

FARKLI HAYVAN TÜRLERİNİN PERİFER KAN LÖKOSİTLERİNDE ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Reşat Nuri AŞTI*

Hikmet ALTUNAY***

Belma ALABAY**

Levent ERGÜN***

Nevin KURTDEDE**

Determination of alpha-naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood leukocytes in the different animal species

Summary: *This study was carried out to determine the alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) activity of peripheral blood leukocytes in various animal species. Heparinized blood samples collected from rat, chicken, cat, dog, sheep, goat, cattle and horse consisting of three each animals were used.*

ANAE stainings were applied at different pH and durations for the determination of ANAE activity.

The best reactions against ANAE were obtained from three hours stainings in chicken, dog, sheep and goat at pH 5, 8, in cattle and horse at pH 6, 2, in rat and cat at pH 6, 4.

There was a positive reaction against ANAE in T lymphocytes, monocytes and eosinophil granulocytes in examined animals. On the contrary positive reactions were observed in neutrophil granulocytes of cattle, sheep, goat and rats and in pseudoeosinophil granulocytes of chicken and in blood platelets of rat and dogs.

Key word: *Leuckocyte, ANAE activity.*

Özet: *Bu çalışma, farklı hayvan türlerinde perifer kan lökositlerinin alfa naftil asetat esteraaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.*

Çalışmada, materyal olarak 3'er adet erişkin rat, tavuk, kedi, köpek, koyun, keçi, sığır ve attan alınan heparinize kan örnekleri kullanıldı. ANAE aktivitesinin belirlenmesi için değişik pH ve sürelerde ANAE boyaması uygulandı.

ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyon tavuk, köpek, koyun ve keçide pH 5,8, at, sığırdı pH 6, 2, rat ve kedide pH 6, 4'de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edildi.

İncelenen hayvan türlerinde T lenfosit, monosit ve eozinofil granulositlerde ANAE'ye karşı pozitif reaksiyona rastlandı. Buna karşılık, sadece rat, koyun, keçi ve sığırların nötrofil granulositleri ile tavukların pseudoeozinofil granulositlerinde, rat ve köpeklerin kan pulcuklarında pozitif reaksiyon gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: *Lökosit, ANAE aktivitesi*

* Prof. Dr. AÜ Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
** Doç. Dr., AÜ Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
*** Dr., AÜ Veteriner Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Giriş

Perifer kan lenfositleri, immunolojik özelliklerine göre T ve B lenfositler 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, 11).

Lenfosit tiplerinin ayırılması amacıyla kullanılmakta olan yöntemler oldukça pahalı olup, uzun zaman almakta ve doku kesitlerine uygulanamamaktadır (4). Bu nedenler, araştırmacıları enzimler üzerinde çalışmaya yöneltmiştir (5, 6, 7, 12). Başlangıçta, lizozomal enzimlerden olan asit fosfataz üzerinde durulmuş; ancak, bu enzimün hem T hem de B lenfositlerde bulunduğu saptanmasından sonra lenfosit tiplerini ayırt etmede kullanılmayacağı anlaşılmıştır (3). Son zamanlarda, nonspesifik esterazlardan olan alfa naftil asetat esterazın (ANAE) T lenfositlerde bulunduğu, B lenfositlerde ise bulunmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (2, 5, 7, 13, 16).

İnsanlarda ve değişik tür hayvanlarda perifer kan lökositlerinin ANAE boyamasına karşı gösterdikleri boyanma özellikleri, uygulanan boyama pH'sı ve süresine bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Knowles ve ark. (7), Kulenkampff ve ark. (9), Müller ve ark. (13) insan perifer kanında yaptıkları ANAE boyamasına karşı en iyi sonucu pH 5, 8'de 3 saatlik. Higgy ve ark. (5) ise pH 8,0'de 30 dakikalık boyamada gözlediklerini bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (15) domuzlarda pH 6,4'de 2 saat, Mueller ve ark. (12) farelerde pH 5,0'de 21 saat, Osbaliston ve ark. (14) köpeklerde pH 6,5'da 90 dakikada, Maiti ve ark. (10) ise tavuklarda pH 7, 2'de 16 saatte en iyi sonucu aldıklarına dikkati çekmişlerdir.

ANAE pozitif reaksiyonun insan ve hayvanların perifer kan T lenfositlerinde 1-2 adet lokalize granül şeklinde gözleendiği, B lenfositlerin ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon verdiği, monositlerin ise diffuz boyandığı, araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (2, 5, 6, 7, 12, 15).

ANAE boyamasına karşı nötrofil granulositlerin insan (5, 8, 14, 16), domuz (14), sığır (16) ve kedide (14) negatif, rat, kobay, koyun ve keçide (14) ise pozitif reaksiyon verdiği bildirilmektedir.

Eozinofil granulositlerde de ANAE boyamasına karşı insan (5, 7, 8, 16), sığır (16), rat kedi, koyun ve keçide (14) negatif, tavşan ve köpeklerde (14) ise pozitif reaksiyonun görüldüğü saptanmıştır.

Bu çalışma, farklı tür hayvanlarda perifer kan lökositlerinin, alfa naftil asetat esteraz'a karşı boyanma özelliklerini ortaya koymak amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak, 3'er adet erişkin ve sağlıklı rat, tavuk, kedi, köpek, koyun, keçi, sığır ve attan alınan heparinize kan örnekleri kullanıldı. Her hayvandan alınan heparinize kan örneklerinden frotiler hazırlanarak oda ısısında kurutuldu ve -10 C'deki glutaraldehid-aseton tesbit sıvısında 3 dakika tesbit edildi. Süre sonunda frotiler 3 defa distile su ile yıkanarak oda ısısında kurutuldu ve -10 C'de 3-7 gün saklandı.

Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) aktivitesinin belirlenmesi için, 0,067 M fosfat tampununun (pH 5,0) 40 ml'sine 2,4 ml hekzazotize edilen pararozanilin solusyonu ve 0,4 ml asetonda eritilen 10 mg alfa naftil asetat eklenerek hazırlanan inkubasyon solusyonu kullanıldı (12). Inkubasyon solusyonları 2N NaOH ile 5,0, 5,4, 5,8, 6,2, 6,4, 6,8 ve 7,2 olmak üzere 7 değişik pH'ya ayarlandı. Her pH için 3 ve 6 saatlik boyamalar uygulandı. Çekirdek boyası olarak metilen mavisi kullanıldı.

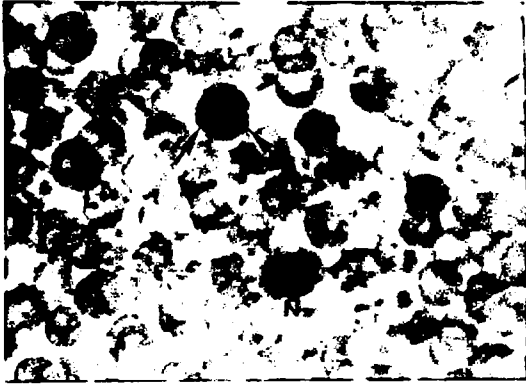
Bulgular

Perifer kan lökositlerinde alfa naftil asetat esteraza karşı en iyi reaksiyon tavuk, köpek, koyun ve keçide pH 5,8, at, sığırdada pH 6,2, rat ve kedide pH 6,4'de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edildi.

İncelenen hayvan türlerinde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğunda sayıları 1-2 arasında değişen spesifik kırmızı granüller gözlenirken (Şekil 1, 4 oklar), kedi ve koyundaki granül sayısının diğer türlere göre daha fazla olduğu dikkati çekti (Şekil 2 oklar).

Monositlerin pozitif reaksiyon verdiği, bu reaksiyonun rat, koyun ve köpekte diffuz (Şekil 3, 6 M), kedi, sığır ve keçide kuvvetli, granüler (Şekil 4 M), at ve tavukta ise daha az sayıda granüler boyanma şeklinde olduğu saptandı.

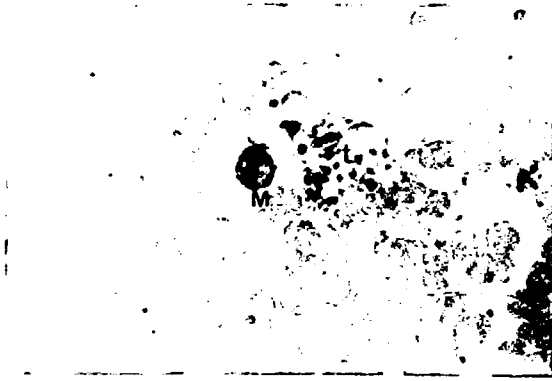
Kedi, köpek ve atlarda nötrofil granulositlerin ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon verdiği gözleendi (Şekil 1, 6 N), Rat, koyun, keçi ve sığırların nötrofil granulositleri ile tavukların pseudocozinofil granulositlerinde ise granüler pozitivite tesbit edildi (Şekil 5 N, oklar); reaksiyonun koyun ve keçilerde daha kuvvetli olduğu dikkati çekti.



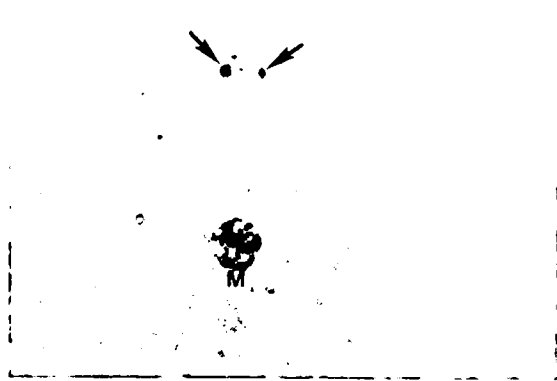
Şekil 1: Erişkin köpekte ANAE boyaması. oklar: T lenfositte ANAE pozitif granüller, N: nötrofil granulosit. ANAE.x1200.
Figure 1: ANAE staining in adult dog. arrows: ANAE positive granules in T lymphocyte, N: neutrophil granulocyte. ANAE.x 1200.



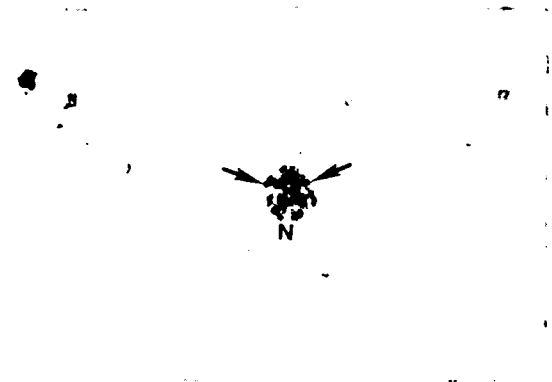
Şekil 2: Erişkin koyunda ANAE boyaması. oklar: T lenfositte ANAE pozitif granüller. ANAE.x 1040.
Figure 2: ANAE staining in adult sheep. arrows: ANAE positive granules in T lymphocyte. ANAE.x 1040.



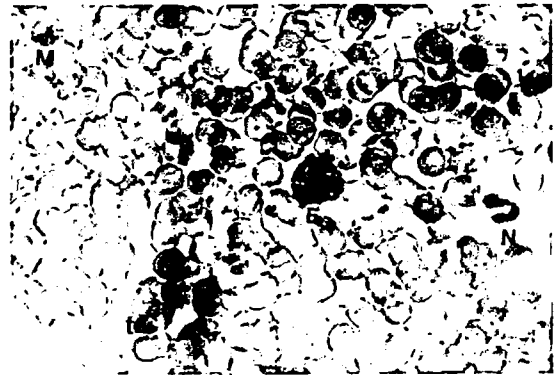
Şekil 3: Erişkin köpekte ANAE boyaması. M: monositte diffuz boyanma, t: kan pulcuğu. ANAE.x480.
Figure 3: ANAE staining in adult dog. M: diffuse ANAE positive reaction in monocyte. t: platelets. ANAE.x:480.



Şekil 4: Erişkin sığırdan ANAE boyaması. M: monositte granuler boyanma, oklar: T lenfositte ANAE pozitif granüller. ANAE.x 910.
Figure 4: ANAE staining in adult cattle. M: granular ANAE positive reaction in monocyte, arrows: ANAE positive granules in T lymphocyte. ANAE.x910



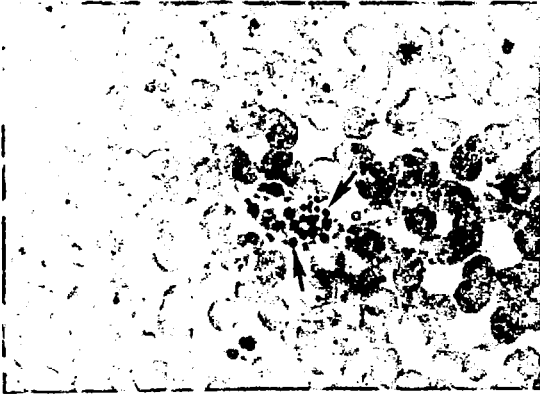
Şekil 5: Erişkin sığırdan ANAE boyaması. N: nötrofil granulositte ANAE pozitif granüller (oklar). ANAE.x670.
Figure 5: ANAE staining in adult cattle. N: ANAE positive granules in neutrophil granulocyte (arrows). ANAE.x670.



Şekil 6: Erişkin köpekte ANAE boyaması. E: eozinofil granulositte diffuz granular ANAE pozitif reaksiyon, N: nötrofil granulosit, M: monosit, t: kan pulcuğu. ANAE.x 670
Figure 6: ANAE staining in adult dog. E: diffuse granular ANAE pozitive reaction in eosinophil granulocyte, N: neutrophil granulocyte, t: platelet. ANAE.x670.

Eozinofil granulositlerde ANAE boyamasına karşı at, kedi ve tavukta zayıf, rat, köpek, sığır, koyun ve keçi ise kuvvetli granüler pozitivite saptandı (Şekil 6E).

Kedi, at, sığır, koyun ve keçilerin kan pulcukları ile tavukların trombositlerinde ANAE boyamasına karşı negatif, rat ve köpeklerde ise kuvvetli, granüler pozitif reaksiyona rastlandı (Şekil 3, 6 t, şekil 7 oklar).



Şekil 7: Erişkin köpekte ANAE boyaması. oklar: kan pulcuklarında ANAE pozitif reaksiyon. ANAE.x640.
Figure 7: ANAE staining in adult dog. arrows: ANAE pozitif reaction in platelets. ANAE.x640.

Tartışma ve Sonuç

Perifer kan T lenfositlerini belirlemek için çeşitli araştırmacılar tarafından lizozomal enzimlerden yararlanılmıştır (3, 5, 6, 8, 12). Başlangıçta, lizozomal enzimlerden olan asit fosfatazdan yararlanılmış, ancak Edwin ve ark (3)'ün insan perifer kan T lenfositlerinde yaptıkları çalışmada asit fosfatazın sadece T lenfositlerde değil, B lenfositlerde de bulunduğunu bildirmesiyle bu enzimin kullanılmasından vazgeçilmiştir. Son zamanlarda, non spesifik esterazlardan olan alfa naftil asetat esteraz'ın T lenfositlerde bulunup B lenfositlerde bulunmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (5, 7, 9, 13).

İnsanlarda (8, 13) ve değişik tür hayvanlarda (14) perifer kan lökositlerinin ANAE boyamasına karşı gösterdikleri boyanma özelliklerinin, uygulanan boyama pH'sı ve süresine bağlı olarak değişiklikler gösterdiği ileri sürülmüştür. Knowles ve ark (7), Kulenkampff ve ark. (9), Müller ve ark. (13) insan perifer kanında ANAE boyamasına karşı en iyi sonucu pH 5,8'de 3 saatlik boyamadan elde ettiklerini, Higgy ve ark. (5) ise pH 8,0'de 30 dakikalık boyamada gözlediklerini bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (15) domuzlarında pH 6,4'de 2 saat, Osbaldiston ve ark. (14) köpeklerde pH 6,5'de 90 dakika, Maiti ve ark. (10) ise tavuklarda pH 7,2'de 16 saatte en iyi sonucu aldıklarına dikkati çekmişlerdir. Bu çalışmada ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyon tavuk, köpek, koyun ve keçide pH 5,8, at ve sığırdada pH 6,2, rat ve kedide pH 6,4'de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edildi. Tavuk, köpek, koyun ve keçide elde edilen boyama pH'sı ve süresi, çeşitli araştırmacıların (7, 9, 13) insanlarda bildirdikleri ile uyum içindedir; ancak, Higgy ve ark. (5)'nin insanlarda Osbaldiston ve ark. (14)'nin köpeklerde, Maiti ve ark. (10)'nin tavuklardaki bulguları ile farklılık göstermektedir.

ANAE pozitif reaksiyonun insan ve hayvanların perifer kan T lenfositlerinde 1-2 adet lokalize granül şeklinde gözleendiği, B lenfositlerin ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon verdiği, monositlerde ise diffuz boyanma gözleendiği araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (2, 5, 6, 7, 12, 15). Bu çalışmada da incelenen hayvan türlerinde ANAE pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğunda sayıları 1-2 arasında değişen spesifik kırmızı granüller gözleendi. Kedi ve koyundaki granül sayısının ise diğer türlere göre daha fazla olduğu saptandı. Monositlerde de diffuz veya granüler boyanma gözleendi. Lenfosit ve monositlerden elde edilen bulgular, araştırmacıların (2, 5, 6, 7, 12, 15) bulgularına benzerlik göstermektedir.

ANAE boyamasına karşı nötrofil granulositlerde insan (5, 8, 14, 16), domuz (14), sığır (16) ve kedide (14) negatif, rat, kobay, koyun ve keçide (14) ise pozitif reaksiyonun görüldüğünü bildiren araştırmalar bulunmaktadır. Çalışmada, kedi, köpek ve atlarda nötrofil granulositlerde ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon, rat, koyun, keçi ve sığırların nötrofil granulositleri ile tavukların pseudoeozinofil granulositlerinde ise granüler pozitivite saptandı. Koyun ve keçilerden elde edilen bulgular, araştırmacıların bulgularını desteklemekte, sığırlardan elde ettiğimiz bulgular ise zıtlık göstermektedir.

Eozinofil granulositlerde de insan (5, 7, 8, 16), sığır (16), rat, kedi, koyun ve keçide (14) ANAE'ye karşı negatif, tavşan ve köpeklerde (14) ise pozitif reaksiyonunun görüldüğü bildirilmiştir. Rat, tavuk, kedi, köpek, at, sığır, koyun ve keçinin eozinofil granulositlerinde ANAE'ye karşı pozitivite görüldüğünden dolayı, Osbaldiston ve ark. (14)'nin rat, kedi, koyun ve keçide, Yang ve ark. (16)'nin sığırlarda eozinofil granulositlerde pozitif reaksiyonunun görülmediğini bildiren görüşlerine katılmıyoruz. Ayrıca, kedi ve köpeklerin kan pulcuklarında da ANAE boyamasına karşı pozitif reaksiyon belirlendi. Çalışmadaki bu bulgu, diğer araştırmacılar tarafından bildirilmemiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak perifer kan lökositlerinde ANAE boyamasına karşı en iyi reaksiyonun tavuk, köpek, koyun ve keçide pH 5, 8, at ve sığırdada pH 6, 2, rat ve kedide pH 6, 4'de yapılan 3 saatlik boyamalardan elde edilebileceği ve ANAE demonstrasyonu ile farklı hayvan türlerinde perifer kan T lenfositlerin spesifik olarak belirlenebileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Barret, T.J. (1980) *Basic immunology and its medical application*. The C.V. Mosby Company, London. pp. 48-65.

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 Dorathy, 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. Fudenberg, H., Stites, D., Caldwell, J. and Wells, V. (1978) *Basic clinical immunology*. Lang Medical Publication, California. pp. 78-95.
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 alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle*. Am. J. Vet. Res., 44, 1549-1552.
7. 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.
8. Knowles, D.M. and Susan, H. (1978) *Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase*. Lab. Invest, 39, 70-76.
9. 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.
10. Maiti, N.K., Saini, S.S. and Sharma, S.N. (1990) *Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes*. Vet. Res. Communication, 14, 207-210.
11. Mielke, H. and 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 leukosekranken Kühen*. Mh. Vet. Med., 44, 629-632.
12. 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.
13. Müller, J., Keller, H.U., Hagmann, J.D., Cornioley, R.J. Ruchti, C. and Cottier, H. (1981) *Nonspecific esterase in human lymphocytes*. Int. Arch. Allergy. Appl., 64, 410-421.
14. Osbaldiston, BVSc., Sullivan, R.J. and Fox, A. (1978) *Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes*. Am. J. Vet. Res., 39, 683-685.
15. 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.
16. Yang, T.J., Patrica, 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.