

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARELERDE ÇİFTLEŞME SONRASI
UYGULANAN ANTİ-IL-10 VE ANTİ-
TGF β 'NİN GEBE KALMA ORANLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali RİŞVANLI

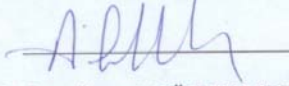
2011

ONAY SAYFASI

.....

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

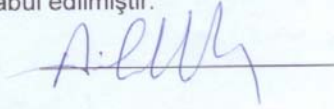
Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN

Immünoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans
Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN


Danışman

Yüksek Lisans Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Handan AKBULUT

Doç. Dr. Mehmet ŞİMŞEK

Doç. Dr. Selim KUTLU

Doç. Dr. Banu KUMBAK AYGÜN

.....

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans Tez çalışmalarıml sırasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN'a, Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi İmmünoloji ABD Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Handan AKBULUT ve Doç. Dr. Fulya İLHAN'a, ayrıca proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. T regülatör (Treg) hücreler ve Gebelik.....	7
3.2. IL-10.....	8
3.3. TGF β	10
3.4. Çiftleşme Sonrası Uterus Ortamının İmmün Sistemle İlişkisi.....	11
4. GEREÇ VE YÖNTEM	13
4.1. Hayvanlar.....	13
4.2. Uygulama Grupları	13
4.3. Uterus Sıvısının Toplanması	14
4.4. Sitokin Analizleri	15
4.5. İstatistikî Analizler	15
5. BULGULAR	16
6. TARTIŞMA	19
7. KAYNAKLAR	25
8. ÖZGEÇMİŞ	31

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Gebe kalma oranları.....	16
Tablo 2: Uterus sıvısı sitokin konsantrasyonları	17
Tablo 3: Serum sitokin konsantrasyonları	18

KISALTMALAR LİSTESİ

IL: Interleukin

TGF β : Transforming Growth Factor Beta

IFN γ : Interferon Gamma

IFN- τ : Interferon Tau

TNF α : Tumor Necrosis Factor Alfa

CD: Cluster of Differentiation

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

NK: Natural Killer

Th: T helper

CBA/J: Fare soyu

DBA/2: Fare soyu

BALB/c: Fare soyu

C3H: Fare soyu

Foxp3: Forkhead box P3,

HLA-G: Human Leukocyte Antigen G

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

MMP-9: Matrix metalloproteinase 9

IGFBP-1: Insulin Like Growth Factor Binding Protein 1

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

Treg: T Regulator Hücresi

MHC: Major Histocompatibility Complex

1. ÖZET

Bu tezde; dişilerde gebelik üzerine önemli etkileri olan IL–10 ve TGF β 'ya karşı geliştirilen nötralizan antikorların, farelerde çiftleşme sonrası uygulanmasının gebelik oranları, IL (Interleukin)–2, IL–4, IL–6, IL–10, IL–17, IFN γ (Interferon Gamma), TNF α (Tumor Necrosis Factor Alfa) ve TGF β (Transforming Growth Factor Beta)'nın kan serumu ve uterus sıvısındaki konsantrasyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. BALB/C ırkı 21 adet dişi farenin kullanıldığı çalışmada, hayvanlar çiftleştirilerek rastgele üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki hayvanlar kontrol grubu olarak seçildi. İkinci grup hayvanlara çiftleşme sonrası 0,5 mg anti-IL–10; 3. gruptaki hayvanlara da 0,5 mg anti-TGF β intraperitoneal olarak enjekte edildi. Tüm gruptaki hayvanlar çiftleşme sonrası 13. günde dekapite edilerek kanları alındı. Hayvanların uterusları çıkarılarak gebe olup olmadıkları saptandı. Ayrıca, hayvanların uterus yıkama (irrigasyon) sıvıları elde edildi. Uterus sıvılarındaki ve kan serumlarındaki sitokin konsantrasyonları, multiplex immünoassay tekniğı kullanılarak belirlendi. Sonuç olarak, gebe kalma oranları açısından gruplar arasında fark bulunmadı. Gebe hayvanların uterus sıvısı sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldığında ise anti-IL-10 antikoru enjekte edilen 2. grupta TGF β konsantrasyonunun ($P<0,01$) diğeri gruplara nazaran daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak, gebe hayvanlarda, diğeri sitokinlerin hem uterus sıvısı hem de kan serum konsantrasyonları açısından fark bulunmadı. Buna

bağlı olarak, çalışmamızda farelerde çiftleşme sonrası anti-IL-10 ve anti-TGFβ antikorları uygulanmasının gebelik oranlarına etki etmediği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Gebelik, Anti-IL-10, Anti-TGFβ, Fare, Sitokin.

2. ABSTRACT

In this thesis, we were aimed to determine the effects on pregnancy rate and blood serum and uterine fluid concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α and TGF β which have significant effects on pregnancy in females of neutralizing antibodies developed against for IL-10 and TGF β after mating in mice. BALB/C breed study of 21 female mice used in the mating of animals was divided randomly into three groups. The first group was chosen as control group animals. The second group of animals, 0.5 mg of anti-IL-10; a third group animal in the 0.5 mg group of anti-TGF β after mating was injected intraperitoneally. All groups of animals were decapitated and their blood was collected 13th days after mating. Removed from uteri of animals and determine whether they were pregnant. In addition, the animals uterine flushing (irrigation) fluids were obtained. Uterine fluids and blood serum cytokine concentrations were determined using a multiplex immunoassay technique. As a result, pregnancy rates did not differ between the groups. In comparison of cytokine concentrations in uterine fluid of pregnant animals, anti-IL-10 antibody injected TGF β concentration in second group ($P < 0.01$) were found to be higher than other groups. However, other cytokines in pregnant animals found no difference in uterine fluid and blood serum concentrations. Accordingly, it was concluded that the present study in

mice after mating anti-IL-10 and anti-TGF β antibodies did not affect pregnancy rates.

Keywords: Pregnancy, Anti-IL–10, Anti-TGF β , Mouse, Cytokine.

3. GİRİŞ

Dişilerde gebelik üzerine immün sistemin etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Gebeliğin şekillenmesi, devamı ve sonlanması ayrı ayrı fizyolojik, biyokimyasal ve immünolojik mekanizmalarla açıklanmaktadır. Özellikle sitokinlerin fertilizasyonda, implantasyonda, gebeliğin devamında, abortlarda ve doğumda oynadıkları roller geçmişte yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ancak, çiftleşme sonrasındaki sitokin profillerinin ve bu profillere etki edecek uygulamaların gebelik üzerine etkileri ile ilgili fazla bilgi bulunmamaktadır. Sunulan bu tezde de, gebeliğin devam etmesinde önemli rol oynayan IL-10 ve TGF β 'ya karşı geliştirilen antikorların farelerde çiftleşme sonrası uygulanmasının gebe kalma oranları ile Th1/Th2 polarizasyonunu gösteren sitokin konsantrasyonları üzerine olan etkilerinin belirlenmesine yönelik bir araştırma planlandı.

Dişilerde üreme biyolojisi üzerine etki eden çok sayıda faktör vardır. Subfertiliteden steriliteye kadar değişen bir yelpazede fertiliteye etki eden enfeksiyöz, genetik, hormonal ve beslenme gibi çok sayıda faktör olmakla birlikte immünolojik sebeplere bağlı faktörler de bu konuda önemli bir yer tutmaktadır. Üreme biyolojisi içerisinde yer alan tüm konularda olduğu gibi gebeliğin şekillenmesi ve sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için de immün sistemin optimal şartlarda çalışması gerekir.

İmmünolojik reaksiyonların düzenlenmesinde hücrelerden özellikle $CD4^+$ T lenfositlerden salgılanan sitokinler önemli rol oynar. Th0 lenfositler Th1 ve Th2 adlı 2 alt gruba farklılaşırlar: Th1 grubu $CD4^+$ T lenfositlerden IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ ve TNF β salgılanırken; Th2 grubu $CD4^+$ T lenfositlerden IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve GM-CSF salgılanır (5, 49). Th1 hücreleri hücreyel immünite ile ilgili iken; Th2'ler ise humoral immüniteden sorumludur. Makrofajlar ve NK hücreler doğal immünitenin hücreleridir ve gerekli sitokinleri üreterek $CD4^+$ T lenfositlerin fonksiyonel polarizasyonuna etki ederler. Th1 polarizasyonu için IFN γ ve IL-12; Th2 polarizasyonu için IL-4 gereklidir. Bu sitokinlerin varlığında Th0 hücreler bu iki alt gruba farklılaşırlar (5, 15, 54, 69). Gebelik süresince Th1 ve Th2 sitokinlerin ek kaynağı olarak decidual epitelyum, decidual stroma, cyto- ve syncytiotrophoblast, chorion, amnion ve Hofbauer hücreleri de vardır. Sitokinler, trofoblast invazyonu süresince dokuların yeniden biçimlendirilmesi, plasental hormonların üretimi ve fetüse karşı maternal toleransın gelişimi gibi gebelikle ilgili birçok konuda görev alırlar (7, 22, 59, 71).

Fetüsün etrafındaki sitokin ortamı, gebeliğin devamı için son derece önemlidir. Gebelik, Th2 polarizasyonu ile ilişkilidir. Th2 tip yanıtlar fetüsün gelişmesine izin verirken, Th1 gibi yanıtlar aborta sebep olur (43). Örneğin, CBA/J ve DBA/2 melezi farelerde abortlar yüksek oranda görülür. Bunun sebebi Th2 tip sitokinlerin üretiminin yetersizliğidir (50). Chaouat ve ark. (9), CBA/J ve DBA/2 melezi farelerde abortların yüksek oranda gözlenmesinden korunmak için IFN-tau enjeksiyonları kullanılarak IL-10

üretiminin stimüle edilebileceğini bildirmektedirler. Yine, bu çalışmada anti-IL-10 monoklonal antikoru enjekte edilen farelerde fetal kayıpların oranının arttığı da ileri sürülmektedir.

3.1. T regülatör (Treg) hücreler ve Gebelik

Supresif veya Treg hücrelerin gebeliğin devamında önemli rol oynadıkları 1970'li yılların sonlarından beri ileri sürülen bir fikirdir. Daha sonradan supresif özelliği olan Treg lenfosit olarak adlandırılan $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T hücrelerin identifikasyonu, gebelikte bu hücrelerin rolü olduğuna dair yeni fikirlerin öne sürülmesini sağlamıştır (29). Aluvihare ve ark. (2), CD25 lenfositlerin BALB/c nu/nu farelere transfer edildiğinde allogeneik gebeliklerin fetal kayıpla sonuçlandığını bildirmektedirler. Yine bu çalışmada, gebelikte maternal $CD4^+CD25^+$ T hücrelerin popülasyonunun arttığı ve bu hücrelerin karışık T lenfosit kültürlerine katıldığında da hücrelerin proliferasyonunun inhibe olduğu bulunmuştur.

Gebelikte Treg lenfositlerin önemli rol oynadığı, farelerde ilk defa 2004 yılında gösterilmiştir (2). Çiftleşme sonrası 2. günde uterustan lenf nodüllerine drene olan Treg lenfositlerin tespiti yapılabilmektedir. Farelerde çiftleşme sonrasındaki günler içerisinde bu hücrelerin sayısının arttığı da ileri sürülmektedir (2).

Farelerde allogeneik veya syngeneik erkeklerle yapılan çiftleştirmelerde, çiftleşme gününde CD25 reaktif PC61 monoklonal antikoru uygulandığında, uterustan lenf nodüllerine drene olan aktive $CD8^+$

ve CD4⁺ lenfositlerin sayısının arttığı ve doğan canlı yavru sayısının azaldığı bildirilmektedir. Ancak, böyle bir durumun syngeneik gebelikte ortaya çıkmadığı da ileri sürülmektedir (11).

Treg lenfositlerin immünosupresif etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış ise de IL-10 ve TGFβ'nın bu immünosupresyon sırasında arttığı bilinmektedir (27).

3.2. IL-10

IL-10, immün yanıtta anahtar bir rol oynar. Çünkü, T hücrelerden sitokin üretimini baskılama yeteneğine sahiptir ve bu nedenle Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (CSIF) olarak bilinir. IL-10 immünosupresif etkisini direkt T hücreler üzerine değil de antijen sunucu hücrelerin seviyesine etki ederek ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Bu sitokinin monosit ve makrofajlardan IL-α1, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα, GM-CSF sentezini, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerini, Th1 hücrelere antijen sunumunu inhibe ettiği bilinmektedir (17).

Bu sitokin monosit, makrofaj, Treg, T lenfosit, dendritik hücreler ve mast hücrelerinden salgılanır. IL-10'un antiinflamatuvar özelliği de vardır ve proinflamatuvar sitokinleri (IL-1 β, TNF-α, IL-6) ve Th2 hücrelerini uyaran IL-4, IL-5'i inhibe eder (28, 66). Ayrıca, IL-2 salınımını da baskılayarak CD4⁺ T lenfositlerin aktivasyonunu inhibe eder ve bu yolla tolerans gelişimini sağlar. MHC-II salınımını da azaltarak makrofaj ve dendritik hücrelerden T hücrelerine antijen sunumunu bloke eder (13). IL-10'un

inhibitör etkilerine rağmen B lenfositlerin proliferasyonunu ve immünoglobulin sentezini de uyarmaktadır (62).

IL-10, sitokinlerin çok miktarda üretilmesini de içine alan aşırı immün reaksiyonların kontrolünde önemli rol oynar. IL-10, tipik olarak TNF α , IL-1, ve IL-6 gibi inflamatuvar mediatörleri inhibe edebilir (4).

Bu sitokin, gebeliğin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için gereklidir. Normal ve patolojik gebeliklerin karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarda, patolojik gebeliklerde IL-10 üretiminin azaldığı bildirilmiştir (32, 38). Progesteronun, Th0 hücrelerin Th1 hücrelere dönüşmesini ve Th2 hücrelerden de IL-10 salınımını inhibe ettiği belirtilmektedir (44). IL-10'un, corpus luteum maturasyonu ile birlikte (25), embriyoya zararlı olan Th1 sitokinlerin üretimini inhibe etmek suretiyle, uteroplental üniteye NK ve bazı inflamatuvar hücrelerin sayısını azaltarak gebeliğin devamında rol aldığı belirtilmektedir. Ayrıca, uterusda bulunan IL-10'un trofoblastlardan HLA-G ekspresyonuna etki ettiği bilinmektedir (10). Yine bu sitokinin, kadınlarda trofoblast invazyonunu azalttığı da ileri sürülmektedir (61).

Sağlıklı bir gebeliğin başlaması için normal şartlar altında IL-10 ve reseptörlerinin erken gebelik döneminde endometriyumda ve decidua hücrelerinde bulunması gerekmektedir. Bu sitokin, otokrin etkiye bağlı olarak decidua hücrelerin proliferasyonuna ve TNF α sekresyonuna sebep olurken, parakrin etkiye bağlı olarak da maternal immün tepkiye sebep olur (70).

3.3. TGF β

TGF β , T hücre bağımlı antikor üretimini baskılar, IgA üretimini indükler. Ayrıca, başta B, T ve makrofajlar olmak üzere birçok hücre türüne antiproliferatif etki gösterir. Trophoblast, decidua, koriyonik ve amniotik membranların hepsi Th2 sitokinlerin (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13) ve TGF β 'nın kaynaklarıdır (6, 14, 33, 60). Bu sitokinler, proinflamatuvar etkili IL-1 β , TNF α ve IL-8'in salınımını sınırlayarak Th2 bazlı bir ortamın gelişimini sağlarlar (6, 18, 19, 33, 35, 53). TGF β , hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerine inhibitör ve stimülatör etkili bir immünoregülatördür (72).

TGF β 'nın 3 izoformunun da insan ve kemirgenlerin endometriyumunun epitelyum ve stromasında lokalize olduğu bilinmektedir. TGF β 'nın implantasyon sürecinde maternal immüntoleransın sağlanmasında ve invitro ortamda VEGF, MMP-9, IGFBP-1 ve LIF gibi implantasyonla ilişkili çeşitli molekülleri düzenlediği ileri sürülmektedir (16, 26). TGF β knockout farelerde, erken embriyonik ölüm veya doğum sonrası ölüm görüldüğü bildirilmektedir (36). Yine yapılan çalışmalarda, TGF β reseptör tip 1 ve tip 2 mRNA'larının östrus siklusu boyunca ve erken gebelikte rat endometriyumunda eksprese edildiği gösterilmiş ve fonksiyonel TGF β sinyallerinin implantasyonun başlangıcıyla ve trofoblast invazyonuyla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (39, 40).

Konu ile ilgili çalışmalarda, TGF β 'nın kadınlarda trofoblast invazyonunu, proliferasyonunu ve sinsityotrofoblastlara farklılaşmasını azalttığı bildirilmektedir (8, 21, 45).

3.4. Çiftleşme Sonrası Uterus Ortamının İmmün Sistemle İlişkisi

Çiftleşme, özellikle seminal plazmadan kaynaklanan nedenlerle uterusda geçici inflamatuvar tepkilere sebep olur. Bu durum, blastocyst hatching'inden başlayıp implantasyona kadar devam edebilir. Bunun, uterusda bulunan lenfositlerin immünopresif etkisinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Vesicula seminaliste bulunan TGF β gibi spesifik faktörler, farelerde uterus epitelinden ve lökositlerden GM-CSF gibi sitokinlerin ve kemokinlerin sentezine sebep olurlar (55, 58, 68). Bu açıdan, çiftleşmenin uzun vadede bir immünomodulasyona sebep olduğu da ileri sürülmektedir. İmplantasyon öncesi dönemde embriyonun yaşaması için uygun bir sitokin ortamının olması gerekir. Özellikle immünosuppresif aktiviteye sahip IL-10'un çiftleşmeye bağlı olarak şekillenen inflamatuvar tepkilerin ortaya çıkışında rol aldığı ileri sürülmektedir (47). Robertson ve ark. (58), çiftleşmenin IL-6 ve GM-CSF seviyelerini de arttırdığını belirtmektedirler.

Çiftleşme sonucunda seminal plazmaya maruz kalan dişilerde Treg lenfositlerin bölgesel lenf yumrularında ve uterusda popülasyonunun arttığı, bunun da, implantasyon öncesi embriyoya karşı maternal immün toleransın gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Söz konusu

reaksiyonun oluşabilmesi ayrıca, $TGF\beta$ 'nın dâhil olduğu immün deviasyonun ve antijenik uyarımın olması gerekmektedir. Bu durumun gerçekleşebilmesi için sperm ve seminal plazmanın her ikisi de ortamda bulunmalıdır (56, 57, 73).

Sunulan çalışmada, gebeliğin şekillenmesinde ve devamında rol oynayan IL-10 ve $TGF\beta$ 'ya karşı geliştirilen antikorların, farelerde çiftleşme sonrası uygulanmasının gebelik oranları, uterus sıvısındaki ve kan serumundaki IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α ve $TGF\beta$ sitokin konsantrasyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hayvanlar

Araştırmada, 25–30 gr ağırlığında, 3–4 aylık, 21 adet BALB/C ırkı dişi fare kullanıldı. Hayvanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edildi. Çalışma süresince hayvanlar yedişerli gruplar halinde kafeslerde tutuldu ve gün boyu 12 saat karanlık, 12 saat ışık rejimi uygulandı. Hayvanlara yiyebildikleri kadar yem ve su verildi. Araştırma için Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan Etik Kurul Raporu alındı.

4.2. Uygulama Grupları

Hayvanların kafeslerine bir adet erkek hayvan yerleştirilerek çiftleşmeleri takip edildi. Vaginal plak görülen veya vaginal smearda spermatozoon tespit edilen hayvanlar çiftleşmiş olarak kabul edildi. Vaginal plak oluşumunun daha kolay tespiti için tüm hayvanların kafeslerinin zeminleri siyah materyalle kaplandı Vaginal plak gözlemi ikişer saat aralıklarla yapıldı. Daha sonra hayvanlar rastgele 3 gruba ayrıldı.

1. Grup hayvanlara (n=7) vaginal plak veya vaginal smearda spermatozoon tespit edilir edilmez 0,5 ml serum fizyolojik intraperitoneal yolla enjekte edildi.

2. Grup hayvanlara (n=7) vaginal plak veya vaginal smearda spermatozoon tespit edilir edilmez 0,5 mg monoklonal Mouse anti-IL-10 antikoru (eBioscience) intraperitoneal yolla enjekte edildi (63).

3. Grup hayvanlara (n=7) vaginal plak veya vaginal smearda spermatozoon tespit edilir edilmez 0,5 mg monoklonal Mouse anti-TGF β antikoru (GeneTex) intraperitoneal yolla enjekte edildi (63).

Tüm gruptaki hayvanlar vaginal plak veya vaginal smearda spermatozoon tespit edildikten 13 gün sonra dekapite edildi. Dekapite edilemeden önce hayvanların kanları intrakardiyak olarak alındı ve rutin işlemler sonrası serumları ayrılarak ölçümler yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

Dekapite edilen hayvanların, uterusları çıkarılarak gebe olup olmadıkları tespit edildi.

4.3. Uterus Sıvısının Toplanması

Hayvanlar öldürüldükten sonra, uterus sıvıları Harris ve ark. (24) ve Orsi ve ark.'nın (47) tarif ettiği şekilde elde edildi. Buna göre, çıkarılan uterusların cornuları ligatüre edildikten sonra mineral yağlarla irrigate edilerek uterus sıvıları toplandı. İrrigasyon için 1 ml mineral yağ kullanıldı. Daha sonra, bu numuneler, 5 dk 9000 devirde mikrosantrifüj edilerek hücre döküntülerinden temizlendi. Elde edilen uterus sıvıları ölçümler yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

4.4. Sitokin Analizleri

Hayvanlardan alınan kan numuneleri serum ve uterus sıvılarındaki IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α ve TGF β konsantrasyonları xMAP® tespit teknolojisini esas alan multiplex immünoassay (Procarta® Cytokine Assay Service, Diagnostics, Italy) ile tespit edildi. TGF β kitleri, TGF β 'nın sadece aktif formunu tespit edebildiğinden numunelerdeki TGF β 'nin aktif formunun ayrılabilmesi için asit uygulamaları yapıldı. Bundan dolayı TGF β ölçümünde ayrı plate kullanıldı (12).

4.5. İstatistikî Analizler

Gruplar arasındaki gebe kalma oranlarının karşılaştırılması için Ki-Kare testi kullanıldı. Gruplar arası sitokin konsantrasyonlarının karşılaştırılması için ise Kruskal Wallis testi yapıldı. Bu testte önemlilik çıktığı durumlarda önemlilik derecesinin belirlenebilmesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistikî analizler, bilgisayar ortamında SPSS 11,5 programında yapıldı.

5. BULGULAR

Elde edilen veriler ışığında, çiftleşme sonrası 13. gündeki gebelik oranları Tablo 1’de özetlendi. Buna göre, gebelik oranları açısından gruplar arasında fark bulunmadı ($P>0,05$).

Gebe hayvanların uterus sıvısı sitokin konsantrasyonları karşılaştırıldığında anti-IL-10 antikoruna enjekte edilen 2. grupta TGF β konsantrasyonunun ($12,30\pm 2,67$ pg/ml) diğer gruplara nazaran anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($P<0,01$) (Tablo 2). Ancak, gebe hayvanlarda, diğer sitokinlerin hem uterus sıvısı hem de kan serumu konsantrasyonları açısından anlamlı fark bulunmadı ($P>0,05$) (Tablo 2, 3).

Tüm gruplarda gebe olmayan hayvanların sayıları düşük olduğundan dolayı gruplar arası karşılaştırmalar için istatistikî hesaplamalar yapılamadı. Yine, aynı sebepten dolayı gebe ve gebe olmayan hayvanların sitokin konsantrasyonları da karşılaştırılamadı.

Tablo 1: Gebe kalma oranları

Grup 1 (n=7)				Grup 2 (n=7)				Grup 3 (n=7)				P
Gebelik				Gebelik				Gebelik				
+		-		+		-		+		-		
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
6	85,71	1	14,29	5	71,43	2	28,57	5	71,43	2	28,57	-

- Gruplar arasındaki fark önemsiz.

Tablo 2: Uterus sıvısı sitokin konsantrasyonları

Sitokin pg/ml	Grup 1 (n=7)		Grup 2 (n=7)		Grup 3 (n=7)		P
	Gebelik		Gebelik		Gebelik		
	+	-	+	-	+	-	
	(n=6)	(n=1)	(n=5)	(n=2)	(n=5)	(n=2)	
IL-2	4,33±0,49	4,0	3,30±0,49	4,5	2,80±0,20	3,0	-
IL-4	3,83±0,65	4,0	4,00±0,77	3,0	3,80±0,37	3,5	-
IL-6	5,50±1,12	5,0	5,00±0,89	5,5	4,80±0,97	4,5	-
IL-10	3,33±0,21	3,0	4,30±0,44	4,25	5,20±0,97	3,5	-
IL-17	7,33±0,71	6,0	7,00±0,32	7,00	6,40±1,02	6,0	-
IFNγ	38,83±5,87	53,0	48,17±3,32	48,75	49,00±4,37	60,5	-
TNFα	4,67±0,49	6,0	4,60±0,51	4,5	3,90±0,40	4,75	-
TGFβ	4,66±0,33 ^b	6,00	12,30±2,67 ^a	17,5	5,50±0,61 ^b	4,75	*

- Gruplar arasındaki fark önemsiz ($P>0,05$).

^{a, b} Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark önemli ($P<0,01$).

Tablo 3: Serum sitokin konsantrasyonları

Sitokin pg/ml	Grup 1 (n=7)		Grup 2 (n=7)		Grup 3 (n=7)		P
	Gebelik		Gebelik		Gebelik		
	+	-	+	-	+	-	
	(n=6)	(n=1)	(n=5)	(n=2)	(n=5)	(n=2)	
IL-2	6,17±1,04	14,0	4,4±0,43	6,5	5,41±2,22	3,75	-
IL-4	10,92±5,29	31,0	7,00±1,17	9,0	9,34±13,17	6,5	-
IL-6	63,11±7,88	87,0	38,40±25,05	12,0	74,80±17,44	127,75	-
IL-10	5,0±0,73	4,0	4,8±0,2	4,0	5,2±0,58	3,5	-
IL-17	287,73±11,12	195,0	170,90±56,58	168,5	218,80±27,60	396,0	-
IFN γ	26,33±5,12	18,0	24,20±4,0	19,0	5,33±5,21	14,75	-
TNF α	31,25±8,52	14,5	39,33±12,33	32,5	19,50±4,84	14,5	-
TGF β	2403,08±410,56	2830,5	3798,50±962,25	4177,5	2287,60±710,70	4147,25	-

- Gruplar arasındaki fark önemsiz ($P>0,05$).

6. TARTIŞMA

Sunulan bu tez, gebeliğin şekillenmesinde ve devamında rol oynayan IL-10 ve TGF β 'ya karşı geliştirilen antikorların, farelerde çiftleşme sonrası uygulanmasının gebelik oranları, uterus sıvısındaki ve kan serumundaki IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α ve TGF β sitokin konsantrasyonları üzerine etkilerinin belirlenmesini kapsamaktadır.

Gebeliğin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için her döneminde birbirinden farklı immünolojik olayların ortaya çıkması gerekir. Bu reaksiyonların temelinde fetüse karşı anne tarafından oluşturulan immün tolerans mekanizmaları yatmaktadır. Genel olarak kabul gören düşünce, gebeliğin çeşitli safhalarında Th1/Th2 dengesinin belirli koşullarda devam etmesidir. Ancak, özellikle son zamanlarda Treg hücrelerle ilgili bilgilerin artmasına bağlı olarak, tüm dişilerde gebeliğin şekillenmesi ve sağlıklı bir şekilde devam edebilmesi için Th1/Th2 dengesinin yanı sıra Treg hücrelerden salgılanan IL-10 ve TGF β 'nın da önemli rol aldığı bildirilmektedir (52). İmplantasyon öncesi ve sonrasında embriyonun sağlıklı bir şekilde gelişebilmesi için endometriyumdan, blastosistden veya değişik kaynaklardan sentez edilen sitokinlerin oluşturduğu bir ortama ihtiyaç vardır. Uygun olmayan bir immün tepki veya dengesiz sitokin salınımı implantasyon yetersizliklerine, gebeliğin sonlanmasına veya jinekolojik bir takım komplikasyonlara sebep olabilir (41).

Ovarian steroidlerin etkisi altındaki uterus, implantasyon öncesi ve sonrası dönemde rol oynayan faktörlerin etkilerini tam olarak

açıklayabilmek oldukça zor bir iştir. İmplantasyon öncesi endometriyumda aseptik yangı benzeri olayların şekillendiği ve çeşitli sitokinlerin intrauterin immün olaylarda önemli düzenleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda plasental ya da sistemik kaynaklı Th2 tip sitokinlerin normal gebeliğin devamında rol aldığı bildirilmektedir. Bu sitokinler içerisinde yer alan IL-10'un fetuse karşı gelişen immün yanıtın kontrolünde görev aldığı ileri sürülmektedir (10).

Reprodüktif olaylarda sitokinlerin rolleri ile ilgili yapılan çalışmalarda IL-10'un fertilitede, implantasyonda, maternal immün toleransta, plasentasyonda ve fetal gelişmede (70); TGF β 'nın da aynı olaylarda rol aldığı ve salınmasındaki aksaklıklara bağlı olarak ta fetal ve doğum sonrası ölümlere rastlandığı ileri sürülmektedir (36).

Gebelikte Treg hücreler tarafından salgılanan immünosupresif özellikli IL-10 ve TGF β , aktive olmuş lökositlerin efektör fonksiyonlarını inhibe etmektedirler (23, 34). IL-10'un fizyolojik rollerinin değerlendirilmesi amacıyla BALB/c farelere, doğumdan 8 haftalık oluncaya kadar, nötralize edici anti-IL-10 antikorları devamlı surette uygulanmış ve sonuçta endojen IFN γ ve TNF α seviyelerinin arttığı belirlenmiştir (30, 31). Gebe farelerde Treg hücrelerin koruyucu etkilerini ortadan kaldırmak için yapılan bir çalışmada (63) anti-IL-10 antikorları kullanılmış ve sonuçta, bu antikorların enjekte edildiği hayvanlarda çok yüksek abort oranları gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada, nötralizan antikorlar kullanılarak gebe hayvanlarda TGF β bloke edilmiş ve sonuçta anti-IL-10 antikorları uygulanan gruptaki kadar olmasa da bu hayvanlarda da yüksek abort oranları gözlenmiştir. Bu da

gebelikte Treg hücrelerden salgılanan TGF β ve IL-10'un allogeneik fetusun korunmasında ne kadar önemli rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, değişik hayvan modellerinde otoimmünite, alerji ve deri allograft rejeksiyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda IL-10'u bloke eden antikorların kullanımı sonucunda bu sitokin fonksiyonlarının baskılandığı gözlenmiştir (3, 46, 48, 67). Nötralize edici anti-IL-10 antikorlarının uygulanması farelerde endotoksinlere bağlı mortalite oranlarını artırırken; IL-10'un eksojen olarak uygulanması ise TNF α , IL-1, IFN γ ve diğer proinflammatuar mediyatörlerin sentezini inhibe ederek septik şok oluşumunu engellemektedir (42, 65). Sunulan tezde de istatistikî açıdan fark olmasa da anti-IL-10 antikorlarının uygulandığı grupta kan serumu TNF α ve TGF β konsantrasyonlarının diğer gruplara nazaran daha yüksek; IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 ve IL-17'nin daha düşük olduğu tespit edildi. Bu durum, istatistikî açıdan anlamlı olmasa da, farelere uygulanan söz konusu antikorların, gebe hayvanlarda kan serumu sitokin konsantrasyonlarını değişik düzeylerde etkilediği şeklinde yorumlanabilir. Ancak, etik kurallar nedeniyle çalışmada sınırlı sayıda hayvan kullanılmasından dolayı, gebe ve gebe olmayan hayvanların sitokin konsantrasyonlarının karşılaştırılması yapılamadığı için bu konuda herhangi bir yoruma ulaşılamadı. Anti- TGF β antikorlarının uygulandığı grupta da benzer yorumlar, gebe ve gebe olmayan hayvanlar arasında hem uterus sıvısı hem de kan serumu sitokin konsantrasyonları için yapılabilir. C3H allopregnant farelerden postimplantasyon sonrası elde edilen desidual dokularda TGF β 2 aracılığıyla salgılanan *Decidual*

Suppressor Factor olarak adlandırılan immünosupresif bir molekülün salgılandığı bildirilmektedir (37). Slager ve ark. (64) farelerde TGF β 2 için spesifik nötralize edici antikörlerin enjeksiyonu sonrası implantasyon oranlarının önemli oranda azaldığını bildirmektedirler. Graham ve Lala (20), desidua kültür medyumlarına TGF β 1 eklendiğinde trophoblast invazyonunu baskıladığı ancak, kültür medyumlarına anti-TGF β 1 taşıyan antiserumlar eklendiğinde ise bu anti-invaziv etkinin ortadan kalktığını bildirmektedirler. Altman ve ark. (1), fare amniotik sıvısı içerisinde immünosupresif bazı faktörlerin olduğunu ve anti-TGF β 2 antikörleri tarafından bu faktörlerin nötralize edilebileceğini, ancak, aynı etkinin anti-TGF β 1 antikörleri tarafından oluşturulamayacağını ileri sürmektedirler.

Yukarıda belirtilen görüşlere zıt fikirler ileri süren yayınlar da vardır. Örneğin; Rijhsinghani ve ark. (51), IL-10'un farelerde normal gebelikteki rolü üzerine yaptıkları bir çalışmada, gebe farelere IL-10'u nötralize etmek için anti IL-10 monoklonal antikörleri uygulanmış ve sonuçta bu uygulamanın gebelik süresine etki etmediği, fetüs gelişimine olumsuz etkilerinin olmadığı ancak, yeni doğan yavrularda ileri dönemlerde bazı problemlere sebep olduğu ileri sürülmektedir. Erken gebelikte ve implantasyon döneminde IL-10'un etkilerinin belirlenmeye çalışıldığı bir araştırmada (74), IL-10 null mutant farelerde, IL-10 yetersizliğine rağmen çiftleşme sonrası endometriyal dokularda inflamatuvar tepkilerin ortaya çıktığı, normal farelerle karşılaştırıldığında bu hayvanlarda implantasyon oranlarının daha yüksek olduğu, yavrularının hayatta kalma oranlarının daha fazla olduğu ve sonuçta da IL-10'un farelerde maternal immün

toleransın ve gebeliğin sağlıklı devamı için gerekli olmadığı bildirilmektedir. Sunulan bu tezde de farelerde çiftleşme sonrası uygulanan anti-TGF β ve anti-IL-10 uygulamalarının gebelik oranlarına etki etmediği gözlenmiştir. Bu açıdan elde edilen veriler yukarıda belirtilen literatürlerdeki sonuçlarla uyum içerisindedir.

Sunulan tezde uterus sıvısından elde edilen sitokin konsantrasyonlarının tüm gruplarda kan serumu sitokin konsantrasyonlarından önemli oranda daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, Orsi ve ark.'nın (47) bulduğu verilerle uyum içerisindedir ve bu gözlem uterus gibi lümenli organlarda sitokinlerin konsantrasyonlarının ve etkilerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar için dikkat edilmesi gereken bir husus olarak ele alınmalıdır. Uterus sıvısında sitokin konsantrasyonlarının kan serumundan daha düşük olması yapılan irrigasyonlar sırasında sitokin konsantrasyonlarının dilüe olmasından kaynaklanabilir.

Anti IL-10 ve anti-TGF β uygulamalarının gebeliğin şekillenmesi ve devamı üzerine olan etkileri ile ilgili olarak değişik çalışmalardan birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, fetusun oluşumu ve hayatiyetinin devamı için gebelik sırasında annede immüntoleransın gelişmesi, bunun için de IL-10 ve TGF β 'nın da dahil olduğu immünosupresif bir ortamın oluşması gerekmektedir. Bu noktada IL-10 ve TGF β 'ya karşı geliştirilen nötralize edici antikörlerin, söz konusu sitokinlerin fonksiyonlarını baskılayarak gebeliğin şekillenmesi ve devamını olumsuz etkilemesi mümkündür. Bu hipoteze zıt görüş bildiren Rijhsinghani ve ark. (51) ve White ve ark. (74) gibi araştırmacıların yaptığı yayınlarda, kullanılan

antikorların IL-10 ve TGF β 'yı yeteri kadar nötralize edip etmediği noktasında görüş belirtilmediği gibi kullanılan yöntem, denek sayıları ve türleri konusunda da farklılıklar vardır.

Özet olarak, erken gebeliğin, özellikle implantasyon periyodunun sağlıklı bir şekilde geçirilmesi, reproduktif biyolojinin önemli amaçlarından biridir. Bu tezde de gebeliğin şekillenmesinde IL-10 ve TGF β 'nın öneminin ne olduğunun ortaya konulması hedeflendi ve çiftleşme sonrası bu sitokinlere karşı geliştirilen nötralizan antikorların kullanılması ile de farelerde gebeliğin şekillenmesi engellenmeye çalışıldı. Bu şekilde üremenin denetlenmesi amacıyla yeni bir immünokontrasepsiyon yönteminin geliştirilmesine yönelik veriler elde edilmesi hedeflendi. Fakat, çalışmamızda farelerde çiftleşme sonrası gerek anti-TGF β ve gerekse de anti-IL-10 uygulamalarının gebelik oranlarına etki etmediği gözlemlendi. Bu nedenle, söz konusu çalışmanın daha fazla denek kullanılarak ve/veya diğer türlerde ileri araştırmalarla desteklenmesinin faydalı olacağı kanaatine varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Altman DJ, Schneider SL, Thompson DA, Cheng HL, Tomasi TB. (1990). A Transforming Growth Factor-b2 (TGF-b2)-like Immunosuppressive Factor in Amniotic Fluid and Localization of TGF-b2 mRNA in the Pregnant Uterus. *J Exp Med* 172: 1391–1401.
2. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. (2004). Regulatory T Cells Mediate Maternal Tolerance to the Fetus. *Nat Immun* 5: 266–271.
3. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. (1999). An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells that Inhibit Intestinal Inflammation. *J Exp Med* 190: 995–1004.
4. Balcewicz-Sablinska MK, Gan H, Remold HG. (1999). Interleukin 10 Produced by Macrophages Inoculated with *Mycobacterium avium* Attenuates Mycobacteria Induced Apoptosis by Reduction of TNF- α Activity. *J Infect Dis* 180:1230–1236.
5. Belardelli F. (1995). Role of Interferons and Other Cytokines in the Regulation of the Immune Response. *APMIS*, 103:161–179.
6. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Brackin MN, Hale E, Cowan BD. (1996). Cytokine Expression by Models of Human Trophoblast as Assessed by a Semiquantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Technique. *Am J Reprod Immunol* 36: 285–294.
7. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Stopple JA, Barber WH, Hale E, Brackin MN, Cowan BD. (1998). Cytokine Expression by First Trimester Human Chorionic Villi. *Am J Reprod Immunol* 40: 309–318.
8. Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK. (2002). Regulation of Human Trophoblast Migration and Invasiveness. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 116–124.
9. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliot J, Mosmann T, Wegmann TG. (1995). IL–10 Prevents Naturally Occurring Fetal Loss in the CBA x DBA/2 Mating Combination, and Local Defect in IL–10 Production in this Abortion Prone Combination is Corrected by in vivo Injection of IFN- τ . *J Immunol* 154: 4261–4268.
10. Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittruecker HW, Levy GA. (1998). Cytokine Dependent Abortion in CBA x DBA/2 Mice is Mediated by the Procoagulant fgl2 Prothrombinase. *J Immunol* 160: 545–549.
11. Darrasse-Jeze G, Klatzmann D, Charlotte F, Salomon BL, Cohen JL. (2006). CD4+CD25+ Regulatory/Suppressor T Cells Prevent Allogeneic Fetus Rejection in Mice. *Immunol Lett* 102:106–109.

12. de Jager W, Prakken B, Rijkers GT. (2009). Cytokine Multiplex Immunoassay: Methodology and (Clinical) Applications. *Method Mol Biol* 514: 119-133
13. de Waal Malefyt R, Hanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, De Vries JE. (1991). Interleukin-10 and Viral Interleukin-10 Strongly Reduce Antigen Specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen Presenting Capacity of Monocytes via Downregulation of Class II Major Histocompatibility Complex Expression. *J Exp Med* 174: 915-924.
14. Dealtry GB, Clark DE, Sharkey A, Charnock-Jones DS, Smith SK. (1998). Expression and Localization of the Th2-type Cytokine Interleukin-13 and its Receptor in the Placenta during Human Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 40: 283-290.
15. Del Prete G, Maggi E, Romagnani S. (1994). Human Th1 and Th2 Cells: Functional Properties, Mechanisms of Regulation and Role in Disease. *Labor Invest* 70: 299-306.
16. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. (2005). Cytokines, Chemokines and Growth Factors in Endometrium Related to Implantation. *Hum Reprod Update* 11: 613-630.
17. Dinga YZ, Fua S, Zamarina D, Bromberga J. (2003). Interleukin-10, The Cytokine Handbook (Fourth Edition) Pages 603-625, New York, NY, USA.
18. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. (1997). Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β Inhibit Amniochorion Tumor Necrosis Factor- α Production by Contrasting Mechanisms of Action: Therapeutic Implications in Prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 177: 803-809.
19. Goodwin VJ, Sato TA, Mitchell MD, Keelan JA. (1998). Anti-inflammatory Effects of Interleukin-4, Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β on Human Placental Cells in vitro. *Am J Reprod Immunol* 40: 319-325,
20. Graham CH, Lala PK. (1991). Mechanism of Control of Trophoblast Invasion in Situ. *J Cell Physiol* 148: 232-234.
21. Graham CH, Lysiak JJ, McCrae KR, Lala PK. (1992). Localization of Transforming Growth Factor- β at the Human Fetal-Maternal Interface: Role in Trophoblast Growth and Differentiation. *Biol Reprod* 46: 561-572.
22. Guilbert L, Robertson SA, Wegmann TG. (1993). The Trophoblast as an Integral Component of a Macrophage-cytokine Network. *Immunol Cell Biol* 71: 49-57.
23. Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. (2001). IL-10 is Required for Regulatory T Cells to Mediate Tolerance to Alloantigens in Vivo. *J Immunol* 166: 3789-3796.
24. Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ, Orsi NM. (2005). Nutrient Concentrations in Murine Follicular Fluid and the Female Reproductive Tract. *Theriogenology* 64: 992-1006.

25. Hashii K, Fujiwara H, Yoshioka S, Kataoka N, Yamada S, Hirano T, Mori T, Fujii S, Maeda M. (1998). Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulate Progesterone Production by Luteal Cells Derived from Pregnant Women: Possible Involvement of Interleukin-4 and Interleukin-10 in Corpus Luteum Function and Differentiation. *Hum Reprod* 13: 2738–2744.
26. Herrler A, von Rangob U, Beierb HM. (2003). Embryo-Maternal Signalling: How the Embryo Starts Talking to its Mother to Accomplish Implantation. *Reprod Biomed. Online* 6: 244–256.
27. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Pruffer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. (2004). The Pathogenesis of Schistosomiasis is Controlled by Cooperating IL–10-Producing Innate effector and Regulatory T Cells. *J Immunol* 172: 3157–3166.
28. Ho AS, Moore KW. (1994). Interleukin–10 and its Receptor. *Ther Immunol* 1: 173–185.
29. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299: 1057–1061.
30. Ishida H, Hastings R, Kearney J, Howard M. (1992). Continuous Anti-interleukin 10 Antibody Administration Depletes Mice of Ly-1 Cells but not Conventional B Cells. *J Exp Med* 175: 1213–1220.
31. Ishida H, Hastings R, Thompson-Snipes L, Howard M. (1993). Modified Immunological Status of Anti-IL-10 Treated Mice. *Cell Immunol* 148: 371–384.
32. Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shilito J, Walker JJ. (2000). Evidence of Th1 Type Response Associated with Recurrent Miscarriage. *Fertil Steril* 73: 1206–1208.
33. Jones CA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. (1997). Type–1 and Type–2 Cytokines in Human Late-Gestation Decidual Tissue. *Biol Reprod* 57: 303–311.
34. Josien R, Douillard P, Guillot C, Muschen M, Anegon I, Chetrit J, Menoret S, Vignes C, Souillou JP, Cuturi MC. (1998). A critical role for transforming growth factorbeta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 102: 1920–1926.
35. Keelan JA, Sato TA, Mitchell MD. (1998). Comparative studies on the effects of interleukin–4 and interleukin–13 on cytokine and prostaglandin E2 production by amnion-derived WISH cells. *Am J Reprod Immunol* 40: 332–338.
36. Kulkarni AB, Karlsson S. (1993). Transforming Growth Factorbeta 1 Knockout Mice. A Mutation in One Cytokine Gene Causes a Dramatic Inflammatory Disease. *Am J Pathol* 143: 3–9.
37. Lea RG, Flanders KC, Harley CB, Manuel J, Banwatt D, Clark DA. (1992). Release of a Transforming Growth Factor (TGF)-b2-related Suppressor Factor from Postimplantation Murine Decidual Tissue can be Correlated with the

- Detection of a Subpopulation of Cells Containing RNA for TGF- β 2. *J Immunol* 148: 778–787.
38. Lim KJH, Odukoya OA, Ajjan RA, Lin TC, Weetman AP, Cooke ID. (2000). The Role of T-helper Cytokines in Human Reproduction. *Fertil Steril* 73: 136–142.
 39. Lin HY, Qian D, Zhang X, Liu GY, Wang HM, Zhu C. (2006). Gene Expression of Transforming Growth Factor-beta Receptors Types I and II in Rat Endometrium During the Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Life Sci* 78: 2669-2675.
 40. Lin HY, Wang HM, Li QL, Liu DL, Zhang X, Liu GY, Qian D, Zhu C. (2004). Expression of Smad2 and Smad4, Transforming Growth Factor-Beta Signal Transducers in Rat Endometrium during the Estrous Cycle, Pre-, And Peri-Implantation. *Anim Reprod Sci* 80: 303–316.
 41. Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP. (2006). Hormonal and Cytokine Regulation of Early Implantation. *Trends Endocrin Met* 17: 178-185.
 42. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, De Groote D, Abramowicz D, Velu T, Goldman M. (1994). Interleukin-10 Controls Interferon- γ and Tumor Necrosis factor Production during Experimental Endotoxemia. *Eur J Immunol* 24: 1167-1171.
 43. Mellor AL, Munn DH. (2000). Immunology at the Maternal–fetal Interface: Lessons for T Cell Tolerance and Suppression. *Annu Rev Immunol* 18: 367–391.
 44. Miyaura H, Iwata M. (2002). Direct and Indirect Inhibition of Th1 Development by Progesterone and Glucocorticoids. *J Immunol* 168: 1087-1094.
 45. Morrish DW, Dakour J, Li H. (1998). Functional Regulation of Human Trophoblast Differentiation. *J Reprod Immunol* 39: 179–195.
 46. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. (2003). Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 170: 3939–3943.
 47. Orsi N, Ekbote U, Walker JJ, Gopichandran N. (2007). Uterine and Serum Cytokine Arrays in the Mouse during Estrus. *Anim Reprod Sci* 100: 301–310.
 48. Ostroukhova M, Ray A. (2005). CD25+T Cells and Regulation of Allergen induced Responses. *Curr Allergy Asthma R* 5: 35–41.
 49. Raghupathy R. (1997). Th1-type Immunity is Incompatible with Successful Pregnancy. *Immunol Today* 18: 478–482 .
 50. Raghupathy R. (2001). Pregnancy: Success and Failure within the Th1/Th2/Th3 Paradigm. *Semin Immunol* 13: 219–227.
 51. Rijhsinghani AG, Thompson K, Tygrett, L, Bhatia SK. (1997). Inhibition of Interleukin-10 during Pregnancy Results in Neonatal Growth Retardation. *Am J Reprod Immunol* 37: 232-235.
 52. Rişvanlı A, Gödekmerdan A. (2011). Gebelikte T Regülâtör Hücreler ve Sitokinler. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, (In press).

53. Rivera DL, Olister SM, Liu X, Thompson JH, Zhang XJ, Pennline K, Azuero R, Clark DA, Miller MJ. (1998). Interleukin-10 Attenuates Experimental Growth Restriction and Demise. *FASEB J*, 12: 189–197.
54. Röcken M, Racke M, Shevach EM. (1996). IL-4-Induced Immune Deviation as Antigen-Specific Therapy for Inflammatory Autoimmune Disease. *Immunol Today* 17: 225–231.
55. Robertson SA, Allanson M, Mau VJ. (1998). Molecular Regulation of Uterine Leukocyte Recruitment during Early Pregnancy in the Mouse. *Trophoblast Res* 11: 101–120.
56. Robertson SA, Guerin LR, Bromfield JJ. (2006). Male Seminal Constituents Activate Expansion of the T Regulatory Cell pool in Early Pregnancy. *J Reprod Immunol* 71: 135–176.
57. Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. (2002). Transforming Growth Factor Beta—a Mediator of Immune Deviation in Seminal Plasma. *J Reprod Immunol* 57: 109–128.
58. Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. (1992). Uterine Epithelial Cells Synthesize Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-6 in Pregnant and Nonpregnant Mice. *Biol Reprod* 46: 1069–1079.
59. Robertson SA, Seamark RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. (1994). The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol* 14: 239–292.
60. Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. (1996). Human Placental Cytotrophoblasts Produce the Immunosuppressive Cytokine Interleukin 10. *J Exp Med* 184: 539–548.
61. Roth I, Fisher SJ. (1999). IL-10 is an Autocrine Inhibitor of Human Placental Cytotrophoblast MMP-9 Production and Invasion. *Dev Biol* 205: 194–204.
62. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. (1992). Interleukin-10 is a Potent Growth and Differentiation Factor for Activated Human B Lymphocytes. *P Natl Acad Sci USA* 89: 1890–1893.
63. Schumacher A, Wafula PO, Zambon BA. (2007). Mechanisms of Action of Regulatory T Cells Specific for Paternal Antigens During Pregnancy. *Obstet Gynecol* 110: 1137–1145.
64. Slager HG, Van Inzen W, Freund E, Van den Eijnden-Van Raaij AJ, Mummery CL. (1993). Transforming Growth Factor-beta in the Early Mouse Embryo: Implications for the Regulation of Muscle formation and Implantation. *Dev Genet* 14: 212–224.

65. Standiford TJ, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. (1995). Neutralization of IL-10 Increases Lethality in Endotoxemia: Cooperative Effects of Macrophage Inflammatory Protein-2 and Tumor Necrosis Factor. *J Immunol.* 155: 2222-2229.
66. Staples KJ, Bergmann M, Barnes PJ, Newton R. (2000). Stimulus-Specific Inhibition of IL-5 by cAMP-Elevating Agents and IL-10 Reveals Differential Mechanisms of Action. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 811–815.
67. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. (2000). Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25(+)CD4(+) Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Exp Med* 192: 303–310.
68. Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA. (1998). Seminal Transforming Growth Factor beta1 Stimulates Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production and Inflammatory Cell Recruitment in the Murine Uterus. *Biol Reprod* 58: 1217–1225.
69. Trinchieri G. (1993). Interleukin-12 and Its Role in the Generation of Th1 Cells. *Immunol Today* 14: 335–338.
70. Vigano` P, Somigliana E, Mangioni S, Vignali M, Vignali M, Di Blasio AM. (2002). Expression of Interleukin-10 and Its Receptor is Up-Regulated in Early Pregnant Versus Cycling Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5730–5736.
71. Vince G, Shorter S, Starkey P, Humphreys J, Clover L, Wilkins T, Sargent I, Redman C. (1992). Localization of Tumour Necrosis Factor Production in Cells at the Materno/fetal Interface in Human Pregnancy. *Clin Exp Immunol* 88: 174–180.
72. Wahl SM. (1994). Transforming Growth Factor-beta: The Good, the Bad, and the Ugly. *J Exp Med* 180: 1587-1590.
73. Weiner HL. (2001). Oral Tolerance. Immune Mechanisms and the Generation of Th3-type TGF-beta Secreting Regulatory Cells. *Microbes Infect* 3: 947–954.
74. White CA, Johansson M, Roberts CT, Ramsay AJ, Robertson SA. (2004). Effect of Interleukin-10 Null Mutation on Maternal Immune Response and Reproductive Outcome in Mice. *Biol Reprod* 70: 123–131.

8. ÖZGEÇMİŞ

Malatya'da 1972 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya'da tamamladım. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1994 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladım. Bu anabilim dalında 2001 yılında doktora eğitimimi tamamladım. 2004 yılında Doçent ve 2009 yılında da Profesör unvanı aldım. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı'nda 2009 yılında Yüksek Lisans eğitimine başladım. Evli ve iki çocuk babasıyım.