

## ETANOLÜN UYGULANMA DOZU VE SÜRESİNE BAĞLI OLARAK ALKOLİK GEBELERDE İMMÜN SİSTEM DEĞİŞİMLERİ \*

Sibel AKYOL, Halil TUNALI

**Background and Design.**- Maternal immunosuppression and immunotolerance are required during a successful pregnancy. Differential regulation of the immune system by the maternal immune system enables this interaction during pregnancy. Effect of teratogenic substances used during fetal development on the maternal immune status is not fully understood. Our purpose was to study the role of alcohol on the maternal immune system following a variety of doses and administration routes.

Wistar albino rats (10-12 weeks of age) were used in this study. Six experimental groups (n=10 each) consisted of controls (C), control pregnant (CG); those who received 17.5% ethanol by diet (E), and their pregnant counterparts (EG), and the 30% gavage ethanol group (GE) and pregnant rats treated similarly (GEG). Group administered ethanol by diet was treated for 4 months (8.75 g/kg/day); and gavage was treated for 2 months (6 g/kg/day). Subsequently these rats were impregnated, and ethanol treatments were continued. Lymphocytes were analyzed by flow cytometry for CD3, CD4, CD8 and CD19. IL-1 and IL-2 levels were determined by ELISA.

**Results.**- Ethanol treated group demonstrated significant increase in CD4, CD3 and IL-1 compared to the control group. Same group demonstrated decrease in CD8, CD19 and IL-2. In the gavage group there was no change in CD4, CD3, CD19 and IL-1, however IL-2 and CD8 were decreased compared to controls. In the pregnant groups there was decrease in CD4, CD8, CD19 and IL-2 in the EG group compared to control pregnant rats, and CD3 and IL-1 were increased. Comparison of the GEG to CG showed that there was no change in CD4 and CD3, decrease in CD8, CD19 and IL-2, and increase in IL-1.

When experimental groups were compared to controls, there was decrease in CD4 (18%), CD3 (19%), IL-2 (24%) in the control pregnant group compared to controls. There was no change in CD8 and CD19, however IL-1 (28%) was increased. When ethanol treated pregnant group was compared to ethanol group, significant increases in CD4 (%46), CD8 (%20), CD3 (%22), CD19 (%31) and IL-1 (%34) were seen. In the pregnant gavage group decrease in CD4 (%24), CD8 (%13), CD3 (%24), CD19 (%23), and IL-2 (%15), and %29 increase in IL-1 was demonstrated compared to non-pregnant gavage group. Most significant changes were observed in the long-term ethanol treated group.

**Conclusion.**- Our results demonstrate that ethanol administration resulted in variable amount of immunosuppression in pregnant rats depending on the duration and method of administration.

Akyol S, Tunali H. Effect of dose and duration of ethanol administration on the immune system in pregnancy. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 181-188.

**G**ebeliğe bağlı immün profil değişimleri geniş bir spektrum içinde incelenmektedir. Gebelikte fetusun bir transplanta olarak algılanmasını engellemek için özel tolerans sistemleri gelişir. Anne ile fetus arasındaki fetoplazental ünite, immüntolerans bölgesi olarak gelişir ve immün regülasyonun sağlanmasında rol oynar.<sup>1,2</sup> Gebeliğin devamı ve sağlıklı olabilmesi açısından immün supresyonun gerekliliği üzerinde durulmaktadır.<sup>3-5</sup> Gebelik döneminde dışarıdan alınan teratojenik etkili maddelerin immün sistemi nasıl etkilediği cevaplanmamış bir sorudur.

Gebelikte fetusun gelişimi sırasında teratojenik faktörlerin oluşturacağı malformasyonların doza ve süreye bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. Teratojenik etkilerinden dolayı etanolün gebelerde fetusa, fetal/plazental markerlar üzerinden etkili olduğu saptanmıştır.<sup>7-9</sup> Alkolik gebelerde uzun süreli alkol alımı sonucu fetus ve yeni doğanlarda büyüme geriliği, başta karaciğer ve beyin dokusu olmak üzere doku lezyonlarına veya doku fonksiyonlarının bozulmasına yol açabileceği ve immün cevapları olumsuz etkileyebileceği gösterilmiştir.<sup>10,11</sup> Fetal Alkol Sendromu (FAS) adı verilen bu bulguların elde edilmesinden dolayı alkol gebeler

\***Anahtar Kelimeler:** Etanol, gebelik, immün sistem, interlökin; **Key Words:** Ethanol, pregnancy, immune system, interleukin; **Alındığı Tarih:** 22 Kasım 2004; **Arş. Gör. Dr. Sibel Akyol, Prof. Dr. Halil Tunali:** İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul; **Yazışma Adresi (Address):** Arş. Gör. Dr. Sibel Akyol, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Fizyoloji Anabilim Dalı, 34098, Cerrahpaşa, İstanbul.

<http://www.ccf.istanbul.edu.tr/dergi/online/2005v36/s4/054a1.pdf>

için teratojen bir madde olarak tanımlanmıştır. Birçok deneysel hayvan modelleri alkolik gebelerin soylarında FAS oluşumu ve intrauterin büyüme üzerinde odaklanmıştır.<sup>12-14</sup> Buna rağmen, alkolün dozuna ve alım süresine bağlı olarak alkolik gebelerde hücrel ve humoral immun sistem üzerindeki etkisini inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Gebelik döneminde alınan etanolün T ve B lenfosit cevabını engellediği, IL-2 ve TNF sitokin üretimini baskıladığı<sup>1,14</sup>, kronik alkol alışkanlığının T ve NK hücrelerinin azalmasına bağlı olarak lenfopeniye, hücrel bağışıklığın zayıflamasına ve RES'in fagositik yeteneğinin belirgin biçimde azalmasına neden olduğu belirtilmiştir.<sup>15,16</sup>

Maternal alkol kullanımının yeni doğanda B ve T lenfositlerinin cevaplarında azalma meydana getirdiği alkole bağlı immun supresyon sonucu, CD4 sayısında ve NK hücre aktivasyonunda baskılanma olduğu gösterilmiştir.<sup>17,18</sup> Araştırmamız, sağlıklı ve gebe gruplarında farklı sürelerde ve dozlarda alınan alkolün annede immün sisteme etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

## YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışmamızda ortalama ağırlıkları 180-220 gr. olan 10-12 haftalık a/a Wistar albino soyu dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar;

- 1) Kontrol grubu (C) (n=10)
- 2) %17.5 diyet etanol uygulanan grup (E) (n=10)
- 3) %30 gavaj etanol uygulanan grup (GE) (n=10)
- 4) Kontrol gebe grubu (CG) (n=10)
- 5) %17.5 diyet etanol uygulanan gebe grup (CG) (n=10)
- 6) %30 diyet etanol uygulanan gebe grup (GEG) (n=10)

olmak üzere 6 grup (n=60) oluşturuldu. Sıçanlar 21±2°C'deki odalarda hepsi aynı ışık periyotlarında bırakıldı. Sıçanlar pellet yemle adlibidum olarak beslendiler. Diyet etanol uygulanan gruba 4 ay boyunca günde 8.75 g./kg % 17.5 etanol, gavaj yöntemi uygulanacak gruba

ise 2 ay boyunca günde 6 g/kg. gelecek şekilde %30 etanol uygulandı.<sup>19,20</sup> Bu uygulamanın ardından gebe bırakıldılar. Gebe bırakılacak sıçanların menstrual sikluslarının düzenli olup olmadığı vajinal smear tekniğiyle tayin edildi. Bu uygulamanın ardından gebe bırakıldılar. Gebelik süresince etanol uygulamasına devam edildi. Gebe olmayan gruplarda da etanol uygulaması, gebe gruplarına paralel devam ettirildi. Gebeliğin 17. günü sıçanların kuyruklarından venöz kan örnekleri alındı. Bu alınan kan örneklerinde;

**1. CD4, CD8, CD19 Analizi:** Flow sitometrik yöntemle yapıldı. Lenfositlerin monoklonal antikorlar ile işaretlenmesi esasına dayalı ve tam kanın inkübasyonundan sonra mevcut eritrosit lizisine dayanan bu yöntemle, floresan işaretli spesifik lenfosit alt grupları COULTER-EPICS-Profile II Flow sitometri cihazında analiz edildi.

**2. IL-1, IL-2 Düzeyi:** Elisa yöntemiyle tayin edildi.

Çalışma başlangıcında ağırlıkları 180-220 gr. olan Wistar albino soyu dişi sıçanlarda, etanol uygulanan gruplarda (diyet+gavaj) kan alınmadan önce yapılan tartımlarda %5-7 (170-205 gr.) arasında ağırlık kaybı görüldü. Bu değer normal sınırlar içindeydi (±10-15). Gebe gruplarının ağırlık ortalamaları başlangıçtakine paraleldi.

## BULGULAR

Araştırmamızda sağlıklı kontrol grubu (C) ile %17.5 etanol diyet uygulanan (E) dişi sıçanların immün parametreleri karşılaştırıldı. Diyet etanol uygulanan gruplarda kontrole göre CD4 ve CD3-T lenfositlerinde anlamlı artış ( $p<0.01^{xx}$ ), CD8 ve CD19 lenfositlerinde çok anlamlı azalma ( $p<0.001^{xxx}$ ) gözlemlendi (Tablo I). IL-1 düzeyinde çok anlamlı ( $P<0.01^{xx}$ ) artış, IL-2 düzeyinde anlamlı ( $P<0.01^{xx}$ ) azalma bulunmuştur (Tablo II).

Sağlıklı kontrol grubu (C) ile %30 gavaj etanol uygulanan (GE) dişi sıçanlarda; CD4, CD3-T lenfositlerinde, CD19-B lenfositlerinde ve IL-1 düzeyinde değişim gözlenmezken, CD8-T lenfositlerinde ve IL-2 düzeyinde çok

anlamli ( $P<0.001^{xxx}$ ) azalma saptanmıştır (Tablo I, II).

Kontrol gebe grubu (CG) ile %17.5 etanol diyet uygulanan gebe grup (EG) karşılaştırıldığında CD4-T lenfositlerinde az anlamli ( $p<0.05^x$ ), CD8-T lenfositlerinde anlamli ( $p<0.01^{xx}$ ) ve CD19 lenfositlerinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ), IL-2 düzeyinde anlamli ( $p<0.01^{xx}$ ) azalma, CD3-T lenfositlerinde az anlamli ( $p<0.05^x$ ), IL-1 düzeyinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ) artış görülmüştür (Tablo III, IV).

Kontrol gebe grubu (CG) ile %30 gavaj etanol uygulanan gebe grubu (GEG) karşılaştırıldığında CD4, CD3-T lenfosit düzeylerinde değişim görülmezken, CD8-T lenfositlerinde ve CD19-B lenfositlerinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ) azalma bulunmuştur (Tablo 3). IL-1 düzeyinde az anlamli ( $p<0.05^x$ ) artış, IL-2 düzeyinde ise anlamli ( $p<0.01^{xx}$ ) azalma görülmüştür (Tablo IV).

Çalışma gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda; Kontrol grubu (C) ile kontrol gebe (CG) grubu arasında, kontrol grubuna (C) göre, CD4 (%18) ve CD3-T lenfositleri (%19) az anlamli ( $P<0.05^x$ ) azalma gösterirken, CD8-T lenfositlerinde (%8), CD19-B lenfositlerinde (%7) anlamli bir değişim gözlenmedi (Tablo: V, Grafik 1). IL-1 (%28) düzeyinde çok anlamli ( $P<0.001^{xxx}$ ) artışa karşılık, IL-2 (%24) düzeyinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ) azalma saptandı (Tablo VI, Grafik 1).

%17.5 diyet etanol uygulanan grup (E) ile %17.5 diyet etanol uygulanan gebe gruplar (EG) arasında, diyet etanol uygulanan gruba (E) göre, CD4 (%46), CD3 (%22)-T lenfositlerinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ), CD8 (%20)-T lenfositlerinde ve CD19-B lenfositlerinde (%31) ise anlamli ( $p<0.01^{xx}$ ) azalma bulunmuştur

(Tablo V, Grafik 1). IL-1 (%34) düzeyinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ) artışa karşılık, IL-2 (%26) düzeyinde ise çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ) azalma gözlenmiştir (Tablo VI, Grafik 1).

%30 gavaj etanol uygulanan grup (GE) ile %30 gavaj etanol uygulanan gebe gruplar (GEG) arasında, gavaj etanol uygulanan gruba (GE) göre, CD4(%24), CD3(%24)-T lenfositlerinde ve CD19-B lenfositlerinde (%23) anlamli ( $p<0.01^{xx}$ ) azalma görülürken, CD8-T lenfositlerinde (%13) anlamlilik saptanamadı (Tablo V, Grafik 1). IL-1 (%29) düzeyinde çok anlamli ( $p<0.001^{xxx}$ ) artış, IL-2 (%15) düzeyinde ise az anlamli ( $p<0.05^x$ ) azalma bulunmuştur (Tablo VI, Grafik 1).

## TARTIŞMA

Gebelik fetal gelişim sürecinde maternal immün sistemin fetusa karşı tolerans kazanımında temel mekanizma, maternal immün sistemin baskılanmasıdır. Gebelik sürecinde, maternal ve fetal antijen sunumu yanında anti-jenlere karşı annede geliştirilen immunolojik tanıma reaksiyonları önemlidir. Gebelikte başarı ya da başarısızlık maternal immünolojik reaksiyonların farklılığına bağlanmaktadır.<sup>2,7,21</sup> Araştırmamız gebelik sürecinde değişime uğrayan maternal immün sistemin, etanolün uygulanma dozu ve süresine bağlı olarak alkolik gebelerde nasıl değişime uğradığını açıklamaya çalışmaktadır. Alkol ile immün sistem arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, etanol kullanımını sonucu periferik kan, dalak ve timusta lenfoid hücrelerin azaldığı, özellikle T hücrelerine bağlı immün yanıtlarda supresyonun olduğu, IL-2 sitokin yolunun kullanılmadığı, gösterilmiştir.<sup>18,22, 23</sup>

**Tablo I.** Sağlıklı kontrol grubu, %17.5 diyet etanol ve %30 gavaj etanol uygulanan sıçanların CD4, CD8, CD3 ve CD19 immün parametrelerine ait istatistiksel değerleri (Kontrolle karşılaştırmalı) ( $p<0.05$ ,  $p<0.01^{xx}$ ,  $p<0.001^{xxx}$ ).

GRUPLAR	CD4 (%)	CD8 (%)	CD3 (%)	CD19 (%)
Kontrol (C) (n=10)	36.7±4.63	24.78±5.86	52.3±3.3	25.73±3.07
Diyet etanol (E) (n=10)	47.91±5.24 <sup>xx</sup> ↑	16.97±3.10 <sup>xxx</sup> ↓	63.68±7.1 <sup>xx</sup> ↑	19.86±1.5 <sup>xxx</sup> ↓
Gavaj etanol (GE) (n=10)	38.5±5.08	14.80±2.8 <sup>xxx</sup> ↓	52.9±7.7	23.83±1.6

**Tablo II.** Sağlıklı kontrol grubu, %17.5 diyet etanol ve %30 gavaj etanol uygulanan sıçanların IL-1 ve IL-2 sitokin değerleri ( $p<0.05^x$ ,  $p<0.01^{xx}$ ,  $p<0.001^{xxx}$ ).

GRUPLAR		IL-1 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Kontrol (C)	(n=10)	37.4±2.3	86.5±1.3
Diyet etanol (E)	(n=10)	43.5±1.7 <sup>xxx</sup> ↑	81.7±3.5 <sup>xx</sup> ↓
Gavaj etanol (GE)	(n=10)	39.6±3.1	71.0±2.4 <sup>xxx</sup> ↓

**Tablo III.** Kontrol gebe grubu, diyet etanol ve gavaj etanol uygulanan gebe sıçanların CD4, CD8, CD3 ve CD19 immün parametrelerine ait istatistiksel değerleri (Kontrolle karşılaştırmalı) ( $p<0.05^x$ ,  $p<0.01^{xx}$ ,  $p<0.001^{xxx}$ ).

GRUPLAR		CD4 (%)	CD8 (%)	CD3 (%)	CD19 (%)
Kontrol Gebe (CG)	(n=10)	30.18±2.78	22.84±4.03	42.62±5.4	23.98±1.7
Diyet etanol gebe (EG)	(n=10)	26.23±4.16 <sup>x</sup> ↓	13.68±3.11 <sup>xxx</sup> ↓	49.96±4.19 <sup>x</sup> ↓	13.85±2.6 <sup>xxx</sup> ↓
Gavaj etanol gebe (GEG)	(n=10)	29.42±3.2	12.88±2.7 <sup>xxx</sup> ↓	40.37±3.4	18.46±1.7 <sup>xx</sup> ↓

**Tablo IV.** Kontrol ve gebe grubu, diyet etanol ve gavaj etanol uygulanan gebe sıçanların IL-1, IL-2 sitokin değerleri (Kontrolle karşılaştırmalı)  $P<0.05$ ,  $P<0.01^{xx}$ ,  $P<0.001^{xxx}$ .

GRUPLAR		IL-1 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Kontrol Gebe (CG)	(n=10)	47.9±2.9	65.9±1.1
Diyet Etanol gebe (EG)	(n=10)	58.3±4.1 <sup>xxx</sup> ↑	60.5±3.4 <sup>xx</sup> ↓
Gavaj Etanol Gebe (GEG)	(n=10)	51.4±3.1 <sup>x</sup> ↑	60.9±2.1 <sup>xx</sup> ↓

**Tablo V.**

- a) Sağlıklı kontrol (C) grubu ve kontrol gebe (CG) grubu sıçanlarda;  
b) %17.5 diyet etanol (E) uygulanan grup ile %17.5 diyet etanol uygulanan gebe (EG) sıçanlarda;  
c) %30 gavaj etanol (GE) uygulanan grup ile %30 gavaj etanol uygulanan gebe (GEG) sıçanlarda;  
CD4, CD8, CD3 ve CD19 immün parametrelerine ait istatistiksel değerler

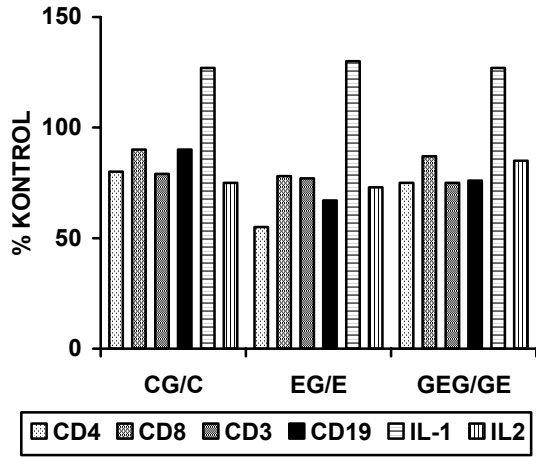
Gruplar		CD4 (%)	CD8 (%)	CD3 (%)	CD19 (%)
a	Kontrol (C)	(n=10) 36.70±4.63	24.78±5.86	52.30±3.30	25.73±3.07
	Kontrol Gebe (CG)	(n=10) 30.18±2.78* ↓	22.84±4.03	42.62±5.40* ↓	23.98±1.70
b	Diyet Etanol (E)	(n=10) 47.91±5.24	16.97±3.10	63.68±7.10	19.86±1.50
	Diyet Etanol Gebe (EG)	(n=10) 26.23±4.16*** ↓	13.68±3.11* ↓	49.96±4.19*** ↓	13.85±2.60** ↓
c	Gavaj Etanol (GE)	(n=10) 38.5±5.08	14.80±2.80	52.9±7.70	23.83±1.60
	Gavaj Etanol Gebe (GEG)	(n=10) 29.42±3.20** ↓	12.88±2.70	40.37±3.40** ↓	18.46±1.70** ↓

**Tablo VI.**

a) Sağlıklı kontrol (C) grubu ve kontrol gebe (CG) grubu sıçanlarda;  
 b) %17.5 diyet etanol (E) uygulanan grup ile %17.5 diyet etanol uygulanan gebe (EG) sıçanlarda;  
 c) %30 gavaj etanol (GE) uygulanan grup ile %30 gavaj etanol uygulanan gebe (GEG) sıçanlarda;  
 IL-1 ve IL-2 sitokinlerine ait istatistiksel değerler

Gruplar	CD4 (%)	CD8 (%)
a Kontrol (C) (n=10)	37.4±2.3 ↑	86.5±1.3 ↓
Kontrol Gebe (CG) (n=10)	47.9±2.9***	65.9±1.1***
b Diyet Etanol (E) (n=10)	43.5±1.7 ↑	81.7±3.5 ↓
Diyet Etanol Gebe (EG) (n=10)	58.3±4.1***	60.5±3.4***
c Gavaj Etanol (GE) (n=10)	39.6±3.1 ↑	71.0±2.4 ↓
Gavaj Etanol Gebe (GEG) (n=10)	51.4±3.1***	60.9±2.1***

**Grafik 1.** Kontrol gebe/kontrol (CG/C), diyet etanol gebe/diyet etanol (EG/E), gavaj etanol gebe/gavaj etanol (GEG/GE) gruplarının (%) değişim oranları



Araştırmamızda %17.5 diyet etanol uygulanan grupta, CD4 ve CD3-T lenfositlerindeki anlamlı artış, sitokinler içinde geniş bir ligand ve reseptör ailesi bulunan IL-1 artışına bağlanabilir. CD4 lenfositlerinin etanolün etkisi sonucu baskılanması beklenirken artmış olması, etanolün karaciğer üzerindeki etkisinin sitokin düzeyini dolaylı olarak etkilediğini düşündürmektedir. IL-1 sentezi, bakteriyel endotoksinler, mitojenler, virüsler, farklı antijenlerle uyarılır. Düşük dozlarda uzun süreli alınan etanol, IL-1 sentezini uyararak spesifik immün sistemin reseptör hücresi CD4'lerin uyarılmasını sağlamaktadır.<sup>24,25</sup> IL-1, IL-2, IL-4 ve IL-6 sitokinlerinin gerek otokrin, gerekse parakrin

kontrolle CD4 düzeyini yükselttiği vurgulanmaktadır.<sup>26</sup> CD4 lenfositleri, doğal immün sistemin ve sitotoksik hücrelerin gelişim ve aktivasyonunda anahtar rol oynayan hücrelerdir. Aktivasyon etkisi, özellikle IL-2 sitokininin sentez ve salgısıyla başlar. CD4 T lenfositlerinden salgılanan, spesifik immün sistemi aktive eden sistemle ilgili hücrelerin, farklılaşmasını ve çoğalmasını düzenleyen IL-2 düzeyi, diyet etanol uygulanan grupta azalmıştır. IL-2'nin sentez ve salgısı, hücrede IL-2r dengesine ve IL-1 sitokini ile uyarılmasına bağlı olarak regüle edilir. Aktive olan CD4 hücrelerinde büyüme faktörü olarak etkin rol oynayan IL-2 sitokininin reseptörü, CD19-B lenfosit yüzeyinde de bulunmaktadır. IL-1 sitokininin CD19-B hücreleri üzerinde proliferasyonu ve immünglobulin sentezini artırıcı etkisi, IL-2 sitokini ile dengeli bir ilişki oluşturmaktadır.<sup>24,27,28</sup> Bulgularımız bu bağlamda CD8 ve CD19 hücrelerinde supresyonun olduğunu göstermiştir. %30 gavajla etanol uygulanan grupta, CD4, CD3, CD19 ve IL-1 düzeyinde değişim bulunmazken, IL-2 sitokin düzeyindeki azalmaya paralel CD8-T lenfositlerinde supresyon görülmüştür. Yüksek dozda, kısa süreli uygulanan alkolün, immün sistemin kilit hücreleri üzerinde kalıcı bir etki oluşturmadığını göstermektedir.

Alkol ile immün parametreler arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda olduğu gibi, bizim araştırmamızın sonuçları da etanolün immün sistem üzerinde değişik etkilerinin oldu-

ğunu göstermektedir. Ancak etanolün gebelik sürecinde immün sistem üzerine etkileri konusunda fazla bilgi bulunmamakla birlikte, varolan bilgiler de çelişkilidir. Gebelik sürecinde immün tolerans gelişimi T lenfosit repertuarının değişimi ile sağlanmaktadır. İmmünsupresyon olayları T lenfositlerin sayısal ve aktivasyon programlarının değişimiyle başlar.<sup>29,30</sup> Fetal antijenleriyle karşılaşan maternal T lenfositlerinin klasik yanıtları değişir. Bellek programları apoptozise yönleneyle yok edilir. Sağlıklı gebelik sürecinde periferik T lenfositlerin tolerans kazanım mekanizmaları tam olarak açıklanmamış bir konudur. Literatürlerde CD4 ve CD8 düzeylerinin gebelerde değişmez veya azalmış olarak bulunduğu ifade edilmesi bilgilerdeki çelişkiyi göstermektedir.<sup>31-34</sup> Çalışmalarda T hücre proliferasyonundaki düşüklüğün, hücre sayısındaki veya IL-2 üretimindeki azalmadan değil, IL-2r aktivasyonunun düşük olmasından kaynaklanacağı gösterilmiştir.<sup>35,5</sup>

Araştırmamızda etanol uygulanan gebe gruplarında (diyet ve gavaj), CD4 ve CD8 lenfositleri ve CD4/CD8 oranlarının düşüklüğü, risk kriteri olarak alınmaktadır. Gebelikte etanolün CD4 üzerindeki supressif etkisi, CD8 üzerinde çok daha anlamlı artmaktadır. Etanolün immün sistem üzerine etkisine ait fikir birliği yoktur. Etanol kullanımı ile gebelikte T hücre proliferasyonu ve aktivasyonu düşmekte, CD3 yolağı etkilenmekte, buna bağlı olarak da CD19'da anlamlı azalma gözlenmektedir. Humoral immün sistemin göstergesi olarak aldığımız CD19 değerindeki azalma, karaciğer, dalak gibi lenfoid dokuların alkolün etkisi sonucu baskılandığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, etanol uygulanan gebe sıçanlarda T hücre proliferasyonunun alınan etanol düzeyine göre değiştiği gösterilmiştir.<sup>18,26,36</sup> Araştırmamızda etanol uygulanan (diyet ve gavaj) gebe gruplarında, CD19 düzeyindeki baskılanma, antikor üretiminde ve antijen sunumunda etkin rol oynayan bu hücrelerin aktivasyonunun engellendiğini göstermektedir. CD19 lenfositleri antikor düzeyini etkilemektedir. Doğal immün sistemin hücreleri tarafından hedef hücrenin tanınmasını ve lizisini sağlayan antikor sentezini engelleyerek, doğal immün sistem aktivasyo-

nu etkileyecektir. IL-2 düzeyindeki azalma bu etkinin güçlenmesini sağlayacaktır.<sup>37,38</sup> Yapılan çalışmalarda etanol diyet uygulanan gebelerde Thy 1. 2 +, CD8 ve IgG + B (CD19) hücreleri ile periferik kan, dalak ve timus dokularında lenfoid hücrelerde azalma olduğu gösterilmiştir.<sup>39</sup> Ayrıca bu çalışmada T hücre bağımlı cevapların IL-2 üretiminin azaldığı da belirtilmiştir. Wu ve arkadaşları, etanol alımı sonucu T lenfosit düzeylerinin değiştiğini ve B lenfosit düzeylerinde ise güçlü bir supresyon olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.<sup>40</sup>

Sonuç olarak; çalışma gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmasında da görüldüğü gibi, direkt ve indirekt olarak etanol uygulaması spesifik immün sistem üzerinde genel bir immünsupresyona neden olurken, gebelikte bu etkinin daha da güçlü olduğu gözlemlendi. Sağlıklı yavruların doğumu için annenin gebelik süresince teratojenik faktörlerin fetal anomaliyi oluşturacak zararlı etkilerinden uzak kalması gerekmektedir. Kullanılan alkolün dozu, süresi uygulama yöntemine göre oluşturduğu toksit etki hem hücre yapısı ve fonksiyonları, hem de immün parametreleri değişik şekillerde ve şiddette etkilemektedir.

## ÖZET

Sağlıklı gebelik maternal immünsupresyonu ve immün tolerans gelişimini zorunlu kılar. Gebelik sürecinde annede geliştirilen immüno- lojik tanıma reaksiyonlarının farklılığı, bu süreçte immün sisteme özgün yeni bir dengenin oluşmasını sağlar. Gebelikte fetusun gelişimi sırasında kullanılan teratojenik faktörlerin oluşturacağı malformasyonların immün sistemi nasıl etkilediği cevaplanmamış bir sorudur. Araştırmamız, sağlıklı ve gebe gruplarında farklı sürelerde ve dozlarda alınan alkolün annede immün sisteme etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

Çalışmamızda 10-12 haftalık a/a Wistar albino soyu dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar; Kontrol grubu (C), %17.5 etanol uygulanan grup (E), %30 gavaj etanol uygulanan grup (GE), Kontrol gebe grubu (CG), %17.5 diyet

etanol uygulanan gebe grubu ve %30 gavaj etanol uygulanan gebe grubu olmak üzere 6 grup (n=60) oluşturuldu. Diyet etanol uygulanan gruba 4 ay boyunca günde 8.75 g/kg., gelecek şekilde %17.5 diyet etanol, gavaj yöntemi uygulanacak gruba ise 2 ay boyunca günde 6 g/kg., gelecek şekilde %30 etanol uygulandı. Bu uygulamanın ardından gebe bırakıldılar ve alkol uygulamasına devam edildi. Alınan kan örneklerinde CD4, CD8, CD19 analizi; Flow sitometrik yöntemle, IL-1 ve IL-2 düzeyi; Elisa yöntemiyle tayin edildi.

Araştırmamızda (C) ile (E) grubu karşılaştırıldığında, (C) grubuna göre, CD4, CD3, IL-1 düzeyindeki anlamlı artışa karşın, CD8, CD19, IL-2 düzeyindeki azalmayla immün supresyon belirlendi. (C) ile (GE) grubu karşılaştırıldığında, (C) grubuna göre, CD4, CD3, CD19 ve IL-1 düzeyinde değişim gözlenmezken, gebeliğin kilit sitokini olan IL-2 düzeyindeki azalma, CD8 azalmasının temel nedeni olarak belirlendi.

(CG) ile (EG) gruplarının karşılaştırılmasında, (CG) ye göre, CD4, CD8, CD19 ve IL-2 düzeylerinde azalmayla gelişen immün supresyonu görünürken, CD3 ve IL-1 düzeylerinde artış saptandı. (CG) ile (GEG) karşılaştırıldığında ise, (CG) ye göre, CD4, CD3 düzeyinin değişmediği, CD8, CD19, IL-2 düzeylerinde azalma olduğu, IL-1 düzeyinde ise artışın olduğu belirlendi. Çalışma grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, (C) ile (CG) arasında, (C) grubuna göre CD4 (%18), CD3 (%19), IL-2 (%24) oranında azalırken, CD8 (%8), CD19 (%7) değişim gözlenmemiş, IL-1 (%28) ise artmıştır. (E) ve (EG) gruplarında ise (E) grubuna göre, CD4 (%46), CD8 (%20), CD3 (%22), CD19 (%31), IL-1 (%34) artış göstermiştir. (GE) ve (GEG) gruplarına baktığımızda ise, (GE) ye göre CD4 (%24), CD8 (%13), CD3 (%24), CD19 (%23), IL-2 (%15) azalmış, buna karşın IL-1 (%29) oranında artmıştır. Gruplar arasında en anlamlı değişim, uzun süreli diyet etanol uygulanan grupta gözlemlendi.

Sonuç olarak; direkt ve indirekt etanol uygulanan gebe sıçanlarda spesifik immün parametrelerde güçlü bir immünsupresyonun oldu-

ğu, etanolün uygulama süresi ve yönteminin supresyon kuvvetini etkilediği gözlemlendi.

## KAYNAKLAR

1. Boney EA, Matzinger P. The maternal immune system's interaction with circulating fetal cells. *J. Immunol.* 1997; 158: 40.
2. Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected? *Current Opinion in Immunology.* 2001; 13: 590-593.
3. Poole JA, Claman HN. Immunology of pregnancy. Implication for the mother. *Clinical Reviews in Allergy&Immunology.*2004; 26: 161-70
4. Bulla R, Fischetti F, Bossi F, Tedesco F. Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus.*2004;13: 625-9
5. Akyol S. Gebeliğin erken evresinde gebelik hormonları ve immün sistemin MHC-II ve s IL-2r ile bağımlı incelenmesi. *Doktora Tezi,* 2004.
6. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology* 2004; 5: 266-277.
7. Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system. a review. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 1998; 22: 1927-1942.
8. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defense. *Alcohol Alcoholism.* 1999; 34: 830-841.
9. Ahluwalia B, Wesley B, Adeyrga O, Smith DM, Da Silva A, Rajguru S. Alcohol modulates cytokine secretion and synthesis in human fetus: an in vivo and in vitro study. *Alcohol.* 2000; 21: 207-13.
10. Akyol S, Tunali H, Kiran B, İter O. Alkolik yapılan gebe sıçanlar ve yavrularında NK aktivasyonu ile IL-2, IFN-gama ve CD19 etkileşimi. *I.U. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi.* Ocak- Mart 2001; 32; 43-50.
11. Weinberg J. Recent studies on the effect of fetal alcohol exposure on the endocrine and immune systems. *Alcohol&Alcoholism.Supplement.*1994; 2: 401-9.
12. Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Research&Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse& Alcoholism.* 2000; 24: 93-104.
13. Norton S., Kotkoskie LA. Basic animal research (Review). *Recent Development Since.* *Alcoholism.* 1991; 9: 95-105.
14. Chang MP, Yamaguchi DT, Yeh M, Taylor AN, Norman DC. Mechanism of impaired T cell proliferation in adult rats exposed to alcohol in utero. *International Journal of Immunopharmacology.* 1994; 16: 345-57.

15. Gallucci RM, Meadows GG. Ethanol consumption suppresses the IL-2 induced proliferation of NK cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 138: 90-7.
16. Astori M, Finke D, Karapetian O, Acha-Orbea H. Development of T-B cell collaboration in neonatal mice. *Int Immunol.* 1999; 11: 445-51.
17. Wolcott RM, Jennings SR, Cheruenak R. In utero exposure to ethanol effects postnatal development of T and B lymphocytes, but not natural killer cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995; 19: 170-6.
18. Kuhnert M, Strohmeier R, Stegmuller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obst. Gynecol Reprod Biol* 1998; 76: 147-51.
19. Song K, Coleman RA, Zhu X, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Cook RT. Chronic ethanol consumption by mice result in activated splenic T cells. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72: 1109-1196.
20. Chang MP, Wang O, Norman DC. Diminished proliferation of B blast cell in response to cytokines in ethanol-consuming mice. *Immunopharmacol. Immuno toxicol.* 2002; 24: 69-82.
21. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol.* 2002; 21: 471- 495.
22. Laso FJ, Lapenta P, Madruga J, San-Miguel JF. Alternations in TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  and IL-6 production by natural cell enriched peripheral blood mononuclear cells in chronic alcoholism; relationship with liver disease and ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1226-1231.
23. Lam MK, Homewood J, Taylor AJ, Mazurski EJ. Second generation effect of maternal alcohol consumption during pregnancy in rat. *Neuropsychopharmacol Bio Psychiatry.* 2000; 24: 619-31.
24. Hill JA. Cytokines in human reproduction. 1999: 161-171. (Newyork:John Wiley-Liss)
25. Schafer A, Pauli G, Friedmann W, Dudenhausen JW. Human choriogonadotropin (hCG) and placental lactogen (hPL) inhibit IL-2 and increase IL-1beta,IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in monocyte cell culteres. *J Perinat Med.*1992; 20: 233-240.
26. Vitala K, Israel Y, Blake JE, Nimela O. Serum IgA, IgG and IgA antibodies directed against acetaldehyde-derived epitopes: Relationship to liver disease severity and alcohol consumption. *Hepatology* 1997; 25: 1418-1424.
27. Burns DN, Nourjah P, Wright DJ, Minkoff H, Landesman S, Rubstein A, Goedert JJ, Nugent RP. Changes in immune activation markers during pregnancy and pospartum. *J Reprod Immunol.* 1999; 42: 147-165.
28. Han YC, Pruett SB. Mechanisms of ethanol induced suppression of primary antibody response in a mouse model for binge drinking. *Journal of pharmacology & Experimental Therapeutics.*1995; 275: 950-7.
29. Jiang SP, Vacchio MS. Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal allograft. *J Immunol.* 1998; 160: 3086-3090.
30. Vacchio MS, Jiang SP. The fetus and the maternal immune system; pregnancy as a model to study peripheral T cell tolerance. *Crit Rev Immunol.*1999; 19: 461-480.
31. Kuhnert M, Strohmeier R, Stegmuller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 76: 147-151.
32. Luppi P, Haluszczak C, Trucco M, De Loia J. Normal pregnancy is associated with leukocyte activation. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47: 72-81.
33. Crouch SPM, Crocker IP, Fletcher J. The effect of pregnancy on polymorponuclear leukocyte function. *J Immunol.* 1995; 155: 5436-5443.
34. Sacks G, Sargent I, Redman C. An innate view of human pregnancy. *Immunolgy Today.* 1999; 114: 114-118.
35. Chao KH, Wu MY, Yang JH, Chen SH, Yang VS, Ho HN. Expression of the interleukin 2 receptor  $\alpha$  (CD25) is selectively decreased on decidual CD4+ and CD8+ lymphocytes in normal pregnancies. *Molecular Human Reproduction.* 2002; 8: 667-673.
36. Helm RM, Wheeler G, Burks AW, Hakkak R. Badger TM. Flow cytometric analysis of lymphocytes from rats following chronic ethanol treatment. *Alcohol* 1996; 13: 467-71.
37. Minami Y, Kono T. The IL-2 receptor complex:Its structure, function and target genes. *Am Rev Immunol.* 1993; 11: 245-268.
38. Trinchieri G, Wysocka A, D' Andrea. Natural killer stimulatory factor (NKSF) or IL-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res.* 1993; 4: 355-368.
39. Lam MK, Homewood J, Taylor AJ, Mazurski EJ. Second generation effect of maternal alcohol consumption during pregnancy in rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Bio. Psychiatry.* 2000; 24: 619-31.
40. Wu VJ, Wolcott RM, Pruett SB. Ethanol decreases the number and activity of splenic natural killer cells in a mouse model for binge drinking. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 271: 722-9.