

Üç Farklı Yarasa Türünün Perifer Kan Lenfositleri Üzerine Enzim Histokimyasal Bir Çalışma

Tuğba TELATAR¹, Atilla ARSLAN², Emrah SUR¹,
Yasemin ÖZNURLU¹, Haluk ÖZPARLAK^{2*}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya

²Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

Özet: Bu çalışmada Türkiye'deki üç farklı yarasa türünün 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 dört *Rhinolophus ferrumequinum* (Büyük nal burunlu yarasa; 2♀, 2♂, Kilis), dört *Pipistrellus kuhlii* (Beyaz yakalı yarasa; 2♀, 2♂, Mersin) ve beş *Tadarida teniotis* (Kuyruklu yarasa; 4♀, 1♂, Şanlıurfa) örneğinden usulüne uygun olarak kan alınmış ve her örnekten altı adet froti hazırlanarak havada kurutulmuştur. Rutin May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyanan iki frotide lenfosit oranları 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 lenfositler 1-3 arasında değişen sayıda kiremit kırmızısı-kahverengi granülden ibaret nokta tarzında pozitivite göstermiştir. Monositler sitoplazmalarında güçlü ve yaygın tarzda pozitivite gösterirken, nötrofiller ise zayıf bir reaksiyon vermiştir. ACP-az demonstrasyonu sonucunda ise bu çalışmada incelenen her üç yarasa türünün lenfositlerinde ACP-az pozitivitesine özgü granüllere rastlanmamıştır. *R. ferrumequinum*, *P. kuhlii* ve *T. teniotis* için ortalama lenfosit oranları sırasıyla %68.94±6.53, %61.58±7.14 ve %72.80±3.18, ortalama ANAE pozitif lenfosit oranları ise %52.61±2.55, %44.76±9.07 ve %46.29±3.48 olarak belirlenmiştir. Lenfosit oranı bakımından *P. kuhlii* ve *T. teniotis* arasındaki fark ile ANAE pozitif lenfosit oranı bakımından *R. ferrumequinum* ve *T. teniotis* arasındaki fark istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: *Rhinolophus ferrumequinum*, *Pipistrellus kuhlii*, *Tadarida teniotis*, lenfosit, alfa-naftil asetat esteraz, asit fosfataz.

An Enzyme Histochemical Study on the Peripheral Blood Lymphocytes of Three Different Bat Species

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 three bat species (*Rhinolophus ferrumequinum* 2♀, 2♂, Kilis; *Pipistrellus kuhlii* 2♀, 2♂, Mersin; and *Tadarida teniotis* 4♀, 1♂, Şanlıurfa) in Turkey. 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. 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 positive lymphocytes displayed a dot like positivity pattern characterized with 1-3 reddishbrown cytoplasmic granules. Monocytes gave a diffuse and strong reaction while neutrophils displayed a weak positive reaction in their cytoplasms for ANAE. However, lymphocytes were not displayed ACP-ase positivity in all bat species investigated. Mean PBL ratios were 68.94±6.53%, 61.58±7.14% and 72.80±3.18%, and mean ANAE positivity ratios of PBL were 52.61±2.55%, 44.76±9.07% and 46.29±3.48% for *R. ferrumequinum*, *P. kuhlii* and *T. teniotis*, respectively. The differences in PBL ratios between *P. kuhlii* and *T. teniotis* and in ANAE positivity ratios of PBL between *R. ferrumequinum* and *T. teniotis* were statistically significant ($p<0.05$).

Key words: *Rhinolophus ferrumequinum*, *Pipistrellus kuhlii*, *Tadarida teniotis*, lymphocyte, alpha-naphthyl acetate esterase, acid phosphatase.

* E-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

Giriş

Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) lizozomal bir enzimdir [1, 2]. Pratikte pek çok türün gerek doku ve gerekse perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde bu enzimden yararlanılmaktadır [3-10]. 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 lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlamış, gebeliğin ilerlemesi ile birlikte 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 [3]. ANAE özellikle başta insan olmak üzere [13, 14], sığır [15, 16], tavuk [17], köpek [18] ve farede [3] T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir.

Asit fosfataz (ACP-az) asit hidrolazlar grubundan olup, 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].

Bazı yarasa türlerinin kanlarında hematolojik parametreler belirlenmiş ve histokimyasal çalışmalar yapılmış olmakla birlikte [21-23], perifer kan lenfositlerinde ANAE ve ACP-az pozitivitesine ait literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu çalışmada Türkiye'deki üç farklı yarasa türünün 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 dört *Rhinolophus ferrumequinum* (Büyük nal burunlu yarasa; 2♀, 2♂, Kilis), dört *Pipistrellus kuhlii* (Beyaz yakalı yarasa; 2♀, 2♂, Mersin) ve beş *Tadarida teniotis* (Kuyruklu yarasa; 4♀, 1♂, Şanlıurfa) örneği kullanılmıştır. Canlı olarak laboratuara getirilen sağlıklı hayvanların ön üyelerindeki toplardamarlardan usulüne uygun olarak örnekleri alınmış ve her örnekten altı adet frotiler hazırlanarak havada kurutulmuştur. Bu frotilerden ikisi rutin May-Grünwald Giemsa boyama yöntemiyle [24] 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 (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 için inkübasyon işlemi şu sıra ile gerçekleştirilmiştir. 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. Daha sonra 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 süzölmüştür. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde frotiler 37°C'de en az 2 saat süreyle kontrollü bir şekilde bekletilmiş, kırmızı-kahverengi granüllerin şekillenmesinden sonra inkübasyon işlemi sona erdirilmiştir.

ACP-az demonstrasyonu için inkübasyon işlemi şu sıra ile gerçekleştirilmiştir. pH'sı 5 olan tamponlu Michael'in Veronal-asetat solüsyonu ile substrat 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 süzölmüştür. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri 37°C'de kontrollü bir şekilde kırmızı granüller şekilleninceye kadar (maksimum 6 saat) inkübe edilmiştir.

İnkübasyon 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 1-3 arasında değişen sayıda kiremit kırmızısı-kahverengi granüle sahip olan hücreler ANAE(+) lenfositler olarak kabul edilirken, ACP-az demonstrasyonunda 1-3 arasındaki sayıda kırmızı granüle sahip hücreler ACP-az(+) lenfositler olarak kabul edilmiştir. Işık mikroskopik incelemelerde immersiyon objektifiyle her birey için 200 adet lenfosit değerlendirilerek ANAE(+) lenfosit oranları (%) belirlenmiştir. ACP-az demonstrasyonu sonucunda uzun süreli inkübasyona rağmen bu çalışmada incelenen her üç yarasa türünün lenfositlerinde ACP-az pozitivitesine özgü granüllere rastlanmamış ve ACP-az(+) lenfosit oranları belirlenememiştir. Enzim demonstrasyonları ve değerlendirmeler Sur ve ark. [25]'na göre gerçekleştirilmiştir.

Üç yarasa türünün lenfosit ve enzim pozitif lenfosit oranları arasındaki farkların belirlenmesi için t-testi uygulanmış ve SPSS (9.0.0 versiyonu) paket programından faydalanılmıştır.

Sonuçlar

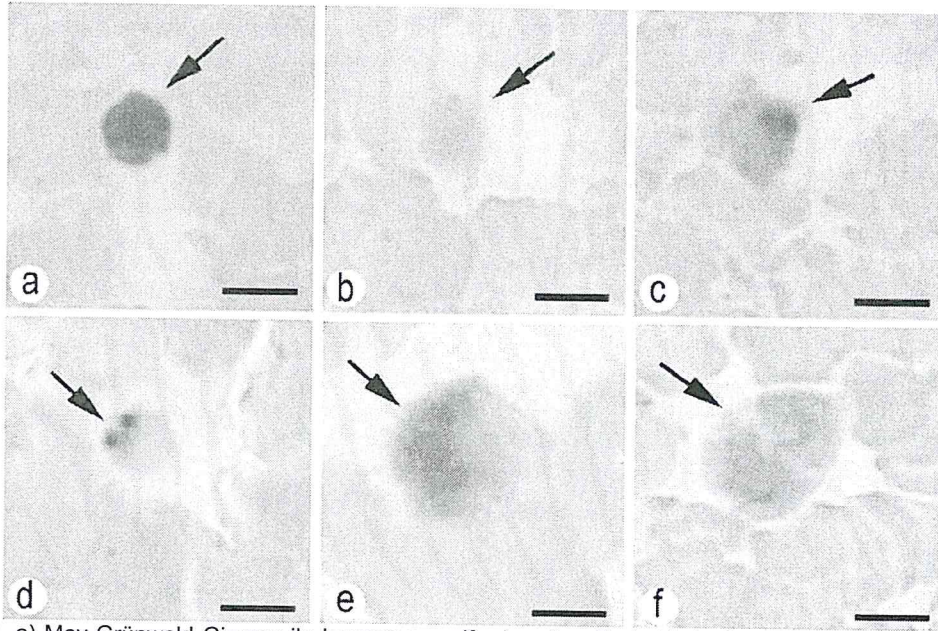
R. ferrumequinum, *P. kuhlii* ve *T. teniotis*'in perifer kan örneklerinden hazırlanmış ve May-Grünwald Giemsa ile boyanmış preparatlarındaki lenfositler Şekil 1 (a)'da görülmektedir. Bu üç türe ait ortalama lenfosit oranları Tablo 1'de verilmiş ve lenfosit oranı bakımından *P. kuhlii* ve *T. teniotis* arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Her üç yarasa türünde de ANAE demonstrasyonu sonucunda lenfositler bir ya da birkaç adet kiremit kırmızısı-kahverengi granülden ibaret nokta tarzında pozitivite gösterirken, monositler sitoplazmalarında yaygın ve güçlü tarzda pozitivite göstermiş, nötrofiller ise zayıf reaksiyon vermiştir (Şekil 1 (b-f)). ACP-az demonstrasyonu sonucunda ise bu çalışmada incelenen her üç yarasa türünün lenfositlerinde ACP-az pozitivitesine özgü granüllere rastlanmamıştır. Her üç yarasa türünün ortalama ANAE(+) lenfosit oranları Tablo 1'de verilmiştir. ANAE(+) lenfosit oranı bakımından *R. ferrumequinum* ve *T. teniotis* arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 1. Çalışmada incelenen üç farklı yarasa türünün perifer kan lenfosit oranları ile ANAE(+) lenfosit ve ACP-az(+) lenfosit oranları

	Lenfosit oranı (%) $\bar{x} \pm SS$	ANAE(+) lenfosit oranı (%) $\bar{x} \pm SS$	ACP-az(+) lenfosit oranı (%) $\bar{x} \pm SS$
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (n=4)	68.94±6.53 ^{ab}	52.61±2.55 ^a	Pozitivite tespit edilmedi
<i>Pipistrellus kuhlii</i> (n=4)	61.58±7.14 ^a	44.76±9.07 ^{ab}	Pozitivite tespit edilmedi
<i>Tadarida teniotis</i> (n=5)	72.80±3.18 ^b	46.29±3.48 ^b	Pozitivite tespit edilmedi

^{ab}Aynı sütunda farklı harf bulunduran ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (t testi, $p<0.05$)



Şekil 1. a) May-Grünwald Giemsa ile boyanmış perifer kan örneğinde bir lenfosit b) Perifer kanda ANAE enzim demonstrasyonu sonunda pozitivite göstermeyen lenfosit c) Tek granüllü ANAE(+) lenfosit d) İki granüllü ANAE(+) lenfosit e) Sitoplazmasında yaygın ve güçlü tarzda pozitivite gösteren monosit f) Sitoplazmasında zayıf reaksiyon gösteren nötrofil (Bar= 5 µm).

Tartışma

Lenfosit oranı memeli hayvanlardan tavşanlar için %54.2-62.5, kobay için %71.4, ratlar için %68.3-71.1 ve fareler için %74.3-76.9 olarak bildirilmiştir [26]. Bu çalışmada yarasalar için tespit ettiğimiz %61.58-72.80'lik lenfosit oranları, yukarıda bahsedilen diğer bazı memeli hayvanların lenfosit oranlarına yakın görünmektedir. Bununla birlikte farklı yarasa türleri arasında lenfosit oranı bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık olabileceği tespit edilmiştir.

ANAE pozitivitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde iki farklı pozitivite tipi tespit edilmiştir [2, 4, 14]. Bunlardan birincisi, bir veya birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tipindeki pozitivite (Dot Like Positivity Pattern) T-lenfositlere özgüdür [1, 2, 4, 5, 9, 14, 16, 18]. İkinci tip pozitivite ise ince-granüler boyanmadır (Fine Granuler Positivity Pattern). Bu tarz boyanmanın "Null Cells" olarak adlandırılan hücrelere özgü olduğu ifade edilmektedir [4]. B-lenfositlerin ise ANAE negatif reaksiyon verdiği bildirilmektedir [3, 4, 6, 7, 14]. Monosit ve makrofajlarda ise sitoplazmada yaygın ve güçlü bir pozitivite gözleendiği bildirilmiştir [4, 14, 16, 27]. Bu çalışmada da benzer şekilde her üç yarasa türünde ANAE demonstrasyonu sonucu lenfositler nokta tipinde, monositler ise yaygın ve güçlü bir pozitivite göstermiştir.

Goldberg ve Barka [28] insan perifer kan frotilerinde, en güçlü ACP-az aktivitesine monosit ve eozinofillerde rastlamışlar, bazofillerin ise negatif reaksiyon verdiklerini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada [29] 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]'nin 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 tarzdeki ACP-az pozitivitesi gözlenirken; dalak ve lenf yumrularındaki lenfositlerde ise yaygın non-granüler pozitivite gözlenmektedir [30, 31]. Basso ve ark. [11] insanlarda timositlerde erken fetal dönemde kazanılan ACP-az pozitivitesinin doğumdan sonra da perifer kan T-lenfositlerinde de güçlü bir şekilde gözleendiğini

bildirmişlerdir. Bununla birlikte tavukların T-lenfositlerinde ACP-az pozitiviteyi konusunda farklı görüşler vardır. Glick [32] ile Moriya ve Ichikawa [33], 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 [34, 35]. Bazı memeli türlerde ve tavukta iyi sonuç veren ve bu çalışmada da uygulanan ACP-az demonstrasyon yöntemiyle inkübasyon süresi maksimum tutulmasına rağmen, üç yarasa türünde de lenfositlerde pozitiviteye özgü granüller gözlenememiştir. Bu durum enzim histokimyasal çalışmalarda önemli bir etken olan inkübasyon solüsyonunun pH'sına bağlı olabilir ve yapılacak değişikliklerle yöntem yarasalar için modifiye edilebilir.

Farklı memeli türlerinin perifer kanlarındaki ANAE(+) ve ACP-az(+) lenfosit oranları oldukça değişiklik göstermektedir. İnsanlarda %69-75 [7, 14], köpeklerde %56-78 [18], sığırlarda %47.70 [16], develerde %81.33 [36] ve tavşanlarda %34 [37] oranında ANAE(+) lenfosit bulunduğu bildirilmiştir. Sen ve ark. [38] melez köpeklerin perifer kan lenfositlerinde %62.64 oranında ANAE, %46.74 oranında ACP-az pozitivitesi belirlerken, Sur ve ark. [25] ise erkek ve dişi Kangal köpeklerinde sırasıyla %63.13-%60.75 oranında ANAE, %39.40-%39.13 oranında ACP-az pozitivitesi belirlemişlerdir. Bu çalışmada yarasalarda elde ettiğimiz %44.76-52.61'lik ANAE(+) lenfosit oranları yukarıda bahsedilen memeli türlere göre genel olarak düşük görülmektedir. Ayrıca farklı yarasa türleri arasında da ANAE(+) lenfosit oranı bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık olabileceği tespit edilmiştir.

Kaynaklar

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. Ranki, A. **Non-specific esterase activity in human lymphocytes.** Clin. Immunol. Immunopathol. 10: 47-58 (1978)
8. 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)
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., Aşti, 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., Aşti, 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. Caxton-Martins, A.E. **Histochemistry of blood and bone marrow smears of the straw-coloured fruit-eating bat, *Eidolon helvum*.** J. Anat. 124 (1): 31-39 (1977)
22. Caire, W., Cox, B.C. and Levescy, B. **Some normal blood values of *Myotis velifer* (Chiroptera: Vespertilionidae).** J. Mamm. 62 (2): 436-439 (1981)
23. Wolk, E. and Bogdanowicz, W. **Hematology of the hibernating bat: *Myotis daubentoni*.** Comp. Biochem. Physiol. A. 88 (4): 637-639 (1987)
24. Konuk, T. **Pratik Fizyoloji.** A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, 378, A.Ü. Basımevi, Ankara (1981)
25. 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)
26. Jain, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology.** Lea&Febiger (1993)
27. 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)
28. Goldberk, A.F. and Barka, T. **Acid phosphatase activity in human blood cells.** Nature 21: 292 (1962)
29. 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)
30. Tamaaki, 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)
31. 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)
32. Glick, B. **Bursa of Fabricius: development, growth, modulation, and endocrine function.** CRC Crit. Rev. Poultry Biol. 1 (2): 107-132 (1988)
33. Moriya, O. and Ichikawa, Y. **Acid phosphatase in lymphoid tissues of developing chick embryos.** Acta Histochem. 87 (2): 99-105 (1989)
34. 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)

35. 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)
36. 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)
37. Aydın, M.F., Telatar, T., Öznurlu, Y., Çelik, İ. ve Sur, E. **Angora tavşanlarının perifer kan lenfositlerin alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) aktivitelerinin belirlenmesi.** VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Özet Kitabı (27-30 Haziran, Malatya), 240 (2006)
38. 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)

