

Konya Bölgesindeki Kör Farelerin Perifer Kan Lenfositleri Üzerine Enzim Histokimyasal Bir Çalışma

Haluk ÖZPARLAK^{1*}, Emrah SUR², Yasemin ÖZNURLU², Atilla ARSLAN¹

¹Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya

Özet: Bu çalışmada Konya bölgesindeki kör farelerin (*Nannospalax nehringi*, 2n=60 kromozomal formu) perifer kan lenfosit oranları ile alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) pozitif lenfosit oranlarının ışık mikroskopik düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla beş ergin *N. nehringi* (2♀, Meram ve Selçuklu; 3♂, Selçuklu, Çumra ve Ilgın) örneğinden usulüne uygun olarak kan alınmış ve her örnekten altı adet froti hazırlanarak havada kurutulmuştur. Frotilerden ikisi lenfosit oranının tespit edilmesi için rutin May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanmış ve lenfosit oranı %68.00±5.43 olarak belirlenmiştir. Diğer frotiler fosfat tamponlu gluteraldehit-asetonda (-10°C) 3 dakika tespit edilmiştir. Bu frotilerden ikisine ANAE demonstrasyonu, son ikisine de ACP-az demonstrasyonu uygulanmıştır. ANAE demonstrasyonu sonucunda lenfositlerin çoğunluğu pozitif sonuç verdiği halde, daha az orandaki lenfositlerin (%22.29±5.79) negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. ANAE pozitif lenfositlerde iki tip granüler pozitivite tespit edilmiştir. Bu lenfositlerin çoğunda (%73.45±6.87) sayıları 1-5 arasında değişen kırmızı-kahverengi iri granüller (nokta tarzında pozitivite) gözlenirken, daha az orandaki lenfositlerde (%4.26±2.36) ise diffüz çok sayıda küçük granüller (ince granüler pozitivite) gözlenmiştir. Bunun yanı sıra monositler genellikle sitoplazmalarında güçlü ve yaygın tarzda pozitivite gösterirken, nötrofiller ise zayıf bir reaksiyon vermiştir. ACP-az demonstrasyonu sonucunda ise lenfositler çoğunlukla (%83.40±5.90) negatif reaksiyon verirken, daha az orandaki lenfositler (%16.60±5.90) sayıları 1-3 arasında değişen pembe-kırmızı granüler tarzda pozitivite göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Nannospalax nehringi*, kör fare, lenfosit, alfa-naftil asetat esteraz, asit fosfataz

An Enzyme Histochemical Study on the Peripheral Blood Lymphocytes of Mole Rats in Konya Region

Abstract: The aim of this study was to determine peripheral blood lymphocyte (PBL), alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE) and acid phosphatase (ACP-ase) positive PBL percentages of mole rats (*Nannospalax nehringi* (2n=60 chromosomal form); 2♀, Meram and Selçuklu; 3♂, Selçuklu, Çumra and Ilgın) in Konya region. For this purpose, six smears were prepared and air dried from each animal. Two of them were stained with May Grünwald-Giemsa for the determination of PBL percentages. The PBL percentage was 68.00±5.43%. Four smears were fixed in glutaraldehyde-acetone solutions (pH 4.8) at -10°C for 3 minutes. Two of the smears were used for ANAE demonstration. The remaining two smears were used for ACP-ase demonstration. ANAE staining revealed that large majority of the PBLs were positive, whereas smaller proportion (22.29±5.79%) were negative. Positive PBLs showed two distinct granular positivity. While most of the ANAE positive cells (73.45±6.87%) had 1-5 large reddish-brown granules (dot-like granular positivity), 4.26±2.36% of positive cells had large quantity of diffusely arranged small granules (fine granular positivity). Besides, monocytes generally gave a diffuse and strong reaction while neutrophils

*hozparlak@selcuk.edu.tr

displayed a weak positive reaction in their cytoplasms for ANAE. ACP-ase staining revealed that large majority of the PBLs ($83.40 \pm 5.90\%$) were negative, whereas smaller proportion ($16.60 \pm 5.90\%$) were positive. ACP-ase positive cells had 1-3 large pinkish-red granules.

Key words: *Nannospalax nehringi*, mole rat, lymphocyte, alpha-naphthyl acetate esterase, acid phosphatase.

Giriş

Lizozomal bir enzim olan alfa naftil asetat esteraz (ANAE) pratikte pek çok hayvanın gerek doku ve gerekse perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayrıt edilmelerinde kullanılmaktadır [1-10]. ANAE, T-lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanılan bir enzimdir [11]. Çelik ve ark. [12]'da sığır fütüslerinde yaptıkları bir çalışmada, fütüslerin perifer kanlarında ANAE pozitif lenfosit oranlarının da arttığını tespit etmişlerdir. Diğer esteraz grubu enzimler gibi ANAE enziminin de aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır [1]. ANAE enzimi özellikle başta insan olmak üzere [13,14], sığır [15,16], tavuk [17], köpek [18] ve farede [1] T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir.

Asit hidrolazlar grubundan olan asit fosfataz (ACP-az), miyelositler, polimorf nükleer lökositler, lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulcukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir [19]. Özellikle makrofajlar çok güçlü ACP-az aktivitesi gösterirler [13]. ACP-az enzimi de özellikle insanda T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir [11,20].

Kör fareler, memeliler sınıfından kemirgenler ordosuna aittir ve Türkiye'de Wilson ve Reeder [21]'a göre üç türle temsil edilmektedir. Bunlardan *Nannospalax leucodon* Trakya'da, *N. ehrenbergi* Güneydoğu Anadolu'da ve *N. nehringi* ise Güneydoğu Anadolu dışındaki diğer yerlerde yayılış göstermektedir. Konya bölgesinde yapılan en son çalışmada *N. nehringi*'nin üç kromozomal formu ($2n=40, 58$ ve 60) tespit edilmiştir [22].

Kör fareler üzerinde çeşitli histolojik çalışmalar yapılmış olmakla birlikte [23-28], perifer kan lenfositlerinde ANAE ve ACP-az pozitivitesine ait literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu çalışmada Konya bölgesinden elde edilen kör farelerin (*N. nehringi*, $2n=60$ kromozomal formu) perifer kan lenfosit oranları ile ANAE pozitif (ANAE(+)) ve ACP-az pozitif (ACP-az(+)) lenfosit oranlarının ışık mikroskopik düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada Konya bölgesinden sistematik amaçlı bir başka çalışma için yakalanan beş ergin kör fare (*Nannospalax nehringi* ($2n=60$ kromozomal formu); 2♀, Meram ve Selçuklu; 3♂, Selçuklu, Çumra ve Iğın) örneği kullanılmıştır. Canlı olarak laboratuara getirilen sağlıklı hayvanlardan kısa süre içerisinde usulüne uygun olarak kan örnekleri alınmış ve her örnekten altı adet frotiler hazırlanarak havada kurutulmuştur. Bu frotilerden ikisi rutin May-Grünwald Giemsa boyama yöntemiyle [29] boyanarak, etanol serisinde dehidrasyon ve ksilolde şeffaflaştırma basamaklarından sonra entellan (*Merck*) ile kapatılmıştır. Bu preparatlarda lenfosit oranları (%) ışık mikroskopunda immersiyon objektif yardımıyla her birey için 200 akyuvar değerlendirilerek belirlenmiştir.

Diğer dört frotiler enzim demonstrasyonu için -10°C 'deki fosfat tamponlu glutaraldehit-aseton tespit solüsyonunda ($\text{pH}=4.8$) 3 dakika tespit edilmiş ve distile su ile üç kez yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu frotilerden ikisine ANAE demonstrasyonu diğer ikisine ACP-az demonstrasyonu uygulanmıştır.

ANAE demonstrasyonu;

pH'sı 5.0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0.8 ml aseton içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate-*Sigma-N-8505*) yavaş yavaş damlatılmıştır. Ardından 2.4 ml %4'lük sodyum nitrit (*Merck-1.06544*) solüsyonu ile 2.4 ml pararozanilin (*Sigma-P-3750*) (1 g pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesiyle elde edilen 4.8 ml heksazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklenmiştir. Hazırlanan solüsyonun pH'sı, 1 N NaOH solüsyonu ile 5.8'e ayarlandıktan sonra süzümüştür. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde frotiler 37°C'de en az 2 saat süreyle kontrollü bir şekilde bekletilmiş, kırmızı-kahverengi granüllerin şekillenmesinin ardından inkübasyon işlemi sona erdirilmiştir.

ACP-az demonstrasyonu;

Tampon solüsyonu olarak pH'sı 5 olan tamponlu Michael'in Veronal-asetat solüsyonu, substrat solüsyonu olarak 1 ml N,N-dimetilformamide içerisinde çözdürülmüş 10 mg naphthol AS-BI phosphate (*Sigma-N-2125*) kullanılmıştır. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu, 13 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 1.6 ml heksazotize edilmiş (0.8 ml pararozanilin, 0.8 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklenmiştir. Karışımın son pH'sı 1 N NaOH solüsyonu ile 5.0'e ayarlandıktan sonra süzümüştür. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri 37°C'de kontrollü bir şekilde kırmızı granüller şekilleninceye kadar en az 2 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Inkübasyon sonunda üçer defa distile suyla yıkanan preparatlara 20 dakika süreyle 0.1 M asetat tamponunda (pH=4.2) hazırlanan %1'lik methyl-green (*Merck C.I.N. 2585*) çekirdek boyası uygulanmış, preparatlar etanol serisinde dehidrasyon ve ksilolde şeffaflaştırma basamaklarından sonra entellan (*Merck*) ile kapatılmıştır. ANAE demonstrasyonunda lenfosit morfolojisine sahip 1-5 arasında değişen sayıda kırmızı-kahverengi granüle sahip olan hücreler ANAE(+)¹ lenfositler, farklı tipte reaksiyon gösterenler ANAE(+)² lenfositler ve reaksiyon vermeyenler ANAE(-) lenfositler olarak kabul edilmiştir. ACP-az demonstrasyonunda ise 1-3 arasındaki sayıda pembe-kırmızı granüle sahip hücreler ACP-az(+) lenfositler ve reaksiyon vermeyenler ACP-az(-) lenfositler olarak kabul edilmiştir. Işık mikroskopik incelemelerde immersiyon objektifiyle her birey için 200 adet lenfosit değerlendirilerek ANAE(+)¹, ANAE(+)², ANAE(-), ACP-az(+) ve ACP-az(-) lenfosit oranları (%) belirlenmiştir. Enzim demonstrasyonları ve değerlendirmeler Sur ve ark. [30]'na göre gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar

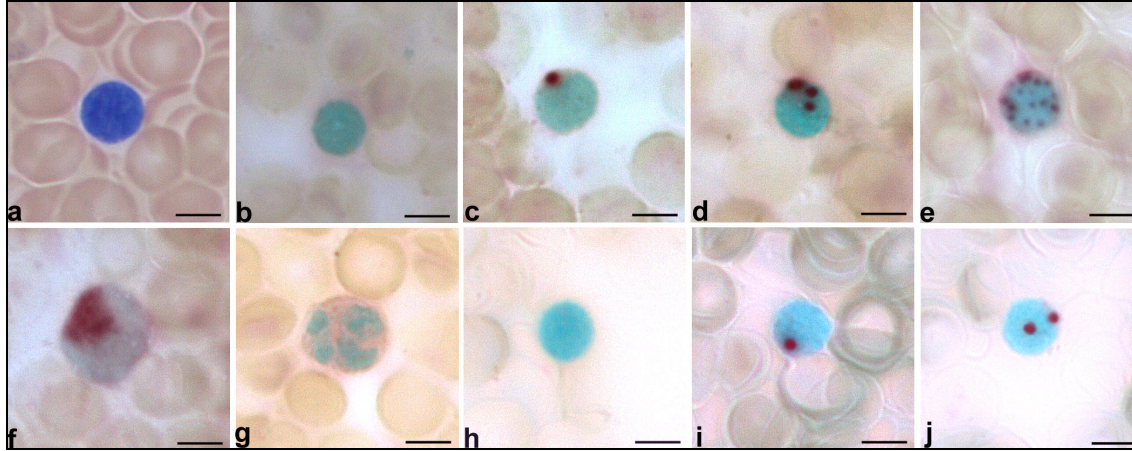
N. nehringi perifer kan örneklerinden hazırlanmış ve May-Grünwald Giemsa ile boyanmış preparatlardaki lenfositlerden biri Şekil 1.a'da görülmektedir. Bu türe ait ortalama lenfosit oranı ise Tablo 1'de verilmiştir.

ANAE demonstrasyonu sonucunda lenfositlerin çoğunluğu pozitif sonuç verdiği halde, daha az orandaki lenfositin (%22.29) negatif sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 1.b, Tablo 1). ANAE(+) lenfositlerde iki tip granüler pozitivite tespit edilmiştir. Lenfositlerin %73.45'inde sayıları 1-5 arasında değişen kırmızı-kahverengi iri granüller (ANAE(+)¹, nokta tarzında pozitivite) gözlenirken, lenfositlerin %4.26±2.36'sında ise diffüz çok sayıda küçük granüller (ANAE(+)², diffüz ince granüler pozitivite) gözlenmiştir (Şekil 1.c-e, Tablo 1). Nokta tarzında pozitivite gösteren hücrelerde granüller çoğunlukla hücre zarının hemen altında lokalize olmakla birlikte sitoplazmanın değişik yerlerinde de gözlenmiştir. Diffüz granüler pozitivite gösteren hücrelerde ise granüllerin sitoplazmanın her tarafına dağılımı olduğu dikkat çekmiştir. Bunun yanı sıra monositler genellikle sitoplazmalarında güçlü ve yaygın tarzda pozitivite gösterirken, nötrofiller ise çok zayıf bir reaksiyon vermiştir (Şekil 1.f ve g).

ACP-az demonstrasyonu sonucunda ise lenfositler çoğunlukla (%83.40) negatif reaksiyon verirken, daha az orandaki lenfositler (%16.60) sayıları 1-3 arasında değişen pembe-kırmızı granüler tarzda pozitivite göstermiştir (Şekil 1.h-j, Tablo 1). ACP-az pozitif lenfositlerde granüller çoğunlukla hücre zarının hemen altında lokalize olmakla birlikte sitoplazmanın değişik yerlerinde de gözlenmiştir.

Tablo 1. *Nannospalax nehringi*'nin (n=5) perifer kan lenfosit oranı ile ANAE ve ACP-az pozitivite oranları ($\bar{x} \pm SS$)

Lenfosit Oranı (%)	Lenfositlerin ANAE Pozitivite Oranı (%)			Lenfositlerin ACP-az Pozitivite Oranı (%)	
	ANAE(+) ¹	ANAE(+) ²	ANAE(-)	ACP-az(+)	ACP-az(-)
68.00±5.43	73.45±6.87	4.26±2.36	22.29±5.79	16.60±5.90	83.40±5.90



Şekil 1. a) May-Grünwald Giemsa ile boyanmış lenfosit b) Pozitivite göstermeyen ANAE(-) lenfosit c) Tek granüllü ANAE(+)¹ lenfosit d) Üç granüllü ANAE(+)¹ lenfosit e) Diffüz, çok sayıda ve ince granüler pozitivite gösteren ANAE(+)² lenfosit f) Sitoplazmasında yaygın ve güçlü tarzda ANAE pozitivitesi gösteren monosit g) Sitoplazmasında çok zayıf ANAE pozitivitesi gösteren nötrofil h) Pozitivite göstermeyen ACP-az(-) lenfosit i) Tek granüllü ACP-az(+) lenfosit j) İki granüllü ACP-az(+) lenfosit (Bar= 5 µm).

Tartışma

Lenfosit oranı memeli hayvanlardan tavşanlar için %54.2-%73.25, kobay için %71.4, ratlar için %68.00-71.1 ve fareler için %74.3-76.9 olarak bildirilmiştir [31,32]. Bu çalışmada kör fare (*N. nehringi*) için tespit ettiğimiz %68.00'lik lenfosit oranı, memelilerden kemirgen olan ratlara, kobaylara ve farelere ayrıca kemirgen olmamakla birlikte tavşanlara çok yakındır. Bununla birlikte Candan [23]'ün Ankara bölgesinden elde ettiği kör farelerle (*Spalax leucudon*) yaptığı bir çalışmada, kontrol grubu örneklerinde akyuvarlar içinde en yüksek oranda nötrofiller belirlenmiş, ikinci sırada %33 oranla lenfositlerin bulunduğu bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımızla karşılaştırıldığında lenfosit oranları arasındaki farkın hayvanların yaşam koşulları, yaşları, cinsiyetleri, strese maruz kalmaları ve örneklerin farklı bölgelere ait olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

ANAE pozitivitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde iki farklı pozitivite tipi tespit edilmiştir [2,8,14]. Bunlardan birincisi, bir veya birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tipindeki pozitivite (Dot-Like Positivity Pattern) T-lenfositlere özgüdür [2-4,8,9,16,18]. İkinci tip pozitivite ise ince granüler boyanmadır (Fine Granular Positivity Pattern). Bu tarz boyanmanın "Null Cells" olarak adlandırılan hücrelere özgü olduğu ifade edilmektedir [2,14]. B-lenfositlerin ise ANAE negatif reaksiyon verdiği bildirilmektedir [1,2,5,6,14,33]. Monosit ve makrofajlarda sitoplazmada yaygın ve güçlü bir pozitivite gözlemlendiği bildirilmiştir [2,14,16,33,34]. Nötrofillerin ise memelilerde çoğunlukla zayıf pozitivite verdiği belirtilmiştir [34]. Bu çalışmada da benzer şekilde kör farelerde ANAE demonstrasyonu sonucu lenfositler nokta tipinde ve ince granüler pozitivite, monositler

yaygın ve güçlü bir pozitivite, nötrofiller ise çok zayıf bir pozitivite göstermiştir. Nokta tipinde pozitivite gösteren lenfositler ANAE(+)¹ kabul edilmiştir. Bununla birlikte ANAE enziminin kör farelerde T-lenfositlere özgü olduğu konusunda bir literatür bilgisi olmadığı için ışık mikroskopik düzeydeki bu çalışma ile ANAE(+)¹ lenfositlerin T-lenfositler, ANAE(-) lenfositlerin B-lenfositler olduğu söylenemez. İnce granüler pozitivite gösteren lenfositler ise ANAE(+)² kabul edilmiştir. Düşük orandaki bu hücrelerin ise Null hücresi olması muhtemeldir.

Goldberg ve Barka [35] insan perifer kan frotilerinde, en güçlü ACP-az aktivitesine monosit ve eozinofillerde rastlamışlar, bazofillerin ise negatif reaksiyon verdiklerini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada [36] ise insan perifer kanındaki lenfositlerin birkaç adet iri granülden oluşan granüler enzim pozitivitesi gösterdikleri, monositlerin ise soluk ve sitoplazmaya dağılmış haldeki ince granüllerden oluşan yaygın pozitivite gösterdikleri belirlenmiştir. Yang ve ark. [20]'nın neoplastik ve non-neoplastik insan lenf yumrularında yapmış oldukları bir çalışmada, ACP-az için biri hem lenf yumrusu hem de kan frotilerindeki T-lenfositlerinde gözlenen globuler pozitiviteyle, sadece lenf yumrularındaki T-lenfositlerinde tespit edilen granüler pozitivite tiplerini gözlemişlerdir. Kobay, fare ve ratların timositlerinde, bir ya da birkaç iri granül halinde veya sitoplazmanın bir kutbunda toplanmış küçük granüler tarzındaki ACP-az pozitivitesi gözlenirken; dalak ve lenf yumrularındaki lenfositlerde ise yaygın non-granüler pozitivite gözlenmektedir [37,38]. Basso ve ark. [11] insanlarda timositlerde erken fetal dönemde kazanılan ACP-az pozitivitesinin doğumdan sonra da perifer kan T-lenfositlerinde güçlü bir şekilde gözlendiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte tavukların T-lenfositlerinde ACP-az pozitiviteleri konusunda farklı görüşler vardır. Glick [39] ile Moriya ve Ichikawa [40], bursa Fabricii'deki lenf foliküllerinin korteks ve medullaları ile timusun hem korteks ve hem de medullasında ACP-az içeren lenfositlerin bulunduğunu; bu nedenle de ACP-az'ın tavuk T-lenfositlerine özgü olmadığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise ACP-az enziminin tavuklarda B-lenfositlere özgü olduğunu ileri sürmektedir [41,42]. Bu çalışmada ACP-az demonstrasyonu sonucu lenfositlerde iri granüler pozitivite gözlenmiştir. Bununla birlikte bazı memeli türlerinde ve tavukta iyi sonuç veren ve bu çalışmada da uygulanan ACP-az demonstrasyon yöntemiyle kör farelerde lenfositlerdeki ACP-az pozitivitesi düşük oranda tespit edilmiştir. Bu durum enzim histokimyasal çalışmalarda önemli bir etken olan inkübasyon solüsyonunun pH'sına bağlı olabilir ve ileride yapılacak çalışmalarda pH değişikliklerine gidilerek yöntem kör fareler için modifiye edilebilir. Ayrıca ACP-az'ın kör farelerde T-lenfositlere özgü olduğu konusunda bir literatür bilgisi olmadığı için ışık mikroskopik düzeydeki bu çalışma ile ACP-az(+) lenfositlerin T-lenfositler olduğu sonucuna varılamaz.

Farklı memeli türlerinin perifer kanlarındaki ANAE(+)¹ ve ACP-az(+) lenfosit oranları oldukça değişiklik göstermektedir. İnsanlarda %69-75 [6,14], köpeklerde %56-78 [18,34], kedilerde %64 [34], domuzlarda %59 [34], sığırlarda %47.7-%56.1 [16,34], develerde %81.33 [43], tavşanlarda %34 [32] ve yarasalarda %44.76-52.61 [44] oranında ANAE(+)¹ lenfosit bulunduğu bildirilmiştir. Sen ve ark. [45] melez köpeklerin perifer kan lenfositlerinde %62.64 oranında ANAE(+)¹ lenfosit, %46.74 oranında ACP-az(+) lenfosit belirlerken, Sur ve ark. [30] ise erkek ve dişi Kangal köpeklerinde sırasıyla %63.13 ve %60.75 oranında ANAE(+)¹ lenfosit, %39.40 ve %39.13 oranında ACP-az(+) lenfosit belirlemişlerdir. Sur [46] koyunlarda yaptığı çalışmada ise %66.37-83.54 oranında ANAE(+)¹ ve %21.12-42.62 oranında ACP-az(+) lenfosit belirlemiştir. Goldberg ve ark. [47] ratlarda ACP-az(+) lenfosit oranını yaklaşık %60 olarak belirlemiş ve farelerde bu oranın daha düşük olduğunu vurgulamıştır. Yukarıda bahsedilen memeli türlerine kıyasla bu çalışmada kör fareden elde ettiğimiz %73.45'lik ANAE(+)¹ lenfosit oranı genel olarak yüksek, %16.60'lık ACP-az(+) lenfosit oranı ise düşük görülmektedir.

Sonuç olarak Konya bölgesinden elde edilen kör farelerin perifer kan lenfosit oranları ile ANAE(+)¹ ve ACP-az(+) lenfosit oranlarının belirlendiği bu çalışmada, elde edilen verilerin bundan sonra yapılacak olan benzer çalışmalara katkı sağlayacağı ve alanındaki literatür boşluğunu kısmen de olsa dolduracağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Mueller, J., Brundel G., Buerki, H., Keller, H.U., Hess, M.W. and Cottier, H. **Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes.** Eur. J. Immunol. 5: 270-274 (1975)
2. Higgy, K.E., Burns, G.F. and Hayhoe, F.G.J. **Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry.** Scand. J. Haematol. 18: 437-448 (1977)
3. Knowles, D.M. and Holck, S. **Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase.** Lab. Invest. 39 (1): 70-76 (1978)
4. Knowles, D.M., Hoffman, H.T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G. **The demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker.** Cell Immunol. 35: 112-123 (1978)
5. Pangalis, G.A., Waldman, S.R. and Rappaport, H. **Cytochemical findings in human nonneoplastic blood and tonsillar B and T lymphocytes.** Am. J. Clin. Pathol. 69: 314-318 (1978)
6. Ranki, A. **Non-specific esterase activity in human lymphocytes.** Clin. Immunol. Immunopathol. 10: 47-58 (1978)
7. Knowles, D.M. and Halper, J.P. **Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity.** J. Immunol. 125 (6): 2823-2825 (1980)
8. Zicca, A., Zeprini, A., Cadoni, A., Franzi, A.T., Ferrarini, M. and Grossi, C.E. **Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human T_m lymphocytes.** Am. J. Pathol. 105 (1): 40-46 (1981)
9. Pruthi, A.K., Gupta, R.K.P. and Sadana, J.R. **Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens.** J. Vet. Med. A. 34: 390-392 (1987)
10. Ramos, J.A., Ramis, A.J., Marco, A., Domingo, M., Rabanal, R. and Ferrer, L. **Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine.** Am. J. Vet. Res. 53 (8): 1418-1426 (1992)
11. Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A. and Zanesco, L. **Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes.** Brit. J. Haematol. 44: 577-582 (1980)
12. Çelik, İ., Aştı, R.N. ve Boyraz, M.Ü. **Sığır fetal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar.** S.Ü. Vet. Fak. Derg. 8 (2): 41-44 (1992)
13. Li, C.Y., Yam, L.T. and Crosby, W.H. **Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen.** J. Histochem. Cytochem. 20 (12): 1049-1058 (1972)
14. Çelik, İ., Aştı, R.N. ve Ergene, N. **İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immüoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi.** S.Ü. Tıp Fak. Derg. 7 (4): 497-503 (1991)
15. Yang, T.J., Jantzen, P.A. and Williams, L.F. **Acid α -naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T- and B lymphocytes.** Immunology 38: 85-93 (1979)
16. Kajikawa, O., Koyama, H., Yashikawa, T., Tsubaki, S. and Saito, H. **Use of alpha-naphthyl acetate acid esterase staining to identify T lymphocytes in cattle.** Am. J. Vet. Res. 44 (8): 1549-1552 (1983)
17. Maiti, N.K., Saini, S.S. and Sharma, S.N. **Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes.** Vet. Res. Commun. 14: 207-210 (1990)
18. Wulff, J.C., Sale, G.E. Deeg, H.J. and Storb, R. **Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes.** Exp. Hematol. 9 (8): 850-870 (1981)
19. Catowsky, D. **Leucocyte cytochemical and immunological techniques.** In: Practical Haematology. Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (eds.). Churchill Livingstone, 7th edition, pp. 143-174 (1981)

20. Yang, K., Bearman, R.M., Pangalis, G.A., Zelman, R.J. and Rappaport, H. **Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes.** Am. J. Clin. Pathol. 78 (2): 141-149 (1982)
21. Wilson, E. and Reeder, M.D. **Mammal species of the world, A taxonomic and geographic reference.** 2nd edition, Smithsonian Institution Press, Washington and London, 2000 p. (2005)
22. Akan, Ş. **Konya bölgesindeki *Nannospalax* (Mammalia:Rodentia) kromozomal formlarının (2n= 40, 58, 60) heterokromatin dağılımı ve nükleolar organizatör bölgeleri (NORs).** S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 74 s. (2009)
23. Candan, S. **Normal ve U.V. ile ışınlanmış *Spalax leucodon* (Rodentia: Spalacidae)'da kan sayımı ve kan hücrelerinin ışık mikroskopuyla incelenmesi.** G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 33 s. (1990)
24. Nikolic, Z., Blagojevic, Z., Vitorovic, D. and Mrvic, V. **The morphology and the arteries of the ovary and the uterus in the molle rat (*Spalax leucodon*).** Acta Vet. (Beograd) 44 (5-6): 365-370 (1994)
25. Shanas, U., Arensburg, B., Hammel, I., Hod, I. ve Terkel, J. **Quantitative histomorphology of the blind mole rat harderian gland.** J. Anat. 188: 341-347 (1996)
26. Türker, H., Güven, T. ve Yel, M. **Kör fare (*Spalax leucodon*) tiroit bezi foliküler hücrelerinin ince yapısı.** G.Ü. Fen Bilim. Derg. 13 (4): 895-904 (2000)
27. Yel, M. **Kör fare (*Spalax leucodon*) epidermisinin stratum basale ve stratum spinosum kısımlarının ince yapısı.** G.Ü. Fen Bilim. Derg. 13 (4): 1143-1154 (2000)
28. Yel, M. **Kör fare (*Spalax leucodon*) epidermisinin stratum granulosum ve stratum corneum kısımlarının ince yapısı.** G.Ü. Fen Bilim. Derg. 14 (1): 197-208 (2001)
29. Konuk, T. **Pratik Fizyoloji.** A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, 378, A.Ü. Basımevi, Ankara (1981)
30. Sur, E., Celik, I., Oznurlu, Y., Aydin, M.F., Sen, I. and Ozparlak, H. **Enzyme histochemistry and AgNOR numbers in the peripheral blood leukocytes of 6 month-old Kangal bred Anatolian shepherd dogs.** Revue Med. Vet. 154 (10): 591-598 (2003)
31. Jain, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology.** Lea&Febiger (1993)
32. Aydın, M.F., Öznurlu, Y., Çelik, İ., Telatar, T. ve Sur, E. **Ankara tavşanı perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esterase (ANAE) ve bazı AgNOR parametreleri üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar.** Veterinarium 18: 3-9 (2007)
33. Pinkus, G.S., Hargreaves, H.K., McLeod, J.A., Madler, L.M., Rosenthal, D.S. and Said, J.V. **α -naphthyl acetate esterase activity. A cytochemical marker for T-lymphocytes.** Am. J. Pathol. 97: 17-42 (1979)
34. Nakase, Y. and Kobayashi, K. **Cytochemical studies of leukocytes of some animal species III. Esterase stain.** Bull. Azabu Univ. Vet. Med. 5 (1): 1-10 (1984)
35. Goldberk, A.F. and Barka, T. **Acid phosphatase activity in human blood cells.** Nature 21: 292 (1962)
36. Kaplow, L.S. and Burstone, M.S. **Cytochemical demonstration of acid phosphatase in hematopoietic cells in health and various hematological disorders using azo dye techniques.** J. Histochem. Cytochem. 12 (2): 805-812 (1964)
37. Tamaoki, N. and Essner, E. **Distribution of acid phosphatase, β -glucuronidase and N-acetyl- β -glucosaminidase activities in lymphocytes of lymphatic tissues of man and rodents.** J. Histochem. Cytochem. 17 (4): 238-243 (1969)
38. Seymour, G.J., Dockrell, H.M. and Greenspan, J.S. **Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease.** Clin. Exp. Immunol. 32: 169-178 (1978)
39. Glick, B. **Bursa of Fabricius: development, growth, modulation, and endocrine function.** CRC Crit. Rev. Poultry Biol. 1 (2): 107-132 (1988)

40. Moriya, O. and Ichikawa, Y. **Acid phosphatase in lymphoid tissues of developing chick embryos.** Acta Histochem. 87 (2): 99-105 (1989)
41. Graczyk, S. **The effect of anti-bursa serum (ABS) on the intensity of acid phosphatase reaction in bursa-dependent structures of the spleen and on the level of antibodies in the blood serum.** Arch. Vet. Pol. 34 (1-2): 25-36 (1994)
42. Sur, E. and Celik, I. **Effects of aflatoxin B₁ on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken.** Brit. Poultry Sci. 44 (4): 558-566 (2003)
43. Sandıkçı, M., Kum, Ş. ve Eren, Ü. **Develerin (*Camelus dromedarius*) perifer kan lökositlerinde alfa-naftil asetat esteraz aktivitesinin belirlenmesi.** Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 52: 13-16 (2005)
44. Telatar, T., Arslan, A., Sur, E., Öznurlu, Y. ve Özparlak H. **Üç farklı yarasa türünün perifer kan lenfositleri üzerine enzim histokimyasal bir çalışma.** S. Ü. Fen Ed. Fak. Fen Derg. 32: 1-7 (2008)
45. Sen, I., Turgut, K., Celik, I. and Kiran, M.M. **The importance of lymphocyte enzyme profile, inclusion bodies in circulating leukocytes and conjunctival smear samples in the diagnosis on canine distemper virus infection.** Indian Vet. J. 79: 213-217 (2002)
46. Sur, E. **Farklı yaş gruplarındaki Türk merinosu erkek kuzularının perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) enzimi aktivitelerinin belirlenmesi.** Veterinarium 15 (1): 15-22 (2004)
47. Goldberk, E.D., Karpova, G.V., Melik-Gaikazyan and Pakhryaeva, G.N. **Content of acid and alkaline phosphatases in lymphocytes of peripheral blood and hematopoietic organs of intact rats and mice.** B. Exp. Biol. Med. 85 (2): 150-151 (1978)