

Article Arrival Date

28.07.2021

Article Type

Research Article

Article Published Date

20.09.2021

Doi Number: <http://dx.doi.org/10.38063/ejons.460>**SIÇANLARDA YAŞLANMAYA BAĞLI CD4⁺T, CD8⁺T LENFOSİTLERİN****DEĞİŞİMİNİN FLOW SİTOMETRİ İLE İNCELENMESİ****FLOW CYTOMETRIC EVALUATION OF AGE-RELATED CHANGES OF CD4⁺T AND CD8⁺T LYMPHOCYTES IN RATS****Nuray GÜREL-POLAT**

Dr., Koç Üniversitesi , Koç Üniversitesi Hastanesi, Klinik Laboratuvar, İmmünoloji ve Alerji Tanı Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye,
Orcid: 0000-0002-5513-575X

Aydın ÇEVİK

Dr. Öğretim Üyesi, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Orcid: 0000-0001-9321-9818

ÖZET

Yaşlanma, çeşitli vücut fonksiyonlarının azalması ve yeniden şekillenmesi ile seyreden bir süreçtir. İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen farklı yaşlardaki *Wistar albino sıçanlar* kullanılmıştır. İki gruba ayrılan *Wistar albino sıçanlar*, Grup I; 2,5–18 aylık genç erişkinler ve erişkinler (n=16) ve grup II; 19-30 aylık yaşlı sıçanlardan (n=13) oluşmaktadır. Lenfosit alt gruplarının tayini için kan alımından sonra hücreler CD8⁺FITC ve CD4⁺FITC işaretli monoklonal antikolar ile boyanmıştır. Hazırlık aşamasından sonra Flow sitometri analizi yapılmıştır. İstatistiksel analiz de, genç ve yaşlı gruplardaki hücrelerin değerlendirilmesi Kolmogorov- Smirnov testi ile yapılmıştır. Gruplar arasında bağımsız sample test kullanılmıştır. Analiz sonucunda p< 0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir. Genç sıçanların CD4/CD8 oranı ise 1,6±0,5 olmasına karşılık, yaşlı sıçanlarda bu oran 3,1±1 olarak bulunmuştur. Genç grupta CD4⁺ ve CD8⁺ hücreleri arasında ters yönde (r =-0,898) korelasyon gözlenmiştir (p<0,0001). Yaşlı grupta CD4⁺T hücreleri ile CD4/CD8 arasında doğru (r=0,620) yönde korelasyon gösterilmiştir (p<0,024). CD8⁺T hücreleri ile CD4/CD8 arasında ise ters yönde (r=-0,876) korelasyon saptanmıştır (p<0,0001). İmmün yaşlanma, immün sistem fonksiyonlarının yaşa bağlı olarak azalmasıdır, hem B hem de T hücrelerinde belirgin değişiklikler meydana gelir. Bu çalışmada, immün sistem hücrelerinde yaşa bağlı değişiklikler deneysel olarak gösterilmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Yaşlanma, CD4⁺ T lenfositleri, CD8⁺ T lenfositleri, flow sitometri

ABSTRACT

Aging is a process that progresses with the reduction and remodeling of various bodily functions. *Wistar albino rats* of different ages bred in Istanbul University Aziz Sancar Experimental Medicine Research Institute were used. *Wistar albino rats* divided into two groups consist of Group I; young adults aged 2.5-18 months and adults (n=16) and Group II; 19-30 months old rats (n=13). After blood collection for the determination of lymphocyte subgroups, cells were stained with CD8⁺FITC and CD4⁺ FITC labeled monoclonal antibodies. Flow cytometry analysis was adhered to after the preparatory phase. In the statistical analysis, the evaluation of the cells in the young and old groups was made with the Kolmogorov-

Smirnov test. Independent sample testing was used between groups. As a result of the analysis, $p < 0.05$ was accepted as significant. While the CD4/CD8 ratio of young rats was 1.6 ± 0.5 , this ratio was found to be 3.1 ± 1 in old rats. An inverse correlation ($r = -0.898$) was observed between CD4⁺ and CD8⁺ cells in the young group ($p > 0.0001$). A direct correlation ($r = 0.620$) was shown between CD4⁺ T cells and CD4/CD8 in the elderly group ($p < 0.024$). There was an inverse correlation ($r = -0.876$) between CD8⁺ T cells and CD4/CD8 ($p < 0.0001$). Immune aging is the age-related decline of immune system functions, significant changes occur in both B and T cells. In this study, age-related changes in immune system cells were tried to be demonstrated experimentally.

Keywords: Immunosenescence, CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, flow cytometry

GİRİŞ

Yaşlanma süreci ilerledikçe canlıların çeşitli sistemlerinde değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Değişime uğrayan sistemlerden birisi de immün sistem organ ve fonksiyonlarıdır. İmmün yaşlanma çoklu organ değişiklikleri içeren, immünitinin yaşa bağlı olarak azalmasıdır (Malaguarnera., et al., 2001; Pawelec., et al 1997). Yaşa bağlı olarak gelişen immün sistem değişiklikleri kanser (Hakim et al., 2004), enfeksiyon (Pawelec, et al., 2004) ve otoimmün hastalıkların (Prelog., 2006) daha sık ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Telomeraz aktivitesi ve telomeraz uzunluğu hücre replikasyonunun kontrolünde rol oynayan önemli faktörlerdir. Telomeraz kısalığı yaşlanma ile hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücreleri ve B hücrelerinde de gözlenir (Tarazona, et al., 2002). Yaşlanmaya bağlı değişikliklerin mekanizmaları çeşitli yönleriyle araştırılmaya çalışılmaktadır. Biz de çalışmamızda bu noktadan yola çıkarak deneysel olarak yaşlanma ile CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri ilişkisini flow sitometri analizi ile saptamayı planladık.

MATERYAL VE METOD:

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen farklı yaşlardaki Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. *Wistar albino sıçanlar* iki gruba ayrılmıştır: Grup I; 2,5 –18 aylık genç erişkinler ve erişkinler ($n=16$) ve grup II; 19-30 aylık yaşlı sıçanlardan ($n=13$) oluşmaktadır. Hayvanların normal oda ısısında ($21^{\circ} \pm 2^{\circ} C$) ve 12 saatlik gece- gündüz döngüsü altında yaşamlarını sürdürmelerine dikkat edilmiştir.

İmmünolojik analiz: Tüm hayvanların kalbine girilerek sabah 09.00-10.00 saatleri arasında kanları alınmıştır. Lenfosit alt gruplarının tayini için mouse anti-rat CD8 FITC (MCA 48F, Serotec) ve mouse anti-rat CD4 FITC (MCA 55F, Serotec) işaretli monoklonal antikorlar kullanılmıştır. Tüplere 100 µl heparinli kan konulup üzerine uygun antikor eklenmiştir. 45 dakika $+4^{\circ}C$ 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler Q-prep (Coulter Electronics, ABD) aletinden geçirilmiştir. $+4^{\circ}C$ santirifüjde 2000 rpm'de 20 dakika yıkama işleminden sonra hücreler %1 paraformaldehitli PBS ile fikse edilerek analize hazırlanmıştır. Hücre otofloresanını ayarlamak için, ayrı tüplere sadece hücreler konularak negatif kontrol ayarı yapılmıştır. Lenfosit bölgesi elektronik kapı alınarak diğer lökosit hücrelerinden ayrılmıştır (Şekil 1). Flow sitometri analizi, Epics Profile II (Coulter Electronics, ABD) ile yapılmıştır.

Mikrobiyolojik analiz: Hayvanlarda bir enfeksiyona bağlı immünolojik değişim olma olasılığını ortadan kaldırmak için steril koşullarda alınan 1 ml kan 10 ml Triptik soy buyyon (Lab M) içeren besiyerine ekilerek $35^{\circ}C$ 'de 14 gün bekletilmiştir. Daha sonra Triptik soy agar ile hazırlanan %5 koyun kanlı jeloz besiyerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 48 saat $35^{\circ}C$ 'de aerop koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında petrielerde üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir. Tüm hayvanların kan kültürleri, aerop bakteri yönünden steril kalmıştır.

İstatistiksel analiz: Genç ve yaşlı gruplardaki hücrelerin değerlendirilmesi Kolmogorov-Smirnov testi ile yapılmıştır. Gruplar arasında bağımsız sample test kullanılmıştır. Analiz sonucunda $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Flow sitometri incelemesi sonucunda, genç sıçanların CD4 T hücreleri ortalaması $47,3 \pm 6$, CD8 T hücreleri ortalaması ise $31,3 \pm 7$ olarak saptanmıştır. CD4/CD8 oranı ise $1,6 \pm 0,5$ 'dir. Genç grupta CD4 ve CD8 hücreleri arasında ters yönde ($r = -0,898$) korelasyon gözlenmiştir ($p < 0,0001$). Yaşlı sıçanlarda ise, CD4 T hücre ortalaması $58,1 \pm 7$, CD8 T hücre ortalaması ise $20,2 \pm 6$ olarak saptanmış, fakat CD4/CD8 oranı $3,1 \pm 1$ olarak bulunmuştur. Yaşlı grupta CD4 T hücreleri ile CD4/CD8 arasında doğru ($r = 0,620$) yönde korelasyon gösterilmiştir ($p < 0,024$). CD8 T hücreleri ile CD4/CD8 arasında ise ters yönde ($r = -0,876$) korelasyon saptanmıştır ($p < 0,0001$) (Tablo 1).

TARTIŞMA

Yaşlanma süreci, hücrel ve sıvısal immünolojik fonksiyonları kapsayan ve tüm organların morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğünü içeren kompleks bir fenomendir. Temel değişiklikleri şöyle listelenebilir; a) lenfoid öncü T ve B hücrelerinin azalan sayıda sonuçlanan timik gerilemesi, b) T hücrelerinin azalmış çoğalma kapasitesi; telomerazın kısılmasının bir sonucu olarak lenfosit alt gruplarının kaybı, c) ekzojen antijenlere azalan cevap ile B lenfositlerinin yetersizliği, d) hem direkt olarak kemotaktik ve fagositik yanıtın baskılanması hem de indirekt olarak T hücrelerinin çoğalmasının baskılanması ve prostaglandinlerin artması ile yardımcı hücreleri tehlikeye sokan aktivite, e) çeşitli sitokinlerin üretimi ve sekresyonundaki değişiklikler, f) genel fizyolojik şartlar gibi diğer faktörler, ör. beslenme durumu, psikolojik alışkanlıklar ve çeşitli hormon düzeyleridir (Malaguarnera., et al., 2001; Pawelec., et al., 2008).

Yaşlılarda lenfositlerinde CD8⁺ artışı ve CD19⁺ hücrelerin azalışı sonucu azalmış proliferatif kapasite gözlenir (Romanyukha., et al., 2004). Yaşlı kişilerde enfeksiyonun teşhisi sıklıkla zordur ve antimikrobiyal stratejiler bu hasta popülasyonunda değişmiştir (Ginaldi., et al., 2001). Yaşlılarda enfeksiyon problemi spesifik olmayan işaretler ve semptomlar ile sıklıkla mevcuttur ve enfeksiyonun odak noktası genellikle belirsizdir veya altta yatan kronik şartlar ile ilişkilidir (Kinsey., et al., 2008). Chen ve ark., 2014, farelerde *Pseudomonas aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada yaşa bağlı immün fonksiyon bozuklukları olduğunu göstermişlerdir. Bakteri enjeksiyonu ile oluşturulan intrakraniyal enfeksiyonu incelemek için akciğer patolojisi, kemokin seviyesi ve nötrofil sayılarını araştırmış ve yaşlı farelerde kemokin seviyesinin artmasına rağmen akciğerlere nötrofil göçünün azaldığını saptamışlardır. Goldman ve ark., 2010, *Streptococcus pyogenes* enfeksiyonunun riskini değerlendirmek üzere genç ve yaşlı farelerde subkutan ve intravenöz bakteri inoküle etmiş ve farelerin immün sistemini inceledikleri çalışmaları sonucunda doku makrofajlarında yaşa bağlı azalma olduğunu göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda enfeksiyon riskini gözlemek üzere mikrobiyolojik analiz sonucunda sterilite sonrasında immünolojik olarak hücrelerdeki sayısal değişimi araştırdık. Spontan olarak yaşanan sıçanlardaki hücrelerin normal döngüleri gereği değişime uğradıklarını gözlemledik.

İmmün sistemde yaşlanma hem sıvısal hem de hücrel immüniteyi kapsar. Yaşlanmadan dolayı sıvısal immünitede; serum immünglobülin düzeylerinde artış (özellikle IgA ve IgG), total B lenfositleri sayısında azalma, organ spesifik antikorlarda azalma, organ spesifik olmayan antikorlarda artış ve yüksek afinite koruyucu antikor cevabında azalma gibi değişiklikler saptanmaktadır (Ginaldi., et al., 2001). Bu sonuçlara göre sıçanların yaşı ilerledikçe CD4/CD8 oranları artmaktadır. Olayın nedenlerine inilebilmesi için CD4 ve CD8 alt gruplarının tayin edilerek sayısal değişimin nedenleri çözümlenmelidir.

Sharma ve ark., 2014, hücrel ve sıvısal immün yanıtı araştırdıkları ve 4, 8, 12 ve 16 aylık farelerde yaptıkları çalışmada hücrel immün yanıt ve kronik enflamasyonda azalma ile birlikte sıvısal immün yanıtta kötüleşme olduğunu göstermişlerdir.

Sıçanlarda yapılan barsak ilişkili lenfoid dokular ve dalaktan izole edilen CD4⁺T hücrelerinin flow sitometrik analizinde, CD4⁺T hücre alt gruplarında yaşa bağlı olarak azalma saptanmıştır (Flo. ve Mossouh., 1997).

Daha sonraki yıllarda sıçanların lenf düğümleri, timus ve periferik kan örneklerinde yapılan flow sitometrik çalışmada ise CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerin alt grupları araştırılmış ve hücre alt gruplarının bazılarında artış, bazılarında ise düşüş gözlenmiştir (Capri., et al., 2000). Yaptığımız çalışma sonucunda CD8⁺ T hücrelerinin yaşlı grupta sayısal değerinin azaldığını saptanmıştır. Benzer bir çalışmanın periferik lenfositlerdeki gibi diğer organ yerleşimli lenfositlerde de yapılabileceği öngörülmektedir.

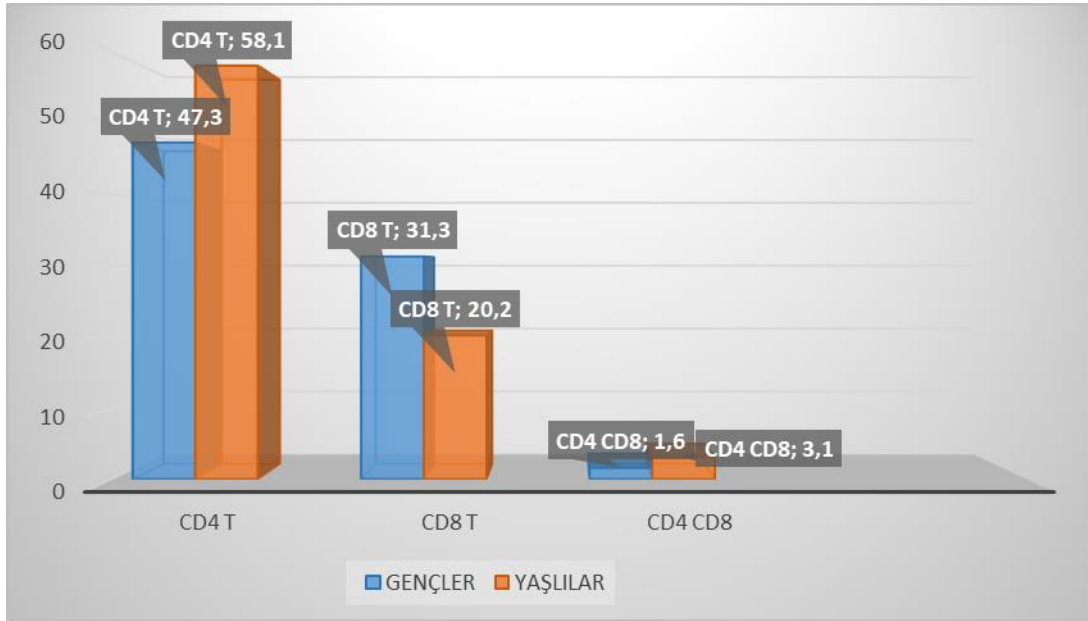
Yaşlılık süresince diyet uygulamasında kullanılan yağların (Quiles., et al., 2004), diyete eklenen folatın (Field., et al., 2006) ve yaşanan stresin (Pahlavanı. ve Harris., 1998) immün sistem fonksiyonları üzerine ciddi etkileri olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Yaşlılık döneminde alınan besinler ile yaşanan stresin bu dönemde etkili olduğu saptanmıştır.

Çalışmamız ülkemizde de laboratuvarımızın sahip olduğu olanakları kullanarak kapsamlı araştırmalar yapılabileceğini göstermiştir.

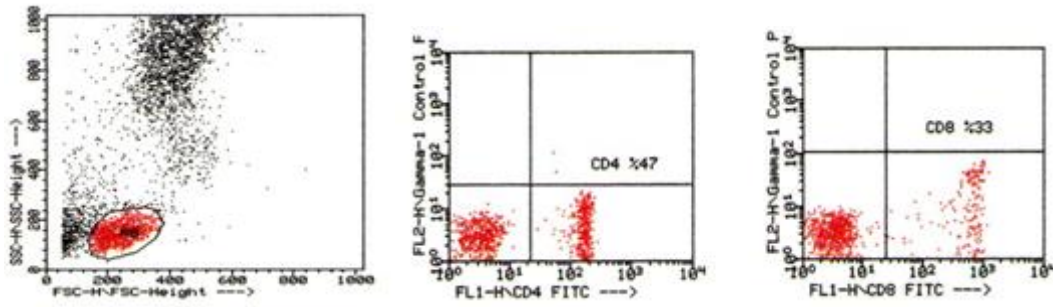
KAYNAKLAR

- Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A (2001). Immunosenescence: a review. Arch Gerontol Geriatr. 32: 1-14.
- Pawelec G, Solana R (1997). Immunosenescence. Immunol. Today 18(11): 515-6.
- Hakim FT, Flomerfelt FA, Boyiadzis M, Gress RE (2004). Aging, immunity and cancer. Curr. Opinion in Immunol. 16:151-156.
- Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Effros R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A (2004). Is immunosenescence infectious? Trends in Immunology. 25(8) : 406-410.
- Prelog M (2006). Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity? Autoimmunity Reviews. 5: 136-139.
- Tarazona R, Solana R, Ouyang Q, Pawelec G (2002). Basic biology and clinical impact of immunosenescence. Experimental Gerontol. 37: 183-189.
- Pawelec G, Larbi A(2008). Immunity and ageing in man: Annual review 2006/2007 Experimental Gerontology. 43: 34-38.
- Romanyukha AA, Yashin AI (2004). Age related changes in population of peripheral T cells: towards a model of immunosenescence. Mechanisms of Ageing and Development. 124: 433-443.
- Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis M (2001). Immunosenescence and infectious diseases. Microbes Infect. 3: 851-857.
- Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JF, Padgett DA (2008). The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. Physiology & Behavior. 93: 628-636.
- Chen MM, Palmer JL, Plackett TP, Deburghraeve CR, Kovacs EJ (2014). Age-related differences in the neutrophil response to pulmonary pseudomonas infection. Exp. Gerontol. 54: 42-6.
- Goldmann O, Lehne S, Medina E (2010). Age-related susceptibility to Streptococcus pyogenes infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity. J Pathol. 220: 521-529.
- Sharma R, Kapila R, Haq MR, Salingati V, Kapasiya M, Kapila S (2014). Age-associated aberrations in mouse cellular and humoral immune responses. Aging Clin Exp Res. 26(4): 353-62.
- Flo J, Mossouh E(1997). Age-related changes of naive and memory CD4 rat

- lymphocyte subsets in mucosal and systemic lymphoid organs. *Developmental & Comparative Immunol.* 21(5): 443-453.
- Capri M, Quaglino D, Verzella G, Monti D, Boratè M, Cossarizza A, Troiano L, Zecca L, Pasquali-Ronchetti I, Franceschi C (2000). A cytofluorimetric study of T lymphocyte subsets in rat lymphoid tissues (thymus, lymph nodes) and peripheral blood: a continuous remodelling during the first year of life. *Experimental Gerontology.* 35: 613-625.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa C, Battlno M, Huertas JR, Martin Y, Mataix J. (2004) Dietary fat type (virgin olive vs. sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology.* 39: 1189-1198.
- Field CJ, Van Aerde A, Drager KL, Goruk S, Basu T (2006). Dietary folate improves age-related decreases in lymphocyte function. *J Nutritional Biochemistry.* 7: 37-44.
- Pahlavan MA, Harris MD (1998). Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on T cell function in young and old rats. *Free Radic Biol Med.* 25(8): 903-913.



Tablo 1: Grupların CD4+ T lenfosit ve CD8+ T lenfosit değerleri.



Şekil 1: CD4⁺ ve CD 8⁺ T lenfositlerinin flow sitometri analiz görüntüleri.