

## ЛИМФОЦИТОПОЕЗНА ФУНКЦИЈА ТИМУСА

Лештаревић С.<sup>1</sup>, Анђелковић З.<sup>1</sup>, Митић Н.Б.<sup>2</sup>, Милосављевић З.<sup>3</sup>, Милошевић М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт за хистологију и ембриологију Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

<sup>2</sup>Институт за патолошку анатомију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

<sup>3</sup>Институт за хистологију и ембриологију Медицински факултет Крагујевац, Крагујевац

<sup>4</sup>Институт за судску медицину, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

## LYMPHOPOETIC FUNCTION OF THE THYMUS

Лештаревић С.<sup>1</sup>, Анђелковић З.<sup>1</sup>, Митић Н.Б.<sup>2</sup>, Милосављевић З.<sup>3</sup>, Милошевић М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Histology and Embriology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>2</sup>Institute of Pathology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>3</sup>Institute of Histology and Embriology, Medical Faculty Kragujevac, Kragujevac

<sup>4</sup>Institute of Phorensic medicine, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

### SUMMARY

The process of multipotential lymphatic stem cell maturation and differentiation into immunocompetent T cells is accomplished by the expression and deletion of specific surface CD antigens. The CFU-L stem cells enter the medulla of the thymus via a post capillary venule and then migrate to the periphery of the thymic lobule. The presence of CD2 and CD7 molecules on the cell surface indicates an early stage of differentiation. This is followed by expression of the CD1 molecule, indicating the midstage of T cell differentiation. As maturation progresses, the cells express TCRs, CD3, CD4, and CD8 molecules. It seems that intensity of interreacion between TCR/co receptor molecule complex and self peptide/MHC complex determine the outcome of the thymocyte selection process. If the lymphocyte recognizes self MHC and self or foreign antigen, it will survive the selection (positive selection); if not, death of the cell will occur. Cells that pass the positive selection test leave the cortex and enter the medulla. Here they undergo another selection process in which cells directed to self-antigen displayed by self MHC are eliminated (negative selection). Cells that survive that selection then become either cytotoxic CD8+ T lymphocytes or helper CD4+ T lymphocytes.

**Key words:** Thymocyte, Differentiation, Selection.

### САЖЕТАК

Процес сазревања мултипотентних лимфатичких стем ћелија и њихово диференцирање у имунокомпетентне Т ћелије се завршава експресијом и делецијом специфичних површинских CD антигена. CFU-L стем ћелије улазе у медулу тимуса преко посткапиларних венула, а онда мигрирају ка периферији лобула тимуса. Присуство CD2 и CD7 молекула на површини ћелија указује на рани стадијум диференцијације. Експресија CD1 молекула, указује на средњи стадијум диференцијације Т ћелија. Са напредовањем матурације, ћелије експримују TCR, CD3, CD4, и CD8 молекуле. Сматра се да интензитет интеракције комплекса TCR/корцепторни молекули са комплексом сопствени пептид/MHC одређује исход процеса селекције тимоцита. Уколико лимфоцит препозна комплекс сопствени MHC/антигенски пептид, он ће преживети селекцију (позитивна селекција); уколико не, настаје смрт ћелије. Ћелије које прођу тест позитивне селекције напуштају кортекс и улазе у медулу. Овде подлежу другој селекцији која ћелије које су усмерене ка комплексу сопствени антигенски пептид/сопствени MHC, елиминише (негативна селекција). Ћелије које преживе ову селекцију тада постају или цитотоксични CD8+ Т лимфоцити или хелпер CD4+Т лимфоцити.

**Кључне речи:** Тимоцит, Диференцијација, Селекција.

### УВОД

Паренхим тимуса представља специфичну микросредину у којој је једино могуће диферентовање и сазревање Т-лимфоцита (2) кроз три врсте процеса: умножавање незрелих ћелија, експресија гена за антигенске рецепторе и селекција лимфоцита који експри-

мирају корисне антигенске рецепторе (1). Поменути процеси су, уједно, и централна фаза у стварању имунокомпетентних ћелија-тимоцита, на којима почива целуларни имунитет организма (3), а основна сврха унутар-тимусне диференцијације лимфоцита је стварање анти-

ген специфичних тимоцитних рецептора (TCR), генетски програмираних да препознају специфичне ћелијске антигене (4).

По данас прихваћеној монофилетској теорији хемопоезе, прекурсори лимфоцита развијају се из једне плурипотентне хемопоеетске стем ћелије (PHSC), која се диферентује у мултипотентну лимфоидну стем ћелију (CFU-Ls) (3). Пролиферацијом и диференцијацијом ове биопотентне ћелије стварају се прогениторне ћелије за Т или Б лимфоците (45). Овај процес (стварање стем лимфоцита) би представљао рану фазу лимфоцитопоезе (5), а одиграва се у жуманчаној кеси, слезини и јетри у раном фетусном животу, а у каснијем фетусном и читавом постнаталном периоду у костној сржи (3).

Смисао интратимусне диференцијације лимфоцита је у синтези специфичних унутрашњих и мембранских протеина, неопходних за њихову функционалну активност (3), а овај период лимфоцитопоезе, обично се означава као антиген-независна фаза (5). Пут који тимоцити морају да превале током 3-4 недељног развоја представља маратон за ове ћелије (7), будући да "путују" хиљаду микрона кроз тимус пре него што постану функционалне Т ћелије (6). Завршна фаза лимфоцитопоезе одвија се у периферним (секундарним) лимфним органима где Т-лимфоцити доживљавају антиген-зависну пролиферацију и диференцијацију у ефektorне лимфоците или ћелије памћења (memory cells) (3).

Током матурационог процеса тимоцити експримирају бројне антигене, међу којима је део укључен у тзв. CD (cluster differentiation) систем (8), на основу кога су Reinherz и сар. (1980) направили класификацију од три стадијума у току интратимусног сазревања Т-лимфоцита - рани, средишњи (интермедијарни) и касни. Сваку од ових фаза карактерише низ фенотипских и функционалних промена у популацији тимоцита (41).

### Диферентовање Т лимфоцита у тимусу

#### Рана фаза лимфоцитопоезе

Рана фаза лимфоцитопоезе почиње 11. дана ембриогенезе код миша и око девете недеље код човека, када циркулишуће хемопоезне ћелије-CFU-Ls, као директни прекурсори Т-лимфоцита, колонизују тимус (11, 41, 12). Процес није континуиран, већ се тимусни прогенитори из костне сржи интермитентно ослобађају (13, 14), а њихова мобилизација и улазак у тимус доводе до настанка интермитентне Т ћелијске продукције, периодично на 3-5 недеља (15). Фенотипски идентитет ћелија које напуштају костну срж није познат, али новија истраживања показују да ове ћелије припадају примитивној популацији (Lin<sup>-</sup> Sca-1+ c-kit<sup>hi</sup> Thyl.1<sup>-</sup>) и да се могу разликовати помоћу експресије L-selektina (16). Показано је да ћелије са овим фенотипским профилем поседују развојни потенцијал својствен Т лози, а фенотипски сличан раним тимусним прогениторима (ETP) који су нађени у тимусу. Да ли овај субсет костне сржи представља чисту популацију тимичних прогенитора или је у питању хетерогена популација, која садржи и тимусне прогениторе, још увек се не зна (17-21).

Могуће је да процес почиње и пре васкуларизације рудимента (22), уз учешће хемоатрактаната. Актуелна истраживања показују да хемокин-сигнали играју значајну улогу у оркестрираној интратимичкој миграцији. Ин витро, тимоцити могу да одговарају на хемотактичке стимулусе, а бројне студије показују да се у тимусу налазе различити хемокини, као и одговарајући рецептори на тимоцитима, зависно од стадијума њиховог развоја (23, 24, 25, 28, 30). Могло би се рећи да су тимусни хемокини најприсутнији у медули, мада се често хемокин откривен у медули исказује и у субкапсуларној зони. Хемокини су откривени и у кортексу, премда се генерално разликују од оних који су изражени у медули и субкапсуларној зони. У једној студији је показано да CXCR4, рецептор за хемокин SDF-1 игра критичну улогу у спољој (површинској) миграцији раних Т прогенитора (31). У другим студијама је показано да CCR7, рецептор за CCL19 и CCL21, такође игра круцијалну, премда сложенију улогу у миграцији тимоцита. Најзад, изучавање CCR9, рецептора за CCL25 су указала на значајну улогу у миграцији тимоцита, премда прецизније објашњење тог значаја изостаје (30). Сада се применом два фотонска scanning микроскопа (TPLSM) може визуализовати понашање лимфоцита у природном окружењу што ће можда разрешити постојеће дилеме (32).

Формирањем крвних судова, стварају се услови за несметан доток прекурсорних ћелија које у паренхим доспевају, највероватније, преко посткапиларних венула, под хемотактичним утицајем тимусног епителног фактора (тимотаксин), који производе субкапсуларне епителне ћелије (42). По приспећу у тимус, долази до екстравазације раних прогенитора кроз васкуларни ендотел посткапиларних венула. Чиниоци који регулишу овај процес нису довољно разјашњени, мада новија истраживања показују да мала GTP-аза RAP1 посредује у екстравазацији зрелих Т ћелија кроз васкуларни ендотел редистрибуирањем CD44 и CXCR4 унутар мембрране ћелија, које излазе из крвних судова (34). По уласку у тимус, нови "имигранти" морају да буду компетентни за интеракције у локалном микроокружењу које дефинитивно воде пролиферацији и даљој диференцијацији у Т лозу, а у којима учествују L-selektin ligandi, ICAM-1, VCAM-1, и VAP-1 (46). Зашто тимус периодично прихвата ћелије из костне сржи није јасно. Могуће је, да је у питању ограничен број микрониша које се синхроно или полусинхроно празне. Периодична пријемчивост за имиграцију може бити зависна и од цикличне продукције фактора који посредују у овом процесу (47). По уласку у тимус, прогенитори остају у региону кортикомедуларне зоне (КМЗ) око 10 дана и током тог времена подлежу пролиферативној експанзији и даљој диференцијацији (35).

Про- Т ћелије се у тимусу умножавају под утицајем IL-7 произведеног у тимусу (1). Новодошли "имигранти" су у најранијем стадијуму развоја тимоцита, а део су хетерогене популације назване DN1 која обухвата најмање 5 субтипова, од којих сваки показује различит развојни потенцијал, сходно фенотипским и пролиферативним својствима (36). DN1 популација може

дати Б лимфоците, НКТ, дендритичне ћелије, као и Т ћелије. Настанак Т лозе и диференцијација у DN2 стадијум коинцидира са изласком ћелија из КМЗ и одласком дубоко у кортекс (37). Изгледа да протимоцити улазе у КМЗ због анатомске локализације нутритивних венула, али није јасно зашто се DN1 ћелије задржавају у овом подручју. Да ли је у питању мањак покретљивости или активна рестрикција кретања прогенитора? Најзад, није јасно шта индукује егзодус DN1 ћелија у кортекс и на који начин је та миграција повезана са процесом диференцијације. Да ли DN тимоцити излазе у КМЗ јер подлежу иницијалном стадијуму диференцијације? Да ли је напуштање овог подручја нужни предуслов даље диференцијације? Недавно је показано да губитак експресије хемокинског рецептора CXCR4 на тимичким прогениторима узрокује изостанак напуштања КМЗ од стране DN1 прогенитора, а CXCR4<sup>-/-</sup> DN ћелије не диференцирају до DN2 стадијума током формирања Т лозе. Ови резултати подржавају став да DN1 тимоцити морају напустити КМЗ да би се наставила даља диференцијација (31).

Поред хемоатракције, у колонизацији тимуса значај се придаје и молекулама експримираним на површини протимоцита који стичу могућност препознавања рецептора на ендотелу капилара и венула тимуса (9). У овој фази диференцијације аб тимоцити на својој мембрани испољавају CD44 и CD117 молекуле, укључене у регулацију адхезивних процеса, као и мањи број CD4 молекула. Ове ћелије немају испољен ни CD8 ни TCR. За разлику од феталних, прекурсори Т лимфоцита у адултном периоду испољавају мањи број Thy-1 (CD 90) и HSA молекула.

У наредном ступњу развоја, прекурсори Т лимфоцита, претежно локализовани у субкапсуларном региону (48, 42), губе CD4, а повећавају експресију CD90 и HSA молекула. Будући да на овом ступњу про-Т лимфоцити не испољавају CD4 и CD8 молекуле, као ни CD3/TCR комплекс, називају се троструко негативним (TN) тимоцитима. TN ћелије се могу поделити у 4 фракције на основу различите експресије молекула CD44 и CD25 на ћелијској површини. Најнезрелији тимоцити су у оквиру CD44+CD25<sup>-</sup> (TN1) субсета, а сазревање се наставља кроз CD44+CD25<sup>+</sup> (TN2), CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> (TN 3) и CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> (TN4) стадијум развоја. Кључни догађај у даљој диференцијацији Т лимфоцита представља испољавање ланца IL-2 рецептора (CD25) уз истовремено смањење експресије CD117 молекула. Убрзо почиње преуређење гена за β ланац TCR-а. У најранијим Т ћелијским прекурсорима гени за TCR се налазе у нефункционалној конфигурацији са типичном просторном одвојеношћу В, Д, Ј и Ц генских сегмената, наслеђеној од родитеља. У тој конфигурацији, локуси за α и β-ланце TЦР, садрже више гена за варијабилни (В) регион, којих има и до неколико стотина и само један или неколико гена за константни (Ц) регион. Између В и Ц гена налазе се мали низови нуклеотида који се називају спојни генски сегменти (енгл. Joining, J) и генски сегменти разноликости (енгл. Diversit, D). Сви генски локуси за антигенске рецепторе садрже V, J и C-гене, али само локуси за β-ланац TCR имају још и D-сегменте.

(1). Соматску рекомбинацију ових генских сегмената, према редоследу: DJ, VDJ, VDJC, врше ензими V(D)J рекомбиназе које активирају продукти RAG-1 и RAG-2 гена. Компонента V(D)J рекомбиназе, специфично експримирана у лимфоцитима, састоји се од протеина RAG-1 и RAG-2, кодираних генима који активирају рекомбинацију и препознаје ДНК секвенце које се налазе испред и иза сваког В, Д и Ј-генског сегмента. Као резултат овог препознавања, рекомбиназе доводе В, Д и Ј-сегменте у међусобну близину. Егзонуклеазе затим секу ДНК на крајевима сегмената, а прекиди ДНК се репарирају дејством лигаза, при чему настаје рекомбинован V-J или V-J-D ген. Компонента V(D)J рекомбиназе, специфична за лимфоците, експримирана је само у незрелим Т-лимфоцитима. Иако би исти ензими могли да обаве рекомбинацију свих TCR гена, функционални гени за α и β-ланце TCR експримиран су само у Т-ћелијама (1).

Процес преуређења гена за β-ланац TCR започиње експресијом CD25 молекула, а завршава се експресијом β-ланца TCR-а и губитком CD44 и CD117. β-ланац на мембрани TN ћелија је асоциран са p33 протеином (пре-Тa) који представља сурогат α ланца. Овај молекул учествује у преносу сигнала што је од великог значаја за даљу прогресију процеса диферентовања Т лимфоцита Овај стадијум у развоју Т лимфоцита назива се пре-Т стадијум (40).

#### Интермедијарна фаза лимфоцитопоезе

Средишњу (интермедијарну) фазу карактерише трансформација TN у кортикални тип тимоцита. Она почиње смањењем експресије, а затим и губитком експресије CD25 молекула на TN тимоцитима. Овај процес траје око 10-12 сати и за његово одвијање важна је микросредина тимуса. TN тимоцити на овом ступњу развоја почињу преуређење гена за α ланац TCR-а и експресију мањег броја CD4 или CD8 молекула. Због тога се и називају незрели (енг. Imature) једноструко (енг. Single) позитивни (ISP) тимоцити или TN4. Преуређење гена за α ланац слично је преуређењу гена за β-ланац TCR-а, с тим што α ланац нема D генске делове (1). TN4 ћелије су непосредни прогенитори CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоцита. Од ISP (TN4) настају тзв. двоструко позитивни (DP) тимоцити (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), који на својој мембрани испољавају и CD4 и CD8 молекулу као и CD3/αβTCR комплекс. Процес није синхрон тако да се могу идентификовати и тимоцити који немају подједнаку експресију оба корцепторска молекула (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>hi</sup> и CD4<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup>). На CD тимоцитима експресија CD3 молекула и αβ ланца TCR-а је увек мања (CD3<sup>hi</sup>TCR-αβ<sup>hi</sup>) од експресије CD4 и CD8 молекула. Током периода од 3-5 дана кортекс служи као основа за тестирање новоформираног TCR комплекса, а DP тимоцити морају, или успешно везати self-MHC/пептиде експримиране на стромалним ћелијама преко TCR, са одређеним нивоом афинитета или умрети (40).

#### Касна фаза лимфоцитопоезе

Касна фаза диферентовања Т лимфоцита обухвата трансформацију DP у једноструко позитивне (SP) тимоците. Процес је постепен, највећим делом се деша-

ва у медули, обухвата неколико фаза и траје различито, зависно од разних студија: од 3 до 5 дана, највише 12-16 дана. Успешно селекционисани тимоцити повећавају експресију CD3/TCR- $\alpha\beta$  комплекса, а смањују експресију CD4 или CD8 молекула. CD4<sup>+</sup>TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> тимоцити представљају хетерогену популацију тимоцита у односу на експресију CD8 молекула. Око 70% CD4<sup>+</sup>TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> ћелија је CD8<sup>+</sup> и HAS<sup>+</sup>. Ове ћелије су функционално незреле и за њихово потпуно sazревање неопходна је интактна микросредина тимуса. Остатак чине CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup>HSA<sup>+</sup> тимоцити, који највероватније представљају еквивалент периферних, наивних ("девичанских") CD4<sup>+</sup>T лимфоцита. Сличне популације су идентификоване и у оквиру CD8<sup>+</sup>TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> тимоцита, који представљају прекурсоре цитотоксичних Т лимфоцита. Зрели тимоцити испољавају "homing" молекул CD62L, напуштају тимус и постају саставни део популације циркулишућих Т лимфоцита. Само мали проценат (<10%) DP тимоцита, који успешно заврши процесе селекције пролази кроз терминалну фазу диферентовања. Тимоцити који не успеју да успешно преуреде TCR гене и испоље функционалне  $\alpha$  и  $\beta$  ланце TCR на мембрани, тимоцити који не буду позитивно селекционисани, као и потенцијално аутореактивни тимоцити који су негативно селекционисани, умиру у тимусу процесом апоптозе (40).

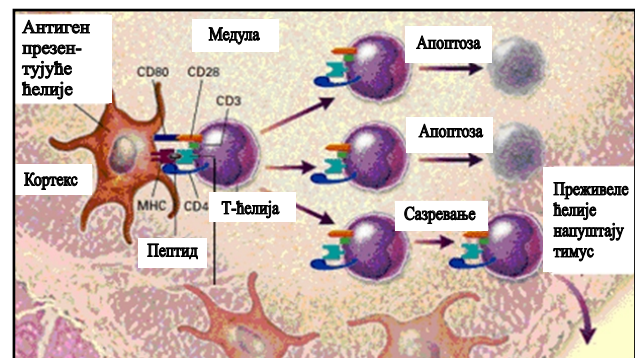
$\gamma\delta$  лимфоцити чине малу популацију Т лимфоцита. Најчешће насељавају кожу и слузокожу. Диферентују се у тимусу независно од  $\alpha\beta$  Т лимфоцита. Наиме, у једној субпопулацији TN тимоцита долази до преуређења гена најпре за гама, а затим за делта ланац TCR-а и формирања пре- $\gamma\delta$  Т лимфоцита. Тимоцити који испољавају CD3/TCR- $\gamma\delta$  рецепторски комплекс немају исполене CD44 и CD25 молекуле. Од њих, у даљем развоју, настају бар две субпопулације TCR- $\gamma\delta$  ћелија. Једна субпопулација, осим TCR комплекса испољава и NK.1 молекул (маркер NK ћелија) и претежно насељава епидермис и слузокожу репродуктивних органа. Друга субпопулација нема NK.1 молекул, а испољава CD8 ( $\alpha\alpha$  димер). Ове ћелије, углавном, насељавају интестинални епител (49).

#### Процеси селекције Т лимфоцита у тимусу

За формирање "репертоара" зрих Т лимфоцита, осим експресије TCR комплекса и корецепторских CD4 и CD8 молекула, кључни значај имају процеси селекције у тимусу. Ови процеси осигуравају преживљавање Т лимфоцита који испољавају тзв. "корисне" TCR-е, односно оне TCR-е који ће препознавати стране антигенске пептиде у асоцијацији са властитим MHC молекулима. Иако ћелијски и биохемијски механизми селекције нису довољно познати значајно је да се они не могу одвијати без експресије TCR, CD4 и CD8 молекула на тимоцитима, без присуства MHC молекула на APC-ама микросредине тимуса, односно без директних међућелијских контаката (50).

Позитивна селекција је процес који омогућава преживљавање и sazревање оних Т лимфоцита у тимусу чији TCR имају специфичност за комплекс антигенски пептид/властити MHC молекул и истовремену елими-

нацију Т лимфоцита који у тимусу не успеју да препознају ове комплексе (40). Позитивну селекцију Т лимфоцита могу вршити све APC-е тимуса (ћелије које испољавају MHC молекуле) али највише експерименталних података указује да кључну улогу у овом процесу имају кортикалне епителне ћелије, зато што имају велику густину експресије MHC молекула I и II класе у којима су везани сопствени антигенски пептиди и налазе се у блиском контакту са незрелим DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>+</sup>) тимоцитима. Према тзв. Стохастичкој теорији на прелазу тимоцита из DP у SP стадијум (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> или CDA-CD8<sup>-</sup>) долази до насумичног (стохастичког) смањења, а затим губитка експресије једног или другог корецепторског молекула што није повезано са специфичношћу TCR-а. По тзв. Инструктивној теорији, тек након успешног препознавања и везивања TCR/CD4 молекула за комплекс антигенски пептид/властити MHC молекул II класе, односно TCR/CD8 молекула за комплекс антигенски пептид/властити MHC молекул I класе, на DP тимоцитима долази до смањења, а затим и до губитка експресије другог "погрешног" корецепторског молекула. (40). Сматра се да је експресија активационог молекула CD69 први показатељ да су тимоцити почели позитивну селекцију али не мора бити маркер успешне позитивне селекције. При томе се већи значај придаје повећаној експресији TCR-а. Сматра се да су позитивно селекционисани они тимоцити који имају већу експресију TCR-а (SP око 3% DP тимоцита), која је слична експресији TCR-а на зрелим Т лимфоцитима. Као показатељ успешно завршене позитивне селекције користи се доказивање других маркера (губљење једног од корецепторских молекула) и тестови за испитивање ефекторских функција тимоцита (40).



Шема 1. - Процес селекције тимоцита у тимусу.

Негативна селекција је процес толеранције на сопствене антигене која се постиже делецијом или инактивацијом аутореактивних клонова Т лимфоцита у тимусу. Сматра се да негативна селекција путем клонске делеције (елиминације аутореактивних Т лимфоцита) има кључну улогу у индукцији ауто толеранције и спречавању аутоимуности. Претпоставља се да у томе кључну улогу имају TDC. Под одређеним условима делецију могу вршити и друге APC-е- као што су епителне ћелије, макрофаги и В-лимфоцити тимуса (38).

TDC конститутивно снажно испољавају МНС молекуле класе I и II, као и други костимулаторни (CD 80 и CD86) или адхезивни молекули (CD54). Основу делеције чини специфично везивање TCR-а за комплекс сопствени антигенски пептид/сопствени МНС молекул на APC. При томе међућелијске интеракције треба да буду довољно јаке да доведу до индукције апоптозе, потенцијално аутореактивног тимоцита. Овакав тип апоптозе тимоцита настаје као последица везивања (лигације) TCR-а и преноса активационих сигнала и према својим механизмима се разликује од апоптозе тимоцита који нису позитивно селекционисани (44,38). Други вид негативне селекције је клонска инактивација или анергија у чијој основи је да Т лимфоцит, реактиван са властитим антигенским пептидима, није одстрањен у тимусу, већ из њега излази и перзистира на периферији у неактивном стању, функционално неспособан да реагује на одговарајући аутоантиген. Верује се да клонску инактивацију врше епителне ћелије (вероватно више медуларне него кортикалне). Овај вид негативне селекције је вероватно последица одсуства или присуства недовољно јаких костимулаторних сигнала који би покренули процесе апоптозе (40,44). Претпоставља се да се негативна селекција може одвијати на свим ступњевима развоја DP тимоцита и ступњу SP тимоцита, пре позитивне селекције, истовремено са њом или после ње. Топографска локализација DC у КМЗ и медулу указује на то да ове ћелије врше негативну селекцију на каснијем ступњу развоја Т лимфоцита (38).

Финални стадијум развоја тимоцита почиње миграцијом ових ћелија у крвну или лимфну струју, где се губи CD38 антиген (48). Међу зрелим лимфоцитима преко 60% је CD4<sup>+</sup>, док је остатак CD8<sup>+</sup>, тако да је однос CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> приближно 2:1 (52). Само око 1% свих тимоцита напушта тимус сваког дана (у експерименталних животиња) путем крвних судова КМЗ I медуле. Овај скромни број повећава се пролиферацијом медуларних тимоцита, непосредно пре њиховог напуштања тимуса (42).



Слика 1. - Scanning електронско-микроскопски снимак лимфоцита.

### Улога директних међућелијских комуникација за развој Т лимфоцита

Познато је да се током развојног процеса Т-лимфоцита дешавају интеракције између тимоцита и стромалних ћелија (51). Они се остварују преко бројних рецептора који су испољени на тимоцитима са одговарајућим лигандима присутним на ћелијама микросредине тимуса или ванћелијском матриксу, али је прецизна улога појединих стромалних интеракција неразјашњена; чини се да је фибробластна компонента неопходна за рану транзицију тимоцита од CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (двоструко негативних-DN) до CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (двоструко позитивних-DP) ћелија, док се допринос стромалних ћелија у транзицији од DP до SP (једноструко позитивних- CD4<sup>+</sup> или CD4<sup>-</sup>) лимфоцита још увек тумачи. Предлаже се модел по коме би кортикални епител учествовао у позитивној селекцији (43, 44), док би макрофаги, дендритичне ћелије и медуларни епител у негативној селекцији (44).

### Улога цитокина у развоју Т лимфоцита

Показано је да у тимусу цитокине луче, како тимоцити (све субпопулације осим DP) тако и нелимфоидне ћелије. Профил продукованих цитокина је различит у адултном и феталном периоду, а механизми који контролишу њихову секрецију, односно експресију цитокинских рецептора нису довољно познати (39). IL-1 продукују претежно епителне ћелије и макрофаги. Утиче на пролиферацију појединих субпопулација раних TN тимоцита и прелаз TN у DP тимоците, као и на епителне ћелије и фибробласте у везивном ткиву да продукују IL-6. IL-6 и IL-1 делују синергистички на пролиферацију CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> тимоцита. Ефекат је потенциран у присуству IL-7. У тимусу, како у феталном тако и у адултном периоду, главни произвођач IL-2 су CD25<sup>+</sup>TN тимоцити. Они истовремено испољавају нискоафинитетни IL-2 рецептор (IL-2R) αCD25). Претпоставља се да IL-2 у комбинацији са другим цитокинима (IL-4<sup>+</sup>IL-10 или TNF-α утиче на пролиферацију ових ћелија. IL-2 секретују и активисани, зрели, медуларни тимоцити, и он за њих представља аутокрини фактор раста. IL-3 продукују нелимфоидне ћелије тимуса. Његова улога у развоју Т лимфоцита није довољно проучена, али се сматра да главно дејство остварује на нивоу најранијих плурипотентних CD4<sup>+</sup> прекурсора усмеравајући њихово диферентовање ка ћелијама Т ћелијске линије. IL-4 је веома моћан фактор раста различитих субпопулација тимоцита, а IL-6 стимулише пролиферацију обе субпопулације зрелих SP тимоцита. Пролиферативни одговор је интензивнији у присуству IL-2 и IL-4. IL-6 је вероватно и аутокрини фактор раста других ћелија (епителне ћелије, ћелије моноцитно-макрофагног система и др.). IL-7 продукују тимусне епителне ћелије. Он је критичан фактор за развој TN тимоцита (39). Делује синергистички са SFC-ом (енгл. Stem cell factor) и задржава TN тимоците на ступњу развоја који претходи оном на којем долази до преуређења гена за β или γ ланац TCR-а. Такође, у комбинацији са IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, поспешују пролиферацију SP тимоцита. IL-9 продукују Т лимфоцити чија фенотипска својства нису довољно проучена. Показано је да IL-9 убрзава раст феталних ти-

моцита стимулираних IL-2. IL-10 вероватно продукују нелимфоидне ћелије тимуса. Утичу на пролиферацију свих субпопулација тимоцита и њихових прекурсора, са изузетком ћелија на DP ступњу развоја. IL-12 стварају тимусне епителне ћелије и CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> TN ћелија. Он је и фактор раста ове субпопулације тимоцита који је потенциран у присуству SCF-а. Такође фаворизује раст CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> тимоцита и инхибира прелаз TH у DP тимоците. INF- $\gamma$  продукују све субпопулације тимоцита, осим DP. Међутим, продукција је најинтензивнија на нивоу CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>TN тимоцита. Основна функција овог цитокина у тимусу је стимулација и одржавање експресије МНС молекула I и II класе на ћелијама микросредине тимуса. SCF продукују тимусне нелимфоидне ћелије. Овај цитокин делује пролиферативно на развој најранијих тимоцитних прекурсора и субпопулација TN тимоцита. Овај фактор своје деловање остварује преко специфичног рецептора (CD117) који је испољен на овим ћелијама. Делује синергистички са IL-7 и IL-12. TNF- $\alpha$  продукују бројне ћелије тимуса. У садејству са TGF- $\beta$  индукује експресију CD8 молекула на CD25<sup>+</sup>TN тимоцитима, што је од значаја за диферентовање ових ћелија у DP тимоците. Такође TNF- $\alpha$ , у садејству са IL-2, стимулише пролиферацију зрелих SP тимоцита. LIF (леукемијски инхибиторни фактор), M-CSF, GM-CSF, IFN- $\alpha$  и IL-13 продукују, са изузетком IL-13, тимусне нелимфоидне ћелије. Механизми њиховог деловања на лимфоците нису добро проучени (39).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abbas A.K., Lichtman A.H.: *Bassie Immunology*. Elsevier Inc., New York, 2006.
2. Weiss L.: *Cell and Tissue Biology. A Text Book of Histology*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 1988.
3. Ross M.H., Kaye G.L., Pawlina W.: *Histology - a Text and Atlas*. Ed: Lippincott Williams and Wilkins. A Wolters Kluwer co. Philadelphia-Baltimore-New York-London-Buenos Aires- Hong Kong-Sydney-Tokyo, 2003.
4. Weis A.: Structure and function of the T cell antigen receptor. *J Clin Invest*. 1990; 86: 1015.
5. Gaudecker B.: Functional histology of the human thymus. *Anat Embriol*. 1991; 183: 1-15.
6. Lind E.F., Prockop S.E., Porritt H.E., Petrie H.T.: Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*. 2001; 194:127-34.
7. Witt C.M., Robey E.A.: The ins and outs of CCR7 in the thymus. *J Exp Med*. 2004; 200: 405409.
8. Knapp W., Rieber P., Dorken B., Schmidt R.E., Stein H., Borner A.E.G.: *Immunol Today*. 1989; 10: 253-258.
9. Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Leveu R.H., Schlossman S.F.: Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukaemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1980; 77: 1588-1592.
10. Nikolić-Žugić J.: T cell development: Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of alpha-beta T-cells. *Immunol Today*. 1991; 12: 65-70.
11. Sprent J., Lo D., Gao E.K., Ron J.: T-cell selection in the thymus. *Immunol Rev*. 1988; 101: 173-190.
12. Ritter M.A., Crispe I.N.: *The thymus (In Focus)*. Oxford University Press. 1992.
13. Fontaine-Perus J.C., Culman F.M., Kaplan C., Le Douarin N.M.: Seeding of the 10-day mouse embryo thymic rudiment by lymphocyte precursors in vitro. *J Immunol*. 1981; 126: 2310-2316.
14. Donskoy E., Foss D., Goldschneider I.: Gated importation of prothymocytes by adult mouse thymus is coordinated with their periodic mobilization from bone marrow. *J Immunol*. 2003; 171: 35683575.
15. Foss D.L., Donskoy E., Goldschneider I.: The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med*. 2001; 193:36574.
16. Perry S.S., Wang H., Pierce L.J., Yang A.M., Tsai S., Spangrude G.J.: L selectin defines a bone marrow analog to the thymic early T-lineage progenitor. *Blood*. 2004; 103:2990-6.
17. Spits H.: Early stages in human and mouse T-cell development. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6:212-21.
18. Tjonnfjord G.E., Steen R., Veiby O.P., Morkrid L., Egeland T.: Haemopoietic progenitor cell differentiation: flow cytometric assessment in bone marrow and thymus. *Br J Haematol*. 1995; 91:1006-16.
19. Kondo M., Weissman I.L., Akashi K.: Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997; 91:661-672.
20. Lancrin C., Schneider E., Lambalez F., Arcangeli M.L., Garcia-Cordier C., Rocha B.: Major T cell progenitor activity in bone marrow-derived spleen colonies. *J Exp Med*. 2002; 195:919-29.
21. Martin C.H., Aifantis I., Scimone M.L., von Andrian U.H., Reizis B., von Boehmer H., et al.: Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol*. 2003; 4:866-73.
22. Kendall M.D.: Functional anatomy of the thymus microenvironment. *J Anat*. 1991; 177: 1-29.
23. Normant A.M., Bevan M.J.: Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol*. 2000; 12: 445-455.
24. Bowman E.P., Campbell J.J., Soler D., Dong Z., Manlongat N., Picarella D. et al.: Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J Exp Med*. 2000; 191:1303-1318.
25. Bleul C.C., Boehm T.: Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 3371-3379.
26. Campbell J.J., Pan J. and Butcher E.C.: Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J Immunol*. 1999; 163: 2353-2357.
27. Kim C.H., Pelus L.M., White J.R., Broxmeyer H.E.: Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood*. 1998; 91:4434-4443.
28. Carramolino L., Zaballos A., Kremer L., Villares R., Martin P., Ardavin C., et al.: Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood*. 2000; 97: 850-857.
29. Suzuki G., Nakata Y., Dan Y., Uzawa A., Nakagawa K., Saito T., et al.: Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int Immunol*. 1998; 10: 1049-1056.
30. Uehara S., Grinberg A., Farber J.M., Love P.E.: A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol*. 2002; 168: 2811-2819.
31. Plotkin J., Prockop S.E., Lepique A., Petrie H.T.: Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol*. 2003; 171: 4521-7.
32. Delon J., Stoll S., Germain R.N.: Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue. *Immunol Rev*. 2002; 189:51-63.

33. Cereding R., Schreyer M.: Immunohistological location of host and donor derived cells in the regenerating thymus of radiation bone marrow chimeras. *Thymus*. 1984; 6: 15-26.
34. Shimonaka M., Katagiri K., Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, et al.: Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol*. 2003; 161:417-27.
35. Porritt H.E., Gordon K., Petrie H.T.: Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med*. 2003; 198:957-62.
36. Porritt H.E, Rumpfelt L.L., Tabrizifard S., Schmitt T.M., Zuniga-Pflucker J.C., Petrie H.T.: Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity*. 2004; 20:735-45
37. Lind E.F., Prockop S.E., Porritt H.E., Petrie H.T. : Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*. 2001; 194:127-34.
38. Ardavin C.: Thymic dendritic cells. *Immunol Today*. 1997; 18: 350-361.
39. Zlotnik A., Kelner S.G.: Cytokines in the adult Thymus. U: Nikolić-Žugić J. (ured) *Intrathymic T-cell development*. R.G. Landes Company, Austin. 1994; 65-75.
40. Nikolić-Žugić J.: Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of TCR  $\alpha\beta$  thymocytes. U: Nikolić-Žugić J. (ured.). *Intrathymic T-cell development*. R.G. Landes Company, Austin, 1994; 28-45.
41. Nikolić-Žugić J.: T cell development: Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of alpha-beta T-cells. *Immunol. Today*. 1991;12:65-70.
42. Milićević Ž., Milićević N.: *Histologija limfatični organi*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2000.
43. Hugo P., Kappler J. W., Goldfrey D.I., Marack P.C.: Acell line can induce thymocyte positive selection. *Nature*. 1992; 360: 679-681.
44. Vukmanović S: The molecular jury: deciding whether immature thymocytes should live or die. *J. Exp. Med*.1996; 184: 305-309.
45. Nikolić P.I., Rančić G., Radenković G., Lačković V., Todosrović V., Mitić D.: *Embriologija čoveka*. Medicinski fakultet, Niš, 2004.
46. Lepique A.P., Palencia S., Irjala H., Petrie H.T.: Characterization of vascular adhesion molecules that may facilitate progenitor homing in the post-natal mouse thymus. *Clin Dev Immunol*. 2003; 10:27-33.
47. Witt C.M., Robey E.A.: The ins and outs of CCR7 in the thymus. *J Exp Med*. 2004; 200: 405-409.
48. Rubin E., Farber J.L.: *Pathology*. Ed: J.B. Lippincott Co. Philadelphia, 1994.
49. Haas W., Pereira P., Tonegawa S.: Gamma/delta cells. *Ann Rev Immunol*.1993; 11: 637-686.
50. Blackman M., Kappler J., Marrack P.: The role of the T-cell receptor in positive and negative selection of developing T-cells. *Science*. 1990; 248: 1335-1341.
51. Ritter M.A., Boyd R.L.: Development in the thymus: it takes two tango. *Immunol. Today*. 1993; 14:462-469.
52. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L.: *Robbins: Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders Company. Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, 1994.