

## İki Farklı Yer Sincabı Türünün Perifer Kan Lenfositlerinde Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) ve Asit Fosfataz (ACP) Aktivitelerinin Belirlenmesi

Haluk ÖZPARLAK\*

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

**Özet:** Bu çalışmada iki farklı yer sincabı türünün perifer kan lenfosit oranları ile alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP) pozitif lenfosit oranlarının ışık mikroskopik düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla altı ergin *Spermophilus taurensis* (Hadim, Konya) ve dört ergin *Spermophilus xanthoprimum* (Selçuklu, Konya) örneğinden usulüne uygun olarak kan alınmış ve her ömektan altı adet frotiler hazırlanarak havada kurutulmuştur. Frotilerden ikisi lenfosit oranının tespit edilmesi için rutin May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanmıştır. Diğer frotiler fosfat tamponlu glutaraldehit-aseton solüsyonunda tespit edilmiştir. Bu frotilerden ikisine ANAE demonstrasyonu, diğer ikisine ise ACP demonstrasyonu uygulanmıştır. ANAE demonstrasyonu sonucunda her iki türde lenfositlerin çoğunluğu pozitif sonuç vermiştir. ANAE pozitif lenfositlerde iki tip granüler pozitivite tespit edilmiştir. Bu lenfositlerin çoğunda sayıları 1-5 arasında değişen kırmızı-kahverengi iri granüller (nokta tarzında pozitivite) gözlenirken, daha az orandaki lenfositlerde ise yaygın çok sayıda küçük granüller (ince granüler pozitivite) gözlenmiştir. ACP demonstrasyonu sonucunda da her iki türde lenfositlerin çoğunluğu pozitif sonuç vermiştir. ACP pozitif lenfositler sayıları 1-3 arasında değişen pembe-kırmızı küçük granüler tarzda pozitivite göstermiştir. Bunun yanı sıra her iki enzim demonstrasyonunda monositler genellikle sitoplazmalarında güçlü ve yaygın tarzda pozitivite gösterirken, nötrofillerin ise zayıf bir reaksiyon verdiği dikkat çekmiştir. *S. taurensis* ve *S. xanthoprimum*'un lenfosit, ANAE ve ACP pozitif lenfosit oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Ayrıca her bir türün ANAE ve ACP pozitif lenfosit oranları arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** *Spermophilus taurensis*, *Spermophilus xanthoprimum*, yer sincabı, lenfosit, alfa-naftil asetat esteraz, asit fosfataz.

### Determination of the Alpha-Naphthyl Acetate Esterase (ANAE) and Acid Phosphatase (ACP) Activity in the Peripheral Blood Lymphocytes in Two Different Species of the Ground Squirrel

**Abstract:** This study was carried out to determine peripheral blood lymphocyte (PBL), alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) and acid phosphatase (ACP) positive PBL percentages in two different species of the ground squirrel. For this purpose, smears were prepared and air dried from blood of six adult *Spermophilus taurensis* specimens (Hadim, Konya) and four adult *Spermophilus xanthoprimum* specimens (Selçuklu, Konya). Two smears were stained with May Grünwald-Giemsa for the determination of PBL percentages. Four smears were fixed in glutaraldehyde-acetone solutions. Two of the smears were used for ANAE demonstration. The remaining two smears were used for ACP demonstration. ANAE positive PBLs showed two distinct granular positivity. While most of the ANAE positive cells had 1-5 large reddish-brown granules (dot-like granular positivity), the other positive cells had large quantity of diffusely arranged small granules (fine granular positivity). ACP positive PBLs had 1-3 pinkish-red small granules. Besides, monocytes generally gave a diffuse and strong reaction while neutrophils displayed a weak positive reaction in their cytoplasm for ANAE and ACP. The differences between PBL, ANAE and ACP positive PBL percentages of *S. taurensis* and

\*  
hozparlak@selcuk.edu.tr

*S. xanthopyrmnus* were not statistically significant ( $p>0.05$ ). The differences between ANAE and ACP positive PBL percentages of each species were also not statistically significant ( $p>0.05$ ).

**Key words:** *Spermophilus taurensis*, *Spermophilus xanthopyrmnus*, ground squirrel, lymphocyte, alpha-naphthyl acetate esterase, acid phosphatase.

## Giriş

Klasik kan boyaları ile ayırt edilemeyen bazı kan hücrelerinin olgunlaşmamış formları ile olgun formlarının ayırımında, basit ve pratik yöntemler olan enzim histokimyasal yöntemler tercih edilir. Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) lizozomal bir enzimdir ve pratikte pek çok hayvanın gerek doku ve gerekse perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılmaktadır [1-10]. ANAE, T-lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanılan bir enzimdir [11]. Yapılan bir çalışmada, sığır fütüslerinin perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlanmış, gebeliğin ilerlemesi ile birlikte pozitif lenfosit oranlarının da arttığı tespit edilmiştir [12]. ANAE enziminin diğer esteraz grubu enzimler gibi aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiği düşünülmektedir [1]. ANAE enzimi özellikle başta insan olmak üzere [13,14], sığır [15,16], tavuk [17], köpek [18] ve farede [1] T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir. Asit hidrolazlar grubundan olan asit fosfataz (ACP) enzimi ise, miyelositler, polimorf nükleer lökositler, lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulcukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir [19]. Özellikle makrofajların çok güçlü ACP aktivitesi gösterdiği bilinmektedir [13]. ACP enzimi de özellikle insanda T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir [11,20]. Pek çok evcil hayvanın yanı sıra fil [21], ayı [22], yarası [23], kör fare [24] ve kirpi [25] gibi bazı egzotik memeli türlerin perifer kan hücrelerinde ve özellikle lenfositlerinde ANAE ve ACP pozitifite tipleri ve bunların oranları belirlenmiştir.

Yer sincapları Rodentia (kemirgenler) ordosunun Sciuridae familyasındaki *Spermophilus* cinsinde yer alan karasal memeli hayvanlardır. Küçük kulakları ve kısa kuyruklarıyla dikkat çekerler. *Spermophilus* cinsi Türkiye'de üç türle temsil edilmektedir. Bunlardan *Spermophilus citellus* Trakya'da, *Spermophilus xanthopyrmnus* ve *Spermophilus taurensis* ise Anadolu'da yayılış göstermektedirler [26,27].

Anadolu'daki yer sincaplarıyla ilgili yapılmış çeşitli sitogenetik [26,27] çalışmalar bulunmakla birlikte, *S. xanthopyrmnus*'un bazı hematolojik ve kan biyokimyasal değerleri üzerine yapılan bir çalışma [28] hariç yer sincaplarının dokuları üzerinde yapılmış histolojik ve enzim histokimyasal bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Konya bölgesinden elde edilen iki yer sincabı türünün (*S. taurensis* ve *S. xanthopyrmnus*) perifer kan lenfosit oranları ile ANAE pozitif (ANAE(+)) ve ACP pozitif (ACP(+)) lenfosit oranlarının ışık mikroskopik düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmanın materyalini ekolojik bir çalışma esnasında 2008 ve 2009 yıllarının Mayıs-Temmuz aylarında yakalanan sağlıklı altı adet *Spermophilus taurensis*'den (1 ♂, 5 ♀♀, Hadim, Konya) (Şekil 1) ve dört adet *Spermophilus xanthopyrmnus*'dan (1 ♂, 3 ♀♀, Selçuklu, Konya) elde edilen kan örnekleri oluşturmuştur. Arazide usulüne uygun bir şekilde hayvanların femoral veninden heparinli tüplere alınan 0.5 ml kan (10 IU heparin ml<sup>-1</sup> kan) soğuk zincirle kısa süre içinde laboratuara ulaştırılmış ve her bir kan örneğinden altı adet frotiler hazırlanarak havada kurutulmuştur. Bu frotilerden ikisi rutin May-Grünwald Giemsa boyama yöntemiyle [29] boyanarak, etanol serisinde dehidrasyon ve ksilolde şeffaflaştırma basamaklarından sonra entellan (Merck KgaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır. Bu

preparatlarda lenfosit oranları (%) ışık mikroskopunda immersiyon objektif yardımıyla her birey için 200 akyuvar değerlendirilerek belirlenmiştir.



**Şekil 1.** Arazide kan örneği alınan ve serbest bırakılan bir *Spermophilus taurensis*.

Diğer dört froti enzim demonstrasyonu için -10°C'deki fosfat tamponlu glutaraldehit-aseton tespit solüsyonunda (pH=4.8) 3 dakika tespit edilmiş ve distile su ile üç kez yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu frotilerden ikisine ANAE demonstrasyonu diğer ikisine ACP demonstrasyonu uygulanmıştır.

*ANAE demonstrasyonu;*

pH'sı 5.0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0.8 ml aseton içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate N-8505, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen, Germany) yavaş yavaş damlatılmıştır. Ardından 2.4 ml %4'lük sodyum nitrit (1.06544, Merck) solüsyonu ile 2.4 ml pararozanilin (P-3750, Sigma-Aldrich) (1 g pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun karıştırılarak 2 dakika süreyle bekletilmesiyle elde edilen 4.8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklenmiştir. Hazırlanan solüsyonun pH'sı, 1 N NaOH solüsyonu ile 5.8'e ayarlandıktan sonra süzölmüştür. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde frotiler 37°C'de en az 2 saat süreyle kontrollü bir şekilde bekletilmiş, kırmızı-kahverengi granüllerin şekillenmesinin ardından inkübasyon işlemi sona erdirilmiştir.

*ACP demonstrasyonu;*

Tampon solüsyonu olarak pH'sı 5 olan tamponlu Michael'ın Veronal-asetat solüsyonu, substrat solüsyonu olarak 1 ml N,N-dimetilformamide içerisinde çözdürülmüş 10 mg naphthol AS-BI phosphate (N-2125, Sigma) kullanılmıştır. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu, 13 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 1.6 ml hekzazotize edilmiş (0.8 ml

pararozanilin, 0.8 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklenmiştir. Karışımın son pH'sı 1 N NaOH solüsyonu ile 5.0'e ayarlandıktan sonra süzümüştür. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri 37°C'de kontrollü bir şekilde pembe-kırmızı granüller şekilleninceye kadar en az 2 saat süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda üçer defa distile suyla yıkanan preparatlara 20 dakika süreyle 0.1 M asetat tamponunda (pH=4.2) hazırlanan %1'lik methyl-green (C.I.N. 2585, Merck) çekirdek boyası uygulanmış, preparatlar etanol serisinde dehidrasyon ve ksilolde şeffaflaştırma basamaklarından sonra entellan (Merck) ile kapatılmıştır.

#### *Enzim demonstrasyonlarının değerlendirilmesi;*

ANAE demonstrasyonunda lenfosit morfolojisine sahip 1-5 arasında değişen sayıda kırmızı-kahverengi granüle sahip olan hücreler ANAE(+)<sup>1</sup> lenfositler, farklı tipte reaksiyon gösterenler ANAE(+)<sup>2</sup> lenfositler ve reaksiyon vermeyenler ANAE(-) lenfositler olarak kabul edilmiştir. ACP demonstrasyonunda ise 1-3 arasındaki sayıda pembe-kırmızı granüle sahip hücreler ACP(+) lenfositler ve reaksiyon vermeyenler ACP(-) lenfositler olarak kabul edilmiştir. Işık mikroskopik incelemelerde immersiyon objektifiyle her birey için 200 adet lenfosit değerlendirilerek ANAE(+)<sup>1</sup>, ANAE(+)<sup>2</sup>, ANAE(-), ACP(+) ve ACP(-) lenfosit oranları (%) belirlenmiştir. Enzim demonstrasyonları ve değerlendirmeler Özparlak ve ark. [25] ile Sur ve ark. [30]'na göre gerçekleştirilmiştir.

#### *İstatistiksel analiz;*

*S. taurensis* ve *S. xanthopyrmyrus*'un lenfosit oranları ve enzim pozitivite oranları arasındaki farklar ile her bir türün enzim pozitivite oranları arasındaki farklar nonparametrik Mann-Whitney U testiyle karşılaştırılmıştır. Verilere istatistiksel analizler SPSS paket programında (SPSS 9.0.0, SPSS Inc., Chicago 60606, USA) uygulanmıştır.

## **Sonuçlar**

*S. taurensis* ve *S. xanthopyrmyrus*'un perifer kan örneklerinden hazırlanmış ve May-Grünwald Giemsa ile boyanmış preparatlardaki lenfositlerden biri Şekil 2.a'da görülmektedir. Bu iki türe ait ortalama lenfosit oranları ise Tablo 1'de verilmiş ve iki tür arasında lenfosit oranı bakımından istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ).

Her iki yer sincabı türünde de ANAE demonstrasyonu sonucunda lenfositlerin çoğunluğu pozitif sonuç vermiştir. ANAE(-) lenfositlerin oranı *S. taurensis*'de %11.80 ve *S. xanthopyrmyrus*'da %11.25'dir. ANAE(-) bir lenfosit Şekil 2.b'de görülmektedir. ANAE(+) lenfositlerde iki tip granüler pozitivite tespit edilmiştir. *S. taurensis*'de lenfositlerin %73.78'inde ve *S. xanthopyrmyrus*'da %77.75'inde sayıları 1-5 arasında değişen kırmızı-kahverengi iri granüller (ANAE(+)<sup>1</sup>, nokta tarzında pozitivite) gözlenmiştir (Şekil 2.c-d). *S. taurensis*'de lenfositlerin %14.42'sinde ve *S. xanthopyrmyrus*'da %11.25'inde çok sayıda dağınık küçük granüller (ANAE(+)<sup>2</sup>, yaygın ince granüler pozitivite) gözlenmiştir (Şekil 2.e). İki tür arasında ANAE(+)<sup>1</sup> ve ANAE(+)<sup>2</sup> lenfosit oranları bakımından istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ , Tablo 1). Nokta tarzında pozitivite gösteren ANAE(+)<sup>1</sup> hücrelerde granüller çoğunlukla hücre zarının hemen altında lokalize olmakla birlikte nadiren sitoplazmanın değişik yerlerinde de gözlenmiştir. Yaygın granüler pozitivite gösteren ANAE(+)<sup>2</sup> hücrelerde ise granüllerin sitoplazmanın her tarafına dağılmış olduğu dikkat çekmiştir. Bunun yanı sıra ANAE demonstrasyonu sonucunda monositler genellikle sitoplazmalarında güçlü ve yaygın tarzda pozitivite gösterirken (Şekil 2.f), nötrofiller ise çok zayıf bir reaksiyon vermiştir (Şekil 2.g).

ACP demonstrasyonu sonucunda da her iki yer sincabı türünde lenfositlerin çoğunluğu pozitif sonuç vermiş bununla birlikte tek tip pozitivite dikkat çekmiştir. ACP(+) lenfositlerde sayıları 1-3 arasında değişen pembe-kırmızı renkli ve genellikle küçük granüller (granüler tarzda pozitivite) gözlenmiştir. ACP pozitif hücrelerde granüller çoğunlukla hücre zarının hemen altında lokalize olmakla birlikte bazen sitoplazmanın değişik yerlerinde de gözlenmiştir. ACP(-) ve

ACP(+) lenfositler Şekil 2.h-j'de görülmektedir. ACP(+) lenfositlerin oranı *S. taurensis*'de %74.11 ve *S. xanthopyrmnus*'da %78.50'dir. İki tür arasında ACP(+) lenfosit oranı bakımından istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ , Tablo 1). Ayrıca ACP demonstrasyonu sonucunda da ANAE demonstrasyonunda olduğu gibi monositler genellikle sitoplazmalarında güçlü ve yaygın tarzda pozitivite gösterirken (Şekil 2.k), nötrofiller ise çok zayıf bir reaksiyon vermiştir (Şekil 2.l).

Ayrıca her bir türün ANAE(+)<sup>1</sup> ve ACP(+) lenfosit oranları arasında da istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ , Tablo 1).

**Tablo 1.** *Spermophilus taurensis* (n=6) ve *Spermophilus xanthopyrmnus*'un (n=4) perifer kan lenfosit oranları ile lenfositlerin ANAE ve ACP pozitivite oranları

Türler	Perifer Kan Lenfosit Oranı (%)	Perifer Kan ANAE Pozitif Lenfosit Oranı (%)			Perifer Kan ACP Pozitif Lenfosit Oranı (%)	
		ANAE(+) <sup>1</sup>	ANAE(+) <sup>2</sup>	ANAE(-)	ACP(+)	ACP(-)
<i>S. taurensis</i>	61.22±4.86 <sup>z</sup>	73.78±6.85	14.42±4.84	11.80±4.17	74.11±7.28	25.89±7.28
<i>S. xanthopyrmnus</i>	60.25±4.27	77.75±7.68	11.00±6.22	11.25±2.50	78.50±9.29	21.50±9.29

<sup>z</sup>  $\bar{x} \pm SS$

Aynı sütunda perifer kan lenfosit oranı ile perifer kan ANAE ve ACP pozitif lenfosit oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur ( $p>0.05$ ) (Mann-Whitney U Testi)

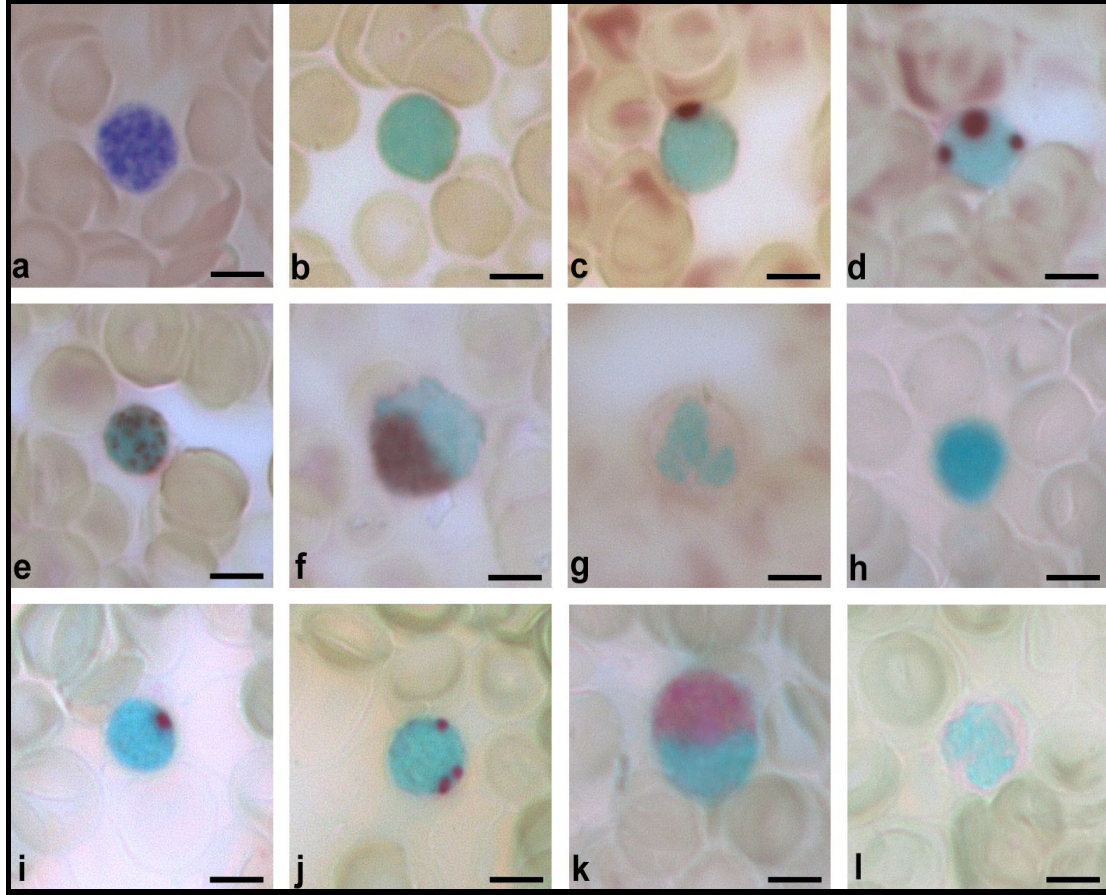
Aynı satırda perifer kan ANAE(+)<sup>1</sup> ve ACP pozitif lenfosit oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur ( $p>0.05$ ) (Mann-Whitney U Testi)

## Tartışma

*S. taurensis* ve *S. xanthopyrmnus*'un perifer kan lenfositlerinin May-Grünwald Giemsa boyaması sonucu diğer memeli türlerin lenfositleriyle tamamen benzer morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir. Lenfosit oranı memeli hayvanlardan tavşanlar için %54.2-%73.3, kobay için %71.4, ratlar için %68.0-71.1, fareler için %74.3-76.9, kör fareler için %73.5 ve karpiller için %64.3-65.5 olarak bildirilmiştir [24,25,31,32]. Bu çalışmada iki farklı yer sincabı türü için tespit ettiğimiz %61.22 ve %60.25'lik lenfosit oranları kemirgen memelilerden ratlara, kobaylara, farelere, kör farelere ve karpilere oranla daha düşük bulunmuştur.

Lenfosit, monosit ve makrofajlarda ANAE demonstrasyonu sonucu bu enzimin pozitivitesinin farklı şekillerde gözlemlendiği bilinmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde iki farklı pozitivite tipinden bahsedilmiştir [2,8,14]. Bunlardan birincisi, bir veya birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tipindeki pozitivite (Dot-Like Positivity Pattern) olup T-lenfositlere özgüdür [2-4,8,9,16,18]. İkinci tip pozitivite tipi ise ince granüler boyanmadır (Fine Granular Positivity Pattern). Bu tip pozitivitenin "Null Cells" olarak adlandırılan hücrelere özgü olduğu ifade edilmektedir [2,14]. B-lenfositlerin ise ANAE enzimi için negatif reaksiyon verdiği bildirilmektedir [1,2,5,6,14,33]. Bunun yanı sıra monosit ve makrofajlarda sitoplazmada yaygın ve güçlü bir pozitivite gözlemlendiği bildirilmiştir [2,14,16,33,34]. Nötrofillerin ise memelilerde çoğunlukla zayıf pozitivite verdiği belirtilmiştir [34]. Bu çalışmada da benzer şekilde her iki yer sincabı türünün perifer kanında ANAE demonstrasyonu sonucu lenfositler hem nokta tipinde hem de ince granüler tipte pozitivite sergilemiştir. Yine benzer şekilde monositler yaygın ve güçlü bir pozitivite, nötrofiller ise çok zayıf bir pozitivite göstermiştir. Bu çalışmada nokta tipinde pozitivite gösteren lenfositler ANAE(+)<sup>1</sup> kabul edilmiştir. Bununla birlikte ANAE enziminin yer sincaplarında T-lenfositlere özgü olduğu konusunda bir literatür bilgisi olmadığı için ışık mikroskopik düzeydeki bu çalışma ile ANAE(+)<sup>1</sup> lenfositlerin T-lenfositler, ANAE(-) lenfositlerin B-lenfositler olduğu sonucuna varılamamaktadır. Bu çalışmada yaygın ince granüler pozitivite

gösteren lenfositler ise ANAE(+)<sup>2</sup> kabul edilmiştir. Çok daha düşük orandaki bu hücrelerin ise Null hücreleri olması muhtemeldir.



**Şekil 2.** a) May-Grünwald Giemsa ile boyanmış bir lenfosit b) ANAE demonstrasyonunda pozitive göstermeyen ANAE(-) lenfosit c) Tek granüllü ANAE(+)<sup>1</sup> lenfosit d) Üç granüllü ANAE(+)<sup>1</sup> lenfosit e) Yaygın, çok sayıda ve ince granüler pozitive gösteren ANAE(+)<sup>2</sup> lenfosit f) Sitoplazmasında yaygın ve güçlü tarzda ANAE pozitivitesi gösteren monosit g) Sitoplazmasında çok zayıf ANAE pozitivitesi gösteren nötrofil h) ACP demonstrasyonunda pozitive göstermeyen ACP(-) lenfosit i) Tek granüllü ACP(+) lenfosit j) Üç granüllü ACP(+) lenfosit k) Sitoplazmasında yaygın ve güçlü tarzda ACP pozitivitesi gösteren monosit l) Sitoplazmasında çok zayıf ACP pozitivitesi gösteren nötrofil (Bar= 5 µm).

İnsan perifer kanı üzerinde yapılan bir çalışmada, en güçlü ACP aktivitesi monosit ve eozinofillerde görülmüş, bazofillerin ise negatif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir [35]. Bir başka çalışmanın sonuçlarında insan perifer kanındaki lenfositlerin birkaç adet iri granülden oluşan granüler enzim pozitivitesi gösterdikleri, monositlerin ise soluk ve sitoplazmaya dağılmış haldeki ince granüllerden oluşan yaygın pozitive gösterdikleri bildirilmiştir [36]. Neoplastik ve non-neoplastik insan lenf düğümlerinde yapılan bir çalışmada ise, ACP için biri hem lenf düğümü hem de perifer kan frotilerindeki T-lenfositlerinde gözlenen globuler pozitive ve sadece lenf düğümündeki T-lenfositlerinde tespit edilen granüler pozitive tiplerinden bahsedilmiştir [20]. Kobay, fare ve ratların timuslarındaki lenfositlerde, bir ya da birkaç iri granül halinde veya sitoplazmanın bir kutbunda toplanmış küçük granüler tarzdaki ACP pozitivitesi, dalak ve lenf düğümündeki lenfositlerde ise yaygın non-granüler pozitive gözlenmiştir [37,38]. İnsanlarda

timustaki lenfositlerde erken fetal dönemde kazanılan ACP pozitifitesinin doğumdan sonra da perifer kan T-lenfositlerinde güçlü bir şekilde gözlemlendiğini bildirilmiştir [11]. Bununla birlikte tavukların T-lenfositlerinde ACP pozitifiteleri konusunda farklı görüşler mevcuttur. Bazı araştırmacılara göre bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin korteks ve medullaları ile timusun hem korteks ve hem de medulasında ACP pozitif lenfositlerin bulunmasından dolayı ACP enziminin tavuk T-lenfositlerine özgü olmadığı bildirilmiştir [39,40]. Bazı araştırmacılar ise ACP enziminin tavuklarda B-lenfositlere özgü olduğunu ileri sürmektedir [41,42]. Bu çalışmada her iki yer sincabı türünde de ACP demonstrasyonu sonucu lenfositlerde 1-3 adet küçük granüler tarzda pozitifite tespit edilmiştir. Bununla birlikte ACP enziminin yer sincaplarında T-lenfositlere özgü olduğu konusunda bir literatür bilgisi olmadığı için ışık mikroskopik düzeydeki bu çalışma ile ACP(+) lenfositlerin T-lenfositler olduğu sonucuna varılamamaktadır.

Farklı memeli türlerinin perifer kanlarındaki ANAE(+)<sup>1</sup> ve ACP(+) lenfosit oranları oldukça değişiklik göstermektedir. İnsanlarda %69-75 [6,14], köpeklerde %56-78 [18,34], kedilerde %64 [34], domuzlarda %59 [34], sığırlarda %47.7-%56.1 [16,34], develerde %81.3 [43], tavşanlarda %34 [32], yarasalarda %44.8-52.6 [23], kör farelerde %73.5 [24] ve kirpelerde %36.6-51.3 [25] oranında ANAE(+)<sup>1</sup> lenfosit bulunduğu bildirilmiştir. Melez köpeklerin perifer kanlarında %62.64 oranında ANAE(+)<sup>1</sup> lenfosit, %46.74 oranında ACP(+) lenfosit belirlenirken [44], erkek ve dişi Kangal köpeklerinde sırasıyla %63.13 ve %60.75 oranında ANAE(+)<sup>1</sup> lenfosit, %39.40 ve %39.13 oranında ACP(+) lenfosit belirlenmiştir [30]. Farklı yaşlardaki Merinos ırkı erkek kuzularda yapılan bir çalışmada ise hayvanların yaşına bağlı olarak değişmekle birlikte %66.37-83.54 oranında ANAE(+)<sup>1</sup> ve %21.12-42.62 oranında ACP(+) lenfosit belirlenmiştir [45]. Ratlarda ACP(+) lenfosit oranı yaklaşık %60 olarak belirlenmiş ve farelerde bu oranın daha düşük olduğu vurgulanmıştır [46]. Yukarıda bahsedilen memeli türlerine kıyasla bu çalışmada her iki yer sincabı türünün perifer kanlarından elde ettiğimiz %73.78 ve %77.75'lik ANAE(+)<sup>1</sup> lenfosit oranı ve %74.11 ve %78.50'lik ACP(+) lenfosit oranı ise genel olarak yüksek kabul edilebilir. Bu çalışmada *S. taurensis* ve *S. xanthopymnus*'un perifer kanlarındaki lenfosit oranları ile ANAE(+)<sup>1</sup> ve ACP(+) lenfosit oranları arasında farklar gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak bu farklar önemli düzeyde değildir. Bu durum Anadolu'da yayılış gösteren bu iki türün yakın akraba olmasıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca her bir türün ANAE(+)<sup>1</sup> ve ACP(+) lenfosit oranları birbirine çok yakındır ve aralarındaki farklarda istatistiksel olarak önemli düzeyde değildir. ANAE(+)<sup>1</sup> ve ACP(+) lenfosit oranlarının birbirine bu derece yakın çıkması bu iki enzimin yer sincaplarında T lenfositlere özgü olduğuna işaret edebilir.

Enzim histokimyasal teknikler, insan ve çeşitli hayvan türlerinin bağışıklık sistemleri üzerinde yapılan deneysel çalışmaların yanı sıra bazı hastalıkların teşhisinde ve sınıflandırılmalarında kullanılmaktadır. Bu sebeple kan hücrelerinin sayı ve oranlarının ayrıca kan hücrelerinden özellikle lenfositlerin enzimatik özelliklerinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Sağlıklı yer sincaplarının perifer kan lenfositleri üzerine yapılan bu çalışmadan elde edilen veriler bu türlerin biyolojilerine ve bundan sonra yapılacak olan benzer çalışmalara katkıda bulunacaktır.

### **Teşekkür**

Bu çalışmanın materyalini oluşturan kan örneklerinin teminini sağlayan Doç. Dr. Atilla ARSLAN'a teşekkür ederim.

### **Kaynaklar**

1. Mueller, J., Brundel G., Buerki, H., Keller, H.U., Hess, M.W. and Cottier, H. **Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes.** Eur. J. Immunol. 5: 270-274 (1975)
2. Higgy, K.E., Bums, G.F. and Hayhoe, F.G.J. **Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry.** Scand. J. Haematol. 18: 437-448 (1977)
3. Knowles, D.M. and Holck, S. **Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase.** Lab. Invest. 39 (1): 70-76 (1978)



4. Knowles, D.M., Hoffman, H.T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G. **The demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker.** Cell Immunol. 35: 112-123 (1978)
5. Pangalis, G.A., Waldman, S.R. and Rappaport, H. **Cytochemical findings in human nonneoplastic blood and tonsillar B and T lymphocytes.** Am. J. Clin. Pathol. 69: 314-318 (1978)
6. Ranki, A. **Non-specific esterase activity in human lymphocytes.** Clin. Immunol. Immunopathol. 10: 47-58 (1978)
7. Knowles, D.M. and Halper, J.P. **Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity.** J. Immunol. 125 (6): 2823-2825 (1980)
8. Zicca, A., Zeprini, A., Cadoni, A., Franzi, A.T., Ferrarini, M. and Grossi, C.E. **Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human T<sub>m</sub> lymphocytes.** Am. J. Pathol. 105 (1): 40-46 (1981)
9. Pruthi, A.K., Gupta, R.K.P. and Sadana, J.R. **Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens.** J. Vet. Med. A. 34: 390-392 (1987)
10. Ramos, J.A., Ramis, A.J., Marco, A., Domingo, M., Rabanal, R. and Ferrer, L. **Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine.** Am. J. Vet. Res. 53 (8): 1418-1426 (1992)
11. Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A. and ZanESCO, L. **Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes.** Brit. J. Haematol. 44: 577-582 (1980)
12. Çelik, İ., Aştı, R.N. ve Boyraz, M.Ü. **Siğır fötal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar.** S.Ü. Vet. Fak. Derg. 8 (2): 41-44 (1992)
13. Li, C.Y., Yam, L.T. and Crosby, W.H. **Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen.** J. Histochem. Cytochem. 20 (12): 1049-1058 (1972)
14. Çelik, İ., Aştı, R.N. ve Ergene, N. **İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immüoglobülinlerinin immüoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi.** S.Ü. Tıp Fak. Derg. 7 (4): 497-503 (1991)
15. Yang, T.J., Jantzen, P.A. and Williams, L.F. **Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T- and B lymphocytes.** Immunology 38: 85-93 (1979)
16. Kajikawa, O., Koyama, H., Yashikawa, T., Tsubaki, S. and Saito, H. **Use of alpha-naphthyl acetate acid esterase staining to identify T lymphocytes in cattle.** Am. J. Vet. Res. 44 (8): 1549-1552 (1983)
17. Maiti, N.K., Saini, S.S. and Sharma, S.N. **Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes.** Vet. Res. Commun. 14: 207-210 (1990)
18. Wulff, J.C., Sale, G.E. Deeg, H.J. and Storb, R. **Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes.** Exp. Hematol. 9 (8): 850-870 (1981)
19. Catowsky, D. **Leucocyte cytochemical and immunological techniques.** In: Practical Haematology. Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (eds.). Churchill Livingstone, 7<sup>th</sup> edition, pp. 143-174 (1981)
20. Yang, K., Bearman, R.M., Pangalis, G.A., Zelman, R.J. and Rappaport, H. **Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes.** Am. J. Clin. Pathol. 78 (2): 141-149 (1982)
21. Rajan, A., Vikram-Reddy, M., Sulochana, S. and Valsala, K. V. **Demonstration of T lymphocyte distribution in the peripheral blood of Indian elephant (*Elephas maximus*) using acid alpha naphthyl acetate esterase activity as a T cells marker.** Afr. J. Clin. Exp. Immun. 2: 357-362 (1981)
22. Salakij, J., Salakij, C., Narkkong, N.A., Trongwonsa, L. and Pattanarangsarn, R. **Hematology, cytochemistry and ultrastructure of blood cells in asiatic black bear (*Ursus thibetanus*).** Kasetsart J. Nat. Sci. 39: 247-261 (2005)
23. Telatar, T., Arslan, A., Sur, E., Öznurlu, Y. ve Özparlak H. **Üç Farklı Yarasa Türünün Perifer Kan Lenfositleri Üzerine Enzim Histokimyasal Bir Çalışma.** S. Ü. Fen Ed. Fak. Fen. Derg. 32: 1-7 (2008)



24. Özparlak, H., Sur, E., Öznurlu, Y. ve Arslan, A. **Konya Bölgesindeki Kör Farelerin Perifer Kan Lenfositleri Üzerine Enzim Histokimyasal Bir Çalışma.** S. Ü. Fen Ed. Fak. Fen. Derg. 35: 1-8 (2010)
25. Özparlak, H., Çelik, I., Sur, E., Özyaydin, T. and Arslan, A. **A study of peripheral blood in hedgehogs in Turkey.** J. Zoo Wild. Med. 42(3): 392-398 (2011)
26. Arslan, A. **Cytogenetic studies on *Spermophilus xanthoprimum* (Rodentia: Sciuridae) in Central Anatolia.** Folia Zool. 54(3): 278-284 (2005)
27. Arslan, E. and Arslan, A. **Heterochromatin distribution and nucleolar organizer regions (NORs) in chromosomes of the Taurus ground squirrel, *Spermophilus taurensis* Gunduz et al., 2007 (Mammalia: Rodentia), in Turkey.** Turk. J. Zool. 34: 105-110 (2010)
28. Gazyağci, S., Aşan, N. ve Albayrak, İ. **İç anadolu'daki anadolu yer sincabı, *Spermophilus xanthoprimum* (Bennett, 1835)'un hematolojik ve kan biyokimyasal değerleri üzerine bir ön çalışma.** TÜBAV Bilim 2 (4): 462-464 (2009)
29. Konuk, T. **Pratik Fizyoloji.** A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, 378, A.Ü. Basımevi, Ankara (1981)
30. Sur, E., Celik, I., Oznurlu, Y., Aydin, M.F., Sen, I. and Ozparlak, H. **Enzyme histochemistry and AgNOR numbers in the peripheral blood leukocytes of 6 month-old Kangal bred Anatolian shepherd dogs.** Revue Med. Vet. 154 (10): 591-598 (2003)
31. Jain, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology.** Lea&Febiger (1993)
32. Aydın, M.F., Öznurlu, Y., Çelik, İ., Telatar, T. ve Sur, E. **Ankara tavşanı perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) ve bazı AgNOR parametreleri üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar.** Veterinarium 18: 3-9 (2007)
33. Pinkus, G.S., Hargreaves, H.K., McLeod, J.A., Madler, L.M., Rosenthal, D.S. and Said, J.V.  **$\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity. A cytochemical marker for T-lymphocytes.** Am. J. Pathol. 97: 17-42 (1979)
34. Nakase, Y. and Kobayashi, K. **Cytochemical studies of leukocytes of some animal species III. Esterase stain.** Bull. Azabu Univ. Vet. Med. 5 (1): 1-10 (1984)
35. Goldberk, A.F. and Barka, T. **Acid phosphatase activity in human blood cells.** Nature 21: 292 (1962)
36. Kaplow, L.S. and Burstone, M.S. **Cytochemical demonstration of acid phosphatase in hematopoietic cells in health and various hematological disorders using azo dye techniques.** J. Histochem. Cytochem. 12 (2): 805-812 (1964)
37. Tamaoki, N. and Essner, E. **Distribution of acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase activities in lymphocytes of lymphatic tissues of man and rodents.** J. Histochem. Cytochem. 17 (4): 238-243 (1969)
38. Seymour, G.J., Dockrell, H.M. and Greenspan, J.S. **Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease.** Clin. Exp. Immunol. 32: 169-178 (1978)
39. Glick, B. **Bursa of Fabricius: development, growth, modulation, and endocrine function.** CRC Crit. Rev. Poultry Biol. 1 (2): 107-132 (1988)
40. Moriya, O. and Ichikawa, Y. **Acid phosphatase in lymphoid tissues of developing chick embryos.** Acta Histochem. 87 (2): 99-105 (1989)
41. Graczyk, S. **The effect of anti-bursa serum (ABS) on the intensity of acid phosphatase reaction in bursa-dependent structures of the spleen and on the level of antibodies in the blood serum.** Arch. Vet. Pol. 34 (1-2): 25-36 (1994)
42. Sur, E. and Celik, I. **Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken.** Brit. Poultry Sci. 44 (4): 558-566 (2003)
43. Sandıkçı, M., Kum, Ş. ve Eren, Ü. **Develerin (*Camelus dromedarius*) perifer kan lökositlerinde alfa-naftil asetat esteraz aktivitesinin belirlenmesi.** Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 52: 13-16 (2005)

44. Sen, I., Turgut, K., Celik, I. and Kiran, M.M. **The importance of lymphocyte enzyme profile, inclusion bodies in circulating leukocytes and conjunctival smear samples in the diagnosis on canine distemper virus infection.** Indian Vet. J. 79: 213-217 (2002)
45. Sur, E. **Farklı yaş gruplarındaki Türk merinosu erkek kuzularının perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetatesteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) enzimi aktivitelerinin belirlenmesi.** Veterinarium 15 (1): 15-22 (2004)
46. Goldberk, E.D., Karpova, G.V., Melik-Gaikazyan and Pakhryaeva, G.N. **Content of acid and alkaline phosphatases in lymphocytes of peripheral blood and hematopoietic organs of intact rats and mice.** B. Exp. Biol. Med. 85 (2): 150-151 (1978)