T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI GEBELERİN PERİFER KAN LENFOSİTLERİNDE BAZI AGNOR PARAMETRELERİ VE MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI İLE ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ VE ASİT FOSFATAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Baki AKBULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Emrah SUR

KONYA–2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI GEBELERİN PERİFER KAN LENFOSİTLERİNDE BAZI AGNOR PARAMETRELERİ VE MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI İLE ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ VE ASİT FOSFATAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Baki AKBULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Emrah SUR

Bu proje için herhangi bir destek talebinde bulunulmamıştır.

KONYA–2010

ii. ÖNSÖZ

Kanatlılar ve keseli memelilerde (marsupianlar) embriyonun maternal organizma içerisindeki yaşamı son derece sınırlıdır. Kanatlılar, fertilizasyondan kısa bir süre sonra yumurtlama işlemi ile embriyoyu dışarı atarlarken, keseli memelilerde gebelik uterus dışında tamamlanır. Dişi memeliler ise normal şartlarda bir parazit olarak algılayabilecekleri sperm hücresinin kendi bünyeleri içerisinde ilerlemesine ve genetik yapısını açığa çıkarmasına izin verirler. Buradan da anlaşılacağı üzere gebelik, fötüs tarafından eksprese edilen paternal (babaya ait) antijenlere karşı maternal (anneye ait) immün sistemin toleransı ile karakterize fizyolojik bir durumdur. Normal gebelik süresince semiallojenik (yarı yarıya kendinden olan) embriyo maternal immün sistemin saldırılarından kaçabilecek stratejiler gerçekleştirir ve organize olur. Bu durum annenin dış etkenlere karşı reaksiyonlarını etkilemez. Zira maternal tolerans olarak adlandırılan bu durum ağırlıklı olarak plasenta ve burada yer alan trofoblast adı verilen hücrelerle ilgili bir olaydır.

Bu çalışmada bazı basit enzim histokimyasal yöntemlerin yanı sıra May-Grünwald-Giemsa ve gümüşleme boyama yöntemleri gibi maliyeti oldukça düşük olan ve kısıtlı imkânlara sahip laboratuar şartlarında bile kolaylıkla yapılabilen metotları kullanarak, hamileliğin bağışıklık sistemi hücrelerinden lenfositler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Böylece çalışmadan elde edilen verilerin bundan sonra yapılacak olan benzeri çalışmalar için referans değerler niteliği taşıması ve maliyeti oldukça yüksek olan ileri tetkikler için vakaların seçilmesinde söz konusu metotlardan da yararlanılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhami Çelik'e, Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Hasan Hüseyin Dönmez, Yrd. Doç. Dr. Murat Boydak ve Yrd. Doç. Dr. Yasemin Öznurlu'ya, Arş. Gör. Dr. Tuğba Özaydın'a; hamile bayanların takibini yaparak kan materyalinin sağlanmasında tüm imkânları seferber ederek yardım ve desteklerini bizden esirgemeyen Özel Selçuklu Hastanesi Doktorlarından Jinekolog Opr. Dr. D. Nil Okur'a ve çalışmaya katılmayı kabul eden tüm gönüllü bayanlar ve eşlerine teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER

1.	**GİRİŞ**	**1**
1.1.	Memelilerde Embriyonik Gelişim ve Plasentasyon	**2**
1.2.	Plasentanın Oluşması	**3**
1.3.	Maternal İmmün Toleransın Gelişimi	**4**
1.4.	Anneye Ait Faktörler	**4**
1.5.	Yavruya Ait Faktörler	**5**
1.6.	Maternal Toleransta Rol Oynayan Mekanizmalar	**6**
1.6.1.	Non-klasik İnsan Lökosit Antijenlerinin Varlığı	**6**
1.6.2.	Fas-Fas-Ligand Etkileşimi	**8**
1.6.3.	Komplement Düzenleyici Proteinler (Complement Regulatory Protein, CRPs)	**8**
1.6.4.	Sitokin Etkileşimi	**8**
1.6.5.	Düzenleyici Hücreler	**9**
	Makrofajlar	**9**
	İri Granüllü Lenfositler (Large granular lymphocytes-LGLs)	**9**
	Tip-2 Yardımcı T-lenfositler	**10**
	Düzenleyici T-lenfositler (T_{reg})	**10**
1.6.6.	Hormonal Mekanizmalar	**10**
1.6.7.	Triptofan Metabolizması	**11**
1.7.	Plasenta Tiplerine Göre Maternal Tolerans	**11**
1.7.1.	Epitelyo-koryal Plasentasyonda İmmün Reaksiyon	**12**
1.7.2.	Hemo-koryal Plasentasyonda İmmün Reaksiyon	**13**
1.7.3.	Hemo-endotelyal Plasentasyonda İmmün Reaksiyon	**13**
1.8.	Alfa Naftil Asetat Esteraz Enzimi	**13**
1.9.	Asit Fosfataz Enzimi	**15**
1.10.	Mikronükleuslar	**15**
1.11.	Çekirdekçik Organize Bölgeleri	**17**
2.	**GEREÇ VE YÖNTEM**	**21**
2.1.	Materyal	**21**
2.2.	Yöntem	**21**
2.2.1.	Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi Demonstrasyonu	**21**

2.2.2. Asit Fosfataz (ACP-az) Enzimi Demonstrasyonu **22**
2.2.3. Modifiye May-Grünwald-Giemsa Solüsyonunun Hazırlanması ve Frotilerin Boyanması **22**
2.2.4. AgNOR Solüsyonunun Hazırlanması ve Frotilerin Boyanması **23**
2.2.5. Preparatların İncelenmesi ve Görüntü Analiz Sistemi ile Analizleri **23**
2.2.6. İstatistikî analizler **24**
3. BULGULAR **25**
4. TARTIŞMA **29**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **40**
6. ÖZET **41**
7. SUMMARY **42**
8. KAYNAKLAR **43**
9. EKLER **50**
EK-A **50**
EK-B **51**
EK-C **52**
10. ÖZGEÇMİŞ **53**

iv. SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP-az:	Asit fosfataz
AgNOR:	Gümüşle boyanan çekirdekçik organize bölgeleri
ANAE:	Alfa naftil asetat esteraz
HLA-G:	Human Leukocyte Antigen-G
IDO:	İndolamin 2,3 dioksijenaz
IFN:	İnterferon
IL:	İntrelöykin
KIR:	Killer Inhibitory Receptor
KIR2DL4:	Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor-4
KL:	Korpus luteum
LGL:	İri granüllü lenfositler (Large granular lymphocytes)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MHC-I ve II:	Major Histocompatability Complex I ve II
MN:	Mikronükleus
NK:	Doğal katil hücre
PGF_2-alfa:	Prostaglandin F_2-alfa
PIF:	Pre-implantation factor
RSA:	Tekrarlayan spontan düşükler (Recurrent Spontan Abortus)
TGF:	Transforme Edici Büyüme Faktörü
Th_1 ve Th_2:	Tip-1 ve Tip-2 yardımcı T-lenfosit
TNF:	Tümör Nekrozan Faktör
TR:	Trimester
T_{reg}:	Düzenleyici T-lenfositler
Unk:	Uterus doğal katil hücreleri

1. GİRİŞ

Gebelik, zigot ve fötüs tarafından eksprese edilen ve gebe için yabancı olan antijenlere karşı maternal (anneye ait) bağışıklık sistemin toleransı ile karakterize fizyolojik bir durumdur. Gebeliğin implantasyon ve plasentasyon sürecinde yarı yarıya annenin/dişinin genotipini paylaşan embriyo, maternal immün sistemin saldırılarından kaçabilecek stratejiler gerçekleştirir. Maternal tolerans olarak adlandırılan bu olayda ya maternal immün sistemin fötal dokuları "yabancı" olarak algılaması engellenmekte, ya da maternal immün sistem hücrelerinin fötal hücrelere immün reaksiyon geliştirmek üzere tutunmasının önüne geçilmektedir. Özellikle T-lenfosit alt tipleri ve doğal katil hücrelerin (NK) kan ve plasenta dokusundaki sayı ve dağılımları ile söz konusu hücrelerin ürettikleri sitokinlerin düzeyi bu değişimin temelini oluşturmaktadır (Ostensen ve ark 2005).

Çeşitli araştırıcılar (De Lemos 2003, Trowsdal ve Betz 2006) tarafından gebeliğin maternal kabulünü açıklayan bazı hipotezler öne sürülmüş ve bu hipotezler üzerinden maternal toleransın mekanizması açıklanmaya çalışılmıştır. Bu hipotezler özet olarak aşağıdaki gibidir;

1. Fötüs immünolojik olarak henüz yeterli olgunluğa erişememiştir,
2. Uterus immün sistem yönünden özellikle toleranslı bir bölgedir,
3. Plasenta hücre geçişini engelleyen anatomik bir bariyerdir
4. Plasentada organizmanın başka hiçbir yerinde rastlanmayan kompleks bir immün bariyer vardır.

Aradan geçen zaman içerisinde bu hipotezlerden ilk üçü geçerliliğini yitirmiştir. Zira fötal hücrelerin immün sistemi harekete geçirebilen hücreler oldukları gösterilmiştir. Yine benzer şekilde zaman zaman karşılaşılan ektopik gebelikler de uterus'un immün sistem açısından toleranslı bir bölge olduğu görüşünü ortadan kaldırmıştır. Yine mikro-kimerizm adı verilen ve anne ile yavru arasında çift yönlü hücre geçişini ifade eden olgunun tanımlanması, plasentanın hücre trafiğini engelleyen bir bariyer olduğu iddiasını geçersiz kılmaktadır (Trowsdal ve Betz 2006). Yukarıda bahsedilen hipotezler içerisinde sadece sonuncu hipotez, yani plasentada kompleks bir immün bariyerin varlığı geçerliliğini korumakta olup; bu

hipotez üzerinde de çalışmalar devam etmektedir. Sonuçta başarılı bir gebeliğin devamı için, ya maternal immün sistemin fötal dokuları "yabancı" olarak algılaması engellenmekte ya da maternal immün sistem hücrelerinin fötal hücrelere immün bir reaksiyon geliştirmek üzere tutunmasının önüne geçilmektedir (De Lemos 2003). Bu durum öylesine önemlidir ki patolojik herhangi bir neden olmaksızın karşılaşılan infertilite olaylarından, yavrunun anne tarafından kabul edilmemesi, yani maternal tolerans yetersizliği sorumlu tutulmaktadır (Trowsdal ve Betz 2006).

Maternal toleransta rol oynayan hücreler ve mekanizmalara geçmeden önce memelilerde embriyonik gelişim hakkında kısa bir bilgi vermekte yarar vardır.

1.1. Memelilerde Embriyonik Gelişim ve Plasentasyon

Döllenmiş yumurta hücresi (zigot) ardı ardına geçirdiği bir dizi bölünmelerden sonra "morula" adını alır. Morulanın vejetatif kutbuna yakın olan iç kısmındaki hücreler yavaş yavaş eriyerek "morula boşluğu" adı verilen bir boşluk oluştururlar. Bu boşluğun genişleyerek büyümesi ve "blastösöl" e dönüşmesi sonucu "blastula" şekillenir. Memeli blastulasının animal kutbunda blastösöl'e doğru sarkan ektodermden köken almış bir hücre grubu göze çarpar. Bu yapıya "nodus embriyonalis (embriyoblast)" adı verilir. Bu aşamadan sonra gerek nodus embriyonalis'in üzerini örten ve gerekse blastösöl'ü çevreleyen ektoderm hücreleri beslenme ile ilgili fonksiyonlarından dolayı "trofoblast" olarak adlandırılırlar. Nodus embriyonalis'in üzerini örten trofoblastlar "polar trofoblast", blastösöl'ü çevreleyen trofoblastlar da "pariyetal trofoblast" şeklinde bölümlenirler (Hassa ve Aştı 1997).

Zigot'tan sonraki gelişmelerle uterus'a ulaşan yavru taslağının (blastosist) iç ve dış etkenlere karşı korunabilmesi için bir takım embriyo dışı keseler gelişir. Bunlar amnion, vitellüs ve allantoyis keseleridir. Bu keseleri içinde bulunduran en dıştaki kese ise koryon kesesidir. Tüm keseleri içerisinde barındıran bu kese aynı zamanda plasentanın oluşumuna da katılır. Zira yavrunun beslenmesi ve gelişiminde koryon kesesinin uterus mukozasına göndermiş olduğu ve üzerleri trofoblast hücreleri ile döşeli villusların önemi büyüktür (Hassa ve Aştı 1997).

Koryon villusları üzerinde yapı ve şekil bakımından 2 çeşit trofoblast hücresi vardır. Bunlardan dışta bulunanı hücre sınırları belli olmayan ve sitoplazmaları birbirine karışmış olan "sinsityo-trofoblastlar", diğeri ise bu tabakanın hemen altında yer alan sınırları belirgin, esas koryon epiteli olarak da tanımlayabileceğimiz "sito-trofoblast" lardır. Sito-trofoblastlar sinsityo-trofoblastlara köken teşkil ederken; sinsityo-trofoblastlar progesteron gibi önemli gebelik hormonlarını üretmelerinin yanında çift yönlü madde transportundan da sorumludurlar (Hunt 2006).

Yukarıda bahsedilen trofoblastlar "villöz trofoblastlar" olarak da isimlendirilirler. Bunların dışında üçüncü bir trofoblast türü daha vardır ki bunlara da "ekstra-villöz trofoblastlar" ya da "intersitisyel trofoblastlar" adı verilir. Bu hücreler, gebelik başlangıcında değişmekte olan uterus mukozasını (desidua) işgal eden "invaziv-yayılmacı" trofoblastlar olup; embriyonun uterusa tutunma noktası olan "trofoblastik kabuk" bölgesinden ışınsal diziler halinde uterusu istila ederler. Bu hücrelerin bir kısmı, insanın da içinde bulunduğu bazı memeli türlerinde uterus spiral arterlerinin intervillöz aralığa açıldığı bölgeden damara girerek endotel tabakasının yerini alırlarken, bazıları da damarın etrafındaki düz kas hücrelerinin yerine geçerler (Bulla ve ark 2004, Hunt 2006).

1.2. Plasentanın Oluşması

Plasenta, koryon ile uterus mukozasının birbirine kaynaşmasından meydana gelmiş, yavru ile anne arasındaki metabolik ve hormonal ilişkiyi sağlayan ekstra-embriyonal bir dokudur. Bu dokuda anneye ve yavruya ait olmak üzere iki kısım bulunur. Anneye ait olan bölüme "plasenta maternalis", yavruya ait olan bölüme "plasenta fötalis" denir. Anneye ait kısımlar uterus epiteli, bağ dokusu ve damar endoteli iken; yavruya ait olan kısımlar trofoblast hücreleri (koryon epiteli), koryon mezenşimi ve damar endoteli olarak sıralanır. Yavru ve anne arasındaki çift taraflı madde alış-verişi, her iki tarafa ait damar endotelleri arasında difüzyon yolu ile olacağından söz konusu tabakalar bir bariyer fonksiyonu görürler. Buna "plasenta bariyeri" adı verilir. Memelilerde plasentanın şekillenmesi sırasında bariyeri oluşturan tabakalardan bazılarının ve de çoğunlukla anneye ait olanların değişikliğe uğradığı hatta ortadan kalktığı görülür. Bu durum memeli türlerine göre farklılıklar gösterir. Buna göre kısrak ve domuzda epitelyo-koryal, ruminantlarda sindesmo-

koryal (epitelyo-koryal olarak da gruplandıranlar vardır-Moffet ve Loke 2006), karnivorlarda endotelyo-koryal, maymun ve insanda hemo-koryal ve kobay, rat ve tavşan gibi kemiricilerde de hemo-endotelyal plasenta tipi söz konusudur. Buradaki isimlendirmede ilk anılan yapı anneye ait, ikinci anılan yapı ise yavruya ait olup plasentasyon sonunda karşı karşıya gelen dokular olarak kabul edilir (Hassa ve Aştı 1997).

1.3. Maternal İmmün Toleransın Gelişimi

Gerçek anlamda maternal tolerans embriyo ve uterus'un doğrudan teması olan implantasyona dek şekillenmez. İmplantasyon aşamasında ise embriyo maternal dokularla doğrudan doğruya temas halindedir. Bu olay immünolojik yönden de oldukça komplekstir. Önce zona pellüsida açılır ve trofoblastlar ortaya çıkar. Bu esnada oldukça hassas bir yapıda olan embriyo henüz endometriyum'a tutunmamış ve aynı zamanda da kendisine zarar verebilecek sitokinler üreten ve "düşmanca" davranan maternal immün sistem hücreleri ile ilk kez karşı karşıya gelmiştir. İmmünolojik yönden ele alındığında en hassas evre bu evredir (Barnea 2004).

İleride ayrıntılarına değinilecek olan maternal immün tolerans üzerinde etkili olan faktörler esas olarak anneye ait faktörler ve yavruya ait faktörler olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir.

1.4. Anneye Ait Faktörler

Daha önceki çalışmalar maternal immün toleransın gelişimi başlangıçta anneye ait faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir. İmmünosüupresif etkiye sahip progesteron hormonu, ovaryumlardan siklusun sekresyon fazında salgılanmaya başlar. İmplantasyon ise yangısal sitokinlerin salınmasıyla karakterize olup, söz konusu bu sitokinler başta nötrofiller ve makrofajlar olmak üzere diğer lökositlerden de salıverilir. Bu şekilde anne implantasyona hazırlanmış olur (Hunt 2006).

Daha köklü değişimler uterus mukozasında olur. 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 mukozası hücresel yönden yeniden düzenlenir. İnsanlarda uterus mukozasında bu dönemde uterus doğal katil hücreleri (uNK) toplam lökositlerin %20-40'ını 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. Makrofajlar ise yine insanda %10–20 oranında doğuma kadar varlıklarını sürdürürler (Hunt 2006).

1.5. Yavruya Ait Faktörler

Özellikle trofoblastların ürettikleri bazı immünosüpresantlar doğal immün sistemin hücrelerini ortama çekerler. Çözünmüş immünosüpresantlardan etki mekanizması en iyi bilineni Human Lekocyte Antigen-G (HLA-G) molekülüdür (Hunt 2006).

Yapılan çalışmalar embriyonun bizzat kendisinin gebeliğin başlangıcında aktif rol oynadığını gösterir niteliktedir. Embriyo ve salgıladığı ürünler başarılı bir gebelik için gerekli maternal ortamı yarattığı tahmin edilmektedir. Bu tahmin aşağıdaki gözlemlerle de desteklenmektedir (Barnea 2004).

—Her şeyden önce nakledilen embriyolar immünolojik olarak farklı olmalarına rağmen hiçbir zorlukla karşılaşmadan implante olabilmektedirler.

—İmplantasyon bölgesi her zaman uterus olmamakta; ovaryumlar, ovidukt ya da karın boşluğunda da implantasyon şekillenebilmektedir (Ektopik gebelik).

—Belli bazı şartlarda bir türden elde edilen bir embriyo bir başka türe nakledilebilmekte ve yavru doğabilmektedir (Tek tırnaklılarda olduğu gibi)

—Sadece canlı embriyolar implante olabilmektedir.

—Çok sayıda embriyonun implantasyon olasılığı tek embriyolu gebeliklerdekinden daha yüksek olmaktadır.

Özellikle implantasyonun başlangıç sürecinde salgılanan "pre-implantation factor-PIF" sinyali başarılı bir gebelik için gerekli olup; invitro fertilizasyon (IVF) sonrası ilk 4 gün içinde maternal serumda tespit edildiğinde implantasyon başarı oranının %70 olduğunu, edilemediğinde ise başarısızlık ihtimalinin %97 olduğunu

göstermesi açısından oldukça önemlidir. PIF aktivitesi, düşük yapan bayanlarda hızla düşmekte ve düşükle birlikte tespit edilemez seviyeye gelmektedir. Söz konusu faktörün aktivitesi insanlara benzer biçimde at, sığır, domuz ve farelerde de gözlenmektedir (Barnea 2004).

Sonuç olarak, embriyo ileride ayrıntılarına değinileceği gibi ya annenin immün sistemini zayıflatarak ya da annenin immün sisteminden kaçacak stratejiler geliştirerek adeta kendi kaderini kendisi belirlemektedir (Pearson 2002, Barnea 2004).

1.6. Maternal Toleransta Rol Oynayan Mekanizmalar

Söz konusu mekanizmaları birkaç alt başlık halinde sıralayabiliriz (Straszewski-Chavez ve ark 2005).

1. Non-klasik insan lökosit antijenlerinin varlığı
2. Fas-Fas-Ligand etkileşimi
3. Komplement düzenleyici proteinler
4. Sitokin etkileşimi
5. Düzenleyici hücreler
6. Hormonal mekanizmalar
7. Triptofan metabolizması

1.6.1. Non-klasik İnsan Lökosit Antijenlerinin Varlığı

Bilindiği gibi yüksek yapılı organizmalarda doku uyum antijenleri kompleksi olarak bilinen glikoprotein yapısında iki tip antijen grubu söz konusudur. Bunlar Major Histocopatability Complex I ve II (MHC-I ve MHC-II) olarak adlandırılırlar. MHC-I tüm çekirdekli hücrelerde bulunurken, MHC-II sadece antijen sunan hücrelerde yer alır. Ancak, plasentada bu durum oldukça farklıdır. Zira memeli gebeliği bir bakıma doku nakline benzer ve plasentada yer alan hücreler yarı yarıya yabancı genleri içerirler. Gerçekte MHC-II genleri plasentanın hiçbir bölgesinde tespit edilmezken, MHC-I genleri insanlarda özellikle endometriyumla temas halinde olan sinsityo-trofoblastlar ve intersitisyel trofoblastlarda gözlenmez. Bununla

birlikte, intersitisyel trofoblastlar non-polimorfik HLA-G olarak adlandırılan bir antijeni yüzeylerinde taşırlar ki bu da uNK'ların saldırılarının önüne geçmede son derece kritik bir öneme sahiptir (Arvola 2001). Trofoblastlar yanında bazı tümör hücrelerinde de bulunan HLA-G antijeni, 3 farklı yoldan etkileyerek immün toleransın gelişmesine katkı sağlar (Carosella ve ark 1999). Bunlar;

1. CD8+ sitotoksik T-lenfositlerinin sitolitik aktivitesini baskılayarak
2. T-lenfositlerinin çoğalmasını baskılayarak
3. NK'ların neden olduğu sitolizi baskılayarak.

Bu mekanizmalar arasında, trofoblastların özellikle uNK'ların saldırılarından kurtulabilmeleri son derece önemlidir. Zira gebeliğin erken dönemlerinde uterus endometriyumu uNK'lar tarafından istila edilmiştir. Burada uNK'ların yüzeylerinde bulunan ve Killer Inhibitory Receptor (KIR) ya da Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR2DL4) adı verilen reseptör grubuna HLA-G'lerin bağlanması uNK'ların sitolitik aktivitelerini baskılar (Hunt ve Orr 1992, De Lemos 2003, Gomez-Lorenzo ve ark 2003, Hunt ve ark 2005).

HLA-G'nin bağışıklık sistemini düzenleyici etkileri Çizelge 1.1'de kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. HLA-G'nin bağışıklı sistemini düzenleyici etkileri (Hunt ve ark 2005).

Hedef hücre	Fonksiyonel etki
NK	Sitolitik saldırılarını engeller
	Göçlerini engeller
	Apopitozis'e sevk eder
Kan kökenli mononükleer hücreler	Düzenleyici sitokin üretimini artırır
Sitotoksik T-lenfositler	Sitolitik saldırılarını engeller
	Apopitozis'e sevk eder
	CD_8 ekspresyonlarını azaltır
Yardımcı T-lenfositler	Çoğalmalarını yavaşlatır
Monosit/makrofajlar	TGF-B_1 üretimini artırır
Dendritik hücreler	Uyarılma düzeylerini düşürür
	Olgunlaşma süreçlerini bozar

1.6.2. Fas-Fas-Ligand Etkileşimi

Fas Ligand (FasL), lenfosit yüzeyinde bulunan Fas (CD95) molekülüne bağlanarak onların apopitozis sürecine girmelerine neden olur (Arvola 2001).

1.6.3. Komplement Düzenleyici Proteinler (Complement Regulatory Proteins, CRPs)

Trofoblastların yüzeyinde yer alan Decay Accelerating Factor (DAF-CD55) ve Membrane Co-factor Protein (MCP-CD46) gibi düzenleyiciler, komplement aktivitesini baskılarlar. Yine trofoblastların yüzeyinde yer alan CD59 adı verilen komplement düzenleyicisi de hücre yüzeyinde sitolitik membran saldırı komplekslerinin oluşumunu engeller (Bulla ve ark 2004). İnsanlardaki bu komplement düzenleyici proteinlere benzer şekilde işlev gören bir protein de farelerde Crry9 geni tarafından kodlanır. Yapılan deneysel çalışmalarda Crry9 geninin aktivitesinin ortadan kaldırılmasının plasental hücrelerde komplement birikimine ve yangıya neden olduğu tespit edilmiştir (Arvola 2001).

1.6.4. Sitokin Etkileşimi

Gebelik süresince çeşitli hücrelerden salıverilen sitokinler arası etkileşim de maternal immün sistemin kontrolünü sağlayarak embriyonun yaşamını devam ettirmesinde önemli rol oynar. Tip-1 yardımcı T-lenfositlerden (Th_1) salıverilen intrelöykin-2 (IL–2), gama-interferon (IFN-gama) ve alfa-Tümör Nekrozan Faktör (TNF-alfa) embriyo için zararlı olan sitokinler grubuna girerken; Th_2'lerden salıverilen IL–4, IL–5, IL–6, IL–10 ve Leukemia Inhibitory Factor (LIF) gebelik yararına çalışan sitokinlerdir (Kannelopoulos-Langevin ve ark 2003, Bulla 2004). Tekrarlayıcı spontan düşüklerde (Recurrent Spontan Abortus-RSA) annenin kanında Th_1 aktivasyonunun göstergesi olan IL–2 yüksek düzeyde bulunurken; sağlıklı bir hamilelik dönemi geçiren annelerin kanlarında ise IL–4 ve IL–10 düzeyi oldukça yüksek bulunmuştur. Hatta RSA'lı annelerden elde edilen süpernatantların gebe farelere verilmesi durumunda bu farelerde önemli oranda embriyo ölümleri tespit edilmiştir (De Lemos 2003).

Plasentada sitokin sentezleyen hücreler sadece lenfositler değildir. Trofoblastlar da immün sistemi baskılayan Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta) ve IL–10 üretimine katılırlar. Yine erken embriyonik dönemde trofoblastlarca sentezlenen IFN-tau'da dolaylı yollardan PGF_2-alfa sentezini durdurur ve korpus luteum'un ve dolayısıyla da progesteron'un devamlılığını sağlayarak gelişmekte olan embriyonun yaşama şansını artırır (Güzeloğlu ve ark 2007).

1.6.5. Düzenleyici Hücreler

Yukarıda da değinildiği gibi maternal immün toleransta anneye ait bazı hücreler salgıladıkları ya da bir diğer hücreye salgılattıkları sitokinler aracılığıyla etkili roller üstlenmişlerdir.

Makrofajlar

Alternatif makrofajlar grubu adı da verilen makrofajlar, hücresel aracılı immüniteyi baskılayan IL–10 ve prostaglandin E_2 salgılamaktadır (De Lemos 2003, Bulla ve ark 2004).

İri granüllü lenfositler (Large granular lymphocytes-LGLs)

Sıçan, fare ve hamster'larda granüllü metriyal bez hücreleri olarak da anılan bu hücreler, insan ve maymunlarda endometriyal stromal granülositler ya da "Körnchenzellen-K hücreleri" olarak isimlendirilirler (Dietl 2001). Söz konusu bu hücrelerin gebeliğin ilk 3 aylık döneminde desidua'da arttığına dair bulgular vardır. Koç ve Kanter (2000)'in gebe sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada ANAE pozitivitesi gösteren ve uterus doğal katil hücreleri (uNK) olarak bilinen hücrelerin implantasyonun ikinci gününden itibaren arttığı ve 6. günde en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmektedir. Uterus doğal katil hücreleri (uNK) olarak da bilinen ve sıçanlarda implantasyonun ilk üç gününde desidual alanda belirgin bir biçimde artan $CD_{56}^{+}CD_{16}^{-}$ NK'ların aktivitesi tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olsa da diğer NK'lar gibi tümöral hücrelere saldırmakta ancak tümör hücrelerini andırır biçimde yayılan trofoblastlara karşı daha toleranslı davranmaktadırlar. Zaman zaman artan IL–2 seviyesine paralel olarak aktivitelerini artıran LGL'lerin, trofoblastların uterus

mukozası içerisinde aşırı çoğalmalarını ve yayılmalarını kontrol ettikleri düşünülmektedir (Bulla ve ark 2004).

Tip-2 yardımcı T-lenfositler (Th_2)

Bu hücrelerin üretmiş olduğu IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13, özellikle tip-1 yardımcı T-lenfositlerinin ürettiği sitokinler olan IL-2, TNF-beta ve IFN-gama üzerinde etkili olarak hücresel aracılı immün sistemin aktivasyonunu baskılar. Zira Th_1'lerin ürettikleri sitokinler sitotoksik T-lenfositlerinin sitolitik aktivitesini artırarak fötüs'a zarar verirler (Padua 2004).

Düzenleyici T-lenfositler (T_{reg})

Diğer hücrelerin proliferatif tepkilerini ve sitokin üretimlerini baskılayan bu hücreler $CD_4^+CD_{25}^+$ olup; fötal-maternal ara yüzde özellikle IL–10 ve TGF-beta gibi immünosüpresif sitokinleri üreterek ya da ayrıntısına ileride değinilecek olan triptofan metabolizmasını devreye sokarak etkilerini göstermektedirler (Padua 2004, Lewkowicz ve ark 2005). Gebelik süresince kanda, desidua dokusunda ve uterus lenf yumrularında sayıları artan bu hücreler, son yıllarda üreme problemlerinde terapötik amaçlı olarak kullanılması planlanan hücrelerin başında gelmektedirler (Guerin ve ark 2009).

1.6.6. Hormonal Mekanizmalar

Östrojen, progesteron ve testosteron gibi steroid hormonların lökosit çoğalmasını baskılayıcı etkilerinin olduğu; hatta doza ve zamana bağlı olarak mononükleer hücreleri apoptozis'e sevk ettikleri bilinmektedir (Lutton ve Callard 2006). Özelikle insanlarda tekrarlayan düşük vakalarında progestreon takviyesi ile tedavi yöntemlerinin günümüzde sıklıkla tercih edilen bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Szekeres-Bartho ve Balasch 2008).

Üreme hormonlarının immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri otoimmün hastalıkların gebelikteki seyirlerinde de kendini açıkça belli eder. Multiple skleroz (MS) ve romatoid artrit (RA) gibi bazı hastalıklar Th_1'lerin sentezlemiş olduğu

sitokinlerle ilişkili iken; sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalığında Th_2'lerin sentezlediği sitokinler etkilidir. Progesteron hormonu hamilelik sürecinde Th_1'lerin aktivasyonunu baskılarken Th_2'lerin aktivasyonunu artırmaktadır. Bunun bir sonucu olarak hamilelik esnasında MS ve RA'lı hastalarda belirgin bir iyileşme fark edilirken; SLE'li hastalarda durum biraz daha ağırlaşmaktadır (Lutton ve Callard 2006).

1.6.7. Triptofan Metabolizması

Triptofan, memeli organizmaların sentezleyemediği "esansiyel" bir amino asittir. T-lenfositleri çoğalabilmek için belli düzeylerde lokal triptofan konsantrasyonuna gereksinim duyarlar. Özellikle sinsityo-trofoblastların fötal-maternal ara yüzde lokal olarak sentezleyerek ortama verdikleri indolamin 2,3 dioksijenaz (IDO) enzimi lokal triptofan konsantrasyonunu düşürerek bölgede yer alan T-lenfositlerinin çoğalmasını yavaşlatır (De Lemos 2003, Trowsdal ve Betz 2006).

Yukarıda bahsedilen tüm bu mekanizmaların yanı sıra son yıllarda önemi gittikçe artan ve üzerinde en çok çalışılan nitrik oksit (NO) molekülünün de maternal toleransta rol aldığı ileri sürülmektedir. Özellikle IDO ve Fas/FasL mekanizmalarında düzenleyici bir fonksiyon üstlenen NO'nun Th_1 ve Th_2 hücreleri arasındaki dengeyi de etkilediği bildirilmektedir (Hernandez ve ark 2004).

1.7. Plasenta Tiplerine Göre Maternal Tolerans

Her türün kendine ait bir üreme stratejisi ve buna bağlı olarak da plasentasyon tipi vardır. Daha önce de değinildiği gibi bu farklılıklardan en belirgin olanı trofoblastların uterus'u istilasıdır. Bu farklılık çok geniş bir yelpazede kendini gösterir. Öyle ki bazı türlerde bu istila hiç şekillenmezken (epitelyo-koryal plasenta), bazı türlerde çok yaygın bir invazyon söz konusudur (hemo-koryal ve hemo-endotelyal plasentalar). Dahası bu son plasenta tiplerinde trofoblast hücreleri anneye ait kan damarlarının endotel katmanına kadar ulaşarak maternal kan ile doğrudan temas ederler (Moffet ve Loke 2006).

1.7.1. Epitelyo-koryal Plasentasyonda İmmün Reaksiyon

Tek tırnaklılar, domuz ve ruminantlarda görülen bu tip plasentasyonda uterus yüzey epiteli ile temas eden allanto-koryonik trofoblastlar MHC-I ve MHC-II moleküllerini eksprese etmezler. Bununla birlikte gerek belirli bölgeler ve gerekse de gebelik dönemleri dikkate alındığında türe özel farklılıklar söz konusudur. Örneğin, kısraklarda gebeliğin devamı, gebeliğin ilk 2–3 haftası boyunca varlığını sürdüren aselüler, müsin benzeri glikoprotein yapıdaki kapsüle bağlıdır. Kapsülde yer alan proteinler bu süreçte değişime uğrasalar da genel olarak söz konusu bu kapsülün görevinin, embriyonun uterusa tutunmasına kadar geçen süreçte embriyoyu beslemek ve onu maternal immün sistem hücrelerinin saldırılarından korumak olduğu ileri sürülmektedir (Quinn ve ark 2007). İlerleyen haftalarda MHC-I-pozitif trofoblastlar uterus mukozası içine doğru yayılarak geçici endometriyal çukurcukları oluştururlar. Bu yapıların çevresi lenfositlerce çevrelenmiştir. Buna ek olarak, atlarda paternal MHC antijenine karşı maternal antikor reaksiyonu sıklıkla şekillenirken, sitotoksik T-lenfosit reaksiyonu da paternal alloantijenlere karşı şekillenir. Ancak bu tepkiler gebelik öncesi dönemdeki tepkilerle karşılaştırıldığında oldukça zayıftır ve fötüs'a karşı asimetrik immün reaksiyon olarak tanımlanır (Moffet ve Loke 2006).

Sığırlarda plasentomlar arası bölge ile plasentanın geçiş bölgelerinde yer alan trofoblastlar membranda lokalize olan immünreaktif MHC-I proteinlerini gebeliğin son üç aylık dönemi boyunca taşılar. Buna karşın, karunkular kript hücreleri ile yakın teması olan kotiledonar villuslardaki trotrofoblast hücreleri hiçbir dönemde MHC-I proteini taşımazlar (Davies 2007). Koyunlarda ise çift çekirdekli trofoblast hücreleri uterus yüzey epitelleri ile birleşerek "synepithelio-chorial" plasentasyon kavramını ortaya çıkarırlar. Çift çekirdekli bu trofoblast hücreleri MHC-I molekülünü eksprese etmelerine karşın, iki allojenik arasındaki birleşmenin immünolojik yönden ne şekilde etkili olduğu henüz bilinmemektedir (Moffet ve Loke 2006).

Epitelyo-koryal plasentaya sahip türlerde plasenta ve uterus epiteli arasında basit bir birliktelik söz konusu olup; annenin immün sisteminde çok ciddi bir reaksiyon şekillenmez. Bir başka deyişle bu birliktelik kommensalizm tarzda bakteri-konakçı birlikteliğine benzer. Fötüs uterus'a zarar vermeden yerleşmiştir. Bu tip plasentalarda mukozal yüzeylerde intraepitelyal granüllü lenfositlere sıkça rastlansa

da endometriyum içerisinde NK'lar ancak belirli bölgelerde yer alırlar. Bu da göstermektedir ki, trofoblast invazyonunun ve desidualizasyonun şekillendiği plasenta tiplerine nazaran epitelyo-koryal plasentasyonlarda farklı bir immün tepki söz konusudur (Moffet ve Loke 2006).

1.7.2. Hemo-koryal Plasentasyonda İmmün Reaksiyon

İnsan ve primatlarda görülen bu plasenta tipinde maternal immün tolerans gelişimi hakkında ayrıntılı bilgiler yukarıda verilmiştir.

1.7.3. Hemo-endotelyal Plasentasyonda İmmün Reaksiyon

Rodentlerde görülen bu plasenta tipi bazı kaynaklarda insanlardaki gibi hemo-koryal plasenta olarak adlandırılır. Ancak gerek insan plasentası ve gerekse de kendi aralarında bazı farklar söz konusudur. Özellikle farelerde uNK'ların uterus arterlerinin mediya katmanında da yer almaları bu hücrelerin kan akımını düzenlediğini akla getirmektedir (Moffet ve Loke 2006).

1.8. Alfa Naftil Asetat Esteraz Enzimi

Alfa-naftil asetat esteraz (ANAE) lizozomal bir enzimdir (Knowles ve ark 1978, Zicca ve ark 1981). Pratikte, gerek doku kesitleri ve gerekse de perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırdedilmelerinde yararlanılan ANAE (Mueller ve ark 1975, Ramos ve ark 1992), T-lenfosit olgunlaşması sırasında son dönemde kazanılan bir enzimdir (Basso ve ark 1980). Nitekim Çelik ve ark (1992)'nın sığır fötüslarında yapmış oldukları bir çalışmada, fötüsların perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlanılmış, gebeliğin ilerlemesi ile birlikte pozitif lenfosit oranlarının da arttığı tespit edilmiştir. Öteki esteraz grubu enzimler gibi, aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır (Mueller ve ark 1975). Başta insan olmak üzere (Çelik ve ark 1991), sığırlar (Kajikawa ve ark 1983), tavuklar

(Maiti ve ark 1990), köpekler (Wulff ve ark 1981) ve farelerde (Mueller ve ark 1975) T-lenfositlerin ayrımında yararlanılan bir enzimdir.

ANAE pozitivitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan perifer kan lenfositlerinde iki farklı pozitivite tipi tespit edilmiştir (Higgy ve ark 1977, Zicca ve ark 1981, Çelik ve ark 1991). Bunlardan ilki, bir ya da birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tarzındaki pozitivite (Dot Like-Positivity Pattern), T-lenfositlere özgü olan pozitivitedir (Higgy ve ark 1977, Wulff ve ark 1981, Zicca ve ark 1981, Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991). İkinci pozitivite tipi ise ince-granüler boyanmadır (Fine Granular Positivity Pattern). Bu tarz boyanmanın "Null Cells" olarak da adlandırılan hücrelere özgü olduğu çeşitli araştırıcılar tarafından ifade edilmektedir (Higgy ve ark 1977). B-lenfositlerinin ise ANAE negatif reaksiyon verdiği bildirilmektedir (Mueller ve ark 1975, Higgy ve ark 1977, Çelik ve ark 1991). Monosit ve makrofajlarda ise sitoplazmada diffüz ve güçlü bir pozitivite gözlenmektedir (Higgy ve ark 1977, Kajikawa ve ark 1983, Çelik ve ark 1991).

Lenfositlerde tespit edilen pozitivite tipleri göz önüne alınarak, lenfoid dokularda yapılan çalışmalarda; ANAE pozitif hücrelerin, lenf yumrularında parakortikal (Mueller ve ark 1975, Wulff ve ark 1981) ve interfoliküler bölgelerde, tonsillalarda interfolliküler bölgelerde (Knowles ve Holck 1978), dalakta arteriya sentralis'i saran periarteriyoler lenfoid kılıfta (Mueller ve ark 1975) ve timusta medulla bölgesinde lokalize oldukları tespit edilmiştir. Lenf yumruları ile dalak ve tonsillaların lenf foliküllerinin germinal merkezlerindeki lenfositler ile kortikal timositler ANAE negatif reaksiyon vermektedirler (Mueller ve ark 1975, Wulff ve ark 1981).

Farklı türlerin perifer kanlarındaki ANAE pozitif lenfosit oranları ise oldukça değişiklik göstermektedir. İnsanlarda %69-%75 (Ranki 1978, Çelik ve ark 1991), köpeklerde %56-%78 (Wulff ve ark 1981), tavuklarda %35 (Pruthi ve ark 1987) ve sığırlarda ise %47,7 (Kajikawa ve ark 1983) oranında ANAE pozitif lenfosit bulunmaktadır.

1.9. Asit Fosfataz Enzimi

Asit fosfataz (ACP-az), miyelositler, polimorf nükleer lökositler, lenfositler, plazma hücreleri, megakaryositler, kan pulçukları ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinde bulunan lizozomal bir enzimdir (Catowsky 1981). Özellikle makrofajlar çok güçlü ACP-az aktivitesi gösterirler (Li ve ark 1972). Goldberg ve Barka (1962), insan perifer kan frotilerinde, en güçlü ACP-az aktivitesine monosit ve eozinofillerde rastlamışlar; bazofillerin ise negatif reaksiyon verdiklerini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada (Kaplow ve Burstone 1964) ise insan perifer kanındaki lenfositlerin birkaç adet iri granülden oluşan granüler enzim pozitivitesi gösterdikleri, monositlerin ise soluk ve sitoplazmaya dağılmış haldeki ince granüllerden oluşan diffüz pozitivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Yang ve ark (1982)'nın neoplastik ve non-neoplastik insan lenf yumrularında yapmış oldukları bir çalışmada, ACP-az için biri hem lenf yumrusu ve hem de kan frotilerindeki T-lenfositlerinde gözlenen globüler pozitivite ile sadece lenf yumrularındaki T-lenfositlerinde tespit edilen granüler pozitivite tiplerini gözlemişlerdir.

Kobay, fare ve ratların timositlerinde, bir ya da iri birkaç granül halinde veya sitoplazmanın bir kutbunda toplanmış küçük granüller tarzındaki ACP-az pozitivitesi gözlenirken; dalak ve lenf yumrularındaki lenfositlerde ise diffüz non-granüler pozitivite gözlenmektedir (Tamaoki ve Esner 1969, Seymour ve ark 1978).

1.10. Mikronükleuslar

Mikronükleuslar (MN) bölünen hücrelerde metafaz-anafaz geçişi aşamasında oluşan ve hücre çekirdeğinin en fazla üçte biri kadar büyüklüğe sahip, sitoplazmada oval-yuvarlak olarak göze çarpan yapılardır. Kromozomların kutuplara çekilmeleri esnasında meydana gelen ve kromozom kaybı ya da kırığına neden olan bir olay sonucu sentromersiz bir parçanın kardeş hücreye geçememesi sonucu oluşan bu

yapıların tanımlanmasında bazı önemli kriterler dikkate alınmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir (Müller ve Streffer 1994).

1. MN'un çapı esas çekirdeğin çapının 1/4'ünden daha azdır.
2. MN'ler ana çekirdeğe bağlı değildirler.
3. MN'ler yuvarlak ya da oval şekillidirler.
4. MN'ler boya partiküllerinde olduğu gibi refraktil değildir ve bu nedenle artefaktlardan kolayca ayrılabilirler.
5. MN ana çekirdeklere dokunabilir fakat üstüne oturmazlar. Ayrıca MN sınırı ana çekirdeğin sınırından belirgin olarak ayrılmış olmalıdır.
6. MN'ların boyanma yoğunlukları ana çekirdeğinkinden nispeten daha koyudur.

MN'lar sadece, telofazda yeni oluşan hücre çekirdeklerinden ayrılan asentrik parçalar (asentrik fragmanlar, AF) tarafından oluşturulabildiklerinden, görülmeleri için hücre bölünmesi gerekli bir şart olup; görülme frekanslarının, kromozom kırığına yol açan ajanla muameleyi takiben artması beklenir. Zira mitoz bölünmeyle gittikçe daha fazla sayıda kusurlu hücrenin oluşması beklenir (Müller ve Streffer 1994).

MN frekansının, gerek *in vivo* ve gerekse de *in vitro* yöntemlerle belirlenmesi, genotoksik hasarların tespitinde önemli ipuçları vermektedir. MN sayımı, lenfosit ve fibroblast kültürleri ile epitel hücresi döküntülerinde yapılabilmektedir. Hatta doku kesitlerinde de MN sayımı yapılan çalışmalar vardır (Campos ve ark 2008). Standart MN indüksiyon testinde; etkisi incelenecek olan madde hücre kültürüne ilave edilir. Takiben, mitojen (örneğin fitohemaglütinin, PHA) ilavesiyle mitoza sevk edilen hücreler, mitozun karyokinez aşamasını tamamladıktan sonraki kritik bir evrede, hücre kültürü vasatına sitokinezi (kardeş hücrelerin çekirdeklerinin şekillenmesini takip eden sitoplazma bölünmesi) durduran bir maddenin (Örneğin; cyto chalacin-B, Cyt-B) ilave edilmesinden sonra iki çekirdekli (dikaryotik) hücreler oluşturulur. Böyle hücrelerde yapılan incelemede oluşan MN'lar daha kolayca tanınabilirler (Müller ve Streffer 1994).

.

MN testi bir takım toksik maddelerin ve ilaçların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Pitarque ve ark (2002) ayakkabı fabrikasında çalışan işçilerin perifer kan lenfositlerinde MN sıklığını, fabrikada organik solventlere maruz kalmayan kontrollerden daha yüksek bulurlarken; Doğan (2009), sigara içenlerin dil ve yanak mukoza epitel hücrelerindeki MN sıklığını içmeyenlere kıyasla daha yüksek olduğunu tespit etmiştir. Masjedi ve ark (2000) ise tüberküloz tedavisi gören hastaların perifer kan lenfositlerindeki MN sıklığını tedavi öncesi döneme kıyasla daha yüksek bulmuşlardır.

MN testi perifer kan eritrositleri ile lenfositlerine uygulanabildiği gibi kordon kanı lenfositlerine de uygulanabilir (Batista-Gonzales ve ark 2006). Özellikle gebelik döneminde alınan bazı ilaç ve hormonların gerek anne ve gerekse bebek üzerindeki genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MN testi sık başvurulan bir yöntemdir (Milosevic-Dordevic ve ark, 2003Grujicic ve ark 2008).

MN testi, çeşitli dokulara ve epitel hücrelerine de uygulanarak, kanser riski taşıyan hastaların belirlenmesine de yardımcı olan bir testtir. Campos ve ark (2008) PAP smear ile elde ederek MN testi uyguladıkları servikal epitel hücrelerindeki MN sıklığını, servikal kanser riski taşıyan (sigara içen, çok eşli, cinsel yoldan bulaşan bir hastalık geçmişi olan, vajinitisli ya da servikal intraepitelyal neoplazi tanısı konmuş) bayanlarda, risk faktörlerini taşımayanlara oranla daha yüksek bulmuşlardır. Gandhi ve ark (2003)'da ürotelyal ve servikal hücrelerde yaptıkları MN testi sonucunda, kanserli hastaların MN sıklığını daha yüksek bulmuşlardır. Araştırıcılar (Gandhi ve ark 2003), MN sıklığının hastanın yaşı, kanserin evresi, gebelik sayısı, evlenme yaşı, sosyo-ekonomik statü gibi faktörlerden de etkilendiğini ortaya koymuşlardır.

1.11. Çekirdekçik Organize Bölgeleri

Çekirdekçikler, ribozomal alt birimlerin sentezlediği çekirdek bölgeleridir. Ribozomal RNA (rRNA)'ları sentezleyen genler (rDNA), canlı türlerinde belirli kromozomlarda taşınırlar. Bunlar insanlarda 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomlardır. Bu kromozomların rRNA sentezleyen bölümleri, interfazdaki bir hücrenin çekirdeğinde belirli bölgelerde toplanır ve çekirdekçik olarak bilinen koyu bölgeleri

oluştururlar. Buna göre DNA'nın rRNA sentezleyen genlerini içeren ve çekirdekçiği oluşturan bölgeleri *nucleolus organizer regions (NOR)* olarak adlandırılır (Masabanda ve ark 2004, Kaya 2005, Aydın ve Çelik 2005).

Genel olarak nükleolar organizasyon, ribozom biyogenezisinde 3 temel olay arasında bir takım ilişkilere işaret eder. Bunlar, pre-ribozomal parçacıkları üreten rDNA genlerinin transkripsiyonu, söz konusu bu pre-ribozomların olgunlaşması ve olgun ribozomal parçacıkların çekirdekçikten salıverilmesi olaylarıdır. Bu anlamda çekirdekçiğin yapısal morfolojisi ve boyutları, başta protein sentezi olmak üzere hücresel aktivitenin hassas bir belirleyicisi olarak kabul edilebilir (Lafarga ve ark 1989).

Gümüşleme metoduyla NOR'ların boyanması (*Silver Staining Nucleolus Organizer Regions, AgNORs*) sırasında aktif olarak transkripsiyon yapan NOR'lar ve bu nedenle de rDNA bölgeleri de boyanır. Bu nedenle aktif olarak çoğalan hücrelerdeki NOR'lardaki genlerin ekspresyonunda önemli bir artış olmaktadır. Gerçekte gümüşle boyanan yapılar bu bölgelerdeki asidik proteinlerdir (Lee ve ark 1999).

AgNOR'ların çekirdekteki lokalizasyonları da farklılıklar gösterebilir. Özellikle merkezi sinir sistemindeki nöronlar, büyüklük ve dolayısıyla da çekirdek büyüklükleri bakımından birbirlerinden oldukça farklı hücreler oldukları için, AgNOR yerleşimleri de bu hücrelerde farklılıklar arz eder. İnsanlarda yapılan bir çalışmada (Manuelidis 1984) iri nöronlarda merkezi yerleşimli 1–2 adet AgNOR varken, beyinciğin *stratum granulosum* katmanını oluşturan küçük nöronlarda birkaç adet küçük ve periferal yerleşimli AgNOR bulunduğu bildirilmektedir.

AgNOR parametrelerinden, çoğunlukla kanser vakalarında yararlanılmıştır (Hubbell ve Hsu 1977, Derenzini ve ark1989, Hoyo ve ark 1993, Lee ve ark 1999, Quinones-Hinojosa ve ark 2005). Kötü huylu tümörlerin, iyi huylu tümörler ile köken aldıkları sağlıklı dokulardan daha fazla AgNOR'a sahip oldukları tespit edilmiştir (Duchrot 1990, Kanitakis ve ark 1992). Zira Karademir ve ark (1996) AgNOR boyama metodunun tümörlerin malignitelerinin belirlenmesinde ve

derecelendirilmesinde kullanılabileceği gibi hastalığın prognozu ve tedavi süreçlerinin belirlenmesinde de faydalı olabileceğini bildirmektedirler.

AgNOR sayıları, büyüklükleri ve AgNOR alanı / Çekirdek alanı oranı da türlerde ve aynı türün farklı dokularında değişiklik gösterir. Bu parametrelerin, hücrelerin çoğalma aktiviteleri ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Zaczek ve ark 1992). Bukhari ve ark (2007) özellikle merkezi sinir sistemi tümörlerinde AgNOR'un boyut ve dağılımının sayıdan daha önemli bir kriter olduğunu bildirirlerken, Chappard ve ark (1998) insanlarda viral kaynaklı bir kemik hastalığı olan Paget hastalığında osteoklastların çekirdeklerinde yer alan ortalama AgNOR sayısının 2,12'den 6,8'e kadar artabildiğini, ancak bu artışın osteoklastlardaki proliferatif aktiviteyi değil ribozom sentezindeki artışı gösterdiğini ileri sürmektedirler.

Aydın (2004) ise broyler ve yumurtacı piliçlerin bacak ve göğüs kasları ile ovaryum folikül hücrelerinde yaptığı çalışma sonucunda AgNOR boyama metodu sayesinde hayvanlarda değişik verim özellikleri hakkında önemli ipuçları elde edilebileceğini ve bu şekilde uzun süreler beklemeksizin yüksek verimli hayvanların önceden tespit edilip seleksiyona tabi tutulabileceğini ileri sürmektedir. Zira verim performansının ilgili dokuları oluşturan hücrelerde ribozom ve protein sentezinin artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Genetik çalışmalarda kullanılan materyaller genler ve kromozomlardır. Günümüzde bu tip çalışmalar sayesinde kromozomlardaki yapısal ve sayısal bozuklukların tespiti yapılabilmektedir. Bu amaca yönelik kalitatif ve kantitatif metotlar geliştirilmiş olmakla birlikte bunlar pahalı bir donanım gerektirmektedir. Geçmiş yıllarda insanlardaki bazı kanserlerin teşhisinde, evrelerinin belirlenmesinde ve hastalığın seyri ile progronuzun takibinde kullanılan interfazdaki hücre çekirdeğindeki çekirdekçik organizer bölgelerin (NOR) gümüşleme metoduyla boyanması yöntemi, son yıllarda sitogenetik çalışmalarda kendine yer bulan önemli, basit ve ucuz bir metottur (Aydın 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda gerek sağlıklı gerekse problemli gebeliklerde annenin bağışıklık sistemi hücreleri, bunların alt tipleri ya da ilgili

sitokinler hakkında çok sayıda araştırma vardır. Bununla birlikte, bu tip çalışmalarda araştırılan verilerin elde edilmesinde kullanılan teknikler ancak iyi donanımlı merkezlerde mevcut olup; ülkemiz koşullarında oldukça yüksek sayılabilecek maddi imkânlarla sağlanabilmektedir. Bu çalışmanın amacı kısıtlı imkânlara sahip laboratuar şartlarında bile kolaylıkla uygulanabilen metotlar uygulanarak bağışıklık sistemi hakkında önemli ipuçları verecek nitelikte bulgular sağlamaktadır. Bu sayede, maliyeti yüksek ancak daha detaylı analizler gerektiren vakaların seçilmesine olanak tanınmış olacaktır. Ayrıca elde edilecek verilerin bundan sonra yapılacak olan benzeri çalışmalar için referans değerler niteliği taşıması da bu çalışmanın amaçları arasındadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışma, T.C. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 25.04.2008 tarih ve 2008/112 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi (Bkz. EK-A). Buna göre, önce EK-B'de verilen "Bilgilendirilmiş Onay Formu" ile bilgilendirilen bayanlar ve eşlerinden çalışma için gerekli izin alındı. Çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllüler EK-C'de verilen "Anket Formu"'nu doldurdurarak imzaladılar.

Çalışmada materyal olarak farklı dönemlerde (I. Trimester, II. Trimester ve III. Trimester; TRI, TRII, TRIII) sağlıklı bir gebelik geçiren 30 adet bayandan, uzman bir Jinekolog tarafından rutin tetkikler için alınan kan örnekleri ile 10 adet sağlıklı gönüllü bayandan alınan kan örnekleri kullanıldı.

2.2. Yöntem

Alınan kanlardan 7'şer adet froti hazırlandı. Bu frotilerden birisi AgNOR boyama yöntemi için kullanılırken, ikisi mikronükleus testi için modifiye May Grünwald-Giemsa boyama yöntemi, ikisi ANAE, ikisi ise ACP-az enzimi demonstrasyonları için kullanıldı. Havada kurutulan frotiler -10 ^{o}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 ve ark 2008).

2.2.1. Alfa-Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi Demonstrasyonu

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0,8 ml aseton (Merck) içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate, N–8505-Sigma) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 2,4 ml %4'lük sodyum nitrit (S–3421, Merck) solüsyonu ile 2,4 ml pararozanilin (P–3750, Merck) (1 gr pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesi

sonucunda elde edilen 4,8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,8'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri 37 ^{o}C'de 2 saat bekletildiler. Kırmızı-kahverengi granüllerin ortaya çıkmasının ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi ve 3 kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı (Çelik ve ark 1991).

2.2.2. Asit Fosfataz (ACP-az) Enzimi Demonstrasyonu

Bu amaçla, pH'sı 5,0 olan tamponlu Michael'in Veronal-asetat solüsyonu ile, substrat olarak 1 ml N,N-dimetilformamide içerisinde çözdürülmüş 10 mg Naphthol AS-BI phosphate (N–2125, Sigma) kullanıldı. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu, 13 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 1,6 ml hekzazotize edilmiş (0,8 ml pararozanilin, 0,8 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklendi. Karışımın son pH'sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,0'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonu içerisinde kan frotileri oda sıcaklığında 2 saat bekletildiler. Hücre sitoplazmalarında spesifik kırmızı granüllerin oluşumunun ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi. Üç kez distile su ile yıkanan preparatlara %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı (Sur ve ark 2008).

2.2.3. Modifiye May-Grünwald-Giemsa Solüsyonunun Hazırlanması ve Frotilerin Boyanması

Mikronükleus (MN) sıklığı ile lenfosit oranlarının (%) belirlenmesi için modifiye May-Grünwald-Giemsa boyama solüsyonu kullanıldı. Frotiler süzülmüş May Grünwald (Merck 1424, Germany) boyasıyla 3 dakika boyandı. Süre sonunda frotiler, boya ile eşit hacimde 0,1 M disodyum sitrat/NaOH tampon solüsyonu (pH 5,2) ile muamele edildi. Frotilerin üzerinde metalik parıltı oluşuncaya kadar (beş dakikayı aşmayacak bir süre) beklendi. Daha sonra boya solüsyonu döküldü. Distile suyla 3 kez yıkanan frotiler, 0,1 M disodyum sitrat/NaOH tamponunda (pH 5,2) hazırlanan %30'luk Giemsa solüsyonuyla 20 dakika süreyle boyandı. Boyama

sonunda distile suyla iyice yıkanan frotiler seri bir şekilde saf etanolden geçirilerek ksilolde şeffaflaştırıldı ve sentetik resinle (Entelan, Merck, Germany) lamelle kapatıldı (Özparlak 2006, Doğan 2009).

2.2.4. AgNOR Solüsyonunun Hazırlanması ve Frotilerin Boyanması

AgNOR'ların belirlenmesi için gümüşleme boyama yöntemi uygulandı. Bu amaçla 2 g jelâtin %1'lik formik asit içinde çözdürüldü. Bu solüsyondan 1 hacim alınarak 2 hacim %50'lik gümüş nitrat solüsyonu (50 g gümüş nitrat, Merck 100 ml distile suda eritildi) ile karıştırıldı. Frotiler taze hazırlanan ve süzülen çalışma solüsyonu içerisinde 37 ^{o}C'de ve karanlık ortamda 20–30 dakika kontrollü olarak bekletildiler. Bu sürenin sonunda frotiler 3 kez distile suda çalkalanarak bilinen rutin işlemlerden sonra Entellan (Merck) ile kapatıldılar (Aydın 2004).

2.2.5. Preparatların İncelenmesi ve Görüntü Analiz Sistemi ile Analizleri

Enzim demonstrasyonu yapılan kan preparatlarının her birinde toplam 200 adet lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları belirlenirken, modifiye May-Grünwald-Giemsa yöntemi ile boyanan diğer kan preparatlarında lenfosit oranları (%) ile mikronükleus sıklığı tespit edildi. MN sıklığını belirlemek amacıyla tipik lenfosit morfolojisine sahip hücreler sayımlara dâhil edildi. Her örnekte toplam 1000 adet lenfosit sayılarak, bunlardaki MN sayıları belirlendi ve sonuçlar, 1000 hücre başına düşen MN olarak ifade edildi. AgNOR parametrelerinin elde edilebilmesi için her preparattan 10'ar adet lenfosit değerlendirilmeye alındı. Bu hücrelerin çekirdeklerinin alanları ve içerdikleri AgNOR'ların alan ve sayılarının tespiti IM–50 görüntü analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Hazırlanan preparatlar DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobu ile incelendikten sonra gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi.

2.2.6. İstatistikî analizler

Enzim pozitivite oranları ile lenfosit oranları Açı (Arc Sinus) dönüşüm metodu kullanılarak analiz edildiler. Bu metoda göre transforme edilen parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırmalarında SPSS 10.0 istatistik programı yardımıyla DUNCAN testi uygulanılarak değerlendirildi. Verilerin tablolaştırılmasında dönüşüm öncesi gerçek değerler kullanıldı.

AgNOR alnının çekirdek alanına oranı (%) yine SPSS 10.0 istatistik programı yardımıyla DUNCAN testi uygulanılarak değerlendirilirken; MN sıklığı ve AgNOR sayılarının istatistiki analizleri t-testi ile gerçekleştirildi.

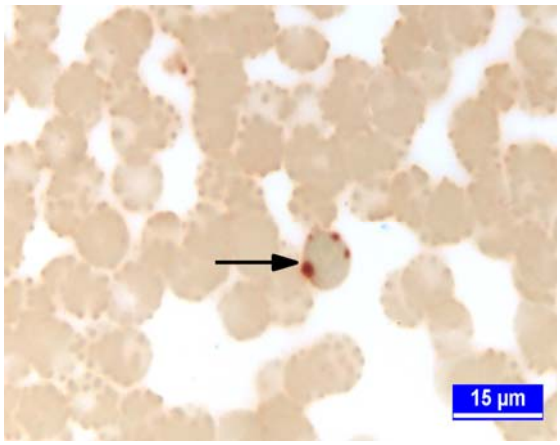
3. BULGULAR

Frotiler üzerinde yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda, perifer kan lenfositlerinin 2 farklı ANAE enzimi aktivitesine sahip oldukları gözlendi. Sayıları 1–4 arasında değişen kırmızı-kahverengi granüller içeren lenfositler T-lenfositler olarak değerlendirilirken (Şekil 3.1); sayıları 5–8 arasında değişen kırmızı-kahverengi granüller içeren lenfositler "null lenfositler" olarak değerlendirildi (Şekil 3.2). ACP-az enzimi aktivitesinin ise 1–3 adet pembe-kırmızı granül şeklinde olduğu dikkati çekti (Şekil 3.3).

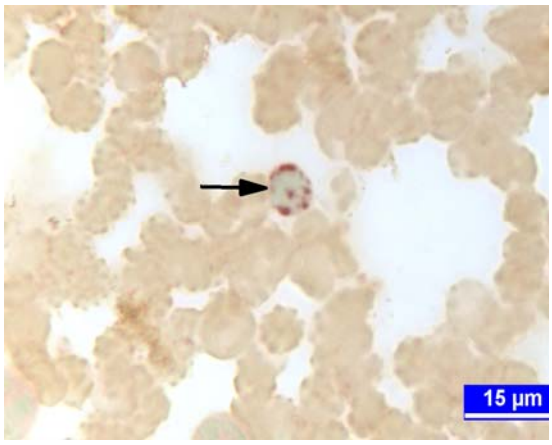
Lenfositlerde çapı ana çekirdeklerin çapının 1/4' ün den daha az olan, ana çekirdeklerden bağımsız, yuvarlak-oval şekilli, refraktilite göstermemesi ile artifaktlardan kolaylıkla ayıredilebilen ve ana çekirdeklerden biraz daha koyu boyanan yapılar MN olarak kabul edildi (Şekil 3.4).

Lenfositlerde şekilleri farklı, kahverengi-siyah lekeler halinde boyanan yapılar AgNOR'lar olarak kabul edildi (Şekil 3.5).

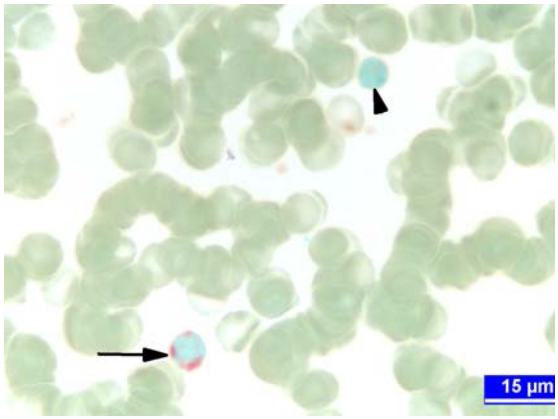
Çalışmada elde edilen perifer kan lenfosit oranları, MN sıklığı, AgNOR parametreleri ile T-lenfosit, null lenfosit ve ACP-az-pozitif lenfosit oranları Çizelge 3.1'de verilmiştir.



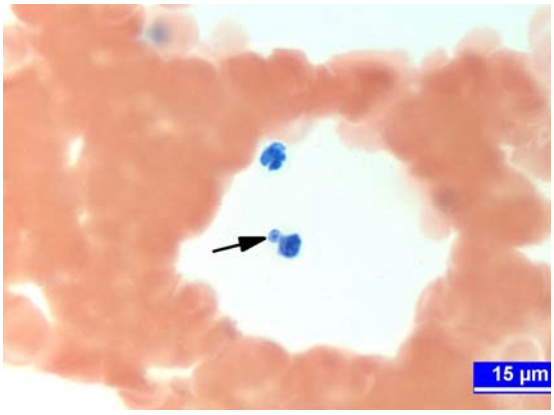
Şekil 3.1: TRI grubundan bir bayana ait perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: ANAE-pozitif lenfosit. Büyütme çizgisi: 15 µm.



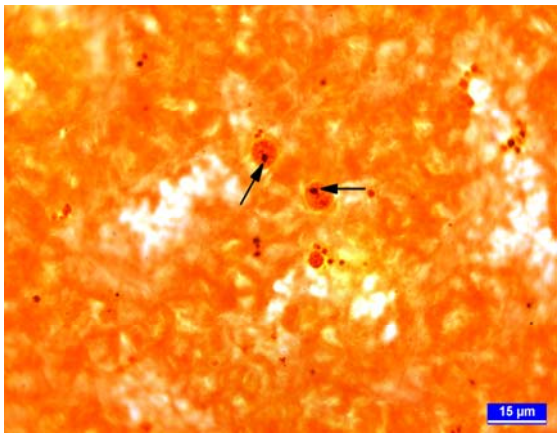
Şekil 3.2: TRI grubundan bir bayana ait perifer kan frotisinde ANAE demonstrasyonu. Ok: Çok sayıda dağınık granül içeren null lenfosit. Büyütme çizgisi: 15 µm.



Şekil 3.3: Kontrol grubundan bir bayanın perifer kan frotisinde ACP-az demonstrasyonu. Ok: ACP-az-pozitif lenfosit. Ok başı: ACP-az-negatif lenfosit. Büyütme çizgisi: 15 µm.



Şekil 3.4: TRIII grubundan bir bayanın modifiye May-Grünwald-Giemsa ile boyanan perifer kan frotisindeki bir lenfositte gözlenen mikronükleus (MN) Ok: MN. Büyütme çizgisi: 15 µm.



Şekil 3.5: Kontrol grubundan bir bayanın perifer kan frotisinde gümüşleme boyası. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. Büyütme çizgisi: 15 µm.

Çizelge 3.1.Çalışmada elde edilen ANAE- ve ACP-az-pozitif lenfosit oranları ile perifer kan lenfosit ve null lenfosit oranları; mikronükleus (MN) sıklığı ve bazı AgNOR parametreleri.

Gruplar	Perifer kan ANAE – pozitif lenfosit oranı (%)	Perifer kan Null hücre oranı (%)	Perifer kan ACP-az– pozitif lenfosit oranı(%)	Perifer kan lenfosit oranı (%)	Perifer kan lenfositlerinde Ag NOR alanının çekirdek alanına oranı (%)	Perifer kan lenfositlerinde AgNOR sayısı (çekirdek/adet)	Perifer kan lenfositlerinde mikronükleus (MN) sıklığı (1000 Hücre başına düşen MN sayısı)
Kontrol	70,00±1,6 [a]	2,00±0,51 [b]	69,9±1,84 [a]	39,4±1,21 [a]	7,39±0,28 [b]	1,45±0,12 [a]	5,8±0,87 [c]
I. Trimester	60,9±1,36 [b]	11,00±1,22 [a]	57,9±2,59 [b]	35,2±2,26 [a]	8,66±0,44 [ab]	1,57±0,08 [a]	11,7±1,06 [b]
II. Trimester	58,2±1,55 [b]	2,2±0,57 [b]	66,4±3,4 [a]	27,3±2,19 [b]	9,55±0,7 [a]	1,56±0,15 [a]	11,8±1,35 [ab]
III. Trimester	62,2±1,81 [b]	2,5±0,5 [b]	57,8±1,51 [b]	24,9±1,46 [b]	10,22±0,87 [a]	1,44±0,08 [a]	14,60±0,03 [a]

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

4. TARTIŞMA

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_2-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. Türlere göre değişmekle birlikte, gebeliğin erken dönemlerinde meydana gelen ve babaya ait antijenleri de 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).

Maternal immün toleransın gelişiminde en önemli faktör, immünosupresif etkiye sahip progesteron hormonudur. Siklusun sekresyon fazında ovaryumdan 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 sürülmektedir (Cuello ve ark 2006).

Gebeliğin, zigotu maternal kabulü sürecinin sağlıklı bir biçimde devamı için gebelik süresince çeşitli hücrelerden salıverilen sitokinler arası etkileşim de önemli rol oynar. Tip–1 yardımcı T-lenfositlerden (T-helper-Th_1) salıverilen interlöykin–2 (IL–2), IFN-gama ve Tümör Nekrozan Faktör-alfa (TNF-alfa) embriyo için zararlı olan sitokinler grubuna girerken; Th_2'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 düzeylerinde belirgin değişimlerle karakterizedir. Uterus endometriyumunun türlere göre değişen düzeyde yıkımlandığı ve organizma için "yabancı" olarak algılanan embriyonun uterusta yerleşmeye çalıştığı bu süreçte bölgesel ve sistemik bir dizi olay da tetiklenir (Barnea 2004). Tüm bu olaylar, reprodüktif immunologlarca gebeliğin farklı bir biçimde tanımlanmasına yol açmıştır. Reprodüktif 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 hem perifer kanda hem endometriyumda ve hem de 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)'nın 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 gözlendiği bildirilmektedir (Rugh ve Somogyi 1969). Agricola ve ark (2008)'nın gebe ve postpartum kısraklarda 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.

Çalışmamızda 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 mukozası hücresel yönden 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)'nın 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)'nın 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 ($CD_2^+CD_8^+$) ortadan kalkarken, granüllü lenfosit alt tipinin ($CD_2^+CD_8^-$) 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 yeterli sayıda güncel çalışmaya rastlanmamıştır.

ANAE enzimi, içerisinde insanın da yer aldığı pek çok türde 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 pozitivitesi 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 pozitivitenin "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 hücreleri de içeren bir lenfosit alt tipi olduğu bildirilmektedir (Chiao ve ark 1978, Hercend ve ark 1982). Bazı araştırıcılar ise NK hücrelerinin null hücreler olarak değerlendirilmesi gerektiğini ileri sürmektedirler (Moretta ve ark 2001, Lanier 2007). Higgy ve ark (1977)'nın insanlarda yapmış oldukları bir çalışmada null lenfosit olarak değerlendirilen lenfosit alt tipi perifer kan oranının %9 olduğu tespit edilirken; Çelik ve ark (1991)'nın yine insanlarda yaptıkları bir başka çalışmada ise bu oran %13 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 5–8 adet dağınık ANAE (+) granüller içeren lenfositlerin oranı kontrol grubunda %2 olarak bulunurken, gebeliğin I. trimesterindeki bayanlarda bu hüclerin oranı önemli derecede artarak %11'e yükselmiştir ve aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu dikkati çekmiştir ($p<0,05$, Tablo 1). II. ve III. trimesterlerde ise bu oran sırasıyla %2,2 ve %2,5 seviyelerine kadar düşerek kontrol grubu ile benzer oranlarda bulunmuştur ($p>0,05$, Tablo 1)

Null hücrelerinin NK hücreleri olarak değerlendirilmesinin ve ANAE histokimyası ile bunların tespit edilebilmesinin 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-LGLs)" olarak da anılan ve granülleri ANAE pozitivitesi gösteren bu hücrelerin (Grossi ve ark 1982), insanlarda gebeliğin ilk 3 aylık döneminde desidua'da arttığına dair bulgular vardır. Andalip ve ark (2005)'nın sağlıklı bir gebelik süreci geçiren kadınlar ile tekrarlayıcı 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 pozitivitesi 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 ANAE demonstrasyonu sonucu elde edilen rakamlar dikkate alındığında kontrol grubu bayanların T-lenfosit oranları %70 olarak tespit edilirken hamilelikle birlikte belirgin düşüşler dikkati çekmiştir. Kontrol grubu ile diğer

gruplar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu ancak hamilelik dönemleri arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Sur ve ark (2008)'nın gebe sığırlarda yaptıkları benzer bir çalışmada ANAE pozitif lenfosit oranları dikkate alındığında (T-lenfosit) gruplar arasında fark tespit edilmediği bildirilmiştir. Baines ve ark (1977) ise 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 ileri sürmektedirler. Agricola ve ark (2008)'nın gebe ve postpartum kısraklarda 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)'nın 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 populasyonları 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 çekerken kontrol grubu ile I. ve III. trimester grupları arasındaki farkın önemli olduğu ($p<0,05$, Tablo 1); II. trimesterde oranın %66,4'e yükseldiği ve kontrol grubu ile arasındaki farkın önemli olmadığı dikkati çekti ($p>0,05$, Tablo 1). Sur ve ark (2008)'nın gebe sığırlarda yaptıkları çalışmada da benzer şekilde kontrol grubu ile II. trimester grubu arasındaki farkın önemli olmadığı ancak I. ve III. trimester gruplarının ACP-az pozitif lenfosit oranlarının kontrol ve II. trimester gruplarından belirgin bir biçimde düşük olduğu tespit edilmiştir.

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 gözlendiği bildirilmektedir. Buna karşın Pisek ve ark (2008)'nın 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 oranlarının hamileliğin ilk dönemlerinden itibaren belirgin bir biçimde

düştüğü ancak istatistiksel açıdan farkın II. trimester grubundan itibaren tespit edilebildiği dikkati çekmiştir (Tablo 1). Sur ve ark (2008)'nın gebe sığırlarda yaptıkları çalışmada da perifer kan lenfosit oranının I. trimesterde belirgin bir biçimde düştüğü; II. ve III. trimester gruplarında elde edilen değerlerin kontrol grubu ile benzer olduğu ileri sürülmektedir.

Mikronükleus testi, genetik toksikoloji testleri arasında standart bir sitogenetik test olarak dünyada birçok laboratuarca kabul edilen kolay, ucuz ve kısa sürede güvenilir sonuçlar veren pratik bir metodtur (Müller ve Streffer 1994). Özellikle kordon kanı lenfositlerinde yapılan MN testinin transplasental mutajenlerin ve bunların etkilerinin belirlenmesinde yararlı olabileceği ileri sürülmektedir. Zira fötüs ve yeni doğanlar, birçok çevresel toksin ve zararlı etkenlere karşı erişkinlerden daha duyarlıdırlar. Bunun sebeplerinden birisi plasentanın fötüs için tam anlamıyla bir koruyucu bariyer olamamasıdır. Özellikle yeni doğanlarda ve çocuklarda maruz kalınan çevresel toksinlerin artışına paralel olarak genetik materyalde de hasarlar meydana gelir. Levario-Carillo ve ark (2005) kentsel bölgelerde yaşayan annelerin perifer kan lenfositlerindeki MN sıklığı ile bu annelerin yeni doğan bebeklerinin kordon kanı lenfositlerindeki MN sıklığını sırasıyla 3,7 ve 1 MN/1000 hücre olarak bulurken; kırsal alanda daha kötü şartlarda yaşayan annelerin perifer kan lenfositleri ile bu annelerden doğan bebeklerin kordon kanı lenfositlerindeki MN sıklığını sırasıyla 4,5 ve 2 MN/1000 hücre olarak tespit etmişlerdir. Stankovic ve ark (2004)'nın Sırbistan'da yaptıkları geniş kapsamlı bir çalışmada ise Sırbistan'ın bombalanmasından (Mart-Haziran 1999) sonra hamile kadınların perifer kan ve kordon kanı lenfositlerinde MN sıklığının belirgin bir biçimde arttığı ortaya konulmuştur. Araştırıcılar (Stankovic ve ark 2004), 1995 yılındaki değerlerin perifer kan ve kordon kanı için sırasıyla 9,61 ve 3,74 MN/1000 hücre olarak tespit ederlerken, 2000 yılında değerler aynı sırayla 28,26 ve 22,22 MN/1000 hücre rakamlarına kadar ulaşmıştır.

Bunların yanı sıra tedavi amaçlı olarak gebelerde kullanılan bazı ilaçların da fötüsta gelişme geriliğinden genetik kusurlara kadar varan yan etkilere neden oldukları bilinmektedir. Grujicic ve ark (2008) erken doğumları önlemek amacıyla anti-aritmik ilaçlarla birlikte kullanılan bazı betamimetiklerin de kordon kanı lenfositlerinde MN sıklığını artırdığını ileri sürmektedirler. Araştırıcılar (Grujicic ve

ark 2008), anneleri herhangi bir ilaç kullanmamış olan bebeklerin kordon kanı lenfositlerindeki MN sıklığını 3,30 MN/1000 hücre olarak bulurlarken, hamilelik dönemlerinde fenoterol + verapamil alan annelerin bebeklerinin kordon kanı lenfositlerinde MN sıklığını 9,10 MN/1000 hücre olarak tespit etmişlerdir.

Bayanlarda tedavi amaçlı ya da doğum kontrolü amacıyla kullanılan başta gestojenler olmak üzere bazı hormon preparatlarının da perifer kan lenfositleri üzerinde genotoksik etkiye sahip oldukları ve MN sıklığını artırdıkları bildirilmektedir. Milosevic-Dordevic ve ark (2003), spontan düşük tehlikesi nedeniyle farklı dozlarda gestojen tedavisi uygulanan hamile bayanlarda MN sıklığının arttığını ortaya koymuşlardır. Söz konusu çalışmada, 2000–8400 mg dozunda gestojen tedavisi uygulanan grupta ortalama MN sıklığının tedavi öncesi 11,89 iken tedavi sonrası 21,22 MN/1000 hücre değerine ulaştığı kaydedilmiştir. Aynı çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan ve hiçbir hormon tedavisi uygulanmayan hamile bayanlardaki MN sıklığının ise 6,79 olduğu bildirilmiştir.

Yeşilada ve ark (2006)'nın genetik bir bozukluk sonucu ortaya çıkan ve hiperandrojenizmin yanı sıra yaygın endokrin düzensizlik ile karakterize polikistik over sendromlu (PCOS) bayanlarda yapmış oldukları bir çalışmada sağlıklı bayanların perifer kan lenfositlerindeki MN sıklığının 3 MN/1000 hücre iken PCOS'lu bayanlarda bu rakamın 9 MN/1000 hücre olduğu ileri sürülmektedir. Bizim çalışamamızda kontrol grubunu oluşturan bayanların MN sıklığı 1000 hücrede 5,8 olarak tespit edilmiştir. Hamilelikle birlikte MN sıklığının arttığı ve III. trimester grubundaki bayanlarda bu rakamın 14,6 MN/1000 hücre olduğu; kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların istatistiksel açıdan farklı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).

Çekirdekçik organize bölgeleri (nucleolus organizing regions-NORs) ribozomal genlerin toplandığı kromozomal bölgeler olup; nükleofosmin ve nükleolin gibi çekirdekçik proteinleri de rDNA'nın transkripsiyonal aktivitesinin bir göstergesidir. Gümüşleme metodu ile boyanma özelliğine sahip olan bu proteinler sayesinde AgNOR metodu, hücre ploidisini ve proliferatif aktiviteyi gösteren önemli bir parametre olarak insan hekimliğinde yıllardır kullanılmaktadır (Chatterjee ve ark 1997, Kaplan ve ark 2001, Janczukowics 2003).

Mourad ve ark (1997)'nın insan akciğer kanserlerinde yapmış oldukları bir çalışmada, ortalama AgNOR sayısının ve çekirdek başına 5 ya da daha fazla sayıda AgNOR taşıyan hücre oranının tümör hücrelerinin proliferatif aktivitelerinden ziyade ilerleyici davranışları hakkında bilgi verebileceği ortaya konulmuştur. Xiu ve ark (2003) ise AgNOR parametrelerindeki artışın astrosit tümörlerinin teşhisinde yarar sağladığı gibi söz konusu tümörlerin nüksü ile de doğru orantılı olduğunu bildirmektedirler. Terlikowski ve ark (2004) da servikal intraepitelyal neoplazilerden aldıkları biyopsi örneklerinde 4 ya da daha fazla sayıda AgNOR içeren hücre sayılarında belirgin artşlar tespit ettiklerini bildirmektedirler.

Lafarge ve ark (1989)'nın erişkin rat beyinciğinde gümüşleme yöntemi ile yapmış oldukları bir çalışmada, granüler tabakada yer alan nöronlarda hücre başına düşen çekirdekçik sayısının 1,46 olduğu ortaya çıkarılmıştır. Araştırıcılar (Lafarge ve ark, 1989) ratlarda NOR (rDNA geni) içeren 3 çift kromozom olduğunu ve teorik olarak hücre başına 6 adet çekirdekçiğin olması gerektiğini ileri sürerlerken, bu rakamın 1,46 olmasını 2 temel nedene bağlamaktadırlar. Bunlardan ilki çekirdekçik formasyonuna ulaşamamış inaktif NOR'ların olması; bir diğeri ise hücre farklılaşması aşamasında nükleolar füzyonun meydana gelmiş olma olasılığıdır. Zira nükleolar füzyon olayı hücre aktivitesi ile birlikte artmakta ve birleşme özellikle rDNA genlerine yani NOR'lara yakın bölgelerde gerçekleşmektedir.

Yapılan çalışmalar hamileliğin perifer kan lenfositlerinin AgNOR aktiviteleri üzerindeki etkilerinden ziyade trofoblastik hücrelerin AgNOR aktiviteleri üzerinde yoğunlaşmıştır**.** Neudeck ve ark (1997) trofoblastik proliferasyonla karakterize tam ve kısmi hidatiform mol vakalarının teşhis ve ayrımında AgNOR parametrelerinin güvenilir, ucuz ve kolay bir yöntem olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Suresh ve ark (1990) ise hidropik abort ve hidatiform mol vakalarında trofoblast hücrelerinin sorun hakkında önemli ipuçları verdiğini belirtirlerken; özellikle parsiyel hidatiform mol olaylarında trofoblastlardaki AgNOR sayılarının belirgin bir biçimde artış gösterdiğini ve AgNOR sayılarının neoplastik olmayan trofoblastik dokularda hücre çoğalmasından ziyade hücre ploidisine işaret ettiğini ileri sürmektedirler. Yang (1993) ise trofoblastik tümörlerde malignitenin artışı ile birlikte AgNOR sayılarının da arttığını ortaya koymuştur.

Oltulu ve ark (2006)'da yaptıkları bir çalışmada, trofoblastik hücre başına düşen ortalama AgNOR sayısının, kısmi ve tam hidatiform mol vakalarına kıyasla persiste mol vakalarında daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar (Oltulu ve ark 2006), AgNOR yönteminin, gestasyonel trofoblastik hastalıklarda persistans kabiliyeti ve prognozu belirlemede klinik açıdan önemli bir parametre olan ß-hCG seviyelerinin yükselmesinden daha önce bilgi verebilecek ekonomik ve kullanımı kolay bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada ise lenfosit başına düşen AgNOR sayıları 1,44–1,57arasında değişirken; gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli kabul edilecek farklar bulunamamıştır.

Farklı dokularda AgNOR alanının çekirdek alanına oranı ile ilgili olarak özellikle kanatlılarda embriyonik ve kuluçka sonrası dönemlerde yapılmış çok sayıda çalışma vardır. Aydın (2004) yumurtacı tavukların beyincik Purkinje hücrelerinde AgNOR alanının çekirdek alanına oranını yüzde (%) olarak kuluçkanın 11, 14 ve 17. günlerinde sırasıyla %16,95; %15,31 ve %16,61 olarak tespit etmiştir. Araştırıcı (Aydın, 2004) kuluçkadan çıkış günü ile birlikte kuluçka sonrası 6, 18 ve 32. haftalar sonunda aynı parametreyi yine sırasıyla %17,44; %16,4; %8,94 ve %5,57 olarak ölçmüştür. Aynı araştırıcı (Aydın, 2004) bu oranı etçi piliçlerde kuluçkanın 11, 14 ve 17. günlerinde %14,47; %12,14 ve %12,68 olarak bulurken kuluçkadan çıkış günü ile birlikte takip eden 1, 4 ve 6. haftalarda %12,99; %17,38; %10,95 ve %10,70 olarak tespit etmiştir. Akar (2007) ise yine yumurtacı tavuklarda beyincik Purkinje hücrelerinde AgNOR alanının çekirdek alanına oranını yüzde (%) olarak kuluçkanın 11, 13, 15 ve18. günleri ile kuluçkadan çıkış günü ve takip eden onuncu gün, üçüncü hafta ve dördüncü haftalarda sırasıyla %19; %20; %25; %17; %6,5; %7,1; %8 ve %10 olarak ölçümüştür.

AgNOR boyama metodu sayesinde hayvanlarda değişik verim özellikleri hakkında önemli ipuçları elde edilebileceğini ve bu şekilde uzun süreler beklemeksizin yüksek verimli hayvanların önceden tespit edilip seleksiyona tabi tutulabileceğini ileri sürülmektedir. Zira verim performansının ilgili dokuları oluşturan hücrelerde ribozom ve protein sentezinin artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Aydın, 2004). Russel ve ark (1991) AgNOR'un hücrelerin proliferatif aktiviteleri ile ilişkili olduğunu ve AgNOR'un sayısından ziyade boyutlarının daha anlamlı sonuçlar ifade edeceğini ileri sürmektedirler. Zira

çekirdekciklerin yapısı ve boyutları başta protein sentezi olmak üzere pek çok hücresel aktivitenin işareti olarak değerlendirilmektedir. Aydın (2004), yumurtacı ve etçi piliçlerin bacak ve göğüs kasları üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, 6 haftalık dönemde yumurtacı piliçlerin bacak kaslarındaki ortalama AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranını %5,54 olarak bulurken; etçi piliçlerde bu oranı %9,54 olarak tespit etmiştir. Çalışmada göğüs kasları için elde edilen rakamlar ise yumurtacı ve etçi piliçler için sırasıyla %5,37 ve %8,42'dir. Gündüz (2010) ise yemlerde üreyen en önemli mikotoksin olan aflatoksin B1'in etçi piliç embriyoları üzerindeki toksik etkisini araştırdığı çalışmasında, toksinin özellikle kuluçkanın 11 ve 13. günlerinde yüksek doz gruplarında göğüs kası dokularında AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranını düşürdüğünü tespit etmiştir. Sunulan bu çalışmada da perifer kan lenfositlerinde AgNOR alanının çekirdek alanına oranı dikkate alındığında hamilelikle birlikte bu değerin artışa geçtiği, özellikle II. ve III. trimester grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu göze çarpmıştır (Tablo 1). Embriyonun kabulü ve devam eden süreçte, bu çalışmada analizlerini yapmadığımız ancak yukarıda bahsi geçen ve çeşitli lenfosit alt tipleri tarafından sentezlenen bazı sitokinlerin sentezinin arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranında tespit edilen bu artışların, gebelikle birlikte lenfositlerde meydana gelen protein sentezindeki artışların bir yansıması olduğu düşünülmektedir.

Genetik olarak yarı yarıya farklı yapıdaki fötüsun immünolojik olarak reddedilmemesi, 1961 yılında Heinlein'in "Stranger in a Strange Land" isimli bilim kurgu yapıtına benzetilebilir. Heinlein bu eserinde Valentine Michael Smith adında Mars'ta doğan fakat daha sonra tekrar dünyaya geri dönen bir insanın yabancılaşma ile birlikte yakınlaşmayı bir arada hissetmesini irdeler. Benzer şekilde insan embriyosu da kendisine düşmanca davranan hücre ve moleküllerin bulunduğu ancak aynı zamanda beslenebilmesi için de tüm olanakların seferber edildiği bir ortamda, "uterus"'ta yaşam ve uyum savaşı vermektedir (Hunt 2006). Bu süreçte anne ile fötüs arasındaki "diyalog", karşılıklı olarak farklı zamanlarda ve farklı yoğunluklarda salgılanan moleküller, hormonlar ve sitokinler aracılığı ile farklı "dillerde" ve farklı "ses tonlarında" devam eder. Bu biyolojik düzen, insanoğlunun sosyal olaylara bakış açısına da yol gösterir. Zira anne ve fötüs arasında olduğu gibi kişiler arasında da

“doğru” iletişim ve etkileşimin, “toleransı” yani hoşgörüyü sağlayacağı hiçbir zaman unutulmamalıdır (Paulescu ve ark 2005).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Maternal toleransın gelişiminde embriyonun rolü büyüktür. Zira embriyonun başlattığı sinyal trafiği kısa sürede bölgesel olmaktan çıkıp sistemik bir tolerans oluşturmaktadır. Bu durum öylesine önemlidir ki fizyolojik ve/veya patolojik herhangi bir neden olmaksızın karşılaşılan infertilite olaylarından, yavrunun anne tarafından kabul edilmemesi, yani maternal tolerans yetersizliği ya da başka bir deyişle maternal immün sistemin aşırı reaksiyonu sorumlu tutulmaktadır. Bu süreçte immünsupresif mekanizmalar mutlaka gereklidir. Ancak bu arada annenin immün sisteminin hastalık yapıcı patojen etkenlere karşı hem anneyi ve hem de yavruyu koruması da son derece önemlidir. Bu dengenin kurulması ve söz konusu mekanizmaların kusursuz işlemesi anne ve yavrunun yaşaması için gerekli olup; bu mekanizmaların iyi anlaşılması özellikle infertilite ve tekrarlayıcı düşük vakalarının tedavisine de ışık tutacaktır. Aynı zamanda yine bu mekanizmaların iyi anlaşılmasının, ilerleyen dönemlerde doku nakillerinde yaşanan sorunların çözümüne de katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sağlıklı Gebelerin Perifer Kan Lenfositlerinde Bazı AgNOR Parametreleri ve Mikronükleus Sıklığı ile Alfa Naftil Asetat Esteraz ve Asit Fosfataz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Baki Akbulut
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ /KONYA–2010

Bu çalışma, bayanlarda hamileliğin perifer kan lenfositlerinin alfa naftil asetat esteraz (ANAE) ve asit fosfataz (ACP-az) aktiviteleri ile perifer kan lenfosit oranları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Ayrıca perifer kan lenfositlerinde mikronükleus (MN) sıklığı ile bazı AgNOR parametreleri de belirlendi.

Hamile bayanlar Kontrol; I. trimester; II. trimester ve III. trimester olmak üzere 4 gruba ayrıldılar (n= 10). En düşük ANAE-pozitif lenfosit oranı II. trimesterde tespit edilirken gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulundu. I. ve III. trimesterde ACP-az pozitif lenfosit oranlarında istatistiksel olarak önemli düşüşler gözlendi. Hamilelik süresince perifer kan lenfosit oranlarında belirgin düşüşler dikkati çekerken ($p<0,05$) en yüksek null hücre oranı I. trimesterde tespit edildi. MN sıklığında hamilelik süresince belirgin artışlar gözlendi ($p<0,05$). AgNOR sayılarında gruplar arasında fark tespit edilmezken; AgNOR alanı/Çekirdek alanı oranının hamilelikle birlikte artarak en yüksek değerine III. trimesterde ulaştığı görüldü ($p<0,05$).

Trimesterler arasında bazı farklar olsa da hamileliğin ANAE- ve ACP-az pozitif perifer kan lenfosit oranlar ile perifer kan lenfosit oranı ile MN sıklığı ve bazı AgNOR parametrelerini etkilediği sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: ANAE; ACP-az; Mikronükleus; AgNOR; Gebelik.

7. SUMMARY

Determination of The Some AgNOR Parameters, Micronucleus Frequency, Activity of Alpha Naphthyl Acetate Esterase and Acid Phosphatase of Peripheral Blood Lymphocytes in Healty Pregnant Women

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 (PBL) and PBL percentages in pregnant women. Micronucleus frequency (MN) and some AgNOR parameters of PBL were also estimated.

Women divided into four groups as Control; Trimester I (TRI); Trimester II (TRII) and Trimester III (TRIII) (n= 10 for each group). The lowest ANAE (+) lymphocytes percentage was determined in TRII and the differences between the groups were statistically important ($p<0,05$). There was a statistically significant decrease in the proportions of the ACP-ase (+) lymphocytes in TRI and TRIII. A dramatic reduction in the percentage of PBL was recorded during pregnancy ($p<0,05$), whereas the highest null cell rates were found in TRI. A distinct increasing was observed in MN frequency during pregnancy ($p<0,05$). There was no difference in mean AgNOR counts between the groups, whereas AgNORs area/nucleus area increased during pregnancy and it gained its highest value in TRIII.

It was concluded that the ANAE- and ACP-ase positive PBL proportions, PBL percentages, MN frequency and some AgNOR parameters were affected by pregnancy although there were some differences among the TRs.

Key Words: ANAE; ACP-ase; Micronucleus; AgNOR; Pregnancy.

8. KAYNAKLAR

1. Agricola R, Carvallao H, Barbosa M, Pereira M, Medeiros JAS, Ferreira-Dias G. Blood lymphocyte subpopulations, neutropil phagocytosis and proteinogram during late pregnancy and postpartum in mares. Reprod Domest Anim. 2008;43 (2): 212–217.

2. Akar S. Tavuklarda beyincik korteksinin embriyonik gelişimi ve purkinje hücrelerinin çekirdeklerinde AgNOR aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2007.

3. Andalip A, Rezaie A, Oreizy F, Baluchi S. The assesment of NK cytotoxicity and CD_{56}^{+}/CD_{16}^{+} phenotype by flow-cytometry in PBL isolated from women eith recurrent spontaneus abortion. IJI. 2005;2 (4): 213–219.

4. Arvola M. Immunological aspects of maternal foetal interactions in mice. Compherensive Summaries of Upsala Dissertations from The Faculty of Science and Technology. 2001; 608.

5. Aydın MF. Yumurta ve et tavuklarının farklı dokularında gümüşleme metoduyla boyanan nükleolus organizer (AgNOR) bölgelerin dağılımının belirlenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2004, Konya.

6. Aydın MF, Çelik İ. Yumurta ve et tavuklarının karaciğerlerinde gümüşleme metoduyla boyanan nücleolus organizer (AgNOR) bölgeleri dağılımının belirlenmesi. Vet Bil Derg. 2005;21 (1–2): 91–99.

7. Baines MG, Pross HF, Millar KG. Lymphocyte populations in peripheral blood during normal human pregnancy. Clin Exp Immunol. 1977;28: 453–457.

8. Barnea ER. Insight into early pregnancy events: The emerging role of the embryo. Am J Rep Immunol. 2004;51: 319–322.

9. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L. Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. Br J Haematol. 1980;44: 577–582.

10. Batista-González CM, Corona-Rivera JR, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez AL, Ramos-Ibarra ML, Zúñiga-González GM. Micronucleated erythrocytes in preterm newborns in relation to maternal pathology. Rev Biomed. 2006;17: 11–16.

11. Bukhari MH, Niazi S, Khan SA, Hashmi I, Perveen S, Qureshi SS. Modified method of AgNOR staining for tissue and interpretation in histopathology. Int J Exp Path. 2007;88; 47–53.

12. Bulla R, Fischetti F, Bossi F, Tedesco F. Feto-maternal immune interaction at the placental level. Lupus. 2004;13: 625–629.

13. Campos LMFR, Dias FL, Antunes LMG, Murta EFC. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. Sao Paulo Med J. 2008;126 (6): 323–328.

14. Carosella ED, Dauset J, Rouas-Freiss N. Immunotolerant functions of HLA-G. Cell Mol Life Sci. 1999;55: 327–333.

15. Catowsky D. Leucocyte cytochemical and immunological techniques. In: Dacie JV, Lewis SM, editors. Practical Haematology. Seventh ed. Churchill Livingstone; 1981. p. 143–174.

16. Chappard D, Gaborit NR, Filmon R, Audran M, Basle MF. Increased nucleolar organizer regions in osteoclast nuclei of Paget's bone disease. Bone. 1998;22 (1): 45–49.

17. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Chakraborty RN, Mitra RB. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection and cytokinetics. J Oral Pathol and Med. 1997;26: 310–314.

18. Chiao JW, Dowling M, Good RA. Rosette formation of human null lymphocytes with Rhesus monkey erythrocytes. Clin Exp Immunol. 1978;32: 498–503.

19. Cuello F, Martinez R, Grosso C, Vivas A. Peripheral lymphocytes response to progesterone during early pregnancy in pigs. REDVET. 2006;VII: 11.

20. Çelik İ, Aştı RN, Ergene N. İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. SÜ Tıp Fak Derg, 1991;7 (4): 497–503.

21. Çelik İ, Aştı RN, Boyraz MÜ. Sığır fötal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. SÜ Vet Fak Derg. 1992;8 (2): 41–44.

22. Davies CJ. Why is the fetal allograft not rejected? J Anim Sci. 2007;85(E. Suppl.) E32-35.

23. De Lemos MA. How your mother tolerated you for nine months. Bio Teach J. 2003;1: 27-30.

24. Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Trere D, Badiali M, Dehan P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. Am J Path. 1989;134 (4): 925–932.

25. Dietl J. Implantation aus molekularer sicht. Gynäkologe. 2001;34: 485-493.

26. Doğan F. Sigara içen ve içmeyen erkek bireylerin ağız içi mukoza epitel hücrelerinin mikronükleus (MN) ve nükleolus organizer bölgeleri (NOR'lar) üzerinde ışık mikroskobik çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009, Konya.

27. Duchrot P. Etude des organisateurs nucleolaries (AgNOR) dans les tumeurs melanocytaires benignes, dysplasiques et malignes. Reims, France: Universite de Reims Champagne-Ardenne. Thesis, M203: 1990.

28. Engelhardt H, Croy BA, King GJ. Conceptus influences the distribution of uterine leukocytes during early porcine pregnancy. Biol Reprod. 2002;66: 1875–1880.

29. Gandhi G, Sharma P, Kaur-Badaruddoza A. The micronucleus test in urothelial cells and uterine smears of cervix cancer patients: A Comparison. Int J Hum Genet. 2003;3 (2): 121-126.

29. Gnatek GG, Smith LD, Duby RT, Godkin JD. Maternal recognition of pregnancy in the goat: Effects of conceptus removal on interestrus intervals and characterization of conceptus protein production during early pregnancy. Biol Reprod. 1989;41: 655–663.

30. Goldberg AF, Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cells. Nature. 1962;21: 292.

31. Gomez-Lorenzo N, De Pablo R, Puente S, Vilches C. Recognition of HLA-G by the NK cell receptor KIR2DL4 is not essential for human reproduction. Eur J Immunol. 2003;33; 639–644.

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

33. Grujici D, Milosevic-Dordevic O, Arsenijevic S, Marinkovic D. Treatment of pregnant women with a betamimetic and verapamil increases the micronuclei frequency in umblical cord blood lymphocytes. Tohoku J Exp Med. 2008;215: 363–371.

34. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? Human Reprod Update. 2009;1(1): 1-19.

35. Gündüz N. Yumurtaya verilen aflatoksin B_1'in broiler civcivlerde kas gelişimi üzerindeki etkilerinin histolojik metotlarla incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2010.

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

37. Güzeloğlu A, Erdem H, Sarıbay MK, Thatcher WW, Tekeli T. Effect of the administration of flunixin meglumin on pregnancy rates in Holstein heifers. Vet Rec 2007;160: 404–406.

38. Hassa O, Aştı RN. Embriyoloji, 3. Baskı, Yorum matbaacılık Sanayi, 1997, Ankara.

39. 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. 1982;129 (3): 1299–1305.

40. Hernandez AG, Alegre E, Moratalla NL, Zambrano JLA, Lopez AS. Does nitric oxide play a role in maternal tolerance towards the foetus? J Physiol Biochem 2004;60(3): 227-238.

41. Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FGJ. Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. Scand J Haematol. 1977;18: 437–448.

42. Hoyo E, Kanitakis J, Euvrard S, Thivolet J. Proliferation characteristic of cutaneous squamous cell carcinomas developing in organ graft recipients. Arch Dermatol. 1993;129: 324–327.

43. Hubbell HR, Hsu TC. Identification nucleolus organizer regions (NOR) in normal and neoplastic human cells by the silver staining technique. Cytogenet Cell Genet. 1977;19: 185–196.

44. Hunt JS, Orr HT.. HLA and maternal-fetal recognition. FASEB J. 1992;6: 2344–2348.

45. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. FASEB J. 2005;19: 681–693.

46. Hunt JS. Stranger in a strange land. Immunol Rev. 2006;213: 36–47.

47. Janczukowics J. The prognostic role of proliferation activity in human CNS tumours: the determination of AgNOR, PCNA and Ki–67 expression, Part1: AgNOR expression in CNS tumours. Folia Neuropathol. 2003;41 (2): 97–101.

48. 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. 1983;44 (8): 1549–1552.

49. Kanitakis J, Hoyo E, Hermier C, Chouvet B, Thivolet J. Nuclear organiser region (AgNOR) enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin. Cancer. 1992;69: 2937–2941.

50. Kannelopoulos-Langevin CK, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. Rep Biol Endocrinol. 2003;2(1): 121.

51. Kaplan I, Engelberg J, Dayan D. The effect of desalivation on 4-nitroquinoline–1-oxide-induced tongue carcinogenesis: a morphometric study of nucleolar organizer regions. J Oral Pathol Med. 2001;30: 48–52.

52. Kaplow LS, Burstone MS. Cytochemical demonstration of acid phosphatase in haemapoietic cells in health and in various hematological disorders using azo dye techniques. J Histochem Cytochem. 1964;12 (2): 805–811.

53. 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. 1978;35: 112–123.

54. Karademir N, Güvenç T, Yarım M, Orman MM, Gülbahar MY. Comparison of AgNORs staining and PCNA immunostaining methods, and mitotic index scores in intracutaneous cornifying epithelioma and suquamous cell carcinoma. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 1996;43: 281–285.

55. Kaya T. Yumurtaya verilen Aflatoksin B_1'in, kanatlı hepatosit çekirdeklerinin bazı morfolojik özellikleriyle AgNOR aktiviteleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2005.

56. Koç A, Kanter M. Sıçanlarda implantasyonda endometriyum dokusunun hücresel ve sıvısal savunma sistemi hücreleri üzerinde histokimyasal ve histometrik araştırmalar. I. Hücresel savunma sistemi hücreleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2000; 6 (1–2): 122–130.

57. Lanier LL. NK cells: Null no more. 2007; vailable from www.jimmunol.org.

58. Lafarga M, Berciano MT, Hervas JP, Villegas J. Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. J Neurocytol. 1989;18: 19–26.

59. Lee W, Kim Y, Lee KY, Kang CS, Lee W, Lee KS. AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentric chromosomes. Cancer Genet Cytogenet. 1999;113: 14–18.

60. Levario-Carrillo M, Sordo M, Rocha F, González-Horta C, Amato D, Ostrosky-Wegm P. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2005;586 (1): 68–75.

61. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchorzewski H. $CD_4^+CD_{25}^+$ T regulatory cells in clinical immunology and therapy. Postepy Hig Med Dosw. 2005;59: 371–376.

62. Li CY, Yam LT, Crosby WH. Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen. J Histochem Cytochem. 1972;20 (12): 1049–1058.

63. Lutton B, Callard I. Evolution of reproductive-immune interactions. Integ Comp Biol. 2006;46 (6): 1060–1071.

64. Mahmoud F, Abul H, Omu A, Al-Rayes S, Haines D, Whaley K. Pregnacy-associated changes in peripheral blood lymphoctye subpopulations in normal Kuwaiti women. Gynecal Obstet Invest. 2001;52: 232–236.

65. Maiti NK, Saini SS, Sharma SN. Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. Vet Res Commun 1990;14: 207–210.

66. Manuelidis L. Active nucleolus organiser regions are precisely positioned in adult central nervous system cell but not in neuroectodermal tumour cells. J Neuropathol Exp Neurol. 1984;43 (3): 225–241.

67. 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. 2005;34: 240–246.

68. Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PCM, Vignal A, Fillon V, Walsh PS. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: The first complete avain karyotype. Genetics. 2004;166: 1367–1373.

69. Masjedi MR, Heidary A, Mohammadi F, Velayati AA, Dokouhaki P. Chromosomal abberations and micronulei in lymphocytes of patients before and after exposure to anti-tuberculosis drugs. Mutagenesis. 2000;15 (6): 489–494.

70. Medina KL, Smithson G, Kincade PW. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. J Exp Med. 1993;178: 1507–1515.

71. Milosevic-Dordevic O, Grujici D, Marinkovic D, Arsenijevic S, Bankovic S. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. Hum Reprod. 2003;18 (2): 433–436.

72. Moffet A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. Nature Rev. 2006;6: 584–594.

73. 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. 2001;106 (4): 335–342.

74. Mourad WA, Vallieres E, Chuen J, Alrobaish A. Cell kinetics analysis of surgically resected non-small cell carcinoma of the lung using the AgNOR silver stain, Ann Saudi Med. 1997;17 (2): 161–166.

75. Mueller J, Brundel RG, Buerki H, Keller HU, Hess MW, Cottier H. Nonspesific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Eur J Immunol. 1975;5: 270–274.

76. Müller WU, Streffer C. MicronucleusAssays In: G.Obe editor. Advances in mutagenesis research. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1994. p. 1–108

77. Nakamura H, and Watabane Y. Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon. Int J Dev Biol. 2005;49: 231–235.

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

79. Neudeck H, Unger M, Hufnagl P, Eiben B, Peters K, Kalla J, Graf R, Vogel M. Villous cytotrophoblast proliferating potential in complete and partial hydatidiform mole: diagnostic value of silver-stained nucleolar organizer region (AgNOR)-associated proteins. Gen Diagn Pathol. 1997;143 (2–3): 179–84.

80. Oltulu P, Gezginç K, Yılmaz O, Çelik Ç. Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda AgNOR yönteminin prognozdaki önemi ve bazı klinik parametrelerle karşılaştırılması. Türk Jinekoloji ve Obstetric Derneği Dergisi. 2006;3 (3): 195–201

81. Ostensen M, Sicher P, Förger F, Villiger PM. Activation markers of peripheral blood mononuclear cells in late pregnancy and after delivery: a pilot study. Ann Rheum Dis. 2005;64: 318–320.

82. Özparlak H. Yumurtaya verilen organik insektisit Fipronil'in tavukların embriyonik ve kuluçka sonu erken dönem gelişimi üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2006.

83. Padua MB. Endometrial adenogenesis and uterine immune regulation in sheep. A thesis presented to the graduate school of the University of Florida in partial fullfillment of the requirements for the degree of master of science. 2004.

84. Paulesu L, Ietta F, Petraglia F. Feto-maternal biology and ethics of human society. Rep Biol Endocrin. 2005;18 (3): 55.

85. Pearson H. Immunity's pregnant pause. Nature. 2002;420 (21): 265–266.

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

87. Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Pavlova S, Petkova V, Hirvonen A, Creus A, Norppa H, Marcos R. Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. Environ Health Perspect. 2002;110: 399–404.

88. Pruthi AK, Gupta RKP, Sadana JR. Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens. J Vet Med A. 1987;34: 390–392.

89. Quinn BA, Hayes MA, Waelchli RO, Kennedy MW, Betteridge KJ. Changes in major proteins in the embryonic capsule during immobilization (fixation) of the conceptus in the third week of pregnancy in the mare. Reprod. 2007;134: 161–170.

90. Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW. Techniques to asses the proliferative potential of brain tumors. Lab Invest. 2005;74: 19–30.

91. Ramos JA, Ramis AJ, Marco A, Domingo M, Rabanal R, Ferrer L. Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine. Am J Vet Res. 1992;53 (8): 1418–1426.

92. Ranki A. Non-spesific esterase activity in human lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol. 1978;10: 47–58.

93. Rugh R, Somogyi C. The effect of pregnancy on peripheral blood in the mouse. Biol Bull. 1969;135: 454–460.

94. Russel DL, Aliso MR, Sarraf C. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. J Pathol. 1991;165: 43–51.

95. Seymour GJ, Dockrell HM, Greenspan JS. Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease. Clin Exp Immunol. 1978;32: 169–178.

96. Slowik J, Kuryszko J, Graczyk S, Kuprowski M. 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. 1990;30 (3–4): 75-87.

97. SPSS. 1999. SPSS 10.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL.

98. Stankovic M, Joksic G, Guc-Scekic M. Incidence of micronuclei in pregnant women and cord blood samples before and after the bombing of Serbia. Arch Oncol. 2004;12 (4): 200–202.

99. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. Endocrine Rev. 2005;26 (7): 877–897.

100. Sur E, Çelik İ. Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. Br Poul Sci. 2003;44: 558–566.

101. Sur E, Aydın İ, Öznurlu Y, Telatar T, Çelik İ. Sağlıklı gebe sığırların perifer kan lenfositlerinde alfa naftil asetat esteraz ve asit fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi. Vet Bil Derg. 2008;24 (2): 5–12.

102. Suresh UR, Chawner L, Buckley CH, Fox H. Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. J Pathol. 1990;160 (3): 213–215.

103. Szekeres-Bartho J, Balasch J. Progestagen therapy for reccurrent miscarriage. Human Reprod Update. 2008;14 (1): 27-35.

104. Tamaoki N, Essner E. Distribution of acid phosphatase, β-glucuronidase and N-acetyl-β-glucosaminidase activities in lymphocytes of lymphatic tissues of man and rodents. J Histochem Cytochem. 1969;17 (4): 238–243.

105. Terlikowski S, Dziêcio J, Mazurek A, Sulkowski S, Boroñ R, Oniszczuk M, Lejmanowicz K. A morphometric study of nucleolar organiser regions in cervical intraepithelial neoplasia. Folia Morphol. 2004;63 (2): 209–212.

106. Trowsdal J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. Nature Immunol. 2006;7 (3): 241–246.

107. Wulff JC, Sale GE, Deeg HJ, Storb R. Nonspesific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. Exp Hematol. 1981;9 (8): 85–870.

108. Xıu CL, Du ZW, Liu ZY, Huang Q, Chan WY. A2B5 lineages of human astrocytic tumors and their recurrence. Int J Oncol. 2003;23: 353–361.

109. Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, Zelman RJ, Rappaport H. Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. Am J Clin Pathol. 1982;78 (2): 141–149.

110. Yang BL. AgNOR of gestational trophoblastic tumors and its clinical significance. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 1993;28 (7): 408–410.

111. Yeşilada E, Şahin İ, Özcan H, Yıldırım İH, Yoloğlu S, Taşkapan Ç. Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol. 2006;154: 563–568

112. Zaczek M, Maciejowski J, Gil K, Szot W, Chlap Z. Silver-binding nucleolar organiser regions (AgNORs) in the normal epithelium of different parts of the digestive tract in rats. Acta Pathol Jpn. 1992;42 (8): 573–578.

113. Zicca A, Zeprini A, Cadoni A, Franzi AT, Ferrarini M, Grossi CE. Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human T_m lymphocytes. Am J Pathol. 1981;105 (1): 40–46.

9. EKLER

EK-A

ETİK KURUL ONAYI

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ETİK KURUL KARARLARI

Toplantı Sayısı: 04	Toplantı Tarihi: 25-04-2008

Karar Sayısı:2008/112: Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Emrah SUR'un **"Sağlıklı Gebelerin Perifer Kan Lenfositlerinde bazı AgNOR Parametreleri ve Mikronükleus Sıklığı ile Alfa Naftil Asetat Esteraz ve Asit Fosfataz Aktivitelerinin Belirlenmesi"** başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 21.04.2008 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü; yüksek lisans tez çalışmasının Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Emrah SUR'un sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.

T.C.
ASLI GİBİDİR
25-04-2008
Şaziye BİLGİN
Fakülte Sekreteri

EK-B

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU
HASTA ONAM FORMUNUZ

a- Araştırmanın amacı, gebelik süresince bağışıklık sistemi hücrelerinin sayısının ne şekilde değiştiğini belirlemektir. Bu amaçla kontrolleriniz sırasında doktorunuzun istediği tahliller yapıldıktan sonra artan kan kullanılacaktır. Bu çalışma için sizden ekstra bir kan istenmeyecek, işi bittiği için atılacak olan kanlar kullanılacaktır. Dolayısıyla çalışmanın size getireceği hiçbir risk yoktur. Çalışma süresince bağışıklık sistemi hücre sayılarınızda herhangi bir farklılık gözlenirse hemen siz ve doktorunuz bilgilendirilecek; böylece sizin ve bebeğinizin sağlık durumu daha yakından takip edilmiş olacaktır.
b- Araştırma, siz doktorunuza kontrole gelmeye başladığınız zaman başlayacak ve doğuma dek devam edecektir. İstediğiniz zaman araştırmadan çıkmakta özgürsünüz. Bunun için doktorunuza sözlü beyanda bulunmanız bile yeterli olacaktır.
c- Yapılacak tetkik ve tahliller size herhangi bir mali yük getirmeyecektir.
d- Kimliğiniz gizli tutulacak ancak bilgiler ve bulgular çalışmada kullanılacaktır. Dilediğiniz zaman size de bağışıklık sisteminizin son durumu hakkında bilgi verilecektir.
e- Araştırmada sizinle birlikte toplam 40 gönüllü yer alacaktır.
f-Çalışma süreci içinde herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun ve araştırmayı yürüten kişinin adı-soyadı, telefon numarası aşağıdadır.
g- Sizin ya da doktorunuzun dilediği zaman çalışma dışı kalabilirsiniz. Bunun dışında hamileliğiniz problemli ise çalışmanın dışında tutulacaksınız. Bununla birlikte hamileliğiniz problemli olsa dahi sizin ve doktorunuzun istemesi durumunda ek hiçbir ücret talep etmeden bağışıklık sistemi hücreleriniz hakkında bilgi edinmek amacıyla size yardımcı olunacaktır.
h- Çalışmaya katılmayı reddetme veya herhangi bir zamanda ayrılma/vazgeçme hakkına sahipsiniz.
ı- Eşiniz de bu durumdan haberdar edilecek ve onayı alınacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih
…../…../……..

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)…….
Eşinin;
Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)……..
Açıklamaları yapan araştırıcının Adı soyadı, İmzası:
Doç. Dr. Emrah SUR (0 505 766 95 51)……
Baki AKBULUT……
Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)
Uzman Jinekolog Dr. D. Nil OKUR……
Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin.
Adı soyadı, İmzası, Görevi…….

EK-C

ANKET FORMU

ADINIZ-SOYADINIZ:

YAŞINIZ:

BOYUNUZ:

HAMİLELİK BAŞLANGIÇ KİLONUZ:

ŞİMDİKİ KİLONUZ:

KAÇ HAFTALIK/AYLIK HAMİLESİNİZ?:

KAÇINCI HAMİLELİĞİNİZ?:

ALKOL/SİGARA KULLANIYOR MUSUNUZ?:

ŞU ANDA KULLANDIĞINIZ BİR İLAÇ VAR MI? VARSA NEDİR?

HERHANGİ BİR HASTALIĞINIZ VAR MI? VARSA NEDİR?:

EŞİNİZLE AKRABALIĞINIZ VAR MI? VARSA YAKINLIĞINIZ NEDİR?

EĞİTİM DURUMUNUZ:

ÇALIŞAN BİR BAYAN MISINIZ?:

ÇALIŞIYOR İSENİZ GÖREVİNİZ:

DAHA ÖNCE PROBLEMLİ BİR HAMİLELİK GEÇİRDİNİZ Mİ?:

EĞER PROBLEMLİ BİR HAMİLELİK GEÇİRDİYSENİZ NE TÜR BİR PROBLEM YAŞADINIZ?

DAHA ÖNCE HİÇ DÜŞÜK YAPTINIZ MI?:

DÜŞÜK YAPTIYSANIZ KAÇINCI HAFTADA/AYDA YAPTINIZ?:

ŞİMDİKİ HAMİLELİĞİNİZDE BİR PROBLEM VAR MI? VARSA NEDİR?

GEÇMİŞ OLSUN TEŞEKKÜR EDERİZ

TARİH:

İMZA:

10. ÖZGEÇMİŞ

01.07.1984 tarihinde Konya Beyşehir' de doğdu. 1995 yılında Beyşehir Eşrefoğlu İlkokulunu, 1998 yılında Beyşehir İmam Hatip Lisesi Orta Okulunu, 2002 yılında da Beyşehir Süper Lisesini bitirdi. 2003 yılında kazandığı Kafkas Üniversitesi Kars Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Memurluğu bölümünü 2007 yılında bitiren aday, 04.07.2007 tarihinde Konya Özel Selçuklu Hastanesi Acil Servis Bölümü'nde sağlık memuru olarak göreve başladı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa programına başlayan Akbulut, 03.11.2008 tarihinde Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesi'ne sözleşmeli memur olarak atandı. 07.01.2010 tarihinde İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dâhiliye Servisi'nde kadrolu olarak göreve başlayan ve 17.02.2010 tarihinden bu yana da Konya İl Sağlık Müdürlüğü Ruh Sağlığı ve Hastalıklar Şubesinde görevine devam eden Baki AKBULUT evlidir.