

SİĞİR FÖTAL PERİFER KAN LENFOSİTLERİNİN ALFA-NAFTİL ASETAT ESTERAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNDE IŞIK MİKROSKOPİK ÇALIŞMALAR

İlhami Çelik¹

Reşat N. Aştı²

Mustafa Ü. Boyraz³

Light microscopic studies on the alpha-naphthyl acetate esterase activity of the fetal bovine peripheral blood lymphocytes

Summary : *In this study, first appearance time of the alpha-naphthyl acetate esterase positive lymphocytes in the fetal peripheral blood were determined by demonstrating of the alpha-naphthyl acetate esterase. Positively stained lymphocytes were first seen in the peripheral blood smears of the fetuses in 60 days old.*

Large majority of the alpha-naphthyl acetate esterase pozitive lymphocytes showed localised granular positivity, whereas, in the smaller numbers of positive cells, a diffuse granular staining pattern was observed.

Neutrophyls were negative. Monocytes displayed a diffuse granular staining pattern.

The frequency of the alpha-naphthyl acetate esterase pozitive lymphocytes increased with the fetal age and the highest levels were determined in the 240 th day of the gestation.

Özet : *Bu çalışmada sığırların fotal perifer kanındaki alfa-naftil asetate esteraz pozitif lenfositlerin ilk ortaya çıktığı dönem bu enzimin sitokimyasal yolla demonstrasyonu ile belirlendi. Pozitif lenfositlere ilk olarak 60 günlük fütüslerin perifer kanında rastlandı.*

Pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğu lokalize granüler pozitivite gösterirken, daha az orandaki lenfositte diffüz granüler pozitivite gözlemlendi.

Nötrofillerin negatif reaksiyon verdikleri tespit edildi. Monositler diffüz granüler pozitivite göstermekteydi.

Gebeliğin ilerlemesiyle birlikte, alfa-naftil asetate esteraz pozitif lenfositlerin oranlarında da artışlar tespit edildi ve 240 günlük fütüslerde bu hücrelerin oranları en yüksek seviyedeydi.

Giriş

T-lenfositleri hemopoetik organlardan timusa gelen lenfositlerin timik faktörlerin etkisi altında olgunlaşmalarıyla meydana gelirler (5). Perifer kana geçen T-lenfositleri lenf yumrularındaki lenf folliküllerinin şinüslara bakan yüzlerinde, dalakta ise periarteriyoller

kılıf içinde (Timusa bağımlı bölgeler) lokalize olurlar (5,6,18).

Timus, karnivorlarda gebeliğin kırkinci, atlarda altmışinci, koyunlarda ise otuzaltıncı gününde fonksiyona başlamaktadır (23). İnsanlarda ise gebeliğin sekiz ile dokuzuncu haftalarında timus dokusunda küçük tip lenfositlere rastlanmaktadır. Bu dönemde perifer kanda da küçük lenfositlere rastlandığı bildirilmiştir (5). Gebeliğin onikinci ve onaltıncı haftalarında dalak, lenf yumruları ve kemik iliğindeki lenfosit sayılarında önemli artışların olduğu, gebeliğin dördüncü ayında ise bu organlardaki lenfosit sayılarının en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (5).

Fötal hayatta timusun korteks bölgesine gelen lenfositler burada süratle çoğalırlar ve bunların çok azı medullaya geçerek olgun T-lenfosit karakterlerini kazanırlar (5). Basso ve ark. (2), insan fotal timositlerinin olgunlaşma aşamalarına bağlı olarak dört farklı enzimatik profil gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılara (2) göre, dördüncü fenotipte yer alan olgun T-lenfositleri asit fosfataz (AcP), beta-glukuronidaz (BG), asit alfa-naftil asetate esteraz (ANAE), N-asetil beta glukuronidaz (NABG) ve alfa-naftil bütirat esteraz (NBE) enzimlerine sahiptir. ANAE ve NBE enzimleri dışındaki diğer enzimler erken dönem timositlerinde de bulunduğu için, bu iki enzimin, perifer kandaki T-lenfositlerinin belirlenmesinde kullanılabileceği çeşitli araştırmacılar (3,8,9,11,12,14,16,20,24,25) tarafından bildirilmiştir. Mueller ve ark. (16) fare lenf yumrusu kesitleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada timusa bağımlı bölgelerde lokalize olan lenfositlerin % 94'ünün ANAE pozitif sonuç verdiğini tespit etmişlerdir. Knowles ve Halper (13) ise ANAE pozitif timositlerin timusun medullasında lokalize olduğunu, kortikal timositlerin ise ANAE boyamasında negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

1. Yard. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Konya.

2. Prof. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Konya.

3. Arş. Grv., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Konya.

Bu çalışmada fetal dönemde sığır perifer kanında ANAE pozitivitesi gösteren lenfositlerin ortaya çıktığı dönemin saptanması ve bu dönem boyunca ANAE pozitivitesine sahip lenfositlerin oranlarındaki değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Gebeliğin farklı dönemlerdeki toplam 50 adet sığır fötüsünden alınan perifer kan örneği materyal olarak kullanıldı.

1. Kan örneklerinin alınması ve frotilerin hazırlanması:

Kan örnekleri, kesimden hemen sonra uterustan çıkarılan fötüslerin vena jugularislerinden alındı. Fötüs yaşları Fraser'a göre (4) belirlendi. Antikoagülan olarak heparin (10 İÜ/ml. kan) kullanıldı.

Alınan kan örneklerinden hazırlanan frotiler havada kurutuldu ve soğuk (-10°C) glutaraldehid-aseton solüsyonunda 3 dakika tespit edildi. Tespit sonunda frotiler distile suda yıkandı ve havada kurutuldu.

2. Frotilerin boyanması:

Bu amaçla çeşitli araştırmacıların (11,12,16) bildirdiği şekilde 0.067 M'lık 40 ml. fosfat tamponuna (pH 5.0), 2.4 ml. hekzazotize edilmiş pararozanilin (Sigma) solüsyonu ve 0.4 ml. asetonda eritilmiş 10 mg. alfa-naftil asetat (Sigma) eklenerek hazırlanan inkübasyon solüsyonu kullanıldı. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 2N NaOH ile 5.8'e ayarlandı. Oda sıcaklığında dört saatlik inkübasyondan sonra boya solüsyonu dökülerek, frotiler distile suyla yıkandı ve metilen mavisi ile 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı. Distile suyla yıkanan frotiler, dereceli alkollerden ve ksilolden geçirilerek entellanla kapatıldı.

Işık mikroskopik incelemede tipik kahverengi-kırmızı granüllere sahip olan hücreler pozitif olarak değerlendirildi. Monositler tipik çekirdek morfolojileri ve diffüz lokalizasyonlu ince granüler pozitivite vermeleri ile lenfositlerden ayrıldı. Her frotide 200 lenfosit sayılarak pozitif lenfositlerin oranı aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\frac{\text{Pozitif lenfositlerin sayısı}}{\text{Sayılan toplam lenfosit}} \times 100 = \text{Pozitif lenfositlerin yüzdesi.}$$

Bulgular

Yapılan incelemelerde, alfa-naftil asetat pozitivitesi gösteren lenfositlere en erken altmış günlük fötüslerin perifer kanlarında rastlandı (Tablo 1). Bu dönemde oldukça düşük (5%) olan pozitivite oranının, gebeliğin ilerlemesiyle birlikte arttığı ve 240 günlük fötüslerde en yüksek seviyeye (%42) ulaştığı saptandı (Tablo

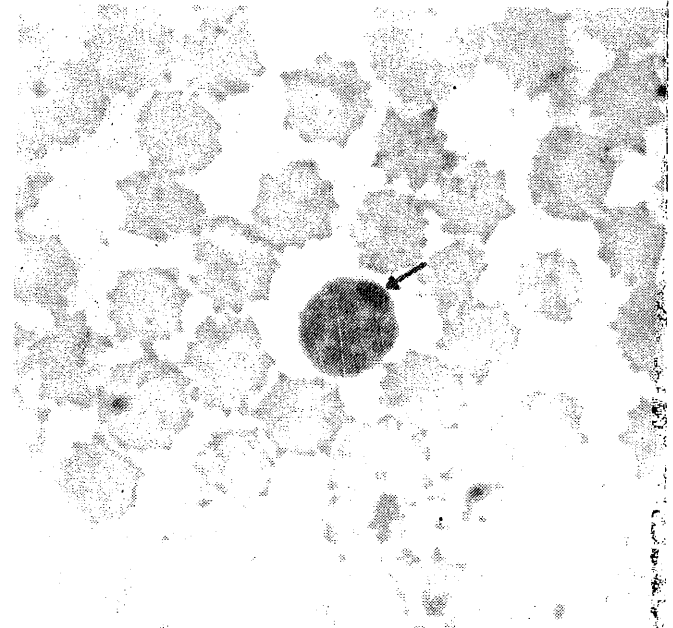
1).

Pozitif lenfositlerde iki farklı pozitivite tespit edildi. Hücrelerin çoğunda sayıları 1-3 arasında değişen, iri ve hücrenin bir kutbunda toplanmış, kahverengi-kırmızı granüller gözlenirken (Resim 1 ok), daha az sayıda lenfositte ise diffüz lokalizasyonlu çok sayıda granül gözlemlendi (Resim 2L).

İri ve tipik çekirdek morfolojisine sahip olan monositlerin diffüz granüler pozitivite gösterdikleri tespit edildi (Resim 3). Nötrofillerde ise negatif reaksiyon görüldü (Resim 2N).

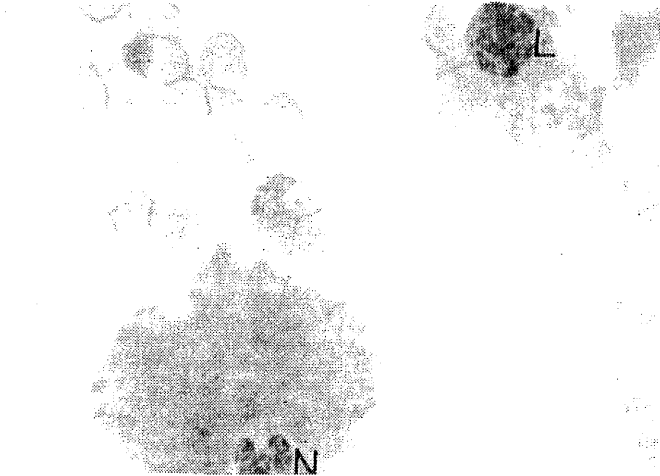
Tablo-1 Gebeliğin değişik dönemlerindeki fötüslerin perifer kanlarında tespit edilen alfa-naftil asetat esteraz pozitif lenfosit oranları.

Fötüs boyu (cm.)	Gebelik dönemi (gün)	Pozitif lenfosit oranı (%)	Negatif lenfosit oranı (%)
3.5-5.0	50	gözlenmedi	100
6-8	60	5	95
7-10	70	14	86
8-13	80	15	85
13-17	90	18	82
22-32	120	20	80
30-45	150	23	77
40-60	180	28	72
55-75	210	34	66
60-85	240	42	58



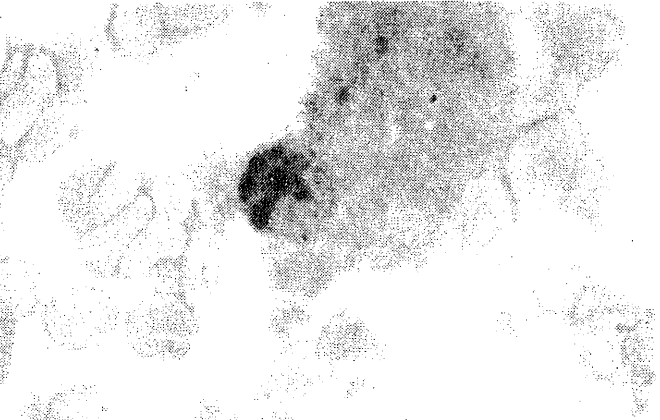
Resim-1 Lokalize granüler pozitivite gösteren lenfosit. OK) Pozitif granül. Alfa-naftil asetat esteraz boyaması. X1400.

Fig- 1 Localised granular positive lymphocyte. Arrow) Positive granule. Alfa-naphthyl acetate esterase staining. X1400.



Resim-2 Diffüz granüler pozitive gösteren lenfosit ve negatif reaksiyon veren nötrofil. L) Lenfosit, N) Nötrofil. Alfa-naftil asetat esteraz boyaması., X1200.

Fig- 2 A diffuse granular positive lymphocyte and a negative neutrophyl. L) Lymphocyte, N) Neutrophyl. Alpha-naphthyl acetate esterase staining., X1200.



Resim-3 Diffüz granüler pozitive gösteren monosit. Alfa-naftil asetat esteraz boyaması., X1200.

Fig- 3 A monocyte showing diffuse granular positivity. Alpha-naphthyl acetate esterase staining., X1200.

Tartışma ve Sonuç

Knowles ve Halper (13), immün yanıt oluşturma yeteneği bulunmayan fare kortikal timositlerinin, alfa-naftil asetat esteraz enzimine de sahip olmadığını, medullada lokalize olan timositlerin önemli bir kısmının ise bu enzime sahip olduklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (13), erken gebelikte medulladaki pozitif hücrelerin oranının oldukça düşük olduğunu ve gebeliğin ilerlemesiyle birlikte bu bölgedeki pozitif hücrelerin sayısının da arttığını tespit etmişlerdir. Mueller ve ark. (16) ise alfa-naftil asetat enziminin, timositlerinin medulladan kortekse geçişleri sırasında kazanıldığını ileri sürmektedir. Basso ve ark. (2) insan erken fetal dönem timositlerinin çok küçük bir oranının alfa-naftil asetat esteraz pozitif olduğu halde, doğum sonunda bu oranın % 4.1'e ulaştığını, perifer kan lenfositlerinin ise % 46'sının pozitif reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir.

Perifer kan lenfositlerinde iki farklı tip alfa-naftil

asetat esteraz pozitivitesi gözlemlendiği çeşitli araştırmacılar (3,7,12,16,20,25) tarafından bildirilmektedir. Higgy ve ark. (7), lokalize granüler pozitivitenin T-lenfositlerinin, diffüz granüler pozitivitenin null hücrelerinin, negatif reaksiyonun da B-lenfositlerinin spesifik reaksiyonları olduğunu bildirmektedir. Zicca ve ark. (25), lokalize granüler pozitivitenin Ig M(T_M), diffüz granüler pozitivitenin ise Ig G yüzey reseptörlerine sahip olan T-lenfositlerinin (T_G) spesifik reaksiyonları olduğunu ileri sürmektedir. Knowles ve ark. (12), diffüz granüler pozitiviteyi zayıf pozitif reaksiyon olarak değerlendirmektedir. Armitage ve ark. (1) ise bu enzimin B-lenfositlerin çok küçük bir oranında da bulunmakla birlikte, T-lenfositlerinin spesifik bir reaksiyonu olarak değerlendirilebileceğini, ancak T-lenfosit alt tiplerinin bu yöntemle belirlenemeyeceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada perifer kan lenfositlerinin lokalize ve diffüz granüler olmak üzere iki belirgin ve farklı reaksiyon verdikleri tespit edildi. Lokalize granüler pozitif reaksiyon veren lenfositler çoğunlukta idi. Bu bulgu, insanlarda (2,3,7,11,12,13,20,25) ve farelerde (16) bildirilen reaksiyon tipleriyle benzerlik göstermektedir. Maiti ve ark. (14) kanatlılarda, Nakase ve Kobayashi (17) çeşitli hayvan türlerinde ve Kajikawa ve ark. (8), normal ve enzootik lökozlu sığırların perifer kanları üzerinde yaptıkları bir çalışmada 45 dakikalık inkübasyon süresi önermektedir. Bu çalışmada yapılan gözlemlerde bu sürede oldukça zayıf boyanmış granüller gözlemlendiğinden, inkübasyon süresi dört saate çıkarıldı. Sekiz saati aşan inkübasyon süresinde ise frotilerde tortular oluştuğu ve bu durumun, değerlendirmeyi zorlaştırdığı gözlemlendi. Bu nedenle sığırlarda en uygun inkübasyon süresinin dört ile sekiz saat arası olduğu sonucuna varıldı.

Mezodermden köken alan kan hücrelerinin, erken embriyonal dönemde vitellüs kesesi mezodermde şekillendiği, daha sonra bu işlemin sırasıyla pirimitif endotel, dalak ve karaciğer tarafından yerine getirildiği, doğumdan sonra kan yapımının kemik iliğinde gerçekleştiği bilinmektedir (22,23).

T-lenfositlerin olgunlaştığı timusta, lenfositler fetal hayatın ikinci haftasında gözlenmektedir (5,10). Yutak endoderminden köken alan epitel hücrelerinin retikulum hücrelerine farklılaşması da bu dönemde başlamaktadır (10). Perifer lenfoid organlara lenfosit göçü ise karnivorlarda gebeliğin kırk-kırksekizinci, atlarda yirmirinci gününden önce başladığı ve doğuma yakın evrede lenf yumrularında germinatif merkezlerin şekillenmiş olduğu bilinmektedir (23). Koyunlarda ise bu olay gebeliğin ellidördüncü gününden önce gerçekleşmektedir. Çünkü, gebeliğin altmışikinci gününden sonra yapılan timektominin, humoral ve selüler yanıtta

önemli bir kayıp oluşturmadığı bildirilmiştir (15). Bu türde gebeliğin ellidört ile altmışıncı günleri arasında timositlerin % 2'sinin, dalaktaki lenfositlerin ise % 5'inin T-lenfositleri için spesifik olan T-80 monoklonal antikoruna karşı pozitif yanıt verdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise sığır fötüslerinin perifer kanlarında gebeliğin altmışıncı gününde T-lenfositlere spesifik olduğu bildirilen alfa-naftil asetat esteraz (8,12,16) enzimi pozitivitesi tespit edildi. Bu bulgu Miyasaka ve ark. (15) nın, T-80 monoklonal antikor ile koyunlarda yaptıkları çalışmada bildirdikleri gebelik evresine yakın olmakla birlikte, altı günlük bir fark bulunmaktadır. Bu farklılığın koyunların gebelik süresinin sığırlarinkinden daha kısa olmasına bağlı olabileceği kanaatine varıldı.

Reeves ve Renshaw (21), rözet oluşturma teknikleriyle yaptıkları bir çalışmada sığır perifer kan lenfositlerinin % 45'inin T, % 26'sının da B-lenfositlerinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Kajikawa ve ark. (8) ise sığır perifer kan lenfositlerinin % 47'sinin alfa-naftil asetat esteraz pozitif, % 26'sının da B-lenfositlerine spesifik yüzey immünoglobülinlerine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ikiyüzkırk günlük fötüslerin perifer kanındaki alfa-naftil asetat esteraz pozitif lenfosit oranı % 42 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu, ergin dönemde T-lenfosit oranlarının Kajikawa ve ark. (8) ile Reeves ve ark. (21)'lerinin bildirdiği oranlardan biraz daha yüksek olabileceğini akla getirmektedir. Nitekim, Paul ve ark. (19), ergin sığırların perifer kanındaki T-lenfositlerin oranının % 63, B-lenfosit oranının da % 11 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanılarak sığırlarda timusda T-lenfositlerin gebeliğin altmışıncı gününde olgunlaşarak, perifer lenfoid organlara göç etmeye başladıkları, perifer kandaki T-lenfosit oranlarının gebeliğin ilerlemesiyle birlikte arttığı sonucuna varıldı.

Kaynaklar

- 1-Armitage, R. J., Linch, D. C., Warman, C. P. and Cowley, J. L. (1982) The morphology and cytochemistry of human T-cell subpopulations defined by monoclonal antibodies and Fc receptors. *British J. Haematol.*, 51, 605-613.
- 2-Basso, G., Cogito, M. G., Semenzato, G., Pezzuto, A. and Zanescio, L. (1980) Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *British J. Haematol.*, 44, 577-582.
- 3-Çelik, İ., Aştı, R., Ergene, N. (1991) İnsan perifer kanındaki B, T ve null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *S. Ü. Tıp Fak. Dergisi.*, 7,4, 497-503.
- 4-Fraser, A. F. (1971) "Animal reproduction. Tabulated data.", Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- 5-Fudenberg, H. H. (1978) "Basic and clinical immunology." 2nd. Edit. Lange Med. publicat., Canada.
- 6-Gutman, G. H., Weissman, I. L. (1972) Lymphoid tissue architecture. Experimental analysis of the origin and distribution of T cells and

B cells. *Immunology.*, 23, 465-479.

- 7-Higgy, K. E., Burns, G. F., Hayhoe, F. G. J. (1977) Discrimination of B, T and null lymphocytes by enterase cytochemistry. *Scand. J. Haematol.*, 18, 437-448.
- 8-Kajikawa, O., Koyama, H., Yoshikawa, T., Tsubaki, S. (1983) Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 44,8, 1549-1552.
- 9-Kan, Y., Bearman, R. M., Pangalis, G. A., Zelman, R. J., Pappaport, H. (1982) Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.*, 78,141-149.
- 10-Kelly, D. E., Wood, R. L., Enders, A. C. (1984) "Bailey's Textbook of microscopic anatomy". Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 11-Knowles, D.M., Holck, S. (1978) Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase. *Lab. Invest.*, 39,1, 70-76.
- 12-Knowles, D. M., Hoffman, H. T., Ferrarini, M., Kunkel, H. G. (1978) The demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. *Cellular Immunol.*, 35, 112-128.
- 13-Knowles, D. M. and Halper, J. P. (1980) Human cortical and medullary thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) activity. *The J. Immunol.*, 125,6, 2823-2825.
- 14-Maiti, N. K., Saini, S. S., Sharma, S. N. (1990). Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Short com.*, 14, 207-210.
- 15-Miyasaka, M., Heron, I., Duddler, L., Cahill, R. N. P., Fermi, L., Knaak, T., Trnka, Z. (1983) Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep: I. Recognition of sheep T-lymphocyte differentiation antigen by a monoclonal antibody T-80. *Immunol.*, 49, 545-552.
- 16-Mueller, G. J., Brun, D. R. G., Buerki, H., Keller, H. U., Hess, M. W. and Cottier, H. (1975) Nonspecific esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur. J. Immunol.*, 5, 272-274.
- 17-Nakase, Y., Kobayashi, K. (1984) Cytochemical studies of leucocytes of some animal species. III. Esterase stain. *Bull. Azabu Univ. Vet. Med.*, 5,1,1-10.
- 18-Nieuvenhuis, P. and Ford, W.L. (1976) Comparative migration of B and T-lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cellular Immunol.*, 23, 254-267.
- 19-Paul, P. S., Senogles, D. R., Muscoplat, C. C., 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, 300-306.
- 20-Franki, A. (1978) Nonspecific esterase activity in human lymphocytes. Histochemical characterization and distribution among major lymphocyte subclasses. *Clin. Immunol. and Immun Pathol.*, 10, 47-58.
- 21-Reeves, J. H., Renshaw, H. W. (1978) Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.*, 39,6, 917-923.
- 22-Schalm, O. W., Jain, N. C., Carrol, e. J. (1975) "Veterinary Hematology". 3rd. Edit. Lea Febiger Co., Philadelphia, U.S.A.
- 23-William, K., Latschaw, D. V. M. (1987) "Veterinary developmental anatomy. A clinically oriented approach". B. C. Decker Inc., Toronto, Canada.
- 24-Yang, T. J., Jantzen, P. A. and Williams, L. F. (1979) Acid alphanaphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T-and B-lymphocytes. *Immunol.*, 38, 85-93.
- 25-Zicca, A., Leprini, A., Cadeni, A., Franz, A. T., Ferrarini, M., Grossi, C. E. (1981) Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human T_m lymphocytes. *Am. J. Pathol.*, 105, 40-46.