

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**POSTPARTUM DÖNEMDE SIÇAN UTERUSUNDA TOLL-
LIKE RESEPTÖRLER VE BETA DEFENSİNLER**

**Tezi Hazırlayan
Emel ALAN**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Narin LİMAN**

Doktora Tezi

**Nisan 2011
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**POSTPARTUM DÖNEMDE SIÇAN UTERUSUNDA TOLL-
LIKE RESEPTÖRLER VE BETA DEFENSİNLER**

**Tezi Hazırlayan
Emel ALAN**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Narin LİMAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD-08-624 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Doktora Tezi

**Nisan 2011
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Emel ALAN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

Postpartum Dönemde Sıçan Uterusunda Toll-Like Reseptörler ve Beta Defensinler adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Ad Soyad İmza

Emel ALAN

Danışman

Ad Soyad İmza

Prof. Dr. Narin LİMAN

Prof. Dr. Narin LİMAN danışmanlığında **Emel ALAN** tarafından hazırlanan “**Postpartum Dönemde Sığan Uterusunda Toll-like Reseptörler ve Beta Defensinler**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

17.10.2011

JÜRİ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Reşat Nuri AŞTI
Üye : Prof. Dr. Narin LİMAN (Danışman)
Üye : Doç. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM
Üye : Doç. Dr. Kutlay GÜRBULAK
Üye : Yard. Doç. Dr. Feyzullah BEYAZ



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..../..../2011

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarımın her aşamasında her türlü bilgi birikimiyle bana her zaman yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Narin LİMAN'a, tez süresince manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM ve Yard. Doç. Dr. Feyzullah BEYAZ'a, laboratuvar çalışmalarında her türlü teknik destek ve bilgi birikimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Abdullah İNCİ, Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN, Doç. Dr. Alparslan YILDIRIM, Yard. Doç. Dr. Ayşe GENÇAY ve Yard. Doç. Dr. Servet ÖZCAN'a, tezimin grafiklendirilmesinde desteğini aldığım arkadaşım Yard. Doç. Dr. Hakan SAĞSÖZ'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Gökhan ŞENEN'e teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda hayatımın her evresinde desteklerini sürekli yanımda hissettiğim sevgili eşim Araş. Gör. Aydın ALAN'a ve tezimi maddi yönden destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sonsuz teşekkürler.

**POSTPARTUM DÖNEMDE SIÇAN UTERUSUNDA TOLL-LIKE RESEPTÖRLER VE
BETA DEFENSİNLER**

ÖZET

Bu araştırma, patojeni tanıyan reseptörler ailesine ait olan Toll-like reseptör 1-10'un ve vücudun doğal antimikrobialları olarak tanımlanan β -Defensin 1-4'ün postpartum 1., 3., 5., 10., 15. günlerde ve diöstrüs dönemindeki sıçan uterusunda yerleşimi ile miktarlarında oluşabilecek değişimleri immunohistokimyasal ve western blot analizleri ile ortaya koymak amacıyla yapıldı. Çalışmada toplam 30 dişi sıçan kullanıldı. TLR1-10 ve β -defensin 1-4'ün sıçan uterusunda luminal ve bez epitelinde, bazı stromal hücrelerde, mast hücrelerinde, miyometriyumdaki düz kas hücrelerinde, damar endoteli ile mezotel hücrelerinde eksprese olduğu ve bu hücrelerin membran, sitoplazma veya çekirdeklerinde yerleştiği gözlemlendi. Diöstrüsün TLR1 ve TLR9 için postpartum 1. günden, TLR1, TLR3-7 ve TLR9 için postpartum 3. ve 5. günlerden, TLR1, TLR4-7, TLR9 için postpartum 10. günden, TLR1, TLR4, TLR7 için ise postpartum 15. günden farklı olduğu saptandı ($P<0.05$). Ayrıca postpartum 1. günde TLR1, TLR4 ve TLR6'nın protein değerlerinin postpartum 3. ve 5. günlerdeki değerlerden farklı olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). β -defensin 1 immunoreaktivitesi sadece damarlarda olmak üzere diöstrüsde postpartum 1., 3., 5. günlerdekinden farklıydı ($P<0.05$). β -defensin 2 immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında stromal hücrelerde postpartum 1. gün ile diöstrüs ve postpartum diğer günler arasındaki farklılıklar anlamlı bulundu ($P<0.05$). β -defensin 3 immunoreaktivitelerinin ise uterusun luminal epitelinde postpartum 3. gün ile postpartum 5., 10., 15. günlerden farklı olduğu belirlendi ($P<0.05$). β -defensin 4 immunoreaktivitesi değerlendirildiğinde ise luminal epiteldeki reaktivitenin postpartum 3. gün ile postpartum 5., 10. ve 15. günler arasında önemli oranda farklı olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Diöstrüsde stromal hücrelerdeki β -defensin 4 immunoreaktivitesinin postpartum dönemin tüm günlerinden farklı olduğu saptandı ($P<0.05$). Sonuç olarak tüm bulguların ışığında TLR1-10'nun ve β -defensin 1-4'ün involüsyon dönemindeki uterusun çoğu bileşeninde eksprese olduğu, ancak bunların ekspresyonlarının lokalize oldukları hücreye ve involüsyon sürecine bağlı olarak değiştiği saptanmış olup, bu moleküllerin involüsyon sürecindeki uterusu olası enfeksiyonlardan korumak amacıyla organize bir savunma oluşturdukları ileri sürülebilir.

Anahtar kelimeler: β -defensin, sıçan, Toll-like reseptörler, uterus, western blot

**TOLL-LIKE RECEPTORS AND BETA DEFENSINS
IN RAT UTERUS IN POSTPARTUM PERIOD
ABSTRACT**

This study was conducted to demonstrate the possible changes in proportions and localization of Toll-like receptors 1-10 belonging to pathogen recognition receptors family and β - defensin 1-4 known as natural antimicrobial of the body at 1st, 3th, 5th, 10th and 15th days of postpartum and at the period of diestrus rat uterus using immunohistochemical and western blotting techniques. In the study, 30 female rats were totally used. It was observed that TLR1-10 and β -defensin 1-4 localized to the membrane, cytoplasm and nuclei in the luminal and glandular epithelium, some stromal cells, mast cells, muscle cells in the myometrium as well as and the endothelium of blood vessel and mesothelial cells in rat uterus. It was determined that diestrus was different for TLR1 and TLR9 at 1th day of postpartum, for TLR1, TLR4-7 and TLR9 at 10th day of postpartum, and for the TLR1, TLR4 and TLR7 at 15th day of postpartum ($P < 0.05$). Additionally, it was determined that protein values of TLR1, TLR4 and TLR6 at 1st day of postpartum were different from those at 3th and 5th days of postpartum ($P < 0.05$). β -defensin 1 immunoreactivity was different from that at 1., 3. and 5. days postpartum on the way only blood vessels during diestrus ($P < 0.05$). When β -defensin 2 immunoreactivity was compared, it was determined that differences among the 1st day of postpartum, diestrus and the other days of postpartum were meaningful ($P < 0.05$). Immunoreactivity for β -defensin 3 was identified that the 3th days of postpartum was different from the 5th, 10th and 15th days of postpartum in luminal epithelium of uterus ($P < 0.05$). When immunoreactivity for β -defensin 4 was evaluated, it was determined that reactivity in the luminal epithelium was remarkably different between the 3th day of postpartum and 5th, 10th and 15th days of postpartum ($P < 0.05$). Immunoreactivity for β -defensin 4 in the stromal cells in diestrus differed from all days of postpartum period. Consequently, it was determined that TLR1-10 and β -defensin 1-4 were expressed in the most component of uterus, but these expressions were determined to be changed depending to cells in which they localized and duration of involution, it might be asserted that these molecules constitute a organised protection to prevent uterus from probable infections at duration of involution.

Key words: β -defensin, rat, Toll-like receptors, uterus, western blotting

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	I
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	II
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	III
KABUL VE ONAY SAYFASI	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
KISALTMALAR	XI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. UTERUSUN YAPISI.....	5
2.1.1. Endometriyum.....	5
2.1.2. Miyometriyum	6
2.1.3. Perimetriyum.....	6
2.2. MEMELİ HAYVANLARDA POSTPARTUM UTERUS İNVOLÜSYONU	7
2.2.1. Sıçanlarda Postpartum uterus involüsyonu	13
2.3. POSTPARTUM UTERUS DOKUSUNDA İMMUNİTE	17
2.4. TOLL-LIKE RESEPTÖRLER	20
2.4.1. TLR1	22
2.4.2. TLR2.....	22
2.4.3. TLR3.....	23
2.4.4. TLR4.....	24
2.4.5. TLR5.....	25
2.4.6. TLR6.....	25
2.4.7. TLR7	26
2.4.8. TLR8.....	26
2.4.9. TLR9.....	27
2.4.10. TLR10.....	27
2.5. TLR SİNYAL YOLAKLARI.....	32

	<u>Sayfa No</u>
2.5.1. MyD88-bağımlı yolak ve proinflatuvar sitokin üretimi	32
2.5.2. MyD88-bağımsız yolak ve interferon üretimi.....	33
2.6. TOLL-LIKE RESEPTÖRLERİN İMMUN YANITA ETKİLERİ	34
2.7. DIŞI GENİTAL SİSTEMDE TOLL-LIKE RESEPTÖRLER.....	36
2.8. ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLER	38
2.8.1. Anyonik Antimikrobiyal peptidler.....	39
2.8.2. Katyonik Antimikrobiyal Peptidler.....	39
2.8.2.1. Defensinler	39
2.8.2.2. Katelisinler	42
2.8.3. Büyük Antimikrobiyal Peptidler.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI.....	46
3.1.1. Doku Temini.....	46
3.1.2. İmmunohistokimya tekniği için doku hazırlanması.....	47
3.1.3. Western Blot tekniği için doku hazırlanması	47
3.1.3.1. Lizat Hazırlama	47
3.1.3.2. Protein Miktarının Belirlenmesi	48
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ	50
3.3. SDS-PAGE WESTERN BLOT PROTOKOL.....	52
3.4. TRİS-TRİSİN SDS-PAGE WESTERN BLOT PROTOKOL.....	56
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	58
3.5.1. Western Blot Analizleri	58
3.5.2. Semikantitatif Değerlendirme	58
4. BULGULAR	60
4.1. UTERUSUN YAPISAL ÖZELLİKLERİ.....	60
4.2. UTERUSDA TOLL-LIKE RESEPTÖRLER VE β -DEFENSİNLERİN LOKALİZASYONU	66
4.2.1. TLR1	66
4.2.2. TLR2	68
4.2.3. TLR3	71
4.2.4. TLR4	73
4.2.5. TLR5	75

	<u>Sayfa No</u>
4.2.6. TLR6	78
4.2.7. TLR7	81
4.2.8. TLR8	83
4.2.9. TLR9	85
4.2.10. TLR10	86
4.2.11. Beta defensin-1	88
4.2.12. Beta defensin-2	90
4.2.13. Beta defensin-3 ve Beta defensin-4	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	101
6. KAYNAKLAR	114
ETİK KURUL KARARI	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

AB	Acrylamide Bisacrylamide
AMP	Antimicrobial Peptide
AP	Anionic Peptide
APC	Antigen Presenting Cell
APES	3-Aminopropyl triethoxysilane
APS	Amonyum Persulfat
BD	Beta Defensin
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMP	Human Cathelisidin Antimicrobial Peptide
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	Colloidal Coomassie Dye
CCR6	Chemokin (C-C motif) receptor 6
CpG	Deoksisitydil-Phosphate-Deoksiguanozin
CRAMP	Cathelisidin Associated Antimicrobial Peptide
CSF1	Macrophage Coloni Stimulating Factor
CSF2	Granulocyte-Macrophage Coloni Stimulating Factor 2
DAB	Diaminobenzidin
DD	Death Domain
DTT	1,4 Dithiothreitol
ECM	Extracellular Matriks
FADD	Fas-Associated Death Domain protein
GB	Gel Buffer
HBD	Human Beta Defensin
HCAP	Human Cathelisidin Antimicrobial Protein
HD	Human Defensin
HNP	Human Neutrophil Peptide
HSP60	Heat Shock Protein 60
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule

IFN- γ	Interferon- γ
IL-1R	Interleukin 1 Receptor
IRAK	Interleukin-1 Receptor Associated Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LAM	Lipoarabinomanan
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LTA	Lipoteicoic Acid
LPS	Lipopolysaccharide
MAL	Myeloid Differantation Factor 88 Adapter Like
MAP	Mitogen Activated Protein
MIP-3 α	Macrophage Inflammatory Peptid-3 α
MKK6	Mitogen Activated Kinase Kinase-6
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	Myeloid Differantation Factor 88
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK	Naturel Killer Cell
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAMP	Patogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffer Saline
PGN	Peptidoglycan
PIK	Protease Inhibitor Cocktail
PRR	Patogen Recognition Receptor
PVDF	Polyvinylydenfluoride
SBD	Sheep Beta Defensin
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SGP-2	Sulphated Glycoprotein-2
SIP24	Super Inducible Protein 24
SLPI	Secretoric Leukocyte Protease Inhibitor
Strep-ABC	Streptavidin Biotin Kompleks

XIII

TAK	Transforming Growth Factor Kinase
TBS-T	Tris Buffer Saline-Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIMP	Metallaproteinase Tissue Inhibitor
TIR	Toll Interleukin 1 Receptor
TIRAP(TIRAM)	Toll- Interleukin Receptor Domain Containing Adapter Protein
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TRAF	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor
TRIF (TICAM)	Toll Interleukin -1 Receptor Containing Adapter Inductive
Interferon	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 2.1. TLR'lerin bağlayıcıları, yerleşim yerleri ve bulunduğu hücre tipleri	29
Tablo 3.1. Kullanılan antikorlara ait bilgiler	51
Tablo 4.1. Epitel, kript, stroma ve miyometriyum kalınlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	95
Tablo 4.2. Postpartum dönemde sıçan uterusunda bulunan TLR'in western blot analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	100
Grafik 4.1. Sıçan uterusunda TLR1 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	68
Grafik 4.2. Sıçan uterusunda TLR2 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	70
Grafik 4.3. Sıçan uterusunda TLR3 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	73
Grafik 4.4. Sıçan uterusunda TLR4 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	75
Grafik 4.5. Sıçan uterusunda TLR5 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	78
Grafik 4.6. Sıçan uterusunda TLR6 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	79
Grafik 4.7. Sıçan uterusunda TLR7 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	83
Grafik 4.8. Sıçan uterusunda TLR8 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	83
Grafik 4.9. Sıçan uterusunda TLR9 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	86
Grafik 4.10. Sıçan uterusunda TLR10 immunreaksiyonunun toplam skoru	88
Grafik 4.11. Sıçan uterusunda β -defensin 1 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	88
Grafik 4.12. Sıçan uterusunda β -defensin 2 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	90
Grafik 4.13. Sıçan uterusunda β -defensin 3 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	92
Grafik 4.14. Sıçan uterusunda β -defensin 4 immunreaksiyonunun toplam skoru.....	95
Grafik 4.15. Western blot sonuçlarının kantitatif analizi.....	97
Şekil 2.1. Toll-like reseptörlerinin sinyal yolağı.....	34
Şekil 4.1. Diöstrüs döneminde sıçan uterusunun histolojik yapısı.....	61
Şekil 4.2. Postpartum 1. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı.....	62
Şekil 4.3. Postpartum 3. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı	62
Şekil 4.4. Postpartum 5. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı.....	63
Şekil 4.5. Postpartum 10. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı.....	64
Şekil 4.6. Postpartum 15. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı.....	64

Şekil 4.7.	Postpartum 1. (A), postpartum 3. (B), postpartum 5. (C), postpartum 10. (D) ve postpartum 15. (E) günde sıçan uterusundaki hemosiderin yüklü makrofajlar.	65
Şekil 4.8.	Diöstrüs ve postpartum 1. günde (PP1a,b,c) sıçan uterusunda TLR1 immunoreaktivitesi.	66
Şekil 4.9.	Postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR1 immunoreaktivitesi.	67
Şekil 4.10.	Diöstrüs ve postpartum 1. günde (PP1a,b,c) sıçan uterusunda TLR2 immunoreaktivitesi.	69
Şekil 4.11.	Postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR2 immunoreaktivitesi.	70
Şekil 4.12.	Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR3 immunoreaktivitesi.	71
Şekil 4.13.	Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR3 immunoreaktivitesi.	72
Şekil 4.14.	Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR4 immunoreaktivitesi.	73
Şekil 4.15.	Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR4 immunoreaktivitesi.	74
Şekil 4.16.	Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR5 immunoreaktivitesi.	76
Şekil 4.17.	Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR5 immunoreaktivitesi.	77
Şekil 4.18.	Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR6 immunoreaktivitesi.	79
Şekil 4.19.	Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR6 immunoreaktivitesi.	80
Şekil 4.20.	Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR7 immunoreaktivitesi.	81
Şekil 4.21.	Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR7 immunoreaktivitesi.	82
Şekil 4.22.	Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR8 immunoreaktivitesi.	84

Sayfa no

Şekil 4.23. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR9 immunoreaktivitesi.....	85
Şekil 4.24. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR10 immunoreaktivitesi.....	87
Şekil 4.25. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 1 immunoreaktivitesi.....	89
Şekil 4.26. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 2 immunoreaktivitesi.....	91
Şekil 4.27. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 3 immunoreaktivitesi.....	93
Şekil 4.28. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 4 immunoreaktivitesi.....	94
Şekil 4.29. Pozitif kontrol olarak kullanılan insan bağırsağı ve sıçan akciğerinde β -Defensin 1, β -defensin 2, β -defensin 3 ve β -defensin 4 immunoreaktivitesi...	96
Şekil 4.30. Pozitif kontrol olarak kullanılan insan plasentas ve sıçan akciğerinde TLR3, TLR4, TLR7 ve TLR8 immunoreaktivitesi.....	97
Şekil 4.31. Postpartum 1., 3., 5., 10., 15. günlerde ve diöstrüs döneminde sıçan uterusunda western blot analizi ile belirlenen Toll-like reseptörler ve β -aktine ait protein bantları	98
Şekil 4.32. Western SDS-PAGE jel, Colloidal Coomassie Brilliant Blue.....	99
Şekil 4.33. Trisin jel, Colloidal Coomassie Brilliant Blue.....	99

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Postpartum dönem (postparturient veya puerperal dönem) doğumun tamamlanmasından sonra genital organların anatomik, histolojik ve fonksiyonel bakımdan gebelik öncesi durumuna dönmesi olarak tanımlanır (1). Postpartum dönem, fertilitenin sürekliliği yönünden oldukça önemlidir. Doğumdan sonra genital organlar gebelik öncesi durumlarına dönerken birtakım fizyolojik olaylar meydana gelir. Bunlar; genital organların involüsyonu, endometriyum'un rejenerasyonu, uterustaki bakteriyel kontaminasyonun eliminasyonu ve ovaryumların siklik aktivitelerinin yeniden başlaması aşamalarından oluşur. Doğumdan sonra uterus'un gebelik öncesi hacmine ve fonksiyonuna dönmesine uterus involüsyonu denir. İnvölüsyon, gebeliğin olduğu kornunun gebeliğin olmadığı kornuya çok yakın ölçülere dönmesi, pelvik çatıdaki normal yerine gelmesi, normal tonusunu ve içeriğini tekrar kazanması olarak düşünülür (2). Doğumdan sonra ekstrasellüler matriksin özellikle de kollajenin parçalanmasından dolayı involü olan uterus hacminde hızlı bir düşüş gerçekleşir (3). Uterustaki hücrelerin apoptozisi, nötrofil granülosit girişi, lipaz, karbonhidraz, proteaz, nükleaz gibi yıkıcı enzimlerin salgılanması ve hücre döküntülerinin fagositozu olaylarını içine alan involüsyon, doku kaybı ve doku rejenerasyonu olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Uterus involüsyonunda apoptozisde artışı takiben proteaz ekspresyonunda da artış olur (4). Meme ve uterus involüsyonundaki ilk aşamada, oksidatif stresin (5) neden olduğu oksidant yaralanmaya karşı hücrelerin toplanmasını uyaran sülfatlı glikoprotein-2, [Sulphated Glycoprotein-2, SGP-2; clusterin (apolipoprotein olarak da adlandırılır)], metalloproteinaz aktivitesine (6) karşı metalloproteinaz doku inhibitörü

(Metalloproteinase Tissue Inhibitor, TIMP) ve süper indüklenebilir protein 24 (Super Inducible Protein 24, SIP24)/uterocalin ekspresyonu artar. Doğum sonrası 1-6. günler arasında uterusun yaş doku ağırlığı 8 kat azalır. Bu azalma uterusun hücresel içeriğindeki azalıştan kaynaklanır (4). Apoptozis ve doku yıkımını içine alan doku rejenerasyonu doğal immun yanıtı aktive eden sinyallerin üretimine neden olur. Uterusun involüsyon sürecini miyometriyal kontraksiyonlar, bakteriyel kontaminasyonunun eliminasyonu ve endometriyumun rejenerasyonu etkiler. Ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron, tavşan uterus epitelinde proliferasyona ve apoptozisin azalmasına neden olurken (7), sıçanda her iki hormon seviyesinin azaldığı postpartum birinci günde uterus epitel hücrelerinde apoptozisin varlığı, bir diğer faktörün apoptozise neden olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (8).

Postpartum uterus enfeksiyonu (metritis) ve süttten kesilme sonrası meme enfeksiyonu (mastitis), başlıca dişi üreme sistemi hastalıklarıdır. Bu dokuların mikroorganizmalara karşı duyarlılığı üreme döneminde en yüksek seviyeye ulaşır ve involü olan dokuların ortamı mikroorganizmaların gelişmesi için zengin bir besin kaynağıdır. Bu nedenle özellikle involüsyon periyodunda bu dokuların mikrobiyal enfeksiyonla savaşıma kapasitelerini artırması beklenir (4). Gebelik süresince serviks müköz bir tıpa ile kapalı olduğundan uterus lumeni bakteriyel kontaminasyondan korunur. Ancak, uterusu koruyan bu fiziksel bariyer doğum sırasında ortadan kalkar. Yavrunun doğumunu takiben oluşan negatif basınç nedeniyle gaita ve çevredeki mikroorganizmalar kolayca uterusu girerler (9). Gebelik süresince uterus anaerob bir ortam olmasına rağmen sterilidir; postpartum dönemde ise nekrotik doku, hücre döküntüleri, fetal sıvılar ve kan, bakteriler için uygun üreme ortamı oluştururlar. Genital sistemde başarılı bir fertilizasyon, implantasyon ve gebeliğin gerçekleşebilmesi, ovidukt ve uterusdaki savunma mekanizmaları ile vaginada yerleşik bakteri varlığının dengede tutulmasına bağlıdır. Uterus mukozası (endometriyum) cinsiyet hormonlarının etkisi altında yapısal değişimlere uğrayan tek mukozadır. Uterus mukozasını örten epitel uterusda enfeksiyöz ajanlar, spermiyum ve embriyo bulunduğu sırada kesintiye uğramayan tek bariyerdir ve özelleşmiş reseptörlerle donatılmıştır. Epitelin altındaki stroma ise hormonlara bağlı sıklık değişiklikler ve gebelik sırasında geçici değişimler gösteren immun sistem hücreleri içerir. Dolayısıyla uterus endometriyumu uterus enfeksiyonlarına karşı korumayı sağlayan önemli bir doğal immun savunma yeridir (10). Dişi genital sistemde, doğal immun sistem esas olarak anatomik, fizyolojik, fagositik ve yangısal savunma

hatlarıyla uterusun bakteriyal kontaminasyonunun önlenmesinden sorumludur. Vulva, vestibul, vagina ve serviks, genital kanalın üst bölümlerini bakterilere karşı koruyan fiziksel bir bariyer oluşturur. Özellikle östrus döneminde vagina ve serviks tarafından salgılanan bol miktardaki mukus fizyolojik bir bariyer şekillendirir. Yangısal bariyer; laktoferrin, defensinler ve akut faz proteinleri gibi spesifik olmayan savunma molekülleri tarafından oluşturulur. Fagositik bariyer ise, bakteriyal saldırıya karşı nötrofil granülositlerin invazyonu ile sağlanır. Nötrofil granülositler periferik kandan uterus lumenine ilk olarak göç eden, bakterileri öldüren ve irin oluşumuna katılan en önemli fagositik hücrelerdir (11). Aynı zamanda nötrofil granülositler; lizozim, laktoferrin, α -defensin, katelisidin, elafin, kofaktör bağlayıcı protein, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH) oksidaz sistem, nötral serin proteaz, miyeloperoksidaz (Myeloperoxidase, MPO) ve kalprotektin kompleks gibi çok sayıda antimikrobiyal komponentler içerir (12, 13). MPO, fagositik demir-içeren bir enzimdir ve fagositlerde eksprese edilir. Fagolizozomlarda bol miktarda bulunan bu enzim özellikle nötrofil granülositlerin azurofilik granüllerinde lokalize olmuştur. Aynı zamanda kollejenaz ve jelatinaz olarak da faaliyet gösterir (14). Dolayısıyla involüsyon döneminde oluşan kollajenler MPO sayesinde yıkımlanır. Benzer olarak makrofajlar da uterusda immun yanıtın oluşturulmasında önemli rol oynarlar. Yangısal bariyer olarak işlev gören antimikrobiyal peptidler non-spesifik savunma molekülleri (11) ile mikroorganizmaların gelişmesini inhibe etme kapasitelerine göre sınıflandırılan küçük katyonik polipeptidlerdir. Doğal immunitenin efektörleri olarak antimikrobiyal peptidler, bakteri, mantar ve virusları direkt olarak öldürürler. Aynı zamanda bu peptidler, hücrel ve edinsel immunitenin aktif mekanizmalarını ve lokal inflamatorik yanıtı değiştirirler. Antimikrobiyal peptidler, 12 ilâ 100 amino asitten oluşurlar, pozitif yüklüdürler ve amfifilik özellik gösterirler. Yaşayan bütün türlerde mevcut olan antimikrobiyal peptidler, memelilerde defensinler ve katelisidinler olmak üzere iki grupta toplanırlar. Multisellüler hayvanlarda bu peptidler, sistemik olarak (örneğin; insekt hemolenfi veya omurgalı immun hücreleri) ve/veya deri ve mukoza epiteli gibi enfeksiyona duyarlı vücudun spesifik hücre ve dokularına lokalize olmuştur (15). Vücutta çeşitli organların yüzeyini örten mukoza epiteli gibi uterus epiteli hücreleri de antimikrobiyal peptidleri üretir ve daha sonra bu maddeleri potansiyel patojenlere karşı kullanılmak üzere IgA ve IgG ile birlikte uterus salgılarına verir. Uterusta antimikrobiyal ortamın yeterliliği memelilerde

hayati önem taşımakta olup, bu durum memeli türlerinin devamlılığı için gereklidir (16, 17). Dişi genital sistemin epitel hücreleri sadece antimikrobiyal peptidleri, şemokinleri ve sitokinleri üretmez; bu hücreler aynı zamanda patojenleri tanıma potansiyeline de sahiptirler. Doğal immun sistem yoluyla potansiyel patojenik mikropları tanıma, Toll-like reseptörlerini (Toll-Like Receptor, TLR) de içine alan patojenleri tanıyan reseptörleri (Pattern Recognition Receptors, PRRs) olarak bilinen hücresele reseptörler sınıfının önemli bir fonksiyonudur (18, 19). Bu reseptörler aynı zamanda bakteriyel, fungal ve viral patojenler tarafından üretilen patojenle ilişkili moleküler yapıları da (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) tanıma yeteneğindedirler (20). Bu patojenle ilişkili moleküler yapılar, lipopolisakarit (Lipopolysaccharide, LPS), peptidoglikan (Peptidoglycan, PGN), lipoteikoik asit (Lipoteicoic Acid, LTA) veya lipoarabinomanan (Lipoarabinomanan, LAM) gibi hücre duvar bileşiklerini içermesinin yanında tek veya çift zincirli RNA ile metillenmemiş (Deoxisitydil Phosphate Deoxiguanozin, CpG) DNA da içerebilir (21-25). TLR nötrofiller, makrofajlar, dentritik hücreler, dermal endotelial hücreler, mast hücreleri, eozinofil granulositler, kardiyak miyositler, adipositler ve mukoza epitel hücreleri gibi birçok hücrede bulunurlar (26). TLR'in fonksiyonu mikroorganizmaların varlığında immun sistemi uyarmaktır. TLR ailesinin farklı üyeleri aktive edilen hücre tipine bağlı olarak sitokinler, şemokinler, nitrik oksit ve efektör moleküller gibi çeşitli yangı öncesi moleküllerin üretimine neden olurlar (27, 28).

Genital kanalın doğal immun sisteminin birer ögesini oluşturan antimikrobiyal peptidler ile immun hücrelerin sahip olduğu TLR'inin özellikle insan ve farede (29) seksüel siklusun farklı dönemlerinde ve gebelik sırasında fetal membranlar, desidual hücreler ve plasentadaki lokalizasyonları ve fonksiyonlarına ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmıştır (30-33). Gerek antimikrobiyal peptidlerin ve gerekse Toll-like reseptörlerinin siklusa ve gebeliğe bağlı değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Doku yıkımı ve rejenerasyonunun birlikte görüldüğü ve bakteriyel kontaminasyona açık olan involüsyon sürecinde bu öğelerin ekspresyonlarının farklılık gösterebileceği fikrinden yola çıkılarak hazırlanan bu araştırmada sıçan uterusunda postpartum 1. günden başlayarak antimikrobiyal peptidlerden β -defensinlerin ve TLR tiplerinin lokalizasyonları ile bunlara involüsyon sürecinde uğradığı olası değişikliklerin kantitatif olarak ortaya konması amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra sıçan uterusunda involüsyon sürecinde oluşan endometriyum ve miyometriyumdaki yapısal değişikliklerin kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Memelilerde dişi genital sistemin; ovum üretme, fertilizasyon için dişi ve erkek gametlerinin transportu, gebelik ve hormon salgılama olmak üzere çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır. Dişi genital sistemin organları ovaryum, ovidukt, uterus, vajina ve vulvadır. Aynı zamanda meme de bu sistemin bir parçasıdır.

2.1. UTERUSUN YAPISI

Anatomik olarak uterus; kornu uteri, korpus uteri ve serviks uteri olmak üzere üç kısma ayrılır. Uterusun şekli türlere göre farklılık gösterir. Birçok evcil tür bikornulu uterusu (bir korpus, iki kornu ve bir serviks uteriden oluşur) sahipken, primatlar basit bir uterusu (belirgin bir korpus, iki küçük kornu ve basit bir serviks uteriden oluşur), keseli hayvanlar ise dubleks bir uterusu sahiptir. Uterusun duvarı; endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç tabakadan oluşur (34).

2.1.1. Endometriyum: Tunika mukoza olarak da adlandırılan bu katmanın lamina epitelyalisi köpek, kısırak ve kedide tek katlı kübik ya da prizmatik epitel, domuzlarda ve ineklerde ise yalancı çok katlı prizmatik epitelden oluşur. Epitel hücreleri silyumlu ve sekresyon yapan hücrelerden oluşmakla birlikte sekresyon aktiviteleri ovaryum hormonları etkisi altında değişir. Lamina propriya, çok sayıda mononükleer hücreler ve nötrofil granülositler içeren hiperplastik, gevşek kollajenöz dokuya sahiptir. Uterus bezleri basit veya dallanmış tubuler bezlerdir. Bu bezlerin distal uçları türlere bağlı

olarak değişen derecede sarmal yapar. Uterus bezlerini ve lumeni örten epitelin salgı ürünleri mukus, lipid, glikojen ve proteinlerdir. Ruminantlarda lamina propriyanın damardan zengin, bezlerden yoksun bölgeleri karunkül olarak adlandırılır. Karunküller, maternal dokular ve ekstraembriyonik membranlar arasındaki temas bölgeleridir. Ovulasyona yakın dönemde uterus bezlerinde proliferasyon görülür, ancak çok az olan mukus salgısı dışında sekresyon yoktur. Uterus bezlerinin salgı yapması ovulasyon ile başlar. Ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının düzeylerindeki değişimler endometriyumda değişikliklere neden olur ki bu değişiklikler uterinal siklus olarak tanımlanır. Ovaryumda folliküllerin olgunlaştığı ve hormonal aktivitenin arttığı dönemde endometriyumda kalınlaşma, lamina propriyanın genişlemesi ve uterus bezlerinin büyümesi gerçekleşir. Bu dönem proliferasyon evresidir. Ovulasyon gerçekleştikten sonra oluşan korpus luteum ve salgılanan progesteronun etkisi ile uterus bezleri salgı yapmaya başlar, lamina propriya oldukça ödemli hal almaya başlar. Bu dönem sekresyon evresidir. Bu evrede fertilizasyon gerçekleşirse uterus implantasyon için hazırdır. Döllenme olmadığında sekresyon evresi biter ve uterus bezlerinde sekresyon durur, bezler küçülür, endometriyumun kalınlığı da azalır. Bu dönem involüsyon evresi olarak tanımlanır. Ovaryumda folliküllerin olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum, fertilizasyon, atrezi gibi tüm değişiklikler ve bunların meydana gelmesinden sorumlu hormonal değişimlerin hepsi ise ovariyal siklusunu oluşturur. Ovaryumda ve uterusda görülen hormonal değişimlere bağlı periyodik olarak şekillenenen bu iki evreye genital siklus denir.

2.1.2. Miyometriyum: Tunika muskularis olarak da adlandırılan bu tabaka içte kalın sirküler, dışta ise daha ince bir longitudinal düz kas katmanına sahiptir. İki kas tabakasının arasında arter, ven ve lenf damarlarından zengin stratum vaskülare bulunmaktadır.

2.1.3. Perimetriyum: Bir diğer adıyla tunika seroza, peritoneal mezotel hücreleri ile sarılı gevşek bağ dokusundan ibarettir. Peritonun viseral yaprağıdır ve oldukça az sayıda düz kas hücreleri ile çok sayıda lenf, kan damarı ve sinir telleri içerir (34, 35).

Sıçanlarda uterus sağ ve sol olmak üzere iki kornudan oluşur. Bu yapı sıçanlarda çok sayıda yavrulamayı sağlar. Her bir uterus kornusu kendi serviksine sahiptir. Serviksler uterusun vaginaya bağlandığı yerde bulunmaktadır. Serviks kanalı çok dardır, fakat daha sonra doğuma izin verecek ölçüde genişler. Serviksin temel fonksiyonu ise uterusu korumaktır (36). Dişi sıçanlar doğduktan sonra 41-54. günler arasında düzensiz östrus siklusunu gösterirken, normal östrus siklusunu 54. günden sonra görülür ve 90-95. günden

sonra tam erişkin olurlar. Sıçanlarda siklus 4-5 gün sürer ve seksüel olarak yaklaşık 14 saat boyunca çiftleşmeye müsaittirler. Dişi sıçanlarda seksüel olgunluğun vagina perforasyonu ile başladığı ve ovulasyonla son bulduğu tahmin edilmektedir (37, 38). Dişi sıçanlarda luteinize hormonu salgılatıcı hormonun (LHRH) salınması vagina perforasyonunun oluşmasına etki etmektedir. Vaginal perforasyonun oluşma süresi, pubertal periyod boyunca oluşan endokrin değişikliklerin günlük ritmine bağlıdır (39).

2.2. MEMELİ HAYVANLARDA POSTPARTUM UTERUS İNVLÜSYONU

Memeli hayvanlarda uterus involüsyonu bir sonraki gebeliğin oluşması için gereklidir. Uterus involüsyonu; uterus hacminde azalma, morfolojik ve histolojik (kas ve bağ doku vb. doku bileşenlerinin rezorpsiyonu gibi) bir takım değişiklikler ile karakterizedir. Hayvanlar arasında uterus involüsyon süresi türlere göre farklılık göstermektedir (40).

Uterusun involüsyon hızı plasentasyon tipine bağlıdır. Tavşanlar hemokoriyal plasentaya sahip olduğu için uterus involüsyonu iki günde tamamlanır (41). Epiteliyokoriyal plasentaya sahip hayvanlarda (kısırak ve domuz) uterus involüsyonu 2 ila 3 hafta da tamamlanırken, sindesmokoriyal plasentaya sahip hayvanlarda (koyun, keçi ve inek) uterus involüsyonu 4 ila 5 hafta sürer. Endoteliyokoriyal plasentaya sahip hayvanlarda ise (köpek ve kedi) uterus involüsyonu 10 ila 12 hafta sürer (42). Sıçanlarda postpartum dönemde uterusun re-epitelizasyonu 36 saatte gerçekleşir ve bu hızlı rejenerasyon muhtemelen erken postpartum östrüstan kaynaklanır. İlk postpartum ovulasyon ise yavrulamadan sonraki yaklaşık 18 saat içinde oluşur (43). İnsanlarda puerperium (postpartum periyod), doğumdan sonra uterusun gebe olmayan formuna dönmesi ve fizyolojik involüsyonu ile karakterize 6-8 haftalık bir periyod olarak tanımlanmıştır. Bu süreç içinde miyometriyumun küçülmesi, mikroorganizmaların eliminasyonu, endometriyumun onarımı ve restorasyonu gibi bir seri olaylar meydana gelir. Bu seri olaylar dizisi hem apoptozis hem de proliferasyonla ilişkilidir. Postpartum ilk üç günde endometriyum çok ince olup bir miktar desidual doku içerir. Normal iyileşme süreci bol miktarda loşiya akıntısıyla birlikte 7 ila 17 gün sürer. 26-56. günde endometriyum inaktif olup proliferasyon evresine özellikleri gösterir (44, 45).

Köpeklerde postpartum dönemde uterus involüsyonu incelendiğinde ilk haftada uterus kornularının dilate ve ödemli olduğu, interplasental bölgedeki mukozal yüzeyin koyu kahverengi mukus tabakasıyla örtülü olduğu görülür. İnterplasental endometriyum primer ve sekonder kıvrımlardan oluşmuştur. Primer kıvrımlar bir kaç lenfosit ve plazma hücresi içeren ödemli bir lamina propriyaya sahiptir. Sekonder epiteliyal

kıvrımlar, uzun prizmatik epitel hücreleriyle örtülüdürler. Çeşitli büyüklükte olan epitel hücreleri bol miktarda lipid damlacığı içerdiğinden köpüklü bir sitoplazmaya sahiptirler. Endometriyal lumende epitel hücre yıkıntıları görülmez, miyometriyum tabakası ise kalındır. Stratum vaskulare bol miktarda kollajen iplikler ve genişlemiş kan damarları içerdiğinden dolayı çok kalınlaşmıştır. İkinci ve üçüncü haftada uterus küçülmüş olup mukozal yüzeyin tamamı yine koyu kahverengi mukus tabakasıyla örtülüdür, fakat birinci hafta ile kıyaslandığında miktarı azalmıştır. Lamina propriyada küçük hemorajiler ve mononükleer hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler temel olarak makrofajlar, lenfositler ve birkaç plazma hücresidir. Kollajen, lamina propriyada proliferen olan fibroblastlar tarafından üretilmektedir. Üçüncü haftada plasental alanlarda endometriyumda kollajen miktarında artış şekillenir. Endometriyal bezler dilatedir, lumenleri hücre döküntüleri ve eritrosit içerir. İnterplasental bölgelerde lamina propriya daha az ödemlidir. Plasental alanlar daha kalın ve yüzeyleri granülerdir. Dördüncü haftada uterus bezleri oldukça dilate ve dejeneratiftir, lumenleri mukus ve nekrotik hücre döküntüsü ile doludur. Lamina propriya da mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenir. İnterplasental bölgelerdeki mukozal yüzey daha az kıvrımlıdır ve açık renkte bir mukus tabakasıyla örtülüdür. Miyometriyum tabakası ince ve kas telleri çok daha küçüktür. Stratum vaskularedeki kollajen iplikler büyük oranda azalmış olup kas teli demetleri arasında sadece birkaç iplik halinde görülmektedir. Damarların intima ve media tabakaları kalınlaşmış fakat adventisyadaki kollajen iplikleri azalmıştır. Ancak plasental alanlardaki kollajen depoları maksimuma ulaşır. Bu kollajen yığınları eozinofilik boyanan prizmatik epitel hücreler tarafından örtülüdür. Beşinci haftada uterus bezlerinin çoğu küçük ve daha az oranda da dilate formdadır. Uterus bezlerinin etrafında ve endometriyal epitelin altında fibroblastlar, makrofajlar, lenfositler ve birkaç plazma hücresinin yoğunluğunda bir artış şekillenir. Plasental alanlar serozal yüzeylerde küçük elipsoid şişkinlikler olarak görülür. Plasental alan involüsyonunun son ve en önemli aşaması kollajen yığınlarının parçalanarak lumene atılması ile başlar. Beşinci hafta da görülen değişiklikler altıncı ve yedinci hafta da gözlenir, fakat daha belirgindir. Altıncı haftada miyometriyum tabakası hücre hacmindeki azalma nedeniyle daha hücresel bir yapıya dönüşür. Altıncı ve yedinci haftalarda plasental alanların mukozal yüzeyi açık kahverenginde ve dardır. Lamina propriya artan sayılarda fibroblast, makrofaj, plazma hücresi ve birkaç nötrofil granülosit içermesinden dolayı oldukça hücrelidir. Yedinci haftada uterus kornuları oldukça küçülmüş olup plasental alanlar dar ve açık renklidir. Lamina propriyada büyük yer kaplayan kollajen iplikler

endometriyumdan ayrılır ve endometrial bezler normal büyüklüğüne ve şekline döner. Sekizinci haftada uterus kornularının çapı en küçük boyutuna ulaşır ve kornular, serozal yüzeyden görülen küçük elipsoid şekilli plasental alanlarla uniform şekillidir. Endometriyum, tek katlı prizmatik epitel hücre tabakası ile örtülüdür. Bu hücreler rejenera olan uterus bezlerinin kanallarında koyu boyanmış bazal nukleuslu ve bazofilik sitoplazmalı daha küçük hücreler ile devam eder. Dokuzuncu haftaya kadar uterus kornuları uniform şekilli olup dar bir lumene sahiptir. Endometriyum tabakası tek katlı dejeneratif epitel hücreleri ile örtülüdür. Nukleusların çoğu düzensiz ve piknotiktir. Endometrial epitelin rejenerasyonu ve eski şeklini alması involüsyon işleminin tamamlandığı onikinci haftaya kadar devam eder. Onikinci haftada endometriyum bazofilik boyanan sitoplazmaya sahip küboidal veya prizmatik tek katlı hücre tabakası ile örtülüdür. Plasental alanlar kahverengi nedeniyle interplasental endometriyumdan ayrılır. Uterus postpartum onüçüncü haftada anöstrus formuna geçer. İnvole plasental alanların kahverengini alması, büyük miktarlarda hemosiderin yüklü makrofajlardan kaynaklanır (46).

Genel olarak köpeklerde post partum uterus involüsyonu çok yavaş süren bir işlem olup oniki haftada tamamlanır. Major endometriyal değişiklikler postpartum ilk dokuz hafta boyunca gerçekleşir. Bu süreç hücresel materyalin yıkımlanması ve bağ doku komponentlerinin değişimi ile karakterizedir. İkinci endometriyal değişiklikler dokuzuncu haftada başlar ve onikinci haftada sonlanır. Bu dönemde endometriyumu örten epitelial hücrelerin büyüklüğünde ve şeklinde değişiklikler meydana gelir.

Kollajen yığınlarının uterus lumenine dağılmasının tamamlanmasında postpartum uterus kontraksiyonunun etkili olduğu düşünülür. Aynı zamanda kollajenin bir kısmı makrofajlar tarafından rezorbe edilir. Postpartum dördüncü haftadan sonra mononükleer hücre sayısında belirgin bir artış şekillenirken kollajen miktarında azalma meydana gelir. Kollajenin yoğun ve hızlı yıkımlanması doğumdan sonra miyometriyum tabakasında da fark edilmiştir (46).

Koyunlarda postpartum birinci günde uterusun ağırlığında ve kornuların uzunluğunda azalma şekillenirken, ovaryumların ağırlığında değişiklik görülmemiştir. Endometriyal bez yoğunluğu yanında endometriyum, stratum kompaktum, stratum spongiosum ve miyometriyumun total genişliğinde doğumdan sonra azalma şekillenir. Postpartum birinci ve yedinci günde invole olan uterusdaki apoptotik hücreler vakuollü ve çok sayıda olup endometriyal glanduler epitel hücreleri arasında lokalize olmuştur. Postpartum birinci günde glanduler epitel içerisinde hem T- hem de B-lenfositler

bulunur. Luminal ve glanduler epitelde postpartum birinci ve yedinci günde hücre proliferasyonu saptanmaktadır. Postpartum birinci, yedinci ve ondördüncü günlerde uterus lumeninde kalın ve koyu bir loşıya tabakası bulunurken, postpartum yirmisekizinci günde tamamen kaybolmaktadır (47). Koyunlarda doğumdan sonraki ilk haftada oluşan bu sıvı (loşi) eritrositlerin otolizi sonucunda meydana gelen kahverengi bir sıvıdır. Postpartum ikinci haftada involü olan karunküllerden serbest bırakılan kahverengi nekrotik plaklar uterus lumenini doldurur. Karunküllerin re-epitelizasyonu postpartum üçüncü ve dördüncü haftalarda oluşur (48). Uterusun interkarunkuler bölgesinde endometriyum ve miyometriyumun genişliği postpartum birinci günde maksimumdur. Endometriyum, genişlemiş endometriyal bezler içerirken, stroma çok az seçilebilir ekstrasellüler matrikse (Extracellular Matrix, ECM) sahiptir. İnterkarunkuler bölgenin tamamı birçok kıvrım içerirken postpartum yedinci günde endometriyumun luminal epitelinde daha az kıvrım bulunur. Endometriyumun genişliği, endometriyal bezler arası mesafede ve stromada bulunan hücreler arasında ekstrasellüler boşluktaki azalmadan dolayı daha dardır. Stromada ekstrasellüler matriksin boyanmasında belirli bir artış gözlenmektedir. Postpartum ondördüncü günde endometriyum ve miyometriyumun genişliği minimuma ulaşır. Uterus bezleri daha organize haldedir ve postpartum yedinci günden daha küçüktür. Endometriyal bez çapı minimuma ulaşmasına rağmen, total endometriyal ve miyometriyal genişlik postpartum ondördüncü günden postpartum yirmisekizinci güne kadar cüzi miktarda azalır. İnterkarunkuler endometriyum daha az kıvrım içerir. Postpartum yirmisekizinci günden önce luminal epitelde, plasentom veya karunkul kalıntılarının bulunmadığı gözlenmiştir ve endometriyum, histolojik olarak gebe olmayan koyundakine benzer. İnvole olan koyun uterusunda üç durum şekillenir: 1) uterus hacminde azalma, 2) yavruya ait dokuların kaybı, 3) doku onarımı. Uterusun yaş doku ağırlığındaki ve kornu uzunluğundaki azalma hem endometriyumun, hem de miyometriyum tabakalarının incelmesinden kaynaklanmaktadır. Endometriyal stromanın ekstrasellüler boşluğunda azalma ve ECM'de artış histolojik olarak tespit edilebilir. Histolojik analizler, dokunun yeniden biçimlenmesinin uterus duvarının hem karunkuler, hem de interkarunkuler bölgelerinde olduğunu göstermiştir. İnvölüsyon süresi boyunca doku bileşimi ve şeklindeki değişikliklere ek olarak uterus duvarının hem karunkuler, hem de interkarunkuler bölgelerinde damarlaşmada belirgin bir azalma gözlenmiştir. Endometriyal luminal epitel ve süperfisiyel glanduler epitel, luteolizin ve prostaglandin ürettiğinden siklus açısından öneme sahiptir (47).

Sığırlarda uterus involüsyonu, uterus kornusunun pozisyonunun, büyüklüğünün ve tonusunun gebe olmayan haline dönüştüğünde tamamlanır. Bunu etkileyen birçok faktör vardır: doğum sayısı, laktasyonal durum, beslenme, barınma ve mevsim. Sığırlarda uterusun involüsyon süreci, kotiledon doku kaybı, büyüklüğünde azalma ve doku onarımı gibi işlemleri kapsar (1).

Keçilerde doğumdan sonraki üçüncü günde uterusda dejenere epitel hücreleri bulunur. Bu epitel hücreleri lamina propriyada bulunan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Uterus bezleri iyi gelişmiş olup yalancı çok katlı prizmatik epitelden oluşur. Bazal membran zarar görmemiştir ve mikrovilluslar apikal kısımda yer alır. Uterus bezlerinin lumeninde lenfositler ve nötrofil granüositler bulunur. Elektron mikroskopik incelemelerde sitoplazma içerisinde çok sayıda mitokondriyon ve endoplazmik retikulum sisternlerine rastlanılır. Az sayıda sekretorik granüle sahip sekretorik hücreler lumene doğru uzanır. Bu hücrelerin yüzeyinde kısa mikrovilluslar bulunur ve endoplazmik retikulum kesecikleri iyi gelişmiştir. Postpartum yirmibirinci günde endometriyumun karunkuler bölgesinde vakuollü sitoplazmaya sahip hasar görmüş hücrelere rastlanır. Bazal membran zarar görmemiş bir şekilde devam eder ve bu bazal membrana yakın yerde mitotik hücreler bulunur. Hücreler birkaç granüllü endoplazmik retikulum kesecikleri içerir. Uterus bezleri proliferasyon aşamasındadır. Postpartum 36. günde uterusun yüzey epiteli genelde tek katlı prizmatik olup bazı yerlerde ise yalancı çok katlı prizmatik görünümündedir. Hücrelerde morfolojik olarak bir bozukluk bulunmamakla birlikte, yarı-ince kesitlerde epitelde dağınık halde intraepitelyal lökositler tespit edilmiştir. Mevcut makrofajların sayısı artmamıştır. Endometriyumda proliferate uterus bezleri çok sayıdadır ve bağ dokusunun büyük bir kısmını doldurmuştur. Mitotik bölünmenin değişik aşamasında olan glanduler epitel hücreleride bulunmaktadır. Glanduler hücreler sitoplazmalarında çok sayıda salgı granülleri içerir ve bu çok sayıdaki sekretorik granülün varlığı metabolik ve sekretorik aktivitenin arttığını gösterir. Postpartum kırkıncı günde ise uterusu görülen mikroskopik ve submikroskopik görünüm postpartum otuzaltıncı günde olduğu gibidir. Sitoplazmada büyük granüllü sekretorik hücreler postpartum kırkıncı günde de bulunur. Endometriyumda bulunan uterus bezlerinin kademeli proliferasyonu gözlenir. Keçilerde endometriyumun yüzey epitelinin morfolojik yapısı incelendiğinde involüsyonun ve onarım işleminin doğumdan sonra otuzaltıncı güne kadar tamamlandığını göstermektedir (49).

Tavşanlarda sağ ve sol uterus kornularının uzunluğu ve ağırlığındaki asimetri, farklı sayıda embriyoların implantasyon alanlarındaki uterus hipertrofisi ve hiperplazisinden kaynaklanır. Uterus kesitlerinin mikroskopik olarak incelenmesi normal histolojik yapısına hızlı döndüğünü göstermektedir. Doğum sırasında uterus epitelinde multifokal erozyonlar vardır. Postpartum dördüncü saate kadar uterus yüzeyindeki epitel hücrelerin yoğun bir mitotik aktivite gözlenmektedir. Aynı zamanda endometriyum ödemli olup nötrofil granüositler içerir. Postpartum sekizinci saate mitotik aktivite devam etmektedir ve luminal epitel bazıları silyumlu olan küboidal hücrelerden oluşmaktadır. Postpartum onaltıncı saate yüzey epiteli normal haline döner ve silyumlu, uzun prizmatik, bazal yerleşimli çekirdeği olan hücrelerden oluşur. Ara sıra, çok çekirdekli dev hücrelere de rastlanmaktadır. Postpartum onaltıncı ve kırkıncı saate öldürülen tavşanlarda bu hücrelerin epitelium altındaki altındaki kapillar damarlara yakın olarak yerleştikleri gözlenmiştir. Postpartum yirmidördüncü saate nötrofil granüositlerin sayısı ve stromal ödemin derecesi azalırken otuzikinci saate kadar endometrial stroma normal haline döner. Endometriyal bezler başlangıçta basit tubuler iken, postpartum kırkıncı saate kadar daha kıvrımlı bir şekil alırlar. Postpartum kırkıncı saate uterus müköz membranının yüzeyini çok çekirdekli dev hücreler ve desidual plaklar istila ederler. İnvolyasyon çok hızlı bir şekilde gerçekleşerek kırksekinzi saate tamamlanır ve birkaç saat içinde uterus ağırlığının yarısını kaybeder. Tavşanlar doğumdan sonraki saate genellikle çiftleşmeyi kabul ederler. Bu yüzden tavşanlar hem laktasyonda hem de gebe kalabilirler. Diğer evcil memelilere karşın, postpartum süreç boyunca tavşanların ovaryumları pre-ovulatör folliküller içerir (50).

Meishan ırkı dişi domuzlarda postpartum birinci ve onüçüncü günlerde uterusun glanduler epitel hücrelerinin basık küboidal şekilli olup sitoplazmaların zayıf bir şekilde boyandığı belirlenmiştir. Aynı özellik laktasyon döneminde de gözlenmiştir. Sütten kesilme sonrası glanduler epitel hücreleri yüksek prizmatiktir. Doğum sonrası birinci günde, luminal epitel hücreleri büzölmüş çekirdekli, basık prizmatik veya küboidal ve yüksek küboidal olmak üzere iki görünüme sahiptir. Postpartum onüçüncü günde luminal epitel hücrelerinin görünüşü basık ve yassıdır. Postpartum yirminci günde luminal epitel hücreleri postpartum onüçüncü gündeki hücrelerden biraz daha yüksektir. Postpartum otuzbirinci günde luminal epitel hücrelerinin görünümü postpartum yirminci günde olduğu gibidir. Sütten kesilme sonrası luminal epitel hücreleri bir hayli yüksek prizmatik görünüme sahiptir. Sonuç olarak luminal ve glanduler epitel hücrelerinin postpartum laktasyon döneminde gelişmediği (basık küboidal), sütten

kesildikten sonra (yüksek prizmatik) geliştiği görülmüştür. Bazal membran bileşenlerinin düzenlenmesi, domuza ait uterus involüsyonunda luminal epitelin proliferasyonu ve gelişimi üzerine etkilidir. Bu durum, uterus involüsyonunun süttten kesildikten sonra tamamlandığını göstermektedir (51).

2.2.1. Sıçanlarda postpartum uterus involüsyonu

Sıçanlarda doğumdan hemen sonra (0 saat) uterus incelendiğinde mukozanın lumene doğru farklı şekil ve büyüklükte kıvrımlar oluşturduğu görülür. Plasental alanlar haricinde mukoza tek katlı ve silyumsuz prizmatik hücreler ile örtülü iken, kıvrımların uçlarına doğru tek katlı kübik şekle dönüşür. Hücrelerin sitoplazmasında özellikle supranükleer bölgede çok sayıda granül bulunur. Çekirdek ise hücrelerin bazaline doğru yerleşmiş durumda oval şekilli ve veziküler görünüşte olup bir ya da iki adet çekirdekçik içerir. Hücreler toluidin blue ile boyandığında özellikle supranükleer bölge belirgin bir sitoplazmik bazofili gösterir. Plasental alana bitişik bölgeler haricinde uterus epitelinde çok sayıda mitotik figürler izlenir. Uterus epitelinde prizmatik hücreler arasında ikinci bir hücre tipi bulunur. Bu hücrelerin sitoplazması yoğun boyanmış olup mekik şeklinde bir çekirdeğe sahiptirler. Plasental alana yakın bölgedeki epitelde çok sayıda polimorfnükleer lökositler infiltre olmuştur. Uterus kornularının yan duvarında ve antimesometriyal sınırdaki az sayıda bezler bulunurken mezometriyal sınırlarda bez yoktur. Endometriyum çok ince bir tabaka olan ve hücre yoğunluğu değişen lamina propria (stroma) ile miyometriyuma ayrılır. Stromada bol miktarda kan damarı ve sinir pleksusları bulunur. Plasental alanlarda epitel bulunmaz ve stromal hücreler çok daha fazla sayıdadır. Postpartum birinci günde uterus epitelinde çok daha fazla değişiklik şekillenir. Luminal epitel hücreleri diğer postpartum günlerinden çok daha büyüktür. Hücrelerin bazalindeki eozinofili belirginleştiği halde hücre sınırları belirgin değildir. Aynı zamanda hücreler vakuollü olup bu vakuoller hücrenin supranükleer bölümüne yerleşmiştir ve onların çoğu hücre döküntüleri içerir. Vakuolleşmenin yoğun olduğu bölgelerde epitel ile endometriyal stroma arasındaki sınırı tespit etmek zordur. Bu bölgelerde epitel tek katlı prizmatik olduğu halde yalancı çok katlı prizmatik gibi görünür ve mitotik aktivite yoktur. Stromanın hücre yoğunluğu artar, bu artış plasental bölgelerde daha fazladır. Plasental arterlerin yapılıması ilerlerken kan damarları dilate olmaya devam eder (43, 52). Gebe olmayan sıçanların uterusunda longitudinal düz kas tabakası daha az bağ doku içerir. Postpartum birinci günde ise longitudinal düz kas tabakası nispeten daha geniş bağ doku alanlarına sahipken, bağ doku miktarı postpartum

3. günde azalır ve bu azalma postpartum onuncu güne kadar devam eder. Postpartum birinci günde sirküler miyometriyum mekik şekilli hücrelere sahip olup gebe olmayan sıçanlarla kıyaslandığında daha fazla bağ dokuya sahip olduğu görülür (52). Postpartum üçüncü ve beşinci günde ise birkaç ilave değişiklik meydana gelir. Postpartum üçüncü günde endometriyum birinci günden daha kalındır ve luminal epitel hücreleri daha küçük olup mukoza daha az kıvrımlıdır. Aynı zamanda sirküler düz kas tabakasındaki hücreler mekik şeklini kaybederek daha kompakt bir yapı kazanır. Postpartum üçüncü günde düz kas hücrelerinde hem apoptozis, hem de hücre proliferasyonu en yüksek seviyededir (8, 52). Postpartum beşinci günde plasental alanlardaki stromal hücre popülasyonu diğer bölgeler ile aynıdır. Pigment içeren hücreler çok sayıdadır ve bu hücreler uterus bezleri ile sirkular kas tabakasına bitişik endometriyumda gruplar halinde (43). Postpartum onuncu günde uterusun endometriyum tabakası kontrol grubununki ile aynıdır, fakat kontrol grubu ile kıyaslandığında çok sayıda eozinofilik hücreler gözlenmiştir. Bu hücreler miyometriyuma bitişik endometriyal stroma bölgesine yayılmıştır. Eozinofilik hücreler postpartum onbeşinci ve yirminci günlerde de gözlenmektedir. Postpartum onuncu günde sirküler düz kas tabakası gebe olmayan uterusunkine benzer özellik gösterir (52).

Sıçanlarda postpartum dönemde uterusun re-epitelizasyonu 36 saatte gerçekleşir ve bu hızlı rejenerasyon muhtemelen erken postpartum östrüstan kaynaklanır. İlk postpartum ovulasyon ise yavrulamadan sonra yaklaşık 18 saat içinde gerçekleşir (43). Kobaylarda uterus epiteli, yaklaşık olarak postpartum üçüncü günde vaginadan atılır ve bunun yerine uterus bezlerinin epiteli gelir (53). Tavşanlarda da benzer işlem postpartum birinci günde gerçekleşir (54). İnsanlarda, plasental alan eksfoliyasyon (pul pul dökülme) yoluyla temizlenir. Bu durum yeni gelişen endometriyumun, damarlarda tromboz ve dokularda yıkımlanmaya yol açması ile karakterizedir. Daha sonra bu nekrotik materyal uterus lumenine, oradan da dışarı atılır (55). Farelerde eksfoliyasyon plasental alanlarda oluşurken, sıçanlarda eksfoliyasyonun varlığına dair hiçbir kanıt yoktur. Bu durum kısmen plaseenta gelişimindeki detayların farklılığından kısmen de ilk postpartum ovulasyonunun oluşma zamanıyla ilişkili olabilir (56).

Sıçanlarda uterusun yaş ağırlığı postpartum birinci günde oldukça fazla iken postpartum üçüncü günde yaş ağırlık %50'den daha fazla azalır. Bu günden sonra involüsyon oranı azalır ve daha sonra uterus gebe olmayan sıçanların uterusu ile benzer özellik gösterir. Kollajen kaybı postpartum ikinci ve üçüncü günlerde hızlı bir şekilde gerçekleşirken

daha sonra hızı azalır. Kollajen ve uterus ağırlığındaki azalma postpartum süreç boyunca eşit değildir (52).

Sıçanlarda gebelik boyunca uterusun, düz kas hücrelerinin hipertrofisi ve kollajen miktarındaki artış ile birlikte hacmi büyür. Doğumdan sonra ise uterus involü olarak gebelik öncesi formuna döner. Bu involüsyon döneminde matrix metalloproteinaz (MMP) adı verilen endopeptidazların miktarı artarak, ekstrasellüler matriks ve bazal membranının kollajen gibi çeşitli makromoleküler komponentlerini parçalar ve böylelikle kollajen miktarında azalma şekillenir (57). İnvolü olan sıçan uterusunun katepsin içerdiği de bildirilmektedir. pH'nın 3,5 olduğu 37 C⁰ lik ortamda katepsin, uterus homojenatlarındaki kollajeni sindirir. Kollajen yıkımlanmasının ilk aşamasında iplikler çözünür. Çözülen kollajen daha sonra termal olarak 37 C⁰ de denature olur ve muhtemelen lizozomal orijinli asit katepsinler yoluyla sindirilir (58). İnsan uterusunda düz kas hücrelerinin kollajen fagositozunu ve yıkımlanmasını sağladığı ortaya konulmuştur (59). Kobaylarda ise kollajen ipliklerin ortadan kaldırılmasında miyometriyal damarların endotelial hücrelerinin de görev aldığı bildirilmektedir (60).

Sıçanlarda postpartum uterusun kollajenolitik aktivitesi steroid hormonların seviyesinden büyük ölçüde etkilenir. Postpartum dönemdeki sıçanlara östrojen ve progesteron verilmesinin uterus involüsyonunu ve kollajenolitik aktiviteyi yavaşlattığı tespit edilmiştir. Buna karşın doğum sırasında ovariyektomi yapılması kollajen kaybını ve involüsyonu hızlandırır. Sıçanlarda progesteron seviyesindeki azalma uterus involüsyonunun ve dolayısıyla da kollajenaz aktivitesindeki artışın bir işareti sayılabilir (61).

İnvolü olan sıçan uterusunda kollajen yıkımlanmasından fibroblastların sorumlu olduğu tespit edilmiştir (62). Öte yandan başka bir çalışmaya göre, postpartum dönemde uterusunda kollajen yıkımlanması makrofajlar tarafından gerçekleştirilmektedir (63). Postpartum dönemdeki farelerde miyometriyum ve endometriyumun bağdokusunda çok sayıda makrofajların bulunduğu ve elektron mikroskopik incelemelerde bu makrofajların vakuollerinin çok sayıda kollajen iplikleri içerdiği bildirilmektedir. Bu durum postpartum dönemde kollajenin yıkımlanmasından makrofajların sorumlu olduğunu göstermektedir. Doğumdan sonra dördüncü güne kadar asit fosfataz aktivitesinde hızlı bir artış şekillenir ve bu enzimler temel olarak makrofajlarda kollajen içeren vakuoller içinde, daha az oranda da endotelial hücrelerde lokalize olmaktadır. Postpartum yirmidördüncü saatte involü olan uterusunda bulunan makrofajlar belirgin bir takım morfolojik değişikliğe uğrarlar. Düzgün duvarlı tubul ve vezikül içeren Golgi

kompleksinin sayısı artar ve granüllü endoplazmik retikulum sitoplazmasının tamamına yayılır. Aynı zamanda bu hücreler değişik büyüklükte vakuollere sahiptir. Bu makrofajlar kollajeni fagosite ettikten sonra sitoplazmaları ince uzun görünür (64).

Uterus involüsyonunda makrofajların önemli bir rolü olduğu düşünülürken, tavşanlarda nötrofil granüositlerin baskın olduğu tespit edilmiştir. Sıçanlarda doğumdan sonraki ilk dört gün boyunca makrofajlar ve nötrofil granüositler yüksek miktardadır (65). Sıçanlarda endometriyal fagositler, postpartum dönemde bol miktarda lizozomların gelişmesi ile yoğun bir fagositik ve pinositik aktivite gösterirler. Fagositik hücrelerin doğumdan sonra toplanmasının nedeni, konağı bakteriyel enfeksiyona karşı koruma ve doku döküntülerini fagosite etme yönündedir. Makrofajlar ve aynı zamanda nötrofil granüositler, düz kas hücre sitoplazmasının ayrılan parçalarını içeren hücre döküntülerini ve kollajeni de fagosite ederler (66).

Sıçan ve farede involüsyon boyunca uterus büyüklüğünün azalması aynı zamanda doku bileşenlerinin tekrar düzenlenmesi ile ilgilidir. Bu işlem ECM bileşenlerinin hem yıkılmasında, hem de tekrar sentezlenmesi ile düzenlenir. ECM; glikoprotein, proteoglikan ve glikozaminoglikanlardan oluşur. Aynı zamanda ECM, hücrelerin adhezyonu, proliferasyonu, migrasyonu ve differensiyasyonu üzerinde de etkilidir ve organlara yapısal desteklik sağlar (3).

Sıçan uterusunun involüsyon döneminde otofagositozis, heterofagositozis ve krinofaji olarak adlandırılan 3 sistemin devreye girdiği belirtilmektedir. Yaşlanan hücre organellerinin ve inklüzyonlarının fagositozisi anlamına gelen otofagositozis, düz kas hücrelerinde meydana gelir. Bazı durumlarda yoğun otofajinin hücre ölümüne neden olduğu görülmüştür (67).

Postpartum sıçan uterusunda bir takım kimyasal değişiklikler de meydana gelir. İnvölüsyon döneminde total heksoz içeriği azalır. Heksoz konsantrasyonu gebeliğin 20. gününde bulunan değer yaklaşık yarısı kadar bir değere ulaşır. Kollajen konsantrasyonu involüsyon süresi boyunca oldukça değişiklik gösterirken, heksozamin ve üronik asit konsantrasyonlarında çok az bir azalma görülür. İnvölüsyon süresi boyunca ve gebeliğin son dönemlerinde belirgin miktarda artış gösteren serum mukoprotein seviyelerine karşın, serum hidrokspirolin değerleri postpartum dönemde önemsiz derecede bir artış gösterir, fakat postpartum beşinci ve sekizinci günde tekrar azalmaya geçer. Yine uterustaki total nükleik asit değerleri involüsyon süresi boyunca azalır (68).

2.3. POSTPARTUM DÖNEMDEKİ UTERUS DOKUSUNDA İMMUNİTE

Dişi genital sistemin epitelinde menstruasyon, döllenme, implantasyon, gebelik ve doğum gibi bir seri fizyolojik olay gerçekleşir. Bu durum dişi genital sistemin epitelini, sindirim ve solunum sistemleri gibi vücudun diğer sistemlerin epitelinden farklı kılar (69). Dişi genital sistem dış ortama açıldığından sürekli farklı tipte patojenler ile karşı karşıya gelir. Bu yüzden dişi genital organların immun sistemi, alt genital sistemin doğal sakinleri olan kommensal organizmalarla reaksiyona girerek patojenik saldırılardan konakçıyı koruması beklenir (70).

Postpartum involüsyon döneminde uterusun bakteriyel kontaminasyonuna sıkça rastlanılır. Uterusdaki bakteriyel enfeksiyonlar sadece uterusun fonksiyonunu bozmakla kalmayıp, aynı zamanda ovaryum ve hipotalamus-hipofiz gibi kontrol merkezlerini de etkileyebilirler. Uterus enfeksiyonunun hipotalamus ve hipofiz bezinin fonksiyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde, Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan endotoksin ile ilişkili olduğu yöndedir. Endotoksin, postpartum uterus lumeninden absorbe edilerek periferal kana verilir ve plazma endotoksin konsantrasyonu artar. Daha sonra kan yoluyla hipofize gelir ve hipofiz bezinden LH sekresyonunu inhibe eder, hipotalamustan GnRH salgılanmasını baskılar, endojen veya ekzojen kaynaklı GnRH'a karşı hipofizin duyarlılığını azaltır. Uterusta oluşan enfeksiyonlar, subfertilite ve infertilite gibi üreme sistemi bozukluklarına da yol açar. Uterustan bakteriyel komponentlerin absorpsiyonu, ovulasyon ve folliküler faz LH artışını engelleyebilir (71).

Uterusun kalitatif ve kantitatif bakteriyel kontaminasyonu, bakteriyel kontaminasyon ve hayvanın savunma mekanizmaları arasındaki dengeye bağlıdır. Endo-serviks, uterus ve tuba uterina epiteli, luminal antijenlerden alttaki dokuları bariyer olarak koruyan ve tight junctionlar ile bağlanan kutuplaşma gösteren epitel hücrelerinden oluşur (72). Fiziksel bariyer oluşturan uterus epitel hücreleri komplement, lizozim, laktoferrin, defensin ve sekretorik lökosit proteaz inhibitörü içeren antimikrobiyal maddeler üretir (32,70). Uterus epitel hücreleri aynı zamanda doğal immun sistem hücrelerinin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlayan sitokinleri ve şemokinleri de salgılar (73). Örneğin endometriyumdaki epitel hücreler, granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör 2 (Granulocyte-Macrophage Coloni Stimulating Factor 2, CSF2), makrofaj koloni uyarıcı faktör (Macrophage Coloni Stimulating Factor, CSF1), tümör nekrozis faktör- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α), interlökin (Interleukin, IL) 1, IL 6, IL 8, lökemi-inhibitör

faktör ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) kapsayan çok sayıda sitokinleri üretir (74). Sitokinler, uterusu hücreler arasında intersellüler iletişimi sağlayan ve cinsiyet hormonları tarafından yönetilen hem menstrual hem de östrus siklusu boyunca geçici olarak salgılanan önemli komponentlerdir (75).

Uterus epitel hücrelerinin oluşturduğu mukozal bariyer, bakteriyel, fungal ve viral patojenlere karşı konakçıyı korur. Doğal immun koruma, patojenlerden organizmayı koruma ve kendinden olanla olmayana ayırma gibi non-adaptif mekanizmalardan oluşur. Aynı zamanda doğal immun sistem, edinsel immun yanıtı uyarmada ve uygun hale getirmede önemli bir role sahiptir. Buna karşın edinsel immunité, mikrobiyal tehdidin ortadan kaldırılması ve bir sonraki enfeksiyonda aynı patojeni tanıyan spesifik antikorlar içeren spesifik hücresel yanıtın gelişimine neden olur (76, 77). Ovaryumdan salgılanan östradiol ve progesteron gibi hormonlar dişi genital sistemi başarılı bir fertilizasyon, implantasyon ve gebelik için hazır hale getirir (78).

Doğumdan önce uterus lumeni sterildir ve bu dönemde eğer bakteriyel invazyon olursa bu durum genellikle ya abort ya da fütüsün rezorpsiyonu ile sonuçlanır. Bu aborta neden olan mikroorganizmaların bazıları zoonotiktir ve bu nedenle insan sağlığı için bir risk oluşturmaktadır (79). Gebelik boyunca serviks, vagina ve vulvanın fiziksel bariyerleri, hayvanın derisi, dışkısı ve çevresinden bakterilerin genital sistemin üst kısımlarına doğru geçişini engeller. Aynı zamanda gebelik boyunca servikal mukus tıkacı, plasenta ve fütal membranlar, uterus boşluğunun sterilitesini sağlayarak ve gelişen fütüsü koruyarak doğal immun yanıtı katkıda bulunurlar. Uterus lumeninin bakteriyel kontaminasyonuna diğer memelilerden farklı olarak en çok sığırlarda rastlanılır (80). Uterusun bakteriyel kontaminasyonu spesifik değildir ve klinik hastalıkla ilişkili çok sayıda uterus patojenleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları: *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* ve *Prevotella melaninogenicus*'dur. Aslında *A. pyogenes*, *F. necrophorum* ve *P. melaninogenicus* uterus hastalığının şiddetini artırmak için sinerjik olarak hareket ederler (81).

Ovaryumun siklik aktivitelerine postpartum dönemde geri dönmesi, uterusun immun yanıtını etkiler. Özellikle progesteronun luteal faz konsantrasyonları immun yanıtı baskılayarak uterusu bakteriyel enfeksiyona karşı daha duyarlı hale getirir (82).

Alt dişi genital sistem kommensal mikroorganizmaları barındırırken, üst dişi genital sistem sterildir. Genital sistem boyunca mikrobiyal temastaki bu farklılık,

mikroorganizmalara cevapta ihtiyaç duyulan doğal savunma mekanizmalarının vajinadan uterusu kadar uniform olmadığını göstermiştir (78). zelleşmiş immunreglator mekanizmaların işlevsel olduğu genital sistemde doğal immun sistemin üç önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, fiziksel olarak enfeksiyonu engellemektir. İkincisi, enfeksiyon oluştuğuunda edinsel immun yanıt gelişinceye kadar patojenlerin çoğalmasını sınırlayan anti-mikrobiyal bileşikleri üretmektir. Üçüncüsü, adaptiv immun yanıtın fenotipini çalıştıran immunmodlator molekülleri üretmektir. Bu savunma mekanizmalarının kombinasyonları infeksiyöz ajanlara karşı konakçıyı korumada gereklidir (83). Fiziksel bariyerler mukozal yüzeylerde konakçı savunmasının ilk basamağını oluşturur. Örneğin; epiteliyal tight junctionlar ve mukozal sekresyonlar dokulara mikrobiyal girişi engelleyen önemli faktörlerdendir. Lactobasillus spp. gibi vajinal kommensaller, düşük pH ortamı (<5) oluşturmak için hidrojensel peroksit ve laktik asit üretilir. Bu durum alt genital sistemi patojenik mikroorganizmalardan korumaya yardımcı olur ve dolayısıyla da st genital sisteme enfeksiyonun ulaşma olasılığını azaltır (70). Yine de, birçok patojen mukozal yüzeylerden girer ve bu nedenle konakçının enfeksiyonun yayılmasını sınırlaması ve hızlı bir cevap oluşturması gerekir ki, bu invaze olan patojenlerin tanınması ile sağlanır. Potansiyel patojenik mikroorganizmaların tanınması, TLR'ini de içine alan patojenleri tanıyan reseptörler (PRR) olarak bilinen hücresel reseptörler sınıfının önemli bir fonksiyonudur. PRR reseptörleri; endositik, salgılanan ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu Toll-like reseptör ailesi oluşturmaktadır (18). PRR'lerin oluşmasında merkezi bir rol oynayan yedi protein ailesi identifiye edilmektedir: 1) kollektinleri içeren C-tipi lektinler, 2) Doğal ldrc (Naturel Killer, NK) hücreler ve makrofajlar tarafından eksprese edilen reseptörler, 3) birçok protein-protein etkileşimine aracılık eden lösinden zengin bölgesi olan proteinler, aynı zamanda LPS için hücresel bir reseptör olan CD14 gibi PRR'ler, Toll homologu, 4) p (scavenger) reseptörler, 5) karaciğerden salgılanan ve patojenlere cevapta plazmaya salıverilen akut faz reaksiyon komponentleri pentraksinler, 6) LPS bağlayan protein gibi lipid transferazlar, 7) integrinler ve komplement kontrol proteinleri (76).

2.4. TOLL-LIKE RESEPTÖRLER

TLR bakteriyal, fungal ve viral patojenler tarafından üretilen PAMP'ı tanıma yeteneğinde olan transmembran proteinlerdir. Bu mikrobiyal moleküler belirteçler protein, karbonhidrat, lipid, nükleik asit ve/veya bunların birleşiminden oluşabilir (84). PAMP tarafından indüklenen endojen sinyaller 3 kategoride gruplandırılır: 1) IL-1, TNF- α , IL-6, Tip 1 interferon ve çeşitli şemokinleri içeren inflamatuvar yanıt aracılı sinyaller, 2) T-hücre aktivasyonunun kostimülatörleri olarak fonksiyon gösteren sinyaller, 3) IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TGF- β ve interferon- γ (Interferon- γ , IFN- γ) içeren efektör fonksiyonların indüklenmesini kontrol eden sinyaller (76). TLR ve spesifik PAMP'nın bağlanması, nüklear transkripsiyon faktörlerinin translokasyonunu, birçok yangı öncesi sitokinlerin, gamma/beta interferon ve antimikrobiyal peptidlerin üretimine sebep olan uygun gen transkripsiyonunu başlatır (22, 85).

TLR periferel kan lökositleri ve dalak gibi immunolojik açıdan önemli olan ortamlar dışında akciğer ve gastrointestinal sistem gibi dış ortamlarla ilişkili olan dokularda da yüksek miktarlarda eksprese edilmektedir (86). Son zamanlarda yapılan çalışmalar patojenleri tanımadaki rolleri yanında TLR'nin stres altında veya zarar gören hücreler tarafından üretilen endojen faktörlere karşı da cevap verdiğini göstermiştir. Bu faktörler; ısı şok proteinleri (Heat Shock Protein 60, HSP), ekstrasellüler matriks komponentleri, fibronektin, heparan sülfat ile hiyaluronanın parçalanma ürünleri, memeli kromatinini ve yangı gen ürünlerini kapsar (87).

Toll reseptörleri ekstrasellüler lösinden zengin domainler içeren bir amino ucuna ve intrasellüler Toll/IL-1 reseptör (Toll/Interleukin 1 Receptor, TIR) sinyal domainleri içeren bir karboksil ucuna sahiptir. Toll'un sitoplazmik bölgesi memeli IL-1 reseptörünün (Interleukin 1 Receptor, IL-1R) sitoplazmik bölgesine benzerlik gösterdiğinden bu alana TIR alanı denir (87).

Toll Almandada "şaşırtıcı" anlamına gelmektedir. İlk olarak 1985 yılında meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*) üzerinde embriyonik araştırmalar yapan Christiane Nüsslein-Volhard önemli bulduğu genleri tek tek iptal ederek, onların canlı gelişimi üzerindeki etkilerini anlamaya çalışmıştır. İptal ettiği genlerden birinin etkisini engellediğinde, meyve sineklerinde *Aspergillus* mantarına bağlı enfeksiyon ve ölümler gözlemlenmiş, sağlıklı hayvanlarda ise böyle bir enfeksiyon gözlenmemiştir. Bunun üzerine Volhard "Das war ja Toll" (Ne kadar şaşırtıcı) demesi üzerine Toll kelimesi bu sahada kalıcı hale gelmiştir. Bu transmembran Toll proteinin görevi erken embriyonik gelişimi

düzenlemek ve doğal immun mekanizmalara aracılık etmektir. *Drosophila*'da Toll reseptörleri, bir adaptör tüpe bağlanma yoluyla (memelilerde fonksiyonel homoloğu MyD88) doğal immun cevabın başlatılmasına neden olur. Bu tüp, kinaz Pelle'ye (memelilerde homoloğu IRAK) bağlanır ve daha sonra patojenleri direkt öldüren antimikrobiyal yolların aktivasyonuna aracılık eden ve bu yolları ayarlayan genlerin transkripsiyonuna neden olur (88, 89). TLR, IL-1R süper ailesinin bir üyesi olup amino asit sıralarında benzerlikler ve intrasellüler sinyallerine göre beş alt aileye ayrılır: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR9'dur. TLR2 alt ailesi TLR1, TLR2, TLR6 ve TLR10'dan oluşur. TLR9 alt ailesi ise TLR7, TLR8 ve TLR9'dan oluşmaktadır. TLR1 ve TLR6, TLR2 ile heterodimer oluşturur (90).

TLR IL-1R süper ailesinin bir üyesi olup nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, dentritik hücreler, dermal endotel hücreleri, mast hücreleri ve mukoza epitel hücrelerini içine alan konakçı savunmasında birincil fonksiyona sahip olan hücrelerde bulunurlar. İmmun hücreler endotoksin, peptidoglikan, flagellin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyal komponentleri TLR aracılığıyla tanır. TLR ekspresyonu sadece bu hücre tipleri ile sınırlı değildir, aynı zamanda adrenal bez, karaciğer, akciğer, dalak, testis, timus ve trakeya gibi dokularda da tespit edilmiştir. TLR'in fonksiyonu mikroorganizmaların varlığında immun sistemi uyarmak, immun sistem hücrelerinin antimikrobiyal öldürme mekanizmalarını ve antijen sunma kapasitelerini artırmaktır. TLR ailesinin farklı üyeleri aktive edilen hücre tipine bağlı olarak tümör nekrozis faktör- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) ve IL'leri (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) içeren sitokinleri, şemokinler ve efektör moleküller (CD80, CD86 ve CD40) gibi çeşitli yangı öncesi moleküllerin üretimine neden olarak doğal ve adaptif immun sistem arasında bağ kurar (91). Daha sonra bu sitokinler, yüksek ateşe neden olur ve pozitif feed back yaparak immun hücre mobilizasyonunu daha da artırır. Aynı zamanda bakteriyal enfeksiyona karşı serbest bırakılan bu yangı öncesi sitokinler, karaciğerden akut faz proteinlerinin sekresyonunu uyarır. Böylelikle periferal plazma akut faz protein konsantrasyonu doğum süresince artar ve daha sonra uterus involüsyonu ile bakteriyal kontaminasyonun eliminasyonunun eşlik ettiği dönemde azalır (71).

İnsanlarda 11 adet TLR tipi tanımlanmıştır ve bu reseptörler koyun hariç fare, tavuk, domuz, sığır, kedi ve köpek gibi çeşitli türlerde klonlanmıştır (77, 92). TLR1-9 fare ve insanda homolog olduğu halde, insan genomu TLR10'a sahiptir fakat TLR11, 12 ve 13 bulunmaz. Oysa fare genomu TLR11, 12 ve 13'e sahiptir, ancak TLR10 içermez (85). Bakteriyal ve diğer mikrobiyal hücre duvarı komponentlerini tanıyan TLR1, 2, 4-6 ve

10 hücre yüzeyinde bulunurken, bakteri ve virusların nükleotid komponentlerini tanıyan TLR3, 7, 8 ve 9 sitoplazmik organellerde özellikle de endozomlarda intrasellüler olarak bulunur (93).

2.4.1. TLR1

TLR1 84 kDa moleküler ağırlığında olup makrofajlar, dendritik hücreler, polimorf nükleer lökositler, NK hücreler, B- ve T-lenfositler gibi hücreler ile özellikle monositlerde eksprese olurlar. Doku olarak ise; böbrek, akciğer ve dalakta eksprese edilir. TLR1 seviyesi, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerle temastan etkilenmez. Canlı ortam dışında hem monositler hem de granülositler, Gram-negatif bakterilere maruz kalındığında TLR1 ekspresyonuna zıt yönde etki yapar (86). TLR1, TLR2 ile heterodimer oluşturur. TLR heterodimerizasyonun önemi tam olarak anlaşılmazken, TLR1 gibi bazı TLR, TLR2'nin PAMP'a karşı duyarlılığını ve spesifitesini artırdığı düşünülür. Ancak TLR2'nin bir homodimer olarak sinyal vermeyip bu fonksiyon için TLR1'e gerek duyduğuna dair kanıtlar da vardır. TLR1 aynı zamanda TLR4 ile de heterodimer oluşturur. Fakat TLR4'ün fonksiyonunu artırmaz tam tersine aktivitesini inhibe eder (94).

2.4.2. TLR2

TLR2 mRNA ekspresyonu beyin, akciğer, kas, kalp ve dalak gibi dokularda gözlenirken en çok da periferik kan lökositlerinde özellikle de myelomonositik orijinli olanlarında incelenmiştir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında TLR2 mRNA ekspresyonu artar (86). TLR2, TLR1 ve TLR6 ile birlikte ve daha nadir olarak da TLR10 ile (95) heterodimerler oluşturur ve Gram-pozitif bakteriler (PGN, LTA, lipoprotein) (25), Gram-negatif bakteriler (lipoprotein), mantarlar (zymosan) (96), sentetik lipoprotein (97), mikobakterilerin [LAM (lipidden zengin mikobakteriyal hücre duvarının major bir immunstimulator komponentidir)], spiroketler, LPS, glikolipid ve glikoprotein gibi patojenle ilişkili moleküler yapıları tanıır. TLR2/TLR6 heterodimeri LTA, TLR2/TLR1 heterodimeri bakterilerin hücre duvarının triaçil lipoprotein/peptidlerini, TLR1/TLR6 ise mikoplazmanın diaçil lipoproteinlerin tanınmasından sorumludur (98). TLR2 vasıtasıyla bakteriyal lipoproteinler yangı öncesi sitokin IL-1 β prekürsörünün sentezini indükler. Bakteriyal lipoproteinler aynı zamanda TLR2 yoluyla kaspaz 1'i aktive ederek IL-1 β sekresyonuna ve proteolizisine neden olur (99). 84 kDa moleküler ağırlığında olan TLR2, aynı zamanda kızamık virusu, insan

sitomegalivirus, hepatit C virusu gibi virusları da tanıma yeteneğine sahiptir (95). Son yıllarda yapılan çalışmalar TLR4 gibi TLR2 komplekslerinin de patojen ile ilişkili yapıları tanımak ve sinyalizasyon için CD14'e ihtiyaç duyduğunu ileri sürmektedir (100). İnsanlarda sepsisin yaşamı tehdit eden komplikasyonları, Gram-negatif bakteriler yanında Gram-pozitif bakterilerin meydana getirdiği enfeksiyonlar tarafından ortaya çıkar. Son zamanlarda Gram-negatif bakterilerin major bir bileşeni olan LPS, TLR2 tarafından hücrel aktivasyona aracılık ettiği gösterilmiştir. LPS gibi Gram-pozitif bakterilerin temel stimulator komponentleri olan PGN ve LTA, membran proteini olan CD14'e bağlanır ve makrofajlar gibi konakçı hücrelerinde transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonunu indükler (25).

2.4.3. TLR3

TLR3 plasenta ve pankreas gibi dokularda yüksek miktarlarda, daha az oranda da farenin akciğer, beyin ve böbrek dokularında eksprese edilmiş olup 97 kDa moleküler ağırlığındadır (101). TLR3 ayrıca epitel, granülosit, monosit, T- ve B- hücrelerinde de eksprese edilmektedir. TLR3 mRNA ekspresyonu Gram-negatif bakterilere maruz kalındığında artarken, Gram-pozitif bakterilerle temasta da belli bir miktar artar. Canlı dışında TLR3 mRNA ekspresyonu, Gram-negatif bakterilere maruz kalındığında hem monositlerde hem de granülositlerde artmaktadır (86). TLR3 homodimer formda bulunur, viral veya hücrel orijinli çift sarmallı RNA (dsRNA) molekülünü tanır (21). Genellikle TLR'i hücre yüzeyinde eksprese edilmesine karşın viral yaşam siklusunun bir ürünü olan dsRNA gibi internal PAMP'a duyarlı TLR3, hücre içinde bazen de lizozomal kısımda yer alabilir (102). TLR3 sinyal yolağının dsRNA ile uyarılması sonucunda NF- κ B ve interferon regülör faktör 3 gibi transkripsiyon faktörleri aktif hale geçer ve bunun sonucunda yangı öncesi ve antiviral sitokinler salgılanır (21). TLR3, miyeloid farklılaşma faktör 88'e (Myeloid Differentiation Factor 88, MyD88) bağlı olmadan fonksiyonunu sürdürür ve çekirdeğe sinyal göndermek için sadece adaptör TIR domaini içeren adaptör indükleyici interferona (Toll Interleukin-1 Receptor Containing Adapter Inductive Interferon, TRIF) ihtiyaç duyar. Aynı zamanda fare Sitomegalovirus, Reovirus ve influenza virusun neden olduğu enfeksiyonlarda görev almaktadır (103).

2.4.4. TLR4

Memelilerde TLR ailesinin ilk tespit edilen üyesi olan TLR4'ün, LPS'e bağlanması üzerine yangı öncesi NF- κ B yolağını başlattığı gösterilmiştir. İn vivo TLR4 mRNA en yüksek seviyede dalakta ve periferel kan lökositlerinde (B-lenfositler, dendritik hücreler, monositler, makrofajlar, granulositler ve T-lenfositler) eksprese edilmektedir (104). Diğer çalışmalar ise TLR4'ün sadece myelomonositik hücrelerde eksprese edildiğini ve en yüksek miktarda da mononükleer hücrelerde bulunduğunu ileri sürmektedir (86). TLR4'ün TLR5 ile oluşturduğu heterodimer aktivitesini artırırken, TLR1 ile oluşturduğu heterodimer ise aktivitesini inhibe eder (105, 106).

TLR4 Gram-negatif bakterilerin dış membranının major komponenti olan ve kuvvetli bir makrofaj aktivatörü olan LPS'i tanır ve aynı zamanda infeksiyon ve vücudun zarar gören bölgelerinde serbest bırakılan HSP60 gibi konakçı protein moleküllerine bağlanır (11, 45). Makrofajların LPS ile stimülasyonu TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, makrofaj inflamasyon protein-1 α/β gibi çeşitli sitokinlerle; prostanoidler, lökotrienler ve nitrik oksit gibi yangısal efektör substansların üretimiyle sonuçlanır (107). TLR4 kompleksi respiratorik sinsityal virus, hepatit C virusu ve fare meme tümör virusu gibi virusları; fibrinojen, fibronektin, surfaktan protein A ve β -defensinler gibi endojen ligandları da tanıma kapasitesine sahiptir (95). 90 kDa moleküler ağırlığında olan TLR4, yangısal bölgelerde üretilen fibronektinin bir başka biçimidir. Bazı TLR doğal immun ligandlarına direkt bağlanırken, TLR4 gibi reseptörler bu işlem için yardımcı moleküllere ihtiyaç duyarlar. TLR4 sadece ikinci bir polipeptid olan MD-2 varlığında LPS'lere cevap verir. Bu molekül TLR4'ün ekstrasellüler domainine bağlanır ve LPS'in lipid içeren bölgesine TLR4'ün bağlanmasını sağlar. Bütün bakterilerde bulunmayan LPS formlarına cevap ikinci bir yardımcı molekül varlığında artar. CD14 olarak adlandırılan bu molekül monosit, makrofaj ve nötrofil granülositler tarafından eksprese edilen bir membran proteindir. CD14 molekülünün görevi LPS-bağlayan protein (Lipopolysaccaride Binding Protein, LBP) olarak adlandırılan bir serum lipid transfer proteinden LPS'i kabul eder. Lipidlerin çoğunda olduğu gibi LPS de çok küçük miktarlarda hücrelerden salgılanır. Doğal immun sistem hücreleri tarafından LPS'in tanınmasında bu nedenle LPS monomerlerinin ekstraksiyonunu sağlayan bir mekanizmaya ihtiyaç duyulur. Bu durum lipid bağlayan alanlarında bulunan diğer lipidlerden LPS monomerlerini ayıran LBP'in görevidir ve daha sonra bu protein LPS monomerlerinin CD14'e transfer edildiği hücrelere taşır. CD14 de bu monomerleri

TLR4-MD2 kompleksine sunar. CD14'ün genetik olarak bulunmaması veya monoklonal antikolar tarafından fonksiyonunun engellenmesi, LPS'e karşı makrofajların ve nötrofil granüositlerin duyarlılığını azaltır. Buna rağmen bazı bakterilerde bulunan LPS'ye karşı hala bir cevap oluşabilir. CD14, *Mycobacterium tuberculosis*'in LAM ve Gram-pozitif bakterilerin LTA gibi diğer bakteriyel hücre duvarı bileşenlerine de cevap geliştirebilir (108, 109).

TLR4'ün subsellüler lokalizasyonu makrofajlarda ve intestinal epitel hücrelerinde farklıdır. Makrofajlarda TLR4, hücre yüzeyinde eksprese edilirken liganda bağlanmasını takiben internal pozisyona geçer. Buna karşın epitel hücrelerinde Golgi aygıtının yanında bulunur (110).

2.4.5. TLR5

Ovaryum, prostat ve periferal kan lökositlerinde, en yüksek seviyede de monositlerde eksprese edilen (101) TLR5 mRNA ekspresyonu hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında artar. TLR5 91 kDa moleküler ağırlığında homodimer formda bulunmakla birlikte TLR4 ile heterodimer de oluşturabilir ve flagellalı bakterilerin flagellin proteinini tanır (111, 112). TLR5'in flagellin ile bağlanması sonucu TNF- α gibi inflamatuvar sinyal oluşur. İn vitro yapılan çalışmalar TLR5'in Gram-negatif bakterileri tanımada epitel hücrelerinin major bir sensörü olduğunu, intestinal ve korneal epitel hücrelerinde NF- κ B ve yangı öncesi gen aktivasyonuna öncülük eden anahtar sinyal yollarını aktive ettiğini ortaya çıkarmıştır. TLR5 intestinal epitelin basolateral yüzeyinde eksprese edilir. Bu yüzden flagellinin yangı öncesi gen ekspresyonunu aktive edebilmesi için intestinal epiteli geçip basolateral membranla kontak kurması gerekmektedir (113). TLR2, TLR4 ve TLR6 birçok farklı mikrobiyal ajana cevap verebilirken, TLR5 ve TLR9 tek bir yapıyı spesifik olarak tanıyan reseptörlerdir (114).

2.4.6. TLR6

İn vivo TLR6 timus, dalak ve akciğerde özellikle de B-lenfositler ve monositlerde eksprese edilmektedir. TLR6 91 kDa moleküler ağırlığında olup TLR2 ile heterodimer oluşturur. TLR1 gibi TLR6 da TLR2'nin PAMP molekülüne karşı duyarlılığını ve spesifitesini artırır. Aynı zamanda heterodimerizasyon yoluyla sinyal verme kapasitesine de katkıda bulunur (102). TLR6, Mikoplazma türevli lipoproteinleri ve peptidoglikanları tanır (97).

2.4.7. TLR7

TLR7 insanlarda, memeli hayvanlarda ve kanatlı türlerinde antiviral immün yanıtın başlatılmasında önemli bir rol oynayan immün bir gendir. İn vivo TLR7 mRNA kalp, kemik iliği, akciğer, plasenta, dalak, lenf düğümü ve tonsil gibi organlarda eksprese edilmesine karşın en yüksek düzeyde monosit, B-lenfosit ve dendritik hücrelerde eksprese edilir. 121 kDa moleküler ağırlığında olan TLR7'nin ekspresyonu in vitro ortamda Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında monositler ve granüositlerde artar (86). TLR3 gibi TLR7 de intrasellüler olarak lokalize olmuştur. Doğal ligandları hala bilinmemesine karşın, TLR7 imidazoquinolin olarak adlandırılan bir grup küçük sentetik antiviral bileşiklere (115), tek sarmallı RNA'ya (24) ve sentetik nükleotid türevlerine (115, 116) bağlanır. Anti-viral ve anti-tümör özelliklere sahip olan imiquimod ve R-848 gibi imidazoquinolin bileşikleri düşük moleküler ağırlıkta olup, çeşitli hücrelerde IFN- α , IL-12 ve diğer sitokinlerin sentezini uyarırlar (115). İmiquimod ilk olarak herpes simplex virus ile enfekte kobaylarda tanımlanmıştır ve bu bileşik şu anda insan papillomavirus enfeksiyonunun neden olduğu dış genital ve perianal siğillerin tedavisinde kullanılmaktadır (117). R-848 ise imiquimod'un kuvvetli bir türevidir ve bu bileşikte klinik tedavilerde kullanılmaktadır (118). TLR7 influenza virus ve vezikular stomatitis virusu gibi tek sarmallı RNA viruslarının neden olduğu enfeksiyonlar tarafından aktive edilir. Viral nükleik asitler tarafından TLR7'nin stimülasyonu, tip 1 IFN cevabına, büyük miktarlarda IFN- α salgılanmasına ve inflamatuvar sitokinlerin (IFN- β , IL-6, IL-12, TNF- α) üretimine neden olur (119). TLR7 tarafından nükleik asitlerin tanınmasını takiben MyD88 olarak adlandırılan ve TIR-içeren adaptörün toplanmasına yol açar. MyD88, IL-1 reseptör ilişkili kinaz (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase, IRAK) ailesinin üyeleri (IRAK1 ve IRAK4) ve dönüştürücü büyüme faktör kinazın (Transforming Growth Factor Kinase, TAK1) aktivasyonunu başlatan tümör nekrozis faktör (TNF)-ilişkili faktör 6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor, TRAF6) ile bir kompleks oluşturur ve bu durumda NF- κ B'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. TLR7'nin loxoribine ve broprimine gibi diğer sentetik kimyasalları da tanıdığı gösterilmiştir (120).

2.4.8. TLR8

TLR8 120 kDa moleküler ağırlığında olup TLR7 ve TLR9 ile yakından ilişkilidir. TLR8 mRNA akciğer, dalak, plasenta, lenf düğümü, kemik iliği ve periferik kan lökositlerinde en çok da monositlerde eksprese edilir. İn vitro ortamda Gram-negatif bakterilerle

temasa gelindiğinde monosit TLR8 ekspresyonu artarken, granüosit TLR8 ekspresyonu azalır (86). TLR8 intrasellüler olarak lokalize olmuştur ve TLR7 gibi doğal ligandları bilinmemesine rağmen imidazoquinolinlere (121), tek sarmallı RNA'ya (24) ve sentetik nükleotid türevlerine (115, 116) bağlanır ve sitokin salınımına neden olur.

2.4.9. TLR9

TLR9 116 kDa moleküler ağırlığında olup, TLR7 ve TLR8 ile yakından ilişkilidir. İn vivo TLR9 mRNA dalak, iskelet kası, lenf düğümü, kemik iliği ve periferel kan lökositlerinde, özellikle de B-lenfositler ve dendritik hücrelerde ekspresedir (122). TLR9 homodimer formda bulunur; bakteriyel ve bazı viral nükleik asitlerde bulunan non-metilli deoksisitidil-fosfat-deoksiguanozin (CpG) dinükleotidleri tanır (23). Buna karşın memeli DNA'sı daha az sıklıkta CpG dinükleotidlerine sahiptir ve çoğunlukla da metillenmiştir. Bu yüzden memeli DNA'sı immunstimulator aktiviteye sahip değildir (123). Metillenmemiş DNA'yı içeren PAMP'ların bulunduğu lizozomik ve endositik kompartımanlarda intrasellüler olarak bulunur (18). Diğer TLR'i hücre yüzeyinde eksprese edilmesine karşın, TLR9 (TLR3, TLR7 ve TLR8 dahil) bir intrasellüler reseptördür.

2.4.10. TLR10

TLR10 95 kDa moleküler ağırlığında olup, TLR1 ile TLR6'nın homologudur ve farelerde sadece psöydogen olarak bulunmasına rağmen çoğunlukla immun sistem ile ilişkili dokularda (dalak, lenf düğümü, timus, tonsil) (124) ve özellikle de B-lenfositlerde (86) eksprese olur. TLR10 ligandları ve ilişkilerine dair çok az şey bilinmesine karşın TLR1 ve TLR6 gibi, TLR2 ile heterodimer oluşturduğu ve benzer PAMP'a karşı duyarlı olduğu ileri sürülmektedir (94).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar farelerde bulunan TLR11'in protozoon bir parazit olan *Toxoplasma gondii*'deki profilin benzeri proteine ve üropatojenik *Escherichia coli*'ye bağlandığını, insanlarda ise TLR11'in psöydogen olarak bulunduğunu göstermiştir. Bu profilin benzeri protein TLR11 vasıtasıyla fareye ait dendritik hücreleri aktive ederek IL-12 üretimini başlatır. Aynı zamanda in vivo ortamda parazitin indüklediği IL-12 üretimi ve paraziter enfeksiyona direnç için TLR11'e ihtiyaç duyulur (125, 126).

TLR12 yüksek oranda karaciğer, sidik kesesi ve böbrekte zayıf olarak da dalakta eksprese edilmiştir. TLR12 de üropatojenik bakteriler tarafından oluşturulan

enfeksiyonlara yanıt vermede görevlidir (85).

TLR13 faredeki TIR domaine homolog olarak identifiye edilmiştir. TLR13'ün TLR3 ile yakın ilişkide olduğu bilinmektedir (127).

Tavuk genomu biyoinformatik analiz yoluyla incelendiğinde omurgalılarda bilinen TLR'den farklı bir reseptör tanımlanmıştır. TLR15 olarak tanımlanan bu reseptör kanatlı hayvanlara spesifiktir. Orijinal TIR ve transmembran domainlere, farklı dizilimde ekstrasellüler lösinden zengin bölgelere sahiptir ve kromozom 3 üzerinde bulunur. TLR15 mRNA sağlıklı tavukların dalak, bursa fabricius ve kemik iliğinde eksprese edilir ve temel konakçı savunmasında önemli bir role sahiptir (128).

Tablo 2.1. Toll-like reseptörlerinin bağlayıcıları, adaptörleri, yerleşim yerleri ve bulunduğu hücre tipleri

Reseptör	Bağlayıcı(lar)	Adaptör(ler)	Yerleşim Yeri	Hücre Tipleri
TLR1+TLR2 Heterodimeri	Bakteriler ve mikobakterilerin hücre duvarının triaçil lipoprotein ve peptidlerini tanıır.	MyD88/MAL	Hücre Yüzevi	monosit/ makrofaj, dendritik hücrelerin bir alt kümesi, B-lenfosit
TLR2	Gram pozitif bakteriler (peptidoglikan, lipoteikoik asit, lipoprotein), Gram negatif bakteriler (lipoprotein), mantarlar (zymosan), spiroketler, Glikolipid, mikobakteriler (lipoarabinomanan), Trypanosoma cruzi (glikofosfatidilinositol) ve glikoprotein gibi patojenle ilişkili moleküller yapıları tanıır.	MyD88/MAL	Hücre Yüzevi	monosit/makrofaj, miyeloid dendritik hücreler, mast hücreleri
TLR2+TLR6 Heterodimeri	Bakteriyel lipoproteini, lipoteikoik asiti ve mantar hücre duvarında mannanları tanıır.	MyD88/MAL	Hücre Yüzevi	monosit/makrofaj, miyeloid dendritik hücreler, mast hücreleri
TLR3	Viral ve hücresele orijimli çift sarmallı RNA(dsRNA) molekülünü tanıır.	TRIF	Hücre içi	dendritik hücreler B lenfositler
TLR4	Gram negatif bakterilerin dış membranının majör komponenti olan lipopolisakkaritleri ve viral glikoproteinleri tanıır.	MyD88/MAL TRIF/TRAM	Hücre Yüzevi	monosit/makrofajlar miyeloid dendritik hücreler, mast hücreleri, bağırsak epiteli

Tablo 2.1. Toll-like reseptörlerinin bağlayıcıları, adaptörleri, yerleşim yerleri ve bulunduğu hücre tipleri (**Devamı**)

Reseptör	Bağlayıcı(lar)	Adaptör(ler)	Yerleşim Yeri	Hücre Tipleri
TLR5	Flagellalı bakterilerin flagellin proteinini tanır.	MyD88	Hücre Yüzeyi	monosit/makrofaj, dendritik hücrelerin bir alt kümesi, bağırsak epiteli
TLR6	Mikoplazma türevli dışıl lipoproteinleri ve peptidoglikanları tanır.	MyD88/MAL	Hücre Yüzeyi	monosit/makrofaj mast hücreleri, B lenfositler
TLR7	İmidazoquinolin olarak adlandırılan küçük sentetik antiviral bileşikleri, tek sarmallı RNA'yı ve sentetik nükleotid türevlerini (loxoribin, bropirimin) tanır.	MyD88	Hücre içi	monosit/makrofaj Plazmasitoid dendritik hücreler, B-lenfositler
TLR8	İmidazoquinolin, tek sarmallı RNA'yı ve sentetik nükleotid türevlerini tanır.	MyD88	Hücre içi	monosit/makrofaj dendritik hücrelerin bir alt kümesi, mast hücreleri
TLR9	Bakteriyel ve bazı viral nükleik asitlerde bulunan non-metilli deoksitidil- fosfat-deoksiguanozin (CpG) dimükleotidleri tanır.	MyD88	Hücre içi	monosit/makrofaj Plazmasitoid dendritik hücreler, B-lenfositler

Tablo 2.1. Toll-like reseptörlerinin bağlayıcıları, adaptörleri, yerleşim yerleri ve bulunduğu hücre tipleri (**Devamı**)

Reseptör	Bağlayıcı(lar)	Adaptör(ler)	Yerleşim Yeri	Hücre Tipleri
TLR10	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Hücre yüzeyi	monosit/makrofaj B-lenfositler
TLR11	<i>Toxoplasma gondii</i> deki profilin benzeri proteine ve üropatojenik <i>Escherichia Coli</i> 'ye bağlanmaktadır.	MyD88	Hücre yüzeyi	monosit/makrofaj, karaciğer hücreleri, böbrek-sidik kesesi epiteli
TLR12	Bilinmiyor	Bilinmiyor	?	?
TLR13	Bilinmiyor	Bilinmiyor	?	?
TLR15	Kanathı hayvanlara spesifiktir.	Bilinmiyor	?	?

2.5. TLR SİNYAL YOLAKLARI

TLR ile ilişkili sinyal yolları hala açıklanmaya devam ederken, bu yollarda çok sayıda spesifik molekülün rol aldığı bilinmektedir. Bunlar; MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), MyD88 adapter-like (MAL), Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR), Toll/IL-1R domain containing adapter protein (TIRAP, TRAM), TIR domain containing adapter inductive interferon (TRIF, TICAM1 olarak da bilinir) gibi adaptör moleküllerdir. Diğer anahtar sinyal proteinler ise; IRAK1, 2, 4 gibi IL-1 reseptör ilişkili kinazlar, Transforming Growth Factor (TGF)- β -activated protein kinase (TAK-1), Inhibitor- κ B (IkB) kinase ve TNF receptor associated factor (TRAF) kapsar (85, 129, 130).

2.5.1. MyD88-bağımlı yolak ve proinflamatuvar sitokin üretimi: Çeşitli PAMP ligandlarına rağmen, TLR3 haricindeki diğer TLR'ler adaptör bir molekül olan MyD88 ile genel bir sinyal yolağını paylaşırlar. MyD88 bütün TLR'lerde TNF- α ve IL-12 gibi inflamatuvar sitokinleri indüklemek için gereklidir.

MyD88 molekülü C-terminal bölgesinde TIR domainine, N-terminal bölgesinde de death domainine (DD) sahiptir. PAMP'ın TLR'ine bağlanması, TIR'ın aktivasyonuna neden olur ve bunun üzerine TLR'lerin kendilerine ait TIR domainleri ile MyD88'in TIR domainleri etkileşime girerek MyD88'in toplanmasına yol açar. MyD88'in DD'i daha sonra IRAK ve IRAK4'ün DD'e bağlanır. IRAK'lar N-terminal DD'ne ve merkezde serin/treonin-kinaz domainine sahiptir. MyD88'in IRAK ve IRAK4'e bağlanması onların fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olur. Fosforlanmış IRAK'lar daha sonra MyD88'den ayrılır ve TRAF-6 ile birleşir. TRAF6, TAK1 ve mitojenler tarafından aktif edilen protein (MAP) kinaz kinaz 6 (Mitogen Activated Kinase Kinase-6, MKK6)'nın aktivasyonunu indükler ve sırasıyla transkripsiyon faktör Nüklear Faktör- κ B (NF- κ B), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 MAP kinaz aktif hale geçer. Bu yolların aktivasyonu intersellüler hücre adhezyon molekülü (Intercellular Cell Adhesion Molecule, ICAM)-1 ve E-selektin gibi adhezyon molekülleri yanında TNF- α , IL-6, IL-8, IL-18 gibi sitokin ve şemokinleri içeren çoklu genlerin ekspresyonu için gereklidir (90, 131-133). Son yıllarda yapılan çalışmalarda TLR1/2, TLR2/6 ve TLR4'ün MyD88 bağlı yollarında olan fakat diğer TLR'ni kapsamayan ikinci bir TIR içeren adaptör protein (TIRAP)/MAL identifiye edilmiştir.

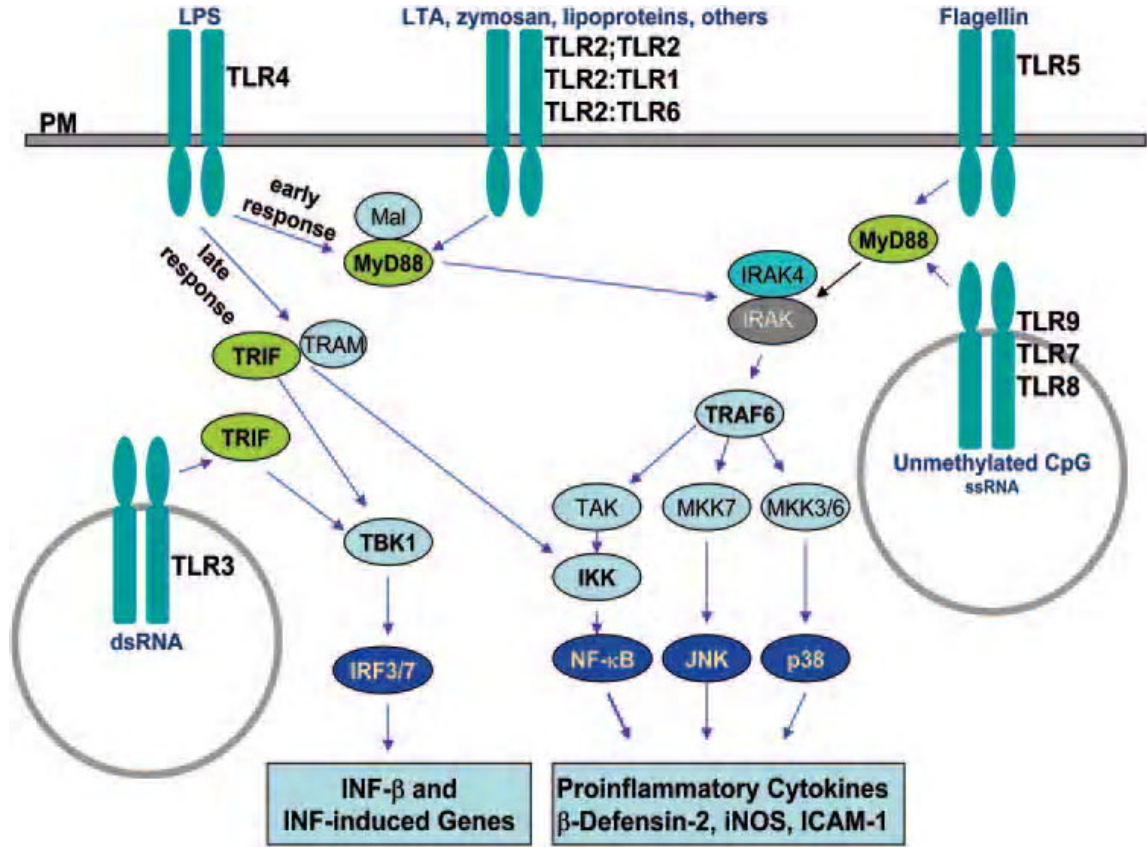
TIRAP/MAL, IRAK2 ile etkileşerek NF- κ B aktivasyonuna yol açar (134). MyD88 ve MAL, LPS'e cevapta NF- κ B aktivasyonunun erken fazında sorumlu iken, TRIF ve TRAM'ın bu moleküllerden yoksun farelerde NF- κ B aktivasyonunun geç fazından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (135).

2.5.2. MyD88-bağımsız yolak ve interferon üretimi: TLR3'ün ligandı olan çift sarmallı RNA, MyD88'in devre dışı bırakıldığı farelerde NF- κ B aktivasyonunu uyarabilmektedir. Bu durum TLR3 sinyal yolağının MyD88 bağımsız olduğunu göstermiştir (21). Genel MyD88 aracılı sinyal yolağına ek olarak, MyD88 bağımsız yolağının üçüncü bir TIR içeren adaptör molekül (TRIF/TICAM) kapsadığı saptanmıştır. Bu molekül TLR3 ve TLR4 sinyal yolağı için gereklidir. Aynı zamanda transkripsiyon faktör ve IFN düzenleyici faktör 3 ve 7'nin indüklenmesine, IFN- β 'nin devamlı üretimine, dendritik hücrelerin olgunlaşmasına ve aktivasyonuna neden olur (136).

Son zamanlarda dördüncü TIR içeren adaptör molekül olan, TRIF-ilişkili adaptör molekülün (TRAM), TLR4 aracılı fakat TLR3 aracılı olmayan MyD88 bağımsız yolağında IFN- β üretiminde özelleştiği gösterilmiştir. Bu nedenle TIRAP, TRIF ve TRAM, TLR-aracılı sinyal yolağında bir öneme sahiptir (135).

Spesifik TLR'lerin aktivasyonu, gen ekspresyon profillerinin modellerinde farklıdır. Örneğin; TLR3 ve TLR4 sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda Tip 1 interferon indüklenirken, TLR2 ve TLR5 aracılı yolların aktivasyonunda Tip 1 indüklenmez. Ayrıca TLR3 ve TLR4 aracılı tip 1 interferonun indüklemesi TLR7, TLR8 ve TLR9 aracılı tip 1 interferonun indüklemesinden farklıdır (85).

TIR içeren proteinler, memeliler, kuşlar, insektler, nematodlar ve bitkilerde identifiye edilmiştir. Savunma fonksiyonu yanında bazı TIR proteinleri (Drosophila Toll ve genel omurgasız TIR içeren proteinler), embriyonal yaşam boyunca farklılaşmada (örneğin; dorso-ventral polarizasyon) ek bir role sahiptirler (88).



Şekil 2.1. Toll-like reseptörlerinin sinyal yolağı (Toll-like receptors and the eye” makalesinden alınmıştır)

2.6. TOLL-LIKE RESEPTÖRLERİN İMMUN YANITA ETKİLERİ

Konağın patojen ajanlara karşı oluşturduğu immün yanıt, birbiriyle ilişkili olan doğal (innate, nonspesifik) ve kazanılmış (spesifik, adaptif, edilgen) yanıtlardan oluşur. Doğal immün yanıt hücreleri periferde bulunurlar ve hızlı yanıt oluştururlar. Antijene özgü olmayan (nonspesifik) bu yanıt; sitokin salgılama (özellikle IFN, TNF, IL ve şemokin), komplement aktivasyonu, fagositoz ve yüzey savunma mekanizmalarından ibarettir. Adaptif immün yanıt sekonder lenfoid organlar tarafından yönetilir, daha yavaş gelişir, uzun sürelidir ve antijene özgüdür (137). Doğal immün sistemin reseptörleri, örneğin bütün Gram-negatif bakterilerde bulunan LPS’ler gibi patojenlerde bulunan yapıları tanıırken, adaptif immün sistem tek bir patojendeki tek bir epitopyu tanır (138). Doğal immün yanıt, esas olarak dendritik hücreler, makrofajlar, NK hücreleri, nötrofil granülositler, lenfositler ve epitel hücrelerini kullanır. Adaptif immün sistem ise, antijen sunan hücreler (Antigen Presenting Cell, APC), dendritik hücreler, B-lenfositler ve makrofajları kullanır. Doğal immün sistem bütün multisellüler canlılarda bulunurken, adaptif immün sistem sadece omurgalılarda bulunmaktadır (137).

Epiteliyal bariyere veya dokuya penetre olan mikroorganizmalar, dokularda bulunan 3 tip nöbetçi immun hücre tarafından karşılanır: doku makrofajları, mast hücreleri ve olgunlaşmamış dendritik hücreler. Bu nöbetçi hücreler, normal hücre döngüsü sonucunda ortaya çıkan apoptotik partikülleri ve enfeksiyonun neden olduğu partikülleri ayırabilecek niteliktedir. Bu önemli ayırımı yapmaktan sorumlu moleküller ise TLR'dir. TLR tarafından mast hücrelerinin ve makrofajların stimülasyonu yangı öncesi sitokinlerin ve lipid mediatörlerinin salgılanmasına ve sentezine neden olur, dolayısıyla da hem çözülebilir immun bileşiklerin hem de kandan immun hücrelerin toplanmasına yol açan inflamatuvar cevabı başlatır (90).

TLR'ler mikrobiyal ürünlerin primer sensörleri gibi davranır, immun ve inflamatuvar genlerin sentezini başlatacak mekanizmaları devreye sokarak T ve B lenfositlerden oluşan kazanılmış (adaptif) immun yanıtı etkiler. TLR liganda bağlanınca aktive olur ve intrasellüler kısmı aracılığıyla NF- κ B ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve yangı öncesi ürünlerin genlerini aktive eder. Bu süreç konağın doğal immun cevabıdır. TLR dendritik hücrelerin T hücrelerini daha etkin bir şekilde uyarmasını sağlayan ko-stimulan moleküllerin de seviyelerini artırır. TLR patojenlerin fagositozunu uyarır, fagozom içeriğine karşı gelişen inflamatuvar yanıtı güçlendirir ve böylelikle fagosite edilmiş bakterinin öldürülmesi kolaylaşır. TLR aktivasyonu apoptoza da neden olabilir. LPS'in ya da lipoproteinlerin TLR4 ve TLR2/6 üzerinden apoptoza uyatabildikleri gösterilmiştir. TLR4 enfekte hücrelerin apoptoza uğraması, konağın enfeksiyonu ortadan kaldırmasına yardımcı olabilir (139).

TLR ilişkili NF- κ B'nin aktivasyonu ile salınan enzimler, sitokinler ve mediyatörler konağın antimikrobiyal savunmasını uyarır ve inflamatuvar olayları tetiklerler. Bu süreç patojenin ortadan kaldırılmasını sağlar. İnflamatuvar reaksiyon sınırlandırılmazsa, konak hücrelerinin harabiyetine neden olabilir (129, 133).

Farklı TLR'ler farklı sitokin kombinasyonlarının sentezini uyarırken, farklı mikrobiyal moleküller de aynı hücrede bile farklı cevabın oluşmasına neden olabilir. TLR yalnızca yangı gibi doğal immun yanıtı tetiklemeyle kalmaz, aynı zamanda kazanılmış immun yanıtı da başlatır. Örneğin; TLR4 immun sistem hücrelerinin güçlü bir uyarıcısı olan sitokinlerin makrofaj ve dendritik hücrelerden üretilmesini sağlar (90).

TLR mikrobiyal moleküllerin yanısıra zarar görmüş hücrelere ait molekülleri de

tanıyabilirler. Zarar görmüş hücreler hücre zarında bulunan heparin sülfat fragmentlerini ekstraselüler sıvılara verir ve TLR4 bu moleküle bağlanarak fagositik hücreleri aktive eder. Bunların dışında fibrinojen, ısı şok proteinleri gibi diğer moleküller de zarar görmüş hücrelerden salgılanır ve TLR4 aracılığı ile makrofajları aktive ederler (90).

2.7. DIŞI GENİTAL SİSTEMDE TOLL-LIKE RESEPTÖRLER

Dişi genital sistemin mukozasını örten epitel hücreleri çeşitli TLR'yi taşırlar. Dişi genital sistemde TLR seksüel siklus sırasında konakçı savunmasında önemli rol oynarlar ve gebelik sırasında maternal-fötal ara yüzeylerine ait dokular TLR aracılığıyla patojenleri tanırlar ve onlara karşı yanıt oluştururlar (140). İnsan da TLR1-3, 5 ve 6 vaginal ve servikal epitel hücrelerinde rapor edilmiştir (141). TLR4'ün sadece endoserviks, endometriyum ve tuba uterinada eksprese olduğu, ancak vagina ve ektoservikste bulunmadığı bildirilmektedir (142). Pioli ve ark (2004) TLR2 ve TLR4'ün dişi genital sistemin farklı bölümlerinde farklı miktarlarda gözlemlendiğini, örneğin serviks ve vaginada en yüksek miktarda iken tuba uterinada en düşük miktarda eksprese olduklarını belirtmişlerdir (143). İnsanda ovidukt, endometriyum, serviks ve ektoservikste MyD88 ve CD14 ile birlikte TLR1-6 mRNA'larının ekspresyonu rapor edilmiştir. İnsanda vajinal ve servikal epitel hücrelerinde TLR1-6, üst genital sistemde özellikle uterus epitel hücrelerinde ise TLR1-9 eksprese edildiği belirtilmektedirler (91). Ayrıca TLR2'nin ovidukt ve endometriyumda daha yüksek oranda bulunduğu, TLR4'ün ise genital kanalın üst bölümünden aşağı bölümlerine doğru giderek azaldığı ve ovidukt ile endometriyumda servikse nazaran daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmektedir (143). TLR'leri endometriyal epitel hücrelerinin yanı sıra stromal hücrelerde de bulunmaktadır. Örneğin; TLR4 stromal hücrelerde bulunan bir reseptördür (144). Alt genital sistemdeki epitel hücrelerinin farklı TLR'yi içerdiği gösterilmiştir. TLR1-3 ve TLR6 endoservikal epitel hücreleri tarafından, TLR1-3, 5 ve TLR6 ise servikal ve vaginal epitel hücreleri tarafından üretilmektedir (141). İnsanda servikal epitel hücrelerinin TLR3 ve 9'u eksprese ettikleri ve bu reseptörlerin viral ve bakteriyel patojenlerle oluşan enfeksiyon sırasında alt genital kanalda antiviral bir çevrenin sağlanmasında ve yangı öncesi sitokinlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları belirtilmektedir (31, 145). Endometriyal epitelde TLR3 ligasyonunun etkisi önemlidir. Çünkü endometriyum viral ve bakteriyel enfeksiyon için önemli bir alan oluşturur (31).

İnsanda endometriyumda TLR3 mRNA ekspresyonu östrus siklusuna bağlı olarak değişmektedir. Sekretorik fazın orta ve son dönemlerinde TLR3 ekspresyonu en fazla iken, proliferatif fazda en düşük miktarlardadır. Aynı zamanda TLR3 ekspresyonu luminal epitelde yüksek, glanduler epitelde ise daha düşük seviyelerdedir. TLR3 pozitif hücrelerinin stimülasyonunun ve dsRNA'lı insan endometriyal epitel hücrelerinin TLR3 bağımlı IFN- β , IL6 ve IL8'in ekspresyonlarına yol açtığı bilinmektedir (31).

İnsanda menstural siklus sırasında TLR1-10 genlerinin endometriyal dokuda eksprese olduğu, bunlardan TLR2-6, 9 ve 10 genlerinin sekretorik faz sırasında menstural siklusun diğer fazlarına kıyasla daha yüksek oranda olduğu, TLR2-4 ve TLR9'un ise perimenstural fazda yüksek olduğu bildirilmiştir. TLR7-10'nun endometriyal epitelde ve endometriyum stromasında bulunduğu tespit edilmiştir (146).

Fareye ait vagina epitelinde TLR'in ekspresyonu östrus siklusuna göre değişmektedir (29). TLR'ler epiteliyal tabakanın yıkımlandığı menstruasyon döneminde PAMP'a karşı cevapta rol oynayan uterus NK hücrelerinde ve implantasyon ile erken gebelikte anahtar bir role sahip endometriyal hücrelerde de eksprese edilmektedir. Farede de TLR6 ekspresyonu uterus epitelinde de demonstre edilmiştir (29).

Uterusta bulunan NK hücrelerinde TLR2, TLR3 ve TLR4 eksprese olduğu bildirilmektedir. TLR3 ve TLR4 hücrenin yüzeyinde bulunurken, TLR2 bu hücrelerin sadece intrasellüler kompartmanında bulunur. İnsanda dendritik hücrelerin de intrasellüler kompartmanında TLR2 eksprese edilmektedir. Uterus NK hücreleri, diğer endometriyal hücrelerin varlığında bir TLR2 agonisti olan PG'a cevap olarak IFN- γ üretir (147).

TLR'ler gebe uterus da bulunmaktadır. Gebeliğin hem ilk trimester, hem de geç dönemlerinde TLR ekspresyonunun incelendiği birkaç çalışma bulunmaktadır. İnsan plasentasında TLR2 ve TLR4 anne ve fötüs arasında bariyer oluşturan ve periferal koriyonik villusu örten trofoblastlar üzerinde en yüksek düzeyde eksprese olur (30). TLR2 ve 4'ün amniyon kesesi epitelinde eksprese olduğu, TLR2 ekspresyonunun bu hücrelerin bazolateral yüzeyinde sınırlı olduğu bildirilmektedir (148). Gebeliğin ilk trimesterinde desidial hücrelerde TLR1, 2 ve 4, plasental dokularda ve trofoblast hücrelerinde ise TLR2 ve 4 yüksek oranda ekspresedir (140). Bu nedenle de gebelik boyunca uterus içi enfeksiyonlar TLR ile birlikte trofoblast hücreleri üzerinde direkt etkiye sahiptir. Çünkü meydana gelen enfeksiyon plasental gelişimi ve fonksiyonunu etkileyebilir. İlk trimester döneminde trofoblast hücrelerinde hem TLR2, hem de TLR4

eksprese edilir ve bakteriyal ürünlerle TLR2'nin bağlanması trofoblast hücrelerinde apoptotik yolların aktivasyonuna neden olur (149).

TLR2 tarafından hem apoptozis hem de nuklear faktör- κ B (NF- κ B)'nin aktivasyonuna bir adaptör molekül olan MyD88 aracılık eder. MyD88 aracılığında TLR2 Fas-ilişkili death domain protein (Fas-Associated Death Domain protein, FADD) ve kaspaz 8'i kapsayan yollar ile apoptozis sinyalini başlatır. Aynı zamanda MyD88'in FADD'ye bağlanması apoptozisin indüklenmesi için yeterlidir (99). Buna karşın TLR4'ün ligasyonu ilk trimesterde trofoblast hücrelerinde sitokinlerin üretimi ile sonuçlanır (149). Gebeliğin ilk trimesterinde bu reseptörleri (TLR2 ve TLR4) eksprese eden trofoblast hücre popülasyonları villöz sitotrofoblastlar ve ekstrasitotrofoblast hücreleridir. Sinsityotrofoblast hücreleri de bu reseptörleri eksprese etmektedirler (30, 149, 150).

Sığır endometriyumunda yapılan bir çalışmaya TLR ekspresyonunun endometriyal epitel hücreleri ve stromal hücrelerde farklı olduğunu göstermiştir. Buna göre epiteliyal hücrelerde TLR1-7 ve TLR9 eksprese edilirken, stromal hücrelerde TLR1-4, TLR6, TLR7, TLR9 ve TLR10 eksprese edilmektedir (151). Sığırlarda olduğu gibi insanlarda da TLR hem endometriyal epitel hücrelerinde, hem de stromal hücrelerde bulunmaktadır (92).

2.8. ANTİMİKROBİYAL PEPTİDLER

Doğal immün sistemde TLR ve doğal antimikrobiyal peptidler [sekretorik lökosit proteaz inhibitör (SLPI), elafin ve defensinler] anahtar bir role sahiptir. Epiteliyal yüzeyden salgılanan bu doğal antimikrobiyal peptidler birçok mikrobiyal patojenin membran yapısını bozarak etkilerini gösterirler (152). Mukozal yüzeylerde bulunan TLR'ler ise mikrobiyal moleküler yapıları tanıyarak intrasellüler sinyal yollarını başlatır ve dolayısıyla NF- κ B bağımlı ya da bağımsız sitokin ve kemokin salgılanmasını indüklerler (86).

Antimikrobiyal peptidler, mikroorganizmaların gelişmesini inhibe etme kapasitelerine göre sınıflandırılan küçük katyonik polipeptidlerdir. Doğal immunitenin efektörleri olarak antimikrobiyal peptidler (153) bakteri, mantar ve virusları direkt olarak öldürürler (154). Aynı zamanda bu peptidler hücrel ve edinsel immunitenin aktif mekanizmalarını ve lokal inflamatorik yanıtı değiştirirler (155). Bu peptidlerin büyüklükleri, bileşimleri, aktivite mekanizmaları ve antimikrobiyal özgünlükleri

farklıdır. Antimikrobiyal peptidlerin 900 farklı türü belirlenmesine karşılık (156) bu peptidler yüklerine, fonksiyonel benzerliklerine ve üç boyutlu yapılarına göre üç gruba ayrılırlar; anyonik antimikrobiyal peptidler, katyonik antimikrobiyal peptidler ve büyük antimikrobiyal peptidler (157).

2.8.1. Anyonik Antimikrobiyal Peptidler

Anyonik peptidler (Anyonic Peptide, AP) insan, koyun ve sığır akciğerinde bulunan küçük antimikrobiyal peptidlerdir (158-160). Anyonik peptidler, sentez sırasında aktif proteinlerin katyonik yüklerini nötralize eden aspartatın homopolimerik bölümlerinden dolayı anyoniktirler ve onların bakteriyal aktiviteleri için kofaktör olarak çinko gereklidir. Anyonik peptidlerin zimogen gibi büyük peptidlerin posttranslasyonel yarıklanması sonucu oluşan ürünler oldukları düşünülmektedirler (161).

2.8.2. Katyonik Antimikrobiyal Peptidler

Katyonik antimikrobiyal peptidler insan ve evcil hayvanlarda bulunurlar (162). Ancak bileşimleri, yapıları ve dağılımları türler arasında farklılıklar gösterir (156, 163-166). Bu peptidler antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antitümör benzeri mitojenik aktivite de gösterirler. Ayrıca sinyal transduksiyon yolağında önemli rol oynarlar (167). Memelilerde katyonik antimikrobiyal peptidler defensinler ve kateksinler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (168, 169).

2.8.2.1. Defensinler

Defensinler, C-terminal katyonik peptid ve anyonik prosegment peptidten oluşan 93-96 amino asit olarak sentezlenirler. Elastaz, metalloproteinaz veya diğer proteolitik parçalanma yoluyla prosegmentten C-terminal peptidin serbest bırakılması antimikrobiyal peptidleri aktif hale geçirir. Aktif olan peptidler 29-35 amino asitten oluşmaktadır. Daha sonra bu peptidler bakteri, mantar, virus ve mayalara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterirler (170). Toksinler veya enfeksiyonlar tarafından indüklenen bu doğal antibiyotikler etkilerini mikrobiyal membran üzerinde porlar açarak ya da permeabilityyi artırarak göstermektedirler. Daha sonra açılan bu porlardan defensinler ve diğer konakçı savunma molekülleri girerek içeriğin dışarı çıkmasını sağlarlar. Böylelikle iyon yoğunluğu değişen hücre daha sonra ölür (171). Bu küçük katyonik peptidler bakteri membranlarını oluşturan negatif yüklü fosfolipidleri hedef alır. Memeli konakçı hücre membranları bu peptidlere daha az duyarlıdır. Çünkü onların membranları elektrik olarak nötral zwitteriyonik (zwitter: hermafrodit)

fosfolipid ve kolesterol içerir. Defensinlerin aktivitesi tuz konsantrasyonuna bağlıdır (172). İnsan ve kobaylarda nötrofil granülositlerce üretilen defensinler antibakteriyel aktivite için düşük iyonik kuvvete ihtiyaç duyarlar ve onların etkileri NaCl'ün fizyolojik konsantrasyonları (150 mM) tarafından bozulur (173). Defensinler doğal ve adaptif immun sistem arasında bir bağ oluştururlar. Aynı zamanda immunkompetent lökositlerin kemotaktik mobilizasyonu yoluyla adaptif antimikrobiyal immun yanıtın indüklenmesine katkıda bulunurlar (174). Altı-sistein ve üç-disülfid köprülerinden oluşmuş, arjininden zengin, 3- ila 6-kDa ağırlığında olan defensinler disülfid köprünün sırası ve moleküler yapısından dolayı alfa (α -), beta (β -), ve teta (θ -)defensinlere ayrılır (175).

α -defensinler Paneth hücreleri, nötrofiller ve epitel hücreleri tarafından üretilirken, β -defensinler keratinositler ve epitel hücreleri tarafından üretilirler (176, 177). Nötrofillerde bulunan α -defensinler insan nötrofil peptid (human neutrophil peptide, HNP) 1, 2, 3, 4 olarak tanımlanırken, epitelde bulunan α -defensinler human defensin (HD) 5, 6 olarak tanımlanırlar (178). β -defensinler [insan β defensini, human β defensin (HBD)] ise bağırsak, akciğer gibi epitelial yüzeylerde bulunur (179). θ -defensinler maymun lökositlerinde identifiye edilmişlerdir ve α -defensinlerden geliştikleri düşünülmektedir (180). θ -defensin mRNA transkriptleri insanda kemik iliği, dalak, timus, testis ve iskelet kasında bulunmuştur (181).

Endometriyal epitel hücreleri bir α -defensin olan insan defensin (human defensin, HD5), sekretorik lökosit proteaz inhibitörü (Secretoric Leucocyte Protease Inhibitor, SLPI) ve CCL20/makrofaj inflamatuvar protein (Macrophage Inflammatory Protein-3 α , MIP3 α) (CCR6'nın şemokin ligandı) gibi antimikrobiyal faktörleri salgırlar (141, 182-186). HD5 en çok sekretorik fazda bulunmaktadır. Aynı zamanda HD5, vagina, serviks ve ovidukta demonstre edilmektedir (185).

Mukozal yüzeylerde epitel hücreleri tarafından üretilen defensinler, β -defensinler'dir. İnsan β -defensinlerinin temel görevi mukozal yüzeyi ve epitel hücrelerini mikroplara karşı korumak iken, α -defensinlerin fonksiyonu immun hücrelerin vaskularize dokulara geçişine izin vermektir (187). Son yıllarda yapılan çalışmalar insan genomunda 28 defensin benzeri sekansın olduğunu fakat bunlardan sadece HBD 1-6'nın tanımlandığını göstermektedir. β -defensinler temel olarak eksprese edilen (mesela HBD-1) ve yangısal olarak ya da patojen türevli stimülasyon üzerine indüklenen olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır. Antimikrobiyal görevleri dışında β -defensinler, doğal ve edilgen immun sistem

arasında etkileşimi sağlayan kemotaktik ajanlardır (188).

β -defensinler antimikrobiyal etkileri yanında immunmodülator etki de gösterirler. Örneğin β -defensin bir şemokin reseptörü olan şemokin (C-C motif) reseptör 6 (CCR6)'ya bağlanır ve bellek T-hücreleri ile olgunlaşmamış dendritik hücreler için kemotaktik etkiye sahiptirler (189). İnsanlarda şimdiye kadar altı β -defensin identifiye edilmiştir. HBD1 ürogenital sistemde primer olarak bulunur ve devamlı üretilir, fakat HBD2 ve HBD3 genellikle infeksiyon durumunda indüklenir (15). Bu moleküller gebeliği ve fertilitiyi tehdit eden enfeksiyonlara karşı koruyucu özelliğe de sahiptirler. Uterus epitel hücreleri ve lökositler tarafından üretilen HBD ekspresyonu steroid hormonlar (östradiol ve progesteron) tarafından yönetilen menstrüal siklusda değişiklik gösterir. İnsan endometriyumunda bulunan HBD1, HBD3 ve HD5 siklusun sekretorik fazında yüksek seviyede iken, HBD4 proliferatif fazda en yüksektir (184). HBD2 mRNA ekspresyonu ise menstrüasyon sırasında pik yapar (190). Siklus döneminde defensinlerin ekspresyonlarında görülen bu farklılık antimikrobiyal aktivitelerindeki farklılıktan ya da lökosit kemotaksis regülasyonu gibi diğer aktivitelerden kaynaklanabilir (185).

Bazı epitelial β -defensinler doğal ve adaptif immun sistem arasında çoklu etkiye sahiptirler. Örneğin; uterus epitel hücreleri tarafından üretilen mikrobisid HBD2 bellek T hücreleri, olgunlaşmamış dendritik hücreler ve nötrofiller için bir şemokindir. Benzer şekilde bir şemokin olan makrofaj inflamator peptid-3 α (MIP-3 α) LPS'e yanıtta uterus epitel hücreleri tarafından salgılanır. Aynı zamanda bakteriyel lipopolisakkaritler HBD2'yi de stimüle ederler (191).

Dişi genital sistem defensinlerin önemli bir üretim yeridir, HBD1 ve 2 genital sistemin epitelial hücrelerinde bulunurlar ve mukozal yüzeyi mikroorganizmalara karşı korumada primer role sahiptirler (183). Endometriyal makrofajlar ve mast hücrelerinde de doğal antimikrobiyal peptidler eksprese edilmektedir. HBD1 ve HBD2'nin kan monositleri ve alveolar makrofajlar tarafından eksprese edildiğine dair kanıtlar mevcuttur (192). İnsan β -defensinleri (HBD)1-4 endometriyumda eksprese edilirler ve bunların ekspresyonları farklı stimülasyonlar tarafından düzenlenir. Örneğin; endometriyal hücrelerde HBD2 ve HBD3'nin aktivasyonu, IL-1 β plus, TNF- α veya IFN- γ gibi yangı öncesi sitokinler tarafından düzenlenir (57). Normal kadınlarda vagina, serviks, endometriyum, ovidukt ve ovaryumda HBD1 mRNA'nın eksprese edildiği, HBD2 mRNA'nın ise vagina ve ovaryum hariç, genital sistemin diğer dokularında

eksprese olduğu bildirilmektedir (193). HBD2 bununla birlikte serviko-vaginal sekresyonlarda da bulunmaktadır ve in vitro ortamda vaginal keratinositler tarafından eksprese edilmektedir. Das ve ark. (2007) insan endometriyumunda HBD1'in ana kaynağının glandüler epitel olduğunu ileri sürmüşlerdir (178). Bu araştırmacılar HNP1-3'in endometriyum stromasındaki nötrofil granülositler tarafından üretildiğini ve dişilerde infertilite şekillendiğinde HNP1-3 ekspresyonunun artış gösterdiğini, oysa HBD1 ekspresyonunun yüksek olmadığını, bu defensinlerin implantasyonu etkilemediğini saptamışlardır (178). Gebe kadınlarda ise HBD1 mRNA'nın koriyon, villus epiteli, plasenta ve göbek kordonunda eksprese olduğu, amniyonda bulunmadığı, HBD2 mRNA'nın ise koriyon, villus epiteli ve plasentada bulunduğu ve HBD1 ile 2'nin insanda genital kanalın savunma mekanizmalarında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (194). Bir başka çalışmada gebe kadınlarda HBD1-3'ün amniyon, desidua, koriyon ve plasental trofoblastta eksprese olduğu tespit edilmiştir (193). Bir α -defensin olan HD5 de insanda endoserviks, endometriyum ve koriyonda transkripsiyon düzeyinde tespit edilmiştir (195).

Dişi genital sistemin epitel hücreleri tarafından salgılanan bu antimikrobiyal polipeptidler, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, herpes simplex virus-2 (HSV-2) ve insan immün yetersizlik virus-1 (HIV-1) gibi Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterileri, mantarları ve virüsleri öldürme yeteneğine sahiptir (196-199).

Koyunda (Koyun Beta Defensini, SBD) 1 ve SBD2 olmak üzere iki β -defensin geninin bulunduğu, α -defensinlerin ise bulunmadığı, SBD1'in gastrointestinal sistem epitelinde, SBD-2'nin ise sindirim sistemi, akciğer ve uterusunda eksprese olduğu bildirilmektedir (200).

2.8.2.2. Katelisinler

Bir diğer katyonik antimikrobiyal peptid olan katelisinler, N-terminal sinyal peptid, kathelin domaini ve C-terminusda yapısal olarak değişebilir katyonik antimikrobiyal peptid ile karakterizedir (201, 202) Kathelin domaini, insanlarda hem proteaz inhibitörü olarak, hem de antimikrobiyal peptid olarak görev görür (203, 204). Hayvanlar üzerindeki çalışmalar, katelisinlerin çeşitli immunmodülatör fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir (205-207).

İnsan ve farede sadece bir katelisin geni bulunurken, domuz ve sığır gibi diğer memelilerde çeşitli katelisin genleri bulunur (208-210). İnsan ve farelerde sadece bir

katelisinin geninin bulunması enfeksiyona karşı duyarlılığı artırır. Buna karşın domuz, inek, at, koyun ve tavşan gibi memeli turlerinde birden fazla katelisinin geni bulunduğu için enfeksiyona duyarlılık açısından bu turler insan ve fareden farklıdırlar (211).

Katelisin Antimikrobiyal Peptid (Human Cathelisin Antimicrobial Peptide, CAMP) olarak adlandırılan insan cathelisin peptid geni hem sirkle olan kanda, hem de epitelde eksprese edilmiştir (176). Aynı zamanda gelişmekte olan nlotrofil granulositler de major bir katelisinin kaynağıdır. Bu gen olgun peptidin yarıklanmasından oluşan LL-37 (İnsan Katelisin Antimikrobiyal Protein, hCAP18) antimikrobiyal peptidinin prekürsörünü kodlar ve alfa helikal yapıya sahiptir. İnsan katelisin peptidi, LL-37, immunmodülasyon (212, 213), kemotaksis (214), yara iyileşmesi (215) ve anjiogenezis (203) gibi birçok biyolojik etkilere sahiptir. En yüksek antibakteriyal aktivite maksimum helikal içerikle, orta ve dloşük antibakteriyal aktivite ise dloşük helikal içerikle ilişkilidir. LL-37'nin alfa helikal yapısı pH'ya, anyon konsantrasyonuna ve kendi konsantrasyonuna bağlıdır. Mikrobiyal membranda porlar oluşturmadan ziyade hCAP18, başlangıçta monomer ve oligomer olarak bakterinin yüzeyini kaplar ve daha sonra deterjan benzeri tarzda parçalanmaya neden olur (216).

Fare katelisini CRAMP (Cathelisin-Related AMP) olarak adlandırılır ve insan katelisini olan LL-37'ye benzer olarak kemik iliğinde nlotrofil granulositlerde ekspresedir ve amfipatik α -helikal yapıdadır (217). Domuzlar PR-39, protegrinler, profeninler ve porsin miyeloid AMP'leri içine alan birçok cathelisine sahiptirler (208, 210). Sıanda insan cathelisini LL-37'nin homologu olan peptid rCRAMP (rat Cathelisin-Related AMP) granulositlerde, olfaktorik lopta, beyin, beyincik, medulla oblongata, omurilik, timus, testis, akciğer, ağız mukozası, dil, özofagus, kolon, sekum ve ince bağırsaklarda identifiye edilmiştir (218, 219).

LL-37'yi de içeren birçok katelisinin antimikrobiyal C-terminal peptidi, Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan LPS'e bağlanır. hCAP18, bağlandıktan sonra LPS'in endotoksin şoku indleleme kapasitesini nlotralize eder (220). Defensinler ile birlikte katelisinler 150 mM NaCl varlığında bakterileri öldürmek için sinerjik etkiye sahiptirler. Bir diğer rapora göre, LL-37/hCAP18 ve human defensin α -1 sinerjik olarak *E. coli* ve *S. aureus*'u öldürür (221). Defensinler gibi katelisinler de adaptif immun sistemi stimle ederler. LL-37 nlotrofil granulositler, monositler ve T hücreleri için kemotaktik olup, dendritik hücreler için kemotaktik değildir. Bu yüzden konakçı-hedef hücre spesifitesi farklıdır (222).

Endometriyumda bulunan lökosit popülasyonları antimikrobiyal proteinlerin üretim yeridir. Nötrofil granüositler α -defensin, katelisin, insan katelisin antimikrobiyal peptid 18 (hCAP-18), laktoferrin, lizozim ve elafin yönünden zengindir. Menstrüasyon boyunca nötrofil granüositlerin varlığı özellikle de epiteliyal bariyerin yıkımlandığı dönemde antimikrobiyal korumayı artırır. NK hücreler tarafından üretilen granülün gibi diğer antimikrobiyal peptidler de endometriyumda görev almaktadır (32).

2.8.3. Büyük Antimikrobiyal Peptidler

Büyük antimikrobiyal proteinler ise lizozim, azurosidin, katepsin G, fosfolipaz A₂ ve laktoferrindir (223). 78 kD ağırlığında, transferrin benzeri glikoprotein olan laktoferrin bakır, çinko, manganez ve diğer metal iyonlar yanında demir iyonlarının bir ya da iki molekülüne bağlanır. Gözyaşı, sperma ve süt gibi salgılarda bol miktarda bulunur. Laktoferrin bakteriyel membranları permeabilize eder ve katyon-aracılı işlemlerle LPS'i parçalar (224). Endometriyal epitelde eksprese edilen ve demir bağlayan protein olan laktoferrin proliferatif fazda maksimum seviyededir. Laktoferrin ve SLPI ile birbirlerine sinerjik etki gösterirler ve her ikisinde antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Laktoferrin gebeliğin altıncı haftasında glandüler epitel hücrelerinde zayıf bir şekilde eksprese edilir (225).

Doku ve biyolojik sıvılarda bulunan lizozim Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı komponenti olan N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit arasındaki bağı parçalayarak lizisini katalizler. Lizozim Gram-negatif bakterilere karşı daha az etkili olmasına rağmen Gram-negatif bakterilerin LPS yapıları ile etkileşime girerek onların yapısını bozar (226). Gram-negatif bakteriler üzerinde lizozimin yıkıcı etkisi enzimatik aktiviteye bağlı değildir. Lizozimden türevli bir pentadekapeptid olan muramidaz, dış bakteriyel membranı permabilize eder. Bakteriyel RNA ve DNA sentezini inhibe ederek bakteriyel ölüme neden olur (227).

Doğal bir antimikrobiyal peptidlerden SLPI nötrofil elastaz, tripsin ve katepsin G gibi birkaç proteazı inhibe ederken, elafinin görevi nötrofil elastaz ve proteinaz 3'ü düzenlemekle sınırlıdır (228). Her iki molekül de antiproteaz ve antimikrobiyal faaliyetlerin yaşandığı mukozal yüzeylerde eksprese edilmektedir. SLPI ve elafin sekiz identik sistein ve beş identik prolinden oluşmaktadır. Bütün dişi genital sistemde SLPI ve elafin eksprese edilmektedir. SLPI özellikle servikal mukusta yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere, elafin ile birlikte serviks ve vaginada bulunmaktadır.

Endoservikal hücrelerde bulunan SLPI ve elafin miktarı bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS ile temasta artmaktadır. İnsan endometriyumunda bulunan nötrofil granüositlerde özellikle menstrüasyon aşamasında elafin miktarı artarken, progesteronun baskın olduğu siklusun sekretorik fazında endometriyal epitelde SLPI ekspresyone edilmektedir (229, 230). SLPI ve elafin, gebelik döneminde de mevcuttur. SLPI, servikal mukus tıkaçında yüksek miktarlarda bulunur ve gebelik boyunca üst genital sistem enfeksiyonu için anahtar bir role sahiptir. Aynı zamanda hem SLPI, hem de elafin gebelikte vajinal sekresyonlarda bulunurlar (231).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar TLR ve antimikrobiyal peptidler arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir. İnsan uterus epitel hücrelerinin TLR3 agonisti Poly (I:C) ile muamelesi HBD1 ve HBD2 induksiyonuna neden olduğu belirtilmektedir (232). Dişi genital sistemdeki epitel hücrelerinin TLR stimülasyonu, antimikrobiyal faktörlerin üretimini artırma yoluyla mukozal yüzeylerde doğal immunitenin artmasına neden olabilir (233).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi deney hayvanları merkezinde yetiştirilen 6-8 haftalık, daha önce bir deneysel çalışmada kullanılmamış ve ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan *Rattus norvegicus* (Wistar) ırkı 30 dişi ve 4 adet erkek ergin sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar standart laboratuvar koşullarında standart diyet ve musluk suyu ile beslendi. Vaginal smearla östrusta olduğu belirlenen sıçanlar iki dişiye bir erkek olacak şekilde çiftleştirildi ve ertesi sabah alınan vaginal smearda spermiyumların görüldüğü gün gebeliğin birinci günü olarak kabul edildi. Doğumların başlamasını takiben postpartum dönemde TLR'ini ve antimikrobiyal peptidleri belirlemek amacıyla, doğumun 1., 3., 5., 10., 15. günlerinde ve kontrol amaçlı olarak da diöstrüsda bulunan gebe olmayan sıçanların rompun ve ketalar anestezisi (Rompun 13 mg/kg, Ketalar 87 mg/kg) altında uterus dokuları alındı ve kalbin sağ atriyumu kesilerek hayvanlar ötenazi edildi. Postpartum 1., 3., 5., 10., 15. günler ve kontrol grubu için 5'er adet olmak üzere toplam 30 adet sıçan kullanıldı. Erkek sıçanlar ve doğan yavrular deney sonrasında deney hayvanları ünitesine geri iade edildi.

3.1. DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

3.1.1. Doku Temini

Kontrol grubu sıçanların ve postpartum dönem 1., 3., 5., 10., 15. günlerindeki sıçanların rompun ve ketalar anestezisi (Rompun 13 mg/kg, Ketalar 87 mg/kg) altında uterus

dokuları alındı. Alınan uterus örneklerinin bir kısmı immünohistokimyasal tekniklerde kullanılmak üzere %4 formaldehit solüsyonunda (10 ml %40'lık formaldehit + 90 ml distile su) 12 saat tespit edildi. Bir kısmı ise western blot çalışmalarında kullanılmak üzere alüminyum folyo içerisine konularak sıvı nitrojene alındı.

3.1.2. İmmunohistokimya tekniği için doku hazırlanması

Formaldehit solüsyonunda tespit edilen dokular 24 saat musluk suyunda yıkandı ve ardından sırası ile %70, %80, %96, %100'lük alkol serilerinde 1'er saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Daha sonra metil benzoat ve benzol solüsyonlarında şeffaflaştırma işlemi yapılarak parafinde bloklandı. Bu parafin bloklardan Leica RM 2125 rotary miktomu ile alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitlere yapısal değişiklikleri belirlemek için Crossman'ın üçlü boyaması (234), hemosiderin yüklü makrofajları (siderofajlar) belirlemek için Perl'in Prussian Blue metodu (235), TLR ve β -defensinlerin lokalizasyonlarını belirlemek için ise Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz yöntemi uygulandı.

3.1.3. Western Blot tekniği için doku hazırlanması

3.1.3.1. Lizat hazırlama

Alüminyum folyo içine alınan ve sıvı nitrojende (-196°C) dondurulan uterus örneklerinden şu şekilde lizatlar hazırlandı:

1. Çalışılacak doku sayısına göre, 10 ml'lik tüplerin üzerine kontrol ve deney gruplarının isimleri yazıldı ve tüpler spor üzerine yerleştirildi.
2. Uterus doku örnekleri bir camın üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
3. Darası alınan tüplere bu parçalanmış uterus örnekleri konularak ağırlıkları tartıldı.
4. 0,2 gr doku başına 600 μ l lizis buffer [10ml 0,1M Tris (pH 7.4), 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate ve 1gr SDS (Sodyum Dodesil Sülfat, Riedel, Katalog No:62862, 1 kg)] ve 10 μ l proteaz inhibitör kokteyli [Protease inhibitor cocktail (PIK), Sigma, Katalog No: P8340] olacak şekilde hesaplama yapılarak eppendorflara lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyli kondu.

Lysis buffer hazırlanması:

0.1M Tris pH 7.4

0.6 gr Tris (Merck, Katalog No:108387, 500 g) 40 ml distile suda eritildi ve HCl ile

pH 7.4 ile ayarlanarak son hacim 50 ml'ye tamamlandı.

Sodyum-Ortovanadate (100X)

0.184 gr Na-Ortovanadate (Sigma, Katalog No: S6508, 50 gr)

10 ml Tris (pH.10) (0.1 M Tris: 0.6 gr/50 ml)

5. Ezilmiş doku, lysis buffer ve PIK karışımı ile vorteksenerek buz üzerine aktarıldı.
6. Tüpler içindeki bu dokuların homojenizatör yardımıyla homojen bir biçimde lizise uğraması sağlandı.
7. Daha sonra 15.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı -80°C'ye alındı. Bu şekilde hazırlanan lizatlar analizler yapıncaya kadar -20°C de muhafaza edildi.

3.1.3.2. Protein miktarının belirlenmesi

Lizatların içerdiği protein miktarı Lowry yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde standart olarak protein içeriği 1mg/ml olan Sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin, BSA (Fraction V, Sigma Katalog No: B4287, 5 g) kullanıldı.

1. BSA'nın (1000µg/ml), 1:1 (500µg/ml protein), 1:2 (250µg/ml), 1:3 (125µg/ml), 1:5 (62,5µg/ml) dilüsyonları yapılarak 5 adet BSA standart protein aralığı hazırlandı ve BSA-1, BSA-2, BSA-3, BSA-4, BSA-5 şeklinde kodlandı.
2. 10 ml'lik tüplere uterus lizatlarının, standartların ve körün adları yazıldı. Her bir numune, kör ve standart çift çalışılacağı için A ve B tüpleri olarak hazırlandı.

Uterus lizatlarından 1/10 dilüsyonlar hazırlanılarak çalışıldı ve bu 1/10'luk dilüsyonları hazırlamak için bir tüp içerisine 900 µl fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline, PBS) ve 100 µl uterus lizatı konuldu. Daha sonra hazırlanan bu 1/10'luk dilüsyondan A ve B yazılı tüplere 30'ar µl pipetlendi. Bu numuneler kısa süreli olarak vortekslendikten sonra buz üzerine alındı.

0.01 M pH 7.2 Fosfat Buffer Saline (PBS)'in Hazırlanması: 3.74 gr Disodyum hidrojen fosfat dodehidrat (Merck, Katalog No: 106579, 1 kg) + 0.43 gr Monobazik potasyum fosfat anhidroz (Merck, Katalog No: 104873, 1 kg) + 7.2 gr Sodyum klorür (Merck, Katalog No: 106404, 1 kg) tartılarak bir litre distile suda eritildi.

1. Aynı şekilde ml'sinde 1 mg BSA olan ana standartımızdan BSA-1A ve BSA-1B yazılı tüplere 30'ar µl pipetlendi ve bu işlem 2., 3., 4., 5., BSA-A ve BSA-B

tüpleri için de tekrarlandı (BSA-2A, BSA-2B, BSA-3A, BSA-3B, BSA-4A, BSA-4B, BSA-5A, BSA-5B). BSA-1A ve BSA-1B deki miktar (30'ar µl) sabit kalırken BSA-2A ve BSA-2B'ye 30'ar µl PBS, BSA-3A ve BSA-3B'ye 60'şar µl PBS, BSA-4A ve BSA-4B'ye 90'ar µl PBS, BSA-5A ve BSA-5B'ye 150'şer µl PBS eklendi. Daha sonra bu miktarlardan 30'ar µl alınarak aynı numaralı tüplere aktarıldı.

2. Uterus lizatları PBS içerisinde dilüe edildiği için kör1 ve kör2'ye sadece 30'ar µl PBS eklendi.
3. 30'ar µl konulmuş olan bütün numunelerin, standartların ve körlerin üzerine 900 mikrolitre Lowry solüsyonu konuldu. Lowry solüsyonu 100:1:1 oranında Lowry A: Lowry B: Lowry C solüsyonlarının karıştırılmasıyla hazırlandı. İlk önce Lowry B ve C solüsyonları karıştırılıp ardından Lowry A solüsyonu ilave edildi. Kısa süreli olarak vortekslenen numuneler, standartlar ve körler buz üzerinde 10 dakika bekletildi.

Lowry Solüsyonlarının Hazırlanması:

Lowry A: 1 gr NaOH (Sodyum Hidroksit, Merck, Katalog No: 106462, 1 kg) ve 5.3 gr Na₂CO₃ (Sodyum karbonat, Merck, Katalog No: 106392, 1kg) 250 ml distile suda eritildi.

Lowry B: 0.5 gr KNaC₄H₄O₆ (Sodyum potasyum tartarat, Merck, Katalog No: 108087, 1 kg) 50 ml distile suda eritildi.

Lowry C: 0.5 gr CuSO₄.5H₂O (Bakır sülfat pentahidrat, Merck, Katalog No: 102790, 1 kg) 50 ml distile suda çözüldü.

4. Lowry solüsyonu ile 10 dakika inkübasyonun ardından tüm tüplere 90 mikrolitre folin pipetlendi. Folin solüsyonu (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Merck, Katalog No: 109001, 100 ml) 1:1 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanıldı. Böylelikle toplam hacim 1020 µl oldu.
5. Folin eklenmiş olan tüpler 30 dakika buz üzerinde ve karanlıkta inkübe edildi.
6. Spektrofotometrik (Thermo, Helios alfa) ölçüm için tüm tüpler teker teker kuartz küvetlere boşaltılarak 540 nm dalga boyunda okunması sağlandı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Daha sonra verilerin hepsi Excel programına aktarıldı. Tüm numunelerin protein

miktarlarının eşit olması sağlanarak western blot analizlerinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

APES [(3-Aminopropyl) triethoxysilane, minimum % 98, Sigma, A3648, 100 ml) ile kaplı lamlara alınan 5 mikrometre (μm) kalınlığındaki parafin kesitlere Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı.

1. Bu tekniğe göre parafin bloklardan alınan kesitler 1 gece boyunca 50 °C'de etüvde tutuldu.
2. Bir gün sonra deparafinizasyon için parafin kesitler 2 defa 5'er dakika ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 3'er dakika (%100, %96, %80, %70) bekletildi.
3. Distile su ile çalkalanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için metanolde (Merck, Katalog No: 106009.2511) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (%30 Hidrojen peroksit, Merck, Katalog No: 108597, 2.5 lt) içinde 15 dakika bekletildi.
4. Takiben kesitler 0,01 M PBS'de 2 kez 5'er dakika yıkandı.
5. Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler sitrat tamponu [2300 ml distile su içerisinde 4.8 gr sitrik asit (Anhidroz, Sigma, C0759, 500 gr) eritildi ve 12N NaOH ile pH 6.0'e ayarlanarak son hacim distile su ile 2500 ml'ye tamamlandı] içinde 95⁰C'de 20 dakika kaynatıldı ve takiben aynı tampon içinde oda ısısında 30 dakika bekletildi.
6. PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları yani dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek için kesitler 5 dakika bloklama solüsyonu (Ultra UV Block, LabVision Corporation TA-125UB) ile bir nem kamarası içinde inkübe edildi.
7. Hemen sonrasında, serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldı ve TLR1 (1:100), TLR2 (1:50), TLR3 (1:100), TLR4 (1:200), TLR5 (1:50), TLR6 (1:150), TLR7 (1:75), TLR8 (1:100), TLR9 (1:75), TLR10 (1:100), Beta-defensin 1 (1:75), Beta-defensin 2 (1:150), Beta-defensin 3 (1:100), Beta-defensin 4 (1:100) primer antikorlarıyla 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikorun Adı	Antikorun Türü	Katalog Numarası
Toll-like reseptör 1(TLR1)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30000
Toll-like reseptör 2(TLR2)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 10739
Toll-like reseptör 3(TLR3)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 28999
Toll-like reseptör 4(TLR4)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30002
Toll-like reseptör 5(TLR5)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30003
Toll-like reseptör 6(TLR6)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30001
Toll-like reseptör 7(TLR7)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30004
Toll-like reseptör 8(TLR8)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 25467
Toll-like reseptör 9(TLR9)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 25468
Toll-like reseptör 10(TLR10)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30198
β -defensin 1	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 25573
β -defensin 2	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 20798
β -defensin 3	goat poliklonal	Santa cruz, sc- 10860
β -defensin 4	goat poliklonal	Santa cruz, sc- 10862

8. Kesitler primer antikorlar ile inkübasyondan sonra, 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
9. Daha sonra kesitler, biyotinle işaretlenmiş keçi anti-tavşan (Labvision Corporation TR-125-BN) ve keçi anti-polivalant sekonder antikor (Labvision Corporation TP-125-BN) ile 20 dakika oda ısısında muamele edildi.
10. PBS de 4 defa 5'er dakika ile yıkandı.
11. Horseradish peroksidaz konjugatlı streptavidinle (Labvision Corporation TS-125-HR) 20 dakika muamele edildi.
12. Tekrar 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
13. Diamino benzidin (DAB) kromojeni (Zymed) ile dokular 3-5 dakika muamele edildi. Enzim substrat etkileşimi sonucunda oluşan ürün kahverengi olarak mikroskopta gözlemlendi.
14. Kesitler 2-3 kez distile suda çalkalandı.
15. Gill'in Hematoksilen solüsyonu ile 4 dakika zıt boyama yapıldı ve kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı.

16. Daha sonra sırasıyla %96, %100'lük alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitlerin üzerine yapıştırıcı (entellan) damlatılıp lamelle kapatıldı.

Pozitif Kontrol olarak insan dalağı (TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, TLR9, TLR10), insan plasentası (TLR3, TLR7), sıçan akciğeri (TLR4, TLR8, β -defensin 1, β -defensin 3, β -defensin 4) ve insan bağırsağı (β -defensin 2) kullanıldı. Negatif kontrol olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi.

Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Japan) incelenerek fotoğraflandı.

3.3. SDS-PAGE (POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİS) WESTERN BLOT PROTOKOL

1. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdede ayrıştırma jeli seçildi. Buna göre TLR yüksek moleküler ağırlıkta protein olduğu için por çapı geniş olan %7,5'lük poliakrilamit jel tercih edildi.
2. Ayrıştırma jeli [3.75 ml akrilamit-bisakrilamit (Acrylamide Bisacrylamide, AB) (%30 akrilamit-bisakrilamit 37.5:1, Merck, Katalog No: 100639, 1 lt) + 3.75 ml Tris-SDS pH8.8 + 7.5 ml deiyonize su + 50 mikrolitre %10 luk Amonyum persülfat (APS, Sigma, Katalog No: A3678, 25 gr) + 10 mikrolitre TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Merck, Katalog No: 110732, 100 ml)] hazırlanarak tutucular arasında sıkıştırılan dikey elektroforezis (Mini vertical electrophoresis, Thermo Shandon EC-120) camları arasına döküldü.

Jel Solüsyonlarının Hazırlanması:

4Xtris-HCl/SDS, pH 8.8: 18.15 gr Tris tartıldı ve 40 ml distile suda çözüldü. HCl asit ile pH 8.8'e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve daha sonra 0.4 gr Sodyum dodesil sülfat (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS) eklendi.

4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8: 6.05 gr Tris tartıldı ve 40 ml distile suda çözüldü. HCl asit ile pH 6.8'e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve daha sonra 0.4 gr SDS eklendi.

%10'luk APS: 0.1 gr toz APS tartılarak 1 ml distile suda eritildi.

3. Üzerindeki hava kabarcıklarını önlemek için n-butanol (50 ml butanol + 5 ml distile su) ile doldurularak polimerizasyon işlemi için 45 dakika bekletildi.

4. Polimerizasyon işleminden sonra n-butanol boşaltılarak jelin üstü birkaç kez distile su ile yıkandı.
5. Daha sonra toplama jeli (650 µl akrilamit-bisakrilamit+1.25 ml pH 6.8 Tris-SDS + 3050 µl deiyonize su + 25 µl %10'luk Amonyum persülfat + 5 µl TEMED) hazırlanarak ayrıştırma jelinin üzerine döküldü ve 10'lu tarak yerleştirildi.
6. Polimerizasyon için 45 dakika bekletildi.
7. Polimerizasyon işlemi tamamlanan jeller elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine 1X'lik elektroforez tamponu (150 ml stok solüsyondan (10X) alınarak üzerine 1350 ml deiyonize su eklendi) döküldü ve bu tampon içinde taraklar çıkartıldı.

Elektroforez Tamponunun Hazırlanması (10X): 30 gr Tris ve 144 gr Glisin (Merck, Katalog No: 104169, 1 kg) önce 500 ml deiyonize suda eritildi. Daha sonra üzerine 100 ml %10 SDS eklenerek toplam hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı (pH ayarlaması yapılmaz ve pH 8.6 olmalıdır).

8. Her kuyucuğa 60 mikrogram/ml oranında protein içeren ve protein miktarları distile su, numune ve laemmlı buffer (Sample Buffer 2X, Laemmlı electrophoresis Reagent, Sigma, Katalog No: S3401, 10 vial) oranları ile eşitlenen numunelerin ağzı parafilmle sıkıca kapatılarak su banyosunda 5 dakika 95 °C'de kaynatıldı.
9. Yükleme yaparken moleküler ağırlığı bilinen bir belirteç (marker, Amersham RPN800E) 1:1 oranında sample buffer ile sulandırılarak kaynatma yapmadan jelin ilk kuyucuğuna 5 µl olarak yüklendi.
10. 10'luk tarak kullanıldığı için numuneler 20 µl olarak yüklendi ve hangi kuyucuğa hangi numunenin yüklendiğini anlamak için bir kağıda haritalama işlemi yapıldı.
11. Elektroforezde numuneler ilk önce 100 Voltta 1 saat, sonrasında ise 80 Voltta jelin sonuna kadar yürütüldü.
12. Elektrofez işleminden sonra ise jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için immunoblotting yapıldı. Blotlama işleminde semi-dry yöntemi kullanıldı.

13. Elektroforez tankından çıkarılan jeller direk 1X transfer solüsyonuna (50 ml transfer stok solüsyonundan alınarak üzerine 350 ml deiyonize su ve 100 ml metanol eklenir) alınarak 15 dakika bu solüsyon içinde bekletildi.

Transfer stok solüsyonunun hazırlanması: 58.15 gr Tris ve 29.3 gr Glisin 600 ml deiyonize suda eritildi. Daha sonra üzerine 0.375 gr SDS koyularak toplam hacim deiyonize suyla 800 ml'ye tamamlandı (Bu solüsyona hiçbir şekilde pH ayarlaması yapılmaz ve pH 8.2 olmalıdır).

14. Jel transfer solüsyonu içinde beklerken polivinilidenflorid (Polyvinilidenfluorid, PVDF) membran (Immobilon-PSQ Katalog No: ISEQ00010, 26.5 cm X 3.75 m 1 roll) metanolde 3 saniye ıslatılarak önce deiyonize suda 2 dakika, daha sonra 1X'lik transfer solüsyonunda 3 dakika yıkanarak immunoblotting için hazır hale getirildi.

15. Bir membran için dört adet olmak üzere transfer solüsyonu ile ıslatılmış filtre kağıtları (Whatman Katalog No: 10426972, GB005, 15X15 cm) içinde altta PVDF membran üstte jel olacak şekilde 80 mA akım verilerek 55 dakikada transfer işlemi gerçekleşti.

16. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, Ponceau S (Ponceau S Solution, Sigma, Katalog No: P-7170, 1 lt) boyaması yapılarak proteinlerin membrana transfer olup olmadığı kontrol edildi.

17. Ponceau S membrandan uzaklaşmaya kadar pH'sı 7.4 olan, %0.1 Tween-20 (Merck, Katalog No: 822184, 500 ml) ilaveli Tris-tuz tamponu (Tris Buffer Saline, TBS-T) ile yıkama yapıldı.

Tris Buffer saline (TBS) Solüsyonunun hazırlanması (10X): 60.55 gr Tris ve 87.66 gr NaCl tartılarak 800 ml distile suda eritildi. Daha sonra saf HCl ile pH 7.4 ayarlanarak son hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

TBS-T Hazırlanması: 100 ml bu stok (10X) TBS solüsyonunda alınarak üzerine 900 ml distile su ve 1000 µl Tween-20 eklendi.

18. Ardından membran 1 saat süre ile oda ısısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu (Skim milk powder, Fluka, Katalog No: 70166, 500 gr) ile bloklandı.

%5'lik yağsız süt tozunun hazırlanması: 100 ml TBS-T içinde 5 gr süt tozu eritilerek hazırlandı.

19. Membran, süt tozu ya da TBS-T içinde sulandırılmış antikorlar [TLR1 (1/200), TLR2 (1/100), TLR3 (1/50), TLR4 (1/400), TLR5 (1/50), TLR6 (1/50), TLR7 (1/100), TLR9 (1/100), TLR10 (1/50)] ile + 4⁰C'de gece boyu inkübe edildi.
20. İnkübasyon sonrasında membran TBS-T ile 4 kez 15 dakika yıkandı.
21. Takiben membran, TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile 1/6400 oranında sulandırılmış sekonder antikorla (goat anti-rabbit, santa cruz, sc-2004, 0.5 ml) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi ve sekonder antikor her zaman taze hazırlandı.
22. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 4 kez 15 dakika yıkandı.
23. Ardından 5 dakika TBS ile muamele eden membranlar 1 dakika western blotting Luminol Reagent (Santa cruz, Katalog No: sc-2048) ile temas ettirildi.
24. Hiperkaset (Amersham Autoradiography cassette, 24x30 cm, RPN11643) içine yerleştirilen membranlar 1-10 dakika karanlık odada inkübe edilip membrandaki protein bantları hiperfilme (Amersham Hyperfilm ECL, 50 sheets, 18x24 cm 28906836) aktarıldı.
25. Film developer (Developer, ILFORD Multigrade, Katalog No:757855) ve fiksatiften (Rapid Fixer, ILFORD Hypam, Katalog No:1758285) geçirildi, distile su ile yıkandı ve ardından kurutuldu. Daha sonra bu filmler Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarıldı.
26. Aynı membrana protein bantlarının eşit yüklenip yüklenmediğini anlamak için strip işlemi [20 ml TBS-T + 0.4 gr SDS + 1400 ml β -merkapt ethanol (Sigma, Katalog No: M3148, 250 ml) solüsyonunda 65 ⁰C etüvde 30 dakika bekletildi] yapıldıktan sonra bol miktarda TBS-T içinde yıkama yapıldı.
27. Bu membrana süttozunda bloklama aşamasından itibaren aynı işlemler uygulandı.

28. Primer antikör olarak 1/400 oranında TBS-T sulandırılmış Beta aktin antikörü (Mouse monoclonal AC-15 to beta actin loading control, Santa Cruz, Katalog No: sc-69879, 1 ml) kullanıldı.
29. Sekonder antikör olarak ise goat anti mouse (Santa Cruz, Katalog No: sc-2005, 0.5 ml) tercih edildi (236).

Western blot metodunda pozitif kontrol olarak Namalwa cell lysate (Santa Cruz, Katalog No: sc-2234), sıçan ve fare akciğer lizatları kullanıldı.

3.4. TRIS-TRİSİN SDS-PAGE WESTERN BLOT PROTOKOL

Küçük moleküler ağırlıkta olan beta defensinler için Tris-Trisin SDS-PAGE yöntemi uygulandı (237, 238).

1. Bu metodda SDS-PAGE jel aşamasına kadar numunelerin hazırlanması ve protein değerlerinin hesaplanması klasik western tekniğinde olduğu gibidir.
2. Öncelikle jel için gerekli solüsyonlar [3XJel buffer (Gel buffer, GB), akrilamit-bisakrilamit-3 (AB-3), %10 APS] hazırlandı.

Jel solüsyonlarının Hazırlanması:

Gel Buffer (3X, pH 8.45): 18.16 gr Tris 30 ml distile suda eritildi. Saf HCl ile pH 8.45'e ayarlandı ve son hacim deiyonize suyla 50 ml'ye tamamlandı. Daha sonra bu hacime 0.15 gr SDS eklendi.

AB-3: 24 gr akrilamit (Fluka, Katalog No: 01699, 1 kg) ve 0.75 gr bisakrilamit (Merck, Katalog No: 101546, 100 gr) 50 ml deiyonize suda eritildi.

%10 APS: 0.1 gr APS 1 ml distile suda eritildi.

3. Ayrıştırıcı jel olarak %16'lık poliakrilamit jel hazırlanarak [1.65 ml AB-3 + 1.65 ml 3XGB + 1.18 ml deiyonize su + 0.5 ml gliserol (Merck, Katalog No: 104093, 2.5 lt) + 15 µl %10 luk APS + 2 µl TEMED] camlar arasına döküldü.
4. Üzerindeki hava kabarcıklarını önlemek için n-butanol (50 ml butanol + 5 ml distile su) ile doldurularak polimerizasyon işlemi için 45 dakika bekletildi.
5. Polimerizasyon işleminden sonra n-butanol solüsyonu boşaltılarak jelin üstü birkaç kez distile su ile yıkandı.

6. Daha sonra %4'lük toplama jeli (0.2 ml AB-3 + 0.6 ml 3XGB + 1.68 ml deiyonize su + 20 mikrolitre %10' luk Amonyum persülfat + 2 mikrolitre TEMED) hazırlanarak tarak yerleştirildi.
7. Polimerizasyon işlemi tamamlanan jeller elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine 1X'lik trisin katot tamponu döküldü.

Trisin Katot Tamponunun Hazırlanması (1X): 18.16 gr Tris ve 26.88 gr Trisin (Sigma, Katalog No: T0377, 100 gr) 800 ml distile suda eritildi. Daha sonra 1.5 gr SDS eklenerek son hacim deiyonize suyla 1500 ml'ye tamamlandı.

8. İçerdikleri protein miktarları tespit edilen ve protein miktarları deiyonize su, numune ve Tricine sample buffer, 2X [1ml 1M Tris-HCl pH6.8 + 2.4 ml gliserol + 0.8 gr SDS + 2 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Katalog No: 115444, 25 gr) + 0.31 gr Dithiothreitol (DTT, Merck, Katalog No: 111474, 1 gr) ve en son hacim deiyonize suyla 10 ml'ye tamamlandı] oranları ile eşitlenen numuneler 30 dakika 40 derecede inkube edildi.
9. Yükleme yaparken moleküler ağırlığı bilinen bir belirteç (marker, Amresco K880) jelin ilk kuyucuğuna 3 mikrolitre olarak yüklendi.
10. Her kuyucuğa 30 mikrogram/ml oranında protein içeren numunelerde 20 mikrolitre yüklendi.
11. Elektroforezde numuneler ilk önce 100 Volta 1 saat, sonrasında ise 80 Volta jelin sonuna kadar yürütüldü.
12. Daha sonra jelde proteinlerin düzgün yürüyüp yürümediğini kontrol etmek için Colloidal Coomassie Dye (CCD) boyama yöntemi uygulandı.

Coomassie Brilliant Blue (CBB) stok çözeltisinin Hazırlanması: 6 gr CBB G250 tartılıp 100 ml distile suda çözüldü.

CCD Stok Hazırlanması: 100 gr amonyum sülfat (Carlo Erba, Katalog No: 420777, 1 kg) tartılıp 900 ml distile suda eritildi. % 85'lik orto fosforik asit (Merck, Katalog No: 100563, 2.5 lt) stoğundan 12 ml eklendi ve son olarak da 20 ml CBB stoğundan ilave edilerek son hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

13. Yürümesi tamamlanan jel 1-2 saat süre ile % 40 etanol (Merck, Katalog No: 100971, 2.5 lt) % 10 asetik asit (Merck, Katalog No: 100056, 2.5 lt) solüsyonunda (200 ml etanol + 50 ml asetik asit + 250 ml distile su) fikse edildi.
14. Fiksasyonun ardından 10'ar dakika distile suda iki yıkama yapıldı.
15. Yıkaması tamamlanan jel üzerine CCD eklendi ve boyanın üzerine çökme olmaması için yavaş yavaş metanol eklendi.
16. 1 gün süreyle bekletildikten sonra jeller distile suda yıkandı.
17. Jel üzerinde bulunan protein bantlarını göstermek için Gene Genius Bio Imaging System kullanıldı.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

3.5.1. Western Blot Analizleri

Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarılan kontrol ve postpartum günlere ait bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçüldü. Her bir antikor için gruplar arasında farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, farklılık durumunda ise bunun hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için de Mann-Whitney U testi uygulandı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (239).

3.5.2. Semikantitatif Değerlendirme

İmmunohistokimyasal boyanmalar, yoğunluk (intensity score) ve oransal skordan (proportional score) oluşan total skor (Quick score) olarak isimlendirilen ikili derecelendirme yöntemi kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi (240). Yoğunluk skorunda (I), hücrelerdeki pozitif boyanma yoğunlukları değerlendirilirken, oransal skorda (P) ise pozitif boyanan hücrelerin yüzde oranı belirlendi.

İmmunohistokimyasal boyanma sonuçlarındaki skorlama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.

Yoğunluk skoru

0: Negatif (yüksek büyütmede hiçbir hücrede boyanma yok)

1: Zayıf (sadece yüksek büyütmede görülen boyanmış hücreler)

- 2: Orta (düşük büyütmelelerde kolaylıkla görülen boyanmış hücreler)
3: Güçlü (çok düşük büyütmelelerde görülen boyanmış hücreler)

Oransal skor

0: 0	%11-33: 3
%1<: 1	%34-66: 4
%1-10: 2	%67-100: 5

Yoğunluk skoru ve oransal skor toplandıında 0-8 arasındaki “Quick score-total skor” elde edildi. Elde edilen bütün veriler bilgisayara girildi ve SPSS 11.5 programı ile istatistiksel analizleri yapıldı. Western blot analizlerinde olduğu gibi immunohistokimyasal analizlerde de gruplar arasında farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, farklılık durumunda ise bunun hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için de Mann-Whitney U testi uygulandı. $P<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (239).

Aynı zamanda Crossman’ın üçlü boyaması ile hazırlanan preparatlarda postpartum 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerine ait uterus örneklerinin epitel, kript epiteli, stroma ve miyometriyum tabakalarının kalınlıkları oküler mikrometre ile ölçüldü. Bu ölçümler her bir hayvandan elde edilen kesitlerde en az 5 farklı noktadan yapıldı. Elde edilen verilere istatistiksel analiz yapılarak $P<0,01$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

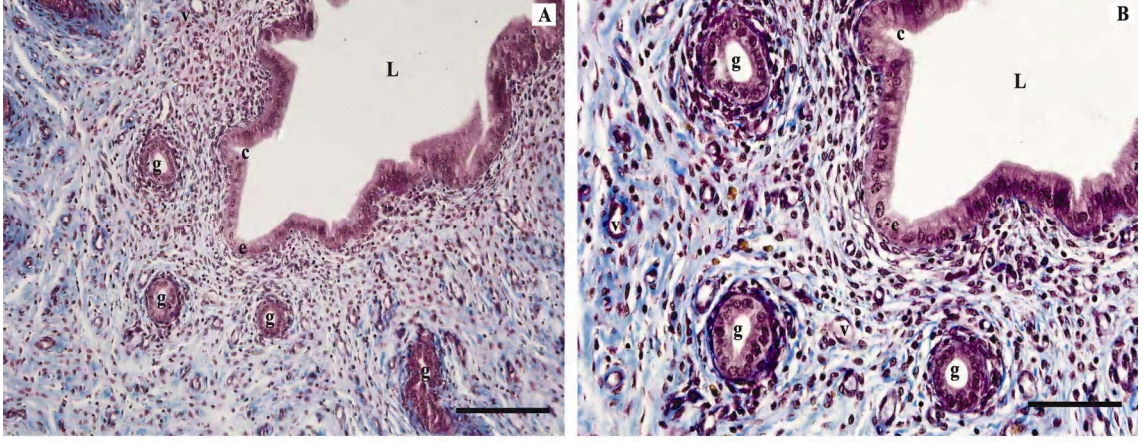
4. BULGULAR

4.1. UTERUSUN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Anatomik olarak iki kornulu uterusu sahip olan sıçanlarda uterus duvarı endometriyum, miyometriyum ve perimetriyum olmak üzere üç tabakadan oluşmaktaydı.

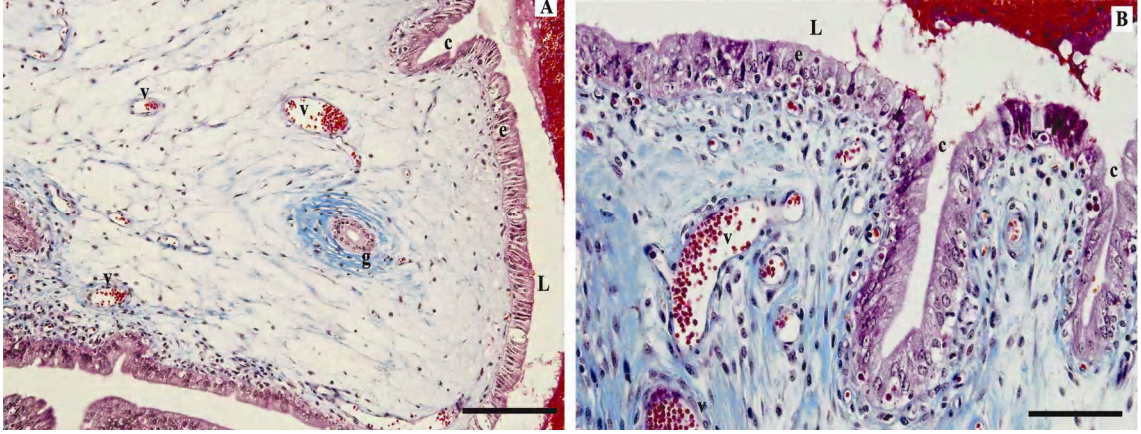
Diöstrüs döneminde endometriyumun yüzey epiteli tek katlı prizmatik ya da kübik özellikte olup lumene doğru kıvrımlar yapmaktaydı ve aynı zamanda epitel lamina propriyaya doğru kriptler oluşturmuştu (Şekil 4.1 A-B). Çok kısa silyumlara sahip olan epitel hücrelerinin sitoplazmasında özellikle supranükleer bölgede çok sayıda salgı granülü dikkat çekti. Çekirdek ise hücrelerin bazaline doğru yerleşmiş durumda oval şekilli ve ökromatik özellikte olup bir ya da iki adet çekirdekçik içermekteydi. Uterus epitelinde prizmatik hücreler arasında ikinci bir hücre tipi bulunmaktaydı ve bu hücrelerin sitoplazması yoğun boyanmış olup mekik şeklinde bir çekirdeğe sahipti. Lamina propriya tabakası geniş olup bol miktarda kan damarlarına ve stromal hücrelere sahipti. Epitelin hemen altındaki bağ dokuda hücre yoğunluğu fazla iken, kas katmanına doğru azalmakta olduğu dikkati çekti. Aynı zamanda bu gevşek bağ doku içerisinde basit alveolar karakterde bezler yer almakta olup, bu bezlerin lumenleri dar ve epiteli tek katlı kübik idi (Şekil 4.1 A-B). Lamina propriya içinde hemosiderin yüklü makrofajlara (siderofajlar) rastlandı. Uterusun miyometriyum tabakası içte sirküler dışta longitudinal olmak üzere iki kas katmanı içermekteydi. Bu iki kas katmanı arasında arter, ven ve lenf damarlarından zengin stratum vaskulare tabakası bulunmaktaydı. Perimetriyum ya da tunika seroza tabakası ise peritoneal mezotel hücreleri ile sarılı

gevşek bağ dokusundan ibaretti. Bu tabakada oldukça az sayıda düz kas hücreleri yanında çok sayıda lenf, kan damarı ve sinir tellerine rastlandı.



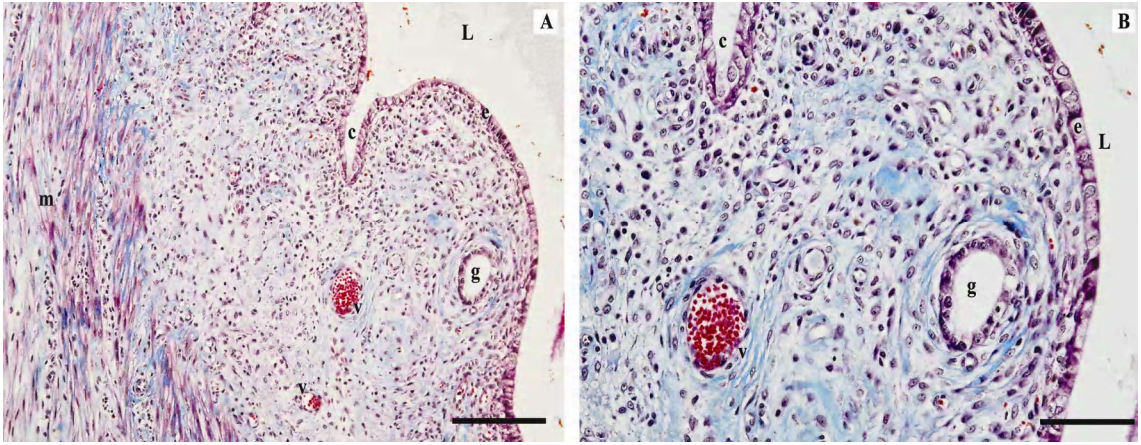
Şekil 4.1. Diöstrüs döneminde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 µm (A), 100 µm (B).

Postpartum 1. günde uterus lumeninin oldukça genişlediği ve mukozanın lumene doğru değişik büyüklük ve biçimlerde kıvrımlar yaptığı ve bu nedenle epitel altındaki lamina propriyanın (stroma) yer yer kalın, yer yer ince olduğu görüldü. Lamina epiteliyalis içerisinde koyu ve açık boyanan asidofilik sitoplazmalı hücreler, piknotik çekirdekli hücreler gibi değişik hücre tiplerinin bulunduğu bu nedenle epitelin yalancı çok katlı prizmatik özellik belirlendi. Epitel hücrelerinin çoğunun vakuollü olduğu ve epitelin bazalinde intraepitelyal kapilar damarların bulunduğu tespit edildi. Vakuolleşmenin ve intraepitelyal damarların yoğun olduğu bölgelerde ise epitel ile endometriyal stroma arasındaki sınır belirgin değildi. Yüzey epitel kripleri ise oldukça derin ve düzensizdi. Mukozal kıvrımların içindeki stromanın ödemli olduğu ve bunları örten epitelin yüksekliğinin azalmış olduğu dikkati çekti. Stromanın hücre yoğunluğunun az olduğu, ayrıca hiperemik ve değişik büyüklüklerde olan kan damarları ile çok az sayıda uterus bezleri ve bu bezler etrafında konsantrik dizilmiş kollagen ipliklerin bulunduğu tespit edildi. Miyometriyumun stratum vaskülare tabakasındaki damarların da geniş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2 A-B).



Şekil 4.2. Postpartum 1. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 µm (A), 100 µm (B).

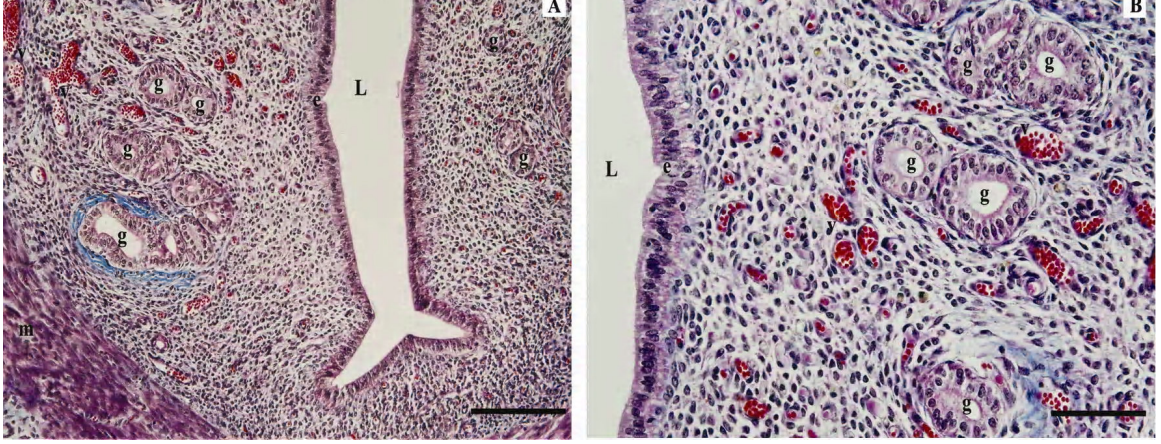
Postpartum 3. günde mukozal kıvrımların azalmasıyla birlikte lumenin daraldığı, intraepitelial damarların kaybolduğu, uterusunda bulunan kriplerin derinlikleri ile sayılarının da azaldığı gözlemlendi. Ayrıca stromadaki ödemin azaldığı buna karşılık stromal hücre yoğunluğunun arttığı (Şekil 4.3A-B) ve çok az sayıda siderofajın (hemosiderin yüklü makrofajların) ortaya çıktığı belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.3. Postpartum 3. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 µm (A), 100 µm (B).

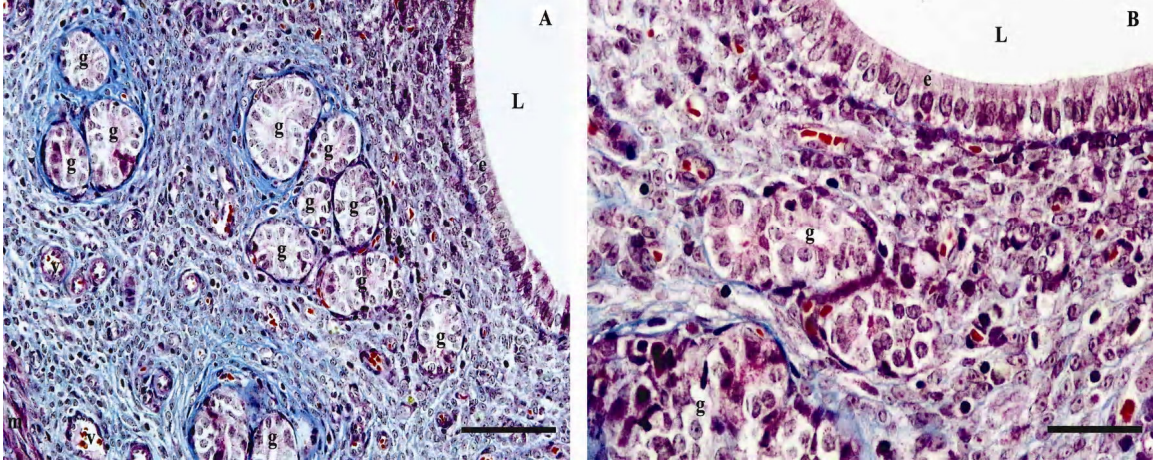
Postpartum 5. günde uterus lumeninin iyice küçülerek T şeklini aldığı, epitelin aynı tipteki prizmatik hücrelerden oluştuğu, birkaç tane olduğu gözlenen kriplerin derinliklerinin iyice azaldığı görüldü. Luminal epitel hücrelerinde görülen vakuollerin ve stromal ödemin de kaybolduğu, stromada küçük çaplı kapillar damarların bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.4 A-B). Stromal hücre yoğunluğunun artmasına paralel olarak özellikle bez grupları etrafında olmak üzere hemosiderin yüklü makrofajların sayısında

da artış saptandı (Şekil 4.7). Ayrıca gruplar halindeki uterus bezlerinin etrafındaki kollagen ipliklerin kalınlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.4 A-B).

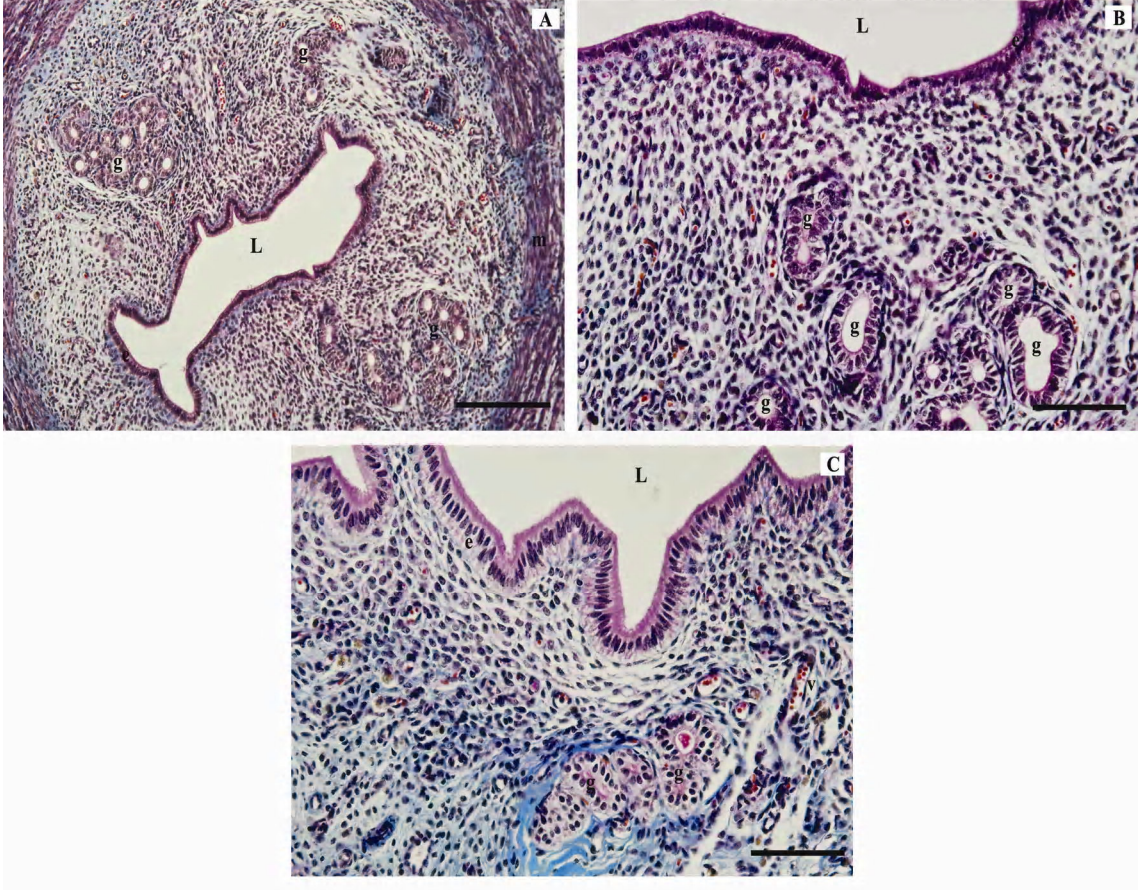


Şekil 4.4. Postpartum 5. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, g: endometrial bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 µm (A), 100 µm (B).

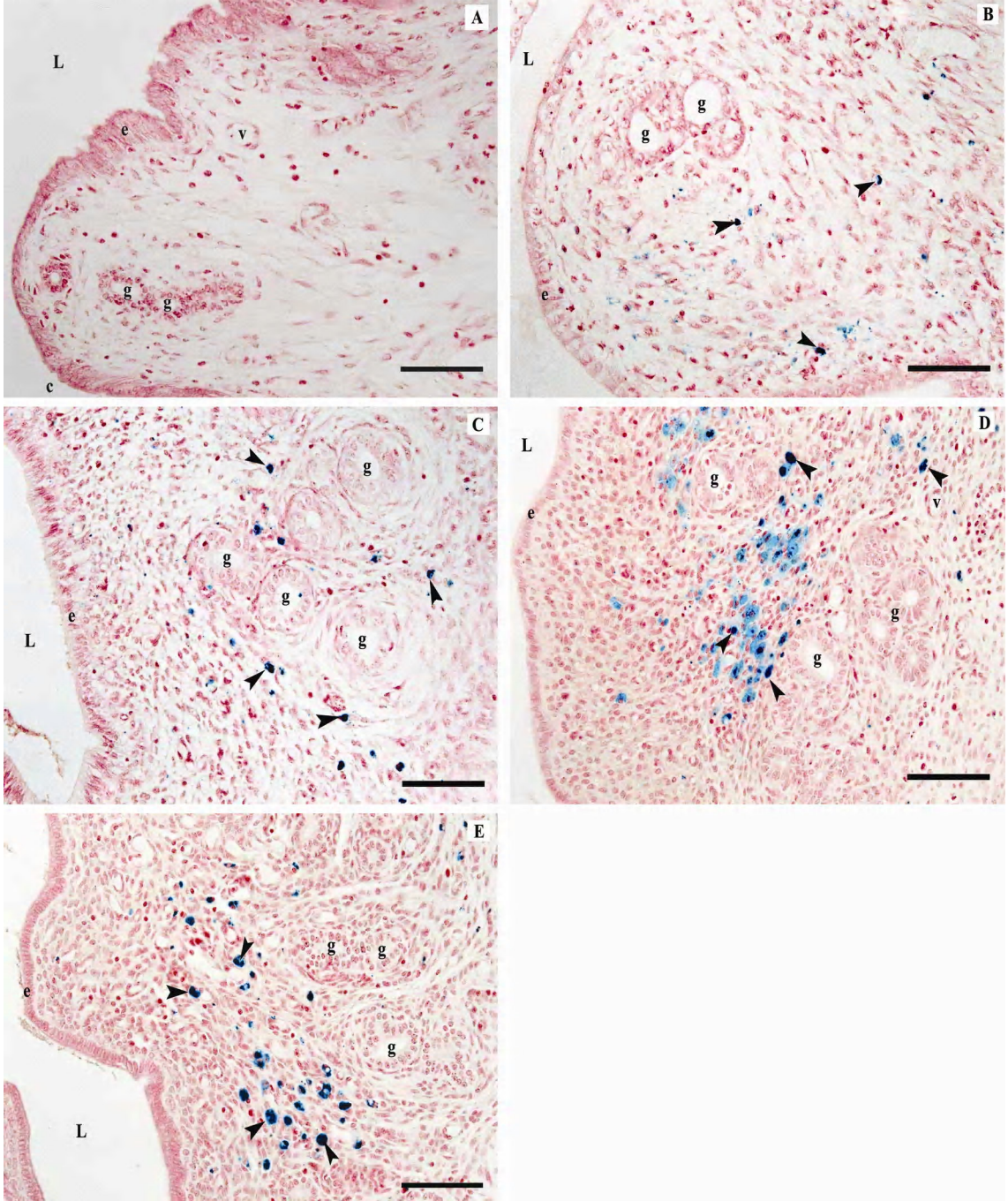
Postpartum 10. ve 15. günde uterus mukozasında kriplerin kaybolduğu, lumenin daraldığı ve yüzey epitelinin ise yüksek prizmatik özellik kazandığı tespit edildi. Postpartum 10. günde uterusun endometriyum tabakası kontrol (diöstrüs) grubununki ile aynıydı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında çok sayıda hemosiderin yüklü makrofajlara rastlandı (Şekil 4.7). Bu hücreler özellikle miyometriyuma bitişik endometrial stroma bölgesine yayılmıştı (Şekil 4.5 A-B). Postpartum 15. günde hemosiderin yüklü makrofaj miktarının biraz azaldığı görüldü (Şekil 4.7). Epitelin hemen altındaki bağ dokuda stromal hücre yoğunluğu fazla iken kas katmanına doğru azalmakta olduğu dikkati çekti. Uterus bezlerin sayısının arttığı ve aynı zamanda hücre yoğunluğu artmasıyla birlikte lamina propriya tabakası kalınlığının arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6 A-C).



Şekil 4.5. Postpartum 10. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 100 μ m (A), 50 μ m (B).



Şekil 4.6. Postpartum 15. günde sıçan uterusunun histolojik yapısı. L: lumen, e: epitel, g: endometriyal bez, m: miyometriyum, Crossman'ın Üçlü Boyaması. Bar: 200 μ m (A), 100 μ m (B,C).

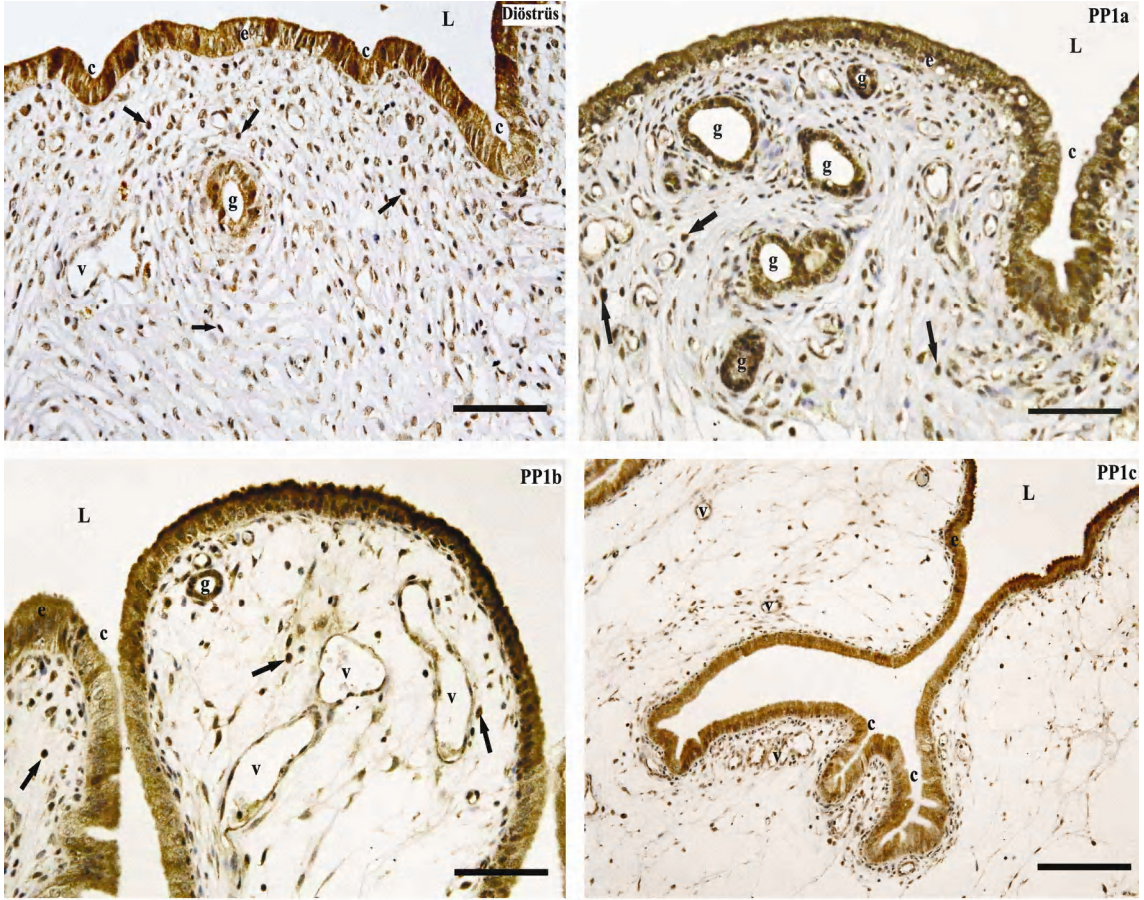


Şekil 4.7. Postpartum 1. (A), postpartum 3. (B), postpartum 5. (C), postpartum 10. (D) ve postpartum 15. (E) günde sıçan uterusundaki hemosiderin yüklü makrofajlar. L: lumen, e: epitel, c: kript, g: endometriyal bez, v: kan damarı, ok başı: hemosiderin yüklü makrofajlar, Perl'in Prussian Blue Boyaması, Barlar: 100 µm.

4.2. UTERUSDA TOLL-LIKE RESEPTÖRLER VE β -DEFENSİNLERİN LOKALİZASYONU

4.2.1. TLR1

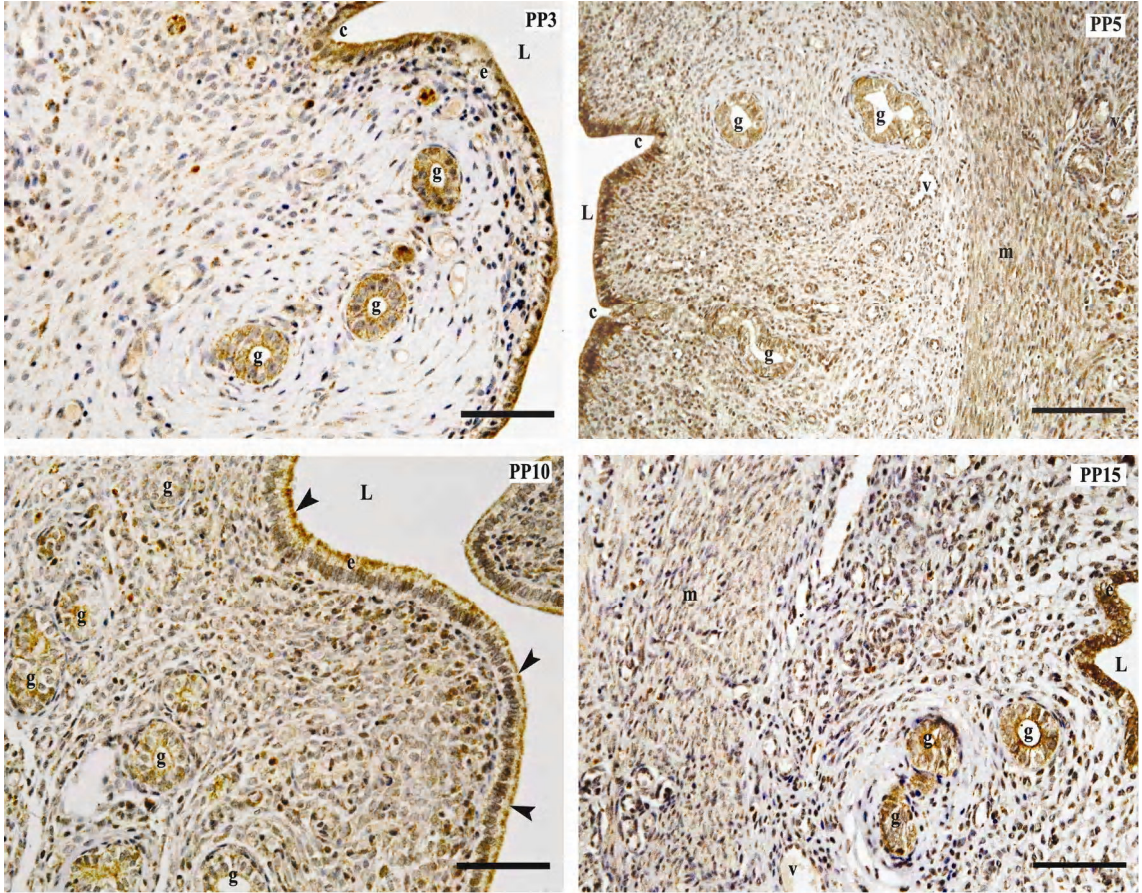
TLR1 immunreaksiyonunun postpartum ve diöstrüs dönemlerinde endometriyumda yüzey epitelini oluşturan hücrelerin çekirdek, sitoplazma ve apikal membranlarında bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Postpartum 1., 3., 5. gün ve diöstrüs dönemlerinde kript epitel hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında zayıf bir TLR1 pozitif reaksiyon gözlenirken, apikal membranda reaksiyon negatifti.



Şekil 4.8. Diöstrüs ve postpartum 1. günde (PP1a,b,c) sıçan uterusunda TLR1 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR1 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 μ m (Diöstrüs, PP1a, PP1b), 200 μ m (PP1c).

Postpartum 10. ve 15. günlerde kriptler kaybolduğu için böyle bir reaksiyondan söz etmek mümkün değildi. Diöstrüs döneminde lamina propriya matriksinde TLR1 immunreaksiyonu negatifti. İncelenen tüm günlerde endometriyal bez epiteli ile lamina propriyada bulunan bazı stromal hücrelerin hem çekirdek, hem de sitoplazmasında pozitif immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Postpartum 10. günde epitelin

altında bulunan stromal hücrelerdeki reaksiyon kas katmanına yakın olan stromal hücrelerinkinden daha yoğunlu. Endometriyal bezlerin etrafından bulunan miyoepitel hücrelerinde ise TLR1 reaktivitesi negatifti. Miyometriyum miyositlerinde zayıf bir reaksiyon saptandı. Postpartum 10. günde ve diöstrüste dış longitudinal kas katmanındaki hücrelerin çekirdeklerindeki TLR1 immunreaksiyonu iç sirküler kas katmanındakilerden biraz daha yoğunlu. Kan damarlarında endotel hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdekte TLR1 reaksiyonu orta dereceli pozitif iken, media katmanındaki düz kas hücrelerinde reaksiyon daha zayıftı. Aynı zamanda kan damarları etrafında kuvvetli TLR1 pozitif mast hücrelerine rastlandı. Mezotel hücrelerinde de oldukça kuvvetli TLR1 immunreaksiyon gözlemlendi. Genel olarak postpartum 1. günden itibaren uterusdaki TLR1 immunoreaktivitesinin 15. güne doğru azaldığı belirlendi.

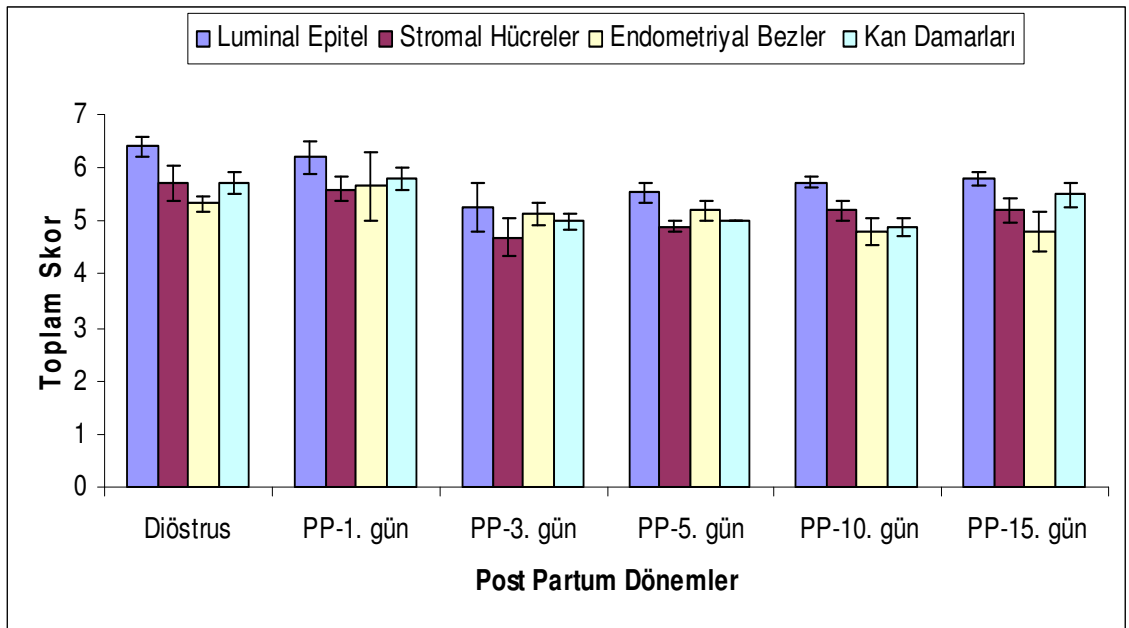


Şekil 4.9. Postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR1 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: TLR1 pozitif apikal membran, Bar: 100 μ m (PP3, PP10, PP15), 200 μ m (PP5).

TLR1 için luminal epiteldeki boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında diöstrüs ile postpartum 3., 5., 10. ve 15. günlere ait gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu tespit edildi ($P < 0,05$). Stromal hücrelerdeki TLR1 immunoreaktivitesinin diöstrüs ve

postpartum dönemler arasında farklılık göstermediği belirlendi ($P>0,05$). Endometriyal bezlerdeki TLR1 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında postpartum 1. gündeki reaksiyonun incelenen tüm günlerden farklı olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Damarlardaki TLR1 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında ise 1. gün ile 3., 5., 10. günler arasında farklılığın, 3., 5. ve 10. günler ile de diöstrüs arasında ki farklılığın önemli olduğu saptandı ($P<0,05$) (Grafik 4.1).

Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde TLR1 için diöstrüsün ve postpartum 1. gündeki protein değerlerinin postpartum dönemin diğer günlerinden istatistiksel açıdan farklı olduğu belirlendi ($P<0,05$) (Grafik 4.15).

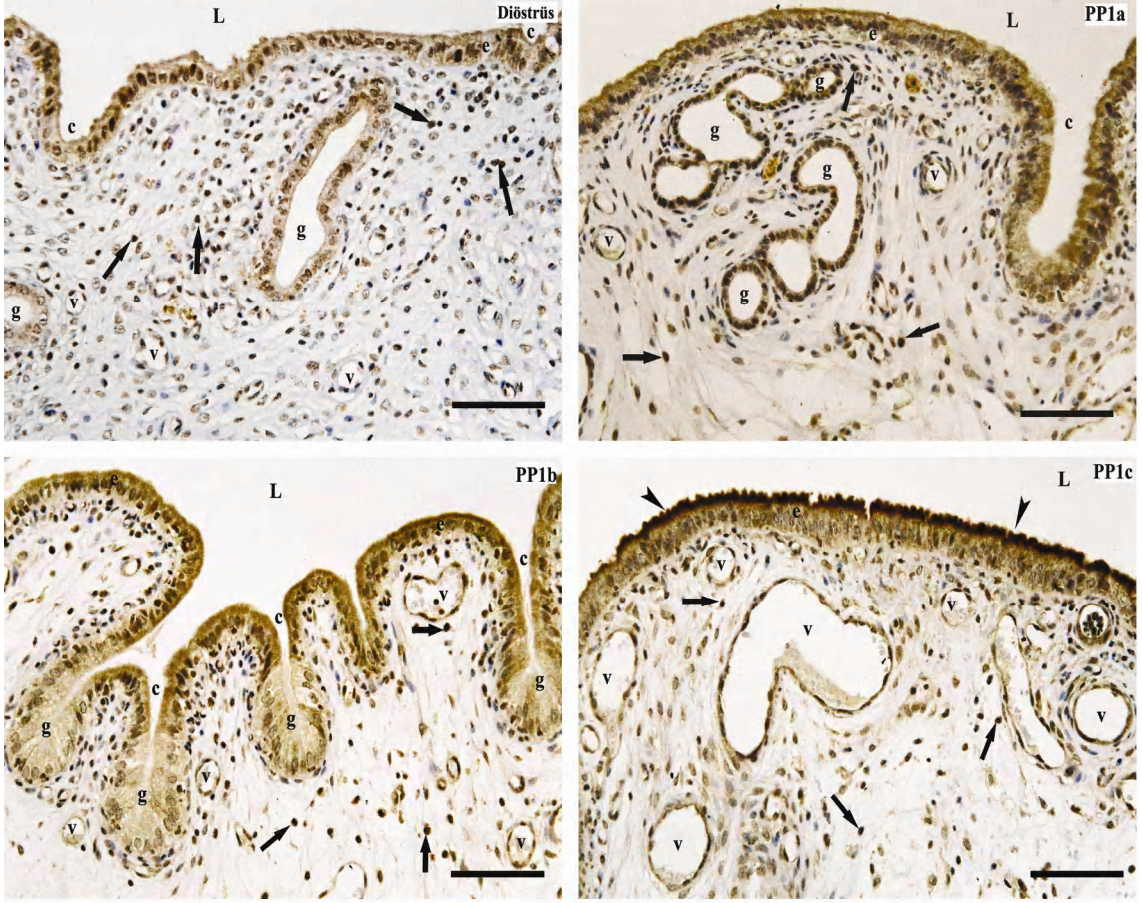


Grafik 4.1. Sıçan uterusunda TLR1 immunreaksiyonunun toplam skoru

4.2.2. TLR2

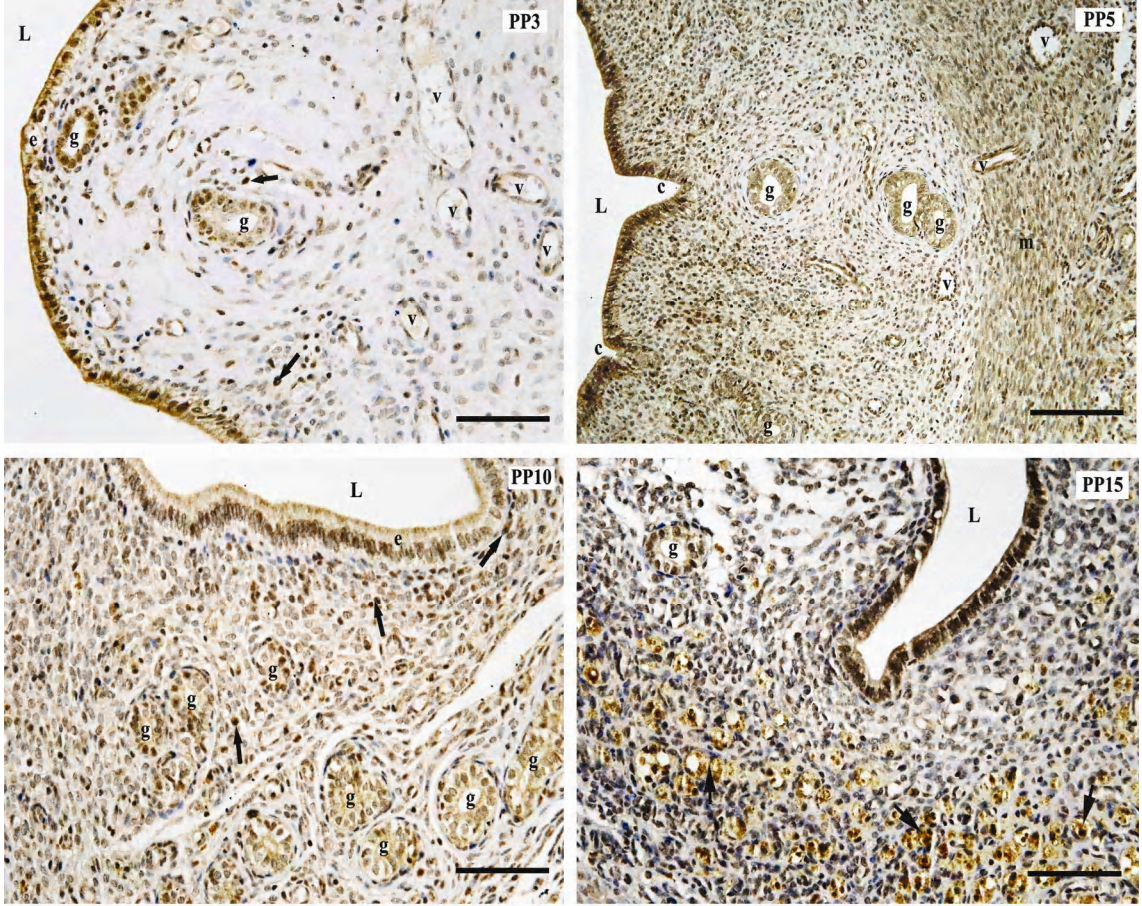
İncelenen tüm gruplarda TLR2 reaktivitesinin luminal epitelin çekirdek, sitoplazma ve apikal membranında bulunduğu, kript epitelindeki reaksiyonun çekirdek ve sitoplazmada zayıf olduğu saptandı. Endometriyal bez epiteli ile lamina propriyada bulunan bazı stromal hücrelerin hem çekirdek, hem de sitoplazmasında TLR2 pozitif immunreaksiyon gözlemlendi. Bezlerin etrafından bulunan miyoepitel hücrelerinde reaksiyon negatifti. Kas tabakasında bulunan miyositlerin, damar endotelisi ile media tabakasında bulunan düz kas hücrelerinin çekirdeğindeki reaksiyon sitoplazmaya oranla daha fazlaydı. Aynı zamanda kan damarları etrafında kuvvetli TLR2 pozitif mast

hücrelerine rastlandı. Mezotel hücrelerinde de oldukça kuvvetli TLR2 immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



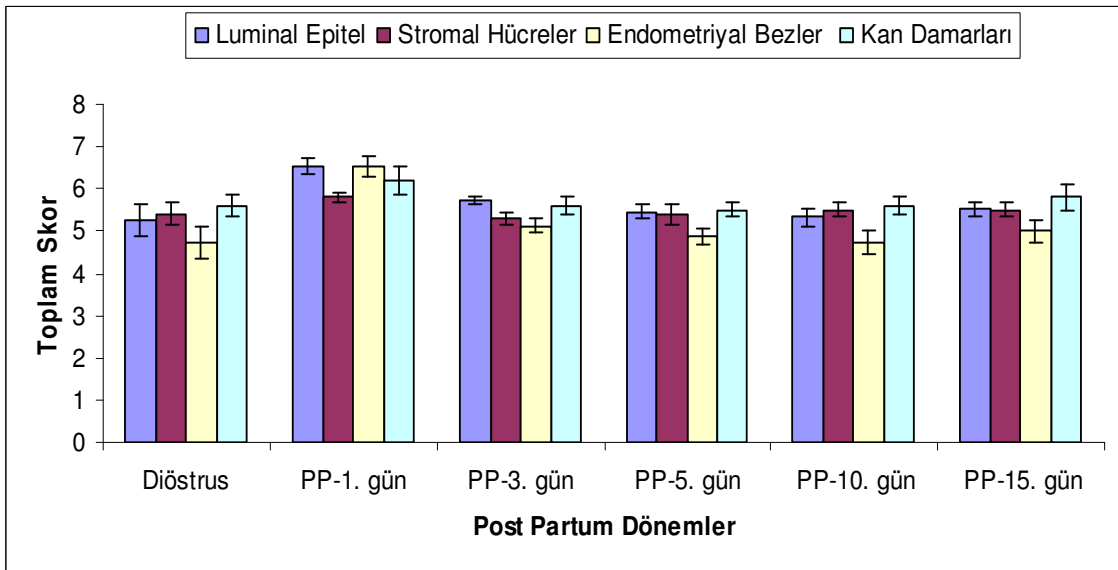
Şekil 4.10. Diöstrüs ve postpartum 1. günde (PP1a,b,c) sıçan uterusunda TLR2 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR2 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR2 pozitif apikal membran, Bar: 100 µm (Diöstrüs, PP1a, PP1b, PP1c).

TLR2 için luminal epiteldeki boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında postpartum 1. gündeki reaksiyonun incelenen tüm günlerden farklı olduğu saptandı ($P < 0.05$). Stromal hücrelerdeki TLR2 immunoreaktivitesinin diöstrüs ve postpartum dönemler arasında farklılık göstermediği belirlendi. Endometriyal bezlerde postpartum 1. gündeki TLR2 immunoreaktivitesinin diğer günlerden farklı olduğu tespit edildi ($P < 0.05$). Damarlardaki TLR2 immunoreaktivitesi açısından diöstrüs ve postpartum dönemler arasında önemli farklılık bulunmadı ($P > 0.05$) (Grafik 4.2).



Şekil 4.11. Postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR2 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, kalın ok: TLR2 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 µm (PP3, PP10, PP15), 200 µm (PP5).

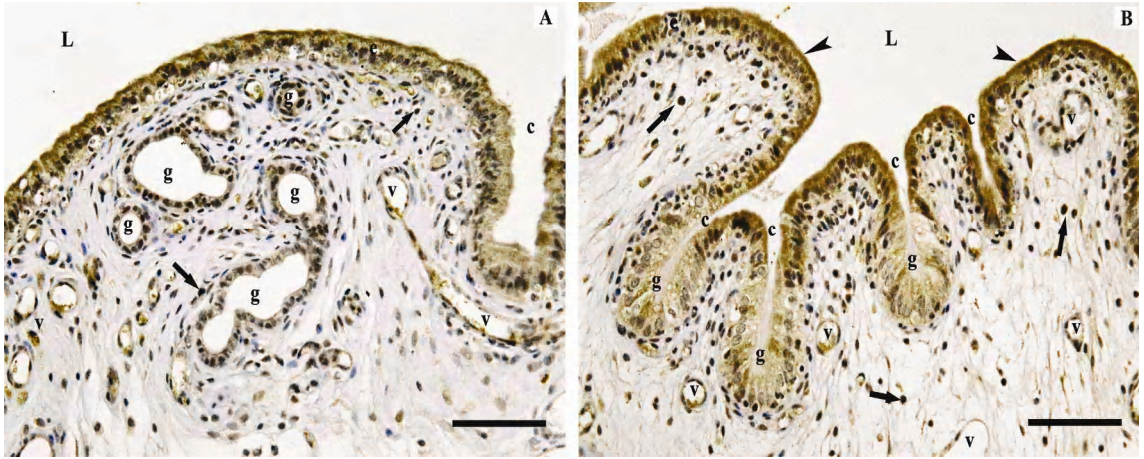
TLR2 için western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise diöstrüs ve postpartum günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıkların anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$) (Grafik 4.15).



Grafik 4.2. Sıçan uterusunda TLR2 immunreaksiyonunun toplam skoru

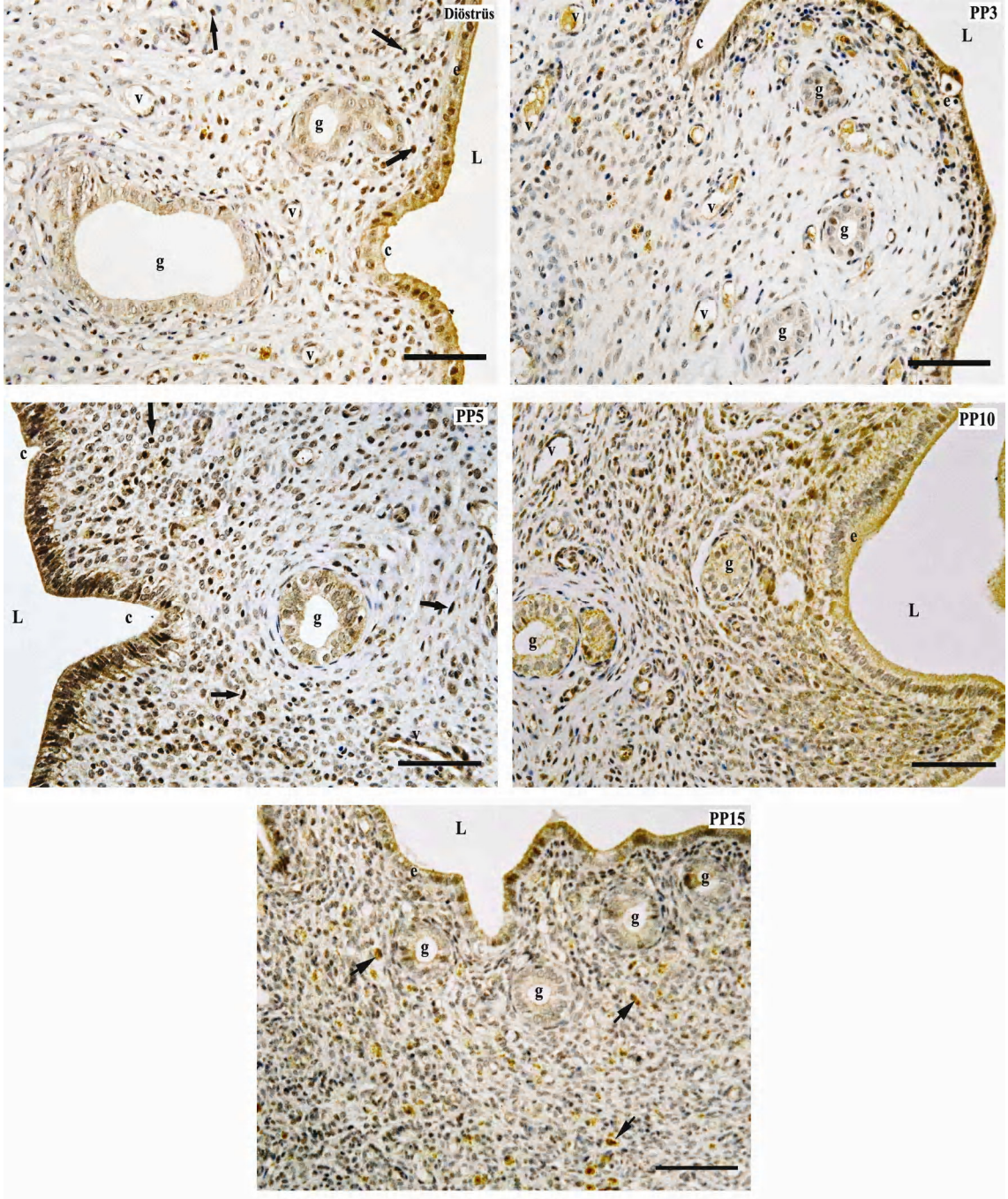
4.2.3. TLR3

Diöstrüs ve postpartum dönemlerde TLR3 immunreaktivitesi, luminal epitelin çekirdek, sitoplazma ve apikal membranında ve daha da zayıf olmak üzere kript epitelinin çekirdek ve sitoplazmalarında, endometriyal bez epiteli ile lamina propriyada bulunan bazı stromal hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında pozitif reaksiyon gözlemlendi. Postpartum 3. günde epitelin altında bulunan stromal hücrelerdeki boyanma yoğunluğu kas katmanına yakın olan stromal hücrelerden fazlaydı. Endometriyal bezlerin etrafından bulunan miyoepitel hücrelerinde reaksiyon negatifti. Miyometriyumdaki düz kas hücreleri, damar endotel hücreleri ile mediadaki düz kas hücrelerinin çekirdeğindeki reaksiyon sitoplazmaya oranla daha yoğundu. Aynı zamanda kan damarları etrafında kuvvetli TLR3 pozitif olan mast hücrelerine rastlandı. Mezotel hücrelerinde de oldukça kuvvetli TLR3 immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.12, Şekil 4.13).



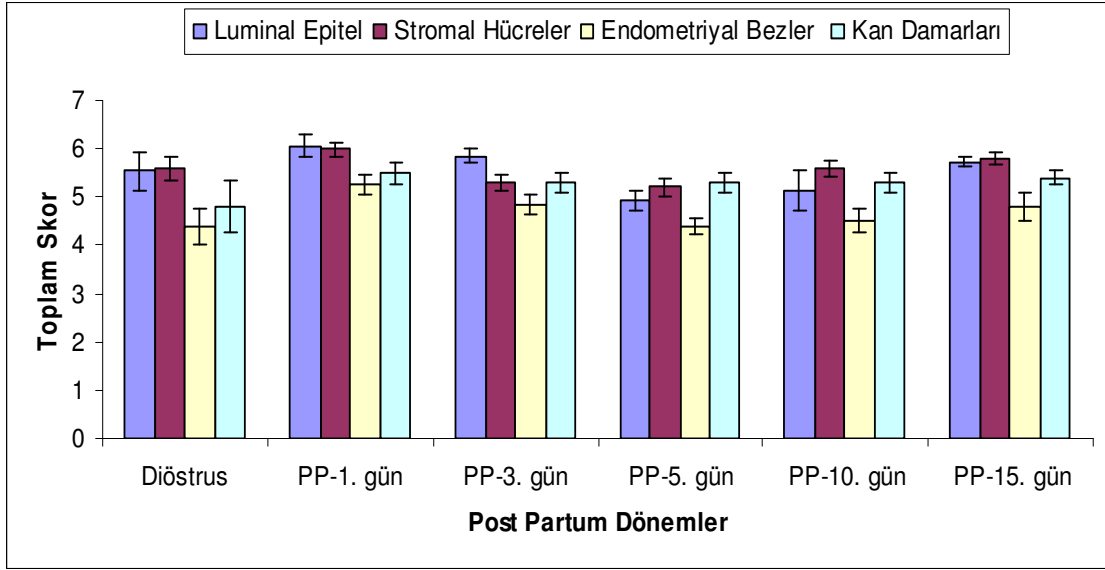
Şekil 4.12. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR3 immunreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR3 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR3 pozitif apikal membran, Bar: 100 μ m (A,B).

TLR3 için luminal epiteldeki boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında postpartum 1. gün ile 5. gün, 3. gün ile 5. gün, 5. gün ile 10. gün ve diöstrüs arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($P < 0.05$). Stromal hücrelerdeki TLR3 immunreaktivitesi postpartum 1. gün ile 3. ve 5. günler arasında farklı idi ($P < 0.05$). Endometriyal bezlerdeki ve damarlardaki TLR3 immunreaktivitesinin diöstrüs ve postpartum dönemlere göre değişmediği görüldü ($P > 0.05$) (Grafik 4.3)



Şekil 4.13. Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR3 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR3 pozitif stromal hücreler, ince ok: hemosiderin yüklü makrofajlar, Bar: 100 µm.

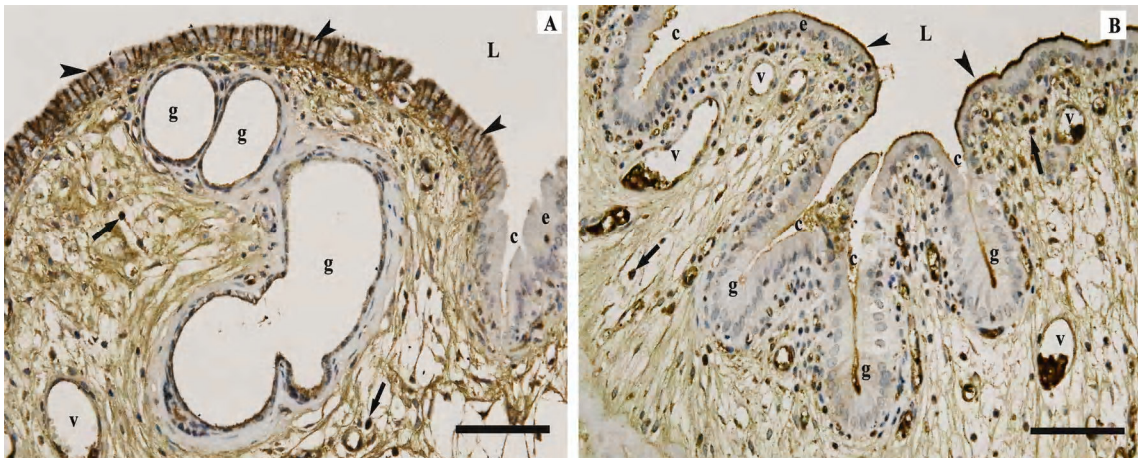
TLR3 için western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise diöstrüs ile postpartum 3. ve 5. günlere ait protein değerleri arasındaki farklılıkların önemli olduğu saptandı ($P<0.05$) (Grafik 4.15).



Grafik 4.3. Sıçan uterusunda TLR3 immunreaksiyonunun toplam skoru

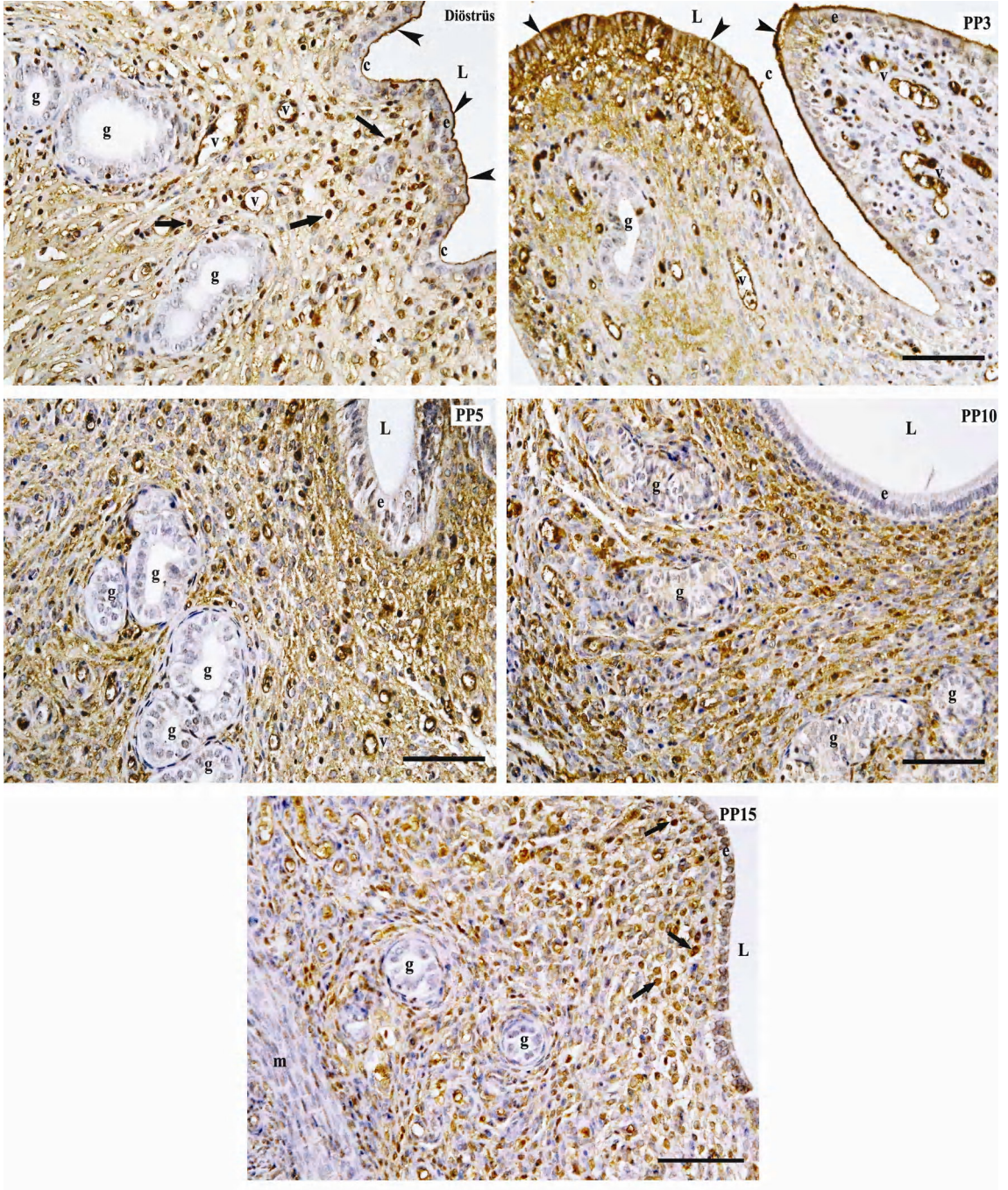
4.2.4. TLR4

TLR1, TLR2 ve TLR3'ün uterus dokusunda verdiği reaksiyon hemen hemen birbirine benzerlik göstermesine rağmen TLR4 de farklı bir reaksiyon tespit edildi. Postpartum günlerde ve diöstrüs döneminde luminal epitelin çekirdek ve sitoplazmasında zayıf bir reaksiyon gözlenirken, özellikle postpartum 1., 3. gün ve diöstrüs döneminde apikal membranda ve lateral membranlarda kuvvetli pozitif immunreaksiyon saptandı. Lateral membranlardaki reaksiyon postpartum 1. günde oldukça kuvvetli iken, 3. günde reaksiyon azalmış, diğer günlerde ise tamamen ortadan kaybolmuştu (Şekil 4.14, Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR4 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR4 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR4 pozitif apikal ve lateral membran, Bar: 100 µm (A,B).

Kript epitelinin apikal membranında da reaksiyon kuvvetli pozitifti. TLR4 reaktivitesi endometriyal bez epiteli ile kript epitelinin sitoplazmalarında negatifken, çekirdeklerinde zayıf olarak tespit edildi. Lamina propriyada stromal hücrelerde de TLR4 immunoreaktivitesi pozitifti. Aynı zamanda lamina propriya matriksinde de kuvvetli pozitif immunreaksiyon tespit edildi (Şekil 4.14, Şekil 4.15).

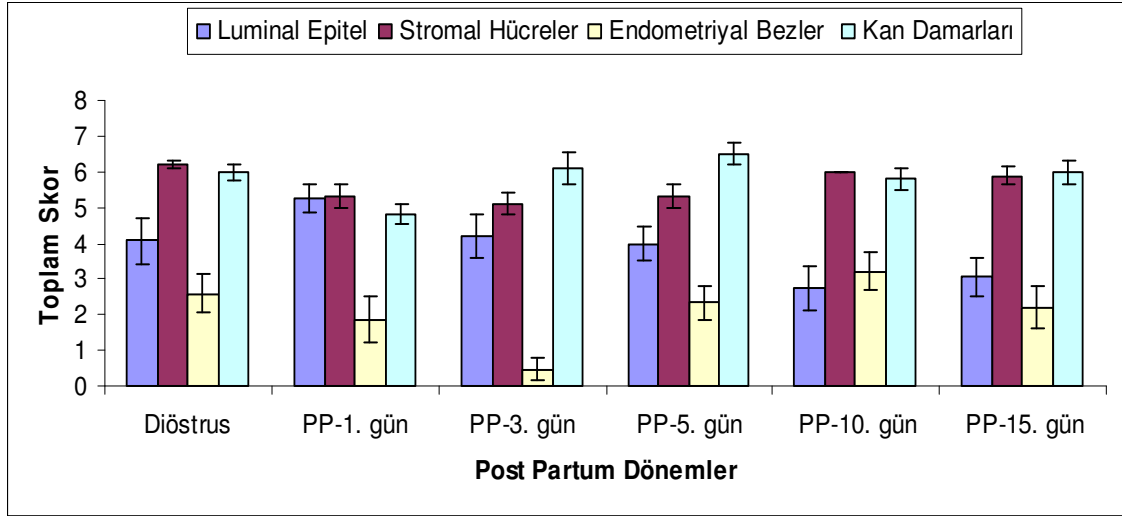


Şekil 4.15. Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR4 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, kalın ok: TLR4 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR4 pozitif apikal ve lateral membran, Bar: 100 µm.

Miyositlerin sadece çekirdeğinde zayıf bir reaksiyon gözlenirken, kan damarlarında endotel hücrelerinin hem sitoplazması, hem de çekirdeğinde ve mezotel hücrelerinde kuvvetli pozitif immunreaksiyon saptandı. Kan damarları etrafındaki mast hücrelerinde, perimetriyum tabakasının bağ doku hücrelerinde ve matriksinde de kuvvetli pozitif immunreaksiyon tespit edildi (Şekil 4.15).

Luminal epiteldeki TLR4 immunreaktivitesinin diöstrüs ve postpartum dönemlere göre farklı olmadığı belirlendi ($P>0.05$). Stromal hücrelerdeki TLR4 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında postpartum 3. gündeki reaksiyonun diöstrüs ve 10. günden anlamlı olduğu ($P<0.05$), endometriyal bezlerde 3. günde diğer tüm günlerden, damarlarda ise 1. günde diğer tüm günlerden farklı olduğu tespit edildi ($P<0.05$) (Grafik 4.4).

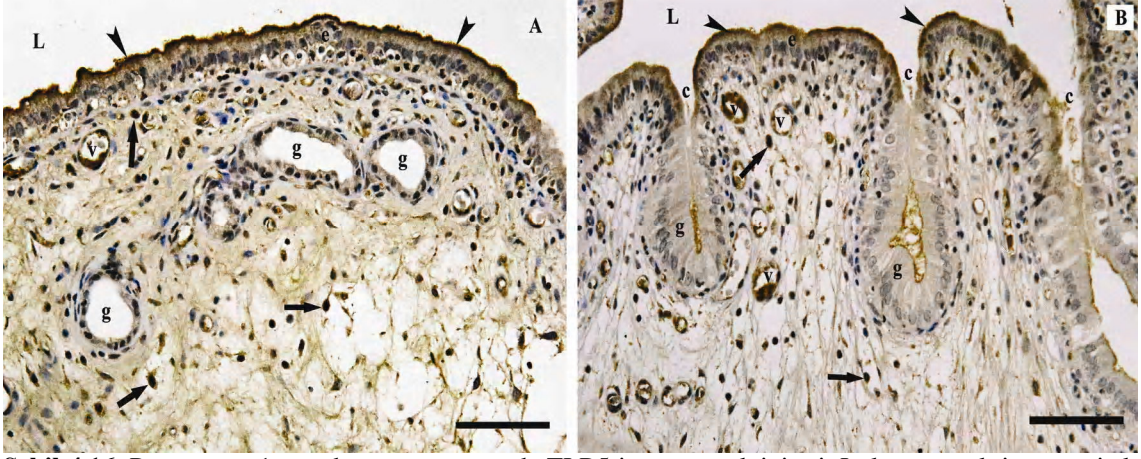
Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise TLR4 için diöstrüs ile postpartum 3., 5., 10., 15. günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıkların ve postpartum 1. gün ile postpartum 3. ve 5. günler arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan anlam taşıdığı gözlemlendi ($P<0.05$) (Grafik 4.15).



Grafik 4.4. Sıçan uterusunda TLR4 immunreaksiyonunun toplam skoru

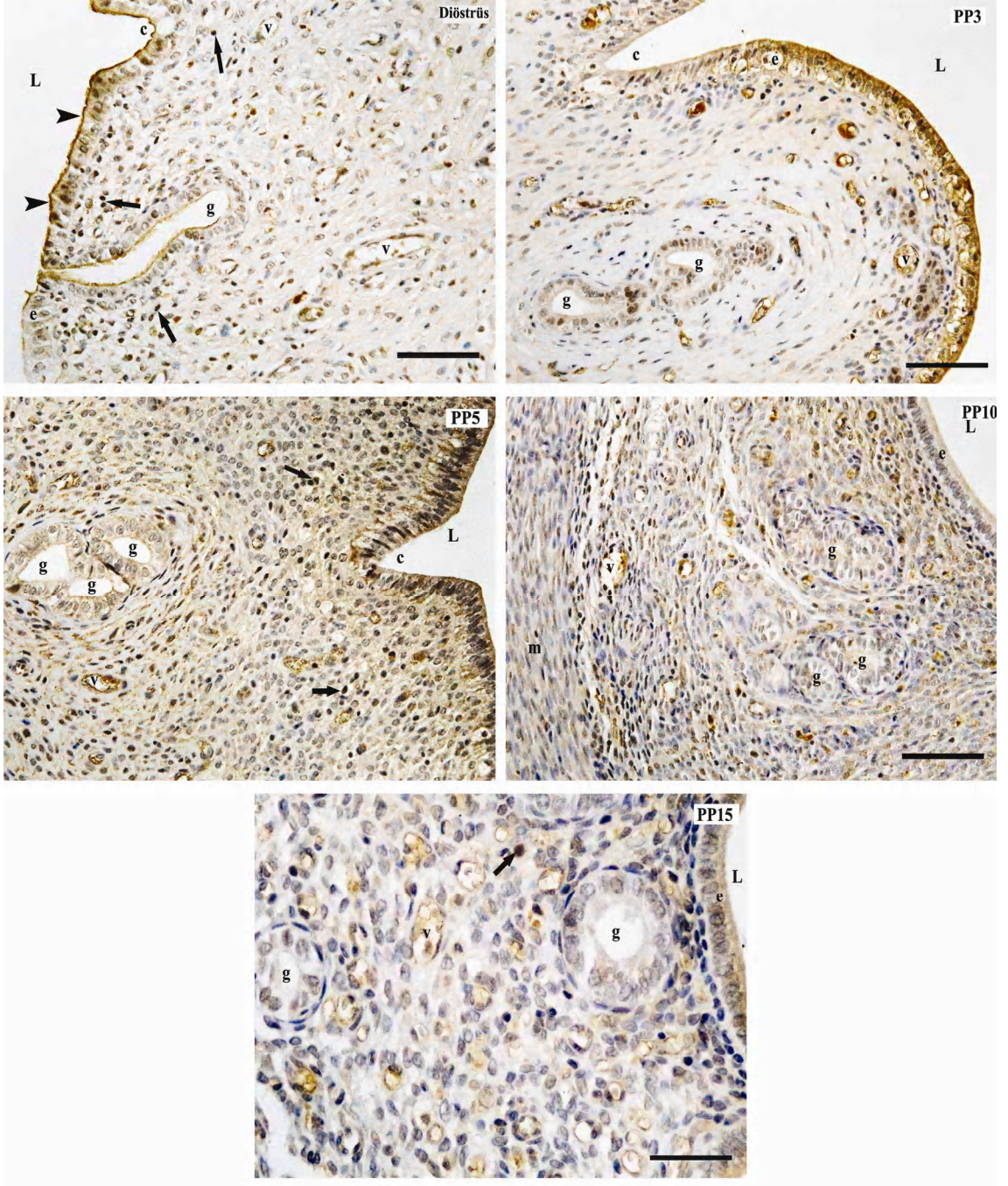
4.2.5. TLR5

Postpartum 1., 3., 5., 10., 15. gün ve diöstrüs dönemlerinde TLR5 immunreaktivitesinin luminal epitelin çekirdek ve sitoplazmaları ile daha yoğun olmak üzere apikal membranlarında bulunduğu görüldü. Aynı zamanda erken postpartum dönemlerinde (özellikle 1. ve 3. gün) luminal epitelin lateral membranlarında da pozitif TLR5 reaksiyon saptandı (Şekil 4.16, Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR5 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR5 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR5 pozitif apikal membran, Bar: 100 µm (A,B).

Kript epitelinin bulunduğu erken postpartum dönemlerde apikal membranda kuvvetli pozitif boyanma gözlenirken, sitoplazma ve çekirdekte daha zayıf bir reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.16). Yine aynı şekilde endometriyal bez epitelinin sitoplazması ve çekirdeğinde de zayıf reaksiyon tespit edildi. Lamina propria içinde stromal hücrelerin sitoplazmalarında da TLR5 immunreaksiyonu pozitif idi. Diöstrüs döneminde luminal epitelin hemen altındaki stromal hücrelerde ve matriksde TLR5 reaktivitesi kuvvetli idi. Miyositlerin, miyoepitel hücrelerin ve kan damarlarının media katmanında reaksiyon zayıf iken, endotel hücrelerinde daha kuvvetli bir reaksiyon belirlendi. Kan damarları etrafındaki mast hücrelerinde de pozitif TLR5 immunreaksiyonu saptandı (Şekil 4.16, Şekil 4.17).

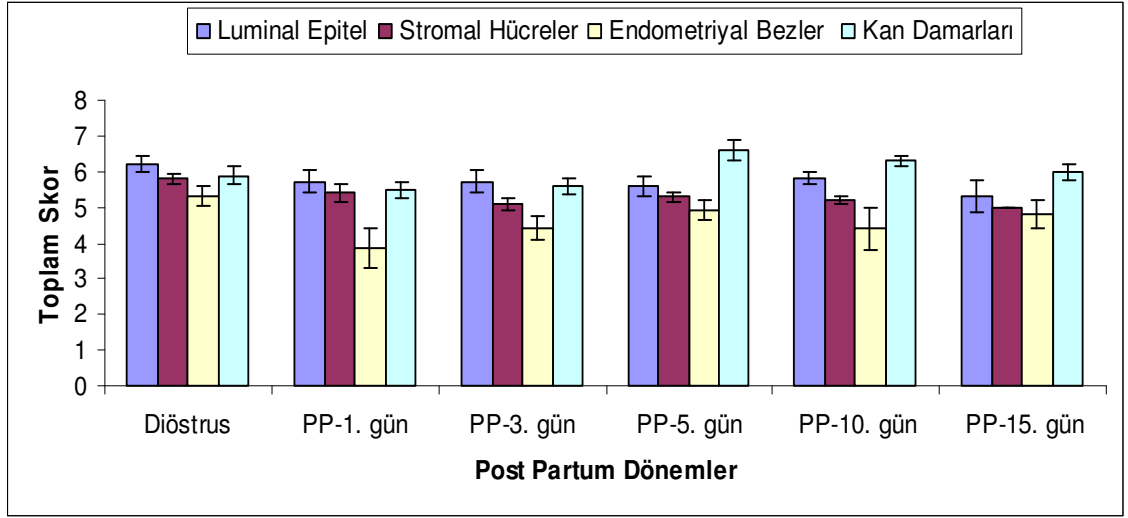


Şekil 4.17. Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR5 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, kalın ok: TLR5 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR5 pozitif apikal membran, Bar: 100 µm (Diöstrüs, PP3, PP5, PP10), 50 µm (PP15).

Luminal epitelde ve endometriyal bezlerdeki TLR5 immunoreaktivitesinin diöstrüs ve postpartum dönemlerde farklılık taşımadığı belirlendi ($P>0.05$). Stromal hücrelerde diöstrüs dönemindeki TLR5 immunoreaktivitesi postpartum 3., 10. ve 15. günlerdekinden farklı bulundu ($P<0.05$). Damarlardaki TLR5 immunoreaktivitesi

karşılaştırıldığında ise postpartum 1. günün 5. ve 10. günlerden, 3. günün de 5. ve 10. günlerden farklı olduğu tespit edildi ($P<0.05$) (Grafik 4.5).

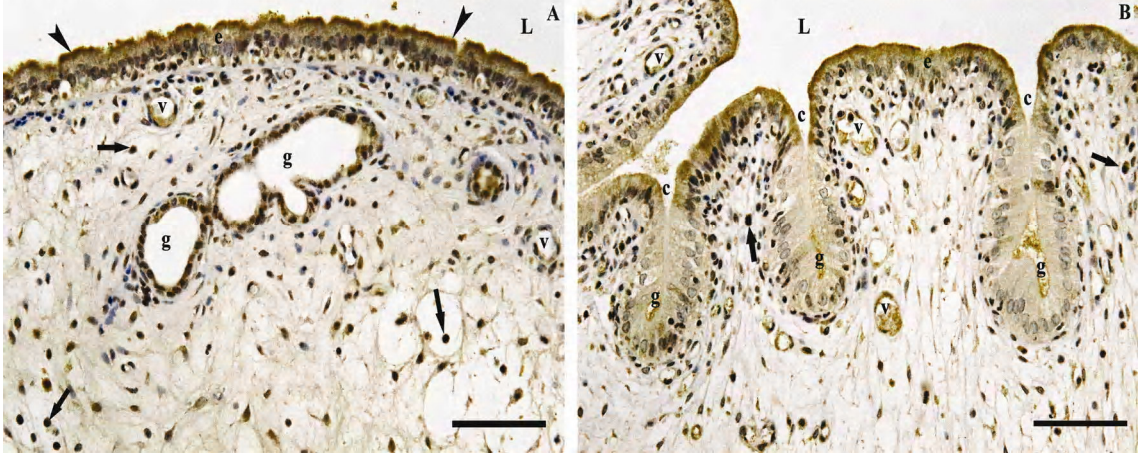
TLR5 için western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise diöstrüs ve postpartum 3., 5. ve 10. günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıklar önemli bulundu ($P<0.05$) (Grafik 4.15).



Grafik 4.5. Sığan uterusunda TLR5 immunreaksiyonunun toplam skoru

4.2.6. TLR6

İncelenen tüm dönemlerde TLR6 immunoreaktivitesinin luminal epitelin apikal membranında kuvvetli olduğu, sitoplazma ve çekirdeklerinde ise zayıftan kuvvetliye doğru değişen derecelerde bulunduğu görüldü. Özellikle postpartum 1. günde lamina propria içinde kuvvetli pozitif stromal hücelere rastlandı. Yine bu dönemde endometriyal bez epitelinin çekirdeğinde ve kript epitelinin apikal membranında TLR6 immunoreaktivitesinin kuvvetli iken, postpartum günlerde ileriye doğru giderek azaldığı tespit edildi (Şekil 4.18, Şekil 4.19).

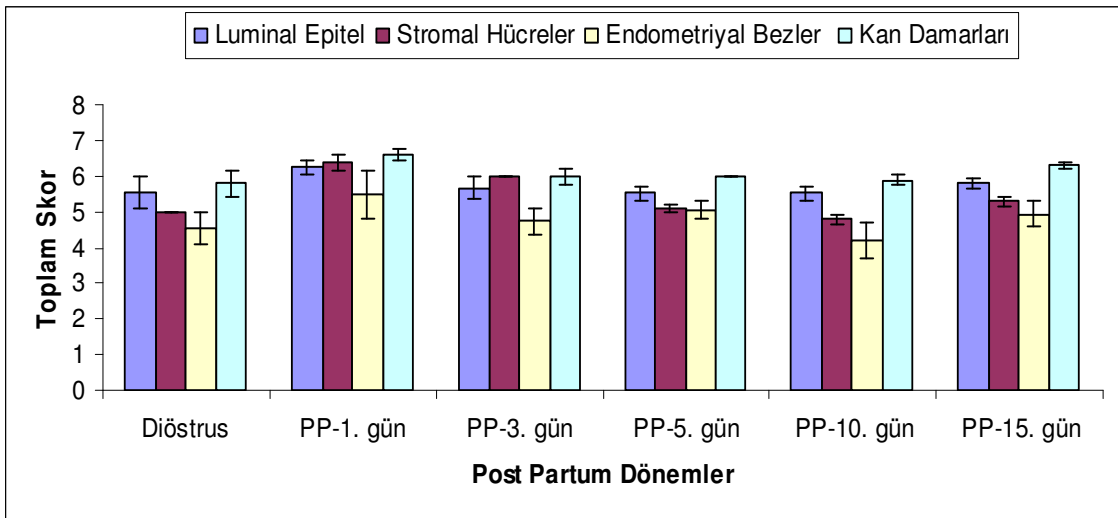


Şekil 4.18. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR6 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR6 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR6 pozitif apikal membran, Bar: 100 µm (A,B).

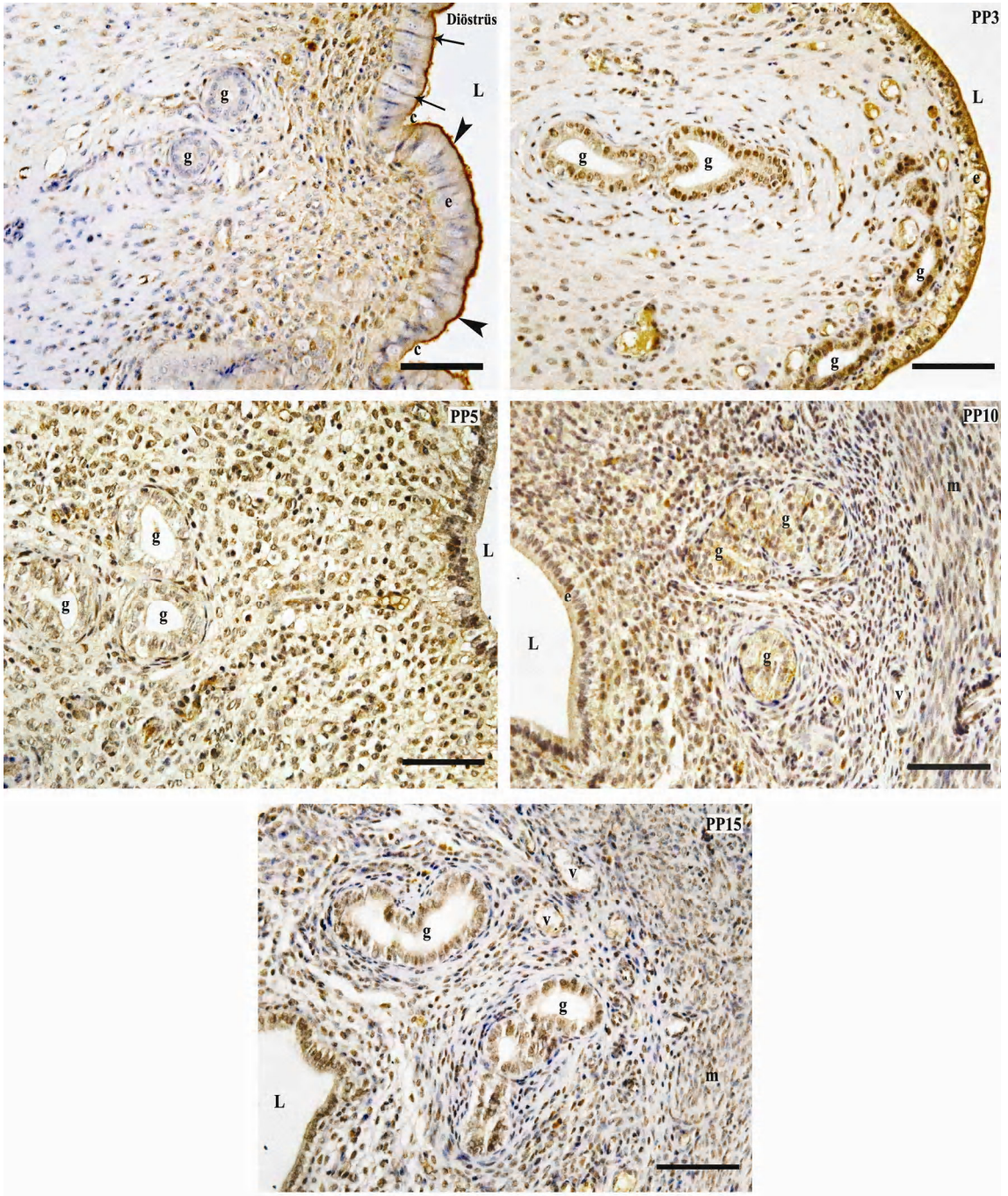
Miyositlerde, mioepitel hücrelerinde ve kan damarlarının media katmanında zayıf olan reaksiyonun, endotel hücrelerinde ve mezotel hücrelerinde daha kuvvetli olduğu belirlendi. Kan damarları etrafındaki mast hücrelerinde de TLR6 pozitif reaksiyon görüldü (Şekil 4.19).

Luminal epitelde, endometriyal bezler ve damarlardaki TLR6 immunoreaktivitesinin diöstrüs ve postpartum dönemlere göre farklılık taşımadığı belirlendi ($P>0.05$). Stromal hücrelerde postpartum 1. ve 3. günlerdeki TLR6 immunoreaktivitesinin diöstrüs ve diğer günlerdekenden farklı olduğu gözlemlendi ($P<0.05$) (Grafik 4.6).

TLR6 için western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise diöstrüs ve postpartum 3., 5. ve 10. günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıkların ve postpartum 1. gün ile postpartum 3. ve 5. günler arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan anlam taşıdığı tespit edildi ($P<0.05$) (Grafik 4.15).



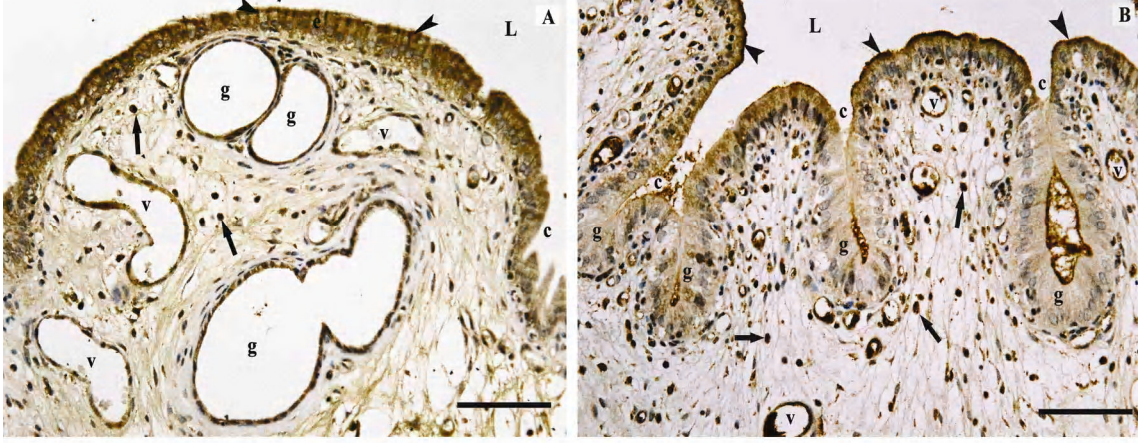
Grafik 4.6. Sıçan uterusunda TLR6 immunreaksiyonunun toplam skoru



Şekil 4.19. Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR6 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: TLR6 pozitif apikal membran, ince ok: mekik şeklinde olan hücreler, Bar: 100 µm.

4.2.7. TLR7

Genel olarak tüm dönemlerde luminal, kript ve bez epitelinin çekirdek ve sitoplazmalarında, miyositlerde ve kan damarlarının media tabakasında zayıf bir reaksiyon gözlenirken, luminal epitelin apikal membrandaki reaksiyon daha yoğundu. Ayrıca postpartum 1. ve 3. günlerde luminal epitelin apikal membranınin yanısıra lateral membranlarında da TLR7 immunreaksiyonu saptandı (Şekil 4.20, Şekil 4.21).

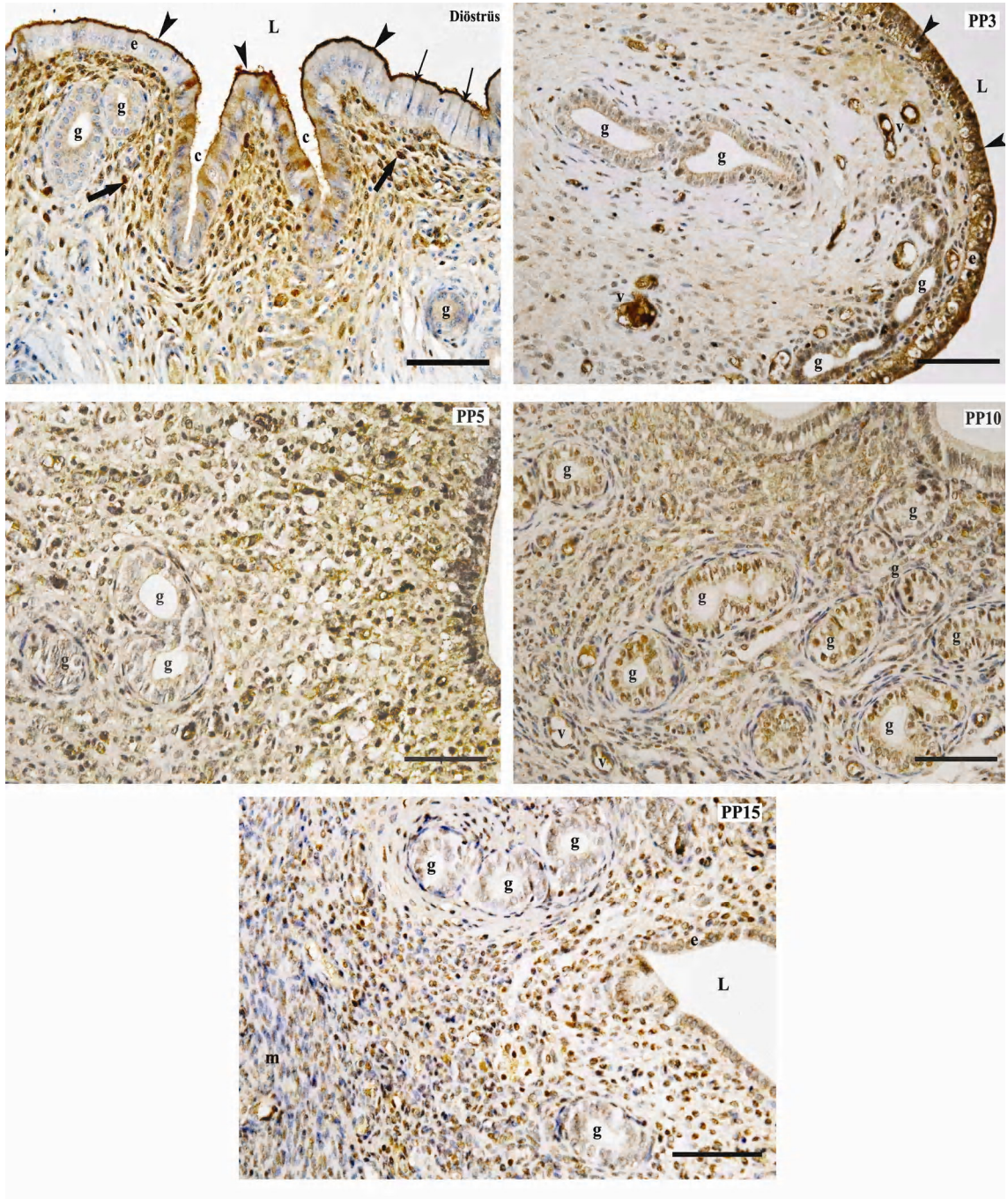


Şekil 4.20. Postpartum 1. günde sıçan uterusunda TLR7 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, kalın ok: TLR7 pozitif stromal hücreler, ok başı: TLR7 pozitif apikal ve lateral membran, Bar: 100 μ m (A,B).

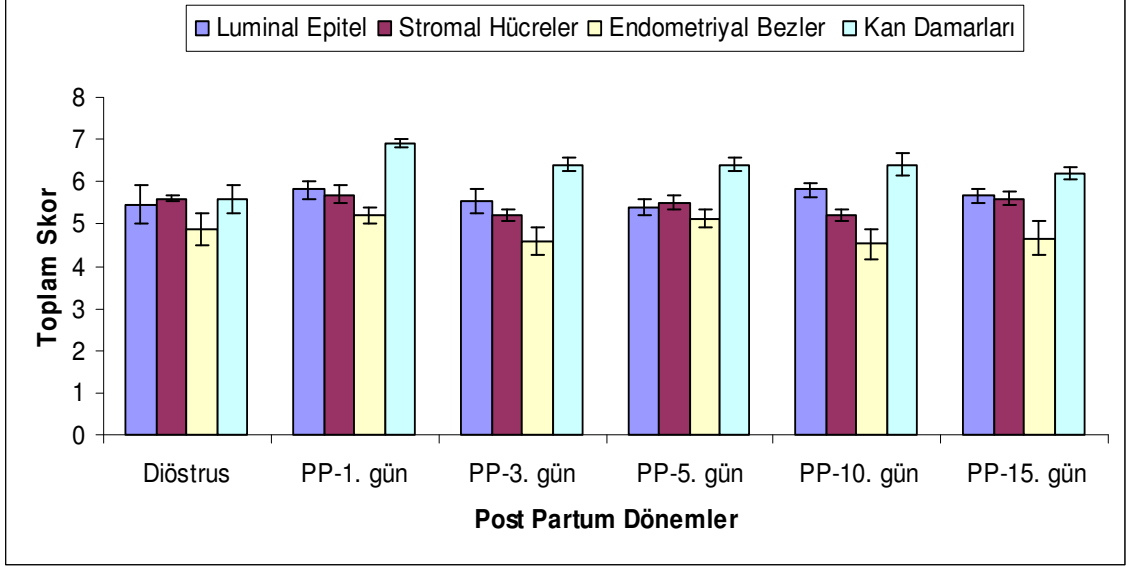
Yine özellikle postpartum 1. günde lamina propriya matriksi TLR7 pozitif olup, kuvvetli boyanan stromal hücrelere rastlandı (Şekil 4.20). Endotel hücrelerinin hem sitoplazması hem de çekirdeğinde, mezotel hücrelerinde ve mast hücrelerinde de TLR7 immunoreaktivitesi kuvvetli pozitif olarak belirlendi.

TLR7 immunoreaktivitesi luminal epitelde, endometriyal bezler ve stromal hücrelerde dönemlere göre farklılık göstermezken ($P>0.05$), damarlarda 1. gün ile diöstrüs ve postpartum 15. günler arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlendi ($P<0.05$) (Grafik 4.7).

Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise diöstrüs ve postpartum 3., 5., 10. ve 15. günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıkların anlamlı olduğu tespit edildi ($P<0.05$) (Grafik 4.15).



Şekil 4.21. Diöstrüs, postpartum 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR7 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: TLR7 pozitif apikal ve lateral membran, ince ok: mekik şeklinde olan hücreler, kalın ok: TLR7 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 µm.

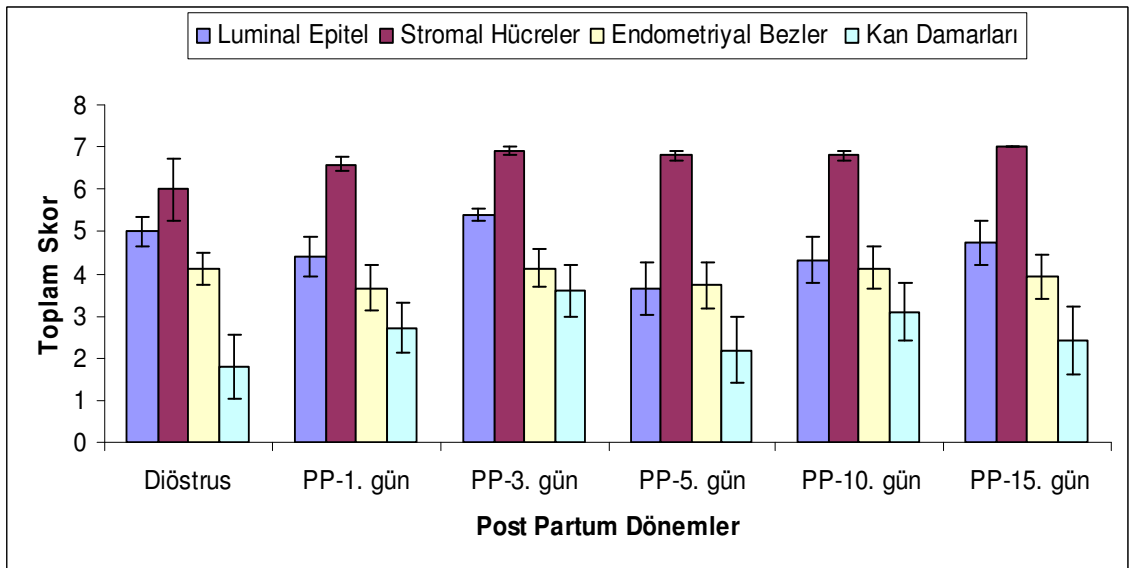


Grafik 4.7. Sıçan uterusunda TLR7 immunreaksiyonunun toplam skoru

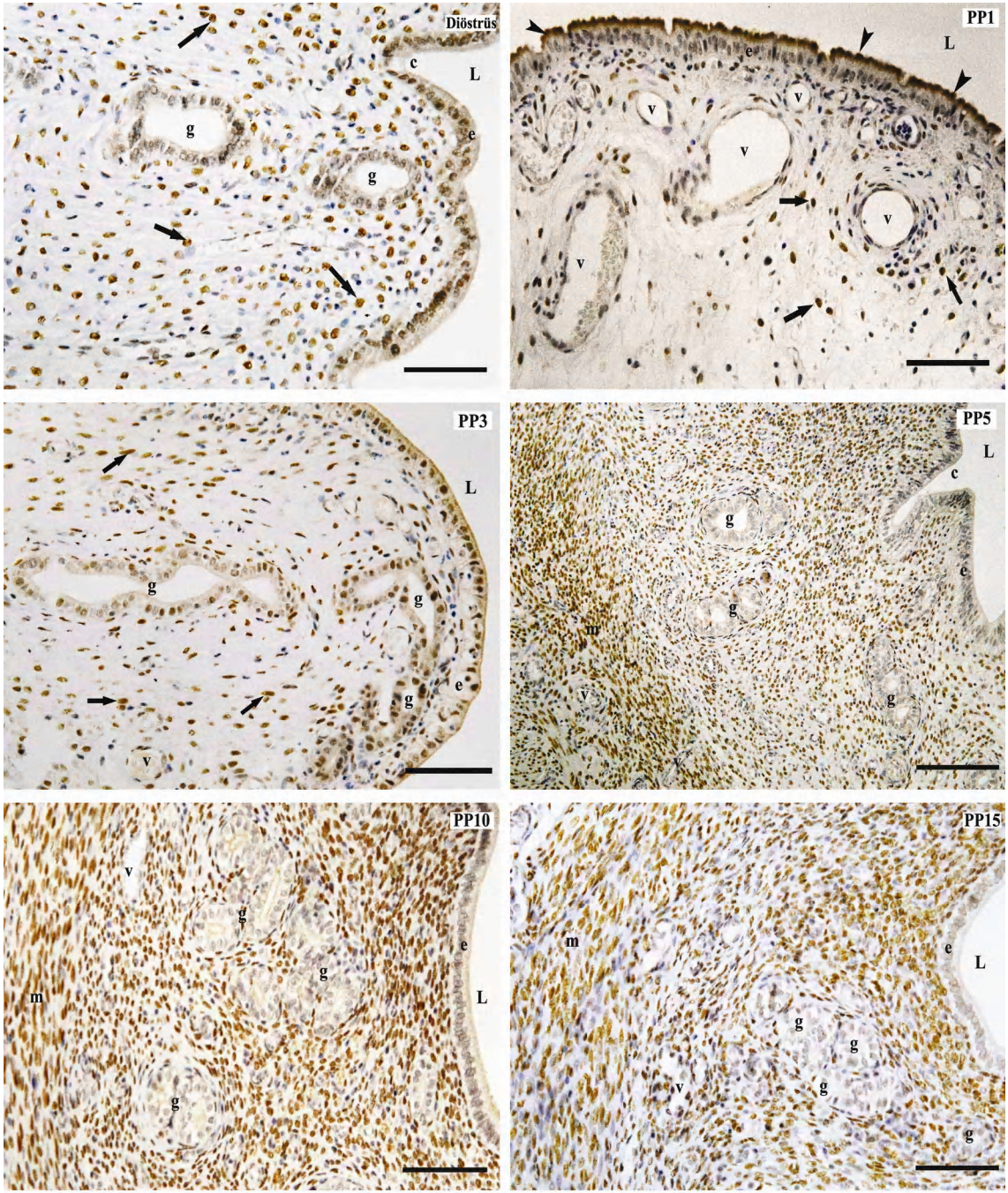
4.2.8. TLR8

TLR8 immunoreaktivitesi luminal, kripte ve bez epitellerinin sitoplazmalarında zayıf olarak gözlenirken, çekirdekte ise biraz daha yoğun olarak tespit edildi. TLR8 immunreaksiyonunun genelde stromal hücrelerde ve miyositlerin çekirdeğinde kuvvetli olmak üzere miyoepitel hücrelerinde, mezotel hücrelerinde, endotel hücrelerinde ve mast hücrelerinde de bulunduğu belirlendi (Şekil 4.22).

Luminal epitelde, stromal hücreler, endometriyal bezler ve damarlardaki TLR8 immunoreaktivitesinin dönemlere göre anlamlı olarak değişmediği tespit edildi ($P>0.05$) (Grafik 4.8).



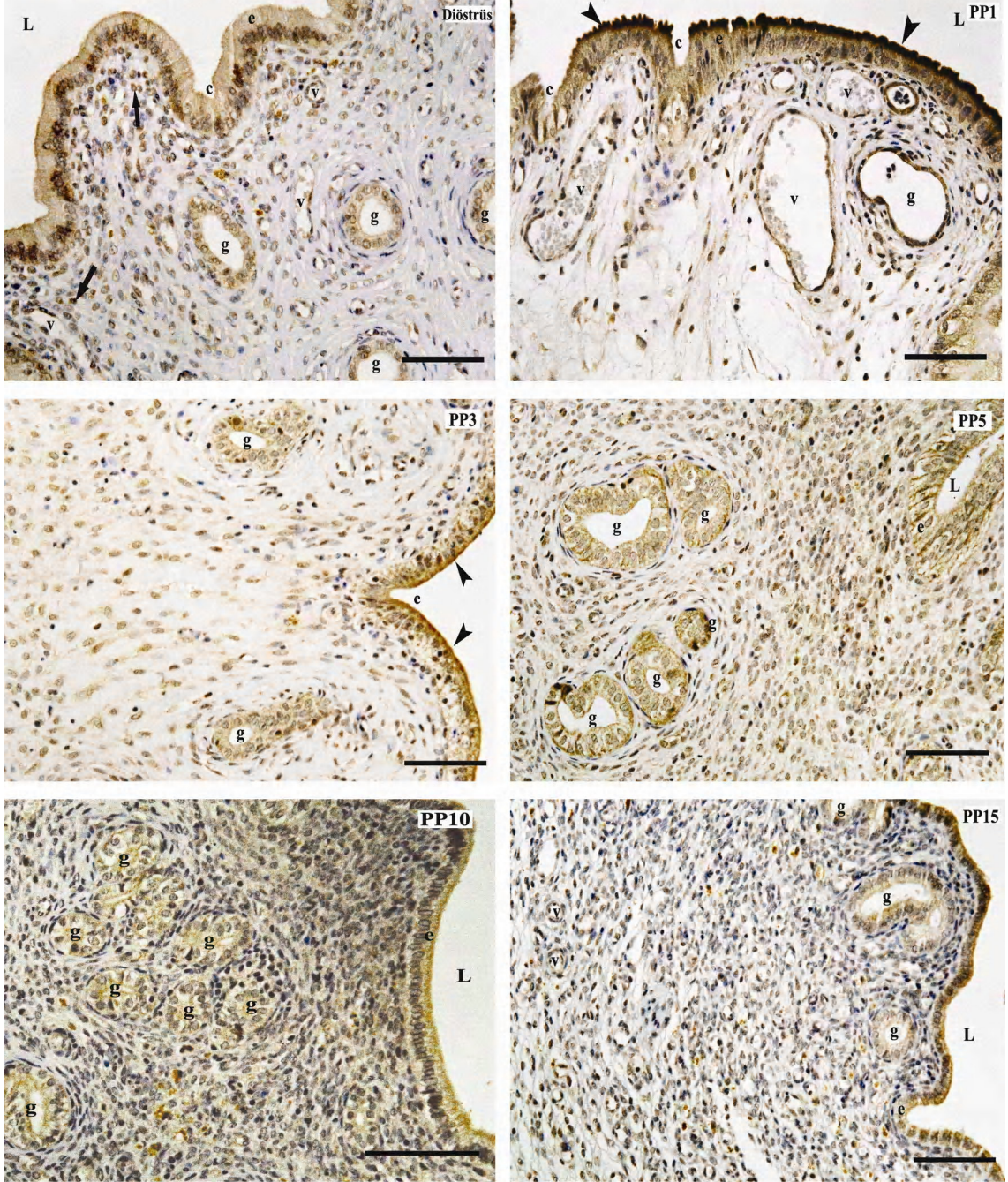
Grafik 4.8. Sıçan uterusunda TLR8 immunreaksiyonunun toplam skoru



Şekil 4.22. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR8 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: TLR8 pozitif apikal membran, kalın ok: TLR8 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 μ m (Diöstrüs, PP1, PP3, PP10, PP15), 200 μ m (PP5).

4.2.9. TLR9

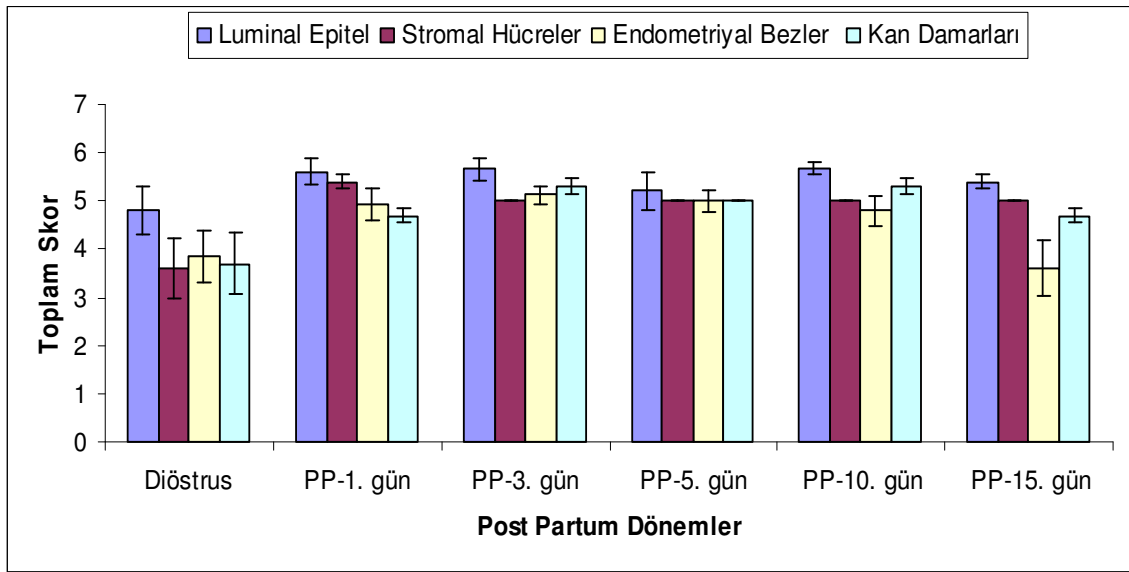
TLR9 immunoreaktivitesi postpartum ve diöstrüs dönemlerinde kript epiteli, miyometriyum ve damarların media tabakasında zayıf, luminal epitel ve bez epiteli, mezotel, endotel ve stromal hücrelerde biraz daha kuvvetli olarak izlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR9 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, ok başı: TLR9 pozitif apikal membran, kalın ok: TLR9 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 µm.

TLR9 için luminal epiteldeki ve bezlerdeki boyanma yoğunluğunun dönemlere göre farklılık taşımadığı ($P>0.05$), ancak stromal hücrelerdeki boyanma karşılaştırıldığında diöstrüsün incelenen tüm postpartum günlerinkinden farklı olduğu görüldü ($P<0.05$). Damarlardaki TLR9 immunreaktivitesi karşılaştırıldığında ise 3. ve 10. günlerdeki immunreaksiyonun diöstrüsdekenden önemli ölçüde farklı olduğu belirlendi ($P<0.05$) (Grafik 4.9).

TLR9 için western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde ise diöstrüs ve postpartum 1., 3., 5. ve 10. günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel önem taşıdığı tespit edildi ($P<0.05$) (Grafik 4.15).



Grafik 4.9. Sığan uterusunda TLR9 immunreaksiyonunun toplam skoru

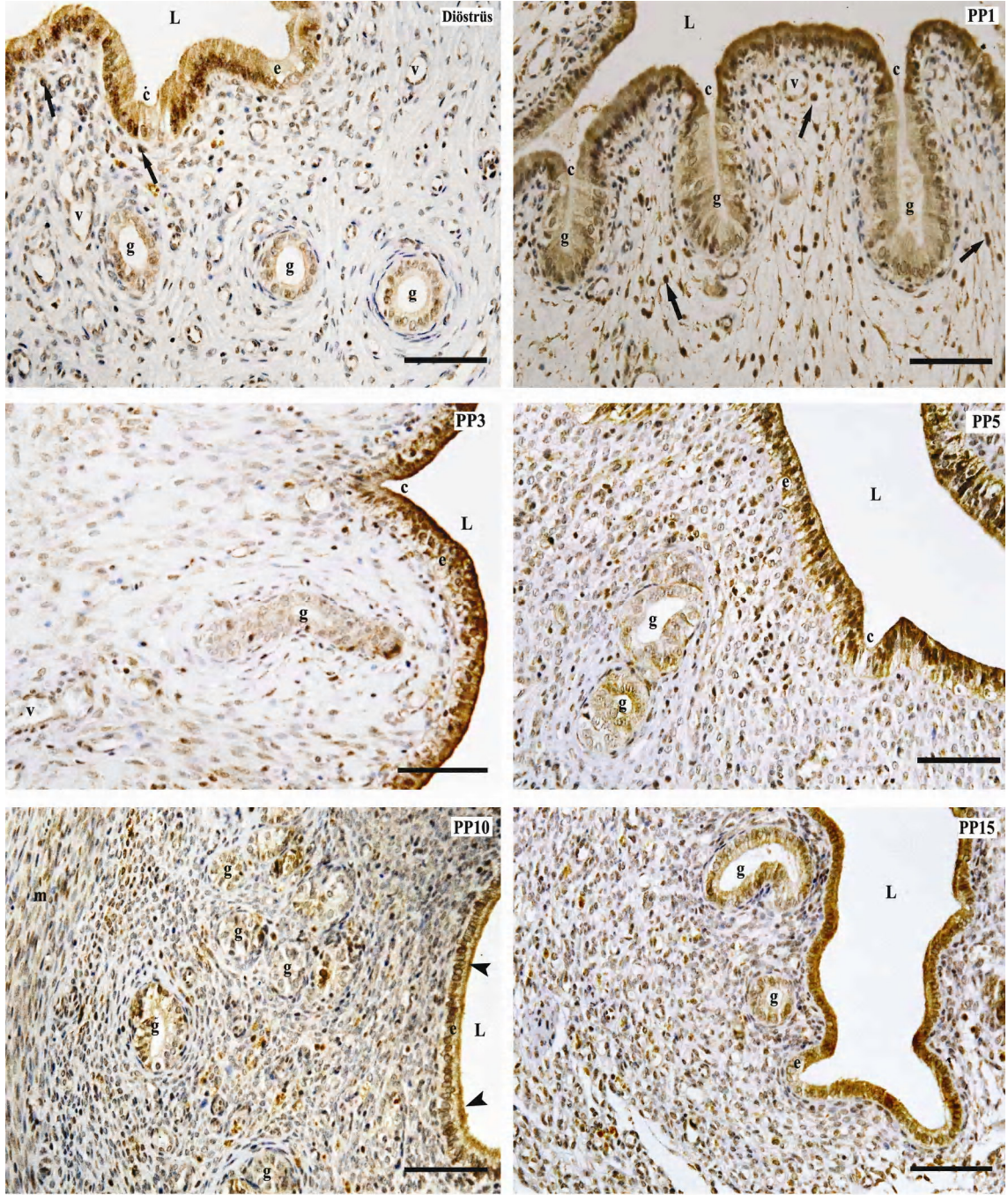
4.2.10. TLR10

TLR10 ekspresyonu özellikle luminal epitel, endometriyal bez epiteli, stromal, mezotel ve endotel hücrelerinin hem çekirdek, hem de sitoplazmalarında belirlendi. Aynı zamanda hem luminal epitelin, hem de bez epitelinin apikal membranında da pozitif TLR10 immunreaksiyonu saptanırken, lateral membranlarda reaksiyon negatifti. Kript epitelinde, mioepitel hücrelerinde, miyositlerde ve damarların media katmanında ise reaksiyon zayıf olarak görüldü (Şekil 4.24).

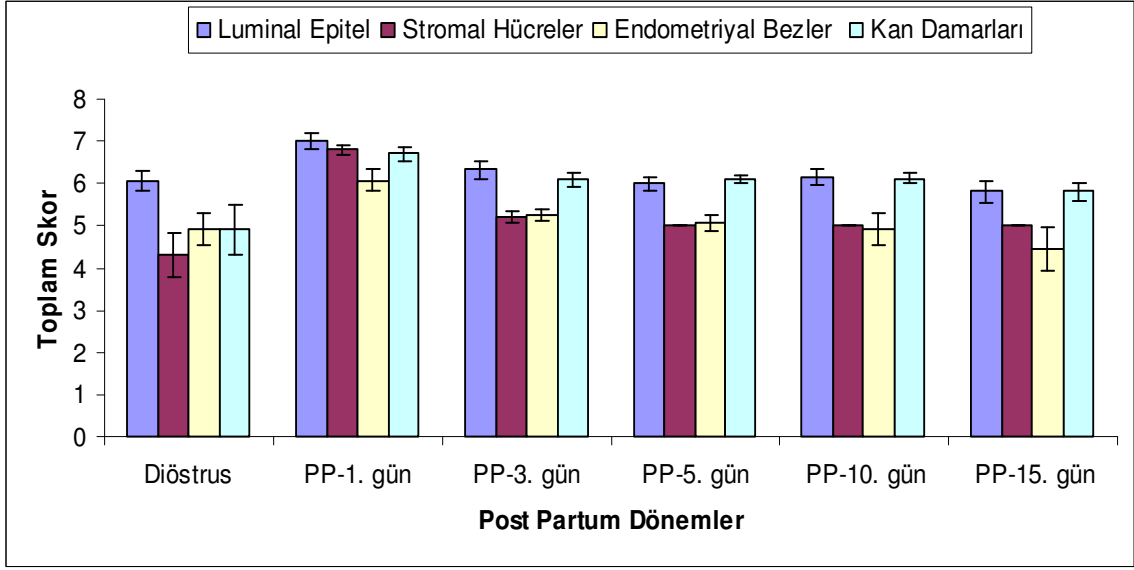
Luminal epitelde ve stromal hücrelerdeki TLR10 immunreaktivitesi, postpartum 1. günde, diöstrüs ve postpartum diğer günlerdekenden anlamlı bulundu ($P<0.05$). Endometriyal bezlerde dönemlere göre farklılık gözlenmezken ($P>0.05$), damarlardaki TLR10 immunreaktivitesinin 1. gün ile diöstrüs ve postpartum diğer günler arasındaki,

5., 10. günler ile diöstrüs arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önem taşıdığı tespit edildi ($P < 0.05$) (Grafik 4.10).

Western blot analiz sonuçları değerlendirildiğinde TLR10 için diöstrüs ve postpartum günlerdeki protein değerleri arasındaki farklılıkların anlamlı olmadığı görüldü ($P > 0.05$) (Grafik 4.15).



Şekil 4.24. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda TLR10 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: TLR10 pozitif apikal membran, kalın ok: TLR10 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 µm.

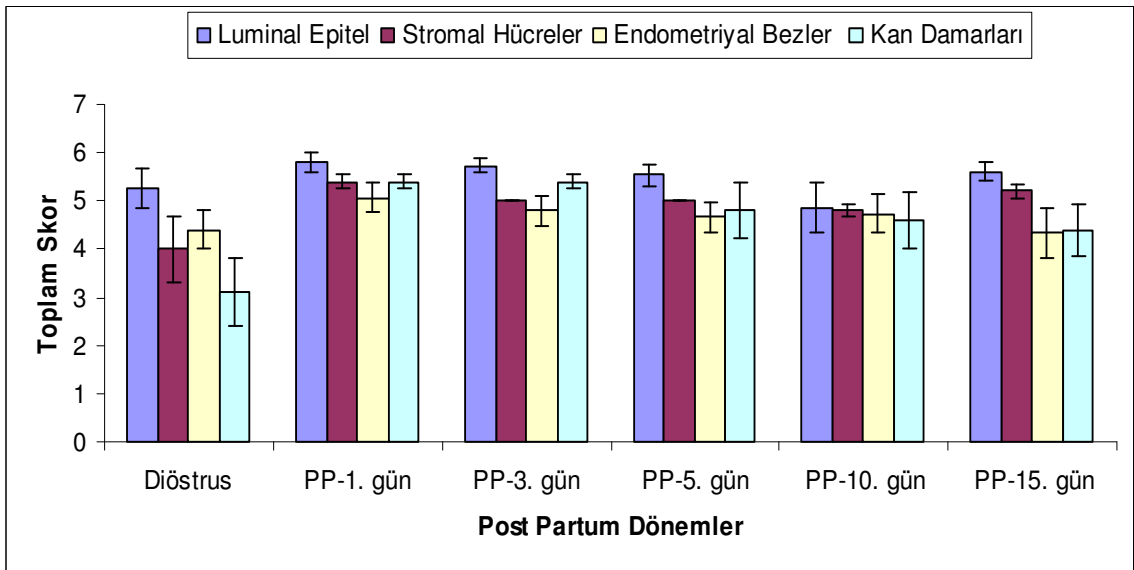


Grafik 4.10. Sıçan uterusunda TLR10 immunreaksiyonunun toplam skoru

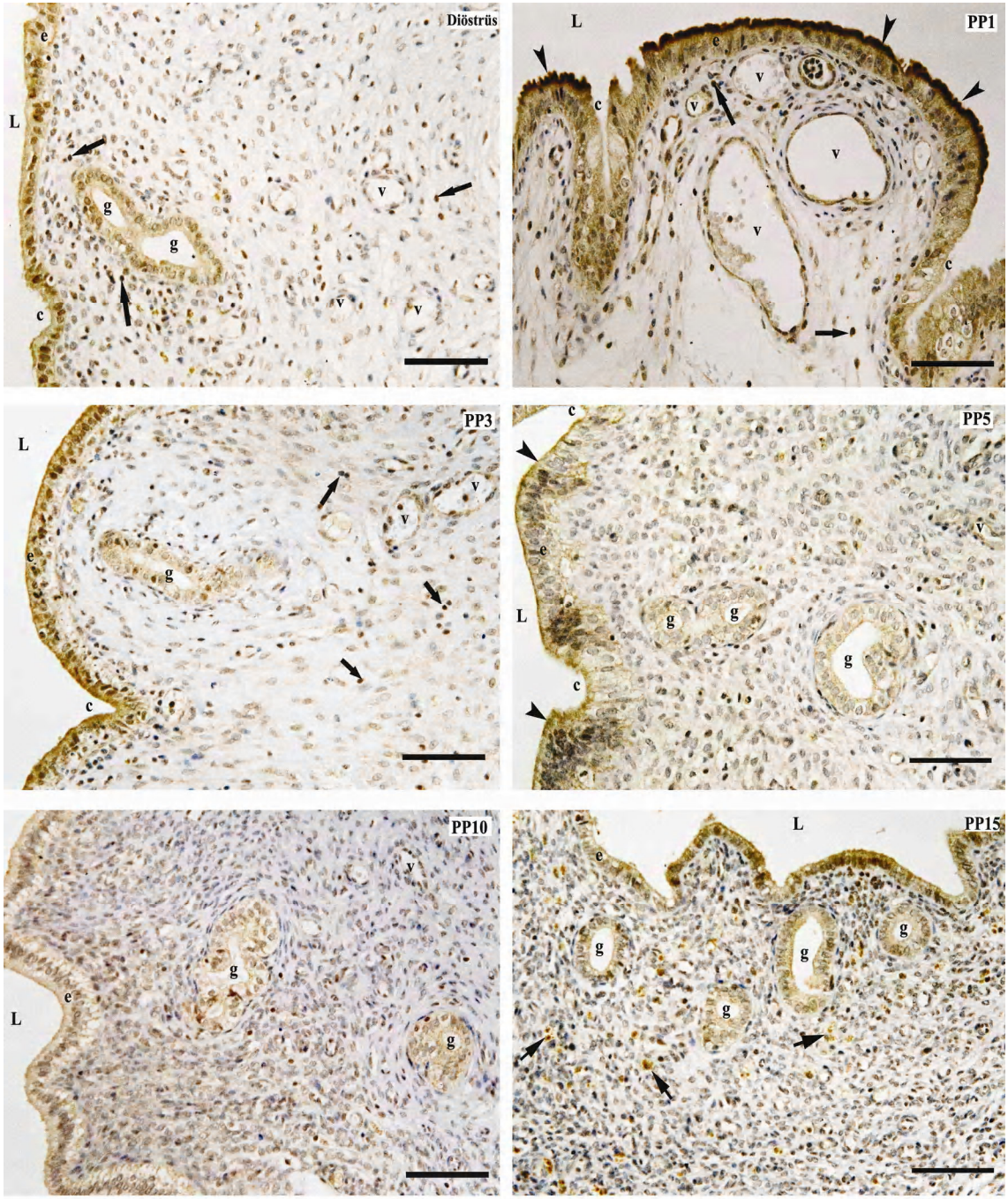
4.1.11. β -defensin 1

β -defensin1 immunreaksiyonunun kript epitelinde, damarların media katmanı ile miyometriyumda zayıf, luminal epitel ve bez epitelinde, endotel hücrelerinin çekirdeğinde, mezotel, mast ve bazı stromal hücrelerde orta yoğunlukta olduğu saptandı (Şekil 4.25).

Luminal epitel, stromal hücreler ve bezlerdeki β -defensin 1 immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında dönemler arası farklılık bulunmazken ($P>0.05$), damarlardaki diöstrüsdeki immun reaksiyonun postpartum 1., 3., 5. günlerdekinden farklı olduğu belirlendi ($P<0.05$) (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. Sıçan uterusunda β -defensin 1 immunreaksiyonunun toplam skoru

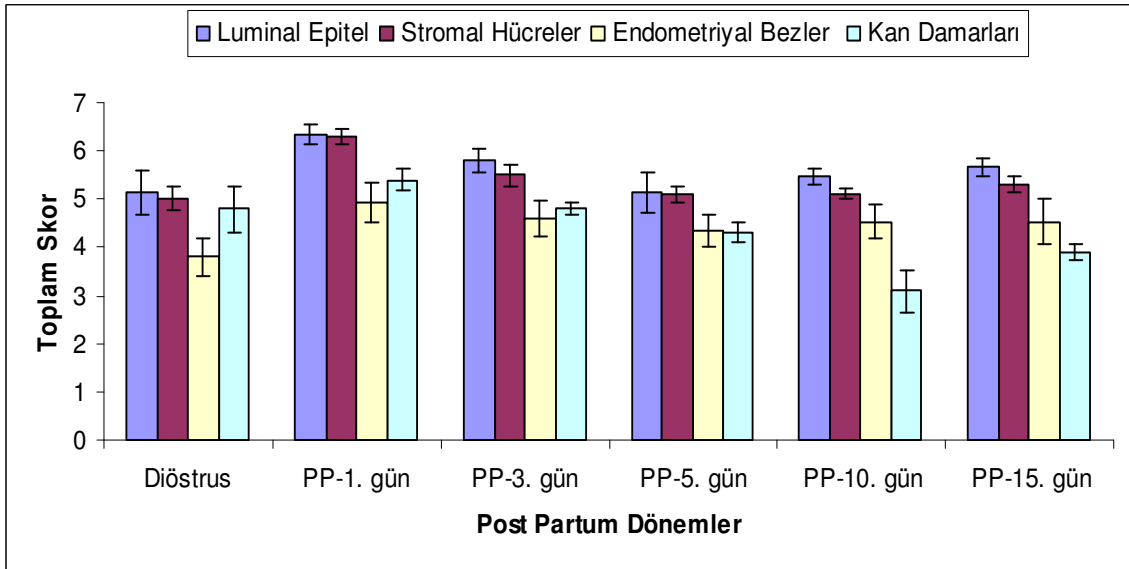


Şekil 4.25. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 1 immunreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, ok başı: β -defensin 1 pozitif apikal membran, kalın ok: β -defensin 1 pozitif stromal hücreler, ince ok: Hemosiderin yüklü makrofajlar, Bar: 100 μ m.

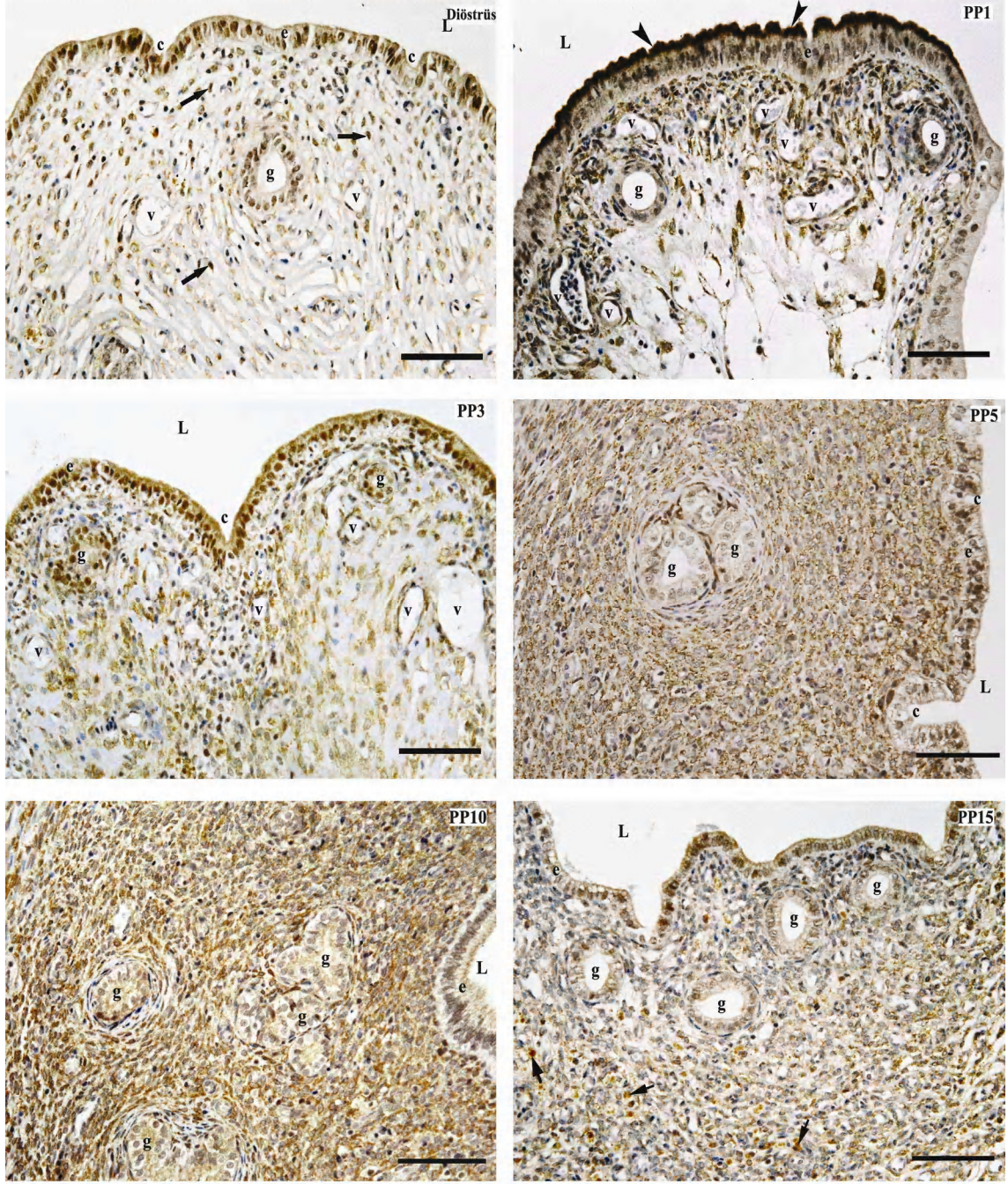
4.2.12. β -defensin 2

İncelenen tüm dönemlerde β -Defensin 2 immunreaktivitesinin luminal epitel hücrelerinin apikal membranı ve sitoplazmalarında orta derecede, çekirdeklerinde ise kuvvetli pozitif olduğu belirlendi. Lamina propriyada bulunan ve fibroblastlara olduğu düşünülen stromal hücrelerin, miyositlerin, mezotel hücrelerinin ve media katmanında bulunan düz kas hücrelerinin sitoplazmasında da kuvvetli pozitif immunreaksiyona rastlandı. Endotel hücrelerinde zayıf reaksiyon gözlenirken, kript epiteli ve bez epitelinin çekirdeğinde orta dereceli reaksiyon tespit edildi (Şekil 4.26).

β -defensin 2 immunoreaktivitesi luminal epitel ve bezlerde dönemlere göre anlamlı ölçüde değişmezken ($P>0.05$), stromal hücrelerde postpartum 1. gün ile diöstrüs ve postpartum diğer günler arasındaki farklılığın anlamlı olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Damarlardaki β -defensin 2 immunoreaktivitesi dönemlere göre karşılaştırıldığında postpartum 1. gün ile diöstrüs, postpartum 5., 10. ve 15. günler arasındaki, postpartum 3. gün ile diöstrüs, postpartum 10. ve 15. günler arasındaki, postpartum 5. gün ile diöstrüs ve postpartum 10. günler arasındaki, postpartum 15. gün ile diöstrüs arasındaki farklılıkların önemli olduğu tespit edildi ($P<0.05$) (Grafik 4.12).



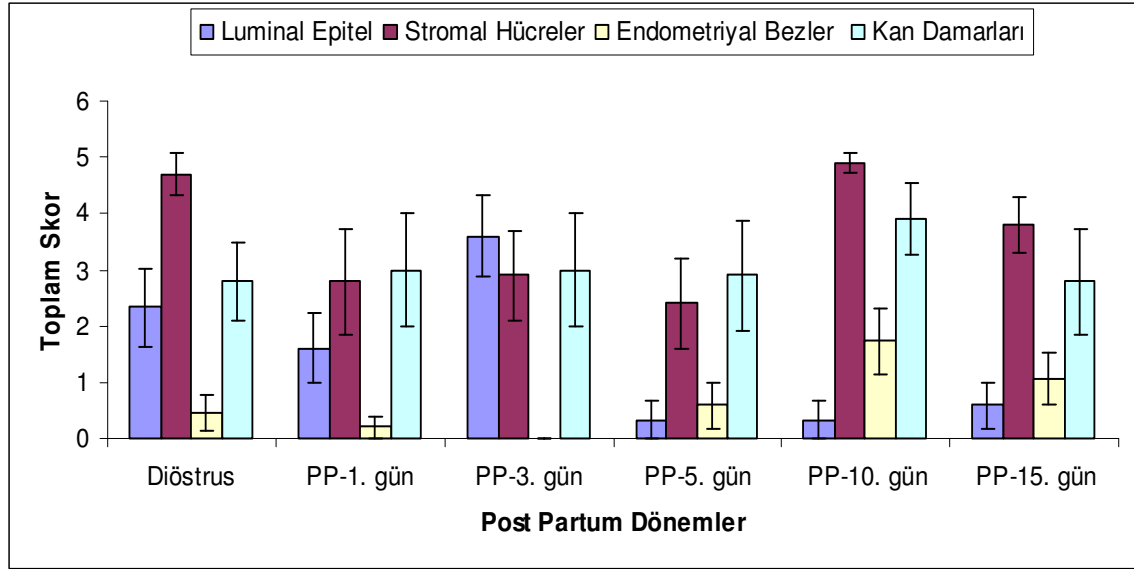
Grafik 4.12. Sıçan uterusunda β -defensin 2 immunreaksiyonunun toplam skoru



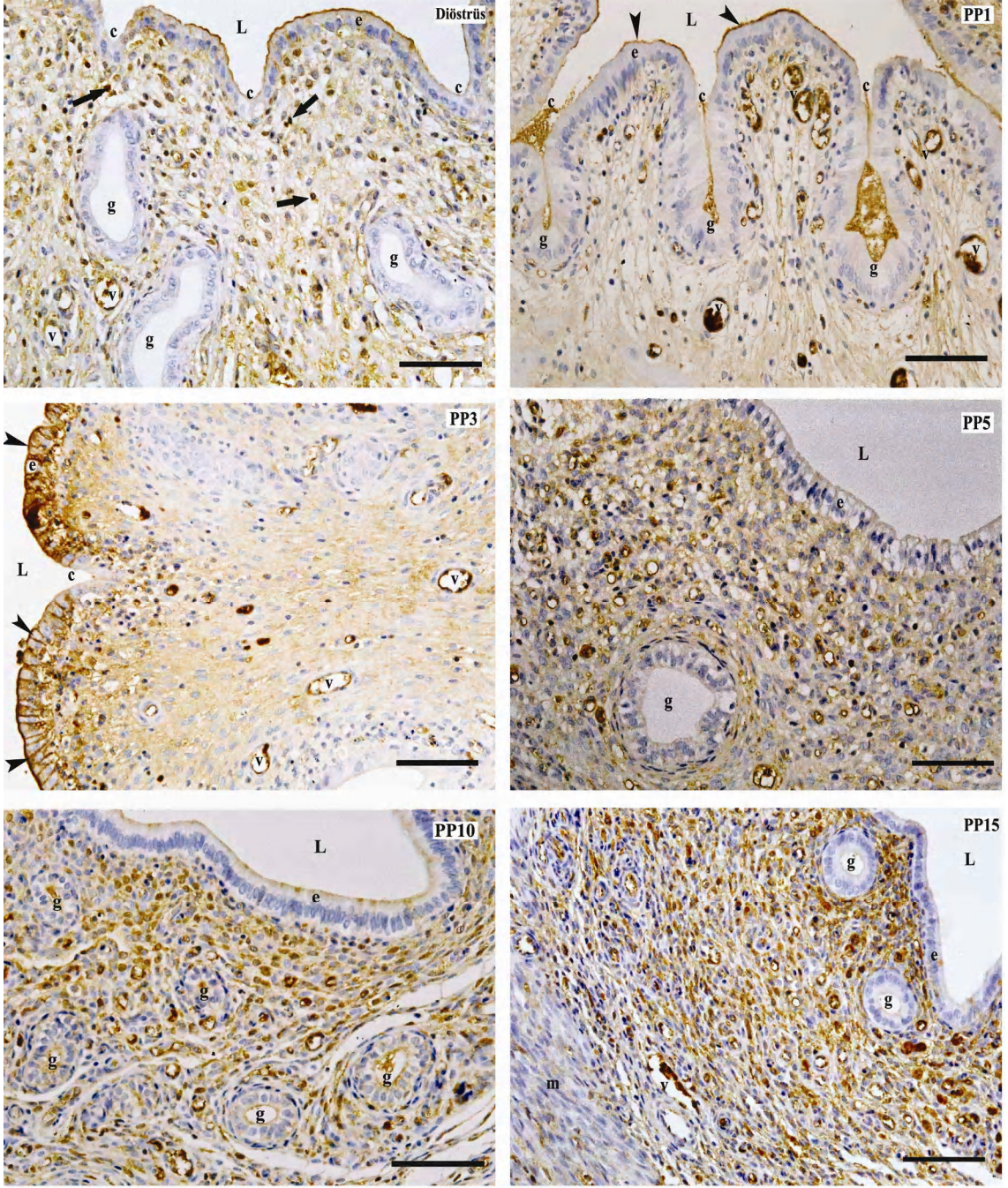
Şekil 4.26. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 2 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, ok başı: β -defensin 2 pozitif apikal membran, kalın ok: β -defensin 2 pozitif stromal hücreler, ince ok: Hemosiderin yüklü makrofajlar, Bar: 100 μ m.

4.2.13. β -defensin 3 ve β -defensin 4

β -defensin 3 ve β -defensin 4'ün uterus dokusunda oluşturduğu immun reaksiyon birbiri ile benzerlik göstermekteydi. Luminal epitelin, kript epitelinin ve bez epitelinin sitoplazma ve çekirdeğinde negatif reaksiyon saptanırken, sadece luminal epitelin ve kript epitelinin apikal membranında pozitif immunreaksiyon tespit edildi. Postpartum 1. ve 3. günlerde luminal epitelin lateral membranlarında da β -defensin 3 ve β -defensin 4 için reaksiyon pozitifliği. Postpartum 1. günde lamina propriyada ve stratum vaskulare ekstrasellüler matriksinde, diğer postpartum günlerde ise stromal hücrelerin sitoplazmasında kuvvetli pozitif immunreaksiyon saptandı. Her iki antikor için miyometriyumda, damarların media katmanında, endotel ve mezotel hücrelerin çekirdeğindeki immunreaksiyonlar negatif olduğu halde, endotel ve mezotel hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli pozitif immunreaksiyon saptandı. Mast hücrelerinde ve miyoepitel hücrelerinde de β -defensin 3 ve β -defensin 4 pozitif immunreaksiyonu pozitifliği (Şekil 4.27, Şekil 4.28).

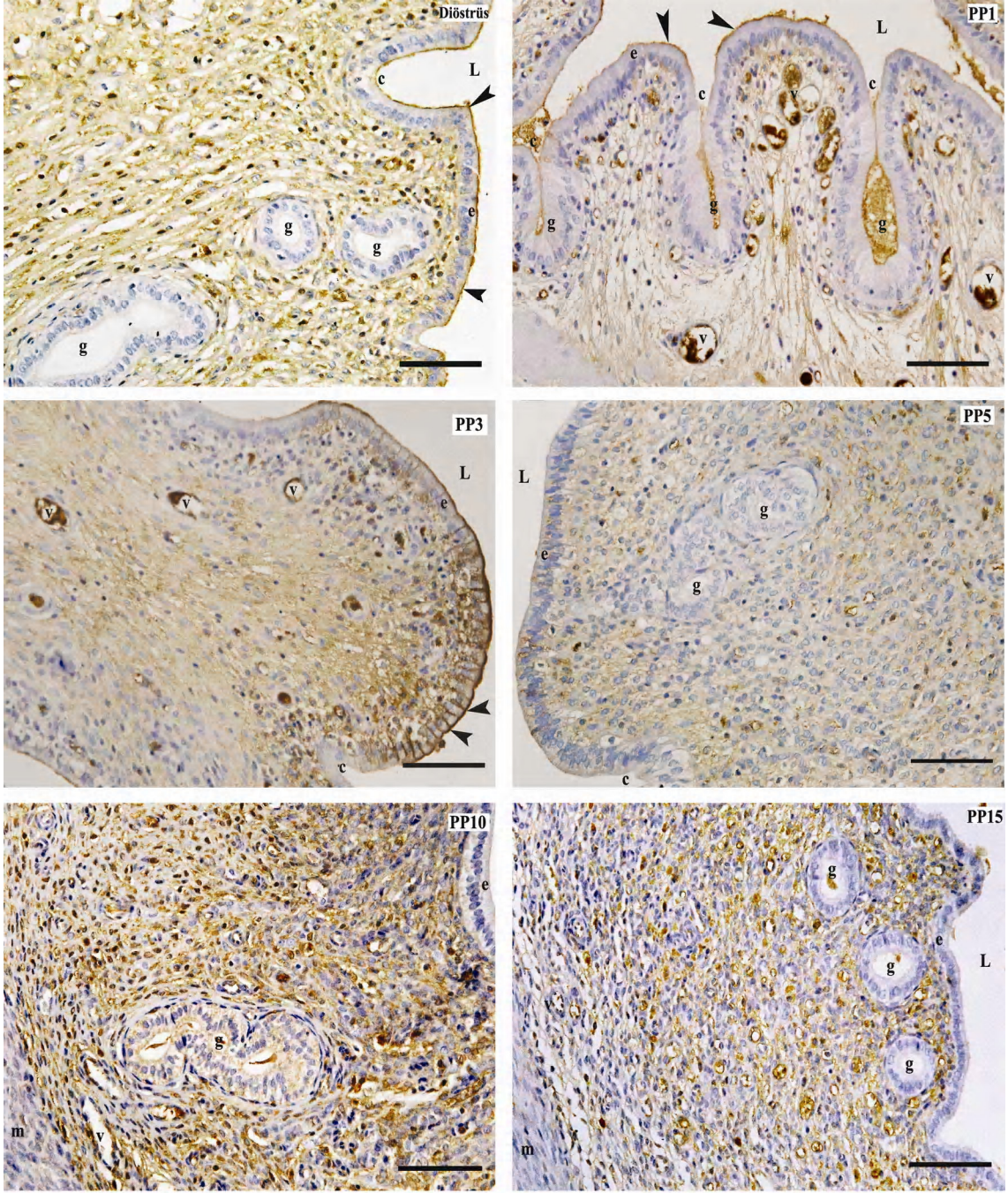


Grafik 4.13. Sıçan uterusunda β -defensin 3 immunreaksiyonunun toplam skoru



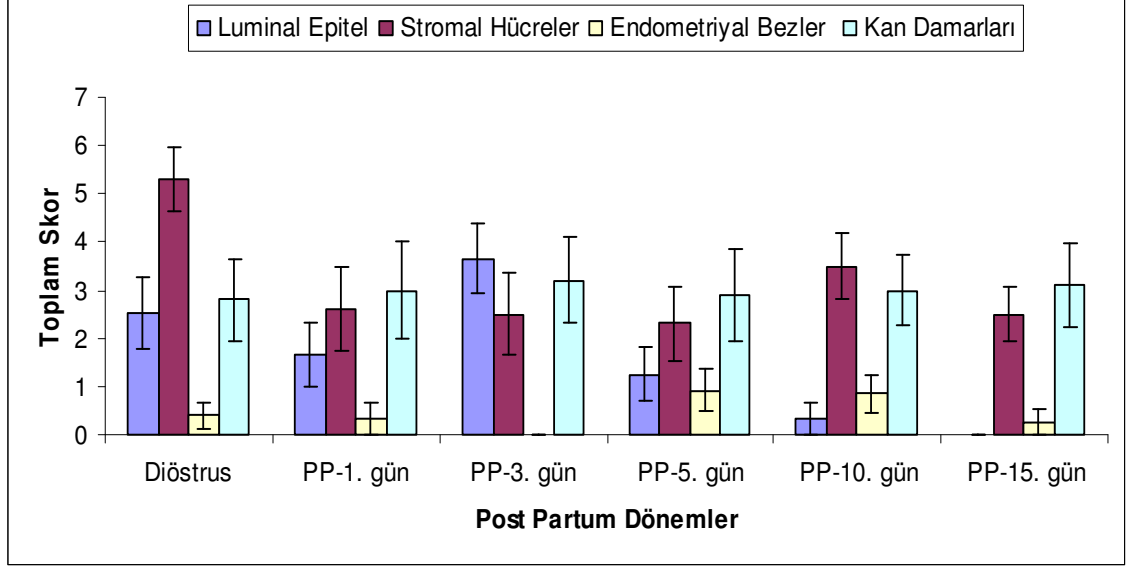
Şekil 4.27. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 3 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kripta, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: β -defensin 3 pozitif apikal ve lateral membran, kalın ok: β -defensin 3 pozitif stromal hücreler, Bar: 100 μ m.

Luminal epiteldeki β -defensin 3 immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında postpartum 3. gün ile postpartum 5., 10., 15. günler arasındaki farklılıkların önem taşıdığı ($P < 0.05$), ancak stromal hücrelerde, bezlerde ve damarlardaki immunoreaktivitenin dönemlere göre anlamlı ölçüde değişmediği belirlendi ($P > 0.05$) (Grafik 4.13).



Şekil 4.28. Diöstrüs, postpartum 1. (PP1), 3. (PP3), 5. (PP5), 10. (PP10) ve 15. günlerde (PP15) sıçan uterusunda β -defensin 4 immunoreaktivitesi. L: lumen, c: kript, e: epitel, g: endometriyal bez, v: kan damarı, m: miyometriyum, ok başı: β -defensin 4 pozitif apikal ve lateral membran, Bar: 100 μ m.

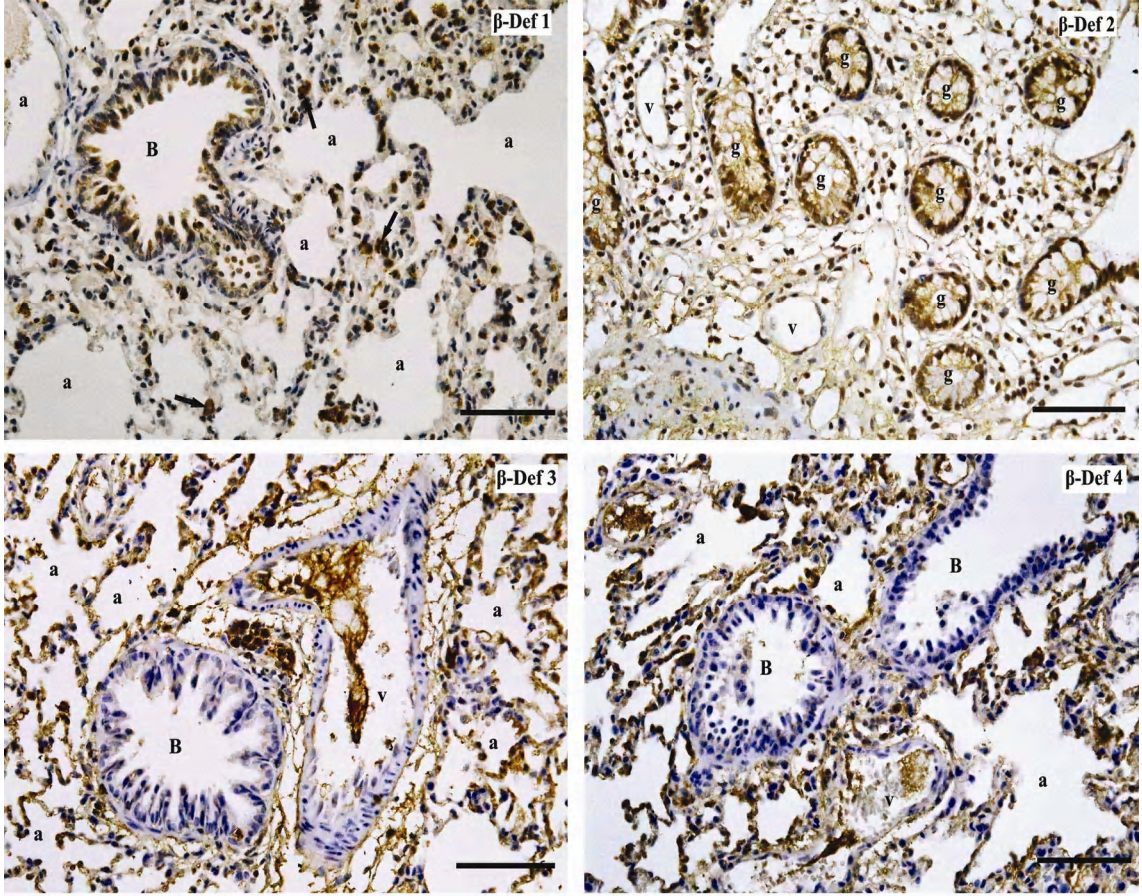
β -defensin 4 immunoreaktivitesi endometriyal bezlerde ve damarlarda dönemlere göre anlamlı ölçüde değişmezken, luminal epiteldeki reaktivitenin postpartum 3. gün ile postpartum 5., 10. ve 15. günler arasında önemli oranda farklı olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Stromal hücrelerde diöstrüsdeki β -defensin 4 immunoreaktivitesinin postpartum dönemin tüm günlerinden farklı olduğu saptandı ($P<0.05$) (Grafik 4.14).



Grafik 4.14. Sıçan uterusunda β -defensin 4 immunreaksiyonunun toplam skoru

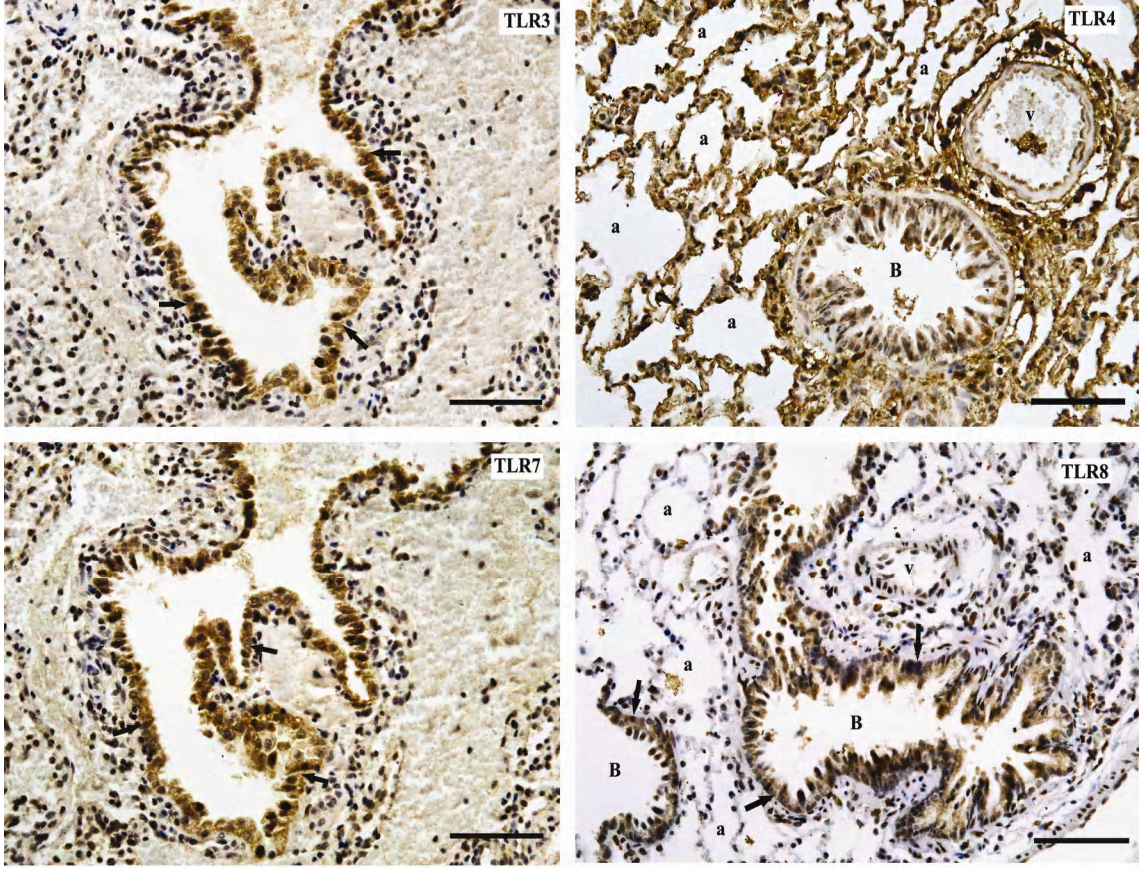
Tablo 4.1. Epitel, kript, stroma ve miyometriyum kalınlıklarının istatistiksel değerlendirilmesi

Postpartum Günler	Epitel	Kript	Stroma	Miyometriyum
	Median (Min-Max) (μm)	Median (Min-Max) (μm)	Median (Min-Max) (μm)	Median (Min-Max) (μm)
1.GÜN	30 (15-42,5)	35 (27,5-52,5)	-----	810 (520-1300)
3.GÜN	27,5 (15-35)	25 (15-35)	630 (260-800)	810 (550-1200)
5.GÜN	27,5 (20-50)	27,5 (17,5-62,5)	550 (370-700)	480 (270-660)
10.GÜN	22,5 (15-37,5)	-----	470 (290-630)	490 (300-650)
15.GÜN	25 (12,5-37,5)	-----	350 (250-450)	400 (300-550)

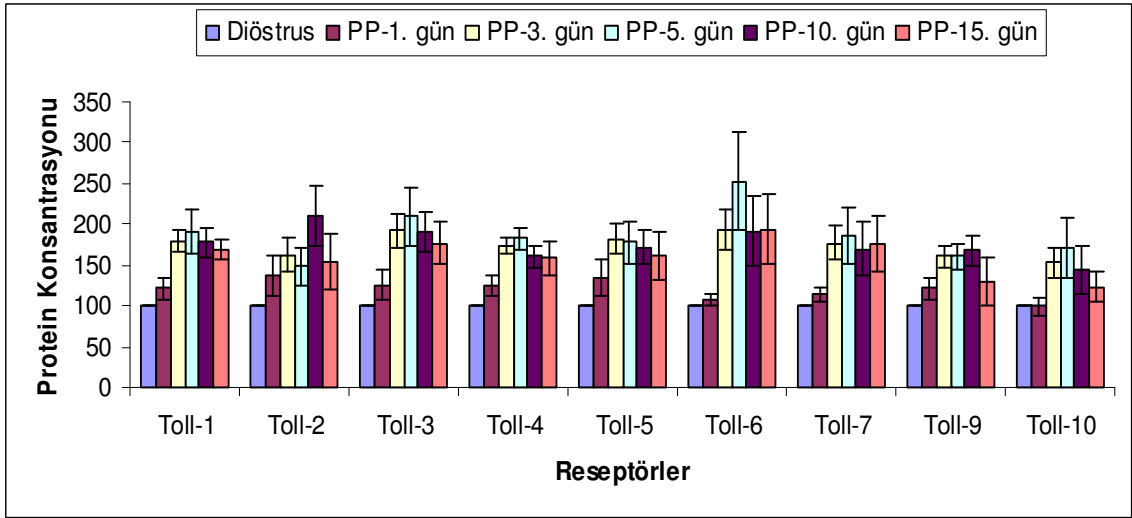


Şekil 4.29. Pozitif kontrol olarak kullanılan insan bağırsağı ve sıçan akciğerinde β -defensin 1, β -defensin 2, β -defensin 3 ve β -defensin 4 immunoreaktivitesi. B: bronşçuk, a: alveol, v: kan damarı, kalın ok: β -defensin 1 pozitif hücreler, Bar: 100 μ m.

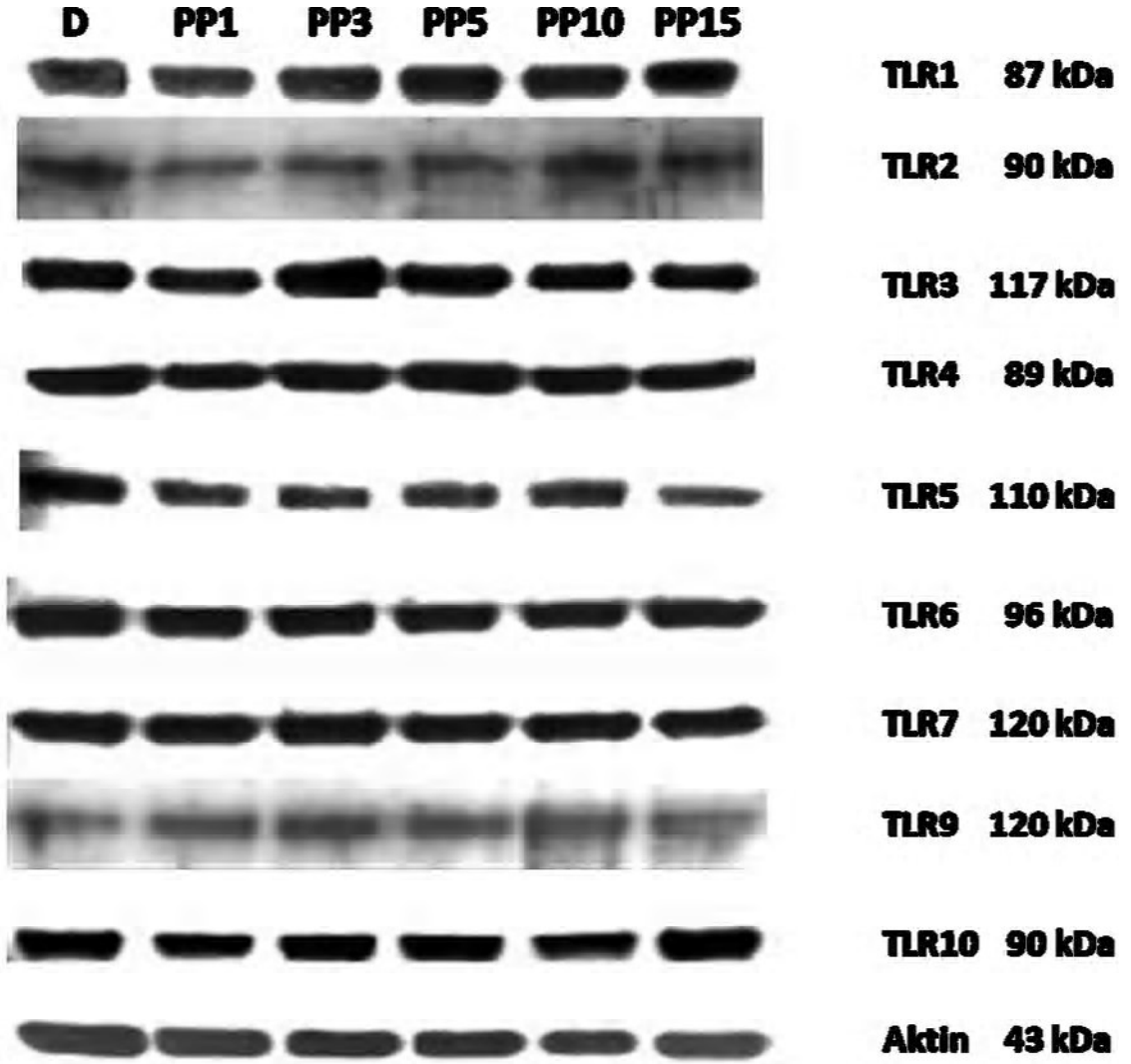
β -defensin 3 ve β -defensin 4'ün pozitif kontrolü olarak kullanılan sıçan akciğerinde de bronş ve bronşçuk epitellerinde boyanma negatifti (Şekil 4.29).



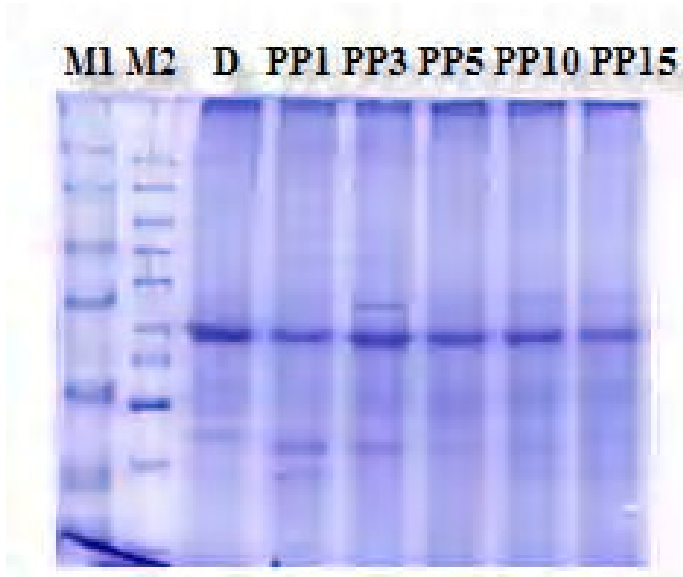
Şekil 4.30. Pozitif kontrol olarak kullanılan insan plasentas ve sıçan akciğerinde TLR3, TLR4, TLR7 ve TLR8 immunoreaktivitesi. B: bronşçuk, a: alveol, v: kan damarı, kalın ok: TLR3, TLR4, TLR7 ve TLR8 pozitif hücreler, Bar: 100 µm.



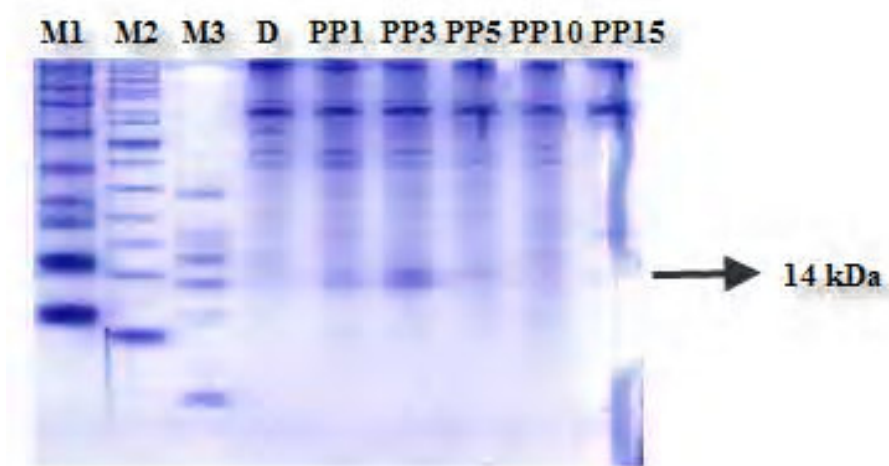
Grafik 4.15. Western blot sonuçlarının kantitatif analizi



Şekil 4.31. Postpartum 1., 3., 5., 10., 15. günlerde ve diöstrüs döneminde sıçan uterusunda western blot analizi ile belirlenen Toll-like reseptörler ve β -aktine ait protein bantları



Şekil 4.32. Western SDS-PAGE Jel, Colloidal Coomassie Brilliant Blue, M1 (Marker, Amersham), M2 (Marker, Fermentas). D: Diöstrüs, PP1: Postpartum 1. gün, PP3: Postpartum 3. gün, PP5: Postpartum 5. gün, PP10: Postpartum 10. gün, PP15: Postpartum 15. gün.



Şekil 4.33. Trisin jel, Colloidal Coomassie Brilliant Blue. M1 (Marker, Amersham), M2 (Marker, Fermentas), M3 (Marker, Amresco), D: Diöstrüs, PP1: Postpartum 1. gün, PP3: Postpartum 3. gün, PP5: Postpartum 5. gün, PP10: Postpartum 10. gün, PP15: Postpartum 15. gün.

Tablo 4.2. Postpartum dönemde sıçan uterusunda bulunan TLR'inin western blot analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Postpartum Günler	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR9	TLR10
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)
1.GÜN	130,17 (80,36- 158,61)	169,15 (57,76- 181,24)	117,95 (87,43- 191,55)	133,30 (93,02- 149,33)	117,46 (89,83- 220,67)	106,66 (92,82- 133,52)	111,11 (91,89- 138,76)	104,04 (103,68- 168,47)	93,47 (78,90- 142,08)
3.GÜN	160,38 (156,41- 215,24)	150,88 (103,91- 228,31)	199,43 (129,17- 250,48)	165,59 (149,58- 208,24)	184,72 (138,23- 240,16)	180,85 (145,91- 287,95)	206,14 (117,79- 216,74)	166,16 (119,83- 195,32)	172,41 (89,61- 193,86)
5.GÜN	197,40 (132,20- 281,42)	136,34 (99,15- 230,00)	197,37 (112,87- 317,52)	188,28 (139,32- 218,55)	156,32 (126,83- 264,57)	247,32 (119,86- 469,41)	134,15 (124,60- 278,20)	160,28 (107,88- 203,16)	163,65 (84,89- 273,39)
10.GÜN	193,02 (105,23- 213,13)	196,26 (106,21- 304,00)	210,54 (99,53- 239,44)	144,22 (143,15- 210,19)	150,46 (119,40- 220,64)	201,43 (100,23- 296,17)	125,42 (106,46- 260,33)	177,63 (107,76- 224,67)	153,00 (66,09- 221,67)
15.GÜN	164,02 (132,58- 209,82)	145,13 (50,73- 239,14)	180,65 (93,87- 257,90)	137,34 (119,65- 234,84)	147,77 (90,91- 251,29)	224,79 (93,64- 312,94)	150,64 (106,04- 270,92)	119,85 (61,98- 206,03)	111,83 (71,00- 171,30)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnvölüsyon bir yara iyileşmesine benzer şekilde doku kaybı ve doku rejenerasyonu olmak üzere iki aşamada gerçekleşen kompleks bir biyolojik olgudur. Bu olgu hem endometriyumdaki hem de miyometriyumdaki hücresel değişiklikleri içine alır (4, 241, 242). Sıçanlarda postpartum dönemde uterus epitelinin yeniden şekillenmesinin (re-epitelizasyonu) 36 saatte gerçekleştiği ve bu hızlı rejenerasyonun erken postpartum östrusdan kaynaklandığı bildirilmektedir (43). Sunulan çalışmada postpartum 1. gündeki sıçan uterusunda lumene doğru farklı şekil ve büyüklükte kıvrımlar oluşturduğu gözlenen mukozanın bir epitle örtülü olduğu saptanmış olup bu bulgu epitelin varlığını göstermekte ancak epitelizasyonun tamamlandığı (43, 52) bilgisini desteklememektedir. Çünkü bu çalışmada ayrıca postpartum 1. günde epitelin boyanma nitelikleri ile yapısal özellikleri farklı olan hücrelerden oluştuğu ve intraepiteliyal kapillar damarlar içerdiği, postpartum 3. günde intraepiteliyal kapillarların kaybolduğu ve 5. günde ise epitelin tek tip prizmatik hücrelerden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca postpartum günler arasında epitel yükseklikleri karşılaştırıldığında postpartum 1. gündeki ve 5. gündeki epitel yüksekliklerinin postpartum 10. ve 15. günlerdekinden farklı olduğu ($P<0.01$) diğer farklılıkların ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($P>0,01$).

Tablo 4.1'de görüldüğü üzere luminal epitel yükseklikleri özellikle postpartum süreçte giderek azalmaktadır. Nitekim Takamoto ve ark (1998) sıçanlarda postpartum üçüncü günde luminal epitel hücrelerinin postpartum 1. günde kiyasla daha küçük olduğunu

(8) belirtmektedirler. Tüm bulgulara dayanarak epitelin rejenerasyon ve farklılaşma sürecinin 10. güne kadar devam ettiği görüşünü ileri sürebiliriz.

Bu çalışmada, ayrıca postpartum periyodun 3. gününde kriptlerin derinliklerinin azaldığı, lamina propriyanın hücre yoğunluğunun arttığı, 5. gününde uterus lumeninin daralarak T şeklini aldığı, epitelin aynı tipteki prizmatik hücrelerden oluştuğu, 10. ve 15. günlerinde ise kriptlerin tamamen kaybolduğu, yüzey epitelinin ise yüksek prizmatik özellik kazandığı gözlenmiş olup, bu bulgularımız sıçan uterusunun involüsyonu sırasında endometriyumdaki yapısal değişiklikleri tanımlayan çalışmalardaki bilgilerle (43, 52) paralellik göstermektedir. Çalışmamızda kriptler postpartum 10. ve 15. günlerde kaybolduğundan, kript yükseklikleri sadece postpartum 1., 3., ve 5. günlerde ölçülmüş ve bu gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Bu çalışmada kriptlerin 5. günde varlığını devam ettirdiği halde postpartum 10. günde bulunmadığının gözlenmesi de uterus involüsyonunun postpartum 10. günde çoktan tamamlanmış olduğunun delilidir.

Takamoto ve ark (1998) sıçanlarda postpartum 3. günde endometriyumun 1. gündekinden daha kalın olduğunu (8), Elkhalil ve ark. (2005) ise postpartum 1. günde sıçan uterusunun endometriyal tabakasının kalınlığının diöstrüs döneminden farklı olmadığını ve postpartum 3. günden 25. güne kadar arttığını bildirmektedirler (52). Sunulan çalışmada postpartum 1. günde mukozanın lumene yapmış olduğu düzensiz kıvrımlardan dolayı stroma kalınlığının ölçümünün pek sağlıklı olamayacağı düşünüldüğünden stroma kalınlığı ölçülmemiştir. Bu nedenle diğer postpartum günler arasında stroma kalınlıkları karşılaştırılmış postpartum 3. gün ile 5. gün arasındaki farklılığın önemsiz olduğu ($P>0,01$), ancak diğer farklılıkların anlamlı olduğu ($P<0,01$) belirlenmiştir. Bu bulgu literatür bilgiyle tamamen çelişmektedir. Tablo 4.1'de görüldüğü üzere postpartum 10. ve 15. günlerde stroma kalınlığında önemli bir azalma dikkati çekmektedir. Postpartum 1. günde stroma ödemli olup az sayıda hücre içerirken, postpartum dönemin diğer günlerinde stromadaki ödemin azalmasıyla ters orantılı olarak stromal hücrelerde bir artış söz konusudur. Bu nedenle involüsyon sürecinde stroma kalınlığının azaldığının ancak içerdiği hücre miktarının arttığının ileri sürülmesi daha uygun olacaktır.

İnvolüsyon sürecinde uterusda görülen yapısal değişikliklerle ilgili çalışmalar inekler (10, 40, 243) ve kısraklar (244, 245) üzerinde odaklanmıştır. Fakat sıçanlarda uterus involüsyonu ile ilgili sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Bunlardan rutin histolojik

tekniklerini kullanarak sıçanlarda postpartum 6. güne kadar olan dönemde sadece endometriyumdaki değişikleri inceleyen Kanter ve Koç (1997) uterus mukozasının involüsyonunun postpartum 5. veya 6. günlerde tamamlandığını ileri sürmektedirler (246). Uterus involüsyonunun sadece endometriyumu kapsamadığı, bunun yanısıra miyometriyumun çeşitli intrasellular mekanizmalar aracılığıyla değişimler geçirerek involüsyon sürecinde uterus hacminin normal boyutlara ulaşmasında etkin olduğu bilinmektedir (241).

Warbrick (1955) postpartum 5. günde sıçan uterusunda özellikle uterus bezleri ile sirkular kas tabakasına bitişik endometriyumda gruplar halinde pigment içeren hücreler olduğunu bildirirken (43), Elkhalil ve ark. (2005), postpartum 10. günde yine aynı bölgede gözlemledikleri ve eozinofilik hücreler olarak adlandırdıkları bu hücrelerin postpartum 15. ve 20. günlerde miktarlarının arttığını belirtmektedirler (52). Bizim çalışmamızda da Croosman'ın üçlü boyamasında (234) postpartum 3. günde birkaç adet, 5. günde ise bez grupları etrafında stromada altın sarısı renkte boyanan ve değişik büyüklükte granüller içeren hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.7).

Fare (247), inek (40), kısrak (248) ve köpeklerde (249) uterus mukozasında siderofaj (hemosiderin yüklü makrofaj) adı verilen hücrelerin bulunduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmamızda gözlemlediğimiz bu granüllü hücrelerin siderofajlar olabileceği fikrinden yola çıkarak Perl's Prussian Blue metodu (235) uygulanmış ve mavi renkte reaksiyon veren irili ufaklı granüller içerdiği gözlenen bu hücrelerin siderofajlar olduğu kesin olarak belirlenmiştir (250). Önceki çalışmalarda belirtildiği şekilde (43, 52) miyometriyuma bitişik endometriyal stroma bölgesinde gruplar halinde bulunduğu gözlenen bu hücrelerin miktarının postpartum 5. günden itibaren giderek arttığı tespit edilmiştir. Siderofajların eritrositleri fagosite eden makrofajlar olduğu ve 36-72 saatte hemoglobini hemosiderine dönüştürdükleri bilindiğinden (251-253), bu çalışmada sıçan uterusunda siderofajların sayılarının postpartum süreçle doğru orantılı olarak arttığının gözlenmesi, bu hücrelerin diğer stromal hücreler ile birlikte uterusun temizlenme sürecinde görev aldıklarını düşündürmüştür.

Sunulan çalışmada sıçan uterusunda mukozadaki değişikliklerin yanı sıra miyometriyumdaki değişiklikler de kantitatif olarak değerlendirilmiş olup Tablo 4.1'de görüldüğü üzere miyometriyum kalınlığının postpartum günün ilerlemesiyle azaldığı belirlenmiştir. Miyometriyum kalınlıkları karşılaştırıldığında ise postpartum 1. gün ile 3. gün ve postpartum 5. gün ile 10. gün arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu

($P>0,01$) ancak diğer farklılıkların istatistiksel açıdan önem taşıdığı tespit edilmiştir. Bu bulgularımız involüsyon sürecinde miyometriyal değişikliklerin olduğu bilgisini (241, 242) desteklemektedir.

Endometriyumun anahtar rolü fertilizasyon, implantasyon ve gebelik gibi olayları düzenlemektir. Aynı zamanda doğumdan sonra dışı genital sisteme ulaşan bakterilere karşı savunmada temel bir mukozal bariyer görevi görür. Uterus enfeksiyonlarının engellenmesi başarılı bir üreme için gereklidir. Endometriyal hücreler bariyer fonksiyonlarının yanısıra sığırdaki, insanda ve kemiricilerde bildirildiği (29, 91, 92) üzere reproduktif sistemin doğal immun savunmasında da önemli bir role sahiptirler. Endometriyumun bakterilere karşı ilk savunması Toll-like reseptörlerini, antimikrobiyal peptidleri ve akut faz proteinlerini içine alan bir doğal immun sisteme bağlıdır (72, 250).

Toll-like reseptörleri bakteri, virus ve mantar gibi mikrobiyal patojenlerde bulunan spesifik moleküler yapıları tanıyan (Pathogen associated molecular pattern, PAMP), invaze olan mikroorganizmaları yok etmek için yangısal, antiviral immun yanıtı başlatan ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını sağlayan transmembran proteinleridir (254). PAMP'lar çeşitli bakterilerde hücre duvarının bileşeni olan lipopolisakkarid (LPS), peptidoglikan (PDG) ve lipopeptidleri, bakteri flagellumundaki filamentleri şekillendiren bir protein olan flagellini, bakteriyel DNA'yı, çift zincirli viral RNA'yı ihtiva eder. PAMP'lar tarafından TLR'nin stimülasyonu TLR sinyalizasyonunu başlatır (104).

Günümüze kadar insanlarda 11 (TLR1-11), farelerde 12 adet (TLR1-9, TLR11, TLR12 ve TLR10'un homoloğu olarak TLR13) TLR tanımlanmıştır (85, 255). Bu reseptörler koyun hariç, tavuk, domuz, sığır, kedi ve köpek gibi çeşitli türlerde de klonlanmamıştır (77, 92). TLR homodimerler veya heterodimerler (TLR2 + TLR1 veya TLR2 + TLR6) olarak eksprese olurlar ve farklı mikrobiyel uyarınları tanırlar. TLR1, TLR2 ve TLR6 lipoteikoik asit (lipoteichoic acid, LTA) gibi bakteriyel lipidleri tanırlarken (256), TLR3 virus kökenli çift zincirli RNA'yı tanırlar (257). TLR4, *E. coli* gibi Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkaridlerini (LPS) tanırlar (258). TLR5, flagelline bağlanır (112). TLR7 ve TLR8 küçük sentetik antiviral molekülleri tanırlar (259) ve tek zincirli RNA'nın ligandıdır (116). TLR9 bakteri genomunda bulunan metilasyona uğramamış tek zincirli CpG-DNA'ya yanıt için gereklidir (260) TLR10'un ligandı hala

bilinmemektedir. TLR11 üropatojenik *E. coli*'yi (126) ve *Toxoplasma gondii*'nin bir proteini olan profilin-benzeri bir proteini (261) tanır.

İnsanda TLR'nin dentritik hücreler, makrofajlar, doğal katil hücreleri (NK hücreleri), mast hücreleri, nötrofil granülositler, B ve T lenfositler gibi immun sistem hücreleri ile fibroblastlar ve epitel hücreleri tarafından eksprese edildiği bilinmektedir (262).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, dişi genital sistemde TLR tiplerinin organlara göre farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. İnsanlarda ovidukt, endometriyum, endoserviks, ektoserviks, vagina epitel hücrelerinde TLR1 (263), TLR2 (143), TLR3 (263), TLR4 (142, 264), TLR5 (263), TLR6 (263), TLR7 (91), TLR8 (91) ve TLR9'un (265) eksprese olduğu bilinmektedir. Aflatoonian ve ark (2007) insanda endometrial dokuda TLR1-10 eksprese edildiğini bildirdiği halde (146), Schaefer ve ark (2004) insan endometriyal epitel hücre kültüründe TLR1-9'un eksprese edildiğini, aksine TLR10'un eksprese edilmediğini rapor etmektedirler (91). Bununla birlikte, Fazeli ve ark (2005) TLR4'ün sadece endoserviks, endometriyum ve tuba uterinada eksprese olduğunu, ancak vagina ve ektoservikste bulunmadığını ifade etmektedirler (142). Pioli ve ark (2004) ise TLR2 ve TLR4'ün, dişi genital sistemin farklı bölümlerinde farklı miktarlarda gözlemlendiğini, örneğin serviks ve vaginada en yüksek miktarda iken tuba uterinada en düşük miktarda eksprese olduğunu belirtmektedirler (143).

Endometriyumun seksüel siklus boyunca cinsiyet hormonlarının etkisi altında olduğu ve bu hormonlarının sadece endometriyumun anatomik ve histolojik özelliklerini düzenlemekle kalmayıp, aynı zamanda endometriyumda immunolojik olayları (immun hücrelerin lokalizasyonunu ve akışı gibi) düzenlediği belirtilmektedir (266-268). Östrojen hormonunun siklusun proliferatif fazında, progesteron hormon seviyesinin ise sekretorik fazda daha yüksek olduğu bilinmektedir (146). Endometriyumda bulunan TLR'in ekspresyon seviyelerinin siklusa göre farklılık gösterdiği bu durumun endometriyumda TLR moleküllerinin ekspresyonu üzerinde östrojenin inhibitör etkisinden ya da progesteronun destekleyici etkisinden kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (146). İnsanlarda TLR2-6, 9, 10'un ekspresyonlarının menstrüal siklusun sekretorik fazında en yüksek seviyelerde olduğu, TLR1-7, 9 ve 10'un ise menstrüal siklus süresince bulunduğu ifade edilmektedir (146, 269). Jorgenson ve ark. (2005) primer endometriyal epitel hücrelerinde TLR3 ekspresyonunun siklusa bağlı olarak değiştiğini ifade etmektedirler (31).

TLR'nin dişi genital sistemdeki lokalizasyon ve ekspresyonlarına ilişkin olarak insan, sığır ve farede yapılan çalışmalar incelendiğinde bu çalışmaların seksüel siklus ile gebelik dönemine odaklandıkları görülmektedir (30-33, 77, 140, 142, 151, 270). Postpartum involüsyon döneminde sağlıklı uterus dokusunda TLR'nin lokalizasyonları ve ekspresyonlarına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte sığırlarda postpartum periyotlarda sağlıklı (fertil), metritis, klinik endometritis ve subklinik endometritisli infertil sığırlarda TLR1-10'un incelendiği bir çalışmada doğum ve postpartum 1. haftaya kadar olan postpartum süreç I. Periyod, postpartum 3., 5. ve 7. haftaları içine alan süreç ise II. periyod olarak ayrılmıştır. Çalışmada her iki gruptaki sığırlarda birinci periyotta endometriyumda TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9, TLR10'un eksprese olduğu ve TLR2 ile TLR10'un infertil hayvanlarda fertil hayvanlardakinden daha yüksek düzeylerde bulunduğu bildirilmektedir. Ayrıca TLR2 ekspresyon düzeyinin infertil sığırlarda I. ve II. periyotlar arasında azaldığını, II periyotta fertil ve infertil sığırlarda TLR'nin (TLR1-10) benzer düzeylerde eksprese olduğu ifade edilmektedir. Bunların yanı sıra I. periyotta TLR4 ekspresyonunun infertil hayvanlarda fertil hayvanlarınkinden daha yüksek olduğu, infertil sığırlarda TLR4 ekspresyon düzeyinin I. ve II. periyotlar arasında azaldığı halde II. periyotta fertil ve infertil hayvanlar arasında gen ekspresyon açısından önemli bir farklılık bulunmadığı da rapor edilmektedir (271). Sunulan çalışmada fertil sığırlarda bildirilenlere (271) benzer olarak postpartum 1., 3., 5., 10., 15. günlerdeki sıçan uterusunda TLR1-10'un eksprese olduğu immunohistokimyasal olarak ve western blot analizi ile belirlenmiş olup sağlıklı olarak gelişen postpartum süreçteki Toll-like reseptörlerinin (TLR1-10) varlığını gösteren ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Tez çalışmamda gebeliğin şekillendiği ve sonlandığı organ olan uterusda postpartum dönemde TLR1-10'lerinin lokalizasyonları ve ekspresyonları incelenmiş, dişi genital sistemin diğer organları (ovaryum, ovidukt, serviks ve vagina) çalışmaya dahil edilmemiştir. Postpartum süreçteki uterus örneklerinde TLR'nin lokalizasyonları ile ekspresyonları diöstrüs döneminde bulunan sıçan uterusundaki bulgular ile karşılaştırılmıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde diöstrüs dönemi ile postpartum günler arasında TLR ekspresyonu açısından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Postpartum süreçte TLR'nin protein değerlerine bakıldığında TLR1, 3-7 ve 10'un postpartum 5. günde, TLR2 ve 9'un ise postpartum 10. günde diğer dönemlere göre daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Diöstrüs ile postpartum günlerdeki protein değerleri

istatistiksel açıdan kıyaslandığında; TLR1 ve TLR9'un postpartum dönemin 1. günündeki protein değerlerinin diöstrüs döneminden, TLR1, TLR3-7 ve TLR9'un postpartum dönemin 3. ve 5. günlerindeki protein değerlerinin diöstrüs dönemdekilerden farklı olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Aynı zamanda TLR1, TLR4-7, TLR9'un postpartum dönemin 10. günündeki protein değerlerinin diöstrüs dönemdekilerden, TLR1, TLR4, TLR7'nin postpartum dönemin 15. günündeki protein değerlerinin diöstrüs dönemdekilerden farklı olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Bunun dışında postpartum günler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında TLR1, TLR4 ve TLR6'nın postpartum dönemin 1. günde protein değerleri ile postpartum dönemin 3. ve 5. günde protein değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). TLR2 ve TLR10'un protein değerleri açısından diöstrüs dönemi ve postpartum günler arasında herhangi bir önemli farklılık saptanmamıştır ($P>0.05$). Bu sonuçlar seksüel siklusa olduğu gibi (142, 146, 269) postpartum dönemde de uterusda TLR ekspresyonlarının involüsyon sürecine bağlı olarak değişebildiğinin göstergesi olarak yorumlanabilir.

Sığır endometriyumunda endometriyal epitel hücreleri ve stromal hücrelerde Toll-like reseptör ekspresyonunun farklı olduğu, buna göre epitel hücrelerinde TLR1-7 ve 9'un, stromal hücrelerde ise TLR1-4, 6, 7, 9 ve 10'un eksprese olduğu belirtilmektedir (151). Hirata ve ark (2007) TLR2, 3, 4 ve 9'un menstrüal siklus boyunca hem epitel, hem de stromal hücrelerde eksprese olduğunu, ekspresyon düzeyinin TLR3 için epitel hücrelerinde, TLR4 için ise stromal hücrelerde daha yüksek olduğunu bildirmektedirler (270). Hirata ve ark (2007) (270), yanı sıra diğer bazı araştırmacılar da (146, 269) TLR2 ve TLR9 ekspresyonunun endometriyal epitel ve stromal hücrelerde benzer miktarlarda bulunduğu ifade etmektedirler. Sunulan tez çalışmamda, postpartum dönemdeki sıçan uterusunda ise tüm Toll-like reseptörleri hem epitel hücrelerinde hem de stroma hücrelerinde gözlenmiştir. Fakat, immunohistokimyasal boyamalar sonucunda boyanma yoğunluklarında farklılıklar saptanmıştır. TLR4 pozitif immunoreaktivitesinin, endometriyal stroma hücrelerinde endometriyal epitel hücrelerindeki daha yoğun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca postpartum dönemde endometriyal stromada TLR7 immunoreaktivitesinin daha yoğun olduğu, buna karşılık TLR3 immunreaksiyonunun endometriyal epitel hücrelerinde stromal hücrelerdekiden daha baskın olduğu görülmüştür. Elde ettiğim bu bulgular, Hirata ve ark (2007)'nin bildirdiklerine paralellik göstermektedir (270).

İnsanda uterusun endometriyumunda yerleşen NK hücrelerinde TLR1-4, 6, 7, 10'un eksprese olduğu, ancak TLR5, 8 ve 9'un ise bulunmadığı, bu nedenle epitelyal tabakanın yıkımlandığı süreç olan menstrüasyon döneminde PAMP'a karşı cevapta NK hücrelerinin görev aldığı bildirilmektedir (272). Çalışmamda NK hücreleri spesifik olarak belirlenmediğinden bu hücrelerde TLR'nin lokalizasyon ve ekspresyonu incelenmemiştir. Ancak stromal hücrelerin TLR tiplerinin tümüne karşı immunreaktif olduğu immunohistokimyasal olarak tespit edildiğinden, pozitif reaksiyon veren stromal hücrelerden bazılarının NK hücreleri olabileceği düşünülmüştür.

İnsanda, TLR1, 2, 4, 5 ve 6 hücre membranında, TLR3, 7, 8 ve 9 ise hücre içinde endozomların yüzeyinde bulunurlar (273). Gewirtz ve ark (2001) TLR5'in bağırsak epitel hücrelerinin bazolateral yüzeylerinde de eksprese olduğunu bildirmektedirler (274). Aktifleşmemiş immun sistem hücrelerinde TLR9 endoplazmik retikulumda bulunurken, hücrenin aktivasyonu ile endozomlara ve lizozomlara geçer (275, 276). TLR'in endometriyal epitel hücrelerinin apikal membranlarına yerleşmesinin nedeninin mikroorganizmaların PAMP bölgelerinin ilk olarak bu hücrelerin apikal yüzeyleri ile temas etmesi ve dolayısıyla TLR'nin sitokin/şemokin salgılanmasını bu apikal bölümden stimüle etmesi ile ilgili olduğu bilinmektedir (263). Çalışmamda da TLR'inden TLR4, TLR5 ve TLR7 immunreaktivitelerinin özellikle postpartum 1. ve 3. günde lumeni çevreleyen epitel hücrelerinin hem apikal ve hem de lateral membranlarında bulunduğu ve postpartum 5., 10. ve 15. günlerde ise lateral membrandaki immunreaksiyonların gözden kaybolduğu tespit edilmiştir. TLR'inden TLR7'nin hücre içinde bulunması beklenirken (273) hücre membranında lokalize olması oldukça ilginç bir bulgudur. Çalışmamız bulgularına ve Gewirtz ve ark (2001) bildirdiklerine dayanarak (274), sıçan uterusunda postpartum sürecin ilk günlerinde TLR'lerinden TLR4, TLR5 ve TLR7'nin lateral membranlarda da yerleşerek apikal yüzeyden lateral yüzeye doğru invaze olacak olan mikroorganizmaların PAMP'larını tanıyabileceklerini ileri sürülebilir. Ancak bu hipotezimizi doğrulamak için postpartum süreçte bir enfeksiyon sırasında uterusda TLR'nin lokalizasyonlarını araştıran çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu kanısındayım.

TLR1'in damar endotel hücrelerinde, uterusun miyometrial düz kas hücrelerinde ve serviksin stroması içerisindeki düz kas hücrelerinde bulunduğu, TLR2'nin serviks ve vaginanın düz kas hücrelerinde, TLR3'ün vagina ve endoserviks'in stromal fibroblastlarında, TLR4'ün uterus ve serviksin düz kas hücrelerinde, TLR5'in vagina ve

endoserviksin stroması içindeki damar endotel ve düz kas hücrelerinde, TLR6'nın vagina içindeki stromal fibroblastlarda (142), TLR8'in ise endometriyal stromada (146) eksprese olduğu bilinmektedir. Sunulan tez çalışmamda postpartum günlerde ve diöstrüs döneminde yapılan immunohistokimyasal ve western blot analizi sonucunda sıçan uterusunda TLR1-10 reseptörlerinin lumen epiteli dışında, stromal hücreler, bez epiteli, damar endotel hücreleri, miyometrial düz kas hücreleri, mast hücreleri ve mezotel hücrelerde lokalize olduğu tespit edilmiştir.

Dişi genital sistemin epitel hücreleri sadece patojenleri tanıma potansiyeline sahip olmayıp aynı zamanda antimikrobiyal bileşikleri, şemokinleri ve sitokinleri üreterek enfeksiyonlara cevap verebilme yeteneğine de sahiptirler. Bu antimikrobiyal bileşikler arasında bakteri, virus ve mantarlara karşı geniş spektrumlu aktivite gösteren bir grup katyonik peptid olan defensinler gelir. α -, β - ve θ -defensinler olmak üzere üç temel defensin alt ailesi bulunmaktadır (176). İnsanda α -defensinler nötrofil granülositlerde HNP1-4 ve epitelial yüzeylerde HD 5 ve 6 bulunurken, β -defensinler ise genel olarak epitelial yüzeylerde baskındırlar ve enfeksiyona karşı mukozayı korumak için bir bariyer görevi görürler (277). Şimdiye kadar insanlarda 6 defensin geninin identifiye edildiği (278-283), bunların kalıcı olarak eksprese olanlar ve yangısal veya patojen kaynaklı uyarılar ile indüklenenler olmak üzere alt gruplara ayrıldıkları bildirilmektedir (281, 282, 284-286). Dişi genital sistemin defensinlerin önemli bir üretim yeri olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (32, 178, 184, 190, 193, 194). Ancak söz konusu çalışmalar genellikle seksüel siklus veya menstrüal siklus, implantasyon ve gebelik gibi olgularda bu antimikrobiyel peptidlerin varlığına veya hangi tipinin daha yoğun veya az oranda eksprese olduğuna ilişkindir. Ancak postpartum dönemin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle sunulan araştırma postpartum dönemin 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerinde sıçan uterusunda insan β -defensin 1-4'ün lokalizasyonunun belirlendiği ilk çalışmadır.

Günümüzde molekül ağırlığı 100 kDa üzerinde bulunan proteinler klasik western blot tekniği (Tris-Glycine-SDS-PAGE) ile belirlenebilirken 2.5-50 kDa molekül ağırlığına sahip olan proteinlerin analiz edilebilmeleri için Schagger ve Von Jagow (1987) (237), Schagger (2006) (238) tarafından Tricine-SDS-PAGE tekniği geliştirilmiştir. Bu çalışmada biz de β -defensin 1-4 küçük moleküler ağırlıkta proteinler (3.9-9 kDa) oldukları için bu proteinleri belirlemek amacıyla klasik western blot tekniği yerine Trisin-SDS-PAGE tekniğini uyguladık. Ancak genel olarak western blot tekniğinde

belirtilen şekilde lizis aşamasında uterus dokusunun lizis buffer ile muamelesinden sonra homojenize etmek amacıyla kullandığımız homojenizatör (Heidolph, Silent Crusher M) ile büyük moleküler ağırlıkta proteinler olan Toll-like reseptörleri hücre dışına çıkarabildiğimiz halde küçük moleküler ağırlıkta proteinler olan β -defensinleri hücre dışına çıkarmamız mümkün olamamıştır. Bu işlem, homojenizatör yerine titreşim yaparak ve yüksek ses dalgalarıyla hücre bütünlüğünü bozan sonikatör adını verdiğimiz cihazın kullanılması ile gerçekleşebilmektedir. Dolayısıyla Toll-like reseptörleri klasik western tekniği uygulanarak belirlenebildiği halde olanak yetersizliği nedeniyle sonikatör kullanılmadığı için 14 kDa altındaki küçük proteinler (β -defensin1-4) tespit edilememiştir. Yapılan bu işlemin göstergesi olarak Trisin-SDS-PAGE jel Colloidal Coomassie Blue boyası ile boyanmış ve 14 kDa altındaki proteinlerin olmadığı jel üzerinde gözlenmiştir (Şekil 4.33). Bu nedenle çalışmamızda β -defensinlerin involüsyon döneminde sıçan uterusundaki lokalizasyonları sadece immunohistokimyasal yöntemle ortaya konulmuştur. Aynı şekilde sonikatör kullanılmadığı için büyük moleküler ağırlıkta protein olmasına rağmen çoğunlukla çekirdekte eksprese olduğu immunohistokimyasal olarak belirlenen TLR8 reseptöründe western tekniği ile uterus dokusunda saptanamamıştır.

Dişi genital sistemde β -defensinlerin ekspresyonlarının organlara göre değiştiği bilinmektedir. İnsanlarda β -defensinlerden β -defensin 1-4 genlerinin endometriyumda eksprese olduğu ve β -defensin ekspresyonlarının her birinin farklı stimulasyonlar tarafından düzenlenmekte olduğu ifade edilmektedir (32). Örneğin HBD2 ve HBD3, endometriyumda IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenmektedir (184). Soboll ve ark (2006) farenin uterus ve vagina dokularında α -defensinlerden AD1, 2 ve 5'in, β -defensinlerden ise BD1, 2 ve 4 ve SLPI'nin bulunduğunu belirtmektedirler (233). Normal kadınlarda HBD1'in vagina, serviks, endometriyum, ovidukt ve ovaryumda, HBD2'nin ise vagina ve ovaryum hariç, genital sistemin diğer dokularında eksprese olduğu bildirilmektedir (193). HBD2'nin ayrıca serviko-vaginal sekresyonlarda da bulunduğu ve in vitro ortamda vaginal keratinositler tarafından eksprese edildiği belirtilmekte ve HBD1 ile 2'nin insanda genital kanalın savunma mekanizmalarında önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (194). Tez çalışmamda, insan β -defensinlerinden β -defensin 1-4'ün hem diöstrüs dönemindeki sıçanların uteruslarında, hem de postpartum süreçteki sıçanların uteruslarında buldukları saptanmıştır.

Sunulan çalışmada, involüsyon dönemine ait sıçan uterusunda β -defensin 1 ve 2'nin luminal epitel ve bez epitelini oluşturan hücrelerin apikal membranlarında, kript epitelinde ve bazı stromal hücrelerde bulunduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte damar endoteli, mezotel hücreleri, mast hücreleri, miyometriyumdaki kas hücrelerinde her iki antimikrobiyel peptid için pozitif immun reaksiyon gözlenmiştir. Grafik 4.11 ve 4.12'de görüldüğü üzere β -defensin 1 ve β -defensin 2'in bütün postpartum günlerde ve diöstrüs döneminde en yüksek miktarlarda luminal epitelde, daha az oranda da stromal hücrelere yerleştiği, β -defensin 1'in damar endotelindeki immunoreaktivitesinin postpartum 1. günde en yüksek, diöstrüsde ise en düşük değerde olduğu tespit edilmiştir. β defensinlerden HBD1'in asli olarak epitel hücreleri tarafından eksprese edildiği bilinmektedir (287). Das ve ark. (2007) da insan endometriyumunda HBD1'in bir epiteliyal defensin olduğunu ve buna göre ekspresyonunun ana kaynağının luminal epitelden ziyade glandüler epitel olduğunu ve HBD1'in daha az oranda da stromada bulunduğunu ileri sürmektedirler (178). Bu literatür bilgi (178) postpartum dönemde sıçan uterusunda β -defensin 1'in epiteliyal ve stromal hücrelerde lokalize olduğu bulgusu ile paralellik göstermektedir.

İnsanda β -defensin 2 ve 3'ün viruslar gibi farklı uyaranlar tarafından indüklendiği bilinmektedir (287). β -defensin 2'nin, bir şemokin reseptörü olan CCR6 aracılığıyla inflamasyon alanlarına olgunlaşmamış dendritik hücrelerin ve bellek T hücrelerinin toplanmasına yol açtığı ve bu durumun da infeksiyon boyunca adaptif immun sistemin aktivasyonu ile sonuçlandığı ifade edilmektedir (174). Ayrıca β -defensin 2'nin histamin ve prostaglandin D₂'nin serbest kalmasına neden olan sıçan mast hücrelerini aktive ettiği belirtilmektedir (288). Çalışmamızda postpartum süreçte herhangi bir patojenle ilişkili uyarmı olmadığı halde β -defensin 2'nin uterusun tüm yapısal bileşenlerinde lokalize olduğunun belirlenmesi HBD2'nin viruslar gibi farklı uyaranlar tarafından indüklendiği bilgisine tezat teşkil etmektedir. Tüm bu sonuçlar involüsyon döneminde β -defensin 1 ve β -defensin 2'nin uterusun doğal savunmasında antimikrobiyel ekinliklerini uterus epitelinin yanı sıra uterusun diğer tüm yapısal unsurları aracılığıyla da sağladıklarını akla getirmektedir.

İnsanlarda yapılan çalışmalara göre (178, 184, 190) β -defensinlerin ekspresyonları menstrüal sıklusa bağlı olarak da değişmektedir. HBD1 sekretorik fazda maksimum seviyede eksprese edilirken, menstrüasyon boyunca ise HBD2 ekspresyonunda önemli ölçüde bir artış görülmektedir (190). Sunulan tez çalışmamda diöstrüs ve postpartum

dönemlerde luminal epitel, bezler ve stromal hücrelerdeki β -defensin 1 immunoreaktivitesi karşılaştırıldığında dönemler arası farklılık bulunmazken ($P>0.05$), diöstrüsde damarlardaki immunreaksiyonun postpartum 1., 3., 5. günlerdekinden farklı olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). β -defensin 2 immunoreaktivitesi ise luminal epitel ve bezlerde dönemlere göre anlamlı ölçüde değişmezken ($P>0.05$), stromal hücrelerde postpartum 1. gün ile diöstrüs ve postpartum diğer günler arasındaki farklılığın anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Bu bulgular da β -defensin 1 ve 2'nin lokalizasyonları ile miktarlarının postpartum involüsyon sürecinde değiştiğini göstermektedir.

İnsan uterusunda HBD3 ve HBD4'ün endometriyumda bulunduğu, ancak endometriyumun epitel hücrelerinde HBD3 ve HBD4 ekspresyonlarının stromal hücrelere oranla daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (184). Tez çalışmamda ise incelenen tüm gruplarda β -defensin 3 ve β -defensin 4'ün sadece luminal epitelin ve kript epitelinin apikal membranında ancak postpartum 1. ve 3. günlerde luminal epitelin lateral membranlarında da eksprese olduğu tespit edilmiştir. Bazı stromal hücreler, miyometriyum, damarların media katmanı, endotel ve mezotel hücreler, mast hücreler ve miyoepitel hücrelerinde de β -defensin 3 ve β -defensin 4 pozitif immunreaksiyonları gözlenmiştir. Diöstrüs ve postpartum dönemlerde β -defensin 3 immunoreaktiviteleri karşılaştırıldığında uterusun luminal epitelinde postpartum 3. gün ile postpartum 5., 10., 15. günler arasındaki farklılıkların önem taşıdığı ($P<0.05$), ancak stromal hücrelerde, bezlerde ve damarlardaki immunoreaktivitenin dönemlere göre anlamlı ölçüde değişmediği belirlenmiştir ($P>0.05$). β -defensin4 immunoreaktivitesi değerlendirildiğinde ise endometriyal bezlerde ve damarlarda dönemlere göre anlamlı ölçüde değişmezken, luminal epiteldeki reaktivitenin postpartum 3. gün ile postpartum 5., 10. ve 15. günler arasında önemli oranda farklı olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Stromal hücrelerde diöstrüsdeki β -defensin 4 immunoreaktivitesinin postpartum dönemin tüm günlerinden farklı olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). King ve ark (2003) HBD3'ün erken ve geç sekretorik fazda maksimum seviyelerde bulunduğunu, buna karşılık HBD4 ekspresyonunun menstrual siklusun proliferatif fazında en yüksek seviyelerde olduğunu rapor etmektedirler (184). Bu bilgiyle (184) uyumlu olarak tez çalışmamın sonuçları β -defensin 3 ve β -defensin 4'ün sıçan uterusunda postpartum involüsyonun tamamlanmasından önce (postpartum 10. günden önce) epitele lokalize olduğunu, involüsyon tamamlandıktan sonra stromal hücrelere yerleştiğini göstermiştir.

Sonuç olarak tüm bulgular ele alındığında, postpartum dönemin 1., 3., 5., 10. ve 15. günleri ile diöstrüs döneminde bulunan sağlıklı sıçanlarda uterusun postpartum 10. günde diöstrüs dönemindeki uterusla benzer özellik taşıdığı buna göre de involüsyonun postpartum 10. günde tamamlandığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda postpartum 5. günden itibaren stroma içinde miyometriyum tabakasına yakın şekilde ve endometriyal bezler etrafında hemosiderin yüklü makrofajlara rastlanılmış ve makrofajların miktarının postpartum 10. günde artarken, 15. günde biraz azaldığı saptanmıştır. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda postpartum günlerde ve diöstrüs döneminde TLR1-10 ve β -defensin 1-4'ün sıçan uterusunun luminal ve bez epitelinde, bazı stromal hücreler, mast hücreleri, miyometriyum, mezotel hücreleri ve damar endotelinde değişen miktarlarda gözlenmesi bu reseptörlerin involüsyon döneminde olası uterus enfeksiyonlarına karşı savunmada yaygın şekilde görev yaptığını düşündürmektedir. TLR1-7, 9 ve 10 ekspresyonlarının ve β -defensin 1-4 peptidlerinin diöstrüs dönemi ile diğer postpartum günlere göre farklı olması ($p < 0.05$) bu moleküllerin ekspresyonlarının involüsyon sürecine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bu bağlamda involüsyon döneminde uterus dokusunun endometriyal epitel hücrelerinde apoptozis yoluyla gerçekleşen dejenerasyon ve yoğun yıkımlanma dikkate alındığında, bu TLR'in ve β -defensinlerin uterus dokusunun rejenerasyonunun yeniden sağlanmasında ve vasküler permeabiliteyi artırarak immun sistem hücrelerinin uterus dokusuna geçişine aracılık etmek suretiyle patojenlerden kaynaklanacak enfeksiyonlara karşı uterusun korunmasında rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Kiracofe GH. Uterine involution: its role in regulating postpartum intervals. *J Anim Sci* 1980; 51: 16-28.
2. Casida LE, Graves WE, Lauderdale JW, et al. Studies on the postpartum cow *Research Bulletin 270 University of Wisconsin*, 1968, Madison.
3. Harkness RD, Moralee BE. Time course and route of loss of collagen from the rat's uterus during post-partum involution. *J Physiol* 1956; 132: 502-508.
4. Nilsen-Hamilton M, Liu Q, Ryon J, et al. Tissue involution and the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 995: 94-108.
5. Lund LR, Romer J, Thomasset N, et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase independent and dependent pathways. *Development* 1996; 122: 181-193.
6. Schwochau GB, Nath KA, Rosenberg ME. Colusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and non-aggregative properties. *Kidney Int* 1998; 53: 1647-1653.
7. Nawaz S, Lynch MP, Galand P, Gerschenson LE. Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 1987; 127: 51-59.
8. Takamoto N, Leppert PC, Yu SY. Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. *Connect Tissue Res* 1998; 37: 163-175.
9. Elliot L, McMahan KJ, Gier HT, Marion GB. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am J Vet Res* 1968; 29: 77-81.

10. Gier HT, Marion GB. Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am J Vet Res.* 1968; 29: 83-96.
11. Zerbe H, Schneider N, Leibold W, et al. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 2000; 54: 771-786.
12. Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology.* (10th ed), W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1975.
13. Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol* 1991; 62: 761-774.
14. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007-3017.
15. Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 1999; 45: 785-794.
16. Buchanan DL, Setiawan T, Lubahn DB, et al. Tissue compartment specific estrogen receptor-alpha participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology* 1999; 140: 484-491.
17. Sullivan DA, Wira CR. Hormonal regulation of immunoglobulins in the rat uterus: uterine response to a single estradiol treatment. *Endocrinology.* 1984; 114: 650-658.
18. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
19. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol.* 1998; 10: 349-350.
20. Horne A, Stock S, King A. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 2008; 135: 739-749.
21. Alexopoulou L, Hold AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738.
22. Beutler B, Hoebe Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 479-85.
23. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745.
24. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *PNAS* 2004; 101: 5598-5603.

25. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406-17409.
26. Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 333-341.
27. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 2004; 6: 1382-1387.
28. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995.
29. Soboll G, Shen L, Wira CR. Expression of Toll-like receptors (TLR) and responsiveness to TLR agonists by polarized mouse uterine epithelial cells in culture. *Biol Reprod* 2006; 75: 131-139.
30. Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR, et al. Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 2002; 107: 145-151.
31. Jorgenson RL, Lesmeise MJ, Misferldt ML. Human endometrial epithelial cells cyclically express Toll-like receptor-3 (TLR3) and exhibit TLR3- dependent responses to dsRNA. *Hum Immunol* 2005; 66: 469-482.
32. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 116.
33. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296: 298.
34. Banks WJ. *Applied Veterinary Histology*. (3rd ed), Mosby Year Book, United States of America 1993; pp 446-455.
35. Özer A. *Veteriner Özel Histoloji*. (1. Baskı) Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın, Ankara 2008; ss 234-237.
36. Yavru N. *Deney Hayvanları*. (1. Baskı) Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya 1996; ss 189.
37. Zemunik T, Peruzovic M, Capkun V, et al. Reproductive ability of pubertal male and female rats. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 871-877.

38. Gabriel SM, Roncaciona JR, Ruiz NS. Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 619-628.
39. Hashizume K, Ohashi K. Timing of sexual recetivity and the release of gonadotropins during puberty in female rats. *J Reprod Fertil* 1984; 72: 97-91.
40. Okano A, Tomizuka T. Postpartum uterine involution in the cow. *JARQ* 1996; 30: 113-121.
41. Lebas F. Physiologie de la reproduction chez le lapin. Journée AERA-ASFC “La reproduction chez le lapin”, 20 Janvier 1994, 2-11.
42. Slama H, Tainturier D, Chemli J, Zaiem I, Bencharif J. Involution utérine chez les femelles domestiques: étude comparée. *Revue Med Vet* 1999; 150: 779-790.
43. Warbrick JG. Postpartum changes in the uterus of rat. *J Embryol Exp Morph* 1955; 3: 256-264.
44. Kim M, Kitson R, Albertson P, et al. Secreted and membrane-associated matrix metalloproteinases of IL-2-activated NK cells and their inhibitors. *J Immunol* 2000; 164: 5883-5889.
45. Salamonsen LA. Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction* 2003; 125: 301-311.
46. Al-Bassam MA, Thomson RG, O'Donnell L. Normal postpartum involution of the uterus in the dog. *Can J Comp Med* 1981; 45: 217-232.
47. Gray CA, Stewart MD, Johnson GA, Spencer TE. Postpartum uterine involution in sheep: histoarchitecture and changes in endometrial gene expression. *Reproduction* 2003; 125: 185-198.
48. Van WYK LC, van Niekerk CH and Belonje PC. Involution of the postpartum uterus of the ewe. *J S Afr Vet Assoc* 1972; 43: 19-26.
49. Krajnicakova M, Gigankova V, Lenhardt L, Kostecky M, Maracek I. Functional and morphological evaluation of the mucosa of endometrium and oviduct in postpartum goats. *Acta Vet Brno* 2002; 71: 517-522.
50. Zoubida B, Rafik B, Michele T-C, et al. Behavior at birth and anatomo-histological changes studies of uteri and ovaries in the postpartum phase in rabbits. *Eur J Sci Res* 2009; 34: 474-484.

51. Ogawa H, Takahashi M, Takahashi H, Okano A. Histochemical observations during uterine involution in Meishan Pigs. *J Reprod Dev* 2001; 47: 83-89.
52. Elkhailil AO, Maejima Y, Aoyama M, Tanaka H, Sugita S. Morphometric and histochemical study of involution in the rat uterus after parturition. *J Anim Sci* 2005; 76: 313-323.
53. Hamilton WJ. The restoration and regeneration of the epithelium and endometrium of the uterus of cavia postpartum in non-pregnant animals. *Trans Roy Soc Edin* 1933; 57: 593-600.
54. Bull MM. Repair of the placental site in the rabbit. *J Obstet Gynaec* 1949; 56: 799-818.
55. Williams JW. Disappearance of the placental site during the puerperium. *J Am Med Ass* 1931; 97: 523-529.
56. Dano RA. Uterine macrophages in the mouse and their relation to involution. *Am J Anat* 1937; 60: 433-471.
57. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioassays* 1992; 14: 455-463.
58. Woessner JF. Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution. *Lab Biochem* 1962; 83: 304-314.
59. Jurukova Z, Milenkov C. Involvement of smooth muscle cells in collagen degradation in the postpartum uterus. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981; 37: 237-244.
60. Dessouky DA. Myometrial changes in postpartum uterine involution. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 110: 318-329.
61. Halme J, Woessner JF. JR. Effect of progesterone on collagen breakdown and tissue collagenolytic activity in the involuting rat uterus. *J Endocr* 1974; 66: 357-362.
62. Luse S and Huton R. An electron microscopic study of the fate of collagen in the postpartum rat uterus. *Anat Rec* 1964; 148: 308.
63. Schwarz W, Güldner FH. Elektronenmikroskopische untersuchungen des kollagenabbaus im uterus der ratte nach der schwangerschaft. *Z Zellforsch* 1967; 83: 416
64. Parakkal PF. Involvement of macrophages in collagen resorption. *J Cell Biol* 1969; 41: 345-354.
65. Paydkula HA. Cellular mechanisms involved in cyclic stromal renewal of the uterus. III. Cells of the immune response. *Anat Rec* 1975; 184: 49-71.

66. Brandes D, Anton E. An electron microscopic cytochemical study of macrophages during uterine involution. *J Cell Biol* 1969; 41: 450-461.
67. Henell F, Ericsson LE, Galumann H. An electron microscopic study of the post-partum involution of the rat uterus. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 1983; 42: 271-287.
68. Grant RA. Chemical changes in the uterus of the rat during late pregnancy and post-partum involution. The effects of lactation and hormone treatment. *J Reprod Fertil* 1965; 9: 285-299.
69. Grossman CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* 1985; 227: 257-261.
70. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 2002; 57: 61-79.
71. Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 295-306.
72. Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol* 2005; 53: 65-76.
73. Kayisli UA, Mahutte NG, Arici A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 213-22.
74. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod* 1993; 46: 1069-1079.
75. Robertson SA, Mau VJ, Hudson SN, Tremellen KP. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 438-442.
76. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4-9.
77. Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91: 1-12.
78. Wira CR, Fahey JV. The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. *Immunology* 2004; 111: 13-15.
79. Semambo DK, Ayliffe TR, Boyd JS, Talor DJ. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *actinomyces pyogenes*. *Vet Rec* 1991; 129: 12-16.

80. Regassa F, Noakes DE. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. *Vet Rec* 1999; 144: 502-506.
81. Griffin JFT, Hartigan PJ, Nunn WR. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first 7 weeks post-partum. *Theriogenology* 1974; 1: 91-106.
82. Lewis GS. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1, 117.
83. Fahey JV, Schaefer TM, Wira CR. Sex hormone modulation of human uterine epithelial cell immune response. *Integ Comp Biol* 2006; 46: 1082-1087.
84. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 12-19.
85. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14.
86. Zarembka KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J Immunol* 2002; 168: 554-561.
87. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS3011
88. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 791-798.
89. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973.
90. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
91. Schaefer TM, Desouza K, Fahey JV, Beagley KW, Wira CR. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology* 2004; 112: 428-436.
92. Herath S, Fischer DP, Werling D, et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology* 2007; 147: 562-570.
93. Dunne A, O'Neill LA. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3330-3335.

94. Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 2000; 165: 7125-7132.
95. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 81-92.
96. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401: 811-815.
97. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14.
98. Takeda K, Takeuchi O, Akira S. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2002; 8: 459-463.
99. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO* 2000; 19: 3325-3336.
100. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor-2. *J Virol* 2003; 77: 4588-4596.
101. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptor structurally related to *Drosophila* Toll. *PNAS* 1998; 95: 588-593.
102. Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Letters* 2002; 532: 171-176.
103. Sen GC, Sarkar SN. Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth F R* 2005; 16: 1-14.
104. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397.
105. Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-Like receptor 5/Toll-Like receptor 4 complexes. *J Immunol* 2003; 170: 6217-6223.
106. Spitzer JH, Visintin A, Mazzoni A, Kennedy MN, Segal DM. Toll-like receptor 1 inhibits Toll-like receptor 4 signaling in endothelial cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1182-1187.
107. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85: 85-95.

108. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782.
109. Gluck T, Silver J, Epstein M, et al. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* 2001; 6: 351-358.
110. Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2002; 195: 559-570.
111. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9247-9252.
112. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103.
113. Zhang J, Xu K, Ambati B, Yu FS. Toll-like receptor 5-mediated corneal epithelial inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4247-4254.
114. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-110.
115. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology* 2002; 3: 196-200.
116. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-1529.
117. Von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect* 2000; 76: 162-168.
118. Stephenson J. New therapy promising for genital herpes. *J Am Med Assoc* 2001; 285: 2182-218.
119. Philbin VJ, Iqbal M, Boyd Y, et al. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 2005; 114: 507-521.
120. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 5-11.
121. Li X, Qin J. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* 2005; 83: 258-266.

122. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 372-378.
123. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745.
124. Beutler B, Rehli M. Evolution of the TIR, toll and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 1-21.
125. Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, et al. TLR 11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308: 1626-1629.
126. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526.
127. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 2008; 14: 86-92.
128. Higgs R, Cormican P, Cahalane S, et al. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2006; 74: 1692-1698.
129. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
130. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191-202.
131. Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000; 10: 1139-1142.
132. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 38105-38108.
133. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9.
134. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420: 329-333.
135. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4: 1144-1150.
136. Yamamoto M, Sato S, Mori K, et al. Cutting edge: a novel Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169: 6668-6672.

137. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 241-249.
138. Blach-Olszewska Z. Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp* 2005; 53: 245-253.
139. McInturff JE, Modlin RL, Kim J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1-8.
140. Abrahams VM. Toll-like receptors in the cycling female reproductive tract and during pregnancy. *Current Women's Health Reviews* 2005; 1: 35-42.
141. Fichorova RN, Anderson DJ. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Biol Reprod* 1999; 60: 508-514.
142. Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum Reprod* 2005; 20: 1372-1378.
143. Pioli PA, Amiel E, Schaefer TM, et al. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissue of the human female reproductive tract. *Infect Immun* 2004; 72: 5799-5806.
144. Hirata T, Osuga Y, Hirota Y, et al. Evidence for the presence of Toll-like receptor 4 system in the human endometrium. *J Clin Endocr Metab* 2008; 90: 548-556.
145. Andersen JM, Al-Khairy D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: Role of Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod* 2006; 74: 824-831.
146. Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22: 586-593.
147. Eriksson M, Meadows SK, Basu S, et al. TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. *J Immunol* 2006; 176: 6219-6224.
148. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1346-1355.
149. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *Immunol* 2004; 173: 4286-4296.
150. Abrahams VM, Mor G. The role of Toll-like receptors in trophoblast-macrophage interactions. *J Reprod Immunol* 2006; 71: 135-176.
151. Davies D, Meade KG, Herath S, et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 53.

152. Ganz T. Antimicrobial polypeptides. *J Leukocyte Biol* 2004; 75: 34-38.
153. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415: 389-395.
154. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Ag* 2004; 24: 536-547.
155. Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 9-13.
156. Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers (Peptide Sciences)* 2006; 84: 435-458.
157. Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Ag* 2003; 22: 465-478.
158. Brogden KA, de Lucca AJ, Bland J, Elliott S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 412-416.
159. Fales-Williams AJ, Brogden KA, Huffman E, Gallup JM, Ackerman MR. Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. *Vet Pathol* 2002; 39: 706-711.
160. Kalfa VC, Brogden KA. Anionic antimicrobial peptide-lysozyme interactions in innate pulmonary immunity. *Int J Antimicrob Ag* 1999; 13: 47-51.
161. Brogden KA, Ackerman M, Huttner M. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrob Agents CH* 1997; 41: 1615-1617.
162. Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001; 1: 156-164.
163. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003; 254: 197-215.
164. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature* 2005; 3: 238-250.
165. Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 2004; 198: 169-184.
166. Powers J-PS, Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003; 24: 1681-1691.

167. Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 461-469.
168. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 823-831.
169. Smet KD, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1337-1347.
170. Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol* 1997; 34: 343-354.
171. Lehrer R, Ganz T: Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 96-102.
172. Gazit E, Boman A, Boman H, Shai Y. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1995; 34: 11479-11488.
173. Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res* 2000; 49: 73-79.
174. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528.
175. Marissa HB, Bardan A, Nizet V, Gallo RG. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 9-13.
176. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710-720.
177. Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Scroder JM. Differential gene induction of human beta-defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 522-529.
178. Das S, Vince GS, Lewis-Jones I, Bates MD, Gazvani R. The expression of human alpha and beta defensin in the endometrium and their effects on implantation. *J Assit Reprond Genet* 2007; 24: 533-539.
179. Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res* 1999; 45: 785-794.
180. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 41-44.
181. Nguyen TX, Cole AM, Lehrer RI. Evolution of primate θ -defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* 2003; 24: 1647-1654.

182. Fahey JV, Wira CR. Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. *J Infect Dis* 2002; 185:1606-1613.
183. King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Regulation of natural antibiotics expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells. *Mol Hum Reproc* 2002; 8: 341-349.
184. King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4 in human endometrium. *J Repro Immunol* 2003; 59: 1-16.
185. Quayle AJ, Porter EM, Nussbaum AA, et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* 1998; 152: 1247-1258.
186. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, et al. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998; 101: 1633-1642.
187. Zhao CQ, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of β -defensin HBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1996; 396: 319-322.
188. Garcia JR, Krause A, Schulz S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 2001; 15: 1819-1821.
189. Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 306: 27-66.
190. Fleming DC, King AE, Critchley HOD, Williams ARW, Kelly RW. Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium. *Fertil Steril* 2003; 76: 856-863.
191. Crane-Godreau CA, Wira CR. MIP3 α production by polarized uterine epithelial cells: response to apical treatment with Pam3Cys and LPS. *Infect Immunol* 2004; 73: 476-484.
192. Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* 2002; 106: 517-525.
193. King AE, Paltoo A, Kelly RW, et al. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28: 161-169.

194. Feng Y, Pan X, Huang N, et al. The human beta-defensins expression in female genital tract and pregnancy-related tissues. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003; 34: 217-219.
195. Svinarich DM, Wolf NA, Gomez R, Gonik B, Romero R. Detection of human defensin 5 in reproductive tissues. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:470-475.
196. Ganz T. Defensins and host defense. *Science* 1999; 286: 420-421.
197. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, et al. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 1996; 64: 4520-4524.
198. Hocini H, Becquart P, Bouhlal H, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits infection of monocytes and lymphocytes with human immunodeficiency virus type 1 but does not interfere with transcytosis of cell-associated virus across tight epithelial barriers. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 515-518.
199. McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 1995; 96: 456-464.
200. Meyerholz DK, Gallup JM, Grubor BM, et al. Development expression and distribution of sheep beta-defensin-2. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 171-178.
201. Gennaro R, Zaneetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopoly* 2000; 55: 31-49.
202. Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins-structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci* 2005; 6: 23-34.
203. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *Clin Invest* 2003; 111: 1665-1672.
204. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 810-816.
205. Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrate. *J Leukocyte Biol* 1995; 58: 128-136.
206. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001; 414: 454-457.
207. White SH, Wimley WC, Selsted ME. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5: 521-527.

208. Agerberth B, Lee JY, Bergman T, et al. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem* 1991; 202: 849-854.
209. Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med* 2002; 80: 549-561.
210. Zhang G, Ross CR, Blecha F. Porcine antimicrobial peptides: New prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res* 2000; 31: 277-296.
211. Lee PHA, Ohtake T, Zaiou M, et al. Expression of an additional cathelicidin antimicrobial peptide protects against bacterial skin infection. *Immunology* 2005; 102:3750-3755.
212. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins- a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 711-720.
213. Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci* 2005; 6: 35-51.
214. Yang D, Chen Q, Schmidt AP, et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes and T cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1069-1074.
215. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, et al. The cathelicidine antimicrobial peptide LL-37 is involved in re-epithelization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 379-389.
216. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 1999; 341: 501-513.
217. Gallo RL, Kim KJ, Bernfield M. Identification of CRAMP, a cathelin related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* 1997; 272: 13088-13093.
218. Bergman P, Termen S, Johansson L. The antimicrobial peptide RCRAMP is present in the central nervous system of the rat. *J Neurochem* 2005; 93: 1132-1140.
219. Termen S, Tollin M, Olsson B, et al. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin RCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 536-549.

220. Larrick JM, Hirata M, Balint RF, et al. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immunol* 1995; 63: 1291-1297.
221. Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A, Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res* 2000; 49: 73-79.
222. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukocyte Biol* 2001; 69: 691-697.
223. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002; 23: 291-296.
224. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 1995; 80: 252-267.
225. Baveye S, Ellass E, Mazurier J, Spik G, Legrand D. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 281-286.
226. Ohno N, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 4434-4441.
227. Pellegrini A, Thomas U, Wild P, Schraner E, von Fellenberg R. Effect of lysozyme or modified lysozyme fragments on DNA and RNA synthesis and membrane permeability of *Escherichia coli*. *Microbiol Res* 2000; 155: 69-77.
228. Sallanave JM, Ryle AP. Purification and characterization of elastase-specific inhibitor. Sequence homolog with mucus proteinase inhibitor. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1991; 372: 13-2.
229. King AE, Critchley HOD, Kelly RW. Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 191-196.
230. King AE, Critchley HOD, Sallanave JM, Kelly RW. Elafin in human endometrium: an anti-protease and anti-microbial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocr Metabol* 2003; 88: 4426-4431.
231. Hein M, Valore EV, Helmig RB, Uldbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 137-144.

232. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol* 2005; 174: 992-1002.
233. Soboll G, Schaefer TM, Wira CR. Effect of Toll-like receptor (TLR) agonists on TLR and mikrobicide expression in uterine and vaginal tissues of the mouse. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 434-446.
234. Crossman G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec* 1937; 69: 33-38.
235. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of histological techniques*. (1 th ed), Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York 1984; pp 151-152.
236. Çiler Çelik Özenci, Leyla Satı. I. Uygulamalı Moleküler Teknikler ve Gamet Biyoloji Kursu, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, 14-27 Mayıs 2007, Antalya, ss. 86-99
237. Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; 166: 368-379.
238. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat protoc* 2006; 1: 16-22.
239. Özdamar K. Paket programlar ile istatistiksel veri analizi. (2. Baskı), Kaan Kitabevi, Eskişehir 1999; ss 369-377.
240. Mudduwa LKB. Quick score of hormone receptor status of breast carcinoma: correlation with the other clinopathological prognostic parameters. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52: 159-163.
241. Shkurupiy VA, Dubinin EV, Dubinina NN. Dynamics of myocytes of different types in rat myometrium during pregnancy and early postpartum involution. *B Exp Biol Med* 2008a; 146: 849-852.
242. Shkurupiy VA, Dubinin EV, Dubinina NN. Structural transformations of myocytes during gestation and early postpartum involution of the uterus. *B Exp Biol Med* 2008b; 146: 97-100.
243. Mochow R, Olds D. Effect of age and number of calvings on histological characteristics of the bovine uterus. *J Dairy Sci* 1966; 49: 642-646.

244. Gomes CC, Flores JM, Sanchez J, Rodriguez A, Sanchez MA. Histological changes in the uterus during postpartum in the mare. *Anat Histol Embryol* 1995; 23: 19-23.
245. Gyax AP, Ganjam VK, Kenney RM. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *J Reprod Fert* 1979; 27: 571-578.
246. Kanter M, Koç A. Sıçanlarda Doğumdan sonra uterus involüsyonunun histolojik olarak incelenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg* 1997; 8: 21-24.
247. Deno RA. Uterine macrophages in the mouse and their relation to involution. *Am J Ant* 1937; 60: 433-471.
248. Agricola R, Pessa P, Barbosa M, Medeiros AS, Ferreira-Digas G. Microvascularization and proliferation of cell nuclear antigen expression in the postpartum endometrium in the mare. *Proceeding of the 9th International Symposium on Equine Reproduction, Rolduc, Hollanda, 6-11 August 2006, Anim Reprod Sci* 94: 417-419.
249. Cruchten SV, Broeck VD, Duchateau L, Simoens P. Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 2003; 60: 1595-1608.
250. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrin* 2003; 1:116.
251. Epstein CE, Elidemir O, Colasurdo GN, Fan LL. Time course of hemosiderin production by alveolar macrophages in a murine model. *Chest* 2001; 120: 2013-2020.
252. Sherman JM, Winnie G, Thomassen MJ, Abdul-Karim FW, Boat TF. Time course of hemosiderin production and clearance by human pulmonary macrophages. *Chest* 1984; 86: 409-411.
253. Morselt AF, Cambier PH, James J. Electron-microscopical and microphometric studies on the breakdown of erythrocytes by macrophages. *Histochemie* 1973; 37: 161-168.
254. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-825.

255. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
256. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller K-H, et al. TLR1- and TLR6-independent Recognition of Bacterial Lipopeptides. *J Biol Chem* 2006; 281: 9049–9057.
257. Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliver Rev* 2008; 60: 805-812.
258. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 36-46.
259. Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3(6): 499.
260. Rutz, M, Metzger J, Gellert T. et al. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2541.
261. Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005; 26(10): 509-511.
262. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. "Innate immunity: structure and function of TLRs". *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 67–73.
263. Young SL, Lyddon TD, Jorgenson RL, Misfeldt L. Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 67-73.
264. Herbst-Kralovetz MM, Quayle AJ, Ficarra M, et al. Quantification and comparison of Toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 212-224.
265. Hart KM, Murphy AJ, Barrett KT, et al. Functional expression of pattern recognition receptors in tissues of the human female reproductive tract. *J Reprod Immunol* 2002; 80: 33-40.
266. Beier HM, Beier-Hellwig K. Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 448-458.
267. Spornitz UM. The functional morphology of the human endometrium and decidua. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1992; 124: 1-99.
268. Classen-Linke I, Alfer J, Hey S, et al. Marker molecules of human endometrial differentiation can be hormonally regulated under in-vitro conditions as in-vivo. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 539-549.

269. Lin Z, Xu J, Jin X, Zhang X, Ge F. Modulation of expression of Toll-like receptors in the human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 2009; 61: 338-345.
270. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, et al. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4 and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Immunol* 2007; 74: 53-60.
271. Herath S, Lilly ST, Santos NR, et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrin* 2009; 7: 55.
272. Sentman CL, Wira CR, Eriksson M. NK cell function in the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57: 108-115.
273. Christmas, P. Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection. *Nature Education* 2010; 3: 85.
274. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167: 1882-1885.
275. Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 2004; 25: 381-386.
276. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, et al. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 2004; 173: 1179–1183.
277. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 6: 551-557.
278. Bals R, Wang X, Wu Z, et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* 1998; 102: 874-880.
279. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 368: 331-335.
280. Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 257-264.
281. Garcia JR, Krause A, Schulz S, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt- sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J* 2001; 15: 1819-1821.

282. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713.
283. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, et al. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 2002; 169: 2516-2523.
284. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNFalpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human betadefensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 714-721.
285. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 1998; 66: 4222-4228.
286. O'Neil DA, Porter E, Elewaut D, et al. Expression and regulation of the human β -defensins hBD1 and hBD2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718-6724.
287. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* 2004; 327: 539-549.
288. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D (2) production from mast cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1066-1075.

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 09.04.2008

Toplantı Sayısı: 05

Karar No: 08/23

Etik kurul toplantısı tarihinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik

Kurul Başkanlığı'nda **Prof.Dr. Zübeyde Gündüz** başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Doç.Dr	Tıp Fakültesi	
Can Küçük	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Tancan Uysal	Doç.Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Halit Erkiletlioğlu	Diş Hekimi		
Halil Tekiner	Eczacı		

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr. Narin Liman'ın "Postpartum dönemde sıçan uterusunda Toll-like reseptörler ve beta-defensinler" adlı araştırması incelenerek, çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Dosyada sunulan dökümanlar;


Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

Tarih : 09.04.2008

Etik Kurul Başkanı : Prof.Dr. Zübeyde Gündüz

Etik Kurul Başkanı İmzası





ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emel ALAN

Doğum Tarihi: 19.01.1981

Doğum Yeri: Kayseri

İlköğretim: Öğretmen Derviş Güneş İlkokulu, Kayseri, 1991

Ortaöğretim: Kayseri Lisesi, Kayseri,1997

Lisans: Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kayseri, 2002

Yüksek Lisans: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 2005

Sürekli Adres: Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 38090, Kocasinan/Kayseri,

Telefon ve e-posta: 0352 3380006-148, ealan@erciyes.edu.tr

Yüksek lisans Tezi: Bıldırcınlarda Postnatal Dönemde Trakeya Epitelinin Kantitatif Histomorfolojik Gelişimi ve Histokimyasal Özellikleri (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narin LİMAN).

Katıldığı Kurslar: I. Uygulamalı Moleküler Teknikler ve Gamet Biyolojisi Kursu, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2007