

NÖTROFİL ALKALEN FOSFATAZININ KOLORİMETRİK TAYİNİ

Dr. Ebubekir Bakan (x)
Dr. M. Münip Yeğin (xx)
Dr. Mehmet Gündoğdu (xxx)
Uz. İdris Akkuş (x)

ÖZET:

Polimorfnüveli lökosit alfalen fosfataz aktivite seviyeleri, bölgemizdeki sağlam şahıslardan alınan kan numunelerinde kolorimetrik olarak tayin edildi. Periferik kanda lökosit sayımı yapıldı, lökosit formülü çıkarıldı plazma alkale fosfataz aktivitesi ölçüldü. Bulgular uygun yaş gruplarına göre değerlendirilerek bölgemiz normal değerleri tesbit edildi.

GİRİŞ:

Polimorfnüveli lökositler (PMN) (nötrofiller), sitoplazmalarında taşıdıkları çeşitli granüllerde, yabancı partikülleri parçalayan, yirmiden fazla enzime sahiptirler (1). Lökosit alkale fosfataz da (LAP) bunlardan biridir. Sitoplazmada fosfazom denen bir çeşit granülde membrana bağlı olarak bulunur (2). LAP enziminin lökositin bakterisidal aktivitesi ile ilgili olduğu sanılmaktadır (3). Örneğin kronik granulositik lösemide fagositoz yapma yeteneği ve LAP aktivitesinin birlikte azalma göstermesi (4) de bu düşüncüyü destekler. Diğer taraftan LAP aktivitesi bir kısım hastalıkta artma gösterirken diğer bazı hastalıkta azalır. Bu sebeple enzimin normal değerlerinin tesbit edilmesi önem taşımaktadır. Zaten yurdu-muzda bu konuda yapılmış bir çalışma yoktur. Bu çalışmamızda hem bölge normal değerlerinin tesbitini hem de kolorimetrik bir metodun takdimini amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Hiç bir klinik şikayet ve bulgusu olmayan 156 normal kişinin (86 K, 70 E) venöz kanında lökosit sayımı ve yayma yapıldı. Aynı kandan izole edilen lökositler

(x) Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı.

(xx) Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı, Prof.

(xxx) Tıp Fak. İç Hast. Anabilim Dalı Y.Doç.

de LAP aktivitesi tayin edildi. Ayrıca plazma alkalen fosfataz aktivite seviyesi ölçüldü.

Lökositlerin total kandan izolasyonu çalışmamızda önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu işlem için bütün kademelerde plastik malzeme (tüp, pipet, enjektör) kullanıldı (5). Plastik enjektöre alınan 10 ml heparinize (20-30 U/ml olacak şekilde) kanın 4 ml si lökosit sayımı ve yayma için kullanıldı. Aynı kanda plazma alkalen fosfataz aktivitesi DeChatelet ve Cooper (6) tarafından kullanılan metotla (6) tayin edildi.

Plastik enjektörde kalan 6 ml kan üzerine 3 ml (1/2 oranında) % 6 lık dekstrandan (fizyolojik tuzlu suda) eklenerek yavaşça altüst edildi. Oda sıcaklığında, enjektör dik pozisyonda olmak üzere, eritrositlerin çökmesi için 30-60 dakika bekletildi. Eritrositlerin yeteri kadar çöktüğü kanaatine varılınca lökositce zengin üst faz çengel biçimine getirilmiş bir iğne ile plastik bir tüpe aktarıldı. Üzerine 3-4 ml ilk yıkama çöçeltisi (fizyolojik tuzlu suda % 1 oranında etilendiamintetraasetik asit) eklendi (7). Santrifüj edilerek (160xg, 10 dk) yıkama çöçeltisi uzaklaştırıldıktan sonra serum fizyolojik ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Elde edilen lökosit tableti az miktara da olsa eritrosit ihtiva ettiği için, ozmotik şok uygulanarak eritrositler uzaklaştırıldı. Bu lökosit paketine 1-2 ml kadar fizyolojik tuzlu su eklenerek (6) süspanse edildi. Bu üspansiyonda lökosit sayımı yapıldı. Lökosit muhtevası $5-8 \times 10^6$ lök/ml olarak şekilde ayarlandı.

Lökosit sayısını bildiğimiz bu süspansiyondan 1 ml alınarak soğuk hipotonik ortamda (1 ml üspansiyon + 8 ml soğuk distile su) ve aseton-buz karışımında dondurup çözmek suretiyle (8) hücreler parçalandı. Zara bağlı enzimi çözmek için ortama 1 ml saponin (% 2) eklendi. Hazırlanan 10 ml hacmindeki bu muhteva (lizat) 30 dk 0°C'da bekletildi. Bunda DeChatelet ve Cooper'in metoduna göre alkalen fosfataz aktivitesi tayin edildi.

LAP aktivite tayini şöyle yapıldı: Numune (N) ve numune körü (NK) diye işaretlediğimiz iki tüpten her birine 1 ml subtrat (4 mmol p-nitrofenilfosfat/lit ve 0.8 mmol Mg^{+2} /lit; 0,84 M 2-metil-2-amino-1-propanol içinde, pH= 10,2-10,4) konularak 5 dk. süreyle 37°C'de preinkübasyon yapıldı. N tüpüne 0,5 ml lökosit lizatı eklendi ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Bu sürenin bitiminde her iki tüpe de 50 ml NaOH (0,05M) ilave edilerek N tüpündeki reaksiyon durduruldu. NK tüpüne de 0,5 ml lizat eklendikten sonra karıştırıldı ve su körüne karşı 520 nm de optik dansiteler okundu. İki tüpün arasındaki fark, daha önce hazırlanan p-nitrofenol standart grafiğinden U/lit (umol PNP/dak/lit) biriminde okundu. Elde edilen bu aktivite değeri mmol PNP/ 10^{10} lök/saat/(Akt, A) birimine çevrildi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Olgularımız 4 gruba ayrıldı:

1.yg (n=39) 0-15

- 2.yg (n=31) 16-30
 3.yg (n=49) 31-44
 4.yg (n=37) 45 ve yukarısı

Sonuçların ortalama değer ve standart sapmaları hesaplanarak t-testi uygulandı. Plazma alkalin fosfataz değerleri 1.yg'da diğerlerine nazaran daha yüksek bulundu ve bu istatistik açıdan önemli idi ($P < 0,001$) (Tablo-I).

Lökositlerin, yapı ve fonksiyonları bakımından, birbirlerinden çok farklı özellikleri olduğu için, yaygın olarak kullanılan sitolojik tekniklerle bunları ayırmak oldukça zordur. Bu hücrelerin özelliklerini tayin eden önemli metabolizma olaylarındaki değişimleri bizim görebilme yeteneğimiz ise oldukça sınırlıdır. Diğer taraftan sözü edilen bu metabolik olaylar, hücre içindeki katalitik enzimlerin aktiflik derecesine önemli ölçüde bağlıdır. Belki de bazı patolojik ve fizyolojik değişimlere ait metabolik tablonun göstereceği özellikler hücre içindeki enzimlerin aktiflik değişimlerinde kendini gösterecektir. İşte bu, ilim adamlarını hücre içi enzimleri araştırmaya yöneltmiştir (9).

LAP'ın hücredeki esas fonksiyonu tam olarak tesbit edilememiş ise de bu enzimin aktivitesi sitokimyasal olarak tayin edilmiş (10) ve aktivite düzeylerinin daha güvenilir olarak belirlenmesi amacıyla biyokimyasal kantitatif analiz metotları da kullanılmaya başlanmıştır (11). Her iki yöntemin de kendine göre üstün tarafları vardır. Kantitatif yöntem daha güvenilir sonuçlar vermesine karşılık diğeri daha pratik olması dolayısıyla rutin olarak daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo-I. Bulguların yaş grupları, cinsiyet ve genel toplam için ortalama değer ve standart sapmaları.

	n	PLS/mm ³ kan		PPMN/mm ³ kan		PALP (U/lt)		Akt.A	
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$		
1.yg	39	8137	1672	4118	1462	147.6	70.6x	1.51	0.81
2.yg	31	6868	1418	3923	982	54.8	17.2	1.37	0.77
3.yg	49	7084	2997	3936	1875	54.4	15.3	1.50	0.97
4.yg	37	6033	2122	3408	1683	64.8	16.6	1.40	0.66
Kadın	86	7065	2553	3881	2997	80.1	53.6	1.58	0.98
Erkek	70	6891	2262	3836	1533	74.4	46.4	1.30	0.61
Toplam	156	6988	2395	3861	1590	80.1	54.3	1.45	0.82
Literatür değeri (Sato ve ark).								1.16	0.70

*) $P < 0,001$ (diğer gruplarla karşılaştırıldığında)

PLS : Periferik lökosit sayımı

PPMN : Periferik nötrofil değeri

PALP : Plazma alkalin fosfatazı

Akı. A : mmol PNP/10¹⁰lök/saat

Genel toplam için elde ettiğimiz aktivite değerleri literatürle (12) uygunluk göstermektedir. Ayrıca birinci yaş grubunda plazma alkalen fosfataz aktivitesinin yüksek olması bu gruptaki yüksek osteoblastik aktivite ile açıklanabilir.

COLORIMETRIC DETERMINATION OF NEUTROPHIL ALKALINE PHOSPHATASE

SUMMARY

Polymorphonuclear leucocyte alkaline phosphatase levels were determined colorimetrically in blood samples from healthy subjects. In whole blood, peripheral white blood cell count was determined, and the percentage of neutrophils was obtained. Plasma alkaline phosphatase activity levels were measured. By evaluating the findings on the basis of age groups, the normal activity levels were obtained.

KAYNAKLAR

1. Spitsnagel, JK, Dalluorf, PC, Leffel MS, Folds, JD, Welah IRH Cooney MH ve Martin LE. Character of azurophil and specific granules purified from human neutrophils. *Am J Hematol* 1974 13: 73-74.
2. Wilson PD, Rustin GJS, Smith GP ve Fetters TJ. Electron microscopic cytochemical localization of nucleoside phosphatases in normal and chronic granulocytic leukemic human neutrophils. *Histochem. J.* 19.1 13: 73-74.
3. Williams DM. Leukocyte alkaline phosphatase as a marker of cell maturity: a quantitative cytochemical and autoradiographic study *Br J Hematol* 1975 31 (3): 371-369.
4. Whitteaker, JA, Khurspid, M, Hughes HR. Neutrophil function in chronic granulocytic leukaemia before and after treatment. *Br. J. Hematol.* 5974 28: 541.
5. Fvhr J. ve Grossmann HC. Disparity between circulating and marginating neutrophils: evidence from studies on the granulocyte alkaline phosphatase, a marker of cell maturity. *Am J Hematol* 1979 7 (4): 369-379.
6. DeChetelet LA ve Cooper MR. A modified procedure for the determination of leucocyte alkaline phosphatase. *Biochem Med.* 1970 4: 66-68.
7. Yeh AK, Tulsiana DRP ve Cerubelli R. Neuraminidase activity in human leukocytes. *U LAB Clin Med* 1971 78: 771.
8. Rosner F ve Lee SL. Endocrine relationships of alkaline phosphatase. *Blood* 1965 (25 (3): 346-369.

9. Kemp JA, Herndon, JV ve Right CS. Vacillations in leukocyte alkaline phosphatase. Southern Med J 1962 55: 281.
10. Kaplow LS. A histochemical procedure for localizing and evaluating alkaline phosphatase in smear and marrow Blood 1955 10: 1023.
11. Wiltshaw E ve Moloney, WC. Histochemical and biochemical studies leukocyte alkaline phosphatase. Blood 1955 10+1120-1138.
12. Sato N Mori M. Oshimura M, Ueyema Y, Miva T, Ohsawa T, Kosaka, K, ve Asano S. Factor(s) responsible for the increase in alkaline phosphatase activity of postleukemic granulocyte from human individuals and patients with chronic myeloid leukaemia Blood 1972 39 (1): 5a1-5a7.