

İNSAN PERİFER KANINDAKİ B, T VE NULL LENFOSİTLERİNİN ESTERAZ SİTOKİMYASI VE YÜZEY İMMÜNOGLOBÜLİNLERİNİN İMMÜNOENZİMATİK YÖNTEMLE BOYANARAK BELİRLENMESİ

Dr. İlhami ÇELİK *, Dr. Reşat N. AŞTI *, Dr. Neyhan ERGENE **

* S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, ** S.Ü.T.F. Fizyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada insan perifer kanındaki T, B-lenfositleri ile null hücrelerinin oranları immünoenzimatik ve sitokimyasal tekniklerle belirlendi.

NBE enzimi boyamasına karşı lenfositlerin büyük çoğunluğunun (%82) pozitif sonuç verdiği halde, daha az orandaki lenfositin (%17) negatif sonuç verdiği gözlemlendi. NBE pozitif lenfositlerde iki tip granüler pozitivite tespit edildi. Bu lenfositlerin çoğunda (%69) lokalize yerleşimli, sayıları 1-4 arasında olan, kırmızı-kahverengi granüller gözlenirken (lokalize granüler pozitivite), daha az orandaki lenfositte (%13) ise diffüz yerleşimli küçük granüller gözlemlendi. Lokalize granüler pozitivite veren lenfositler T-lenfositleri, diffüz granüler pozitivite verenler null hücreleri, negatif sonuç veren lenfositler ise B-lenfositleri olarak değerlendirildi.

B-lenfositlerinin yüzey immünooglobülinlerinin (SIg) immünoenzimatik yolla boyanmasıyla perifer kan lenfositlerinin %15'inin B-lenfositleri olduğu tesbit edildi.

Anahtar Kelimeler: Lenfositler, yüzey immünooglobülinleri, esterase.

SUMMARY

Discrimination of B, T and null Lymphocytes of Human Peripheral Blood by Esterase Cytochemistry and Immunoenzymatic Staining of Surface Immunoglobulins

In this study, T, B and null cell proportions of human peripheral blood lymphocytes were determined by using immunoenzymatic and cytochemical staining techniques.

Alpha-naphthyl butyrate esterase (NBE) staining revealed that large majority of the peripheral blood lymphocytes (82%) were positive, whereas smaller proportion (17%) were negative. Positive lymphocytes showed two distinct granular positivity. Most of the NBE positive cells (69%) had 1-4 large (dot-like), reddish-brown granules (localised granular positivity), 13% of the positive cells had large quantity of diffusely arranged small granules (diffuse granular positivity).

Localised granular, diffuse granular positive and negative cells were evaluated as T-lymphocytes, null cells and B-lymphocytes respectively.

By means of immunoenzymatic staining of the surface immunoglobulins (SIg), 15% of the peripheral blood lymphocytes were found to be B-lymphocytes.

Key Words: Lymphocytes, surface immunoglobulins, esterase.

GİRİŞ

Perifer kanda T ve B-lenfositleri ile null hücrelerinin bulunduğu bilinmektedir (1,2). Primer lenfoid organlarda olgunlaşan lenfositler, kan yoluyla sekonder lenfoid organlara giderek kendilerine ait olan spesifik bölgelere yerleşmektedirler (3,4).

Perifer kandaki lenfosit tipleri, hücre zarındaki spesifik moleküllerin immünoenzimatik, immüno-floresans veya otoradyografi teknikleri ile belirlenmesi ile ayırdedilebilmektedir (1,4,5,6,7). Ayrıca T-lenfositleri, heterojenik alyuvarlarla spontan rozet (E

rozeti) oluşturmaları (3,8) ve Scanning elektron mikroskopunda (SEM) daha düzgün bir yüzeye sahip olmaları ile de B-lenfositlerinden ayrılabilirlerdir.

Lenfosit tiplerinin ayırdedilmesi amacıyla kullanılan yöntemler oldukça pahalı olup, uzun zaman almakta ve pekçoğu da doku kesitlerine uygulanamamaktadır. Bu nedenle, hem frotilerde ve hem de doku kesitlerinde uygulanabilecek pratik bir yöntemin geliştirilmesi amacıyla son yıllarda çeşitli araştırmalar yapılmıştır (2,9,10,11,12).

Basso ve arkadaşları (9) timositlerin, olgun T-lenfositlerine dönüşüncüye kadar asit fosfat (AcP), beta-glukuronidaz (BG), alfa-naftil asetat esteraz (NAE) ve alfa-naftil bütirat esteraz (NBE) enzimleri pozitifitesi yönünden 4 farklı fenotip gösterdiklerini bildirmişlerdir. Dördüncü fenotipi oluşturan olgun T-lenfositleri, hem NAE ve hem de NBE enzimlerine sahiptir (9). Olgun T-lenfositlerinin bu özelliğinden yararlanarak insanlarda T ve B-lenfositlerinin ayrılabilceği çeşitli araştırmacılar (2,10,11,13,14) tarafından ortaya konmuştur. Kajikawa ve arkadaşları (10) sıgırlarda, Maiti ve arkadaşları (15) kanatlılarda, Mueller ve arkadaşları (13) ise farelerde NAE enzimi demonstrasyonu ile olgun T-lenfositlerinin hem kan frotilerinde ve hem de doku kesitlerinde spesifik olarak belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Knowles ve arkadaşları (11), lenfositlerde lokalize granüler ve diffüz granüler olmak üzere iki tip pozitive bulunduğunu tespit etmişlerdir. Higgy ve arkadaşları (2) ise NBE enzimini demonstre ettikleri bir çalışmada, lokalize granüler pozitifitenin T-lenfositlerinde, diffüz granüler pozitifitenin de null hücrelerinde gözlendiğini; B-lenfositlerinin ise negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada NBE enzimi ve yüzey immüno-globülinlerinin demonstrasyonu ile insan perifer kanındaki T ve B-lenfositleri ile null hücrelerinin oranlarının belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada yaşları 18-35 arasındaki 15 sağlıklı insandan alınan heparinize (Liquemine-Roche) kan örneği materyal olarak kullanıldı.

Alınan kan örneklerinden, önce alfa-naftil bütirat esteraz enzimi (NBE) demonstrasyonu için frotiler hazırlanarak havada kurutuldu. Kalan kan örneklerinden lenfosit izolasyonu yapılarak yüzey immüno-globülinleri (SIg) boyandı.

NBE enziminin demonstrasyonu için lenfosit enzimleri kiti (Research Kit No: 180-B^S), B-lenfositlerinin yüzey immüno-globülinlerinin (SIg) boyanması için de B-lenfosit kiti (Research Kit No: 96-A^S) kullanıldı.

NBE pozitif sonuç veren lenfositlerden 1-4 arasında iri, lokalize, kırmızı-kahverengi granüle sahip olan hücreler T-lenfositleri, çok sayıda, küçük ve diffüz yerleşimli granüle sahip olanlar ise null hücreleri; negatif sonuç veren lenfositler de B-lenfositleri olarak kabul edildi.

SIg'leri boyandıktan sonra, lenfositlerin izolasyonu sırasında kontamine olabilen monositlerin B-lenfositlerinden ayrılabilmesi için peroksidaz reak-

siyonu uygulandı. SIg boyaması uygulanan preparatlarda kırmızı-mor granüler pozitive gösteren hücreler B-lenfositleri, kahverengi-siyah granüllere sahip olan hücreler ise monosit olarak kabul edildi. B-lenfositlerinin sayımı yapılırken kahverengi-siyah granüllü monositler sayıma dahil edilmedi.

NBE ve SIg boyama metodlarıyla hazırlanan preparatlarda pozitif lenfositlerin sayımları yapılarak, pozitif lenfositlerin yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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

BULGULAR

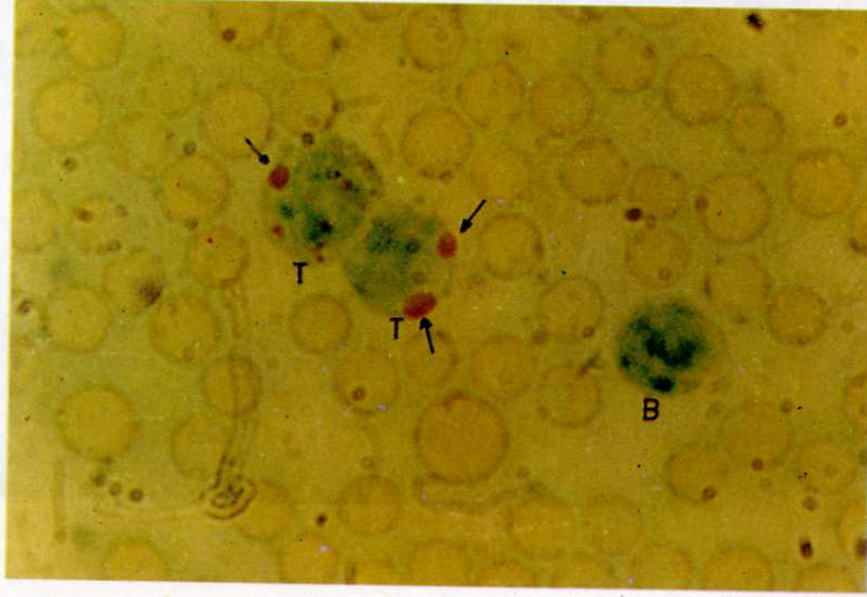
NBE boyamalarında lenfositlerin büyük çoğunluğunda spesifik kırmızı-kahverengi granüller gözlemlendi. Pozitif reaksiyon veren lenfositlerin büyük bir kısmında sayıları 1-4 arasında değişen iri granüller gözlenirken (lokalize granüler tip pozitive), daha az orandaki lenfositlerde ise çok sayıda, küçük ve diffüz lokalizasyonlu granüller (diffüz granüler tip pozitive) gözlemlendi (Resim 1,2). Lokalize granüler tipte granüller genellikle hücre zarının hemen altında lokalize olurken (Resim 1), diffüz granüler tipte ise sitoplazmanın her tarafına dağılmış olduğu dikkati çekti (Resim 2). Nötrofillerde pozitif reaksiyon gözlenmedi (Resim 3). Monositlerde kuvvetli, diffüz granüler pozitive tesbit edildi (Resim 4).

SIg boyaması uygulanan preparatlarda, SIg'lerinin hücre zarı yüzeyinde homojen bir dağılım gösterdikleri, ya da hücrenin bir kutbunda toplanmış oldukları gözlemlendi (Resim 5,6).

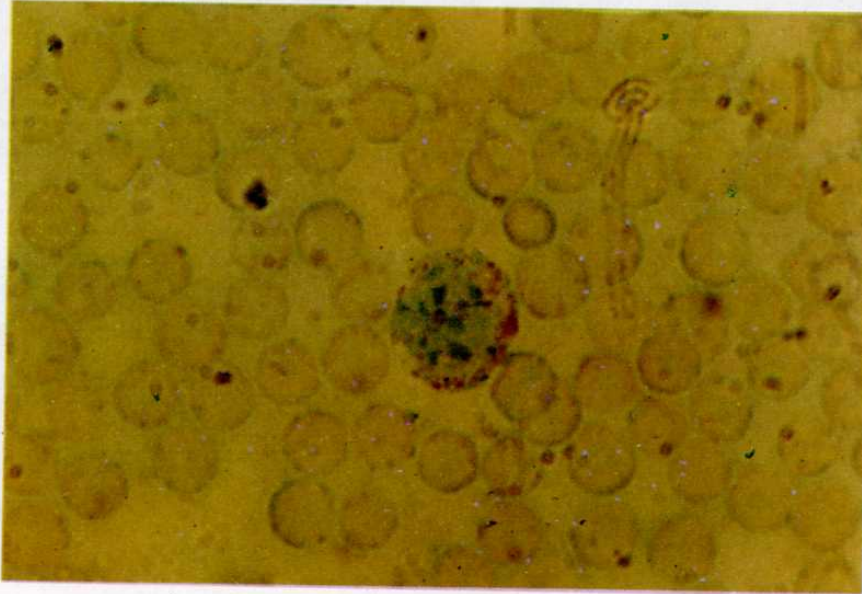
Yapılan sayım sonuçlarında perifer kan lenfositlerinin %82'sinin NBE pozitif, %17'sinin de negatif sonuç verdiğini tesbit edildi. Pozitif sonuç veren lenfositlerin %69'unda lokalize granüler pozitive (T-lenfositleri) gözlenirken, %13'ünde diffüz granüler pozitive (Null hücreleri) gözlemlendi. SIg boyamalarında ise, perifer kan lenfositlerinin %15'nin B-lenfositlerin SIg'lerine sahip oldukları belirlendi (Tablo I).

Tablo I. NBE ve SIg'lerinin boyanmasıyla normal perifer kanda tesbit edilen B, T-lenfosit ve null hücre oranları.

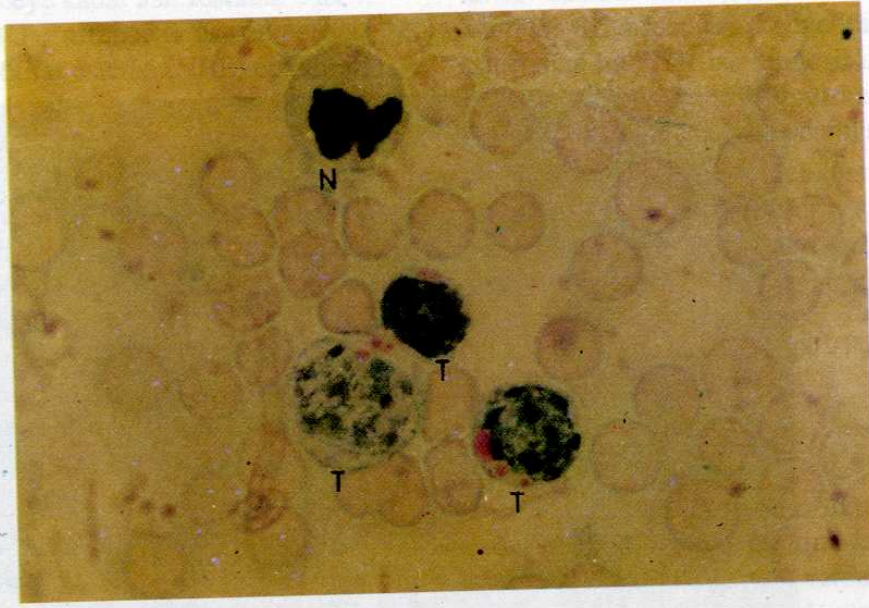
Örnek sayısı (%)	NBE (-) %	NBE(+) %	%	SIg(+) %
15	17.88±5.2 (13.5-32.2)	%69.06±5.3 (48.3-75.2)	13.06±0.32 (12.6-15.3)	15.53±0.42 (11.2-20.6)



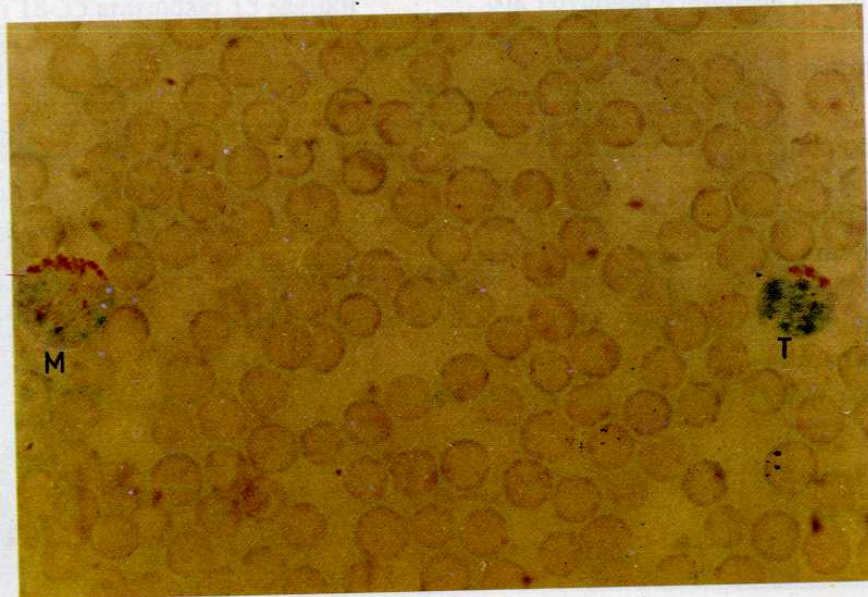
Resim 1: Negatif reaksiyon gösteren B-lenfosit ile lokalize granüler pozitivite gösteren T-lenfositleri, B) B-lenfosit, T) T-lenfositleri, oklar) granüller. NBE., X1450.



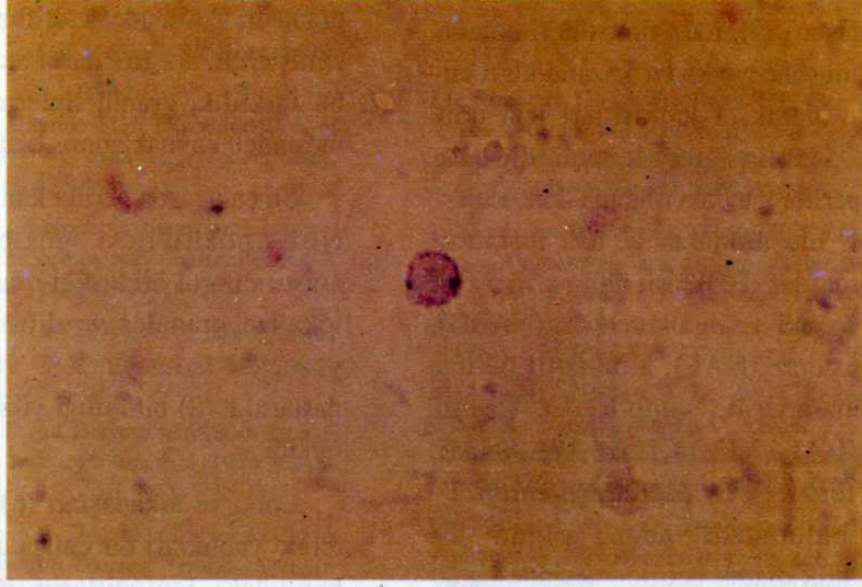
Resim 2: Diffüz granüler pozitivite gösteren null hücresi. NBE., X1450.



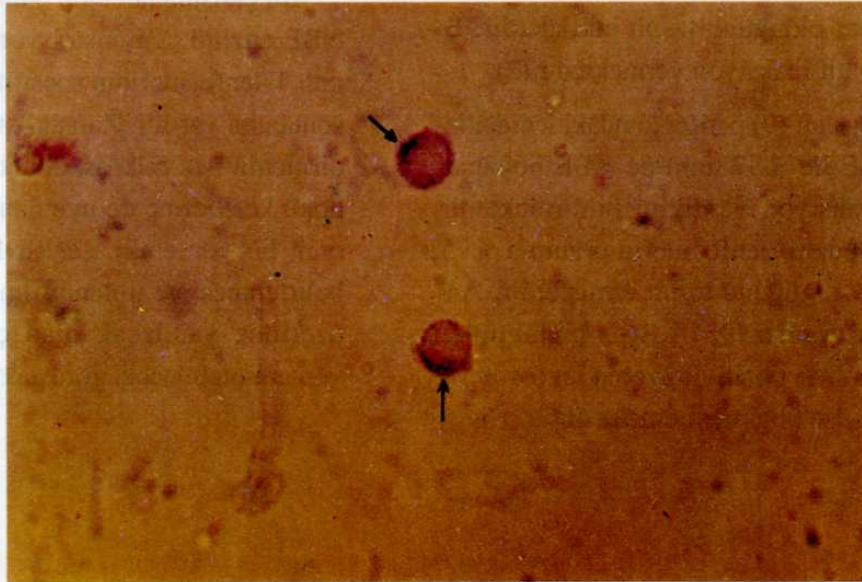
Resim 3: Negatif reaksiyon veren nötrofil ile lokalize granüler pozitivite gösteren T-lenfositleri.
N) Nötrofil, T) T-lenfositler. NBE., X1450.



Resim 4: Diffüz granüler pozitivite gösteren monosit ile lokalize granüler pozitivite gösteren T-lenfosit. T) T-lenfosit, M) Monosit. NBE., X1450.



Resim 5: Yüzey immüno globülinleri zar yüzeyinde homojen dağılım gösteren B-lenfosit. İmmünoenzimatik yöntemle yüzey immüno globülinleri boyaması., X1400.



Resim 6: Yüzey immüno globülinlerinin hücrenin bir kutbunda toplanmış olduğu (oklar). B-lenfositleri. İmmünoenzimatik yöntemle yüzey immüno globülinleri boyaması.,X1400.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Basso ve arkadaşları (9), fetal timositlerin olgun T-lenfositlerine dönüşüncüye kadar kazandıkları enzimleri göz önüne alarak, T-lenfositleri için dört farklı enzimatik fenotip tanımlamışlardır. Bu araştırmacılara göre perifer kandaki olgun T-lenfositleri dördüncü fenotipi oluşturmakta ve asit fosfataz (AcP), beta-glukuronidaz (BG), asit alfa-naftil asetat esteraz (ANAE), N-asetil beta-glukuronidaz (NABG), alfa-naftil asetat esteraz (NAE), alfa-naftil bütirat esteraz (NBA) enzimlerine sahiptir (9). Çeşitli araştırmacılar (2,9,10,11,12,13,14,15,16,17) ANAE, NAE ve NBE enzimleri olgunlaşmamış T-lenfositlerinde bulunmadığından, olgun T-lenfositlerinin spesifik olarak belirlenmesinde bu üç enzimin kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Knowles ve arkadaşları (11), ANAE enzimi boyamalarında lenfositlerde lokalize ve diffüz granüler olmak üzere iki tip pozitivite gözlediğini bildirmişlerdir. Higgy ve arkadaşları (2), T ve B-lenfositleri ile null hücrelerinden zenginleştirilmiş olan hücre süspansiyonları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, NBE enzimini demonstre ederek, lokalize granüler pozitivitenin T-lenfositlerine, diffüz granüler pozitivitenin null hücrelerine spesifik olan pozitif reaksiyonlar olduğunu tespit etmişlerdir. B-lenfositleri ise negatif reaksiyon vermektedir (2).

Basso ve arkadaşları (9) perifer kandaki lenfositlerin %56'sının NAE ile %57'sinin de NBE boyamalarında pozitif reaksiyon verdiğini bildirmektedir. Ranki (14), NAE pozitif lenfositlerin oranının %75, Lake (16) ise %87 olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak yukardaki araştırmacılar (9, 14, 16), granül tipleri ile lokalize ve granüler pozitivite veren lenfositlerin yüzdeleri hakkında ise bilgi vermemektedirler. Higgy

ve arkadaşları (2) ise, lenfositlerin %67'sinde lokalize granüler, %13'ünde de diffüz granüler pozitivite tespit etmişlerdir. araştırmacıların bulguları arasında gözlenen bu farklılık, granül tiplerinin farklı değerlendirilmesinden kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada perifer kan lenfositlerinin %82'sinde NBE pozitivitesi gözlemlendi. Bu oran diğer araştırmacıların bildirdiği oranlara yakındır. Özellikle lokalize granüler ve diffüz granüler lenfositlerin yüzdeleri (sırasıyla %69 ve %13), Higgy ve arkadaşlarının (2) bildirdiği yüzdelere oldukça yakın bulundu.

Lobo ve arkadaşları (6), immüno Floresans yöntemiyle yaptıkları bir çalışmada sağlıklı insan perifer kanındaki lenfositlerin %18'inde yüzey immüno globülinlerin bulunduğunu bildirmişlerdir. İmmünoenzimatik yöntemin kullanıldığı bu çalışmada ise %15 oranındaki lenfositte B-lenfositlerinin yüzey immüno globülinlerinin bulunduğu tespit edildi. İmmünoenzimatik yöntemde incelemeler ışık mikroskopuyla yapılabilmektedir. Ayrıca lenfositlerin izolasyonu sırasında kontamine olabilen monositler peroksidaz reaksiyonu ile spesifik olarak ayrılabilir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanılarak NBE enzimi demonstrasyonu ile perifer kandaki olgun T-lenfositlerinin spesifik olarak belirlenebileceği sonucuna varıldı. Zaman kazandırması ve değerlendirmenin ışık mikroskopunda yapılabilmesi yanında doku kesitlerine de uygulanabilmesi gibi avantajları olan bu yöntemin, çeşitli lenfosit bozukluklarının belirlenmesi ve tiplendirilmesi ile bağışıklık sistemi üzerinde yapılacak olan çalışmalarda yararlı bir yöntem olabileceği görüşüdeyiz.

KAYNAKLAR

1. Fudenberg HH, Sites DP, Caldwell JL, Wells JV. Basic and clinical immunology. Lange Medical Publicat, 1978: 78-122.
2. Higgy KE, Burns GF and Hayhoe FGJ. Discrimination of B, T and null lymphocytes by esterase cytochemistry. Scand J Haematol 1977; 18: 437-448.
3. Gutman GA, Weissman IL. Lymphoid tissue architecture. Experimental analysis of the origin and distribution of T cells and B cells. Immunology 1972; 23: 465-479.
4. Nieuwenhuis P and Ford WL. Comparative migration of B-and T-lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. Cellular Immunol 1976; 23:254-267.
5. Diaz JE, Williams CRJR. T and B lymphocytes in human colostrum. Clin Immunol and Immunopathol 1974;3:248-255.
6. Lobo PI, Frederic BW, Horwitz DA. Identification of two populations of immunoglobulin-bearing lymphocytes in man. J Immunol 1975;114(1):116-119.
7. Reeves JH, Renshaw HW. Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes. Am J Vet Res 1978; 39(6): 917-923.
8. Gupta S, Good A, Siegal FP. Rosette-formation with mouse erythrocytes. II. A marker for human B and non T lymphocytes. Clin Exp Immunol 1976; 25:319-327.
9. Basso G, Cogito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L. Cytochemical study of thymocytes and T-lymphocytes. J Haematol 1980; 44:557-582.
10. Kajikawa DWM, Koyama H, Yoshikawa T, Tsubaki S. Use of alphanaphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. Am J Vet Res 1983; 44(8): 1549-1552.
11. Knowles DVM, Hoffman HT, Ferrarini M, Kunkel HG. The demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as T cell marker. Cellular Immunol 1978;35:112-123.
12. Knowles DWM and Halper JP. 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 1980; 125(6): 2823-2825.
13. Mueller J, Brun GR, Buerki H, Keller H, Hess MW, Cottier H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Eur J Immunol 1975; 5:270-274.
14. Ranki A. Nonspecific esterase activity in human lymphocytes. Histochemical characterization and distribution among major lymphocyte subclasses. Clin Immunol and Immunopathol 1978; 10:47-58.
15. Maiti NK, Saini SS, Sharma SN. Histochemical studies on chicken's peripheral blood lymphocytes. Veterinary Research Com 1990;14: 207-210.
16. Lake BD. Histochemical detection of the enzyme deficiency in blood films in wolman's disease J Clin Pathol 1971; 24. 617-620.
17. Ranki A, Totterman TH and Hyry P. Identification of resting human T and B-lymphocytes by acid a-nephtyl acetate esterase staining combined with rosette formation with staphylococcus aureus strain cowan 1. Scan J Immunol 1976; 5:1129-1138.