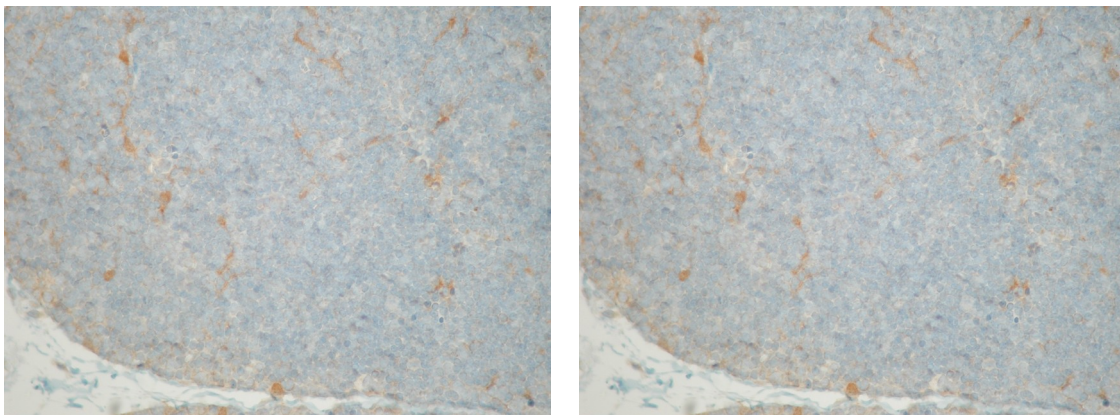


Εικόνα 7-2: Παρατηρούνται λίγα CD 56 θετικά επιθηλιακά κύτταρα του θύμου στη μυελική μοίρα (α: μεγέθυνση x 250; β: μεγέθυνση x 400)

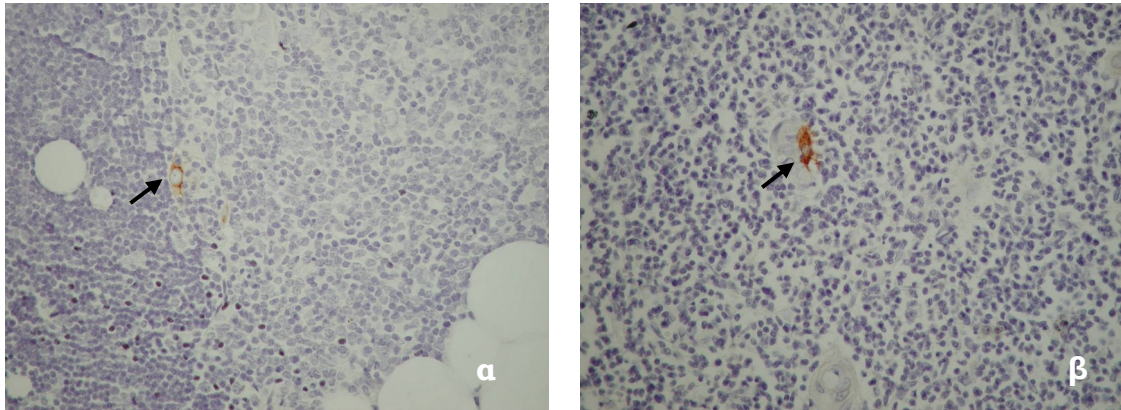
Εικόνες 8, 9: Έκφραση των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα νεύρων (NGF) στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα



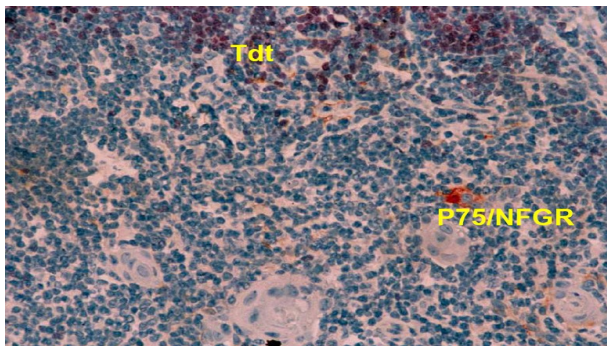
Εικόνα 8-1: Επιθηλιακά υποκαψικά κύτταρα του θύμου (TEC) και επιθηλιακά κύτταρα φλοιικής μοίρας του θύμου (TEC) θετικά για τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα αυξητικού παράγοντα νεύρων Trk-A (μεγέθυνση x 250)



Εικόνα 8-2: Επιθηλιακά υποκαψικά κύτταρα του θύμου (TEC) και επιθηλιακά κύτταρα φλοιικής μοίρας του θύμου (TEC) θετικά για τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα αυξητικού παράγοντα νεύρων Trk-A (μεγέθυνση x 250)

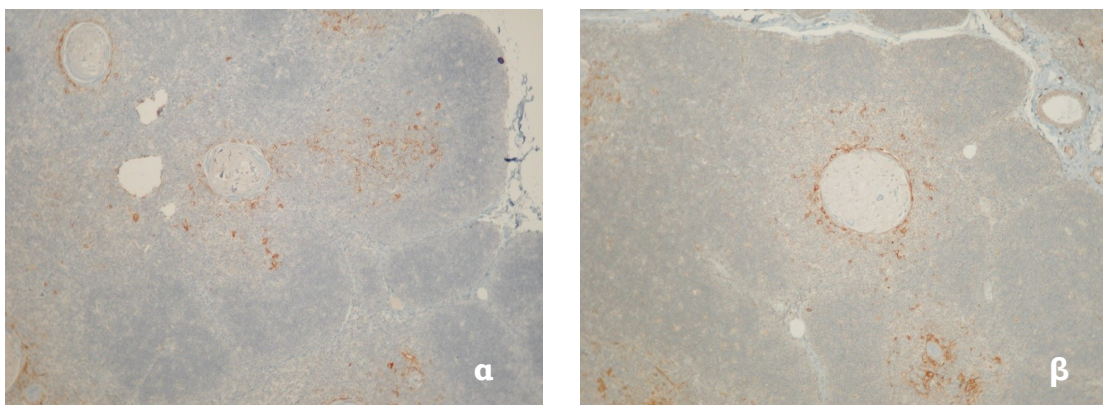


Εικόνα 9-1: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC), μυελικής μοίρας θετικά για τον χαμηλής συγγένειας υποδοχέα αυξητικού παράγοντα νεύρων p 75 / NGF (α:μεγέθυνση x 250 και β:μεγέθυνση x 400)

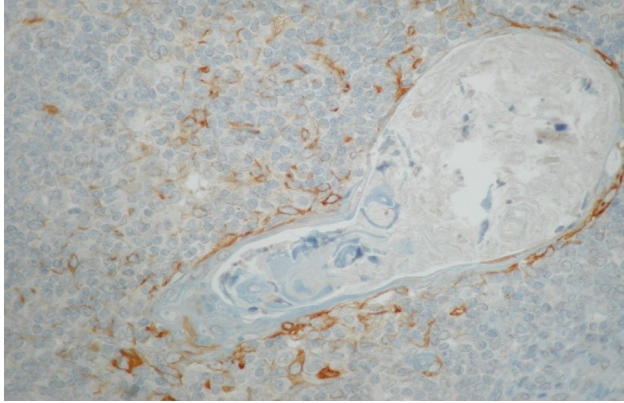


Εικόνα 9-2: Επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας θετικά για p75/NGF και παρουσία TdT θετικών λεμφικών κυττάρων (μεγέθυνση x400)

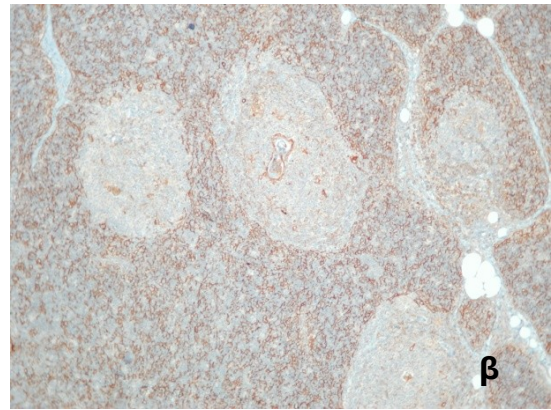
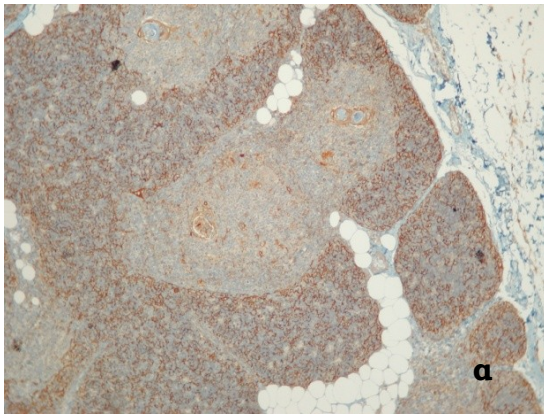
Εικόνες 10,11: Έκφραση των ισotyπων β-τουμπουλίνης στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα



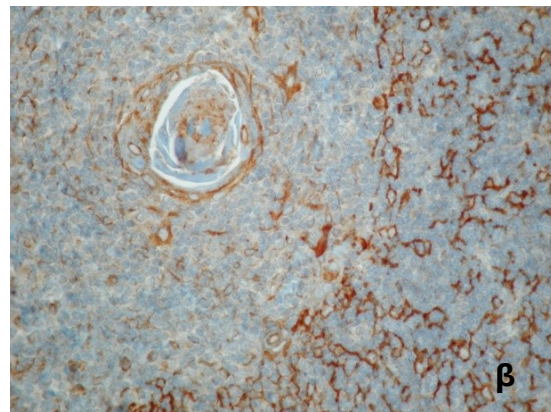
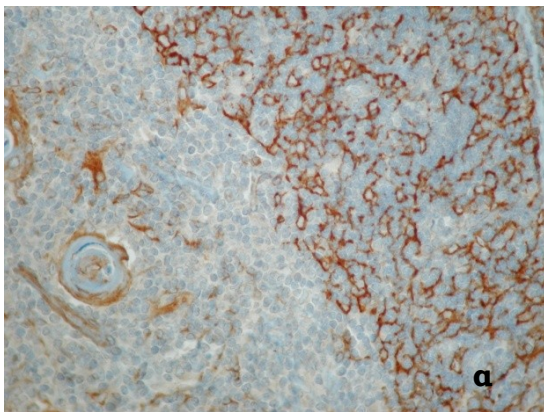
Εικόνα 10-1: Επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC) και σωματίων Hassall θετικά για β-τουμπουλίνη II (α: μεγέθυνση x 250, β: μεγέθυνση x 250)



Εικόνα 10-2: Επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας του θύμου (TEC) και σωματίων Hassall θετικά για β-τουμπουλίνη II (μεγέθυνση x 400)

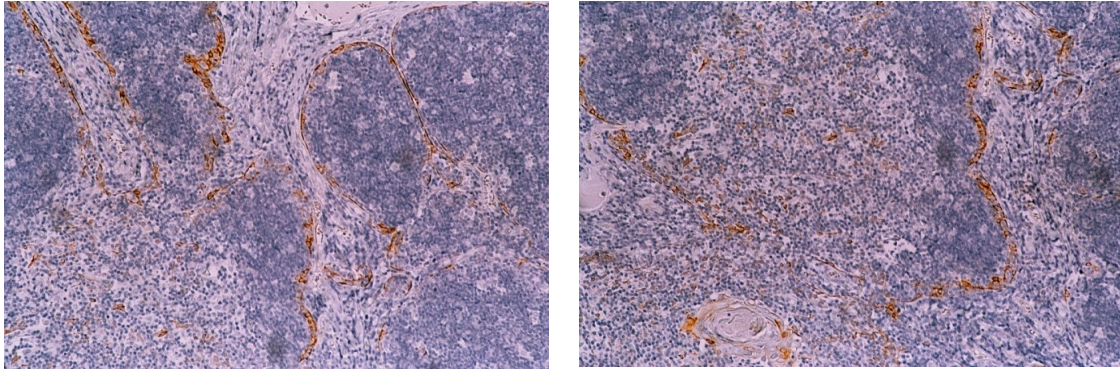


Εικόνα 11-1: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) φλοιικής μοίρας, μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για β-τουμπουλίνη IV (α: μεγέθυνση x 100, β: μεγέθυνση x 250)

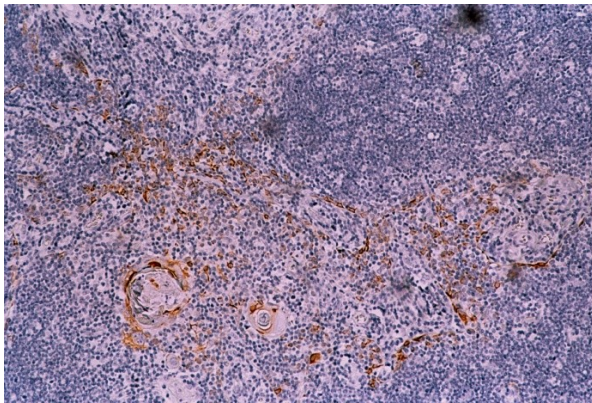


Εικόνα 11-2: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) φλοιικής μοίρας, μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για β-τουμπουλίνη IV (α: μεγέθυνση x 400, β: μεγέθυνση x 400)

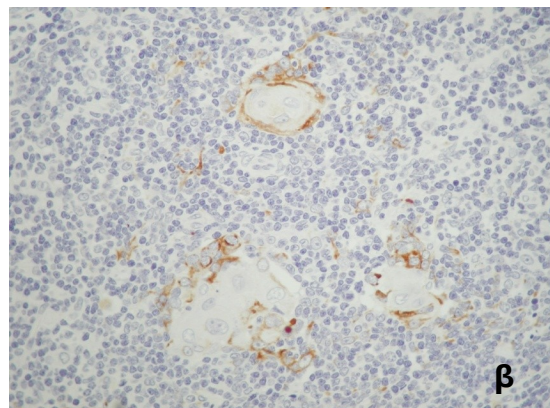
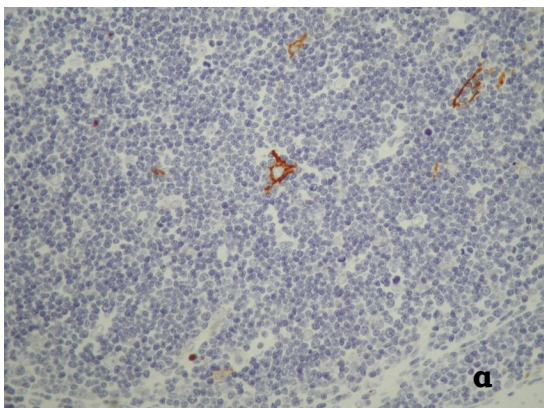
Εικόνες 12-17: Έκφραση κυτοκερατινών στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα



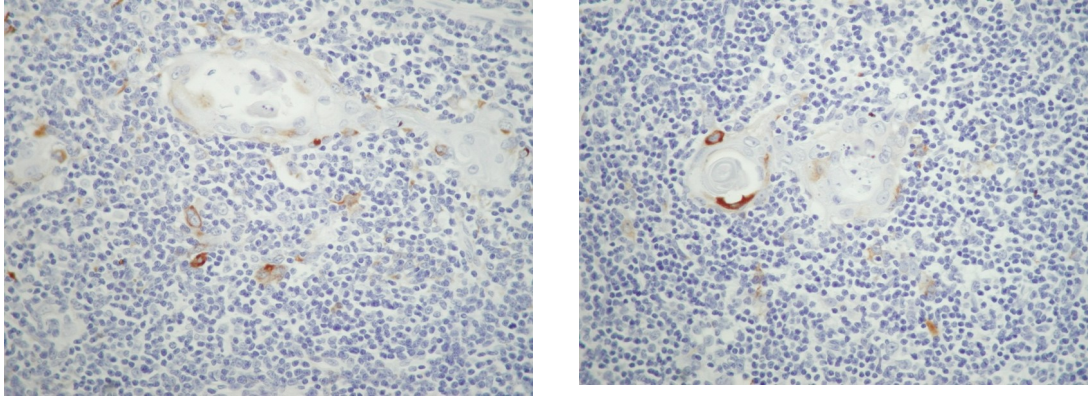
Εικόνα 12-1: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) υποκαψικά, μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για κυτταροκερατίνη 7 (μεγέθυνση x 250)



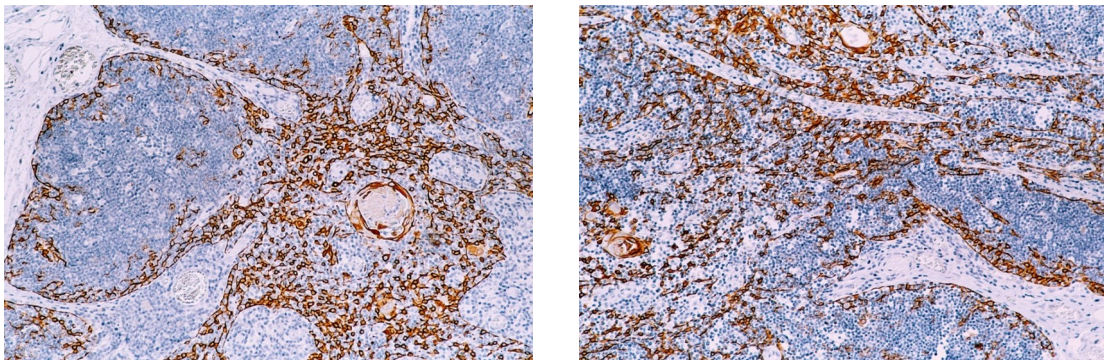
Εικόνα 12-2: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) υποκαψικά, μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για κυτταροκερατίνη 7 (μεγέθυνση x 250)



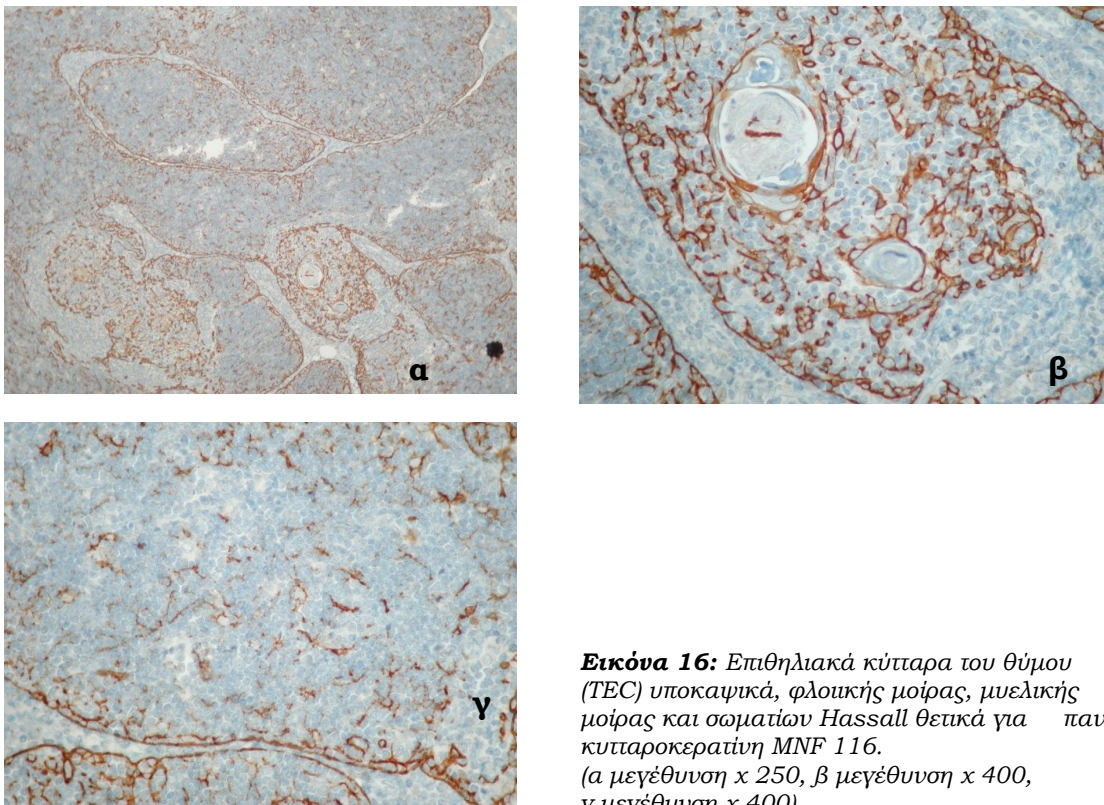
Εικόνα 13: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για κυτταροκερατίνη 8. (α μεγέθυνση x 250, β μεγέθυνση x 400)



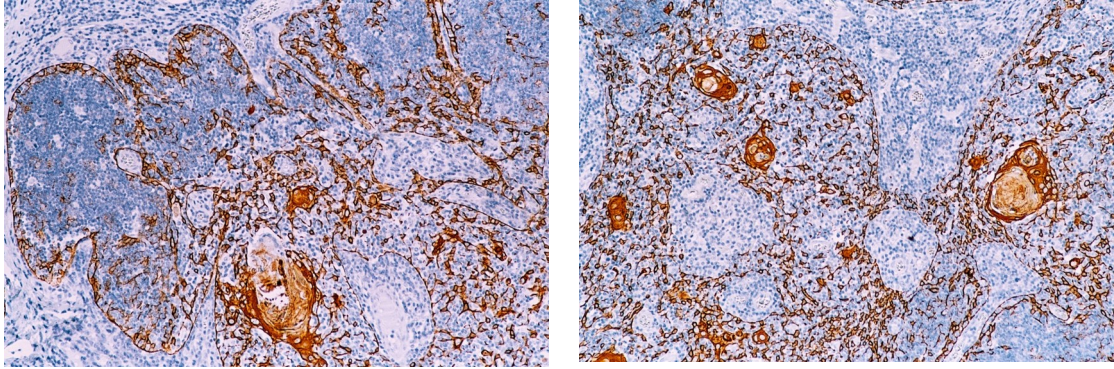
Εικόνα 14: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για κυτταροκερατίνη 13 (μεγέθυνση x 400)



Εικόνα 15: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) υποκαψικά, φλοιικής μοίρας, μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για κυτταροκερατίνη 19 (μεγέθυνση x 250)

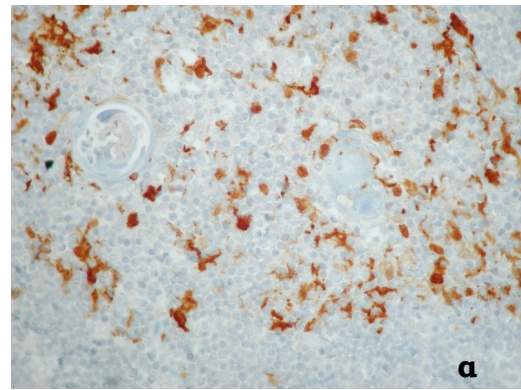
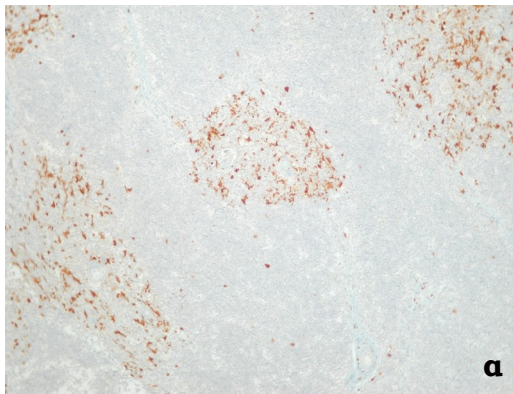


Εικόνα 16: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) υποκαψικά, φλοιικής μοίρας, μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για παν-κυτταροκερατίνη MNF 116. (α μεγέθυνση x 250, β μεγέθυνση x 400, γ μεγέθυνση x 400)

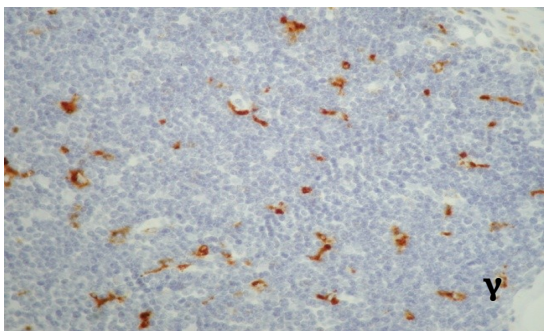
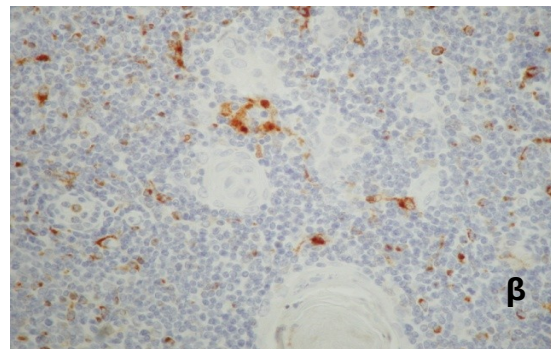
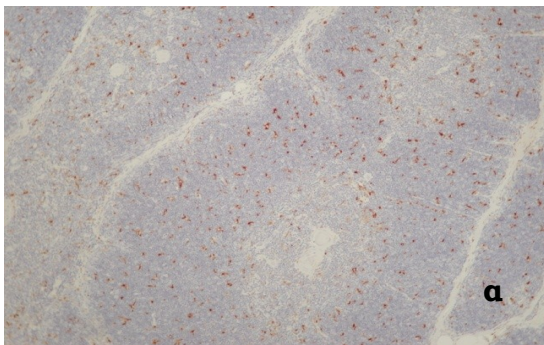


Εικόνα 17: Επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (TEC) υποκαψικά, φλοικής μοίρας μυελικής μοίρας και σωματίων Hassall θετικά για πανκυταροκερατίνη AE1 AE3 (μεγέθυνση x 250)

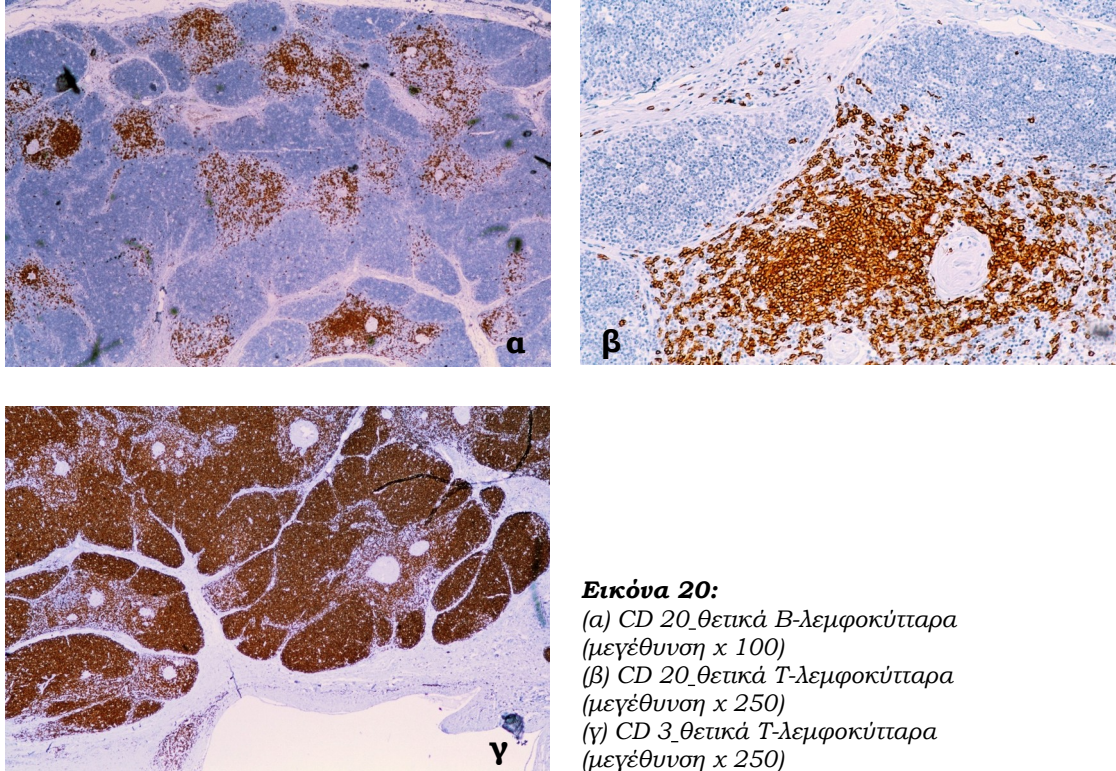
Εικόνες 18-20: Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις S-100, CD68, CD20,CD3



Εικόνα 18: Δενδριτικά κύτταρα σωματίων Hassall και μυελικής μοίρας θετικά για πρωτεΐνη S 100. (α μεγέθυνση x 250, β μεγέθυνση x 400)



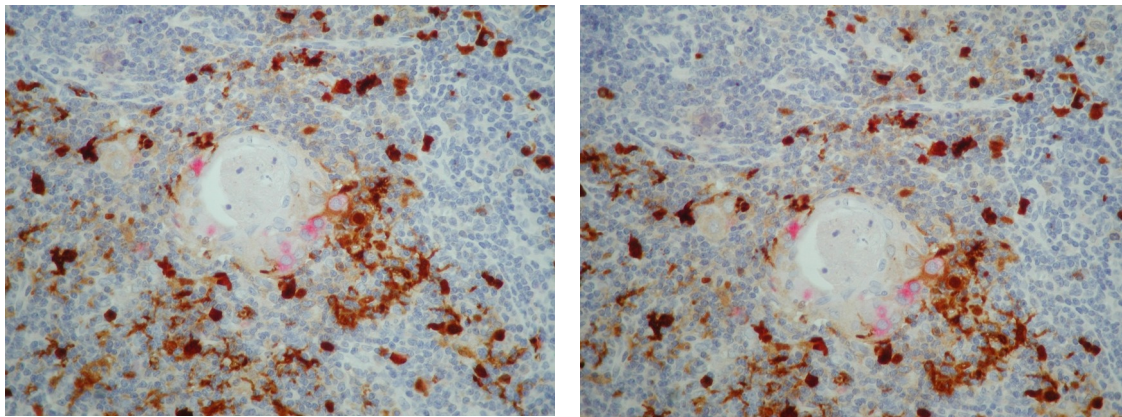
Εικόνα 19: CD 68 θετικά μακροφάγα φλοικής και μυελικής μοίρας (α μεγέθυνση x 250, β μεγέθυνση x 400, γ μεγέθυνση x 400)



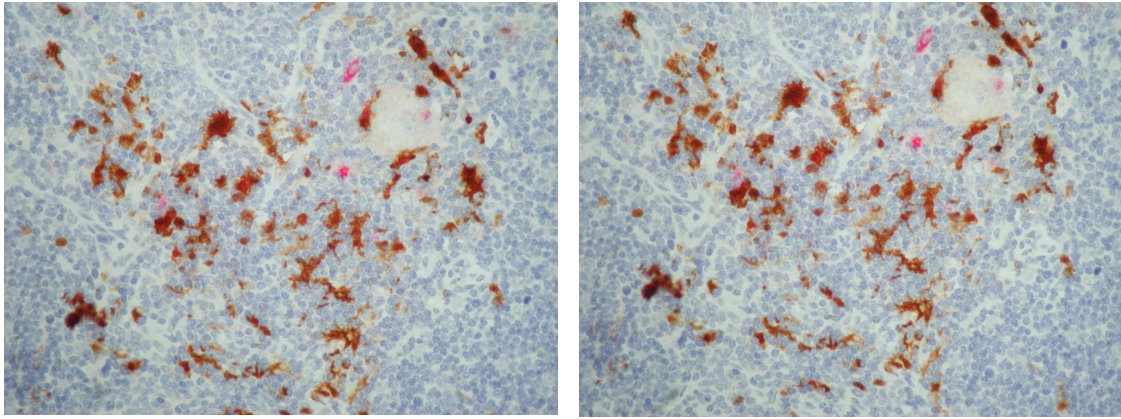
Εικόνα 20:

- (α) CD 20_θετικά Β-λεμφοκύτταρα
(μεγέθυνση x 100)
(β) CD 20_θετικά Τ-λεμφοκύτταρα
(μεγέθυνση x 250)
(γ) CD 3_θετικά Τ-λεμφοκύτταρα
(μεγέθυνση x 250)

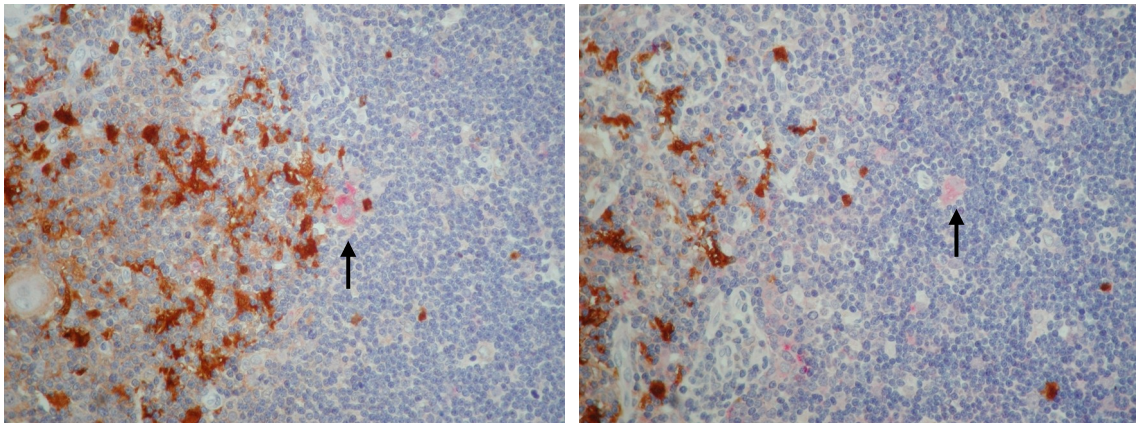
Εικόνες 21-28: Διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις



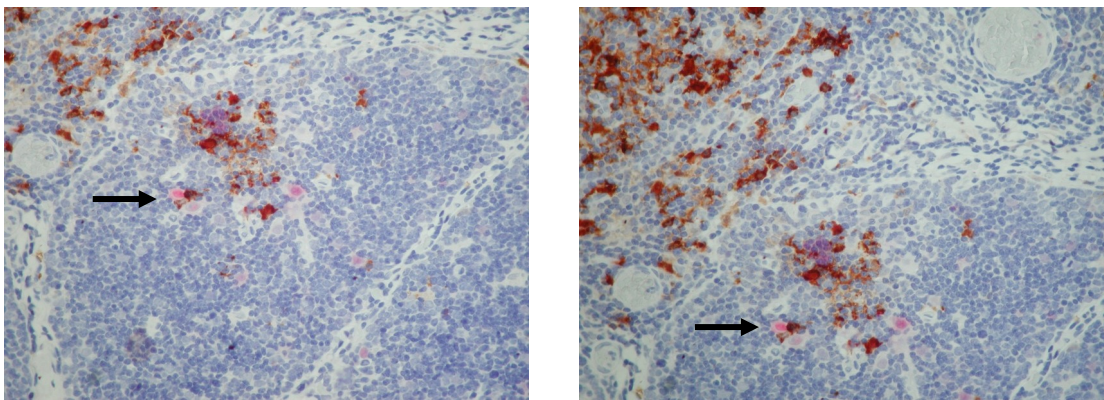
Εικόνα 21: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [περοξυδάση (καφέ χρώση) / αλκαλική φωσφατάση (κόκκινη χρώση)]. Συναπτοφυσίνη (κόκκινη χρώση)/ S 100 (καφέ χρώση). Επιθηλιακά κύτταρα σωματίων Hassall και μυελικής μοίρας θετικά για συναπτοφυσίνη και δενδριτικά κύτταρα θετικά για S 100 (μεγέθυνση x 400)



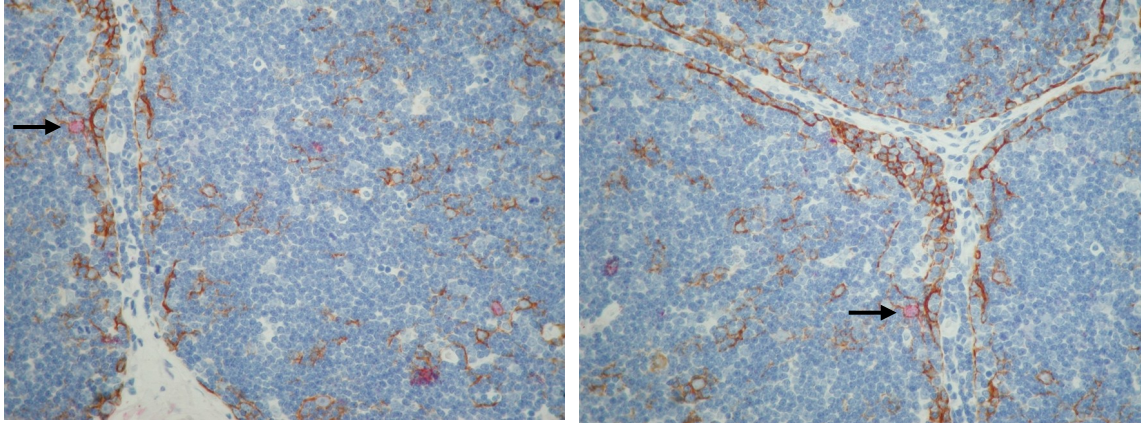
Εικόνα 22: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [περοξυδάση (καφέ χρώση)/αλκαλική φωσφατάση (κόκκινη χρώση)]. Χρωμογρανίνη Α (κόκκινη χρώση)/S 100 (καφέ χρώση). Επιθηλιακά κύτταρα σωματίων Hassall και μυελικής μοίρας θετικά για χρωμογρανίνη Α και δενδριτικά κύτταρα θετικά για S 100 (μεγέθυνση x 400)



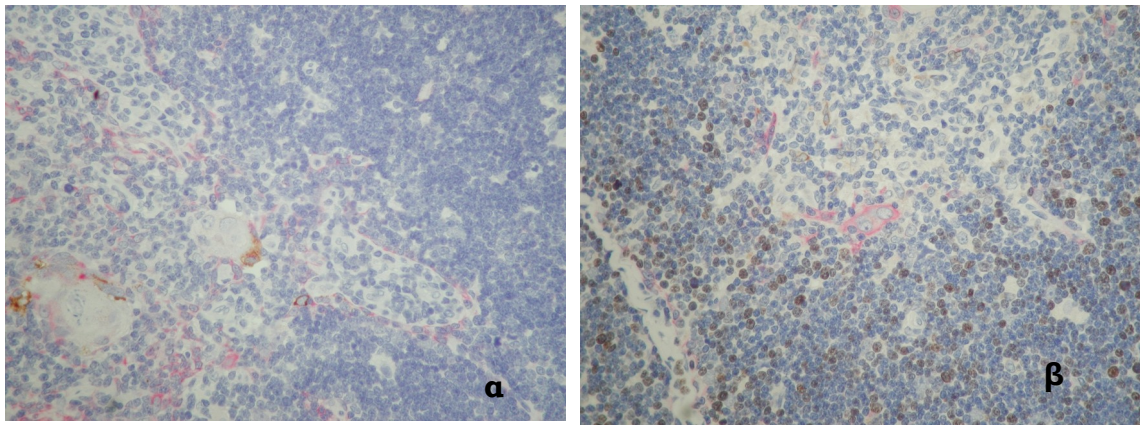
Εικόνα 23: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [περοξυδάση (καφέ χρώση)/αλκαλική φωσφατάση (κόκκινη χρώση)]. TrkA (κόκκινη χρώση)/S 100 (καφέ χρώση). Επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας θετικά για TrkA και δενδριτικά κύτταρα θετικά για S 100 (μεγέθυνση x 400)



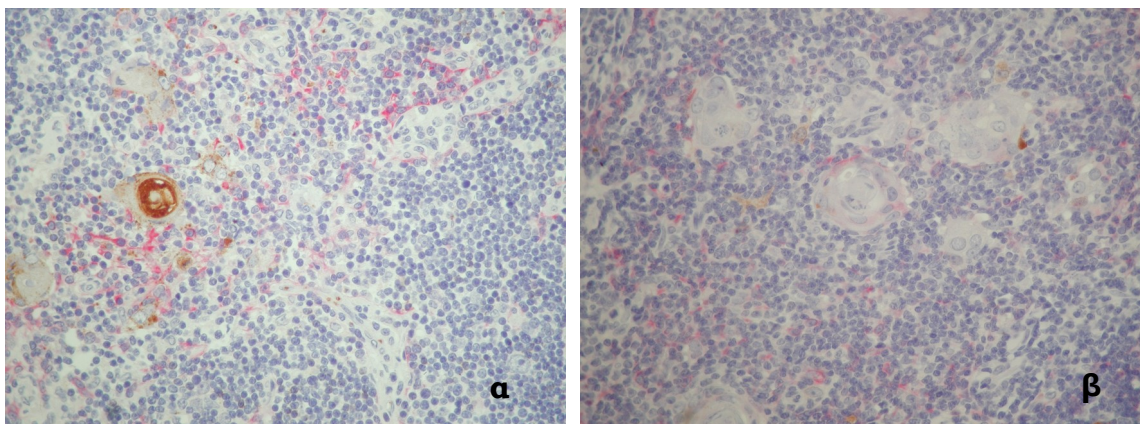
Εικόνα 24: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [περοξυδάση (καφέ χρώση)/αλκαλική φωσφατάση (κόκκινη χρώση)]. Τυροσινική υδροξυλάση (κόκκινη χρώση)/S 100 (καφέ χρώση). Επιθηλιακά κύτταρα μυελικής μοίρας θετικά για τυροσινική υδροξυλάση και δενδριτικά κύτταρα θετικά για S 100 (μεγέθυνση x 400)



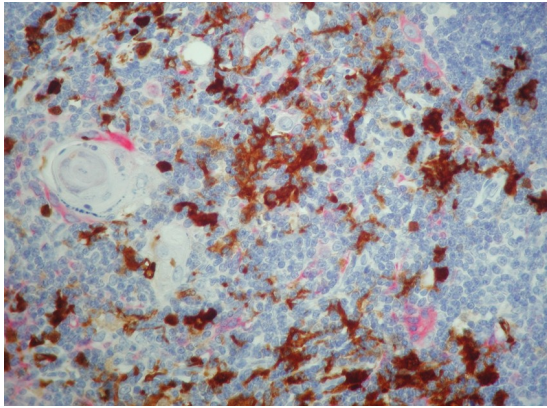
Εικόνα 25: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [περοξυδάση (καφέ χρώση)/αλκαλική φωσφατάση (κόκκινη χρώση)]. PGP 9.5 (κόκκινη χρώση)/ παν- κυτταροκερατίνη MNF 116 (καφέ χρώση). Επιθηλιακά κύτταρα φλοιικής μοίρας θετικά για PGP 9.5 και επιθηλιακά κύτταρα υποκαψικά και φλοιικής μοίρας θετικά για παν- κυτταροκερατίνη (μεγέθυνση x 400)



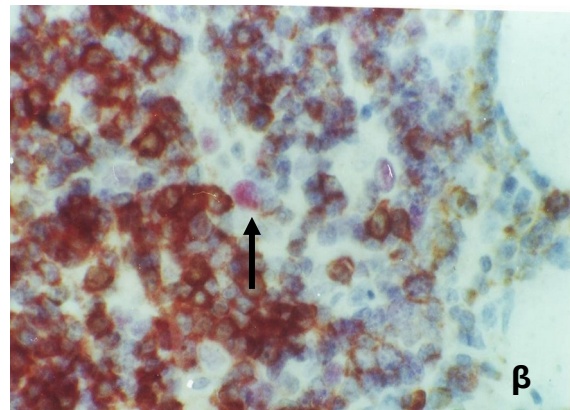
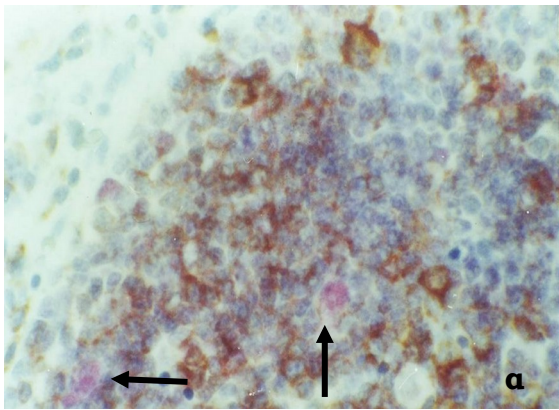
Εικόνα 26-1: α) Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(πανκυτταροκερατίνη (κόκκινη χρώση) / χρωμογρανίνη (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400), β) Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(πανκυτταροκερατίνη (κόκκινη χρώση) / Ki67 (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400).



Εικόνα 26-2: α) Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(πανκυτταροκερατίνη (κόκκινη χρώση) / συναπτοφυσίνη (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400), β) Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(πανκυτταροκερατίνη (κόκκινη χρώση) / τυροσίνη υδροξυλάση (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400).

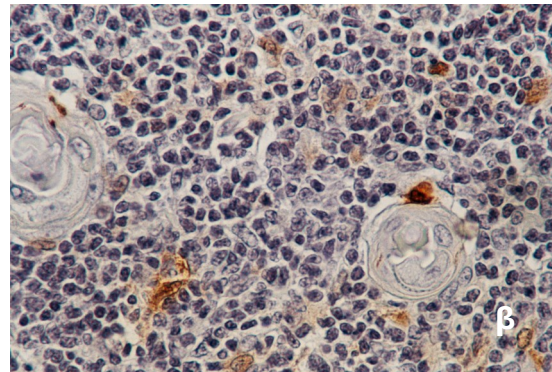
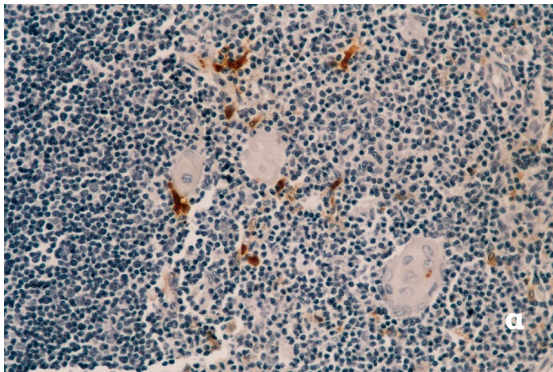


Εικόνα 27: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(πανκυτταροκερατίνη (κόκκινη χρώση) / S100 (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400).

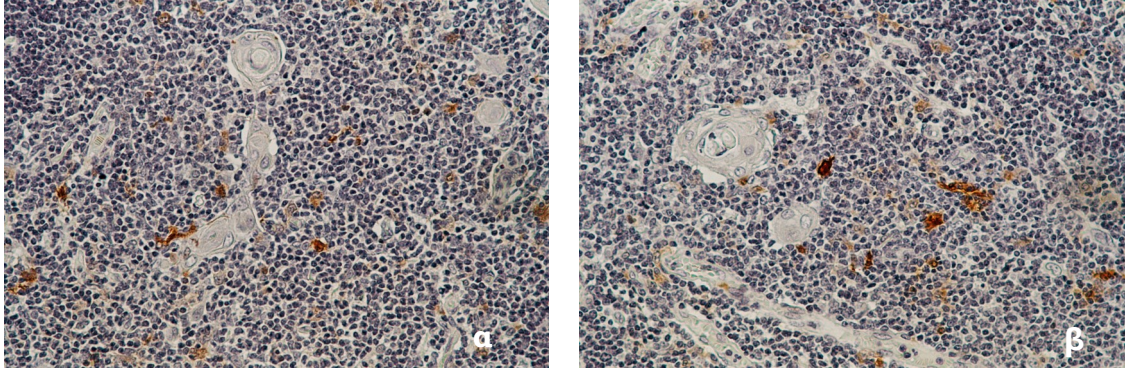


Εικόνα 28: α) Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(PGP9.5 (κόκκινη χρώση) / CD3 (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400), β) Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση [(PGP9.5 (κόκκινη χρώση) / CD45 (καφέ χρώση)] (μεγέθυνση x 400).

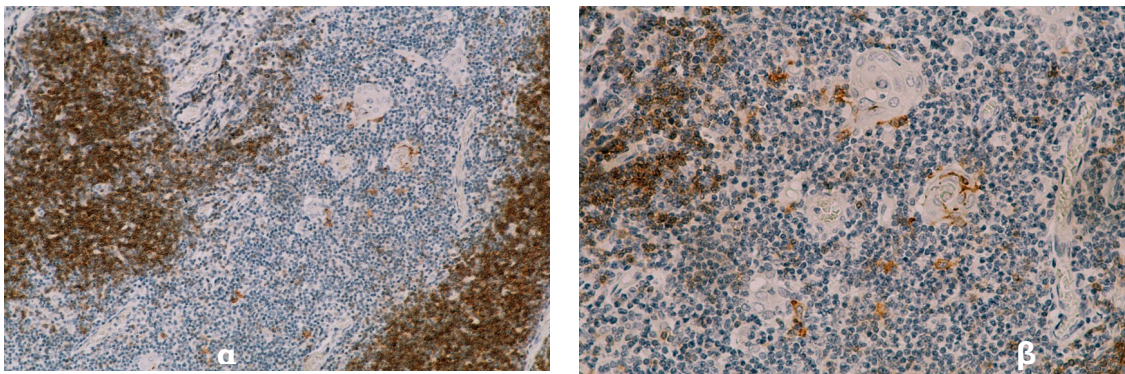
Εικόνες 29-44: Πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών S100, CD1α, CD207 (Λαγκερίνη), CD123 ΚΑΙ CD11c



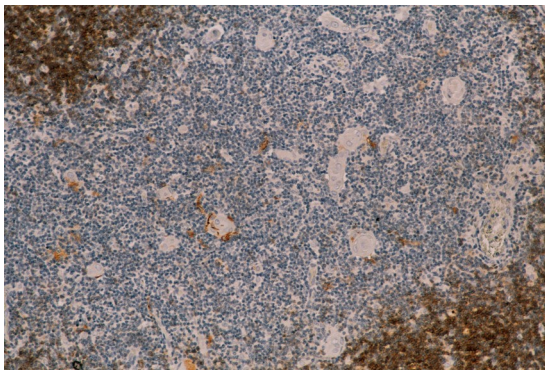
Εικόνα 29-1: S100 θετικά κύτταρα εγγύς και σπανίως εντός ενεργών σωματίων του Hassall (α:μεγέθυνση x250, β:μεγέθυνση x400)



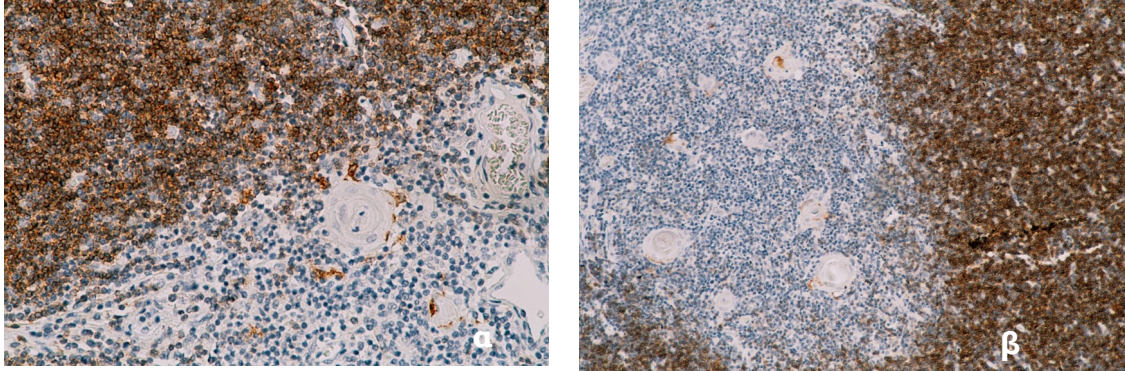
Εικόνα 29-2: S100 θετικά κύτταρα στη μυελική ζώνη και εγγύς σωματίων του Hassall
(α:μεγέθυνση x250, β:μεγέθυνση x250)



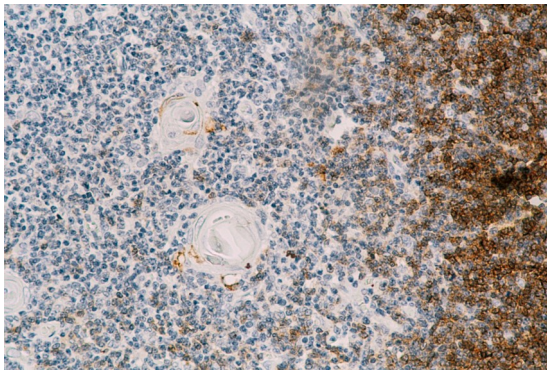
Εικόνα 30-1: α) CD1a θετικά κύτταρα εγγύς σωματίων Hassall
(μεγέθυνση x 250, β) CD1a θετικά κύτταρα εγγύς ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση x 400)



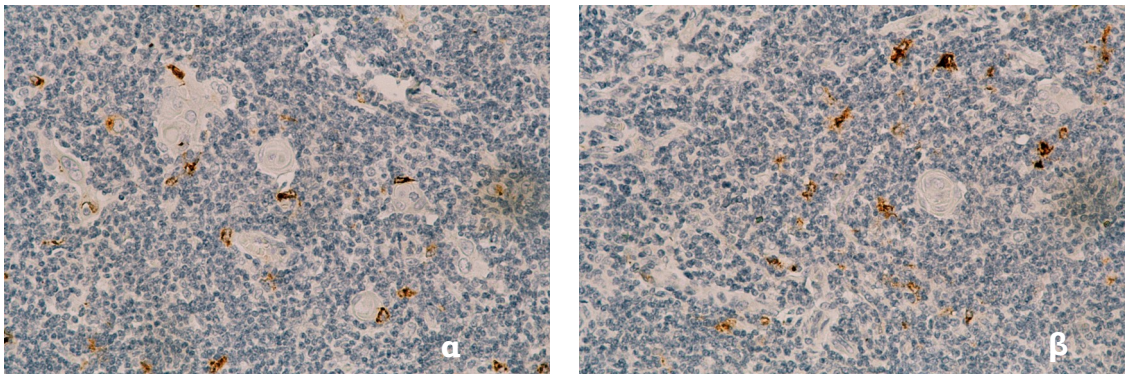
Εικόνα 30-2: CD1a θετικά κύτταρα κυρίως
εγγύς ενεργών σωματίων Hassall
(μεγέθυνση x 250)



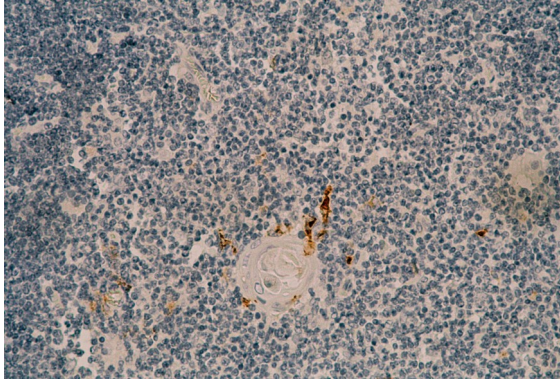
Εικόνα 31-1: α) CD1a θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση x 400), β) CD1a θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα (μεγέθυνση x 250)



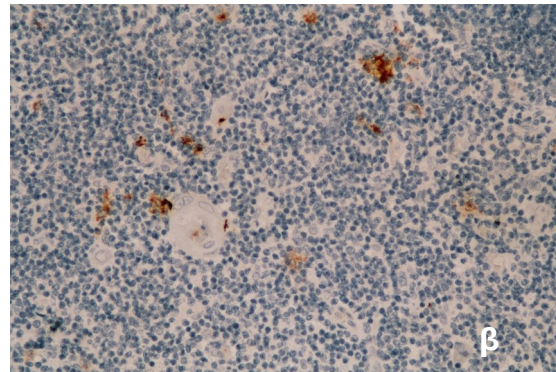
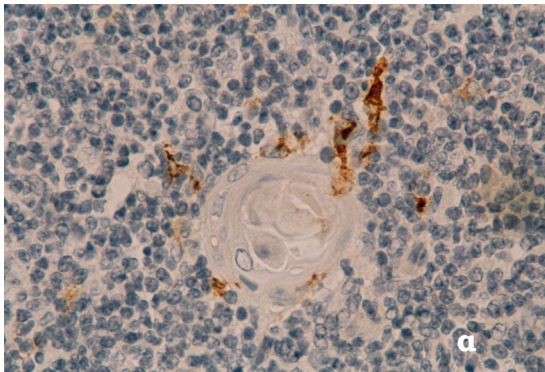
Εικόνα 31-2: CD1a θετικά κύτταρα σε ενεργά σωματλια Hassall (μεγέθυνση x 400)



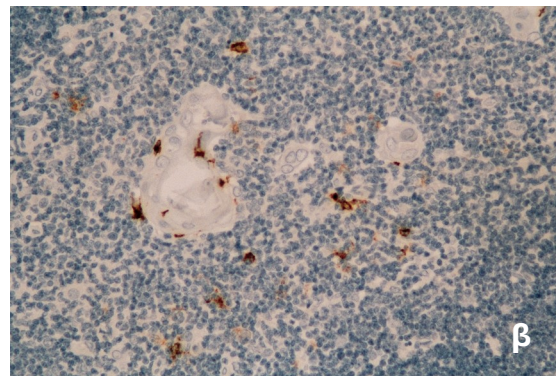
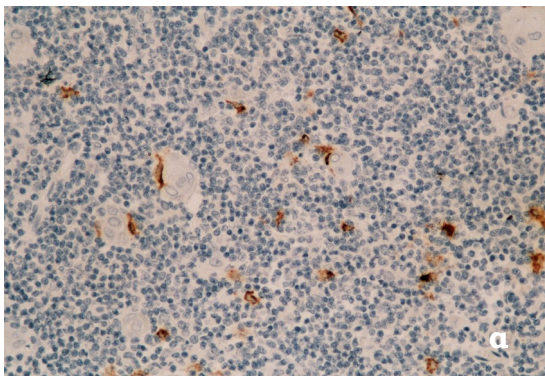
Εικόνα 32-1: α) CD207 θετικά κύτταρα κυρίως εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 100), β) CD207 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα (μεγέθυνση X 250)



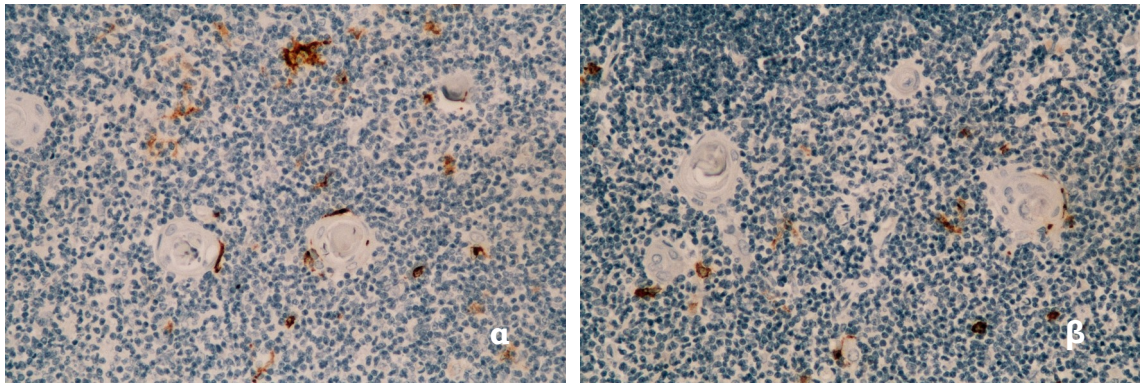
Εικόνα 32-2: CD207 θετικά κύτταρα εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 250)



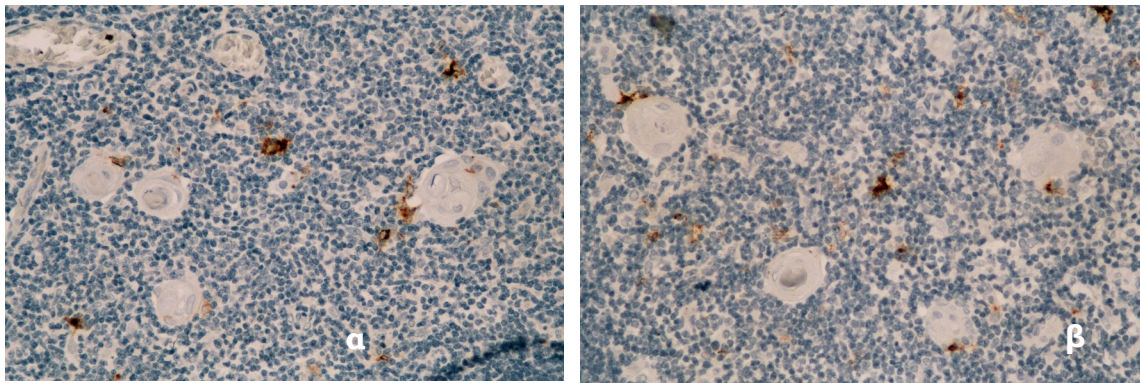
Εικόνα 33-1: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα κυρίως εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 400), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα (μεγέθυνση X 250)



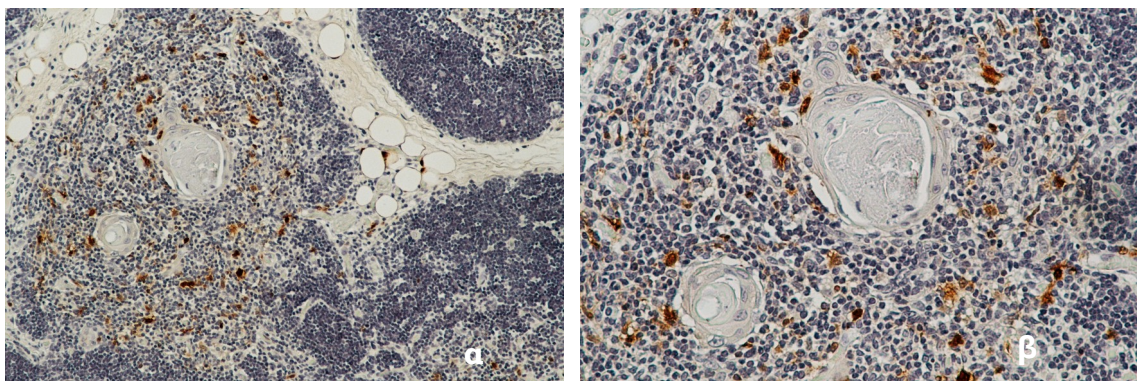
Εικόνα 33-2: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 250), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 400)



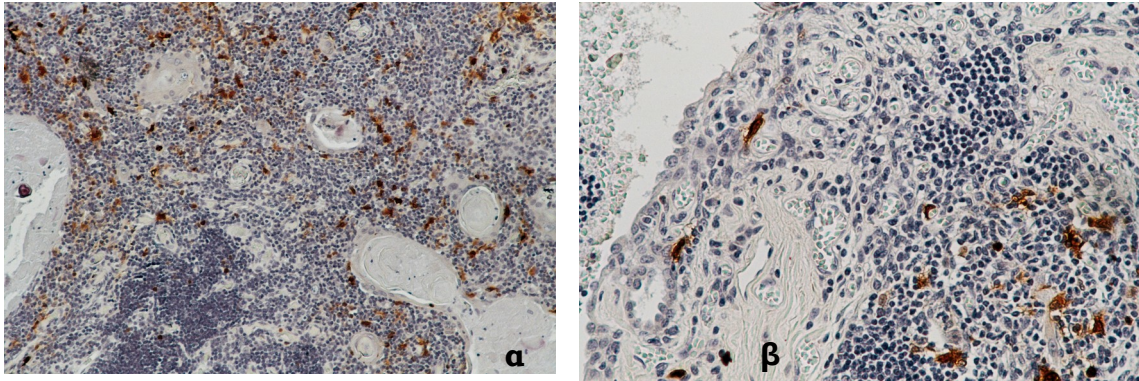
Εικόνα 34: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall(μεγέθυνση X 250), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall(μεγέθυνση X 250)



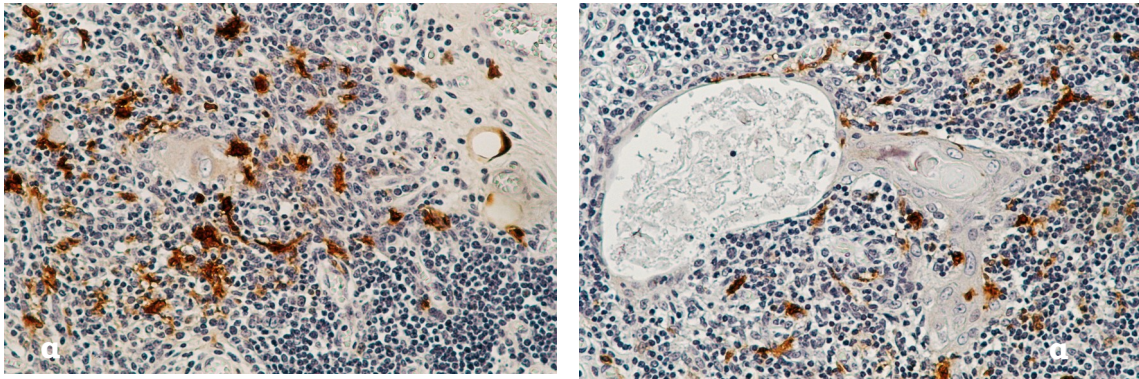
Εικόνα 35: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall(μεγέθυνση X 250), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα, εγγύς και εντός ενεργών σωματίων Hassall(μεγέθυνση X 250)



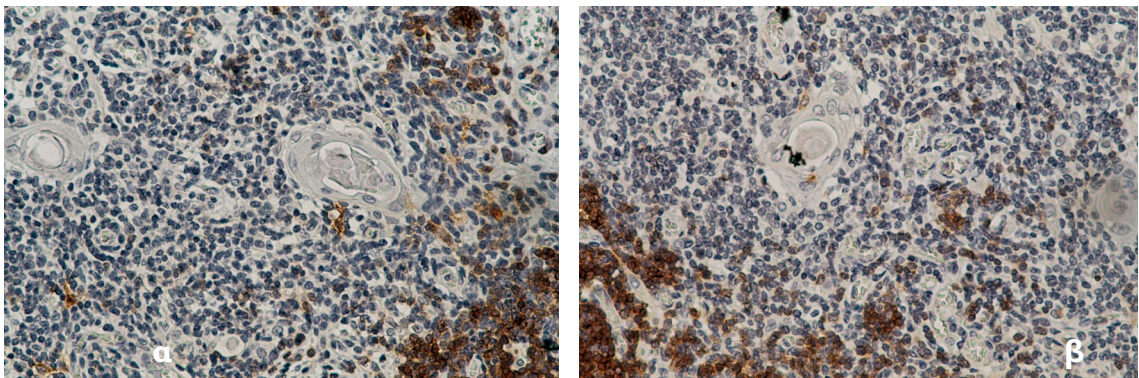
Εικόνα 36: α) S100 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εγγύς σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 250), β) S100 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εγγύς σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 400)



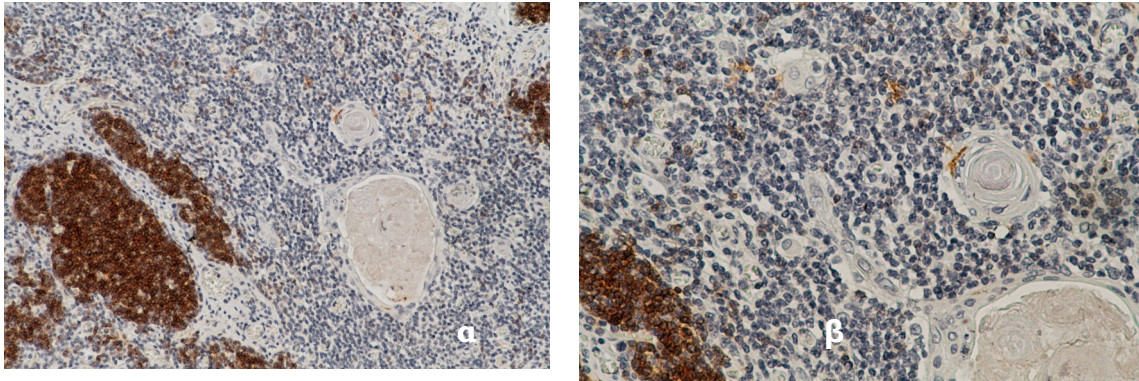
Εικόνα 37: α) S100 θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα (μεγέθυνση X 100), β) S100 θετικά κύτταρα κοντά σε μικρή θυμική κύστη του παραπάνω θύμου (μεγέθυνση X 250)



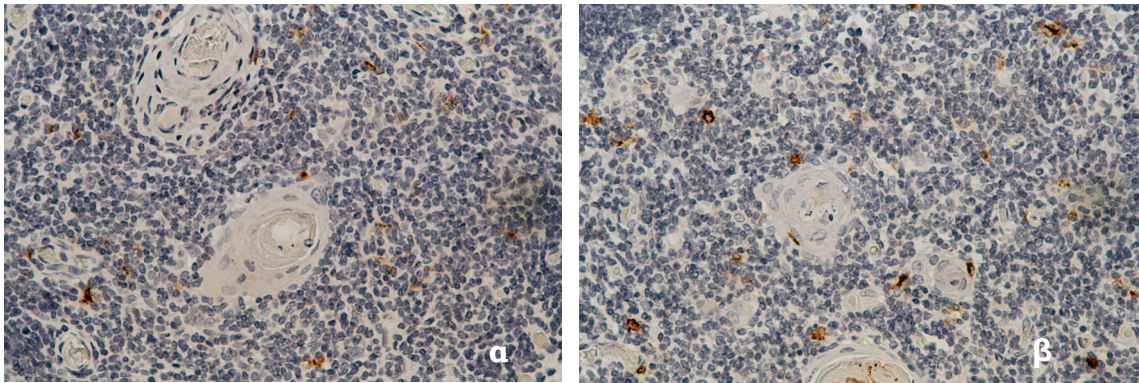
Εικόνα 38: α) S100 θετικά κύτταρα εγγύς ενεργού σωματίου Hassall (μεγέθυνση X 250), β) S100 θετικά κύτταρα εγγύς κυστικού σωματίου Hassall (μεγέθυνση X 400)



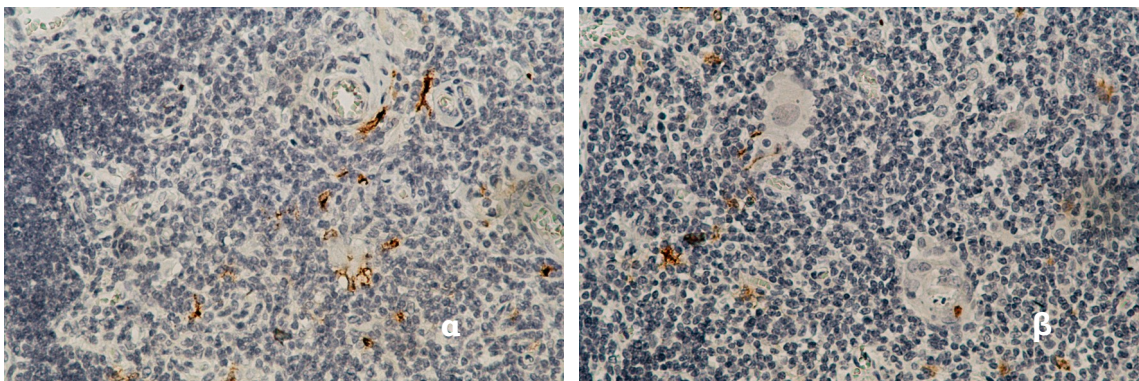
Εικόνα 39: α) CD1a θετικά κύτταρα εγγύς ενεργού σωματίου Hassall (μεγέθυνση X 250), β) CD1a θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εντός ενεργού σωματίου Hassall (μεγέθυνση X 250) (μεγέθυνση X 400)



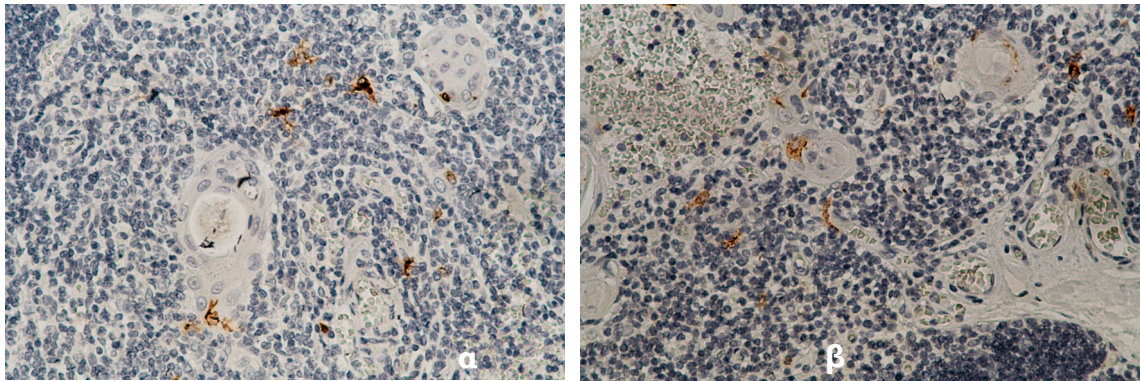
Εικόνα 40: α) CD1a θετικά κύτταρα σε ενεργό σωματίο Hassall και σε λεμφικά κύτταρα (μεγέθυνση X 250), β) CD1a θετικά κύτταρα σε ενεργό σωματίο Hassall και σε λεμφικά κύτταρα (μεγέθυνση X 400)



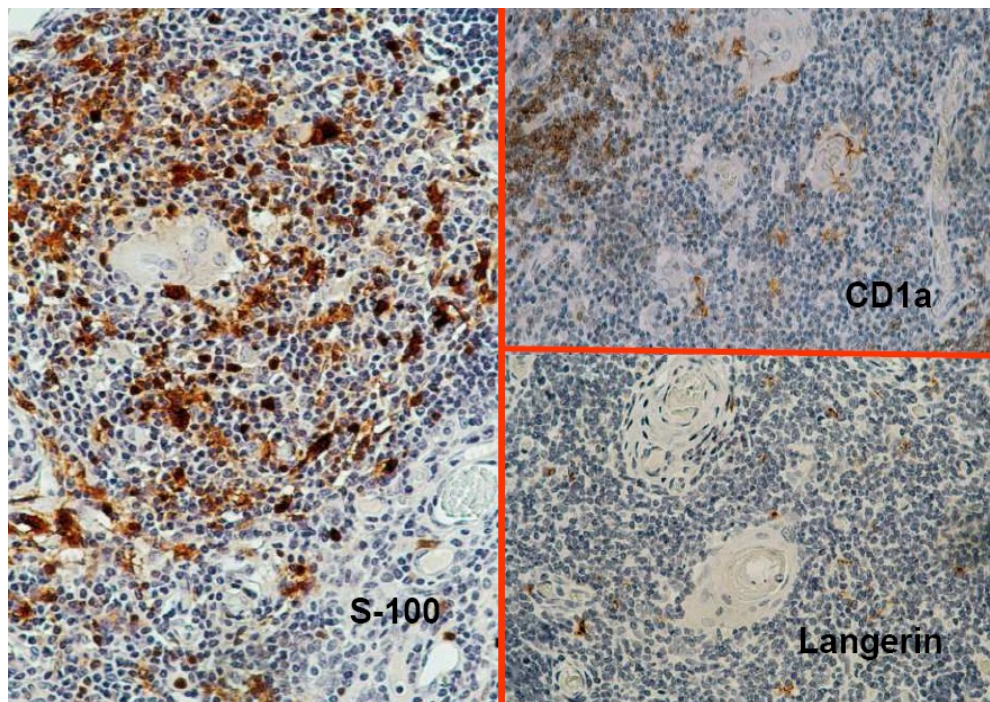
Εικόνα 41: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα εγγύς σωματίου Hassall (μεγέθυνση X 250), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 250)



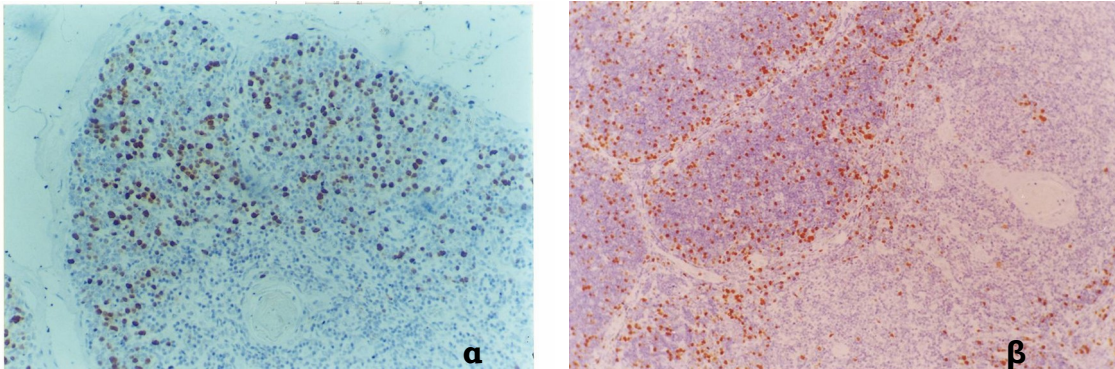
Εικόνα 42: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα (μεγέθυνση X 250), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εντός ενεργού σωματίου Hassall (μεγέθυνση X 250)



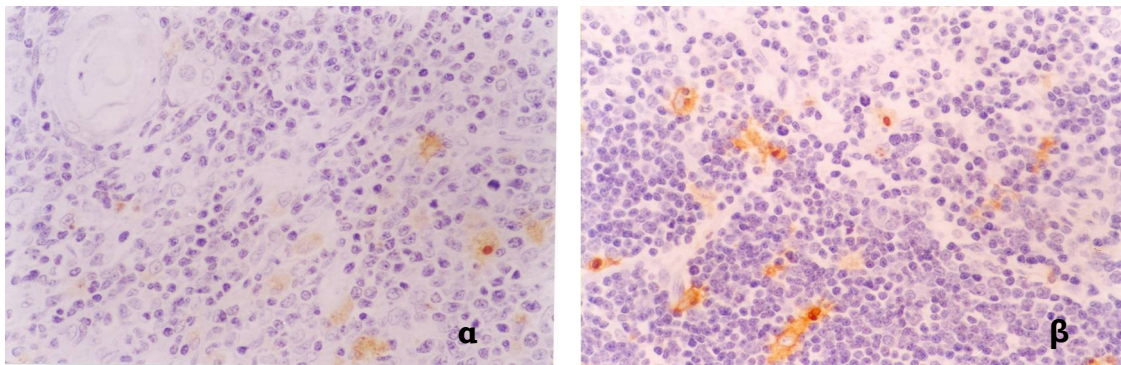
Εικόνα 43: α) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 250), β) CD207 (Langerin) θετικά κύτταρα στη μυελική μοίρα και εντός ενεργών σωματίων Hassall (μεγέθυνση X 250)



Εικόνα 44: Συγκριτική ανοσοτοπογραφική κατανομή κυττάρων θετικών για S100, CD1a, CD207 (Langerin) (μεγέθυνση X 400)

Εικόνες 45-46: Ανοσοϊστοχημική χρώση Κι-67, χρώση TUNEL

Εικόνα 45: α) Κύτταρα θετικά για Κι67 κυρίως στο φλοιό (μεγέθυνση X 100),
β) Κύτταρα θετικά για Κι67 κυρίως στο φλοιό (μεγέθυνση X 100)



Εικόνα 46: α) χρώση TUNEL: παρουσία TUNEL θετικών κυττάρων
(μεγέθυνση X 400), β) χρώση TUNEL: παρουσία TUNEL θετικών κυττάρων (μεγέθυνση X 250)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Olszewski WL.** The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. *Lymphat Res Biol.* 1:11-21, 2003.
2. **Di Santo JP, Vosshenrich CA.** Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev.* 214:35-46, 2006.
3. Anderson J, Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol.* 1:31-40, 2001.
4. Manley NR. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol.* 12:421-428, 2000.
5. Larsen WJ. «Ανατομία-Ανάπτυξη, Λειτουργία, Κλινικές Συσχετίσεις», Εκδόσεις Παρισιάνου, 2007.
6. Moore KL. «Κλινική Ανατομία». Εκδόσεις Πασχαλίδης, 1998.
7. Benoist C, Mathis D. T-cell development: a new marker of differentiation state. *Curr Biol.* 9: 56-61, 1999.
8. Gartner LP, Hiatt JL. «Εγχειρίδιο Ιστολογίας». Εκδόσεις Παρισιάνου, 2001.
9. Wheater P, Burkitt HG, Daniels VG. «Λειτουργική Ιστολογία». Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2002.
10. Junqueira LC, Carneiro J. «Βασική Ιστολογία». Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2004.
11. Larsen WJ. «Εμβρυολογία του ανθρώπου». Εκδόσεις Παρισιάνου, 2004.
12. O` Rahilly R, Muller F. «Εμβρυολογία και Τερατολογία του Ανθρώπου», Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2000.
13. Le Douarin NM, Jotereau FV. Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. Exp. Med.* 142:17-40, 1975.
14. Cordier AC, Haumont SM. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J. Anat. Mar.* 157:227-63, 1980.
15. Itoi M., Kawamoto H., Katsura Y., Amagai T. Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int. Immunol.* 13:1203-11, 2001.

16. Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G, et al. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*. 441:988-91, 2006.
17. Gordon J, Wilson VA, Blair NF, et al. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat. Immunol.* 5:546-53, 2004.
18. Moore MA. Commentary: the role of cell migration in the ontogeny of the lymphoid system. *Stem Cells Dev.* 13:1-21, 2004.
19. Ritter MA, Boyd RL. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol. Today.* 14:462-9, 1993.
20. Ritter M.A. and Palmer D.B. The human thymic microenvironment: new approaches to functional analysis. *Semin. Immunol.* 11:13-21, 1999.
21. Anderson G, Jenkinson EJ, Moore NC, et al. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature.* 4, 362:70-3, 1993.
22. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, et al. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development.* 127:1607-16, 2000.
23. Suniara RK, Jenkinson EJ, Owen JJ. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J. Exp. Med.* 191:1051-6, 2000.
24. Yamazaki H, Sakata E, Yamane T, et al. Presence and distribution of neural crest-derived cells in the murine developing thymus and their potential for differentiation. *Int. Immunol.* 17:549-58, 2005.
25. Hollander G, Gill J, Zuklys S, Cellular and molecular events during early thymus development. *Immunol. Rev.* 209:28-46, 2006.
26. Manley NR, Capecchi MR. The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development.* 121:1989-2003, 1995.
27. Shen J, Gudas LJ. Molecular cloning of a novel retinoic acid-responsive gene, HA1R-62, which is also up-regulated in Hoxa-1 overexpressing cells. *Cell Growth Differ.* 11:11-7, 2000.
28. Neubuser A, Koseki H, Balling R. Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev. Biol.* 170:701-16, 1995.
29. Xu PX, Zheng W, Laclef C, et al. Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development.* 129:3033-44, 2002.

30. Zou D, Silvius D, Davenport J, et al. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev. Biol.* 293:499-512, 2006.
31. Dietrich S, Gruss P. Undulated phenotypes suggest a role of Pax-1 for the development of vertebral and extravertebral structures. *Dev. Biol.* 167(2):529-48, 1995.
32. Su DM, Manley NR. Hoxa3 and pax1 transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development. *J. Immunol.* 164:5753-60, 2000.
33. Manley N, Selleri L, Brendolan A, et al. Abnormalities of caudal pharyngeal pouch development in **Pbx1** knockout mice mimic loss of **Hox3** paralogs. *Dev. Biol.* 276: 301-312, 2004.
34. Bleul CC, Corbeaux T, Reuter A, et al. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature.* 441:992-6, 2006.
35. Dooley J, Erickson M, Roelink H, et al. Nude thymic rudiment lacking functional foxn1 resembles respiratory epithelium. *Dev. Dyn.* 233:1605-12, 2005.
36. Chatterjea-Matthes D, Garcia-Ojeda ME, Dejbakhsh-Jones S, et al. Early defect prethymic in bone marrow T cell progenitors in athymic nu/nu mice. *J. Immunol.* 171(3):1207-15, 2003.
37. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, et al. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature.* 372:103-7, 1994.
38. Marx A, Muller-Hermelink HK. From basic immunobiology to the upcoming WHO-classification of tumors of the thymus. The Second Conference on Biological and Clinical Aspects of Thymic Epithelial Tumors and related recent developments. *Pathol. Res. Pract.* 195:515-33, 1999.
39. Shortman K, Vremec D, Corcoran LM, et al. The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol. Rev.* 165:39-46, 1998.
40. Allman D, Sambandam A, Kim S, et al. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4:168-74, 2003.
41. Kathrein KL, Lorenz R, Innes AM, et al. Ikaros induces quiescence and T-cell differentiation in a leukemia cell line. *Mol. Cell Biol.* 25:1645-54, 2005.
42. Anderson MK. At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol. Rev.* 209:191-211, 2006.

43. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Friedrich C, et al. Ikaros in hemopoietic lineage determination and homeostasis. *Semin. Immunol.* 10:119-25, 1998.
44. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell.* 79:143-56, 1994.
45. Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev. Biol.* 195:1-15, 1998.
46. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, et al. Intrathymic non-lymphatic hematopoiesis during mammalian ontogenesis. *In Vivo.* 12:599-618, 1998.
47. Wilkinson B, Owen JJ, Jenkinson EJ. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J. Immunol.* 162:3873-81, 1999.
48. Gill J, Malin M, Hollander GA, et al. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 3:635-42, 2002.
49. Shinohara T, Honjo T. Studies in vitro on the mechanism of the epithelial/mesenchymal interaction in the early fetal thymus. *Eur. J. Immunol.* 27:522-9, 1997.
50. Jenkinson WE, Jenkinson EJ, Anderson G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J. Exp. Med.* 198:325-32, 2003.
51. Kalinichenko VV, Gusarova GA, Shin B, et al. The forkhead box F1 transcription factor is expressed in brain and head mesenchyme during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns.* 3:153-8, 2003.
52. Burkly L, Hession C, Ogata L, et al. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature.* 373:531-6, 1995.
53. Weih F, Carrasco D, Durham SK, et al. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell.* 80:331-40, 1995.
54. Weih F, Caamano J. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* 195:91-105, 2003.
55. **Dejardin E.** The alternative NF-kappa B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* 72:1161-79, 2006.

56. Gray DH, Seach N, Ueno T, et al. Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*. 108:3777-85, 2006.
57. Hollander GA, Wang B, Nichogiannopoulou A, et al. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature*. 373:350-3, 1995.
58. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, et al. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature*. 383:81-5, 1996.
59. Naquet P, Naspetti M, Boyd R. Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin. Immunol*. 11:47-55, 1999.
60. Nagahama H, Hatakeyama S, Nakayama K, et al. Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development. *Anat. Embryol. (Berl)*. 203:77-87, 2001.
61. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Ann. Rev. Immunol*. 24:571-606, 2006.
62. **Jenkinson WE, Rossi SW, Jenkinson EJ, et al.** Development of functional thymic epithelial cells occurs independently of lymphostromal interactions. *Mech. Dev*. 122:1294-9, 2005.
63. Salaun J, Corbel C, Le-Douarin NM. Regulatory T cells in the establishment and maintenance of self-tolerance: role of the thymic epithelium. *Int. J. Dev. Biol*. 49:137-42, 2005.
64. Ziegler SF, Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol*. 7:709-14, 2006.
65. Gallegos A.M. and Bevan M.J. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol. Rev*. 209:290-6, 2006.
66. Le Douarin NM, Dieterlen-Lievre F, Oliver PD. Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am. J. Anat*. 170:261-99, 1984.
67. Jotereau F, Heuze F, Salomon-Vie V, et al. Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration. *J. Immunol*. 138:1026-30, 1987.
68. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol*. 47:327-59, 1976.

69. Blais ME, Louis I, Perreault C. T-cell development: an extrathymic perspective. *Immunol. Rev.* 209:103-14, 2006.
70. Zapata A, Diez B, Cejalvo T, et al. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20:126-36, 2006.
71. Guttinger M, Sutti F, Panigada M, et al. Epithelial V-like antigen (EVA), a novel member of the immunoglobulin superfamily, expressed in embryonic epithelia with a potential role as homotypic adhesion molecule in thymus histogenesis. *J. Cell Biol.* 141:1061-71, 1998.
72. Zakharova LA, Malyukova IV, Proshlyakova EV, et al. Hypothalamo-pituitary control of the cell-mediated immunity in rat embryos: role of LHRH in regulation of lymphocyte proliferation. *J. Reprod. Immunol.* 47:17-32, 2000.
73. Roitt, Brostoff and Male. «Ανοσολογία». 6^η έκδοση. Εκδόσεις Παρισιάνου, 2004.
74. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 59:253-88, 1990.
75. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 364:33-9, 1993.
76. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 368:215-21, 1994.
77. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure.* 2:245-51, 1994.
78. Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, et al. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science.* 277:339-45, 1997.
79. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, et al. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science,* 274:209-19, 1996.
80. Garcia KC, Teyton L, Wilson IA. Structural basis of T cell recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 17:369-97, 1999.
81. Ely LK, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, et al. Structural studies on the alphabeta T-cell receptor. *IUBMB Life.* 57:575-82, 2005.
82. Cao W, He W. The recognition pattern of gammadelta T cells. *Front. Biosci.* 1. 10:2676-700, 2005.

83. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Ann. Rev. Immunol.* 11:637-85, 1993.
84. Chien YH, Jores R, Crowley MP. Recognition by gamma/delta T cells. *Ann. Rev. Immunol.* 14:511-32, 1996.
85. Bentley GA, Mariuzza RA. The structure of the T cell antigen receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 14:563-90, 1996.
86. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Ann. Rev.* 16:523-44, 1998.
87. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity.* 24:133-9, 2006.
88. Salter RD, Benjamin RJ, Wesley PK, et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature.* 345:41-6, 1990.
89. Porcelli SA, Segelke BW, Sugita M, et al. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol. Today.* 19:362-8, 1998.
90. San Jose E, Sahuquillo AG, Bragado R, Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model. *Eur. J. Immunol.* 28:12-21, 1998.
91. Manning TC, Kranz DM. Binding energetics of T-cell receptors: correlation with immunological consequences. *Immunol. Today.* 20:417-22, 1999.
92. Konigshofer Y, Chien YH. Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? *Curr. Opin. Immunol.* 18:527-33, 2006.
93. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126:25-31, 2006.
94. Lauritsen JP, Haks MC, Lefebvre JM, et al. Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate. *Immunol. Rev.* 209:176-90, 2006.
95. Kuhnlein P, Mitnacht R, Torres-Nagel NE, et al. The canonical T cell receptor of dendritic epidermal gamma delta T cells is highly conserved between rats and mice. *Eur. J. Immunol.* 26:3092-7, 1996.
96. Todd D, Singh AJ, Greiner DL, et al. A new isolation method for rat intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol. Methods.* 224:111-27, 1999.

97. Otten K, Wang HC, Wyde PR, et al. Modulation of gamma delta T cells in mouse buccal epithelium following antigen priming. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:626-9, 2002.
98. Nagaeva O, Jonsson L, Mincheva-Nilsson L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am. J. Reprod. Immunol.* 48:9-17, 2002.
99. Girardi M. Cutaneous biology of gammadelta T cells. *Adv. Dermatol.* 20:203-15, 2004.
100. Zocchi MR, Poggi A. Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense. *Front. Biosci.* 9:2588-604, 2004.
101. Kabelitz D, Marischen L, Oberg HH, et al. Epithelial defence by gamma delta T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137:73-81, 2005.
102. Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, et al. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol.* 1:47-53, 2000.
103. Davis MM. The evolutionary and structural 'logic' of antigen receptor diversity. *Semin. Immunol.* 16:239-43, 2004.
104. **Cobb RM, Oestreich KJ, Osipovich OA, et al.** Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv. Immunol.* 91:45-109, 2006.
105. Touvrey C, Borel E, Marche PN, et al. Gene-specific signal joint modifications during V(D)J recombination of TCRAD locus genes in murine and human thymocytes. *Immunobiol.* 211:741-51, 2006.
106. Warmflash A, Dinner AR. A model for TCR gene segment use. *J Immunol.* 177:3857-64, 2006.
107. Sloan-Lancaster J, Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Ann. Rev. Immunol.* 14:1-27, 1996.
108. Plytycz B, Seljelid R. MHC molecules and lymphocytes: evolutionary perspective. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 46:137-42, 1998.
109. Ristori G, Montesperelli C, Uccelli A, et al. A major influence of the T cell receptor repertoire as compared to antigen processing-presentation in the selection of myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 96:241-4, 1999.

110. Krummel M, Wulfing C, Sumen C, et al. Thirty-six views of T-cell recognition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355:1071-6, 2000.
111. Franklin EC. Structure and function of immunoglobulins. *Acta. Endocrinol. Suppl. (Copenh)*. 194:77-95, 1975.
112. Taussig M. Molecular genetics of immunoglobulins. *Immunol. Suppl.* 1:7-15, 1988.
113. Pike KA, Baig E, Ratcliffe MJ. The avian B-cell receptor complex: distinct roles of Igalpha and Igbeta in B-cell development. *Immunol. Rev.* 197:10-25, 2004.
114. Maizels N. Immunoglobulin gene diversification. *Ann. Rev. Genet.* 39:23-46, 2005.
115. Milicevic Z, Milicevic NM. Ultrastructure of different types of thymic epithelial cells in normal and cyclosporin-A-treated rats. *Anat. Embryol. (Berl)*. 196:171-83, 1997.
116. Lafontaine M, Landry D, Montplaisir S. Human thymic dendritic cells. *Microsc. Res. Tech.* 38:267-75, 1997.
117. Bodey B, Bodey B. Jr, Siegel SE, et al. Molecular biological ontogenesis of the thymic reticulo-epithelial cell network during the organization of the cellular microenvironment. *In Vivo.* 13:267-94, 1999.
118. Milicevic NM, Milicevic Z. Ultrastructural identification of specialized endocytic compartments in macrophages of the thymic cortico-medullary zone and germinal centers of peripheral lymphatic organs of the rat. *Ann. Anat.* 182:471-8, 2000.
119. Brelinska R. Thymic epithelial cells in age-dependent involution. *Microsc. Res. Tech.* 62:488-500, 2003.
120. Savchenko AS, Hasegawa G, Naito M. Development and maturation of thymic dendritic cells during human ontogeny. *Cell Tissue Res.* 325:455-60, 2006.
121. Elmore SA. Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 34:656-65, 2006.
122. Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 34:504-14, 2006.
123. Pearse G. Histopathology of the thymus. *Toxicol. Pathol.* 34:515-47, 2006.
124. Rouse RV, Bolin LM, Bender JR, et al. Monoclonal antibodies reactive with subsets of mouse and human thymic epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 36:1511-7, 1988.

125. Margolese H, O'Keefe C, Chung F, et al. Expression of major histocompatibility complex class II antigen in NOD mouse thyroid. *Autoimmunity*. 17:1-11, 1994.
126. Ernst BB, Surh CD, Sprent J. Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures. *J. Exp. Med.* 183:1235-40, 1996.
127. Colic M, Vucevic D, Gasic S, et al. Biochemical and functional characterization of a molecule expressed by a subset of thymic medullary epithelial cells. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 47:33-42, 2001.
128. Gallo F, Morale MC, Sambataro D, et al. The immune system response during development and progression of carcinogen-induced rat mammary tumors: prevention of tumor growth and restoration of immune system responsiveness by thymopentin. *Breast Cancer Res. Treat.* 27:221-37, 1993.
129. Theodor L, Shoham J, Berger R, et al. Ubiquitous expression of a cloned murine thymopoietin cDNA. *Acta Haematol.* 97:153-63, 1997.
130. Turrini P, Tirassa P, Vigneti E, et al. A role of the thymus and thymosin-alpha1 in brain NGF levels and NGF receptor expression. *J. Neuroimmunol.* 82:64-72, 1998.
131. Savino W, Arzt E, Dardenne M. Immunoneuroendocrine connectivity: the paradigm of the thymus-hypothalamus/pituitary axis. *Neuroimmunomodulat.* 6:126-36, 1999.
132. Hansenne I, Rasier G, Pequeux C, et al. Ontogenesis and functional aspects of oxytocin and vasopressin gene expression in the thymus network. *J. Neuroimmunol.* 158:67-75, 2005.
133. Hansenne I. Thymic transcription of neurohypophysial and insulin-related genes: impact upon T-cell differentiation and self-tolerance. *J. Neuroendocrinol.* 17:321-7, 2005.
134. Ropke C. Thymic epithelial cell culture. *Microsc. Res. Tech.* 38:276-86, 1997.
135. Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, et al. MHC class II-dependent NK1.1+ gammadelta T cells are induced in mice by Salmonella infection. *J. Immunol.* 162:1573-81, 1999.
136. Joachims ML, Chain JL, Hooker SW, et al. Thompson L.F. Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential--differences between men and mice. *J. Immunol.* 176:1543-52, 2006.

137. Rowell EA, Wells AD. The role of cyclin-dependent kinases in T-cell development, proliferation, and function. *Crit. Rev. Immunol.* 26:189-212, 2006.
138. Xiong N, Raulet DH. Development and selection of gammadelta T cells. *Immunol. Rev.* 215:15-31, 2007.
139. Mekkenschlager M, Fischer AG. Selective manipulation of the human T-cell receptors repertoire expressed by thymocytes in organ culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4255-9, 1992.
140. Coutinho A, Caramalho I, Seixas E, et al. Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 293:43-71, 2005.
141. Gangadharan D, Lambolez F, Attinger A, et al. Identification of pre- and postselection TCRalpha β ⁺ intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus. *Immunity.* 25:631-41, 2006.
142. Lambolez F, Kronenberg M, Cheroutre H. Thymic differentiation of TCRalpha β (+) CD8alpha α (+) IELs. *Immunol. Rev.* 215:178-88, 2007.
143. Janossy G, Thomas JA, Goldstein G, et al. The human thymic environment. *Ciba. Found. Symp.* 84:193-214, 1981.
144. Milicevic NM, Milicevic Z. Cyclosporin A-induced changes of the thymic microenvironment. A review of morphological studies. *Histol. Histopathol.* 13:1183-96, 1998.
145. Von Gaudecker B, Kendall MD, Ritter MA. Immuno-electron microscopy of the thymic epithelial microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 38:237-249, 1997.
146. Arudchelvan Y, Nishimura Y, Tokuda N, et al. Differential expression of MHC class II antigens and cathepsin L by subtypes of cortical epithelial cells in the rat thymus: an immunoelectron microscopic study. *J. Electron. Microsc.* 51:173-81, 2002.
147. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, et al. The role of the reticulo-epithelial (RE) cell network in the immuno-neuroendocrine regulation of intrathymic lymphopoiesis. *Anticancer Res.* 20:1871-88, 2000.
148. Haddad R, Guimiot F, Six E, et al. Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. *Immunity.* 24:217-30, 2006.

149. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 372:100-3, 1994.
150. Lee CK, Kim JK, Kim Y, et al. Generation of macrophages from early T progenitors in vitro. *J. Immunol*. 166:5964-9, 2001.
151. Kramer BW, Jobe AH, Ikegami M. Monocyte function in preterm, term, and adult sheep. *Pediatr. Res*. 54:52-7, 2003.
152. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol. Life Sci*. 63:60-72, 2006.
153. Fairchild PJ, Austyn JM. Thymic dendritic cells: phenotype and function. *Int .Rev. Immunol*. 6:187-96, 1990.
154. Wacker HH, Radzun HJ, Parwaresch MR. Accessory cells in normal human and rodent lymph nodes: morphology, phenotype, and functional implications. *Curr. Top Pathol*. 84:193-218, 1990.
155. **Manz MG, Traver D, Miyamoto T**, et al. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 97:3333-41, 2001.
156. Raulet DH. Expression and function of interleukin-2 receptors on immature thymocytes. *Nature*. 314:101-3, 1985.
157. Palacios R, Samaridis J, Thorpe D, et al. Identification and characterization of pro-T lymphocytes and lineage-uncommitted lymphocyte precursors from mice with three novel surface markers. *J. Exp. Med*. 172:219-30, 1990.
158. Rossi S, Blazar BR, Farrell CL, et al. Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood*. 100:682-91, 2002.
159. Halin C, Rodrigo Mora J, Sumen C, et al. In vivo imaging of lymphocyte trafficking. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol*. 21:581-603, 2005.
160. Khaled AR, Durum SK. The role of cytokines in lymphocyte homeostasis. *Biotechniques. Suppl.*, 40-5, 2002.
161. Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol*. 75:951-61, 2004.
162. Jin R, Zhang J, Chen W. Thymic output: influence factors and molecular mechanism. *Cell. Mol. Immunol*. 3:341-50, 2006.
163. Kisielow P, von Boehmer H. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58:87-209, 1995.

164. Anderson G, Moore NC, Owen JJT. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14:73–99, 1996.
165. Fowlkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events of T-cell development. *Adv. Immunol.* 44:207–264, 1989.
166. Van Ewijk W, Shores E, Singer A. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol. Today.* 15:214–217, 1994.
167. Van Ewijk W, Hollander G, Terhorst C, et al. Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development.* 127:1583–1591, 2000.
168. Brelinska R, Kaczmarek E, Warchol JB, et al. Distribution of different cell types within the rat thymus in the neonatal period of life. *Cell. Tissue Res.* 240:473–478, 1985.
169. Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Ann. Rev. Immunol.* 13:307–338, 1995.
170. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr. Rev.* 21:412–443, 2000.
171. Goya RG, Console GM, Herenu CB, et al. Thymus and aging: potential of gene therapy for restoration of endocrine thymic function in thymus-deficient animal models. *Gerontology.* 48:325–328, 2002.
172. Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* 22:563–575, 1985.
173. Simpson JG, Gray ES, Beck JS. Age involution in the normal human adult thymus. *Clin. Exp. Immunol.* 19:261–265, 1975.
174. Pido-Lopez J, Imami N, Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. *Clin. Exp. Immunol.* 125:409–413, 2001.
175. Oner H, Ozan E. Effects of gonadal hormones on thymus gland after bilateral ovariectomy and orchidectomy in rats. *Arch Androl.* 48(2):115–26, 2002.
176. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al. T cells and aging. *Front. Biosci.* 7:1056–1183, 2002.
177. Farr A, Sidman ChL. Reduced expression of Ia antigens by thymic epithelial cells of aged mice. *J. Immunol.* 133:98–103, 1984.

178. Aspinall R. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. *J. Immunol.* 158:3037–3035, 1997.
179. Andrew D., Aspinall R. IL-7 and not stem cell factor reverses both the increase in apoptosis and the decline in thymopoiesis seen in aged mice. *J. Immunol.* 166:1524–1530, 2001.
180. Pido-Lopez J, Imami N, Andrew D, et al. Molecular quantitation of thymic output in mice and the effect of IL-7. *Eur. J. Immunol.* 32:2827–2836, 2002.
181. Lacorazza H, Guevara-Patio JA, Weksler ME, Failure of rearranged TCR transgenes to prevent age-associated thymic involution. *J. Immunol.* 163:4262–4268, 1999.
182. Sempowski GD, Hale LP, Sundry JS, et al. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and are associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* 164:2180–2187, 2000.
183. Grabeek-Loebenstein B. Changes in the aging immune system. *Biologicals.* 25:205–208, 1997.
184. Berzins SP, Boyd RL, Miller JFAP. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the peripheral lymphocyte pool. *J. Exp. Med.* 187:1839–1848, 1998.
185. Bertho JM, Demarquay C, Mouliau N, et al. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell. Immunol.* 179:30–40, 1997.
186. Poulin JF, Viswanathan MN, Harris JM, et al. Direct evidence for thymic function in adult human. *J. Exp. Med.* 190:479–486, 1999.
187. Wallin J, Eibel H, Neubuser A, et al. Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development.* 122:23–30, 1996.
188. Screpanti I, Scarpa S, Meco D, et al. Epidermal growth factor promotes a neural phenotype in thymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression. *J. Cell. Biol.* 130:183–192, 1995.
189. Botham CA, Jones GV, Kendall MD. Immuno-characterization of neuroendocrine cells of the rat thymus gland in vitro and in vivo. *Cell. Tissue Res.* 303:381–389, 2001.

190. Ropke C, Van Soest P, Platenburg PP, et al. Common stem cell for murine cortical and medullary thymic epithelial cells? *Dev. Immunol.* 4:149–156, 1995.
191. Bennett AR, Farley A, Blair NF, et al. Identification and characterization of a complete thymic microenvironment by MTS24 thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 3:635–642, 2002.
192. Brelinska R, Ostalska D, Kaczmarek E, et al. Stages of the rat thymic medulla development in foetal period. *Folia Histochem Cytobiol.* 40:171–172, 2002.
193. Rodewald HR, Paul S, Haller C, et al. Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature.* 414:763–768, 2001.
194. Klug DB, Carter C, Crouch C, et al. Independence of cortical thymic epithelial cell differentiation of T lineage commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 95:11822–11827, 1998.
195. Shezen E, Okon E, Ben-Hur H, et al. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell Tissue Res.* 279:221–231, 1995.
196. Van de Wijngaert FP, Kendall MD, Schuurman HJ, et al. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell. Tissue Res.* 237:227–237, 1984.
197. Von Gaudecker B, Steinmann GG, Hansmann M, et al. Immunohistochemical characterization of the thymic microenvironment. A light-microscopic and ultrastructural immunocytochemical study. *Cell. Tissue Res.* 244:403–412, 1986.
198. Farr A, Nakane P. Cells bearing Ia antigens in the murine thymus. An ultrastructural study. *Am. J. Pathol.* 11:88–97, 1983.
199. Colic M, Jovanovic' S, Mitrovic' S, et al. Immunohistochemical identification of six cytokeratin-defined subsets of the rat thymic epithelial cells. *Thymus.* 13:175–185, 1989.
200. Colic' M, Dragojevic'-Simic' V, Gasic S, et al. Interspecies differences in expression of cytokeratin polipeptides within thymic epithelium: a comparative immunohistochemical study. *Dev. Comp. Immunol.* 14:347–354, 1990.
201. Haynes BF, Shimizu K, Eisenbarth GS. Identification of human and rodent thymic epithelium using tetanus toxin and monoclonal antibody A2B5. *J. Clin. Invest.* 71:9–14, 1983.

202. Moll UM. Functional histology of the neuroendocrine thymus. *Microsc. Res. Tech.* 38:300–310, 1997.
203. Savino W. Thymic hormone-containing cells. VI. Immunohistologic evidence for the simultaneous presence of thymulin, thymopoietin and thymosin I in normal and pathological human thymus. *Eur. J. Immunol.* 14:987–991, 1984.
204. Colic' M, Pejnovic' N, Kataranowski M, et al. Rat thymic epithelial cells in culture constitutively secrete IL-1 and IL-6. *Int. Immunol.* 3:1165–1174, 1991.
205. Le PT, Tuck DT, Dinarello ChA, et al. Human thymic epithelial cells produce interleukin 1. *J. Immunol.* 138:2520–2526, 1997.
206. Savino W, Ban E, Ville-Verde DM, et al. Modulation of thymic endocrine function, cytokeratin expression and cell proliferation by hormones and neuropeptides. *Int. J. Neurosci.* 51:201–204, 1990.
207. Malendowicz LK, Brelinska R, DeCaro R, et al. Endothelin-1, acting via the receptor subtype, stimulates thymocyte proliferation in the rat. *Life Sci.* 62:1959–1963, 1998.
208. Trejter M, Warchol JB, DeCaaro R, et al. Studies on the involvement of endogenous neuropeptides in the control of thymocyte proliferation in the rat. *Histol. Histopathol.* 16:155–158, 2001.
209. Farr A, Nelson A, Truex J, et al. Epithelial heterogeneity in the murine thymus: a cell surface glycoprotein expressed by subcapsular and medullary epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* 5:645–653, 1991.
210. Nabarra B, Andrianarison I. Pattern of secretion in thymic epithelial cells: ultrastructural studies of the effect of blockage at various levels. *Cell Tissue Res.* 249:171–178, 1987.
211. Brelinska R, Ostalska D, Zabel M. Subtypes of thymic epithelial cells defined by neuroendocrines markers. *Histochem. Cell Biol.* 114:239–44, 2000.
212. Wekerle H, Ketelsen U, Ernst M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymus. Morphological and serological characterization. *J. Exp. Med.* 151:925–944, 1980.
213. Brelinska R. Thymic nurse cells: division of thymocytes within complexes. *Cell Tissue Res.* 258:637–643, 1989.
214. Brelinska R, Seidel HJ, Kreja L. Thymic nurse cells: differentiation of thymocytes within complexes. *Cell Tissue Res.* 264:175–183, 1991.

215. Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Cartwright J Jr, et al. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 152:2645–2651, 1994.
216. Brelinska R, Warchol JB. Thymic nurse cells: their functional ultrastructure. *Microsc Res Tech.* 38:250–266, 1997.
217. Farr AG, Rudensky A. Medullary thymic epithelium: a mosaic of epithelial ‘self’? *J. Exp. Med.* 188:1–4, 1998.
218. Farr AG, Dooley JI, Erickson M. Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. *Immunol. Rev.* 189:20–27, 2002.
219. Nelson AJ, Hosier S, Brady W, et al. Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 in situ and in vitro. *J. Immunol.* 151:2453–2561, 1993.
220. Dunn RJ, Luedecker CJ, Haugen HS, et al. Thymic overexpression of CD40 ligand disrupts normal thymic organization. *J. Histochem. Cytochem.* 45:129–141, 1997.
221. Klein L, Klein T, Ruther U, et al. CD4 T-cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J. Exp. Med.* 188:5–16, 1998.
222. Klein L, Kyewski B. “Promiscuous” expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med.* 78:483–494, 2000.
223. Lobach DF, Scearce RM, Haynes BF. The human thymic microenvironment. Phenotypic characterization of Hassall’s bodies with the use of monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134:250–257, 1985.
224. Laster A, Itoh T, Palker TJ, et al. The human thymic microenvironment: thymic epithelium contains specific keratins associated with early and late stages of epidermal keratinocyte maturation. *Differentiation.* 31:67–77, 1986.
225. Nicolas JF, Reano A, Kaiserlian D, et al. Epithelial cell heterogeneity in mammalian thymus: monoclonal antibody to high molecular weight keratins exclusively binds to Hassall’s corpuscles. *Histochem. J.* 21:357–364, 1989.
226. Nabarra B, Andrianarison I. Ultrastructural study of thymic microenvironment involution in aging mice. *Exp. Gerontol.* 31:89–506, 1996.
227. Takeoka Y, Chen S, Yago H, et al. The murine thymic microenvironment: changes in age. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111:5–12, 1996.

228. Masunaga A, Sugawara I, Nakamura H, et al. Cytokeratin expression in normal human thymus at different ages. *Pathol. Int.* 47:842–847, 1997.
229. Elcuman EA, Akay MT. Age-dependent immunolocalization of fibronectin and histological changes in the thymus of rats. *Vet. Res. Commun.* 22:525–532, 1998.
230. Consolini R, Legitimo A, Calleri A, et al. Distribution of age-related thymulin titres in normal subjects through the course of life. *Clin. Exp. Immunol.* 121:444–447, 2000.
231. Brelinska R, Seidel HJ, Warchol JB, et al. Murine thymic multicellular complexes during latency period after methylnitrosourea (MNU) injection. *Thymus.* 11:67–75, 1988.
232. Clarke A, Kendall MD. The effects of pregnancy on the mouse thymic epithelium. *Cell Tissue Resch.* 275:309–318, 1994.
233. Brelinska R, Paczkowska A, Kowalska K, et al. Lympho-epithelial interactions in rat thymus during pregnancy. *Folia Histochem Cytobiol.* 40:175–176, 2002.
234. Quaglino D, Capri M, Bergamini G, et al. Age-dependent remodeling of rat thymus. Morphological and cytofluorimetric analysis from birth up to one year of age. *Eur. J. Cell. Biol.* 76:156–66, 1998.
235. Buckland J. The ageing process. *Nat. Rev. Immunol.* 1:31–40, 2001.
236. Ortman CL, Dittmar KA, Witte PL, et al. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int. Immunol.* 14:813–822, 2002.
237. Bar-Dayán Y, Afek A, Bar-Dayán Y, et al. Proliferation, apoptosis and thymic involution. *Tissue Cell.* 31:391–396, 1999.
238. Clark A, McLennan KA. The many facets of thymic involution. *Immunol. Today.* 7:204–205, 1986.
239. Flores KG, Li J, Sempowski GD, et al. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J. Clin. Invest.* 104:1031–1039, 1999.
240. Nishio H, Matsui K, Tsuji H, et al. Immunohistochemical study of tyrosine phosphorylation signaling in Hassall's Corpuscles of the human thymus. *Acta. Histochem.* 101:421–429, 1999.
241. Nishio H, Matsui K, Tsuji H, et al. Immunohistochemical study of tyrosine phosphorylation signaling in the involuted thymus. *Forensic Sci. Int.* 110:189–198, 2000.

242. Dardenne M, Savino W. Neuroendocrine control of the thymic epithelium: modulation of thymic endocrine function, cytokeratin expression and cell proliferation by hormones and neuropeptides. *Prog. Neuroendocrinimmunol.* 3:18–25, 1990.
243. Fabris N, Mocchegiani E, Provinciali M. Plasticity of neuroendocrine-thymus interactions during aging: a minireview. *Cell Mol. Biol.* 43:529–541, 1997.
244. Garcia-Suarez O, Germana A, Hannestad J, et al. Changes in expression of the nerve growth factor receptors TrkA and p75LNGR in the rat thymus with ageing and increased nerve growth factor plasma levels. *Cell Tissue Res.* 301:225–234, 2000.
245. Brelinska R, Ostalska D, Kaczmarek E, et al. Stages of the rat thymic medulla development in foetal period. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 40:171–172, 2002.
246. Glucksmann A, Cherry CP. The effect of castration, oestrogens, testosterone and the oestrous cycle on the cortical epithelium of the thymus in male and female rats. *J Anat.* 103:113–133, 1968.
247. Brelinska R, Zabel M, Paczkowska A. Effects of pregnancy on the rat thymic cortex. *Histochem Cell Biol.* 108:274–275, 1997b.
248. Aspinall R, Andrew D. Immunosenescence: potential causes and strategies for reversal. *Biochem. Soc. Trans.* 28:250–254, 2000.
249. Aspinall R, Andrew D. Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine.* 18:1629–1637, 2000.
250. Blackburn C, Manley N. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 4:278–89, 2004.
251. Bodey B. Neuroendocrine influence on thymic haematopoiesis via the reticulo-epithelial cellular network. *Expert Opin Ther Targets.* 2002 Feb;6(1):57–72, 2002.
252. Garcia-Suarez O, Perez-Perez M, Germana A, et al. Involvement of growth factors in thymic involution. *Microsc. Res. Tech.* 62:514–523, 2003.
253. Hannestad J, Monjil DF, Diaz-Esnal B, et al. Age-dependent changes in the nervous and endocrine control of the thymus. *Microsc. Res. Tech.* 63:94–101, 2004.
254. Mentlein R, Kendall MD. The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments. *Immunol. Today.* 21:133–140, 2000.

255. Geenen V, Kecha O, Martens H. Thymic expression of neuroendocrine self-peptide precursors: role in T-cell survival and self-tolerance. *J Neuroendocrinol.* 10:811-822, 1998.
256. Geenen V. Thymus-dependent T cell tolerance of neuroendocrine functions: principles, reflections, and implications for tolerogenic/negative self-vaccination. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1088:284-296, 2006.
257. Batanero E, de Leeuw FE, Jansen GH, et al. The neural and neuro-endocrine component of the human thymus. II. Hormone immunoreactivity. *Brain. Behav. Immun.* 6:249-264, 1992.
258. De Leeuw FE, Jansen GH, Batanero E, et al. The neural and neuro-endocrine component of the human thymus. I. Nerve-like structures. *Brain. Behav. Immun.* 6:234-248, 1992.
259. Gessi M, Monego G, Lauriola L, et al. Parathyroid hormone-related peptide and Parathyroid hormone-related peptide receptor 1 expression in human thymus. *J. Histochem. Cytochem.* 53:955-962, 2005.
260. Kranz A, Kendall MD, von Gaudecker B. Studies on rat and human thymus to demonstrate immunoreactivity of calcitonin gene-related peptide, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. *J. Anat.* 191:441-450, 1997.
261. Piantelli M, Maggiano N, Larocca LM, et al. Neuropeptide-immunoreactive cells in human thymus. *Brain. Behav. Immun.* 4:189-197, 1990.
262. Raica M, Encica S, Motoc A, et al. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann. Anat.* 188:345-352, 2006.
263. Robert F, Geenen V, Schoenen J, et al. Colocalization of immunoreactive oxytocin, vasopressin and interleukin-1 in human thymic epithelial neuroendocrine cells. *Brain. Behav. Immun.* 5:102-115, 1991.
264. Silva AB, Aw D, Palmer DB. Evolutionary conservation of neuropeptide expression in the thymus of different species. *Immunology.* 118:131-140, 2006.
265. Derbinski J, Gabler J, Brors B, et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202:33-45, 2005.
266. Gillard GO, Farr AG. Features of medullary thymic epithelium implicate postnatal development in maintaining epithelial heterogeneity and tissue-restricted antigen expression. *J. Immunol.* 176:5815-5824, 2006.

267. Gotter J, Brors B, Hergenahn M et al. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosome clusters. *J. Exp. Med.* 199:155-166, 2004.
268. Taubert R, Schwendemann J, Kyewski B. Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: implications for self-tolerance and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 37:838-848, 2007.
269. Tessarolo L. Pleotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:125-137, 1998.
270. Vega JA, Garcia-Suarez O, Hannestad J, et al. Neurotrophins and the immune system. *J. Anat.* 203:1-19, 2003.
271. Lopez-Sanchez N, Frade JM. Control of the cell cycle by neurotrophins: lessons from the p75 neurotrophin receptor. *Histol. Histopathol.* 17:1227-1237, 2002.
272. Hannestad J, Garcia-Suarez O, Huerta JJ, et al. TrkA neurotrophin receptor protein in the rat and human thymus. *Microsc. Res. Tech.* 249:373-379, 1997.
273. Parrens M, Labouyrie E, Groppi A, et al. Expression of NGF receptors in normal and pathological human thymus. *J. Neuroimmunol.* 85:11-21, 1998.
274. Pescarmona E, Pisacane A, Pignatelli E et al. Expression of epidermal and nerve growth factor receptors in human thymus and thymomas. *Histopathology.* 23:39-44, 1993.
275. Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178:207-275, 1998.
276. Katsetos CD, Herman MM, Mork SJ. Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 55:77-96, 2003.
277. Dozier JH, Hiser L, Davis JA, et al. Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. *Breast Cancer Res.* 5:R157-R169, 2003.
278. Draberova E, Lukas Z, Ivanyi D, et al. Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem. Cell. Biol.* 109:231-239, 1998.
279. Roach MC, Boucher VL, Waiss C, et al. Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of β -tubulin: The β isotypes of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 39:273-275, 1998.

280. Gianbianco I, Bianchi R, Ceccarelli P, et al. Neuron-specific protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is also expressed in glioma cell lines and its expression depends on cellular growth state. *FEBS* 290:131-134, 1991.
281. Haley KJ, Drazen JM, Osathanondh R, et al. Comparison of the ontogeny of protein gene product 9.5, chromogranin A and proliferating cell nuclear antigen in developing human lung. *Microsc. Res. Tech.* 37:62-68, 1997.
282. Tokunaga Y, Imai S, Torii R et al. Cytoplasmic liberation of protein gene product 9.5 during the seasonal regulation of spermatogenesis in the monkey (*macaca fuscata*). *Endocrinology.* 140:1875-1883, 1999.
283. Kanavaros P, Stefanaki K, Rontogianni D, et al. Immunohistochemical expression of p53, p21/waf1, Rb, p16, cyclin D1, p27, Ki67, cyclin A, cyclin B1, bcl2, bax and bak proteins and apoptotic index in normal thymus. *Histol. Histopathol.* 16:1005-1012, 2001.
284. Kanavaros P, Stefanaki S, Vlachonikolis J, et al. Expression of p53, p21/waf-1, bcl-2, bax, Rb and Ki-67 proteins in Hodgkin's lymphomas. *Histol. Histopathol.* 15:445-453, 2000.
285. Stefanaki S, Rontogianni D, Kouvidou C, et al. Immunohistochemical expression of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf-1 proteins in thymomas. *Histopathology.* 30:549-555, 1997.
286. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Peters EM et al. Epithelial growth control by neurotrophins: leads and lessons from the hair follicle. *Prog. Brain. Res.* 146:493-513, 2004.
287. Chiarenza A, Lazarovici P, Lempereur L, et al. Tamoxifen inhibits nerve growth factor-induced proliferation of the human breast cancerous cell line MCF-7. *Cancer Res.* 61:3002-3008, 2001.
288. Kyewski B, Derbinski J, Gotter J et al. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol.* 23:364-371, 2002.
289. Moran CA, Suster S. Neuroendocrine carcinoma (carcinoid tumor) of the thymus: a clinicopathologic analysis of 80 cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 114:100-110, 2000.
290. Kuo TT. Cytokeratin profiles of the thymus and thymomas: histogenetic correlations and proposal for a histological classification of thymomas. *Histopathology.* 36:403-414, 2000.

291. Bodey B, Bodey BJr, Kemshead JT, et al. Identification of neural crest derived cells within the cellular microenvironment of the human thymus employing a library of monoclonal antibodies raised against neuronal tissues. *In Vivo*. 10:39-47, 1999.
292. Jones GV, Botham CA, Clarke AG et al. Immunoreactivity of neural crest-derived cells in thymic tissue developing under the rat kidney capsule. *Brain. Behav. Immun.* 12:163-180, 1998.
293. Rossi SW, Jenkinson WE, Anderson G and Jenkinson EJ: Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*. 441:988-991, 2006.
294. Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*. 11:1245-1256, 1997.
295. Garcia-Suarez O, Germana A, Hannestad J, et al. Involvement of the NGF receptors (Trka and p75^{Ngfr}) in the development and maintenance of the thymus. *Ital. J. Anat. Embryol.* 106:279-285, 2001.
296. Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O, Prieto JG, et al. Thymocyte depletion affects neurotrophin receptor expression in thymic stromal cells. *J. Anat.* 208:231-238, 2006.
297. Yoon S, Lee HW, Baek SY, et al. Upregulation of TrkA neurotrophin receptor expression in the thymic subcapsular, paraseptal, perivascular, and cortical epithelial cells during thymus regeneration. *Histochem. Cell. Biol.* 119:55-68, 2003.
298. Tabassum A, Khwaja F, Djakiev D. The p75 (NTR) tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. *Int. J. Cancer*. 105:47-52, 2003.
299. Ranganathan S, Salazar H, Benetatos CA, et al. Immunohistochemical analysis of β -tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *The Prostate*. 30:263-268, 1997.
300. Renthall R, Schneider BG, Miller NM et al. β IV is the major β -tubulin isotype in bovine cilia. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 25:19-29, 1993.
301. Fukai I, Masaoka A, Hashimoto T, et al. Cytokeratins in normal thymus and thymic epithelial tumors. *Cancer*. 71, 99-105, 1993.
302. Schezen E, Okon E, Ben-Hur H, et al. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell Tissue Res*. 279, 221-231, 1995.

303. Evans V, Cameron P and Lewin S. Human thymic dendritic cells: Regulators of T cell development in health and HIV-1 infection. *Clinical Immunology*, 126, 1-12, 2008.
304. Schmitt N, Cumont MC, Nureyre MT, et al. Ex vivo characterization of human dendritic cells subsets. *Immunobiology*. 212, 167-177, 2007.
305. Vars A, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Jimenez E, et al. Age-dependent changes in Thymic Macrophages and dendritic cells. *Microscopy Research and Technique*. 62, 501-507, 2003.
306. Bodey B, Siegel SE, Kaise HE. Antigen presentation by dendritic cells and their significance antineoplastic immunotherapy. *In Vivo*. 18, 81-100, 2004.
307. Nishio H, Matsui H, Tsuji A, et al. Immunolocalization of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in Hassall's corpuscles of the human thymus. *Acta Histochem*. 103, 89-98, 2001.
308. Zaiteseva M, Kawamura R, Loomis H, et al. Stromal derived factor 1 expression in the human thymus. *J. Immunol*. 168, 2609-2617, 2002.
309. Friend SI, Hosier A, Nelson D, et al. Athymic stromal line supports in vitro development of surface IgM+B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol*. 22, 321-328, 1994.
310. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol*. 3, 673-680, 2002.
311. Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, et al. CD25+CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med*. 199, 1467-1477, 2004.
312. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD+CD25+ regulatory T cells in the human thymus. *Nature*. 436, 1181-1185, 2005.
313. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*. 35, 1886-1894, 1999.
314. Bodey B, Kaiser HE. Development of Hassall's bodies of the thymus in humans and other vertebrates (especially mammals) under physiological and pathological conditions: immunohistochemical, electronmicroscopic and in vitro observations. 11, 61-85, 1997.

315. Cox LS, Hupp T, Midgley CA, et al. A direct effect of activated p53 on nuclear DNA replication. *EMBO J.* 14, 2099-2105, 1995.
316. Reznifoff CA, Yeager TR, Belair CD, et al. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papilloma virus 16E6 but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.* 56, 2886-2890, 1996.
317. Uhrborm L, Nister M, Wastermark B. Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16/INK4A. *Oncogene.* 15, 505-514, 1997.