


Gebe Farelerde Perifer Kan ve Endometriyum Dokusunda T-lenfosit, Null Lenfosit ve Asit Fosfataz Pozitif Lenfositlerin Oran ve Dağılımları

Emrah SUR^{1,2} 
İlhami ÇELİK²

Yasemin ÖZNURLU²
İbrahim AYDIN³

Tuğba ÖZAYDIN²
Nariste KADIRALİEVA¹

¹ Kırgızistan Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bişkek - KIRGIZİSTAN

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-42003 Kampüs, Konya - TÜRKİYE

³ Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, TR-42003 Kampüs, Konya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-9642

Özet

Bu çalışma, farelerde gebeliğin T-lenfosit, null lenfosit ve asit fosfataz (ACP-az) pozitif lenfositlerin perifer kandaki oranı ve endometriyumun desidua bazalis bölgesindeki dağılımı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla, 12-14 haftalık fareler, gebe olmayan-kontrol grubu ile gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü haftalarının ortasına karşılık gelecek şekilde erken, orta ve geç gebelik dönemi (sırasıyla gebeliğin 3., 10. ve 17. günleri) olmak üzere 4 gruba ayrıldılar (n = 6). En düşük T-lenfosit oranı perifer kanda (%43.83) ve desidua bazalis dokusunda (10.83 adet/0.1 mm²) sırasıyla gebeliğin erken ve orta dönemlerinde tespit edildi. Perifer kan ACP-az pozitif lenfosit oranlarında gebeliğin ikinci haftasında istatistiksel olarak önemli bir yükselme gözlenirken (%44.33); desidua bazalis dokusunda en düşük ACP-az pozitif lenfosit sayısı (5.50 adet/0.1 mm²) gebeliğin erken döneminde gözlemlendi. Hem perifer kanda (%11.50) ve hem de desidua bazalis dokusunda (7.83 adet/0.1 mm²) en yüksek null hücre oranı erken gebelik döneminde tespit edildi. En düşük perifer kan lenfosit oranı (%56.00) erken dönemde gözlemlendi. Dönemler arasında bazı farklar olsa da gebeliğin lenfosit, T-lenfosit, null lenfosit ve ACP-az pozitif lenfositlerinin sayı ve dağılımlarını etkilediği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: ACP-az, ANAE, Fare, Gebelik

The Proportion and The Distribution of T-lymphocytes, Null Lymphocytes and Acid Phosphatase Positive Lymphocytes of The Peripheral Blood and Endometrium in Pregnant Mice

Summary

This study was performed to determine the effects of pregnancy on the proportion of T-lymphocytes, null lymphocytes and acid phosphatase (ACP-ase) positive peripheral blood lymphocytes and the distribution of the mentioned cells in the decidua basalis region of endometrium in the pregnant mice. For this purpose, mice at 12-14 weeks of age were divided into four groups as non-pregnant control, and at the middle of the first, second, and the third week of the pregnancy, corresponding to early, middle, and late (3rd, 10th, and 17th days of pregnancy) gestational stages respectively (n = 6 for each group). The lowest T-lymphocytes percentage was determined at early and middle pregnancy in the peripheral blood (43.83%) and decidua basalis (10.83 number/0.1 mm²), respectively. There was a statistically significant increase in the proportions of the peripheral blood ACP-ase (+) lymphocytes (44.33%) at the mid-gestational period while the lowest ACP-ase positive lymphocyte numbers (5.50 number/0.1 mm²) in the decidua basalis was observed at early pregnancy. The highest null cell rates were found at early gestation either in the peripheral blood (11.50%) or in the decidua basalis (7.83 number/0.1 mm²). The lowest percentage of peripheral blood lymphocyte (56.00%) was recorded at the early pregnancy. It was concluded that the number and the distribution of the lymphocyte, T-lymphocyte, null lymphocyte, and ACP-ase positive lymphocyte were affected by pregnancy although there were some differences among the gestational periods.

Keywords: ACP-ase, ANAE, Mice, Pregnancy



İletişim (Correspondence)



+90 505 7669551



emrahsur@selcuk.edu.tr

GİRİŞ

Gebelik, zigot ve devam eden süreçte fötüs tarafından eksprese edilen ve anne için yabancı olan antijenlere karşı maternal bağışıklık sistemin toleransı ile karakterize fizyolojik bir durum olarak tanımlanmaktadır. Temelini lenfosit alt tipleri ve doğal katil hücrelerinin (NK) kan ve endometriyum dokusundaki sayı ve dağılımları ile ürettikleri sitokin düzeylerindeki değişimlerim oluşturduğu bu süreç maternal tolerans olarak da adlandırılır [1,2].

Mahmoud ve ark.'nın [3] sağlıklı gebe ve gebe olmayan kadınlarda yaptıkları bir çalışmada, gebelik süresince perifer kan toplam lenfosit sayılarının yanı sıra B-lenfosit sayısı ile doğal katil hücrelerin sayısında belirgin düşüşler gözlenirken; Medina ve ark.'nın [4] farelerde yaptığı bir çalışmada da gebelikle birlikte B-lenfosit öncüllerinin ve B-lenfosit yapımının düştüğü bildirilmiştir. Nakamura ve ark.[5] da insanlarda gebelik boyunca sitotoksik T-lenfositlerinin aktivitelerinin azaldığını bildirmektedirler.

Gebeliğin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma, histolojik açıdan en belirgin değişimlerin uterus mukozasında olduğunu göstermiştir. Martinez ve ark.'nın [6] keçilerde yaptıkları bir çalışmada gebe olmayan uterusların içerdiği lenfositlerin pek çoğunun T-lenfosit olduğu; buna karşın gebe uterusların karunkular bölgesinde tüm lenfosit alt tiplerinin büyük çoğunluğunun gözden kaybolduğu bildirilmiştir.

Lizozomal bir enzim olan alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) enziminden [7], başta insan [8] olmak üzere, sığır [9], tavuk [10], köpek [11] ve farelerde [12] T-lenfositlerin ayrımında yararlanılır. Asit fosfataz (ACP-az) ise miyelositler, polimorf nükleer lökositler, lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulçukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir [13].

Bu çalışma, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında elde edilmesi son derece sınırlı olan sağlıklı gebe uterus endometriyum dokusunda T-lenfosit, null lenfosit ve asit fosfataz (ACP-az) pozitif lenfositlerin dağılımında gebelikle birlikte meydana gelen değişimlerin farelerde belirlenmesi ve bundan sonra maternal tolerans konusunda yapılacak olan çalışmalara katkı sağlamak amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Hayvan Materyali

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 31.08.2009 tarih ve 2009/50 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmanın materyalini erişkin (12-14 haftalık) dişi fareler oluşturdu. Dişi ve erkek fareler, 1 adet erkek 4 adet dişi birlikte olacak şekilde gruplara ayrılarak aynı kafese alındılar. Bir gece

boyunca çiftleşmeye bırakılan fareler günlük olarak vajinal tıkaç oluşumu yönünden kontrol edildiler. Vajinal tıkaç oluşan dişi fareler gebeliklerinin sıfıncı gününde kabul edilip ayrı kafeslere aktararak takibe alındılar. Fareler, her grupta 6'şar adet olacak şekilde gebe olmayan-kontrol grubu ile gebeliğin birinci, ikinci ve üçüncü haftalarının ortalarına karşılık gelecek şekilde erken, orta ve geç gebelik dönemi (sırasıyla gebeliğin 3, 10. ve 17. günleri) olmak üzere 4 gruba ayrıldılar. Sakrifiye edilen farelerden perifer kan ve implantasyon bölgesinden uterus dokusu örnekleri alındı.

Metot

Alınan kan örneklerinden 6'şar adet froti hazırlanarak havada kurutulduktan sonra ANAE ve ACP-az enzimi demonstrasyonu ve May Grünwald-Giemza boyaması için -10°C'deki glutaraldehid-aseton tespit solüsyonunda (pH = 4.8) 3 dk. süreyle tespit edildiler. Frotilerden ikişer adedi, inkübasyon solüsyonları içerisinde 37°C'de 2 saat kontrollü bir şekilde boyandılar. Lenfositlerde kırmızı ya da kahverengi granüllerin ortaya çıkmasını takiben inkübasyon işlemi sona erdirildi ve ardından %1'lik methylgreen ile çekirdek boyası uygulandı [14]. Kalan 2 froti ise perifer kan lenfosit oranlarının belirlenmesi amacıyla klasik May Grünwald-Giemza boyama metodu ile boyandılar.

Uterus dokusundan alınan örnekler enzim demonstrasyonları için 24 saat formal-sükroz (+4°C, pH 6.8) solüsyonunda tespit edildikten sonra 22 saat de Holt solüsyonunda (+4°C) bekletildiler. Doku örneklerinden kriyostatta (Leica, CM 1510 S) 12 µm kalınlığında seri kesitler alındı. İnkübasyon solüsyonları içerisinde oda sıcaklığında 15 dak. süreyle kontrollü bir şekilde bekletilen kesitlerdeki lenfositlerde kırmızı-kahverengi granüllerin ortaya çıkmasının ardından %1'lik methylgreen ile çekirdek boyası uygulandı [15].

Hücre Sayımları

Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit sayılarak enzim pozitif lenfosit oranları belirlendi. Tüm preparatlar DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile incelendikten sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Kriyostatta 36 µm aralıklarla alınan 3 seri uterus kesitinin desidua bazalis'e karşılık gelen 10 farklı bölgesinden toplam 0.1 mm²'lik alanda, ANAE demonstrasyonu yapılan preparatlarda T-lenfosit ve null lenfositler sayılırken; ACP-az demonstrasyonu yapılanlarda ACP-az pozitif lenfositler sayıldı.

İstatistik Analizler

Doku kesitlerinden elde edilen sayısal veriler SPSS 10 [16] programı yardımıyla One-Way Anova testi ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden DUNCAN testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.

Perifer kan enzim pozitivite oranları ile lenfosit oranları ise Açı (Arc Sinus) dönüşüm metodu kullanılarak analiz edildi. Bu metoda göre transforme edilen parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırmalarında SPSS 10 istatistik programı yardımıyla DUNCAN testi kullanıldı. Verilerin tablolaştırılmasında dönüşüm öncesi gerçek değerler kullanıldı.

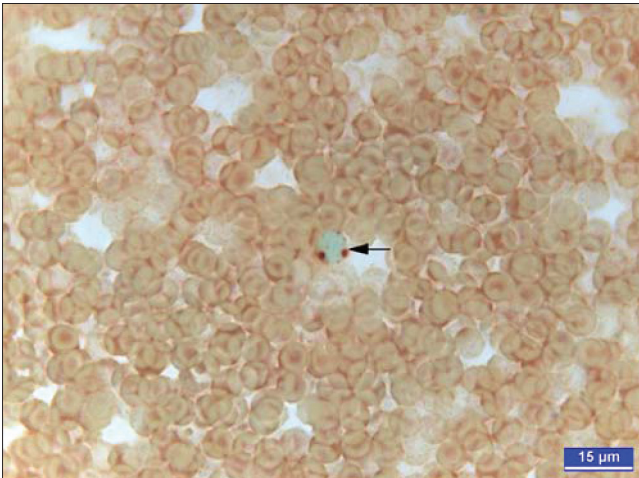
BULGULAR

Enzim Histokimyasal Değerlendirmeler

Gerek frotiler ve gerekse kriyostat kesitleri üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemeler sonucunda, lenfositlerde 2 farklı ANAE enzimi aktivitesi gözlemlendi. Sayıları 1-4 arasında değişen kahverengi granüller içeren lenfositler T-lenfosit olarak değerlendirilirken (Şekil 1 ve Şekil 4); sayıları 5-8 arasında değişen kahverengi granüller içeren lenfositler "null lenfosit" olarak değerlendirildi (Şekil 2 ve Şekil 5). ACP-az enzimi aktivitesinin ise 1-3 adet pembe-kırmızı granül şeklinde olduğu dikkati çekti (Şekil 3 ve Şekil 6).

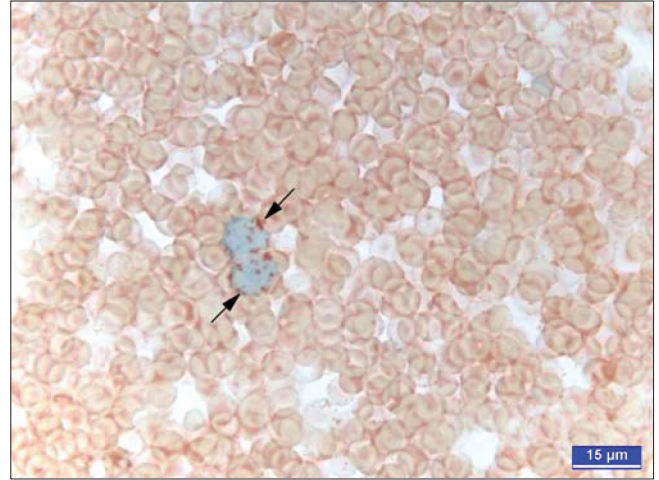
Enzim Histokimyasal Bulgular

Perifer Kan: Perifer kanda yapılan enzim histokimyasal boyamalar sonucunda kontrol grubunda %64.67 olan T-lenfosit oranının gebeliğin 1. haftası içerisinde belirgin bir biçimde düşerek %43.83'e gerilediği; kontrol grubunda %5.66 olan null lenfosit oranının ise yine erken dönemde en yüksek seviyesine ulaşarak %11.5'e çıktığı tespit edildi. Kontrol grubunda %67.5 olan lenfosit oranının ise gebeliğin ilk haftasında %56'ya düştüğü dikkati çekti. Buna karşın ACP-az pozitif lenfosit oranının ise gebeliğin ilk haftası içinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da %36.83'ten %34.66'ya düştüğü, gebeliğin ikinci haftası içinde ise belirgin bir biçimde yükseldiği (%44.33), ancak doğuma yakın dönemde tekrar başlangıç değerlerine (%35.5) gerilediği belirlendi (Tablo 1).



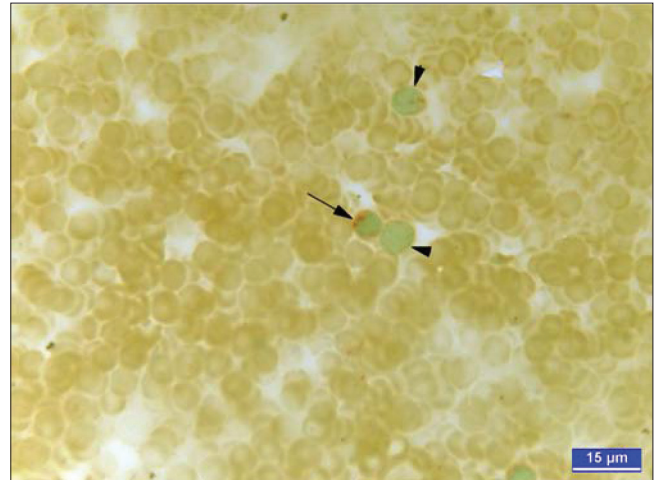
Şekil 1. Kontrol grubundan bir fareye ait perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: T-lenfosit, Büyütme çizgisi: 15 µm

Fig 1. A peripheral blood T lymphocyte in animal from control group. ANAE demonstration. Arrow: T lymphocyte, Bar: 15 µm



Şekil 2. Gebeliğin erken dönemindeki bir fareye ait perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Oklar: Null lenfositler, Büyütme çizgisi: 15 µm

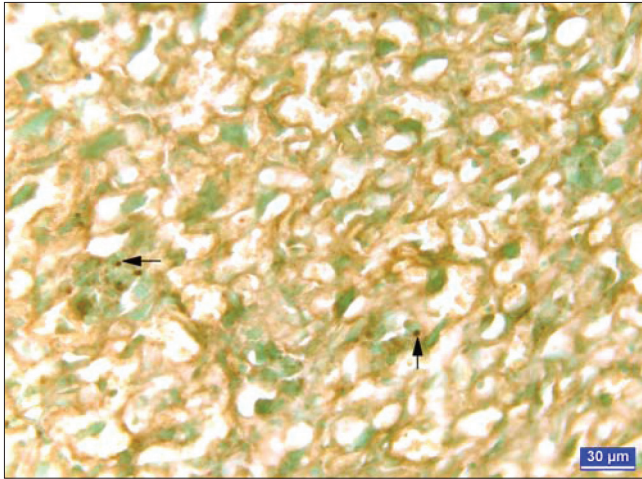
Fig 2. A peripheral blood null lymphocyte in animal at the early pregnancy period. ANAE demonstration. Arrows: Null lymphocytes, Bar: 15 µm



Şekil 3. Kontrol grubundan bir farenin perifer kan frotisinde ACP-az enzimi demonstrasyonu. Ok: ACP-az-pozitif lenfosit, Ok başları: ACP-az negatif lenfositler, Büyütme çizgisi: 15 µm

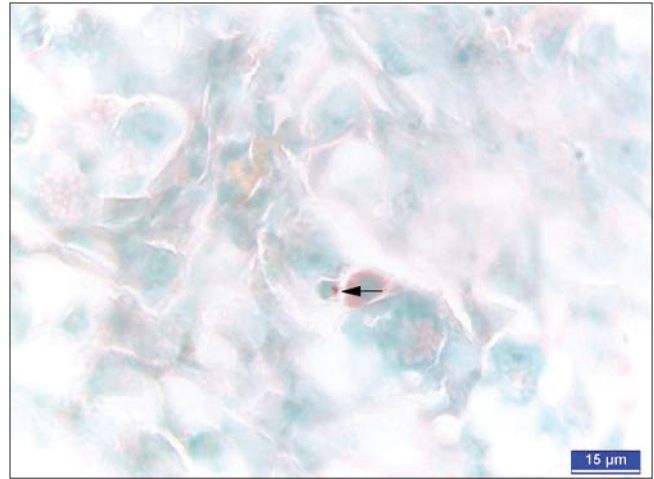
Fig 3. An ACP-ase-positive peripheral blood lymphocyte in animal from control group. ACP-ase demonstration. Arrow: ACP-ase-positive lymphocyte, Arrow heads: ACP-ase-negative lymphocytes, Bar: 15 µm

Endometriyum: Endometriyum'un desidua bazalis'e karşılık gelen bölgesinden yapılan hücre sayımları sonucunda kontrol grubunda yer alan hayvanların birim alanındaki T-lenfosit sayıları 17.67 adet/0.1 mm² olarak tespit edildi. Gebelikle birlikte düşüşe geçen ve tüm gebelik süresince düşük seyreden bu sayının gebeliğin orta dönemindeki hayvanlarda 10.83 adet/0.1 mm² ile en düşük değerine gerilediği dikkati çekti. ACP-az pozitif lenfositlerin sayıları da benzer biçimde tüm gebelik boyunca kontrol grubundan düşük değerlerde seyrederken en düşük değerine 5.5 adet/0.1 mm² ile gebeliğin erken döneminde ulaştığı tespit edildi. Buna karşın kontrol grubunda 3.83 adet/0.1 mm² olan null lenfosit sayısının gebeliğin erken döneminde belirgin bir biçimde artarak 7.83 adet/0.1



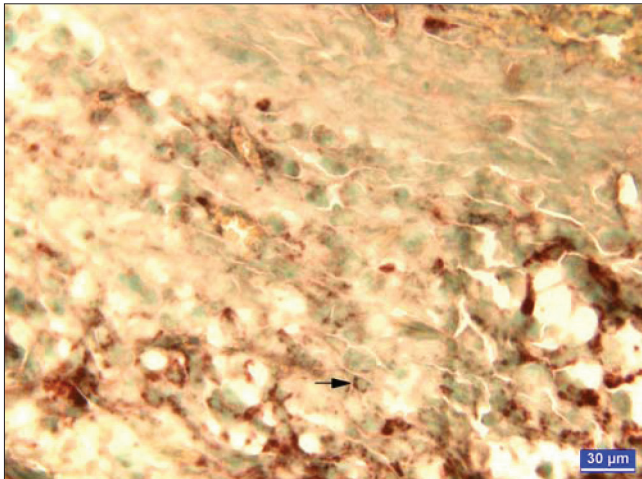
Şekil 4. Gebeliğin orta dönemindeki bir farenin endometriyumundan alınan kriyostat kesiti. ANAE demonstrasyonu. Oklar: T-lenfositler, Büyütme çizgisi: 30 µm

Fig 4. A cryostat section from endometrium of animal at middle gestational period. ANAE demonstration. Arrows: T lymphocytes, Bar: 30 µm



Şekil 6. Gebeliğin geç dönemindeki bir farenin endometriyumundan alınan kriyostat kesiti. ACP-az demonstrasyonu. Ok: ACP-az pozitif lenfosit, Büyütme çizgisi: 15 µm

Fig 6. A cryostat section from endometrium of animal at late gestational period. ACP-ase demonstration. Arrow: ACP-ase positive lymphocyte, Bar: 15 µm



Şekil 5. Gebeliğin erken dönemindeki bir farenin endometriyumundan alınan kriyostat kesiti. ANAE demonstrasyonu. Ok: Null lenfosit, Büyütme çizgisi: 30 µm

Fig 5. A cryostat section from endometrium of animal at early gestational period. ANAE demonstration. Arrow: Null lymphocyte, Bar: 30 µm

TARTIŞMA ve SONUÇ

Gebeliğin perifer kan hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar çoğunlukla lenfositler üzerinde yoğunlaşmıştır. Agricola ve ark.'nın ^[17] kısırlarda yaptıkları bir çalışmada gebelik süresince perifer kan toplam lökosit sayılarının yanı sıra, toplam T-lenfosit, yardımcı T-lenfosit ve sitotoksik T-lenfosit sayılarında düşüşlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Pisek ve ark.'nın ^[18] koyunlarda yapmış oldukları bir çalışmada ise 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 ^[14] gebe sığırlarda yaptıkları çalışmada da perifer kan lenfosit oranının I. trimesterde belirgin bir biçimde düştüğü ortaya konulmuştur. Bu çalışmada da perifer kan lenfosit oranlarının sadece gebeliğin erken dönemlerinde belirgin bir biçimde düştüğü, ancak ilerleyen günlerde yükselişe geçerek kontrol grubu farelere yakın değerlere ulaştığı görülmüştür (Tablo 1).

mm²'ye ulaştığı, ancak devam eden süreçte kontrol grubuna yakın değerlere gerilediği dikkati çekti (Tablo 2).

Alfa naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi, içerisinde insan ve farelerin de yer aldığı pek çok türde T-lenfositleri için

Tablo 1. Gebeliğin farklı dönemlerinde perifer kan lenfosit, T lenfosit, null lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit oranları

Table 1. Proportion of peripheral blood lymphocyte, T lymphocyte, null lymphocyte, and ACP-ase positive lymphocyte in different gestational stages

Gruplar (n=6)	Lenfosit (%) ± SE	T-lenfosit (%) ± SE	Null Lenfosit (%) ± SE	ACP-az + Lenfosit (%) ± SE
Kontrol (Gebe olmayan fareler)	67.50±1.258 ^a	64.67±1.308 ^a	5.66±0.421 ^a	36.83±2.821 ^a
Grup 2 (Erken dönem)	56.00±1.064 ^b	43.83±2.167 ^b	11.50±0.670 ^c	34.66±1.584 ^a
Grup 3 (Orta dönem)	65.00±3.00 ^a	44.17±1.167 ^b	8.83±1.424 ^b	44.33±1.406 ^b
Grup 4 (Geç dönem)	67.16±1.922 ^a	61.33±1.406 ^a	10.66±0.666 ^{bc}	35.50±1.910 ^a
P	*	**	**	*

a-c: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir. * P<0.05, ** P<0.001

Tablo 2. Gebeliğin farklı dönemlerinde desidua bazalis dokusunda T lenfosit, null lenfosit ve ACP-az pozitif lenfositlerin dağılımı (adet/0.1 mm²)
Table 2. Distribution of T lymphocyte, null lymphocyte, and ACP-ase positive lymphocyte in decidua basalis of different gestational stages (number/0.1 mm²)

Gruplar (n=6)	T-lenfosit ± SE	Null ± SE	ACP-az ± SE
Kontrol (Gebe olmayan fareler)	17.67±0.715 ^a	3.83±0.5426 ^a	14.83±0.477 ^a
Grup 2 (Erken dönem)	13.67±1.145 ^b	7.83±1.166 ^b	5.50±0.763 ^c
Grup 3 (Orta dönem)	10.83±1.515 ^b	3.33±0.714 ^a	7.66±0.760 ^b
Grup 4 (Geç dönem)	12.67±1.085 ^b	3.83±0.307 ^a	7.66±0.666 ^b
P	*	**	**

a-c: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir. * P<0.05, ** P<0.001

spesifiktir [8-12]. Gerek perifer kan ve gerekse dokulardaki lenfositlerde iki farklı ANAE enzimi pozitivitesi söz konusudur. Sayıları 1-4 arasında değişen granüllerin oluşturduğu boyanma şeklinin T-lenfositleri için spesifik olduğu bildirilmektedir [8]. Akbulut'un [19] insanlarda yapmış olduğu çalışmada ANAE histokimyası ile T-lenfosit olarak değerlendirilen hücrelerin perifer kandaki oranı hamile olmayan sağlıklı bayanlarda %70 olarak bulunurken; hamilelikle birlikte bu oranın %58-60'lara kadar düştüğü görülmüştür. Sur ve ark.'nın [14] sığırlarda yaptıkları bir çalışmada da ANAE histokimyası ile demonstre edilen perifer kan T-lenfositlerinde gruplararası istatistiksel farklar olmasa da en düşük oranın ilk trimesterdeki hayvanlarda gözleendiği bildirilmektedir. Sur ve ark.'nın [20] koyunlarda yaptıkları bir başka çalışmada ise ANAE pozitif lenfosit oranı diğer gruplara nazaran gebeliğin ilk ayında %63.5'lik oranla en düşük seviyede gözlenmiştir. Bu çalışmada da kontrol grubunu oluşturan farelerin ANAE histokimyası ile demonstre edilen perifer kan T-lenfosit oranları %64 olarak bulunurken, gebeliğin ilk günlerinde bu rakamın %43'e kadar gerilediği dikkati çekmiştir (Tablo 1).

ANAE histokimyası ile lenfositlerde tespit edilen bir diğer boyanma şekli ise çok sayıda dağınık yerleşimli granüllerin oluşturduğu ve "null" lenfositleri için özel olduğu ileri sürülen boyanma şeklidir [8]. Null lenfositlerinin, matur T- ve B-lenfositlerine ait reseptörler taşımayan ancak doğal katil (natural killer cell-NK) hücrelerinin öncüllerinin yanı sıra farklı gelişim aşamalarındaki T- ve B-lenfosit serilerine ait hücreleri de içeren bir lenfosit alt tipi olduğu bildirilmektedir [21,22]. Akbulut'un [19] insanlarda yapmış olduğu çalışmada null lenfosit olarak değerlendirilen hücrelerin oranı kontrol grubunda %2 olarak bulunurken, gebeliğin I. trimesterindeki bayanlarda bu hücrelerin oranının önemli derecede artarak %11'e yükseldiği bildirilmiştir. Sur ve ark.'nın [14] sığırlarda yaptıkları bir çalışmada da en yüksek perifer kan null lenfosit oranının %8.1'lik ortalama ile yine gebeliğinin ilk trimesterindeki hayvanlarda tespit edildiği bildirilmiştir. Sur ve ark.'nın [20] koyunlarda yaptıkları bir başka çalışmada ise en yüksek null lenfosit oranı %12.75'lik ortalama ile yine gebeliğinin ilk ayındaki koyunlarda tespit edilmiştir. Bu çalışmada da null lenfosit olarak değerlendirilen perifer kan lenfositlerinin oranı kontrol grubunda %5.66 iken, gebeliğin ilk günlerinde bu oranın %11.5'e kadar yükseldiği ve gebelik süresince de

kontrol grubundan yüksek seyrettiği tespit edilmiştir (Tablo 1). Gebelikte NK hücrelerinin perifer kandaki oranlarında gözlenen değişimlerin klinik açıdan önemli olduğu bildirilmektedir. Andalip ve ark.'nın [23] sağlıklı bir gebelik süreci geçiren kadınlar ile tekrarlayan spontan düşük (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 bilgiler dikkate alındığında, çalışmada elde edilen bulguların ileride yapılacak olan klinik çalışmalar için de önemli olduğu düşünülmektedir.

Lenfosit histokimyasında kullanılan bir diğer enzim de asit fosfataz (ACP-az) enzimidir. Sur ve ark.'nın [14] sığırlarda yaptıkları çalışmada gebeliğin ilk ve son dönemlerinde ACP-az pozitif lenfosit oranlarında belirgin düşüşlerin varlığı dikkati çekmiştir. Yine Sur ve ark.'nın [20] koyunlarda yapmış oldukları bir başka çalışmada en düşük ACP-az pozitif lenfosit oranının gebeliğin son dönemindeki hayvanlarda tespit edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise ACP-az histokimyası ile elde edilen sonuçlar çiftlik hayvanlarından elde edilen sonuçlardan oldukça farklı bulunmuştur. Zira gebelik süresince ACP-az pozitif lenfosit oranlarında anlamlı bir düşüş tespit edilmemiş; aksine gebeliğin orta dönemindeki farelerde bu oranın belirgin bir biçimde yükseldiği görülmüştür (Tablo 1). Bu durumun türler arası farktan ileri gelebileceği düşünülmektedir.

Gebeliğin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma, histolojik açıdan en belirgin değişimlerin uterus mukozasında olduğunu göstermiştir. Diğer sistemlere ait mukozalarda olduğu gibi uterus mukozası da normalde T- ve B-lenfositlerinin yanı sıra makrofajlar, dendritik hücreler ve NK hücrelerini içerir [24,25]. Bununla birlikte hormonal değişimlerin etkisi altında olan uterus dokusu, gerek seksüel siklus, gerekse gebelikle birlikte hücresel anlamda yeniden düzenlenir [26]. Karaca ve ark.'nın [27] keçilerde yapmış oldukları bir çalışmada ANAE-pozitif lenfositlerin preimplantasyon dönemindeki hayvanların uterus dokusundaki sayısal dağılımlarının gebe olmayan hayvanlara göre daha az olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmada da desidua bazalis'e karşılık gelen endometriyum bölümünden alınan kriyostat kesitlerinde birim alandaki T-lenfosit ve ACP-az pozitif lenfosit sayıları dikkate alındığında belirgin değişimler göze çarpmaktadır.

Özellikle T-lenfosit sayılarında gebelikte birlikte başlayan ve tüm gebelik boyunca devam eden düşüşler oldukça belirgin (Tablo 2); benzer şekilde ACP-az pozitif lenfosit sayılarında da özellikle gebeliğin ilk haftasında gözlenen düşüşler, uterus endometriyumunda gebelikte birlikte meydana gelen hücresel değişimler açısından değerlendirildiğinde oldukça dikkat çekicidir (Tablo 2).

Bu çalışmada farelerden elde edilen bulgular, insan [3,5,19,23], kısırak [17], keçi [6,27], sığır [14], koyun [18,20] ve farelerde [4] daha önce yapılan benzer çalışmalardan elde edilen bulgularla uyumlu bulunmuştur. Özellikle gebeliğin ilk dönemlerinde perifer kan lenfosit oranlarında tespit edilen ve hem perifer kan T-lenfosit oranında hem de desidua bazalis bölgesinin birim alanındaki T-lenfosit sayılarında meydana gelen paralel düşüşler en dikkat çekici bulgular olarak karşımıza çıkmaktadır. Seksüel siklusun diöstrus evresinde korpus luteumdan salgılanan ve eğer gebelik şekillenmişse bu süre içerisinde de salgılanmaya devam eden progesteron hormonunun lenfositlerin çoğalmasında baskıladığı bilinmektedir. Gerek luteal fazda ve gerekse gebelik süresince lenfositlerdeki progesteron reseptörlerinin arttığı yönündeki bilgiler dikkate alındığında söz konusu düşüşlerin altında yatan mekanizma bir ölçüde açıklanabilir [28]. Buna karşın yine erken dönemde gözlenen null lenfosit oran ve sayılarındaki artışlar da (Tablo 1 ve Tablo 2), annenin bağışıklık sisteminin bir tepkisi olarak değerlendirilebilir. İmplantasyon, bağışıklık sistemine ait hücrelerce belli bazı sitokinlerin salgınmasıyla karakterize yangısal bir süreçtir [29]. Başlangıçta anneye ait bağışıklık sisteminin babaya ait antijenler de içeren plasenta dokusuna karşı tepkisel bir reaksiyonu gibi algılanabilecek olan bu durum, gerek progesteron hormonunun ve gerekse plasentaya ait hücrelerin salgılamış oldukları bir takım mediyatörler aracılığıyla önce bölgesel sonra da sistemik bir immün tolerans olarak karşımıza çıkmaktadır. Maternal tolerans olarak da bilinen bu durumun bir sonucu olarak, normal bir gebelikte annenin bağışıklık sisteminin embriyoya saldırmaması için hem perifer kan ve hem de endometriyumda bağışıklık sistemi hücrelerinin sayısı, dağılım ve fonksiyonel aktivitelerinde bir takım değişimler söz konusudur [1,30]. Koç ve Kanter'in [31] gebe siçanlarda yaptıkları bir çalışmada ANAE pozitivitesi ile demonstre edilen uterus NK hücrelerinin endometriyum dokusunda implantasyonun ikinci gününden itibaren arttığı ve 6. günde en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmektedir. Bazı araştırmacıların, null hücreler ile NK hücrelerinin birlikte değerlendirilebileceğini ileri süren çalışmaları da dikkate alındığında [32] bu çalışmada gebeliğin erken dönemlerinde tespit edilen perifer kan ve desidua bazalis dokusundaki null hücre sayısındaki artışlar, embriyonun maternal kabulü sürecinde meydana gelen en dikkat çekici hücresel değişim olarak ileri sürülebilir. Özellikle desidua bazalis dokusundaki null hücre sayısında gebeliğin ilerleyen günlerinde gözlenen düşüşler de embriyonun maternal kabulünün hücresel bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (Tablo 2).

İmplantasyon ile başlayan ve embriyonun kabulü ile devam eden süreçte annenin immün sisteminin, bir yandan hastalık yapıcı patojen etkenlere karşı işlevsel kalabilmesi bir yandan da gelişmekte olan embriyoya karşı tolerans geliştirmesi ileri derecede hassas bir dengeyi sonucudur. Bu dengeyi kurulumu ve söz konusu mekanizmaların kusursuz işlemesi sağlıklı bir gebelik süreci için mutlaka gereklidir. Ayrıca bu mekanizmaların iyi anlaşılmasının infertilite ve tekrarlayıcı düşük vakalarının tedavisine ışık tutacağı gibi ilerleyen dönemlerde doku nakillerinde yaşanan sorunların çözümüne de katkı sağlayacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Ostensen M, Sicher P, Förger F, Villiger PM:** Activation markers of periferal blood mononuclear cells in late pregnancy and after delivery: A pilot study. *Ann Rheum Dis*, 64, 318-320, 2005.
- Moffet A, Loke C:** Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Rev*, 6, 584-594, 2006.
- 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.
- Medina KL, Smithson G, Kincade PW:** Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J Exp Med*, 178, 1507-1515, 1993.
- Nakamura N, Miyazaki K, Kitano Y, Fujisaki S, Okamura H:** Suppression of cytotoxic-T-lymphocyte activity during human pregnancy. *J Reprod Immunol*, 23 (2): 119-130, 1993.
- 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.
- Knowles DM, Hoffman HT, Ferrarini M, Kunkel HG:** The demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. *Cell Immunol*, 35, 112-123, 1978.
- Çelik İ, Aştı RN, Ergene N:** İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünooglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *SÜ Tıp Fak Derg*, 7 (4): 497-503, 1991.
- 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.
- Maiti NK, Saini SS, Sharma SN:** Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet Res Commun*, 14, 207-210, 1990.
- Wulff JC, Sale GE, Deeg HJ, Storb R:** Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. *Exp Hematol*, 9 (8): 85-870, 1981.
- 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.
- Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanasco L:** Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol*, 44, 577-582, 1980.
- Sur E, Aydın İ, Öznurlu Y, Telatar T, Çelik İ:** Sağlıklı gebe sığırların perifer kan lenfositlerinde alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfatase aktivitelerinin belirlenmesi. *Vet Bil Derg*, 24 (2): 5-12, 2008.
- Dönmez HH, Eken E, Beşoluk K, Sur E:** The histological characteristics and localisation of ACP and ANAE positive lymphocytes in the oesophageal tonsil of the duck (*Anas platyrhynchos*). *Avian Biol Res*, 5 (1): 11-15, 2012.
- SPSS.** SPSS 10.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL. 1999.
- 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 mares. *Reprod Domest Anim*, 43 (2): 212-217, 2008.

18. Pisek L, Travnicek J, Salat J, Kroupova V, Soch M: Changes in white blood cells in sheep blood during selenium supplementation. *Veterinari Medicina*, 53 (5): 255-259, 2008.

19. 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.

20. Sur E, Aydın İ, Öznurlu Y, Özaydın T, Çelik İ, Kadiralieva N: Merinos ırkı sağlıklı gebe koyunların perifer kan lenfositlerinde alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (3): 483-488, 2013, DOI: 10.9775/kvfd.2012.8067

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. 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.

24. Kusakabe K, Okada T, Sasaki F, Kiso Y: Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. *J Vet Med Sci*, 61 (10): 1093-1010, 1999.

25. Herington JL, Bany BM: Effect of the conceptus on uterine natural killer cell numbers and function in the mouse uterus during decidualization. *Biol Reprod*, 76, 579-588, 2007.

26. Karaca T, Yörük M, Uslu S, Uslu BA, Çetin Y: Preimplantasyon sürecindeki keçilerin dişi genital kanal organlarında plazma hücresi ve alfa naftil asetat esteraz pozitif lenfositlerin dağılımı. *YYU Vet Fak Derg*, 20 (2): 1-5, 2009.

27. Karaca T, Arıkan Ş, Kalender H, Yörük M: Distribution and quantitative patterns of T lymphocytes in the female reproductive tract and ovary throughout the oestrus cycle of Angora goats. *Medycyna Wet*, 63 (11): 1320-1323, 2007.

28. Cuello F, Martinez R, Grosso C, Vivas A: Peripheral lymphocytes response to progesterone during early pregnancy in pig. *REDVET*, 7 (11): 1-7, 2006.

29. Hunt JS: Stranger in a strange land. *Immunol Rev*, 213, 36-47, 2006.

30. 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.

31. Koç A, Kanter M: Sıçanlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücresel ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar. I. Hücresel savunma sistemi hücreleri. *YYÜ Sađ Bil Derg*, 6 (1-2): 122-130, 2000.

32. 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.