

## KANGAL KÖPEKLERİNİN PERİFER KAN T LENFOSİTLERİ ÜZERİNDE IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK ÇALIŞMALAR

Reşat Nuri Aştı<sup>1</sup>

Nevin Kurtdede<sup>2</sup>

Levent Ergün<sup>3</sup>

### Light and electron microscopic studies on the peripheral T lymphocytes in Kangal dogs

**Summary:** *The purpose of this study was to determine the percentage of the peripheral blood T lymphocytes and the localization of ANAE enzyme at the electron microscopic level in various ages of Kangal dogs by using alpha-naphthyl acetate esterase procedure and to establish the percentage of the B lymphocytes in adults by using SIg staining.*

*As a material, peripheral blood samples taken from 50 Kangal dogs of varying ages were used.*

*In adults, ANAE staining revealed that large majority of the peripheral blood lymphocytes (82,3 %) give positive reaction, whereas smaller proportion (17,7 %) were negative. ANAE positive lymphocytes showed two distinct positive granules. Most of the ANAE positive cells (78,8 %) had 1-2 large reddish granules, 3,3 % of them had large quantity of diffusely dispersed small granules. In young animals (20-30 days), the percentage of the ANAE positive lymphocytes (91,9 %) and the number of the localized granules (1-8) were found to be higher than adults.*

*It has been demonstrated that neutrophils gave a negative reaction, whereas monocytes, platelets and eosinophil granulocytes showed a diffuse granular positivity.*

1- Prof. Dr., AÜ Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

2- Dr., AÜ Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

3- Araş. Gör., AÜ Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*In the electron microscopic examination, ANAE positive reaction were seen in lisosomal granules found in lymphocytes, monocytes, platelets and eosinophil granulocytes.*

*By means of immunoenzymatic staining of the surface immunoglobulins (SIg), 18 % of the peripheral blood lymphocytes were found to be B lymphocytes in adults.*

**Özet:** *Bu çalışma, ANAE enzimi boyaması ile değişik yaşlardaki Kangal köpeklerinin perifer kan T lenfosit oranlarının saptanması, enzimin ince yapı düzeyindeki lokalizasyonunun tespiti ve SIg boyaması ile erişkinlerde B lenfosit oranının belirlenmesi amacıyla yapıldı.*

*Değişik yaşlardaki, 50 adet Kangal köpeğinden alınan perifer kan örnekleri materyal olarak kullanıldı.*

*Erişkinlerde, ANAE boyamasında lenfositlerin % 82,3'ünün pozitif, % 17,7'sinin negatif reaksiyon verdiği gözlemlendi. ANAE pozitif lenfositlerde iki tip granüler pozitivite saptandı. Bu lenfositlerin çoğunda (% 78,8) lokalize yerleşimli, sayıları 1-2 arasında olan, kırmızı granüller gözlenirken, daha az orandaki lenfositte (% 3,3) ise diffuz yerleşimli küçük granüller gözlemlendi. Gençlerde (20-30 gün), ANAE pozitif lenfosit oranı (% 91,9) ile lenfositlerdeki lokalize granül sayısı (1-8) erişkinlere göre daha fazla bulundu.*

*Nötrofil granulositlerin negatif reaksiyon verdikleri, monosit, eozinofil granulosit ve kan pulcuklarının diffuz granüler pozitivite gösterdikleri tespit edildi.*

*Elektron mikroskopik incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif reaksiyona, lenfosit, monosit, eozinofil granulosit ve kan pulcuklarında bulunan lisosomal granüllerin içinde rastlandı.*

*SIg boyaması ile, erişkinlerdeki perifer kan lenfositlerinin % 18'inin B lenfosit olduğu tespit edildi.*

## Giriş

Perifer kan lenfositleri, immunolojik özelliklerine göre T, B lenfositleri ve Null hücreleri olarak sınıflandırılır (1, 6). Bu lenfosit tipleri, sağlıklı bir canlının perifer kanında belirli oranlarda bulunurken, bazı proliferatif hastalıklarda bu oranlarda önemli sapmalar şekillenmektedir (1, 6, 9, 17). İmmun yetmezlik hastalıklarının diagnozu, lenfositik lösemilerde orijinin belirlenmesi, kanser olgularında selüler

immunitede meydana gelen değişikliklerin saptanabilmesi için perifer kan B ve T lenfosit oranları ile Null hücresi oranının belirlenmesi gereklidir (6).

T lenfositlerini E rozet, B lenfositlerini EAC rozet tekniği ile ayırt etmek mümkünse de, bu yöntemler pahalı olup, uzun zaman almakta ve doku kesitlerine uygulanamamaktadır (6). Ayrıca, spesifik antiserum kullanarak lenfosit tiplerini ayırt etmek mümkünse de, gelişmiş laboratuvar koşullarını gerektirmektedir (23). Bu nedenler, araştırmacıları enzimler üzerinde çalışmaya yöneltmiştir (8, 9, 11, 19). Başlangıçta, lizozomal enzimlerden olan asit fosfataz üzerinde durulmuş; ancak, bu enzimin T ve B lenfositlerinde bulunduğu saptanmasından sonra lenfosit tiplerini ayırt etmede kullanılamayacağı anlaşılmıştır (5). Son zamanlarda, nonspesifik esterazlardan olan alfa naftil asetat esterazın (ANAE) T lenfositleri ile Null hücrelerinde bulunduğu, B lenfositlerinde ise bulunmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (2, 8, 11, 20, 26). ANAE pozitif reaksiyonun T hücrelerinde 1-2 adet lokalize granüler, Null hücrelerinde ince diffuz granüler, makrofajlarda ise diffuz boyanma şeklinde gözleendiği, B lenfositlerinin ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon verdiği araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (2, 8, 9, 11, 19). Kajikawa ve ark. (9) sığırlarda, Maiti ve ark. (16) kanatlılarda, Mueller ve ark. (19) farelerde ve Knowles ve Susan (12) insanlarda ANAE tekniği ile olgun T lenfositlerinin spesifik olarak belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

ANAE enziminin lizozomal enzim olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (8, 19, 27). Zicca ve ark. (27) insan T lenfositleri üzerinde yaptıkları elektron mikroskopik çalışmada ANAE enziminin lizozomların membranında bulunduğunu, lizozomların içinde ise rastlanılmadığından bahsetmektedirler. Bozdech ve Bainton (4) elektron mikroskopik çalışmalarında alfa naftil butirat esteraz (ANBE) aktivitesini monosit ve lenfositlerin lizozomları içinde olduğunu göstermişlerdir.

B lenfositleri yüzey immunglobulinlerine (SIg) karşı hazırlanan anti serumlarla demonstre edilebilirler (1, 6). Yüzey immunglobulin boyama metodu ile perifer kan B lenfosit oranı insanda (15) % 18, sığırdada (9) % 26,9, kanatlıda (16) % 17 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, ANAE enzimi ve yüzey immunglobulinlerinin demonstrasyonu, Kangal köpeklerinin perifer kan T ve B lenfositleri ile Null hücresi oranlarının belirlenmesi ve ANAE enziminin ince yapı düzeyindeki yerleşiminin saptanması amaçlandı.

### Materyal ve Metot

Çalışmada, değişik yaşlardaki 50 sağlıklı Kangal köpeğinden alınan heparinize (liquemine-Roche) kan örnekleri materyal olarak kullanıldı.

Alınan kan örneklerinden, ışık mikroskopta alfa naftil asetat esteraz enzimi (ANAE) demonstrasyonu için frotiler hazırlanarak havada kurutuldu ve bunlara ANAE enzim boyaması uygulandı (19).

Elektron mikroskopik araştırmalar için, her hayvandan alınan heparinize kan örneklerinin yarısı, lenfosit izolasyonu yapıldıktan sonra Karnovsky (10) yöntemine göre glutaraldehid paraformaldehid tesbit sıvısı ile tesbit edildi. 1200 devirde 10 dakika santrifüje edildikten sonra çökelti üzerine 50°C de erimiş % 2'lik agar'dan 1-2 damla damlatılarak tüp içeriği temiz bir lam üzerine döküldü. Agar donduktan sonra küçük parçacıklar halinde kesilerek % 1'lik ozmik asitte iki saat süreyle tesbit edildi. Parçalar Araldit M'de bloklandı. İnce kesitler Reynolds (24) yöntemiyle boyanarak Carl Zeiss EM 9S-2 model mikroskopta incelendi.

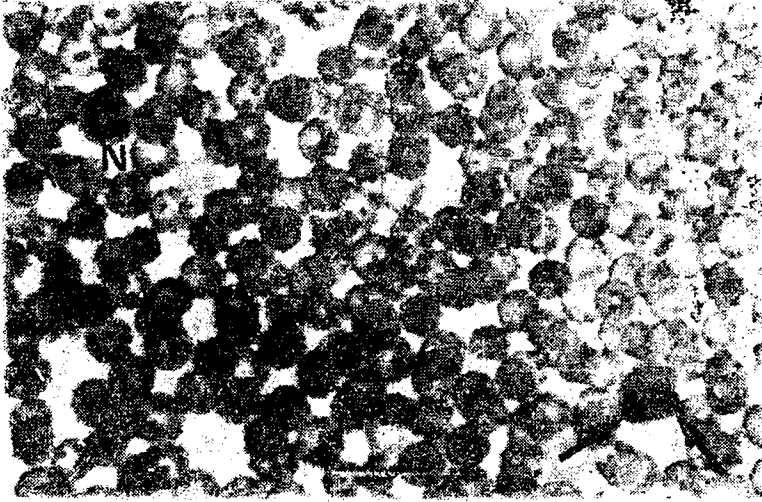
Heparinize kan örneklerinin diğer yarısı ise elektron mikroskopta alfa naftil asetat esteraz enzimini demonstre etmek için kullanıldı (27). Lenfosit izolasyonundan sonra glutaraldehid-aseton ile tesbit yapıldı ve süspansiyon içinde alfa naftil asetat esteraz enzim boyaması 45 dakika süreyle uygulandı. Yukarıda anlatılan tekniğe göre elektron mikroskop'a hazırlandı. Ancak, bu örneklerle ozmik asit tesbiti uygulanmadığı gibi, ince kesitlere kurşun sitrat boyaması da yapılmadı.

B lenfositlerdeki yüzey immunglobulinlerinin (SIg) demonstrasyonu B lenfosit kiti (Sigma diagnostic kit) kullanılarak yapıldı.

ANAE ve SIg boyama metodlarıyla hazırlanan her preparattaki 5 değişik alanda yüzerden beşyüz lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları saptandı.

### Bulgular

Işık mikroskopik incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğunda sayıları 1-2 arasında değişen spesifik kırmızı granüller gözlemlendi. Az sayıdaki pozitif lenfositte ise küçük ve diffuz lokalizasyonlu granüller saptandı. Erişkin hayvanlara ait frotilerde ANAE pozitif lenfositlerdeki granül sayısı 1-2 iken (Şekil 1 oklar), genç hayvanlara (20-30 gün) ait lenfositlerde granül



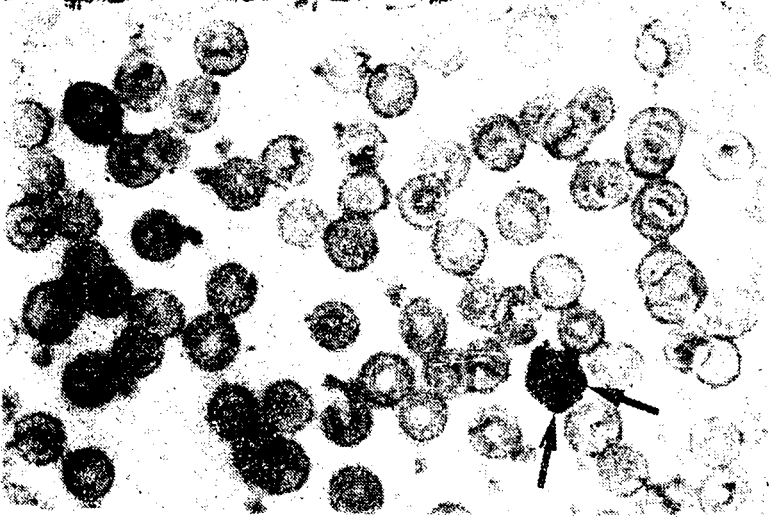
Şekil 1: Erişkin Kangal köpeğinde ANAE boyaması. Oklar: T lenfositinde ANAE pozitif granüller, N: nötrofil granulosit. ANAE. X 820.  
Figure 1: ANAE staining in adult Kangal dog. arrows: ANAE positive granules in T lymphocyte, N: neutrophil granulocyte. ANAE.X820

sayısının arttığı (1-8), granüllerin daha büyük ve pozitif reaksiyonun da daha kuvvetli olduğu gözlemlendi (Şekil 2 oklar). Nötrofil granulositlerde pozitif reaksiyona rastlanmadı (Şekil 1, 3 N). Eozinofil granulosit (Şekil 3 ok) ve monositlerde kuvvetli, diffuz granüler pozitivite tesbit edildi; ANAE enzim boyamasına karşı kan pulcuklarında da pozitif reaksiyonun görüldüğü dikkat çekti (t).

SIg boyaması uygulanan preparatlarda, B lenfositlerde SIg'lerinin hücre membranında homojen dağılım gösterdikleri (Şekil 4 ok) ya da hücrenin bir kutupunda toplandıkları gözlemlendi (Şekil 5 ok).

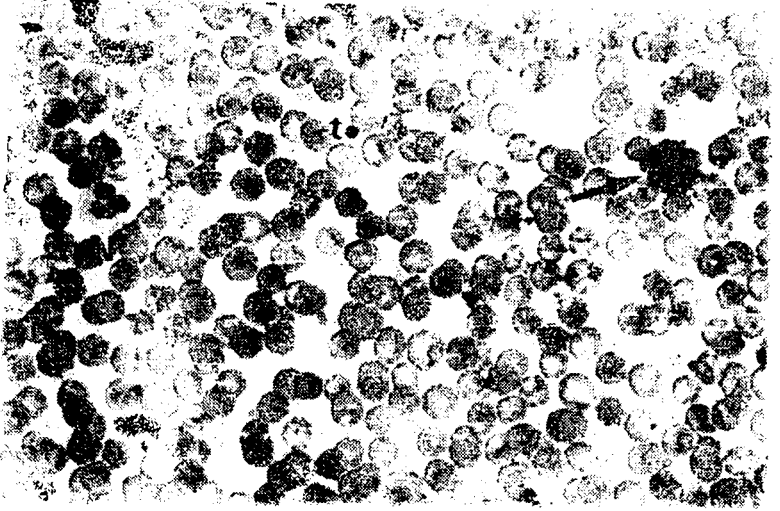
ANAE ve SIg boyaması sonuçları tablo 1 ve 2 de verilmiştir.

ANAE boyamasında 20-30 günlük hayvanlarda perifer kan lenfositlerinin % 91,9'unun pozitif, % 8,1'inin de negatif reaksiyon verdiği tesbit edildi. Pozitif sonuç veren lenfositlerin 89,1'inde lokalize granüler pozitivite (T lenfositleri) gözlenirken, 2,8'inde diffuz granüler pozitivite (Null hücreleri) saptandı. Erişkin hayvanlarda (1-5 yaş) ise, % 82,3'ünün ANAE pozitif, % 17,7'sinin ANAE negatif olduğu tesbit edildi. ANAE pozitif lenfositlerin 78,8'inin lokalize granüler, 3,5'inin de diffuz granüler olduğu saptandı (Tablo 1). Bu bulgulara göre ANAE pozitif lenfosit oranının genç hayvanlarda yüksek olduğu, yaşın



Şekil 2: Otuz günlük Kangal köpeğinde ANAE boyaması. oklar: T lenfositte ANAE pozitif granüller. ANAE. X 1200.

Figure 2: ANAE staining in 30-day-old Kangal dog. arrows: ANAE positive granules in T lymphocyte. ANAE. X 1200.

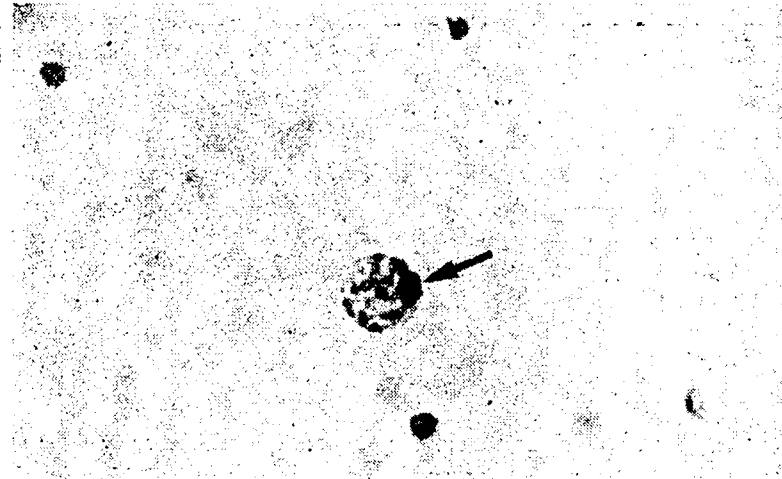


Şekil 3: Erişkin Kangal köpeğinde ANAE boyaması. ok: eozinofil granulositte diffuz granuler ANAE pozitif reaksiyon, N: nötrofil granulosit, t: kan pulcuğu. ANAE. X 735.

Figure 3: ANAE staining in adult Kangal dog. arrow: diffuse granular ANAE positive reaction in eosinophil, N: neutrophil granulocyte, t: platelet. ANAE. X 735.



Şekil 4: Erişkin Kangal köpeğinde SIg boyaması. ok: yüzey immunglobulinlerinin B lenfosit membranında diffuz dağılımı. SIg. X 1020.  
Figure 4: SIg staining in adult Kangal dog. arrow: diffuse distribution of surface immunoglobulins in B lymphocyte membrane. SIg. X 1020.



Şekil 5: Erişkin Kangal köpeğinde SIg boyaması. ok: yüzey immunglobulinlerinin B lenfositinin bir kutpunda toplanması. SIg. X 950.  
Figure 5: SIg staining in adult Kangal dog. arrow: Localization of surface immunoglobulins at one pole of the B lymphocyte. SIg. X 950.

ilerlemesi ile birlikte bu oranda bir düşmenin şekillendiği dikkati çekti (Tablo 1). SIg boyamalarında ise, perifer kan lenfositlerinin % 18'nde pozitif reaksiyon gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 1. Kangal Köpeklerinin Perifer Kan Lenfositlerinde ANAE Boyaması

Hayvanın Yaşı	Hayvan sayısı	Lenfosit (%)		Null (%)
		ANAE <sup>+</sup>	ANAE <sup>-</sup>	
20-30 gün	8	89.1	8.1	2.8
1- 3 ay	12	85.4	10.9	3.7
3-12 ay	18	76.2	20.4	3.4
1- 5 yaş	12	78.8	17.7	3.5

Tablo 2. Kangal Köpeklerinin Perifer Kan Lenfositlerinde SIg Boyaması

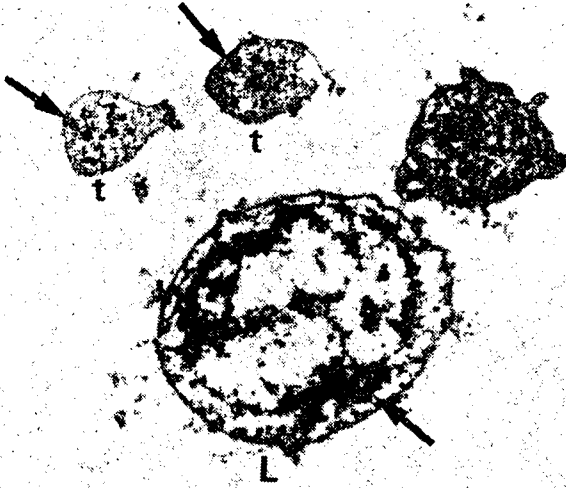
Hayvanın Yaşı	Hayvan Sayısı	Örnek Sayısı	Lenfosit (%)	
			SIg <sup>+</sup>	SIg <sup>-</sup>
1 yaş	2	10	18	82

Elektron mikroskopik incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı lenfosit (Şekil 6L), monosit (Şekil 7 M), eosinofil granulosit (Şekil 8 E) ve kan pulcuklarında (Şekil 6,8 t) bulunan lizozomal granüllerin pozitif reaksiyon verdiği saptandı (Şekil 6, 7, 8 oklar). Reaksiyonun lizozomal granüllerin içinde diffuz olarak yerleştiği dikkati çekti (Şekil 6, 7, 8 oklar).

### Tartışma ve Sonuç

Perifer kan T lenfositlerini belirlemek için çeşitli araştırmacılar tarafından lizozomal enzimlerden yararlanılmıştır (5, 8, 9, 12, 19). Başlangıçta, lizozomal enzimlerden olan asit fosfatazdan yararlanılmış, ancak Edwin ve ark. (5) nın insan perifer kan T lenfositlerinde yaptıkları çalışmada asit fosfatazın sadece T lenfositlerinde değil B lenfositlerinde de bulunduğunu bildirmesiyle, bu enzimin kullanılmasından





Şekil 6: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. oklar: lenfosit ve kan pulcuklarında ANAE pozitif granüller, L: lenfosit, t: kan pulcuğu. ANAE. X 6750.

Figure 6: ANAE staining in Electron microscope. arrows: ANAE positive granules in lymphocyte and platelet, L: lymphocyte, t: platelet. ANAE. X 6750.

vazgeçilmiştir. Son zamanlarda, non spesifik esterazlardan olan alfa naftil asetat esteraz'ın T lenfositlerinde bulunup B lenfositlerinde bulunmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (8, 11, 14, 20).

Knowles ve Susan (12), Kulenkampff ve ark. (14) ve Müller ve ark. (20) insan perifer kan T lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, ANAE enzimi boyamasıyla T lenfositlerinin sitoplazmasında genelde tek bir kırmızı granül, monositlerde diffuz şekilde pozitif reaksiyonun görüldüğünü, nötrofil granulositlerin ise negatif reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (22) domuzlarda ANAE ve ANBE enzim boyamasında perifer kan T lenfositlerinde granüller, monosit ve eosinofil granulositlerde ise diffuz reaksiyonun görüldüğünden bahsetmektedirler. Kajikawa ve ark. (9), sığırlarda yaptıkları çalışmada, ANAE uygulamasıyla perifer kan T lenfositlerinde granüller, monositlerde ise diffuz reaksiyonun görüldüğünü bildirmişlerdir. Higgy ve ark. (8) T ve B lenfositleri ile Null hücrelerinden zenginleştirilmiş hü-



Şekil 7: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. oklar: monositte ANAE pozitif granüller, M: monosit. ANAE. X 8400.

Figure 7: ANAE staining in Electron microscope. arrows: ANAE positive granules in monocyte. M: monocyte. ANAE. X 8400.



Şekil 8: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. oklar: eosinofil granulosit ve kan pulcuğunda ANAE pozitif granüller. E: eosinofil granulosit, t: kan pulcuğu. ANAE. X 7200.

Figure 8: ANAE staining in Electron microscope. arrows: ANAE positive granules in eosinophil granulocyte and platelets ,E: eosinophil granulocyte, t: platelet. ANAE. X 7200.

re süspansiyonları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ANBE enzimini demonstre ederek lokalize granüler pozitivitenin T lenfositleri, diffuz granüler pozitivitenin Null hücreleri için spesifik pozitif reaksiyonlar olduğunu tesbit etmişlerdir.

Kangal köpeklerinin perifer kan T lenfositleri üzerinde yaptığımız bu çalışmada ANAE boyamasıyla erişkin hayvanların lenfositlerinin çoğunda genelde bir, bazen iki adet kırmızı granül şeklinde reaksiyon gözledik. Genç hayvanlarda ise (20-30 gün) granül sayısının fazla (1-8), pozitif reaksiyonun da daha kuvvetli olduğunu saptadık. Bugüne kadar insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, erişkinlerle gençler arasında bu tür farklılığa değinen bir literatür bilgisine rastlayamadık. Monosit ve eosinofil granülositlerde araştırmacıların bildirdiği gibi (12, 19, 22) diffuz reaksiyon gözledik. Nötrofil'lerde ise pozitif reaksiyon tesbit edemedik.

Bu çalışmada ayrıca kan pulcuklarında da ANAE boyamasında pozitif reaksiyon belirledik. Bu bulgumuz bugüne kadar yapılan hiçbir çalışmada bildirilmemiştir.

İnsanlarda yapılan çalışmalarda, ANAE pozitif perifer kan T lenfosit oranını Müller ve ark. (20) % 85, Knowles ve ark. (11) % 70, Kulenkampff ve ark. (14) % 68 olarak bildirmişlerdir. Bu oran, sığırlarda (21) % 63, tavuklarda (16) % 60 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, erişkin hayvanlarda ANAE pozitif T lenfosit oranı % 78,8, ANAE negatif lenfosit oranı % 17,7; genç hayvanlarda (20-30 gün) ANAE pozitif lenfosit oranı % 89,1 ANAE negatif lenfosit oranı ise % 8,1 olarak bulunmuştur. Erişkin hayvanlarda tesbit ettiğimiz T lenfosit oranı insanlarda bildirilene yakındır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar erişkin insan ve hayvanlarda olduğu için gençlerdeki T lenfosit oranının erişkinlere göre yüksek bulunmasını tartışacak literatür bulunamamıştır. Miyasaka ve ark. (18) koyun fötusunda gebeliğin 54. gününde timositlerin % 90'dan fazlasının T lenfosit olduğunu, Beya ve ark. (3) da koyunlarda T lenfositlerine timusta gebeliğin 54. gününde rastlandığını ve gebeliğin 100. gününde perifer kandaki seviyelerinin önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Sminia ve ark. (25), ratlarda B lenfositlerinin yapım yeri olan Payer plaklarının gelişmiş şekillerini doğumdan sonraki 28. günde aldığına, Kroese ve ark. (13) ratların dalağında ilk sentrum germinativum'ların doğumdan sonraki 3-4. haftada geliştiğine dikkati çekmişlerdir. Genç hayvanlardaki ANAE pozitif lenfosit oranının, erişkinlere göre yüksek oluşunun,

ilk bir aylık dönemde selüler immunitenin, humoral immuniteye göre daha iyi gelişmiş olmasından ileri geldiği kanısındayız.

Grossi ve ark. (7) ışık mikroskopik çalışmalarında ANAE aktivitesinin primer lizozomlarda gözleendiğini, Bozdech ve Bainton (4) elektron mikroskopik çalışmalarında ANBE aktivitesinin monosit ve lenfositlerde granüllerin içinde bulunduğunu, Zicca ve ark. (27) insan T lenfositleriyle yaptıkları elektron mikroskopik çalışmada asit fosfataz aktivitesini lizozomların içinde gözlediklerini, ANAE aktivitesinin ise lizozomların membranında bulunduğunu bildirmişlerdir. Elektron mikroskopik incelemelerimizde ANAE ile boyamada pozitif reaksiyonu lenfosit, monosit, eozinofil granulosit ve kan pulcuklarındaki lizozomların içerisinde tesbit ettiğimizden, Zicca ve ark. (27)'nin lizozomların membranında bulunduğu görüşüne katılmıyoruz.

Çeşitli araştırmacılar, yüzey immunglobulinlerini (SIg) boyama yöntemi ile perifer kan B lenfosit oranını saptamaya çalışmışlardır (15, 16). B lenfosit oranını Lobo ve ark. (15) insanlarda % 18, Maiti ve ark. (16) tavuklarda % 17 olarak tesbit etmişlerdir. Biz de erişkin Kangal köpeklerindeki B lenfosit oranını % 18 olarak belirledik. Bu oran, erişkin hayvanlardaki ANAE negatif lenfosit oranına (% 17,7) çok yakın olduğu dikkati çekti.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak Kangal köpeğinde ANAE demonstrasyonu ile perifer kandaki T lenfositlerin spesifik olarak belirlenebileceği, gençlerdeki T lenfosit oranının erişkinlerdenden daha fazla olduğu ve ANAE enziminin T lenfositlerdeki lizozomların içinde bulunduğu sonucuna varıldı.

### Kaynaklar

1. Barret, T.J. (1980). *Basic immunology and its medical application*. The C.V. Mosby Company. London.
2. Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A., Zanescio, L. (1980). *Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes*. Br. J. Haematol. 44: 577-582.
3. Beya, M.F., Miyasaka, M., Dudler, L., Ezaki, T., Trnka, Z. (1986). *Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep. II. Two monoclonal antibodies that recognize all ovine T lymphocytes*. Immunology. 57: 115-121.

4. **Bozdech, M.J., Bainton, D.F.** (1981). *Identification of alfa naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane bounded organelle in lymphocytes*. J. Exp. Med. 153: 182-195.
5. **Edwin, P.T., Sondra, G.B., Marshall, E.K., Dorathy, B.F.** (1981). *Ultrastructural localization of acid phosphatase in rosetted T and B lymphocytes of normal human blood*. Am. J. Pathol. 102: 72-83.
6. **Fudenberg, H., Stites, D., Caldwell, J., Wells, V.** (1978). *Basic Clinical immunology*. Lange Medical Publication. California.
7. **Grossi, C.E., Webb, S.R., Zicca, A., Lydyard, P.M., Moretta, L., Mingari, M.C., Cooper, M.D.** (1978). *Morphological and histochemical analysis of two human T- cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG*. J. Exp. Med. 147: 1405-1417.
8. **Higgy, K.E., Burns, G.F., Hayhoe, F.G.** (1977). *Discrimination of B T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry*. Scand. J. Haematol. 18:437-448.
9. **Kajikawa, DVM., Koyama, H., Yushikawa, T., Tsubaki, S.** (1983). *Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle*. Am. J. Vet. Res. 44 (8): 1549-1552.
10. **Karnovsky, M.J.** (1965). *A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolality for use in electron microscopy*. J. Cell. Biol. 27: 137-138.
11. **Knowles, D.M., Hoffman, T., Ferrarini, M., Kunkel, H.G.** (1978). *The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: usefulness as a T-cell marker*. Cellular Immunol. 35: 112-123.
12. **Knowles, D.M., Susan, H.** (1978). *Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alfa-naphthyl acetate esterase*. Lab. Invest. 39 (1): 70-76.
13. **Kroese, F.G.M., Wubbena, A.S., Kuijpers, K.C., Nieuwenhuis, P.** (1987). *The ontogeny of germinal centre forming capacity of neonatal rat spleen*. Immunology. 60: 597-602.
14. **Kulenkampff, J., Janossy, G., Greaves, M.F.** (1977). *Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes*. British J. Haematol. 36: 231-240.
15. **Lobo, P.I., Frederic, B.W., Horwitz, D.A.** (1975). *Identification of two populations of immunoglobulin-bearing lymphocytes in man*. J. Immunol. 114 (1): 116-119.

16. Maiti, N.K., Saini, S.S., Sharma, S.N. (1990). *Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes*. Vet. Resch. Communication. 14:207-210.
17. Mielke, H., Fürll, B. (1989). *Die Zellen der peripheren Euterlymphe unter Berücksichtigung der B-und T-Lymphozyten im Vergleich zu den Zellen des peripheren Blutes und der Milch bei gesunden sowie mastitis-und leukosekranken Kühen*. Mh. Vet. Med. 44:629-632.
18. Miyasaka, M., Heron, I., Dudler, L., Cahill, R.N.P., Forni, L., Knaak, T., Trnka, Z. (1983). *Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep. I. Recognition of a sheep T-lymphocyte differentiation antigen by a monoclonal antibody T-80*. Immunology. 49:545-553.
19. Mueller, J., Brundel Re, G., Buerki, H., Keller, H., Gottier, H. (1975). *Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes*. Eur. J. Immunol. 5: 270-274.
20. Müller, J., Keller, H.U., Hagmann, J.D., Cornioley, R.J., Ruchti, C., Cottier, H. (1981). *Nonspecific esterase in human lymphocytes*. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 64: 410-421.
21. Paul, P.S., Senogles, D.R., Muscoplat, C.C., Johnson, D.W. (1979). *Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle*. Clin. Exp. Immunol. 35:306-316.
22. Ramos, J.A., Ramis, J.A., Marco, A., Domingo, M., Rabanal, R., Ferrer, L. (1992). *Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine*. Am. J. Vet. Res. 53 (8): 1418-1426.
23. Ranki, A., Totterman, T.H., Hayry, P. (1976). *Identification of mouse T and B lymphocytes from cytocentrifuged cell smears*. Clin. Exp. Immunol. 26: 632-640.
24. Reynolds, E.S. (1963). *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy*. J. Cell. Biol. 17: 208-212.
25. Sminia, T., Janse, E.M., Plesch, B.E.C. (1983). *Ontogeny of Peyer's patches of the rat*. Anat. Rec. 207:309-316.
26. Yang, T.J., Patricia, J.A., Williams, L.F. (1979). *Acid alfa naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes*. Immunology. 38:85-92.
27. Zicca, A., Leprini, A., Cadoni, A., Franci, T.A., Ferrarini, M., Carlo, E.G. (1981). *Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human Tm lymphocytes*. Am. J. Pathol. 105:40-46.