

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LENF DÜĞÜMÜ STROMAL BİLEŞENLERİNİN IŞIK  
MİKROSKOBU, ELEKTRON MİKROSKOBU VE  
İMMUNOHİSTOKİMYA YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ**

**Dr. E. Elif Güzel**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır.**

**Danışman Öğretim Üyesi**  
**Prof. Dr. Attila Dağdeviren**

**Ankara**  
**2005**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezi çalışmamın gerçekleşmesi için konumun seçiminde ve tezimin her aşamasındaki çalışmalarımda bana yol gösteren, destek olan ve yardımını hiç esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Attila Dağdeviren'e, ayrıca bana her türlü desteği sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Esin Aşan olmak üzere tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve aileme en derin saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Metin Önerci ve sayın Dr. Çağdaş Elsürer'e tezim için gerekli dokuları sağlamama yardımcı oldukları için teşekkür ederim.



## ÖZET

**Güzel E.E., Lenf Düğümü Stromal Bileşenlerinin Işık Mikroskobu, Elektron Mikroskobu ve İmmunohistokimya Yöntemleriyle İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2005.** Bağışıklık yanıtı, çeşitli lenfosit alt gruplarının diğer hücrelerle etkileşimi sonucunda göç, uyarılma, çoğalma ve farklanma gibi pek çok sürecin kontrollü biçimde olaylanmasına bağlı olarak gerçekleşir. Bu çalışmada özel hücre gruplarını tanımlamaya yardımcı çeşitli yöntemler kullanılarak lenf düğümü yapısı ayrıntılı olarak incelenmiş, retiküler ağ, sinüs endoteli, yüksek endotelli venülleri oluşturan bileşenler ve ilişkileri tanımlanmaya çalışılarak henüz açıklık kazanmamış konulara ışık tutulması amaçlanmıştır. Rutin yöntemlere ek olarak çinko iyodit-ozmiyum tetroksit ve immünohistokimyasal işaretlemelerle incelemeler gerçekleştirilmiştir. Fibroblastik retiküler hücrelerin retiküler liflerle birlikte oluşturdukları retiküler ağ ayrıntılı olarak incelenmiş, bu ağın oluşturduğu kanalcık ve koridor olarak tanımlanan lenf düğümü işlevini anlamaya yönelik kompartmanlarla ilgili değerlendirmeler yapılmıştır. Hücrelerin daha kolay tanımlanabilmeleri için antijenik profilleri belirlenmiş, kullanılan tüm yöntemlerle hücre gruplarının birbirleriyle olan ilişkileri saptanmıştır. İncelemelerimiz sonucunda, kullandığımız yöntemlerin yüksek endotelli venüller, sinüs endoteli ve fibroblastik retiküler hücreleri ve bunların birbirleriyle olan ilişkilerini ayrıntılı olarak ortaya koyduğunu, kanalcıkların kapalı bir sistem oluşturmadıklarını, kapiller-yüksek endotelli venül geçişinin keskin bir yapısal değişimle gerçekleştiğini, lenfositlerin yüksek endotelli venül duvarından transsellüler yolla da geçtiğini belirledik. Bulgularımızdan bazıları konuyla ilgili tartışmalı noktalara açıklık kazandıracak, diğerleri ileride gerçekleştirilecek çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

**Anahtar kelimeler:** Fibroblastik retiküler hücre, yüksek endotelli venül, immünohistokimya, elektron mikroskobu, çinko iyodit-ozmiyum tetroksit

## ABSTRACT

**Güzel E.E., Light Microscopic, Electron Microscopic and Immunohistochemical Examination of Lymph Node Stromal Components, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Thesis Prepared for the Speciality Degree, Ankara, 2005.** Immune responses develop by the complex interaction of lymphocyte subgroups with other cell types, to undergo well controlled processes such as migration, activation, proliferation and differentiation. In this study, the lymph node structure is examined in detail using several techniques which help to outline special cell groups within the organ; an attempt is made to obtain evidence concerning reticular network, sinus endothelium, high endothelial venules, its associated components and the relations between them to clear up some unresolved points. Zinc iodide-osmium tetroxide and immunohistochemistry are also used in addition to routine techniques. Reticular network is examined, with special emphasis on compartments such as corridors and conduits as parts of it, to evaluate the hypotheses which are introduced to explain its function. We also established the antigenic profiles of the cells in order to distinguish these cells easily to observe the structural relationship between various cell groups using these techniques. As a result of our findings we concluded that, reticular network and its structural relationship with high endothelial venules, sinus endothelium can be demonstrated in detail using both techniques, conduits do not form an entirely closed system, transition from capillaries to high endothelial venules occurs as an abrupt structural change, lymphocytes can migrate through high endothelial venules via a transcellular route. Some of our findings clarify unresolved points on lymph node structure while others represent suggestions for further studies.

**Keywords:** Fibroblastic reticular cell, high endothelial venule, immunohistochemistry, electron microscopy, zinc iodide-osmium tetroxide

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Lenf Düğümü	2
2.2. Lenf Düğümünün Yapısal Bileşenleri ve Tanımlanmış Kompartmanları	2
2.2.1. Korteks (Dış Korteks)	4
2.2.2. Parakorteks (Derin Korteks, İç Korteks)	4
2.2.3. Medulla	4
2.3. Lenf Düğümü Gelişmesi	5
2.4. Lenf Düğümündeki Hücre Grupları	6
2.4.1. B Lenfositler	6
2.4.2. T Lenfositler	7
2.4.3. Makrofajlar	7
2.4.4. Antijen Sunucu Hücreler	7
2.4.5. Retiküler Hücreler	7
2.5. Fibroblastik Retiküler Hücreler ve Lenf Düğümünün Retiküler Çatısı	10
2.6. Lenf Düğümünün Sinüs ve Damar Çatısı, Yüksek Endotelli Venüller	13
2.6.1. Lenf Düğümünde Lenf Sıvısının Akışı	13
2.6.2. Lenf Düğümünde Kan Dolaşımı	14
2.6.3. Yüksek Endotelli Venüller Aracılığıyla Lenfosit Göçü	14
2.6.4. Lenfositlerin Lenf Düğümü İçindeki Yerleşimleri, Kemokinlerin Rolü	15
2.6.5. Lenf Sinüsleri	16
2.7. Lenf Düğümünün Stromal Hücrelerini İncelemek İçin Kullanılan	

Histokimyasal Yöntemler	17
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>19</b>
3.1. Gereç	19
3.1.1. Doku Örneklerinin Alınması	19
3.2. İmmünohistokimya Yöntemi	19
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması	19
3.2.2. Kullanılan Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması	20
3.2.3. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Yöntemi	26
3.2.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Kontrol Boyaması	27
3.2.5. İndirekt immünoperoksidaz Boyamasını Değerlendirme	27
3.2.6. İndirekt İmmünofloresan Boyama Yöntemi	27
3.2.7. İmmünofloresan Kontrol Boyaması	28
3.2.8. İmmünofloresan Boyamasını Değerlendirme	28
3.3. Transmisyon Elektron Mikroskopik İnceleme Yöntemi	29
3.3.1. Örneklerin Hazırlanması	29
3.3.2. Kullanılan Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması	29
3.3.3. Elektron Mikroskop Doku Takibi Yöntemi	31
3.3.4. Değerlendirme	31
<b>BULGULAR</b>	<b>32</b>
4.1. Işık Mikroskobu Bulguları	32
4.2. Elektron Mikroskobu Bulguları	42
4.3. İmmünohistokimya Bulguları	71
4.3.1. Başlıca T Lenfositlerde Reaktivite Gösteren Antijenler	71
4.3.2. Başlıca Makrofajlar ve Makrofaj + Dendritik Hücrelerde Bulunan Antijenler	78
4.3.3. Başlıca Retiküler Hücre Gruplarında Bulunan Antijenler	87
4.3.4. Endotel Hücrelerinde Bulunan Antijenler	97
4.3.5. Çeşitli Hücre Gruplarında Yaygın Dağılım Gösteren Antijenler	105
<b>TARTIŞMA</b>	<b>107</b>
<b>SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>129</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>131</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

BSA	Bovin Serum Albumin (Sığır serum albumini)
CD	Clusters of Differentiation
ÇİO	Çinko iyodit-ozmiyum tetroksit (Zinc iodide-osmium tetroxide-ZİO)
DAB	3,3'- diaminobenzidin tetrahidroklorür
FRH	Fibroblastik Retiküler Hücre (Fibroblastic Reticular Cell-FRC)
FDH	Foliküler Dendritik Hücre (Follicular Dendritic Cell-FDC)
GM	Germinal Merkez
Ig	İmmünoglobulin
İDH	İnterdijitasyon yapan dendritik hücre (Interdigitating Dendritic Cell-IDC)
IL	İnterlökin
kD	kilo Dalton
LT	Lenfotoksin
MHC	Major Histocompatibility Complex (Majör doku uyumluluk antijenleri)
NK	Natural Killer Cell (Doğal öldürücü hücre)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat tamponlu serum fizyolojik)
SDH	Sinüs Döşeyen Hücre (Sinus Lining Cell-SLC)
TCR	T Cell Reseptor (T hücre reseptörü)
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor)
VLA	Very Late Activation Antigen
YEV	Yüksek Endotelli Venül (High endothelial venule-HEV)

## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1	Lenf düğümü ve bölümlerinin şematik görünümü	3
4.1.1	İnsan lenf düğümünde afferent lenfatığın subkapsüler sinüse açılımını gösteren yarı ince kesit mikrograf	33
4.1.2	Sıçan lenf düğümü korteksi yarı ince kesit mikrografı	34
4.1.3	Sıçan lenf düğümü subkapsüler ve trabeküler sinüs yarı ince kesit mikrografı	35
4.1.4	Sıçan lenf düğümü subkapsüler sinüs, sinüs döşeyen ve çaprazlayan hücreler yarı ince kesit mikrografı	36
4.1.5	İnsan lenf düğümü yüksek endotelli venül uzunlamasına kesiti yarı ince kesit mikrografı	37
4.1.6	İnsan lenf düğümü YEV yarı ince kesit mikrografı	38
4.1.7	Sıçan lenf düğümünde kapillerin keskin bir sınırla yüksek endotelli venüle dönüşümü yarı ince kesit mikrografı	39
4.1.8	Sıçan lenf düğümü ÇİO (+) fibroblastik retiküler hücre yarı ince kesit mikrografı	40
4.1.9	Sıçan lenf düğümü medullasında ÇİO(+) boyanmış hücre grupları yarı ince kesit mikrografı	41
4.2.1	Lenf düğümünde ÇİO (+) FRH elektronmikrografı	43
4.2.2	Lenf düğümü parakorteksinde ÇİO (-) FRH uzantısı tarafından büyük ölçüde sarılmış bir kanalcık elektronmikrografı	44
4.2.3	Lenf düğümünde aktif bir FRH'ye ait hücre gövdesi elektronmikrografı	45
4.2.4	Lenf düğümünde FRH uzantıları arasındaki desmozom elektronmikrografı	46
4.2.5	Lenf düğümü parakorteksinde lenfositler arasında uzanan bir FRH uzantısı içinde kanalcıkları gösteren elektronmikrograf	47
4.2.6	Lenf düğümü parakorteksinde kanalcıkları gösteren elektronmikrograf	48



4.2.7	Lenf düğümü parakortesinde kanalcık elektronmikrografi	49
4.2.8	Lenf düğümü parakortesinde kanalcık elektronmikrografi	50
4.2.9	Lenf düğümü parakortesinde FRH uzantısının çepeçevre sardığı retiküler liflere ait elektronmikrograf	51
4.2.10	Lenf düğümü parakortesinde lenfositler arasında uzanan FRH uzantısına ait elektronmikrograf	52
4.2.11	Lenf düğümünde komşu hücrelere ait uzantılarla sarılı bir kanalcık elektronmikrografi	53
4.2.12	Lenf düğümü parakortesinde bir makrofaj uzantısı içinden geçen ÇİO (-) FRH uzantısını gösteren elektronmikrograf	54
4.2.13	Lenf düğümünde makrofaj uzantısı tarafından sarılı kanalcık duvarındaki kesintiyi gösteren elektronmikrograf	55
4.2.14	Lenf düğümünde makrofaj uzantısı tarafından sarılı kanalcık duvarındaki kesintiyi gösteren elektronmikrograf	56
4.2.15	Lenf düğümünde kanalcık duvarı elektronmikrografi	57
4.2.16	Lenf düğümünde ÇİO (+) makrofaj elektronmikrografi	58
4.2.17	Lenf düğümü medullasında dejenere plazma hücresini fagosite etmiş ÇİO (+) makrofaj elektronmikrografi	59
4.2.18	Lenf düğümünde YEV duvarı elektronmikrografi	60
4.2.19	Lenf düğümünde YEV duvarı elektronmikrografi	61
4.2.20	Lenf düğümünde YEV duvarından göç etmekte olan lenfositlere ait elektronmikrograf	62
4.2.21	Lenf düğümünde YEV ve periferik bölümü elektronmikrografi	64
4.2.22	Lenf düğümünde YEV periferik bölümü elektronmikrografi	65
4.2.23	Lenf düğümünde YEV bazal kompartmanı elektronmikrografi	66
4.2.24	Lenf düğümünde YEV bazal kompartmanı elektronmikrografi	67
4.2.25	Lenf düğümünde sinüs lümeni ve yakın komşuluğunun izlendiği elektronmikrograf	68
4.2.26	Lenf düğümünde subkapsüler sinüs iç duvarına ait elektronmikrograf	69
4.2.27	Lenf düğümünde subkapsüler sinüs dış duvarı ve sinüs döşeyen hücrenin görüldüğü elektronmikrograf	70

4.3.1	Lenf düğümünde CD2 immünoaktivitesi (peroksidaz)	72
4.3.2	Lenf düğümünde CD7 immünoaktivitesi (peroksidaz)	73
4.3.3	Lenf düğümünde CD8 immünoaktivitesi (peroksidaz)	74
4.3.4	Lenf düğümünde CD50 immünoaktivitesi (peroksidaz)	75
4.3.5	Lenf düğümünde CD50 immünoaktivitesi (peroksidaz)	76
4.3.6	Lenf düğümünde CD43 immünoaktivitesi (peroksidaz)	77
4.3.7	Lenf düğümünde FB21 immünoaktivitesi (peroksidaz)	78
4.3.8	Lenf düğümünde CD11c immünoaktivitesi (peroksidaz)	79
4.3.9	Lenf düğümünde CD11c immünoaktivitesi (flöresan)	80
4.3.10	Lenf düğümünde CD68 immünoaktivitesi (peroksidaz)	81
4.3.11	Lenf düğümünde 2D7 immünoaktivitesi (peroksidaz)	82
4.3.12	Lenf düğümünde 2D7 immünoaktivitesi (flöresan)	83
4.3.13	Lenf düğümünde HI272 immünoaktivitesi (peroksidaz)	84
4.3.14	Lenf düğümünde E63-880 immünoaktivitesi (peroksidaz)	85
4.3.15	Lenf düğümünde E63-880 immünoaktivitesi (flöresan)	86
4.3.16	Lenf düğümünde CD49a immünoaktivitesi (peroksidaz)	87
4.3.17	Lenf düğümünde CD49a immünoaktivitesi (peroksidaz)	88
4.3.18	Lenf düğümünde B-D46 immünoaktivitesi (peroksidaz)	89
4.3.19	Lenf düğümünde CD90 immünoaktivitesi (flöresan)	90
4.3.20	Lenf düğümünde CD90 immünoaktivitesi (flöresan)	91
4.3.21	Lenf düğümünde Vimentin immünoaktivitesi (flöresan)	92
4.3.22	Lenf düğümünde Vimentin immünoaktivitesi (flöresan)	93
4.3.23	Lenf düğümünde 80373 immünoaktivitesi (flöresan)	94
4.3.24	Lenf düğümünde 80373 immünoaktivitesi (flöresan)	95
4.3.25	Lenf düğümünde LT-ND4 immünoaktivitesi (peroksidaz)	96
4.3.26	Lenf düğümünde CD31 immünoaktivitesi (peroksidaz)	98
4.3.27	Lenf düğümünde CD49c immünoaktivitesi (peroksidaz)	99
4.3.28	Lenf düğümünde CD49f immünoaktivitesi (peroksidaz)	100
4.3.29	Lenf düğümünde CD54 immünoaktivitesi (peroksidaz)	101
4.3.30	Lenf düğümünde CD54immünoaktivitesi (peroksidaz)	102
4.3.31	Lenf düğümünde CD146 immünoaktivitesi (peroksidaz)	103
4.3.32	Lenf düğümünde CD143 immünoaktivitesi (peroksidaz)	104

**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
3.1	İnsan lenf düğümü örneği olarak kullanılan materyalin yaşa, cinsiyete ve tanıya göre dağılımı	19
3.2	Kullanılan primer antikorların özgüllüğü, klon adı ve kaynağı	22



## GİRİŞ

Çoğu klasik kaynaklara girmiş yoğun veri birikiminin varlığına karşın lenf düğümü stromasının ve mikroçevresinin yapısal özellikleri ve birbirleri ve lenfositlerle olan işlevsel ilişkileri henüz tam olarak açıklanmış değildir. Gözlem ve deneylere dayanılarak konuya ilişkin çeşitli hipotezler ileriye sürülmüştür. Lenf düğümünde, lenfositlerin çevre dokudan tümüyle ayrılmış bir hücre ve hücrelerarası madde çatısı içinde bulunup bulunmadıkları organın işlevinin anlaşılması açısından son derece önemlidir.

Bu tez çalışmasında, elektron mikroskobu ve immünohistokimya yöntemlerini kullanarak lenf düğümü stromal bileşenlerinin ve mikroçevresinin antijenik profilini ve ince yapı düzeyindeki yapısal özelliklerini araştırarak bazı sorulara yanıt verecek yeni ipuçları elde etmek amaçlanmıştır.

Çalışmada subkapsüler sinüs yapısının ayrıntılı tanımlanması, kesintisiz bir hücre örtüsüyle çevrenip çevrenmediğinin saptanması, dış ve iç sinüs örtüsü arasında bir fark olup olmadığının aydınlatılması, retiküler ağın yapısal özelliklerinin tanımlanması, sinüs döşeyici-çaprazlayan hücre ve perisitler ile fibroblastik retiküler hücre arasındaki yapısal ilişkinin saptanması, fibroblastik retiküler hücre ve yüksek endotelli venül periferel kompartmanları arasındaki yapısal ilişkinin tanımlanması hedef alınmıştır.

Belirlenen hedefler doğrultusunda çalışmada geniş bir yüzey antijeni paneli kullanılarak tarama yapılmıştır. Hem iyi bilinen klasik yüzey antijenlerinden bazılarının dağılım özellikleri ele alınmış, hem de tanımlayıcı immünoreaktivitesi bulunan antijenlere karşı daha önce literatürde bildirilmemiş yeni geliştirilmiş monoklonal antikorlara ait veriler araştırma kapsamında değerlendirilmiştir. Hedef hücre grupları arasında fibroblastik retiküler hücreler, sinüs döşeyici-çaprazlayan hücreler, folliküler dendritik hücreler, endotel hücreleri (yüksek endotelli venül, arter/arteriyol, ven/venül ve kapiller endoteli), lenfositler, interdijitasyon yapan dendritik hücreler ve makrofajlar yer almıştır.

## GENEL BİLGİLER

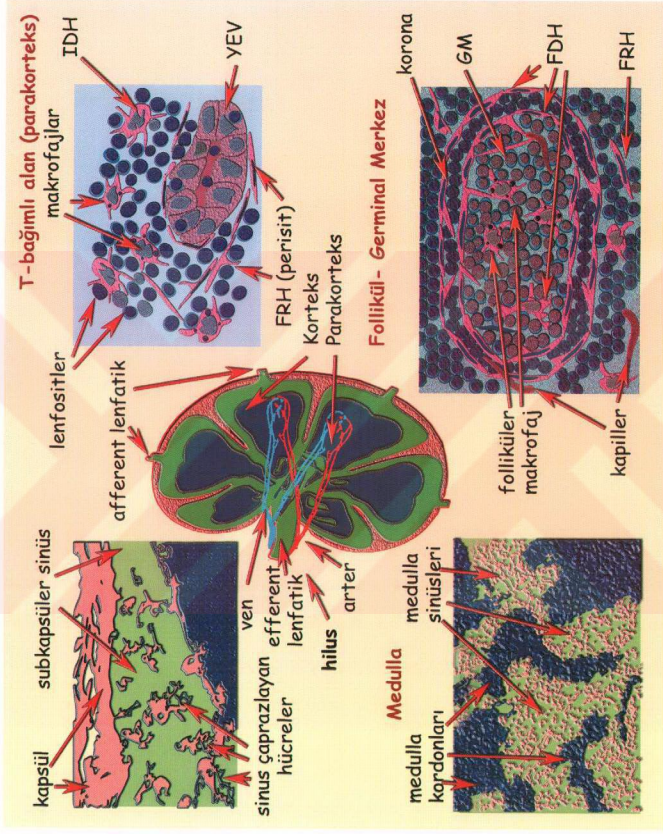
### 2.1. Lenf Düğümü

Lenf düğümleri, lenf yoluyla ulaşan mikroorganizma ve diğer yabancı maddelerin (antijenlerin) ortadan kaldırılması için filtre işlevi gören lenf damarları boyunca yerleşmiş küçük, etrafı kapsülle çevrili, oval biçimli, lenfoid organlardır. Başlıca boyun, koltuk altı, kasık, büyük damarlar boyunca ve vücut boşlukları içinde olmak üzere vücudun birçok bölgesinde bulunurlar. Doku sıvısı kökenli lenf, dolaşıma girmeden önce en az bir lenf düğümünden süzülür. Lenf organdan süzülürken içeriğini savunma hücrelerine (makrofajlar, lenfositler, antijen sunucu hücreler) sunar. Lenf, sinüslerden geçerken içindeki antijen ve diğer artıkların yaklaşık % 99'u makrofajların fagositik aktivitesi ile ortadan kaldırılır. Lenfin akış hızı lenf düğümüne girmesiyle azalır, böylece sinüslerde yerleşen makrofajlara yabancı maddeleri fagosite etmeleri için daha fazla zaman verilmiş olur (4, 22, 34).

Primer lenfoid organlarda (kemik iliği ve timus) gelişen B ve T lenfositler uyarıldıklarında kan yoluyla göç ederek, çoğalıp farklanmalarını tamamlayacakları sekonder (periferik) lenfoid organlardan biri olan lenf düğümlerine ulaşırlar (28, 34).

### 2.2. Lenf Düğümünün Yapısal Bileşenleri ve Tanımlanmış Kompartmanları

Lenf düğümlerinde afferent lenf damarlarının katıldığı konveks bir yüzey ile arterlerin ve sinirlerin girdiği, venlerin ve efferent lenf damarlarının organı terkettikleri hilus (hilum) adı verilen konkav bir çukurluk vardır. Organı dıştan saran düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki kapsül organın içine trabekül denilen bölmeler gönderir. Lenf düğümünün çatısını oluşturan üç boyutlu retiküler çatı, kapsüle ve trabeküllere tutunur. Histolojik olarak, lenf düğümü korteks, parakorteks ve medulla olmak üzere üç alt bölüme ayrılır; ayrıca içerdikleri hücre tipleri ve buna bağlı olarak işlevleri farklı olan T-bağımlı ve B-bağımlı alanlar tanımlanmıştır (4, 22, 34). Lenf düğümlerinin ana kompartmanlarını oluşturan bileşenler aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Lenf düğümü ve bölümlerinin şematik görünümü. IDH: interdigitasyon yapan dendritik, YEV: Yüksek endotelili venül, GM: Germinal merkez, FDH: Folliküler dendritik hücre, FRH: Folliküler dendritik hücre, FRH: Fibroblastik retiküler hücre.

### 2.2.1. Korteks (Dış Korteks)

Dış korteksin çevresinde, dıştan kapsül içten dış korteksle sınırlanmış olan, subkapsüler (marjinal) sinüs vardır. Afferent lenf damarları lenf düğümünün konveks yüzeyinden kapsülü delerler ve içlerindeki lenf sıvısı kapsülün hemen altında yerleşmiş olan subkapsüler sinüse boşalır. Subkapsüler sinüs, kortikal (trabeküler) sinüsler ile devam eder ve lenf sıvısı kortikal sinüslerin ardından medulla sinüslerinin içinden geçerek efferent lenf damarlarına ulaşır. Dış korteks içindeki küresel ya da ovoid (yumurta biçimli) yapılara lenf follikülleri (nodülleri) denir. Primer lenf follikülleri, hem uyarılmamış (virjin) hem de bellek B lenfositleri içerir. Antijene karşı koyuş sırasında germinal merkezin oluşmasıyla primer lenf follikülü sekonder lenf follikülüne dönüşür. Sekonder lenf follikülündeki germinal merkezler bellek B lenfositlerin ve plazma hücrelerinin üretim yeridir (4, 22, 34, 53).

### 2.2.2. Parakorteks (Derin Korteks, İç Korteks)

Lenf düğümünün dış korteks ve medulla arasındaki kısmı parakorteks adını alır. Parakorteks, lenf düğümünün timus-bağımlı bölgesi olup çoğunlukla T lenfositleri içerir. Antijen sunucu hücreler, örneğin derinin Langerhans hücreleri ya da mukozadaki dendritik hücreler, yüzeylerindeki epitop-MHC-II kompleksini yardımcı T lenfositlere sunmak için lenf düğümünün bu bölgesine göç ederler. Lenfositler, parakortekste yerleşmiş özelleşmiş postkapiller venüller olan yüksek endotelli venül (YEV; high endothelial venule: HEV)'lerin duvarından geçerek kan dolaşımından lenf düğümüne göç ederler. B lenfositler dış kortekse göç ederken, T lenfositlerin çoğu parakortekste kalır (22, 53).

### 2.2.3. Medulla

Medulla, geniş lenf sinüslerinden ve bu sinüslerin arasını dolduran, medulla kordonları olarak adlandırılmış, kümeler halinde düzenlenmiş lenfoid hücrelerden oluşur. Medulla kordonlarını oluşturan hücreler (lenfositler, plazma hücreleri ve makrofajlar), retiküler hücrelerin retiküler liflerle birlikte oluşturduğu ağın içinde yerleşirler. Medulla sinüsleri lenfle dolu düzensiz

boşluklardır; bu sinüslerdeki başlıca hücre gruplarını, makrofajlar, retiküler hücreler ve lenfositler oluşturur. Medulla sinüslerinin lümeni içinde bulunan retiküler hücreler kendilerine bağlı makrofajlar ile birlikte ağ oluştururlar (22, 34, 52).

### 2.3. Lenf Düğümü Gelişmesi

Lenfatik kapiller ve damarlar fertilizasyondan sonraki 5. haftanın sonundan itibaren splanknoplevrik mezoderimde vaskülogenezis ve anjiyogenezis yoluyla gelişir (42). Kan damarlarının gelişim sürecinde mezenşimal hücreler bir araya gelerek anjiyoplastik hücre kümelerini oluştururlar ve bunların merkezinde yerleşen hücrelerden kan hücreleri gelişirken, dış kısmındaki hücreler endotel hücrelerine farklılaşırlar. Gelişen bu ilkel kapillerlerin ağzlaşmasıyla pleksuslar, bunlardan da ilkel damarlar gelişir. Benzer şekilde gelişen lenf kapillerleri ağzlaşarak lenfatik pleksusları ve keseleri oluştururlar, bunlar da lenfositlerin bölgeye göçünden sonra bir grup lenf düğümüne farklılaşırlar. Lenfatik damarlar yakınlarındaki yeni gelişmiş lenf düğümlerine açılırlar. Lenf düğümü taslağını oluşturan lenfatik ağından derinlere doğru ilerleyen mezenşimal hücreler organın lenf sinüsü ağını daha da geliştirirler. Organa komşu mezenşimal hücreler ise lenf düğümünün kapsülünü ve bağ dokusu çerçevesini yaparlar (48, 56).

Lenfositler, vitellus kesesi mezenşimindeki primitif kök hücrelerden ve ileri dönemde karaciğer ve dalaktaki öncüllerinden farklılaşırlar. Lenfosit yapımı daha sonra kemik iliğinde gerçekleşir. Doğumdan önce lenf düğümlerine timusta olgunlaşan lenfositler katılırlar (48).

Sıçanlarda gebeliğin 16. gününde (E.16), T lenfositler W3/13 monoklonal antikoru ile fetal karaciğerde tanınabilirler. Karaciğer embriyoda B lenfosit farklılaşmasının major bölgesidir. B lenfositler gebeliğin 19. gününden (E.19) itibaren yüzey IgM ekspresyonuyla fetal sıçan karaciğerinde tanınabilirler. Sıçan fetüslerinde lenfositler diapedez yoluyla venöz damarlardan lenf düğümü alanlarına göç ederler. Fetal lenf düğümlerinde B lenfositler gösterilememiştir ve B lenfositlerin lenf düğümlerinde ortaya çıkması doğumdan sonraki ilk haftaya kadar



gerçekleşmemektedir. Lenf düğümünün B lenfosit kompartmanında primer folliküller ilk olarak doğumdan 2 hafta sonra, sekonder folliküller ise 3 hafta sonra belirlenmiştir. İnterdijitasyon yapan dendritik hücre (IDH; Interdigitating dendritic cell: IDC)'ler erken dönemde T lenfositlerle aynı zamanda ortaya çıkarlar. T hücre kompartmanı B hücre kompartmanından daha erken tam olgunluğa ulaşmaktadır (59).

Lenf düğümü ve diğer sekonder lenfoid organların gelişimi hematopoetik kökenli ve hematopoetik kökenli olmayan hücrelerin karşılıklı etkileşimine dayanan karmaşık bir süreçtir. TNF/LT (Tümör nekroz faktörü/lenfotoksin; tumor necrosis factor/lymphotoxin) ailesine ait olan kemokin ve sitokinler lenf düğümü organogenezinin başlangıç aşamalarında önemli rol oynayan sinyal molekülleridir. CXCL13, CCL21 ve CCL19 gibi homeostatik kemokinlerin ve reseptörleri olan CXCR5 ve CCR7'nin lenfoid organların gelişmesi ve lenfoid doku mikroyapısının oluşturulması ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (49). Ancak B ve T lenfositlerce üretilen lenfotoksin  $\beta$ 'nin, sekonder lenfoid organlardan dalağın yapısal gelişimini ve organizasyonunu etkilemekle birlikte, lenf düğümünde bu yönde bir etkisinin olmadığı literatürde bildirilmiştir. B ve T lenfositlerin zarında kompleks olarak bulunan lenfotoksin  $\beta$ 'nin olmayışının lenf düğümünde lenfosit yerleşiminde önemli rol oynayan kemokinlerden CXCL13, CCL21 ve CCL19 düzeylerini etkilemediği gösterilmiştir (71). Lenfotoksin, yalnızca sekonder lenfoid dokuların organogenezi için değil, mikromimarilerinin sağlanması için de önemli olan bir sinyal molekülüdür (21).

## **2.4. Lenf Düğümündeki Hücre Grupları**

### **2.4.1. B Lenfositler**

B lenfositler kemik iliğinde üretilir ve immünokompetan hale gelirler. İmmünokompetan hale gelme sürecinde her bir B lenfosit her biri özgül antijenler için reseptör işlevi gören 50,000 ile 100,000 arasında IgM ve IgD üretir ve bu yüzey immünoglobulinlerini epitop bağlayıcı kısımları hücrelerarası alana bakacak şekilde hücre zarına yerleştirir. Bir B lenfosit klonundaki her hücre aynı epitopa bağlanan immünoglobuline sahiptir (4, 22,

34). B lenfositlerin hücre zarlarında CD9, CD19, CD20 ve CD24 molekülleri bulunur ve hümmoral bağışıklıkta görev alırlar (34, 63).

#### **2.4.2. T Lenfositler**

T lenfositlerin öncülleri kemik iliğinde üretilir ve immünokompetan hale gelmek üzere timusa göç ederler. T lenfositlerin hücre zarında antijen reseptörleri olarak işlev gören T hücre reseptörleri (TCRs) bulunur. T lenfositler, yardımcı T lenfositler 1 ve 2, sitotoksik T lenfositler, baskılayıcı T lenfositler ve bellek T lenfositler olarak alt tiplere ayrılır (22). T lenfositlerin yüzeyinde CD2, CD3 ve CD7 molekülleri bulunur. Bununla birlikte, diğer iki önemli yüzey işaretleyicisi (protein molekülü) olan CD4 ve CD8'in olup olmamasına göre de alt tiplere ayrılırlar. Sitotoksik T lenfositler hücrenel bağışıklıkta görev alırlar, yardımcı T lenfositler salgıladıkları sitokinlerle her iki tür bağışıklık yanıtının düzenlenmesine de katkıda bulunurlar (34, 63).

#### **2.4.3. Makrofajlar**

Kan monositlerinden gelişip lenf düğümünün çeşitli bölümlerine yerleşerek fagositoz işlevlerini yerine getirirler. Buldukları bölgelere göre adlandırılan makrofajların işlevlerine bağlı olarak farklı yüzey antijenlerine sahip oldukları saptanmıştır. Çeşitli makrofaj alt tipleri en yoğun olarak lenfositlerin seyrek olarak bulunduğu subkapsüler sinüs ve medullada yerleşmişlerdir (47).

#### **2.4.4. Antijen Sunucu Hücreler**

Antijen sunucu hücreler antijeni fagosit edip işleyerek, epitop-MHC II kompleksini T lenfositlere sunan hücrelerdir (22). Sınıf II majör doku uyumluluk antijenlerini (MHC-II) taşımaları ile karakterizedirler (34).

#### **2.4.5. Retiküler Hücreler**

Yerleşim ve özel işlevlerine göre; lenf folliküllerinde yerleşik folliküler dendritik hücreler (FDH; follicular dendritic cell: FDC), T-bağımlı alanlardaki interdijitasyon yapan dendritik hücreler (IDH) ve fibroblastik retiküler hücreler

(FRH; fibroblastic reticular cell: FRC) olmak üzere alt gruplarda incelenirler (18, 69).

Bağışıklık sistemindeki yardımcı rolleri nedeniyle makrofajlar, özellikle sabit olan türleri, çoğu araştırmacı tarafından retiküler hücre grubu içinde değerlendirilmiştir. Bunların germinal merkezlerde yerleşmiş olanları, sitoplazmalarındaki heterofajik vakuollerdeki sindirilmiş lenfositlere ait kromatin artıkları nedeniyle 'tingible body' (boyanabilen cisim) makrofajları ya da folliküler makrofajlar olarak tanımlanmışlardır. Tipik makrofaj yapısal özelliklerini gösterirler (13).

**Folliküler dendritik hücreler**, B-bağımlı alanların özgül yardımcı retiküler hücreleridir ve lenf folliküllerinde B lenfositlerin çoğalması ve ileri farklanması için uygun bir mikroçevre oluştururlar (10, 45). FDH'ler immün kompleksleri yakalayıp hücre zarlarında uzun süre tutarak, germinal merkezdeki B lenfositlere sunarlar ve bağışıklık belleğinin oluşumunu ve devamlılığını sağlarlar (16, 34, 40, 45, 51). FDH'lerin antijenleri endositozla alıp işleme yetenekleri yoktur (34). FDH'lerin yüzeylerinde antijen-antikor komplekslerini bağlamaları komplemana bağlıdır ve bu hücrelerin zarlarında CD21, CD35 gibi kompleman reseptörleri bulunur (3, 23, 58). Farede ayrıca FDH'lerin üzerinde immün kompleksleri yakalamak için immunoglobulin reseptörlerinden FcγRIIB'nin de önemli olduğu gösterilmiştir (58). FDH'ler bu kompleman reseptörleri ve FcγRIIB reseptörü aracılığıyla antijen-antikor komplekslerini bellek B lenfositlerine sunarak B hücre geri çağırma (recall) cevabını güçlü bir şekilde uyarırlar (10, 51). FDH'ler çeşitli yönleriyle T lenfositlere antijen sunan antijen sunucu hücrelerden farklıdır. FDH'ler antijeni sitoplazması içine alıp işleminden geçirmez ve antijenik peptidleri MHC-II molekülü üzerinde sunmaz, yüzeylerinde kendi ürettikleri MHC-II molekülü yoktur. FDH'ler antijenleri CD21 (CR2), CD35 (CR1) ve Fc reseptörü aracılığıyla sunarlar (40, 43, 51). FDH'ler, germinal merkez reaksiyonu sırasında bellek B lenfositlerin seçiminde görev alır. Yüksek afiniteli B hücre reseptörü taşıyan lenfositlerin apoptotik mekanizmasını (afinite matürasyonu) kapatırlar. FDH'ler tarafından yapılan bu seçim bellek B lenfositlerin oluşumunda anahtar basamaktır (10, 51). FDH'lerin kökeni

uzunca bir süre tartışılmış olup çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen görüşler doğrultusunda FDH öncülünün, FDH'ye farklanma potansiyeli olan bağ dokusuna yerleşik fibroblast benzeri bir hücre olduğu genel olarak kabul edilmiştir (51).

Fagositoz yetenekleri olmayan FDH'ler ışık mikroskobu düzeyinde güç seçilen ince sitoplazmik uzantıları, oval, iri çekirdeği, belirgin santral çekirdekçiği olan büyük hücrelerdir. FDH'lerin iki ve üç çekirdekli olanları da tanımlanmıştır (51). Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde ise, çekirdek çevresi dar sitoplazma içinde küçük mitokondriyonlar ve orta derecede granüllü endoplazma retikulumu bulunduğu saptanmıştır. Hücrenin bedeninden çevreye doğru uzanan ve yapıları labirenti andıran desmozomlarla birbirlerine tutunmuş sitoplazma uzantılarının komşu lenfositleri çepeçevre sardıkları gözlenmiştir. Bu hücrelerin zarlarının dış yüzünde, hücrenin görevine özgü olarak bağlamış olduğu antijen-antikor komplekslerine bağlı olduğu düşünülen elektron yoğun madde bulunduğu belirlenmiştir (16).

**İnterdijitasyon yapan dendritik hücreler**, T-bağımlı alanların mikroçevresinin önemli bir bileşeni olup, T lenfositlerin farklanması ve uyarılmasında rol oynayan antijen sunucu hücrelerdir (10, 79). IDH'ler kemik iliğinden köken alan mononükleer öncül hücrelerden farklanırlar ve korteksteki ana antijen sunucu hücre grubudurlar (10, 67). Lenf düğümündeki hücrelerin çok az bir bölümünü (%2 dolayında) oluşturmalarına rağmen çok sayıda uzun uzantıları sayesinde temas için geniş yüzey alanı sağlarlar (26). Dendritik hücreler kan ya da lenf yoluyla lenf düğümüne ulaşır. Lenf yoluyla gelen dendritik hücreler klasik literatürde interstisyel dendritik hücreler olarak da adlandırılmıştır (79). Periferel dokulardan bilgi taşıyan dendritik hücreler afferent lenf damarları aracılığıyla girdikleri subkapsüler sinüsten T-bağımlı alana T hücrelerle etkileşmek üzere göç ederler (12). Örneğin, deride bulunan immatür Langerhans hücreleri in vivo antijen yakalayınca aktive olup lenf damarları aracılığıyla deri altı lenf düğümüne taşınırlar, subkapsüler sinüs tabanından retiküler ağa yapıştıkları parakortekse göç ederler, matür fenotip kazanırlar ve IDH'ye dönüşürler (25, 65). Lenf düğümündeki dendritik

hücrelerin CD11c ekspresyonu, antijen yakalama ve T lenfositlere sunma yeteneği, T lenfositleri uyarma yeteneği gibi özellikleri bulunur. IDH'ler matür fenotipe sahiptirler, yani yüksek düzeyde CD80, CD40 ve CD86 gibi T lenfosit uyarıcı molekülür eksprese ederler, yüksek düzeyde MHC-II molekülü eksprese etmelerine rağmen yeni karşılaştıkları antijenleri fagosite edip işleme ve sunma yetenekleri göreceli olarak sınırlıdır. Kan kaynaklı dendritik hücrelerin periferik toleransta rol oynayarak otoreaktif T lenfositleri ortadan kaldırdıkları, kanda bulunan patojenler ile karşılaşınca aktive olarak matür fenotip kazandıkları ve bağışıklık yanıtı gelişmesine önemli katkı yaptıkları kabul edilir (79). Işık mikroskobu düzeyinde rutin yöntemlerle ayırt edilemeyen IDH'ler ultrastrüktürel olarak T lenfositlere tutunan çok sayıda sitoplazmik uzantısı olan hücrelerdir. İyi gelişmiş tubuloveziküler yapılar içeren elektron geçirgen, organelden fakir geniş bir sitoplazması ve derin çentikli ökromatik oval bir çekirdeği bulunur. Bazı IDC'lerin sitoplazmalarında epidermisteki Langerhans hücrelerinin sitoplazmalarında tanımlanmış olan Birbeck granülleri görülür (67). IDH'ler uzantıları ile lenfositleri saran hücrelerdir. Bu uzantılar IDH'ler ile T lenfositler arasındaki etkileşimi anatomik olarak kolaylaştırmaktadır (7).

## **2.5. Fibroblastik Retiküler Hücreler ve Lenf Düğümünün Retiküler Çatısı**

Lenf düğümlerinin başta lenfositler olmak üzere diğer hücre gruplarına ev sahipliği yapan, onların yerleşme, uyarılma ve farklılaşma süreçlerinde rol oynayan bir stromal çatısı vardır. Retiküler ağ olarak adlandırılan bu çatı, lenf düğümü korteksinin inter- ve peri-foliküler stromasının temel elemanıdır, retiküler liflerden ve bu lifleri üreten ve saran, sitoplazma uzantıları ile birbirlerine tutunmuş fibroblastik retiküler hücrelerden oluşmuştur (18, 26, 35, 74). Lenfositler, makrofajlar, folliküler dendritik hücreler ve bağışıklık sisteminin diğer hücreleri bu stromal retiküler ağ yapısı içerisinde yerleşirler (63), ayrıca kan damarları ve lenf sinüsleri de kendilerini destekleyen retiküler ağa asılıdırlar (18, 36, 53). Fibroblastik retiküler hücreler başlıca T-bağımlı alanlarda (interfolliküler alan ve parakorteks) bulunurlar, retiküler lifleri ve diğer hücrelerarası madde bileşenlerini

sentezlerler (8, 10, 26). FRH'ler folliküller hariç tüm lenf düğümünü çaprazlayan retiküler lifleri kılıf gibi sarar ve bu lifler tarafından desteklenirler (27, 70). Uzantıları ile retiküler lifleri sararak kanalcıkları; birbirleriyle uzantıları aracılığıyla bağlanıp retiküler liflerle birlikte lenf düğümünün üç boyutlu, gevşek ağ yapısındaki çatısını (koridorları) oluştururlar ve bu özel kompartmanlar yoluyla iletişimde ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde görev alırlar (8, 10). Koridorlar retiküler ağ ile sınırlanmış çapı 10-25 mikrometre olan lenfosit içeren boşluklardır (26, 35). FRH'lerin destek hücreleri olmaları yanında T, B lenfositler ve dendritik hücreler için yüzey molekülü eksprese etme ve kemokin üretme, lenfosit trafiğini etkileyen ve çok sayıda sinyalin hızlı transferini sağlayan anatomik düzenler oluşturma (koridor, kanalcık), lenf düğümünün hipertrofisi sırasında lenf düğümünün yeniden modellenmesine katılma gibi ek işlevleri bulunur (1, 10, 26, 73). Parakorteksteki FRH'ler özelleşmiş kemokin ve adezyon molekülü üreterek korteksteki immün efektör hücreler için çekici bir bölge oluştururlar (36).

FRH'ler retiküler lifleri sararak sinüs ve parakortikal interstisyel alandan ayrı bir izole hücre dışı kompartman oluştururlar (25, 27). Kanalcık ("conduit") olarak adlandırılan FRH'ler ve retiküler lifler arasındaki potansiyel mesafenin, subkapsüler sinüsten YEV'e sıvı ve kemokinler, sitokinler ve antijenler gibi düşük molekül ağırlıklı çözünebilir moleküllerin doğrudan ve hızlıca geçişini sağladığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (1, 25, 27, 35, 70).

FRH'lerin gerek ince yapı gerekse enzim ve immunohistokimyasal özellikleri bakımından diğer dokuların fibroblastlarından farklı olmadıkları belirlenmiştir (13). İri ve soluk boyanan çekirdekleri vardır. İnce yapı düzeyinde FRH çekirdeğinin büyük kısmında diffüz granüler kromatin bulunur, sadece az miktarda kromatin çekirdek zarında yoğunlaşmış durumdadır. Çekirdekçik küçük ve santral yerleşimlidir. FRH sitoplazması ılımlı sayıda mitokondriyon ve oldukça geniş granüllü endoplazma retikulumu içerir (63, 73). Sitoplazmasında 6-9 nm çaplı filamanlar ve sitoplazmanın periferinde yoğun cisimler bulunur. Fokal dış (bazal) lamina gözlenir. Hücreler arasında ara bağlantıların gözlemlendiği bildirilmiştir (73). Lenf

düğümündeki FRH'lerin sıçanda erken postnatal dönemde mezenşimal hücrelerden farklandığı bildirilmiştir (80). FRH'lerin birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri aracılığıyla tutunduklarının gözlenmesi ve FRH'lerin sıklıkla basit epitelde bulunan sitokeratin 8 ve 18 ara filamanlarını bulundurmaları epitel kökenli hücreler oldukları yönünde bir görüşün de ortaya çıkmasına neden olmuştur (35).

Retiküler ağın yapısına katılan lifler, çapları 0.5 - 5.0 µm arasında değişen tip I ve III kollajen demetleri ve ilişkili matriks bileşenleridir (25). Germinal merkezde az sayıda retiküler lif bulunurken, T-bağımlı alanda bol bulunur ve büyük oranda kapsüle dik olarak yerleşmişlerdir (18, 35, 53). Retiküler liflerin yoğunluğu kan damarlarının çevresinde, perifoliküler alanda ve parakorteksin periferinde (medulla sınırı) fazladır (53). Lifler kapsülden subkapsüler sinüsü çaprazlayarak folliküllerin arasından derin kortekse yayılırlar (25, 26). Medulla kordonlarındaki retiküler lifler de kan damarlarını saran kollajen lifler ile devam eden bir ağ yapısı oluştururlar (53). Lenf düğümünün yüksek düzeyde organize olmuş, retiküler liflerle desteklenmiş hücre uzantısı ağı (retiküler ağ), lenfositlerin lenf düğümünün içindeki hareketlerini düzenlemede ve yönlendirmede belirgin rol oynar ve hücrelerarası etkileşim için ortam sağlar (25, 36, 53). Retiküler ağ T lenfosit-antijen sunucu hücre etkileşiminin gerçekleştiği optimal moleküler çevreyi ve geometriyi sağlayan yapıdır (25). Retiküler lifler, subkapsüler sinüs duvarındaki ve YEV'leri saran lifler ile devamlıdır (27). Düşük moleküler ağırlıklı lenf kaynaklı materyal, perivenüler kanalı ve yüksek endotel hücreleri arasındaki alanı doldurur. Lenfositler YEV lümeninden parankimaya bu boşlukların içinden göç ederler. Böylece antijene özgü B lenfositler antijenlerini bu alanlarda yakalayıp T hücrelere sunmak üzere kortekse taşırlar. Hücrelerarası madde bileşenlerinin lenf düğümünün bütünlüğünü sağlamak (tip I kollajen, tip II kollajen ve elastin), hücre yapışmasını ve göçünü düzenlemek (örneğin FRH'nin kollajen life yapışmasını, lenfosit ve dendritik hücre gibi hematopoetik hücrelerin lenf düğümü içinde yapışması ve göçünü düzenlerler), lenfosit aktivasyonunu ve farklanmasını etkilemek,

YEV'e retiküler lifler aracılığıyla sıvı ve sitokin taşınması gibi fonksiyonları vardır (35).

Retiküler ağ içinde hücrelerarası madde bileşenleri, kollajen lifler ve aralarındaki matriksten oluşan merkez kısım, merkez kısmın çevresindeki FRH'nin retiküler life tutunmasında rol oynayan bazal membran, FRH'nin apikal yüzeyini kaplayan glikokaliks bölgelerine yerleşmiş görünmektedir. FRH'nin apikal yüzeyi VCAM-1 gibi integral membran proteinlerini ve hiyaluronan gibi apikal yüzeye zincirlenmiş proteinleri de içerir (35). Lenfositlerin FRH ağına tutunması FRH'nin integral membran proteinleri ve FRH tarafından üretilen hücrelerarası madde bileşenleri ile sağlanır Koridorların, antijen sunucu hücre ve T lenfositler arasındaki etkileşimi sağlamak için bu yapısal düzenlemeyi oluşturdukları düşünülmüştür (26). T-bağımlı alandaki lifler arasındaki boşluk lenfositlerin çoğunun liflerle temasını sağlayacak kadar dardır, ancak göçü engellemeyecek kadar geniştir (35). Stromal retiküler ağ aynı zamanda YEV'ler aracılığıyla parakortekse giren lenfositlerin göçünü uygun kompartmanlara yönlendirmekle görevlidir (18).

## **2.6. Lenf Düğümünün Sinüs ve Damar Çatısı, Yüksek Endotelli Venüller**

### **2.6.1. Lenf Düğümünde Lenf Sıvısının Akışı**

Afferent lenf damarları, lenf düğümünün kapsülünü delerek içerindeki lenfi subkapsüler sinüse boşaltırlar. Afferent lenf damarları ile lenf düğümüne lenfositler, antijen sunucu hücreler, sitokinler, çözünebilir antijenler ve partiküller taşınır. Lenf buradan, kortikal sinüsler aracılığıyla lenf düğümünün derinlerine iner ve medulla sinüslerine ulaşır (26, 34, 53). Gerek subkapsüler, gerekse medulla sinüsleri karmaşık yapılarıyla lenf düğümünden süzülmeğe olan lenfin akış hızını yavaşlatır ve yabancı maddelerin makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından alınıp sindirilmesini kolaylaştırırlar. Lenfoid dokuda süzülüp korteksten medullaya yavaşça akan lenf, hilustaki efferent lenf damarları aracılığıyla organı terkeder. Hem afferent hem de efferent lenf damarlarında bulunan kapakçıklar lenfin tek yönde akmasını sağlar (34, 53).



### 2.6.2. Lenf Dügümünde Kan Dolaşımı

Lenf düğümlerine ulaşan kan damarları, lenf düğüme hilustan girerler ve medullada bir çok arteriyole ayrılırlar. Medulladaki arteriyollerden bazıları dış kortekse doğrudan ulaşırken, diğerleri medulla kordonları içinden geçerken kapillerlere dallanırlar. Yüksek endotelli venül (YEV)'ler perifoliküler alanda ve parakorteksin medullaya yakın bölümünde bulunurlar. YEV'lerin olduğu bölgede kapillerlerin bol bulunması göç eden ve yerleşik lenfositlerin metabolik ihtiyaçlarını karşılayacak gerekli maddeleri sağlamaktadır. Kortikomeduller bileşkede YEV'ler aniden medulla venüllerine dönüşürler ve hilus venleri lenf düğümünü hilustan terk ederler (53).

### 2.6.3. Yüksek Endotelli Venüller Aracılığıyla Lenfosit Göçü

Bağışıklık sisteminin işlevi açısından lenfositlerin resirkülasyonu temel bir öneme sahiptir ve hücreler arasındaki özel etkileşimlerle düzenlenir (19). Lenfositler lenf düğümlerine postkapiller ya da yüksek endotelli venül (YEV) adı verilen korteksin T-bağımlı alanında bulunan özel kan damarlarının duvarlarına tutunup kandan ayrılarak lenf düğümünün korteksine göç ederler (4, 22, 27, 34, 51, 53). Bu venüller alışılmışın dışında, lenfositlerin aralarından geçtiği, yüksek boylu hücrelerden oluşmuş bir endotel yapısı gösterirler. YEV endoteli, lenfosit alımı ile ilgili belirli hücre yüzey reseptörleri eksprese etme yönünden diğer endotellerden farklıdır (81). YEV endotelinin antijenik materyale özgü tepki göstermesi sebebiyle özgül immün yanıtta katılmak üzere kandan lenfositlerin göçü antijene özgü olarak gerçekleşir (64). Kandan dokuya lenfosit göçü çeşitli adezyon moleküllerinin aracılığı ile gerçekleşir (68). Lenfosit hücre membranında selektinler olarak bilinen yüzey molekülleri bulunur. Selektinler, lenfositlerin, yüksek endotelli venüllerin endotel hücrelerini tanımlarına yardım ederler ve bu endotel hücrelerinin lüminal yüzeyleri boyunca yuvarlanmalarına izin verirler. Lenfosit, endotel hücre membranında yerleşen sinyal molekülleri veya yüksek endotel hücrelerinin arasından lümene geçen kemokinler ile temas ettiğinde selektinler aktive olur, endotel hücrelerine sıkıca bağlanırlar ve lenfositin yuvarlanma hareketi durur. Bu durumda, lenfositler diapedefz yolu ile, yüksek

endotelli venüllerin duvarından göç ederek lenf düğümünün parankimine girerler (22, 27, 64). T hücre adezyonunu tetikleyen sitokinleri yakalama ve sunmada YEV endoteli üzerindeki karbohidrattan zengin moleküllerin önemli rolü vardır (1). Kemokinler yalnızca lokal olarak lenf düğümünden sentezlenmeyip lenf kaynaklı da olabilirler (27). Afferent lenfatikler ile dokulardan lenf düğümüne gelen ve kemokin içeren lenf sıvısı yüksek endotel morfolojisinin sağlanmasında ve YEV'den lenf düğümü korteksine lenfosit göçünde rol oynamaktadır (25, 27). "Makrofaj inflamatuvar protein-1 beta" (MIP-1 $\beta$ ) T hücrelerinin kemotaksisine ve adezyonuna neden olan bir sitokin olarak izole edilmiştir. Bir diğer çalışmada MIP-1 $\beta$  lenf düğümü endotelinde gösterilmiştir ve endoteliyal proteoglikanlara bağlanarak lenfosit adezyonunu tetiklediği bildirilmiştir (68). "Secondary lymphoid tissue chemokine" (SLC), YEV'de eksprese olan ve T lenfositlerin adezyonu ve göçünde rol oynadığı belirlenmiş olan diğer bir kemokin olarak bildirilmiştir (12).

#### **2.6.4. Lenfositlerin Lenf Düğümü İçindeki Yerleşimleri, Kemokinlerin Rolü**

Lenfositler gerek afferent lenfatikler yoluyla gerekse kandan YEV'ler aracılığıyla lenf düğümüne girdikten sonra rastgele dağılmazlar ve immün hücrelerin lenf düğümü içindeki yerleşimleri stromal bileşenler üzerinde eksprese olan çeşitli kemokinler ve adezyon molekülleri tarafından düzenlenir (12, 81). Bunda embriyonik dönemde olduğu gibi CCL19, CCL21, CXCL12 ve CXCL13 gibi homeostatik kemokinlerin özellikle önemli rolleri vardır (12). Endotel hücreleri, FDH'ler ve FRH'ler gibi stromal hücreler, immün hücrelerin göçü için kemoatraksiyon ve adezyon ortamı oluştururlar (36). Lenf düğümünde hücrelerin göçünü düzenlemede hücrelerarası madde bileşenlerinin de rolü vardır. SLC'nin T-bağımlı alanlardaki stromal hücrelerce eksprese olup T hücreleri ve dendritik hücreleri bu alanlara çektiği belirlenmiştir (12, 81). SLC'nin aktive T hücrelerin lenf düğümünün T-bağımlı alanlarına göçünü CCR7 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Molekülün T-bağımlı alanlardaki ekspresyonu in situ hibridizasyon ile

gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama ile karşılaştırmada in situ SLC ekspresyonunun IDH'lerin dağılımına uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Benzer etkiye sahip diğer bir kemokin olan "EBI ligand chemokine-1" (ELC) de SLC ile ortak reseptörü olan CCR7 aracılığıyla etki göstermektedir (78). Dendritik hücrelerde eksprese olan "dendritic cell-specific chemokine" (DC-CK1)'in de T-lenfositlerin lenf düğümündeki yerleşimini düzenlediği düşünülmektedir (81). Yine lenfosit yerleşmesinde rol oynadığı bilinen CCL21 ve PNA<sub>d</sub> (karbonhidrat antijeni) moleküllerinin de parakorteksteki retiküler ağda eksprese olduğu ve bu retiküler ağın dendritik hücre ve T lenfositleri yerleşmeleri için kendine güçlü bir şekilde çektiği belirlenmiştir (29, 36, 66). B-lenfositler YEV aracılığıyla lenf düğümüne girerler ve follikülde yerleşirler (8). FDH'lerin salgıladığı ve B lenfosit yüzeyindeki BLR1 (CXCR5)'e bağlanan BCA-1 (B cell attracting chemokine-1; CXCL13), B lenfositlerin folliküllere yerleşmesi için gereklidir (10, 12, 51). Sitokinlerden IF $\alpha$ 'nın germinal merkezde eksprese olması immün yanıt sırasında B hücreleri seçici olarak çekmesine neden olan diğer bir etkendir (81). B lenfositler dış kortekse göç ederken, T lenfositlerin çoğu parakortekste kalır (10, 12, 22).

### 2.6.5. Lenf Sinüsleri

Lenf düğümünde içinden lenf sıvısının geçtiği genişlemiş boşluklar olan sinüslerde, retiküler hücreler, retiküler lifler ve makrofajların oluşturduğu gevşek bir ağ yapısı gözlenir. Yıldız biçimindeki retiküler hücrelere tutunmuş olan makrofajlar, yabancı maddeleri fagosite ederler (22, 34). Subkapsüler sinüsü kapsülün iç tabakalarından dış kortekse uzanan retiküler liflerin oluşturduğu ince ağ çaprazlar (53). Subkapsüler sinüsün tabanında parankime bakan fibroblastik retiküler hücrelerin oluşturduğu tabakadan bazal membran ve hücrelerarası madde ile ayrılmış ince yapı özellikleri ve sitokimyasal kriterlere dayanılarak FRH'lerin farklı biçimi olduğu düşünülen sinüs döşeyici hücreler (SDH; sinus lining cell: SLC) bulunur (10, 18, 25, 27). Hemen hemen devamlı bir tek tabaka halinde gözlenen SDH'lerin birçok sitoplazma uzantısı vardır, ayrıca bazısı retiküler lifleri sararlar (18). Subkapsüler sinüsün parankime komşu duvarında delikler olduğu görüşü, bu

deliklerin elektron mikroskop ile 0.1-1 µm arasında gösterilmesiyle desteklenmiştir (25, 27, 64).

## **2.7. Lenf Düğümünün Stromal Hücrelerini İncelemek İçin Kullanılan Histokimyasal Yöntemler**

Lenf düğümündeki retiküler ağın incelenmesi amacıyla metallofilik yöntemler, özellikle gümüşleme yaygın olarak kullanılmıştır (35). Daha çok retiküler liflerin oluşturduğu çatinın ve bazı makrofajların gösterilmesini sağlayan bu yöntemle retiküler hücrelerin tipleri belirlenememektedir. Eikelenboom'un dalakta yaptığı çalışmadaki gözlemlerine göre metallofilik yöntemler makrofajlar ile retiküler hücreleri birbirlerinden ayıramamaktadır. Araştırmacı lenf folliküllerinde bulunan fagositik aktivite göstermeyen dallanmış metallofil hücreleri olgunlaşmamış makrofajlar olarak değil, folliküler dendritik hücreler olarak yorumlamıştır (20).

Lenfoid dokudaki retiküler hücreleri (yardımcı lenfoid doku hücrelerini) seçici olarak göstermek amacıyla -SH gruplarına bağlanma yoluyla pozitif reaksiyon veren çinko iyodit-osmiyum tetroksit (ÇİO) yöntemi kullanılmıştır (11). Konuyla ilgili olarak geriye dönük yapılan kaynak taramasında ilk kez 1913 yılında Champy tarafından osmium tetroksit ve sodyum iodit karışımının otonom sinirler için bir boyama yöntemi olarak tanıtıldığı ve tekniğin Maillet tarafından 1959-62 yılları arasında sodyum yerine çinko kullanarak geliştirip değiştirildiği anlaşılmıştır (61). Takip eden yıllarda teknik nörositolojik çalışmalarda, elektron mikroskop analizi için ve prefiksasyondan sonra kullanılmıştır (57, 60). Bu alanda birçok araştırmacı bu tekniği, sinaptik veziküllerinin dağılımını ve diğer bazı nöron elemanlarını göstermek için kullanmıştır (57, 76). Bu teknik nörositolojik çalışmalar yanında epidermal Langerhans hücrelerini kan ve kemik iliği hücrelerini ve lenfoid dokuyu incelemek için kullanılmıştır (5, 11, 14, 50, 62).

Lenfoid dokuda en iyi boyanmanın daha önce Niebauer ve ark. (50) tarafından kullanılmış olan solusyon ile elde edildiği saptanmış ve asidik tampon ile hazırlanan ÇİO solüsyonları ile daha kuvvetli reaksiyon gözlenmiştir. Reaksiyon hücrenin fizyolojik durumuna göre değişmektedir ve

bazı moleküllere özgü olmayıp, tüm sitoplazmik bileşenleri etkiler. Bununla birlikte lipid içeren yapılar hep ÇLO (+) bulunmuştur. Solüsyonun pH'ının ÇLO reaksiyonunda en kritik etken olduğu düşünülmüştür (14).

Lenf düğümü incelemelerinde immünohisto / sitokimyasal işaretlemeler ve FISH gibi yöntemler de ayrıntılı tanımlamalar için yardımcı tekniklerdir. Lityum karmin enjekte edilerek yapılan vital boyama ile ışık ve elektron mikroskop düzeyinde makrofajlar incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada lityum karminin lenf düğümü sinüslerindeki retiküler hücreler tarafından aktif olarak fagosite edildiği belirlenmiştir. Boyanın makrofajlar tarafından alınımı göreceli olarak çok daha az bulunmuştur (77).



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Doku Örneklerinin Alınması:

Çalışmada insan ve sıçan lenf düğümü örnekleri kullanıldı. İnsan lenf düğümü örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak-Burun-Boğaz Anabilim Dalında çeşitli nedenlerle ameliyat olan 4 hastadan elde edildi (Tablo 3.1). Sıçan lenf düğümü örnekleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlanan 1-3 aylık erkek Wistar albino sıçanlar eter anestezi altında dekapitasyonla sakrifiye edilerek elde edildi. Alınan dokular immünohistokimyasal inceleme ve elektronmikroskop incelemesi için hazırlandı.

**Tablo 3.1:** İnsan lenf düğümü örneği olarak kullanılan materyalin yaşa, cinsiyete ve tanıya göre dağılımı

No	Hastanın Yaşı	Hastanın Cinsiyeti	Hastanın Tanısı
1	32	E	Lipom
2	27	E	Boyunda benign kitle
3	29	K	Lipom
4	58	E	Multinodüler guatr

### 3.2. İmmünohistokimya Yöntemi

#### 3.2.1. Örneklerin Hazırlanması:

Alınan doku örnekleri en kısa süre içinde (1-25 dakika)  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıvı azot içerisinde donduruldu. Antijenitesi bozulmadan kesitlerin elde edilebilmesi için kesit alınana kadar doku örnekleri  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıvı azot tankı içerisinde ideal olarak 2-3 gün bekletildi. Kriostat (Leica Frigocut 2800E) ile 7 mikrometre kalınlığında seri kesitler önceden jelatinle kaplanmış lamlara alındı. Oda ısısında kurutulduktan sonra silikajel (Merck, K.No:1.01925,

Darmstadt, Almanya) kullanılarak nemi alınmış kapalı kutularda immün işaretleme uygulanana kadar saklandı (ideal olarak 1-4 gün).

### 3.2.2. Kullanılan Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması:

Jelatinli lam

Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)

Fosfat tamponlu serum fizyolojik -sığır serum albumini (PBS-BSA) karışımı

Primer antikor

Sekonder antikor

Tris tamponu

Diamino benzidin solüsyonu (DAB)

Bakır sülfat solüsyonu

Mayer'in Hematoksileni

Propidium Iodide/Antifade (Oncor, K. No:S1370-6, ABD)

#### Jelatinli lam hazırlanması:

Jelatin tozu (jelatin) (Sigma, G-6650, ABD)	5 gr
Kromalumsülfat (Chrom (III)-Kaliümsulfat) ( $KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ) (Merck, K.No: K-2830535, Almanya)	0.5 gr
Distile su	1000 ml

Belirtilen miktarlarda jelatin tozu ve kromalum sülfat 1000 ml distile su içinde ısıtılarak ve karıştırılarak eritildi. Kaynadıktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Rodajlı lamlar bir asansöre dizildi ve yarı yarıya %70'lik alkol ve eter karışımından geçirilerek temizlendi, kurutuldu. Rodajlı lamlar kuruduktan sonra soğumuş olan jelatin solüsyonundan geçirildi ve tekrar kurumaya bırakıldı.

**Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) hazırlanması:**

**Solüsyon I :**

Sodium dihydrogen phosphate monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	13.7 gr
(Merck, K.No:3090, Darmstadt, Almanya)	
Sodium chloride (NaCl)	87.66 gr
(Merck, K.No: 6408, Darmstadt, Almanya)	
Distile su	1000 ml

**Solüsyon II:**

Disodyum hidrojen orthophosphate dihydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	71.2 gr
(BDH Chemicals, K.No: 30157)	
Sodium chloride (NaCl)	350.64 gr
(Merck, K.No: 6408, Darmstadt, Almanya)	
Distile su	4000 ml

**Stok solüsyonu:**

Hazırlanan solüsyon I ve solüsyon II ayrı ayrı süzöldükten sonra 4000 ml solüsyon II + 500 ml solüsyon I karıştırıldı. Bir pH metre yardımı ile gerekirse solüsyon I eklenerek stok solüsyonun pH'sı 6,9'a ayarlandı.

**Kullanma solüsyonu:**

Stok solüsyonu 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı. Yine aynı şekilde gerekirse solüsyon I eklenerek kullanma solüsyonun pH'sı 7,4 olarak ayarlandı.

**Fosfat tamponlu serum fizyolojik - sığır serum albumini (PBS-BSA) hazırlanması:**

Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) içine 1/40 oranında %30'luk BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma K.No: A-3174) temiz bir enjektörle eklenerek hazırlandı.



**Primer antikolar:**

Çalışmada kullanılan primer antikolar VI. (39), VII. (46) ve VIII. Human Leukocyte Differentiation Antigens çalıştaylarından (Tablo 3.2) sağlandı. Bu antikolar önerilen oranlarda (ör.1/100) PBS-BSA karışımı ile sulandırılarak kullanıldı.

**Tablo 3.2:** Kullanılan primer antikoların özgüllüğü, klon adı ve kaynağı

Özgüllük	Klon adı	Kaynağı
CD2	OKT-11	VI. HLDA çalıştayı
CD3	OKT-3	Connely
CD4	Leu-3	VI. HLDA çalıştayı
CD7	T55	VI. HLDA çalıştayı
CD8	RPA-T8	Aversa/DNAX
CD11c	KB23	Pulford
CD13	JP34-10	Roos
CD20	CAT13.7H8	Hadam
CD31	TP1/15	Sachez-Madrid
CD36	CLB-IV C7	CLB-Amsterdam
CD43	148-1C3	Vilella
CD49a	SR84	Rettig
CD49b	6F1	Coller
CD49c	J143	Albino
CD49d	8F2	Morimoto
CD49e	2H6	Morimoto
CD49f	S3-41	Quaranta
CD50	152-2D11	Vilella
CD53	AC119	Buck
CD54	CBR-ICI/12	Diamond-Springer
CD62-P	G1	McEver
CD63	H5C6	Hidreth

Özgüllük	Klon adı	Kaynağı
CD68	Y2/131(MR24)	Pulford
CD71	49.1	Valentini
CD90	V45	Clark
CD99	O662	Bernard
CD105	4464	Letarte
CD106	E1/6	Bevilacqua
CD109	D2	Finberg
CD143	9B9	Danilov
CD146	F439E	George
CD151	14A2.H1	Ashman
MHC-Class II	D66	Kumar
Pansitokeratin	AE1/AE3	Zymed
Vimentin	V52-55	Zymed
-	FB21	VIII. HLDA çalıştayı
-	2D7	VIII. HLDA çalıştayı
-	HI272	VIII. HLDA çalıştayı
-	HI277	VIII. HLDA çalıştayı
-	E63-880	VIII. HLDA çalıştayı
-	BD46	VII. HLDA çalıştayı
-	80373	VIII. HLDA çalıştayı
-	LT-ND4	VIII. HLDA çalıştayı
-	80394	VIII. HLDA çalıştayı

Amaca uygun olarak seçilmiş olan antikorlar önerilen oranlarda (ör:1/100) PBS-BSA (phosphate buffer solution-bovine serum albumin) ile sulandırılarak kesitler üzerine damlatıldı.

**Sekonder antikor:****a) İndirekt immünoperoksidaz boyama yöntemi için;**

Antimouse IgG-Peroksidaz (Sigma, K. No: B-9904, ABD)

PBS-BSA

Normal insan serumu

Antimouse IgG- Peroksidaz (Sigma) immünoglobülini hazırlanmış olan PBS-BSA solüsyonu ile 1/200 oranında sulandırıldı. Bu solüsyona 1/100 oranında normal insan serumu eklendi.

**b) İndirekt immünofloresan boyama yöntemi için;**

Goat Antimouse IgG/FITC (DAKO, K. No: F0479, Danimarka)

PBS-BSA

Normal insan serumu

Goat Antimouse IgG/FITC (DAKO) immünoglobülini hazırlanmış olan PBS-BSA solüsyonu ile 1/50 oranında sulandırıldı. Bu solüsyona 1/100 oranında normal insan serumu eklendi.

**Tris Tampon ( 0.05 M Tris-HCl = Tris buffer; pH 7.6) hazırlanması:**

Tris tozu (Tris hydroxymethyl aminomethane ) (Merck, K.No:8387)	1.51 gr
Distile su	250 ml

Belirtilen miktarda Tris hydroxymethyl aminomethane distile suda eritildi ve 1N ve 5N HCl kullanılarak bir pHmetre yardımı ile pH'sı 7.6 olarak ayarlandı.

**Diaminobenzidin (DAB) solüsyonu hazırlanması:**

3,3'- diaminobenzidin tetrahidroklörür (3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride) (Sigma, K.No: D 5637, ABD)	5 mgr
Tris tamponu (Tris-HCl; Tris-Buffer, 0.05M)	10 ml
Hidrojen peroksit (hydrogen peroxide) (Sigma, K.No: H 1009, ABD)	5µl (%0.01)

Derin dondurucuda saklanan DAB kullanım için gereken miktarda tartıldı, yukarıda belirtilen oranlara dikkat edilerek gereken miktarlarda 0.05M'lık tris tampon ve %0.01 hidrojen peroksit eklenerek manyetik karıştırıcıda partikül kalmayınca kadar karıştırılarak eritildi ve kullanıldı. Solüsyon her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı ve bekletilmeden kullanıldı.

**Bakır Sülfat (CuSO<sub>4</sub>) solüsyonu hazırlanması:**

Bakır sülfat (Copper II sulphate: CuSO <sub>4</sub> ) (Carlo Erba, K.No: 364757)	5 gr
%0.9 NaCl	1000ml

DAB reaksiyonunun güçlendirilmesi amacıyla, 1000 ml serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içine 5 gr bakır sülfat eklenerek iyice karıştırılıp eritilerek %0.5'lik bakır sülfat solüsyonu kullanıldı.

**Mayer'in hematoksileninin hazırlanması:**

Aluminyum potasyum sülfat (KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12 H <sub>2</sub> O) (Sigma, K.No:A 7167)	50 gr
Hematoksilen (Sigma, K.No:H 9627)	1.0 gr
Sodyum iyodit (NaIO <sub>3</sub> ) (Sigma, K.No:S 407)	0.2 gr
Kloralhidrat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) (Sigma, K.No:C 8383)	50 gr
Distile su	1000 ml
Sitrik asit (monohidrat) (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O) (Sigma, K.No:C 7129)	1.0 gr

Yukarıda belirtilen reçeteye uygun olarak 1 gr Hematoksilen 1000 ml distile suda eritildi. İyice eridikten sonra 0.2 gr sodyum iyodit eklendi. Bu karışım, 50 gr alüminyum potasyum sülfat ile manyetik karıştırıcıda tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. Daha sonra kloralhidrat ve sitrik asit eklendi. Boya kullanılmadan önce süzüldü.

### 3.2.3. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyama Yöntemi:

İmmün boyama yukarıda örneklerin hazırlanması başlığında tanımlandığı biçimde jelatin kaplı rodajlı lamlara alınmış olan kesitler üzerinde daha önce Dijkstra ve arkadaşlarının tanımladığı aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanarak indirekt immünoperoksidaz tekniğine uygun olarak gerçekleştirildi (17).

1. Kesitler, "molecular sieve" (Merck, K.No: 5704) eklenerek suyu alınmış saf asetonunda, oda ısısında 10 dakika tespit edildi,
2. 30 dakika kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri pap-pen (Zymed Laboratories inc. K.No:71310) ile sınırlandırıldı,
3. Uygun şekilde şulandırılmış primer antikorlar kesitlere damlatıldı ve nem odasında (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet) 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi,
4. Şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
5. Uygun şekilde hazırlanmış olan sekonder antikor kesitlerin üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle nem odasında bekletildi.
6. Tekrar şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
7. Kesitlerin üzerine uygun şekilde hazırlanmış olan DAB damlatıldı ve 20 dakika süreyle nem odasında inkübe edildi,
8. Şalelere dizilen lamlar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
9. Yine şale içinde lamlar serum fizyolojik ile yıkandı,

10. %0.5'lik bakır sülfat solüsyonu içinde lamalar 20 dakika oda ısısında bekletildi,
11. Lamlar şale içinde distile suda yıkandı,
12. Çekirdek boyanması kontrol edilerek 30 saniye-1 dakika süreyle Mayer'in hematoksileni ile zıt boyama yapıldı,
13. Lamlar musluk suyunda yıkandı,
14. Dehidratasyon için sırasıyla; %50, %60, %70, %80, %96 (iki değişim) ve %100'lük (iki değişim) alkollerde 5'er dakika bekletildi,
15. Lamaların üzerindeki kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilolde bekletilerek dokular şeffaflaştırıldı,
16. Entellan kullanılarak kesitler kapatıldı.

#### **3.2.4. İndirekt İmmünoperoksidaz Kontrol Boyaması:**

Kontrol amacıyla boyanan kesitlerde, primer antikor basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı.

#### **3.2.5. İndirekt İmmünoperoksidaz Boyamasını Değerlendirme:**

İndirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış lenf düğümü kriyostat kesitleri Leica DMR Research Microscope-Germany mikroskobunda değerlendirildi ve Leica DC 500 kamera ile görüntüleri alındı.

#### **3.2.6. İndirekt İmmünofloresan Boyama Yöntemi:**

İmmün boyama yukarıda örneklerin hazırlanması başlığında tanımlandığı biçimde jelatin kaplı rodajlı lamlara alınmış olan kesitler üzerinde daha önce Kaymaz ve arkadaşları tarafından kullanılan indirekt immünofloresan boyama tekniğine uygun olarak aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanarak gerçekleştirildi (38).

1. Kesitler, moleküler sieve (Merck, K.No: 5704) eklenerek suyu alınmış saf asetonda, oda ısısında 10 dakika tespit edildi,
2. 30 dakika kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri pap-pen (Zymed Laboratories inc. K.No:71310) ile sınırlandırıldı,
3. Uygun şekilde sulandırılmış primer antikorlar kesitlere damlatıldı ve nem odasında (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet) 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi,
4. Şalelere dizilen lamalar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
5. Uygun şekilde hazırlanmış olan sekonder antikor kesitlerin üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle ışıktan korunarak nem odasında bekletildi.
6. Tekrar şalelere dizilen lamalar, şale içinde PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile ışıktan korunarak yıkandı,
7. Yine şale içinde lamalar distile su ile yıkandı,
8. Çekirdek boyanması için propidium iodide/ antifade (Oncor, K.No: S1370-6, ABD) kesitlerin üzerine birer damla damlatıldı.
9. Lamel ile kesitlerin üzeri kapatıldı ve ışıktan korunarak saklandı.

### **3.2.7. İmmünofloresan Kontrol Boyaması:**

Kontrol amacıyla boyanan kesitlerde, primer antikor basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı.

### **3.2.8. İmmünofloresan Boyamasını Değerlendirme:**

İmmünofloresan yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış lenf düğümü kriyostat kesitleri Leica DMR Research Microscope- Germany mikroskopunda değerlendirildi ve Leica DC 500 kamera ile görüntüleri alındı.

### 3.3. Transmisyon elektron mikroskopik inceleme yöntemi

#### 3.3.1. Örneklerin hazırlanması:

Alınan dokular küçültüldükten sonra bir bölümü hemen çinko iyodit-osmiyum (ÇİO) çözeltisi içine alınırken, diğer bölümü %2'lik gluteraldehitte 2 saat boyunca +4 C<sup>0</sup> de tespit edildi.

ÇİO çözeltisi içine alınan dokular bu çözelti içinde 24 saat süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilerek tespit edildi. Çalışmada, Dağdeviren ve arkadaşları tarafından kullanılan, dokunun tespit ve boyanmasını aynı anda gerçekleştiren çözelti kullanıldı (14).

%2'lik gluteraldehitte 2 saat boyunca tespit edilen dokuların ikinci fiksasyonu %1'lik osmium tetroksit içinde 90 dakika bekletilerek yapıldı.

Dokular Sorenson tampon solüsyonu ile 3-4 defa değiştirilerek yıkanarak rutin elektron mikroskop doku takibine alındılar.

#### 3.3.2. Kullanılan Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması:

Çinko iyodit – osmiyum çözeltisi

Sorenson tampon solüsyonu

%2'lik gluteraldehit solüsyonu

Dörtlü plastik karışım

#### Çinko iyodit-osmiyum çözeltisi:

Metalik çinko (Merck, K.No:645 K2497874, Darmstadt, Almanya) 10-15 gr

Metalik iyot (Merck, K.No: 635 B559360, Darmstadt, Almanya) 5 gr

Distile su 200 ml

%2'lik osmiyum tetroksit

10-15 gr metalik çinko ile 5 gr metalik iyot kuru olarak birbirleriyle iyice karıştırıldı. Daha sonra 200 ml distile suya yavaş yavaş (egzotermik reaksiyon nedeniyle gerekli önlemler alınarak) eklendi. Bu karışım 5 dakika kadar iyice karıştırıldıktan sonra daha önceden hazırlanmış olan temiz, kuru, koyu renkli şişelerin içine filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Bu çözeltinin 4 kısmı, bir kısım hazır %2'lik osmiyum tetroksit çözeltisinin üzerine eklendi ve yine önceden hazırlanmış olan kuru, temiz, koyu renkli şişelere koyuldu. Oda



sıcaklığında, karanlıkta bekletilerek saklandı. Her seferinde taze hazırlanmış ÇİO çözeltilerinin kullanıldı.

**Sorenson tampon solüsyonu:**

**A Solüsyonu (asit):**

Potassium dihydrogen orthophosphate ( $KH_2PO_4$ ) (BDH Chemicals, K.N: 29608)	3,628 gr
Distile su	400 ml

**B Solüsyonu (baz):**

Disodium hydrogen orthophosphate dihydrate ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) (BDH Chemicals, K.N: 30157)	4,744 gr
Distile su	400 ml

A solüsyonundan 20 ml ve B solüsyonundan 80 ml karıştırılarak bir pHmetre ile pH 7,4'e ayarlandı.

**%2'lik gluteraldehit solüsyonu:**

Sorenson tampon solüsyonu	92 ml
%25'lik gluteraldehyde	8 ml

92 ml Sorenson tampon solusyonunun içine 8 ml %25'lik gluteraldehit eklenerek %2'lik gluteraldehit solusyonu elde edildi.

**Dörtlü plastik karışım:**

Araldite (CY 212)	20 ml
Dodecenyl succinic anhydrite (DDSA)	22 ml
Benzildimetilamin (BDMA)	1,1 ml
Dibutylphthalate	0,5 ml

Dörtlü karışım hazırlanırken önceden 60 °C'ye ısıtılmış beher içinde maddeler çizelgede belirtilen sırayla eklenerek karıştırıldı {Agar, Epoxy (Araldite) Resin Kit, R 1030}.

### 3.3.3. Elektron Mikroskop Doku Takibi Yöntemi:

1. Yukarıda belirtilen şekilde %2'lik gluteraldehit ve bunu takiben %1'lik osmium tetroksitte tespit edilen doku örnekleri ve  $\text{ClO}$  çözeltisi içinde tespit edilen ve boyanan doku örnekleri Sorenson tampon solüsyonu ile 20 dakika yıkanarak dehidratasyonu sağlamak için sırayla %50, %60, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirildi.
2. Doku örnekleri propilen oksit ile iki defa 15 dakika yıkandı.
3. Sudan arındırılan doku parçaları bloklanmadan önce dörtlü plastik karışımında alıştırıldı. Alıştırma yapılırken dokular 1 saat 3 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında, 1 saat 1 ölçü propilen oksit + 1 ölçü dörtlü plastik karışımında, bir gece 1 ölçü propilen oksit + 3 ölçü dörtlü plastik karışımında, 2 saat dörtlü plastik karışımında tutulduktan sonra dörtlü plastik karışımla bloklanarak etüvde  $60^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat polimerize edildi.
4. LKB 11800 piramitomunda cam bıçaklarla alınan yarı ince kesitler %1 lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi- Azur II karışımında boyandı (24).
5. Gümüş rengi ince kesitler LKB Ultratom III mikrotomunda cam bıçakla alınarak bakır gridler üzerine toplandı.
6. Alınan ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonu ile boyandı (24).

### 3.3.4. Değerlendirme:

Yarı ince kesitler Leica DMR Research Microscope- Germany mikroskobunda değerlendirildi ve Leica DC 500 kamera ile görüntüleri alındı.

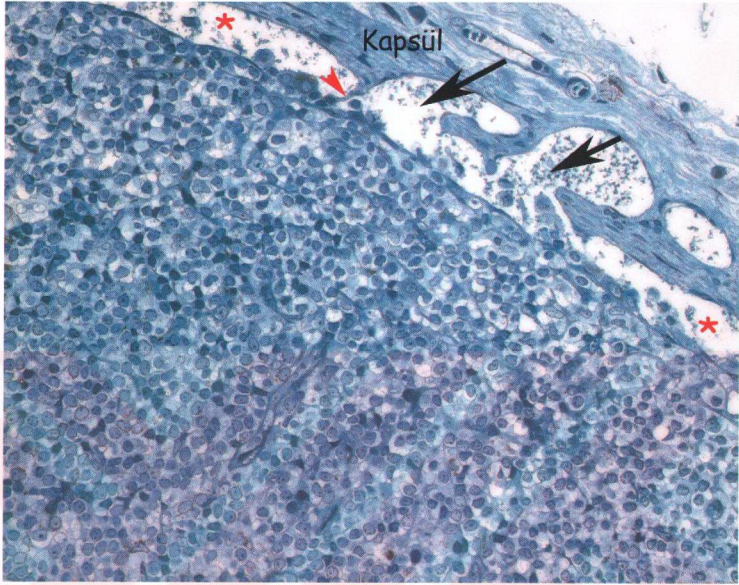
LKB Ultratom III mikrotomunda alınan ince kesitler Jeol JEM 1200 EX (Tokyo/Japonya) transmisyon elektron mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı. Fotoğrafların çekimi ve basımı, Kodak film (6.5X9 elektron mikroskop filmi), banyo ve kartları kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

### 4.1. Işık Mikroskobu Bulguları:

Işık mikroskobu düzeyindeki incelemeler rutin yöntemle ve ÇİO yöntemiyle hazırlanmış plastik bloklardan alınan yarı ince kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir. ÇİO yöntemi, lenfositlerde herhangi bir reaksiyon göstermediğinden organın diğer bileşenlerinin daha kolay ayırt edilmesini sağlamıştır. ÇİO ile pozitif reaksiyon veren hücre grupları arasında makrofajlar, damar ve sinüs endoteli, perisitler, fibroblastik retiküler hücreler, folliküler dendritik hücreler sayılabilir. Ancak yöntem bu hücre gruplarından hiç biri için özgül reaksiyon vermemektedir. Aynı hücre grubuna ait hücrelerden bir bölümü ÇİO (+) reaksiyon verirken diğerleri daha zayıf reaksiyon gösterebilmekte hatta bazıları hiç reaksiyon vermemektedir. Buna karşın lenfositler kesinlikle reaksiyon vermedikleri için ÇİO yöntemi organ içinde lenfosit dışındaki hücrelerin daha kolay tanınması için oldukça yardımcı olmuştur. Işık mikroskobu düzeyindeki incelemelerimize ait bulgular aşağıda özetlenmiştir:

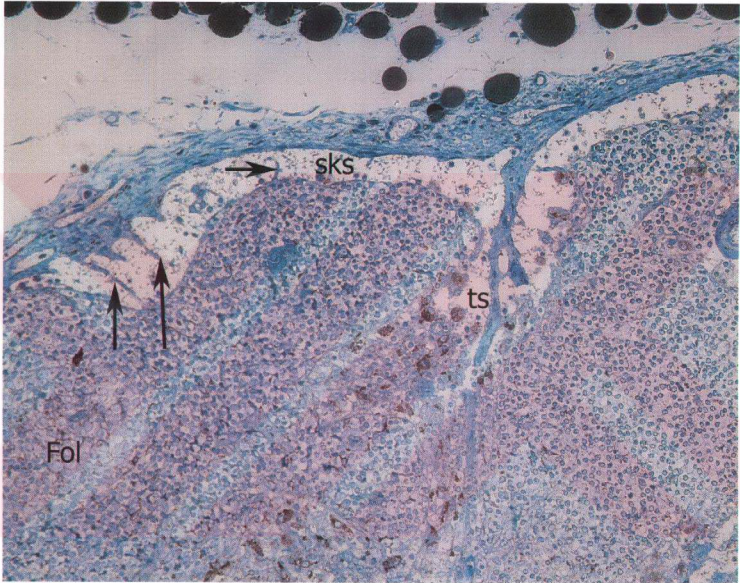
Lenf düğümünün dıştan fibröz bir kapsülle çevrili olduğu, afferent lenf damarlarının, kapsülü delerek kapsülün hemen altında kapsüle komşu ve paralel olarak uzanan subkapsüler (marjinal) sinüse açıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1.1). Subkapsüler sinüse yakın komşulukta bir kapak görüntüsüne rastlanmamıştır.



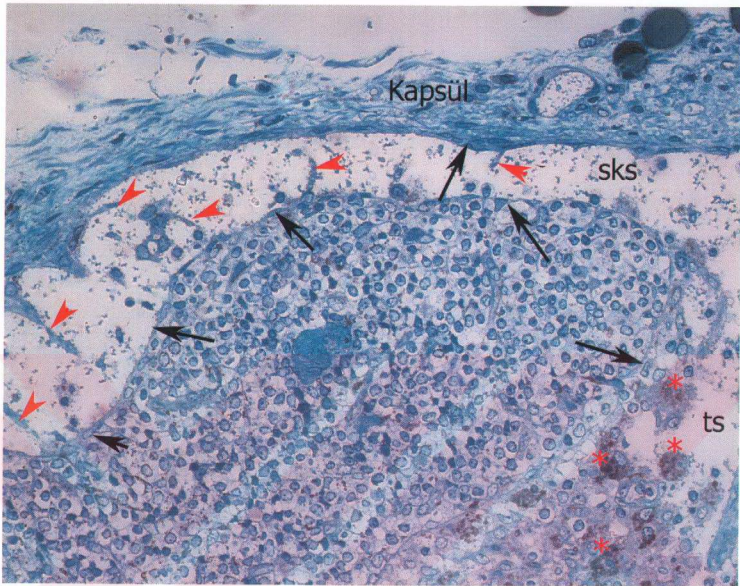
Şekil 4.1.1: İnsan lenf düğümünde bir afferent lenfatiğin subkapsüler sinüse açıldığı bölge (oklar) görülmektedir. Subkapsüler sinüs (\*); sinüs çaprazlayan hücre (ok başı). Metilen mavisi-Azur II, orijinal büyütme X40.

Organın konveks yüzünün karşı kutbunda yer alan hilus, damar kesitlerinin bulunduğu konkav bir çukurluk olarak izlenmiştir. Kapsülden organın içine doğru uzanan trabeküller ve subkapsüler sinüsün devamı olarak trabeküllerin her iki tarafında seyreden trabeküler (kortikal) sinüsler görülmüştür. Subkapsüler sinüsün kapsüle komşu dış duvarını devamlı bir hücre tabakasının döşediği ancak iç duvarını döşeyen hücre tabakasının subkapsüler sinüsten parankime hücrelerin geçişine izin verecek şekilde yer yer kesintili alanlar içerdiği izlenmiştir. Sinüslerin içinde retiküler hücrelerin, lenfositlerin ve çok

sayıda makrofajın bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.2-3). Çinko iyodit ozmiyum tetroksit (ÇİO) yöntemi ile boyanmış kesitlerde sinüsleri çaprazlayarak kateden retiküler hücrelerden bazıları ÇİO (+) reaksiyon vermeleriyle ayırılmıştır (Şekil 4.1.4).

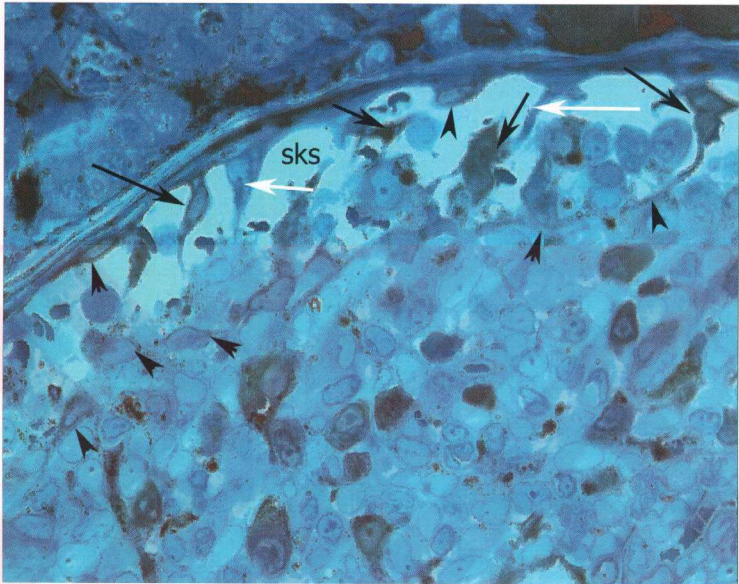


Şekil 4.1.2: Sıçan lenf düğümü kesitinde kapsül, subkapsüler sinüs (sks), trabeküler sinüs (ts), bir lenf follikülü (Fol) izlenmektedir. Lümeninde subkapsüler sinüsü çaprazlayan retiküler hücrelere (oklar) ait kesitler görülmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit tespit ve boyama yöntemi; metilen mavisi-azur II zemin boyaması, orijinal büyütme X20.



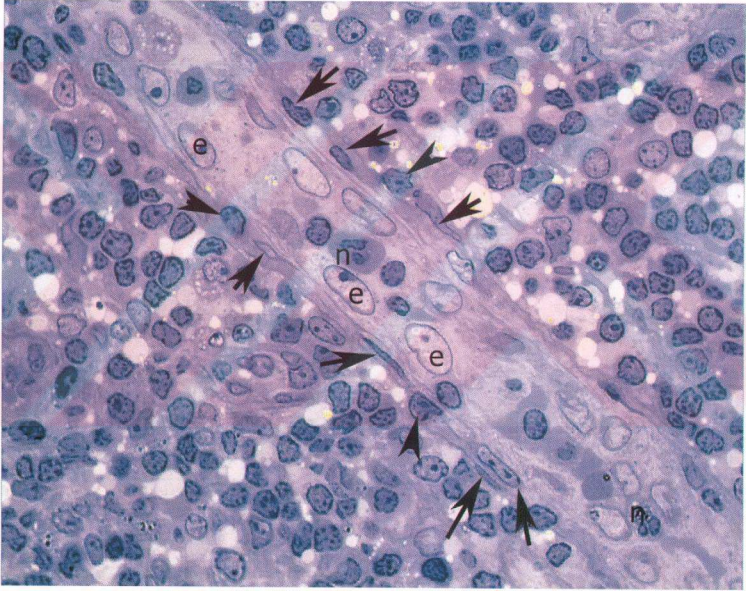
Şekil 4.1.3: Bir önceki resmin daha büyük büyütmesinde kapsül, subkapsüler sinüs (sks), trabeküler sinüs (ts) daha ayrıntılı görülmektedir. Sinüs çaprazlayan retiküler hücreler (ok başları), subkapsüler sinüsün dış ve iç duvarlarını döşeyen hücreler (oklar) ve trabeküler sinüs içinde ÇIO (+) makrofajlar (\*) izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit tespit ve boyama yöntemi; metilen mavisi-azur II zemin boyaması, orijinal büyütme X40.

Lenfoid dokudaki ÇİO (+) hücrelerin çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.3-4).



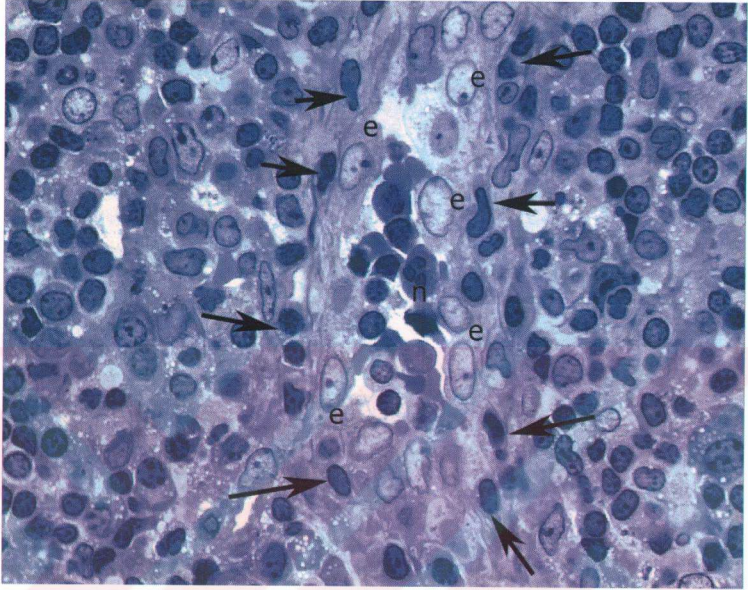
Şekil 4.1.4: Sıçan submandibüler lenf düğümü periferel kompartmanından geçen kesitte subkapsüler sinüs (sks) ile sinüs duvarını döşeyen (ok başları) ve çaprazlayan hücreler (oklar) görülmektedir. Çaprazlayan retiküler hücrelerden bazıları ÇİO (+) iken (siyah oklar); bazıları ÇİO (-) boyanmıştır (beyaz oklar). Üst komşu alanda submandibüler bezin bir bölümü izlenmektedir. Lenfoid dokudaki ÇİO (+) hücrelerin çoğunluğunu makrofajlar oluşturmaktadır. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit tespit ve boyama yöntemi; metilen mavisi-azur II zemin boyaması, orijinal büyütme X100.

Lenf düğümünün periferinde lenf follikülleri yuvarlak ya da yumurta biçimli (ovoid) yapılar olarak saptanmıştır. Folliküllerin içinde ve koronasında folliküler dendritik hücreler uzantılarıyla ÇİO pozitif olarak izlenmişlerdir. Folliküller arası alandaki ve parakorteksteki diffüz lenfoid doku içinde yüksek endotelli venül (YEV)'ler yapısal özellikleri ile kolayca seçilmiştir. Bu damarların duvarında dolaşımdan lenf düğümüne göç eden çok sayıda lenfosit gözlenmiştir (Şekil 4.1.5-6).



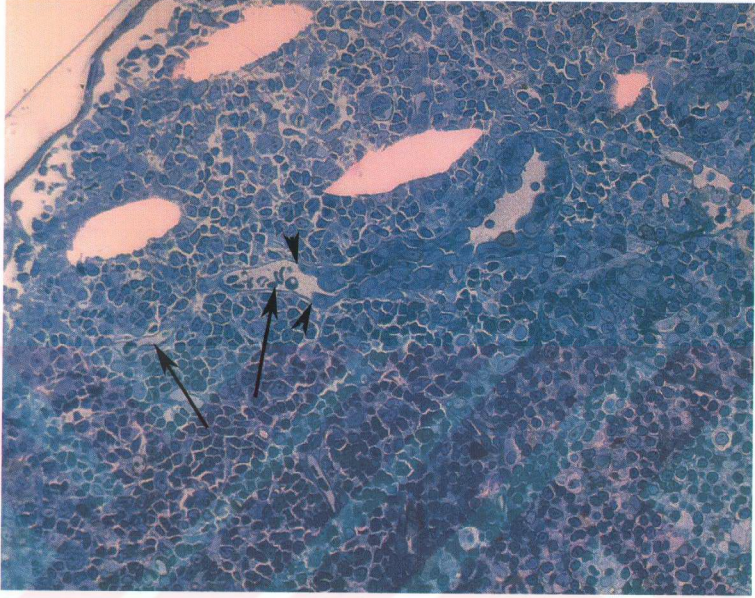
Şekil 4.1.5: Parakortekse yerleşik bir yüksek endotelli venülün uzunlamasına kesitinde duvarı oluşturan bileşenler ve göç eden lenfositler (ok başları) izlenmektedir. e: endotel hücresi, n: nötrofil lökosit, perisitler (oklar). Metilen mavisi-Azur II, orijinal büyütme X100.





Şekil 4.1.6: İnsan lenf düğümüne ait kesitte diğer bir yüksek endotelli venül ve ilişkili hücre grupları görülmektedir. Duvardan göçeden lenfositler oklarla işaretlenmiştir. Bunlardan bazıları aktif göç sürecinde oldukları yansıtır biçimde kum saati yapısında izlenmektedir. e: endotel hücresi, n: nötrofil lökosit. Metilen mavisi-Azur II, orijinal büyütme X100.

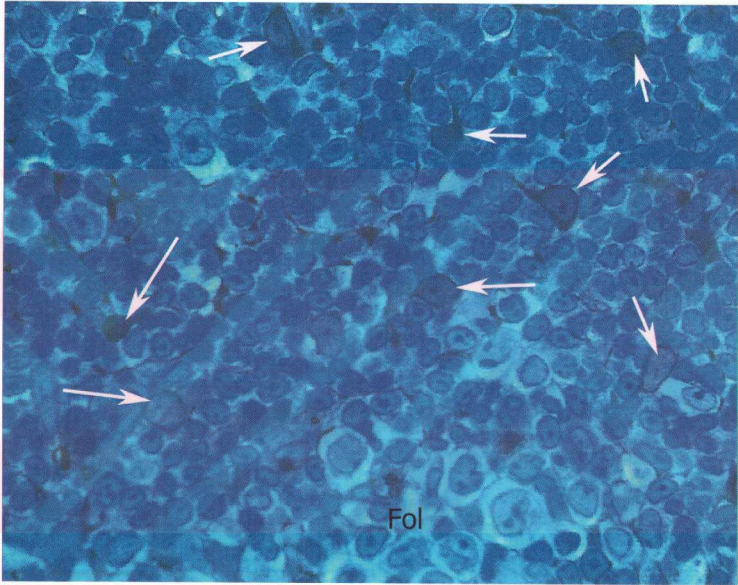
Bazı kesitlerde kapiller-YEV geçidine rastlanmış ve kapiller endotelinin yüksek endotel yapısına ani dönüşümü saptanmıştır (Şekil 4.1.7). Özellikle follikül çevresinde, folliküller arasında ve parakortekste bulunan YEV'lerin klasik tanımlarının ötesinde bazılarının ilginç olarak subkapsüler sinüsün hemen altına kadar yaklaştıkları belirlenmiştir. Bu yakın YEV sinüs komşuluğu özellikle insan lenf düğümlerinde daha çok dikkati çekmiştir.



Şekil 4.1.7: Sıçan lenf düğümü korteks ve parakorteksinden geçmiş kesitte kapiller ve postkapiller venülün (oklar), keskin bir sınırla (ok başları) yüksek endotelli venüle dönüşümü görülmektedir. ÇIO (+) boyanmış hücreler makrofajlardır. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit tespit ve boyama yöntemi; metilen mavisi-Azur II zemin boyaması, orijinal büyütme X40.

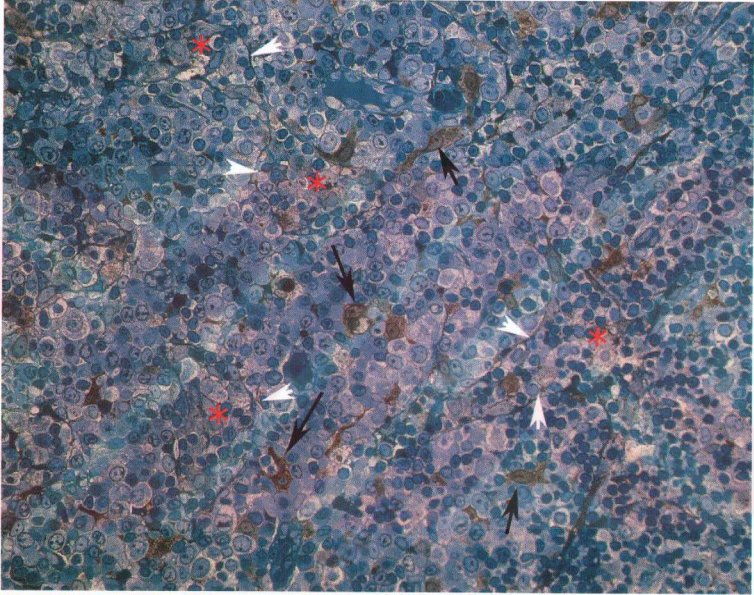
Lenf düğümünde hücelere yönelik olarak yapılan incelemelerde yapısal özellikleriyle kolay tanımlanan başlıca hücre gruplarını lenfositler, dendritik hücreler, makrofajlar, stromal hücreler ve mast hücreleri oluşturmaktadır. Dendritik hücrelerden FRH ve FDH'ler yerleşim ve yapısal özellikleriyle kolay ayırt edilirken IDH'lerin tanımlanması oldukça güçtür. Organın içinde kan kapillerleri dahil tüm damar türleri de kolayca ayırt edilmiştir. YEV'leri ve kan

kapillerlerini saran fibroblast benzeri perisitler ÇİO (+) olarak görüldüğü gibi ÇİO (-) olanlarına da rastlanmıştır. Lenf düğümünü çatısının ana hücresi olan fibroblastik retiküler hücrelerin büyük bir bölümü de ÇİO (+) olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.8).



Şekil 4.1.8: Sıçan lenf düğümüne ait kesitin büyük büyütmesinde alt bölümde bir folliküle ait bazal kompartman (Fol) ile komşu alanda ÇİO (+) boyanmış çoğu fibroblastik retiküler hücre görünümünde hücre gövdeleri ve uzantılarına ait kesitler izlenmektedir (oklar). Çinko iyodit osmiyum tetroksit tespit ve boyama yöntemi; metilen mavisi-Azur II zemin boyaması, orijinal büyütme X100.

Lenf düğümünün medullasında medulla sinüsleri ve özellikle lenfositler, plazma hücreleri, makrofajlar ve stromal hücrelerden oluşan medulla kordonları izlenmiştir (Şekil 4.1.9). Medulla sinüsü endoteli ve makrofajların genellikle ÇİO (+) reaksiyon verdikleri, bu nedenle daha kolay izlendikleri belirlenmiştir.

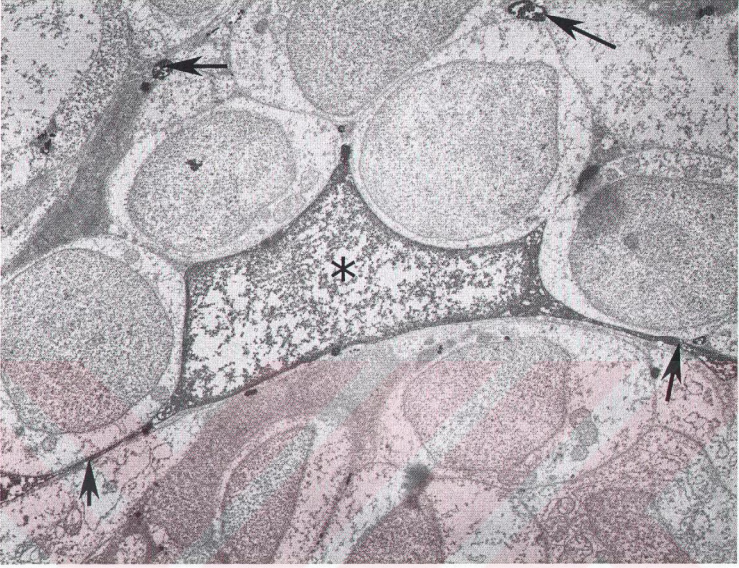


Şekil 4.1.9: Sıçan lenf düğümüne ait kesitte medulla kompartmanında ÇİO (+) boyanmış hücre grupları görülmektedir. Sinus lümeni (\*), sinus endoteli (ok başları) ve makrofajlar (oklar) ile çeşitli hücre uzantılarının ÇİO (+) boyandığı ve doku çatısının ayırt edilmesine yardımcı olduğu izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit tespit ve boyama yöntemi; metilen mavisi-Azur II zemin boyaması, orijinal büyütme X40.

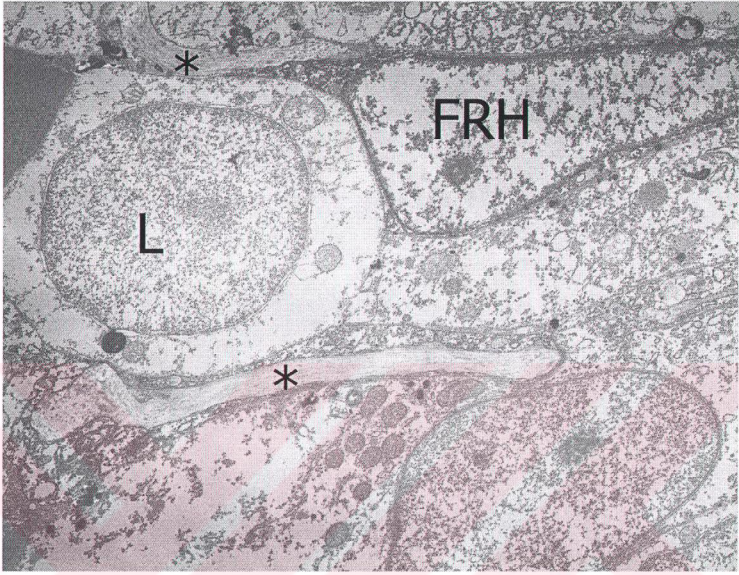
#### 4.2. Elektron Mikroskobu Bulguları:

Her iki yöntemle hazırlanmış bloklardan lenf düğümünün farklı bölümlerine ait ince kesitlerde yapılan incelemelerde ışık mikroskobu düzeyinde olduğu gibi çeşitli hücre grupları yapısal özellikleriyle kolayca tanımlanmıştır. Bu hücre grupları içinde lenfositler, makrofajlar, eozinofil lökositler, mast hücreleri, fibroblastik retiküler hücreler, sinüs endoteli, sinus çaprazlayan hücreler, plazma hücreleri, folliküler dendritik hücreler, yüksek endotelli venül endotel ve perisitleri sayılabilir. Özellikle fibroblastik retiküler hücreler, bunların uzantılarının retiküler liflerle olan ilişkileri, subkapsüler sinüsü döşeyen ve çaprazlayan hücreler ile yüksek endotelli venüller daha ayrıntılı olarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

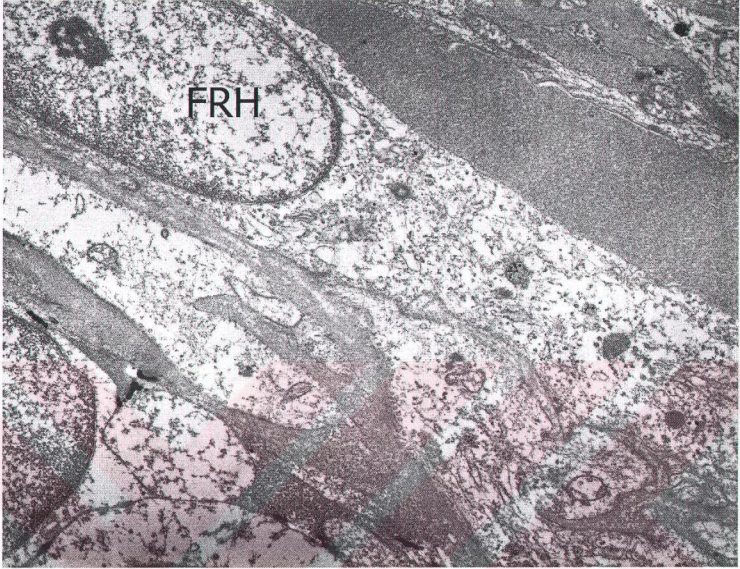
Fibroblastik retiküler hücreler (FRH) iri, oval çekirdekleri, belirgin çekirdekçikleri ve sitoplazmik uzantıları olan ÇİO (-) ya da ÇİO (+) boyanabilen hücreler olarak izlenmiştir; çekirdeğin büyük bir kısmı diffüz granüler kromatin içerirken yalnızca çekirdek zarına komşu alanlarda heterokromatin gözlenmiştir (Şekil 4.2.1-3). FRH'lerin ince yapı özellikleri bakımından diğer dokuların fibroblastlarından çok farklı olmadıkları belirlenmiştir. Uygun kesitlerde FRH uzantılarının birbirlerine desmozom ile bağlandıkları görülmüştür (Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.1: Küçük büyütmedeki elektronmikrografta ÇIO (+) bir fibroblastik retiküler hücre, lenfositlerin arasına doğru uzanan ince sitoplazmik uzantıları (oklar) ile birlikte görülmektedir. Kesitin diğer bölümlerinde ÇIO (+) reaksiyon veren hücre uzantılarının enine kesitlerine de rastlanmaktadır (oklar). Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 5000.



Şekil 4.2.2: Parakortekse ait bir kesitte ÇİO (-) bir fibroblastik retiküler hücrenin uzantısı tarafından büyük ölçüde sarılmış bir kanalcık (\*) izlenmektedir. Resmin üst bölümünde orta derecede ÇİO reaksiyonu veren diğer bir FRH'ye ait hücre gövdesi ile yakın komşuluğunda bir kanalcık (\*) izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6700.



Şekil 4.2.3: Orta büyütmedeki elektronmikrografta, aktif bir fibroblastik retiküler hücreye (FRH) ait hücre gövdesi izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 10000.

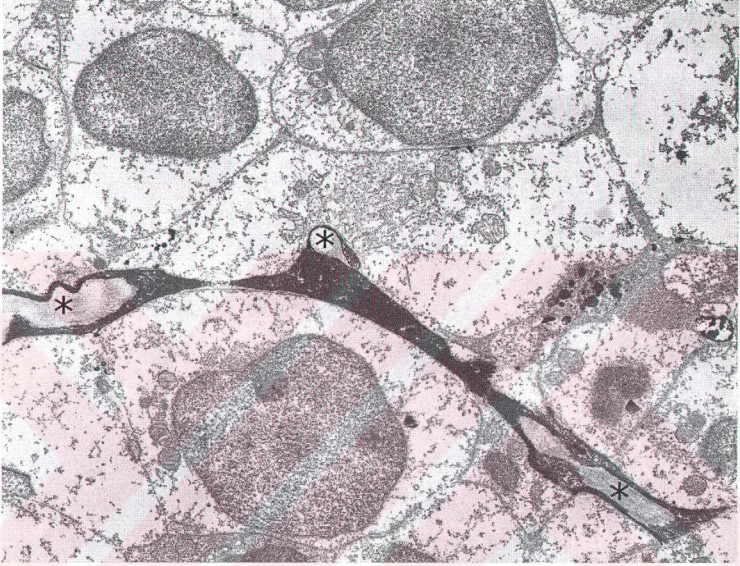




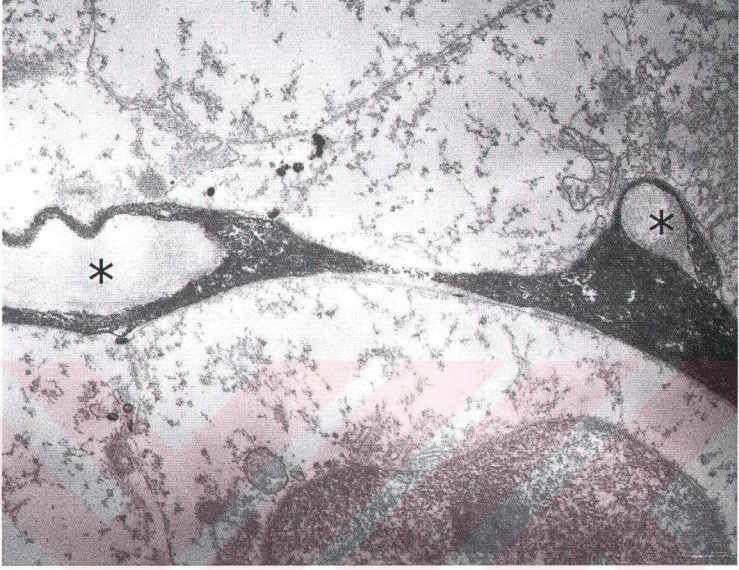
Şekil 4.2.4: Komşu lenfositler (L) arasında uzanan bir makrofaj ve ona ait uzanti ÇİO (+) olarak görülmektedir. Makrofajın hemen üst komşuluğundaki ince FRH uzantılarının ise birbirlerine desmozomla bağlandığı (ok) izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 25000.

ÇİO yöntemiyle hazırlanmış preparatlarda yapılan incelemelerde, gerek fibroblastik retiküler hücelere gerek makrofajlara ait sitoplazma uzantılarının belirgin olarak ÇİO reaksiyonu verdikleri görülmüştür. Bunların ait oldukları hücre ile ilişkisinin gözlenmediği ve çok ince olmaları durumunda hangi hücreye ait oldukları saptanamamıştır. Hücre uzantılarının retiküler liflerle olan yapısal ilişkisi incelendiğinde fibroblastik retiküler hücelerin sitoplazmik uzantılarıyla retiküler lifleri kılıf gibi sardığı gözlenmiştir. Bu FRH uzantılarının retiküler lifleri

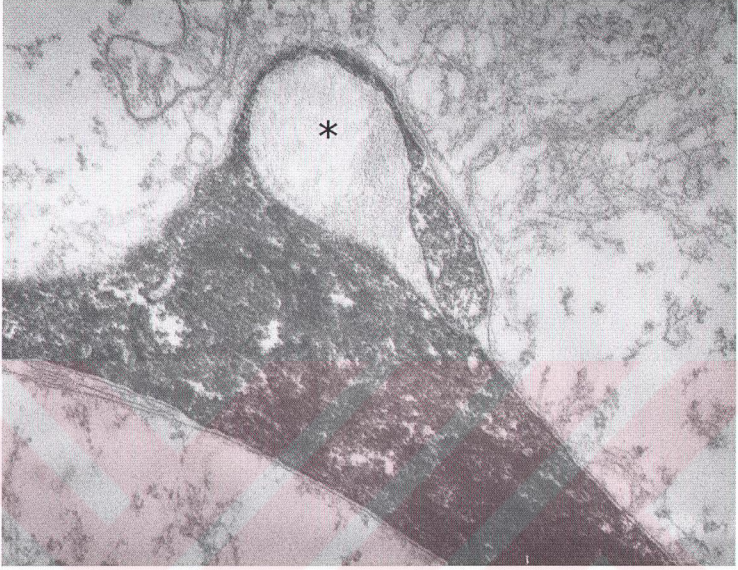
sarak sinüs ve intersitysel alandan ayrı büyük ölçüde izole bir hücre dışı kompartman oluşturdukları saptanmıştır (Şekil 4.2.5-10).



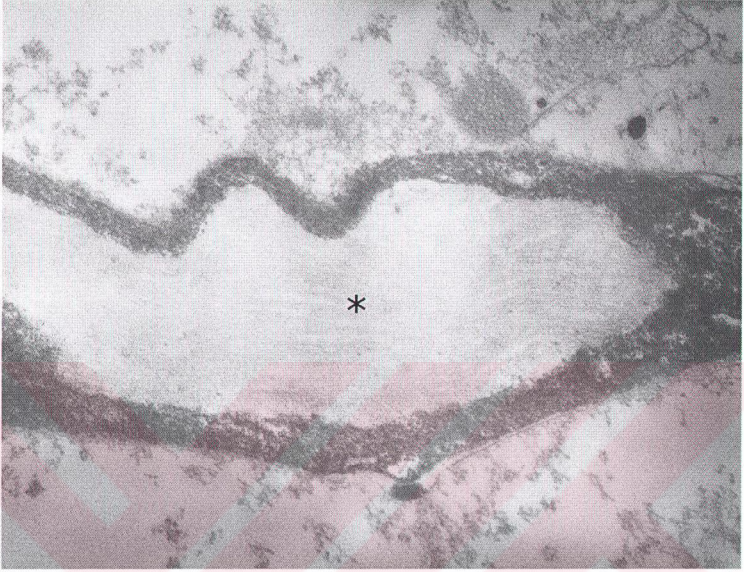
Şekil 4.2.5: Sıçan lenf düğümü parakorteksine ait kesitin elektronmikrografında lenfositler arasında uzanan bir FRH uzantısı içinde kollajen lifler içeren kanalcıklar (\*) görülmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6600.



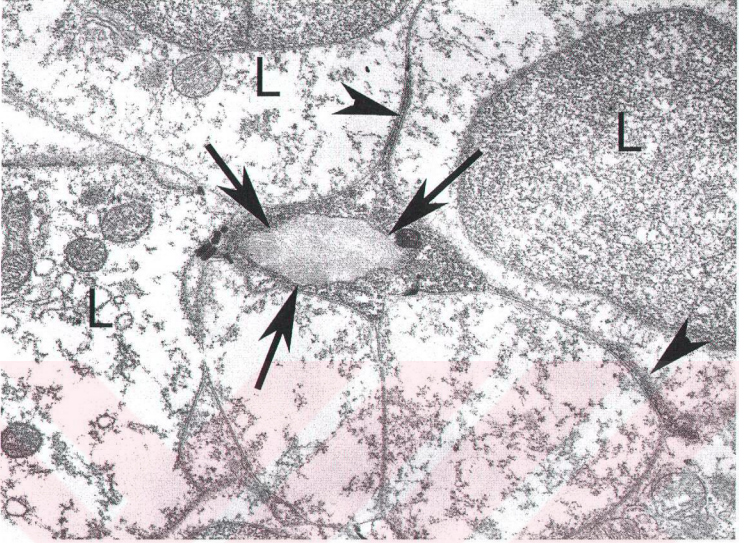
Şekil 4.3.6: Bir önceki resmin daha büyük büyütmesinde iki kanalcık (\*) daha ayrıntılı olarak seçilmektedir. Sağdaki kanalcığın hücrenin bir yan katlantısı tarafından sarıldığı izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 16000.



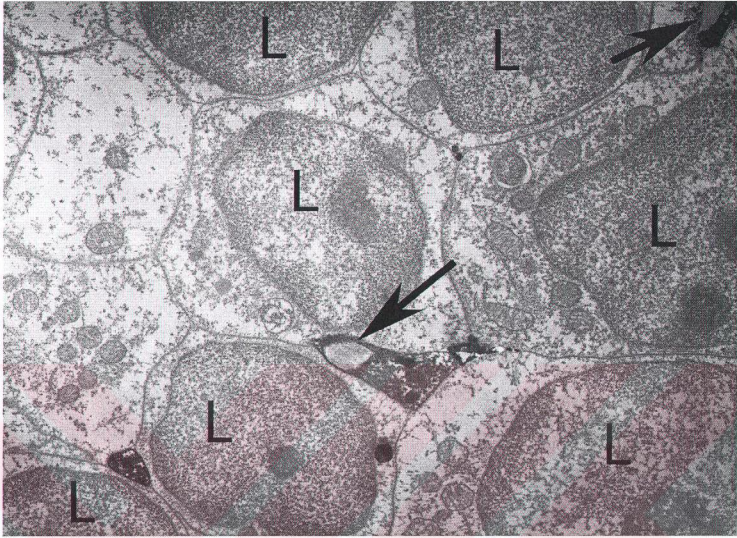
Şekil 4.2.7: Önceki resimde sağda yerleşmiş kanalcığın daha büyük büyütmede merkezi bölümünün daha açık boyandığı, çevrede ise daha sıkı paketlenmiş retiküler lif enine kesitlerinin bulunduğu izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 41000.



Şekil 4.2.8: Şekil 4.2.5 ve 6'da solda yer alan kanalcığın (\*) daha büyük büyütmesinde ÇİO (+) hücre uzantıları ile sarıldığı ve içinde kollajen liflerin bulunduğu izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 41000.

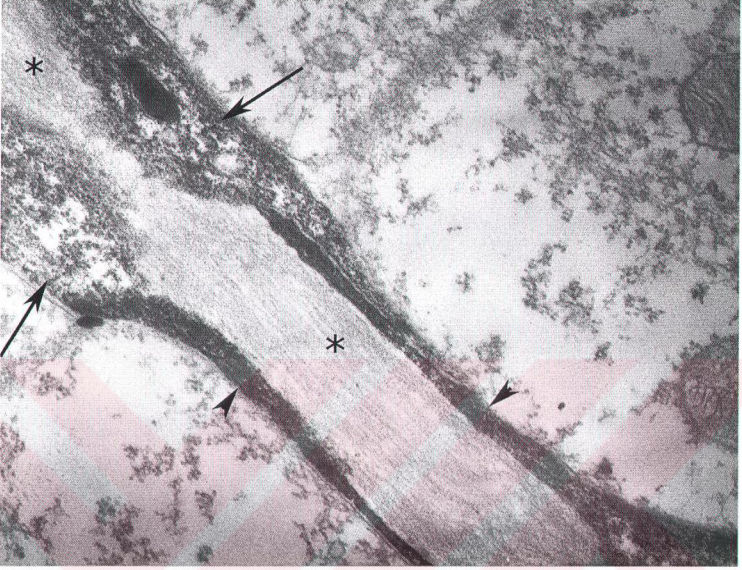


Şekil 4.2.9: Lenf düğümü derin korteksine ait kesitte, lenfositler ve aralarında yerleşmiş bir fibroblastik retiküler hücre uzantısı (ok başı) görülmektedir. Fibroblastik retiküler hücre uzantısının genişçe bir bölümünde retiküler lifleri çepeçevre sardığı ve sınırladığı seçilmektedir (oklar). Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 16000.



Şekil 4.2.10: Derin kortekse ait sıçan lenf düğümü kesitinin elektronmikrografında lenfositler arasında uzanan bir FRH uzantısına ait kesit görülmektedir. Uzantının bir kenarında sitoplazmayla tamamen çevrelenmiş bir kanalcık enine kesiti (ok) izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 7100.

Retiküler lifleri saran fibroblastik retiküler hücre uzantılarına yönelik yapılan ayrıntılı incelemeler, bazı alanlarda retiküler lif içeren kanalcıkların komşu hücrelere ait uzantılar tarafından kesintisiz olarak sarıldığını göstermiştir (Şekil 4.2.11).



Şekil 4.2.11: Bir kanalcığa ait kesitin büyük büyütmedeki elektron mikrografında kanalcığın komşu hücrelere ait uzantılarla sarı olduğu görülmektedir. Daha sol yukarıda kalan hücreye ait uzantılar (oklar), sağ alttaki hücreye (ok başları) oranla daha az yoğun ÇİO (+) reaksiyon vermiş olmasıyla kolaylıkla ayırt edilmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 41000.

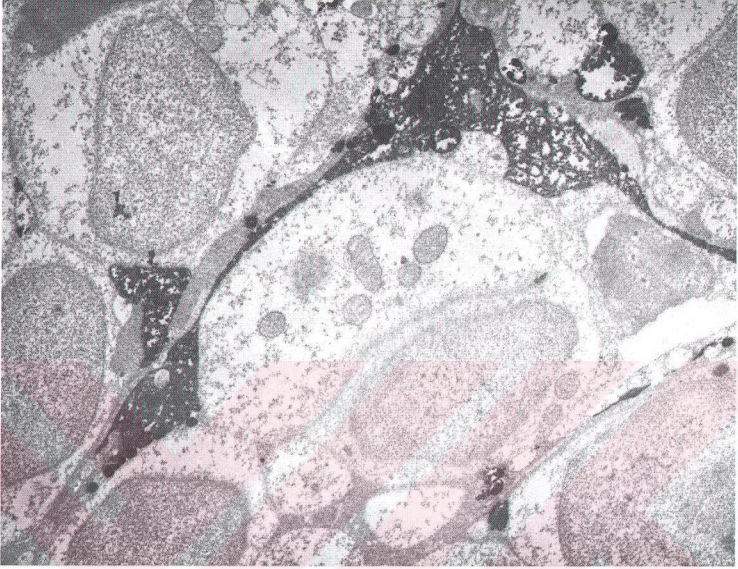
İlginc gözlemlerimizden bir tanesi de fibroblastik retiküler hücre uzantısı ağının karmaşık yapısını yansıtır ilişkiler olmuştur. Bu hücrelerin uzantılarının makrofajların sitoplazmasındaki açıklıktan hücre boyunca geçtiği izlenmiştir (Şekil 4.2.12).



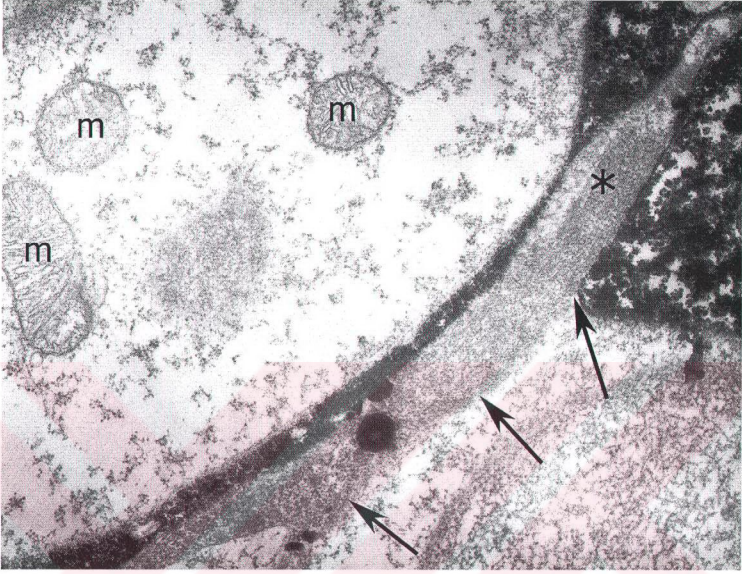


Şekil 4.2.12: Parakortekse ait bir kesitte, ÇİO (+) reaksiyon veren bir makrofaj uzantısının içinden fibroblastik reitküler hücreye ait ÇİO (-) bir uzantının geçtiği görülmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 10000.

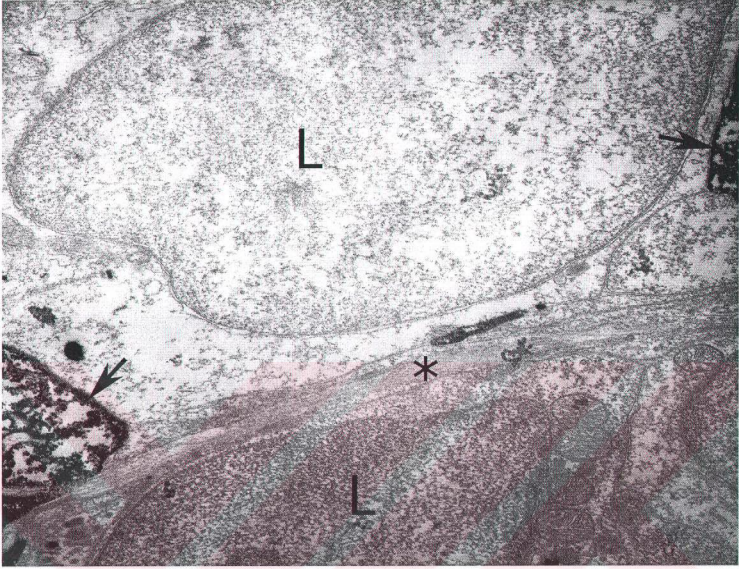
FRH uzantısı-retiküler lif (kanalcık) ilişkisinde ilk göze çarpan bulgu genel olarak lenfositlerin kanalcıkla doğrudan yapısal ilişki içinde olmadıkları, kanalcığı çevreleyen FRH uzantıları ile temasta oldukları şeklinde idi (Şekil 4.2.5-10). Ancak uzantıların ayrıntılı taramasında bazı alanlarda bu uzantıların kesintiye uğradıkları, lenfositlerin doğrudan retiküler liflerle temas kurdukları da izlenmiştir. Dolayısıyla kanalcıkların yer yer kesinti alanları gösterdikleri, kesintisiz ve kapalı bir sistem oluşturmadıkları saptanmıştır (Şekil 4.2.13-15).



Şekil 4.2.13: Bir makrofaj uzantısı tarafından sarılmış kanalcığın alt sınırı ÇİO (+) hücre uzantısı tarafından sarılmışken, üst kenarı doğrudan lenfosit ile temas halindedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 7100.



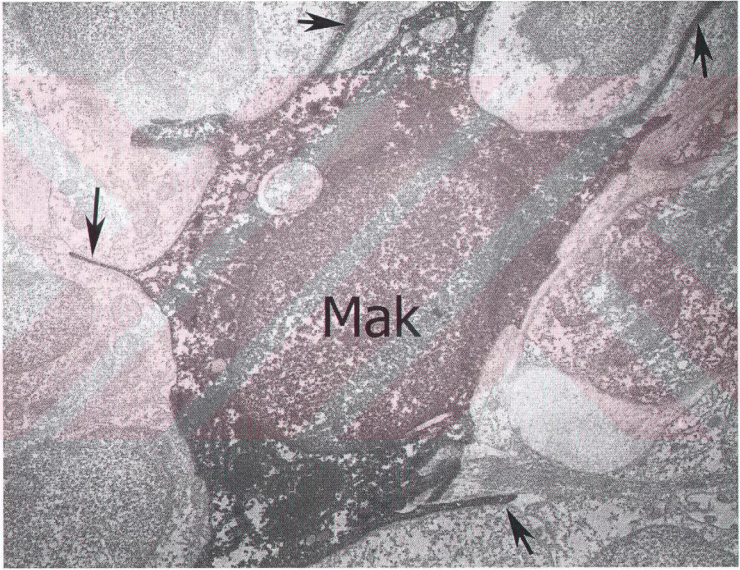
Şekil 4.2.14: Önceki resmin büyük büyütmesinde ÇİO (+) reaksiyon veren bir makrofaj uzantısı tarafından sarılmış kanalcığın (\*) sağ alt sınırının herhangi bir hücre uzantısı tarafından kuşatılmadığı, doğrudan lenfosit komşu olduğu (oklar) seçilmektedir. m: mitokondriyon. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 25000.



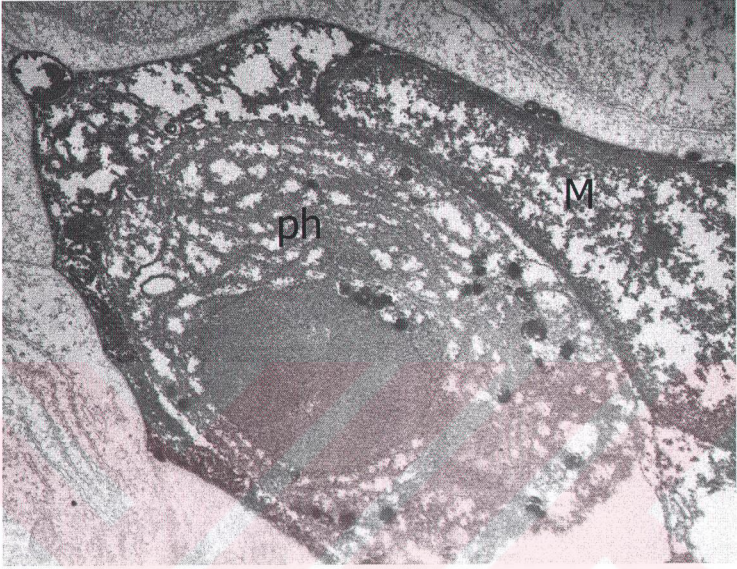
Şekil 4.2.15: Komşu iki lenfosit (L) arasında uzanan diğer bir kanalcığın (\*), kısmen ÇİO (+) makrofaj uzantısı (oklar), kısmen ÇİO (-) FRH uzantısı tarafından sarıldığı izlenmektedir. Ancak kanalcığın bazı bölümlerinde hücre uzantılarıyla çevrelenmediği ve doğrudan lenfositlerle temas halinde bulunduğu görülmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 16000.

Makrofajlar çoğunlukla ÇİO (+) boyanan, uzantılı ve fagositoz işlevi olan hücreler olarak seçilmiştir (Şekil 4.2.16 ve 17). Makrofajların sitoplazmalarında çok sayıda heterofajik vakuol izlenmiştir. Folliküler makrofajlarda daha yoğun olmak üzere bu heterofajik vakuollerin dejeneren lenfosit figürleri içerdiği görülmüştür. Medullada yerleşik makrofajların sitoplazmalarında plazma hücrelerinin fagositozuna ait görüntüler saptanmıştır (Şekil 4.2.17). Makrofaj

uzantılarının da yer yer retiküler lifleri sararak kanalcığın oluşumuna katıldığı gözlenmiştir. Organın parankimasında retiküler lifleri saran FRH'lerin sınırladığı ve içinde lenfositlerin yer aldığı boşluklar gözlenmiştir. Koridor olarak tanımlanan retiküler hücre ve makrofaj uzantıları arasında yerleşik bu üç boyutlu bölgede fibriler yapıda hücre dışı matriks bileşeni görüntüsüne rastlanmamıştır. Koridor içindeki lenfositlerin yukarıda değinildiği gibi genel olarak FRH'ler ya da makrofajların uzantıları ile temas halinde olduğu saptanmıştır.

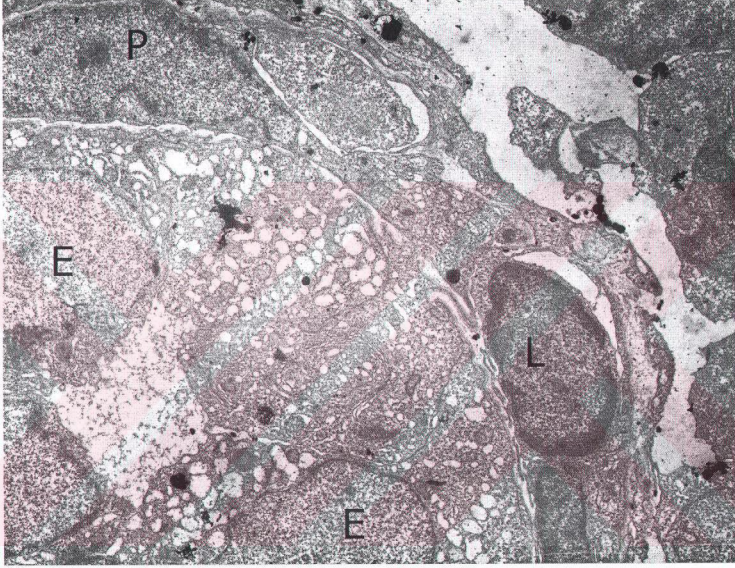


Şekil 4.2.16: Sıçan lenf düğümü parakorteksine ait kesitte, güçlü ÇİO (+) boyanmış bir makrofaj (Mak) ile ince sitoplazmik uzantıları (oklar) seçilmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 10000.



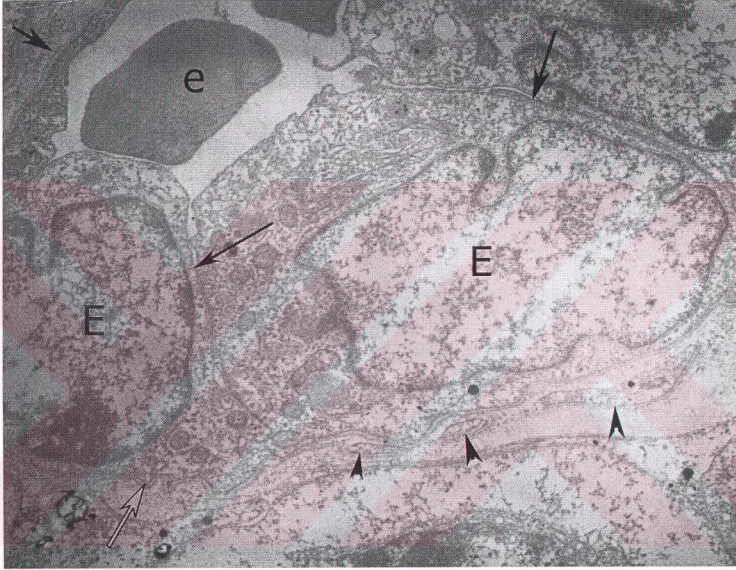
Şekil 4.2.17: Medullada yerleşik ÇİO (+) bir makrofajın (M), dejenere bir plazma hücrelerini (ph) henüz fagosite ettiğinin izlendiği elektronmikrograf. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 12500.

Özelleşmiş postkapiller venüller olan yüksek endotelli venüllerin (YEV) lümenini döşeyen kübik endotel hücreleri ve bu venüllerin çevresindeki fibrilden zengin matriksi saran, ultrastrüktürel olarak FRH'den ayrılamayan perisitler gözlenmiştir (Şekil- 4.2.18).



Şekil 4.2.18: Parakortekse yerleşmiş bir YEV'e ait endotel hücreleri (E), perisit (P) ve perisitler arası kompartmana göç etmiş bir lenfosit (L) küçük büyütmede izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6700.

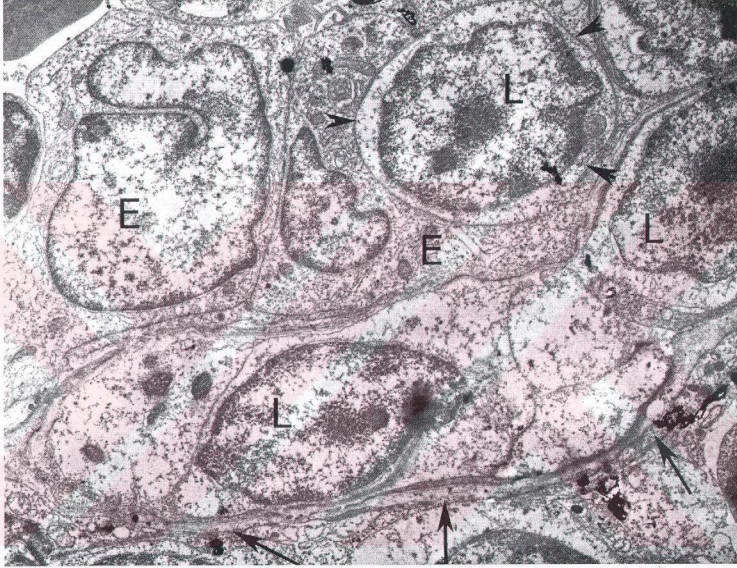
YEV endotel hücrelerinin arasında yan yüzün apikal bölgesinde yerleşik bağlantıların varlığı saptanmış; bu bağlantıların lümeden belli bir mesafede yerleşmiş olduğu, hücrelerin apikal bölümlerinin lümeneye doğru çıkıntı yaptığı izlenmiştir (Şekil 4.2.19).



Şekil 4.2.19: Diğer bir yüksek endotelli venüle ait kesitte endotel hücrelerinin arasındaki bağlantıların hücrelerarası aralığın derinlerinde yerleşmiş olduğu (oklar), hücrelerin apikal bölümlerinin lümeni daraltmak üzere toparlanmış olduğu izlenmektedir. Damarları çevreleyen kompartmanda perisitlere ait kesitler (ok başları) izlenmektedir. Bazal lamina (çerçevesiz ok). Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 10000.

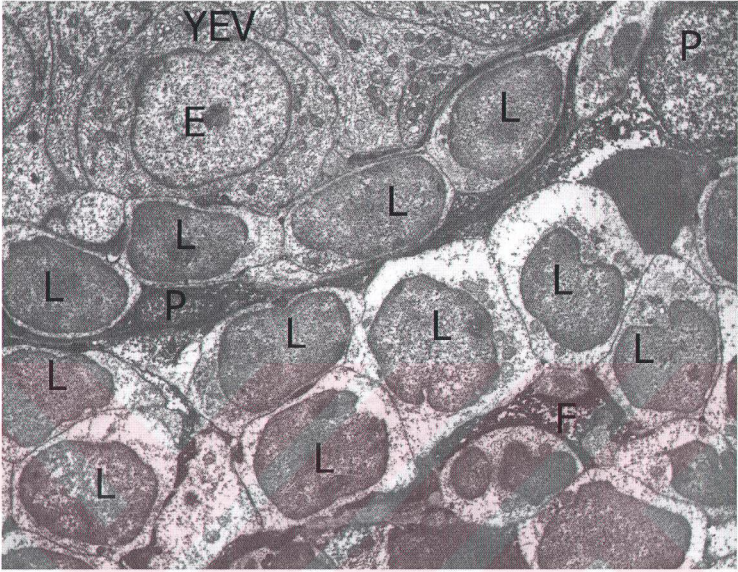


YEV duvarından göç eden lenfositlere yönelik olarak yapılan incelemelerde, bu hücrelerin endotel hücreleri içinden transsellüler olarak göç ettiklerine ait görüntülerle birlikte, hücreler arasında yerleşmiş görünen lenfosit görüntülerine de rastlanmıştır (Şekil 4.2.20).

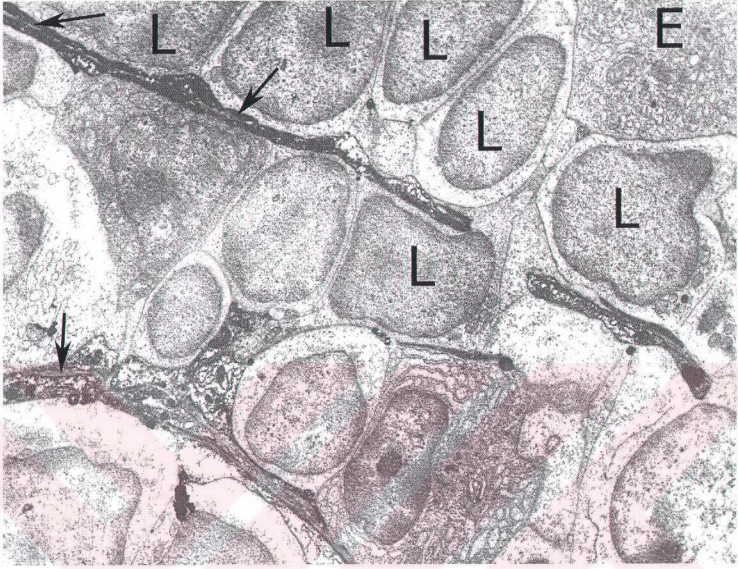


Şekil 4.2.20: Bir yüksek endotelli venül duvarına ait kesitte göç etmekte olan lenfositler izlenmektedir. Bu lenfositlerden yukarıda olanının tümüyle bir endotel hücresinin (E) sitoplazması tarafından kuşatıldığı, göçün transsellüler olduğu izlenimini vermektedir (ok başları). Altta ki lenfosit ise perivenüler kompartmana geçmiştir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6700.

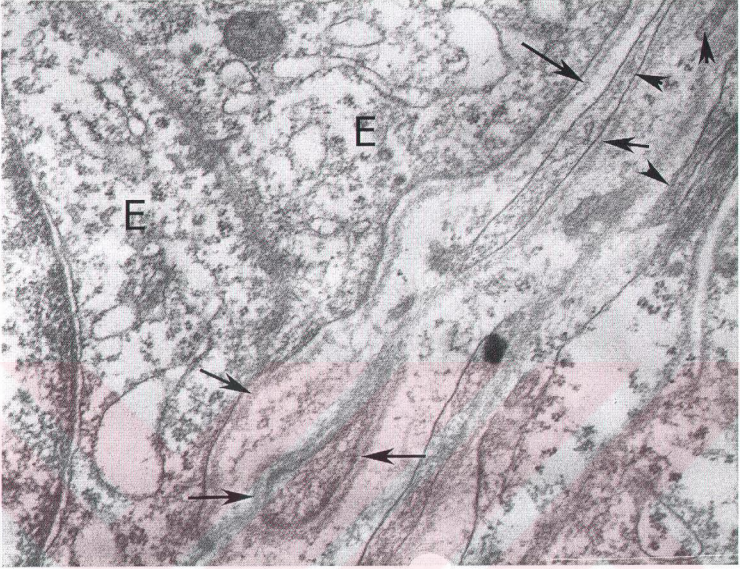
YEV endoteli ile perisit tabakaları arasında yer alan ve perivenüler kanal olarak da adlandırılan alanlar genellikle duvardan göçünü tamamlamış lenfositlerle dolu olarak izlenmiştir (Şekil 4.2.21). Perivenüler kanalda lenfositlerin yanında, özellikle göçün sınırlı kaldığı hücreden fakir bölümlerde perisit ya da fibroblastik retiküler hücre uzantılarının sınırladığı damar bazal yüzüne paralel seyirli, ince kollajen lif demetleri ve hücre dışı matriks bileşenleri içeren bölümler izlenmiştir. Duvardan göçünü tamamlamış lenfositler bu alanda diziler oluşturacak şekilde yerleşmiş olarak görülmektedir. Ancak bu bölgedeki bazı hücrelerin perisit ya da retiküler hücre uzantılarının sınırladığı alanları lenfoid dokunun derinlerine ulaşmak üzere geçtiklerini düşündüren görüntülere rastlanmıştır (Şekil 4.2.22). Özellikle damardan sonraki ikinci ve daha sonraki sıraları oluşturan uzantıların içinde yine kanalcıkların bulunduğu, bu hücrelerin bu yapısal özellikleriyle fibroblastik retiküler hücre özelliklerini yansıttıkları görülmüştür. Perisitlerin ve perivenüler kanalda uzanan fibroblastik retiküler hücre uzantılarının endotel hücreleri gibi bazal lamina ile sınırlandıkları izlenmiştir. Ancak ilginç bir bulgu olarak, bazı uzantılar çepçevre eksternal lamina ile çevrili olarak izlenirken (Şekil 4.2.23), diğerlerinin sadece damardan uzak yüzünde bazal lamina varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.2.24).



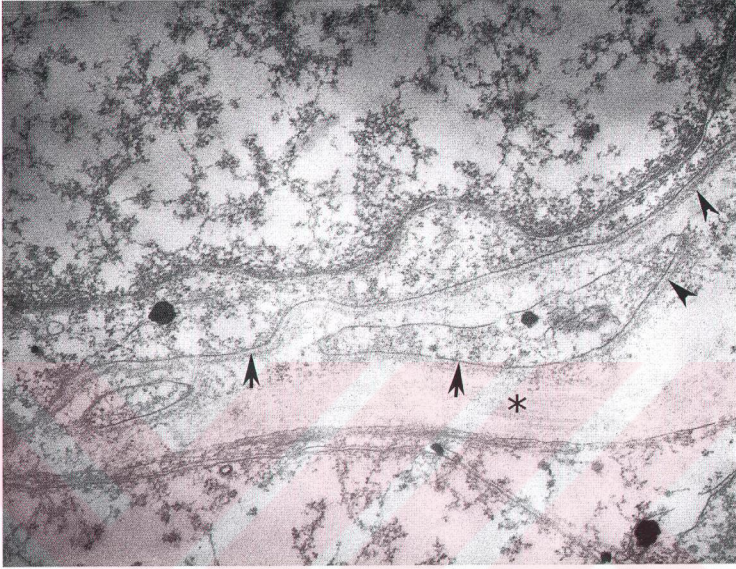
Şekil 4.2.21: Sıçan lenf düğümünde bir yüksek endotelli venül (YEV) ve periferik kompartmanına ait kesitte henüz göç etmiş bir sıra lenfosit (L) endotelin (E) hücrelerinin bazalinde izlenmektedir. Daha periferde yerleşmiş lenfositlerle bu lenfositler arasında ve endotel hücreleri arasında ÇİO (+) reaksiyon veren perisit uzantıları bulunmaktadır. Dış sıra lenfositin daha periferindeki FRH uzantıları (F) arasında kanalcıkların varlığı dikkati çekmektedir. İki ÇİO (+) hücre uzantısı katının arası perivenüler kompartmanda koridor olarak tanımlanan alandır. P: Perisit. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6700.



Şekil 4.2.22: Öncekine benzer bir kesitte lenfositlerin (L) bazılarının göç ettiklerini yansıtır biçim değişiklikleri dikkati çekmektedir. ÇİO (+) uzantıların içinde kanalcıkların varlığı bu büyütmede de izlenebilmektedir (oklar). E: Endotel hücresi. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 12500.

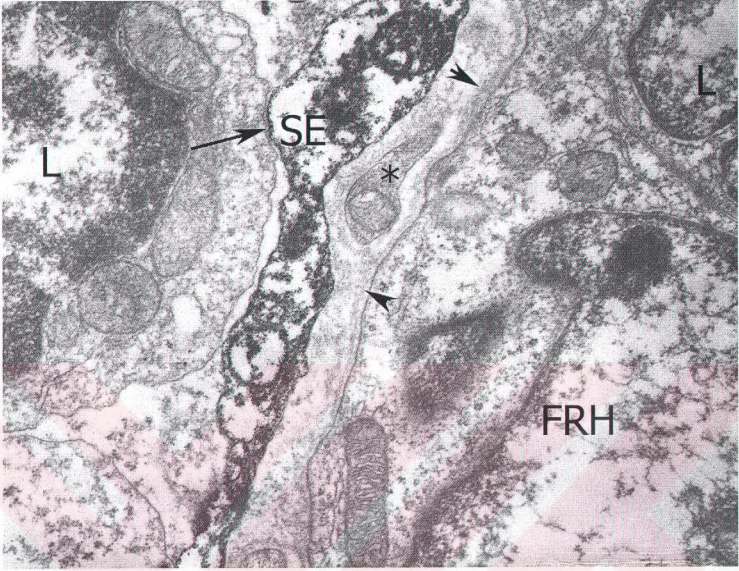


Şekil 4.2.23: Yüksek endotelli venül bazal kompartmanına ait kesitte endotel hücreleri (E) ve perisitlere ait uzantılar görülmektedir. Endotel hücrelerinin bazalinde ve perisitlerin çevresinde bazal lamina izlenmektedir (oklar). Uzantılardan birinin sadece dış yüzünde eksternal lamina bulunması dikkat çekicidir. Perivenüler kompartmanda bir kaç sıra hücre uzantısı bulunduğu da görülmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 33000.



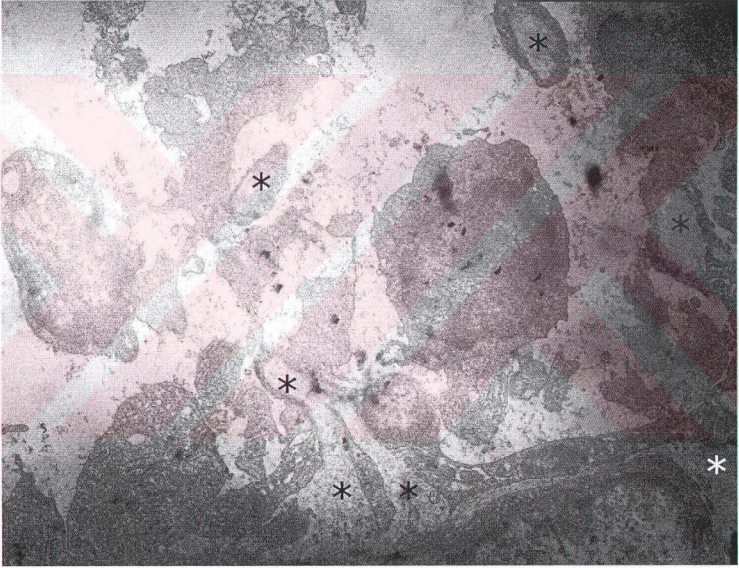
Şekil 4.2.24: Aynı damarın periferine ait diğer bir alanda endotel hücresi, bazal-eksternal lamina (ok başları) ve hücre uzantıları görülmektedir. Uzantılar arasında yerleşik bir kanalcığın (\*) varlığı da dikkati çekmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 25000.

Kortikal sinüs ve medulla sinüslerinin çoğunlukla  $\text{C10 (+)}$  reaksiyon veren endotel hücreleri ile döşeli oldukları görülmüştür. Sinüslerin lenfoid dokuya komşu yüzlerinde fibroblastik retiküler hücreler ve bunların uzantılarına ait kesitlere rastlanmıştır. Bu alanlarda lenfositler ve sinüs endotel hücreleri arasındaki adeziv ilişkilerin varlığı da dikkati çekmiştir (Şekil 4.2.25).



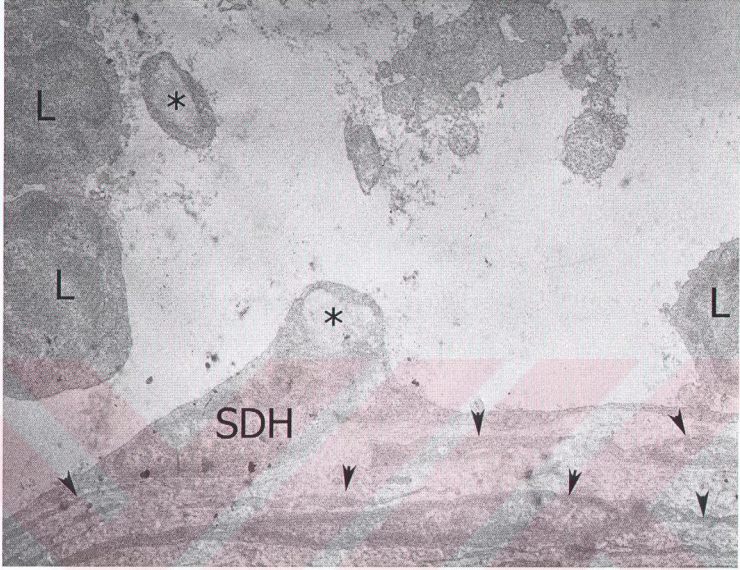
Şekil 4.2.25: Lenf düğümüne ait kesitte, sinüs lümeni ve yakın komşuluğu izlenmektedir. Sinüs endoteli güçlü ÇİO (+) boyanmıştır ve bazalinde belirgin bir bazal lamina bulunmamaktadır. Hemen altındaki kompartmanda küçük bir FRH uzantısı (\*) ile komşuluğunda yer alan bir FRH izlenmektedir. FRH'nin sinüse bakan yüzünde bazal lamina belirgin olarak izlenirken (ok başları) sağ üst köşedeki lenfosit bakan yüzünde bazal lamina mevcut değildir. Sinüs lümeninde yerleşik bir lenfositin (L) sinüs endoteli ile adeziv ilişkisi (ok) dikkati çekmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 25000.

Subkapsüler sinüs ve ilişkili hücre gruplarına yönelik olarak yapılan incelemelerde, sinüsün kapsüle komşu dış ve parankime komşu iç duvarının sinüs endoteli hücreleri ile döşeli olduğu, lümeninde ise retiküler hücrelerce sarılmış retiküler lifler, lenfositler ve makrofajların bulunduğu izlenmiştir. Subkapsüler sinüsü çaprazlayan ve lenf düğümü parankimine doğru uzanan retiküler liflerin retiküler hücreler tarafından sarıldığı gözlenmiştir (Şekil-4.2.26 ve 27).



Şekil 4.2.26: Subkapsüler sinüs iç duvarına ait bir kesitte lenfoid doku içindeki ve sinüsü çaprazlayan retiküler hücrelerce sarılmış kanalcıklar (\*) izlenmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6700.





Şekil 4.2.27: Subkapsüler sinüs dış duvarı ve sinus döşeyen hücrenin (SDH) görüldüğü elektron mikrografta, sinüsü çaprazlayan retiküler hücre uzantıları içinde kanalcıkların varlığı (\*) dikkati çekmektedir. Lümende lenfositler (L) de izlenmektedir. Sinüsün duvarına komşu birkaç sıra hücre uzantısının da bulunduğu (ok başları) seçilmektedir. Çinko iyodit ozmiyum tetroksit yöntemi ile tespit ve boyama; uranil asetat-kurşun sitrat zemin boyaması X 6700.

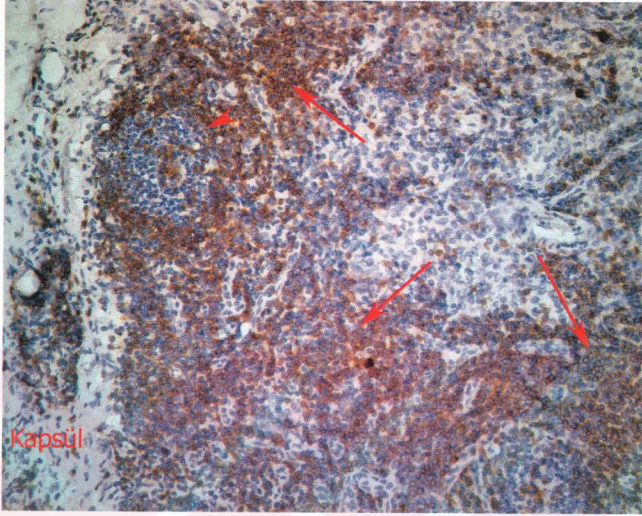
Subkapsüler sinüsün pariyetal duvarı kesintisiz olarak izlenmiş olup, parankime komşu visseral duvarında endotel/FRH örtüsünde yer yer kesinti alanları olduğu görülmüştür (Şekil 4.2.27). Kapsüle komşu duvarda kesintisiz endotel örtüsünün dışında kollajen lifler ve fibroblast uzantıları bulunmaktadır. Ancak lenfoid dokuya komşu duvarda çoğu alanda sinüs endotelini devamlılık gösterse de bu örtü ve bunun altında yer alan fibroblastik retiküler hücre uzantısı örtülerinin kesintisiz olmadığı belirlenmiştir.

### 4.3. İmmünohistokimya Bulguları:

Tümü insan lenf düğümü örneklerinde gerçekleştirilen immünohistokimya inceleme sonuçlarımız aşağıda özetlenmiştir. Çalışmada farklı hücre gruplarında reaktivite gösteren geniş bir panel kullanılmış, bulgular reaktif oldukları ana hücre gruplarına uygun olarak sınıflanmıştır.

**4.3.1. Başlıca T-lenfositlerde Reaktivite Gösteren Antijenler:** Çalışmada özellikle FRH çatısına yönelik veriler elde edilmesi hedeflendiğinden, ağırlıklı olarak bu bölgede yerleşik T lenfositlerde bulunan antijenlerin dağılımı incelenmiştir.

**CD2:** CD2 antijeninin T-bağımlı alanlarda yerleşik lenfositlerde yoğun reaktivite gösterdiği görülmüştür. T-bağımlı alanlardaki (parakorteks, interfolliküler bölge) lenfositlerin hemen tamamı işaretlenirken, folliküllerde az sayıda hücrenin reaktif olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3.1). Lenfositlerin dışındaki hücre gruplarında belirgin bir reaktivite belirlenmemiştir.



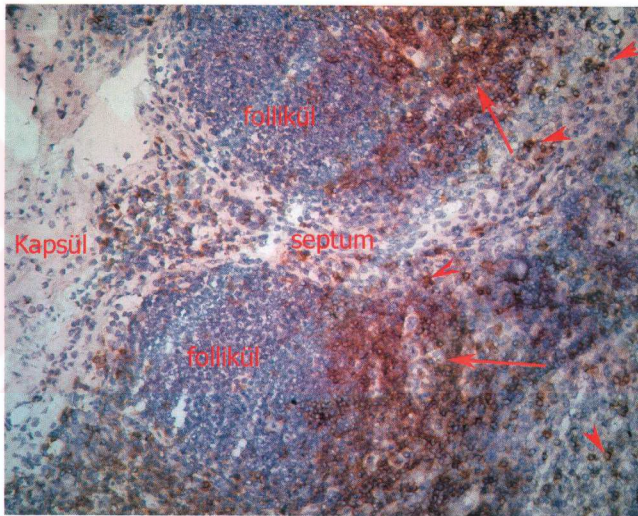
Şekil 4.3.1: Lenf düğümü kesitinde CD2 reaktivitesi. Antijene karşı reaktivitenin ağırlıklı olarak T-bağımlı alanda (oklar) başlıca T lenfositlerde bulunduğu görülmektedir. Aynı alandaki bazı uzantılı hücrelerin de (IDC?) bulunduğu izlenmektedir. Folliküllerde ise az sayıda hücrede (T lenfosit) reaksiyon mevcuttur. Follikül (ok başı). İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.

**CD3:** CD3 molekülünün CD2 molekülüne çok benzer bir dağılım gösterdiği ve başlıca T-bağımlı alanlardaki lenfositlerde bulunduğu görülmüştür. Lenf folliküllerinde de az sayıda hücrede CD3 reaktivitesi saptanmıştır.

**CD4:** Yine T-bağımlı alanlarda ancak daha az sayıda lenfositte CD4 reaktivitesi saptanmıştır. Özellikle T-bağımlı alandaki bazı makrofajların da orta derecede CD4 reaktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. Lenf folliküllerinde ise CD2 ve CD3

pozitif hücre sayısına paralel biçimde hemen hemen aynı sayıda hücrenin reaktif oldukları görülmüştür.

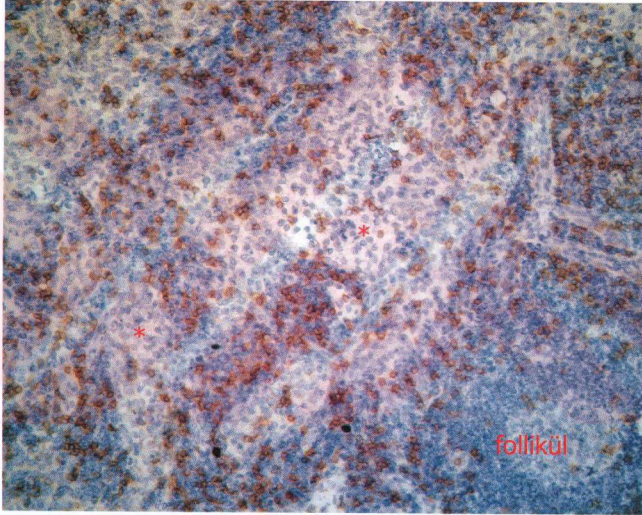
**CD7:** Diğer bir T lenfosit ağırlıklı antijen olan CD7 molekülünün de başlıca T-bağımlı alanda eksprese olduğu görülmüştür. Ancak bu molekül de CD4 molekülünde olduğu gibi, hatta daha güçlü olarak bazı makrofajlarda da reaktivite göstermektedir (Şekil 4.3.2). Medullada hem kordonlarda hem sinüslerde başlıca reaktif hücre grubunu ise makrofajlar oluşturmaktadır.



Şekil 4.3.2: İki follikülün izlendiği lenf düğümü kesitinde CD7 reaktivitesinin parakortikal alanda (oklar) yoğunlaştığı görülmektedir. Reaktif hücrelerin büyük çoğunluğunu lenfositler oluşturmaktadır. Folliküllerde az sayıda hücre reaktiftir. Organın derinlerinde uzantıları ve iri hücre gövdeleri ile ayırt edilen makrofajların

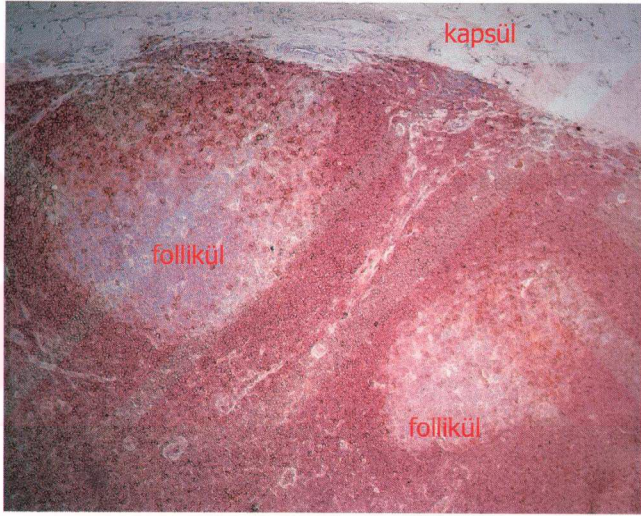
(ok başı) da pozitif reaksiyon verdiği izlenmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyüme X20.

**CD8:** Sitotoksik T lenfositlerde eksprese olduğu bilinen CD8 antijeninin, yine T-bağımlı alanlarda ancak CD2, CD3, CD4 ve CD7 eksprese eden hücelere oranla belirgin olarak daha az sayıda hücrede reaktivite gösterdiği saptanmıştır. Folliküllerde ise tek tük hücrenin CD8 (+) oldukları görülmüştür (Şekil 4.3.3).

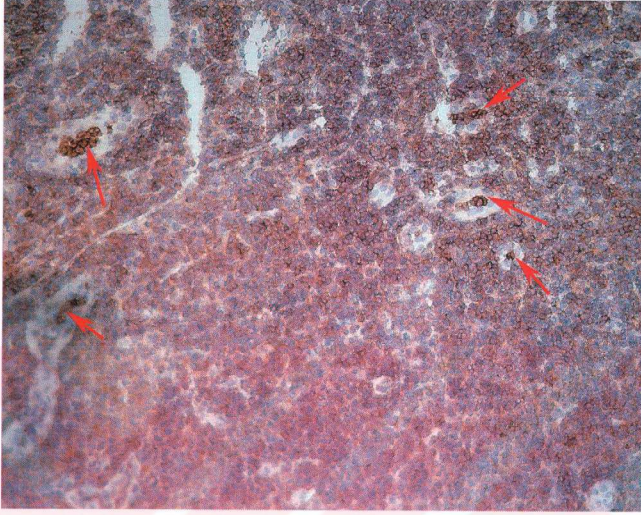


Şekil 4.3.3: Medulla kompartmanında CD8 pozitif hücrelerin başlıca bir grup lenfosit olduğu seçilmektedir. Lenf folliküllerinde CD4 pozitif hücelere oranla çok az sayıda lenfositin CD8 reaktif olarak görülmüştür. Lenf sinüsleri (\*). İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyüme X20.

**CD50 (ICAM-3):** Germinal merkezdeki lenfoblastlar dışında hemen hemen tüm lenfosit alt gruplarının CD50 (+) oldukları görülmüştür. T-bağımlı alan, follikül koronası reaksiyonun en yaygın olduğu bölümlerdir. Buradaki yaygın reaksiyon nedeniyle lenfosit dışındaki hücrelerde reaksiyon olup olmadığını belirlemek mümkün olmamıştır (Şekil 4.3.4). İlginç bir gözlem olarak özellikle YEV lümenindeki lenfositlerin çok güçlü CD50 reaktivitesi gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 4.3.5).

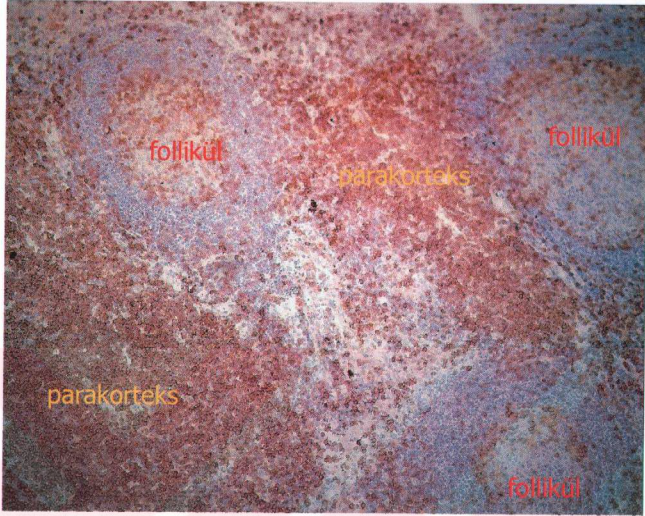


Şekil 4.3.4: Lenf düğümünün kapsül ve komşu alanlarını içeren bölümünde CD50 reaktivitesinin panoramik görünümü. Germinal merkezin açık kutbunda reaktif hücreler mevcutken koyu kutbundaki lenfositlerin büyük çoğunluğu reaktif değildir. CD50 (+) hücreler korona ve parakortikal alanda yoğunlaşmıştır. İndirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütme X10.



Şekil 4.3.5: Parakorteksin bir ileri büyütmadaki mikrografında, bazı lenfositlerin diğerlerine oranla CD50 molekülünü daha fazla bulundurdukları görülmektedir. Özellikle yüksek endotelli venüllerin lümenlerinde ve yakınlarında olan lenfositler daha güçlü CD50 reaksiyonu göstermektedirler (oklar). İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyüme X20.

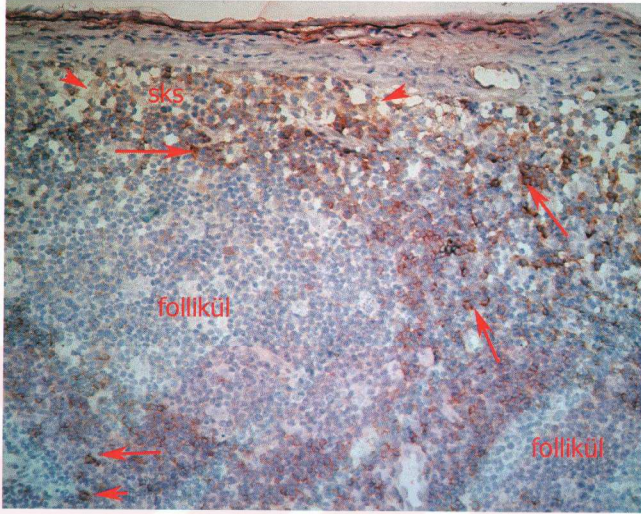
**CD43:** CD43 (Lökosiyalin) molekülü de ağırlıklı olarak T-bağımlı alanlarda eksprese olan diğer bir antijen olarak belirlenmiştir. Bu antijen için yapılan işaretlemelerde parakorteks ve interfolliküler alanda çok yaygın reaktivite belirlenirken, folliküllerde az sayıda hücrenin reaktif olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.6).



Şekil 4.3.6: CD43 antijeninin en yoğun T-bağımlı alanda olmak üzere, sinüs lenfositlerinde, follikülde işaretleme yaptığı izlenmektedir. Follikül koronasında daha yoğun olmak üzere germinal merkezde de daha az sayıda lenfositte reaksiyon mevcuttur. Bu dağılıma göre işaretlenen hücreler T lenfositlerdir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyütme X10.

**FB21:** Monoklonal antikorun tanımladığı antijenin başlıca görüldüğü hücre grubunu özellikle follikül koronasında yoğunlaşmış olan bir T lenfosit alt grubu oluşturmaktadır. Marjinal sinüste sinüs çaprazlayan hücrelerin de daha zayıf bir reaksiyon verdiği belirlenmiştir. T-bağımlı alanda lenfositlerin yanında az sayıda dendritik hücre uzantısının da reaktif olduğu görülmüştür. Reaktif lenfositlerin subkapsüler sinüste de bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3.7).



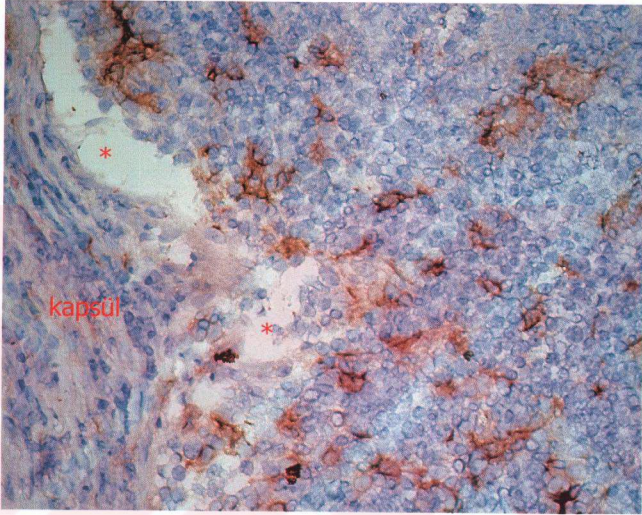


Şekil 4.3.7: Kapsül, subkapsüler sinüs, komşu lenfoid doku içinde iki lenf follikülü görülmektedir. Korona ve T-bağımlı alanda reaktif lenfositler izlenmektedir. Sinüs çaprazlayan hücrelerde de orta derecede reaksiyonun olduğu görülmektedir. İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.

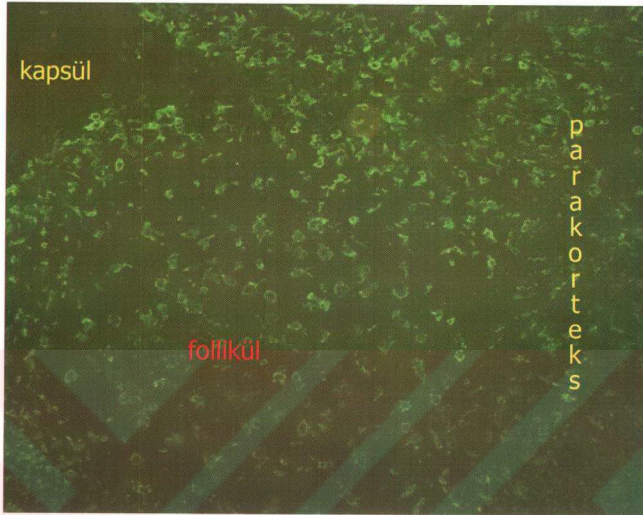
#### 4.3.2. Başlıca Makrofajlar ve Makrofaj + Dendritik Hücrelerde Bulunan Antijenler:

**CD11c:** CD11c reaktivitesinin görüldüğü hücrelerin tüm makrofaj alt grupları ve T-bağımlı bölgedeki dendritik hücreler olduğu belirlenmiştir. Pozitif reaksiyon veren makrofaj grupları arasında, sinüs makrofajları, folliküler makrofajlar, T-bağımlı bölge makrofajları, T-bağımlı bölgede bazı dendritik hücreler (IDH?) ve kapsüldeki histiyositler sayılabilir. T-bağımlı bölgede ve subkapsüler sinüste

bulunan uzantılı hücrelerin makrofaj ya da interdigitasyon yapan hücre (IDH) ve öncülleri olup olmadığının belirlenmesi her zaman mümkün olamamaktadır (Şekil 4.3.8-9). Diğer hücre gruplarında reaksiyon saptanmamıştır.



Şekil 4.3.8: Lenf düğümünde CD11c reaktif hücrelerin çoğunlukla uzantılı iri sitoplazmalı hücreler (makrofajlar) oldukları görülmektedir. Bazı hücrelerin sitoplazmalarının dar olması IDH'lerin de pozitif reaksiyon verdiklerini düşündürmektedir. Subkapsüler sinüste de CD11c reaktif hücreler bulunmaktadır. Subkapsüler sinüs (\*). İndirekt immunoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması, orijinal büyütme X20.

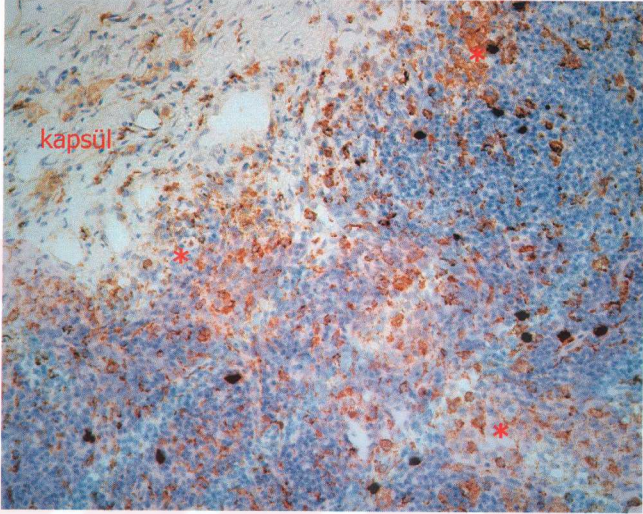


Şekil 4.3.9: Küçük büyütmede lenf düğümünde CD11c reaktivitesi izlenmektedir. Follikülde ve parakortekste makrofajların işaretlendikleri seçilmektedir. Parakortekste dendritik hücre uzantılarını da içeren daha yaygın bir reaksiyonun olması IDH'lerin de reaktif olduklarını düşündürmektedir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X10.

**CD13:** Başlıca makrofajlarda eksprese olan diğer bir antijen de CD13 olarak saptanmıştır. Tüm makrofaj gruplarında pozitif reaksiyon veren CD13 antijeninin sinüs endotelinde de zayıf bir reaktivitesi olduğu izlenmiştir.

**CD68:** Tüm makrofaj alt gruplarında bulunan diğer bir antijen ise CD68'dir. Bu antijenin kapsülde, subkapsüler ve medulla sinüslerindeki makrofajlarla birlikte lenf düğümünün diğer kompartmanlarında yerleşik tüm makrofaj alt gruplarında bulunduğu görülmüştür. CD11c dağılımında olduğu gibi parakortikal

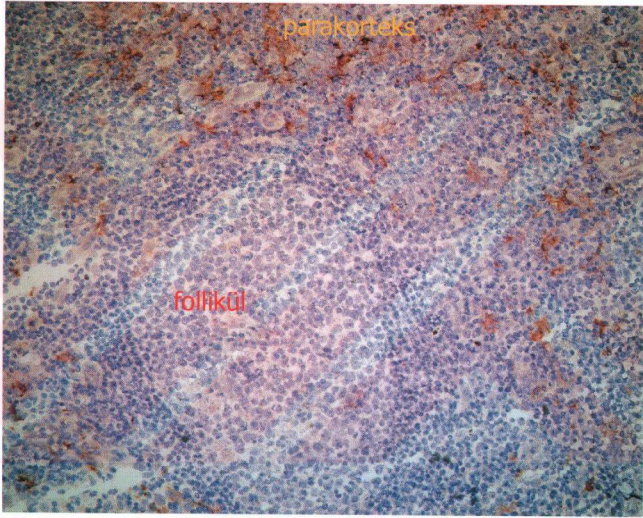
kompartmandaki yoğun reaksiyon IDH'lerin de reaktif olabileceklerini düşündürmektedir (Şekil 4.3.10).



Şekil 4.3.10: Lenf düğümü ve komşu bağ dokusunun izlendiği kesitte subkapsüler sinüs ve trabeküler sinüs çok iyi ayırt edilmemektedir. Bağ dokusu makrofajları dahil tüm makrofaj alt gruplarının CD68 (+) oldukları izlenmektedir. Bazı damarların endotelinde de zayıf bir reaksiyon mevcuttur. Sinüsler (\*); indirekt immunoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması, orijinal büyütmeye X20.

**CD71:** Transferrin reseptörü (CD71) makrofajlarda eksprese olan diğer bir antijen olarak saptanmıştır. Antijen için en belirgin işaretlenmenin folliküler makrofajlarda olduğu görülmüştür.

**2D7:** Antikoron işaretlediği makrofaj alt grubunun ağırlıklı olarak T-bağımlı bđlgede yerleşik olduğu saptanmıştır. Bu bđlgedeki makrofajların hemen hepsi işaretlenirken, folliküller ve diğer kompartmanlardaki makrofajlarda ender işaretlenmeye rastlanmıştır (Şekil 4.3.11-12). İşaretlenen diğer bir hücre grubunu fibroblastlar oluşturmaktadır ancak tüm fibroblastlarda bu antijen mevcut değildir.

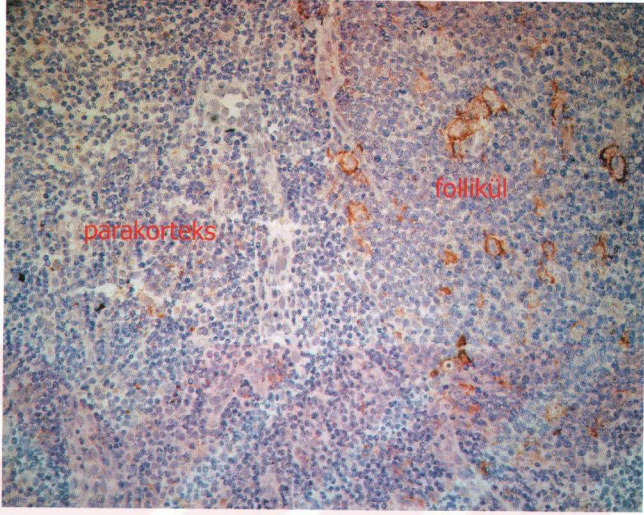


Şekil 4.3.11: Lenf düğümü kesitinde bir follikül ve komşu parakortikal alan görölmektedir. Reaktivitenin yoğun olarak parakortikal makrofajlarda bulunduğu izlenmektedir. Folliküler makrofajlarda çok zayıf bir immunoreaktivite mevcuttur. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilin zemin boyaması orijinal büyüme X20.



Şekil 4.3.12: Lenf düğümünün aynı kompartmanlarını içeren kesitin immünoflöresan boyamasında antijen için aynı dağılım izlenmektedir. FITC işaretli indirekt immünoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.

**HI272:** Bu monoklonal antikor en belirgin olarak folliküler makrofajlarda olmak üzere çoğu makrofaj grubunu işaretleyen bir antikor olarak belirlenmiştir. Folliküler makrofajlardaki varlığı zarda ve sitoplazmanın zara komşu bölümünde yoğunlaşmış olarak seçilmekte ve bu yönüyle diğer makrofaj işaretleyicilerinden ayrılmaktadır (Şekil 4.3.13).

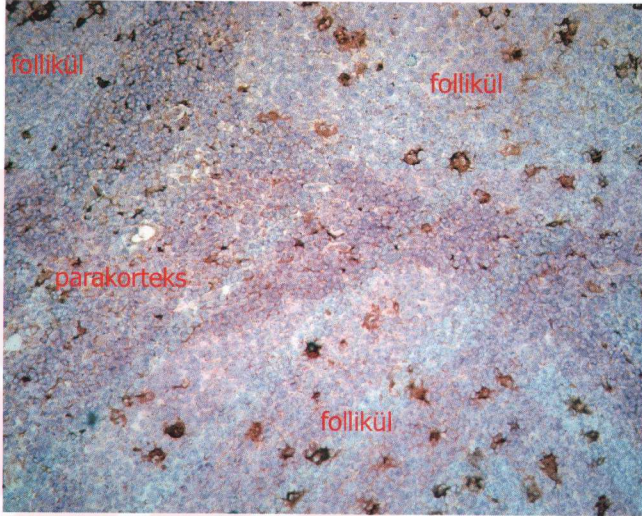


Şekil 4.3.13: HI272 monoklonal antikoruna ile en belirgin işaretlenme follikül makrofajlarında ve zara komşu sitoplazmik kompartmanda izlenmektedir. T-bağımlı alanda az sayıda hücrede daha zayıf bir reaksiyon mevcuttur. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X20.

**HI277:** Aynı araştırmacı tarafından geliştirilen diğer bir monoklonal antikor olan HI277, özellikle folliküler makrofajlarda HI272 ile benzer bir reaktivite göstermekle birlikte, bu antikorun işaretlediği antijen FDH'ler üzerinde de zayıf olarak eksprese edilmektedir. T-bağımlı alanda da zayıf bir dendritik reaksiyon olduğu belirlenmiştir.

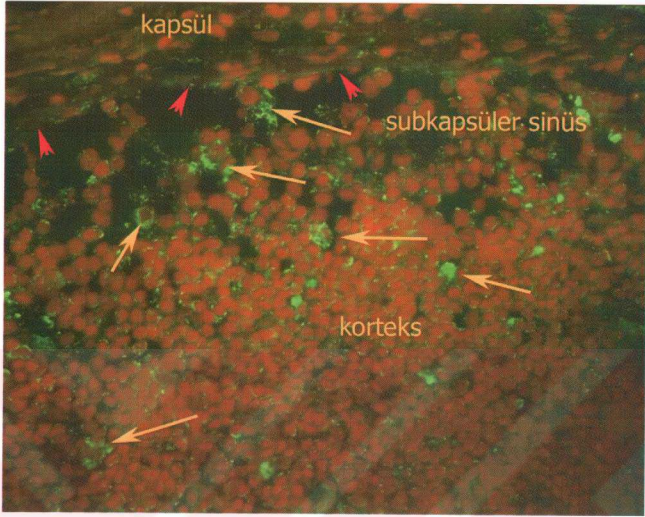
**E63-880:** Antikor, folliküler ve T-bağımlı bölge makrofajları başta olmak üzere makrofajlarda eksprese olan bir antijeni tanımlamaktadır. Yukarıda bulguları özetlenen diğer antijenlerden farklı olarak antijen FDH ve FRH'lerin dendritik

uzantıları üzerinde de mevcuttur (Şekil 4.3.14). Organın periferik kompartmanı incelendiğinde, antijenin yukarıda değinilen hücre gruplarına ek olarak marjinal sinüs endoteli ve sinüs makrofajlarında da bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.3.15).



Şekil 4.3.14: Komşu üç lenf follikülü ile interfolliküler alanın görüldüğü kesitte folliküler makrofajların güçlü reaksiyon verdiği, interfolliküler alanda makrofajlarla birlikte ince dendritik bir boyanmanın olduğu görülmektedir. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X20.

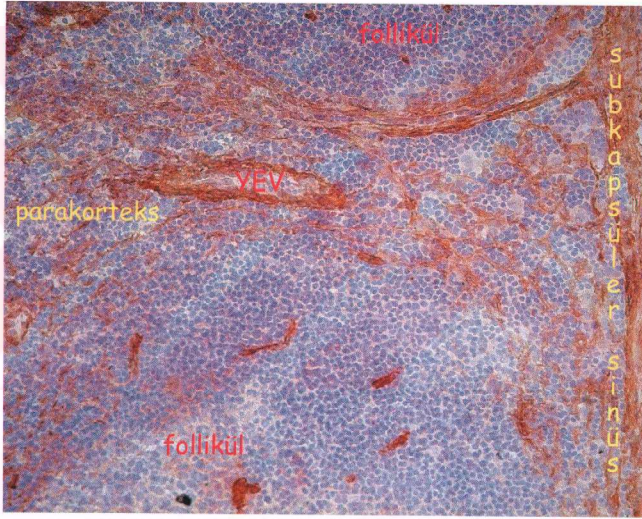




Şekil 4.3.15: Kapsül ve subkapsüler sinüs bölgesini içeren lenf düğümü kesitinde dış düzenli endotel örtüsü (ok başı), sinüs makrofajları ve parankimdeki makrofajlar (oklar) ve lenfositler arasındaki ince uzantıların reaktif oldukları görülmektedir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X40.

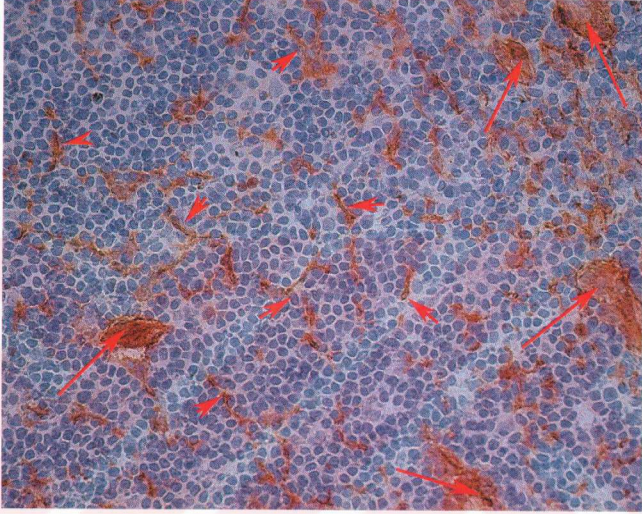
#### 4.3.3. Başlıca Retiküler Hücre Gruplarında Bulunan Antijenler:

**CD49a (VLA-1  $\alpha$  zinciri):** Molekül fibroblastik retiküler hücreler, sinüs endoteli, yüksek endotelli venüller dahil olmak üzere damar endoteli, damar düz kas hücreleri tarafından eksprese edilmekte ve oldukça yaygın bir dağılım göstermektedir. Ancak FRH'lerdeki ekspresyonu antijene, bu hücre grubunun lenfositler ve diğer hücrelerle ilişkisini ortaya koymak için çok yardımcı bir işaretleyici niteliği kazandırmaktadır.



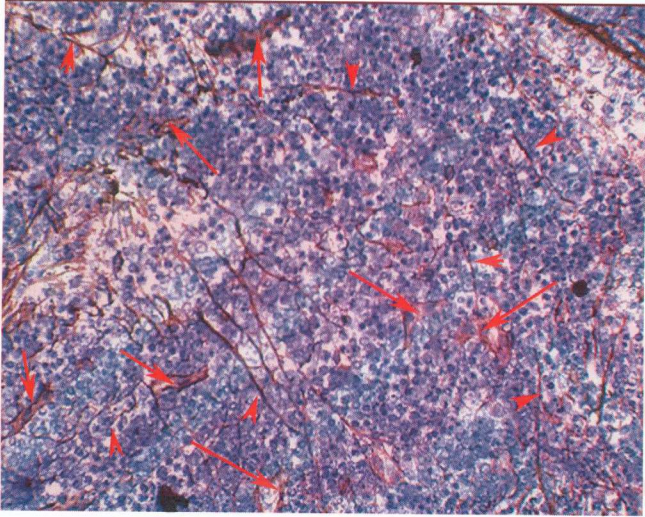
Şekil 4.3.16: Subkapsüler sinüs ve komşu iki lenf follikülünün bulunduğu alanda CD49a reaktivitesi görülmektedir. Damar endoteli ve düz kası en güçlü reaktivitenin görüldüğü hücre gruplarını oluşturmaktadır. Sinüs döşeyen ve çaprazlayan hücreler belirgin reaktivite vermektedir. Fibroblastik retiküler hücrelerde de benzer ve aynı güçte reaksiyon mevcuttur. Folliküler dendritik

hücrelerde ise oldukça zayıf bir immunoreaktivite vardır. İndirekt immünoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması orijinal büyütme X20.



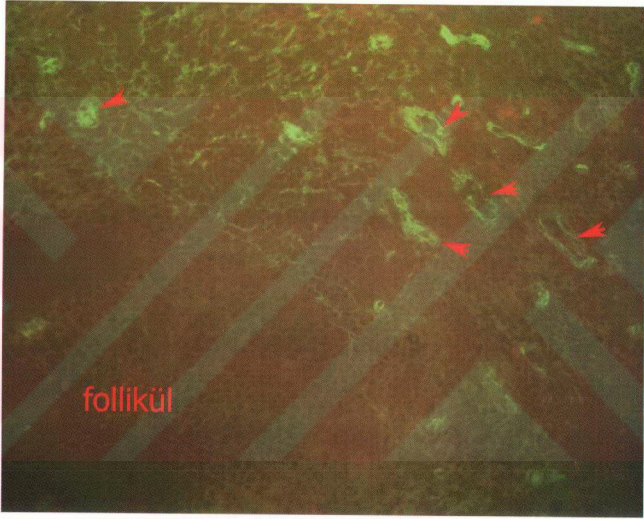
Şekil 4.3.17: Damar yapıları ve fibroblastik retiküler hücrelerdeki CD49a reaktivitesi daha büyük büyütmede net olarak seçilmektedir. Fibroblastik retiküler hücre uzantıları (ok başları) arasındaki boşluklarda lenfositlerin yerleştiği izlenmektedir. Damarlar (oklar); indirekt immünoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması orijinal büyütme X40.

**B-D46:** FRH'lerde güçlü olarak eksprese olan ve bu hücrelerin ayrıntılı tanımlanmasını sağlayan diğer bir monoklonal antikordur. Antikorum işaretlediği antijen damar endotelinde de mevcuttur (Şekil 4.3.18). Bu antikorlar yapılan işaretleme FRH lenfosit yapısal ilişkisini ortaya koymakta oldukça yardımcı olmuştur.

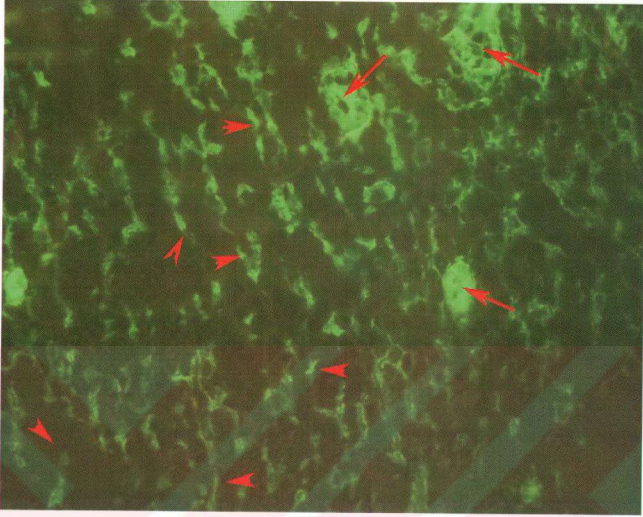


Şekil 4.3.18: B-D46 monoklonal antikoru ile yapılan immün boyamada başlıca reaktivitenin FRH uzantıları (ok başları) ve damarlarda (oklar) olduğu görülmektedir. Önceki şekilde olduğu gibi fibroblastik retiküler hücre uzantıları arasında lenfositlerin yerleştiği seçilmektedir. İndirekt immünoperoksidaz, hematoxilen zemin boyaması orijinal büyütme X40.

**CD90:** Thy-1 antijeni T-bağımlı alandaki retiküler hücreler ve damarlarda daha güçlü, folliküler dendritik hücrelerde göreceli olarak zayıf eksprese olan bir antijen olarak saptanmıştır. T-bağımlı alanda dendritik uzantıları da içeren yaygın işaretlenme bu alandaki dendritik hücre gruplarının hepsinin reaktif olduğu izlenimini vermiştir. Bu bölümde yerleşik yüksek endotelli venüllerde de güçlü reaksiyon mevcuttur (Şekil 4.3.19-20).



Şekil 4.3.19: Lenf düğümünün orta büyütmedeki flöresan fotomikrografında CD90 dağılımı izlenmektedir. Sol altta yerleşik follikülde yalnızca bir damarın işaretlendiği, yoğun işaretlenmenin T-bağımlı alanda bulunduğu görülmektedir. Bu alanda yüksek endotelli venüller ve damarların (ok başları) güçlü, dendritik hücre ağının ise göreceli olarak biraz daha zayıf derecede reaktif oldukları görülmektedir. FITC işaretli indirekt immunoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.

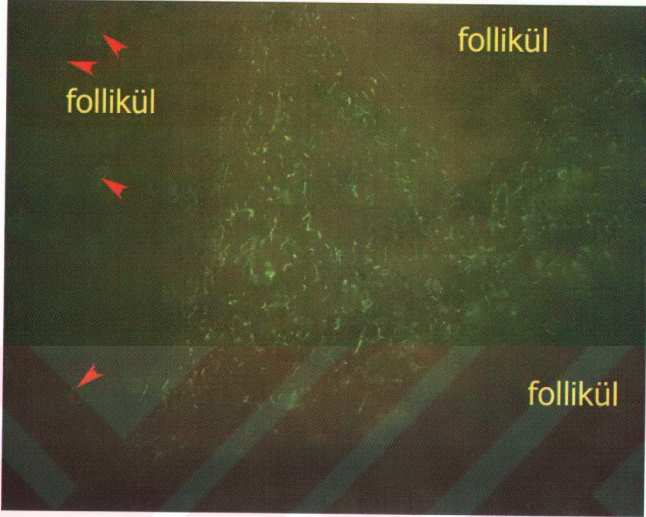


Şekil 4.3.20: Aynı antijen için yapılan işaretleme ile parakortikal bölgenin daha büyük büyütmedeki mikrografında YEV'lere ait kesitler (oklar) ve retiküler hücre uzantılarının oluşturduğu ağ yapı (ok başları) daha ayrıntılı seçilmektedir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X40.

**Vimentin:** Vimentin için yapılan işaretleme bu ara filamanların parakortekste yerleşik FRH'lerde yoğun işaretleme yaptığını ortaya koymuştur. Folliküler makrofajlarda oldukça zayıf bir reaksiyonun olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.21 ve 4.3.22). Kapsülde yerleşik fibroblastlar da yoğun olarak antijeni ekspres etmektedirler.



Şekil 4.3.21: Lenf düğümünde bir follikül ve komşu parakorteks bölgesini içeren alanda vimentin için yapılan işaretlemede reaksiyonun parakortikal bölgede yoğunlaştığı görülmektedir. Uzantıları ile birlikte işaretlenmiş hücre grubunun dağılımı fibroblastik retiküler hücrelerle uyumludur. Follikülde ise folliküler makrofajlarda (ok başları) zayıf bir reaktivitenin bulunduğu izlenmiştir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.

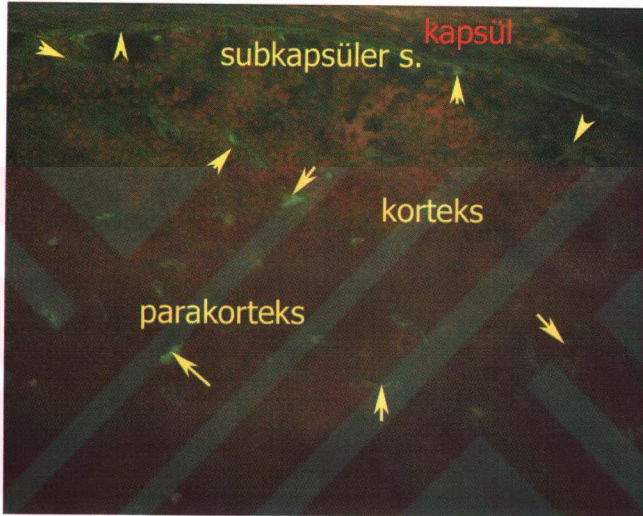


Şekil 4.3.22: Üç follikülün bulunduğu diğer bir alanda reaktivitenin folliküller arası bölgede yoğunlaştığı seçilmektedir. Follikül makrofajlarında da (ok başları) zayıf bir reaksiyonun varlığı görülmektedir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.

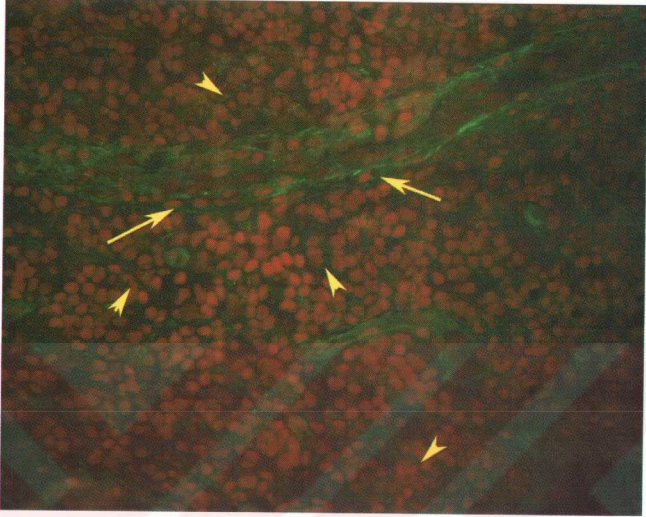
**80373:** Lenf düğümünün fibroblastik retiküler hücreler ve ilişkili hücre gruplarından sinüs endotelini işaretleyen diğer bir monoklonal antikorun 80373 olduğu belirlenmiştir. Bu antijenin aynı zamanda YEV endotelini ve çevresindeki perisitlerle de reaksiyon vermesi bu hücre gruplarının yapısal düzenlenmesinin ayrıntılı olarak incelenmesine olanak vermiştir. Subkapsüler sinüs dış yaprağının düzenli ve kesintisiz endotel örtüsünün işaretlenmesi bu örtünün net olarak seçilmesini sağlamıştır. Sinüs çaprazlayan hücreler ve iç yapraktaki endotel hücrelerinde de işaretlenme mevcuttur. Organın komşu parankimasında fibroblastik retiküler hücre uzantılarının ve damarların da işaretlendiği



belirlenmiştir (Şekil 4.3.23). Parakortikal alanın daha büyük büyütmelerdeki incelemelerinde, YEV endoteli ve damarı çevreleyen perisit örtüsünün FRH'lerle birlikte işaretlenmesi, bu hücre grubu ile lenfositlerin ilişkilerinin daha açık incelenmesini sağlamıştır (Şekil 4.3.24).



Şekil 4.3.23: Lenf düğümü periferik kompartmanına ait flöresan fotomikrografta kapsül, subkapsüler sinüs ve komşu kortikal parankim görülmektedir. Subkapsüler sinüsü döşeyen ve çaprazlayan hücreler (ok başları), damarlar (oklar) ve fibroblastik retiküler hücre uzantılarının reaktif oldukları görülmektedir. FITC işaretli indirekt immunoflöresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X20.

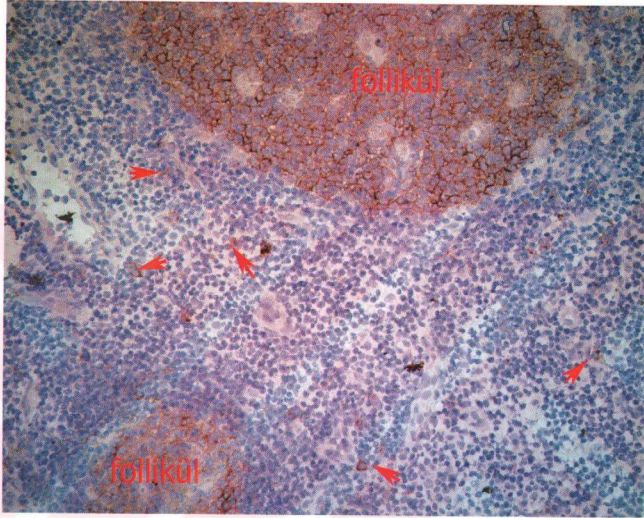


Şekil 4.3.24: Parakoteksini daha büyük büyütmesinde bir YEV ve komşu alan seçilmektedir. YEV duvarında endotel hücreleri ve perisit katının çevredeki fibroblastik hücre uzantısı ağı (ok başları) ile birlikte reaktif olduğu izlenmektedir. YEV duvarından ve perisitler arasından göç eden lenfositlere (oklar) ait çekirdekler ayırt edilmektedir. FITC işaretli indirekt immunofloresan, propidiyum iyodit çekirdek boyalı, orijinal büyütme X40.

**CD20:** Antijenin başlıca folliküllerde lokalize olduğu görülmüştür. Folliküllerdeki reaksiyon FDH'ların dağılımına paralellik göstermektedir. T-bağımlı alandaki bazı hücrelerde de çok zayıf bir reaksiyonun olduğu görülmüştür.

**LT-ND4:** LT-ND4 monoklonal antikoru başlıca lenf folliküllerinde özgül ve güçlü reaksiyon veren bir antijeni tanımaktadır. Lenf folliküllerinde FDH'ler ve lenfositlerde güçlü reaksiyon mevcuttur ancak folliküler makrofajlarda belirgin bir

reaksiyon mevcut değildir (Şekil 4.3.25). Antijen T bağımlı alanda da çok az sayıda dendritik hücre ile (IDC?) reaktif görülmektedir. Sinüs makrofajları da antijen için güçlü reaktivite gösteren diğer bir hücre grubunu oluşturmaktadır.



Şekil 4.3.25: Biri daha büyük iki lenf lenf follikülü ve komşu interfolliküler bölgenin yer aldığı alanda her iki lenf follikülünde, folliküler makrofajlar dışında güçlü bir reaktivitenin olduğu görülmektedir. T-bağımlı alanda ise az sayıda hücrenin (ok başları) göreceli olarak daha zayıf bir reaksiyon verdiği izlenmektedir İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X20.

**CD49d (VLA-4  $\alpha$  zinciri):** Folliküler dendritik hücreler ve T-bağımlı alandaki dendritik hücrelerden bazılarının CD49d (+) oldukları saptanmıştır. HEV

lumenindeki bazı lenfositlerde de fokal VLA-4 antijeni ekspresyonu ilginç bulunmuştur.

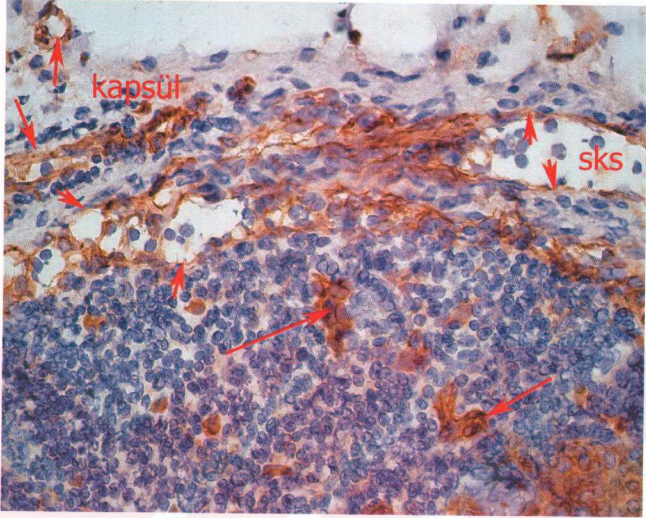
**CD53:** CD53 antijeni folliküllerde diffüz, folliküler dendritik hücreleri de içeren bir reaksiyon oluşturmaktadır. T-bağımlı alanda ise fibroblastik retiküler hücrelerde orta derecede CD53 reaktivitesi olduğu belirlenmiştir.

**CD63:** CD63 molekülünün de retiküler hücreler ve sinüs endotelinde reaktivite gösterdiği bulunmuştur. Reaktif hücre grupları arasında FDH'ler, FRH'ler, sinüs endoteli, sinüs makrofajları ve damar endoteli ile düz kasları vardır.

**Pansitokeratin:** Lenf düğümünde ilginç olarak folliküllerde pansitokeratin ekspresyonuna rastlanmıştır. Bu reaksiyonun dağılımı folliküler dendritik hücrelerle uyumluluk göstermektedir.

#### **4.3.4. Endotel Hücrelerinde Bulunan Antijenler:**

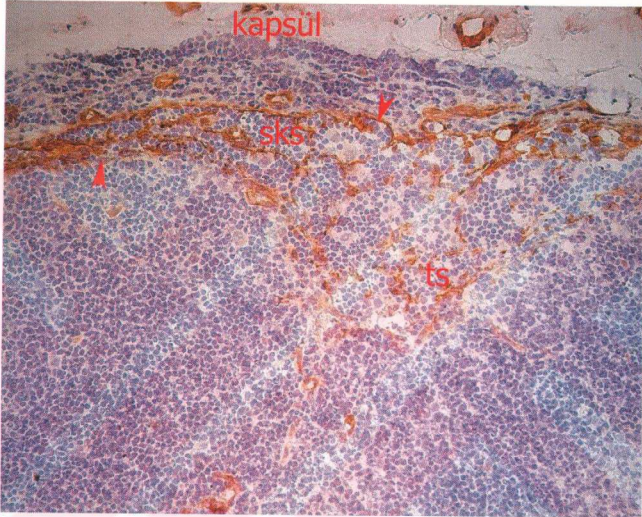
**CD31:** CD31 (PECAM-1) molekülü yüksek endoteli venüller ve kapillerler de dahil olmak üzere tüm endotel hücrelerinde reaktif olduğu saptanmıştır. Bu yönüyle organın damar çatısının izlenmesi için uygun bir işaretleyici niteliğindedir. Antijen subkapsüler, trabeküler ve medüller sinüs endoteli ve sinüs çaprazlayan hücrelerde de pozitif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.3.26).



Şekil 4.3.26: CD31 antijeni için yapılan işaretlemede kapsül dışı bağ dokusunda ve lenfoid dokuda yerleşik tüm damarlara ait endotel hücreleri (oklar) ile birlikte sinus endoteli ve sinusu çaprazlayan hücrelerde (ok başları) de belirgin immunoreaktivite olduğu görülmektedir. sks: subkapsüler sinus. İndirekt immünoperoxidaz, hematoxilen zemin boyaması orijinal büyütme X40.

**CD36:** CD36 molekülünün mikrovasküler endotel hücrelerinde çok güçlü reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Medulla sinus endotelinde de göreceli olarak oldukça zayıf bir reaksiyonun varlığı saptanmıştır. Kapsül dışında yerleşik adipositerin de antijen için güçlü reaktif oldukları görülmüştür. Diğer hücre gruplarında ise herhangi bir reaksiyona rastlanmamıştır.

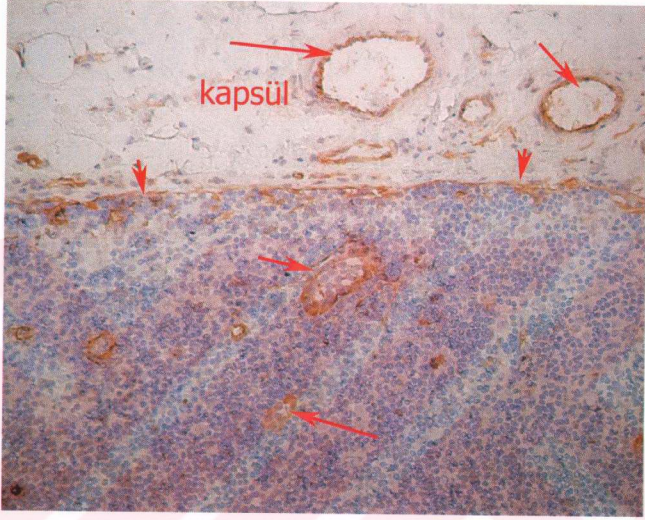
**CD49c (VLA-3  $\alpha$  zinciri):** Bu integrin zincirinin, yüksek endotelli venüller dahil damar endoteli ve damar düz kasında reaksiyon verdiği görülmüştür. Ancak kapiller endotelindeki reaksiyon göreceli olarak daha zayıftır. Subkapsüler ve trabeküler sinüs endotelinde de güçlü bir reaksiyon mevcuttur (Şekil 4.3.27).



Şekil 4.3.27: Kapillerlerde belirgin olarak zayıf olmak üzere damar endotelinde ve düz kasında belirgin bir CD49c reaktivitesi bulunmaktadır. Antijen, subkapsüler sinüsü döşeyen ve çaprazlayan hücreler (ok başları) en güçlü reaktivite veren hücrelerin başında gelmektedir. sks: subkapsüler sinüs. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilin zemin boyaması orijinal büyütme X20.

**CD49f (VLA-6  $\alpha$  zinciri):** Bu antijenin de tüm endotel hücrelerinin özellikle bazal kompartmanında lokalize olduğu görülmüştür. Subkapsüler sinüsün dış yaprak

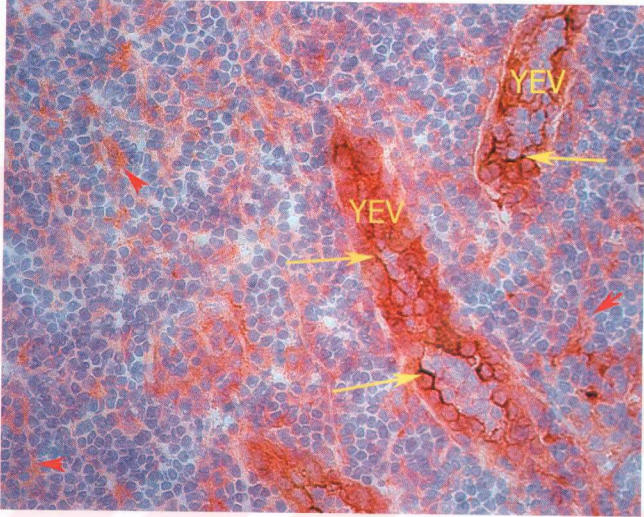
endotel hücrelerinde antijen ekspresyonu belirgin, parankime komşu iç yaprakta kesintili ve daha az belirgin bir işaretlenme mevcuttur (Şekil 4.3.28).



Şekil 4.3.28: CD49f reaktivitesi tüm damarlara ait endotel hücrelerinde (oklar) mevcuttur. Alanda görülen subkapsüler sinüsü döşeyen hücrelerden ise özellikle dış yaprağı oluşturanlarda (ok başları) belirgin reaksiyon varken, iç yaprakta bulunan hücrelerde kesintili ve sınırlı bir reaksiyon izlenmektedir. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X20.

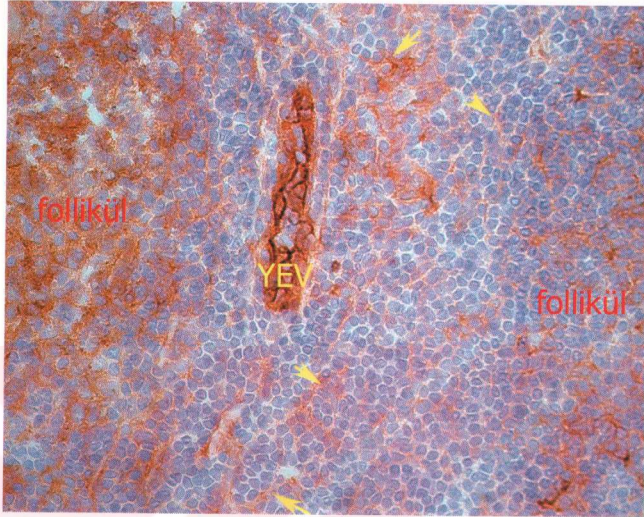
**CD54 (ICAM-1):** ICAM-1 reaktivitesinin YEV'ler dahil tüm damar endotel hücrelerinde bulunduğu saptanmıştır. YEV endotel hücrelerinin özellikle lümendeki lenfositlere komşu yüzlerinde daha güçlü bir CD54 reaktivitesi olduğu dikkati çekmiştir. Parakortekste yerleşik fibroblastik retiküler hücreler ve maktofajlarda da endotel hücrelerindeki orana daha zayıf ancak belirgin bir

reaksiyon olduğu saptanmıştır (şekil 4.3.29). Lenf folliküllerinde FDH'lerin de güçlü bir CD54 reaktivitesi gösterdikleri izlenmiştir (şekil 4.3.30). Özetle ICAM-1 reaktivitesine organda tüm retiküler hücre alt gruplarında ve damar endotelinde rastlanmıştır.



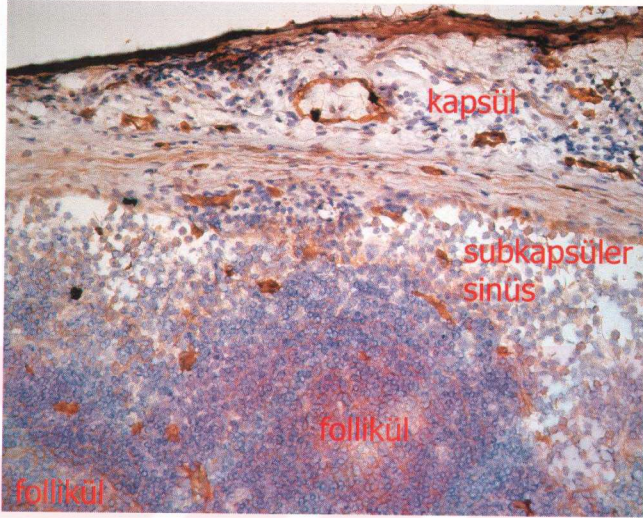
şekil 4.3.29: Parakortekste yüksek endotelli venüller ve fibroblastik retiküler hücrelerde CD54 (ICAM-1) reaktivitesi görülmektedir. Fibroblastik retiküler hücreler ve uzantılarındaki reaksiyon YEV'e göre daha zayıf olmakla birlikte net olarak seçilmektedir. Aynı alandaki makrofajlar da ICAM-1 pozitifdir (ok başları). Yüksek endotelli venül duvarına komşu hücrelerden bazılarında da FRH'lere benzer yoğunlukta reaktivite mevcuttur. YEV endotel hücrelerinin lümendeki lenfositlere komşu yüzlerinde reaksiyonun daha güçlü olduğu dikkati çekmektedir (oklar). İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X40.





Şekil 4.3.30: Bir lenf follikülü ve komşuluğundaki yüksek endotelli venülün bulunduğu bir alanda CD54 reaktivitesi. Germinal merkez ve koronadaki FDH'ler, YEV endoteli, çevresindeki perisitler ve fibroblastik retiküler hücreler CD54 (+) olmalarıyla ayırt edilmektedir (ok başları). Alandaki bir kaç makrofajın da reaktif oldukları görülmektedir. YEV: Yüksek endotelli venül. İndirekt immünoperoxidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X40.

**CD146 (MUC 18; S-Endo):** Karbohidrattan zengin yapıda bir antijen olan CD146'nın folliküllerde FDH'ler, damarların endotel ve düz kas hücreleri, sinüs endoteli, yüksek endotelli venüller, T-bağımlı alanda dendritik hücre uzantıları ve kapsüldeki fibroblastlar olmak üzere oldukça yaygın bir dağılım gösterdiği saptanmıştır. Damar endoteli ve düz kaslarındaki reaksiyon diğer hücre gruplarına oranla belirgin olarak daha güçlüdür (Şekil 4.3.31).



Şekil 4.3.31: Lenf düğümünün periferal kompartmanında CD146 reaktivitesi. Bağ dokusunda ve lenfoid dokuda yerleşik damarların endotel ve düz kas hücreleri güçlü olarak reaktiftir. Kapsüldeki fibroblastlar, FDH'ler, sinus endoteli ve sinus çaprazlayan hücreler göreceli olarak daha zayıf bir reaktivite göstermektedir. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X20.

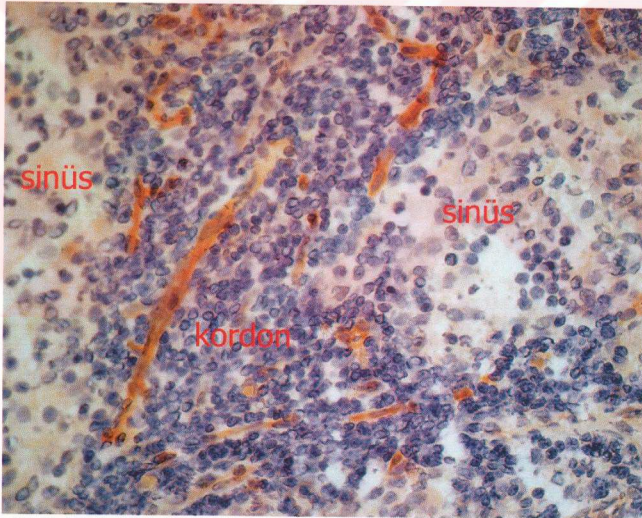
**CD62-P (P-selektin):** Antijenin lenf düğümündeki damarlarda güçlü, sinus endotelinde ise göreceli olarak zayıf olarak işaretlenme yaptığı belirlenmiştir. Yüksek endotelli venüllerde de güçlü bir işaretlenme mevcuttur.

**CD105 (Endoglin):** Yüksek endotelli venüllerde çok güçlü, diğer damar endotelinde orta düzeyde CD105 reaktivitesi olduğu saptanmıştır.

**CD106 (VCAM-1):** Folliküler dendritik hücrelerde güçlü, bazı damarların endotel hücrelerinde ise oldukça zayıf bir CD106 ekspresyonu belirlenmiştir.

**CD109:** Yine başlıca endotel hücrelerinde reaksiyonun görüldüğü CD109 antijeninin yüksek endotelli venüller ve tüm diğer damarlara ait endotel hücrelerinde bulunduğu saptanmıştır.

**CD143 (ACE):** Lenf düğümü mikrovasküler endotelinde oldukça güçlü bir CD143 ekspresyonu olduğu saptanmıştır. Sinüs endotelinde de yer yer çok zayıf reaksiyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.32).



Şekil 4.3.32: Büyük büyütmede mikrovasküler endotelde güçlü, sinüs endotelinde çok zayıf CD143 reaktivitesi izlenmektedir. İndirekt immünoperoksidaz, hematoksilen zemin boyaması orijinal büyütme X40.

#### 4.3.5. Çeşitli Hücre Gruplarında Yaygın Dağılım Gösteren Antijenler:

**Doku uyumluluk antijenleri-II (MHC-Class II):** MHC-class II antijeninin folliküllerde daha yoğun olmak üzere lenf düğümünün çoğu kompartmanında özellikle uzantılı hücreler ve makrofajlar tarafından eksprese edildiği görülmüştür. İnterfolliküler alanda ve parakortekste daha yaygın bir reaksiyon dikkati çekmiştir. Bu alanda makrofajlarda güçlü, dendritik hücrelerde orta derece reaksiyon varlığı dikkati çekmiştir. Bir grup endotel hücresinin de pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Subkapsüler ve trabeküler sinüs endotelinin antijen için reaksiyon vermediği; komşu alanda lenfositler ve bazı FRH'lerin reaktif oldukları görülmüştür. Folliküllerde ise folliküler dendritik hücreler ve makrofajların diffüz olarak işaretlendiği belirlenmiştir. Subkapsüler ve diğer sinüslerde yerleşik makrofajlarda da güçlü reaksiyon saptanmıştır.

**CD99:** CD99, yüksek endotelli venüller dahil damar endoteli, folliküler dendritik hücreler, fibroblastik retiküler hücreler ve makrofajlarda eksprese olan diğer bir antijen olarak saptanmıştır. Folliküllerdeki reaksiyon FDH'lerde daha belirgin olmakla birlikte diffüz olarak saptanmıştır. T-bağımlı alanda dendritik hücre uzantıları ve makrofajların reaktif oldukları görülmüştür.

**80394:** Özgüllüğü tanımlanmamış antikordardan 80394, hemen tüm stromal bileşenlerle ve damar yapılarıyla reaksiyon vermiştir. Sinüs çaprazlayan hücrelerdeki ve lenfoid kompartmanlarda FRH'lerdeki reaksiyonu ilginç bulunarak değerlendirilmiştir.

**CD49b (VLA-2  $\alpha$  zinciri):** CD49b dağılımının da Cd49a dağılımına benzer olduğu ancak, damar dışındaki yapılarda özellikle fibroblastik retiküler hücreler olmak üzere reaksiyonun belirgin olarak zayıf olduğu izlenmiştir.

**CD49e (VLA-5  $\alpha$  zinciri):** CD49e molekülü, en güçlü olarak damar düz kası olmak üzere damar endoteli, sinüs endoteli ve FDH tarafından eksprese edilmektedir.

**CD151 (PETA3):** Folliküler dendritik hücreler ve yüksek endotelli venüllerin CD151 (+) oldukları saptanmıştır. FRH'lerde oldukça zayıf bir ekspresyonun bulunduğu da belirlenmiştir.



## TARTIŞMA

Lenfositler ile organın çatısını oluşturan hücrelerin arasındaki etkileşim lenf düğümünün işlevlerini (antijen sunumu, lenfosit aktivasyonu, çoğalması ve farklanması) yerine getirmesi için çok önemlidir. Konuyla ilgili yoğun araştırmalar gerçekleştirilmiş olmasına karşın lenf düğümünün retiküler çatısı ve mikroçevresinin yapısal özellikleri, birbirleri ve lenfositlerle olan ilişkileri ile ilgili belirsiz ve açık olmayan önemli noktalar bulunmaktadır (36). Bu çalışmada, lenf düğümü mikroçatısının henüz kesinlik kazanamamış çeşitli yönlerine ışık tutmak amacıyla lenf düğümü stroması ve ilişkili hücreleri farklı yöntemler kullanılarak (rutin ve ÇİO yöntemiyle ışık / elektron mikroskobu ve immünohistokimya) ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu çerçevede lenf düğümündeki başlıca parankim hücresi olan lenfositler ve makrofajlar da sınırlı olarak değerlendirilmiştir. Elektron mikroskop düzeyinde özel hücre grupları ve bunların yapısal ilişkileri tanımlanmaya çalışılmıştır. İmmünohistokimya incelemelerinde geniş bir antikör paneli ile tarama yapılmış, immün işaretleme yardımıyla lenfositler ve diğer hücre grupları ayırt edilerek yapısal ve işlevsel ilişkileri ortaya koyulmaya çalışılmıştır. ÇİO yöntemi, daha önceki yayınlarda bildirildiği gibi retiküler hücre, damarlar ve makrofajlarda reaksiyon veren bir yöntem olduğundan, bu hücre ve yapıları daha ayrıntılı inceleyebilmek amacıyla çalışma kapsamında değerlendirilmiştir (14). Makrofajlar, damar ve sinüs endoteli, perisitler, fibroblastik retiküler hücreler, folliküler dendritik hücreler gibi lenf düğümü yapısına katılan çoğu hücre grubunun ÇİO ile pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Ancak yöntem bu hücre gruplarından hiçbiri için özgül reaksiyon vermemektedir. Aynı hücre grubuna ait hücrelerden bir bölümü ÇİO (+) reaksiyon verirken diğerlerinin daha zayıf reaksiyon gösterebildiği hatta bazılarının hiç reaksiyon vermediği görülmüştür. En yaygın ÇİO reaksiyonu gösteren hücre grubunu makrofajların oluşturduğu izlenmiştir. Buna karşın lenfositler kesinlikle reaksiyon vermedikleri için ÇİO yöntemi organ içinde lenfosit dışındaki hücrelerin daha kolay tanınması için oldukça

yardımcı olmuştur. Lenf düğümündeki sitoplazmik uzantılı retiküler hücrelerin lenfositlerle olan yakın yapısal ilişkileri ayrıntılı bir biçimde gösterilmiştir.

Klasik olarak lenf düğümü çatısını destekleyen retiküler lifler gümüşleme yöntemiyle gösterilebilmektedir. Bu çatıyı daha ayrıntılı gözleyebilmek amacıyla yapılan bir çalışmada, hem konvansiyonel yöntem ile hem de alkali-su maserasyonu ile tüm hücre elemanları ve bazal lamina ortadan kaldırılıp retiküler lifler doğal şekil ve yerlerinde bırakılarak, sıçan mezenterik lenf düğümü, retiküler çatının ince yapısı ve organizasyonu yönünden tarama elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Subkapsüler sinüsü çaprazlayan retiküler liflerin kapsülün kollajen liflerinden ortaya çıkıp subkapsüler sinüsü çaprazlayarak sinüs ile dış korteksin sınırında ince bir ağ oluşturdukları gösterilmiştir (74). Ek olarak subkapsüler sinüsün tabanından başlayan liflerin de olduğu başka araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (27).

Lenf düğümlerinde, retiküler liflerle yakın yapısal ilişkideki fibroblastik retiküler hücreler organın temel çatısını oluşturan ana hücre grubudur. Daha önceki bir çalışmada FRH'lerin yapılarının lenf düğümünde buldukları bölgeye göre değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir. Bu hücrelerden kortekste yerleşik, oval çekirdekli, uzun ve iç şeklinde bir grubunun subkapsüler sinüsün iç duvarının endoteline paralel olarak sinüs endotelinin hemen altında yerleştikleri ve sinüs duvarının oluşumuna doğrudan katıldıkları belirlenmiştir. FRH'lerin büyük bölümü ise derin kortikal parankimde ve medullada yerleşmiştir. Bu hücrelerin sitoplazma uzantıları ile sinüslerin ve kan damarlarının arasında bir ağ oluşturdukları, bu hücre-uzantı ağının arasındaki boşluklarda ise lenfositler ve diğer hücre gruplarının yer aldıkları bildirilmiştir (8). Bu yerleşim ve yapısal özellikleri nedeniyle sinüs duvarının oluşumuna doğrudan katılarak sinüs lümeniyle temas eden FRH'lerin subkapsüler sinüs makrofajları ile birlikte antijeni afferent lenften yakalayıp FDH'lere taşımakla görevli hücreler oldukları ileri sürülmüştür (8, 10).

Fibroblastik retiküler hücreler lenf düğümündeki en yaygın ve lenfositler ile doğrudan ilişkide bulunan hücreler olduklarından organın yapı-işlev ilişkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için pek çok araştırmacının ilgisini çeken bir hücre grubunu oluşturmuşlardır. Bu araştırmacılar FRH'lerin hem dağılımları

hem de başta lenfositler olmak üzere diğer hücre grupları ile yapısal ya da gelişimsel ilişkileri ile ilgili ipuçları elde etmeye çalışmışlardır (1, 2, 9, 65, 73, 74). Bir grup araştırmacı ise retiküler lifleri sentezlemenin yanında organın hücresel çatısını da oluşturan FRH'leri immün işaretlemeler yoluyla daha ayrıntılı olarak belirlemeye çalışmıştır (15, 18, 21, 27, 32, 35, 36, 37, 70). Bu amaçla FRH tarafından üretilen bir molekülü boyayan ER-TR7 monoklonal antikor araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmıştır (35, 36, 37). Katakai ve arkadaşları fare lenf düğümünde FRH ağını (retiküler ağı) göstermek amacıyla ER-TR7 monoklonal antikoruyla yaptıkları bir çalışmada, lenf düğümündeki retiküler ağı subkapsüler sinüs destekleyici ağı, esas olarak FDH ağından oluşan B lenfosit ilişkili retiküler ağı, T lenfosit ilişkili retiküler ağı ve meduller retiküler ağı olarak dört ana kısımda incelemişlerdir (36). Son yıllarda fibroblast yapısal özellikleri gösteren farklı yerleşimdeki bir grup hücre, fibroblast benzeri hücreler olarak gruplanmış ve yapı ve işlev benzerlikleri gösterdikleri bildirilmiştir (41). Lenf düğümü çatısını oluşturan FRH'lerin ve yine lenf düğümünde yerleşik bazı hücrelerin bu hücre ailesine üye hücreler oldukları değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu görüşe paralel olarak lenf düğümlerinde FRH'ler ile yüksek endotelli venülleri çevreleyen perisitler ve sinüs döşeyen hücreler aynı gruba ve özelliklere sahip hücreler olarak kabul edilmektedir (26). İmmün işaretleme yardımıyla yapılan incelemeler, FRH'ler ve lenf düğümündeki diğer hücre grupları arasındaki yapısal ve olası işlevsel benzerliklerin ortaya konması için bir destek olarak değerlendirilmiştir. ER-TR7 ile yapılan immün boyamada antikorun korteks-subkapsüler sinüs sınırında devamlı olarak reaktivite verdiği, YEV'lerin ise yine ER-TR7 (+) devamlı bir perisit tabakasıyla çevrelenmiş olduğunun görülmesi her iki hücre grubunun yakın ilişkisini ortaya koymuştur (35). Thomazy ve arkadaşları da YEV'in çevresindeki tek tabakalı hücre kılıfını perivenüler fibroblastlar olarak değerlendirerek bu hücrelerle FRH'ler arasında benzerliği ifade etmişlerdir (70).

Bu çalışmada VI., VII. ve VIII. HLDA çalıştaylarından sağlanan ve FRH'lerle seçici reaktivite gösteren monoklonal antikorlar araştırılmış, bunların yardımıyla FRH'ler ve benzer antijenik profil ve yapı gösteren



hücreler saptanmaya çalışılmıştır (39, 46). Bunlar arasında anti-CD49a, B-D46, anti-CD90, anti-vimentin ve 80373, FRH ile uzantılarını en net olarak ortaya koyan monoklonal antikorlar olmuştur. Bu antikorlarla yapılan immün boyamalarda interfolliküler ve parakortikal bölgelerde FRH uzantılarının oluşturduğu retiküler ağ net olarak izlenmiş, lenfositlerin ve diğer hücre gruplarının bu ağla olan yapısal ilişkileri gözlenmiştir. Bunlardan CD49a, 80373 ve vimentin antijenleri retiküler ağın izlenmesi amacıyla uygun olmanın yanında sinüs endoteli, sinüs çaprazlayan hücreler ve YEV duvarını çevreleyen hücrelerde de reaksiyon vermeleriyle bu hücre grupları arasında daha önce bildirilmiş olan yapısal ve işlevsel ilişkiyi destekleyen bulguların elde edilmesini sağlamışlardır. FRH'lerde varlığı belirlenen antijenler yukarıdakilere ek olarak EG3-880, CD53, CD63, CD54, CD90, CD99 ve 80394 olarak saptanmıştır. Bulgularımız bu antijenlerden özellikle CD54 (ICAM-1) ve CD90'ın, her iki antijenin de hücre-hücre etkileşimi açısından ve hücre içi sinyallerin başlatılmasında önemli moleküller oldukları bilindiğinden, YEV-lenfosit ilişkisinin yanı sıra FRH-lenfosit ilişkilerinde temel rol oynayan adezyon molekülleri olduklarını ortaya koymaktadır (6, 33, 44, 72).

Foliküler dendritik hücrelerin mononükleer fagositik sistem hücrelerinden mi yoksa yerel retiküler hücrelerden mi farklandığı uzunca bir süre tartışma konusu olmuştur (16, 18, 20, 31, 51, 55, 75). Parwaresch ve arkadaşları, özgül olarak FDH'leri belirlediğini gösterdikleri yeni bir monoklonal antikor bildirmişler ve kan mononükleer lökositlerinden bazılarının da bu antikorla çapraz reaksiyon verdiklerini saptadıklarında FDH'lerin öncüllerinin bu KiM4 + mononükleer hücrelerden geliştiklerini ileri sürmüşlerdir (55). Heusermann ve ark. ise ışık mikroskobu, enzim histokimyası ve elektron mikroskobu ile yaptıkları çalışmalarda FRH ve FDH'ler arası geçiş formlarını saptadıklarını bildirmişler ve FDH'lerin yerel fibroblastik retiküler hücrelerden farklandıklarını ileri sürmüşlerdir (31). N-asetilglukozamin (GlcNAc) residülerini tanıyan lektin olarak bilinen chelidonium majus agglutinin (CMA) ile yapılan işaretleme çalışmalarında lenf düğümünde tüm retiküler ağın, B- ve T- bağımlı alandaki dendritik hücrelerin, sinüs döşeyen hücrelerin ve her tip kan damarı endotelinin

işaretlendiği görülmüştür. CMA'nın seçici karbonhidrat özgüllüğü ve FRH ve FDH'leri işaretlemesi daha önce ileri sürülen FRH'lerin FDH'lere dönüştüğü hipotezini desteklemektedir (18). Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen bu görüşler doğrultusunda FDH öncülünün, FDH'ye farklanma potansiyeli olan bağ dokusuna yerleşik fibroblast benzeri bir hücre olduğu genel olarak kabul edilmektedir (51). Antijen-antikor komplekslerini zarlarında bağlayarak lenfositlere sunan ve bu yolla bellek gelişimine katkıda bulunan hücreler olarak kabul edilen FDH'lere yönelik olarak yaptığımız immünohistokimya incelemelerinde bu hücrelerde, EG3-880, CD20, LT-ND4, CD49d, CD53, CD63, pansitokeratin, CD54, CD106, CD151, CD49e ve CD99 antijenlerinin bulunduğu belirlenmiştir. Bunlardan özellikle CD106, CD49d ve CD20 başlıca FDH'lerde bulunan ve özgül işaretleyiciler olarak saptanmıştır. Ancak bazı antijenlerin FDH'ler ve FRH'lerde ortak olarak buldukları da görülmüştür. Bu antijenler CD54, EG3-880, CD53, CD63 ve CD99'dur. Her iki hücre grubunun ortak antijenler buldurması, bu hücrelerin ortak kökenli olabileceğinin bir işareti olarak değerlendirilebilir ancak her iki hücre grubunun çok sayıda farklı antijen de içeriyor olması, bu hücrelerin işlevlerine yönelik olarak ileri derecede farklılaşmış olduklarını da göstermektedir. ÇİO yöntemi de her iki hücre grubunda reaksiyon veren bir histokimyasal yöntem olarak sayılabilir ancak yukarıda değinildiği gibi bu yöntemin hücre grubuna özgül olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Retiküler ağın lenf düğümü işlevi ile ilişkisini ortaya koymaya yönelik incelemeler yapan bir grup araştırmacı, FRH'lerin uzantıları ve bunların retiküler liflerle olan ilişkileri konusunda bazı yeni tanımlamalar yapmışlar ve deneysel verilerle hipotezlerini desteklemeye çalışmışlardır. Bu araştırmacılar kanalcık ve koridor olarak adlandırdıkları kompartmanların lenf düğümü işlevinde önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Lenf düğümündeki retiküler liflerin FRH uzantıları tarafından tamamen sarıldığını bildiren bu araştırmacılar, içinde retiküler liflerin bulunduğu FRH uzantıları ile sarılı dar bölümleri kanalcık ("conduit") olarak adlandırmışlardır. İçinde lenfositlerin bulunduğu hücre uzantılarının arası ise koridor olarak tanımlanmıştır (26, 35, 70). Bu araştırmacılar koridorlarda, lenfositlerin fibroblastik retiküler hücrelere

adezyonu için gerekli olan fibronektin ligandını insan lenf düğümünde immunohistokimyasal olarak perivenüler kanal ve FRH boyunca göstermişlerdir (26). FRH'lerin, koridor duvarında epitel benzeri bir hücre tabakası oluşturduğu, koridor-sinüs komşuluğunda, kollajen lifin bir tarafında sinüs döşeyen hücrelerin, diğer tarafında ise koridorun duvarını döşeyen FRH'lerin yerleştiği bildirilmiştir (35, 74). Çalışmamız gerek immünoperoksidaz gerek immünoflöresan işaretlemelerle, parakortikal FRH ağının arasını lenfositlerin doldurduğunu ortaya koymuştur. Lenfosit FRH ilişkisinin yoğun olarak bulunduğu bu alanların yukarıda belirtilen araştırmacılar tarafından koridor olarak tanımlanan alanlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Gretz ve arkadaşları tarafından kendi çalışmaları ve diğer çalışmalara dayanılarak, retiküler lifler arasındaki boşlukta (koridor) hücrelerarası matriksin olmadığı ve bu durumun koridorlardaki lenfosit hareketlerini kolaylaştırdığı görüşü savunulmuştur (26). Aynı grubun diğer bir çalışmasında lenfositlerin FRH ve koridordaki diğer hücreler ile adeziv ilişkiler kurarak koridor boyunca göç ettikleri kanıtlanmaya çalışılmıştır (35). Çalışmada immunohistokimyasal olarak kollajen IV, fibronektin, laminin-1 ve tenasinin lenf düğümündeki ekspresyonu incelendiğinde interfolliküler alanda retiküler liflere uyan bir yerleşim düzeni gösterdikleri gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre hücrelerarası madde proteinlerinin varlığı kanalıcıklarda yerleşik retiküler liflerin çevresiyle sınırlı olup retiküler ağın arasında yer alan alanda (koridorlarda) yukarıda belirtilen hücrelerarası madde bileşenlerinden hiçbiri bulunmamaktadır, diğer bir deyişle bu alan organize interstisyel matriks içermemektedir. Proteoglikanlardan heparan sülfatın ve keratan sülfatın insan lenf düğümündeki dağılımının hücrelerarası madde proteinlerine benzediği, kondroitin sülfatın ise yalnızca damarları boyadığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada, FRH-interstisyel matriks ilişkisini göstermek amacıyla anti-kollajen III ve anti ER-TR7 ile ikili immün boyama yapılmış ve retiküler lifin yüzeyi boyunca ER-TR7 devamlı reaktif olarak gözlenmiştir. Immünoelektron mikroskopi ile kollajen III'ün lifin merkezinde yerleştiği, tip IV kollajen ve laminin-1'in ise FRH uzantıları ile retiküler lifler arasında uzanan bazal membranda yerleştikleri gösterilmiştir. Yine bazal

laminada bulunan tenasinin FRH'lerin düzenlenmesinde diğer organlarda olduğu gibi rehber bir rol oynadığını bildiren araştırmacılar koridorda ara madde bulunmamasının lenfosit göçünü ve hücrelerarası etkileşimi kolaylaştırdığını ileri sürmüşlerdir (35).

Retiküler liflerin çevresinde bazal membran olduğu görüşünü savunan araştırmacılara ters olarak Dullmann ve arkadaşları chelidonium majus agglutinin (CMA) ile yapılan işaretleme çalışmaları sonucunda FRH'lerin retiküler lifler ile aralarında bazal membran bulunmadığını bildirmişlerdir (18). Bu iki bulgu birlikte değerlendirildiğinde FRH etrafında dış lamina ya da sadece kanalcık etrafında bazal lamina bulunup bulunmadığı henüz netlik kazanmamış görünmektedir. Çalışmamızda integrin  $\alpha$ -1 zinciri (CD49a-VLA-1) için yapılan immün işaretlemede FRH'ler ve uzantılarının güçlü olarak antijeni eksprese ettikleri görülmüştür. Laminin reseptörü olan bu integrin molekülünün FRH'ler tarafından güçlü olarak eksprese edilmesi, bu hücrelerin komşuluğunda laminin/bazal lamina bileşenlerinin bulunduğunu düşündürmektedir. Yaygın olan bu ekspresyon, sadece kanalcıkta değil FRH'lerin tüm yüzeyinde benzer bir durumun olduğuna işaret etmektedir.

Yukarıda belirtilen Gretz ve arkadaşlarının hipotezine karşılık lenf düğümünde hücrelerin göçünü düzenlemede hücrelerarası madde bileşenlerinin rolü olduğu da savunulmuştur (81). Kollajen tip- 1, -3, -4, fibronektin, laminin, tenasin gibi hücrelerarası madde bileşenleri lenf düğümünde interfolliküler alanda bulunurlarken, folliküllerde bulunmadıkları saptanmıştır. Bu özel dağılım araştırmacılara T-bağımlı alanda hücrelerin göç ve yerleşiminde bu moleküllerin ve reseptörlerinin rol oynadığını düşündürmüştür. Germinal merkezde hafif düzeyde eksprese olan  $\beta$ 1 ve  $\alpha$ 4 dışında integrin moleküllerinin ekspresyonu interfolliküler alan ile sınırlı bulunmuştur. Integrin ekspresyonu lenf düğümü içindeki normal hareket ve göç için gereklidir, germinal merkezde hücrelerarası madde proteinlerini içermeyen hücre-hücre etkileşimleri daha önemli görünmektedir (81). Çalışmamızda CD49a, CD49b, CD49c, CD49e ve CD49f'nin follikül dışı yapılar da, CD49d'nin ise folliküllerde bulunduğunu belirledik. Oldukça yaygın dağılım gösteren bu integrinler başta damarlar olmak üzere lenf düğümünün

çeşitli stromal hücreleri tarafından da eksprese edilmekteydi. Folliküllerde görülen CD49f ekspresyonu da sadece burada yerleşik kapillerlerin duvarı ile sınırlıydı. Bizim paralel immünohistokimya bulgularımız yukarıda savunulan lenf düğümünde T-bağımlı alanda hücrelerin göçü ve yerleşiminde hücrelerarası madde bileşenlerinin de rolünün olduğu görüşünü desteklemektedir.

FRH'nin retiküler ağı nasıl oluşturduğu ve lenfosit aktivasyonuna cevap olarak yeniden nasıl yapılandığı tam olarak bilinmemektedir. Bağışıklık yanıtı sırasında retiküler ağda gerçekleşen dinamik değişiklikler, hücrelerarası madde üretimi, hücre adezyon aktivasyonu ve apoptoza karşı koruma gibi hücre içi ve dışı aktiviteleri olan protein olarak tanımlanan transglutaminazın (TG) immün boyanması ile araştırılmıştır. Reaktif lenf düğümünde YEV'in çevresindeki tek tabakalı hücre kılıfını da içeren parakortikal FRH ağında ve hiperplastik folliküllerin çevresindeki damar endotelinde TG ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. TG ekspresyonunun artmasının işlevsel parakortikal aktivasyona işaret ettiği ve endotel hücrelerindeki fazla TG ekspresyonunun aktive YEV morfolojisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. IL-4'ün, kültüre edilmiş lenf düğümü fibroblastik retiküler hücrelerinde TG ekspresyonuna neden olduğu, retiküler lif ağının oluşumunda ve dinamik yeniden yapılanmasında rol oynadığı yani stromal hücre fonksiyonunu düzenlediği saptanmıştır. Reaktif lenf düğümlerinde parakortikal değişikliklerin, follikülerin olgunlaşma aşamalarına eşlik ettiği belirlenmiştir. Germinal merkez oluşumu stromal hücreler tarafından üretilen sitokinlere, özellikle de lenfotoksin- $\beta$ 'ya bağlı bulunmuştur. Germinal merkez oluşumunun başlangıç aşamalarında sitokinlerin parakortikal FRH-kan damarı ağının reorganizasyonuna sebep olduğu ve böylece germinal merkezin genişlemesine yardımcı olduğu sonucuna varılmıştır (70). Bu bulgular, FRH'lerin ve bunların sentezlediği hücrelerarası madde bileşenlerinin lenf düğümlerinde önemli işlevleri olduğuna diğer bir kanıttır.

Katakai ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ERTR7(+), gp38(+), VCAM-1(+) FRH'ler ve ER-TR7 antijeninin üretimi incelenmiştir. FRH'ler tarafından üretilen bir çok kemokinin, T hücrelerin ve

dendritik hücrelerin kemotaksisine ve FRH yüzeyine adezyonuna neden olduğu ve FRH'lerin ER-TR7 antijenini lenfositlerle temasa cevap olarak retiküler ağ oluşturmak üzere hücrelerarası madde bileşeni olarak salgılayabildiği belirlenmiştir.  $TNF\alpha$  ya da lenfotoksin $\alpha$  tarafından, lenfotoksin $\beta$  reseptörü agonist antikoruyla birlikte uyarılmanın retiküler ağın oluşumuna neden olduğu ve bu bulgulara dayanılarak lenfosit kaynaklı sinyallerin, FRH'lerin lenf düğümü içindeki immün hücrelerin etkileşimi ve hareketini destekleyen ağ oluşturmasını sağladığı görüşü savunulmuştur (37). Bu çalışmada yukarıda belirtilen antijenleri eksprese eden bir FRH hücre dizisi kullanılmıştır. Çalışmamızda ise bu FRH hücre dizisinde bulunduğu bildirilen CD106 (VCAM-1) ekspresyonu yalnızca FDH'lerde güçlü olarak belirlenmiş, FRH'lerde belirgin bir reaksiyon olmadığı görülmüştür. Bulgularımız in vivo koşullarda FRH'lerin bu antijeni eksprese etmediklerini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda çekirdek yapısal özellikleri ve ince sitoplazmik uzantıları ve yerleşimleriyle FRH'ler rutin ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu preparatlarında ayırt edilmişlerdir. ÇİO yönteminin bu hücrelerde değişen oranlarda reaksiyon vermiş olması FRH'lerin ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde daha kolay ayırt edilmelerine olanak sağlamıştır. Bu hücrelerin tanımlanması daha yoğun olarak buldukları interfolliküler ve parakortikal alanlarda daha kolay gerçekleştirilmiştir. Özellikle ÇİO ile hazırlanmış preparatlarda uzantıların da boyanmış olması bu hücrelere ait uzantıların oluşturduğu retiküler hücre ağını daha belirgin olarak ortaya koymuştur. Subkapsüler sinüs ve yüksek endotelli venül duvarına komşu benzer yapıda hücrelerin varlığı saptanmıştır. Ancak subkapsüler sinüsün iç yaprağında endotel örtüsü çok düzenli görünmediğinden bu bölgeye komşu FRH'lerin gözlenmesi de göreceli olarak güç olmuştur. İnce yapı düzeyindeki incelemelerde parakortikal, perisinüzoidal ve perivenüler FRH'lerin birbirleriyle ve komşu oldukları yapılarla ilişkileri daha ayrıntılı olarak seçilmiştir. Yaptığımız incelemeler sonucunda FRH uzantılarının yer yer birbirleriyle desmozomlar aracılığıyla tutundukları görülmüştür. Yüksek endotelli venüllerin çevresinde yerleşik hücreler genel olarak perisit ve perisit

kılıfları olarak adlandırılmışlardır. Göç eden lenfosit sayısına paralel olarak yüksek endotelli venüllerin duvarını çevreleyen sitoplazmik uzantıların değişen oranlarda birbirlerinden uzaklaştıkları gözlenmiştir. Bu hücrelerden damara daha yakın olanlar ile çevre katmanları oluşturanlar arasında ince yapı düzeyinde bir farklılık saptanmamıştır. Özellikle dış katları oluşturan hücrelerin uzantılarının yer yer parakortikal FRH uzantıları ile yapısal ilişkide oldukları görülmüştür. ÇİO ile hazırlanmış preparatların incelenmesinde bu perivenüler kılıf hücrelerinin de bazılarının ÇİO (+) reaksiyon verdikleri ve bu sayede daha kolay ayırt edildikleri görülmüştür.

Daha önce değinildiği gibi Gretz ve arkadaşları, retiküler ağın işlevlerini açıklamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirmişler, FRH uzantıları tarafından sarılan kanalcık adını verdikleri retiküler mikroyapıları tanımlamışlardır (25, 26). Kanalcık sisteminin lenf sıvısındaki çözünmüş molekülleri sinüslerden doğrudan YEV'in ablüminal yüzeyine iletimini sağlayan özelleşmiş bir sistem olduğunu göstermek amacıyla işaretçi izleme (tracer) çalışmaları gerçekleştiren bu araştırmacı grubu peroksidaz gibi moleküler işaretleyiciler lenf damarı içine verildiğinde lenf düğümündeki retiküler ağın hızlıca işaretlendiğini bildirmişlerdir (26). Yine aynı grup tarafından flöresan işaretleyici kullanılarak yapılan deneyler lenf sıvısındaki kemokinler gibi düşük molekül ağırlıklı (çapı 7.2 - 10.7 nm'nin altında olan) çözünebilir moleküllerin kanalcık aracılığıyla hızla lenf düğümü korteksinden geçerek YEV'lere ulaştıklarını göstermişlerdir (10, 25). Kandan YEV yoluyla lenf düğümüne giren lenfositler YEV çevresindeki alanda subkapsüler sinüsten kanalcıklar aracılığıyla gelen sitokinlerle ve çözünebilir antijenlerle karşılaşır. Araştırmacılara göre bir çok çözünebilir mediyatör T ve B lenfositleri etkilediği için lenf düğümüne girdiği anda kanalcık yoluyla ulaşan ve kemokinler ile çeşitli mediyatörler içeren bir sıvı ile karşılaşmak bu hücrelerin sonraki göç, uyarılma ve farklılaşmalarını etkilemektedir (12, 25). Diğer bir araştırmada çözünebilir antijenlerin antijen sunucu hücrelere de retiküler ağ aracılığıyla ulaştığı bildirilmiştir (73). Diğer araştırmacıların çalışmalarıyla da desteklenen bu bulgular retiküler ağ ve kanalcık sisteminin lenfosit dolanımında ve immün yanıtta önemli rol oynadığını

düşündürmektedir (35, 54). FRH uzantıları tarafından sarılan ve retiküler lifleri içeren kanalcık sisteminin kapalı bir sistem oluşturup oluşturmadığına ait veriler çeşitli hipotezlerde öngörülen işlevleri yerine getirip getirmediği konusuna önemli kanıt oluşturacak ve açıklık kazandıracak nitelikte bulgulardır. Retiküler ağın kapalı bir sistem olduğu yönündeki ilk görüş parakorteksteki liflerin tamamıyla sarılı olduğunu gözleyen Hayakawa (30) tarafından bildirilmiştir. Kaldjian ve arkadaşları tarafından kanalcık içindeki sıvının koridor boşluğuna sızmasını FRH'ler ve FRH'lerin lifi sarmadığı nadir yerlerde bazal membranın önlediği savunulmuştur (35). Hayakawa, parakorteksteki liflerin yüzey alanının %10'unun IDH, makrofaj ve lenfositler gibi FRH dışındaki hücreler ile kaplı olduğunu belirtmiştir. Hayakawa'nın sonuçlarının tersine parakorteksteki retiküler liflerin sarılmasında kesintiler olduğu bildirilmiştir (74). Liflerin FRH ile sarılmasının postnatal gelişmenin ilk bir kaç günü içinde parakortekse özgü bir adaptasyon olarak gerçekleştiği, medullada da FRH'lerin liflerle etkileştiği ancak onları nadiren sardıkları gözlenmiştir (25, 74). Retiküler liflerin kortekste çoğunlukla sarılı olduğu ve medullada çoğunlukla sarılı olmadığı yönünde görüş birliği vardır (26). Sinüs döşeyen hücrelerin de sinüs lümenine uzanarak retiküler lifleri sarıp ağ oluşturdukları belirtilmiştir (18). Sinüsleri çaprazlayan lifler sinüs döşeyici/ çaprazlayan hücreler tarafından tamamıyla sarılıdır (26). Korteksteki kanalcık içindeki lifleri saran FRH kılıfındaki açıklık ya da kesintilerin boyutu ve oranı ile ilgili farklı görüşler ileri sürülmüştür. Yaptıkları deneysel işaretleme çalışmaları sonucunda kanalcık boşluğunun işlevi açısından ikna oldukları için, Gretz ve arkadaşları gibi Hayakawa ve arkadaşları da hücre bariyerinde bazı elektron mikroskop çalışmalarında gözlenen deliklerin geçici olduğu ve IDH, makrofaj, lenfosit gibi yerleşik hücrelerce kapatıldığı görüşünü savunmuşlardır (26, 30). Sıvı ve sitokinlerin kanalcık içine nasıl girdiği konusunda da çeşitli görüşler ileri sürülmektedir; bunlardan ilkinde göre transsitoz mekanizmasının çalıştığı; materyalin sinüs duvarındaki fibroblastik retiküler hücreler tarafından endositoz yolu ile alındığı savunulmaktadır. Kanalcıklara pencere kapillerler aracılığıyla transudasyon yoluyla sıvı girişi de ikinci bir görüş olarak ortaya konmuştur zira subkapsüler sinüsün hemen



altında bu tür kapillerler izlenmektedir. İlgili çekici olarak yüzeyel kortekste subkapsüler sinüsten YEV'e uzanan bazı lifler bu kapillerlerle kesişmektedir. Intralenfatik olarak verilen moleküler işaretleyicilerin sadece sinüslerde ve kanalcık içinde değil, perivenüler kanallarda, yüksek endotel hücreleri arasında ve YEV lümeninde de bulunması ancak parankim içine sızıntının minimal bir düzeyde kalması kanalcıkların YEV'e kadar tamamıyla FRH'ler ile sarılı olduğunu düşündürmüştür. YEV çevresinde kanalcık liflerinin perivenüler kanalın içindeki liflerle karıştıkları ve perivenüler kanalın spiral bir şekilde interendotelial bağlantılara kadar uzandığı bildirilmiştir. Bu gözlemler perivenüler kanalı da içine alan kanalcık sistemi içindeki materyalin parankimden tamamıyla izole edildiği görüşünün ortaya çıkmasına neden olmuştur (26). Kanalcık sıvısı ve içindeki çözülmüş sitokinlerin kanalcıktan esas çıkış yeri yukarıda tanımlandığı gibi YEV'lerdir. Çözünebilen maddelerin YEV'in lümenine geçişinin endotel transitozu ile ya da YEV'deki endotelarası bağlantıların tek yönlü geçiş sağlayan kapakları aracılığıyla gerçekleştiği ileri sürülmüştür (25).

FRH'ler tarafından çevrelenmiş kanalcıklar yapısal olarak ancak elektron mikroskobu düzeyinde belirlenebilmektedir. Bu çalışmada kullandığımız ÇİO yöntemi ile ince yapı düzeyinde yaptığımız gözlemler hücrelerdeki (+) reaksiyon sayesinde kanalcıkların çok daha kolay ve ayrıntılı tanımlamalarının yapılmasına olanak vermiştir. Böylece özellikle parakortekste daha yoğun olmak üzere FRH uzantıları tarafından çevrelenmiş çok sayıda kanalcığın varlığı belirlenmiştir. FRH uzantıları çok ince ve kanalların çapları da genellikle çok küçük olduğundan çoğunlukla bu kanalcıkların enine ve oblik kesitlerine rastlanmış, uzunlamasına kesitler ise daha az sıklıkta izlenmiştir. Bu gözlem FRH uzantılarının üç boyutlu yapısının ince hücre uzantılarından oluşmuş niteliğini de yansıtmaktadır. Bu çalışmanın hedeflerinden biri, daha önceki çalışmalardan bazılarında ileri sürüldüğü gibi kanalcık sisteminin kesintisiz bir kapalı sistem olup olmadığını belirlemeye yönelik veriler elde etmek olmuştur. Özellikle uzunlamasına kesitlerin büyük büyütmede yapılan incelemelerinde kanalcıkların retiküler lif ve homojen görünümde diğer hücre dışı matris bileşenlerini içerdiği ve çoğu durumda

kesintisiz olarak FRH uzantıları ile sarıldığı gözlenmiştir. Hatta bazı kesitlerde kanalcık duvarını oluşturan komşu FRH uzantılarının birbirleriyle yapısal ilişkileri de gözlenmiştir. Enine ve eğik kesitlerde çok büyük oranda kanalcığın FRH'lerce çepeçevre sarıldığı gözlenmiştir, ancak duvarda herhangi bir kesinti olup olmadığına yönelik yapılan ayrıntılı incelemelerde kanalcık içindeki retiküler liflerin yer yer FRH'lerce sarılmamış olduğu diğer tüm alanlarda lenfositlerin FRH'lerle temasta bulunmasına karşın bu tanımlanan bölgelerde lenfositlerin doğrudan hücre dışı matriks ve retiküler liflerle temasta buldukları görülmüştür. Yukarıda değinildiği gibi daha önceki çalışmalarda özellikle medullaya komşu bölgelerde ya da medullada FRH'lerin kanalcıkları tümüyle sarmadığı bildirilmiştir. Ancak bizim gözlediğimiz kesinti alanları parakortekste yerleşmişti ve boyutları mikrometrelerle ölçülebilecek düzeydeydi. Bu gözlemlerimiz kanalcıkların mutlak kesintisiz bir sistem oluşturmadıklarını göstermektedir. Ek olarak, kanalcık duvarının bazı bölgelerde makrofaj uzantıları tarafından da sarıldığı; dolayısıyla kanalcıkların sadece FRH'ler tarafından sarılan kapalı bir sistem olmadıkları görülmüştür. Ancak kanalcıklara ilişkin diğer ince yapı bulgularımız önceki araştırmacıların bildirdiklerine paralellik göstermektedir. FRH uzantılarının arasına yerleşik, içinde lenfositlerin bulunduğu koridorlarda daha önce başka araştırmacıların da bildirdiği gibi fibriler bir ara madde bileşenine rastlanmamıştır.

Lenfositlerin lenf düğümü içindeki göç yollarının belirlenmesi lenf düğümü işlevinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağından bazı araştırmacılar ilgilerini organın kan ve lenf damarları üzerinde yoğunlaştırmışlardır. Okada ve arkadaşlarının elektron mikroskop ve konfokal lazer tarama mikroskobu ile yaptıkları bir çalışmada lenf düğümündeki lenfatikler, kan damarları ve aralarındaki ilişki gösterilmeye çalışılmıştır. YEV'lerin folliküllerin arasında ve perifolliküler alanda buldukları, korteks kapillerlerinin doğrudan YEV'ler ile birleştikleri ve kortikomedüller bileşkede YEV'lerin aniden medulla venüllerine dönüştükleri gözlenmiştir. YEV'lerin olduğu bölgede kapillerlerin bol bulunması göç eden ve yerleşik lenfositlerin metabolik ihtiyaçları için gerekli maddeleri sağladığını düşündürmüştür (53). Işık mikroskobu ile yaptığımız

incelemeler sırasında postkapiller venüller ve YEV'ler arası geçiş bölgelerine ait kesitler izledik. Bu geçiş bölgelerinde yüksek endotelli venülden klasik yassı endotel hücrelerine geçişin ya da tersinin yukarıda değinilen araştırmacıların belirttiği gibi çok ani olarak gerçekleştiğini gözlemledik. Diğer bir deyişle bu tip geçiş bölgelerinde yassı endotel örtüsünün aniden yüksek boylu endotel hücrelerine dönüştüğünü gördük.

Yüksek endotelli venüllerin çevresinde damarları çevreleyen fibrilden zengin matriks ultrastrüktürel olarak FRH'lerden ayrılamayan perisitler ile sarılmıştır (35). YEV'leri saran fibriler kılıftaki pencerelerin bu bölgedeki hücre trafiğini yönlendirdiği düşünülmektedir (53).

YEV endoteli ile perisit arasında yer alan dar kanal "perivenüler kanal (PVK)" olarak tanımlanmıştır. PVK ve FRH'ler birlikte perivenüler kılıfı oluştururlar. Elektron mikroskop ile perivenüler kanal ince kollajen lif ve hücrelerarası madde tabakası olarak görülür. Lenfositler spiral biçimde FRH'yi takip ederek perivenüler kanaldan çıkarlar. Perivenüler kanal lenfositlerle kanalcık ile iletilen materyalin karşılaştıkları bölgedir. Perivenüler kanal içindeki kanalcık sıvısı ve hücrelerarası maddeden zengin çevre lenfosit göçü ve hatta farklanmasını etkilemektedir (26). Gretz ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı bir çalışmada florofor ile işaretli çözünebilir moleküllerin deri altına enjeksiyonuyla bu moleküllerin bölgeyi direne eden lenf düğümlerindeki dağılımı araştırılmıştır (27). Düşük molekül ağırlıklı lenf kaynaklı materyalin, perivenüler kanalı ve yüksek endotel hücreleri arasındaki alanı doldurduğu, lenfositlerin YEV lümeninden parankime bu boşlukların içinden göç ettikleri gözlenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı moleküllerin yüksek endotel hücrelerinin arasından lümenine geçişleri izlenmiştir (27).

YEV'den lenfosit göçü için endotel hücresi içinden ya da hücreler arasından olmak üzere iki yol önerilmiştir. Lenfositler YEV lümeninden sinüslere hareket ederken perivenüler kanallardan ve koridorlardan geçerler. Bu geçiş YEV endoteli, perivenüler kanal, FRH ve sinüs döşeyen hücrelerden göç ile mümkün olur. YEV'deki interendotelial bağlantılar flep benzeri kapaklar içerir ve lenfosit ve sıvının ters yönde geçişine izin verdiği ileri

sürülmüştür (26). YEV endoteli arasında sitokinlerin damar içine ve lenfositlerin de lenf düğümüne geçişine olanak sağlayan bu tür bir kapak yapısı (flap-valve junction) tanımlanmıştır (1). Normal sıçan lenf düğümünde lenfositlerin YEV duvarından ve bazal membrandan perivasküler alana diapedez yoluyla göçünün incelendiği bir çalışmada bu göçün endotel hücreleri arası bağlantılar yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir. Lenfositlerin göç ederken YEV endoteli hücresi ile bazal membranı arasındaki subendoteliyal alanda birikip hücrelerarası etkileşimden sonra bazal membranı geçtiği düşünülmektedir. Subendoteliyal olarak biriken bu lenfositlerin YEV hücresinin lümenine doğru çıkıntı yapmasına neden olduğu belirtilmiştir (64). Afferent lenfte bulunan çözünmüş ya da hücre sel faktörlerin, YEV morfolojisinin ve işlevinin sürdürülmesi için gerekli olduğu çok önceden bilinmektedir. Literatürde derialtı lenf düğümüne gelen lenf akımının kesilmesi ile YEV endotelinin yassılaştığı ve vasküler adre sinlerin ekspresyonunun kaybolduğu bildirilmiştir. YEV endotelinin yassılaşması işlevini kaybetmesi ile sonuçlanır ya da onun bir sonucudur. Çözünür maddelerin yanında afferent lenf ile gelen sinüs makrofajlarının da YEV işlevini düzenliyor olabileceği düşünülmüştür (81).

Işık mikroskobu düzeyinde yaptığımız incelemelerde yüksek endotelli venüller, endotel hücrelerinin tipik görünümü ve duvarlarında yerleşen lenfositlerin varlığıyla kolaylıkla tanımlandılar. Klasik olarak bu damarların parakortekste yerleştikleri bilinmektedir, ancak biz çok sayıda lenf düğümü üzerinde yaptığımız incelemelerde korteksin yüzeyel interfolliküler bölümlerinde hatta subkapsüler sinüse çok yakın komşulukta bulunabildiklerini gözlemledik. Çoğu follikülün koronasına yakın komşulukta follikülü neredeyse kuşatır tarzda YEV kesitlerinin bulunması da dikkatimizi çekti. Bu bulgularımız Okada tarafından daha önce bildirilenlerle uyumludur. ÇİO yöntemiyle ve immünohistokimya işaretlemeleriyle yaptığımız incelemelerde bu damarların tanımlanması ve dağılımlarının incelenmesi çok daha kolay olarak gerçekleştirildi. CD105, CD54 gibi bazı antijenlerin YEV'lerdeki güçlü ekspresyonu ve özellikle CD54'ün YEV endotel hücrelerinin lenfositlere bakan apikal yüzlerinde daha güçlü eksprese

edilmesi, söz konusu antijenlerin lenfosit göçünde rol oynayabileceklerinin bir kanıtı olarak değerlendirildi. Gerek YEV endoteli gerekse çevreleyen perisitlerdeki (+) reaksiyon bu damarların ince yapı düzeyindeki incelemelerinde ÇİO yöntemiyle hazırlanan preparatların daha ayrıntılı bilgi vermesini sağladı. Yukarıda tanımlanan perivenüler kılıfta yerleşik perisit ya da FRH'lerin bazılarında kanalcıkların bulunduğu görüldü. Bu bulgu diğer araştırmacılar tarafından ileri sürülen kanalcık ve perivenüler kanal ilişkisini destekleyen güçlü bir bulgu olarak değerlendirildi. Endotel hücrelerinden lenfosit göçüne yönelik olarak yaptığımız incelemeler hücre göçünün endotel hücresi sitoplazması içinden gerçekleştiğine yönelik kanıtlar içermektedir. Çoğu yayında diapedezin interselüler aralıktan gerçekleştiği savunulmuştur, ancak bizim gözlemlerimiz hücre göçünün en azından her iki yol ile de gerçekleştiğini düşündüren güçlü kanıtlar içermektedir. İncelemelerimiz sırasında endotel örtüsünü aşan lenfositlerin bazal kompartmanda görülmesiyle birlikte çevreleyen perisit uzantılarının arasında da göçünü yeni tamamlamış lenfositlerin varlığı da dikkati çekti. Bu tür aktif göç sürecinin gerçekleştiği bölgelere ait kesitlerde duvarda ve bazal kompartmanda çok sayıda göç eden lenfositlerle birlikte perisit ya da fibroblastik retiküler hücre uzantılarının arasında çok sayıda diziler halinde lenfositin bulunduğu izlendi. Yoğun göç süreci yaşanan YEV'lerin çevresini kuşatan perisitler arasındaki lenfositlerden bazılarının göç ettiklerini düşündürür yapı kazanmış olmaları ve bu uzantı tabakalarını aşarak görünümündeki biçimleri lenfositlerin YEV duvarından göç ettikten sonra hareketlerinin perisit-FRH uzantılarının sınırladığı kompartmanlarla sınırlı kalmayıp belli alanlarda daha dış kompartmanlara doğru gerçekleştiğinin de bir kanıtı olarak değerlendirildi. Daha sınırlı sayıda hücrenin göç ettiği diğer bazı YEV'lere ait kesitlerde ise perivenüler kompartmanda perisit uzantıları ile birlikte belirgin oranda ara madde bileşenlerinin olduğu görüldü. Bu bölgeye özgü ilginç bir gözlemimiz bazı perisit uzantılarının çepeçevre eksternal laminayla çevrelenmiş olmalarına karşın diğerlerinin yalnızca bir yüzünde bazal lamina olduğunun görülmesiydi. Bazı araştırmacılar FRH'lerin sadece kanalcığa bakan yüzünde bazal lamina olduğunu bildirmiş ve bunun bu hücre grubunun epiteliyal

niteliğini yansıttığını ileri sürmüşlerdir (35). Gözlemlerimiz, perivenüler kompartmanda yerleşik perisit ya da FRH'lerin en az bir yüzlerinin bazal ya da eksternal laminayla çevrelendiğini ortaya koymaktadır. Bu iki veri birlikte değerlendirildiğinde çepeçevre dışı lamina ile sarılmış hücrelerin klasik perisit tanımına uydukları ancak bir yüzünde bazal lamina bulunan hücrelerin FRH'ler olabilecekleri; çok büyük benzerlik gösteren bu iki hücre grubunun bu nitelikleriyle ayrılacakları savunulabilir. Kanalcık tanımını yapan araştırmacıların görüşleri doğrultusunda bir değerlendirme yapıldığında söz konusu bazal laminanın kanalcıkların içindeki bazal laminanın bir devamı olduğu düşünülebilir. Ancak yaptığımız incelemelerde perivenüler kanala açılan bir kanalcık ağzı gözlemlememiş olduğumuzdan bunu kesin olarak söylemek oldukça güçtür.

Okada ve arkadaşları elektron mikroskop ve konfokal lazer tarama mikroskobu ile damarlara yönelik yaptıkları yukarıda da değinilen çalışmalarında lenf sinüslerinin lümenine giren ve lümeni çaprazlayan bir çok retiküler hücre ve retiküler lif içerdiklerini gözlemlemişlerdir. Subkapsüler sinüsü kapsülün iç tabakalarından dış kortekse uzanan retiküler liflerin oluşturduğu ince ağın çaprazladığını bildiren araştırmacılar, bu liflerin subkapsüler sinüs iç duvarında bulunan deliklerden geçtiğini gözlemişlerdir. İçinden retiküler liflerin geçtiği bu deliklerin perifoliküler alan üzerinde folliküler alan üzerinde olduğundan daha dar olduğu görülmüştür. Araştırmacılar germinal merkez ile perifoliküler sinüsler arasında geçiş olduğunu; bazı germinal merkezlerin ise direkt olarak subkapsüler sinüs ile bağlantı kurduğunu; korteksteki kapillerlerin lenf sinüslerini geçebildiklerini ve YEV'lerin lenfatik boşluklarla bağlantısı olduğunu bildirmişlerdir (53). Diğer bir çalışmada sinüs döşeyen hücrelerin sinüs endotelini oluşturdukları, asit fosfataz ve non-spesifik esteraz aktivitesi gösterirken, kan damarı endotelinden farklı olarak alkalin fosfataz aktivitesi göstermedikleri belirtilmiştir (18).

Daha önce FRH'ler ile yapısal ve işlevsel ilişkilerine değinilmiş olan sinüs döşeyen hücrelerin klasik endotel hücreleri mi yoksa modifiye FRH'ler mi olduğu yönünde farklı görüşler vardır (26). Fare lenf düğümünde ÇLO ile

fiksasyondan sonra ışık ve elektron mikroskobu ile sinüs endotel hücreleri incelenmiştir. Bu yöntem ayrıca organın iskelet çatısını oluşturan ve lenf düğümündeki temel stromal hücre olan FRH'leri de işaretlemektedir. Araştırmacılar dendritik sinüs endotel hücreleri gözleendiği gibi sinüs endotel hücreleri ile FRH arası formlar da gözleendiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar sinüs endotel hücrelerinin FRH'lerle ortak yakın yapısal özelliklerinin olması ve ara yapısal özellikler gösteren geçiş hücrelerinin varlığı nedeniyle sinüs endotel hücrelerinin sinüs adventisyasında yerleşmiş olan FRH'lerden köken aldıklarını düşünmüşlerdir (9). Fare lenf düğümlerinde sinüslerin kesintili tek tabakalı bir sinüs endotel hücresi örtüsü ile döşeli olduğunu bildiren bu araştırmacılar komşu parankimdeki FRH'lerin sinüs endotelinin kesintiye uğradığı alanlarda lümen içeriği ile doğrudan ilişkide olduklarını belirtmişlerdir (9).

Sinus duvarının yapısı ve FRH'lerle ilişkisi lenf sıvısının lenf düğümü içindeki dolanımı için belirleyici önem taşımaktadır. Lenf sıvısı içindeki antijenler ve hücrelerin kortikal parankime girip girmediği ile ilgili de çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. Son yıllarda Gretz ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı yukarıda sözü edilen bir çalışmalarında, florofofor ile işaretli çözünebilen moleküllerin deri altına enjeksiyonuyla bu moleküllerin bölgeyi direne eden lenf düğümlerindeki dağılımı araştırılmıştır (27). Lenf kaynaklı çözünebilen moleküllerin lenf düğümü parankiminin her yerinde yaygın dolanımından çok, lenf düğümünün T-bağımlı alanı içinde yerleştiği gösterilmiştir. Çözünebilen moleküllerin subkapsüler sinüsten kortekse girişi moleküler büyüklüklerine bağlı bulunmuş, yüksek molekül ağırlıklı moleküller kortekste belirlenemezken düşük molekül ağırlıklı moleküller retiküler ağda ve YEV'lerde gözlenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı moleküllere ait floresansa T-bağımlı korteks alanlarındaki lenfositlerin arasında sınırlı olarak rastlanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar, protein ve polisakkaritlerin lenf sıvısından lenf düğümü parankiminin içine sızmasını sınırlandıran işlevsel bir bariyerin varlığına dikkat çekmişlerdir. Florofofor işaretli lektinler, lenf kaynaklı materyalin hareketinin subkapsüler sinüsten YEV'e doğru olduğunu göstermiştir. Florofofor işaretli kemokinlerin (örn. MIP-

1 $\alpha$ -FITC) de sinüslerden retiküler ağ (kanalcık) aracılığıyla YEV'lere ulaştığı izlenmiştir. Bu bulgulara bağlı olarak araştırmacılar lenf kaynaklı çözünebilen moleküllerin lenf düğümü korteks parankimine (T-bağımlı alan) girişinin sınırlı olduğunu ve düşük molekül ağırlıklı lenf kaynaklı çözünebilen moleküllerin kanalcık aracılığıyla hızla lenf düğümü korteksinden geçerek YEV'e ulaştıklarını savunmuşlardır. Bu bariyerin lenf kaynaklı materyalin korteks parankimine girişini sınırlamasının lenfosit mikroçevresini koruyarak, korteksi bağışıklık yanıtını bozan, zayıflatan maddelerden izole ettiğini, bunun da lenf düğümü işlevleri açısından oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir (27)..

Subkapsüler sinüsün parankime komşu duvarında yuvarlak pencerelerin varlığını gözleyen Ohtani ve arkadaşları bu pencerelerin antijen ve/veya serbest hücrelerin afferent lenfatiklerden parankim içine geçişlerini sağladığını göstermeye çalışmışlardır. Araştırmacılar bu amaçla periton boşluğuna enjekte edildikten sonra hızla lenf düğümüne giren TRITC-jelatinin lenf yollarındaki seyrini konfokal mikroskop ile incelemişlerdir (52). Araştırmacılar TRITC-jelatini subkapsüler sinüsde izledikleri gibi, korteksin intersitisyumunda lenfositler arasında da gözlemişlerdir. Bu gözlemlerine dayanarak antijenlerin, antijen sunucu hücrelerin, sıvı ve makromoleküllerin immün yanıtı başlatmak üzere pencereci sinüs duvarından kortikal parankime serbest olarak girebileceğini savunan araştırmacılar, SEM ile yaptıkları incelemelerde kollajen liflerin sinüs retiküler hücreleri ile sarılı olarak subkapsüler sinüsü çaprazladığını da bildirmişlerdir.

Sıçan mezenterik lenf düğümünün hem konvansiyonel yöntem ile hem de maserasyon sonrası tarama elektron mikroskobu (SEM) ile incelendiği bir çalışmada masere edilmemiş örneklerde subkapsüler sinüsün iç yüzeyinin sinüs döşeyen hücreler ile döşeli olduğu ve ince kılıfın kapsül tarafında devamlı iken parankim tarafında kesintili olduğu gözlenmiştir. Subkapsüler sinüsün parankime komşu duvarındaki izlenen yuvarlak pencerelerin hücrelerin ve/veya antijenlerin sinüsten parankim içine geçişine olanak verdiği düşünülmüştür. Subkapsüler sinüs lümenini çaprazlayan retiküler liflerin tamamıyla retiküler hücrelerin uzantıları ve hücre gövdeleri ile sarılı olduğunu bildiren araştırmacılar sinüs retiküler hücrelerinin sinüs döşeyen



hücrelerden kaynaklandıklarını savunmuşlardır. Araştırmacılara göre dış korteksteki retiküler lifler tamamiyle retiküler hücre uzantıları ile sarılı değildir; damarlar da retiküler lif ağı ile devamlı kollajen liflerden oluşan dantel benzeri kılıflar ile sarılıdır. İç kortekste ise retiküler liflerin hemen hemen tamamiyle retiküler hücre uzantıları ile sarılı olduğunu belirten araştırmacılar retiküler lifleri açığa çıkaran az sayıda küçük delik gözlediklerini bildirmişlerdir (74). Araştırmacıların bu son gözlemleri, yukarıda değindiğimiz gibi çalışmamızda kanalcık duvarında izlediğimiz kesinti bölgelerinin varlığına bir destektir.

Bu çalışmada gerek ışık, gerek elektron mikroskop gerekse sinüs endotelini işaretleyen antikorlarla yapılan immünohistokimya incelemelerinde subkapsüler sinüs dış yaprak endotel örtüsünün kesintisiz olduğu dış ve iç yaprak arasında sinüs çaprazlayan hücre uzantılarının olduğu, ancak iç yaprak endotel örtüsünün kesintisiz ve düzenli bir yapı göstermediği görüldü. Subkapsüler sinüsünün dıştan paralel düzenlenmiş birkaç sıra fibroblast ve kollajen demetlerce desteklendiği belirlendi. Subkapsüler sinüse yönelik yapılan ayrıntılı incelemelerde çaprazlayan hücrelerin bir bölümünün dış yaprağı döşeyen endotel hücreleriyle bir bölümünün de iç yaprağı döşeyen endotel hücreleriyle yapısal devamlılık gösterdikleri gözlemlendi. Lümende yerleşik çaprazlayan hücre kesitlerinin ortasında retiküler liflerin bulunduğu bu lif demetlerini tamamen hücrelerce sarıldığı belirlendi. Düzensiz yapısı nedeniyle iç duvarı döşeyen endotel hücreleri çoğunlukla güçlükle seçildi. Elektron mikroskopta az sayıda incelenen bu tür hücrelere ait incelemelerde sinüs çaprazlayan hücrelere benzer biçimde bunlardan bazılarının retiküler lifleri çevreledikleri saptandı. Immünohistokimyasal incelemeler de iç duvarı döşeyen hücrelerin kesintili bir örtü oluşturdukları izlenimini destekler nitelikteydi.

Çalışmamızda lenf düğümünün ana elemanı olan lenfositlerle birlikte diğer özel hücre grupları ve yapılara yönelik immünohistokimyasal incelemelerimiz bu hücre gruplarının antijenik profilini belirlememizi de sağladı. Kullandığımız geniş panele ait antikorlardan bazılarının bu hücre grupları için özgül işaretleme gösterdikleri, diğer bir grubunun ise farklı hücre gruplarında buldukları belirlendi.

Klasik T lenfosit antijenlerinden CD2, CD3, CD4, CD7 ve CD8'in T-bağımlı alanda yerleşik lenfositlerde işaretleme yaptığı görüldü. Bunlardan en yaygın CD3 olmak üzere CD2 ve CD7'nin parakorteks ve interfolliküler alandaki hemen hemen tüm lenfositleri işaretlediği belirlendi. CD4 ve CD8'in ise T-bağımlı alandaki lenfositlerden bir bölümünü işaretlediği saptandı. Folliküllerde de az sayıda CD4 (+) lenfositin yerleştiği görüldü. CD43 ve CD50 molekülleri ise germinal merkezdeki çoğu hücre hariç organdaki hemen hemen tüm lenfositlerde mevcuttu. CD43 koronada daha az sayıda hücreyi işaretlerken, CD50 özellikle germinal merkezin koyu kutbundaki hücrelerde mevcut değildi. Bu dağılım söz konusu antijenlerin özellikle bazı B lenfosit alt gruplarında bulunmadığını göstermekteydi.

Makrofajlara yönelik incelemelerimizde bu hücrelerde bulunduğu daha önce bildirilen CD7, CD11c, CD13, CD54, CD68, CD71 ve CD99 antijenlerinin bazılarının tüm makrofaj alt grupları, diğerlerinin ise bir kısım makrofaj tarafından eksprese edildiği saptanmıştır. Henüz özgüllüğü tanımlanmamış 2D7, HI272, HI277 ve E63-880 monoklonal antikorlarının da makrofajlarda bulunan antijenleri işaretlediği görülmüştür. Bunlardan E63-880 makrofajların yanısıra FDH, FRH ve sinüs endotelini de işaretlemiştir. Bu antijenin FDH, FRH ve sinüs endotelinde bulunması bu hücre grupları arasındaki ilişkiyi gösteren diğer bir kanıt olarak değerlendirilebilir.

Çalışmada immünelektron mikroskobu yöntemi kullanmadığımız için IDH'lerin kesin olarak tanımlanması mümkün olmamıştır. Ancak, CD11c ve CD68'le yapılan işaretlemelerde parakortekste yerleşik, dar sitoplazmaları ve derin çentikli çekirdekleri ile makrofajlardan ayırt edilen bir grup hücrenin reaktif oldukları görüldü. Bu hücreler IDH'ler olarak değerlendirildi.

Daha önce değinildiği gibi FDH ve FRH'lerin bazı antijenleri paylaştıkları, diğerlerinin ise sadece bu hücre gruplarından birinde bulunduğu belirlendi. Ancak, FDH'lerin pansitokeratin, FRH'lerin ise vimentin bulundurmaları ilginç bir bulgu olarak dikkatimizi çekti. Benzer şekilde B-D46 ile işaretlemede sadece FRH'lerin (+) reaksiyon vermeleriyle bu iki hücre grubu net olarak ayırt edildi.

Çalışmamızda sinüs endoteli ve sinüs çaprazlayan hücrelerin reaktif oldukları antijenleri saptamaya çalıştık. Sinüs endoteli ile reaksiyon gösteren antijenler CD31, CD49a, CD49c, CD49e, CD49f, CD63, E63-880 ve 80373 olarak belirlendi. Bunlardan özellikle CD31, CD49a, CD49c ve 80373'ün hem sinüs döşeyen hem sinüs çaprazlayan hücrelerde güçlü olarak buldukları görüldü. Bu antijenlerden bazılarının yukarıda değinilen FRH'lerde bulunan antijenler olduğu; diğer bir deyişle her iki hücre grubunun ortak antijenler barındırdıkları saptandı. En çok işaretlenme gösteren hücre grubunu damar endotel hücreleri oluşturmaktaydı. Bu hücrelerde bulunan antijenlerin CD31, CD36, CD49a, CD49c, CD49e, CD49f, CD54, CD62P, CD63, CD90, CD99, CD105, CD109, CD143, CD146, B-D46 ve 80373 oldukları belirlendi. CD143'ün lenf düğümü damar endotelinde varlığı ilginç bir bulgu olarak değerlendirildi. CD31 ve CD36 antijenleri için yapılan immün işaretleme de organda yerleşik küçük damarların dağılımının ayrıntılı olarak izlenmesini sağladı. FRH-sinüs endoteli antijenik profilinde olduğu gibi; damar ve sinüs endotelinin de ortak bazı antijenleri barındıran iki hücre grubu oldukları görüldü. Söz konusu antijenlerin işlevlerine bağlı olduğu düşünülen bu durum her iki hücre grubunun bazı yönleriyle benzer işlevleri yerine getirdiğini düşündürdü. Diğer bir deyişle, sinüs endotel hücreleri hem FRH'ler, hem de endotel hücreleriyle ortak yanları olan bir hücre grubu olarak saptandı.

YEV endotel hücrelerinin de endotel hücrelerinde bulunduğu belirtilen antijenlerin hemen tamamını eksprese ettikleri görüldü. Bu antijenlerden CD54 (ICAM-1), CD105 (endoglin) gibi bazıları güçlü olarak eksprese edildikleri YEV'lerin tanımlanmasına oldukça yardımcı oldu.

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yaptığımız incelemeler,

1. Lenf düğümündeki FRH ağının (retiküler ağ) incelenmesi için ÇİO yöntemi ve belli antijenler için yapılan immün işaretlemelerin oldukça yardımcı olduğunu,
2. Retiküler ağın subkapsüler sinüsün hemen altından başlayarak folliküller arasından daha yaygın olarak bulunduğu T-bağımlı bölgeye kadar uzandığını,
3. FRH uzantıları içinde daha önce kanalcık olarak tanımlanan retiküler lifleri barındıran bölümlerin olduğunu,
4. Büyük oranda FRH'ler tarafından sarılan kanalcık sisteminin lenfoid parankimden kesintisiz bir duvarla ayrılmamış olduğunu ve lenfositlerin yer yer retiküler liflerle temasta bulunduğunu,
5. Bu kanalcık sisteminin sinüsler ve yüksek endotelli venüllerle yapısal ilişkide olduğunu,
6. Kapiller-YEV geçişinin çok keskin bir yapısal değişiklikle gerçekleştiğini,
7. YEV duvarından göçün transselüler olarak da gerçekleştiğini,
8. Parankime göç eden lenfositlerin perivenüler kanalda diziler oluşturduğunu ve bir kaç sıra perisit-FRH tarafından çevrelenmiş bu bölgede tabakalar arası göçün de gerçekleştiğini,
9. Subkapsüler sinüs dış yaprağının kesintisiz, iç yaprağının kesintili endotel örtüsü tarafından sarıldığını ve sinüs lümeninde retiküler lifleri saran sinüs çaprazlayan hücrelerin bulunduğunu,
10. Organda yerleşik hücre gruplarının antijenik profillerinde önemli farklılıkların olduğunu, ancak bazı hücre gruplarının ortak antijenler içerdiğini,
11. YEV endotel hücrelerinin lüminal zarında yoğun CD50 ekspresyonu olduğunu, molekülün YEV duvarından hücre göçünde rol oynayan önemli bir molekül olabileceğini,

12. ÇİO yöntemi ve seçilmiş antijenleri kullanarak yapılacak immün işaretlemelerin organın farklı bileşenlerinin tanımlanmasını kolaylaştırdığını ortaya koymuştur.

Bu bulgularımız, ileride yapılacak çalışmalar için organın henüz tümüyle anlaşılammış yönlerine ışık tutacak niteliktedir.

Retiküler ağı ayrıntılı olarak ortaya koyduğunu belirttiğimiz yöntemler ileride yapılacak üç boyutlu rekonstrüksiyon çalışmalarına önemli katkı sağlayacaktır. YEV duvarından göçün transselüler ya da interselüler olarak gerçekleştiğine yönelik gözlemler yine seri kesitlerde gerçekleştirilecek üç boyutlu analiz çalışmalarında kesin sonuç elde edilmesini sağlayacaktır. Kapsül ya da kapsül dışına uzanan retiküler lifler aracılığıyla bir madde taşınıp taşınmadığının saptanması ve bu yolla da lenf düğümü parankimine giriş olup olmadığının belirlenmesi için bu bölgeye verilecek işaretlerin izlendiği deneysel çalışmalar yararlı olacaktır. Kanalcıklar ancak ince yapı düzeyinde gösterilebildiği için bu yapıların işlevlerini açıklamaya yönelik çalışmaların immünoelektronmikroskopi işaretlemeleriyle gerçekleştirilmesi uygun olacaktır.

**KAYNAKLAR**

1. Anderson, A.O., Shaw, S. T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. *Semin. Immunol.*, 5(4), 271-282, 1993.
2. Anderson, A.O., Shaw, S. Conduit for privileged communications in the lymph node. *Immunity*, 22(1), 3-5, 2005.
3. Bailey, D.J., Ranney, M., Habeshaw, J.A. Immunoperoxidase analysis of B and T cell populations in human lymphoid follicles. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 149, 809-816, 1982.
4. Bloom, W., Fawcett, D.W. *Lymph Nodes, "A text-book of histology" de*, XI. Baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, s. 449-463.
5. Clark, M.A., Ackerman, G.A. Osmium-zinc iodide reactivity in human blood and bone marrow cells. *Anat. Rec.*, 170, 81-96, 1971.
6. Clark, R.A., Timothy, A.S. CD90 Workshop Panel report, "Leucocyte Typing VI" (Ed. Kishimoto, T., Kikutani, H. ve ark.)'da, Garland publishing, Inc., New York, 1998, s. 425-427.
7. Crivellato, E., Baldini, G., Basa, M., Fusaroli, P. The three-dimensional structure of interdigitating cells. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 98(4), 243-258, 1993.
8. Crivellato, E., Mallardi, F. Stromal cell organization in the mouse lymph node. A light and electron microscopic investigation using the zinc iodide-osmium technique. *J. Anat.*, 190, 85-92, 1997.
9. Crivellato, E., Mallardi, F. The sinus endothelial cell architecture in the mouse lymph node. Structural peculiarities and close correlation with the fibroblastic reticular cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 30(4), 495-502, 1998.

10. Crivellato, E., Vacca, A., Ribatti, D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol.*, 25(4), 210-217, 2004.
11. Crocker, J., Hopkins, M. Histiocytic and dendritic reticulum cells shown by a zinc iodide-osmium technique. *J. Clin. Pathol.*, 37, 620-627, 1984.
12. Cyster, J.G. Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science*. 286 (5447), 2098-2102, 1999.
13. Dağdeviren, A., Örs, Ü. Lenfoid doku retiküler hücreleri. *J. Faculty of Medicine University of Ankara*, 43(3'e ek), 773-782, 1990.
14. Dağdeviren, A., Alp, H., Örs, Ü. New applications for the zinc iodide-osmium tetroxide technique. *J. Anat.*, 184, 83-91, 1994.
15. Di Sciuillo, G., Donahue, T., Schachner, M., Bogen, S.A. L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo. *J. Exp. Med.*, 187(12), 1953-63, 1998.
16. Dijkstra, C.D., Kamperdijk, E.W.A., Döpp, E.A. The ontogenetic development of the follicular dendritic cell. *Cell. Tissue. Res.*, 236, 203-206, 1984.
17. Dijkstra, C.D., Döpp, E.A., Joling, P., Kraal, G. The heterogeneity of nuclear phagocytes in lymphoid organs: Distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2, ED3. *Immunology*, 54, 389-399, 1985.
18. Dullmann, J., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Ziesenitz, M., Schumacher, U. Lectin histochemistry of the rat lymph node: visualisation of stroma, blood vessels, sinuses, and macrophages. A contribution to the concept of an immune accessory role of sinus-lining endothelia. *Acta Histochem.*, 104(1), 77-83, 2002.

19. Ebnet, K., Kaldjian, E.P., Anderson, A.O., Shaw, S. Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu. Rev. Immunol.*, 14, 155-177, 1996.
20. Eikelenboom, P. Characterization of non-lymphoid cells in the white pulp of the mouse spleen: An in vivo and in vitro study. *Cell Tiss. Res.*, 195, 445-460, 1978.
21. Fu, Y.X., Chaplin, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 399-433, 1999.
22. Gartner, L.P., Hiatt, J.L. Lymphoid (Immune) System, "Color Textbook of Histology" (Ed. Deborah Thorp ve ark.)'de, II. Baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001, s. 273-299.
23. Gerdes, J., Stein, H. Complement (C3) receptors on dendritic reticulum cells of normal and malignant lymphoid tissue. *Clin. Exp. Immunol.*, 48, 348-352, 1982.
24. Glauert, A. Staining methods for sectioned material, "Practical Methods in Electron Microscopy" de, North-Holland Publishing Company, Hollanda, s. 25-76, 1977.
25. Gretz, J.E., Kaldjian, E.P., Anderson, A.O., Shaw, S. Sophisticated Strategies for Information Encounter in the Lymph Node. The Reticular Network as a Conduit of Soluble Information and a Highway for Cell Traffic. *J. Immunol.*, 157, 495-499, 1996.
26. Gretz, J.E., Anderson, A.O., Shaw, S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol. Rev.*, 156, 11-24, 1997.
27. Gretz, J.E., Norbury, C.C., Anderson, A.O., Proudfoot, A.E.I., Shaw, S. Lymph-borne Chemokines and Other Low Molecular Weight Molecules Reach High Endothelial Venules via Specialized Conduits While a



- Functional Barrier Limits Access to the Lymphocyte Microenvironments in Lymph Node Cortex. *J. Exp. Med.*, 192(10), 1425-1439, 2000.
28. Grossi, C.E., Ciccone, E., Tacchetti, C., Santoro, G., Anastasi, G. Anatomy of the immune system: facts and problems. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 105(4), 97-124, 2000.
  29. Gunn, M.D., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., Cyster, J.G. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(1), 258-263, 1998.
  30. Hayakawa, M., Kobayashi, M., Hoshino, T. Direct contact between reticular fibers and migratory cells in the paracortex of mouse lymph nodes: a morphological and quantitative study. *Arch. Histol. Cytol.* 51(3), 233-240, 1988.
  31. Heusermann, U.K., Zurborn, H., Schroeder, L., Stutte, H.J. The origin of the dendritic reticulum cell. *Cell Tiss. Res.*, 209, 279-294, 1980.
  32. Hiroi, M., Kuroda, N., Toi, M., Hayashi, Y., Miyazaki, E., Naruse, K., Enzan, H. Fascin-positive dendritic cells and fibroblastic reticulum cells build a framework of T-cell areas in lymph nodes. *Virchows Arch.*, 444(2), 158-163, 2004.
  33. Imai, K., Tsujisaki, M., Hareyama, M., Hinoda, Y. CD54 Workshop Panel report, "Leucocyte Typing VI." (Ed. Kishimoto, T., Kikutani, H. ve ark.)'da, Garland publishing, Inc., New York, 1998, s. 409-411.
  34. Junqueira, L.C., Carneiro, J. The Immune System & Lymphoid Organs, "Basic Histology, Text & Atlas" (Ed. J. Foltin, H. Lebowitz, P.J. Boyle)'da, X. Baskı, McGraw-Hill Companies, 2003, s. 265-290.
  35. Kaldjian, E.P., Gretz, J.E., Anderson, A.O., Shi, Y., Shaw, S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells

- anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int. Immunol.*, 13(10), 1243-1253, 2001.
36. Katakai, T., Hara, T., Lee, J.H., Gonda, H., Sugai, M., Shimizu, A. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immunoplatform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int. Immunol.*, 16(8), 1133-1142, 2004.
  37. Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H., Shimizu, A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 200(6), 783-795, 2004.
  38. Kaymaz, F.F., Dagdeviren, A., Asan, E. Antigenic profile of human thymus in concurrence with "Clusters of Thymic Epithelial Staining" classification. *Ann. Anat.*, 185(2), 163-171, 2003.
  39. Kishimoto, T., Kikutani, H., von dem Borne, A.E.G. ve ark. "Leucocyte Typing VI", Garland publishing, Inc., New York, 1998, s. 1-1342.
  40. Klaus, G.G.B., Humphrey, J.H., Kunkl, A., Dongworth, D.W. The follicular dendritic cell: Its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol. Rev.*, 53, 3-27, 1980.
  41. Komuro, T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast like cells. *Anat Embryol.*, 182, 103-112, 1990.
  42. Larsen, W.J. Development of the Vasculature, "Human Embryology" (Ed. L.S. Sherman, S.S. Potter, William J.S.)'de, III. Baskı, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2001, s. 195-234.
  43. Liu, Y.J., Xu, J., de Bouteiller, O., Parham, C.L., Grouard, G., Djossou, O., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Banchereau, J., Moore, K.W. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform. *J. Exp. Med.*, 185(1), 165-170, 1997.

44. Maeda, K., Kosco-Vilbois, M.H., Burton, G.F., Szakal, A.K., Tew, J.G. Expression of the intercellular adhesion molecule-1 on high endothelial venules and on non-lymphoid antigen handling cells: interdigitating cells, antigen transporting cells and follicular dendritic cells. *Cell Tissue Res.* 279(1), 47-54, 1995.
45. Mandel, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A., Tew, J.G. The follicular dendritic cell: Long term antigen retention during immunity. *Immunol. Rev.*, 53, 29-59, 1980.
46. Mason, D., Andre, P., Bensussan, A. ve ark. "Leucocyte Typing VII", Oxford University Press Inc., New York, 2002, s. 1-945.
47. Mcknight, A. J., Gordon, S. Membrane molecules as differentiation antigen of murine macrophages. *Adv. Immunol.*, 68, 271-314, 1998.
48. Moore, K.L., Persaud, T.V.N. *The Cardiovascular System, "The Developing Human: Clinically Oriented Embryology"* (Ed. William Schmitt)'de, VII. Baskı, Saunders, Philadelphia, 2003, s. 329-399.
49. Muller, G., Hopken, U.E., Lipp, M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol. Rev.*, 195, 117-135, 2003.
50. Niebauer, G., Krawczyk, W.S., Kidd, R.L., Wilgrem, G.F. Osmium zinc iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cells. *J. Cell. Biol.*, 43, 80-89, 1969.
51. van Nierop K., de Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin. Immunol.*, 14(4), 251-257, 2002.
52. Ohtani, O., Ohtani, Y., Carati, C.J., Gannon, B.J. Fluid and cellular pathways of rat lymph nodes in relation to lymphatic labyrinths and Aquaporin-1 expression. *Arch. Histol. Cytol.*, 66(3), 261-272, 2003.

53. Okada, S., Albrecht, R.M., Aharinejad, S., Schraufnagel, D.E. Structural aspects of the lymphocyte traffic in rat submandibular lymph node. *Microsc. Microanal.*, 8(2), 116-133, 2002.
54. Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., von Andrian, U.H. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* 194(9), 1361-1373, 2001.
55. Parwaresch, M.R., Radzun, H.J., Hansmann, M.L., Peters, K.P. Monoclonal antibody Ki-M4 specifically recognizes human dendritic reticulum cells (follicular dendritic cells) and their possible precursor in blood. *Blood*, 62(3), 585-590, 1983.
56. Patten, B.M. Development of the Circulatory System, "Human Embryology" de, II. Baskı, McGraw-Hill Book Company, Tokyo, Japonya, 1953, s. 608-705.
57. Pellegrino de Iraldi, A. Electron cytochemical demonstration of -SH groups in the synaptic vesicles of photoreceptor cells with the mixture of zinc iodide -osmium tetroxide. *Experientia*, 31, 842-843, 1975.
58. Qin, D., Wu, J., Vora, K.A., Ravetch, J.V., Szakal, A.K, Manser, T., Tew, J.G. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J. Immunol.*, 164(12), 6268-6275, 2000.
59. van Rees, E.P., Dijkstra, C.D., Sminia, T. Ontogeny of the rat immune system: an immunohistochemical approach. *Dev. Comp. Immunol.*, 14(1), 9-18, 1990.
60. Reinecke, M., Walther, C. Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular -SH groups. *J. Cell Biol.*, 78, 839-855, 1978.

61. Reinecke, M. The zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) method. "Techniques in Neuroanatomical Research" (ed. C.H. Heym & W.G. Forssmann)'da, Springer, Berlin, 1981, s. 293-300.
62. Rodriguez, E.M., Caorsi, I. A second look at the ultrastructure of the Langerhans cells of the human epidermis. *J. Ultrastruct. Res.*, 65, 279-295, 1978.
63. Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W. Lymphatic System, "Histology, A Text and Atlas" (Ed. Kathleen H. Scogna)'da, IV. Baskı, Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, 2003, s. 356-399.
64. Sainte-Marie, G., Peng, F.S. High Endothelial Venules of the Rat Lymph Node. A review and a question: Is their activity antigen specific? *The Anat. Rec.*, 245, 593-620, 1996.
65. Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B., Sorokin, L. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity*, 22(1), 19-29, 2005.
66. Stein, J.V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E., von Andrian, U. H. The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6CKine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J. Exp. Med.*, 191, 61-76, 2000.
67. Takahashi, K., Asagoe, K., Zaishun, J., Yanai, H., Yoshino, T., Hayashi, K., Akagi, T. Heterogeneity of dendritic cells in human superficial lymph node: in vitro maturation of immature dendritic cells into mature or activated interdigitating reticulum cells. *Am. J. Pathol.*, 153, 745-755, 1998.

68. Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*, 361(6407), 79-82, 1993.
69. Tew, J.G., Thorbecke, J., Steinman, R.M. Dendritic cells in the immune response: Characteristics and recommended nomenclature. (A report from the reticuloendothelial society committee on nomenclature). *J. Reticuloendothel. Soc.*, 31, 371-380, 1982.
70. Thomazy, V.A., Vega, F., Medeiros, L.J., Davies, P.J., Jones, D. Phenotypic modulation of the stromal reticular network in normal and neoplastic lymph nodes: tissue transglutaminase reveals coordinate regulation of multiple cell types. *Am. J. Pathol.*, 163(1), 165-174, 2003.
71. Tumanov, A.V., Grivennikov, S.I., Shakhov, A.N., Rybtsov, S.A., Koroleva, E.P., Takeda, J., Nedospasov, S.A., Kuprash, D.V. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol. Rev.*, 195, 106-116, 2003.
72. Turni, L., Shaw, S., Watson, B., Mason, D. CD Guide, "Leucocyte Typing VII" (Ed. David Mason) de, Oxford University Press, New York, 2002, s.747-931.
73. Tykocinski, M., Schinella, R.A., Greco, M.A. Fibroblastic reticulum cells in human lymph nodes. An ultrastructural study. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 107(8), 418-422, 1983.
74. Ushiki, T., Ohtani, O., Abe, K. Scanning Electron Microscopic Studies of Reticular Framework in the Rat Mesenteric Lymph Node. *Anat. Rec.*, 241, 113-122, 1995.
75. Villena, A., Zapata, A., Rivera-Pomar, J.M., Barrutia, M.G., Fonfria, J. Structure of the non-lymphoid cells during the postnatal development of the rat lymph nodes. *Cell. Tiss. Res.*, 229, 219-232, 1983.

76. Vrensen, G., de Groot, D. Osmium-zinc iodide staining and quantitative study of central synapses. *Brain Res.*, 74, 131-142, 1974.
77. Wake, K., Kawai, Y., Smedsrod, B. Re-evaluation of the reticulo-endothelial system. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 106, 261-269, 2001.
78. Willimann, K., Willimann, K., Legler, D.F., Loetscher, M., Roos, R.S., Delgado, M.B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur. J. Immunol.*, 28(6), 2025-2034, 1998.
79. Wilson, N.S., Villadangos, J.A. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.*, 82, 91-98, 2004.
80. Yoshida, T., Takaya, K. The enveloping of intercellular collagenous fibrils by reticular cell processes in postnatal development of rat lymph nodes. *Arch. Histol. Cytol.*, 55(4), 351-359, 1992.
81. Young, A.J. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Semin. Immunol.*, 11(2), 73-83, 1999.