

FARKLI YAŞLARDAKİ SİĞİRLARIN PERİFER KAN T-LENFOSİT ORANLARINDA GÖRÜLEN DEĞİŞİKLİKLER*

İlhami ÇELİK¹

Reşat N. AŞTI²

Ramazan KADAK³

M. Kürşat IŞIK³

T-lymphocyte percentages in the peripheral blood of the cattle in different age groups.

SUMMARY

This study was carried out to determine the percentages of both leucocyte types and alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) positive T-lymphocytes in the peripheral blood of the cattle in different age groups.

On the first day, neutrophyl frequency was higher than the lymphocyte rates whereas, on the third day the neutrophyl percentage was lower. The highest lymphocyte percentages were determined in eighteen months age group, following this period the mean lymphocyte values decreased gradually.

The results of ANAE demonstration have revealed that the lowest ANAE positive lymphocyte rates were in seven days old group, the highest percentages were in 6-7 years old group.

The researchers who studied on the T- and B-lymphocyte discrimination of bovine peripheral blood have reported contradictory results. These differences possibly are due to the methods employed, different interpretation of results, race, management and finally aging. For the reasons given above, it was concluded that a detailed study by employing more sensitive, specific methods and regarding age factor should be performed on the topic.

KEY WORDS: Bovine, peripheral blood, T-lymphocyte.

GİRİŞ

Yeni doğan bir memelide bağışıklık sistemi organları her ne kadar anatomik ve histolojik gelişimlerini tamamlamış durumda iseler de, fonksiyonel açıdan yeterli olgunluğa ulaşmamış durumda olduklarından, yeni doğan canlı, belirli bir süre daha maternal savunma faktörleri tarafından korunur. İleri yaşlarda ise, canlının çevresel streslere adaptasyon yeteneği azalmakta; immün sistem de bu durumdan etkilenmektedir. Fare ve insanlarda, yaşla birlikte immün sistemin fonksiyonlarında da önemli düşüşlerin olduğu bildirilmektedir (8, 26).

Altmış yaşın üzerindeki bireylerin ancak % 25'i gençlerdeki kadar güçlü bir immün sisteme sahiptir ve bu bireylerde, özellikle solunum yolu enfeksiyonları daha sıklıkla görülmektedir (2). Yaşlanmayla birlikte, immün sistemin fonksiyonlarında görülen gerilemenin, bu sistemin hücre sayıları ve bu hücrelerin fonksiyonlarında oluşan düşüşlere bağlı olduğu fare ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (8). Seksüel olgunluğa girişle birlikte, merkezi lenfoid organlarda da involüsyonun başladığı ve bu organların bir süre sonra atrofiye oldukları bilinmektedir. Her ne kadar perifer lenfoid organlarda, yaşlanmayla birlikte belirgin bir küçülme oluşmamakta ise de, bu organlardaki germinatif merkezlerin sayılarında, yaşla birlikte belirgin azalmalar meydana gelmektedir (8).

Günümüzde, immün sistemin çeşitli fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar, büyük oranda kan dokusu hücreleri üzerinde gerçekleştirilmektedir. Özellikle perifer kan lenfositleri (PBL) üzerinde yapılan çalışmalar, insanlarda yaşla birlikte bu hücrelerin sayı, oran ve fonksiyonlarında önemli değişikliklerin ortaya çıktığını göstermektedir.

ÖZET

Bu çalışma, farklı yaşlardaki sığırların perifer kanlarındaki lenfosit oranları ile alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) pozitif T-lenfosit oranlarının belirlenmesi amacıyla yapıldı.

Doğumu takiben ilk günde nötrofillerin oranı lenfositlerinkinden daha yüksek iken, üçüncü günde nötrofillerin oranının lenfositlerinkinden daha düşük olduğu tespit edildi. En yüksek lenfosit yüzdesi 18 aylık grupta tespit edildi. Bu dönemi takiben ortalama lenfosit oranlarının tedricen düştüğü gözlemlendi.

ANAE demonstrasyonu sonuçları, endüyük ANAE- pozitif lenfosit oranının 7 günlük grupta, en yüksek oranın ise 6-7 yaşlı hayvanlarda olduğunu ortaya koymaktadır.

Sığır perifer kanındaki T- ve B-lenfositlerinin belirlenmesi üzerinde çalışan araştırmacılar, birbirleriyle uyumsuz sonuçlar bildirmekte dirler. Bu farklar muhtemelen uygulanan metodlara, sonuçların farklı yorumlanmasına, irka, bakım ve besleme ile yaşa bağlı olabilir. Yukarıda bildirilen nedenlerle, bu konuda daha duyarlı, spesifik metodlar kullanılarak ve yaş faktörünü de dikkate alarak detaylı bir çalışmanın gerçekleştirilmesinin yararlı olacağı sonucuna varıldı.

ANAHTAR KELİMELEER: Sığır, perifer kan, T-lenfositleri.

Örneğin, 60 yaşın üzerindeki bireylerde, PBL sayısı gençlerdekinin ancak % 70'i kadardır (8). Bu azalma büyük oranda T-lenfosit sayılarındaki ve özellikle de baskılayıcı T-lenfosit (T-supressor)'leri dışındaki T-lenfosit tiplerinde oluşan düşüşlere bağlıdır (8).

Günümüzde, perifer kan ve diğer dokulardaki B-lenfositlerin belirlenmesi amacıyla, bu hücrelerin hücre mebranı yüzeyindeki Fc ve komplement reseptörlerinin gösterilmesi (23, 25) ve membran yüzeyindeki immünooglobülinlerin (slg) immüno floresans ya da immünoenzimatik yöntemlerle ortaya konması (13, 15, 16) teknikleri uygulanmaktadır. T-lenfositlerinin belirlenmesi amacıyla ise, bu hücrelerin, heterolog alyuvarlarla spontan rozet (E-rozeti) oluşturmaları (26), sahip oldukları spesifik enzimlerin demonstrasyonu (5, 10, 20, 22, 29), hücre membranlarının yüzeylerindeki spesifik lektin (örneğin, yer fıstığı yağı aglutinini, PNA) reseptörlerinin ortaya konması (19, 27) ve işaretli timosit antikorlarıyla boyama yöntemleri (17, 28) uygulanmaktadır.

Farelerde (15), insanlarda (4, 9, 12), kanatlılarda (14, 20, 21) ve sığırlarda (10) rozet oluşturma yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalarda, alfa-naftil asetat esteraz enziminin (ANAE), T-lenfositlere spesifik bir enzim olduğu ve bu hücrelerin işaretlenmesinde yararlanılabileceği bildirilmiştir.

Çeşitli yöntemlerle sığır perifer kanındaki T- ve B-lenfositlerin oranlarının belirlendiği çalışmalarda, farklı sonuçlar bildirilmiştir. Nakahishi ve ark. (17), anti-timosit serumu ve slg boyama yöntemiyle yaptıkları bir çalışmada, sığır perifer kanındaki lenfositlerin % 64.4'ünün T, % 25.4'ünün de B-lenfositlerinden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Yang (28) ise aynı yöntemlerle yaptığı bir çalışmada, bu oranları T-lenfositler için % 79.2, B-lenfositler için de % 26.9 olarak bildirmektedir. Kajikawa ve ark. (10), normal sığırların perifer kanındaki T-lenfosit oranını % 47.7, B-lenfosit oranını ise % 26.9 olarak belirlemişlerdir. Thurmond ve ark. (26) ise sığır perifer kanındaki E-rozeti oluşturan T-lenfosit oranının % 43.9, B-lenfosit oranının ise % 27-33 arasında değiştiğini bildirmektedir.

*: Bu proje SÜAF ile Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na desteklenmiştir.

1: S.Ü. Veteriner Fak. Hist. Emb. Anabilim Dalı, Konya.

2: A.Ü. Veteriner Fak. Hist. Emb. Anabilim Dalı, Ankara.

3: Hayvancılık Merkez Araştırma Enst. Müdürlüğü, Konya.

Sığırların perifer kanındaki B- ve T-lenfosit oranlarının belirlenmesi amacıyla yapılmış olan çalışmalarda (10, 17, 26, 28), yaşa bağlı olarak bu iki hücre tipinin oranlarında oluşabilecek değişiklikler belirlenmemiştir.

MATERYAL ve METOT

1- Kan örneklerinin alınması, frotilerin hazırlanması ve tespit edilmesi:

Bu çalışmada, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın Konya, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde bulunan değişik yaşlardaki İsviçre Esmeri sığırlardan alınan kan örnekleri materyal olarak kullanıldı. Doğum gününden başlayarak dokuzuncu yaş da dahil olmak üzere değişik yaşlardaki hayvanlardan kan örnekleri alındı (Tablo 1, 2). Her hayvandan, önceden hazırlanan heparinize tüplere (heparin 10 IU/ml kan, Liqumine-Roche) alınan 10 ml'lik kan örneğinin her birinden 4 adet frotiler hazırlanarak; oda sıcaklığında kurutuktu ve soğuk (-10 C) glutaraldehid-aseton tespit sıvısında 3 dakika süreyle tespit edildi (15). Tespit sonunda, frotiler 3 defa distile suyla yıkanarak oda sıcaklığında kurutuldu.

Tespit edilerek kurutulmuş frotilerin 2 adedi May Grünwald-Giemsa (3) boyaması, 2 adedi de ANAE'nin demonstrasyonu amacıyla kullanıldı.

2- ANAE enziminin demonstrasyonu:

Bu işlem, Mueller ve ark. (15)'nin bildirdiği şekilde hazırlanan inkübasyon solusyonunda, frotilerin oda sıcaklığında 4 saat süreyle inkübasyonu ile gerçekleştirildi. Inkübasyon solüsyonu 0.067 M fosfat tamponunun (pH 5.0) 40 ml'sine 2.4 ml heksazotize edilmiş pararozanilin (Sigma) solüsyonu ve 0.4 ml asetonda eritilmiş 10 mg alfa-naftil asetat (Sigma) eklenerek hazırlandı. Solüsyonun pH'sı 2 N NaOH ile 5.8'e ayarlandı.

Inkübasyon sonunda frotilere, distile suyla yıkandıktan sonra, 0.1 M asetat tamponunda (pH 4.2) hazırlanan %1'lik metil green (Merck) ile 10 dakika çekirdek boyası uygulandı. Distile suyla yıkanan preparatlar, dereceli alkoller ve ksilol serisinden geçirilerek Entellan (Merck) ile kapatıldı.

Işık mikroskopunda x1000 büyütmede yapılan incelemelerde tipik, kahverengi-kırmızı granüllere sahip olan lenfositler ANAE -pozitif olarak değerlendirildi. Her frotilde 200 lenfosit sayılarak her örnek için pozitif

lenfosit yüzdeleri hesaplandı. Monositler tipik çekirdek morfolojileri, büyüklükleri ve diffüz, ince granüler pozitivite göstermeleriyle ANAE-pozitif lenfositlerden kolayca ayrıldılar.

Her iki yöntemle boyanan frotilerde, ayrı ayrı yapılan sayımlar sonunda elde edilen sayısal veriler istatistiki yöntemlerle analiz edilerek (7), farklı yaş gruplarının ortalama değerleri arasındaki farklılıkların önem dereceleri belirlendi.

Gerekli görülen bölgelerden Leitz Ortholux-II model araştırma mikroskopunda resimler çekildi.

BULGULAR

Yapılan incelemelerde, perifer kan lenfositlerinin büyük çoğunluğunda granül sayısı 1-3 arasında değişen lokalize granüler pozitivite gözlemlendi

Tablo 2. Farklı Yaş Gruplarından Elde Edilen Perifer Kan ANAE Pozitif Lenfosit Oranları ve Bu Değerlerin İstatistiksel Analiz Sonuçları.

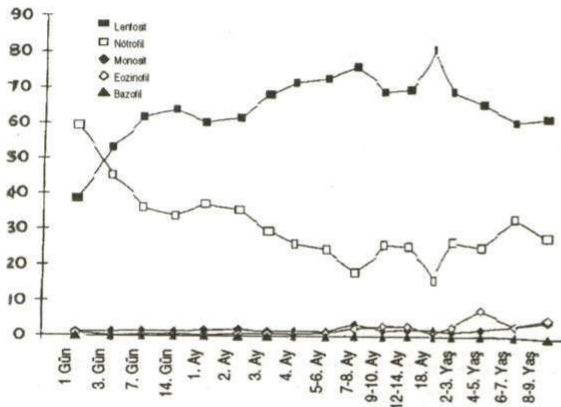
Gruplar	n	ANAE+Lenfosit (%) X±Sx
1. Gün	6	60.21±8.56 abcd
3. Gün	10	62.50±5.66 abcd
7. Gün	7	37.96±4.85 e
14. Gün	12	69.48±1.72 ab
1. Ay	12	69.48±1.72 ab
2. Ay	6	51.42±7.98 de
3. Ay	13	53.69±4.90 bcde
4. Ay	16	53.86±5.21 bcde
5-6. Ay	6	52.92±7.76 cde
7-8 Ay	5	59.25±9.16 abcd
9-10 Ay	16	56.66±3.49 abcd
12-14 Ay	13	51.75±6.14 de
18 Ay	7	65.75±8.11 abcd
2-3 Yaş	23	65.47±2.66 abcd
4-5 Yaş	12	66.02±2.95 abc
6-7 Yaş	10	71.35±2.39 a
8-9 Yaş	16	69.19±1.03 abc

a, b, c, d, e: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

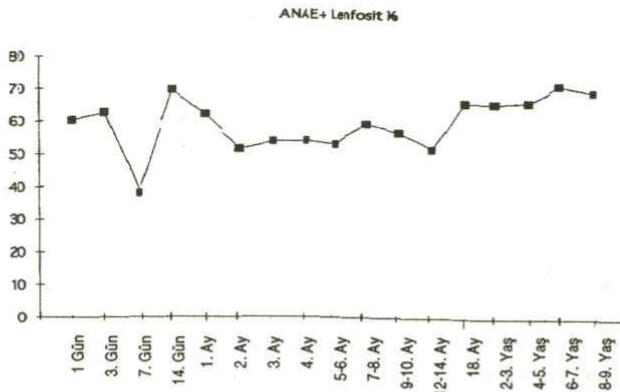
Tablo 1. Farklı Yaş Gruplarından Elde Edilen Perifer Kan Lökosit Yüzdeleri ve Bu Değerlerin İstatistiksel Analiz Sonuçları.

Gruplar	n	Lenfosit X±Sx	Nötrofil X±Sx	Monosit X±Sx	Eozinofil X±Sx	Bazofil X±Sx
1. Gün	10	38.61±1.30 f	59.46±1.21 a	1.23±0.21 d	0.88±0.32 cd	0.03±0.03
3. Gün	9	53.14±4.58 e	45.25±4.67 b	1.40±0.22 d	0.20±0.06 d	0.00±0.00
7. Gün	12	61.83±5.52 cde	36.04±5.51 bcd	1.59±0.36 d	0.46±0.17 cd	0.07±0.05
14. Gün	12	64.02±4.08 cde	33.73±4.27 cde	1.55±0.33 d	0.61±0.21 cd	0.08±0.05
1. Ay	19	60.41±3.31 de	37.20±3.32 bc	1.89±0.30 d	0.40±0.11 cd	0.10±0.08
2. Ay	9	61.69±5.25 cde	35.45±5.14 bcde	2.08±0.34 cd	0.76±0.29 cd	0.08±0.02
3. Ay	15	68.19±4.02 bcd	29.48±4.04 cde	1.47±0.19 d	0.86±0.20 cd	0.00±0.00
4. Ay	9	71.59±2.35 abcd	26.01±2.45 def	1.69±0.41 d	0.61±0.22 cd	0.09±0.09
5-6. Ay	7	72.82±3.95 abc	24.52±3.44 ef	1.49±0.53 d	1.20±0.89 cd	0.00±0.00
7-8. Ay	10	76.00±3.79 ab	18.04±3.19 f	3.45±1.12 b	2.27±1.55 cd	0.12±0.05
9-10. Ay	18	68.97±2.89 bcd	25.73±2.73 def	1.73±0.44 d	3.04±0.96 bcd	0.00±0.00
12-14. Ay	15	69.59±3.39 bcd	25.29±3.08 def	1.98±0.37 cd	2.91±1.22 bcd	0.03±0.03
18. Ay	9	80.97±2.95 a	16.05±2.80 g	2.02±0.39 cd	0.93±0.29 cd	0.03±0.03
2-3. Yaş	26	69.15±1.90 bcd	26.54±1.67 cdef	1.49±0.22 d	2.73±0.41 bcd	0.13±0.05
4-5. Yaş	13	65.67±3.56 bcd	25.08±2.34 def	2.04±0.54 cd	7.57±2.19 a	0.09±0.07
6-7. Yaş	11	60.46±2.46 de	33.06±2.00 cde	3.22±0.39 bc	3.23±0.68 bc	0.10±0.10
8-9. Yaş	16	61.75±2.24 cde	28.00±2.43 cde	4.72±0.36 a	5.38±0.67 ab	0.15±0.08

a, b, c, d, e: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).



Grafik 1. Farklı lökosit tiplerinin değişik yaş gruplarındaki yüzdelerinde oluşan değişiklikler.



Grafik 2. ANAE Pozitif lenfosit yüzdelerinde, farklı yaş gruplarında oluşan değişiklikler.

(Resim 1). Granüller genellikle çekirdek-hücre zarı sınırında yerleşmekle birlikte, nükleer bölge üzerinde yerleşmiş olan granüllere de rastlandı.

Nötrofillerde ANAE reaksiyonu ürünü olan kırmızı-kaverengi granüle rastlanmadı (Resim 2).

Monositlerde ise granüller çoğunlukla çekirdeğin çentik bölgesinde

lokalle olmakla birlikte, sitoplazmanın tamamına dağılmış haldeki küçük granüllere sahip olan monositlere de rastlandı (Resim 2).

Yapılan hücre sayımlarında elde edilen sayısal veriler ve bunların istatistiksel analiz sonuçları Tablo 1 ve 2'de, grafikleri ise Grafik 1 ve 2 şeklinde verilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırların perifer kan lökositlerinin sayı ve oranlarında doğumu takibeden günlerde önemli bireysel farklılıklar gözlenmektedir. Bu durumun doğum esnasında karşılaşılan strese bağlı olarak salgılanan adrenal korteks hormonlarının, yavruya geçmesi ile meydana geldiği bildirilmiştir (24).

Buzağı ve gelişme çağındaki hayvanlarda lökosit sayısı yüksek iken, yaşın ilerlemesiyle birlikte tedrici bir düşüş oluşmaktadır. Doğumda, buzağının perifer kanındaki lenfosit yüzdesi nötrofil yüzdesinden daha düşüktür (24). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, doğumu takibeden 3. günden itibaren lenfositlerin yüzdesi nötrofillerinkinden daha yüksek bir seviyeye ulaşmaktadır (Tablo 1, Grafik 1).

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, doğum sonu 3. günde nötrofillerinkinden daha yüksek seviyeye ulaşan lenfosit yüzdeleri, takibeden dönemlerde de dalgalanmalar göstermekle birlikte bu seviyede devam etmektedir. En yüksek lenfosit yüzdesi, 18 aylık hayvanlarda tespit edilmiştir (Tablo 1, Grafik 1). Bu dönemden itibaren dalgalanmalar gösteren lenfosit yüzdeleri, 8-9 yaşlı hayvanlarda % 61.75 seviyesine inmektedir. Tablo 1'de görüldüğü gibi lökosit yüzdelerinde, incelenen dönemlerde, yaşın ilerlemesine paralel olarak, düzenli artış ve azalışlar tespit edilmemiştir.

Sığırların perifer kanındaki B- ve T-lenfosit oranlarının belirlendiği çalışmalarda, oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 3).

Yukarıdaki araştırmacıların (1, 19, 26, 28, 29) yaptıkları çalışmalarda, farklı yaşlardaki sığırların perifer kanlarındaki T-lenfositleri oranları hakkında bilgi verilmemektedir.

Paul ve ark. (18), 1-2 yaşlı Holstein ırkı sığırların perifer kanındaki B-lenfositleri oranını % 11.3, E-rozeti oluşturan T-lenfositleri oranını ise, % 62.8 düzeyinde olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada, 12-14 aylık sığırların T-lenfosit oranı % 51.75, 2-3 yaşlı sığırların T-lenfosit oranı ise % 65.47 olarak tespit edilmiştir. Bu fark, muhtemelen uygulanan yöntemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Sığırların perifer kan T-lenfositlerinin E-rozeti oluşturma yöntemiyle belirlendiği çalışmalarda, oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Binns (1), sığırlarda E-rozeti oluşturan T-lenfosit

Tablo 3. Sığır Perifer Kanında Farklı Araştırmacılar Tarafından Belirlenen T ve B Lenfosit Oranları.

Araştırmacılar	Belirleme yöntemi	T-Lenfosit %	B-Lenfosit %	Non T, Non B %
Thurmond ve ark.	T-Lenfosit: E-rozet B-Lenfosit: EAC-rozet	37-50	27-33	17-36
Nakahishi ve ark.	T-Lenfosit: Anti-timosit serumu B-Lenfosit: slg	64.4	25.4	10.2
Yang	T-Lenfosit: Anti-timosit serumu B-Lenfosit: slg	79.2	26.9	9
Kajikawa ve ark	T-Lenfosit: E-rozet ve ANAE demonstrasyonu. B-Lenfosit: slg	47.7	26.9	9
Paul ve ark	T-Lenfosit: E-rozet B-Lenfosit: slg	62.8	11.3	26.5
Binns	T-Lenfosit: E-rozet	30.2	-	-
Nakase ve ark.	T-Lenfosit: ANAE demonstrasyonu	56.1	43.9	-
Reeves ve ark.	T-Lenfosit: E-rozet B-Lenfosit: EAC-rozeti ve slg	45.3	26.5 (EAC) 28.2 (slg)	-
Pearson ve ark.	T-Lenfosit: Fitohemaglütinin (PHA) B-Lenfosit: slg	67.8	32.2	-

oranının % 38 olduğunu bildirmektedir. Nakahishi ve ark.(17) ise, sığırların perifer kan T-lenfosit oranlarının belirlenmesinde kullanılan E-rozeti oluşturma yönteminin duyarlılığının oldukça düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kullanılan koyun alyuvarlarının, papain, nöraminidaz, bromelin ve 2-amino etil tiyo üronyum 'la (AET) muamele edilmesi, E-rozeti oluşturan lenfosit yüzdesini artırmaktadır (18). Ortamda dekstran bulunması da benzeri bir etki oluşturmaktadır (1).

Bu çalışmada T-lenfositlerin demonstrasyonu amacıyla, Mueller ve ark. (15)'nin bildirdiği yöntem uygulandı ve inkübasyon süresi oda sıcaklığında (20 °C) 4 saat süreyle sınırlandırıldı. Bu süreden daha az sürelerde enzimatik reaksiyon zayıf gelişmekte, sürenin aşılması durumunda ise tortu oluştuğundan değerlendirme güçleşmektedir (5, 6). Yapılan mikroskopik incelemelerde, lenfosit ve monositlerde gözlenen pozitivite şekilleri önceki araştırmacıların (5, 6, 10) bildirdiklerine uymaktadır.

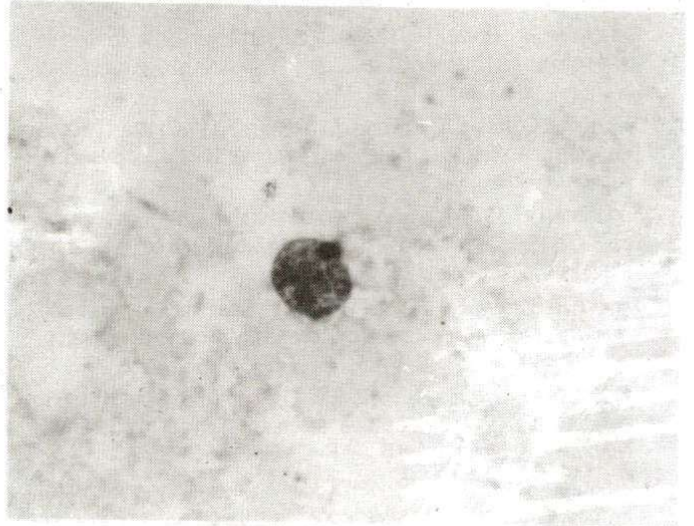
ANAE enzimi, lizozomal bir enzimdir (11). Bu enzim, T-lenfositleri tarafından timusun medullasında kazanılır ve sığırlarda gebeliğin yaklaşık 60. gününde timusun medullası, perifer kan, dalak ve barsak lamina propriasında, bu enzime sahip lenfositler gözlenir (5, 6). Perifer kandaki oranları, gebeliğin ilerlemesiyle birlikte tedricen artarak 240. günde % 42'ye ulaşır (6). Doğum sonu ilk günde % 60 seviyesine ulaşan ANAE pozitif hücre oranının, 7 günlük hayvanlarda yaklaşık % 38'e düştüğü tespit edilmiştir. Daha sonraki dönemlerde artış gösteren ANAE- pozitif hücre yüzdeleri, artış ve azalış şeklindeki dalgalanmalarla % 50-60 düzeyinde seyretmektedir. Onsekiz aylık grupta gözlenen yükselme devam ederek, 6-7 yaşlı grupta ANAE pozitif hücre oranı % 71.35'lik en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Sekiz-dokuz yaşlı hayvanlarda ise belirgin bir düşme eğilimi gözlenmiştir (Grafik 2). Bu sonuçlara göre, sığırlarda perifer kan lenfosit oranlarıyla bunların ANAE- pozitivitesi gösteren T-lenfosit alt tipindeki önemli düşüşler, muhtemelen daha ileri yaşlarda ortaya çıkmaktadır.

İlk kez farelerde (15) T-lenfositlerin belirlenmesinde pratik bir yöntem olabileceği bildirilen ANAE demonstrasyonunun, daha sonra insanlarda (9), sığırlarda (10, 17), tavuklarda (20, 21) da aynı amaçla kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu yöntemle, sığırlarda lökosis gibi lenfosit yapımı bozukluklarının belirlenebileceği bildirilmektedir. Paul ve ark. (18), sığır lökosis virüsü (BLV) ile enfekte sığırların perifer kanındaki B-lenfosit oranının % 58.8'e yükseldiğini, E-rozeti oluşturan T-lenfosit oranlarının ise % 38.7'ye gerilediğini, B- ve T-lenfosit karakteri taşımayan "null" hücreleri oranının da % 6.5 düzeyinde olduğunu tespit etmişlerdir. Kajikawa ve ark. (10) ise BLV ile enfekte sığırların perifer kanındaki ANAE pozitif T-lenfosit oranının % 7.7, slg pozitif B-lenfosit oranının da % 74.0 olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada, Kajikawa ve ark. (10)'nın bildirdiği kadar, düşük seviyede T-lenfosit yüzdesi tespit edilmemiştir.

Thurmond ve ark. (26), T-lenfositlerin spesifik enzimi olarak kabul edilen ANAE'nin B-lenfositlerinde de bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar (26), E-rozeti oluşturan PBL'nin % 62.4'ünün ANAE pozitif iken, EAC-rozeti oluşturan B-lenfositlerin % 38.3'ünün de ANAE pozitivitesi gösterdiğini bildirmektedirler. Pinkus ve ark. (20), insanlarda da benzeri bir pozitivite şekli bulunabileceğini bildirerek; Thurmond ve ark.'nın (26) görüşünü desteklemekte iseler de, bir T-lenfosit mitojeni olan Fitohemaglutinin'le (PHA) uyarılan lenfosit süspansiyonlarında, sadece ANAE pozitif lenfosit oranlarının artışı ve B-lenfositlere spesifik olan mitojenlerle (E.coli bakteriyel lipopolisakaridi, LPS) uyarılan bazı B-lenfositlerinin de ANAE pozitivitesi kazanması, ANAE'nin T-lenfositlere özgü bir enzim olduğu görüşünü doğrulamaktadır. B-lenfositlerin membran yüzeylerinde bulunan slg'leri, monosit yüzeylerinde de vardır ve bu hücreler slg boyamalarında B-lenfositlerini taklit ederler (18). Ancak, Monositler lateks partiküllerini fagosite ettiklerinden, B-lenfositlerinden ayrılabilceğini bildiren araştırmacılar (18), her iki yöntemi birlikte uygulayarak yaptıkları bir çalışmada, sığır perifer kanındaki B-lenfosit oranının %10.7 olduğunu, sadece slg boyaması uygulandığında ise bu oranın, %15-30 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Kajikawa ve ark. (10) ise, E-rozeti oluşturan sığır perifer kan T-lenfositlerinin tamamının, ANAE pozitivitesini kazanmamış

olabileceklerini, bu nedenle, E-rozeti pozitivitesi oranlarıyla ANAE pozitivitesi oranlarının her zaman birbirini tutmayabileceğine işaret etmektedirler.

Sonuç olarak, bu çalışmada, farklı yaşlardaki sığırların perifer kan lökosit yüzdelерinde belirgin değişiklikler tespit edilmiş olmakla birlikte, 8-9 yaşlı sığırlarda, çok önemli düşüşler tespit edilmemiştir. Sığır perifer kanındaki B- ve T-lenfositlerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasında gözlenen farklar, uygulanan yöntemlerdeki ve sonuçların yorumlanmasındaki farklılıklara, bakım besleme ve genel sağlık durumundaki farklılıklara bağlı olabileceği gibi ırk ve yaş grupları arasındaki farklılıklara da bağlı olabilir. Bu farkların giderilmesi için belirleme yöntemlerinin kombine bir şekilde uygulanarak, her yaş grubu için en güvenilir yöntemin tesbiti ve güvenilir tabloların çıkarılması önerilebilir. Ayrıca, ileri yaşlarda perifer kan lenfosit oranlarındaki düşüşlerle birlikte, bu hücrelerin fonksiyonlarında da belirgin düşüşlerin meydana gelip gelmediğinin ortaya konması, bu türde, verimlilik döneminin uzatılması amacıyla, bazı yöntemlerin geliştirilebilmesine katkıda bulunabileceklerdir.



Resim 1. Tek granüllü, lokalize granüler tip pozitivite gösteren bir lenfosit, ANAE boyaması. x1800.

Fig. 1. A localised granular positive lymphocyte with one granule is seen, ANAE staining. x1800.



Resim 2. Diffüz granüler pozitif monositlerle (m), negatif nötrofiller (n) görülmekte, ANAE boyaması. x1280.

Fig. 2. Monocytes showing diffuse granular positivity (m) and negative neutrophils (n) are seen, ANAE staining. x1280.

KAYNAKLAR

1. Binns RM (1978) Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran. *J. Immunol. Methods*, 21: 197-211.
2. Chandra RK (1992) Effect of vitamin and trace element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. *The Lancet*, 340 (7) 1124-1127.
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT (1985) Cellular pathology technique, Butterworths Co., Fourth edition, London.
4. Çelik İ, Aştı RN, Ergene N (1991) İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esterez sitokimyası ve yüzey immüoglobülinlerinin immüoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *S.Ü. Tıp Fak. Derg.* 7 (4) 497-503.
5. Çelik İ, Vural Ö, Dönmez HH, Sandıkçı M (1993) Determination of percentages in peripheral blood and tissue localization of T lymphocytes in fetal and adult lymphoid tissues of cattle by the histochemical demonstration of alpha-naphthyl acetate esterase. *Veterinarium*, 4 (1) 10-15.
6. Çelik İ, Aştı RN, Boyraz MÜ (1992) Sığır fetal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esterez aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. *S.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 8 (2) 41-44.
7. Düzgüneş O, Kesici T, Kavuncu O, Gürbüz F (1987) Araştırma ve deneme metodları. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları: 1021, A.Ü. Basımevi, Ankara.
8. Fudenberg HH (1978) Aging and the decline of immune responsiveness. pp 323-337, in "Basic and Clinical Immunology" 2nd edition, Lange Med. Publicat., Canada.
9. Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FG (1977) Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand. j. Haematol.*, 18: 437-448.
10. Kajikawa O, Koyama H, Yoshikawa O, Tsubaki S, Saito H (1983) Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am.J.Vet.Res.*, 44 (8) 1549-1552.
11. Knowles DM, Halper JP (1980) 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.
12. Knowles DM, Hoffman HT, Ferrarini M, Kunkel HG (1978) The demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usfulness as a T cell marker. *Cel. Immunol.*, 35: 112-123.
13. Kumar SP, Paul PS, Pomeroy KA, Tohnson DW, Muscopolat CC, Van der Mooten MJ, Miller JM, Sorenson DK (1978) Frequency of lymphocytes bearing Fc receptors and surface membrane Ig's in normal, persistent lymphocytotic and leukemic cows. *Am.J.Vet.Res.*, 39: 45-49.
14. Maiti NK, Saini SS, Sharma SN (1990) Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Res. Comm.*, 14: 207-210.
15. Mueller J, Brun del Re, Buerki HU, Hess MW, Cottier H (1975) Nonspecific esterase activity: a criterion of differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur.J.Immunol.*, 5: 270-274.
16. Muscopolat CC, Johnson DV, Pomeroy KA, Olson JM, Larson VL, Stevens JB, Sorensen DK (1974) Lymphocyte surface immunoglobulin: frequency in normal and lymphocytotic cattle. *Am.J.Vet.Res.*, 35: 593-595.
17. Nakanishi H, Koyama H, Kajikawa O and Saito H (1983) Identification of bovine T and B lymphocytes in normal peripheral blood, lymphnodes and spleen. *Jpn.J.Vet.Sci.*, 45 (1) 97-107.
18. Paul PS, Senogles DR, Muscopolat CC (1979) Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle. *Clin.Exp.Immunol.*, 35: 306-316.
19. Pearson TW, Roelants GE, Lena BL, Major-Whitney KS (1979) The bovine lymphoid system: binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins. *J.Immunol. Methods*, 26: 271-282.
20. Pinkus KS, Hargreaves HK, McLeod YA, Nadler LM, Rosenthal DS, Said JW (1979) Alpha-naphthyl acetate esterase activity a cytochemical marker for T lymphocytes. *Am.J.Pathol.*, 97 (1) 17-42.
21. Pruthi AK, Gupta RKP, Sadana JR (1987) Acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens. *J.Vet.Med.Associat.*, 34: 390-392.
22. Ranki A (1978) Nonspecific esterase activity in human lymphocytes: Histochemical characterisation and distribution among major lymphocyte subclasses. *Clin.Immunol. Immunopathol.* 10: 47-58.
23. Reeves JH, Renshaw HW (1978) Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes. *Am.J.Vet.Res.*, 39: 917-923.
24. Schalm OW, Jain NC, Carrol EJ (1975) Normal values in blood morphology in "Veterinary Hematology" 123-142, 3rd edit. Lea and Febiger Co., Philadelphia.
25. Takashima I, Olson C, Driscoll DM, Baumgartener LE (1977) B lymphocytes and T lymphocytes in three types of bovine lymphosarcoma. *J.Natl. Cancer Inst.*, 59: 1205-1209.
26. Thurmond MC, Canter RL, Picanso JP, Stralka K (1990) Upper-normal prediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with bovine leukemia virus. *Am.J.Vet.Res.*, 51 (3) 466-470.
27. Turnwald GH, McClure JJ, Powell MD, Shao KPP (1988) Peanut agglutinin as a surface marker for canine T lymphocytes. *Am.J.Vet.Res.*, 49 (12) 2076-2080.
28. Yang TJ (1981) Identification of bovine T and B lymphocyte subpopulation by immunofluorescence surface marker analyses. *Am.J.Vet.Res.*, 42: 755-757.
29. Yang TJ, Jantzen PA, Williams LF (1979) Acid alpha-naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. *Immunol.*, 38: 85-93.