

Wpływ ACTH na RS jąder i aktywność fosfatazy kwaśnej w aktywowanych antygenem limfocytach krwi ptaków

ALEKSANDRA PLISZCZAK-KRÓL

Zakład Fizjopatologii Katedry Anatomii Patologicznej, Fizjopatologii i Weterynarii Sądowej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Pliszczak-Król A.

The influence of ACTH on the RS of nuclei and acid phosphatase activity in blood lymphocytes of immunized chickens

Summary

The aim of the study was to investigate the Radial Segmentation (RS) of nuclei and Acid Phosphatase (APh) activity in lymphocytes of chickens immunized with SRBC and treated with ACTH. The immunization of chickens with SRBC results in a marked decrease of RS in lymphocyte nuclei, with a concurrent increase of APh activity. The number of RS-nuclei increased after administration of ACTH, but APh activity was only slightly influenced. RS of nuclei and APh activity were different after administration of ACTH and SRBC. The results depend on the time and the sequence of hormone and antigen administration to chickens.

Keywords: lymphocyte, radial segmentation, acid phosphatase, ACTH, SRBC

Funkcjonowanie układu odpornościowego w dużym stopniu zależy od wpływu warunków środowiska. Nie-sprzyjające czynniki zewnętrzne działające na człowieka i zwierzęta, wywołują stres – kaskadę reakcji mających prowadzić do przystosowania (3, 10, 18, 21). Efektem działania czynników stresogennych jest m.in. aktywacja osi podwzgórze–przysadka–nadnercza (3, 4, 10, 13, 21). W wyniku pobudzenia podwzgórza, dochodzi do zwiększonego wydzielania ACTH, a pod jego wpływem do wzmożonej syntezy i uwalniania glikokortykosteroidów z nadnerczy (3, 4, 10, 13, 21). Hormony te, oprócz wywołania swoistych skutków metabolicznych, oddziałują na narządy limfatyczne i limfocyty (3, 4, 10, 13, 21).

Znany jest także modulujący wpływ centralnych narządów limfatycznych (grasicy i torby Fabrycjusza) na gruczoły wewnętrznego wydzielania (4, 13). Potwierdza to powiązanie czynnościowe układu immunologicznego z układem dokrewnym (3, 4, 10, 13, 18, 21).

Przebieg i charakter odpowiedzi immunologicznej są warunkowane stopniem dojrzałości limfocytów, z czym związane są zmiany w morfologii i w wyposażeniu enzymatycznym tych komórek (6, 9). W szczególności dotyczą one enzymów aparatu lizosomalnego (6, 14). Jednym z nich jest fosfataza kwaśna (Fk), uznawana za marker lizosomów (6, 7, 14, 18). Przyjęto, że oznaczanie aktywności tego enzymu może być wskaźnikiem wzrostu i dojrzałości układu immunologicznego oraz odzwierciedleniem stanu czynnościowego limfocytów (6, 7, 14, 18).

Zmianom enzymatycznym może towarzyszyć reorganizacja pozostałych struktur komórkowych, w tym

także cytoszkieletu (2, 5). Ulegając ciągłej, dynamicznej reorganizacji, nie tylko nadaje on kształt komórce, ale także uczestniczy w procesach jej różnicowania, dojrzewania i funkcjonowania (2, 5). O udziale cytoszkieletu w procesach metabolicznych świadczy fakt występowania zmian w budowie i organizacji jego struktur obserwowany w komórkach w różnych procesach regulacyjnych i patologicznych (np. nowotwory, cukrzyca) (16). Włókna budujące cytoszkielet, m.in. mikrotubule, nie są elementami stabilnymi. Wykazują niezwykłą zdolność do ciągłej zmiany swej długości wskutek fazowo przebiegających procesów polimeryzacji i depolimeryzacji (2, 5).

Ze zwiększoną depolimeryzacją mikrotubul związane jest występowanie głębokich szczelin w jądrze komórek jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka (1, 11, 19) i zwierząt (8). Szczeliny te, zbiegając się koncentrycznie w centrum komórki, dzielą jądro na kilka płatów i upodabniają je do np. ósemki lub liścia koniczyny (1, 8, 11, 19). Podział na segmenty spowodowany jest kurczeniem się (w wyniku powolnego rozpadu) mikrotubul opasujących jądro, wychodzących z rejonu centrosomu na jednym biegunie, a schodzących się w podobnym miejscu na drugim biegunie komórki (8, 19). Söderström, Norberg i wsp. zjawisko to nazwali radialną segmentacją jąder (RS) (19). Zjawisko radialnej segmentacji jąder limfocytów może pojawiać się spontanicznie. Można je też indukować *in vitro* inkubując krew w środowisku zawierającym niektóre antykoagulanty, np. szczawiany. Obok procesów, które cechuje zwiększona zdolność komórek do tworzenia szczelin w jądrze, opisano również ta-

kie, w których obserwowano upośledzenie powstawania RS. Na tej podstawie niektórzy autorzy sugerują, iż u człowieka zjawisko RS może być obiektywnym przejawem zmienionej odczynowości limfocytów (20).

Tylko nieliczne dane dotyczą radialnej segmentacji jąder limfocytów krwi obwodowej u zwierząt. We wcześniejszych badaniach własnych (7, 8, 15) wykazano, że zjawisko to występuje także u ptaków (ryc. 1). W niewielkim zakresie RS pojawia się spontanicznie, ale może być z powodzeniem indukowana na drodze chemicznej.

Możliwość modulowania czynności układu limfatycznego ptaków czyni zwierzęta te doskonałym modelem doświadczalnym, który może być wykorzystany do badań powiązań czynnościowych układu endokrynnego i układu limfatycznego.

Celem podjętych badań była próba prześledzenia, w jaki sposób ACTH, prowadząc do zmiany czynności wydzielniczej nadnerczy, może wpłynąć na radialną segmentację jąder i aktywność fosfatazy kwaśnej w aktywowanych antygenem limfocytach krwi ptaków.

Materiał i metody

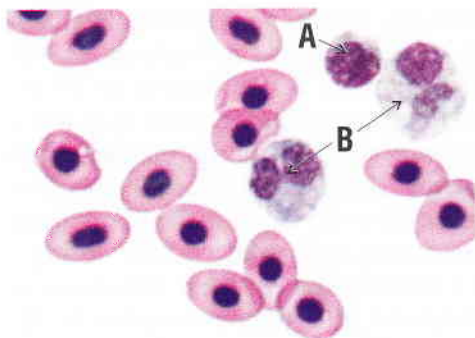
Badania przeprowadzono na 42 kurczętach płci żeńskiej krzyżówki Hisex Brown w wieku 6 tygodni. Ptaki odchowywano we własnym zakresie. Przez cały okres odchowu ptaki posiadały swobodny dostęp do wody oraz paszy, jaką stanowiła pełnoporcjowa mieszanka treściwa DKM-1. Procedurę podawania ACTH i SRBC przyjęto wg 7, a układ doświadczenia przedstawiono w tab. 1. Materiał do badań pobrano w 6 dniu po podaniu kurczętom SRBC.

Immunizacja ptaków. Sporządzono 5% zawiesinę erytrocytów owcy w buforowanym roztworze soli fizjologicznej – PBS. Ptaki immunizowano podając jednorazowo do żyły odłokciowej 0,5 cm³ przygotowanej zawiesiny (6).

Wykonane badania. Materiał do badań stanowiła krew pobierana od kurcząt z żyły odłokciowej. Część pobranej krwi użyto do przeprowadzenia testów RS. Z pozostałej ilości sporządzono rozmazy służące do wykonania odczynu na Fk.

W obydwu etapach przeprowadzonych badań wykonano:

– test spontanicznej i indukowanej radialnej segmentacji (RS), wg metody Söderström i wsp. (19) oraz wypracowanych we wcześniejszych badaniach własnych warunkach indukcji RS jąder limfocytów krwi kur (8),



Ryc. 1. Radialna segmentacja jąder limfocytów krwi u kurcząt

Objaśnienia: A limfocyt prawidłowy, B limfocyt z jądrem segmentowanym.

– cytochemiczne oznaczenie aktywności fosfatazy kwaśnej (FK), wg metody precypitacyjnej Gomoriego (12). Intensywność odczynu oceniano w skali punktowej („score”), jako sumę iloczynów liczby limfocytów oraz liczby ziarnistości w przeliczeniu na 200 limfocytów.

Dla każdej grupy doświadczalnej obliczono średnią arytmetyczną (\bar{x}) i odchylenie standardowe (\pm SD). Średnie poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Limfocyty krwi kurcząt wykazały znikomą zdolność do tworzenia spontanicznej RS (tab. 2). Po indukcji szczawianami, we krwi kurcząt stwierdzono zwiększoną, ale zróżnicowaną liczbę komórek z jądrem segmentowanym (tab. 2, ryc.2.). Immunizacja kurcząt SRBC doprowadziła do znacznego obniżenia RS, podczas gdy podanie kurczętom ACTH przyczyniło się do wzrostu udziału limfocytów RS – dodatków. Podanie kurczętom ACTH na 24 godziny przed immunizacją spowodowało, iż udział limfocytów wykazujących RS nieznacznie przewyższał poziom notowany u ptaków kontrolnych, był on jednak niższy niż po podaniu samego tylko ACTH. Równoczesne podanie ACTH i SRBC spowodowało tylko nieznaczne obniżenie się ilości komórek z jądrem segmentowanym. Natomiast u kurcząt, którym ACTH podano 24 godziny po stymulacji SRBC obserwowano większy niż po łącznym podaniu, spadek ilości limfocytów z RS (tab. 2, ryc. 2). Jednak nie osiągnął on poziomu tak niskiego jaki wystąpił u kurcząt po podaniu samych tylko SRBC.

SRBC posiadały stymulujący wpływ na aktywność Fk, podczas gdy podanie ACTH nie wpłynęło tak wyraźnie na aktywność tego enzymu (tab. 2, ryc. 3). Podanie ptakom ACTH i SRBC doprowadziło do zróżnicowania intensywności odczynu na Fk, w zależności od relacji czasowych pomiędzy podaniem hormo-

Tab. 1. Układ doświadczenia

kontrolne	Kurczęta			Kurczęta, którym podano ACTH:		
	stymulowane SRBC	po podaniu ACTH	24 godz. przed podaniem SRBC	łącznie z SRBC	24 godz. po podaniu SRBC	
O	E	A	A-24+E	A+E	A+24+E	
6 szt.	6 szt.	6 szt.	8 szt.	8 szt.	8 szt.	

Tab. 2. Radialna segmentacja oraz odczyn na fosfatazę kwaśną w limfocytach krwi kurcząt po podaniu ACTH na 24 godz. przed, w trakcie i 24 godz. po immunizacji SRBC ($\bar{x} \pm$ SD)

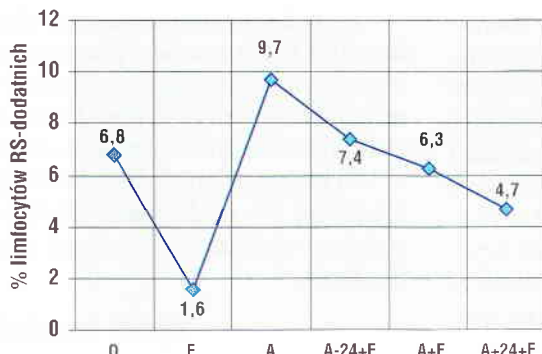
Badane wskaźniki	Grupy kurcząt					
	O	E	A	A-24+E	A+E	A+24+E
RS spont.	0,2 \pm 0,3	0 \pm 0	1,1 ^b \pm 2,2	1,3 \pm 2,4	0,3 \pm 0,5	0 \pm 0
RS induk.	6,8 \pm 5,8	1,6 ^a \pm 1,7	9,7 \pm 8,2	7,4 \pm 5,2	6,3 ^d \pm 3,5	4,7 \pm 4,6
Fk – „score”	313,3 \pm 63,3	428,7 ^a \pm 78,1	286,5 \pm 56	388 ^b \pm 111,1	400,6 \pm 149,4	366,7 \pm 121,8

Objaśnienie: różnica statystycznie istotna przy $\alpha = 0,05$ pomiędzy grupami: a. O i E, b. O i A, c. O i A-24+E, d. E i A+E

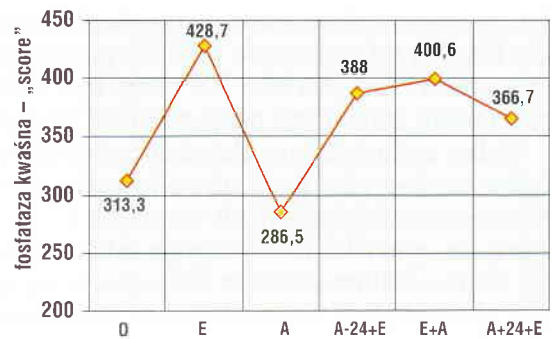
nu i podaniem antygeny. W porównaniu do ptaków kontrolnych, aktywność fosfatazy kwasnej wzrosła odpowiednio: o 28% u kurcząt po łącznym podaniu SRBC i ACTH, o 24% u kurcząt, którym podano ACTH na 24 godziny przed immunizacją i o 17% u kurcząt, którym podano ACTH 24 godziny po immunizacji (tab. 2 i ryc. 3).

Układ endokryny i układ immunologiczny są elementami systemu odpowiedzialnego za utrzymanie homeostazy ustroju (3, 10, 13, 18, 21). Ich sprawne funkcjonowanie i wzajemna kooperacja umożliwia szybką reakcję na bodźce płynące nie tylko od wewnątrz, ale także ze środowiska zewnętrznego (3, 18).

Obecna hodowla i produkcja drobiu (zamknięcie w budynkach bez dostępu do wybiegów i naturalnego światła, przy słabej wymianie powietrza i często nieodpowiedniej temperaturze, utrudniony dostęp do paszy i wody, duże zagęszczenie ptaków na małej powierzchni) oraz oderwanie od warunków naturalnych powodują, iż wpływ w/w czynników środowiska na ptaki jest wielce niekorzystny (18). Świadczyć o tym może, obserwowana u zwierząt narażonych na ich działanie, zwiększona podatność na infekcje bakteryjne i wirusowe (3, 18). Presja czynników środowiska wywołuje u ptaków stres (18). Zauważono, że podawanie, w określonej dawce i przez określony czas, egzogenego ACTH wywołuje u ptaków podobne zmiany do tych, jakie pojawiają się w przebiegu stresu (21). Wysokie stężenie glikokortykosterydów, wywołane podaniem ACTH, powoduje m.in. inwolucję tkanki limfatycznej i pojawienie się zmian atroficznych w narządach limfatycznych: grasicy, torbie Fabrycjusza, śledzionie (3). We krwi pojawia się leukocytoza z limfopenią i heterofilią (21). Przy braku zmian w zakresie populacji limfocytów B (21), obserwuje się spadek ilości limfocytów CD4+ i CD8+, co ma związek z przemieszczeniem ich do obwodowych narządów limfatycznych np. śledziony (13, 21). Glikokortykosterydy wpływając na zdolność limfocytów T (CD4+) do syntezy i uwalniania cytokin (np. IL-2, IFN- γ , IL-4) modulują odpowiedź immunologiczną zarówno komórkową jak i humoralną (10, 13). Wypadkowa oddziaływania tej grupy hormonów stanowi o ich przeciwnym i immunosupresyjnym działaniu. Jednak kierunku reakcji żywego organizmu, będącej następstwem zmian poziomu endogennych glikokortykosterydów nie da się ostatecznie przewidzieć. Wpływ czynników wywołujących stres na odpowiedź immunologiczną jest kompleksowy i zależy nie tylko od charak-



Ryc. 2. Indukowana radialna segmentacja jąder limfocytów krwi kurcząt po podaniu ACTH na 24 godz. przed, łącznie i 24 godz. po SRBC



Ryc. 3. Odczyn na fosfatazę kwasną w limfocytach krwi kurcząt po podaniu ACTH na 24 godz. przed, łącznie i 24 godz. po SRBC

teru samego czynnika (jego natury, częstotliwości działania) lecz również od relacji w jakiej pozostaje jego działanie do fazy odpowiedzi immunologicznej. Stres może także stymulować siły obronne ustroju.

Wykazano, że u kurcząt, którym podano ACTH wystąpił wyraźny wzrost liczby komórek wykazujących RS indukowaną, czemu towarzyszyło obniżenie aktywności fosfatazy kwasnej (tab. 2, ryc. 2, 3). Takie zestawienie wyraźnie wskazuje na zarysowującą się odwrotną zależność: wzrostowi zdolności limfocytów do tworzenia radialnej segmentacji jąder towarzyszy spadek intensywności odczynu na fosfatazę kwasną w tych komórkach i odwrotnie, przy zwiększonej aktywności fosfatazy kwasnej występuje obniżenie zdolności do tworzenia RS – u kurcząt, którym podano tylko SRBC (tab. 2, ryc. 2, 3). Ponadto okazało się, że na powstawanie RS i na aktywność Fk w limfocytach kurcząt ma wpływ nie tylko samo podanie ACTH. Wyniki uzyskane u kurcząt immunizowanych erytrocytami owcy, którym podano ACTH wskazują, że bardzo istotne znaczenie ma odstęp czasu pomiędzy podaniem hormonu i antygeny (tab. 2, ryc. 2). W świetle uzyskanych wyników można mówić o przeciwstawnym efekcie oddziaływania na układ limfatyczny podanych ACTH i SRBC. Efektem podania ACTH był wzrost RS w limfocytach. Natomiast erytrocyty owcy pobudzając komórki limfatyczne, doprowadzały do osłabienia zdolności tych komórek do tworzenia RS. W tym kontekście trudno jednoznacznie ustalić, który z podanych modulatorów, ACTH czy SRBC, ma większy i bardziej znaczący wpływ na zdolność limfocytów do tworzenia RS. Zmiany w limfocytach spowodowane oddziaływaniem ACTH, podanym na 24 godziny przed immunizacją prawdopodobnie były już w takim stopniu zaawansowane, iż próba pobudzenia tych komórek antygenem nie zdołała ich zupełnie zniwelować. Odsetek limfocytów RS-dodatnich u kurcząt w tej grupie doświadczalnej był nadal wyższy od tego, jaki stwierdzono u kurcząt kontrolnych. Natomiast w porównaniu z kurczętami, którym podano tylko ACTH obniżył się. Odwrotny efekt zauważono u kurcząt, którym podano hormon 24 godziny po immunizacji SRBC. U tych ptaków wpływ stymulacji antygenowej na powstawanie RS okazał się być dominującym, cze-

go dowodem jest spadek ilości limfocytów z jądrem segmentowanym. Jednak bezwzględna liczba komórek RS-dodatnich była wyższa od notowanej u kurcząt, którym podano wyłącznie sam antygen. Natomiast równoczesne podanie kurczętom ACTH i SRBC zniwelowało indywidualny wpływ hormonu i antygeny. Dowodem tego jest zbliżona wartość RS do notowanej u kurcząt kontrolnych (tab. 2, ryc. 2).

Podanie ACTH, realizowane w różnych odstępach czasowych względem podania SRBC, prowadzi do zniwelowania różnic w aktywności fosfatazy kwasnej, wynikających z oddzielnego podania hormonu i antygeny (tab. 2, ryc. 3). Charakter tych zmian nie przypomina opisanych wcześniej relacji pomiędzy RS a aktywnością Fk.

Na tej podstawie można przypuszczać, że wpływ antygeny i hormonu na zdolność komórek do tworzenia RS i aktywność enzymów jest różny. Natomiast sekwencja i czas ich podania zdaje się w większym stopniu determinować zdolność limfocytów do tworzenia RS, w mniejszym zaś wpływa na kształtowanie się intensywności odczynu na Fk.

Mimo wykazanego ewidentnego wpływu wspomnianych czynników doświadczalnych na stan i reaktywność struktur wewnątrzkomórkowych limfocytów, interpretacja wyników badań jest wyjątkowo trudna. W dostępnej literaturze nie napotkano bowiem danych na temat radialnej segmentacji w zestawieniu z aktywnością enzymatyczną limfocytów u kurcząt.

Jest rzeczą interesującą, że część limfocytów krwi obwodowej pod wpływem antykoagulantów ulega zmianom morfologicznym (7, 8, 11, 15, 19, 20). Wydaje się wysoce prawdopodobne, że zjawisko radialnej segmentacji dotyczy tych komórek, które w związku ze zmianą własnej aktywności gromadzą większe niż zwykle ilości wapnia i na jego utratę są bardziej wrażliwe (11). Dlatego dodanie do krwi związków wiążących ten pierwiastek, w większym stopniu ujawnia rzeczywisty stan czynnościowy badanych komórek. Komórki pobudzone antygenami pobierają większe ilości jonów Ca^{+2} (tzw. calcium influx) (9). Jony te odgrywają bardzo istotną rolę w procesach związanych z odbieraniem przez komórkę bodźców stymulujących podział (9). Są również zaangażowane w przekazywanie sygnału do apoptozy (16, 17). Zarówno podział jak i apoptoza prowadzą do aktywacji komórki, o czym świadczą m. in.: wzrost stężenia wapnia, reorganizacja cytoszkieletu, zmiana aktywności różnych enzymów (9, 16, 17).

Radialna segmentacja prawdopodobnie ujawnia istniejący defekt funkcjonalny limfocytów, aktywujący mechanizmy prowadzące do apoptozy tych komórek, co związane jest z podaniem ptakom ACTH. Apoptoza bowiem jest zjawiskiem czynnej regulacji, poprzez którą ustrój eliminuje m. in. komórki uszkodzone (16, 17). Morfologicznym tego przejawem jest pojawienie się u kurcząt po podaniu ACTH zwiększonej liczby limfocytów z jądrem segmentowanym, a funkcjonal-

nym spadek aktywności fosfatazy kwasnej. Zainicjowane w limfocytach zmiany nie są jednak zdeterminowane ostatecznie. Wyraźne obniżenie odsetka komórek RS-dodatnich po stymulacji antygenowej może świadczyć o możliwości wyrównania, oczywiście do pewnego stopnia, ujemnych skutków oddziaływania podania ACTH na reaktywność limfocytów.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zjawisko RS może być uważane za marker zmian patologicznych w limfocytach krwi obwodowej u kurcząt.

Piśmiennictwo

1. *Cawley J. C.*: The microtubules of leukaemic Rieder Cells: an ultra structural study. *Scand. J. Haematol.* 9, 1972, 417-423.
2. *Czyż J.*: Wpływ kształtu komórek na wzrost, różnicowanie i przeżywalność komórek. *Post. Biol. Kom.* t 22, Suppl. nr 5, 1995, 41-58.
3. *Dombs J. E., Metz A.*: Stress-mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30, 1991, 89-109.
4. *El-Far A. A., Mashaly M. M., Kamar G. A.*: Bursectomy and in vitro response of adrenal gland to adrenocorticotrophic hormone and testis to human chorionic gonadotropin in immature male chickens. *Poultry Sci.* 73, 1994, 113-117.
5. *Evangelisti R., Becchetti B., Baroni T., Rossi L., Arena N., Valeno V., Carinci P., Locci P.*: Modulation of phenotypic expression of fibroblasts by alteration of the cytoskeleton. *Cell Biochem. Funct.* t 13, 1995, 41-52.
6. *Graczyk S.*: Wpływ bursektomii, tymektomii i surowic anty-limfocytarnych na reaktywność struktur limfatycznych sledzony u kurcząt. *Praca hab. Zesz. Nauk. AR Wrocław*, nr 123, 1994.
7. *Graczyk S., Pliszcak-Król A.*: Odczyn na kwaśną fosfatazę, esterazę octanu a-naftyly oraz radialna segmentacji jąder limfocytów krwi u kurcząt immunizowanych, poddanych działaniu egzogennej ACTH. *Mat. X Kongr. PTNW Wrocław*, t 1, 1996, 51.
8. *Graczyk S., Pliszcak-Król A.*: Wstępne badania Radialnej Segmentacji (RS) jąder limfocytów krwi kur. *Zesz. Nauk. AR Wrocław*, nr 282, 1996, 15-24.
9. *Hadden J. W., Szentivanyi A.*: *Immunopharmacology. Reviews.* t 1 Plenum Press, New York, 1990.
10. *Hassig A., Wen-Xi L., Stampfli K.*: Stress – induced suppression of the cellular immune reactions on the neuroendocrine control of the immune system. *Med. Hypotheses* t 46, 1996, 551-556.
11. *Ito S.*: Study on the in vitro Rieder Cell. *Scand. J. Haemat.* 12, 1974, 356-365.
12. *Krygier-Stojalowska A., Godlewski H. G.*: Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN, Warszawa, 1975.
13. *Marsh J. A., Scanes C. G.*: Neuroendocrine – immune interactions. *Poultry Sci.* 73, 1994, 1049-1061.
14. *Moriya O., Ichikawa Y.*: Acid phosphatase in lymphoid tissues of developing chick embryos. *Acta Histochem.* 87, 1989, 99-105.
15. *Pliszcak-Król A., Graczyk S.*: Wpływ bursektomii, tymektomii oraz stymulacji antygenowej na powstawanie radialnej segmentacji (RS) jąder limfocytów krwi obwodowej kurcząt. *Mat. IX Kraj. Konf. Nauk.-Dydakt. Olsztyn* 1995, 91-92.
16. *Radziszewska E.*: Fizjologiczna rola apoptozy. *Post. Biol. Kom.* t22, 1995, 247-263.
17. *Sikora E.*: Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy). *Post. Biochem.* 40, 1994, 150-160.
18. *Słowik J., Sanecka-Antoniszyn M., Graczyk S.*: Badania cytochemiczne fosfatazy kwasnej limfocytów krwi kurcząt bursektomowanych w różnym wieku, przebywających w zmienionych doświadczalnie warunkach środowiska. *Acta Agr. Silv.* t 20, 1981, 201-211.
19. *Söderström U.-B., Norberg B., Brandt L.*: The oxalate-induced Radial Segmentation of the nuclei in peripheral blood lymphocytes of different size. *Scand. J. Haemat.* 17, 1976, 57-61.
20. *Starzyńska R., Kieszek G.*: Ocena indukowanej przez szczawiany segmentacji jąder limfocytów u chorych na cukrzycę. *Pol. Tyg. Lek.* t XLIII, 1988, 329-333.
21. *Trout J.M., Mashaly M. M.*: The effects of adrenocorticotrophic hormone and heat stress on the distribution of lymphocyte populations in immature male chickens. *Poultry Sci.* 73, 1994, 1694-1698.