

Merinos Irkı Sağlıklı Gebe Koyunların Perifer Kan Lenfositlerinde Alfa Naftil Asetat Esteraz ve Asit Fosfataz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Emrah SUR * 
Tuğba ÖZAYDIN ***

İbrahim AYDIN **
İlhami ÇELİK ***

Yasemin ÖZNURLU ***
Nariste KADIRALİVA *

* Kırgızistan Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Jal 30, 720044, Bişkek - KIRGIZİSTAN

** Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, TR-42003 Kampus, Konya - TÜRKİYE

*** Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-42003 Kampus, Konya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-8067

Özet

Bu çalışma, Merinos ırkı koyunlarda gebeliğin perifer kan lenfositlerinin alfa naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) aktiviteleri ile perifer kan lenfosit oranları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Hayvanlardan her grupta 20'şer adet olacak şekilde gebe olmayan-kontrol, bir aylık, iki aylık, üç aylık, dört aylık ve beş aylık gebeler olmak üzere toplam 6 dönemde perifer kanlar alındı. Histolojik incelemeler sonucunda en düşük ANAE pozitif-lenfosit oranı (%63.5) bir aylık gebe koyunlarda tespit edilirken aynı dönemde null lenfosit sayısı da en yüksek seviyede (%12.75) belirlendi. Gebeliğin son dönemindeki koyunların perifer kan lenfosit (%42.9) ve ACP-az pozitif lenfosit (%43.35) oranlarında da istatistiksel olarak önemli düşüşler gözlemlendi. Tüm gebelik dönemlerinde perifer kan lenfosit oranlarında hormonal değişimlerin neden olduğu düşünülen dalgalanmalar olsa da en belirgin değişimler gebeliğin ilk ve son dönemlerinde gözlemlendi. Bu çalışmadan elde edilen bulguların maternal toleransın olası mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlayabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: ANAE, ACP-az, Null lenfosit, Gebelik, Koyun

Determination of the Activity of Alpha Naphthyl Acetate Esterase and Acid Phosphatase of Peripheral Blood Lymphocytes in Healty Pregnant Merino Sheep

Summary

This study was performed to determine the effects of pregnancy on the activities of alpha naphthyl acetate esterase (ANAE) and acid phosphatase (ACP-ase) of the peripheral blood lymphocytes in pregnant Merino sheep. Peripheral blood lymphocyte percentages were also estimated. Periferal blood samples were taken from animals in six different gestational stages as non-pregnant control, in the first, the second, the third, the fourth and the fifth month of pregnancy. Each group was contained 20 animals. The lowest ANAE (+) lymphocytes percentage (63.5%) was determined in the first month of pregnancy whereas the highest null lymphocytes proportion (12.75%) was detected in the same gestational period. There were statistically decreases in the proportions of peripheral blood lymphocyte (42.9%) and the ACP-ase (+) lymphocytes (43.35%) in the last gestational stages. Although the possible hormonal changes may cause the fluctuation of peripheral blood lymphocyte proportions in all gestational periods, the most distinctive changes were observed at the beginning and at the end of the pregnancy. It was concluded that the data was obtained from this study was useful for understanding of the possible mechanisms of maternal tolerance.

Keywords: ANAE, ACP-ase, Null lymphocyte, Pregnancy, Sheep

GİRİŞ

Memelilerde türün devamlılığı sağlıklı bir gebelikle mümkündür. Embriyonun uterusu tutunması -implante olması-

ve gelişmesi sürecinde meydana gelen en kritik olaylardan biri de "immün tolerans"tır. Zira plasentayı oluşturan



İletişim (Correspondence)



+996 702 428394



emrahsur@selcuk.edu.tr

trofoblast hücreleri yarı yarıya babaya ait antijenleri taşımaktadır. Allojen antijenleri taşıyan trofoblast hücrelerine karşı annenin bağışıklık sistemi tepkisinin belirli sınırlar içerisinde tutulmasını sağlayan tüm olaylar dizisi "maternal tolerans" olarak bilinir^{1,2}.

Sağlıklı bir gebelikte annenin bağışıklık sistemi hücrelerinin embriyoya karşı olumsuz tepki göstermemesi için perifer kanda, endometriyumda ve plasenta dokusunda bir takım değişiklikler meydana gelir. Özellikle T-lenfosit alt tipleri ve doğal katil hücrelerinin (natural killer-NK) kan, endometriyum ve plasenta dokusundaki sayıları ve aktivitelerinde gözlenen farklılıklar söz konusu bu değişimin temelini oluşturmaktadır^{2,3}. Fizyolojik ve patolojik herhangi bir neden olmaksızın karşılaşılan infertilite olaylarında, yavrunun anne tarafından kabul edilmemesi yani maternal tolerans yetersizliği sorumlu tutulabilir^{4,5}.

Mahmoud ve ark.⁶, sağlıklı hamile ve hamile olmayan bayanlarda yaptıkları bir çalışmada, gebelik süresince perifer kan toplam lenfosit sayılarının yanı sıra B-lenfosit sayısı ile doğal katil hücrelerin (Natural killer-NK) sayısında belirgin düşüşler gözlediklerini bildirirken; Medina ve ark.'nın⁷ farelerde yaptığı bir çalışmada da gebelikte birlikte B-lenfosit yapımının düştüğü bildirilmiştir. Agricola ve ark.'nın⁸ gebe ve postpartum kısırlıklarda yaptıkları bir çalışmada da perifer kan toplam lökosit sayılarının yanı sıra, toplam T-lenfosit, yardımcı T-lenfosit ve sitotoksik T-lenfosit sayılarında düşüşlerin meydana geldiği gözlenmiştir.

Alfa naftil asetat enzimi (ANAE), lizozomal bir enzim olup; insanlarda, sığırlarda, farelerde ve tavuklarda T- ve B-lenfositler ile monositlerin birbirlerinden ayırt edilmesinde kullanılır⁹⁻¹². Asit fosfat az enzimi (ACP-az) de lizozomal bir enzim olup; memelilerde çoğunluğunu T-lenfositlerinin oluşturduğu hücre popülasyonları için spesifiktir¹³.

Bu çalışmada Merinos ırkı koyunların perifer kan lenfosit oranları ile ANAE- ve ACP-az-pozitif lenfosit oranlarında gebeliğin farklı dönemlerinde meydana gelen değişimler tespit edilerek, insanlarda ve deney hayvanlarında üzerinde sıkça çalışılan maternal tolerans konusuna çiftlik hayvanları açısından yaklaşılmaya çalışılmış ve bu tür çalışmalarda model hayvan olarak önerilen koyunlardan elde edilecek verilerin ileride yapılacak olan daha detaylı çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hayvan Materyali

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 23.12.2009 tarih ve 2009/77 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmanın hayvan materyalini Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan 20 adet Merinos ırkı koyun oluşturdu. Kontrol grubunu oluşturmak amacıyla

gebe olmayan hayvanlardan kan örnekleri alındı. Daha sonra arama koçları ile östrusları belirlenen koyunlar aynı ırka ait koçlarla elde aşım yöntemiyle çiftleştirildi. Hayvanların gebelik dönemleri, çiftleşme tarihi ve ultrasonografik (Falco 100, Pie medical, Maastrich, The Netherlands) muayenelerle belirlenerek gebeliklerinin birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci ayında olan hayvanlardan kan örnekleri alındı.

Kan Materyali

Hayvanların jugular venasından klasik yöntemle heparinli tüplere yaklaşık 2'şer ml kan alındı. Alınan kanlardan 6'şar adet frotiler hazırlandı ve bu frotilerden ikisi klasik May Grünwald-Giemsa boyama yöntemi ile boyanırken, ikisi ANAE, ikisi de ACP-az enzimi demonstrasyonları için kullanıldı. Havada kurutulan frotiler -10°C'deki glutaraldehid-aseton tespit solüsyonunda (pH=4.8) 3 dak. süreyle tespit edildiler. Bu sürenin sonunda distile su ile 3 kez yıkanan frotiler oda sıcaklığında kurutuldu¹⁴.

Kurumayı takiben frotiler ANAE ve ACP-az enzimi için hazırlanan inkübasyon solüsyonlarında gerekli sürelerde inkübe edildiler. Inkübasyon süresinin sonunda birkaç kez distile suyla yıkanan preparatlara, asetat tamponunda (pH=4.8) hazırlanmış olan %1'lik methyl-green (Merck) ile çekirdek boyası uygulandı¹⁴.

Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları belirlenirken, May-Grünwald-Giemsa yöntemi ile boyanan diğer kan preparatlarında lenfosit oranları (%) tespit edildi. Hazırlanan preparatlar DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile incelendikten sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi.

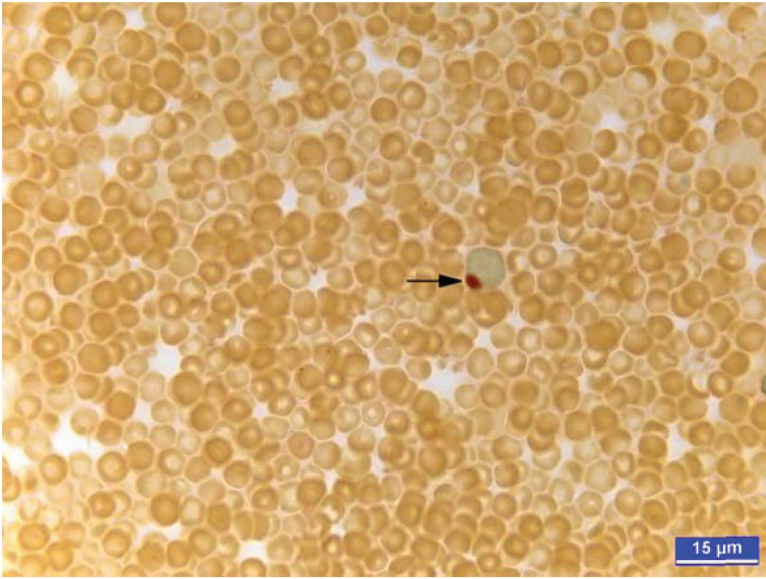
İstatistik

Perifer kan enzim pozitivite oranları ile lenfosit oranları Açık (Arc Sinus) dönüşüm metodu kullanılarak analiz edildiler. Bu metoda göre transforme edilen parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırmalarında SPSS 10.0¹⁵ istatistik programı yardımıyla DUNCAN testi kullanıldı. Verilerin tablollaştırılmasında dönüşüm öncesi gerçek değerler kullanıldı.

BULGULAR

Frotiler üzerinde yapılan ışık mikroskobik incelemeler sonucunda, perifer kan lenfositlerinde 2 farklı ANAE enzimi aktivitesi belirlendi. Sayıları 1-4 arasında değişen kırmızı-kahverengi granüller içeren lenfositler ANAE pozitif lenfositler olarak değerlendirilirken (*Şekil 1*); 5 ve daha fazla sayıda granül içeren lenfositler "null lenfositler" olarak değerlendirildi (*Şekil 2*). ACP-az enzimi aktivitesinin ise 1-3 adet pembe-kırmızı granül şeklinde olduğu dikkati çekti (*Şekil 3*).

Çalışmada elde edilen perifer kan lenfosit oranları ile

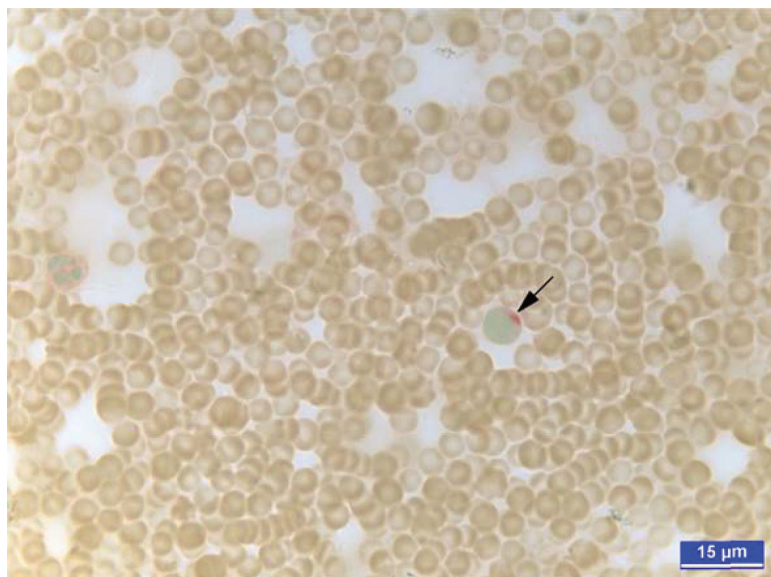
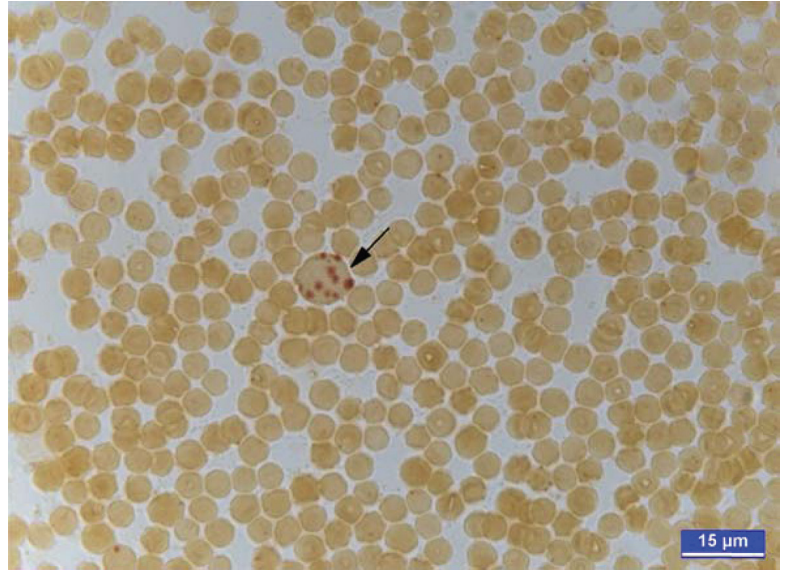


Şekil 1. Kontrol grubundan bir koyuna ait perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: ANAE-pozitif lenfosit. Büyütme çizgisi: 15 µm

Fig 1. An ANAE-positive peripheral blood lymphocyte in animal from control group ANAE demonstration. Arrow: ANAE-positive peripheral blood lymphocyte. Bar: 15 µm

Şekil 2. Gebeliğin birinci ayındaki bir koyuna ait perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: Null lenfosit. Büyütme çizgisi: 15 µm

Fig 2. A null lymphocyte in animal at the first month of pregnancy. ANAE demonstration. Arrow: Null lymphocyte. Bar: 15 µm



Şekil 3. Kontrol grubundan bir koyunun perifer kan frotisinde ACP-az enzimi demonstrasyonu. Ok: ACP-az-pozitif lenfosit. Büyütme çizgisi: 15 µm

Fig 3. An ACP-ase-positive peripheral blood lymphocyte in animal from control group ACP-ase demonstration. Arrow: ACP-ase-positive peripheral blood lymphocyte. Bar: 15 µm

Tablo 1. Gebeliğin farklı dönemlerinde perifer kan lenfosit, null lenfosit ve ANAE- ve ACP-az lenfosit oranları**Table 1.** Proportion of peripheral blood lymphocyte, null lymphocyte, and ANAE and ACP-ase positive lymphocyte in different gestational stages

Gruplar (n=120)	Lenfosit (%) X±SE	ANAE-Pozitif Lenfosit (%) X±SE	Null Lenfosit (%) X±SE	ACP-az Pozitif Lenfosit (%) X±SE
Grup-1 Kontrol (Gebe olmayan hayvanlar)	49.25±8.74 ^{ab}	73.00±5.41 ^a	4.50±1.70 ^b	63.05±6.88 ^a
Grup-2 (1 aylık gebe hayvanlar)	45.00±4.69 ^{bc}	63.50±6.23 ^c	12.75±3.14 ^a	62.70±6.38 ^a
Grup-3 (2 aylık gebe hayvanlar)	51.25±7.64 ^a	68.75±6.95 ^{ab}	5.85±3.51 ^b	60.45±9.00 ^a
Grup-4 (3 aylık gebe hayvanlar)	49.25±7.78 ^{ab}	72.00±6.96 ^a	4.25±2.07 ^b	59.35±7.15 ^a
Grup-5 (4 aylık gebe hayvanlar)	47.90±7.53 ^{abc}	67.15±7.24 ^{bc}	4.40±2.26 ^b	58.95±8.08 ^a
Grup-6 (5 aylık gebe hayvanlar)	42.90±12.78 ^c	68.75±8.22 ^{ab}	6.20±3.90 ^b	43.35±10.75 ^b

a-c: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir (P<0.05)

ANAE pozitif lenfosit, null lenfosit ve ACP-az-pozitif lenfosit oranları *Tablo 1*'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi gebeliğin ilk dönemindeki koyunlarda en belirgin düşüşler ANAE pozitif lenfosit oranlarında tespit edilmiştir. Buna karşın aynı dönemde null lenfosit oranı önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Gebeliğin son döneminde ise perifer kan lenfosit oranındaki belirgin düşüşe paralel olarak ANAE ve ACP-az pozitif lenfosit oranlarında da düşüşler tespit edilmiştir. Gebeliğin 2., 3. ve 4. aylarında elde edilen veriler incelendiğinde hormonal değişimlerle ilgili olduğu düşünülen farklılıklar dikkati çekmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Memelilerde gebelikle birlikte yeni bir östrus siklusunun başlamasını önleyip embriyoya karşı annenin bağışıklık sistemi hücrelerinin saldırısını engelleyen ve embriyonun gelişmesine olanak tanıyan bir dizi olaylar sonucunda "maternal immün tolerans" sağlanmış olur ^{1-2,16}. İmplantasyon olarak bilinen embriyonun uterus endometriyumuna tutunması olayı, temelde yangısal sitokinlerin salınmasıyla karakterizedir ¹⁷. Diğer sistemlere ait mukozalarda olduğu gibi uterus mukozası da normalde T- ve B-lenfositlerinin yanı sıra makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal katil hücreleri (natural killer cell-NK) içerir. Martinez ve ark.'nın ¹⁸ gebe ve gebe olmayan keçi uterusları üzerinde yaptıkları çalışmada gebe olmayan uterusların içerdiği lenfositlerin pek çoğunun T-lenfosit olduğu; buna karşın gebe uterusların karunkular bölgesinde tüm lenfosit alt tiplerinin hemen hemen tamamının gözden kaybolduğu bildirilmiştir.

ANAE enzimi, içerisinde insanın da yer aldığı pek çok hayvan türünde T-lenfositleri için spesifik bir enzimdir ¹⁰⁻¹². Koyunlarda söz konusu enzimin T-lenfositleri için spesifik bir enzim olmadığı bildirilmekle birlikte ¹⁹ diğer türlerde yapılan çalışmalarda lenfositlerde iki farklı ANAE enzimi pozitivitesinden bahsedilmektedir. Bunlardan birisi T-lenfositleri için spesifik olan 1-4 adet lokalize granülden oluşan boyanma şekli, bir diğeri ise çok sayıda dağınık yerleşimli boyanma şeklidir. Bu son pozitivitenin "null" lenfositleri için özel olduğu bildirilmektedir ^{12,20}. Null lenfositlerinin, NK hücrelerinin öncüllerinin yanı sıra farklı gelişim aşama-

larındaki T- ve B-lenfosit serilerine ait hücreleri de içeren bir lenfosit alt tipi olduğu bildirilmektedir ^{21,22}. Perifer kandaki bu hücrelerin dokulara geçerek tümör hücreleri, virüsle enfekte hücreler ve allojen antijenlere karşı organizmayı savunduklarını bildirilirken, uterus dokusuna gelen NK hücrelerinin de uterusla olgunlaşarak büyük ve granüllü hücre formuna dönüştükleri bu andan itibaren de uterus doğal katil hücreleri (uNK) olarak adlandırıldıkları bildirilmektedir ²³. NK hücrelerinin bir bölümünün gebeliğin ilk dönemlerinde sitotoksik T-lenfositlerle birlikte fötusa saldırdığı, ancak düzenleyici NK hücreleri olarak adlandırılan bir diğer bölümünün ise düzenleyici T-lenfositlerle birlikte fötusu bu saldırılardan koruduğu bildirilmektedir ²⁴.

Bazı araştırmacılar null lenfositlerinin NK hücreleri olarak değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmektedirler ²⁵. Null lenfositlerinin NK hücreleri olarak değerlendirilmesinin ve ANAE histokimyası ile bunların belirlenebilmesinin klinik-laboratuvar teşhiste önemli olabileceği; zira gebelikte NK hücrelerinin gerek perifer kan ve gerekse uterus dokusundaki sayılarında önemli değişimlerin olabileceği ileri sürülmektedir. Koç ve Kanter'in ²⁶ gebe sığınarlarda yaptıkları bir çalışmada ANAE pozitivitesi gösteren uterus doğal katil hücrelerinin (uNK) desidual alan içerisinde implantasyonun ilk üç gününde giderek arttığı bildirilmektedir.

Sur ve ark.'nın ¹⁴ gebeliğin farklı dönemlerindeki Holstein ırkı süt sığırlarında yapmış oldukları bir çalışmada, 5-8 adet dağınık ANAE (+) granüller içeren ve null lenfosit olarak değerlendirilen hücrelerin oranı gebe olmayan kontrol grubu hayvanlarda %1.45 olarak tespit edilirken, gebeliğin I. trimesterindeki hayvanlarda bu hücrelerin oranının %8.1'e yükseldiği bildirilmektedir. Yine Sur ve ark.'nın ²⁷ fareler üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada ise perifer kan null lenfosit oranının kontrol grubu hayvanlarda %5.66, gebeliğin 3. gününe karşılık gelen erken dönemde ise %11.5 olarak tespit edildiği ileri sürülmektedir. Akbulut ²⁸ ise sağlıklı hamile ve hamile olmayan bayanlarda yapmış olduğu bir çalışmada söz konusu hücrelerin oranını kontrol grubunu oluşturan bayanlarda %2 olarak tespit ederken, I. trimesterdeki bayanlarda bu oranın %11'e yükseldiğini ifade etmektedir. Perifer kan null lenfositlerinin gebeliğin farklı

dönemlerindeki oransal değişimlerinin klinik açıdan önemli olduğu bildirilmektedir. Andalip ve ark.'nın ²⁹ sağlıklı bir gebelik süreci geçiren kadınlar ile tekrarlayan spontan düşük (Recurrent Spontan Abortus-RSA) geçmişi olan kadınlarda yaptıkları bir çalışmada sağlıklı gebelerin perifer kan NK oranı %9.21 olarak bulunurken RSA geçmişi olanlarda bu oranın %13.48 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da koç katımı öncesinde kanları alınan ve kontrol grubunu oluşturan koyunlarda perifer kan null lenfositlerinin oranı %4.5 olarak bulunurken, gebeliğin birinci ayındaki hayvanlarda bu oranın %12.75'lere kadar yükseldiği tespit edilmiştir (Tablo 1). Null lenfosit ve NK hücreleri arasındaki ilişki, bu hücrelerin perifer kan ve uterus dokusundaki oranlarının gebeliğe bağlı değişimleri ve klinik bilgiler dikkate alındığında, gebeliğin ilk dönemindeki perifer kan null lenfositlerindeki artışın embriyoya karşı şekillenen doğal tepkinin bir sonucu olabileceği sonucuna varılabilir. İlerleyen dönemlerde bu oranın kontrol grubuna yakın seviyelere gerilemesi de gebeliğin maternal kabulünün bir sonucu olarak kabul edilebilir.

Bu çalışmada perifer kan ANAE-pozitif lenfosit oranları dikkate alındığında gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklar tespit edilmiştir ($P<0.05$; Tablo 1). En yüksek perifer kan ANAE-pozitif lenfosit oranı gebe olmayan kontrol grubu hayvanlarda tespit edilirken (%73); en düşük ANAE-pozitif lenfosit oranına gebeliğin birinci ayındaki koyunlarda rastlanmıştır (%63.5). Sur ve ark.'nın ¹⁴ Holstein ırkı süt sığırlarında yapmış oldukları çalışmada ise perifer kan ANAE-pozitif lenfosit oranları açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmamasına karşın en düşük oran I. trimesterdeki hayvanlarda tespit edilmiştir. Sur ve ark.'nın ²⁷ fareler üzerinde yaptıkları çalışmada ise kontrol grubu farelerde perifer kan T-lenfosit oranı en yüksek bulunurken (%64.67), en düşük T-lenfosit oranı gebeliğin 3. gününe karşılık gelen erken dönemde tespit edilmiştir (%43.83). Akbulut'un ²⁸ insanlarda yaptığı bir çalışmada hamile olmayan kontrol grubu bayanlarda %70 olan perifer kan T-lenfosit oranının hamileliğin başlaması ile birlikte hızla düştüğünü bildirmektedir.

Sur ve ark.'nın ¹⁴ Holstein ırkı süt sığırlarında, Akbulut'un ²⁸ ise insanlarda yapmış oldukları çalışmalarda perifer kan ACP-az (+)-lenfositlerde I. ve III. trimesterlerde belirgin düşüşler bildirilmiştir. Bu çalışmada ise perifer kan ACP-az (+)-lenfosit oranındaki en belirgin düşüşe gebeliğin son dönemindeki koyunlarda rastlanmıştır ($P<0.05$; Tablo 1).

Pisek ve ark.'nın ³⁰ koyunlarda yapmış oldukları bir çalışmada gebelik süresince perifer kan toplam akyuvar sayısında önemli düşüşlerin meydana geldiği ve düşüşün asıl kaynağının nötrofil ve lenfosit sayılarındaki düşüşler olduğu kanıtlanmıştır. Sur ve ark.'nın Holstein ırkı süt sığırlarında ¹⁴ ve farelerde ²⁷ yapmış oldukları çalışmalarda en düşük perifer kan lenfosit oranına gebeliğin erken dönemlerinde rastlandığı bildirilmiştir. Akbulut ²⁸ ise insanlarda yaptığı çalışmada en düşük perifer kan lenfosit oranını III. tri-

mesterde tespit ettiğini bildirmektedir. Bu çalışmada da en düşük perifer kan lenfosit oranına gebeliğin son dönemindeki koyunlarda rastlanmıştır ($P<0.05$; Tablo 1).

Çalışmada gebeliğin ilk döneminde perifer kan ANAE pozitif lenfosit, lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranlarında dikkati çeken düşüşlerin gebelik hormonu olarak da bilinen progesteron hormonundaki artışla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Söz konusu hormonun, immüno-supresif etkisi nedeniyle gebeliğin erken dönemlerinde maternal toleransın gelişiminde kritik bir role sahip olduğu ileri sürülmektedir. Progesteron hormonunun baskın olduğu luteal fazda ve eğer şekillenmişse tüm gebelik süresince lenfositlerde yer alan progesteron reseptörlerinin arttığı bildirilmektedir ³¹. Progesteron hormonunun lenfositlerin proliferatif aktivitelerini baskılayıcı etkisi dikkate alındığında söz konusu düşüşlerin progesteron hormonundan ileri gelebileceği düşünülmektedir. Gebeliğin son dönemlerinde meydana gelen ve en belirgin olarak perifer kan lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranlarında dikkati çeken düşüşlerin ise doğuma yakın dönemlerde artan fetal kortizol seviyesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu süreçte fetal hipotalamus-hipofiz-adrenal korteks etkileşimi sonucu salgılanan kortizol hormonu bir seri hormonal değişimleri tetikleyerek doğumu başlatmaktadır ³². Yapılan deneysel çalışmalar, koyunlarda oluşturulan stresin fetal ve maternal plazma kortizol seviyesini yükselterek erken doğuma neden olduğunu ortaya koymaktadır ³³. Kortizol hormonunun lenfositler üzerindeki baskılayıcı etkisi göz önüne alındığında ^{34,35}, çalışmada gebeliğin son dönemindeki koyunlarda tespit edilen perifer kan lenfosit oranlarındaki düşüşler ile buna bağlı olduğu düşünülen ANAE ve ACP-az pozitif lenfosit oranlarındaki düşüşlerinin mekanizması bir ölçüde açıklanabilir.

Koyunlar, canlı ağırlıkları, embriyonik gelişim süreçleri, hormonal değişimler, doğumun aşamaları ve mekanizması ile doğum ağırlıkları dikkate alındığında insanlarla benzer sonuçlar veren uygun bir model hayvan olarak değerlendirilmektedir ³⁶. Fötüs ve annenin hayatını tehlikeye atmaksızın uzun süre monitörize edilebilen ve post-operatif süreci sorunsuz yaşayan bu hayvanlar üzerinde uygun anatomileri nedeniyle kolaylıkla kalıcı kateter ve benzeri işlemler de yapılabilmektedir. Aynı zamanda uysal bir karaktere sahip olan koyunlar, periyodik aralıklarla kan alma işlemi gerektiren gebelik, fetal gelişim ve endokrinolojik çalışmalar gibi uzun süreli deneysel çalışmalarda eskiden beri tercih edilen bir tür olarak değerlendirilmektedirler ³⁷. Sayılan bu avantajlardan dolayı koyunlardan elde edilen bulguların, insanlarda prenatal gelişim ile normal ve premature doğum olgularının anlaşılmasına önemli katkılar sağladığı bildirilmektedir ³⁶. Bu bilgiler doğrultusunda, maternal toleransın olası mekanizmalarının anlaşılabilmesi için yapılacak daha detaylı deneysel çalışmalarda da koyunların model hayvan olarak kullanılabilirliği ve elde edilen verilerin bundan sonra yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Gnatek GG, Smith LD, Duby RT, Godkin JD:** Maternal recognition of pregnancy in the goat: Effects of conceptus removal on interestrus intervals and characterization of conceptus protein production during early pregnancy. *Biol Reprod*, 41, 655-663, 1989.
2. **Nasar A, Rahman A:** Hormonal changes in the uterus during pregnancy-lessons from the ewe: A review. *J Agric Rural Dev*, 4 (1-2): 1-7, 2006.
3. **Ostensen M, Sicher P, Förger F, Villiger PM:** Activation markers of peripheral blood mononuclear cells in late pregnancy and after delivery: A pilot study. *Ann Rheum Dis*, 64, 318-320, 2005.
4. **Watches DC, Robinson RS, Mann GE, Lamming GE:** The establishment of early pregnancy in cows. *Reprod Dom Anim*, 33, 279-284, 1998.
5. **Trowsdal J, Betz AG:** Mother's little helpers: Mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nature Immunol*, 7 (3): 241-246, 2006.
6. **Mahmoud F, Abul H, Omu A, Al-Rayes S, Haines D, Whaley K:** Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women. *Gynecol Obstet Invest*, 52, 232-236, 2001.
7. **Medina KL, Smithson G, Kincade PW:** Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med*, 178, 1507-1515, 1993.
8. **Agricola R, Carvallao H, Barbosa M, Pereira M, Medeiros JAS, Ferreira-Dias G:** Blood lymphocyte subpopulations, neutrophil phagocytosis and proteinogram during late pregnancy and postpartum in manes. *Reprod Domest Anim*, 43 (2): 212-217, 2008.
9. **Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller HU, Hess MW, 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.
10. **Maiti NK, Saini SS, Sharma SN:** Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet Res Commun*, 14, 207-210, 1990.
11. **Kajikawa O, Koyama H, Yashikawa T, Tsubaki S, Saito H:** Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 44 (8): 1549-1552, 1983.
12. **Çelik İ, Aştı RN, Ergene N:** İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerin esteraz sitokimyası ve yüzey immünooglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *SÜ Tıp Fak Derg*, 7 (4): 497-503, 1991.
13. **Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L:** Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol*, 44, 577-582, 1980.
14. **Sur E, Aydın İ, Öznurlu Y, Telatar T, Çelik İ:** Sağlıklı gebe sığırların perifer kan lenfositlerinde alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi. *Vet Bil Derg*, 24 (2): 5-12, 2008.
15. **SPSS:** SPSS 10.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL. 1999.
16. **Barnea ER:** Insight into early pregnancy events: The emerging role of the embryo. *Am J Rep Immunol*, 51, 319-322, 2004.
17. **Hunt JS:** Stranger in a strange land. *Immunol Rev*, 213, 36-47, 2006.
18. **Martinez CM, Buendia AJ, Sanchez J, Navarro JA:** Immunophenotypical characterization of lymphocyte subpopulations of the uterus of non-pregnant and pregnant goats. *Anat Histol Embryol*, 34, 240-246, 2005.
19. **Dixon RJ, Moriarty KM:** Alpha-naphthyl acetate esterase activity is not a specific marker for ovine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 4 (4): 505-512, 1983.
20. **Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FGJ:** Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand J Haematol*, 18, 437-448, 1977.
21. **Chiao JW, Dowling M, Good RA:** Rosette formation of human null lymphocytes with Rhesus monkey erythrocytes. *Clin Exp Immunol*, 32, 498-503, 1978.
22. **Hercend T, Meuer S, Reinherz EL, Schlossman SF, Ritz J:** Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell" fraction of human peripheral blood. *J Immunol*, 129 (3): 1299-1305, 1982.
23. **Herington JL, Bany BM:** Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and functioning of the mouse uterus during decidualization. *Bio Reprod*, 76, 579-588, 2007.
24. **Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M:** Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in fetomaternal tolerance. *Seminars in Immunopathol*, 29 (2): 115-122, 2007.
25. **Moretta A, Bottino C, Sivori S, Marcenaro E, Castriconi R, Chiesa MD, Carlomagno S, Augugliaro R, Nanni M, Vitale M, Millo R:** Natural killer lymphocytes: "Null cells" no more. *It J Anat Embryol*, 106 (4): 335-342, 2001.
26. **Koç A, Kanter M:** Siçanlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücresel ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar. I. Hücreyel savunma sistemi hücreleri. *YYÜ Sağlık Bil Derg*, 6 (1-2): 122-130, 2000.
27. **Sur E, Öznurlu Y, Özaydın T, Çelik İ:** Gebe farelerde perifer kan T-lenfositlerinin oranı ve endometriyum dokusunda alfa naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) pozitif lenfositlerin dağılımı. *SÜ BAP Koordinatörlüğü, Porje No: 10401016, Konya*, 2012.
28. **Akbulut B:** Sağlıklı gebelerin perifer kan lenfositlerinde bazı AgNOR parametreleri ve mikronükleus sıklığı ile alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniv. Sağlık Bil. Enst.*, 2010.
29. **Andalip A, Rezaie A, Oreizy F, Baluchi S:** The assesment of NK cytotoxicity and CD₅₆⁺/CD₁₆⁺ phenotype by flow-cytometry in PBL isolated from women eith recurrent spontaneous abortion. *IJI*, 2 (4): 213-219, 2005.
30. **Pisek L, Travnicek J, Salat J, Kroupova V, Soch M:** Changes in white blood cells in sheep blood during selenium supplementation. *Veterinarni Medicina*, 53 (5): 255-259, 2008.
31. **Cuello F, Martinez R, Grosso C, Vivas A:** Peripheral lymphocytes response to progesterone during early pregnancy in pig. *REDVET*, 7 (11): 1-7, 2006.
32. **Wadhwa PD, Culhane JF, Rauh V, Barve SS:** Stress and preterm Birth: Neuroendocrine, immune/inflammatory, and vascular mechanisms. *Maternal and Child Health J*, 5 (2): 119-125, 2001.
33. **Kumarasamy V, Mitchell MD, Bloomfield FH, Oliver MH, Campbell ME, Challis JRG, Harding JE:** Effects of periconceptional undernutrition on the initiation of parturition in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288: R67-R72, 2005.
34. **Menge C, Dean-Nystrom EA:** Dexamethasone depletes $\gamma\delta$ T cells and alters the activation state and responsiveness of bovine peripheral blood lymphocyte subpopulations. *J Dairy Sci*, 91, 2284-2298, 2008.
35. **Bilandžić N, Šimić B, Terzić S, and Žurić M:** The influence of levamisole on cortisol concentration and peripheral blood in artificially stressed pigs. *Vet Arc*, 80 (4): 477-489, 2010.
36. **Jenkin G, Young IR:** Mechanisms responsible for parturition: The use of experimental models. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 567-581, 2004.
37. **Adams D, McKinley M:** The sheep. Revised and Updated by: Ian Colditz and Christina Dart. *ANZCCART Fact Sheet A9*. The University of Adelaide, South Australia, 2009.