

KANGAL BALIKLARININ (GARRA RUFa) PERİFER KAN LÖKOSİTLERİNDE ALFA-NAFTİL ASETAT ESTERAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Hasan Hüseyin Dönmez¹@ Emrah Sur¹ Murat Boydak¹

Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood leucocytes of Kangal fish (*Garra rufa*)

Özet: Bu çalışmada Kangal balıklarında perifer kan ANAE pozitif lenfosit oranlarının belirlenmesi amaçlandı. Materyal olarak; 12 adet Kangal balığından alınan perifer kan örnekleri kullanıldı. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için frotilere ANAE demonstrasyon metodu uygulandı. ANAE pozitif lenfosit oranı % 62,06 olarak tespit edildi. Monositlerle, granüositlerin diffuz granüler pozitivite gösterdikleri; eritrositlerle trombositlerin ise negatif reaksiyon verdikleri gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Kangal balığı, ANAE, lenfosit

Summary: The aim of the study was to determine the percentage of peripheral blood ANAE (+) lymphocytes in Kangal fishs by using an alpha-naphthyl acetate esterase procedure. Peripheral blood samples taken from 12 Kangal fishs were used. The percentage of ANAE positive lymphocytes was 62.06%. There was a diffuse granular positivity against ANAE demonstration in monocytes and granulocytes; however negative reaction were observed in erythrocytes and thrombocytes.

Key Words: Kangal fish, ANAE, lymphocyte

Giriş

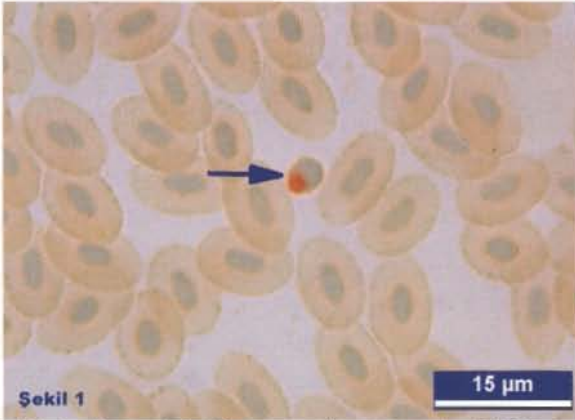
Memelilerde (Kurtde ve ark., 1995) ve karnatlılarda (Dönmez ve ark., 2002; Ergün ve ark., 2004) yapılan enzim histokimyasal çalışmalar bu canlılarda perifer kan T lenfositlerinin alfa naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi taşıdığını ortaya koymaktadır. Bu enzimin B lenfositlerde bulunmadığı, bu nedenle de ANAE enziminin demonstrasyonu T lenfositlerin ayırımında kullanılabilceği kabul edilmektedir (Mueller ve ark., 1981; Pruthi ve ark., 1987). Bu tekniğin ayrıca kötü huylu lenfoid olmayan tümörlerde T lenfositlerin tespitinde de kullanılabilceği bildirilmektedir (Svennevig, 1980). T lenfositlerin bu enzimi timus madulasında olgunlaşmaları esnasında kazandıkları (Basso ve ark., 1980) ve enzimin T lenfositler ile granüositlerin sitoplazmasındaki lizozomlarda lokalize olduğu elektron mikroskopik düzeyde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Yörük ve ark., 1998; Aşti ve ark., 1999).

ANAE enzim demonstrasyonu koyun (Beya ve ark., 1986), sığır (Çelik ve ark., 1994), köpek (Aşti ve ark., 1993), tavuk (Dönmez ve ark., 2002), sülün (Sur ve ark., 2004) gibi çok farklı hayvan tür-

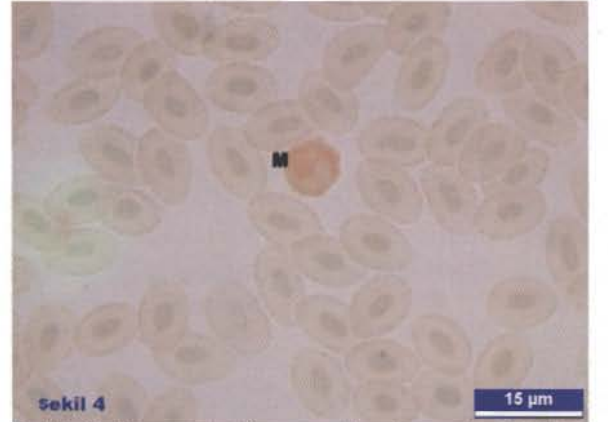
leri ile insanlarda (Pinkus ve ark., 1979; Basso ve ark., 1980) yapılmış ve bu türlerde ANAE (+) lenfosit oranları belirlenmiştir. Blaxhall ve Hood (1985), alabalıklarda T lenfositlerin asit esteraz ve asit fosfataz enzim aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada Sivas-Kangal termallerinde yaşayan ve proteinden fakir beslenmeye bağlı olarak da kolayca insanların derilerine yaklaşılarak cilt üzerindeki ölü deri parçalarını koparan yaklaşık 8–10 cm uzunluğundaki Kangal balıklarında (*Garra rufa*) ANAE (+) lenfosit oranının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

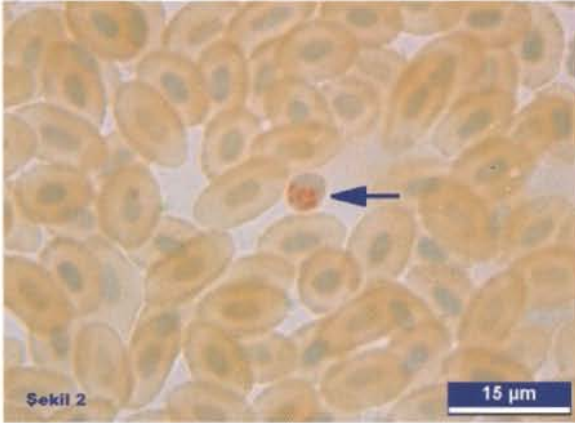
Çalışmada 12 adet 8-10 cm uzunluktaki sağlıklı Kangal balıklarından alınan kan örnekleri materyal olarak kullanıldı. Hazırlanan frotiler (her balıktan 2 adet) oda sıcaklığında kurutulduktan sonra glutaraldehit-aseton tespit sıvısında -10 °C'de 3 dakika süreyle tespit edildi. Tespit edilen frotilere, 0,067 M fosfat tamponunun (pH 5.0) 40 ml'sine 0.4 ml aseptonda eritilen 10 mg alpha naphthyl acetate (Sigma) ve 2,4 ml eşit oranda karıştırılarak hekzozotize edilmiş sodium nitrit (% 4) ve pararosaniline (% 5) (Sigma) solusyonu ilave edildi.



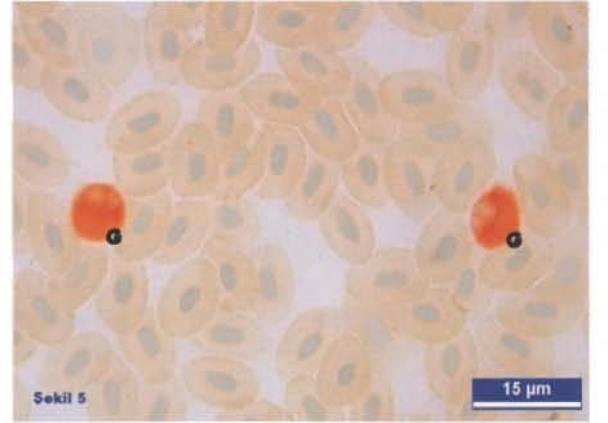
Şekil 1. Kangal balığının perifer kanında ANAE boyaması. Ok: tek granüle sahip ANAE (+) lenfosit. Bar: 15 µm.



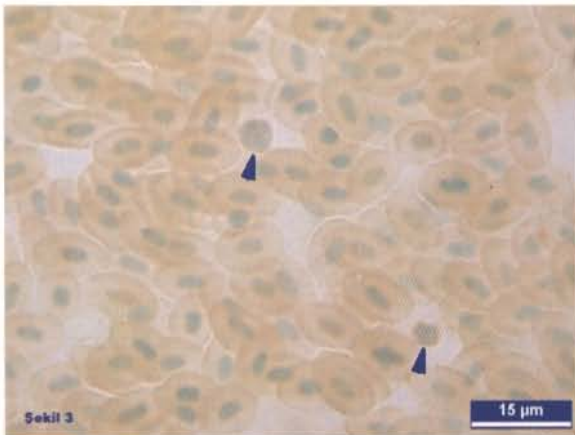
Şekil 2. Kangal balığının perifer kanında ANAE boyaması. M: zayıf difüz granüler boyanma gösteren monosit. Bar: 15 µm.



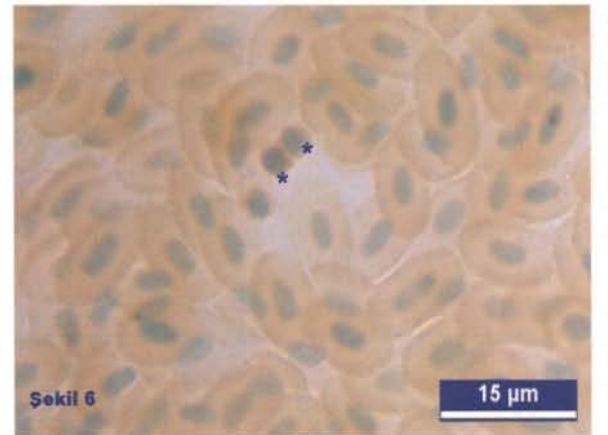
Şekil 3. Kangal balığının perifer kanında ANAE boyaması. Okbaşı: ANAE (-) lenfositler. Bar: 15 µm.



Şekil 4. Kangal balığının perifer kanında ANAE boyaması. G: difüz granüler boyanma gösteren granüositler. Bar: 15 µm.



Şekil 5. Kangal balığının perifer kanında ANAE boyaması. G: difüz granüler boyanma gösteren granüositler. Bar: 15 µm.



Şekil 6. Kangal balığının perifer kanında ANAE boyaması. *: trombositlerin ANAE (-) oldukları görülmekte. Bar: 15 µm.

Daha sonra solusyonun pH'sı 1 N NaOH ile 5,8'e ayarlandı. Frotiler oda sıcaklığında saat başlarında kontroller yapılarak 4 saat süreyle inkübasyon solusyonuna bırakıldı. Inkübasyonun ardından frotilere % 1'lik methyl green ile çekirdek boyaması yapıldı. Preparatlardan her birinde 200 lenfosit olmak üzere toplam 400 lenfosit sayılarak ANAE pozitif lenfosit oranı belirlendi (Maiti ve ark., 1990) ve Leica DFC-320 dijital kamera ile resimleri çekildi.

Bulgular

ANAE pozitivitesi lenfositlerin çoğunluğunda 1-2 adet kahverengi, iri granüler tarzda iken (Şekil 1), bazı lenfositlerde 3 ile 8 arasında değişen küçük granüller (Şekil 2) şeklinde olduğu gözlemlendi. Enzim aktivitesi göstermeyen lenfositler negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3). ANAE pozitif lenfosit oranı % $62,06 \pm 4,18$ olarak tespit edildi (Tablo 1). Monositler (Şekil 4) ile granüositlerin (Şekil 5) difuz granüler pozitivite gösterdikleri, eritrositlerle trombositlerin (Şekil 6) ise negatif reaksiyon verdikleri dikkati çekti.

Tablo 1. Kangal balıklarının perifer kan ANAE (+) ve (-) lenfosit oranları.

Hayvan sayısı	Lenfosit (%)		
	ANAE pozitif	ANAE negatif	X±SD
12	62.06	37.93	4.18

Tartışma ve Sonuç

Lenfositlerin lizozomlarında yerleşen enzimlerin demonstrasyonu yöntemleri ile yapılan çalışmalar (Pruthi ve ark., 1987; Kurtde ve ark., 1995; Aşti ve ark., 1996; Aşti ve ark., 1999), ANAE enziminin T lenfositlerde bulunurken B lenfositlerde bulunmadığını göstermektedir. Aşti ve ark. (1993, 1999) ile Kurtde ve ark. (1995), bu enzimin T lenfositlerin lizozomlarında yerleştiğini bildirmişlerdir. ANAE enziminin demonstrasyonu tekniğiyle farklı hayvan türlerinde perifer kan T lenfositlerinin oranlarının belirlenebileceği sonucuna varmışlardır (Basso ve ark., 1980; Wulf ve ark., 1981; Pruthi ve ark., 1987; Aşti ve ark., 1999; Sandıkçı ve ark., 2005). T lenfositler yanında monositlerin de ANAE enzim aktivitesi gösterdiği; lenfositlerde enzim pozitivitesinin çoğunlukla 1-2 adet kırmızı-kahverengi renkte lokalize granül tarzında gözlemlendiği, monositlerde ise difuz boyanma gözlemlendiği bildirilmektedir (Pruthi ve ark., 1987; Aşti ve ark., 1993; Sandıkçı ve ark., 2005). Osbaldiston ve ark. (1978) domuzda, Yörük ve ark. (1998) kedide,

Ergün ve ark. (2004) deve kuşunda, Sandıkçı ve ark. (2005) deve de granüositlerin ANAE enzim aktivitesi göstermediğini; Osbaldiston ve ark. (1978) rat ve koyunlarda, Aşti ve ark. (1999) tavuklarda, Ergün ve ark. (2004) hindilerde, bu hücrelerin difuz granüler pozitivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada lenfositlerin çoğunluğunda 1-2 adet spesifik granüller gözlenirken bazı lenfositlerin 3-8 adet granüle sahip olduğu gözlemlendi. Monositlerle granüositler difuz granüler tarzda pozitivite gösterirken; eritrositler ile trombositlerin negatif reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

Perifer kan ANAE (+) lenfosit oranları hayvan türlerinde farklılıklar göstermektedir. Bu oran tavşanlarda % 68,2 (Özcan 2005), ergin Ankara keçilerinde % 59,3 (Kurtde ve ark., 1995), kangal köpeklerinde yaşa bağlı olarak değişmek üzere % 76 ile % 89 arasında (Aşti ve ark., 1993), develerde % 81,3 (Sandıkçı ve ark., 2005), deve kuşunda % 59,3 (Ergün ve ark., 2004), tavuklarda % 54,4 (Dönmez ve ark., 2002), sülünlerde % 33,7 (Sur ve ark., 2004), hindilerde 51,8 (Ergün ve ark., 2004), olarak bulunmuştur. Blaxhall ve Hood (1985), kahverengi alabalıklarda (*Salmo trutta* L) yaptığı çalışmada lenfositlerin yaklaşık % 70 oranında enzim aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ANAE pozitif lenfosit oranı % 62,06 olarak tespit edilmiştir. Aradaki farkın tür ve coğrafi bölge farklılığından kaynaklanabileceği kanısındayız.

Ellis (1977), balıklarda perifer kan lenfositleri, granüositleri ve monositlerinin fonksiyonel ve morfolojik olarak memelilerinkine benzer olduğunu; Blaxhall ve Hood (1985) da lenfositlerin gösterdiği enzim aktivitesinin T ve B lenfositlerin varlığının göstergesi olduğunu ileri sürmektedirler. Bu çalışmada da lenfositlerde pozitif ve negatif enzim aktivitesi ile monositler ile granüositlerde görülen enzim aktivitesi bu tezleri desteklemektedir.

İnsanlarda, memeli hayvanlarda ve kanatlılarda olduğu gibi son yıllarda yetiştiriciliği artan balıklarda da kan dokusu, hastalıkların teşhisi, ayırıcı tanısı tedavi ve prognozun belirlenmesinde önemli veriler sağlayan; elde edilmesi, işlenmesi ve sonuçlarının yorumlanması nispeten kolay olan bir materyaldir. Bu anlamda kan hücrelerinin sayısı ve oranları ile özellikle bağışıklık sisteminde kritik bir rol oynayan lenfositlerin enzimatik profillerinin belirlenmesi oldukça pratik yararlar sağlamaktadır. Enzim sitokimyasal teknikler son yıllardaki diğer gelişen ileri teknikler kadar kesin sonuçlar vermese de ucuz ve kolay olduğu kadar güvenilir olmaları sebebiyle pratik bir öneme sahiptir. Sonuç olarak, ülkemizde lokal olarak yetişen ve yerli ve yabancı

turistler tarafından çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan Kangal balıklarının perifer kan hücrelerinde enzim profillerinin belirlenmesi, söz konusu balık türünün yetiştiriciliğinin yanında sağlık durumlarının takip edilebilmesi açısından önemli katkılar sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Aştı, R.N., Kurtdede, N. ve Ergün, L. (1993). Kangal köpeklerinin perifer kan T lenfositleri üzerinde ışık ve elektron mikroskopik çalışmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 40,4, 363-376.
- Aştı, R.N., Alabay, B., Kurtdede, N., Altunay, H., Ergün, L. (1996). Farklı hayvan türlerinin perifer kan lökositlerinde alfa naftil asetat esterase aktivitesinin belirlenmesi. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 43: 129-133.
- Aştı, R.N., Kurtdede, N., Ozen, A. (1999). Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of peripheral Blood T lymphocytes in chicken. Dtsch. Tierarztl. Wschr., 106, 397-399.
- Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato G., Pezzutto, A. ve Zanesco, L. (1980). Cytochemical study of thymocytes and T-lymphocytes. Br. J. Haematol., 44, 577-582.
- Beya, M.F., Miyasaka, M., Dudler, L., Ezaki, T. ve Trnka, Z. (1986). Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep II. Two monoclonal antibodies that recognize all ovine T lymphocytes. Immunol., 57, 115-121.
- Blaxhall, P.C. ve Hood, K. (1985). Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a Percoll gradient. J. Fish Biol., 27,6, 749-755.
- Çelik, İ., Aştı, R.N. Kadak, R. ve Işık, K. (1994). Farklı yaşlardaki sığırların perifer kan T lenfosit oranlarında görülen değişiklikler. Hayvancılık Araştırma Derg., 4,2, 68-72.
- Dönmez, N., Dönmez, H.H., Keskin, E. Ve Çelik, İ. (2002). Effects of Zinc Supplementation to Ration on Some Haematological Parameters in Broiler Chicks. Biological Trace Element Research, 87: 125-131.
- Ellis, A.E. (1977). The leukocytes of fish: a review. J. Fish Biol., 1, 453-491
- Ergün, L., Özen, A., Ergün, E. ve Aştı, R.N. (2004). Alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes of turkeys. Indian Vet. J., 81, 431-434.
- Ergün, E., Ergün, L., Özen, A. ve Aştı, R.N. (2004). Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes of ostrich (*Struthio camelus massaicus*). Revue Méd. Vét., 155,3, 147-150.
- Kurtdede, N., Aştı, R.N., Altunay, H. ve Akdeniz, C. (1995). Ankara keçilerinin perifer kan T ve B lenfositlerinin alfa naftil asetat esteraz ve yüzey immunoglobulin boyama yöntemi ile belirlenmesi. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 42, 85-90.
- Maiti, N.K., Saini, S.S. ve Shanna, S.N. (1990). Histochemical studies on peripheral lymphocytes. Vet. Short Com., 14, 207-210.
- Muller, J., Keller, H.U., Durig, P., Hagmann, J., Cornioley, D.M., Reinhard, J., Ruchti, C., Hess, M.W. ve Cottier, H. (1981). Nonspecific esterase in human lymphocytes. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol., 64, 410-421.
- Osbaldiston, G.W., Sullivan, R.J. ve Fox, A. (1978). Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes. Am. J. Vet. Res. 39,4, 683-685.
- Özcan, Z. (2005). Determination of alpha naphthyl acetate esterase activity in the peripheral blood leukocytes in Angora rabbits. Turkish J. Vet. Anim. Sci., 29, 881-884.
- Pinkus, G.S., Hargreaves, H.K., McLeod, J.A., Nadler, L.M., Rosenthal, D.S. ve Said, J.W. (1979). -Naphthyl acetate esterase activity-A cytochemical marker for T lymphocytes. Am. J. Pathol., 97, 17-42.
- Pruthi, A.K., Gupta, R.K.P., Sadana, J.R. (1987). Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and Monocytes of chickens. J. Vet. Med. A, 34, 390-392.
- Sandıkçı, M., Kum, Ş. Ve Eren, Ü. (2005). Develerin (*Camelus dromedarius*) perifer kan lökositlerinde alfa-naftil asetat esteraz aktivitesinin belirlenmesi. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 52, 13-16.
- Sur, E., Çelik, İ., Öznurlu, Y. ve Aydın, M.F. (2004). Genç ve ergin sülünlerin perifer kan lökosit oranları ile lenfositlerin alfa naftil asetat esteraz (ANAE) aktivitelerinin belirlenmesi. Vet. Bil. Derg., 20,3, 87-93.
- Svennevig, J.L. (1980). T lymphocytes in malignant, non-lymphoid human tumours detected by esterase technique. Scand. J. Immunol., 12, 6, 513-517.
- Yörük, M., Aştı, R.N., Kurtdede, N., Ağaoğlu, Z. ve Altunay, H. (1998). Light and electron microscopic studies on alpha naphthyl acetate esterase activity of the peripheral blood T lymphocytes in Van cats. Anat. Histol. Embryol., 27, 289-292.
- Wulf, J.C., Sale, G.E., Deeg, H.J. ve Storb, R. (1981). Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. Exp.Hematol., 9,8, 865-870.