

## SAĞLIKLI GEBE SIĞIRLARIN PERİFER KAN LENFOSİTLERİNDE ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ VE ASİT FOSFATAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Emrah Sur<sup>1</sup> İbrahim Aydın<sup>2</sup> Yasemin Öznurlu<sup>1</sup> Tuğba Telatar<sup>1</sup> İlhami Çelik<sup>1</sup>

### Determination of The Activity of Alpha Naphthyl Acetate Esterase and Acid Phosphatase of Peripheral Blood Lymphocytes in Healty Pregnant Cattle

Geliş Tarihi: 25.09.2008  
Kabul Tarihi: 23.10.2008

**ÖZET:** Bu çalışma, siğırlarda 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. Hayvanlar Kontrol; I. trimester; II. trimester ve III. trimester olmak üzere 4 gruba ayrıldılar (n= 20). I. ve III. trimesterde ACP-az pozitif lenfosit oranlarında istatistiksel olarak önemli düşüşler gözlemlendi. En düşük ANAE (+) T-lenfosit oranı I. trimesterde tespit edilirken gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli değildi. I. trimesterde perifer kan lenfosit oranında belirgin bir düşüş dikkati çekerken (p<0,05) en yüksek null hücre oranı da yine bu dönemde tespit edildi. Gebeliğin siğırlarda özellikle I. trimesterde perifer kan lenfositlerini etkilediği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** ANAE, ACP-az, Null hücre, siğır, gebelik.

**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 cattle. Peripheral blood lymphocyte percentages were also estimated. These animals divided into four groups as Control; Trimester I; Trimester II and Trimester III (n= 20 for each group). There was a statistically decreases in the proportions of the ACP-ase (+) lymphocytes in Trimester I and Trimester III. The lowest ANAE (+) T-lymphocytes percentage was determined in Trimester I but the differences between the groups were not statistically important. A dramatic reduction in the percentage of peripheral blood lymphocytes was recorded in Trimester I (p<0,05) whereas the highest null cell rates were found at the same period. It was concluded that the pregnancy effects the peripheral blood lymphocytes in cattle especially Trimester I.

**Key words:** ANAE, ACP-ase, Null cell, cattle, pregnancy.

### GİRİŞ

Gebelik, türün devamlılığını sağlayan ve dişi memelilerin yaşam sürecindeki en temel olaylardan biridir. Çiftleşme ve fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesinden sonra blastosist'i oluşturan trofoblast hücreleri, bir takım sinyaller göndererek ovaryum üzerinde yer alan korpus luteum'un (KL) kalıcılığını ve dolayısıyla gebelik hormonu da denilen progesteron hormonunun devamlılığını sağlayarak gebeliğin oluşumunda kritik rol oynarlar. Bunlardan en önemlisi "İnterferon tau-(IFN-tau)" olarak isimlendirilen bir proteindir. Bu proteinin, normal siklus sırasında endometriyumdan salgılanarak KL'u ortadan kaldıran pulzatif prostaglandin F<sub>2</sub>-

alfa salınımını engellediği bildirilmektedir. Bu şekilde KL'un ömrü uzamakta ve progesteron hormonunun da devamlılığı sağlanmaktadır. Yeni bir östrus siklusunun başlamasını önleyip embriyonun gelişmesine olanak tanımaya yönelik bu süreçte meydana gelen olaylardan biri de "immün tolerans" dır. Türlerle göre değişmekle birlikte gebeliğin erken dönemlerinde meydana gelen ve babaya ait antijenleri taşıyan trofoblast hücrelerine karşı annenin bağışıklık sistemi tepkisinin belirli sınırlar içerisinde kalmasını sağlayan tüm olaylar "maternal immün tolerans" olarak bilinir (Gnatek ve ark., 1989; Güzeloğlu, 2006; Nasar ve Rahman, 2006).

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD Kampus Konya.

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji AD Kampus Konya

Maternal immün toleransın gelişiminde en önemli faktör immünosupresif etkiye sahip progesteron hormonudur. Siklusun sekresyon fazında ovaryumlardan salgılanmaya başlayan progesteronun etki mekanizması konusunda tartışmalar sürmektedir. Zira luteal fazda ve gebelik süresince T-lenfositlerinde yer alan progesteron reseptörlerinin arttığı ve progesteron hormonunun T-lenfositlerinin proliferatif aktivitelerini baskıladığı ileri sürülürken (Cuello ve ark., 2006); sığırlarda böyle bir duyarlılığın olmadığı bildirilmektedir (Padua, 2004).

Gebeliğin maternal kabulü sürecinin sağlıklı bir biçimde devamı için gebelik süresince çeşitli hücrelerden salıverilen sitokinler arası etkileşim de önemli rol oynar. T<sub>H</sub>1 yardımcı T-lenfositlerden (T-helper-Th<sub>1</sub>) salıverilen interlökin-2 (IL-2), IFN-gama ve Tümör Nekrozan Faktör-alfa (TNF-alfa) embriyo için zararlı olan sitokinler grubuna girerken; Th<sub>2</sub>'lerden salıverilen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve Leukemia Inhibitory Factor (LIF) gebelik yararına çalışan sitokinlerdir (Bulla, 2004). Trofoblastlar da immün sistemi baskılayan Transforming Growth Factor (TGF-beta) ve IL-10 üretimine katılırlar (Kannelopoulos-Langevin ve ark., 2003; Bulla, 2004).

Maternal immün tolerans sürecinde meydana gelen en karmaşık olaylar implantasyon aşamasında karşımıza çıkar. İmplantasyon, çeşitli hormonlar, adezyon molekülleri, enzimler, sitokinler ve büyüme faktörlerinin doku ve kan düzeylerindeki belirgin değişimlerle karakterizedir. Uterus endometriyumunun türlere göre değişen düzeyde yıkımlandığı ve organizma için "yabancı" olarak algılanan embriyonun uterusu yerleşmeye çalıştığı bu süreçte bölgesel ve sistemik bir dizi olay da tetiklenir (Barnea, 2004). Tüm bu olaylar, reproduktif immunologlarca gebeliğin farklı bir biçimde tanımlanmasına yol açmıştır. Reproduktif immunologlara göre gebelik; embriyo tarafından eksprese edilen paternal (babaya ait) antijenlere karşı maternal (anneye ait) immün sistemin toleransı ile karakterize fizyolojik bir durumdur. Normal gebeliklerde annenin bağışıklık sisteminin embriyoya saldırmaması için perifer kanda, endometriyumda ve plasenta dokusunda bir takım değişimler 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

(Ostensen ve ark., 2005; Nasar ve Rahman, 2006).

Mahmoud ve ark. (2001)'nin 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 gözlenmiştir. Nakamura ve ark. (1993) da gebelik boyunca sitotoksik T-lenfositlerinin aktivitelerinin azaldığını bildirmektedirler. Farelerde yapılan bir başka çalışmada ise implantasyonun gerçekleştiği gebeliğin 4,5. gününde perifer kan toplam lökosit sayısının arttığı; ikinci artışın ise plasentasyon sürecine karşılık gelen gebeliğin 9. gününde gözlemlendiği bildirilmektedir (Rugh ve Somogyi, 1969). Agricola ve ark. (2008)'nin gebe ve postpartum kısıraklarda 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.

Süt sığırcılığında fertilité oranları tüm dünyada her yıl yaklaşık olarak %1 oranında azalmaktadır. Holstein-Fresian ırkı süt sığırlarında tohumlamaların %10 ve bazen daha fazlası gebelikle sonuçlanmamaktadır. Bu olumsuz sonuçların nedenleri arasında ovulasyon zamanının tam olarak tespit edilememesinden beslenme yetersizliğine ve genetik problemlere kadar pek çok faktör sayılabilir. Özellikle erken embriyonik ölümlerin %25'inin gebeliğin ilk üç haftası içinde gerçekleştiği ve "repeat breeder" olarak tanımlanan sığırlarda da embriyo kayıplarının, embriyonun uterus'a geldiği çiftleşme ya da tohumlamayı takip eden 5-7. günler arasında olması, gebeliğin maternal kabulü sürecinde yaşanan bir takım sorunları akla getirmektedir (Watches ve ark., 1998; Thatcher ve ark., 2001; Geisert ve Schmitt, 2002).

Sonuçta başarılı bir gebeliğin devamı için, ya luteal regresyonun engellenmesi, ya da maternal immün sistemin fetal dokuları "yabancı" olarak algılamasının önüne geçilmesi gerekmektedir (Watches ve ark., 1998; De Lemos, 2003). Bu durum öylesine önemlidir ki fizyolojik ve patolojik herhangi bir neden olmaksızın karşılaşılan infertilite olaylarından, yavrunun anne tarafından kabul edilmemesi, yani maternal immün tolerans yetersizliği sorumlu tutulmaktadır (Trowsdal ve Betz, 2006).

Asit fosfataz enzimi (ACP-az) lizozomal bir enzim olup; çoğunluğunu T-lenfositlerinin oluşturduğu hücre populasyonları için spesifiktir (Basso ve ark., 1980). Alfa naftil esteraz enzimi (ANAE) de lizozomal bir enzim olup; insanlarda ve sığırlarda T- ve B-lenfositler ile monositlerin birbirlerinden ayırt edilmesinde kullanılır (Kajikawa ve ark., 1983; Çelik ve ark., 1991).

Bu çalışmada Holstein ırkı süt sığırlarının perifer kan T-lenfosit ve ACP-az-pozitif lenfosit oranları ile lenfosit oranlarında gebeliğin farklı dönemlerinde meydana gelen değişimler tespit edilerek, yukarıda bahsedilen konuya farklı ve pratik bir yaklaşım ortaya konulmaya çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Hayvan materyali

Çalışmanın hayvan materyalini Konya ili sınırları içerisindeki farklı yetiştiriciler elinde bulunan 60'ı gebe toplam 80 adet Holstein ırkı süt sığırları oluşturdu. Gebe hayvanlar tohumlama tarihi, rektal muayene ve ultrasonografik muayene (Scanner 480 Vet, Pie Data Medical, Maastrich, Netherlands) dikkate alınarak gebeliklerinin ilk, ikinci ve son 3 aylık (I., II. ve III. trimester) dönemlerine göre her biri 20 hayvandan oluşan üç gruba ayrıldı. Gebe olmayan 20 hayvan ise kontrol grubu olarak değerlendirilmeye alındı.

### Kan materyali

Hayvanların jugular venasından klasik yöntemle heparinli tüplere yaklaşık 5'er 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 kurutulmuş frotiler -10 °C'deki glutaraldehid-aseton tespit solüsyonunda (pH=4,8) 3 dakika süreyle tespit edildiler. Bu sürenin sonunda distile su ile 3 kez yıkanan frotiler oda sıcaklığında kurutuldu (Sur, 2004).

Kurumayı takiben frotiler ANAE enzimi için Çelik ve ark., (1994)'nın; ACP-az enzimi için Sur (2004)'un bildirdiği yöntemlere göre hazırlanan inkübasyon solüsyonlarında gerekli sürelerde inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 3'er defa distile suyla yıkanan preparatlara, asetat tamponunda (pH=4,8) hazırlanmış olan %1'lik methyl-green (Merck) ile çekirdek boyası uygulandı.

Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları belirlenirken, May-Grünwald-Giemsa (Konuk, 1981) 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.

### İstatistikî analizler

Kan sayımı sonuçları Açık (Arc Sinus) dönüşüm metodu kullanılarak analiz edildiler. Bu metoda göre transforme edilen parametrelerin birbirleriyle karşılaştırmalarında SPSS istatistik programından yararlanılırken, verilerin tablolaştırılmasında dönüşüm öncesi gerçek değerler kullanıldı (Tekin, 2003)

### Bulgular

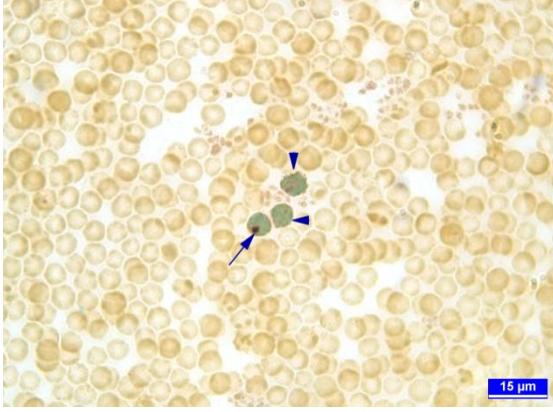
Frotiler üzerinde yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda, perifer kan lenfositlerinin 2 farklı ANAE enzimi aktivitesine sahip oldukları gözlemlendi. Sayıları 1-4 arasında değişen kırmızı-kahverengi granüller içeren lenfositler T-lenfositler olarak değerlendirilirken (Şekil 1); sayıları 5-8 arasında değişen kırmızı-kahverengi granüller 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 T-lenfosit, null lenfosit ve ACP-az-pozitif lenfosit oranları Tablo 1'de verilmiştir.

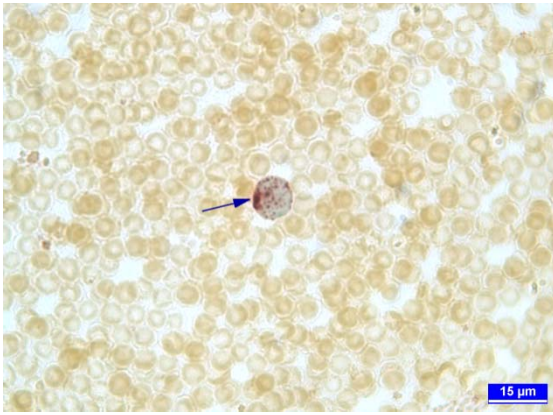
## TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanatlılar ve keseli memelilerde (marsupianlar) maternal organizma içerisinde son derece sınırlı bir yaşam söz konusudur. Kanatlılar, fertilizasyondan kısa bir süre sonra yumurtlama işlemi ile embriyoyu dışarı atarlarken, keseli memelilerde gebelik uterus dışında tamamlanır. Dolayısıyla fertilizasyon ve gebeliğin maternal organizma içerisinde tamamlanması son derece gelişmiş bazı özellikler gerektirir. Bu özellikler yarı yarıya yabancı olan embriyoyu korumak ve beslemektir. Bunun sonucu olarak dişi memeliler normal şartlarda bir parazit olarak

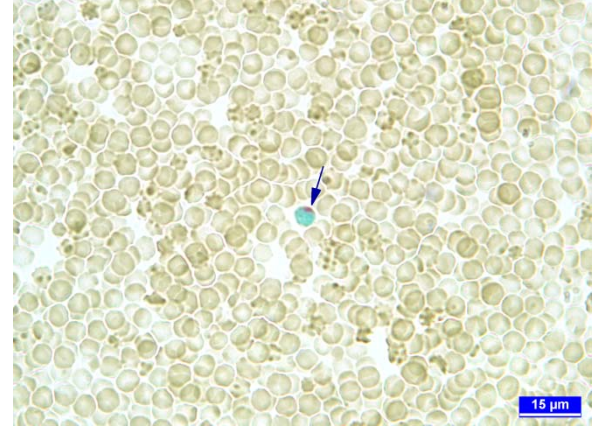
algılayabilecekleri sperm hücrelerinin kendi bünyeleri içerisinde ilerlemesine ve genetik



Şekil 1: Gebe bir sığırın perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: ANAE (+) lenfosit, Ok başları: ANAE (-) lenfosit.



Şekil 2: Gebe bir sığırın perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: Çok sayıda dağınık granül içeren null lenfosit.



Şekil 3: Gebe olmayan bir sığırın perifer kan frotisinde ACP-az demonstrasyonu. Ok: ACP-az (+) lenfosit.

yapısını açığa çıkarmasına izin verirler. Memelilerde 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 (Gnatek ve ark., 1989; Barnea, 2004; Güzeloğlu, 2006; Nasar ve Rahman, 2006).

Bu çalışmada gebeliğin perifer kan lenfositleri üzerindeki etkileri incelenmekle birlikte histolojik açıdan değerlendirildiğinde en belirgin değişimler uterus mukozasında olur. İmplantasyon temelde yangısel sitokinlerin salınmasıyla karakterize olup söz konusu bu sitokinler başta nötrofiller ve makrofajlar olmak üzere diğer lökositlerden de salıverilir. Bu şekilde anne implantasyon için uyarılmış olur (Hunt, 2006). 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. İmplantasyonu takiben uterus

**Tablo 1** Çalışmada elde edilen perifer kan lenfosit oranları ile T-lenfosit, null lenfosit ve ACP-az-pozitif lenfosit oranları.

Gruplar	Perifer kan ANAE(+) lenfosit oranı (%) X±SE	Perifer kan ACP(+) lenfosit oranı (%) X±SE	Null lenfosit (%) X±SE	Perifer kan lenfosit oranı (%) X±SE
Kontrol	61.35±1.31 <sup>a</sup>	49.60±0.98 <sup>a</sup>	1.45±0.25 <sup>a</sup>	45.05±1.19 <sup>a</sup>
I trimester	59.20±0.98 <sup>a</sup>	41.4±1.35 <sup>c</sup>	8.1±0.52 <sup>c</sup>	37.15±1.43 <sup>b</sup>
II Itrimester	63.20±1.67 <sup>a</sup>	49.30±1.03 <sup>a</sup>	3.55±0.65 <sup>b</sup>	45.50±1.22 <sup>a</sup>
III. trimester	61.95±1.64 <sup>a</sup>	44.90±0.88 <sup>b</sup>	3.20±0.58 <sup>b</sup>	45.95±1.22 <sup>a</sup>

a-c: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemlidir(p<0,05).

mukozası hücresele yünden yeniden düzenlenir. İnsanlarda bu dönemde uterus mukozasında yer alan toplam lökositlerin %20-40'ını uterus doğal katil hücreleri (uNK) oluşturur. Yaklaşık olarak 24 hafta (ilk iki trimester) süren bu durumun ardından uNK'lar yavaş yavaş ortadan kalkarlar. Farelerde ise doğuma kadar varlığını sürdüren bu hücreler doğuma yakın dönemlerde degranüle olmuş olarak göze çarparlar. Engelhardt ve ark. (2002)'nin domuzlarda yaptığı bir çalışmada lökosit yoğunluğunun embriyonun temas noktasında diğer bölgelere nazaran 3 kat daha fazla olduğu; gebe olmayan luteal fazdaki hayvanlarda ise gebe hayvanlarda temas noktaları arasındaki lökosit yoğunluğuna eş değer bir yoğunluğun dikkati çektiği görülmüştür. Martinez ve ark. (2005)'nin gebe ve gebe olmayan keçi uterusları üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada ise 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. Ayrıca gebelikte interkarunkular epitelde granülsüz lenfosit alt tipinin (CD2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) ortadan kalkarken, granüllü lenfosit alt tipinin (CD2<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) arttığı ileri sürülmektedir (Martinez ve ark 2005).

Yukarıda tartışılan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi gerek insanlarda ve gerekse evcil memeli hayvanlarda daha çok gebeliğin uterus dokusu bağışıklık sistemi hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmış; gebeliğin perifer kan hücreleri üzerindeki dönemsel etkisi konusunda özellikle ülkemiz hayvancılığında ekonomik önemi olan sığırlarda yapılmış yeterli çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Holstein ırkı süt sığırlarında perifer kan lenfosit oranı ile ANAE (+) ve ACP-az-(+) lenfosit oranlarında gebelik boyunca meydana gelen değişimler incelenmiş ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

ANAE enzimi, içerisinde insanın da yer aldığı pek çok hayvan türünde ve sığırlarda T-lenfositleri için spesifik bir enzimdir (Wulff ve ark., 1981; Kajikawa ve ark., 1983; Maiti ve ark., 1990; Çelik ve ark., 1991). Lenfositlerde iki farklı ANAE enzimi pozitifitesi dikkati çekmektedir. 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 pozitifitenin "null" lenfositleri için özel olduğu bildirilmektedir (Çelik ve ark., 1991). Null lenfositlerinin, matur T- ve B-lenfositlerine ait

reseptörler taşımayan ancak NK hücrelerinin öncüllerinin yanı sıra farklı gelişim aşamalarındaki T- ve B-lenfosit serilerine ait hücreler de içeren bir lenfosit alt tipi olduğu bildirilmektedir (Chiao ve ark., 1978; Hercend ve ark., 1982). Bazı araştırmacılar ise NK hücrelerinin null hücreler olarak değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmektedirler (Moretta ve ark., 2001; Lanier, 2007). Higgy ve ark. (1977)'nin insanlarda yapmış oldukları bir çalışmada null lenfosit olarak değerlendirilen lenfosit alt tipi perifer kan oranının %9 olduğu tespit edilirken; Çelik ve ark. (1991)'nin yine insanlarda yaptıkları bir başka çalışmada ise bu oran %13 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 5-8 adet dağınık ANAE (+) granüller içeren lenfositlerin oranı kontrol grubu hayvanlarda %1,45 olarak bulunurken, gebeliğin I. trimesterindeki hayvanlarda bu hücrelerin oranı önemli derecede artarak % 8,1'e yükselmiştir. II. ve III. trimesterlerde bu oran %3-3,5 seviyelerine düşse de aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu dikkati çekmiştir (Tablo 1).

Null hücrelerinin NK hücreleri olarak değerlendirilmesinin ve ANAE histokimyası ile bunların değerlendirilebilmesinin klinik-laboratuvar teşhiste önemi vardır. Zira gebelikte NK hücrelerinin gerek perifer kan ve gerekse uterus dokusundaki sayılarında önemli değişimler söz konusudur. İnsan, sıçan, fare ve hamster'larda "İri granüllü lenfositler (Large granular lymphocytes-LGL)" olarak da anılan ve granülleri ANAE pozitifitesi gösteren bu hücrelerin (Grossi ve ark., 1982), insanlarda gebeliğin ilk 3 aylık döneminde desidua'da arttığına dair bulgular vardır. Andalip ve ark. (2005)'nin 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. Koç ve Kanter (2000)'in gebe sıçanlarda yaptıkları bir başka çalışmada ise ANAE pozitifitesi gösteren ve uterus doğal katil hücreleri (uNK) olarak bilinen hücrelerin implantasyonun ikinci gününden itibaren arttığı ve 6. günde en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmektedir. Bu bilgiler dikkate alındığında çalışmada elde edilen bulguların, bundan sonra yapılacak çalışmalar için temel veriler olmaları açısından önemli oldukları düşünülmektedir.

Bu çalışmada T-lenfosit sayıları dikkate alındığında gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde

Baines ve ark. (1977) hamile kadınlarda T- ve B-lenfosit sayılarının 8 ay boyunca değişmediğini, ancak gebeliğin son günlerinden doğuma kadar geçen birkaç haftalık dönemde T-lenfosit sayısında düşüş görüldüğünü bildirmişlerdir. Agricola ve ark. (2008)'nin gebe ve postpartum kısıraklarda 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. Medina ve ark. (1993)'nin insanlarda yaptıkları bir çalışmada ise gebelik süresince kemik iliğinde B-lenfosit yapımının azaldığı ileri sürülmektedir.

ACP-az enziminin memeli türlerinde çoğunluğunu T-lenfositlerinin oluşturduğu hücre popülasyonları için spesifik olduğunu bildiren çalışmalar varsa da (Basso ve ark., 1980), tavuklarda B-lenfositleri için spesifik olduğu ileri sürülmektedir (Slowik ve ark., 1990; Sur ve Çelik, 2003). Bu çalışmada da I. ve III. trimesterlerde ACP-az (+)-lenfositlerde belirgin düşüşler dikkati çekmektedir (Tablo 1).

Rugh ve Somogyi (1969)'nin farelerde yaptıkları bir çalışmada ise implantasyonun gerçekleştiği gebeliğin 4,5. gününde perifer kan toplam lökosit sayısının arttığı; ikinci artışın ise plasentasyon sürecine karşılık gelen gebeliğin 9. gününde gözlemlendiği bildirilmektedir. Buna karşın Pisek ve ark. (2008)'nin 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. Bu çalışmada da perifer kan lenfosit oranının I. trimesterde belirgin bir biçimde düştüğü dikkati çekmektedir.

Maternal immün sistemin böylesine büyük bir yabancı cisme uzun süre nasıl tahammül ettiği henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu süreçte immünsupresif mekanizmalar gerekli olmakla birlikte annenin immün sisteminin hastalık yapıcı patojen etkenlere karşı hem anneyi ve hem de yavruyu koruması son derece önemlidir. Bu dengenin kurulması ve söz konusu mekanizmaların kusursuz işlemesi anne ve yavrunun yaşaması için gerekli olup; bu mekanizmaların iyi anlaşılması ülkemiz hayvancılığında son derece önemli ekonomik değere sahip olan süt sığırcılığında karşılaşılan infertilite problemlerine de farklı bir bakış açısı getirecektir.

## KAYNAKLAR

- Agricola, R., Carvallao, H., Barbosa, M., Pereira, M., Medeiros, J.A.S., Ferreira-Dias, G. (2008). Blood lymphocyte subpopulations, neutrophil phagocytosis and proteinogram during late pregnancy and postpartum in manes. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, 2, 212-217.
- Andalip, A., Rezaie, A., Oreizy, F., Baluchi, S. (2005). The assesment of NK cytotoxicity and CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> phenotype by flow-cytometry in PBL isolated from women eith recurrent spontaneus abortion. *I.J.I.*, 2, 4, 213-219.
- Baines, M.G., Pross, H.F., Millar, K.G. (1977). Lymphocytes populations in peripheral blood during normal human pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.*, 28, 453-457.
- Barnea, E.R. (2004). Insight into early pregnancy events: The emerging role of the embryo. *Am. J. Rep. Immunol.*, 51, 319-322.
- Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A., Zanesco, L. (1980). Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br. J. Haematol.*, 44, 577-582.
- Bulla, R., Fischetti, F., Bossi, F., Tedesco, F. (2004). Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus*, 13, 625-629.
- Chiao, J.W., Dowling, M., Good, R.A. (1978). Rosette formation of human null lymphocytes with Rhesus monkey erythrocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 32, 498-503.
- Cuello, F., Martinez, R., Grosso, C., Vivas, A. (2006). Peripheral lymphocytes response to progesterone during early pregnancy in pig. *REDVET*, VII, 11.
- Çelik, İ., Aştı, R.N., Ergene, N. (1991). İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esterez sitokimyası ve yüzey immünooglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *S.Ü. Tıp. Fak. Derg.*, 7 (4), 497-503.
- Çelik, İ., Aştı, R.N., Kadak, R., Işık, M.K. (1994). Farklı yaşlardaki sığırların perifer kan T-lenfosit

oranlarında görülen değişiklikler. Hayvancılık Araş. Derg., 4 (2), 68-72.

De Lemos, M.A. (2003). How your mother tolerated you for nine months. *Bio. Teach. J.*, 1, 27-30.

Engelhardt, H., Croy, B.A., King, G.J. (2002). Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. *Biol. Reprod.*, 66, 1875-1880.

Geisert, R.D., Schmitt, R.A.M. (2002). Early embryonic survival in the pig: Can it be improved? *J. Anim. Sci.*, 80, E, Suppl., 1, E54-E65.

Gnatek, G.G., Smith, L.D., Duby, R.T., Godkin, J.D. (1989). 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.

Grossi, C.E., Cadoni, A., Zicca, A., Leprini, A., Ferrarini, M. (1982). Large granular lymphocytes in human peripheral blood: Ultrastructural and cytochemical characterization of the granules. *Blood*, 59, 2, 277-283.

Güzeloğlu, A. (2006). İneklerde gebeliğin maternal kabulü sürecinde anti-luteolizisin moleküler mekanizması. *Vet. Bil. Derg.*, 22 (1-2), 83-88.

Hercend, T., Meuer, S., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., Ritz, J. (1982). Generation of a cloned NK cell line derived from the "null cell" fraction of human peripheral blood. *J. Immunol.*, 129, 3, 1299-1305.

Higgy, K.E., Burns, G.F., Hayhoe, F.G.J. (1977). Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand. J. Haematol.*, 18, 437-448.

Hunt, J.S. (2006). Stranger in a strange land. *Immunol. Rev.*, 213, 36-47.

Kajikawa, O., Koyama, H., Yashikawa, T., Tsubaki, S., Saito, H. (1983). Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 44(8), 1549-1552.

Kannelopoulos-Langevin, C.K., Caucheteux, S.M., Verbeke, P., Ojcius, D.M. (2003). Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of

inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Rep. Biol. Endocrinol.*, 2,1, 121.

Koç, A., Kanter, M. (2000). Sığırlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücresel ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar. I.Hücreyel savunma sistemi hücreleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6, 1-2, 122-130.

Konuk, T. (1981). *Pratik Fizyoloji*. A.Ü. Vet. Fak. Yayın., 378, A.Ü. Basımevi, Ankara.

Lanier, L.L. (2007). NK cells: Null no more. [www.jimmunol.org](http://www.jimmunol.org).

Mahmoud, F., Abul, H., Omu, A., Al-Rayes, S., Haines, D., Whaley, K. (2001). Pregnancy-associated changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal Kuwaiti women. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 52, 232-236.

Maiti, N.K., Saini, S.S., Sharma, S.N. (1990). Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Res. Commun.*, 14, 207-210.

Martinez, C.M., Buendia, A.J., Sanchez, J., Navarro, J.A. (2005). Immunophenotypical characterization of lymphocyte subpopulations of the uterus of non-pregnant and pregnant goats. *Anat. Histol. Embryol.*, 34, 240-246.

Medina, K.L., Smithson, G., Kincade, P.W. (1993). Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. *J. Exp. Med.*, 178, 1507-1515.

Moretta, A., Bottino, C., Sivori, S., Marcenaro, E., Castriconi, R., Chiesa, M.D., Carlomagno, S., Augugliaro, R., Nanni, M., Vitale, M., Millo, R. (2001). Natural killer lymphocytes: "Null cells" no more. *It. J. Anat. Embryol.*, 106, 4, 335-342.

Nakamura, N., Miyazaki, K., Kitano, Y., Fujisaki, S., Okamura, H. (1993). Suppression of cytotoxic-T-lymphocyte activity during human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 23, 2, 119-130.

Nasar, A., Rahman, A. (2006). Hormonal changes in the uterus during pregnancy-lessons from the ewe: A review. *J. Agric. Rural Dev.*, 4, 1-2, 1-7.

Ostensen, M., Sicher, P., Förger, F., Villiger, P.M. (2005). Activation markers of peripheral blood mononuclear cells in late pregnancy and after

delivery: a pilot study. *Ann. Rheum. Dis.*, 64, 318-320.

Padua, M.B. (2004). Endometrial adenogenesis and uterine immune regulation in sheep. A thesis presented to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science.

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

Rugh, R., Somogyi, C. (1969). The effect of pregnancy on peripheral blood in the mouse. *Biol. Bull.*, 135, 454-460.

Slowik, J., Kuryszko, J., Graczyk, S., Kuprowski, M. (1990). Histochemical studies of acid phosphatase in the bursa-dependent lymphoid tissue of the spleen of chickens after bursectomy and stimulation with ovine erythrocytes. *Pol. Arch. Weter.*, 30 (3-4), 75-87.

Sur, E., Çelik, İ. (2003). Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br. Poul. Sci.*, 44, 558-566.

Sur, E. (2004). Farklı yaş gruplarındaki Türk Merinosu erkek kuzularının perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) enzimi aktivitelerinin belirlenmesi, *Veterinarium*, 15, 15–22.

Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Bineli, M., Hansen, T.R., Pru, J.K. (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 56, 1435–1450.

Tekin, M.E. (2003). Örneklerle bilgisayarda istatistik. S.Ü.Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.

Trowsdal, J., Betz, A.G. (2006). Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nature Immunol.*, 7, 3, 241-246.

Watches, D.C., Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E. (1998). The establishment of early pregnancy in cows. *Reprod. Dom. Anim.*, 33, 279-284.

Wulff, J.C., Sale, G.E., Deeg, H.J., Storb, R. (1981). Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. *Exp. Hematol.*, 9, 8, 85-870.