

TAVUKLARIN PERİFER KAN T LENFOSİTLERİ ÜZERİNDE HİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Reşat Nuri Aştı*

Nevin Kurtdede**

Asuman Özen***

Histochemical studies on chicken peripheral blood T lymphocytes

Summary: *The purpose of this study was to determine the percentage of the peripheral blood T lymphocytes and the localization of ANAE enzyme at the electron microscopic level in adult hens by using alpha-naphtyl acetate esterase procedure.*

Blood samples were obtained from 30 adult Leghorn breed hens.

The percentage of the ANAE positive lymphocytes were 56,4 %. It has been demonstrated that pseudoeosinophil and eosinophil granulocytes showed a granular positivity.

In the electron microscopic examination, ANAE positive reaction were seen in lisosomal granules found in lymphocytes, pseudoeosinophil and eosinophil granulocytes.

Özet: *Bu çalışma, ANAE enzim boyaması ile erişkin tavukların perifer kan T lenfosit oranlarının saptanması ve enzimin ince yapı düzeyindeki lokalizasyonunun tespiti amacıyla yapıldı.*

Çalışmada, Leghorn ırkından 30 adet erişkin tavuğun kan örnekleri materyal olarak kullanıldı.

ANAE boyamasında lenfositlerin %56.4'ünün pozitif reaksiyon verdiği saptandı. Psödoeozinofil ve eozinofil granulositlerin granüler pozitivite gösterdikleri tespit edildi.

Elektron mikroskopu ile yapılan incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif reaksiyona lenfosit, psödoeozinofil ve eozinofil granulositlerde bulunan lizozomal granüllerin içinde rastlandı.

Giriş

Perifer kan lenfositleri, immunolojik özelliklerine göre T ve B lenfositleri olarak sınıflandırılır (1,4). Bu lenfosit tipleri, sağlıklı bir canlının perifer kanında belirli oranlarda bulunurken, bazı proliferatif hastalıklarda bu oranlarda önemli sapmalar şekillenmektedir (1, 4, 6, 12).

T lenfositlerini E rozet, B lenfositlerini EAC rozet tekniği ile ayırdetmek mümkünse de, bu yöntemler pahalı olup, uzun zaman almakta ve doku kesitlerine uygulanamamaktadır (4). Bu nedenlerle, araştırmacılar (5, 6, 8, 13) enzimler üzerinde çalışmaya yönelmişlerdir. Baş-

langıçta, lizozomal enzimlerden olan asit fosfataz üzerinde durulmuş; ancak, bu enzimin T ve B lenfositlerinde bulunduğu saptanmasından sonra lenfosit tiplerini ayırt etmede kullanılamayacağı anlaşılmıştır (3). Son yıllarda, alfa naftil asetat esteraz (ANAE)'ın T lenfositlerinde bulunduğu, B lenfositlerinde ise bulunmadığı çeşitli araştırmacılar (2, 5, 8, 14, 19) tarafından bildirilmiştir. ANAE pozitif reaksiyonun T hücrelerinde 1-2 adet lokalize granüler, makrofajlarda ise diffuz boyanma şeklinde gözleendiği, B lenfositlerinin ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon verdiği araştırmacılar (2, 5, 6, 8, 13) tarafından ileri sürülmüştür. ANAE boyama metodu ile perifer kan T lenfosit oranı insanda

* Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*** Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

%60 (14), sığırdada %64.2 (19), kanatlıda %56 (11) olarak bulunmuştur.

ANAE enziminin ince yapı düzeyindeki yerleşimi üzerinde memelilerde yapılan çalışma (20) oldukça azdır, kanatlılarda ise bu konuda yapılan araştırmaya rastlanılamamıştır. Zicca ve ark. (20) insan T lenfositleri üzerinde yaptıkları elektron mikroskopik çalışmada ANAE enziminin lizozomların membranında bulunduğu, lizozomların içinde ise rastlanılmadığından bahsetmektedirler.

Bu çalışmada, ANAE enzimi demonstrasyonu, tavukların perifer kan T lenfosit oranının belirlenmesi ve ANAE enziminin ince yapı düzeyindeki yerleşiminin saptanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak Leghorn ırkından 30 adet erişkin tavuktan alınan heparinize kan örnekleri kullanıldı.

Alınan kan örneklerinden, alfa naftil asetat esteraz enzimi (ANAE) demonstrasyonu için frotiler hazırlanarak havada kurutuldu ve ANAE enzim boyaması (11) uygulanarak ışık mikroskopunda incelendi.

ANAE boyama metoduyla hazırlanan her ışık mikroskopik preparattaki üç değişik alanda yüzlerden üç yüz lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları saptandı.

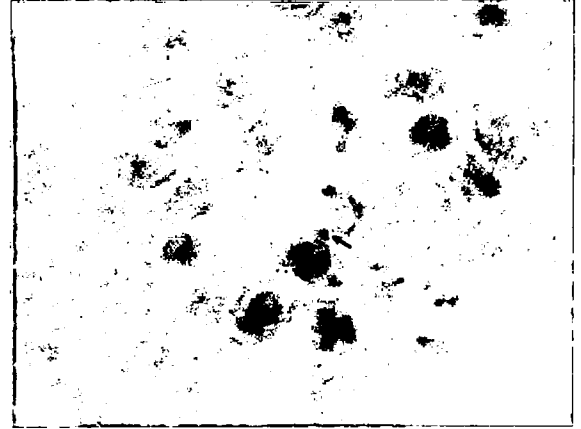
İnce yapıya yönelik araştırmalar için 10 hayvandan alınan heparinize kan örneklerinin yarısı, lenfosit izolasyonu yapıldıktan sonra Karnovsky (7) yöntemine göre glutaraldehid paraformaldehid tespit sıvısı ile tespit edildi. Parçalar, %1'lik ozmik asitte iki saat süreyle tespit edildikten sonra, Araldit M'de blokladı. İnce kesitler Reynolds (18) yöntemiyle boyanarak Carl Zeiss EM 9 S-2 model elektron mikroskopunda incelendi.

Heparinize kan örneklerinin diğer yarısı ise, alfa naftil asetat esteraz enzimini (20) elektron mikroskopunda göstermek için kullanıldı. Lenfosit izolasyonundan sonra glutaraldehidaseton ile tespit yapıldı ve süspansiyon içinde alfa naftil asetat esteraz enzim boyaması 21 saat süreyle uygulandı; yukarıda anlatılan tekniğe göre elektron mikroskoba hazırlandı. Ancak, bu örneklerde ozmik asit tespiti uygulanmadığı gibi ince kesitlere kurşun sitrat boyaması da yapılmadı.

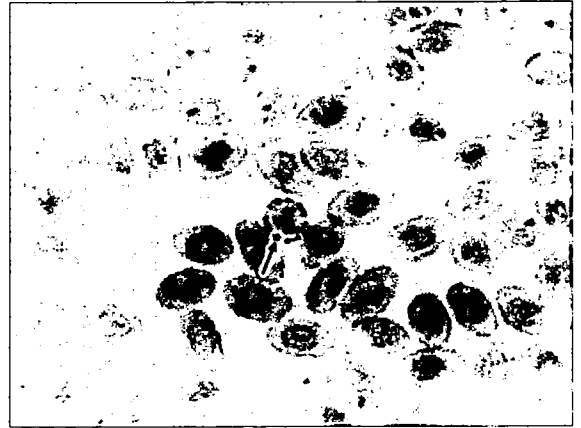
Bulgular

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğunda sayıları 1-2 arasında

spesifik granüller gözlemlendi (Şekil 1 ok). Bazı lenfositlerde granül sayısının daha fazla (1-8 adet) olduğu dikkati çekti (Şekil 2 ok). Psödo-eozinofil ve eozinofil granulositlerde de pozitive tespit edildi. Trombositlerde ise pozitif reaksiyon gözlenmedi.



Şekil 1. Erişkin tavukta ANAE boyaması. Ok: T lenfositinde ANAE pozitif granül. ANAE.x 1500.
Figure 1. ANAE staining in adult hen. Arrow: ANAE positive granule in T lymphocyte. ANAE.x1500.



Şekil 2. Erişkin tavukta ANAE boyaması. Ok: T lenfositinde ANAE pozitif granüller. ANAE.x1100.
Figure 2. ANAE staining in adult hen. Arrow: ANAE positive granules in T lymphocyte. ANAE.x1100.

ANAE boyaması sonuçları tablo 1'de verilmiştir. ANAE pozitif lenfosit oranının %56.4, ANAE negatif lenfosit oranının ise %43.6 olduğu saptandı.

Tablo 1. Tavukların Perifer Kan Lenfositlerinde ANAE Boyaması

Table 1. ANAE Staining in Peripheral Blood Lymphocytes in Hens

Hayvan sayısı	Lenfosit (%)	
	ANAE ⁺	ANAE ⁻
30	56.4	43.6

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı lenfositler (Şekil 3 L) ile psödoeozinofil (Şekil 4P) ve eozinofil (Şekil 4E) granulositlerde bulunan lizozomal granüllerin pozitif reaksiyon verdiği saptandı. Reaksiyonun, lizozomal granüllerin içinde diffuz olarak yerleştiği dikkati çaktı (Şekil 3 ok, 4 oklar).



Şekil 3: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. Ok: lenfositte ANAE pozitif granül, L: Lenfosit, ANAE.x12.000.

Figure 3. ANAE staining in Electron microscope. Arrow: ANAE positive granule in lymphocyte, L: lymphocyte. ANAE.x 12.000.



Şekil 4: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. Oklar: psödoeozinofil ve eozinofil granulositte ANAE pozitif granüller, P: psödoeozinofil granulosit, E: eozinofil granulosit. ANAE.x 7900.

Figure 4. ANAE staining in Electron microscope. Arrows: ANAE positive granules in pseudoeosinophil and eosinophil granulocyte, P: pseudoeosinophil granulocyte, E: eosinophil granulocyte. ANAE.x7900.

Tartışma ve Sonuç

Perifer kan T lenfositlerini belirlemek için çeşitli araştırmacılar (3, 5, 6, 9, 13) tarafından lizozomal enzimlerden yararlanılmıştır. Son zamanlarda, alfa naftil asetat esteraz'ın T lenfositlerinde bulunup, B lenfositlerinde bulunmadığı

birçok araştırmacı (5, 8, 10, 14) tarafından bildirilmiştir.

Knowles ve Susan (9), Kulenkampff ve ark. (10) ile Müller ve ark. (14) insan, perifer kan T lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda ANAE enzimi boyamasıyla T lenfositlerinin sitoplazmasında genelde tek bir kırmızı granül şeklinde pozitif reaksiyonun görüldüğünü, nötrofil granulositlerin ise negatif reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (17) domuzlarda ANAE enzim boyamasında perifer kan T lenfositlerinde granüler, monosit ve eozinofil granulositlerde ise diffuz reaksiyonun görüldüğünden bahsetmektedirler. Osbaldiston ve ark. (15) farklı türler üzerinde yaptıkları ANAE çalışmasında, rat, kobay, koyun ve keçilerin nötrofil granulositlerinde pozitif reaksiyona rastladıklarını, kedi ve domuzlarda ise bunu gözleyemediklerini, ayrıca köpek ve tavşanlarda eozinofil granulositlerde ANAE'ye karşı pozitif reaksiyon gözlediklerini bildirmekteyizdir.

Tavukların perifer kan T lenfositleri üzerinde yapılan bu çalışmada ANAE boyamasıyla erişkin hayvanların lenfositlerinin çoğunda genelde bir, bazen daha fazla sayıda kırmızı granül şeklinde reaksiyon gözlemlendi. Eozinofil granulositlerde kimi araştırmacıların (9, 13, 17) bildirdikleri gibi pozitif reaksiyon saptandı; ancak, reaksiyonun araştırmacıların bildirdikleri gibi diffuz olmayıp, granüler görünüşte olduğu dikkati çaktı. Psödoeozinofil granulositlerde de pozitif reaksiyon tesbit edildi. Psödoeozinofil granulositlerden elde edilen bulgular, Osbaldiston ve ark. (15)'nin nötrofil granulositlerden elde ettikleri bulgulara uyum sağlamakta, Knowles ve Susan (9), Müller ve ark. (14)'nin bulgularına ise uymamaktadır.

Osbaldiston ve ark. (15) insan, kedi, köpek ve keçilerde yaptıkları ANAE boyamalarında, en iyi boyama süresinin 60-90 dakika (pH 6.0-6.5'da) olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşılık Maiti ve ark. (11) tavuklarda yaptıkları ANAE boyamasında, yukarıdaki araştırmacıların (15) bildirdikleri pH'da ve boyama süresinde pozitif reaksiyon gözleyemediklerine, tavuklarda en iyi reaksiyonu pH 5.8'de, 21 saatlik boyama süresinde elde ettiklerine değinmektedirler. Bu çalışmada da, memeliler için bildirilen (15) pH'da ve sürede herhangi bir pozitif reaksiyona rastlanmadı. En iyi sonuç, Maiti ve ark. (11)'nin bildirdikleri gibi pH 5.8'de 21 saatlik boyama süresi sonunda elde edildi.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda, ANAE pozitif perifer kan T lenfosit oranını Müller ve ark. (14) %85, Knowles ve ark. (8), %70, Kulenkampff ve ark. (10) %63 olarak bildirmişler-

dir. Söz konusu oran, sığırlarda %68 (16), tavuklarda %56 (11) olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada, erişkin tavuklarda ANAE pozitif lenfosit oranı %56.4 bulunmuştur. Bu oran, insan (8, 10, 14) ve memeli hayvanların (16, 19) perifer kan T lenfosit oranlarına göre düşüktür. Ancak, Maiti ve ark. (11)'nin tavuklarda elde ettikleri T lenfosit oranına ise benzerlik göstermektedir.

Zicca ve ark. (20) insan T lenfositleriyle yaptıkları elektron mikroskopik çalışmada asit fosfataz aktivitesini lizozomların içinde, ANAE aktivitesini ise lizozomların membranında gözlediklerini bildirmişlerdir. Elektron mikroskop ile yapılan bu incelemede ANAE ile boyamada pozitif reaksiyonun lenfosit, psödoeozinofil ve eozinofil granulositlerdeki lizozomların içerisinde saptanması, Zicca ve ark. (20)'nin, bu reaksiyonun, lizozomların membranında bulunduğu yönündeki görüşlerine uymamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanarak tavuklarda ANAE demonstrasyonu ile perifer kandaki T lenfositlerin spesifik olarak belirlenebileceği ve ANAE enziminin T lenfositlerdeki lizozomların içinde bulunduğu sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Barret, T.J. (1980). *Basic immunology and its medical application*. The C. V. Mosby Company. London.
2. Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzuto, A. and Zanesco, L. (1980). *Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes*. Br J Haematol 44: 577-582.
3. Edwin, P.T., Sondra, G.B., Marshall, E.K. and Dorothy, B.F. (1981). *Ultrastructural localization of acid phosphatase in rosetted T and B lymphocytes of normal human blood*. Am J Pathol 102: 72-83.
4. Fundenberg, H., Stites, D., Caldwell, J. and Wells, V. (1978). *Basic clinical immunology*. Lang Medical Publication. California.
5. Higgy, K.E., Burns, G.F. and Hayhoe, F.G. (1977). *Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry*. Scand J Haematol 18: 437-448.
6. Kajikawa, D.V.M., Koyama, H., Yushikawa, T. and Tsubaki, S. (1983). *Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle*. Am J Vet Res 44: 1549-1552.
7. Karnovsky, M.J. (1965). *A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolality for use in electron microscopy*. J Cell Biol 27: 137-138.
8. Knowles, D.M., Hoffman, T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G. (1978). *The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T cell marker*. Cell Immun 35: 112-123.
9. Knowles, D.M. and Susan, H. (1978). *Tissue localization of T lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alphanaphthyl acetate esterase*. Lab Invest 39: 70-76.
10. Kulenkampff, J., Janossy, G. and Greaves, M.F. (1977). *Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes*. Br J Haematol 36: 231-240.
11. Maiti, N.K., Saini, S.S. and Sharma, S.N (1990). *Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes*. Vet Res Communication 14: 207-210.
12. Mielke, H. und Füll, B. (1989). *Die Zellen der peripheren Euterlymphe unter Berücksichtigung der B- und T-Lymphozyten im Vergleich zu den Zellen des peripheren Blutes und der Milch bei gesunden sowie mastitis-und leukosekrankten*. Kühen Mh Vet Med 44: 629-632.
13. Mueller, J., Brundel, Re, G., Buerki, H., Keller, H. and Gottier, H. (1975). *Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes*. Eur J Immunol 5: 270-274.
14. Müller, J., Keller, H.U., Hagmann, J.D., Cornioley, R.J., Ruchti, C. and Gottier, H. (1981). *Nonspecific esterase in human lymphocytes*. Int Arch Allergy Appl 64: 410-421.
15. Osbaldiston, BVSc. Sullivan, R.J. and Fox, A. (1978). *Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes*. Am J Vet Res 39: 683-685.
16. Paul, P.S., Senogles, D.R. Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W. (1979). *Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle*. Clin Exp Immunol 35: 306-316.
17. Ramos, J.A., Ramis, J.A., Marco, A. Domingo, M., Rabanal, R. and Ferrer, L. (1992). *Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine*. Am J Vet Res 53: 1418-1426.
18. Reynolds, E.S. (1963). *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy*. j Cell Biol 17: 208-212.
19. Yang, T.J., Patricia, J.A. and Williams, L.F. (1979). *Acid alpha naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes*. Immunology 38: 85-92.
20. Zicca, A., Leprini, A., Cadoni, A., Franci, T.A., Ferrarini, M. and Carlo, E.G. (1981). *Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human Tm lymphocytes*. Am J Pathol 105: 40-46.