

Farklı Gelişme Dönemlerinde Bildirgin (*Coturnix coturnix japonica*) Perifer Kan Lenfositlerinde Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Aktivitesi

Nagehan ÇİMENOĞLU^{1*}, Kenan ÇINAR¹, Reşat Nuri AŞTI²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ISPARTA

²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

Alınış Tarihi:05.01.2011, Kabul Tarihi:14.03.2011

Özet: Bu çalışma bildirginlarda (*Coturnix coturnix japonica*) inkübasyon (9, 11, 13, 15, 17. günler) ve inkübasyon sonrası (1 günlük, 7 günlük, erişkin) dönemlerde perifer kan lenfositlerinde alfa naftil asetat esteraz (ANAE) aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Uygulanan ANAE yöntemi sonucunda T lenfosit oranının inkübasyonun 9, 11, 13 ve 15. günlerinde % 60-63, inkübasyonun 17. günü ile inkübasyondan sonraki 1, 7 günlük ve erişkin dönemde % 34-38 arasında olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: ANAE aktivitesi, *Coturnix coturnix japonica*, T lenfosit

Alpha Naphthyl Acetate Esterase (ANAE) Activity in the Peripheral Blood Lymphocytes in Different Development Periods of Quail (*Coturnix coturnix japonica*)

Abstract: In this study was aimed to determine that the alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) activity in the peripheral blood lymphocytes in quail (*Coturnix coturnix japonica*) in periods of incubation (9, 11, 13, 15, 17 days) and after incubation (1 day, 7 day, adult). As a result of applied ANAE method, it was detected that the rate of T lymphocyte was between 60-63 % in 9, 11, 13 and 15. days of incubation, 34-38 % in 17. day of incubation and 1, 7 days of after incubation and adult.

Keywords: ANAE activity, *Coturnix coturnix japonica*, T lymphocyte

Giriş

Lenfositler fonksiyonel olarak T ve B lenfosit olarak ikiye ayrılır (Akay, 2001; Sağlam vd., 2001; Öber ve İzzetoğlu, 2006). B hücrelerin yüzeylelerinde antijen reseptörleri, immunoglobulin reseptörleri, adhezyon molekülleri bulunur. T lenfositler kemik iliğinden köken alarak çoğalır, timusa göç ederler ve bu organda farklı yüzey reseptörleriyle donanarak diğer lenfoid organlara taşınırlar (Alabay, 2008). T ve B lenfositler sağlıklı bireylerde belirli seviyelerde bulunurken hastalık (Kajikawa vd., 1983) ve çeşitli kimyasalların (Sandıkçı vd., 2007; Tuzcu vd., 2010) etkisiyle bu oranlarda değişimler olmaktadır. B ve T lenfositler ışık mikroskop düzeyinde immunolojik yöntemlerle ayırt edilebilirler (Sağlam vd., 2001). Lenfosit tiplerini ayırt etmek amacıyla çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden alfa naftil asetat esteraz T lenfositleri belirlemek amacıyla çeşitli araştırmacılar (Lassila vd., 1982; Kajikawa vd., 1983; Aşti vd., 1993; Aşti vd., 1999; Ergün vd., 2004) tarafından kullanılmıştır. B lenfositleri belirlemek için yüzey immunoglobulinleri (SIg) (Kurtdede vd., 1995) ve alfa naftil bütirat esteraz (NBE) (Çelik vd., 1991) yöntemleri uygulanmaktadır. Farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda araştırmacılar ANAE demonstrasyonu için uygun pH'ın deve (Sandıkçı vd., 2005), tavşan (Özcan, 2005), tavuk, köpek, koyun ve keçide 5.8, at ve sığırdada 6.2, rat ve kedide ise 6.4' de (Aşti vd., 1996) elde edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada inkübasyon ve inkübasyon sonrası bazı dönemlerde bildirgin perifer kanındaki T ve B lenfositlerin belirlenmesi amaçlandı.

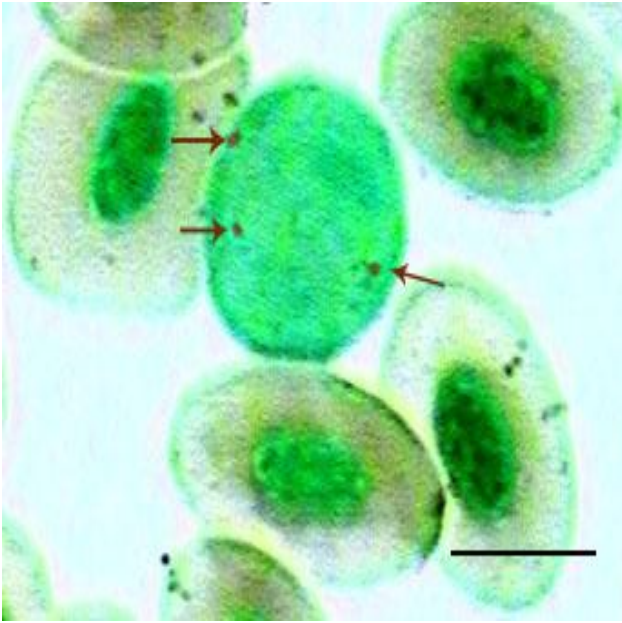
Materyal ve Metot

Bu çalışmada materyal olarak inkübasyonun 9, 11, 13, 15, 17. günleri ve inkübasyondan sonraki 1 günlük, 1 haftalık ve erişkin dönemden 3' er adet olmak üzere toplam 24 adet bildirgin (*Coturnix coturnix japonica*) alınan kan örnekleri kullanıldı. Alınan kan örneklerinden frotiler hazırlanarak oda sıcaklığında kurutuldu ve -10 °C'deki glutaraldehit-aseton tesbit sıvısında 3 dakika tesbit edildikten sonra distile suyla yıkandı. Frotilerde Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, 0.067 M fosfat tamponunun (pH 5.0) 40 ml'sine 2.4 ml heksazotize edilen pararozanilin solusyonu ve 0.4 ml asetonda eritilen 10 mg alfa naftil asetat esteraz eklenerek hazırlanan inkübasyon solusyonu kullanıldı. İnkübasyon solusyonları 2N NaOH ile pH 5.8' e ayarlandı ve frotilere 3 saatlik boyama uygulandı. Çekirdek boyası olarak metilen mavisi kullanıldı (Aşti vd., 1999).

ANAE boyama metoduyla hazırlanan her preparattaki üç değişik alanda yüzer adet olmak üzere üç yüz lenfosit sayılarak ANAE pozitif lenfosit oranları belirlendi.

Bulgular

İnkübasyonun 9, 11, 13, 15. günlerinde ANAE boyamasına karşı T lenfositlerin çoğunlukta olduğu, inkübasyonun 17. günü ile inkübasyondan sonraki 1 günlük, 7 günlük ve erişkin dönemlerde ise B lenfositlerin çoğunlukta olduğu belirlendi. Hem inkübasyon hem de inkübasyon sonrası dönemlerde T lenfositlerin büyük çoğunluğunda 1-3 adet ANAE spesifik granüller saptandı (Şekil 1). Az sayıda lenfositte ise granül sayısının daha fazla olduğu belirlendi. ANAE boyaması sonuçları Çizelge 1’ de verildi.



Şekil 1. T lenfositte ANAE pozitif granüller (oklar).
ANAE. Bar: 50 µm

Çizelge 1. Bildircin perifer kanında ANAE pozitif hücrelerin oranı

		Lenfosit(%)	
		Dönemler	ANAE ⁺
İnkübasyon	9 Gün		60
	11 Gün		62.3
	13 Gün		63
	15 Gün		61
	17 Gün		36
İnkübasyon Sonrası	1 Gün		37.3
	7 Gün		38
	Erişkin		34

Tartışma ve Sonuç

Çeşitli araştırmacılar (Aşti vd., 1996; Özcan, 2004; Sandıkçı vd., 2005) farklı hayvan türlerinde perifer kan lenfositlerine farklı pH larda ANAE uygulaması yaptıklarını bildirmişlerdir. Buna göre Sandıkçı vd. (2005) deve de pH 5.8, Özcan (2004) Ankara tavşanında pH 5.8, Aşti vd. (1996) tavuk, köpek, koyun ve keçide pH 5.8, at ve sığırdan pH 6.2, rat ve kedide pH 6.4, Muller vd. (1981) insanda pH 5.8de ANAE demonstrasyonunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da prenatal ve postnatal dönemlerde bildircin perifer kan lenfositlerinin ANAE demonstrasyonu pH 5.8 de tespit edildi.

Aşti vd. (1995), erişkin tavuk perifer kanında T lenfosit oranının % 56.4 olduğunu bildirmişlerdir. Bu oranın hindide % 51.8 (Ergün vd., 2004), Ankara tavşanında % 68.2 (Özcan, 2005), ceylanda % 72 (Altunay vd., 2008), Van kedisinde % 83 (Yörük vd., 1998), *Anas platyrhynchos* da % 57.9, *Cairina moschata* da % 54.8, *Anas domestica* da % 55.1 (Karaca vd., 2006), deve kuşunda % 59.3 (Ergün vd., 2004) ve insanda (Muller vd., 1981) % 85 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise erişkin bildircinlerde ANAE pozitif lenfosit oranı % 34 olarak saptandı. Dönmez ve Sur (2007) *Anas platyrhynchos* da, Sur vd. (2004) nin sülünde yaptıkları çalışmalarda bu çalışma ile benzer şekilde T lenfosit oranının B lenfosit oranından düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Kınalı keklığın (*Alectoris graeca*) farklı dönemlerindeki perifer kan lenfositleri üzerine yapılan çalışmada inkübasyondan sonraki 1 günlük keklikteki T lenfosit oranının bu çalışmada elde edilen bulgularla benzer biçimde % 37 olduğu bildirilmiştir (Dönmez ve Sur, 2008).

Kurtdede vd. (1995) Ankara keçilerinin perifer kan T ve B lenfositlerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada 1 haftalık keçilerin perifer kanında % 62.9 oranında ANAE pozitif T lenfosit bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise % 38 oranında T lenfosit rastlanmıştır.

Deve (Kurtdede vd., 1995), tavuk (Aştı vd., 1995) ve ceylan (Altunay vd., 2008) ve insan (Muller vd., 1981) perifer kan lökositleri üzerine yapılan çalışmalarda T lenfositlerdeki granül sayısının 1-2 adet olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise T lenfositlerde 1-3 adet granül olduğu belirlendi. Van kedisi (Yörük vd., 1998) ve kınalı keklık (Dönmez ve Sur, 2008) türlerinin perifer kanlarında yapılan çalışmalarda ise bu çalışmayla benzer bulgular olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda bildircin perifer kanındaki T lenfosit sayısının inkübasyonun 13. günü ile erişkin dönem arasında önemli derecede farklılık gösterdiği belirlendi.

Kaynaklar

Alabay, B. 2008. Lenfoid Sistem. s. 49-66. Özer, A. (editör). Veteriner Özel Histoloji. Nobel, Ankara, 328 s.

Altunay, H., Harem, İ., Harem, M.K., Aştı, R.N., Kurtdede, N. 2008. Determination of Naphthyl Acetate Esterase Enzyme Activity in Peripheral Blood Leukocytes of Gazelles (*Gazella subgutturosa*). Biotechnic and Histochemistry, 83, 279-283.

Akay, M.T. 2001. Genel Histoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 96 s.

Aştı, R.N., Kurtdede, N., Ergün, L. 1993. Kangal Köpeklerinin Perifer Kan T Lenfositleri Üzerinde Işık ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 40, 563-576.

Aştı, R.N., Kurtdede, N., Özen, A. 1995. Tavukların Perifer Kan T Lenfositleri Üzerinde Histokimyasal Çalışmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42, 175-178.

Aştı, R.N., Alabay, B., Kurtdede, N., Altunay, H., Ergün, L. 1996. Farklı Hayvan Türlerinin Perifer Kan Lökositlerinde Alfa Naftil Asetat Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 43, 129-133.

Aştı, R.N., Kurtdede, N., Özen, A. 1999. Light and Electron Microscopic Studies on Alpha Naphthyl Acetate Esterase Activity of Peripheral Blood T Lymphocytes in Chicken. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 106, 397-399.

Çelik, İ., Aştı, R.N., Ergene, N. 1991. İnsan Perifer Kanındaki B, T ve Null Lenfositlerinin Esteraz Sitokimyası ve Yüzey İmmüoglobulinlerinin İmmünoenzimatik Yöntemle Boyanarak Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 7, 497-503.

Dönmez, H.H., Sur, E. 2007. Ergin Evcil Ördeklerin (*Anas platyrhynchos*) Perifer Kan Lenfositlerinde Alfa-Naftil Asetat Esteraz ve Asit Fosfataz Aktivitesinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 122-128.

Dönmez, H.H., Sur, E. 2008. Hematology and Enzyme Histochemistry of the Peripheral Blood Leukocytes in Rock Partridges (*Alectoris graeca*). Poultry Science, 87, 56-60.

Ergün, E., Ergün, L., Özen, A., Aştı, R.N. 2004. Determination of Alpha Naphthyl Acetate Esterase Activity in the Peripheral Blood Leukocytes of Ostrich (*Struthio camelus massaicus*). Revue de Medecine Veterinaire, 155, 147-150.

Ergün, L., Özen, A., Ergün, E., Aştı, R.N. 2004. Alpha Naphthyl Acetate Esterase Activity in the Peripheral Blood Leukocytes of Turkeys. Indian Veterinary Journal, 81, 431-434.

Kajikawa, O., Koyama, H., Yoshikawa, T., Tsubaki, S., Saito, H. 1983. Use of Alpha-Naphthyl Acetate Esterase Staining to Identify T Lymphocytes in Cattle. American Journal of Veterinary Research, 44, 1549-1552.

Karaca, T., Cemek, M., Kanter, M. 2006. Lipid Peroxidation and Antioxidant Levels, and Alpha Naphthyl Acetate Esterase Activity of Peripheral Blood Lymphocytes in Mallard, Muscovy and Pekin Ducks. Acta Veterinaria Brunensis, 75, 33-38.

Kurtdede, N., Aştı, R.N., Altunay, H., Akdeniz, C. 1995. Ankara Keçilerinin Perifer Kan T ve B Lenfositlerinin Alfa Naftil Asetat Esteraz ve Yüzey İmmüoglobulin Boyama Yöntemi ile Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42, 85-90.

Lassila, O., Leino, A., Alanen, A., Hirvonen, T., Toivanen, P. 1982. Alpha-Naphthyl Acetate Esterase Activity in Human Foetal Lymphocytes. Journal of Reproductive Immunology, 4, 167-172.

- Muller, J., Keller, H.U., Durig, P., Haggmann, J., Cornioley, D.M., Reinhard, J., Ruchti, C., Hess, M.W., Cottier, H. 1981. Nonspecific Esterase in Human Lymphocytes. *Int Arch Allergy. Appl Immunol*, 64, 410-421.
- Öber, A., İzzetoğlu, G.T. 2006. *Histoloji*, 1. Basım, Nobel, Ankara, 118 s.
- Özcan, Z. 2005. Determination of Alpha Naphthyl Acetate Esterase Activity in the Peripheral Blood Leukocytes in Angora Rabbits. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29, 8 81-884.
- Sağlam, M., Aşti, R.N., Özer, A. 2001. *Genel Histoloji*. 6. Baskı, Yorum, Ankara, 217 s.
- Sandıkçı, M., Kum, Ş., Eren, Ü. 2005. Develerin (*Camelus dromedarius*) Perifer Kan Lökositlerinde Alfa-Naftil Asetat Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 52, 13-16.
- Sandıkçı, M., Eren, Ü., Kum, S. 2007. Effects of Formaldehyde and Xylene on Alpha-Naphthyl Acetate Esterase Positive T-Lymphocytes in Bronchus Associated Lymphoid Tissue and Periheral Blood in Rats. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158, 297-301.
- Sur, E., Çelik, İ., Öznurlu, Y., Aydın, M.F. 2004. Genç ve Ergin Sülünlerin Perifer Kan Lökosit Oranları ile Lenfositlerin Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Veteriner Bilimler Dergisi*, 20(3), 87-93.
- Tuzcu, M., Sur, E., Çelik, İ., Öznurlu, Y., Çiftçi, M.K. 2010. Effects of Aflatoxin on the Proportions of Peripheral Blood Leukocytes and Alpha-Naphtyl Acetate Esterase (ANAE) Positive Lymphocytes in the Mouse. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 337-341.
- Yörük, M., Aşti, R.N., Kurtdede, N., Ağaoğlu, Z., Altunay, H. 1998. Light and Electron Microscopic Studies on Alpha Naphthyl Acetate Esterase Activity of the Peripheral Blood T Lymphocytes in Van Cats. *Anatomia Histologia Embryologia*, 27, 289-92.