

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKSTE NOTCH SİNYALİZASYONU ÜZERİNDE  
İNDOMETAZİN İLE SURFAKTAN-A' NIN ROLÜNÜN  
BELİRLENMESİ VE PRETERM DOĞUMUN ÖNLENMESİ**

Sema AVCI

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKSTE NOTCH SİNYALİZASYONU ÜZERİNDE  
İNDOMETAZİN İLE SURFAKTAN-A' NIN ROLÜNÜN  
BELİRLENMESİ VE PRETERM DOĞUMUN ÖNLENMESİ**

Sema AVCI

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Emmet HIRSCH**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3256 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 21/06/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof.Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr. Sait POLAT  
Çukurova Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Selahattin KUMRU  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr. Sevil ÇAYLI  
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Narin DERİN  
**Enstitü Müdürü**

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Sema AVCI

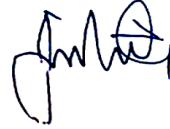
İmza



Tez Danışmanı

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

İmza



## TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesi sırasında, her konuda desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL'e,

Birlikte çalıőtığımız zaman zarfında bana laboratuvarını açarak, her tÜrlÜ imkan ve desteği tarafıma sağlayan ikinci danışman hocam Prof. Dr. Emmet HIRSCH'e,

İhtiyacım olduğunda her zaman tarafıma destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tÜm hocalarına ve arkadaőlarıma,

Sağlık Bilimleri EnstitÜsÜ çalıőanlarına ayrıca yurtdıőında tez çalıőmalarımı gerçekleştirme fırsatını tarafıma sunan TUBITAK'a,

Tez çalıőmamın her aőamasında daima yanımda olarak bana destek olan değerli eőim Hasan H. AVCI' ya ve kıymetli oğullarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Mekanizmalar açık olmasa da, enfeksiyon preterm doğum için öne sürülen en önemli nedenlerden biridir. Bu nedenle tedavi odaklı pek çok çalışma yapılmaktadır. Surfactant A (SP-A) gebelik için mükemmel bir güvenlik profiline sahip endojen fetal bir maddedir. Bu çalışmanın amacı; SP-A ve bir prostaglandin inhibitörü olan İndomethacin (IND)'nin erken doğumu önleme potansiyelini daha ayrıntılı tanımlamak ve SP-A'nın gebelerde preterm doğum için koruyucu bir ajan olarak kullanım potansiyelini belirleyebilmektir.

**Yöntem:** RAW (267.7 Mouse Macrophage Cell) ve RAW Blue (267.7 Mouse Macrophage Reporter Cell Line) hücrelerinin kullanıldığı kültür ortamında, SP-A ile fragmentlerine ait doz ve etki süresi belirlenmesi yapılarak, SP-A ve IND'nin etkisi, lipopolysaccharide (LPS) indüklü cerrahi model üzerinde, koitus sonrası 14.5 günlük gebe CD-1 fareleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** 5 saatlik 0.2 ng/ml LPS indüksiyonu sonrası RAW hücrelerinde Polymerase Chain Reaction (PCR) ile doğrulanan Interlökin 1 beta (IL1 $\beta$ ) ekspresyonunun oluşturduğu inflamatuvar cevabı, SP-A; 20 ug/ul ile baskılamaktadır. Aynı doz LPS ile indüklenen deney hayvanı modelinde LPS aracılı erken doğum yapan grupta Notch aktivitesinin arttığı ve SPA ve IND'nin özellikle mast hücreleri ile Jag-2 aracılı modülasyon yaptığı görüldü.

**Sonuç:** SP-A ve fragmentlerine ait doz zaman eğrisi incelendiğinde, SP-A'nın inflamatuvar yanıtı baskıladığı ancak SP-A'yı oluşturan parçaların farklı cevap özelliklerine sahip olabileceği görülmüştür. Ayrıca, SP-A'nın moleküler etki mekanizmasının karakterize edilmesinde Notch sinyali ile bağlantısının incelenmesinin önemli olduğu tespit edildi. Bu alanda daha çok araştırmanın yapılmasına ihtiyaç duyulmakla birlikte, bu çalışma, SP-A için, tedavi amaçlı ilaç dizaynına yardımcı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** SP-A, Indomethacin, Notch, Serviks

## ABSTRACT

**Objective:** Although the mechanisms are not clear, infection is one of the most important reasons for preterm labor. For this reason, many studies are carried out for treatment. Surfactant A (SP-A) is an endogenous fetal substance with an excellent safety profile for pregnancy. The aim of this study is to identify the potential of indomethacin (IND) which is a prostaglandin inhibitor and of the SP-A as a protective agent for preterm delivery in pregnant women.

**Method:** The dose-effect duration of SP-A and fragments was determined using RAW and RAW Blue cells. The effect of SP-A and Indomethacin was evaluated on a LPS induced surgical model using 14.5 dpc CD-1 mice.

**Results:** After induction with 0.2 ng/ml LPS for 5 hours, expression of IL1 $\beta$  by PCR in RAW cells was evaluated. This effect was suppressed in RAW Blue cells with 20 ug/ml and evaluated by Quanti Blue analysis. The response of the fragments is different depending on the dose and time. Molecular structure after Commassie Blue staining; the monomeric (24 kDa) and dimeric (50-60 kDa) for the full-length SP-A. KINK (22 kDa) was detected as CDM (4 kDa) with GLOB (28 kDa) and PL (2 kDa) with smaller fragments. In the experimental animal model induced by the same dose LPS. The Notch activity in the LPS-mediated preterm delivery group was increased. At the same time, SPA and IND affected the Jag-2 mediated mast cell modulation.

**Conclusion:** When the dose time curve of SP-A and fragments was examined, it was seen that SP-A suppressed the inflammatory response, but SP-A components had different response characteristics. In addition, it was determined that SP-A was important to investigate the linkage of Notch signal in characterizing the molecular mechanism of action. Although more research is needed in this area, this study will help the design to drug for SP-A.

**Keywords:** SP-A, Indomethacin, Notch, Cervix

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	x
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	
2.1. Notch Sinyal Yolağı ve Erken Doğum İlişkisi	6
2.2. Prostaglandinler ve Erken Doğum İlişkisi	9
2.3. Erken Doğum ve Enfeksiyon İlişkisi	14
2.4. Sürfaktan-A (SP-A)'nın Süreçteki Rolü	18
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	
3.1. SP-A Ekstratının Hazırlanması	27
3.1.1. Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Analizi	28
3.1.2. Toxin Eraser Endotoxin Uzaklaştırma	29
3.1.3. Bicinchoninic Acid (BCA) Ölçümü	30
3.2. Coomassie Blue Boyaması	30
3.3. LPS Uygulaması	31
3.4. Hücre Kültürü	31
3.4.1. Raw ve Raw Cell Blue Hücre Kültürü	32
3.5. Quanti-Blue Analizi	33
3.6. Polymyxin Denaturasyonu	33
3.7. RT (Real Time)-PCR	33
3.8. İmmünohistokimyasal Analizi	34
3.9. Protein Ekstraksiyonu ve Western Blot Analizi	35
3.10. İstatistiksel Analiz	36



<b>4. BULGULAR</b>	
4.1. BCA Ölçümleri	39
4.2. Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Analizi ve Toxin Eraser Endotoxin Uzaklaştırma	40
4.3. Coomassie Blue Boyaması	41
4.4. LPS Uygulaması ve RT-PCR	42
4.5. LPS Uygulaması ve Raw Blue Hücrelerinde SP-A/Fragment ve Polymyxin Cevabı	44
<b>4.6. Immunohistokimyasal Bulgular</b>	
4.6.a. Hemotoksilen-Eosin Boyama	49
4.6.b. COX-1 Immünohistokimyasal Boyanma	50
4.6.c. SP-A Immünohistokimyasal Boyanma	51
4.6.d. NOTCH-1 Immünohistokimyasal Boyanma	52
4.6.e. DLL-1 Immünohistokimyasal Boyanma	53
4.6.f. JAG-2 Immünohistokimyasal Boyanma	54
4.6.g. TLR-2 Immünohistokimyasal Boyanma	56
4.6.h. TLR-4 Immünohistokimyasal Boyanma	57
<b>4.7. Western Blot Bulguları</b>	
4.7.a. COX-1	58
4.7.b. SPA	59
4.7.c. NOTCH-1	60
4.7.d. DLL-1	61
4.7.e. JAG-2	62
4.7.f. TLR-2	63
4.7.g. TLR-4	64
<b>5. TARTIŞMA</b>	65
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	80
<b>KAYNAKLAR</b>	81

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Surfaktan Türlerinin İşlevleri ve Ticari Olarak Bulunma Durumları	<b>19</b>
<b>Tablo 2.</b>	Farelere Uygulanan İşlemler ve Zaman Diyagramı	<b>28</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b>	Acien' in Uterovaginal Embriyoloji Teorisi	5
<b>Şekil 2.</b>	Notch Sinyal Yolağı ve Reseptör Ligand İlişkisi	7
<b>Şekil 3.</b>	Amniyo-koryon, Desidua İnflamasyonu ve Preterm Eylem İlişkisi	10
<b>Şekil 4.</b>	Prostaglandinlerin Dönüşüm Mekanizması ve Tez İçerisinde Yer Alan Tedavi Edici Ajanların Olası Etkileri	12
<b>Şekil 5.a</b>	TLR Reseptör ve Ligandları	16
<b>Şekil 5.b</b>	SP-A'nın Makrofajlarda TLR Ekspresyonu ve Sinyalleşmesini Düzenleme Mekanizması	16
<b>Şekil 6.</b>	Gebelik Süresince Makrofaj Polarizasyonu	18
<b>Şekil 7.</b>	Surfaktan türleri	19
<b>Şekil 8.</b>	Surfaktan A ve D moleküler yapı farkları	20
<b>Şekil 9.</b>	Surfaktan A elektroforezi	23
<b>Şekil 10.</b>	İnsan ve Farede Gebelik Dönemleri (Trimester-Gün Eşleşmesi)	25
<b>Şekil 11.</b>	Fare Yaşam Döngüsü ve CD-1 Fareler için Haftalara Göre Ağırlık Tablosu	27
<b>Şekil 12.</b>	Bicinchoninic Acid (BCA) Ölçüm Değerleri	39
<b>Şekil 13.</b>	Toksin Uzaklaştırma İşlemi Öncesi Örneklerde Tespit Edilen Toksin Miktarları	40

<b>Şekil 14.</b>	Toksin Uzaklaştırma İşlemi Sonrası Örneklerde Tespit Edilen Toksin Miktarları	41
<b>Şekil 15.</b>	SP-A ve Fragmentlerine ait Görüntülenen kDa Değerleri	42
<b>Şekil 16.</b>	Raw Blue Hücrelerinin LPS' ye bağlı Quanti-Blue Ölçümleri	43
<b>Şekil 17.a.</b>	10x10 <sup>4</sup> hücre ile gerçekleştirilen Quanti-Blue ölçümleri sonucu doza bağımlı zaman grafiği	44
<b>Şekil 17.b.</b>	10x10 <sup>4</sup> ve 2x10 <sup>4</sup> hücre ile gerçekleştirilen kültürde zamana bağlı olarak LPS' ye verilen cevap grafiği.	44
<b>Şekil 18.</b>	LPS indüksiyonu sonrası IL1 $\beta$ ekspresyonunun internal kontrol GAPDH ile karşılaştırılması	44
<b>Şekil 19.</b>	Sadece SP-A ve SP-A ile birlikte LPS indüksiyonu sonrası baskılama cevabı	45
<b>Şekil 20.a</b>	LPS ve SP-A Fragmentlerinin Zamana Bağımlı Doz Cevabı	46
<b>Şekil 21.a.</b>	Endotoksin-Removal Filtresi İçerisinde Kullanılan Polymyxin' in Sisteme Etkisinin Gösterilmesi	47
<b>Şekil 22.b.</b>	Kaynatılmış Polymyxin' in ve SP-A fragmenti R-PL' in LPS üzerindeki etkisinin karşılaştırılarak volüm ile ilişkisinin gösterilmesi.	48
<b>Şekil 23.</b>	Servikte Hematoksilen Eosin Boyanması	49
<b>Şekil 24.</b>	Servikte COX-1 Boyanması	50
<b>Şekil 25.</b>	Servikte SP-A Boyanması	51
<b>Şekil 26.</b>	Servikte Notch-1 Boyanması	52
<b>Şekil 27.</b>	Servikte DLL-1 Boyanması	53

<b>Şekil 28.</b>	Servikste Jag-2 Boyanması	54
<b>Şekil 29.a</b>	Servikste Jag-2 Boyanması (Gebe Kontrol)	55
<b>Şekil 29.b</b>	Servikste Jag-2 Boyanması (SP-A Block)	55
<b>Şekil 30</b>	Servikste TLR-2 Boyanması	56
<b>Şekil 31.</b>	Servikste TLR-4 Boyanması	57
<b>Şekil 32.</b>	COX-1 western blot analizi	58
<b>Şekil 33.</b>	SPA western blot analizi	59
<b>Şekil 34.</b>	Notch-1 western blot analizi	60
<b>Şekil 35.</b>	DLL-1 western blot analizi	61
<b>Şekil 36.</b>	Servikste Jag-2 Boyanması (SP-A Block)	62
<b>Şekil 37.</b>	TLR-2 western blot analizi	63
<b>Şekil 38.</b>	TLR-4 western blot analizi	64

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ADAM</b>	: Containing a Disintegrin and Metalloprotease
<b>APH</b>	: Anterior Pharynx-Defective 1
<b>COX-1</b>	: Siklooksijenaz-1
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>CRD</b>	: C-terminal karbonhidrat tanıma bölgesi
<b>DLL</b>	: Delta-Like
<b>Dpc</b>	: Days post coitum
<b>EGF</b>	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
<b>IND</b>	: Indomethacin
<b>JAG</b>	: Jagged
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharides (Lipopolisakkarit)
<b>PEN2</b>	: Presenilin Enhancer 2
<b>PTL</b>	: Preterm Labor (Erken doğum)
<b>SP-A</b>	: Surfactant-A
<b>SIRP-<math>\alpha</math></b>	: Signal Regulatory Protein
<b>TLR</b>	: Toll Like Receptor
<b>15-OH-PGDH</b>	: 15-Hidroksi Prostaglandin Dehidrogenaz
<b>OXTR</b>	: Oksitosin Reseptörü
<b>TX</b>	: Tromboksan
<b>CX43</b>	: Connexin 43

## 1. GİRİŞ

Erken doğum (preterm eylem/doğum), gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere, tüm dünyada doğumsal anomalilere bağlı olmayan yenidoğan morbidite ve mortalitesinin en önemli sebeplerindendir (Lawn, Cousens et al. 2005);(Goldenberg, Culhane et al. 2008). Erken doğum sonucu prematür yenidoğanlar, gelişimsel gecikme, solunum yolu hastalıkları, nörolojik hastalıklar, görme bozukluğu gibi ömür boyu bakım ve tedaviyi gerektiren malformasyonlara duyarlıdır. Preterm doğum sonrası hayatta kalan bebeklerin, term bebeklere göre nörolojik bozukluk yaşama olasılığı 10 kat daha fazladır. Yenidoğan ve çocuk bakımı alanlarındaki ilerlemeler ve prenatal steroidlerin risk altında olan kadınlara uygulanması, prematür bebeklerin sonuçlarını iyileştirirse de, preterm doğum insidansı kabul edilemeyecek kadar yüksektir (%11.1) (Blencowe, Cousens et al. 2012). Ülkemiz için ise, bu oran %10-15 arasında değişmektedir (WHO 2012). Yıllık tedavi maliyetleri ise, gelişmiş ülkelerde bile çok yüksektir (Howson, Kinney et al. 2013). Yıllık 1.1 milyon ölüm ile 5 yaş altındaki infantların en sık ikinci ölüm nedeni olan (Lawn, Cousens et al. 2005);(Chin, Dorian et al. 2016) preterm doğumu azaltmak için günümüzde mevcut en etkili müdahale olarak kabul edilen prenatal progesteron uygulaması da, bilinmeyen mekanizmalarla işlev görür ve risk altındaki belirli bir grup için koruyucudur (da Fonseca, Bittar et al. 2003);(Hassan, Romero et al. 2011);(Meis, Klebanoff et al. 2003). Bu gerçekler, doğum nedenleri ve mekanizmaları konusundaki anlayış eksikliklerinin devam ettiğini göstermektedir. Preterm eylem konusundaki çalışmalar; birey, aile ve toplum için büyük bir önem arz eden bir acı kaynağını ve potansiyel maliyet yükünü ortadan kaldırabilmek için, yeni ve şiddetle ihtiyaç duyulan terapötik seçenekleri geliştirmek için kritik bir öneme sahiptir.

*Hipotezimiz;* “SP-A ve IND, LPS’ nin yol açtığı erken doğum eylemini, servikte Notch sinyalizasyonunda meydana gelen değişiklikleri tersine çevirerek önler” şeklindedir. Bu değişikliklerin oluşumunda rol aldığını düşündüğümüz; SP-A ile Notch ve TLR2 (Toll Like Receptor) arasındaki ilişkinin tespiti, erken doğum eyleminin bastırılması ve engellenmesi sürecinin anlaşılması noktasında katkı sağlayacağını düşünüyoruz. LPS kullanarak erken doğumun koryodesidual olarak uyarılması, insan patogenezi

yakından modelleyerek terapötiklerin doğru bir şekilde tasarlanmasına yardımcı olmaktadır.

*Bu çalışmanın amacı;* SP-A ve IND' nin erken doğumu önleme potansiyelinin daha ayrıntılı tanımlanması ve SP-A' nın gebelerde preterm doğum için koruyucu bir ajan olarak kullanım etkinliğinin belirlenebilmesidir. Bir endojen fetal madde olarak olarak üretilen SP-A, gebelikte mükemmel bir güvenlik profiline sahip olma gücündedir. SP-A' nın etkisini doğrulamak daha sonra potansiyel risklerin değerlendirilebilmesine ve SP-A'nın moleküler etki mekanizmasının da karakterize edilmesine olanak sağlayacaktır. Bu çalışma geliştirilmiş performans özelliklerine ve güvenliğe sahip SP-A için sentetik ilaçların nihai dizaynına da yardımcı olacaktır. Daha önceki verilere ek olarak, bu deney modeli ayrıca doğum sürecinde önemli bir rolü olduğunu düşündüğümüz serviks üzerinde de, SP-A'nın oluşturduğu bölgesel değişimi görme fırsatını bizlere sunacaktır. Ayrıca klinikte ve pekçok çalışmada serklaj ile birlikte kullanılan İndometazin, Notch sinyal yolağı üzerindeki etkinliğinin belirlenebileceği gibi, serviks üzerinde oluşturduğu histolojik ve moleküler değişim de SP-A ile karşılaştırılabilecektir. Her iki maddenin de serviks üzerindeki rolleri açık değildir. SP-A'nın, LPS ile indüklenen ve enfeksiyona bağlı preterm eylemi, hücrel reseptörlerle etkileşim yoluyla önlediğini düşünülebilir. Serviksteki etkinliği ve moleküler mekanizması, teyit edilmesi erken doğumun önlenmesine yönelik olarak etkili ve güvenilir ilaçların tasarlanması ve tedavi sürecine girişi ile ilgili ileri aşama çalışmalar için aydınlatıcı olabilecektir. Enfeksiyona bağlı erken doğum eyleminin önlenmesi için SP-A'nın test ediliyor olması hastalar için yeni bir terapi potansiyeli taşımaktadır. Sık rastlanan inflamatuvar yolaklar preterm doğumun çoğunda (açık enfeksiyöz etken veya inflamatuvar neden bulunmayanlar da dahil olmak üzere) aktive olduğundan, SP-A, halen "idiopatik" olarak sınıflandırılan kanıtlanmış enfeksiyonu bulunmayan vakalarda da faydalı olabilir. Buna ek olarak, SP-A' nın, sadece gebeler için değil, aynı zamanda geçmişte erken doğum hikayesi, çoklu gebelik, kısa serviks veya diğer faktörler nedeniyle preterm doğum riski taşıyanlarda da profilaksi için yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilmesi muhtemeldir.



## 2. GENEL BİLGİLER

Erken doğumu; 37. haftadan önce doğum eyleminin başlaması olarak tarif edilebiliriz. Daha alt kategorilere ayırdığımızda; <28 haftadan önceki doğumlar son derece erken, 28 ila 32 hafta arası çok erken ve 32 ile 37 hafta geç preterm eylem olarak tanımlanmaktadır (Nour 2012).

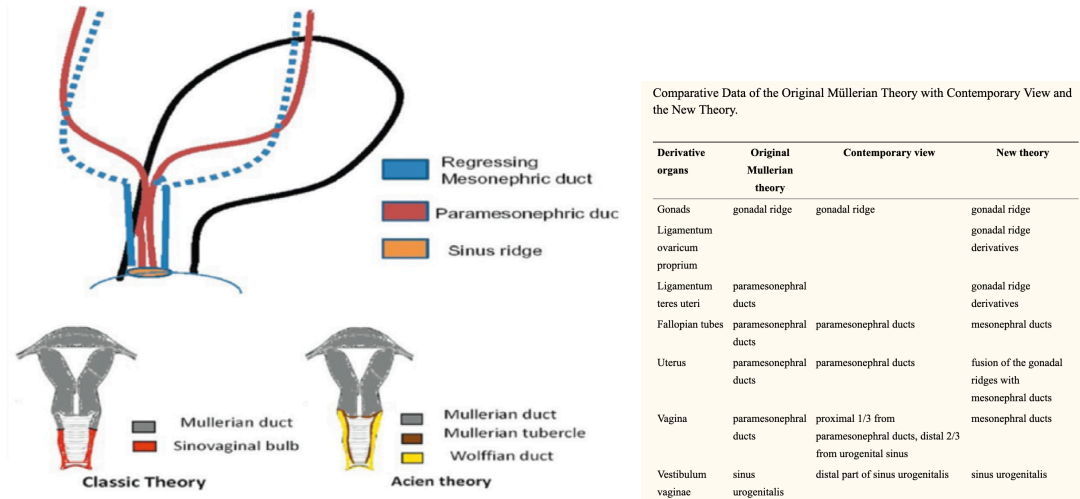
Enfeksiyon kaynaklı erken doğum eyleminin altında yatan en yaygın hipotetik mekanizma, vajinal patojenlerin artan kolonizasyonunun gestasyonal kavitede artması ve transplasental ya da hematojen geçişin bu yolla sağlanmasıdır (Goldenberg, Culhane et al. 2008). Vajinal patojenlerin bu yol ile amnion zarına kadar ulaşabileceği gösterilmiştir (Romero, Dey et al. 2014).

Spontan preterm eylem için pek çok öncül bilinmektedir. Bunlar; enfeksiyon/inflamasyon, çoğul gebelik, intrauterin kanama, hormonal/stres vb. olarak özetlenebilir. Gestasyonel bölmedeki enfeksiyon, preterm eylemlerin % 50' sinde veya daha fazlasında bulunur (Klein and Gibbs 2004). Elde edilen bulgular; enfeksiyonun, inflamasyonun indüksiyonu (örneğin, sitokinler, prostaglandinler, proteazlar ve diğer mediatörler) yoluyla preterm eylemi başlattığını göstermektedir (Agrawal and Hirsch 2012);(Hirsch and Wang 2005);(Lamont, Nhan-Chang et al. 2011). İnflamatuvar basamaklar, enfeksiyon yokluğunda ya da uzak bölmedeki (ağız boşluğu ya da böbrek gibi) bakteriler tarafından aktive edilebildiğinden (Wenstrom, Andrews et al. 1998);(Yoon, Oh et al. 2001);(Offenbacher, Katz et al. 1996), preterm doğumda klinik vakalarda enfeksiyonun rolü tam belirlenmemektedir. Preterm eylemli hastalarda amniyotik sıvıda inflamatuvar belirteçler ve kültüre edilebilir bakteriler yüksektir (Shim, Romero et al. 2004);(Yoon, Romero et al. 2001).

Koryodesidual alan (iç uterin yüz ve dış amniyotik kese arasındaki potansiyel boşluk) ve miyometriyum, inflamasyon kaynaklı eylem sırasında başlatıcı sinyallerin ve efektör süreçlerinin üretildiği yerdir (Elovitz and Mrinalini 2004);(Goldenberg, Hauth et al. 2000);(Gravett, Hitti et al. 2000);(Vanderhoeven, Bierle et al. 2014). Fetal inflamatuvar yanıtın ise birincil preterm eylem nedeni olmadığı, ikincil bir fenomen olduğuna dair

kanıtlar vardır (Gomez, Romero et al. 1998). Hem normal hem de patolojik doğum mekanizmaları iyi anlaşılammış olsa da, enfeksiyon ve/veya inflamasyonun, preterm doğum vakalarının büyük bir kısmı için öne sürülen bir neden olduğu açıktır.

Tüm doğum süreci gözden geçirildiğinde serviks te en az uterus kadar önemlidir. Bugün uterovaginal embriyoloji bilgilerinin yeniden şekillendirilmesi sürecinde ortaya atılan teoriler, belki de serviksin sadece uterusun bir parçası olarak değil, embriyolojik olarak farklı kökene sahip (Şekil 1) (Acien 1992, Makiyan 2016) iki yapı arasında bir geçiş kapısı olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Bu durumda, serviks farklı fizyolojik cevaplar oluşturabileceği gibi, farklı süreçleri de kontrol edebilme olasılığına sahiptir.



Şekil 1. Klasik teori, Acien' in uterovaginal embriyoloji teorisi ve yeni yaklaşımlar (Acien 1992) (Bajaj, Misra et al. 2012), (Makiyan 2016).

Histolojik olarak incelendiğinde; kollajen, serviksin kuru ağırlığının %80'ini oluşturur. Serviks İnternal os'tan eksternal os'a uzanan ve diğer dokulara göre çok daha ince elastik liflere sahiptir ve kas miktarı ise eksternal osa doğru azalır. Doğumun başlangıcından önce, servikte kollajen ve konnektif doku değişiklikleri meydana gelir ve olgunlaşma sürecinde, kollajen konsantrasyonlarındaki azalmayı servikal esneklikteki artış izler (Leppert 1995);(Kleissl, van der Rest et al. 1978);(Kao and Leslie 1977).

Serviks, doğumun başlaması ve gerçekleştirilmesinde, olgunlaşma açısından çok önemlidir. Serviksin olgunlaşması, fizyolojik bir süreçtir. Bu süreç; bağ doku ve temel elemanların biyokimyasal ve yapısal değişikliklerini içerir. Doğumdan birkaç hafta öncesine kadar, sert ve kapalı olan servikte meydana gelen biyokimyasal ve biyomekanik değişiklikler sonucu, servikte yumuşama, silinme ve açılma meydana gelir. Bu sürece, serviksin olgunlaşması denir. Serviksin zamanında olgunlaşması doğum sürecinin sağlıklı olmasını için esastır. Serviksin olgunlaşması, uterus aktivitesini uyarabilir. Sürekli uterin kontraksiyonlar, serviks olgunlaşmasının bir sonucudur (Danforth, Buckingham et al. 1960, Leppert 1995).

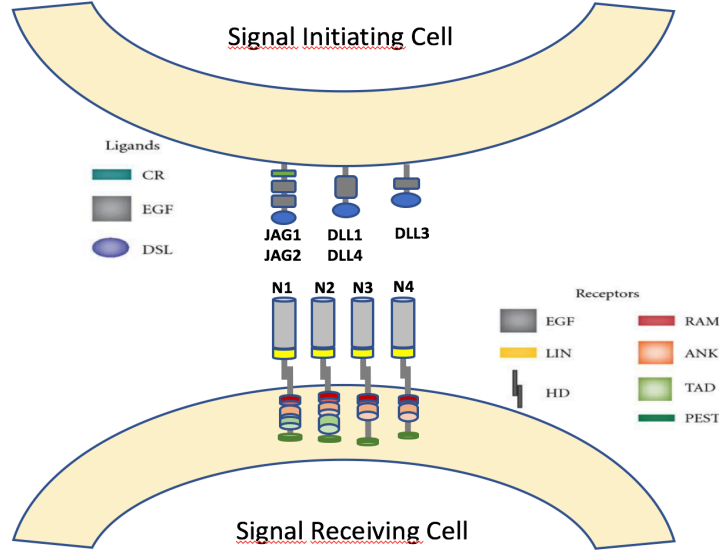
### **2.1. Notch Sinyal Yolağı ve Erken Doğum İlişkisi**

Notch sinyal yolağının en basitten en gelişmişe kadar tüm canlılar aleminde korunmuş olduğu düşünülmektedir. 1917 yılında, genetikçi Thomas Hunt Morgan ve arkadaşları tarafından tanımlanan Notch'lar, *Drosophila* kanatlarında ilk olarak tespit edilmiş, 1980'lerde ise klonlanmıştır. Sıradışı transmembran reseptörler olan Notchlar, membrana bağlı ligandları ile aktive olur (Radtke, Fasnacht et al. 2010).

Notch reseptörleri (insanda heterodimerik 1-4) ve onun ligandları "Delta ve Serrate"nin her ikisi de temel olarak epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrardan oluşan hücre dışı etkili transmembran proteinlerdir. Notch; Delta (insanlarda Delta-like olarak da adlandırılır) ve Serrate (insanlarda Jagged olarak adlandırılır) transmembran ligandları ile etkileşerek komşu hücreler üzerindeki kısa menzilli sinyalleri ileten bir hücre-yüzey reseptörüdür (Schweisguth 2004);(Bray 2006).

Sinyali başlatan hücreler, Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4) ya da Jagged (JAG1, JAG2) ailesine ait Notch ligandlarını eksprese ederler. Notch sinyalini alan hücreler ise, Notch reseptörleri eksprese ederler. Notch sinyali, Notch reseptörleri ile onların ligandları olan Delta ya da Jagged arasındaki etkileşimler sonucunda hücre-hücre bağlantılarıyla aktive olur (Ersvaer, Hatfield et al. 2011).

Notch ligandları Notch reseptörleri ile etkileşim için gerekli olan bir N-terminal DSL (Delta, Serrate ve LAG-2) domeyni ile karakterizedir. Ligandlar, sistein zengin (CR) domeynin varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak Delta ve Serrate olarak sınıflandırılmaktadır (Bray 2006);(Sprinzak, Lakhanpal et al. 2010). Notch reseptör ve ligand ilişkisi Şekil 2’de özetlenmiştir.



Şekil 2. Notch sinyal yolağı ve reseptör ligand ilişkisi (Ersvaer, Hatfield et al. 2011)’den uyarlanmıştır.

Notch ilk olarak endoplazmik retikulumda bir polipeptid öncülü olarak sentezlenir ve daha sonra bir konvertaz tarafından yarıklanır. İlk yarıklanma ADAM (containing a disintegrin and metalloprotease) ailesi metalloproteazları tarafından katalizlenirken, ikincisi presenilin, nikastrin, presenilin enhancer 2 (PEN2) ve anterior pharynx-defective 1 (APH) içeren bir enzim kompleksi olan  $\gamma$ -sekretaz aracılıdır. İkinci yarıklanma ile, Notch hücre içi domeynini (NICD) serbest bırakır. Ligand olmadığında, nükleer hücre içi domeyne bağlanılamadığı için, Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBP-J) korepresör kompleksleri aracılığıyla Notch hedef genleri baskılanır. NICD’nin RBP-J’ye bağlanması, baskılanmış durumdan aktif duruma geçmede oldukça önemlidir.

RBP-J ilişkili kofaktörler ve belirli epigenetik işaretler, Notch hedef gen ekspresyonunun farklı hücre tiplerinde spesifikliğini belirlemektedir. Notch bazı durumlarda hücre proliferasyonunu, bazı durumlarda ise apoptozu başlatır. Farklı yanıtların Notch'un diğer yollarla etkileşimine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Ersvaer, Hatfield et al. 2011);(Borggreffe and Oswald 2009);(Doria, Laccarino et al. 2006).

Notch reseptörü vasıtasıyla komşu hücreler arasında değiştirilen sinyaller, sonunda hücre kaderini belirleyen moleküler aracılığı ile farklılıklar meydana getirebilir. Bu nedenle, Notch sinyalleri, hücrelerin belirli gelişim programlarını ortaya çıkarmak üzere gerekli olan içsel veya dışsal gelişim ipuçlarına nasıl tepki verdiğini kontrol eder. Notch aktivitesi, farklılaşma, çoğalma ve apoptotik programların uygulanmasını etkileyerek organ oluşumunu ve morfogenezi etkilemek için genel bir gelişim aracı olarak işlev görme potansiyeline sahiptir (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999).

Notch sinyali, omurgalılarda vasküler gelişim ve fizyoloji sırasında sayısız rol oynar. Bu roller arasında hem endotel hücrelerinde hem de vasküler düz kas hücrelerinde arteriyovenöz spesifikasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesi, normal ve patolojik anjiyogenez sırasında kan damarı filizlenmesi ve dallanmasının düzenlenmesi ile damar düz kas hücrelerinin fizyolojik tepkileri yer alır (Gridley 2010).

Literatüre eklenen LPS/PGN/Poly (I:C) indüklü uterus ve plasenta çalışmaları Notch sinyal yolağı ile bakteriyel ürünler arasında ilişki olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar; fare uterusundaki N1, DLL1 ve HES1' in inflamatuvar indüklü preterm eylemin başlaması ile ilişkili olabileceğini (Jaiswal, Agrawal et al. 2015) düşündürmektedir.

Araştırmacılar farede uterus içi LPS indüklü preterm eylem ile hormon indüklü eylem karşılaştırıldığında, LPS indüklü preterm eylemin delta ligandını kullanarak başlayabileceğini bunun da uterus ile plasentadaki anjiogenezi etkileyerek gerçekleşmekte olduğunu varsaymıştır (Agrawal, Jaiswal et al. 2016).

Ayrıca, Misoprostol indüksiyonu ile uyarılan erken doğum modelinde, Notch Sinyal yoluna ait reseptör ve ligand değişikliklerinin, kas, kan damarı ile makrofaj üzerinde yaptıkları shift aracılığı ile erken doğum mekanizmasını etkileyebileceği düşünülmektedir (Avcı, Simsek et al. 2018).

## **2.2. Prostaglandinler ve Erken Doğum İlişkisi**

Prostaglandin (PG)'ler ilk kez 1968 yılında laboratuvar ortamında sentezlendiklerinden beri pek çok alanda kullanılmaktadır. Araşidonik asitten sentezlenen prostaglandinler, etkilerini lokal olarak yaparlar ve endojen prostaglandinlerin yarılanma ömürleri birkaç saniye ya da dakika ile sınırlı iken sentetik olanların yarılanma ömürleri çok daha uzundur. PG uygulaması, serviks dokusunda submukozal su miktarını artırır ve kollojen lifler çözülür. Bu değişiklikler normal doğum ile erken doğum sırasında gebede görülen değişikliklerle benzerdir (Bugalho, Daniel et al. 2001); (Cuppert, Caritis, 2013).

Prostaglandinlerin, gebelik sürecindeki serviks ve rahim üzerindeki düzenleyici rollerini otokrin ve parakrin yolları kullanarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Timmons, Reese et al. 2014).

Servikal olgunlaşma sürecindeki problemlerin, non-semptomatik düşüklerin nedeni olduğu da varsayılmaktadır (Radulovic, Ekerhovd et al. 2009). Uygun olmayan bir serviks, başarılı bir doğum için en büyük engel olabilir. Serviksin olgunlaşması için sıklıkla kullanılan ajanlardan biri de prostaglandinlerdir (Bellad, Tara et al. 2012).

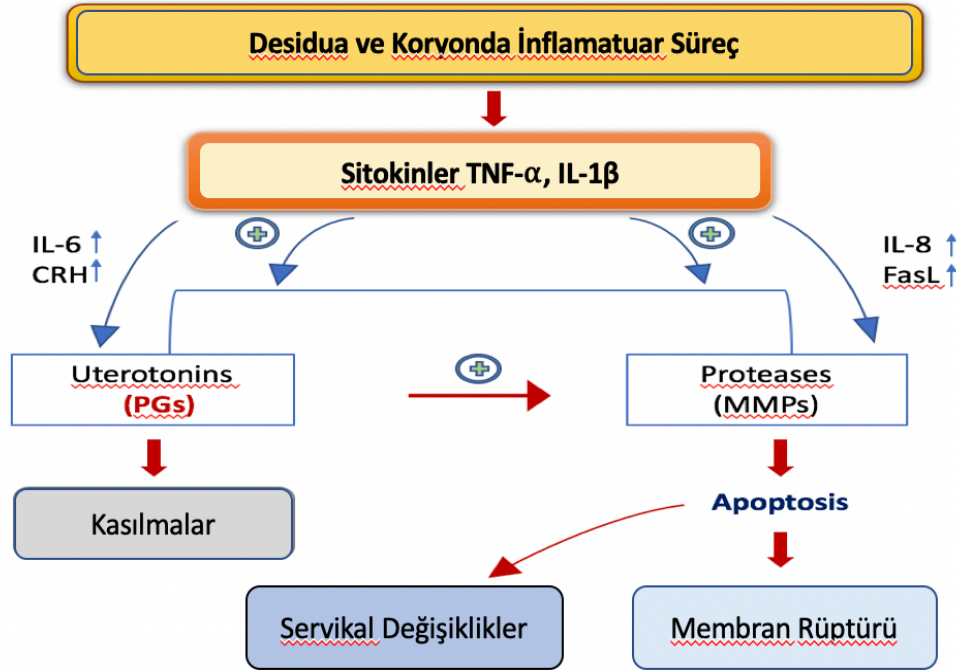
Gebe fare uterusunda, COX-1 ekspresyonu östrojen ve P4 ile düzenlenir. COX genlerinin peri-implantasyonlu fare uterusunda farklı şekilde düzenlendiğini gösterilmiştir. Preplanplantasyon döneminde (1-4 günler), COX-1 geni uterus epitelinde esas olarak 4. günde akşamları bağlanma reaksiyonunun başlamasına kadar eksprese edilirken, COX-2 geni, 4. günde bağlanma reaksiyonu sırasında blastosisti çevreleyen anti-mezometri direğindeki lümen epiteli ve subepitelyal stromal hücrelerde eksprese edilir ve 5. gün sabahına kadar devam eder. COX-2 tarafından katalize edilen PG sentezinin lokalize olarak artmış uterin vasküler geçirgenlik ve bağlanma reaksiyonu

için önemli olduğunu göstermektedir. 4. günde bağlanma reaksiyon zamanından aşağı regüle edilen COX-1 geni, 7. ve 8. günlerde tekrar mezometrial ve anti-mezometrial sekonder desidual alanlarda ifade edilmiştir. Genel olarak, sonuçlar uterin COX-1 geninin yumurtalık steroidlerinden etkilendiğini, COX-2 geninin ise erken gebelikte implante edici blastosist tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Chakraborty, Das et al. 1996).

Prostaglandinlerin üretiminde rol oynayan bir enzim olan siklooksijenaz-1'in (COX-1) silinmesi, farelerde gecikmiş doğum ile sonuçlanmıştır. Beklentinin aksine, COX-1 null farelerde normal uterus kasılma görülür. Hücre dışı matriks proteinleri, lipidler ve nükleik asitlerle ilişkili Raman spektral incelemeleri hamilelik boyunca izlendiğinde COX-1 null farelerde termde doğumun önemli ölçüde geciktiği bulundu. Sonuç olarak, in vivo Raman spektroskopisi, COX-1 null faresinde invazif olmayan bir şekilde anormal remodeling tespit etti ve serviksin gecikmiş partisyonunda önemli bir rol oynadığını açıkça gösterdi. COX-2 izoformunun farelerde silinmesi, doğurganlığı ve gebeliğin ilk aşamalarını bozar; Bu nedenle, partiyon çalışmaları için bilgi verici değildir. Buna karşılık, COX-1KO fareleri geciktirilmiş partiyon fenotipleri ile gecikmiş doğumun temelini incelemek için değerli bir fırsat sunar. COX-1 geninden yoksun farelerin luteolizinin bozulmuş olduğu bilinmesine rağmen, önceki çalışmalar uzamış hamileliklerinden sorumlu mekanizmayı belirlememiştir (Herington, O'Brien et al. 2018).

Doğum eylemi öncesi, siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin etkinleşmesi ve prostaglandinlerin artışı ile birlikte kollajen degrade olurken, hyalüronik asit ve interlökin 8 (IL-8) salınımına paralel olarak nötrofil kemotaksisi ve kollajenaz aktivitesi artar. Sonuçta preterm eylem ile sonuçlanacak olan bir servikal olgunlaşma ortaya çıkar. Preterm doğumların %15'inin koryonunda, 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaz (15-OH-PGDH) enzimi eksikliği saptanmıştır. 15-OH-PGDH aktivitesi, prostaglandinlerin yıkımını sağlar ve amnion zarında yoktur. Bu yüzden amnion ve koryon zarlarında yapılan ana prostaglandin olan PGE<sub>2</sub>; amnionda metabolize edilemez. Uterus desiduasında, fosfatidil etanolamin ile fosfatidilinositol hidrolize olması sonucu PG sentezi başlayabilir. Tüm bu bulgular, doğum eylemi sırasında membranların araşidonik

asitten prostaglandin biyosentezinde kendilerine has bir rolleri olduğunu işaret etmektedir. Bu enzimin eksikliğinde, amniyondaki prostaglandinlerin myometriuma ulaşması kolaylaşır ve kontraksiyonlar başlar. Enfeksiyonlara bağlı bakteriyel ürünlerin; 15-OH-PDGH enzim seviyelerini baskılayabildiği ve erken doğum eylemi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. *Enfeksiyon ile erken doğumun başlaması arasındaki ilişki, araşidonik asidin bakteriyel ürünler aracılığı ile prostaglandin E<sub>2</sub>'ye dönüştürülmesine bağlanabilir.* Şekil 3' te inflamasyon sürecinde sitokinler aracılığı ile prostoglandin uyarısına bağlı kontraksiyonların başlaması ve serviks olgunlaşma mekanizması özetlenmiştir (Kota, Gayatri et al. 2013);(Sangha, Walton et al. 1994);(Copper, Goldenberg et al. 1996);(Cunningham, Macdonald et al. 1993);(Speroff, Glass et al. 1994).



Şekil 3. Amniyo-koryon, desidua inflamasyonu ve preterm eylem ilişkisi FasL: Fas ligand, CRH: Cortico Tropic Hormone, PGs: Prostaglandinler, MMP: Matrix Metallo Proteinase (Kota, Gayatri et al. 2013)'den uyarlanmıştır.



Endoperoksid E-izomeraz enzimi  $PGH_2$ 'den  $PGE_2$  oluşturken, endoperoksid redüktaz enzimi tarafından  $PGH_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ 'ya indirgenir. 9-hidroksiprostaglandin dehidrojenaz enzimi,  $PGF$ 'leri  $PGE$ 'lere dönüştürebilir.  $PGE$ 'ler  $PGF$ 'lere, 9-ketoredüktaz enzimi ile indirgenebilirler. Bu dönüşümler, fizyolojik açıdan önemlidir çünkü  $PGE$ 'ler ve  $PGF$ 'ler bazı sistemler üzerinde zıt yönde etki gösterebilirler (Seo and Oh 2017);(Loudon, Groom et al. 2003);(Kayaalp 1997).

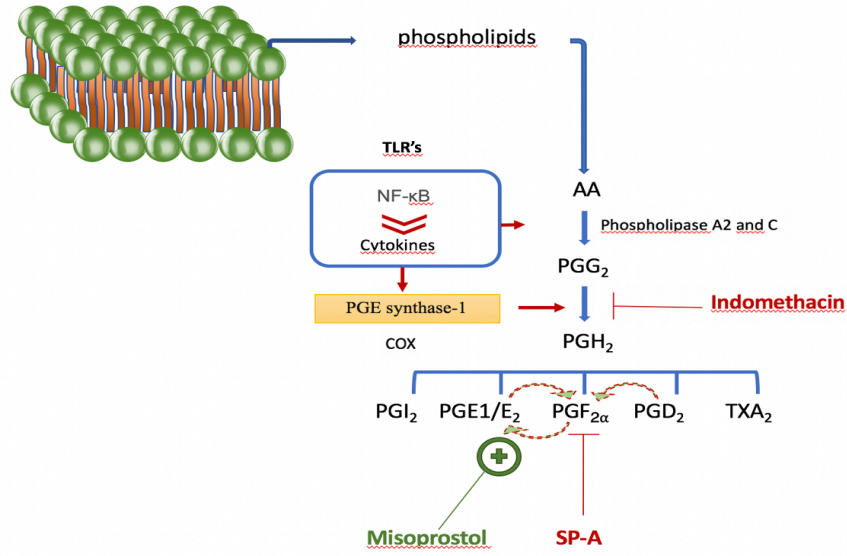
Prostaglandin E2, servikte kollagen konsantrasyonunu azaltmaktadır ve bu etkinin oluşum basamakları henüz açıklanamamıştır. Prostaglandinler, servikte fibroblast aktivitesini değiştirebilir ve lökosit ile makrofaj infiltrasyonuna sebep olabilir. Bu hücreler, serviksin yumuşamasını sağlayan ekstraselüler matriksteki değişikliklerin kaynağı olan enzimlerin salınımından sorumlu olabilirler (Arias 2000).

Prostaglandinler, sentez edildikleri dokularda depolanmaksızın eksprese edilirler. Prostaglandinlerin inaktivasyonunda en önemli organ akciğerdir ve burada %95 oranında inaktive edilirler.  $PGE$ 'ler ve  $PGF$ 'ler gebe yada gebe olmayan uterusu oksitosik etki ile tonusun artmasına ve ritmik kasılmaların oluşmasına sebep olabilirler (Kayaalp 1997).

Desiduada  $PGE_2$  ve  $PGF_{2\alpha}$  sentezlenebilir. Uterus kasılmalarının öncelikli olarak desidual ve myometrial prostaglandinlerce tetiklendiği tartışılmaktadır (Speroff, Glass et al. 1994).

Servikte bu sürecin nasıl işlediği ise açık değildir. Prostaglandinlerin dönüşüm süreci ve tez içerisinde yer verilen ajanların bu süreçteki muhtemel yerleri (Şekil 4)' te özetlenmiştir.

IND gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ajanlar, siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe etmek suretiyle vücutta etkili olan prostaglandin biyosentezi inhibitörleridir. Doğum öncesinde ve doğum sırasında üretilen sitokinler ve prostaglandinler inflamatuvar süreçle benzerlik göstermektedirler. Bu nedenle anti-inflamatuvar ilaçlar erken doğumu önleme potansiyeline sahiptir (Loudon, Groom et al. 2003);(Kayaalp 1997).



**Şekil 4.** Prostaglandinlerin Dönüşüm Mekanizması ve Tez İçerisinde Yer Alan Tedavi Edici Ajanların Olası Etkileri (Zhang, Gong et al. 2010);(Oshima, Oguma et al. 2009);(Meng, Ceryak et al. 2006)' den uyarlanmıştır. PG: Prostaglandin, TX: Tromboksan

IND tedavisinin erken doğum üzerindeki etkisi, uterus kasılmalarının önlenmesi ve gebelik süresinin uzaması açısından değerlendirilmektedir (Zuckerman, Shalev et al. 1984). Gebelik süresince annenin immün sistemi, kendisiyle genetik olarak benzeşmeyen fetüs ve plasental üniteye adapte olmaya çalışır. Bu yüzden normal bir gebelikte T helper 2 (Th2) baskın bir immün durum söz konusudur (Doria, Iaccarino et al. 2006). Uterusun T helper 1 (Th1) cevabını modifiye etmek ve Th2 yi baskın hale getirmek düşük riskini azaltmak için gereklidir. Çünkü Th1 tipi sitokinler, hücre içi parazitlerin öldürülmesi için ve otoimmün tepkilerin sürdürmesinden sorumlu proinflamatuvar yanıtı üretme eğilimindedir (Berger 2000).

Notch ligand ailesinden Delta'nın Th1'i uyarırken, Jagged' ın Th2 yönünde farklılaşmayı uyardığı düşünülmektedir (Amsen, Blander et al. 2004).

IND, steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç ailesinden olup yaygın olarak kullanılan bir tokolitik ajandır. IND, seçici olmayan bir siklooksijenaz veya prostaglandin endoperoksit sentaz inhibitörüdür ve erken doğumu uterusla birlikte farklı bölgelerde,

prostaglandinlerin üretimini baskılayarak ertelediği düşünülmektedir. İndometazin; içindeki 4-klorobenzoil grubunun, 4-bromobenzoile değiştirilmesi ile selektif bir COX-2 inhibitörü haline gelir. Plasebo veya başka tokolitik maddelerle IND karşılaştıran çok sayıda randomize kontrollü çalışmaların çoğunda (% 75), IND'in en fazla 48 saate kadar erken doğumu geciktirdiği gösterilmiştir (Quaas, Goppinger et al. 1987);(Kalgutkar, Crews et al. 2000);(Doggrell 2004);(Vermillion and Landen 2001).

Gebe CD-1 farelerde gebeliğin 18. Gününde, gavaj ile IND (1 mg IND/kg) tuzlu su (salin) içerisinde ya da lipozomal olarak kuyruk veninden enjekte edildikten 4 saat sonra, rahim, plasenta ve fetus üzerinde etkileri incelendiğinde; fetus ve plasenta üzerinde sınırlı, uterusu ise lokal etkiye sahip olduğu görülmüştür (Refuerzo, Alexander et al. 2015). Farelerde, 10 mikrogram LPS uygulaması sonrası desidial explantlarda, kontrole göre PGE, PGF<sub>2α</sub>, COX-2 ve Tromboksan B2 seviyelerinde belirgin artış ve %78 fetal ölüm görülmüştür. Bu farelere 14 µg/ml indometazin içme suyuna eklenerek günde toplam ~56 µg/ml alması sağlandığında fetal ölüm %24, subkutan 35 µg/ml alımda ise fetal ölüm %1 olarak belirlenmiştir (Silver, Edwin et al. 1995).

IND; 37 hafta öncesi doğum eylemini ve <2500 gr' dan düşük doğum ağırlığı insidansını azaltmak için kullanılan tek tokolitik ilaçtır (Loudon, Groom et al. 2003). Bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte bu çalışmalarda; 24-34 hafta arası gebeliklerde başarılı bir tedavi için gerekli olan 200-300 mg/gün indometazin alan vakaların %83'ünde terme ulaşma, %10'unda 2-7 gün arasında gecikme görülmüş, %7'inde ise herhangi bir etki tespit edilememiştir (Zuckerman, Shalev et al. 1984).

Uzun süreli IND kullanımı sistemik ve fonksiyonel hasara sebep olmaktadır. 8 günden fazla 4 mg/kg IP IND kullanılan ratlarda renal bozukluğa eşlik eden, podositlerde ve düz endoplazmik retikulumda stoplazmik inklüzyon cisimleri görülür (Sessa, Allaria et al. 1973). Doğumdan 24 saat önce uygulanan maternal IND infantta ilk 3 gün kreatinin seviyesini artırmak ve idrar çıkışını azaltmak sureti ile renal fonksiyon bozukluğuna sebep olur (Norton, Merrill et al. 1993). Gebeliğin son 3 günü kullanılan maternal 4 mg/kg IND fare ve ratlarda nöronal nekroza sebep olurken, 2 mg/kg için bu bulguya rastlanılmamıştır (Altshuler, Krous et al. 1979).

33. gebelik haftasında vajinal, rektal ve oral IND kullanımının randomize olarak karşılaştırıldığı bir çalışmada, vajinal uygulamanın diğer uygulamalara göre erken doğumu önleme etkinliği daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Abramov, Nadjari et al. 2000). İnsanlarda indometazin için tam tokolitik doz 200 mg olarak önerilmektedir (Halle and Hengst 1978). IND'nin genel etkisi hakkında farklı sonuçlar bildiren az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, serviks üzerindeki moleküler etkinliğine ilişkin çalışmaya rastlanılamamıştır.

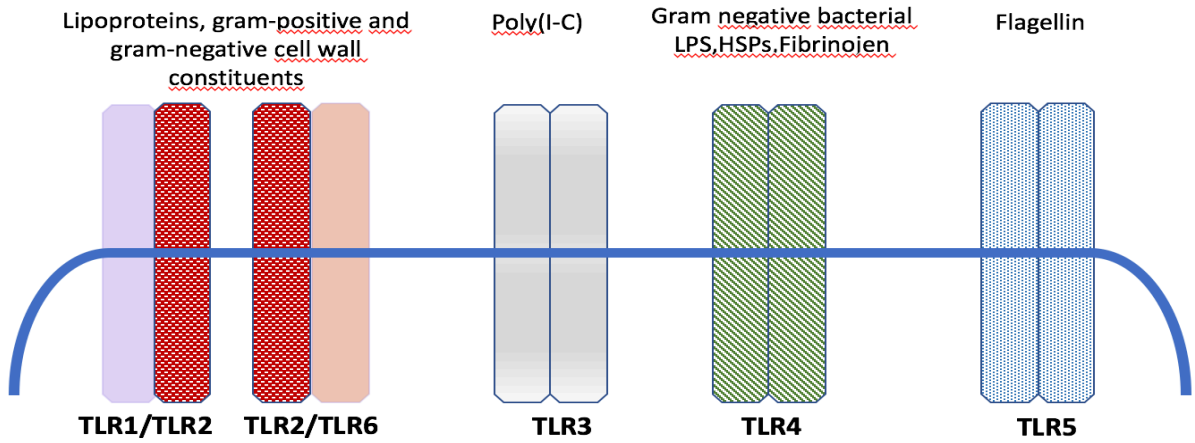
Serkraj (rahim ağzına dikiş atılması) ile birlikte IND kullanımına ilişkin sistematik bir derlemede ise, IND kullanan ve kullanmayan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Smith and DeFranco 2015).

### **2.3. Erken Doğum ve Enfeksiyon İlişkisi:**

Son yirmi yılda, birçok araştırmacı; enfeksiyonun neden olduğu preterm eylemi incelemek için ölü bakterileri veya steril bakteri özütlerini kullanıldığı modelleri tercih etti. Ancak, ölü bakterilerin veya bakteri ekstratlarını kullanmanın belki de en önemli dezavantajı; inflamasyonun temizlenmesindeki yararlı rolün göz ardı edilerek inflamasyonun zararlı sonuçlarına (örn., doku hasarı, şok, organ yetmezliği ve uterus kontraksiyonları) odaklanmasıdır. İnflamasyon ve enfeksiyon arasındaki ayrım önemlidir: inflamasyon, enfeksiyon yokluğunda da ortaya çıkabilir ve enfeksiyon inflamatuvar yanıtları çeşitli tip ve derecelerde üretebilir. Hem gestasyonel bölmedeki enfeksiyon hem de enfeksiyondan farklı olarak inflamasyon (örneğin ağız boşluğu veya steril inflamatuvar durumlar gibi uzak yerlerdeki enfeksiyon nedeniyle) erken doğuma yol açabilir (Filipovich, Lu et al. 2009);(Hirsch, Blanchard et al. 1999);(Hirsch, Filipovich et al. 2006);(Hirsch and Muhle 2002);(Hirsch, Saotome et al. 1995);(Ilievski and Hirsch 2010);(Ilievski, Lu et al. 2007);(Mussalli, Blanchard et al. 1999);(Cardenas, Mulla et al. 2011);(Elovitz, Wang et al. 2003);(Kajikawa, Kaga et al. 1998);(Romero, Gomez et al. 1994, Salminen, Vuolteenaho et al. 2011). Bu çeşitli erken doğum modellerini ele alan klinik strateji, preterm doğumla ilgili perinatal sonuçları iyileştirme potansiyeline sahiptir

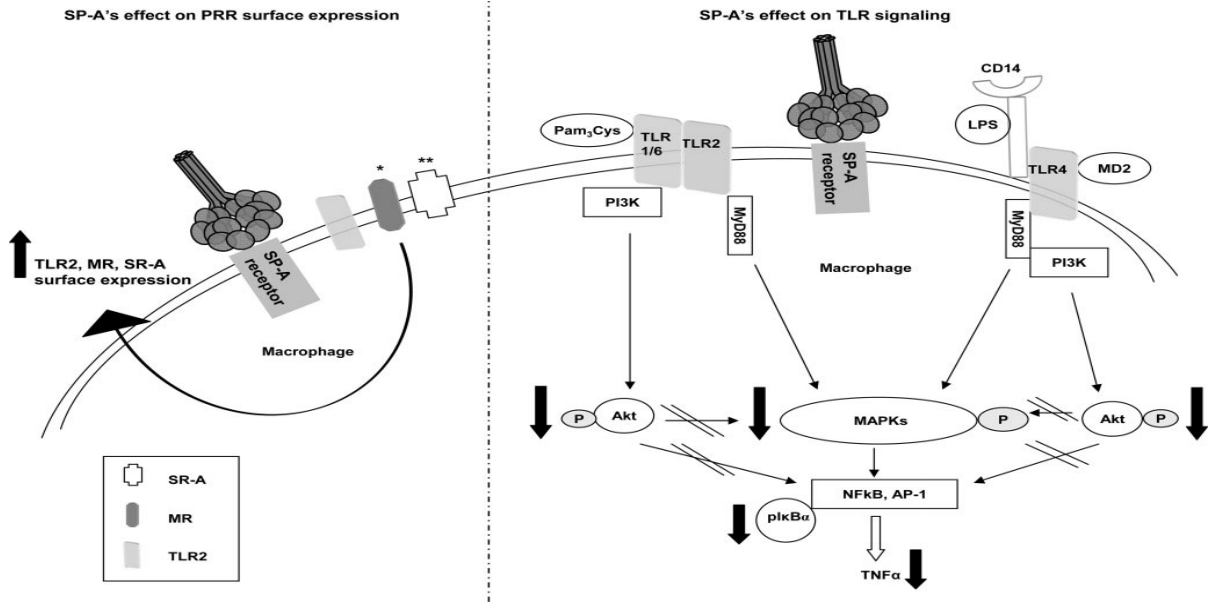
İnflamasyonun yararlı ve zararlı bu iki yönü arasındaki ayrım önemlidir ve bunu anlamak canlı enfeksiyonun araştırılmasını gerektirir. Bu ilkenin bir örneği, IL-1'in rekabetçi bir inhibitörü olan anti-inflamatuar sitokin interlökin 1 reseptör antagonistini (IL-1ra) eksik veya fazla eksprese eden hayvanları kullanarak yayınlanmış grubun çalışmasında yer almaktadır (Hirsch, Irikura et al. 1996).

Buna göre; IL-1'in etkilerinin baskılanması (IL-1ra ekspresyonunun manipülasyonu yoluyla), LPS'ye maruz kaldıktan sonra hayatta kalmayı artırır, ancak canlı *Listeria monocytogenes* enfeksiyonunda hayatta kalmayı ve bakterinin eliminasyonunu azaltır. İyileştirme ve zarar arasındaki bu hassas dengenin, gebelik sırasında enfeksiyon ve inflamasyon tedavisinde belirgin etkileri vardır: anti-inflamatuar ajanlar, inflamasyonun neden olduğu uterus kasılmalarını iyi bir şekilde önleyebilir, ancak, uterus kasılmalarının nedeni doğrudan enfeksiyöz bir ajansa, bu tür tedaviler zararlı olabilmektedir. Enfeksiyon ajanının kendisinin değil de onlara ait farklı maddelerin ve eksojen ligandların; lipopolisakkarit [LPS, Gram negatif bakterilerden elde edilen bir Toll Like Receptor (TLR) 4 ligandı], PGN (Gram pozitif bakterilerden elde edilen bir TLR2 ligandı), poli (I:C) (bir TLR3 ligandı ve çift sarmallı RNA sentetik analogu, çoğu virüs için çoğaltma ara maddesi) (Şekil 5.a) kullanımının farklı bir gerekçesi de; canlı bakteri kültürlerinin risklerinden ve değişkenliğinden uzak olmaları ve erken doğumun patogenezinde yer alan inflamasyonun temel önemine odaklanılmasıydı. Bununla birlikte, bu modeller doğal enfeksiyonun diğer önemli yönlerini atlarlar; kademeli başlangıç, sekonder mikrobiyal virulans faktörleri, doğuştan gelen ve edinilen bağışıklık yollarının karşılıklı etkileşimi, kolonizasyon yolları (en yaygın olarak vajinadan koryodesidual alana doğru yükseldiği düşünülür) vb. Preterm doğumda enfeksiyonun rolünü araştırmak amacıyla, farelerle gerçekleştirilen onlarca yayın arasında, genital bölgede canlı bakteri aşılması modeli ile ilgili sadece iki adet (Hirsch, Saotome et al. 1995);(Reznikov, Fantuzzi et al. 1999), intravenöz enjeksiyonun ve böbrek enfeksiyonunun modellenmesi ile ilgili ise sadece üç çalışma bulunmaktadır (Kaul, Khan et al. 1999);(Mussalli, Brunnert et al. 2000);(Han, Redline et al. 2004).



**Şekil 5.a.** TLR Reseptör ve Ligandları (Basu and Fenton 2004) ve (Sieling and Modlin 2002) den uyarlanmıştır.

TLR2, TLR6 veya TLR1 ile bir heterodimer oluşturur. Diaçil ve triaçil lipopeptitleri tanıır. TLR2'nin önemi üzerine geniş bir literatür bilgisi bulunmasına rağmen, patojen tanıma ve konak yanıtı konusunda TLR2 ve TLR4 ifadesi ile ilgili insan mononükleer fagositlerinin tepkisi hakkında çalışmalar sınırlıdır. SP-A, fagositin ana düzenleyicisi olarak ortaya çıkmıştır. SP-A; TLR2 ve TLR4 ekspresyonunu diferansiyel olarak düzenler. TLR2 ifadesinin upregülasyonuna rağmen, SP-A belirgin şekilde hem TLR2 hem de TLR4 agonistleri tarafından makrofaj aracılı proinflamatuvar yanıtı artırır. Altta yatan mekanizma, hüresel fonksiyonların değiştirilmiş merkezi fosforilasyonuyla ilgilidir. MAPK yolunun downregülasyonu ve NF B'nin deaktivasyonu bu süreç ile ilgilidir (Şekil 5.b). SP-A, akciğer alveoller makrofajlarının biyolojik aktivitesinin şekillenmesinde önemlidir (Henning, Azad et al. 2008), (Ozinsky, Underhill et al. 2000).



**Şekil 5.b.** SP-A'nın makrofajlarda TLR ekspresyonu ve sinyalleşmesini düzenleme mekanizması (Henning, Azad et al. 2008).

Enfeksiyon indüklü erken doğumu, insandaki gelişim sürecine en yakın hali ile görmeyi sağlayan ve serviksteki TLR dağılımlarını belirleyen herhangi bir çalışma bulunmamakla beraber, yakın zamanda utero-servikal neoplazilerde servikte TLR'lerin yüksek ekspresyonunu öngören çalışmalar belirmeye başlamıştır (de Matos, Candido et al. 2017).

Doğum sürecini etkileyen ve enfeksiyon sürecinde yer alan önemli hücrelerden biri de makrofajlardır. Fetal ve maternal bölmedeki makrofajlar, uzun süredir pek çok araştırmanın odağında yer almıştır ve her iki kompartımandaki makrofajlar gebeliğin tüm aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu hücreler uterin bağ dokularının ve kan damarlarının yeniden şekillendirilmesi, trofoblast (fetal hücre) implantasyonunun düzenlenmesi, fetal antijenlere karşı bağışıklık toleransı, komşu lökositlerin immünomodülasyonu ve doğumun başlatılması gibi başarılı gebelik için gerekli olan çeşitli işlemleri desteklemektedir (Nagamatsu and Schust 2010);(Hamilton, Oomomian et al. 2012);(Shynlova, Nedd-Roderique et al. 2013).

Bu işlevlerin tamamı, en basit seviyede M1 ve M2 olarak adlandırılan makrofaj polaritesinin veya aktivasyon durumunun sonucudur. Makrofajlar başlangıçta M1 veya M2 polaritesi olarak tanımlanan farklı fenotipleri gösterir. M1 makrofajlar, antibakteriyel etkinliğe sahip olup, hücre aracılı immün yanıtı karşı T hücre yanıtını TH1 yönünde değiştirme kapasitesi gösterir (Mantovani, Sica et al. 2004);(Mills, Kincaid et al. 2000).

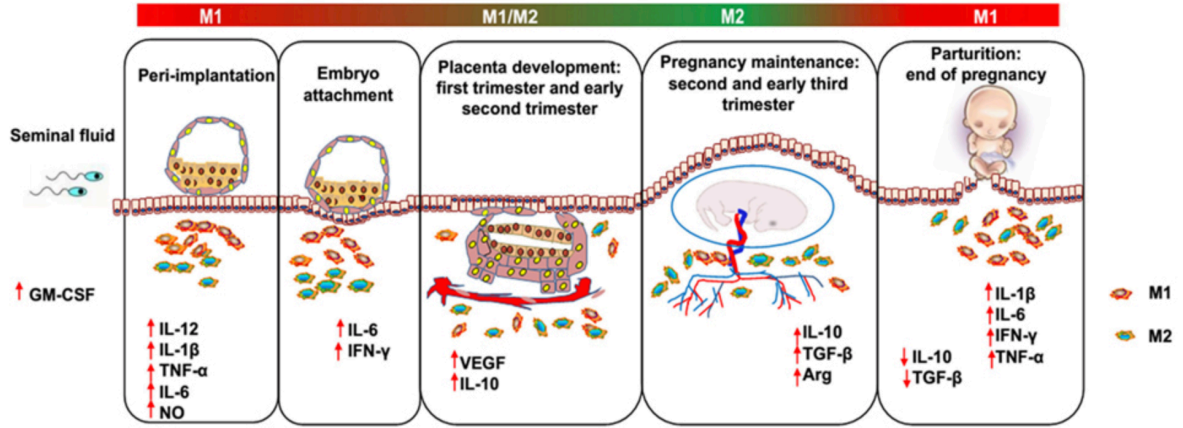
M1 polarizasyonunu teşvik ettiği bilinen harici uyarılar, E. coli kaynaklı lipopolisakkarit, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, GM-CSF (Martinez and Gordon 2014) ve toll like reseptör (TLR4) agonistleridir. Buna karşılık, M2 makrofajları, doku yeniden modellenmesine katılır, immünoşüpresif niteliklere sahiptir ve antikor aracılı TH2 immün yanıtı geliştirir (Mantovani, Sica et al. 2004).

M2 yönünde polarize hücreler (alternatif olarak aktive hücreler) mannoz ve scavenger reseptörleri bol eksprese ederler ve M2 polarizasyonunu indükleyen uyarılar IL-4, 10, 13, 33, TGF- $\beta$  ve G-CSF' dir (Brown, von Chamier et al. 2014).

Esas olarak, M1/M2 yönünde değişebilen makrofaj kutuplaşması ve fonksiyonu çevreden alınan sinyal ve buna uyum ile ilişkilidir. Başarılı gebelik, makrofaj aktivasyon durumunun hamilelik boyunca düzenlenmesini gerektirir. Gerçekten, maternal ve fetal bölmelerdeki uygun olmayan makrofaj polarizasyonu düşük (Guenther, Vrekoussis et al. 2012) ve intrauterin paraziter enfeksiyonlar (Liu, Zhang et al. 2013) ile ilişkili bulunmuştur.

Gebelik sürecinin her evresinde, makrofajların farklı polarite döngüleri geçirdiği düşünülse de enfeksiyonlarda birikmiş M1 makrofaj ilişkisine sıkça değinilmektedir. Ayrıca gebeliğin 2.trimesterinin sonu ile 3.trimester başında görülen M2 makrofajların doğuma yakın süreçte M1 olarak değiştiği de görülmektedir (Şekil 6) (Yong, Sacher et al. 2017).





**Şekil 6.** Gebelik Süresince Makrofaj Polarizasyonu (Yong, Sacher et al. 2017)

#### 2.4. Sürfaktan-A (SP-A)' nın Süreçteki Rolü:

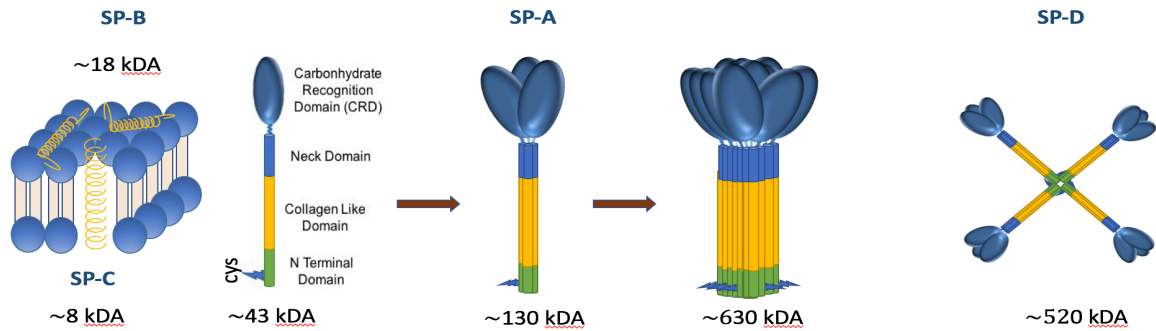
Konakçı tarafından üretilen bazı maddeler TLR'leri bağlayabilir. TLR2 (Henning, Azad et al. 2008);(Sato, Sano et al. 2003);(Sato, Sano et al. 2003) ve TLR4 (Guillot, Balloy et al. 2002) için endojen bir ligand olan SP-A insan gebeliği ile özellikle ilgilidir. SP-A fetal alveoler tip II hücreler ve silsiz bronş epitel hücreleri tarafından gebeliğin 28. haftasından itibaren sentezlenir (Gibson 1997);(Goldmann, Kahler et al. 2009).

SP-A, fetal akciğer olgunluğunun ana belirleyicisidir ve bu da ex-utero hayatta kalmanın anahtarıdır (Ilievski and Hirsch 2010). Sürfaktan ile ilişkili dört protein (surfaktan A/B/C/D) vardır. Bunlardan; SP-B ve SP-C, alveolar membranlardaki yüzey gerilimini azaltmada rol oynar ve böylece inspirasyonlar arasındaki akciğer çökmesini önler. SP-A ve SP-D doğuştan edinilen bağışıklıkta rol oynar ve ticari olarak temin edilebilen yüzey aktif maddeler SP-A veya SP-D içermez (Tablo 1) (Condon, Jeyasuria et al. 2004);(Haagsman, Hogenkamp et al. 2008);(Kültürsay, Uygur et al. 2014).

**Tablo 1.** Sürfaktan Türlerinin İşlevleri ve Ticari Olarak Bulunma Durumları (Kültürsay, Uygur et al. 2014)

PROTEİN	ÇÖZÜNÜRLÜK	TİCARİ PREPARATTA BULUNMA DURUMU	İŞLEV
SP-A	Hidrofilik	Yok	Sürfaktanın tekrar sentezi, konak savunma mekanizması ve makrofaj fagozitozunu artırmak
SP-B	Hidrofobik	Değişik düzeylerde mevcut	Sürfaktanın alveol yüzeyine yayılımı ve lipid tabakasının oluşumu
SP-C	Hidrofilik	Değişik düzeylerde mevcut	Fosfolipidlerin yüzeye yapışması ve yayılımı
SP-D	Hidrofobik	Yok	Mikroorganizma adezyonu, konak savunmasına yardımcı olmak

SP-A; 18 molekül 630 kDa'lık bir oktadecamerdir. SP-D ise, benzer bir molekül yapısı ve örtüşen işlevlere sahip olmakla birlikte, farklı çaprazlama düzeninde dört trimerden oluşur (Şekil 7, Şekil 8). SP-A, etkilenen reseptör türü de dahil olmak üzere çeşitli koşullara bağlı olarak hem pro- ve hem de anti-inflamatuar etkili olabilir (Wright 2005);(Gardai, Xiao et al. 2003).

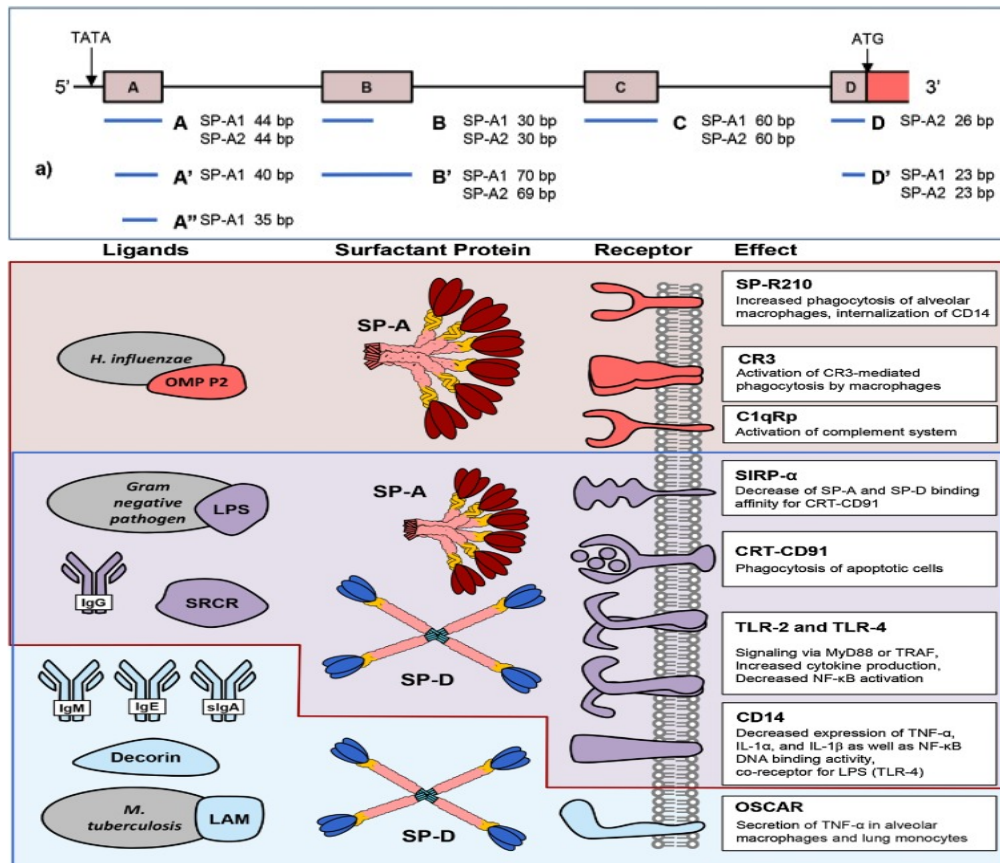


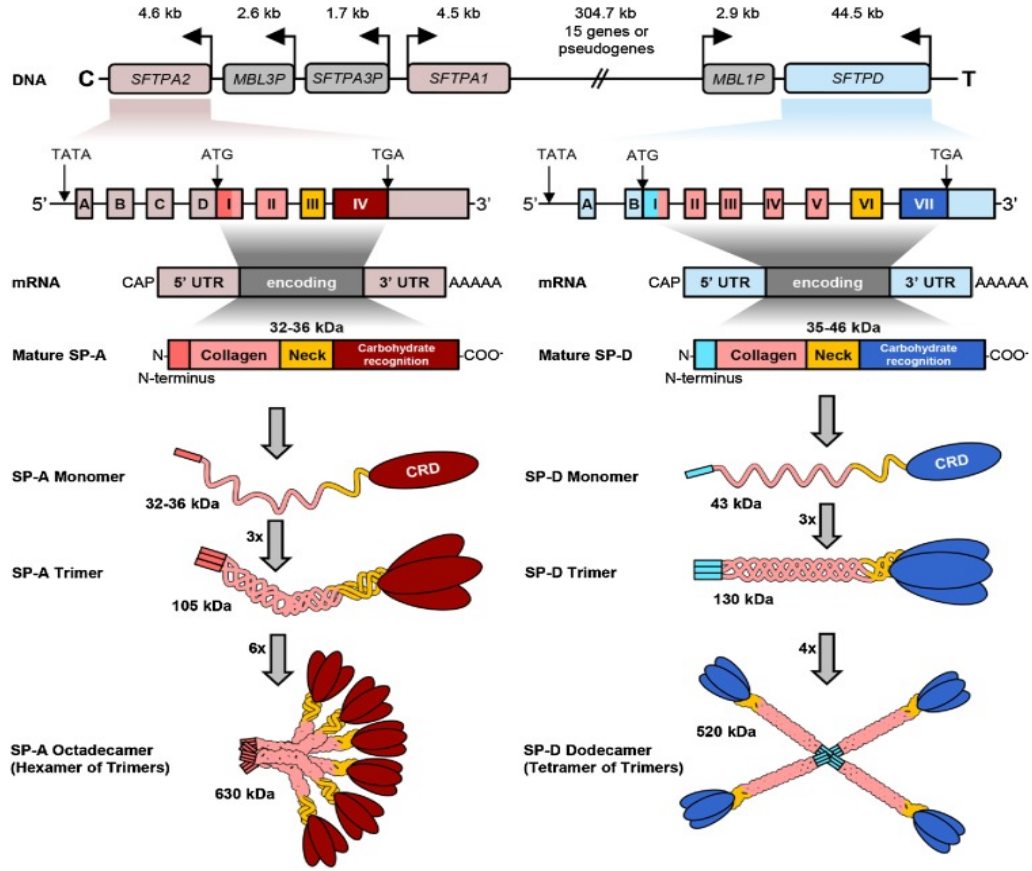
**Şekil 7.** Sürfaktan türleri (Winkler and Hohlfeld 2013)' den uyarlanmıştır.

SP-A, collectin (kollajen-lectin) protein ailesinin bir üyesidir. C-terminal karbonhidrat tanıma bölgesi (CRD), tercihen, kalsiyuma bağımlı bir şekilde patojen karbonhidratlara bağlanmaktadır. CRD, hidrofobik bir alfa-sarmal boyun bölgesine, Gly-XY tekrarlı (trimerler oluşturmak ve hücrel reseptörleri birbirine bağlamak için gerekli) kolajenöz bir bölge ve multimer oluşumu için önemli olan bir N-terminal disülfid bağı içeren bir bölgeye sahiptir (Wright 2005).

Aslında, SP-A ve SP-D üzerinde yapılan çalışmalar tam bir paradox halindedir. SP-A ve SP-D'nin, patojenlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırarak ve enfeksiyona karşı pro-inflamatuvar cevabı arttırarak, doğal immünolojik tepkiye katkı sağladığını bildiren (LeVine and Whitsett 2001);(Kremlev and Phelps 1994) yayınlar bulunmakla birlikte, tam tersine, SP-A ve SP-D'nin makrofajlar tarafından pro-inflamatuvar mediatör üretimini engellediğini belirten çalışmalar da mevcuttur (Bridges, Davis et al. 2000);(Borron, McIntosh et al. 2000).

Farklı olarak SP-A'nın; N-terminal kollajen domeyninin, kalretikülin/CD91 reseptör kompleksiyle ligasyonunun pro-inflamatuvar etki sağlarken, C terminal başlarının sinyal inhibitör regülator protein- $\alpha$  (signal inhibitory regulatory protein  $\alpha$ ; SIRP $\alpha$ )' ya bağlanmasının anti-inflamatuvar etki sağladığı yönünde hipotezler de mevcuttur (Janssen, McPhillips et al. 2008).





**Şekil 8.** Surfaktan A ve D moleküler yapı farkları (Vieira, Johannes W.Kung et al. 2017)

Bazı çalışmalara göre ise; bir patojenin yokluğunda, SP-A, Carbohydrate Recognition Domain (CRD) yoluyla bir hücre yüzey molekülünde (SIRP- $\alpha$ ) bağlanır. CRD'nin bağlandığı yabancı bir organizma veya hücre komponenti ise serbest kolajen bölgesi CD91 ve calreticulin kompleksi vasıtasıyla bağışıklık hücrelerini harekete geçirir. Farklı reseptörlerin katılımı farklı cevaplar ortaya çıkarmaktadır. SP-A, SIRP- $\alpha$ 'ya bağlandığında, inflamatuvar mediatör üretimi engellenir. Aksi takdirde, inflamatuvar mediatör üretimi arttırılabilir. Çoğunlukla SP-A, anti-inflamatuvar ve anti-infeksiyözdür (Salminen, Vuolteenaho et al. 2011);(Henning, Azad et al. 2008);(Wright 2005);(Gardai, Xiao et al. 2003);(Hussain, Wright et al. 2003);(Scanlon, Milovanova et al. 2005);(Blau, Riklis et al. 1994);(Garcia-Verdugo, Tanfin et al. 2008);(Kremlev and Phelps 1994).

İn vitro ve in vivo olarak yapılan bazı çalışmalar SP-A' nın farklı mekanizmalarla patojenlerin eliminasyonunu arttırdığını göstermiştir. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde SP-A' nın olası etkileri; bağışıklık hücreleri tarafından alım için opsonizasyon, aglütinasyon/agregasyon, bakteri zarlarının permeabilizasyonu, kalıp tanıma reseptörlerinin blokajı, arttırılmış fagositoz ve fagosit reseptör ekspresyonu, genişlemiş süperoksit etki, arttırılmış kemotaksis ve TLR işlevlerinin modülasyonu olarak sayılabilir (Wright 2005);(Nayak, Dodagatta-Marri et al. 2012).

SP-A'nın stimüle edici ligand ile doğrudan etkileşime ihtiyaç duyulmadığını ve kısmen TLR2 aracılığıyla etkili olabileceğini gösteren veriler, anti-bakteriyel ve anti-inflamatuvar özelliklerinin özellikle enfeksiyona bağlı preterm eylemi önlemek için birleşebileceğini göstermektedir. Condon ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, farelerde gebeliğin sonlarına doğru fetal SP-A'nın inflamatuvar bir mekanizma yoluyla doğumun başlangıcı için bir intrauterin sinyal gibi davrandığı belirtilmiştir (Condon, Jeyasuria et al. 2004).

Bu gözlem, erken doğum ve inflamatuvar yanıtları artırmak için çeşitli TLR ligandlarının sinerjik etkili olduğunu gösteren veriler ile birlikte değerlendirildiğinde (Ilievski and Hirsch 2010), erken doğum sürecinde SP-A'nın TLR ligandları ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Ancak; in vivo ve in vitro yürütülen bir dizi deney sonucu, inflamatuvar etki durumunun düşünülenin tam tersi olduğu gösterilmiştir: SP-A, aslında, pro-inflamatuvar üretimi baskılayarak kısmen TLR ligandı ile indüklenen preterm doğum ve inflamatuvar cevapların güçlü bir inhibitörüdür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; enfeksiyonun bastırılması, SP-A'nın TLR uyarımından önce veya sonra oluşabilmekte ve hatta eğer uyarıcı PGN ise SP-A bağlanması hiç gerçekleşmemektedir. Son olarak, SP-A'nın bu etkilerinin reseptör aracılı olduğunu ve en azından kısmen TLR2 gerektirdiği görülmüştür. TLR ligandının indüklediği preterm eyleme karşı inhibitör olarak, SP-A'nın peritoneal makrofajlar ve RAW 264.7 fare makrofaj hattında, baskılayıcı etkisinin olduğu teyit edilmiştir (Agrawal, Smart et al. 2013).

SP-A' nın birçok farklı nedenle anti-inflamatuar etkinlik gösterme potansiyeli yüksektir;

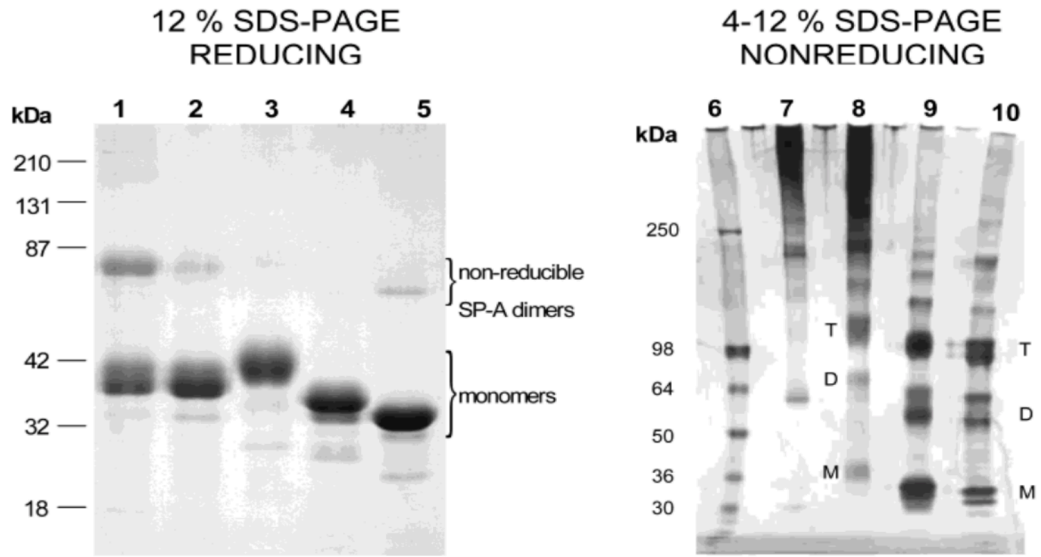
1) SP-A, insan amnion eksplantlarının doku kültüründe, inflamatuvar sitokin varlığını bastırmaktadır (Lee, Romero et al. 2010)

2) Endojen SP-A, insan endometriyumunda ve desidua'da PGF<sub>2α</sub> üretimini inhibe eder ve doğum öncesi desiduaya kıyasla doğum sırasında belirgin olarak daha düşük seviyelerde üretilir (Snegovskikh, Bhandari et al. 2011). PGF2 alfa ve oksitosinin, farklı mekanizmalarla, sarkoplazmik retikulumdan Ca<sup>2+</sup> mobilizasyonunu arttırmak suretiyle insan miyometriyumundaki hücre içi sinyal molekülünün rolünü üstlenerek AA salınımını teşvik ettiği düşünülmektedir (Hertelendy, Molnar et al. 1995).

3) TLR2<sup>-/-</sup> fareler, ikinci gebeliklerinde doğumlarını yaklaşık 12 saat geciktirirken (Montalbano, Hawgood et al. 2013), SP-A' yı aşırı eksprese eden farelerde erken doğum görülmemiştir (Salminen, Vuolteenaho et al. 2011).

SP-A' nın reseptör özgünlüğünün ve potensinin netleştirilmesi, moleküler mekanizmalar içerisindeki yerinin belirlenmesi, tedavi amaçlı kullanımının başarıya ulaşması için öncelikle açıklanması gereken yönlerdendir.

İnsanlarda, iki adet fonksiyonel SP-A geni (SP-A1 ve SP-A2) vardır (White, Damm et al. 1985). Doğal insan SP-A'sının floresan emisyon spektrumları ve 25 ve 70 ° C'de farklı rekombinant SP-A formları (SP-A1) ile farklı durumlar için karşılaştırılmıştır. 5 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.2) içinde 275 nm emisyon spektrumunda; 2 mM'lik bir nihai konsantrasyonda Ca<sup>2+</sup> ve 4 mM EDTA ilavesinden 10 dakika sonra emisyon spektrum değerleri ölçüldüğünde katlanma eğrisi, erime ısı ve floresan emisyonlarının farklı olduğu görülmüştür. SP-A' nın proteinlerle birleşmesi ve konformasyonel yapısını koruması kalsiyumla ilişkilidir. Kalsiyum içeren tampondaki LPS agregasyonunun doğal insan SP-A ve SP-A1m'nin LPS ile daha fazla toplanmasını sağlayabildiğini göstermektedir. SP-A1m ile indüklenen LPS agregasyonu, doğal insan SP-A tarafından indüklenenden daha düşüktür (Garcia-Verdugo, Sanchez-Barbero et al. 2003). Ayrıca SP-A'nın moleküler tanılaması gerçekleştirildiğinde farklı formların farklı moleküler ağırlıklara sahip olduğu görülmektedir (Şekil 9).



**Şekil 9.** Sürfaktan A elektroforezi; 12% SDS PAGE (50 mM dithiothreitol) ile indirgenmiş (lanes 1-5) ve 4-12% SDS-PAGE indirgenmemiş (lanes 6-10) silver staining (Garcia-Verdugo, Sanchez-Barbero et al. 2003).

SP-A; LPS ile etkileşime girdiğinde doğrudan agregasyonuna sebep olabilir (Van Iwaarden, Pikaar et al. 1994). Bu aktivite, alveoler makrofaj aracılı fagositozu kolaylaştırır ve endotoksinlerin veya bakterilerin alveoler epitele yapışmasını önler. (Garcia-Verdugo, Sanchez-Barbero et al. 2003). SP-A lipit A'ya ve rough LPS'ye bağlanır ancak smooth LPS'ye bağlanmaz. O111 LPS suşu smooth LPS olarak tanımlanmıştır (Van Iwaarden, Pikaar et al. 1994),(Hashimoto, Takahashi et al. 2017).

SP-A, LPS indüklü alveoler makrofajlar tarafından üretilen TNF a' yı inhibe edebilir. LPS içermeyen SP-A, TLR4 aracılı NFKB yolunu aktive eder (Guillot, Balloy et al. 2002). Ayrıca; SP-A'nın hem CD14 (cluster of differentiation 14) hem de TLR2'ye bağlandığı da öngörülmektedir. Bu etkileşim muhtemelen SP-A'nın LPS ve peptidoglikan aracılı hücre tepkilerini modifiye etme yeteneği ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır (Akira, Takeda et al. 2001).

SP-A; Ca<sup>2+</sup> ya da EDTA içeren ortamlarda farklı dozlarda ve farklı sürelerde IL-10 ve TNF a gibi mediatörlerin düzeylerini etkilemektedir (Kudo, Sano et al. 2004), (Henning, Azad et al. 2008), (Barr, Pedigo et al. 2000).

Sonuç olarak, literatürde yer alan bilgile değerlendirildiğinde, SP-A davranışlarını açıklama konusunda çalışmalar hala yetersiz görünmektedir. Bu yüzden, bu konudaki araştırmaların sürdürülerek farklı açılardan ele alınması ve etki mekanizmalarının yeterince aydınlatılması gereklidir.

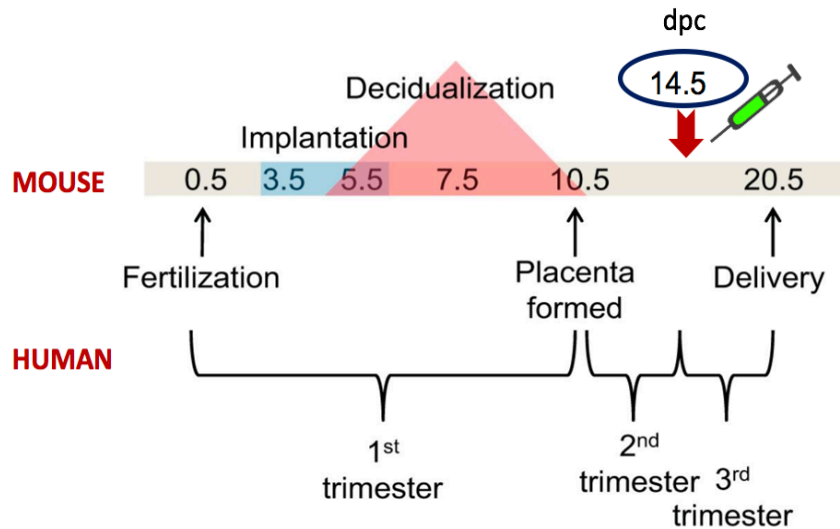


### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Deney Modeli ve Deney Gruplarının Oluşturulması:

Bu araştırmada daha önce hiç deneye girmemiş ve çiftleşmemiş CD-1 ırkı 48 dişi ve 10 erkek fare kullanıldı. Dişiler aynı cins erkek fareler ile çiftleştirildikten sonra, çiftleşme sonrası vajinal plağın görüldüğü gün; 0.5 olarak kabul edildi. Deneyler için kullanılması planlanan; İndometazin ve Anti-SP-A intrauterin (IU) olarak CD-1 fare gruplarına 14.5 dpc (days post coitum) uygulanmıştır. Aşağıda belirtilen deney grupları oluşturulduktan sonra elde edilen dokular, TLR2, TLR4, COX1, Anti-SP-A, Notch 1, DLL1 ve Jag 2 belirteçleri yönünden değerlendirilerek sonuçlar yorumlanacaktır.

14.5 dpc; fare için corpus luteumun gerilediği, tam plesantasyonun kurulduğu ve M1 makrofajlardan M2 makrofajlara muhtemel bir geçişin olduğunu (Yong, Sacher et al. 2017) düşündüğümüz ve ayrıca erken doğuma bağlı sekellerin en sık görüldüğü 28. haftadan sonraki dönemi içerisine alması sebebi ile enfeksiyonun oluşturulacağı en uygun gün olarak belirlendi (şekil 10).



**Şekil 10.** İnsan ve Farede Gebelik Dönemleri (Trimester-Gün Eşleşmesi) (Sones and Davisson 2016)' den uyarlanmıştır.

LPS uygulanan deneklerin %100'ünde preterm doğumu gerçekleştirebilen minimal bakteri inokulumu, fare başına 25 ug/100 ul olarak tespit edildi ve bu miktar IU olarak inoküle edildi. Deney gruplarında kullanılacak olan etkin SP-A ve LPS dozu hücre kültürü sonrasında belirlendi. Uygulanacak IND dozu ise 2 mg/kg/fare olarak gerçekleştirildi. IND+LPS uygulanan grupta LPS uygulamasından 1 gün önce başlanarak 12 saat ara ile IP 2 mg/kg IND uygulanmıştır. Bu doz literatürde belirlenen fetal renal ve nöronal hasarın en az görüldüğü doz esas alınarak belirlenmiştir. Toplam hacim, Anti-SP-A/IND'in her biri için çözücü ile birlikte toplam 100 µl olarak kullanıldı.

Deney modeline ait *ana gruplar* şu şekilde belirlendi;

**1- Kontrol grubu (NPC), (PC)(n:12);** (Gebe Olmayan; n:6, Gebe Olan; n:6). Herhangi bir uygulama yapılmamış olan bu grup, uygulanan enfeksiyöz ve tedavi edici ajanların oluşturduğu etki ve değişimi karşılaştırmak için kullanılacaktır.

**2-Sham grubu (n:6);** anestezi ve insizyonel travmanın oluşturduğu tesadüfi etkiyi izole ederek, tedavinin spesifik etkisini ortaya koymak amacı ile kullanılacaktır.

**3-PBS grubu(n:6);** Uygulanan antikor bloğu ya da tedavi edici ajan ile aynı volümde (100 ul) PBS uygulanan grup

**4-LPS (IU) grubu (n:6);** enfeksiyöz ajanın intrauterin yol ile uygulanacağı ve araştırılan moleküler belirteçler yönünden oluşturduğu etkinin belirleneceği grup,

**5- Tedavi etkinliği belirlenecek ajanların (SPA- Block), (IND) (SPA-Block; n:6 ve IND; n:6)'nin ayrı olarak IU uygulandığı grup(n:12);** Cervio-uterin bileşkede antikor yardımı ile 20ug/100 ul susturma uygulanarak reseptör cevabının izleneceği ve tedavi edici ajanların belirtilen dozlarda ayrı ayrı uygulanacağı ve servikte tek başlarına oluşturacakları etkinin, araştırılan belirteçler yönünden değerlendirilmesine olanak sağlayacağı grup,

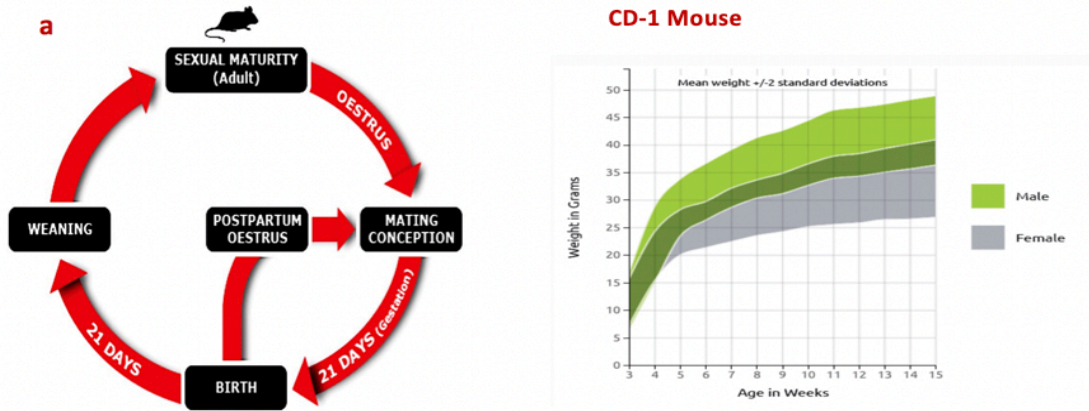
6- LPS ve tedavi edici ajanın (IND+LPS)'nin birlikte IU uygulanacağı grup(n:6); tedavi edici ajanların enfeksiyöz ajana karşı etkinliğinin doğrudan değerlendirilebileceği ve tedavi potansinin belirlenebileceği gruptur.

Cerrahi işlemlerden sonra periton ve üst deri Vicryl 5.0 (Ethicon) sutur ile dikildi ve cerrahi işlemden 48 saat sonra post-op gözlem gerçekleştirildi. Uygulanan işlemlere ve zamanlarını gösteren tablo aşağıda gösterildi.

Grup Adı	n	Ortalama	Ortalama Yavru Sayısı		Uygulama Tipi			Uygulama Zamanı		
			Sağ	Sol	Surgery	CO <sub>2</sub>	Avertin %2.5 (~540-670 ul)	LPS	IND	Anti-SP-A
					(By Respiratory)			(IU)	(IP)	(IU)
1 Non Pregnant Control	6	24,6			(-)	(+)	(-)			
2 Pregnant Control	6	37			(-)	(+)	(-)			
3 Sham	6	40,5			(+)	(+)	(+)			
4 PBS (100 ul)	6	39			(+)	(+)	(+)			
5 LPS (25 ug/100 ul)	6	38,9	5	6	(+)	(+)	(+)	11-12 AM		
6 Anti-SP-A (10 and 20 ug/100 ul)	6	37,3			(+)	(+)	(+)			11:30 AM
7 Indomethacin Control (2 mg/kg)	6	41,8			(-)	(+)	(-)		18:00 PM 07:00 AM	
8 LPS (25 ug/100 ul) + IND (2 mg/kg)	6	39,9			(+)	(+)	(+)	11-12 AM		

**Tablo 2.** Farelere Uygulanan İşlemler ve Zaman Diyagramı

CD-1 türü fareler için ağırlık ölçütü ve yaşam döngüsüne ait süreler [şekil 11](#)'de verildi.



**Şekil 11.** Fare Yaşam Döngüsü (a) (Meehan 1984) CD-1 fareler için haftalara göre ağırlık tablosu(Charles River Lab 2017).

LPS uygulamasından en geç 48 saat sonra, erken doğum gerçekleşmektedir (Agrawal, Smart et al. 2013). SP-A ve IND ile tedavi edilmiş veya tedavi etkinliğinin araştırıldığı ajanların uygulanmadığı diğer gruplarda, LPS uygulamasından 24 saat sonra, serviks dokuları çıkarılarak (erken doğum başlayıp ilk yavru vajen ya da kafese düştükten hemen sonra), deneysel sonuçlar yönünden karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak, uygulama sonrası, 10 saatlik bir zaman noktası, çift yönlü analizde gen ekspresyonu ve protein düzeyindeki değişikliklerinin saptanması için idealdir (Agrawal, Smart et al. 2013).

### **3.2. SP-A Ekstratının Hazırlanması:**

Pulmoner alveoler proteinozis (PAP) surfaktan birikimi ile karakterize edilen ve az rastlanılan bir akciğer hastalığıdır. 1958 yılında Rosen tarafından tanımlanan pulmoner alveoler proteinozisin surfaktanın yapımındaki fazlalık ya da yıkım sürecindeki aksaklıklara bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Bu hastalarda alveol boşluklarında Surfaktan Protein A (SP-A), ve surfaktan fosfolipidleri ve dejenere tip II alveol hücreler saptanmıştır. Lipoprotein sindirimini üstlenen alveoler makrofajların boyutlarında normal makrofajlara göre 5-6 kat artış gözlenmektedir. Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) genindeki mutasyon, toksik inhalasyon veya hematolojik bozukluklara sekonder olarak gelişebilen PAP, oto-immün alveoler makrofaj aktivasyonuna sebep olabilmektedir. Oto-immün alveoler proteinozis, tüm vakaların %90'ını temsil etmektedir ve PAP'ın en sık biçimidir. Bu hastalığın dünyada tahmini görülme sıklığı 0.1/100000' dir (Shah, Hansell et al. 2000);(Borie, Danel et al. 2011). Alveolar proteinozisli hastalardan toplanan bronşiyal lavaj sıvısından ekstraksiyonla elde edilen SP-A, Condon tarafından bildirilen metod ile işlenerek hazırlanmaktadır (Condon, Jeyasuria et al. 2004).

Bu çalışmada, örneklerin içerdiği toksin miktarı kit yardımı ile belirlendi (Genscript Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit Cat. No. L00350C) ve arkasından polimiksin B agaroz jel kullanılarak (ToxinEraser Endotoxin Removal Protocol Kit Cat. No. L00338) endotoksin dekontaminasyonu gerçekleştirildi.

İşlem sonrası, tekrar endotoksin miktarı ölçüldü ve nihai olarak etkin protein düzeyini belirleyebilmek için BCA ölçümü (Pierce Protein Assay Kit Cat.No. 23225) yapıldı. Ölçümler için, SpectraMax M2e ROM v3.0.22 kullanıldı.

### **3.2.1. Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Analizi:**

Üretici protokolü (Genscript Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit Cat. No. L00350C)(Genscript 2018) takip edilerek; 1.7 ml LAL reaktif suyu eklenerek Limulus Amebosit Lysate hazırlandı. Sulandırma sonrası 30 saniye çalkalandı. Kromojenik Substrat 2mM konsantrasyonda ve ışıktan korunarak 1.7 ml LAL reaktif çözücü ile hazırlandıktan sonra Reconstitute the Color-Stabilizer 10 ml tampon S ile sulandırıldı. Color-stabilizer #2 and #3 her ikisine de 10 mL LAL reaktif suyu ekleyerek kullanıldı. Endotoxin Standard Solution; liyofilize endotoksin standardına (10EU) 2 ml LAL reaktif suyu eklenerek konsantrasyon 5 EU/ml olacak şekilde çözülerek 15 dakika boyunca vortekslenerek iyice karıştırıldı. Kullanmadan önce 30 saniye boyunca tüm dilüsyonlar için vortekslendi. Örneklerin hazırlanışı;

1. 100 ul standart veya test numunelerini dikkatlice endotoksin içermeyen tüplere eklendi. Tüm numuneler 30 saniye karıştırıldı.
2. Her şişeye 100 µL sulandırılmış LAL eklendi. 30 dakika boyunca su banyosu kullanarak 37 ° C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir şişeye 100 ul kromojenik substrat çözeltisi eklendi. Şişeler iyice karıştırıldı. Su banyosu kullanarak 6 dakika boyunca 37 ° C'de inkübe edildi.
3. Her bir şişeye 500 ul sulandırılmış renk dengeleyici # 1 eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. Her şişeye 500 ul renk stabilizatör # 2 eklendi ve iyice karıştırıldı arkasından 500 ul renk stabilizatör # 3 eklendi. Her birinden 200ul, 96 welle aktarıldı.
5. Spektrofotometre kullanılarak endotoksin içeriği Microplate Reader SpectraMax M2 545 nm absorbansda okundu.

Bu şekilde örneklerin içerdiği endotoksin miktarları belirlendi.

### **3.2.2. Toxin Eraser Endotoxin Uzaklaştırma:**

Üretici protokolü (ToxinEraser Endotoxin Removal Protocol Kit Cat. No. L00338)([Genscript 2018](#))'ne göre;

1. Kolon Aktivasyonu: 5 ml soğuk rejenerasyon tamponu eklenerek kolon yıkandı. Debi hızını 0.25 ml / dak olarak ayarlandı. Sistemi endotoksinsiz yapmak için yıkama aşaması iki kez daha tekrarlandı. Rejenerasyon tamponu kullanarak kolonun duvarını yukarıdan aşağıya durulandı. Bu işlem 1.5 ml'lik bir sütun için yaklaşık 60 dakika sürmektedir.
2. Kolon Dengeleme: 6 ml dengeleme tamponu eklenerek tamponun 0,5 ml / dak hızında tamamen boşalmasına izin verildi. Dengeleme adımını iki kez daha tekrarlandı. Bu işlem yaklaşık 40 dakika süremektedir.
3. Endotoksin Kaldırma: Sütun dengelemesinden sonra örnek eklenerek akış hızı kontrolü dakikada 10 damla olarak ayarlandı. 1,5 ml hacimden sonra örnek toplamaya başlandı. Numune tamamen sütuna girdikten sonra, numuneyi geri kazanmak için 1,5 ml dengeleme tamponu eklendi. Protein örneği içeren fraksiyonları toplandı. Nihai endotoksin seviyesi, istenen endotoksin seviyesinin üzerinde olan örnekler için işlem tekrarlandı.
4. Sütunun Depolanması. Kolonun saklanması için, 10 ml dengeleme tamponu ile yıkandı ve kolonun tamamen boşaltıldı. 1.5 ml rejenerasyon tamponu eklenerek (% 20 etanol içerir). 2 °C ile 8 °C arasında saklandı.

### **3.2.3. Bicinchoninic Acid (BCA) Ölçümü:**

Üretici protokolü (Pierce Protein Assay Kit Cat.No. 23225)([ThermoFisher 2018](#)) uyarınca gerekli toplam working solution (WR) hacmi belirlendi. Her standart veya bilinmeyen numuneden 25µl pipetlenerek well içerisine eklendi (çalışma aralığı = 5-250µg /ml). 200 ul wr eklenerek 30 saniye boyunca plaka çalkalayıcıda iyice karıştırıldı. 37 ° C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına 562 nm'de absorbansı Microplate Reader SpectraMax M2 ölçüldü.

### **3.3. Coomassie Blue Boyaması:**

Coomassie boyaları (R-250 ve G-250), protein bantlarını parlak mavi boyayan disülfonatlanmış trifenilmetan boyalarıdır. Boyalar elektrostatik etkileşimler ile, protonlanmış bazik amino asitleri (lisin, arginin ve histidin) ve hidrofobik aromatik kalıntıları birleştirir. Boya, poliakrilamide yüksek afinite ile bağlanmaz, ancak jel matrisine düşük afinite ile nüfuz eder. Coomassie boyaları genel olarak bitiş noktası boyaları olarak işlem görür, bu da fiksasyon ve boyama aşamaları için önemli zaman esnekliği sağlar. Coomassie boyaları kovalent değildir ve geri dönüşümlüdür (Steinberg 2009).

Boyama için 200 ug/ml protein yükü her bir yükleme kuyucuğu için örneğin içerdiği (SP-A ve fragmentleri olan CDM, PL, KINK, GLOB) total protein miktarına göre hesaplandı. RIPA lizis buffer (ThermoFisher Cat No 89900) ve leamlı sample buffer (Biorad Cat No 1610737) ile kombine edilerek 15 ul total lizat yüklendi. Endotoksin arındırması uygulanmış örnekler PL, KINK, GLOB, CDM ve SP-A kullanılmıştır. Tüm örnekler, 95<sup>0</sup> C de 5 dk kaynatılarak buz üzerine alındı.

%4-12' lik Bis-Tris jel (ThermoFisher-Novex Cat No NP0321) kullanılarak yapılan yükleme sonrası yürütme tankı 1X MES SDS Running Buffer (Thermo Fisher Cat No NP0002) ile dolduruldu. 100 V da 1 saat 45 dk elektroforez (BioRad Power Pac 3000) uygulandıktan sonra % 50 methanol and % 7 acetic acid solüsyonu ile 15 dk prefiksasyon yapılan jel daha sonra ultrapure saf su (Invitrogen- Cat No 10977015) ile 3x5 dk yıkandı. Arkasından, GelCode Blue Stain Reagent (ThermoFisher Cat No 24590), üretici önerisi doğrultusunda kullanıldı ve jel 1 saat süreyle boyandı. Boyanan jel, daha sonra bantların geliştirilebilmesi için 2 saat boyunca ultrapure saf su ile yıkandı.

### **3.4. LPS Uygulaması:**

Lipopolisakaritler (LPS), Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının karakteristik bileşenleridir. Tipik bir LPS molekülü, lipit A'ya (bir glukosamin bazlı fosfolipit), nispeten kısa bir çekirdekli oligosakarit ve bir distal polisakarite (O-antijen) sahiptir. LPS'ler dış zarın bütünlüğüne katkıda bulunur ve hücreyi safra tuzlarının ve lipofilik

antibiyotiklerin etkisine karşı korur. LPS ve lipit A kısmı, ortak patojen ile ilişkili moleküler desenleri (PAMP'ler) tanıyan Toll benzeri reseptör protein ailesinin bir üyesi olan Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ile doğal immün sistemin hücrelerini uyarır. LPS; konakçı hücreleri, TLR2 ve TLR4 aracılığıyla uyarırlar. Bu stimülasyon, TNFa (tümör nekroz faktörü), IL-1 (interlökin 1) ve IL-6 gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olur. Escherichia coli (E.coli) O111: B4 kaynaklı lipopolisakaritler (LPS'ler), E.coli serotip O111: B4'ten ekstrakte edilen bir fenoldür ve makrofajların uyarılması için de kullanılabilir (Sigma-Aldrich 2018). LPS' nin yarı ömrü yaklaşık 12 saat olarak belirlenmiştir (Huang, Liu et al. 2007).

Bu çalışmada, LPS (Lipopolysaccharides-*Escherichia coli* O111:B4; Sigma, L2630-10 mg), total volüm 25 ug/100ul olacak şekilde hesaplandı. 10 mg stok 5 ml steril PBS ile çözülerek 2mg/ml çalışma solüsyonu elde edildi. Her bir fare için, uygulanan miktar, PBS ile çözülmüş 100 ul' dir. Hücre kültürü için, 0.2 ng/100ul uygulama dozu tercih edildi. Uygulanan dozlar, fare ağırlıkları ve hücre kültüründe kullanılacak medium miktarına göre hesaplanarak uygulandı.

### **3.5. Hücre kültürü:**

Sıvı nitrojen içerisinde saklanan hücreler ve deney özelliğine göre seçilerek kullanılacak olan RAW/ RAW Blue hücreleri 37<sup>0</sup>C su banyosu içerisinde hızlı bir şekilde çözülerek, DMEM (Gibco, 11965092), %10 FBS (Gibco, LS26140079) ve 2 mM L-glutamin (ThermoFisher, Cat No 25030081) içeren temel medium ile %5 CO<sub>2</sub> içeren 37<sup>0</sup>C etüvde aşağıda belirtilen ortamlarda büyütüldü ya da test edildi. T25 flask (Falcon, Cat No 10350391) içerisinde pasajlanmış ve HeraCell 150 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi. Hücre miktarları, 1x10<sup>5</sup> ve 2x10<sup>4</sup> olacak şekilde deneylere alındı. Deneyler konfluens en az %80-90 iken gerçekleştirildi ve %100 konfluense izin verilmedi. Bu konfluens oranı, gece boyu inkübasyon ile sağlanmış hücreler ertesi gün kullanılmıştır.

#### **3.5.1. Raw ve Raw Cell Blue Hücre Kültürü:**

RAW-Blue hücreleri (Invivogen, Cat No Raw-Sp-Mouse Macrophage Reporter Cell Line Version # 16I23-MM) RAW 264.7 makrofajlarından (Mouse RAW 267.4 macrophage cells, ATCC TIB-71) türetilir. Bu hücreler embriyonik alkalın fosfataz



(SEAP) genini eksprese eder ve bu gen NF-kB ve AP-1 transkripsiyon faktörleri tarafından indüklenebilir. RAW-Blue Hücreleri RIG-I, MDA-5'in yanı sıra tüm TLR'leri (TLR5 hariç), ifade ederler. NOD1 ve NOD2 yanısıra, TLR3 ve NOD1'in ifadesi çok düşüktür. Bu reseptörlerin spesifik agonistlerinin varlığı, sinyalleme indükler ve NF-kB ve AP-1'in aktivasyonuna yol açarlar. RAW-Blue hücreleri yüksek seviyede Dectin-1 ekspresyonu yaparlar.

Raw Blue hücrelerin Zymosan ile ya da ısı ile öldürülmüş maya preparasyonları ile indüksiyonu Dectin-1'e bağlı bir NF-kB aktivasyonudur. RAW-Blue hücrelerinde NF-kB ve/veya AP-1 aktivasyonu SEAP salgılanmasına yol açar. QUANTI-Blue Analizi; SEAP'ın algılanmasında ve ölçülmesinde kullanılır. RAW-Blue hücreleri Zeocin ve G418'e dayanıklıdır. Hücreler Zeocin ilave edilmiş büyüme ortamında tutularak SEAP kodlayan plazmid aktivasyonu korunmuştur (Invivogen 2018).

Çalışmada, üretici önerileri doğrultusunda büyüme ve test ortamı hazırlandı;

Büyüme Ortamı: DMEM, 4.5 g/l glukoz (Gibco, 11965092), %10 fetal bovin serumu (FBS) (Gibco, LS26140079), 100 ug/ml Normocin (Invivogen, Cat No ant-nr-1), 2 mM L-glutamin (ThermoFisher, Cat No 25030081) ve Zeocin (200ug/ml) (Invivogen, Cat No ant-an-zn1).

Test Ortamı: DMEM 4.5 g/l glukoz, %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS (30 dakika 56° C'de), 100 ug/ml Normocin, 2 mM L-glutamin

Hücrelerin inkübasyonu için, 6 well ve 96 well plate kullanıldı. PCR tekniği ile, LPS için en uygun etkili dozun 0.2 ng/ml olduğu belirlendi.

**3.6. Quanti-Blue Analizi:** 250 ml'lik steril bir cam şişe içerisine QUANTI-Blue (Invivogen Cat No rep-qb1, Version 18L10-MM) içeriği eklenerek 100 ml steril su ile karıştırıldı. Yavaşça 30 dakika boyunca 37°C su banyosunda ısıtıldı. 96 well plate içerisine 20 ul supernatant ve 180 ul sulandırılmış QUANTI-Blue eklendi ve kalan kısım -20°C'de tekrar kullanılmak üzere saklandı. QUANTI-Blue ışıktan korunarak SEAP aktivitesi 620-655 nm' de Microplate Reader SpectraMax M2 ile ölçüldü.

### 3.7. Polymyxin Denaturasyonu:

Hücre kültüründe, Endotoksin arındırma işlemi amacı ile kullanılan filtre sisteminin içerdiği Polymyxin B içeren boncukların, işlem sırasında sızıntıya bağlı bir etki oluşturup oluşturmadığını incelemek amacı ile, normal PBS filtre sisteminden geçirildikten sonra R-PBS (Removal PBS) elde edilmiştir. Elde edilen ürün, kaynatılmaksızın veya 110<sup>0</sup>C' de 20 dakika kaynatılıp Polymyxin B etkisi ortadan kaldırılarak akarkasından\_Quanti-Blue analizi ile değerlendirildi.

### 3.8. RT (Real Time)-PCR:

RT-PCR, çeşitli doku ve hücre tiplerinde, gelişimsel zaman dilimlerinde gen ekspresyonunu karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem cDNA klonlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Bachman 2013).

Çalışmada, hücre kültürü lizatlarından (Mouse RAW 267.4 macrophage cells, ATCC TIB-71) RNA eldesi için, trizol reaktifi üretici protokolü doğrultusunda (Invitrogen, Cat No 15596026) kullanıldı. Lizatlar için, 1 ml TRIzol Reaktifine 0.2 ml kloroform eklenerek, örnekler 15 dakika boyunca 4 ° C'de 12.000 x g'de santrifüjlendi. RNA içeren renksiz faz, yeni bir tüpe aktarıldı. RNA'nın miktarı ve kalitesi spektrofotometrik (Thermo fisher Nanodrop 2000) olarak doğrulandı. 2 µg toplam RNA, cDNA sentezi için kalıp olarak kullanıldı.

Kantitatif RT-PCR ile IL-1β mRNA'nın indüksiyonunu belirlemek için, cDNA, üreticinin protokolü tarafından tarif edildiği gibi Taqman Gene Expression Master Mix (Cat no 4369016) ve Supermix (Quanta-Lot 020892) sentez kiti kullanılarak IL1b (Mm00434228-m1)' nin ekspresyon analizleri (Applied Biosystems) için kullanıldı. Reaksiyonlar; 0.5 µl cDNA içeren 10 µl 'lik bir karışım içinde dupleks RT-PCR, ilgili geni amplifiye eden bir primer çifti ile aynı tüpte bir iç referans gliseraldehit 3- fosfat dehidrojenaz (GAPDH- Lot 4351309) kullanılarak gerçekleştirildi. Thermocycler (Applied Biosystems-Veriti) parametreleri; 2 dakika 50<sup>0</sup>C, 10 dakika 95<sup>0</sup>C, 15 saniye 95<sup>0</sup>C 'lik 40 döngü ve 1 dakika boyunca 60<sup>0</sup>C 'dir. Gen ekspresyonunun yarı nicel

analizi, GAPDH ile ilgi genin ekspresyonunu normalleştiren karşılaştırmalı CT ( $\Delta\Delta CT$ ) metodu kullanılarak yapıldı. Örnekler ve standartlar, triplicate olarak çalışıldı. ABI StepOnePlus RT-PCR yazılımı (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) ile, sonuçlar okundu ve değerlendirildi.

### **3.9. İmmünohistokimyasal Analiz:**

Dokular; Anti-SP-A (abcam, 115791), COX1(abcam, 109025), TLR2 (thermo, PA5-11592), TLR4 (abcam 13556), Notch1 (cellsignal, D1E11), DLL1 (abcam, 10554) ve Jag-2 (abcam, 109627), Mast Cell Tryiptase (bios-2725R) ve Macrophage Cd-11b (ab13357) protein lokalizasyonlarının değerlendirilebilmesi amacı ile aşağıdaki işlemlerden geçirilmiştir.

Serviks dokuları %10'luk formalin (Merck (%37) Cat No 818708) hazırlanarak bu fiksatif içerisinde dokular 24 saat bekletildi. Arkasından 3 saat boyunca çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra sırasıyla %70, 80 ve 90'luk etanol (Sigma Cat No 459844) serilerinde 24 saat boyunca tutuldu. %100'lük etanolde 3 saat tutulduktan sonra ksilol (Sigma Lot No 534056) içerisinde yaklaşık 5 dakika tutularak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Şeffaflaştırılan dokular 3 saat boyunca 56°C'lik etüvde bulunan parafin içerisinde bekletildikten sonra blok hazırlanmak üzere temiz parafin içeren kalıp içerisine gömüldü. Bloklar mikrotoma yerleştirilerek 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı, su banyosunda düzleşmeleri sağlandıktan sonra süperfrost lamalar (Menzel Superfrost Plus Cat No 4951) üzerine aktarıldı. Kesitler gece boyunca oda ısısında kurutuldu.

Kesitleri yıkamak için kullanılan 1X PBS (Phosphate Buffer Saline) hazırlandı (2 litre distile su içinde 2,85 gr Disodyum Hidrojen Fosfat ( $Na_2HPO_4$ ) (Merck Cat No 567547;), 0,8 gr Potasyum Hidrojen Fosfat ( $KH_2PO_4$ ) (Merck Cat No M1048771000), 16 gr Sodyum Klorür ( $NaCl$ )(Merck Cat No 1.06400.1000), 2M NaOH ile pH=7,4). Boyama öncesi Sitrik Asit tamponu (900ml distile su içerisinde 2,1 gr Sitrik asit ( $C_6H_8O_7.H_2O$ ) (Merck Cat No 1.0044.1000), 2M NaOH ile pH=6,0) ve endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla %3'lük  $H_2O_2$  Solüsyonu (şale içerisinde 82 ml metanol ( $CH_3OH$ ) (Merck Cat No 1.06009.2500) ve 8 ml %30'lük  $H_2O_2$  (Sigma

Cat No 18312) hazırlandı. Bloklama için Ultra V Block (Thermo Scientific Cat No TA-125-UB;), Sekonder Antikor olarak Biotinli Anti-Rabbit IgG (keçide üretilmiş) (Vector Laboratories, Cat No BA-1000), Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) (Invitrogen Cat No 85-9043), Kromojen Diaminobenzidine tabletleri (Sigma Cat No D4168), Zıt boyama için Mayer Hematoksilen (Merck Cat No 1.09249.1000), Kapatma Solüsyonu olarak Kaisers Gliserin Jelatin (Merck Cat No 1.09242.0100) boyama protokolünün diğer aşamalarında kullanılmıştır. Kesitler Axioplan mikroskop ile (Zeiss, Almanya) incelendi ve fotoğraflandırdı. Image J (1.52 V) yazılımı ile ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı.

### **3.10. Protein Ekstraksiyonu ve Western Blot Analizi:**

Elde edilen dokularda Anti-SP-A (abcam, 115791), COX1(abcam, 109025), TLR2 (Thermo, PA5-11592), TLR4 (abcam 13556), Notch1 (cellsignal, D1E11), DLL1 (abcam, 10554) ve Jag2 (abcam, 109627), Mast Cell Triptaz (bios-2725R) ve Macrophage Cd 11b (ab13357) protein düzeylerinin değerlendirilebilmesi amacı ile aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir;

Serviks dokuları için kullanılacak Lizis Tampon Solüsyonu [(Lysis Buffer) (0,01 M Tris (0,6gr Tris (Merck, Cat No 1.08387.2500)] 40 ml distile suda çözülerek hazırlandı (pH'sı HCl ile 7,4). Son hacim 50 ml' dir. Sodyum-ortovanadate (0,184 gr Na-orthovanadate; Sigma, Cat No L4390), 10 ml Tris (pH:10;0,1M tris:0,6gr/50ml) ile ısı yardımıyla çözüldü. Proteaz İnhibitör Kokteyli (Sigma, Cat No P8340) lizatler için kullanıldı.

Serviks dokularının bulunduğu ependorf tüpleri (-80) °C'den çıkarılarak buz üzerine konuldu. Dokular tartılarak tüp içerisine alındı ve doku örnekleri, 0.2 gr doku için 600µl lizis tampon ve 10µl proteaz inhibitör kokteyli kullanıldı. 1 saat boyunca buz üzerinde inkübe edildikten sonra sonikatör ile homojenize edildi. Örnekler 15000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. Bu lizatların içerdiği protein miktarları BCA kiti (Pierce, Cat No 23225) kullanılarak ölçüldü. Arkasından SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez uygulandı. Bu işlem için %4-12 Bis Tris Plus Jel sistemi (Invitrogen Cat No, NW04120BOX) kullanıldı ve 120 V 60 dakika elektrofrez

gerçekleştirildi. Arkasından blotlama iBlot Dry jel transfer sistemi (Invitrogen, IB1001) kullanılarak yapıldı. Membran primer antikorun dilue edildiği bloklama solüsyonu (%1 Tween-20 ilave edilmiş Tris tamponlu tuz solüsyonu-TBS) ve %5'lik yağsız kuru süt tozu kullanılarak oda ısısında 1 saat bloklandı. %5'lik yağsız kuru süt tozu ile hazırlanmış primerler ile membranlar gece boyu karıştırıcı üzerinde +4<sup>0</sup>C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3x10 dakikada yıkandı.

Membranlar, primer antikor için uygun sekonder kullanılarak Peroxidase işaretli Anti Rabbit (1/2000) sekonder ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İBu işlemde sonra TBS-T ile 3x10 dakika yıkandı.

Membran SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP ile 5 dakika inkübe edildi. Membranlar karanlık oda içerisinde hiperfilme aktarıldıktan sonra membran üzerindeki protein düzeyleri Image J (1.51 R) yazılımı ile belirlendi ve kantitatif olarak protein seviyeleri karşılaştırıldı.

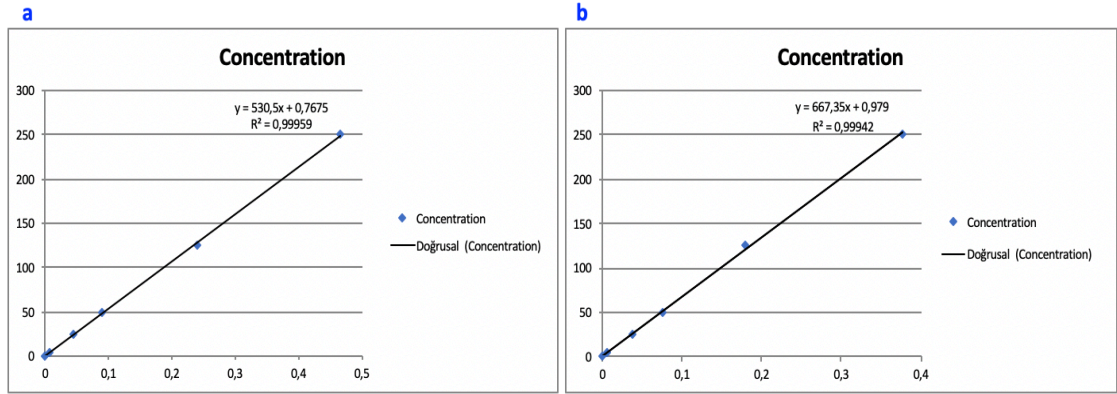
### **3.11. İstatistiksel Analiz:**

Sürekli değişkenler (göreceli mRNA seviyeleri) Student's t-testi veya ANOVA ile değerlendirilecektir veya veriler normal dağılmadığında ve iki grup karşılaştırıldığında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Veriler normal dağıtıldığında, gruplar çoklu kıyaslamalar için Dunn'ın post-hoc analizi ve Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Kategorik değişkenler (örneğin preterm doğum), Fisher's kesin testi kullanılarak analiz edildi. P<0.05 istatistiksel analizlerde anlamlı fark olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bicinchoninic Acid (BCA) Ölçümleri:

Örneklerde mevcut protein miktarının belirlenmesi amacı ile, endotoksin arındırma işlemi öncesinde (Şekil 12.a) ve sonrasında (Şekil 12.b) BCA ile protein miktarı belirlendi. Böylece, işlemler sırasında başlangıca göre ne kadar protein kaybı olduğu belirlenebildi.



**a**

Sample	OD value	OD subtract blank	Calculated concentration (ug/ml)	Concentration corrected for dilution (ug/ml)	
FL 1:50	C2	0,161	0,075	40,6	2028
PL UND	C3	0,115	0,029	16,2	16
KINK UND	C5	0,256	0,170	91,0	91
GLOB UND	C7	0,27	0,184	98,4	98
CDM UND	C9	0,128	0,042	23,0	23

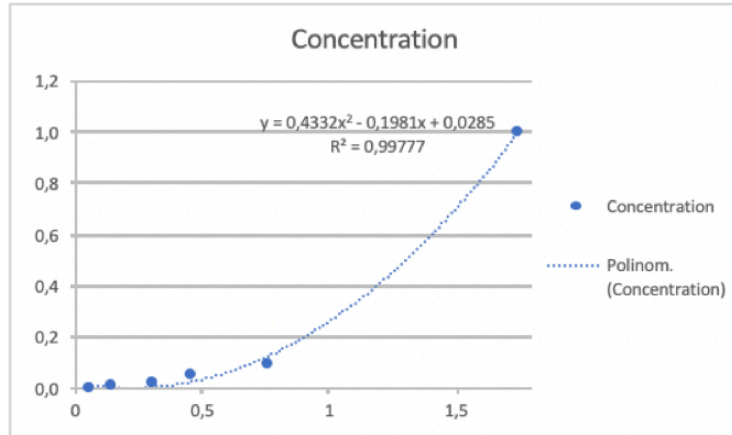
**b**

Sample	OD value	OD subtract blank (x)	Calculated concentration (ug/ml)	Concentration corrected for dilution (ug/ml)	
Negative Control	C1	0,058	-0,025	-15,7	-1
KINK UND	D2	0,096	0,013	9,7	10
GLOB UND	D3	0,131	0,048	33,0	33

**Şekil 12:** Bicinchoninic Acid (BCA) Ölçümü; **a.** İkinci kez endotoksin uzaklaştırma işlemi uygulanmadan önce örneklerde mevcut protein içeriğinin belirlenmesi **b.** İkinci kez endotoksin uzaklaştırma gerçekleştirilen KINK ve GLOB için uygulama sonrası ölçülen protein değerleri. FL: Full length: Tam uzunlukta SP-A, UND: Dilue edilmemiş.

Tam uzunluktaki SP-A (FL) ve dilue edilmemiş (UND) farklı SP-A fragmentleri BCA ölçümü sonrası karşılaştırıldığında, iki kez endotoksin uzaklaştırması yapılan KINK için yaklaşık %88.9 GLOB için %66.3 protein kaybı gözlenmiştir. Polimiksin bağlı boncuklar ile gerçekleştirilen endotoksin uzaklaştırma işlemi sırasında uzaklaştırılmış endotoksine karşın, büyük miktarda protein kaybı gerçekleşmiş olduğundan, daha sonra yapılacak uzaklaştırma işlem sayısını sınırlamaktadır. Bununla birlikte hücre kültürü deneylerinde elde edilen düşük konsantrasyonlu proteinin etkinliği gözlemlenmiştir.

#### 4.2. Toxin Sensor Chromogenic LAL Endotoxin Analizi ve Toxin Eraser Endotoxin Uzaklaştırma:

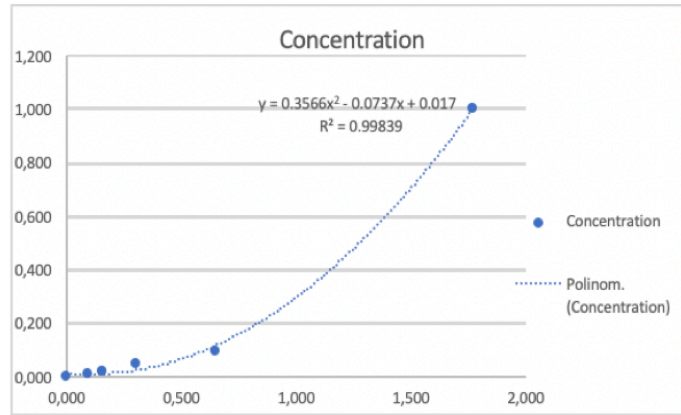


Sample	OD value	OD subtract blank	Calculated concentration (EU/ml)	Concentration corrected for dilution (EU/ml)	Concentration corrected for dilution (ng/ml)
Removal PL 1:1000	C1	0,381	0,26	0,022	22,397
After KINK 1:5000	C3	0,351	0,23	0,019	96,401
After KINK-REDO 1:1000	C6	0,326	0,21	0,017	17,173
After GLOB-REDO 1:5000	D4	0,394	0,28	0,024	119,733
Negative Control	D5	0,160	0,04	0,014	0,014

Şekil 13: Toksin uzaklaştırma işlemi öncesi örneklerde tespit edilen toksin miktarları

Endotoksin arındırma işlemi öncesinde, örneklerde mevcut olan endotoksin miktarı tespit edildi. Ölçümlerde, endotoksin içeriği başlangıçta ölçülerek (Şekil 13) 1-2 ng/ml (Endotoxin Units) değerine olabildiğince yakın değerler elde edilmesi amaçlandı. Ancak endotoksinden arındırma işlemi sırasında yüksek miktarda protein kaybının görülmesi tekrarlı endotoksin arındırma basamağını sınırlamıştır. Bazı proteinlerin belirli ligandlara bağlanması engellenmeden endotoksine sıkıca bağlanır. Bu durumda, protein endotoksin ile endotoksin arındırma reçinesine bağlı kalarak muhtemelen ilgili protein kaybına neden olur (Genscript 2018).

Her deney kurgusunda, önceki basamakta ölçülen bir örnek sabit tutularak, sonraki deney için sistemin doğru şekilde çalışıp çalışmadığı test edildi.



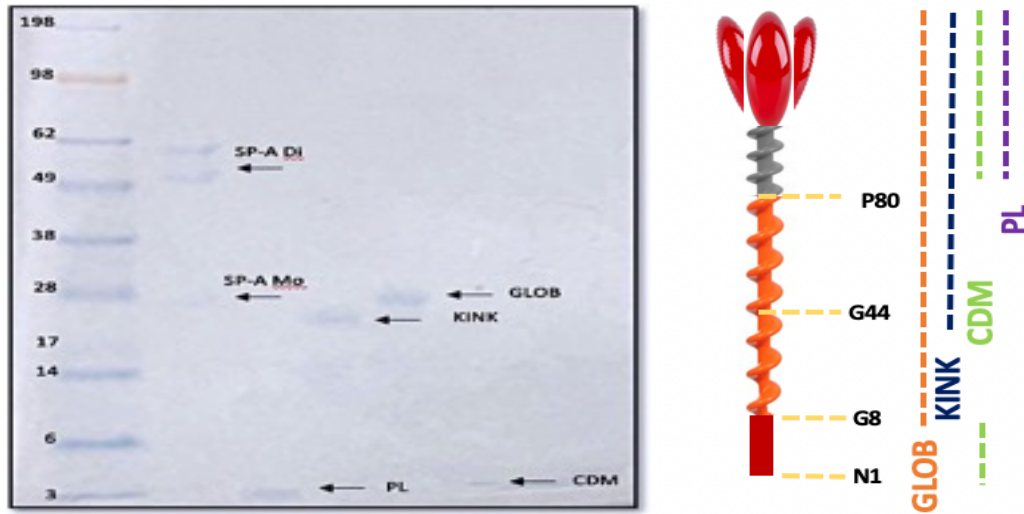
Sample	OD value	OD subtract blank	Calculated concentration (EU/ml)	Concentration corrected for dilution (EU/ml)	Concentration corrected for dilution (ng/ml)	
Removal PL 1:10	1	1,678	1,62	0,849	8,493	0,849
Removal PL 1:50	2	1,300	1,25	0,454	22,711	2,271
Removal PL 1:250	3	0,655	0,60	0,066	16,479	1,648
After CDM 1:50	6	0,273	0,22	0,006	0,295	0,029
After CDM 1:1250	8	0,097	0,04	0,021	25,978	2,598
After KINK 1:250	11	1,197	1,14	0,368	92,006	9,201
After KINK 1:1250	12	0,649	0,60	0,064	79,993	7,999
After GLOB 1:1250	16	1,632	1,58	0,795	993,253	99,325
Negative Control	17	0,054	0,00	0,029	0,029	0,003

Şekil 14: Toksin uzaklaştırma işlemi sonrası örneklerde tespit edilen toksin miktarları



FL SP-A, PL ve CDM ve REDO KINK için endotoksin miktarı kabul edilebilir düzeyde iken ikinci kez endotoksinden arındırılarak çalışılan örneklerde (REDO) (Şekil 14) elde edilen endodoksin değeri; ilk ölçüm ile karşılaştırıldığına After GLOB REDO için %88 azalma elde edilmek ile birlikte protein miktarının %60 azalarak 33 ug/ul' ye kadar inmesi nedeni ile arındırma işlemi tekrarlanmadı. Farklı dilüsyon ve ölçüm değerleri karşılaştırılarak, OD değeri ölçüm aralığı dışında kalan değerler dışarıda bırakıldı ve analiz aralığında yer alan değerler, uygun olarak değerlendirildi.

### 4.3. Coomassie Blue Boyaması:



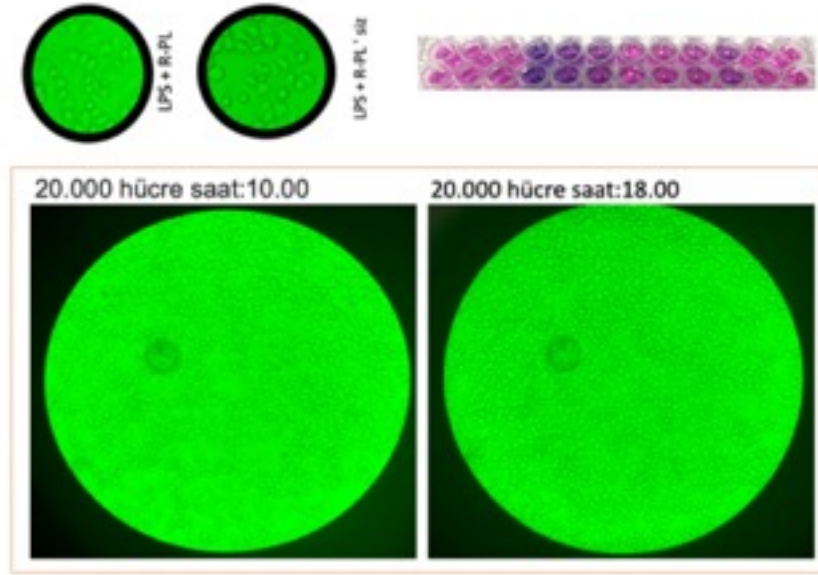
**Şekil 15:** SP-A ve fragmentlerine ait %4-12' lik jel üzerinde 200 ug/ml protein yükü ile görüntülenen kDa değerleri. SP-A Mo: Sürfaktant Monomer, SP-A Di: Sürfaktant Dimer, GLOB, KINK, CDM, PL: SP-A' ya ait diğer fragmentler.

Coomassie Blue boyaması ile, tam uzunluktaki SP-A ve SP-A mutantlarına ait fragmentlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi ve jel üzerindeki lokalizasyonlarının gösterilmesi amacı ile bu boyama tekniği kullanıldı.

Moleküler yapı olarak tam uzunluktaki SP-A yapısı monomerik (24 kDa) ve dimerik (50-60 kDa) olarak belirlendi. Coomassie Blue boyaması ile SP-A fragmentlerine ait kDa değerleri KINK:22 kDa, GLOB:28 kDa, PL:2 kDa ve CDM:4 kDa olarak belirlendi)

#### 4.4. LPS Uygulaması ve RT-PCR:

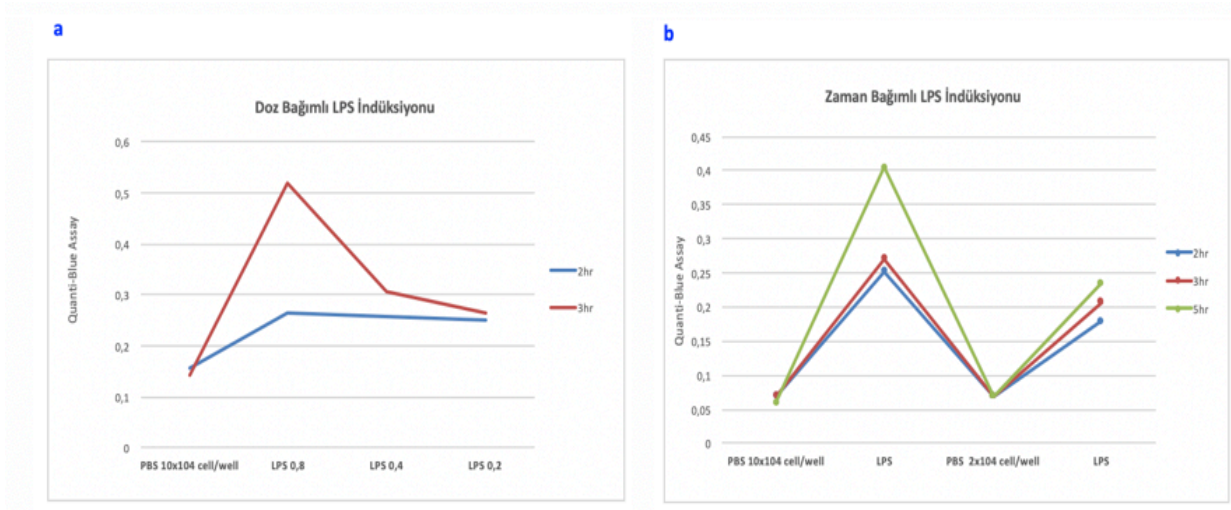
Fare modelinde kullanılaca dozların belirlenebilmesi ve LPS dozu ile inkübasyon süresinin hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi amacı ile RAW Blue hücreleri kullanıldı. (Şekil 16).



**Şekil 16:**  $2 \times 10^4$  Raw Blue hücreleri ile gerçekleştirilen kültürde 0.2 ng/ml LPS' ye bağlı cevabın Quanti-Blue ile ölçümü

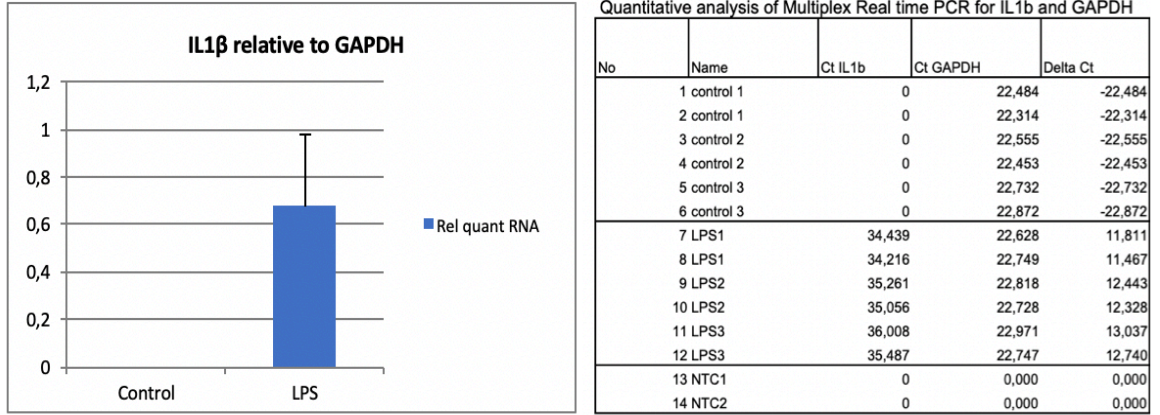
Hücre kültüründe  $10 \times 10^4$  hücre üzerinde uygulanan 0.8, 0.4 ve 0.2 ng/ml LPS indüksiyonu sonrası hücreler üzerinde iki kat ya da daha fazla cevap oluşturacak ancak toksik etkisi en az doz olacak şekilde doz belirlenmeye çalışılmıştır. Uygulama sonucunda; LPS cevabının 2 saat inkübasyon sonrası başladığı ve ölçülebilir cevap için en az 3 saatlik bir bekleme süresinin gerekli olduğu tespit edildi. 0.2 ng/ml LPS için 2 ve 3 saatlik cevabın benzer olduğu görüldü (Şekil 17.a).

$10 \times 10^4$  ve  $2 \times 10^4$  hücre içeren iki farklı well içerisinde 0.2 ng/ml LPS için zaman-doza bağlı olarak yapılan ölçümler incelendiğinde, her iki hücre grubu için de, en iyi cevabın 5 saat sonunda elde edilebildiği belirlendi. Hücre miktarının fazla olması, 5 saat sonunda cevabın şiddetini artırmakta ancak  $2 \times 10^4$  hücre ile devam etmek cevap benzerliği ve komponentlerin miktarsal azlığı nedeni ile uygun bulundu. (Şekil 17.b).



**Şekil 17:** a.  $10 \times 10^4$  hücre ile gerçekleştirilen Quanti-Blue ölçümleri sonucu doza bağımlı zaman grafiği ve b.  $10 \times 10^4$  ve  $2 \times 10^4$  hücre ile gerçekleştirilen kültürde zamana bağlı olarak 0.2 ng/ml LPS' ye verilen cevap grafiği.

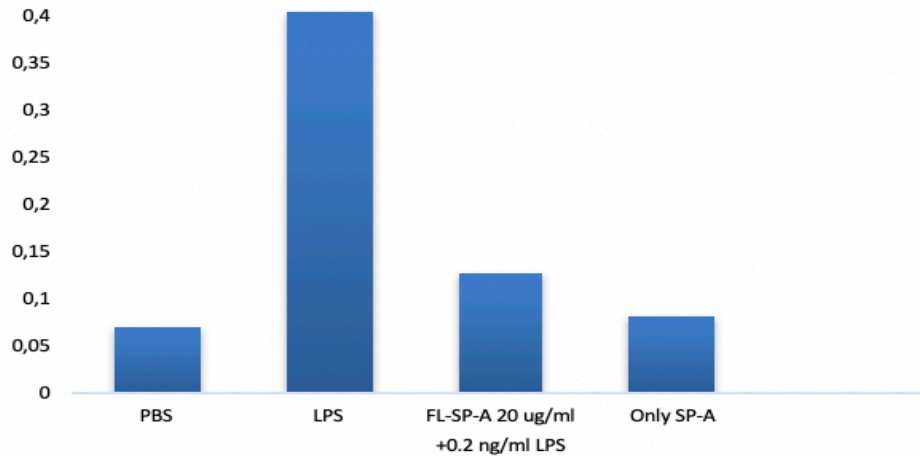
Elde edilen dozlar için, PCR uygulaması yapıldı ve IL1 $\beta$  ekspresyonunu etkileme durumu gözlemlendi. Bu teknik ile, en az toksisite oluşturması bakımından 0.2 ng/ml ile oluşan etkinin kontrole göre en az 2 kat ya da daha üzerinde olması yeterli kabul edildi (Şekil 18). Bundan sonraki uygulamalarda LPS indüksiyonu için bu doz kullanıldı.



**Şekil 18:** 0.2 ng/ml LPS indüksiyonu sonrası, IL1-β ekspresyonunun internal kontrol GAPDH ile karşılaştırılması ( $10 \times 10^4$  hücre)

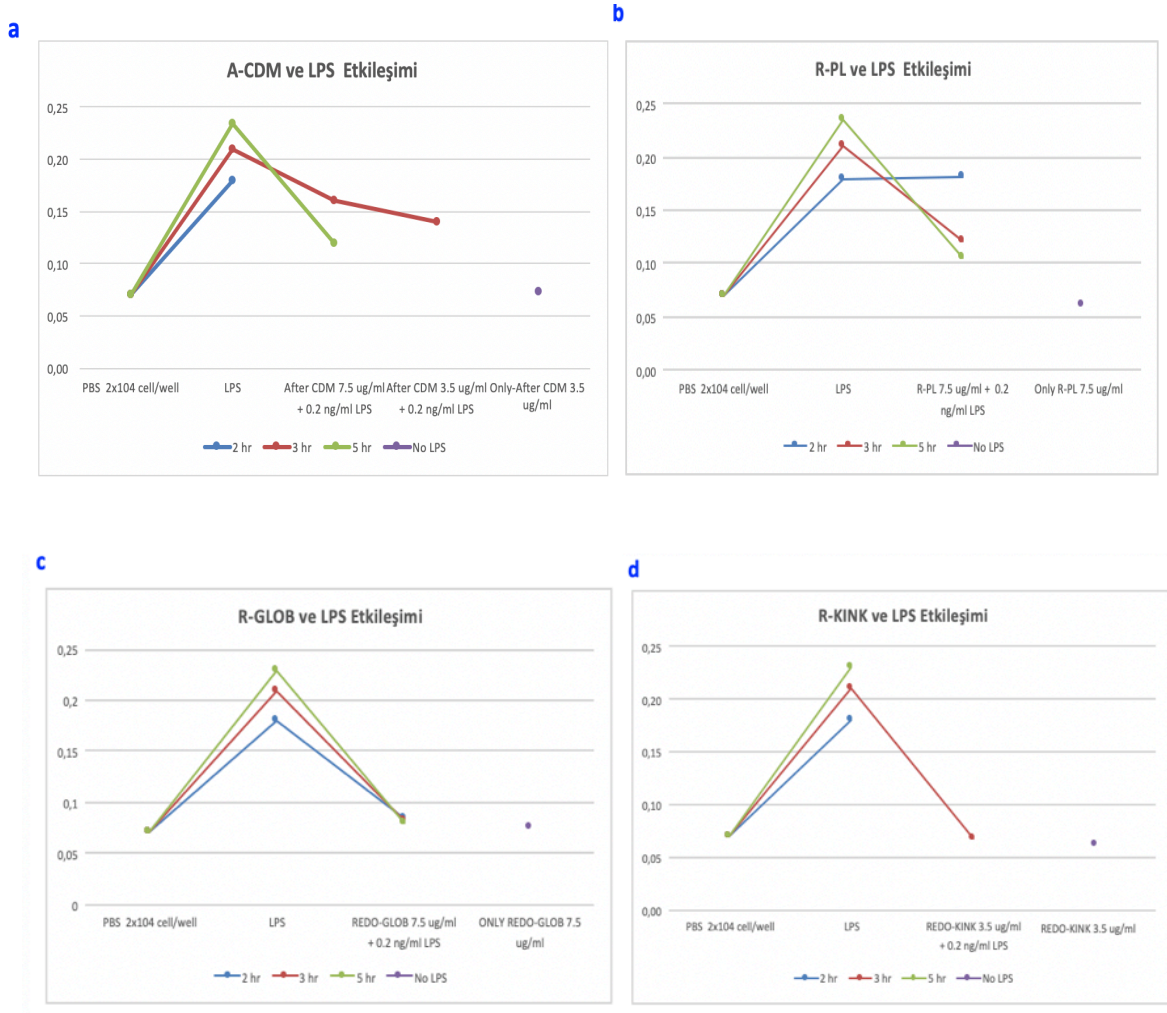
#### 4.5. LPS Uygulaması ve Raw Blue Hücrelerinde SP-A/Fragment ve Polymyxin Cevabı:

$10 \times 10^4$  hücre için 0.2 ng/ml LPS indüksiyonu ile 5 saatlik bekleme süresi sonrası tam uzunlukta SP-A'nın sistem üzerindeki etkisi kontrol ile kıyaslandığında 20 ug/ml için yeterli baskılamayı oluşturduğu ve bu cevabın sadece SP-A'nın oluşturduğu baskılamaya yanıtına yakın olduğu görüldü (Şekil 19).



**Şekil 19:** Sadece SP-A ve SP-A ile birlikte LPS indüksiyonu sonrası baskılama cevabı ( $10 \times 10^4$  hücre).

Sonraki adımda; tüm fragmentleri içeren tam uzunluktaki SP-A'nın oluşturduğu cevaplar ile, SP-A'nın ayrı ayrı fragmentlerinin LPS indüksiyonuna bağlı oluşturduğu cevapların karşılaştırılması amaçlandı. Böylece her bir fragmentin oluşturduğu doz cevap eğrisinin farklı olup olmadığı belirlenebildi.



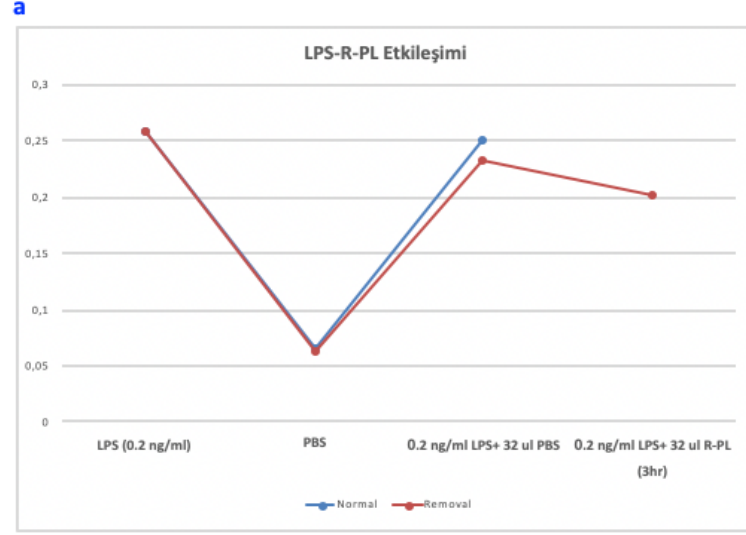
**Şekil 20.a-d:** LPS ve SP-A fragmentlerinin zamana bağımlı doz cevabı ( $2 \times 10^4$  hücre).

Hücre kültüründe uygulanan Quanti-Blue Assay bulgularından 2, 3 ve 5 saatlik inkübasyonlar sonrasında, 3 saat sonrası alınan cevaplar LPS' nin etkisinin bastırılmasında ölçümler açısından yeterlidir. 5 saatlik 0.2 ng/ml LPS indüksiyonunu takiben CDM, PL ve GLOB; 7.5 ng/ml ile KINK ise 3.5 ng/ml ile 3. saat sonrasında etkin cevabı oluşturmaktadır. LPS indüksiyonu olmaksızın sadece GLOB ve KINK' in kontrole yakın değerlere sahip olduğu görüldü (Şekil 20 a-d).

1947'den beri bilinen polimiksinler (Polymyxin A-E), bir katyonik polipeptit antibiyotik grubudur. Yüksek toksisitesi nedeniyle klinik uygulamada yalnızca Polymyxin B ve E (kolistin) kullanılmıştır. Polymyxin B, sülfat tuzu olarak parenteral kullanım için uygundur. Kolistin, oral ve topikal kullanım için iki ticari formda-kolistin sülfat ve kolistin metansülfonatın sodyum tuzu halinde mevcuttur (Nandha, Sekhri et al. 2013),(Zavascki, Goldani et al. 2007), (Roberts, Azad et al. 2015).

Polymyxin B ve polymyxin E (kolistin) Enterobacteriaceae'nin neden olduğu enfeksiyonlar da dahil olmak üzere, son on yılda yaygın olarak, ilaca dirençli gram negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için en önemli antibiyotiklerden biri haline gelmiştir (Thamlikitkul, Dubrovskaya et al. 2017)

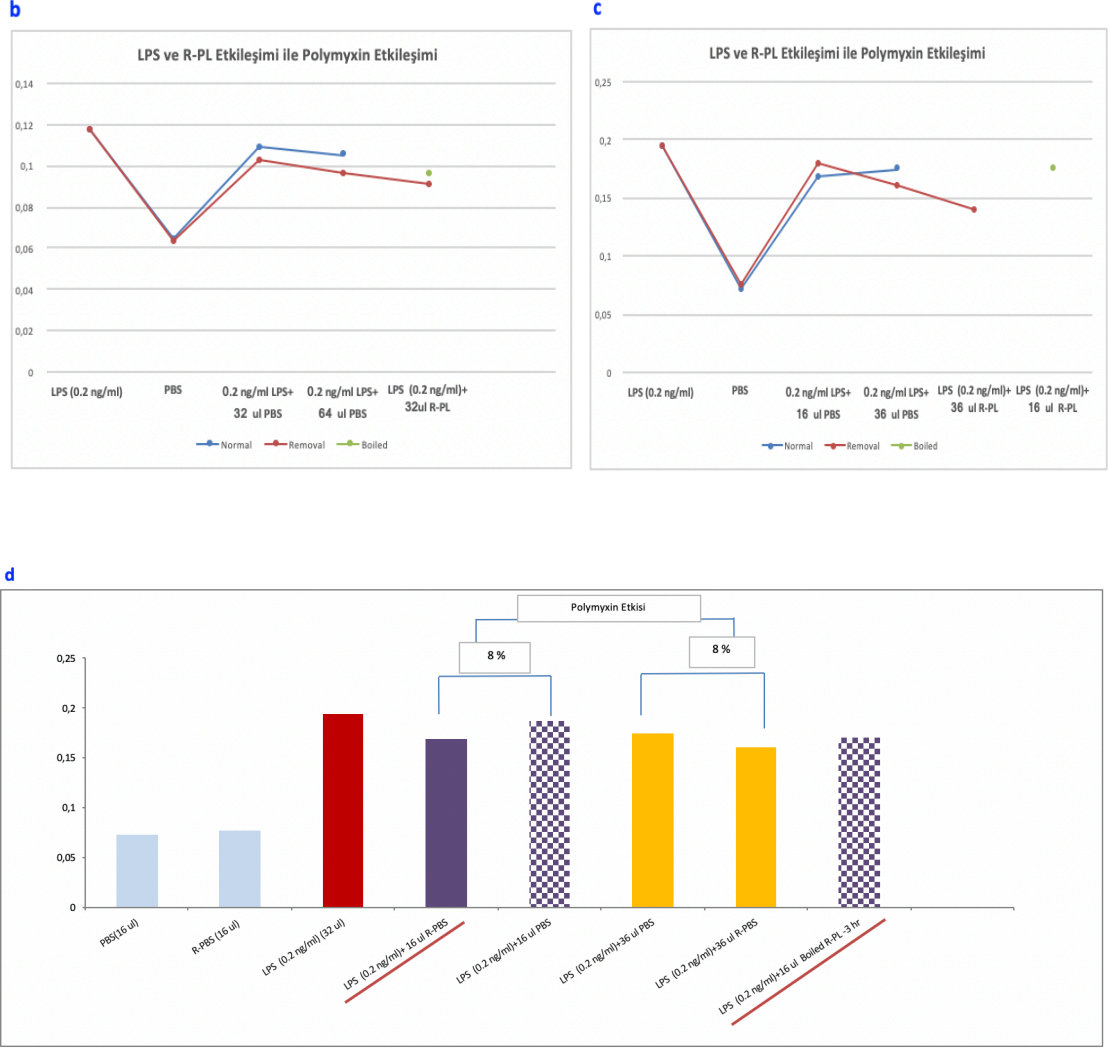
Çalışmamızda, endotoksin uzaklaştırılması sırasında kullanılan filtre sisteminin içerdiği Polymyxin bağlı boncukların, elde edilen örnekler üzerinde sızıntı yolu ile pozitif ek bir etki sağlayıp sağlamadığı araştırıldı. Bu etki araştırılırken, normal PBS ve filtre sisteminden geçirilen PBS' in LPS üzerinde eşit etki gösterip göstermediği incelendi ve sonuçta, filtre sisteminden geçen PBS' in (removal) normal PBS' den farklı olarak LPS üzerinde 3 saatlik inhübasyon sonrası kısmi bir baskılama oluşturduğu görüldü (Şekil 21.a).



**Şekil 21.a:** Endotoksin-Removal filtresi içerisinde kullanılan Polymyxin' in sisteme etkisinin gösterilmesi. R: Removal (Endotoksin uzaklaştırma filtresinden geçirilen örnek).

Polymyxin B kısmen ısı ile kararsız hale gelir ve antibakteriyel aktivitesi dört ila sekiz kat azalır. Farklı ısı dereceleri ve sürelerinde yapılan etki değerlendirmelerinde Polymyxin B 121<sup>0</sup>C ve 15 dakikada otoklavlanarak bu etki sağlanmıştır (Traub and Leonhard 1995).

Çalışmamızda, Polymyxin B'nin kullanılam sistem üzerindeki etkisinin tam olarak belirlenmesi amacıyla, 110<sup>0</sup>C' de 20 dakika kaynatma sonrası, Polymyxin B'nin etkisi ortadan kaldırılmaya çalışıldı. Uygulamalarda kaynatılarak etkinliği normal PBS ile aynı düzeye gelen ve bu nedenle içerisinde Polymyxin olmadığı düşünülen R-PBS etkisi karşılaştırıldı. SP-A fragmentlerinden R-PL ile PBS ve R-PBS karşılaştırıldığında sistemde var olan Polymyxinin etkisinin farklı volümler göz önünde bulundurulduğunda, volüme bağlı değişmeyen yaklaşık %8'lik bir etkinin olduğu görüldü (Şekil 22.b-d).



**Şekil 22.b-d:** Kaynatılmış Polymyxin' in ve SP-A fragmenti R-PL' in LPS üzerindeki etkisinin karşılaştırılarak volüm ile ilişkisinin gösterilmesi. R:Removal (Endotoksin uzaklaştırma filtresinden geçirilen örnek).

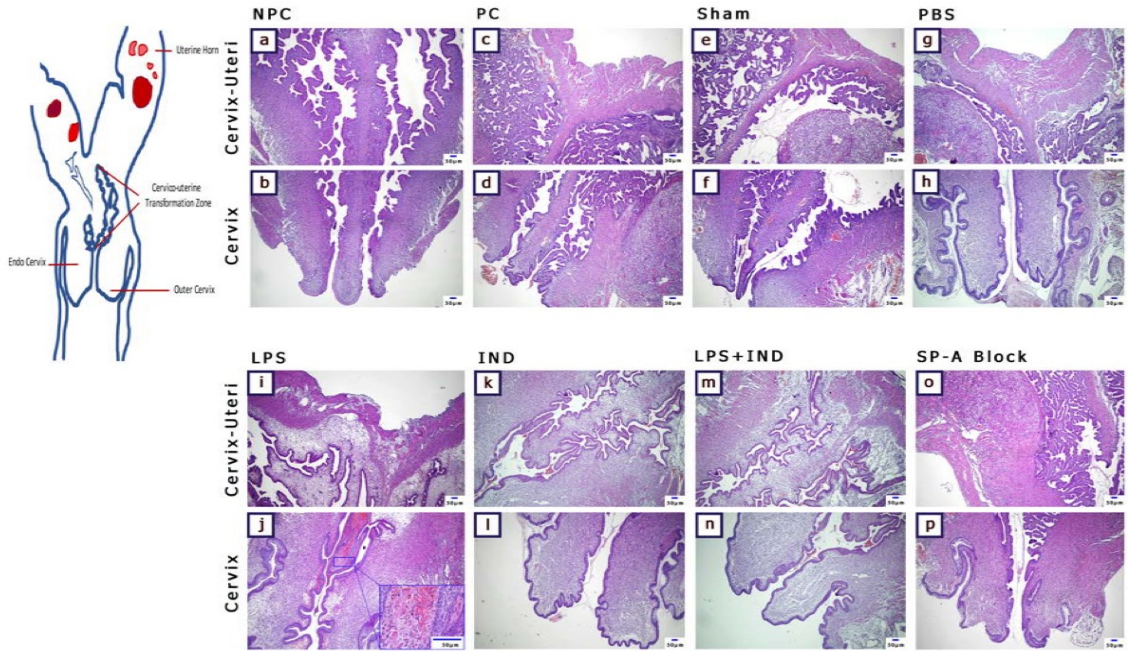
Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde; filtre sisteminden geçirilen örnekler üzerinde % 8' lik bir Polymyxin etkisinin genel olarak var olduğu ve toplam baskılama etkisine bu oranda pozitif katkı sağladığı düşünülmektedir. Her bir fragmentin LPS üzerindeki etkisi değerlendirilirken, sözkonusu etki değeri dikkate alınmıştır.



## 4.6. Immunohistokimyasal Bulgular:

### 4.6.a. Hemotoksilen-Eosin Boyama:

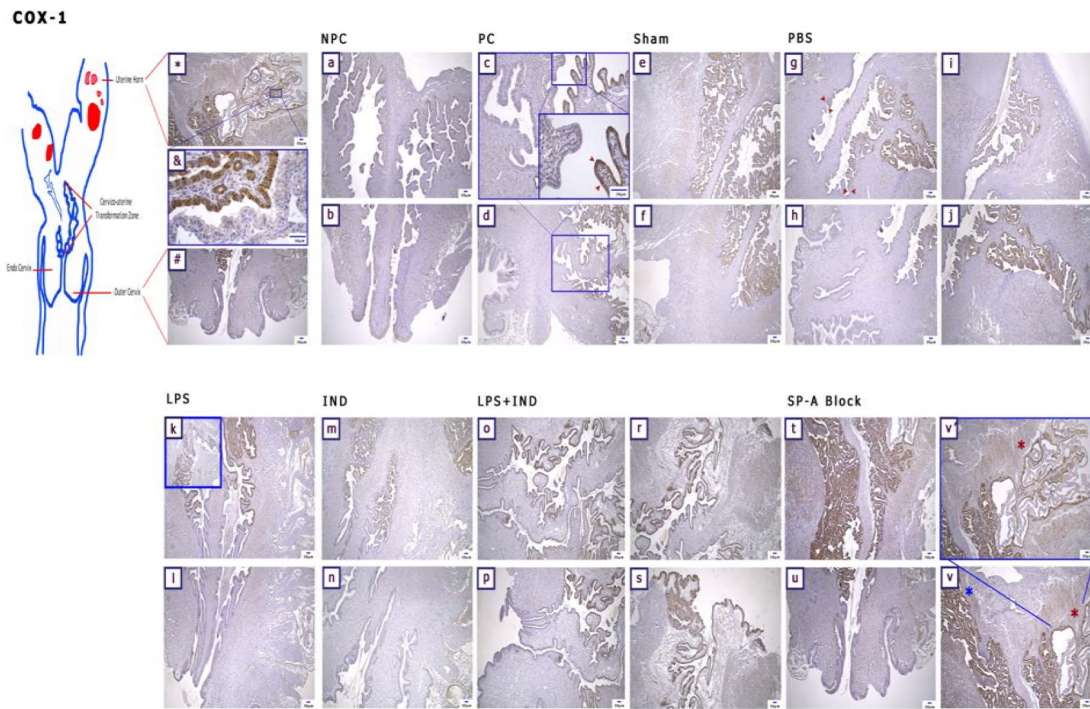
Morfolojik olarak doku değerlendirmesinin yapılabilmesi amacı ile kullanılmıştır. LPS kullanılan grupta kanama odaklarının diğer gruplara göre daha fazla arttığı tespit edilmiştir (şekil 23/i-j). Aynı şekilde cerrahi işlem yapılan gruplarda (şekil 23/e-f, g-h, i-j, m-p) transizyonel alanda vaskülarizasyon artışı izlendi (şekil 23/a-p).



**Şekil 23:** Servikte Hematoksilen Eosin Boyanması (4X)(a-p). NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-d): Gebe Kontrol, Sham (e-f): Cerrahi Kontrol, PBS (g-h): PBS uygulaması, LPS (i-j): Lipopolisakkarit uygulaması, IND (k-l): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (m-n): Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-A Block (o-p): SP-A bloklaması yapılan grup. Scala bar:50 µm.

#### 4.6.b. COX-1 Immünohistokimyasal Boyanma:

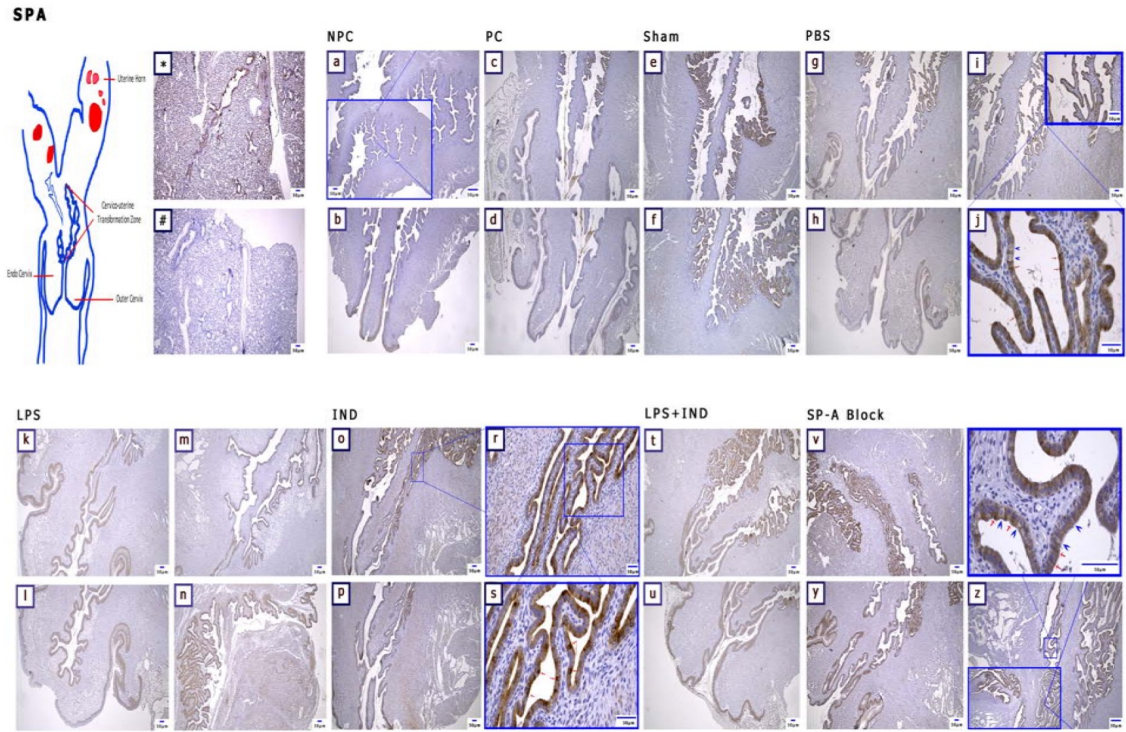
Boyanma paterni gebe kontrol hariç tüm gruplarda benzerdi. Gebelik öncesi dönemde ekspresyonun ekto ve endo servikal alanda yaygın olmadığı, bazal düzeyde izlenen ekspresyonun (şekil 24/a-b) gebelik döneminden başlayarak transizyonel alandaki ekspresyonun arttığı izlendi (şekil 24/c-z, şekil 24 g/kırmızı oklar). Girişimsel işlemlerin COX-1 aktivitesini değiştirerek artırdığı Anti-SPA grubunda diğer gruplara göre boyanmanın daha yoğun olduğu izlendi. Boyanma stromal alandan çok epitel yüzeyinde izlenmiştir (şekil 24 v-v’).



**Şekil 24:** Servikte COX-1 Boyanması (4x)(a-v). NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-d): Gebe Kontrol, Sham (e-f): Cerrahi Kontrol, PBS (g-j): PBS uygulaması, LPS (k-l): Lipopolisakkarit uygulaması, IND (m-n): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (o-s): Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-A Block (t-v’): SP-A bloklaması yapılan grup. SP-A’nın bloklandığı bölgede (kırmızı yıldız) ve bloklanmayan bölge (mavi yıldız, \*, &,#) epitel hücrelerinde gözlenen ekspresyon farkı (&). Scala bar:50 µm.

#### 4.6.c. SP-A İmmünohistokimyasal Boyanma:

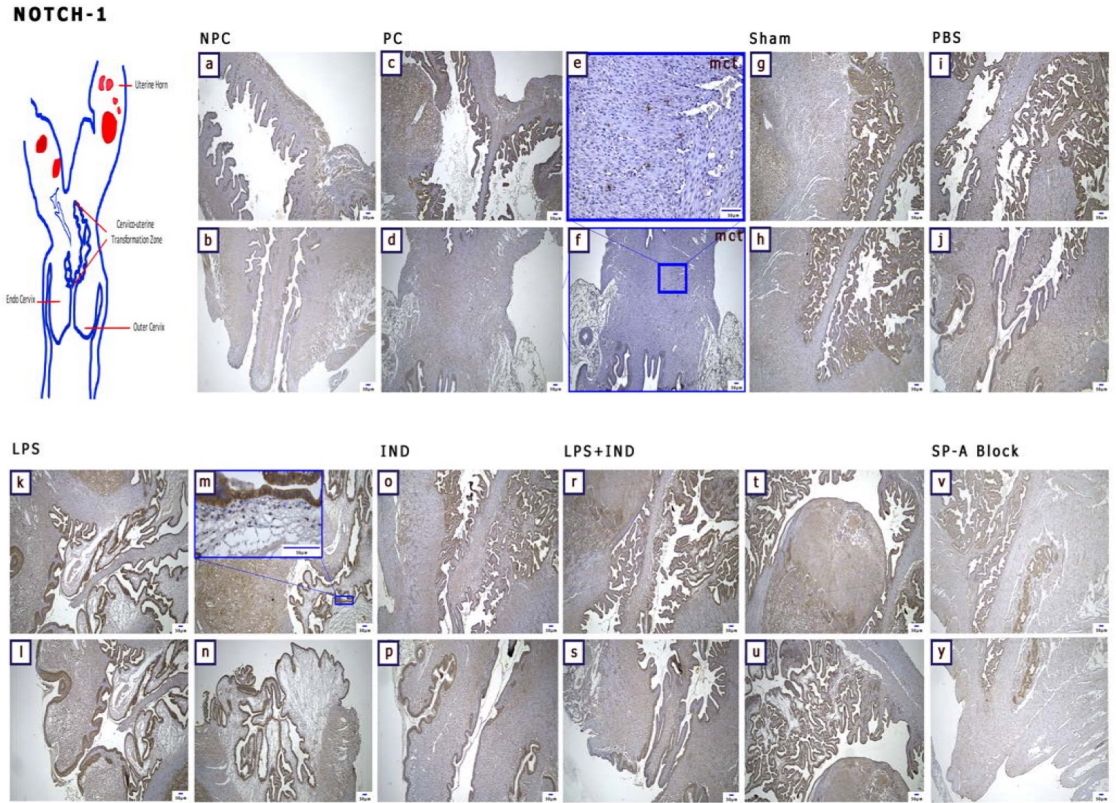
SP-A gebe olan tüm gruplarda izlenirken, gebe olmayan grupta ekspresyon sınırlı idi. Stromal alanda ekspresyon görülmekle birlikte özellikle ekspresyonun transizyonel alandan başlayarak uterusu doğru arttığı görüldü (şekil 25/o,v). Epitel alan incelendiğinde, bu bölgedeki epitel hücrelerinden bazılarının ekspresyona katkıları olduğu (şekil 25/j,s,z; kırmızı oklar), bazılarının ise katkı sağlamadığı (şekil 29/j,z; mavi oklar) görülmüştür.



**Şekil 25:** Servikte SP-A Boyanması (4x)(a-z). NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-d): Gebe Kontrol, Sham (e-f): Cerrahi Kontrol, PBS (g-j): PBS uygulaması, LPS (k-n): Lipopolisakkarit uygulaması, IND (o-s): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (t-u): Lipopolisakkarit ve Indomethacin birlikte uygulanması. SP-A Block (v-z): SP-A bloklaması yapılan grup. Akciğer dokusu pozitif (\*) ve negatif (#) kontrol. Scalabar: 50µm

#### 4.6.d. Notch-1 İmmünohistokimyasal Boyanma:

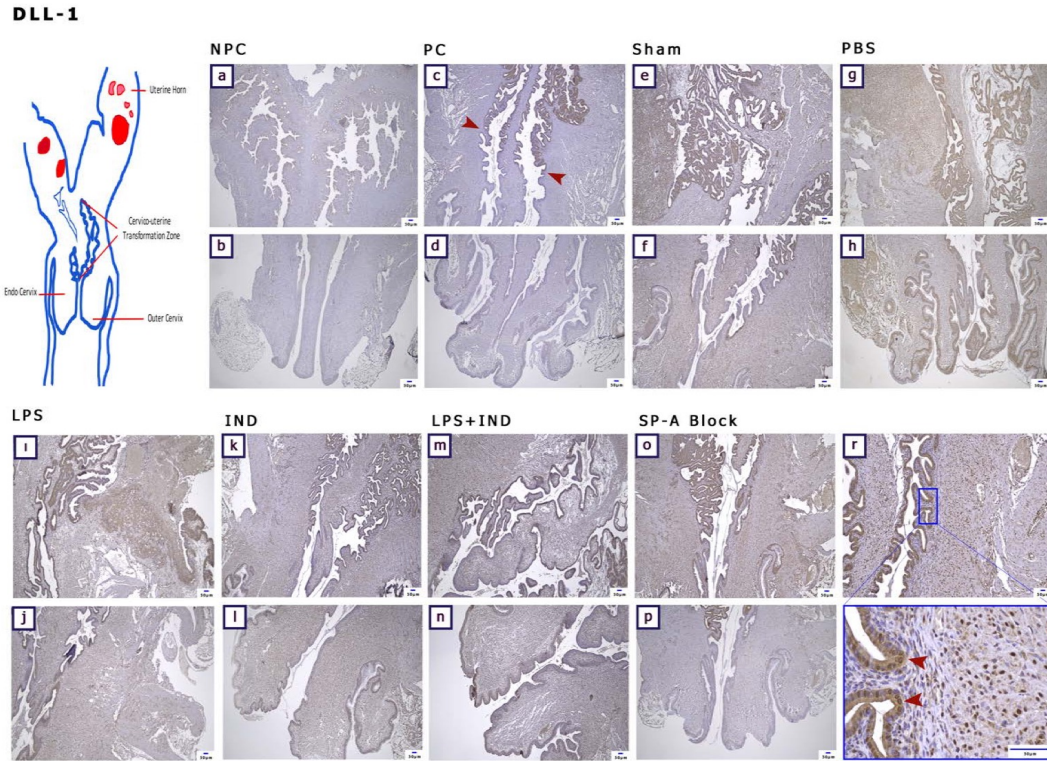
SP-A bloğu yapılan grupta (Şekil 28/ v-y) N1 ekspresyonu azalmış olarak izlendi. LPS grubunda (Şekil 26/k-n) ise artmış bir ekspresyon görüldü. Bu grupta, ekspresyona katılan epitel hücrelerinin bir kısmının bu ifadeden sorumlu olmadığı ve uterusu doğru ekspresyonun arttığı görüldü (Şekil 26/m). Gebe gruplarda serviks ağzına yakın alanda mast hücreleri izlendi (Şekil 26/e-f)



**Şekil 26:** Servikte Notch-1 Boyanması (4x)(a-y). NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-f): Gebe Kontrol, Sham (g-h): Cerrahi Kontrol, PBS (ı-j): PBS uygulaması, LPS (k-n): Lipopolisakkarit uygulaması, IND (o-p): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (r-u): Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması. SP-A Block (v-y): SP-A bloklaması yapılan grup. Mast hücreleri (e,f (20x) ve epitel görünümü (m, 40x) seçili alanlarda gösterildi. Scalabar: 50µm

#### 4.6.e. DLL-1 İmmünohistokimyasal Boyanma:

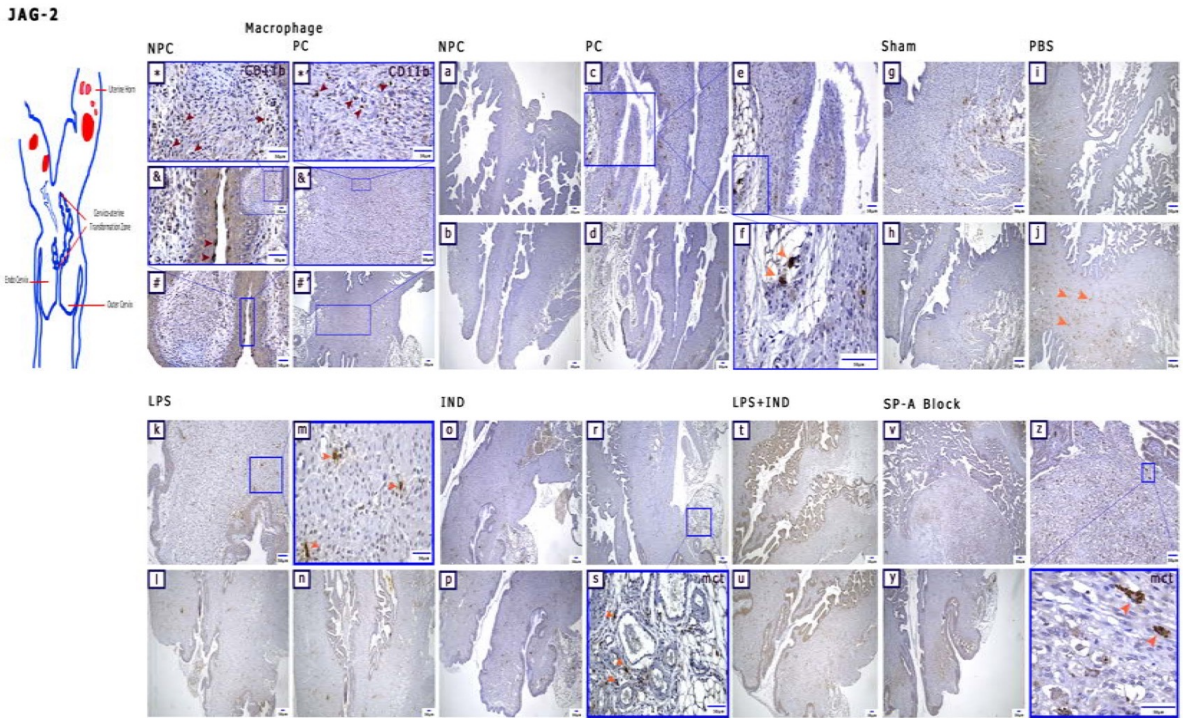
Ekspresyon NPC’ de izlenmez iken, PC’ de ektoservikal alanda görülmemekte ve ekspresyon (şekil 27/c-kırmızı ok) transizyonel alandan başlamaktaydı. Diğer gruplarda stromal alanda yoğun izlenen DLL-1 ekspresyonu epitel alanında ve stromada nükleer formdaydı (şekil 27/r-kırmızı ok, 40x). Ekspresyon serviksten uterusu doğru artmaktadır ve en yoğun boyanma LPS grubunda izlenmektedir (şekil 27(i-j)).



**Şekil 27:** Servikte DLL-1 Boyanması (4x)(a-r). NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-d): Gebe Kontrol, Sham (e-f): Cerrahi Kontrol, PBS (g-h): PBS uygulaması, LPS (i-j): Lipopolisakkarit uygulaması, IND (k-l): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (m-n): Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması. SP-A Block (o-r): SP-A bloklaması yapılan grup. Scala bar:50 µm.

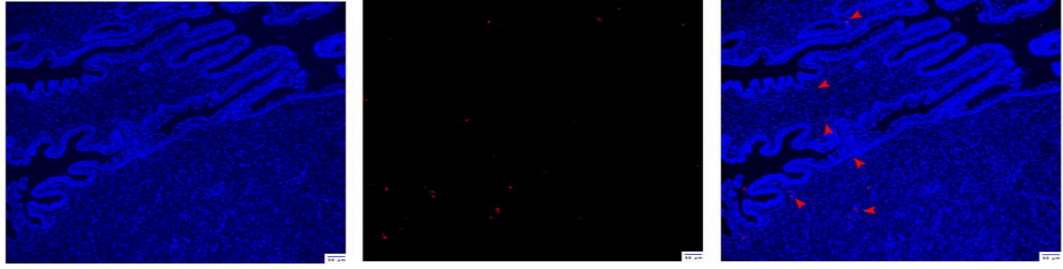
#### 4.6.f. JAG-2 İmmünohistokimyasal Boyanma:

Ekspresyon gebelik ile birlikte artmakta ve özellikle ektoservikal alanda mast hücreleri görülmektedir (şekil 28/(f (40x), m, s, z (40x)'de turuncu oklar). Belirleme mast cell tyriptase ile gerçekleştirildi. Diğer gruplarda da izlenen mast hücreleri IND, IND+LPS ve SP-A bloğu yapılan grupların bağ doku alanlarında yoğundu (mct; şekil 28/k,z; turuncu ok). Ekspresyon serviksten uterusu doğru arka endoservikal duvarda artmaktadır. Bu hücrelerin spesifik olarak JAG-2 ekspresyonu yaptığı immünofloresans ile belirlenmiştir (şekil 29/a,b'de kırmızı ve yeşil oklar). NPC' de dış serviks ağzı epitel alanında izlenen ve CD11-b ile belirlenen makrofajlar (kırmızı ok) gebe gruplarda stromal alanda izlendi (şekil 27/\*-#').

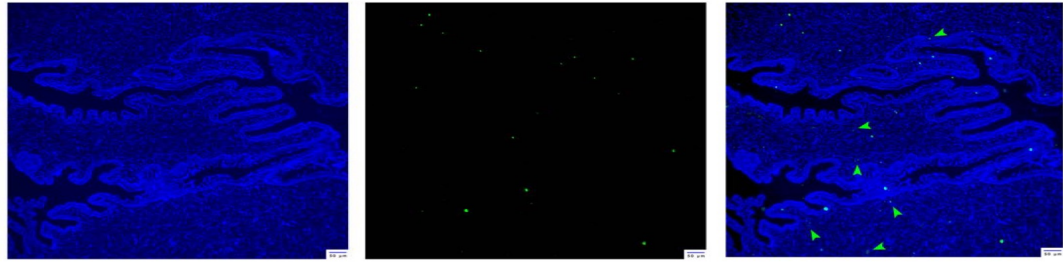


**Şekil 28:** Servikte Jag-2 Boyanması (4x)(a-z). NPC (a-z): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-f): Gebe Kontrol, Sham(g-h): Cerrahi Kontrol, PBS(i-j): PBS uygulaması, LPS(k-n): Lipopolisakkarit uygulaması, IND(o-s): Indomethacin uygulaması, LPS+IND(t-u): Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması. SP-A Block (v-z): SP-A bloklaması yapılan grup. Mast hücreleri (turuncu ok), Makrofajlar (kırmızı ok). Scala bar:50 µm

**PC MCT/Texas Red**

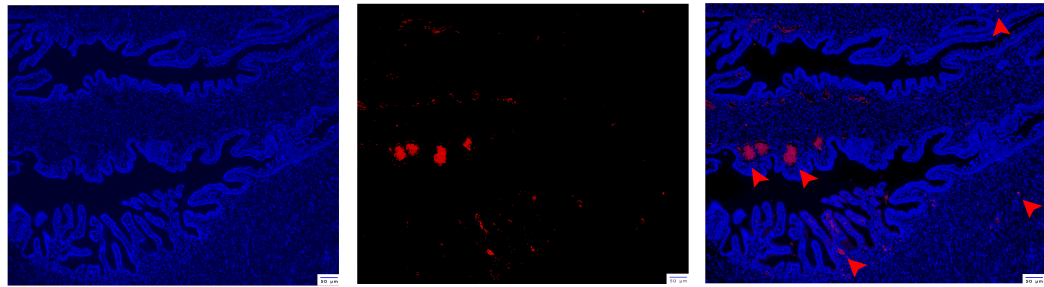


**PC Jag-2/Alexa Green**

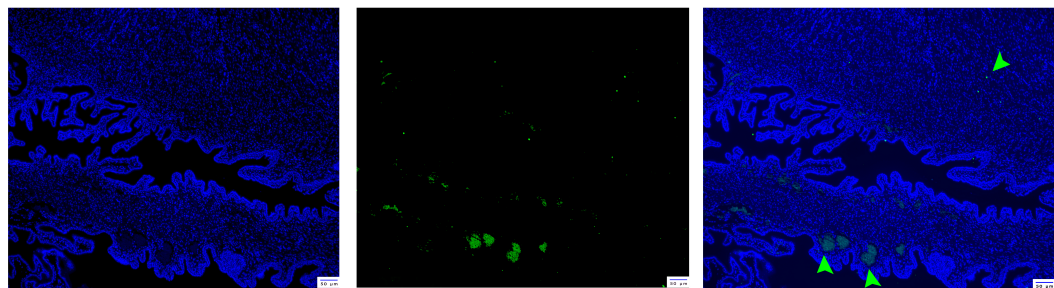


**Şekil 29-a:** Servikte Jag-2 Boyanması (4x)(a). PC: Gebe Kontrol, Mast hücreleri (kırmızı ok). Jag-2 ekspresyonu (yeşil ok)

**LPS+IND MCT/Texas Red**



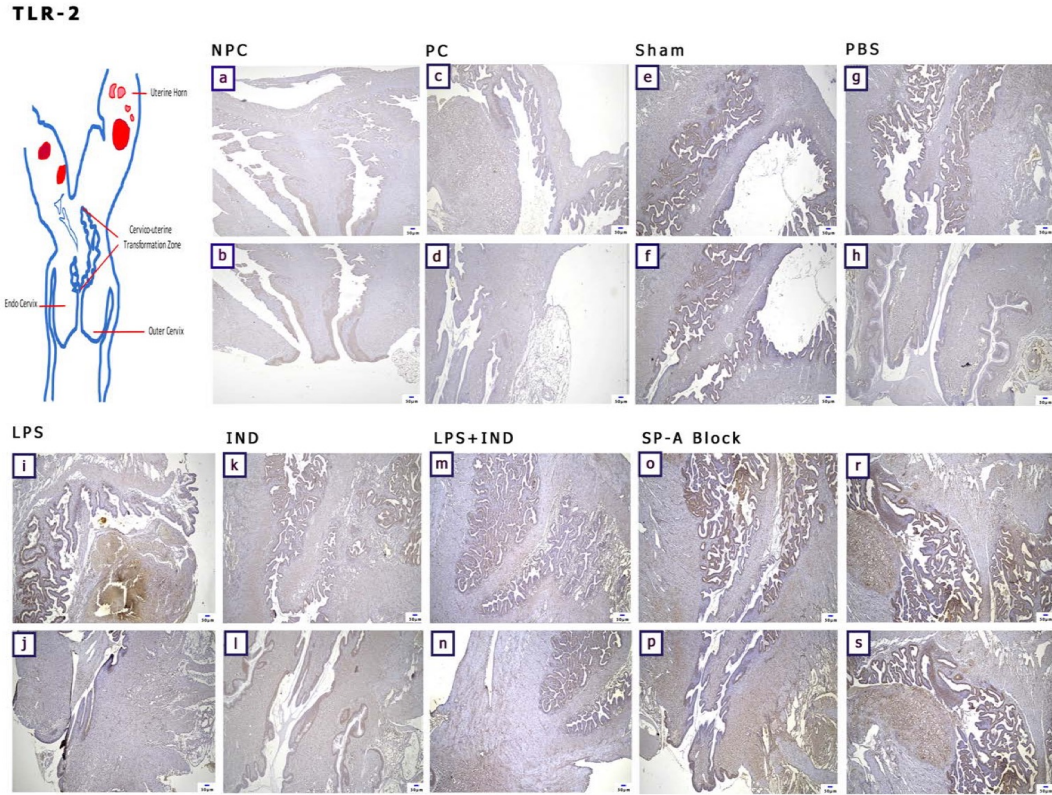
**LPS+IND Jag-2/Alexa Green**



**Şekil 29-b:** Servikte Jag-2 Boyanması (4x)(a). LPS+IND: LPS ve IND' nin birlikte uygulandığı grup, Mast hücreleri (kırmızı ok). Jag-2 ekspresyonu (yeşil ok).

#### 4.6.g. TLR-2 İmmünohistokimyasal Boyanma:

Özellikle girişimsel işlem yapılan tüm gebe gruplarda (şekil 30/c-s) ekspresyon artışı izlenirken, özellikle LPS, LPS+IND ve SP-A bloğu yapılan gruplarda stromal alanda ekspresyon artmıştı (şekil 30/1,j, m-n,-o,s).

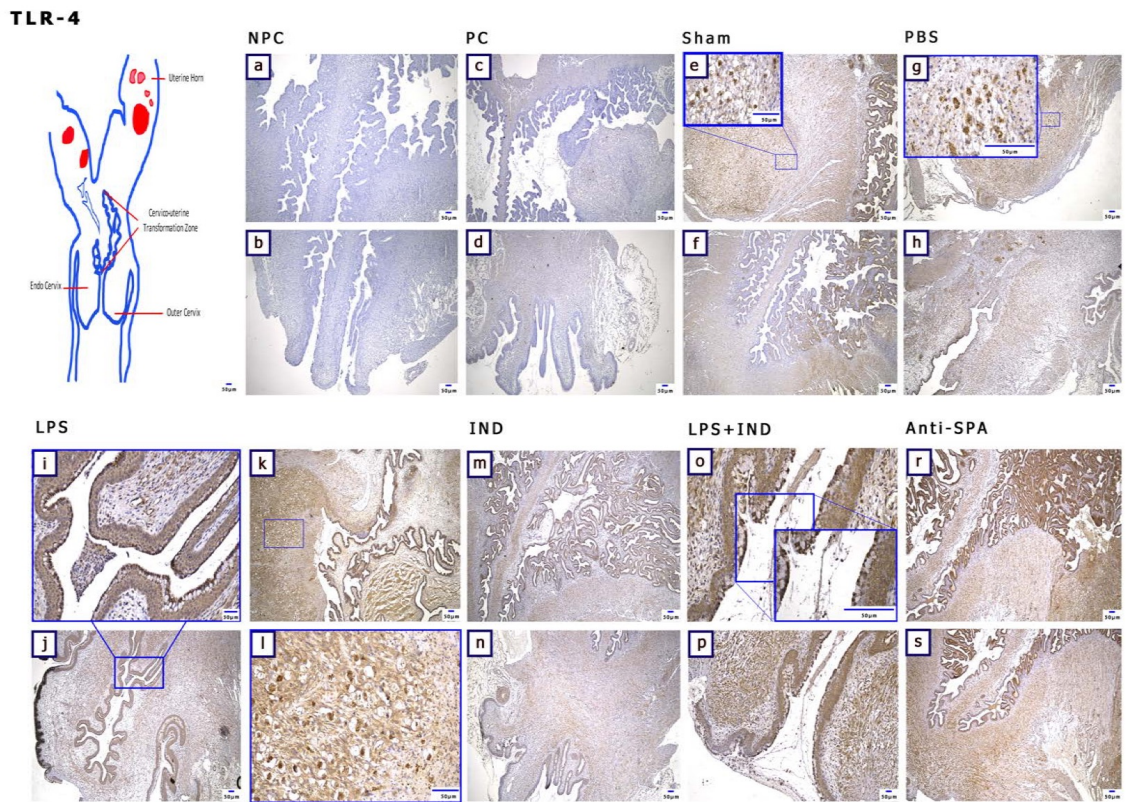


**Şekil 30:** Servikte TLR-2 Boyanması (4x)(a-s). NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-d): Gebe Kontrol, Sham (e-f): Cerrahi Kontrol, PBS (g-h): PBS uygulaması, LPS (i-j): Lipopolisakkarit uygulaması, IND (k-l): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (m-n): Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması. SP-A Block (o-s): SP-A bloklaması yapılan grup. Scalabar: 50µm



#### 4.6.h. TLR-4 İmmünohistokimyasal Boyanma:

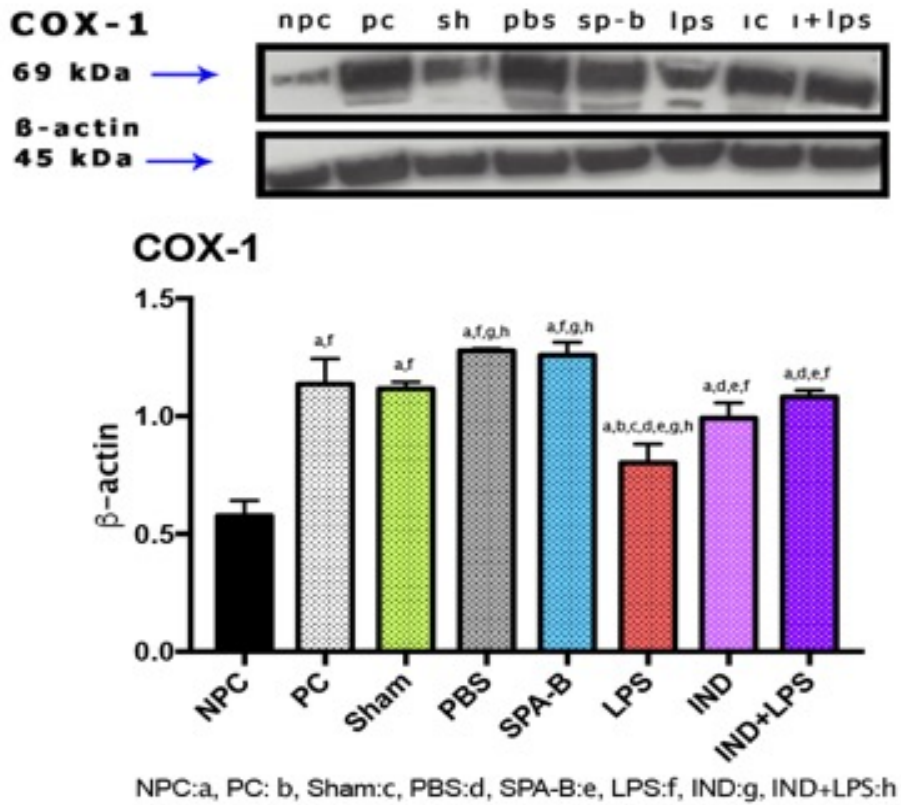
Girişimsel işlem uygulanan tüm gebe gruplarda (şekil 31/e-s) ekspresyon artışı izlenirken, en yoğun artış LPS, LPS+IND ve SP-A bloğu yapılan gruplarda stromal ve epitelyal alanların her ikisinde birlikte izlendi. (şekil 31/i-l, o-p, r-s). Ekspresyon özellikle apikal epitel yüzeylerinde yoğun izlenmektedir (şekil 31/o).



**Şekil 31:** Servikte TLR-4 Boyanması (4x)(a-s) NPC (a-b): Gebe Olmayan Kontrol, PC (c-d): Gebe Kontrol, Sham (e-f): Cerrahi Kontrol, PBS (g-h): PBS uygulaması, LPS (i-l): Lipopolisakarit uygulaması, IND (m-n): Indomethacin uygulaması, LPS+IND (o-p): Lipopolisakarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması. SP-A Block (r-s): SP-A bloklaması yapılan grup. Scalabar: 50µm

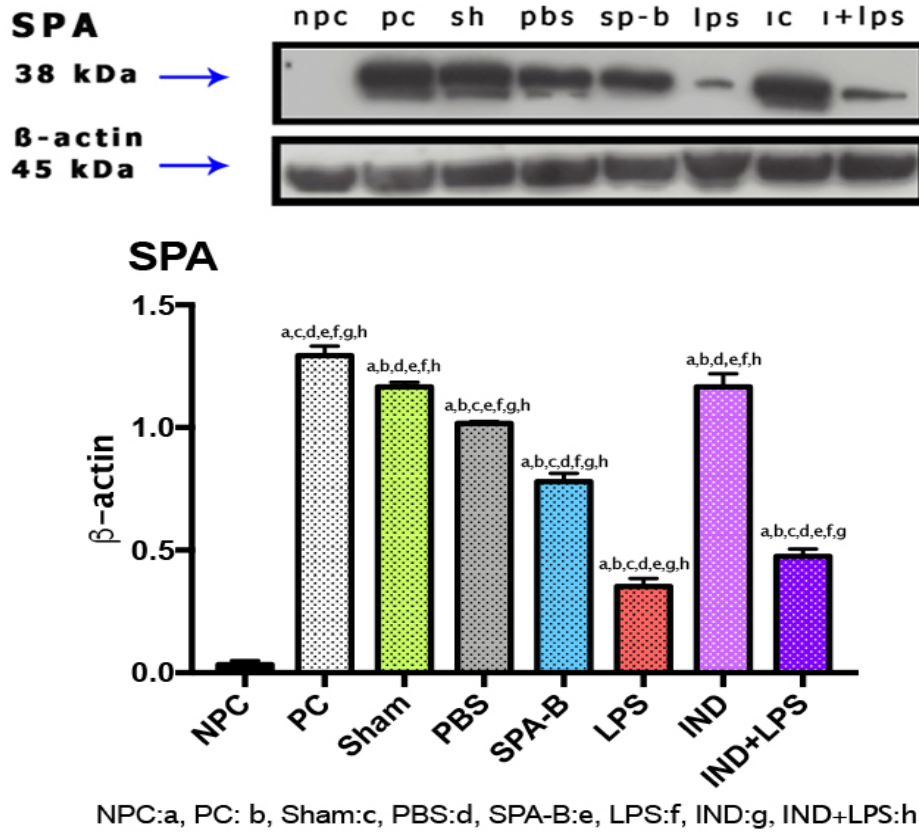
#### 4.7. Western Blot Bulguları:

**4.7.a. COX-1:** Yapısal bir enzim olarak kabul edilen COX-1 tüm gruplarda protein düzeyinde tespit edildi. Ancak gebe gruplarda gebe olmayan gruba göre daha yüksek düzeyde bulunmakta olup bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (şekil 32)( $p < 0.05$ ).



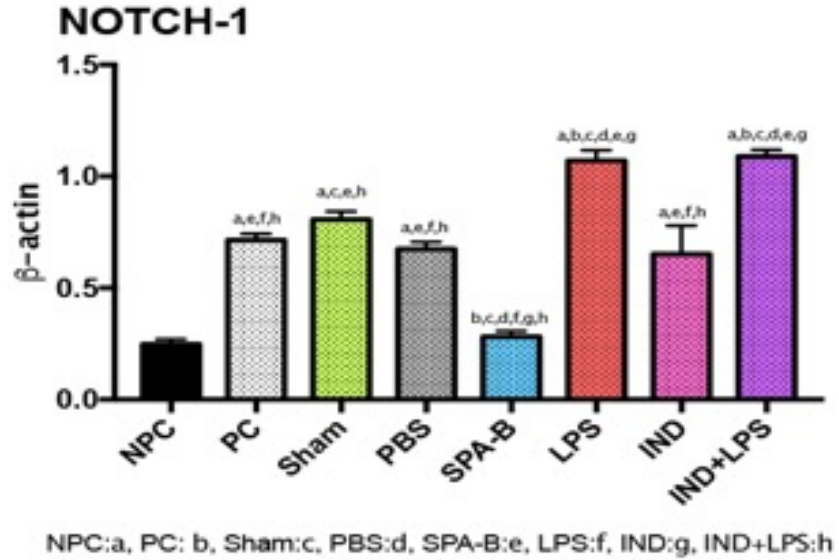
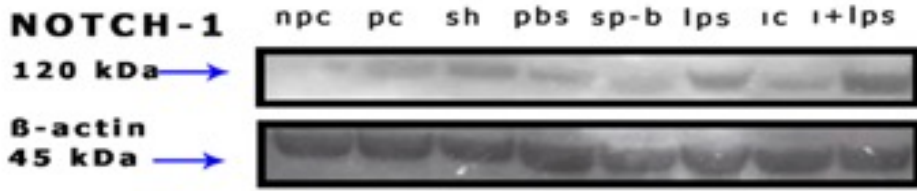
**Şekil 32:** COX-1 western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklaması yapılan grup.

**4.7.b. SPA:** SPA gebe gruplarda yoğun tespit edilmekle birlikte herhangi bir cerrahi müdahale gerçekleştirilmiş gebe farelerde protein düzeylerinde azalma izlendi. LPS verilen grupta diğer gebe gruplara kıyasla protein miktarı en azdı. Indomethacin ile birlikte verildiğinde protein düzeyinde göreceli bir artış izlendi. SPA bloğu yapılan grupta protein azalması görüldü ve kıyaslanan gruplar arasında tespit edilen fark anlamlıydı (şekil 33)( $p<0.05$ ).



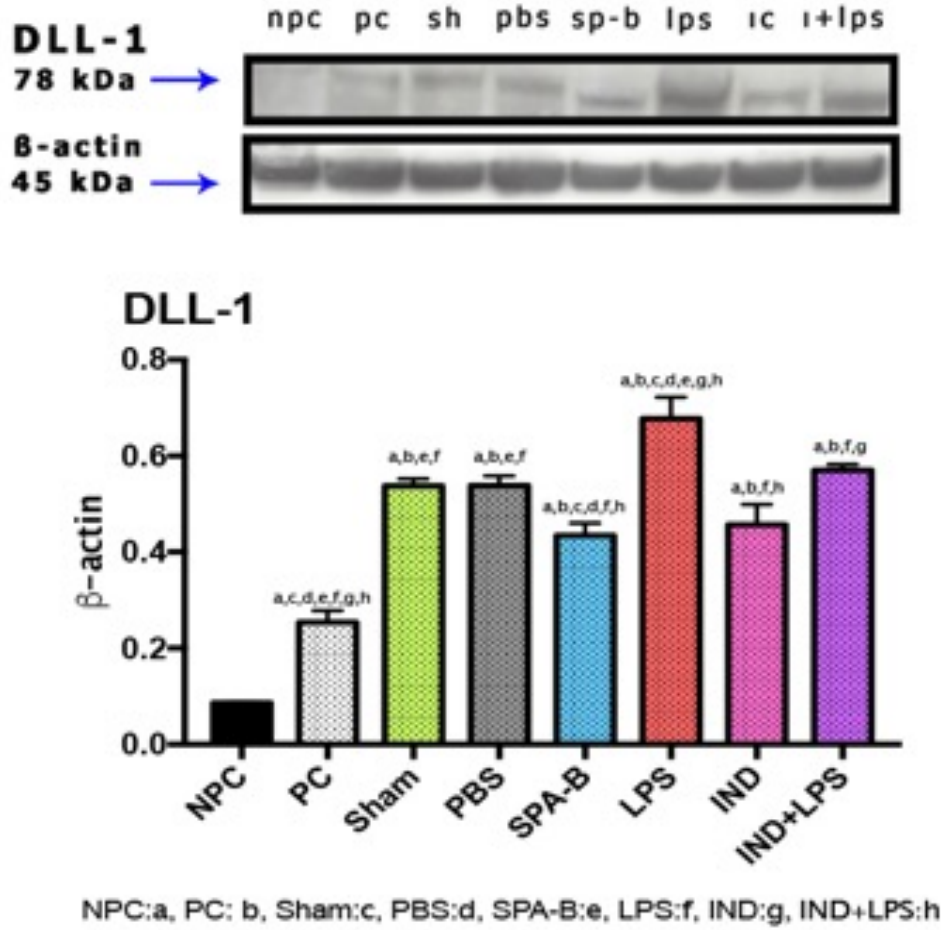
**Şekil 33:** SPA western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakkarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklaması yapılan grup.

**4.7.c. Notch-1:** Notch düzeyi LPS ve LPS+IND verilen gebe gruplarda yoğun tespit edilmekle birlikte herhangi bir cerrahi müdahale gerçekleştirilmiş gebe farelerde protein düzeylerinde artma izlendi. SP-A bloğu yapılan grupta diğer gebe gruplara kıyasla protein miktarı en azdı. PC, Sham, PBS ile Ind gruplarında protein düzeyi benzerdi ve kıyaslanan diğer gruplar arasında tespit edilen fark istatitksel olarak anlamlıydı (şekil 34)( $p<0.05$ ).



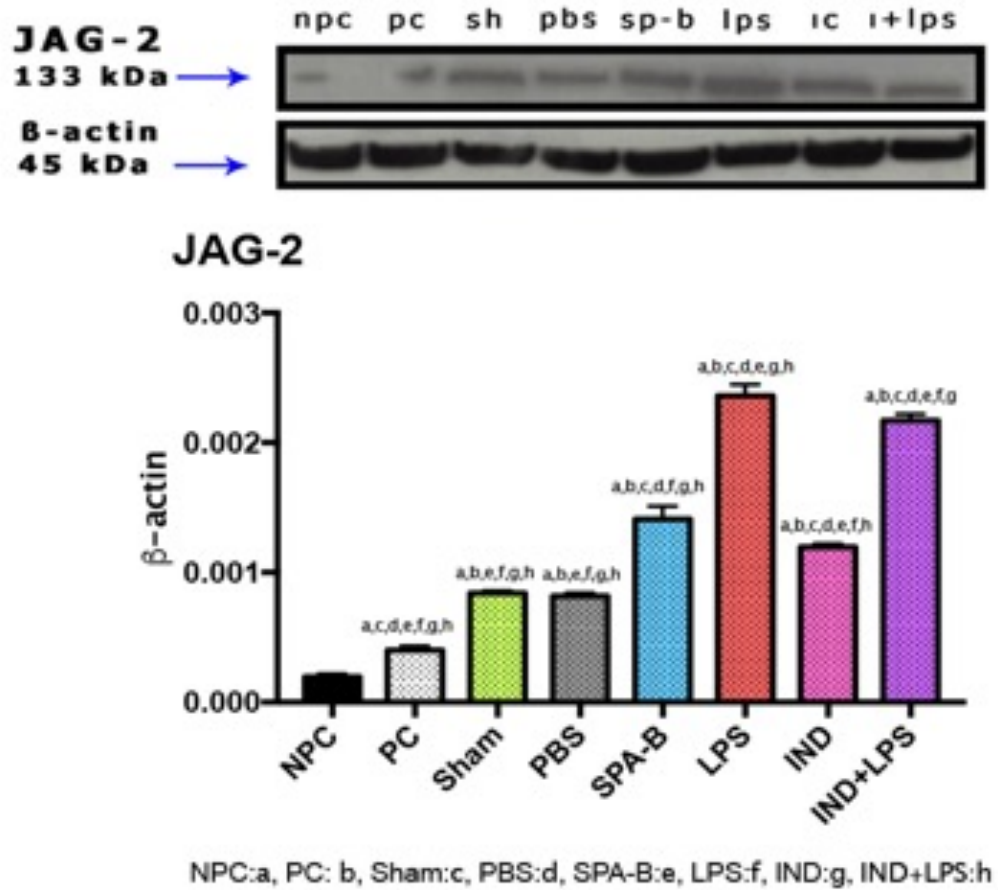
**Şekil 34.** Notch-1 western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakkarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklaması yapılan grup.

**4.7.d. DLL-1:** Gebe gruplarda gebe olmayan gruba göre artış izlenirken, özellikle LPS ve LPS+IND gruplarında görülen artış diğer gruplar ile kıyaslandığında fark anlamlıydı (şekil 35)( $p<0.05$ ).



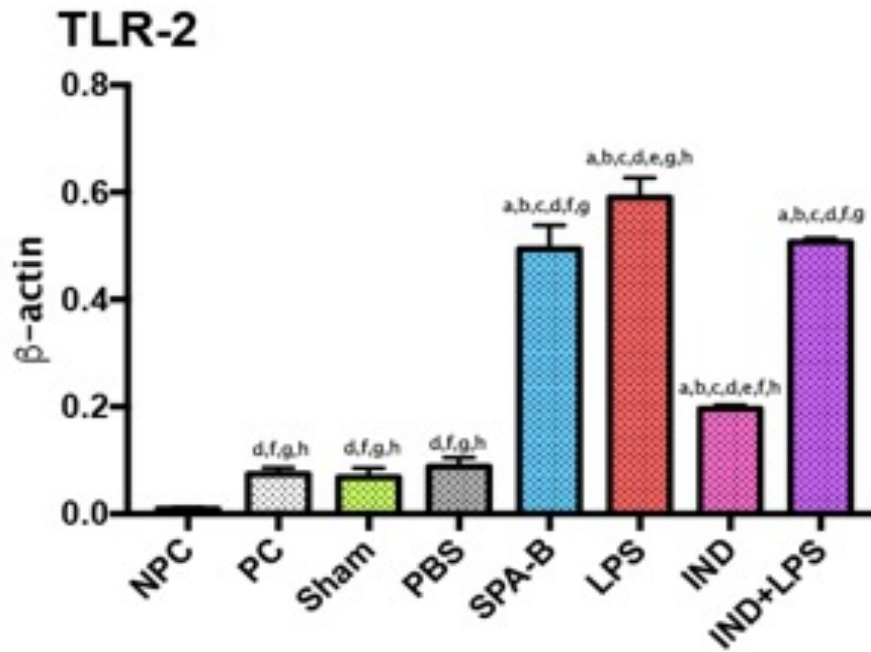
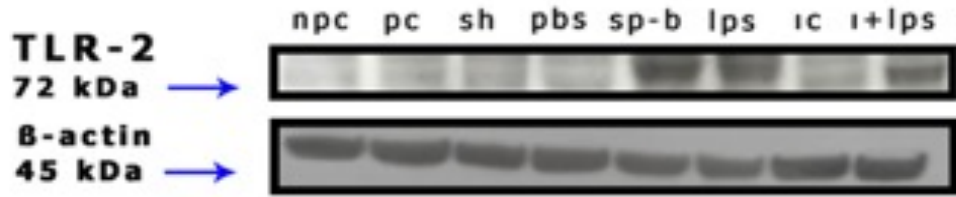
**Şekil 35:** DLL-1 western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakkarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklemesi yapılan grup

**4.7.e. JAG-2:** İzlenen protein düzeyi LPS, SPA-B, IND ve IND+LPS gruplarında diğer tüm gruplara göre artmış düzeyde ve anlamlı olarak izlendi. Gebe gruplarda protein düzeyinde artışın başladığı ve LPS uygulamasının bu artışın en yüksek olduğu görüldü (şekil 36)( $p<0.05$ ).



**Şekil 36:** Jag-2 western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakkarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklaması yapılan grup.

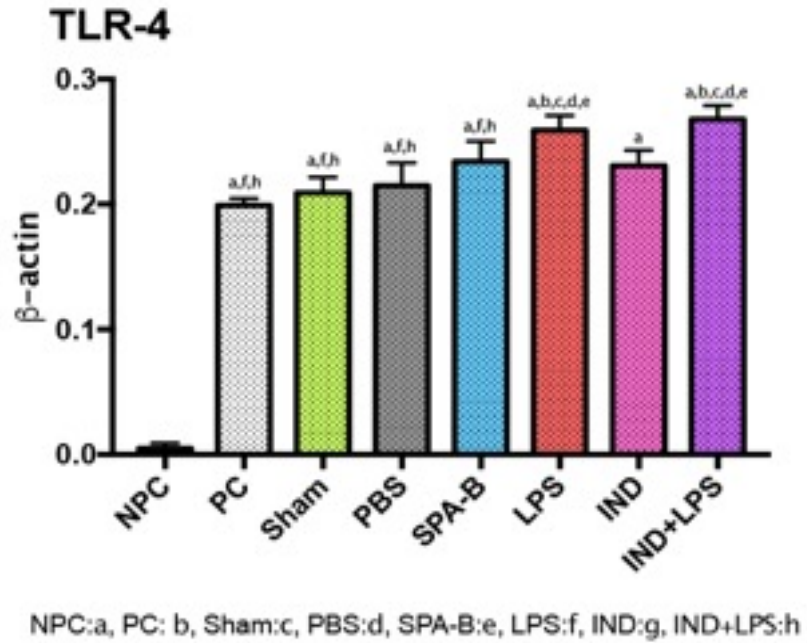
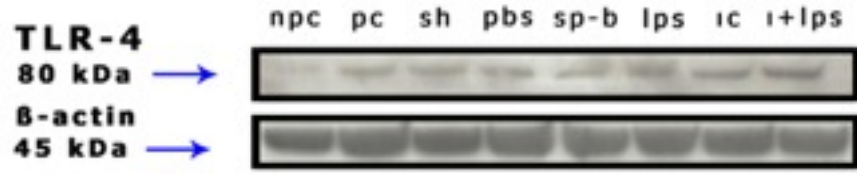
**4.7.f. TLR-2:** İzlenen protein düzeyi LPS, SPA-B, ve IND+LPS gruplarında diğer tüm gruplara göre artmış düzeyde ve anlamlı olarak izlendi. Diğer gruplarda protein düzeyinde görülen azalış istatistiksel olarak anlamlıydı (şekil 37)( $p < 0.05$ ).



NPC:a, PC: b, Sham:c, PBS:d, SPA-B:e, LPS:f, IND:g, IND+LPS:h

**Şekil 37:** TLR-2 western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakkarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklaması yapılan grup.

**4.7.g. TLR-4:** Protein düzeyi özellikle LPS ve SPA-B gruplarında diğer tüm gruplara göre artmış düzeyde ve anlamlı olarak izlendi. Gebe olmayan grup ile kıyaslandığında herhangi bir işlem uygulanmış olan gebe farelerde protein düzeyinde görülen artış istatistiksel olarak anlamlıydı (şekil 38)( $p < 0.05$ ).



**Şekil 38:** TLR-4 western blot analizi. NPC: Gebe Olmayan Kontrol, PC: Gebe Kontrol, Sham: Cerrahi Kontrol, PBS: PBS uygulaması, LPS: Lipopolisakkarit uygulaması, IND: Indomethacin uygulaması, LPS+IND: Lipopolisakkarit ve Indomethacinin birlikte uygulanması, SP-B: SP-A bloklaması yapılan grup.



## 5. TARTIŞMA

Erken doğum (preterm doğum, PTL), 37. gebelik haftasından önce gerçekleşen doğumdur ve perinatal morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Tüm erken doğumların yaklaşık %70' i birden fazla patolojik sürecin neden olduğu bir sendrom olarak değerlendirilebilir (Romero, Dey et al. 2014),(Gomez-Lopez, Romero et al. 2018). Preterm doğum ve enflamasyon nedensel olarak bağlantılıdır. Bu nedenle, maternal ve fetal enflamatuvar yanıtları azaltan bir müdahale bulmak, olumsuz seyreden hamileliği ve yenidoğana ait istenmeyen sonuçlarını önlemek için yeni bir strateji sağlayabilir. Farklı hayvan modelleri kullanılarak; intraperitoneal lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu, fetal inflamasyon ve LPS'nin intra-amniyotik olarak uygulanması ile sistemik maternal inflamasyon, simüle edilebilmektedir (Garcia-Flores, Romero et al. 2018). Normalde doğum süreci, immün hücrelerin gebelik dokularına yönelmesi ve uterus kontraktilesini, servikal olgunlaşmayı ve fetal membran rüptürünü uyaran proinflamatuvar mediatörlerin artan üretimiyle ilişkili enflamatuvar bir süreçtir (Romero, Dey et al. 2014),(Boyle, Rinaldi et al. 2019).

Enfeksiyonun, bilinen etiyojideki PTL'lerin yaklaşık %40'ında rol oynadığı tahmin edilmektedir; Bu nedenle, enfeksiyon aracılı inflamasyonun servikal ortamı nasıl değiştirdiğini ve erken doku biyomekanik değişikliklerinin yol açtığını anlamak ilgi konusudur. LPS aracılı preterm eylemde dönem boyunca servikal olgunlaşma sürecini etkileyen farklı yolların açıklanması, servikste erken doğuma yol açan erken değişiklikleri belirlemek ve önlemek için klinik olarak ilgili tedavilerin geliştirilmesini sağlayacaktır (Willcockson, Nandu et al. 2018). Sonuç olarak; Preterm eylemin başlamasında rolü olan patojen aracılı inflamasyonun modellenmesinde kullanılan LPS, IL1  $\beta$  ekspresyonu artırarak preterm eylemi başlatabilir (Dinarello 2011).

Gram negatif bakterilerin ısıya dayanıklı bir hücre duvarı bileşeni olan endotoksin, doğal immün sistemde sistemik enflamatuvar tepkiyi Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) yolu ile uyurarak şok ve hücre hasarına yol açabilir (Chae 2018). Lipopolisakarit (LPS),

embriyonik rezorpsiyon, intrauterin fetal ölüm (IUFD), intrauterin büyüme geriliği (IUGR) ve kemirgenlerde preterm eylem dahil olmak üzere pekçok ters gelişim süreci ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek doz ve düşük doz LPS uygulamaları dikkate alındığında, hamilelik sırasında düşük dozlu LPS'ye maruz kalındığında oluşacak etki maruz kalma süresinin uzunluğu ile ilişkilidir. Düşük dozlu bir LPS ön muamelesi, yüksek doz LPS'den 24 saat önce uygulandığında, müteakip yüksek dozlu LPS'nin neden olduğu IUFD, TNF-alfa üretimine ve oksidatif strese karşı hassasiyetin azalmasına neden olur (Xu, Wang et al. 2007). LPS'ler, enflamatuar sitokinleri (tümör nekroz faktörü alfa ve IL-1, vs.) salgılamak için monositleri ve makrofajları aktive eder. LPS'nin membranla ilişkili LBP'ye bağlanmasından önce LPS ve LBP'nin kompleksleşmesi, LPS nötralizasyonuna ve dolayısıyla mononükleer hücrelerin aktivasyonunun inhibe edilmesine yol açar. Bununla birlikte, TNF-a üretiminin LPS/LBP kompleksleri tarafından uyarılmamasından dolayı, kompleksler diğer bileşenlere bağlansa bile, LPS'nin LBP tarafından nötrleştirildiği varsayılmaktadır (Gutsmann, Muller et al. 2001).

Endotoksin; prostaglandin E2 (PGE2), tümör nekroz faktörü (TNF)  $\alpha$ , interlökin (IL) -1, IL-6 gibi pro-enflamatuar mediatörlerin üretimini uyarır ve akut enflamatuar yanıt ortaya çıkar. Bununla birlikte lipopolisakarit (LPS) IL-1 reseptör antagonisti, IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi anti-enflamatuar sitokinleri indükler. Bu durum düşük doz LPS'ye (L-LPS<10 ng/ml) maruz bırakılan doğal immün hücrelerin proinflamatuar mediatörleri endotoksin toleransı olarak bilinen bir fenomene bağlı olarak yeterince salgılayamamaları sonucu oluşur (Lopez-Collazo and del Fresno 2013),(Escoll, del Fresno et al. 2003). Endotoksin toleransı, TNF-a, IL-1, IL-6 ve PGE2 üretimi de dahil olmak üzere pro-enflamatuar bir yanıtta uzağa, IL-10 üretimi yoluyla kilit anti-enflamatuar özelliklere sahip bir tepkiye doğru yönelmeye neden olur (Biswas and Lopez-Collazo 2009).

TLR2 agonistleri, TLR4 ligandlarına heterotoleransı indükler (Dobrovolskaia, Medvedev et al. 2003). Servikal dokuda ölçülen endojen prostaglandinler, özellikle PGE2, PGF2a, PGD2 ve 6-keto-PGF1a, LPS aracılı PTL'deki servikste artmasına karşın termde artmaz. Aslında, prostaglandinler, LPS aracılı preterm eylemin servikal uyum

değişiklikleri için önemlidir ve serviks olgunlaşması için vazgeçilmezdir (Timmons, Reese et al. 2014).

İntrauterin LPS enjeksiyonu, hamileliğin 15. gününde farelere 30 ul steril su veya 5 mg/ml LPS (Escherichia coli O55: B5) intrauterin enjekte edildiği ve LPS uygulamasından yaklaşık 7 ila 9 saat sonra serviks dokularının toplandığı bir çalışmada; LPS aracılı PTL sırasında servikste inflamatuvar aktivasyon ve proteazların regülasyonunda rol alan genlerin zenginleştiği tespit edilmiştir (Willcockson, Nandu et al. 2018)

Amniyotik kese başına 100 ng LPS'nin intra-amniyotik enjeksiyonu, yüksek düzeyde erken doğum sıklığına neden olurken, PBS'nin intra-amniyotik enjeksiyonu prematür doğuma sebep olmamaktadır. Rahim içi LPS enjeksiyonu yaygın olarak lokal inflamasyona bağlı erken doğum modeli oluşturmak amacı ile kullanılır. Gebeliğin 16.5 günü uygulanan LPS'nin hem peritoneal hem de intrauterin enjeksiyonu sonrası 2-8 saat sonra kontrole göre daha düşük bir vücut sıcaklığı oluşturduğu görülmektedir (Gomez-Lopez, Romero et al. 2018).

Nükleer faktör  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ve aktivatör protein 1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri, normal doğum ve PTL'de yer alan anahtar proinflamatuvar ve prokontraktıl genleri düzenler. NF $\kappa$ B aktivasyonunun normal olarak, doğumdan önce embriyonik 18. gebelik gününde fare miyometriyumunda gerçekleştiğini, AP-1 ve JNK aktivasyonunun ise doğum başlangıcında gerçekleştiğini göstermektedir. Seçici olarak AP-1'i aktifleştiren LPS (Escherichia coli: serotip O111) kaynaklı PTL modelini kullanarak, myometrial AP-1 aktivasyonunun sitokin üretimini yönlendirdiği gösterilmiştir. Prokontraktıl proteinlerin (Cox-2 ve Cx43) aktivasyonundan 7 saat sonra süreç PTL ile sonuçlanır. Veriler NF $\kappa$ B aktivasyonunun enfeksiyon / inflamasyona bağlı erken doğum eylemi için işlevsel bir gereklilik olmadığını ve AP-1 aktivasyonunun PTL'ye neden olan inflamatuvar yolları harekete geçirmek için yeterli olduğunu ortaya koymaktadır. Önemli olarak, PBS'in ultrason eşliğinde rahim içi enjeksiyonunun doğumun zamanlaması üzerinde etkisi yoktur ve myometrium içine nötrofil infiltrasyonunu etkilememiştir. Bu prosedürün lokal enflamatuvar yanıtı en aza indirgemektedir (MacIntyre, Lee et al. 2014),(Rinaldi, Makieva et al. 2015).

Super-low-dose LPS (SL-LPS: 50 pg/ml) uygulaması RAW 264.7 hücrelerinde LPS kaynaklı TNF-a, IL-6, IL-10, PGE2 ve NO üretimini kuvvetle arttırmaktadır. Düşük dozlu LPS'nin in vitro olarak (>10 ng/ml) önceden maruz bırakılmasıyla indüklenen endotoksin toleransı sonrası makrofajlar pro-enflamatuar bir yanıtta uzaklaşmak suretiyle enfeksiyonu veya yaralanmayı sınırlandıran refrakter bir duruma yol açar. SL-LPS (in vitro olarak 1~100 pg/ml), daha sağlam bir tepki için monositleri/makrofajları “Shwartzman reaksiyonu” olarak bilinen bir fenomen olan ikincil bir LPS mücadelesine yönlendirerek agregasyon, vasküler tıkanma, fibrinolizin inhibisyonu, nötrofil birikimi, endotel hasarı ve mikrovaskülatürde değişken derecelerde apoptoz ve nekroz ile mortalitenin artmasına neden olur (Chae 2018).

Genel olarak, insan endotoksin çalışmaları için 4 ng/kg'ı etkili bir doz olarak kabul eden çalışmalar bulunmakla birlikte, 2 ng/kg ile de derin bir fizyolojik yanıt alındığı da bildirilmektedir. Uygulama sonrası 3 saatlik bir süre pik için gerekli iken 5 saat stabilizasyon için yeterlidir. İnsanlar ve fareler için genel sitokin resimleri çarpıcı şekilde benzerdir. Farelerde IL-1 hariç, tüm proinflamatuar sitokinler endotoksin infüzyonundan yaklaşık 2 saat sonra zirve yapar ve endotoksin uygulamasından 4-6 saat sonra bazal seviyelere geri döner. Aynı patern, insanlarda IL-1RA hariç 4 saatte zirveye çıkan anti-enflamatuar sitokinler ve kemokinler için de gözlenmiştir. Farelerde ml başına 1.000 pg IL-6'nın hedeflenen konsantrasyonunu elde etmek için verilen son doz ise insanlara verilen dozun 250 katı olarak belirlenmiştir. Yine de insan ve farelerde yapılan birçok çalışmada benzer bulgular bildirilmiştir (Copeland, Warren et al. 2005). Bu durumun sebebi olarak; Lipopolisakarit bağlayıcı protein (BLP)' in transkripsiyonel aktivasyon farklılıklarına bağlı olarak, immün hücrelerde endotoksin tanıma, sunma ve bunu takiben oluşan sitokin indüksiyonu etkilemesi ile ilişkili olabileceği düşünülebilir (Kirschning, Unbehaun et al. 1997).

Farklı bir çalışmada  $2.5 \times 10^5$  cells/ ml de 1 ug/ml LPS ile RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde AP-1 aktivasyonu için yeterli cevap oluşmuştur (Hambleton, Weinstein et al. 1996). Diğer bir çalışmada farklı bir LPS (1 ug/ml) orijini için 9 saatlik inkübasyon ile TNF alpha cevabı alınabilmiştir ve cevap 1 ng/ml den itibaren farklı markerler için alınmaya başlanmıştır. Bu dozdan daha yüksek dozlarda plato etkisi gözlenmiştir

(Royle, Totemeyer et al. 2003). 100 ng/ml LPS ve 5 saatlik bir inkübasyon ise yine TNF alpha için kullanılmış ve 0.01 ng/ml' den itibaren cevap oluşmaya başlamıştır (Monick, Powers et al. 2003).

RAW 264.7 makrofaj hücreleri; IL1 $\beta$  (5-CTGAAAGCTCTCCACCTC-3 ve 5-GTGCTGATGTACCAG TTG-3) için RT-PCR uygulamasıyla 0, 0.2, 2, 20, and 200 ng/ml LPS (Sigma; serotip 0111:B4) dozları ile 0-24 saat inkübe edilmiş ve cevap ölçülmüştür. Oluşan yanıt 0.2 ng/ml için 2. saatte başlarken 4. saatten itibaren pik yapmıştır (Baranova, Vishnyakova et al. 2002). Yine IL1 $\beta$ ' nın ölçüldüğü ve 100 ng/ml LPS (serotype 055:B5) ile inkübe edildiği RAW 264.7 hücrelerinde cevap 2. saatte başlarken 5. saatte pik yapmaktadır (Magnanti, Giuliani et al. 2000).

Çalışmamızda IL1 $\beta$  aktivasyonu aracılığı ile inflamatuvar uyarımın gerçekleştiğini gözlemlediğimiz farklı dozlarda LPS uygulaması sonucu 0.2-0.8 ng/ml LPS aralığında 2-5 saatlik inkübasyon süreleri belirlendi. Ölçümlerde RAW Blue hücrelerinin verdiği reaksiyon değeri Quanti- Blue Assay ile ölçüldü (Şekil 16). Değerlendirmemiz neticesinde 2. saatte etkinin başladığı ve 5. saatte pik yaptığı gözlemlendi. Cevabın şiddeti kullanılan hücre miktarına göre farklılık göstermekle birlikte en az 3 kat artış 0.2 ng/ml ile 2. saatten sonra sağlandı (Şekil 17.a). 3. ve 5. saatte elde edilen cevabın şiddeti  $2 \times 10^4$  ve  $10 \times 10^4$  hücre için 3 kat artıştan fazladır. Bu nedenle oluşan yanıtın kontrole göre değerlendirilmesinde 0.2 ng/ml LPS ile en az 3 saat ve en çok 5 saatlik inkübasyon süresi değerlendirilmeler için kullanıldı (Şekil 17.b). Elde edilen değerler doz ve cevap süreleri açısından mevcut literatür ile uyumludur. IL1 $\beta$ ' nın PCR ile ölçümü sonrası gözlenen değerler kontrole göre 6 katlık bir artış göstermiş, bu değerlerin inflamatuvar yanıtın Quanti-Blue ile ölçümü için yeterli yanıtı oluşturduğunu gösterdi (Şekil 18). Bulgular literatür ile paraleldir.

TLR2'nin doğrudan LPS'yi bağlayabildiğine dair kanıtlar vardır (Takeuchi, Hoshino et al. 1999). TLR agonistlerinin incelendiği bir çalışmada  $1 \times 10^6$  cells/ml monosit hücresinin düşük dozlu LPS (0.2 ng/ ml) ile 5 saat inkübasyonu sonrası, kısa süreli inflamatuvar yanıtların analizi için hücreler toplanmış; NF $\kappa$ B aktivasyonu ve TLR cevabı için bu süre ve doz kontrole göre yeterli cevabı oluşturabilmiştir. Aynı şekilde hücre

sitümulasyonu için 2 ug/ml 30 dk ve 37<sup>0</sup>C de Polymyxin B inkübasyonu sonrası LPS etkisinin baskılandığı gözlenmiştir (Monguio-Tortajada, Franquesa et al. 2018).

LPS' nin endotoksin etkisini değerlendirmek amacı ile 15-60 dk kaynatma uygulandığında ve kontrole kıyaslandığında endotoksin aktivitesinin (LAL jelleşme aktivitesinin) ve TNF- $\alpha$  indükleyici aktivitenin kaynatmaya duyarlı olduğu görülmüştür. ~0.2 ng/ml LPS çalışmada maximum TNF $\alpha$  düzeyinin %50' ini elde etmek için yeterli iken 15-30 dakika kaynatılarak yapılan ısı işlem sonrası benzer LPS-TNF $\alpha$  indükleyici etki 2 ng/ml LPS ile elde edilebilmiştir. Isıl işlem sonrası LPS uyarıcı etkisinin %90'ını kaybedilmiştir. Etkinin başlama süresi açısından 0.1 ng/ml ile 10ng/ml arasındaki değerler benzerdir (Gao, Wang et al. 2006).

Polymyxin etkisi de ısı ile azaltılabilmektedir. Etki ısı karşısında stabil değildir ve 121<sup>0</sup> C de 15 dk' da MIC değerinin 6-8 kat arttığı gösterilmiştir (Traub and Leonhard 1995). Optimal PH 6.0 dışında ve 92-115<sup>0</sup>C üzerindeki sıcaklıklarda Polymyxin B' nin antibakteriyel aktivitesini azalttığı düşünülmektedir (Saohin 1997).

LPS yanıtını baskılama amacı ile kullanılan SP-A ve fragmentlerinin kullanıldığı ölçümlerde, Polymyxinin baskılama gücüne katkısı değerlendirildiğinde; literatürde belirlenen bir baskılama düzeyinden çok, etkisinin azaltılmasına yönelik çalışmalara rastlanmıştır. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde belirtilen yöntemle yüksek ısı ve uygun bekleme süreleri sonrası Polymyxin etkisinin yapısal değişikliğe bağlı olarak bozulduğu ve etkinliğini kaybettiği görülmektedir. Uyguladığımız yöntem sonrası yaptığımız ölçümlerde sisteme Polymyxinin etkisi %8 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 20.d).

Endotoksin ölçümleri öncesinde belirlenen toksin düzeylerinin dönüşümünde; 10 EU/ml=1 ng/ml değeri kullanılmıştır. O111:B4 kaynaklı LPS için EU değeri yaklaşık 120 pg E.coli lipopolisakaritine eşittir ve tek bir Escherichia coli, hücre başına yaklaşık 2 milyon LPS molekülü içerir. İnsanlarda 5 EU/kg vücut ağırlığına kadar maruz kaldıklarında bunlarla sınırlı olmamak üzere, ateş, düşük kan basıncı, artan kalp atış hızı ve düşük idrar çıkışı görülebilir. Kan dolaşımındaki küçük endotoksin dozları bile çoğu zaman ölümcül olur. Endotoksin doğrudan hücre veya organlara karşı değil, tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin (IL) gibi bir dizi pro-enflamatuar aracının salınmasıyla

bağışıklık sisteminin, özellikle monositler ve makrofajlar yoluyla aktive edilmesi yoluyla etki eder. Amerika Birleşik Devletleri'nde dağıtılan ilaçlar için FDA tarafından izin verilen azami endotoksin seviyeleri; enjekte edilebilir, intratekal ilaçlar için; 0,2 EU/kg, enjekte edilebilir, intratekal olmayan ilaçlar için; 5 EU/kg ve steril su için; 0,25-0.5 EU/ml (kullanım amacına göre değişir) olarak belirlenmiştir. Farmasötik ve biyolojik ürünün intravenöz uygulamaları için maksimum endotoksin seviyesi, bütün farmakopeler tarafından saatte vücut ağırlığının kg'ı başına 5 endotoksin birimi (EU) olarak ayarlanmaktadır (GenScript 2019),(FDA 1985), (Daneshian, Guenther et al. 2006),(Hirayama and Sakata 2002),(Magalhaes, Lopes et al. 2007). Endotoksin uzaklaştırması sırasında anyonik değişim kromatografisi ile pozitif yüklü proteinlerin dekontaminasyonu için uygun iken, negatif yüklü proteinlerin dekontaminasyonu sırasında adsorpsiyon nedeniyle önemli miktarda ürün kaybı ile sonuçlanır. Endotoksinlerin uzaklaştırılması, proteinler gibi kararsız biyomoleküller ile ilişkilendirildiğinde kullanılacak yöntemin seçimi önemli hale gelir. Polimiksin B gibi bağlayıcı tekniklerin LPS'yi proteinlerden ayırmadaki başarısı, hedef proteinin özelliklerine büyük ölçüde bağlıdır (Kang and Luo 1998),(Matsumae, Minobe et al. 1990, Weber, Henne et al. 1995),(Sakata, Kawai et al. 1993).

Ölçümlerimiz sonrasında tespit edilen endotoksin düzeyleri 1-10 ng/ml düzeyindedir (Şekil 12). Elde edilen endotoksin düzeyleri başlangıçta ölçülen düzeyler ile karşılaştırıldığında arındırma işlemi sonrasında başarılı bulunsa da amaçlanan düzeylerin üzerindedir. Bu aşamada daha fazla endotoksin uzaklaştırma konusunda protein kaybı sınırlayıcı basamak olmuştur (Şekil 13-14). Ancak literatürde çalışılan proteinlerin özelliklerine ilişkin yeterli veri bulunmaması nedeni ile işlem tekrarları daha fazla protein kaybetmemek üzere sınırlandırılmıştır.

Akciğerde kollektin ailesi üyesi bir yüzey aktif madde olan Surfaktant A proteini (SP-A), pulmoner konakçı savunması ve pulmoner enfeksiyonun regülasyonunda rol oynamaktadır (Sato, Sano et al. 2003). Ancak çalışmalar farklı dokularında surfaktant kaynağı olabileceğini göstermektedir. Amniyotik sıvıda bulunan SP-A konsantrasyonu gebelik yaşının bir fonksiyonu olarak artar ve SP-A proteini insan korioamniyotik zarlarında gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, bir trakeal atrezi vakasından elde edilen ilk

trimester amniyotik sıvı örneğinde, ekstrapulmoner kökenli SP-A'nın varlığı 3.13 ug/ml olarak belirlenmiştir. Bu bulgular SP-A ekspresyonunun sadece korioamniyotik inflamasyon sırasında salınan ve doğuştan gelen immün tepkinin bir parçası olmadığını, aynı zamanda korioamniyotik membranların ilerleyen gebelik sürecinde amniyon sıvısına salınan SP-A'nın kaynağı olduğunu göstermektedir (Han, Romero et al. 2007).

SP-A, kullanacağı reseptör tipine bağlı olarak pro-inflamatuar ya da anti-inflamatuar olarak görev yapabilir. Bir patojenin yokluğunda, SP-A, lektin alanı boyunca sinyal önleyici düzenleyici protein-a'ya (SIRP- $\alpha$ ) bağlanır. SP-A'nın lektin bölgesine yabancı bir organizmanın veya hücre kalıntısının bağlandığı durumda ise CD91-calreticulin kompleksi aracılığı ile serbest kollajen benzeri bölge immün hücreleri aktive eder. Farklı reseptörlerin angajmanı farklı tepkilere neden olur. SP-A, SIRP- $\alpha$ 'yı bağladığında, enflamatuar-mediatör üretimi inhibe edilir. Aksine, SP-A, CD91-kalretisin kompleksi yoluyla enflamatuar mediatör üretimini artırır (Gardai, Xiao et al. 2003), (Agrawal, Smart et al. 2013).

Toll like reseptörleri (TLR'ler) patojenlere karşı doğal immün tepkisini başlatan motif tanıma molekülleridir. Pulmoner yüzey aktif madde proteini SP-A, TLR2 ve TLR4 için endojen olarak üretilen bir ligandır. SP-A, farede doğum başlangıcında cenin tarafından üretilen bir sinyal olarak düşünülmüştür. SP-A ile patojenik TLR agonistleri lipopolisakkarit (LPS), peptidoglikan (PGN) ve polinosinik: sitidilik asit (sırasıyla poli; I: C) (TLR4, TLR2 ve TLR3 için ligandlar) arasındaki etkileşimlerin erken doğum ve inflammatuar mediatörlerin ekspresyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada RAW 264.7 hücre hattı, amniyotik sıvı ve periton makrofajları ve TLR4/TLR2 nakavt farelerin peritoneal makrofajları kullanılmıştır. Bu hücreler, SP-A içeren olan ve içermeyen patojenik TLR agonistleri ile 7 saat inkübe edilmiştir. Bu çalışmada, tek başına SP-A'nın, fare makrofajlarında inflammatuar mediatörler üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı ve bağımsız olarak erken doğum eylemine neden olmadığı saptandı. Diğer yandan SP-A; TLR'ye bağlı bir mekanizma yoluyla TLR ligandının neden olduğu inflammatuar mediatörlerin interlökin (IL)1 $\beta$ , tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  ve kemokin CCL5 ekspresyonunu önemli ölçüde bastırdı. Farede enflamasyonunun simüle edildiği preterm doğum modelinde, SP-A'nın intrauterin uygulaması, preterm



doğumu önemli ölçüde inhibe ettiği, proinflatuar mediatörlerin ekspresyonunu bastırıldığı ve CXCL1 ile anti-enflatuar mediatör IL-10'un ekspresyonunu arttırdığı görüldü. SP-A'nın TLR ligandına bağlı erken doğum ve enflatuar yanıtları baskılamak için TLR2 ile etkileşimde bulunduğu düşünülmüştür (Agrawal, Smart et al. 2013).

Çalışmamızda, TLR-2 ve TLR-4 cevapları izlendiğinde, LPS uygulanan ya da SPA bloğu uygulanan grupların diğer gruplar ile kıyaslandığında TLR-2 cevabının, spesifik artış gösterdiği görüldü. Bu bulgu SP-A ve LPS için majör reseptörün TLR-2 olduğunu ancak TLR-4 için yeterli bağlanmanın sözkonusu olmadığı görüldü. Bu bulgu mevcut literatür bilgilerini desteklemektedir (şekil 3, şekil 38).

Preterm doğum indükleyici enflatuar ligandlar (interlökin-1 veya lipopolisakarit), sürfaktan kompleksin sağlam bir indüksiyonuna neden olur. Transgenik deneylere veya insanlarda genetik kanıtlara göre, fetal dokusunda ifade edilen yüzey aktif madde proteinleri A, D veya C (SP-A, SP-D, SP-C), doğum veya erken doğumun başlangıcını etkiler. Doğumdan sonra, yüzey gerilimi azaltan ve eksojen ve endojen surfaktant ianti-inflatuar etkileri tamamlayıcı niteliktedir. Sürfaktan, anne, ve fetus için zararlı enflatuar tepkileri hafifletir. Korioamniyonitte, enflatuar ligandlar, fetal membranlardan alveolar alana amniyotik sıvı ve gelişmekte olan hava yolları yoluyla taşınır. Sürfaktan sentezi ve salgılanmasını indüklerler. Sürfaktan, fetal kompartmanlardaki şiddetli enflatuar tepkileri hafifletir ve spontan preterm doğum teşvik eder (Hallman 2013, M 2013).

Fetal-maternal arayüzde (decidua) ifade edilen SP-A ve SP-D'nin rolüne ait belirsizlik devam etmektedir. Murin desiduada SP-A ve SP-D'nin 17.5 (doğum öncesi) ve 19.5 dpc'de (partisyonun hemen yakınında) ifadesi ve lipopolisakarit (LPS) ile desidual makrofajlar üzerindeki etkileri incelendiğinde; SP-A ve SP-D, maternal spiral arteri kaplayan hücrelerin yanı sıra, 17.5 ve 19.5 dpc'de murin desiduada stromal hücrelere lokalize idi. Bununla birlikte, eş zamanlı SP-A veya SP-D'nin eklenmesi, LPS ile birlikte, TNF- $\alpha$  salgılayan F4/80 pozitif hücreleri azalttı. SP-A ve SP-D'nin eksojen uygulamasının, spontan ve enfeksiyonun neden olduğu erken doğum eylemini potansiyel

olarak kontrol etmesi muhtemeldir. Bu nedenle, murin desiduada SP-A ve SP-D' nin, hamilelik sırasında intrauterin enfeksiyona karşı koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir ([Madhukaran, Koippallil Gopalakrishnan et al. 2016](#)).

Canlı *Escherichia coli* ile oluşturulan intrauterin (IU) enfeksiyonun sonrası SP-A güçlü bir erken doğum önleyici etkiye sahip olduğu savunulmaktadır. SP-A, rahim içine bakteriyel enfeksiyonla eşzamanlı olarak uygulandığında, doğum oranı %100'den, % 0'a düşürülmüş, IU bakteriyel uygulama ile aynı anda intravenöz olarak uygulandığında % 75 ve IU bakteriyel enfeksiyonundan 4 saat sonra intravenöz olarak uygulandığında % 48 oranında erken doğum eyleminde azalma sağlanmıştır. Erken doğum üzerindeki bu etkiye uteroda-fetal sağkalım üzerine paralel bir fayda eşlik etmiştir. SP-A bakteriyel büyümeyi etkilememiş, ancak inflamatuvar mediatörlerin üretimi ve makrofaj polarizasyonunda M1 fenotipine bir kayma dahil olmak üzere enfeksiyonun ana sonuçlarını tersine çevirmiştir. Bu bulgular, eksojen SP-A'nın proinflamatuvar sonuçlarını tersine çevirerek enfeksiyonun neden olduğu erken doğuma karşı koymak için potansiyel bir kullanıma sahip olduğunu göstermektedir ([Agrawal V 2018](#)).

Bir çalışmada, rekombinant SP-A ve SP-D formlarının (rhSP-A ve rhSP-D'nin, trimerik lektin alanından oluşan), in vitro kontraktıl olaylar üzerindeki etkileri, bir insan miyometriyal hücre hattı (ULTR) kullanarak araştırmıştır. RhSP-A veya rhSP-D ile muamelenin, hücre hızını ve kat edilen mesafeyi artırdığı gözlenmiştir. rhSP-A ve rhSP-D ayrıca, ULTR'lerin kasılma tepkisini de etkilemiştir. Bu etkiyi, oksitosin reseptörü (OXTR) ve connexin 43 (CX43) ekspresyonunu ve IL-8'in salgılanmasını indükleyerek gerçekleştirmektedir. rhSP-D ayrıca IL-6 ve IL-6 Ra'nın ifadesini de indüklemiştir. SP-A ve SP-D, doğum öncesi olayları modüle etmede, insan myometriyumunu yenileyerek ve CAP genlerini, pro-enflamatuvar sitokinleri indüklemekte ve böylece uterusu sakin bir durumdan kontraktıl bir duruma kaydırmaktadır ([Sotiriadis, Dodagatta-Marri et al. 2015](#)).

Çalışmamızda kullanılan LPS formu %100 doğum gerçekleştirme potansiyeline ait suş ile benzerdir. Deney modeli için tercih edilen 14.5 dpc aynı zamanda literatürle paralel ve insan için 2. trimester ile uyumludur ([Şekil 10](#)). Intrauterin LPS uygulaması sonrası 24 saat içerisinde %100 erken doğum gözlemlendi.

Alveolar Proteinozisli (AP) hastalarda SP-A elektroforezi gerçekleştirilen bir çalışmada elde edilen moleküler ağırlık, doğal insan SP-A'sı ve rekombinant olanlar ile karşılaştırıldığında %4-12 üzerinde indirgenmiş/ indirgenmemiş ortamlarda AP-SP-A ve normal SP-A monomerik (30-42 kDa) ve dimerik (60-70 kDa) formda izlenmiştir. Oysa rekombinant olanlarda trimerik yapılarda gözlenmiştir (Garcia-Verdugo, Sanchez-Barbero et al. 2003).

Pulmoner proteinozisli hastalardan elde edilen ve endotoksin düzeyi 0.2 pg/ug olan SP-A ile TLR2 ve TNF- $\alpha$  arasındaki ilişkinin Zymosan (TNF indükleyici) varlığı ve yokluğunda test edildiği çalışmada RAW 264.7 hücreleri ( $5 \times 10^5$ ) üzerinde 20-40 ug/ml SP-A kullanılmıştır. 20 ug/ml SP-A TNF a cevabını baskılamada başarılı iken, Polymycin varlığında TNF-  $\alpha$ ' nın baskılanmasında SP-A cevabının kontrole göre %5 düzeyinde değiştiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada kullanılan SP-A 36 ve 62 kDa da iki farklı izoformda tespit edilmiştir. Çalışma, zymosanın SP-A için bir ligand olmadığını ve SP-A'nın zymosan kaynaklı TNF-  $\alpha$  salgılanmasını düşürdüğünü göstermektedir (Sato, Sano et al. 2003). SP-A ayrıca, bir SP-A ligandı olmayan, proinflamatuvar sitokin salınımını da inhibe eder ve TLR2' yi bağlayabilir (Murakami, Iwaki et al. 2002).

Çalışmamızda SP-A' nın moleküler ağırlığı doğrulanarak, literatürde bu konuda sınırlı sayıda yer alan çalışma ile kıyaslandığında jel üzerinde tam uzunluktaki SP-A monomerik (24 kDa) ve dimerik (50-60 kDa) iki formda belirlendi. Her iki değer de yöntemler farklı olmakla birlikte yapılan çalışmalar ile örtüşmektedir. SP-A' ya ait özel fragmentler KINK (22 kDa), GLOB (28 kDa), daha küçük fragmentler olan PL için (2 kDa), CDM (4 kDa) olarak izlendi (Şekil 15).

SP-A'nın oldukça etkili ve doğuştan edinilen bir opsonin olduğu iyi bilinir (Pison, Max et al. 1994). Viral ve bakteriyel etkenler ile indüksiyon sonrası farklı dozların kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Bir çalışmada; 20 ug/ml Polymyxin ile birlikte kullanılan SP-A etkinliği karşısında bağlanması amacı ile kullanılmış ve TNF  $\alpha$  düzeyi 10 ug/ml ve 20 ug/ml' de benzer cevaplar oluşturmuştur. Aynı çalışmada Polymyxin LPS bağlayıcı olarak kullanılmıştır (Guillot, Balloy et al. 2002). Ca<sup>2+</sup> içeren ortamda SP-A patojene bağlanma kapasitesini artırmaktadır. Bu bağlanma ilişkisinin

mannoz reseptörü ile ilgili olduğu ve SP-A'nın makrofaj aracılı fagositozu artırdığı düşünülmektedir. 20 ug/ml SP-A en yüksek cevabın alındığı doz olarak belirlenmiştir (Kudo, Sano et al. 2004). 10 ug/ml SP-A 1-5 gün ve 1-20 saat aralığında insan monositleri ile inkübe edildiğinde TLR2 yüzey protein ekspresyonu azalırken TLR4 yüzey ekspresyonu, makrofaj dönüşümünde değişmeden kalır (Henning, Azad et al. 2008). SP-A aracılı Respiratory Syncytial Virus (RSV) uyarımı sonrası monositlerde TNF $\alpha$  üretimi artmakta ve IL-10 düzeyi azalmaktadır. 5-20 ug/ml SP-A ile inkübasyon sonrası en iyi cevap 20 ug/ml ile alınmıştır. RSV yoğun bir şekilde G proteinini mannozile eder ve SP-A'nın karbonhidrat parçalarına bağlanması için kalsiyum bağımlı G proteinlerine ihtiyaç duyduğu düşünülmektedir (Barr, Pedigo et al. 2000). Glikolize SP-A'nın M. tuberkülozis' i bağladığının düşünüldüğü başka bir çalışmada 100 U/ml IFN gamma ile 48 saat indüklenen alveolar makrofajlar insan SP-A' sını (0-40 ug/ml) ile inkübe edilmiş ve 20 ug/ml SP-A' ya kadar nitrit üretiminin baskılanabildiği görülmüştür (Pasula, Wright et al. 1999).

Çalışmamızda RAW Blue hücreleri 3 saat 20 ug/ml SP-A ve 0.2 ng/ml LPS ile 5 saat inkübe edildi (Şekil 19). Bu değerler yeterli uyaran oluşturma ve cevap elde etme açısından literatür ile uyumludur. Tam uzunluktaki SP-A ile LPS etkileşimine ilişkin literatürde veriler yer almakla birlikte SP-A'nın farklı fragmentlerinin LPS karşısındaki baskı gücünün belirlenmesi literatür için yenidir. Sonuçlar değerlendirildiğinde doz ve etki süresi açısından; R-KINK (3.5 ug/ml, etki başlangıcı: 3 saat), R-GLOB (7.5 ug/ml, etki süresi: 2 saat), R-CDM (7.5 ug/ml, etki süresi: 5 saat), R-PL (7.5 ug/ml, etki süresi: 3 saat) olarak belirlenmiştir. Fragmentler arasında doz ve süre ilişkisi ve baskılama gücü farklıdır. Bu durum SP-A'nın farklı fragmentleri aracılığı ile farklı etkiler oluşturma potansiyeline işaret etmektedir. SP-A çalışmalarında farklı yönlerde elde edilen sonuçlar için cevap oluşturabilir. Sonuçlar ve Polimiksin etkisi gözden geçirildiğinde %8 değeri farklı çalışmalar için yaklaşık etkiye benzer iken sonuçlar açısından LPS etkisinin baskılanmasında ilave etki ürettiğini düşünmekteyiz. Ancak baskılama gücünün Polymyxinin ilave etkisinden daha yüksek oluşu net etkinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Şekil 20-21).

Erken doğum ve Notch ilişkisi de literatüre eklenen bazı çalışmalarda incelenmiştir. LPS/PGN/Poly (I:C) indüklü uterus ve plasenta çalışmaları Notch sinyal yolağı ile bakteriyel ürünler arasında ilişki olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar; fare uterusundaki N1, DLL1 ve HES1' in inflamatuvar indüklü preterm eylemin başlaması ile ilişkili olabileceğini (Jaiswal, Agrawal et al. 2015) düşündürmektedir.

Araştırmalar farede uterus içi LPS indüklü preterm eylem ile hormon indüklü eylem karşılaştırıldığında, LPS indüklü preterm eylemin delta ligandını kullanarak başlayabileceğini bunun da uterus ile plasentadaki anjiogenezi etkileyerek gerçekleşmekte olduğunu varsaymıştır (Agrawal, Jaiswal et al. 2016).

Ayrıca, Misoprostol indüksiyonu ile uyarılan erken doğum modelinde, Notch Sinyal yoluna ait reseptör ve ligand değişikliklerinin, kas, kan damarı ile makrofaj üzerinde yaptıkları shift aracılığı ile erken doğum mekanizmasını N1, DLL1 ve JAG-2 aracılığı ile etkileyebileceği düşünülmektedir (Avcı, Simsek et al. 2018).

Çalışmamızda LPS aracılı erken doğum modeli üzerinde Notch yolunun etkilendiği görüldü. N1, DLL-1 artışı literatüre paralel olup, JAG-2 ekspresyonunun mast hücreleri aracılığı ile modifiye edilmekteydi (şekil 25-28, şekil 35-37). Immunofloresan boyaması ile JAG-2 eksprese eden hücrelerin mast hücreleri olduğu görüldü (şekil-27).

IND hem COX-1 hem de COX-2' yi inhibe etmekle birlikte, COX-1' i daha fazla seçicilik ile inhibe eder (Warner, Giuliano et al. 1999). Aynı zamanda bir PGE2 inhibitörüdür (van den Akker, Vrijssen et al. 2018). IND yaklaşık 5 ila 10 saatlik bir biyolojik yarı ömre ve 1 ila 2.5 ml/kg/dakikalık bir plazma klirensine sahiptir. Prematüre bebeklerde IND yarı ömrü, gebelik yaşı ile ters orantılıdır ve yetişkinlere kıyasla anlamlı şekilde uzar (Helleberg 1981). Histolojik çalışmalar için subcutan 5 mg/kg IND uygulamadan 24 saat sonra farelerde doku düzeyinde inceleme için olanak sağlamıştır (Laudisi, Di Fusco et al. 2019). 1 mg/kg IP IND uygulama sonrası farelerde 1-3 gün arasında bazı interlökinler, PGE2 ve TNF- $\alpha$  cevap değişikliği ELİSA ile ölçülebilmektedir (Gentile, Queiroz-Hazarbassanov et al. 2015). Farklı bir çalışmada egzersiz ile kombine edilen ve gavaj ile uygulanan IND için 2.5 mg/kg farelerde iyi tolere edilen ve letal olmayan doz olarak belirlenmiştir (Enos, Davis et al. 2013). IND' nin alınış zamanı

etkisi açısından önemlidir. Sirkadyen ritimden etkilenen IND açısından sabah öğle ve akşam alınma durumuna bağlı olarak ağrı cevabı etkilenmektedir (Bruguerolle 1992). Yan etkiler gündüz alımlarında daha fazla bildirilmiştir (Levi, Le Louarn et al. 1985) IND' nin farmakokinetiğinin sirkadiyen değişiklik mekanizmaları esas olarak ilaç dağılımındaki değişikliklerle ilgilidir (Guissou, Cuisinaud et al. 1987).

IND gibi steroid olmayan antiinflamatuvar ajanlar, siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe etmek suretiyle vücutta etkili olan prostaglandin biyosentezi inhibitörleridir. Bu nedenle anti-inflamatuvar ilaçlar erken doğumu önleme potansiyeline sahiptir (Loudon, Groom et al. 2003);(Kayaalp 1997).

COX-1 pek çok doku için yapısal bir enzim olarak kabul edilmek ile birlikte COX-2 inflamatuvar stümlasyona yanıt olarak indüklenebilir bir enzimdir. COX eksikliği olan hücreler üzerindeki veya COX inhibitörlerinin kullanıldığı çalışmalar, COX-2'nin PGE2'nin yüksek üretimine neden olduğunu ve LPS'den uygulamasından sonra daha az oranda diğer prostanoidlerin üretimine aracılık ettiğini göstermiştir. Buna karşılık, LPS, MyD88'e bağlı bir şekilde COX-1'i aşağı regüle etmektedir. COX-1 eksikliğinde, LPS uygulamasından sonra PGE2 üretimini arttırdığı ve vazoaaktif PGE2'nin COX-2'ye bağlı prostanoidlerin üretim yanıtını oluşturduğu görülmüştür. COX-2 LPS' den sonra prostanoid üretiminin ana aracısıdır. Yine TLR-4 aktivasyonu astrositlerde COX-1' de azalmaya neden olmaktadır (Font-Nieves, Sans-Fons et al. 2012). COX-1'in azaltılmış ekspresyonunun, artan COX-2 ekspresyonu ile birlikte olduğu, LPS ile tedavi edilen sıçanların akciğerlerinde ve kalplerinde daha önce bulunmuştu (Liu, Newton et al. 1996). LPS uygulamasından sonra PGE2 üretimi tamamen COX-2' ye bağlıdır. COX-1 ise COX-2'ye bağımlı PGE2 üretimi üzerinde negatif kontrol etkisine sahiptir (Font-Nieves, Sans-Fons et al. 2012).

IND tedavisinin erken doğum üzerindeki etkisi, uterus kasılmalarının önlenmesi ve gebelik süresinin uzaması açısından değerlendirilmektedir (Zuckerman, Shalev et al. 1984). IND karşılaştıran çok sayıda randomize kontrollü çalışmaların çoğunda (% 75), IND'in en fazla 48 saate kadar erken doğumu geciktirdiği gösterilmiştir (Quaas, Goppinger et al. 1987);(Kalgutkar, Crews et al. 2000);(Doggrell 2004);(Vermillion and Landen 2001). PGF<sub>2α</sub> uygulanması gebe ratlarda doğumu geciktirirken, IND

uygulanandığında oluşan perinatal ölümler azalmamıştır. Bu durumun IND' nin prostaglandin sentezi üzerinde yaptığı baskılayıcı etkisine bağlı olduğu düşünülmüştür. 5 mg/kg IND progesteron düşüşünü geciktirmekle birlikte engelleyemez. Bireysel olarak sıçanlarda plazma progesteronuna bağlı olarak IND' ye olan tepkiler önemli ölçüde değişebilir. Her ne kadar sıçanlarda indometazinin ana etkisi luteolizin inhibisyonu gibi görünse de, bu mekanizma primatlarda gebeliğin uzamasından pek sorumlu olmayabilir ve uterus kontraktilitesinin, plasental hormon üretiminin veya diğer faktörlerin antienflamatuvardan etkilenip etkilenmediği araştırılmalıdır (Fuchs, Smitasiri et al. 1976).

Farelerde, 10 mikrogram LPS uygulaması sonrası desidial explantlarda, kontrole göre PGE, PGF<sub>2α</sub>, COX-2 ve Tromboksan B2 seviyelerinde belirgin artış ve %78 fetal ölüm görülmüştür. Bu farelere 14 µg/ml indometazin içme suyuna eklenerek günde toplam ~56 µg/ml alması sağlandığında fetal ölüm %24, subkutan 35 µg/ml alımda ise fetal ölüm %1 olarak belirlenmiştir (Silver, Edwin et al. 1995).

IND; 24-34 hafta arası gebeliklerde başarılı bir tedavi için gerekli olan 200-300 mg/gün indometazin alan vakaların %83' ünde terme ulaşma, %10'unda 2-7 gün arasında gecikme görülmüş, %7' sinde ise herhangi bir etki tespit edilememiştir (Zuckerman, Shalev et al. 1984).

Çalışmamızda özellikle TLR-2 cevabının baskılanmasında etkili olduğu görülen IND' nin (Şekil 38), LPS baskılanması sırasında doz bağımlı olarak cevap oluşturabileceği ve farklı reseptör ve ligandlar aracılığı ile bu cevabı yönettiği düşünüldü (şekil 24-31), (şekil 32-37). COX-1 ile etkileşimin LPS uygulanan grupta fazlaydı ve azalan protein düzeyi COX-1 inhibisyonu ile ilişkiliydi. IND' de aynı şekilde COX-1 inhibisyonuna neden olmaktadır (Şekil 32). IND' nin JAG-2' yi baskılayarak LPS'nin etkisini sınırlayabildiği (Şekil 36) ayrıca IND' nin SPA ile etkileşime girdiği (Şekil 33) ancak LPS verilen grupta süreci geriye çevirme de yeterli olmadığı bu durumun doz ile ilgili olabileceği düşünüldü (Şekil 33). Her iki madde de farklı araçlar kullanarak LPS etkisini sınırlayabilmektedir.

Doğum sürecini etkileyen ve enfeksiyon sürecinde yer alan önemli hücrelerden biri de makrofajlardır. Fetal ve maternal bölmedeki makrofajlar, uzun süredir pek çok araştırmanın odağında yer almıştır ve her iki kompartımandaki makrofajlar gebeliğin tüm aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu hücreler uterin bağ dokularının ve kan damarlarının yeniden şekillendirilmesi, trofoblast (fetal hücre) implantasyonunun düzenlenmesi, fetal antijenlere karşı bağışıklık toleransı, komşu lökositlerin immünomodülasyonu ve doğumun başlatılması gibi başarılı gebelik için gerekli olan çeşitli işlemleri desteklemektedir (Nagamatsu and Schust 2010);(Hamilton, Oomomian et al. 2012);(Shynlova, Nedd-Roderique et al. 2013).

Makrofajlar başlangıçta M1 veya M2 polaritesi olarak tanımlanan farklı fenotipleri gösterir. M1 makrofajlar, antibakteriyel etkinliğe sahip olup, hücre aracılı immün yanıtı karşı T hücre yanıtını TH1 yönünde değiştirme kapasitesi gösterir (Mantovani, Sica et al. 2004);(Mills, Kincaid et al. 2000). M1 polarizasyonunu teşvik ettiği bilinen harici uyarılar, E. coli kaynaklı lipopolisakkarit, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, GM-CSF (Martinez and Gordon 2014) ve TLR4 agonistleridir. Buna karşılık, M2 makrofajları, doku yeniden modellemesine katılır, immünoşüpresif niteliklere sahiptir ve antikor aracılı TH2 immün yanıtı geliştirir (Mantovani, Sica et al. 2004). M2 yönünde polarize hücreler (alternatif olarak aktive hücreler) mannoz ve scavenger reseptörleri bol eksprese ederler ve M2 polarizasyonunu indükleyen uyarılar IL-4, IL-10, IL-13, IL-33, TGF- $\beta$  ve G-CSF' dir (Brown, von Chamier et al. 2014).

Servikal olgunlaşma, enflamatuar hücrelerin istilasını, kollajen parçalanmasını ve hücre dışı matrisin yeniden yapılandırılmasını içeren birçok yönden enflamatuar bir işlemi andırır. Mast hücreleri çeşitli enflamatuar ajanlar üretir ve servikal olgunlaşmada fonksiyonel bir rol oynar. Servikal mast hücrelerinin sayısının artmış olup olmadığını ve gebelikte uyarılıp uyarılmadığını inceleyen bir çalışmada gebelik ile birlikte serviks ağzında mast hücresi sayısının arttığı ve serviks olgunlaşmasını etkilediği düşünülmüştür (Norstrom, Vukas Radulovic et al. 2019). İnsan ve fare mast hücreleri TLR-2 ve TLR-4 reseptörlerini birlikte eksprese etmektedir. Ek olarak LPS'nin, insan monositlerinde ve alveolar makrofajlarında TLR2, TLR4 ve TLR9 için mRNA seviyesini arttırdığı (Juarez, Nunez et al. 2010) gösterilmiştir. TLR2, TLR4 ve TLR9 ifadesi, bakteriyel bileşenler



veya TLR'ye özel ligandlar tarafından enfeksiyon veya enflamasyon bölgelerinde in vivo olarak farklı şekilde düzenlenebilir (Juarez, Nunez et al. 2010)

Mast hücreleri sahip oldukları uterotonik mediatör bırakma potansiyeli ile degranüle olduklarında gebelerde miyometriyumundaki kasılmaları başlattığı gösterilmiştir. Bu durum onların gebelik sürecinde düzenleyici rollerinin olabileceğini düşündürmüştür (Bytautiene, Vedernikov et al. 2004). Mast hücrelerinin aktivasyonu uterus kontraktilesinin uyarılması için etkili bir mekanizmadır ve termin ya da erken doğumun kontrolünde önemli bir rol oynayabilir (Garfield, Bytautiene et al. 2000). Östrojenlerin, CRH ve oksitosinin mast hücre degranülasyonunda pozitif regülatörler oldukları bilinmektedir (Rudolph, Rojas et al. 2004). Postpartum servikste de sayılarının artmış olarak görülmesi doğum sonrası servikal düzenleyici rollerinin olabileceğide düşündürmektedir (Bosquiazzo, Durando et al. 2005) Mast hücre degranülasyonunun, hamilelik sırasında sıçan rahim ağzının normal anjiyogenezine katkıda bulunmak için gerekli bir işlem olabileceğine dair kanıtlar vardır (Varayoud, Ramos et al. 2004). Mast hücreleri ile VEGF aracılı anjiogenez arasında ilişkiye dikkat çeken çalışmalar bulunmaktadır (Detoraki, Staiano et al. 2009, Gilfillan and Beaven 2011). Mast hücre degranülasyonunun inhibisyonu sonucu makrofaj sayısını artırmanın gebelik sırasında yeni damar oluşumunu destekleyecek bir mekanizmanın parçası olabileceği de düşünceler arasındadır (Bosquiazzo, Ramos et al. 2007).

Makrofajlar ve monositler, enflamatuar sinyallere yanıt olarak COX-2 enzimlerini düzenler ve bu nedenle PGE2 ve diğer eikosanoidlerin başlıca üreticileridir (Tonby, Wergeland et al. 2016).

Çalışmamızda gebelik ile birlikte makrofaj lokalizasyonunun serviks stromal alanında arttığı izlendi. Bu lokalizasyonun özellikle mast hücrelerinde aracılık ettiği JAG-2 ekspresyonunun modifikasyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü (şekil 28,29). Ayrıca bu hücrelere ait aktivasyonun gebelik döneminde uygulanan cerrahi işlemlerden etkilenebileceğide öngörülmektedir (şekil 36).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Erken doğum süreci ve moleküler alt yapısının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar doğru tedavi ve klinik yaklaşımın belirlenmesi adına hala araştırılmaya devam eden ve geliştirilmeye açık konular arasındadır. Pek çok doku ve sistemi içerisine alan bu süreç aynı zamanda hayvan modellerinin oluşturularak insan fizyolojisini modelleyen deneysel planlamaların yapılmasını da gerekli kılmaktadır. Çalışmamızda *invivo* ve *invitro* deney koşullarında erken doğumu değerlendirmeye yönelik çalışmalar yapılmış ve kullanılan model üzerinde SP-A ve fragmentlerinin etkileri gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarımız SP-A' nın LPS ile oluşturulan inflamatuvar yanıtı baskılayarak erken doğumun önlenmesine yönelik bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Fragmentlerin ayrı ayrı özelliklerinin araştırılmasının literatürde yer alan, SP-A' nın farklı ortamlarda ve farklı bağlanma koşullarında oluşturduğu etkileri açıklama konusunda yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. IND uygulamasının protein düzeyinde Notch sinyalini üzerinde pek çok değişikliğe sebep olduğu ve özellikle SPA ile ilintisinin olduğu görülmüştür. Doza bağımlı etkilerinin ayrıntılı araştırılması ile, erken doğumun önlenmesinde her iki maddeninde önem arz ettiği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

Abramov, Y., M. Nadjari, D. Weinstein, I. Ben-Shachar, V. Plotkin and Y. Ezra (2000). "Indomethacin for preterm labor: a randomized comparison of vaginal and rectal-oral routes." Obstet Gynecol **95**(4): 482-486.

Acien, P. (1992). "Embryological observations on the female genital tract." Hum Reprod **7**(4): 437-445.

Agrawal, V. and E. Hirsch (2012). "Intrauterine infection and preterm labor." Semin Fetal Neonatal Med **17**(1): 12-19.

Agrawal, V., M. K. Jaiswal, S. Pamarthy, G. K. Katara, A. Kulshrestha, A. Gilman-Sachs, E. Hirsch and K. D. Beaman (2016). "Role of Notch signaling during lipopolysaccharide-induced preterm labor." J Leukoc Biol **100**(2): 261-274.

Agrawal V, J. M., Beaman KD, Hirsch E (2018). "Surfactant protein A suppresses preterm delivery induced by live Escherichia coli in mice." Biol Reprod **Sep 1;99(3)**: 546-555.

Agrawal, V., K. Smart, T. Jilling and E. Hirsch (2013). "Surfactant protein (SP)-A suppresses preterm delivery and inflammation via TLR2." PLoS One **8**(5): e63990.

Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-680.

Altshuler, G., H. F. Krous, D. H. Altmiller and G. L. Sharpe (1979). "Premature onset of labor, neonatal patent ductus arteriosus, and prostaglandin synthetase antagonists--a rat model of a human problem." Am J Obstet Gynecol **135**(2): 261-265.

Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo and R. A. Flavell (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." Cell **117**(4): 515-526.

Arias, F. (2000). "Pharmacology of oxytocin and prostaglandins." Clin Obstet Gynecol **43**(3): 455-468.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." Science **284**(5415): 770-776.

Avci, S., M. Simsek, H. Soylu and I. Ustunel (2018). "Misoprostol-Induced Modification of the Notch Signaling Pathway in the Human Cervix." Reprod Sci: 1933719118799208.

- Bachman, J. (2013). "Reverse-transcription PCR (RT-PCR)." Methods Enzymol **530**: 67-74.
- Bajaj, S. K., R. Misra, B. B. Thukral and R. Gupta (2012). "OHVIRA: Uterus didelphys, blind hemivagina and ipsilateral renal agenesis: Advantage MRI." J Hum Reprod Sci **5**(1): 67-70.
- Baranova, I., T. Vishnyakova, A. Bocharov, Z. Chen, A. T. Remaley, J. Stonik, T. L. Eggerman and A. P. Patterson (2002). "Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells." Infect Immun **70**(6): 2995-3003.
- Barr, F. E., H. Pedigo, T. R. Johnson and V. L. Shepherd (2000). "Surfactant protein-A enhances uptake of respiratory syncytial virus by monocytes and U937 macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(5): 586-592.
- Basu, S. and M. J. Fenton (2004). "Toll-like receptors: function and roles in lung disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(5): L887-892.
- Bellad, M. B., D. Tara, M. S. Ganachari, M. D. Mallapur, S. S. Goudar, B. S. Kodkany, N. L. Sloan and R. Derman (2012). "Prevention of postpartum haemorrhage with sublingual misoprostol or oxytocin: a double-blind randomised controlled trial." BJOG **119**(8): 975-982; discussion 982-976.
- Berger, A. (2000). "Th1 and Th2 responses: what are they?" BMJ **321**(7258): 424.
- Biswas, S. K. and E. Lopez-Collazo (2009). "Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance." Trends Immunol **30**(10): 475-487.
- Blau, H., S. Riklis, V. Kravtsov and M. Kalina (1994). "Secretion of cytokines by rat alveolar epithelial cells: possible regulatory role for SP-A." Am J Physiol **266**(2 Pt 1): L148-155.
- Blencowe, H., S. Cousens, M. Z. Oestergaard, D. Chou, A. B. Moller, R. Narwal, A. Adler, C. Vera Garcia, S. Rohde, L. Say and J. E. Lawn (2012). "National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications." Lancet **379**(9832): 2162-2172.
- Borggreffe, T. and F. Oswald (2009). "The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes." Cell Mol Life Sci **66**(10): 1631-1646.
- Borie, R., C. Danel, M. P. Debray, C. Taille, M. C. Dombret, M. Aubier, R. Epaud and B. Crestani (2011). "Pulmonary alveolar proteinosis." Eur Respir Rev **20**(120): 98-107.
- Borron, P., J. C. McIntosh, T. R. Korfhagen, J. A. Whitsett, J. Taylor and J. R. Wright (2000). "Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(4): L840-847.

Bosquiazzo, V. L., M. Durando, J. Varayoud, J. G. Ramos, H. A. Rodriguez, M. Munoz-de-Toro and E. H. Luque (2005). "Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cell degranulation." J Reprod Immunol **65**(2): 147-158.

Bosquiazzo, V. L., J. G. Ramos, J. Varayoud, M. Munoz-de-Toro and E. H. Luque (2007). "Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis." Reproduction **133**(5): 1045-1055.

Boyle, A. K., S. F. Rinaldi, A. G. Rossi, P. T. K. Saunders and J. E. Norman (2019). "Repurposing simvastatin as a therapy for preterm labor: evidence from preclinical models." FASEB J **33**(2): 2743-2758.

Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-689.

Bridges, J. P., H. W. Davis, M. Damodarasamy, Y. Kuroki, G. Howles, D. Y. Hui and F. X. McCormack (2000). "Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury." J Biol Chem **275**(49): 38848-38855.

Brown, M. B., M. von Chamier, A. B. Allam and L. Reyes (2014). "M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy." Front Immunol **5**: 606.

Bruguerolle, B. (1992). Chronopharmacology. Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine. E. H. Yvan Touitou. Berlin, Springer-Verlag: 132-133.

Bugalho, A., A. Daniel, A. Faundes and M. Cunha (2001). "Misoprostol for prevention of postpartum hemorrhage." Int J Gynaecol Obstet **73**(1): 1-6.

Bytautiene, E., Y. P. Vedernikov, G. R. Saade, R. Romero and R. E. Garfield (2004). "Degranulation of uterine mast cell modifies contractility of isolated myometrium from pregnant women." Am J Obstet Gynecol **191**(5): 1705-1710.

Cardenas, I., M. J. Mulla, K. Myrtolli, A. K. Sfakianaki, E. R. Norwitz, S. Tadesse, S. Guller and V. M. Abrahams (2011). "Nod1 activation by bacterial iE-DAP induces maternal-fetal inflammation and preterm labor." J Immunol **187**(2): 980-986.

Chae, B. S. (2018). "Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the Production of In Vitro LPS-Induced Inflammatory Mediators." Toxicol Res **34**(1): 65-73.

Chakraborty, I., S. K. Das, J. Wang and S. K. Dey (1996). "Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids." J Mol Endocrinol **16**(2): 107-122.

Charles River Lab. (2017). "<http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-1-mouse?loc=TR>."

Chin, P. Y., C. L. Dorian, M. R. Hutchinson, D. M. Olson, K. C. Rice, L. M. Moldenhauer and S. A. Robertson (2016). "Novel Toll-like receptor-4 antagonist (+)-naloxone protects mice from inflammation-induced preterm birth." Sci Rep **6**: 36112.

Condon, J. C., P. Jeyasuria, J. M. Faust and C. R. Mendelson (2004). "Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 4978-4983.

Copeland, S., H. S. Warren, S. F. Lowry, S. E. Calvano, D. Remick, Inflammation and I. the Host Response to Injury (2005). "Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 60-67.

Copper, R. L., R. L. Goldenberg, A. Das, N. Elder, M. Swain, G. Norman, R. Ramsey, P. Cotroneo, B. A. Collins, F. Johnson, P. Jones and A. M. Meier (1996). "The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks' gestation. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network." Am J Obstet Gynecol **175**(5): 1286-1292.

Cunningham, G., P. C. Macdonald, N. F. Gant, K. J. Leveno and L. C. Gilstrap (1993). Willians Obstetrics. Physiology of pregnancy. 19 th Ed. Norwalk:Prentice-Hall, Inc. , 81-246.

da Fonseca, E. B., R. E. Bittar, M. H. Carvalho and M. Zugaib (2003). "Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study." Am J Obstet Gynecol **188**(2): 419-424.

Daneshian, M., A. Guenther, A. Wendel, T. Hartung and S. von Aulock (2006). "In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs." J Immunol Methods **313**(1-2): 169-175.

Danforth, D. N., J. C. Buckingham and J. W. Roddick, Jr. (1960). "Connective tissue changes incident to cervical effacement." Am J Obstet Gynecol **80**: 939-945.

de Matos, L. G., E. B. Candido, P. V. Vidigal, P. H. Bordoni, R. M. Lamaita, M. M. Carneiro and A. L. da Silva-Filho (2017). "Association between Toll-like receptor and tumor necrosis factor immunological pathways in uterine cervical neoplasms." Tumori **103**(1): 81-86.

Detoraki, A., R. I. Staiano, F. Granata, G. Giannattasio, N. Prevede, A. de Paulis, D. Ribatti, A. Genovese, M. Triggiani and G. Marone (2009). "Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 1142-1149, 1149 e1141-1145.

Dinarelo, C. A. (2011). "Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases." Blood **117**(14): 3720-3732.

Dobrovolskaia, M. A., A. E. Medvedev, K. E. Thomas, N. Cuesta, V. Toshchakov, T. Ren, M. J. Cody, S. M. Michalek, N. R. Rice and S. N. Vogel (2003). "Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components." J Immunol **170**(1): 508-519.

Doggrell, S. A. (2004). "Recent pharmacological advances in the treatment of preterm membrane rupture, labour and delivery." Expert Opin Pharmacother **5**(9): 1917-1928.

Doria, A., L. Iaccarino, S. Arienti, A. Ghirardello, S. Zampieri, M. E. Rampudda, M. Cutolo, A. Tincani and S. Todesco (2006). "Th2 immune deviation induced by pregnancy: the two faces of autoimmune rheumatic diseases." Reprod Toxicol **22**(2): 234-241.

Doria, A., L. Laccarino, S. Arienti, A. Ghirardello, S. Zampieri, M. E. Rampudda, M. Cutolo, A. Tincani and S. Todesco (2006). "Th2 immune deviation induced by pregnancy: the two faces of autoimmune rheumatic diseases." Reprod Toxicol **22**(2): 234-241.

Elovitz, M. A. and C. Mrinalini (2004). "Animal models of preterm birth." Trends Endocrinol Metab **15**(10): 479-487.

Elovitz, M. A., Z. Wang, E. K. Chien, D. F. Rychlik and M. Phillippe (2003). "A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4." Am J Pathol **163**(5): 2103-2111.

Enos, R. T., J. M. Davis, J. L. McClellan, J. L. Lake, M. D. Carmichael and E. A. Murphy (2013). "Negative interaction between indomethacin and exercise in mice." Int J Sports Med **34**(3): 191-195.

Ersvaer, E., K. J. Hatfield, H. Reikvam and O. Bruserud (2011). "Future perspectives: therapeutic targeting of notch signalling may become a strategy in patients receiving stem cell transplantation for hematologic malignancies." Bone Marrow Res **2011**: 570796.

Escoll, P., C. del Fresno, L. Garcia, G. Valles, M. J. Lendinez, F. Arnalich and E. Lopez-Collazo (2003). "Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients." Biochem Biophys Res Commun **311**(2): 465-472.

FDA. (1985). "Bacterial Endotoxins/Pyrogens." 2019, from <https://www.fda.gov/iceci/inspections/inspectionguides/inspectiontechnicalguides/ucm072918.htm>.

Filipovich, Y., S. J. Lu, S. Akira and E. Hirsch (2009). "The adaptor protein MyD88 is essential for E coli-induced preterm delivery in mice." Am J Obstet Gynecol **200**(1): 93 e91-98.

Font-Nieves, M., M. G. Sans-Fons, R. Gorina, E. Bonfill-Teixidor, A. Salas-Perdomo, L. Marquez-Kisinousky, T. Santalucia and A. M. Planas (2012). "Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes." J Biol Chem **287**(9): 6454-6468.

Fuchs, A. R., Y. Smitasiri and U. Chantharaksri (1976). "The effect of indomethacin on uterine contractility and luteal regression in pregnant rats at term." J Reprod Fertil **48**(2): 331-340.

Gao, B., Y. Wang and M. F. Tsan (2006). "The heat sensitivity of cytokine-inducing effect of lipopolysaccharide." J Leukoc Biol **80**(2): 359-366.

Garcia-Flores, V., R. Romero, D. Miller, Y. Xu, B. Done, C. Veerapaneni, Y. Leng, M. Arenas-Hernandez, N. Khan, B. Panaitescu, S. S. Hassan, L. M. Alvarez-Salas and N. Gomez-Lopez (2018). "Inflammation-Induced Adverse Pregnancy and Neonatal Outcomes Can Be Improved by the Immunomodulatory Peptide Exendin-4." Front Immunol **9**: 1291.

Garcia-Verdugo, I., F. Sanchez-Barbero, F. U. Bosch, W. Steinhilber and C. Casals (2003). "Effect of hydroxylation and N187-linked glycosylation on molecular and functional properties of recombinant human surfactant protein A." Biochemistry **42**(32): 9532-9542.

Garcia-Verdugo, I., Z. Tanfin, E. Dallot, M. J. Leroy and M. Breuiller-Fouche (2008). "Surfactant protein A signaling pathways in human uterine smooth muscle cells." Biol Reprod **79**(2): 348-355.

Gardai, S. J., Y. Q. Xiao, M. Dickinson, J. A. Nick, D. R. Voelker, K. E. Greene and P. M. Henson (2003). "By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation." Cell **115**(1): 13-23.

Garfield, R. E., E. Bytautiene, Y. P. Vedernikov, J. S. Marshall and R. Romero (2000). "Modulation of rat uterine contractility by mast cells and their mediators." Am J Obstet Gynecol **183**(1): 118-125.

Genscript. (2018). "Does any substance interfere with the binding of endotoxin to endotoxin Removal Resin?", from <https://www.genscript.com/endotoxin-kits.html>.

Genscript. (2018). "Protocol : L00338\_Manual.pdf." Retrieved 09/20/2018, from [https://www.genscript.com/product/documents?cat\\_no=L00338&catalogtype=Document-PROTOCOL](https://www.genscript.com/product/documents?cat_no=L00338&catalogtype=Document-PROTOCOL).



GenScript. (2018). "Protocol : L00350\_Manual.pdf." Retrieved 09/20/2018, from [https://www.genscript.com/product/documents?cat\\_no=L00350C&catalogtype=Document-PROTOCOL](https://www.genscript.com/product/documents?cat_no=L00350C&catalogtype=Document-PROTOCOL).

GenScript. (2019). "How do I convert EU/ml to ng/ml of endotoxin/What is the maximum acceptable endotoxin level." from <https://www.genscript.com/endotoxin-kits.html>.

Gentile, L. B., N. Queiroz-Hazarbassanov, O. Massoco Cde and D. Fecchio (2015). "Modulation of Cytokines Production by Indomethacin Acute Dose during the Evolution of Ehrlich Ascites Tumor in Mice." Mediators Inflamm **2015**: 924028.

Gibson, A. T. (1997). "Surfactant and the neonatal lung." Br J Hosp Med **58**(8): 381-384, 397.

Gilfillan, A. M. and M. A. Beaven (2011). "Regulation of mast cell responses in health and disease." Crit Rev Immunol **31**(6): 475-529.

Goldenberg, R. L., J. F. Culhane, J. D. Iams and R. Romero (2008). "Epidemiology and causes of preterm birth." Lancet **371**(9606): 75-84.

Goldenberg, R. L., J. C. Hauth and W. W. Andrews (2000). "Intrauterine infection and preterm delivery." N Engl J Med **342**(20): 1500-1507.

Goldmann, T., D. Kahler, H. Schultz, M. Abdullah, D. S. Lang, F. Stellmacher and E. Vollmer (2009). "On the significance of Surfactant Protein-A within the human lungs." Diagn Pathol **4**: 8.

Gomez, R., R. Romero, F. Ghezzi, B. H. Yoon, M. Mazor and S. M. Berry (1998). "The fetal inflammatory response syndrome." Am J Obstet Gynecol **179**(1): 194-202.

Gomez-Lopez, N., R. Romero, M. Arenas-Hernandez, B. Panaitescu, V. Garcia-Flores, T. N. Mial, A. Sahi and S. S. Hassan (2018). "Intra-amniotic administration of lipopolysaccharide induces spontaneous preterm labor and birth in the absence of a body temperature change." J Matern Fetal Neonatal Med **31**(4): 439-446.

Gravett, M. G., J. Hitti, D. L. Hess and D. A. Eschenbach (2000). "Intrauterine infection and preterm delivery: evidence for activation of the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Am J Obstet Gynecol **182**(6): 1404-1413.

Gridley, T. (2010). "Notch signaling in the vasculature." Curr Top Dev Biol **92**: 277-309.

Guenther, S., T. Vrekoussis, S. Heublein, B. Bayer, D. Anz, J. Knabl, I. Navrozoglou, D. Dian, K. Friese, A. Makrigiannakis and U. Jeschke (2012). "Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express FasL: a potential role for macrophages in trophoblast apoptosis." Int J Mol Sci **13**(7): 9069-9080.

Guillot, L., V. Balloy, F. X. McCormack, D. T. Golenbock, M. Chignard and M. Si-Tahar (2002). "Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4." J Immunol **168**(12): 5989-5992.

Guissou, P., G. Cuisinaud, J. Legheand and J. Sassard (1987). "Chronopharmacokinetics of indomethacin in rats." Arzneimittelforschung **37**(9): 1034-1037.

Gutsmann, T., M. Muller, S. F. Carroll, R. C. MacKenzie, A. Wiese and U. Seydel (2001). "Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells." Infect Immun **69**(11): 6942-6950.

Haagsman, H. P., A. Hogenkamp, M. van Eijk and E. J. Veldhuizen (2008). "Surfactant collectins and innate immunity." Neonatology **93**(4): 288-294.

Halle, H. and P. Hengst (1978). "[Additional tocolysis via inhibition of prostaglandin synthetase with indometacin (author's transl)]." Z Geburtshilfe Perinatol **182**(5): 367-370.

Hallman, M. (2013). "The surfactant system protects both fetus and newborn." Neonatology **103**(4): 320-326.

Hambleton, J., S. L. Weinstein, L. Lem and A. L. DeFranco (1996). "Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2774-2778.

Hamilton, S., Y. Oomomian, G. Stephen, O. Shynlova, C. L. Tower, A. Garrod, S. J. Lye and R. L. Jones (2012). "Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor." Biol Reprod **86**(2): 39.

Han, Y. M., R. Romero, Y. M. Kim, J. S. Kim, K. Richani, L. A. Friel, J. P. Kusanovic, C. Jeanty, S. Vitale, J. K. Nien, J. Espinoza and C. J. Kim (2007). "Surfactant protein-A mRNA expression by human fetal membranes is increased in histological chorioamnionitis but not in spontaneous labour at term." J Pathol **211**(4): 489-496.

Han, Y. W., R. W. Redline, M. Li, L. Yin, G. B. Hill and T. S. McCormick (2004). "Fusobacterium nucleatum induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth." Infect Immun **72**(4): 2272-2279.

Hashimoto, J., M. Takahashi, A. Saito, M. Murata, Y. Kurimura, C. Nishitani, R. Takamiya, Y. Uehara, Y. Hasegawa, Y. Hiyama, N. Sawada, S. Takahashi, N. Masumori, Y. Kuroki and S. Ariki (2017). "Surfactant Protein A Inhibits Growth and Adherence of Uropathogenic Escherichia coli To Protect the Bladder from Infection." J Immunol **198**(7): 2898-2905.

Hassan, S. S., R. Romero, D. Vidyadhari, S. Fusey, J. K. Baxter, M. Khandelwal, J. Vijayaraghavan, Y. Trivedi, P. Soma-Pillay, P. Sambarey, A. Dayal, V. Potapov, J. O'Brien, V. Astakhov, O. Yuzko, W. Kinzler, B. Dattel, H. Sehdev, L. Mazheika, D. Manchulenko, M. T. Gervasi, L. Sullivan, A. Conde-Agudelo, J. A. Phillips, G. W. Creasy and P. Trial (2011). "Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Ultrasound Obstet Gynecol **38**(1): 18-31.

Helleberg, L. (1981). "Clinical Pharmacokinetics of indomethacin." Clin Pharmacokinet **6**(4): 245-258.

Henning, L. N., A. K. Azad, K. V. Parsa, J. E. Crowther, S. Tridandapani and L. S. Schlesinger (2008). "Pulmonary surfactant protein A regulates TLR expression and activity in human macrophages." J Immunol **180**(12): 7847-7858.

Herington, J. L., C. O'Brien, M. F. Robuck, W. Lei, N. Brown, J. C. Slaughter, B. C. Paria, A. Mahadevan-Jansen and J. Reese (2018). "Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1 Mediates the Timing of Parturition in Mice Despite Unhindered Uterine Contractility." Endocrinology **159**(1): 490-505.

Hertelendy, F., M. Molnar and J. Rigo, Jr. (1995). "Proposed signaling role of arachidonic acid in human myometrium." Mol Cell Endocrinol **110**(1-2): 113-118.

Hirayama, C. and M. Sakata (2002). "Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **781**(1-2): 419-432.

Hirsch, E., R. Blanchard and S. P. Mehta (1999). "Differential fetal and maternal contributions to the cytokine milieu in a murine model of infection-induced preterm birth." Am J Obstet Gynecol **180**(2 Pt 1): 429-434.

Hirsch, E., Y. Filipovich and M. Mahendroo (2006). "Signaling via the type I IL-1 and TNF receptors is necessary for bacterially induced preterm labor in a murine model." Am J Obstet Gynecol **194**(5): 1334-1340.

Hirsch, E., V. M. Irikura, S. M. Paul and D. Hirsh (1996). "Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11008-11013.

Hirsch, E. and R. Muhle (2002). "Intrauterine bacterial inoculation induces labor in the mouse by mechanisms other than progesterone withdrawal." Biol Reprod **67**(4): 1337-1341.

Hirsch, E., I. Saotome and D. Hirsh (1995). "A model of intrauterine infection and preterm delivery in mice." Am J Obstet Gynecol **172**(5): 1598-1603.

Hirsch, E. and H. Wang (2005). "The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model." J Soc Gynecol Investig **12**(3): 145-155.

Howson, C. P., M. V. Kinney, L. McDougall, J. E. Lawn and G. Born Too Soon Preterm Birth Action (2013). "Born too soon: preterm birth matters." Reprod Health **10 Suppl 1**: S1.

Huang, H., T. Liu, J. L. Rose, R. L. Stevens and D. G. Hoyt (2007). "Sensitivity of mice to lipopolysaccharide is increased by a high saturated fat and cholesterol diet." J Inflamm (Lond) **4**: 22.

Hussain, S., J. R. Wright and W. J. Martin, 2nd (2003). "Surfactant protein A decreases nitric oxide production by macrophages in a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(4): 520-527.

Ilievski, V. and E. Hirsch (2010). "Synergy between viral and bacterial toll-like receptors leads to amplification of inflammatory responses and preterm labor in the mouse." Biol Reprod **83**(5): 767-773.

Ilievski, V., S. J. Lu and E. Hirsch (2007). "Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse." Reprod Sci **14**(4): 315-320.

Invivogen (2018). "RAW-Blue cells. Mouse Macrophage Reporter Cell Line. Version # 16I23-MM."

Jaiswal, M. K., V. Agrawal, S. Pamarthy, G. K. Katara, A. Kulshrestha, A. Gilman-Sachs, K. D. Beaman and E. Hirsch (2015). "Notch Signaling in Inflammation-Induced Preterm Labor." Sci Rep **5**: 15221.

Janssen, W. J., K. A. McPhillips, M. G. Dickinson, D. J. Linderman, K. Morimoto, Y. Q. Xiao, K. M. Oldham, R. W. Vandivier, P. M. Henson and S. J. Gardai (2008). "Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha." Am J Respir Crit Care Med **178**(2): 158-167.

Juarez, E., C. Nunez, E. Sada, J. J. Ellner, S. K. Schwander and M. Torres (2010). "Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes." Respir Res **11**: 2.

Kajikawa, S., N. Kaga, Y. Futamura, C. Kakinuma and Y. Shibutani (1998). "Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice." J Pharmacol Toxicol Methods **39**(3): 147-154.

Kalgutkar, A. S., B. C. Crews, S. W. Rowlinson, A. B. Marnett, K. R. Kozak, R. P. Remmel and L. J. Marnett (2000). "Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 925-930.

Kang, Y. and R. G. Luo (1998). "Chromatographic removal of endotoxin from hemoglobin preparations. Effects of solution conditions on endotoxin removal efficiency and protein recovery." J Chromatogr A **809**(1-2): 13-20.

Kao, K. Y. and J. G. Leslie (1977). "Polymorphism in human uterine collagen." Connect Tissue Res **5**(2): 127-129.

Kaul, A. K., S. Khan, M. G. Martens, J. T. Crosson, V. R. Lupo and R. Kaul (1999). "Experimental gestational pyelonephritis induces preterm births and low birth weights in C3H/HeJ mice." Infect Immun **67**(11): 5958-5966.

Kayaalp, O. (1997). Eikozanoidler (Araşidonik Asit Metabolitleri) ve Diğer Otakoidler: Siklooksijenaz Ürünleri (Prostaglandinler, Prostaglandin Ve Tromboksanlar). Tıbbi Farmakoloji Ankara, Feryal Matbaacılık: 2820-2842.

Kirschning, C. J., A. Unbehauen, G. Fiedler, W. Hallatschek, N. Lamping, D. Pfeil and R. R. Schumann (1997). "The transcriptional activation pattern of lipopolysaccharide binding protein (LBP) involving transcription factors AP-1 and C/EBP beta." Immunobiology **198**(1-3): 124-135.

Klein, L. L. and R. S. Gibbs (2004). "Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth." Am J Obstet Gynecol **190**(6): 1493-1502.

Kleissl, H. P., M. van der Rest, F. Naftolin, F. H. Glorieux and A. de Leon (1978). "Collagen changes in the human uterine cervix at parturition." Am J Obstet Gynecol **130**(7): 748-753.

Kota, S. K., K. Gayatri, S. Jammula, S. K. Kota, S. V. Krishna, L. K. Meher and K. D. Modi (2013). "Endocrinology of parturition." Indian J Endocrinol Metab **17**(1): 50-59.  
Kremlev, S. G. and D. S. Phelps (1994). "Surfactant protein A stimulation of inflammatory cytokine and immunoglobulin production." Am J Physiol **267**(6 Pt 1): L712-719.

Kudo, K., H. Sano, H. Takahashi, K. Kuronuma, S. Yokota, N. Fujii, K. Shimada, I. Yano, Y. Kumazawa, D. R. Voelker, S. Abe and Y. Kuroki (2004). "Pulmonary collectins enhance phagocytosis of Mycobacterium avium through increased activity of mannose receptor." J Immunol **172**(12): 7592-7602.

Kültürsay, N., O. Uygur and M. Yalaz (2014). "Yenidoğan döneminde sürfaktan kullanımı-bilenler, halen araştırılanlar, araştırılması gerekenler." Turkish Archives of Pediatric **1**(49): 1-12.

Lamont, R. F., C. L. Nhan-Chang, J. D. Sobel, K. Workowski, A. Conde-Agudelo and R. Romero (2011). "Treatment of abnormal vaginal flora in early pregnancy with clindamycin for the prevention of spontaneous preterm birth: a systematic review and metaanalysis." Am J Obstet Gynecol **205**(3): 177-190.

Laudisi, F., D. Di Fusco, V. Dinallo, C. Stolfi, A. Di Grazia, I. Marafini, A. Colantoni, A. Ortenzi, C. Alteri, F. Guerrieri, M. Mavilio, F. Ceccherini-Silberstein, M. Federici, T. T. MacDonald, I. Monteleone and G. Monteleone (2019). "The Food Additive Maltodextrin Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-Driven Mucus Depletion and Exacerbates Intestinal Inflammation." Cell Mol Gastroenterol Hepatol **7**(2): 457-473.

Lawn, J. E., S. Cousens, J. Zupan and T. Lancet Neonatal Survival Steering (2005). "4 million neonatal deaths: when? Where? Why?" Lancet **365**(9462): 891-900.

Lee, D. C., R. Romero, C. J. Kim, T. Chaiworapongsa, A. L. Tarca, J. Lee, Y. L. Suh, S. Mazaki-Tovi, E. Vaisbuch, P. Mittal, S. Draghici, O. Erez, J. P. Kusanovic, S. S. Hassan and J. S. Kim (2010). "Surfactant protein-A as an anti-inflammatory component in the amnion: implications for human pregnancy." J Immunol **184**(11): 6479-6491.

Leppert, P. C. (1995). "Anatomy and physiology of cervical ripening." Clin Obstet Gynecol **38**(2): 267-279.

Levi, F., C. Le Louarn and A. Reinberg (1985). "Timing optimizes sustained-release indomethacin treatment of osteoarthritis." Clin Pharmacol Ther **37**(1): 77-84.

LeVine, A. M. and J. A. Whitsett (2001). "Pulmonary collectins and innate host defense of the lung." Microbes Infect **3**(2): 161-166.

Liu, S. F., R. Newton, T. W. Evans and P. J. Barnes (1996). "Differential regulation of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat." Clin Sci (Lond) **90**(4): 301-306.

Liu, T., Q. Zhang, L. Liu, X. Xu, H. Chen, H. Wang, L. Kong, W. Wang, A. Zhang, Y. Cai, M. Li, L. Yu, J. Du, X. Wang, Q. Luo, Z. R. Lun, Y. Wang and J. Shen (2013). "Trophoblast apoptosis through polarization of macrophages induced by Chinese *Toxoplasma gondii* isolates with different virulence in pregnant mice." Parasitol Res **112**(8): 3019-3027.

Lopez-Collazo, E. and C. del Fresno (2013). "Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences." Crit Care **17**(6): 242.

Loudon, J. A., K. M. Groom and P. R. Bennett (2003). "Prostaglandin inhibitors in preterm labour." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **17**(5): 731-744.

M, H. (2013). "The surfactant system protects both fetus and newborn." Neonatology. **103**(4): 320-326.

MacIntyre, D. A., Y. S. Lee, R. Migale, B. R. Herbert, S. N. Waddington, D. Peebles, H. Hagberg, M. R. Johnson and P. R. Bennett (2014). "Activator protein 1 is a key terminal mediator of inflammation-induced preterm labor in mice." FASEB J **28**(5): 2358-2368.

Madhukaran, S. P., A. R. Koippallil Gopalakrishnan, H. Pandit, E. D. Marri, L. Kouser, K. Jamil, F. S. Alhamlan, U. Kishore and T. Madan (2016). "Expression of surfactant proteins SP-A and SP-D in murine decidua and immunomodulatory effects on decidual macrophages." Immunobiology **221**(2): 377-386.

Magalhaes, P. O., A. M. Lopes, P. G. Mazzola, C. Rangel-Yagui, T. C. Penna and A. Pessoa, Jr. (2007). "Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review." J Pharm Pharm Sci **10**(3): 388-404.

Magnanti, M., L. Giuliani, O. Gandini, P. Gazzaniga, V. Santemma, M. Ciotti, G. Saccani, L. Frati and A. M. Agliano (2000). "Follicle-stimulating hormone, testosterone, and hypoxia differentially regulate UDP-glucuronosyltransferase 1 isoforms expression in rat sertoli and peritubular myoid cells." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(3): 149-155.

Makiyan, Z. (2016). "New theory of uterovaginal embryogenesis." Organogenesis **12**(1): 33-41.

Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.

Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.

Matsumae, H., S. Minobe, K. Kindan, T. Watanabe, T. Sato and T. Tosa (1990). "Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine." Biotechnol Appl Biochem **12**(2): 129-140.

Meehan, A. P. (1984). Rats and Mice. Their Biology and Control. Tonbridge, UK, Rentokil Ltd.

Meis, P. J., M. Klebanoff, E. Thom, M. P. Dombrowski, B. Sibai, A. H. Moawad, C. Y. Spong, J. C. Hauth, M. Miodovnik, M. W. Varner, K. J. Leveno, S. N. Caritis, J. D. Iams, R. J. Wapner, D. Conway, M. J. O'Sullivan, M. Carpenter, B. Mercer, S. M. Ramin, J. M. Thorp, A. M. Peaceman, S. Gabbe, H. National Institute of Child and N. Human Development Maternal-Fetal Medicine Units (2003). "Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate." N Engl J Med **348**(24): 2379-2385.

Meng, J. P., S. Ceryak, Z. Aratsu, L. Jones, L. Epstein and B. Bouscarel (2006). "Biphasic regulation by bile acids of dermal fibroblast proliferation through regulation of cAMP production and COX-2 expression level." Am J Physiol Cell Physiol **291**(3): C546-554.

Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman and A. M. Hill (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." J Immunol **164**(12): 6166-6173.

Monguio-Tortajada, M., M. Franquesa, M. R. Sarrias and F. E. Borrás (2018). "Low doses of LPS exacerbate the inflammatory response and trigger death on TLR3-primed human monocytes." Cell Death Dis **9**(5): 499.

Monick, M. M., L. S. Powers, N. S. Butler and G. W. Hunninghake (2003). "Inhibition of Rho family GTPases results in increased TNF-alpha production after lipopolysaccharide exposure." J Immunol **171**(5): 2625-2630.

Montalbano, A. P., S. Hawgood and C. R. Mendelson (2013). "Mice deficient in surfactant protein A (SP-A) and SP-D or in TLR2 manifest delayed parturition and decreased expression of inflammatory and contractile genes." Endocrinology **154**(1): 483-498.

Murakami, S., D. Iwaki, H. Mitsuzawa, H. Sano, H. Takahashi, D. R. Voelker, T. Akino and Y. Kuroki (2002). "Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2." J Biol Chem **277**(9): 6830-6837.

Mussalli, G. M., R. Blanchard, S. R. Brunnert and E. Hirsch (1999). "Inflammatory cytokines in a murine model of infection-induced preterm labor: cause or effect?" J Soc Gynecol Investig **6**(4): 188-195.

Mussalli, G. M., S. R. Brunnert and E. Hirsch (2000). "Preterm delivery in mice with renal abscess." Obstet Gynecol **95**(3): 453-456.

Nagamatsu, T. and D. J. Schust (2010). "The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface." Reprod Sci **17**(3): 209-218.

Nandha, R., K. Sekhri and A. K. Mandal (2013). "To study the clinical efficacy and nephrotoxicity along with the risk factors for acute kidney injury associated with parenteral polymyxin B." Indian J Crit Care Med **17**(5): 283-287.

Nayak, A., E. Dodagatta-Marri, A. G. Tsolaki and U. Kishore (2012). "An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity." Front Immunol **3**: 131.

Norstrom, A., N. Vukas Radulovic, M. Bullarbo and E. Ekerhovd (2019). "Mast cell involvement in human cervical ripening." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **238**: 157-163.

Norton, M. E., J. Merrill, B. A. Cooper, J. A. Kuller and R. I. Clyman (1993). "Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor." N Engl J Med **329**(22): 1602-1607.

Nour, N. M. (2012). "Premature delivery and the millennium development goal." Rev Obstet Gynecol **5**(2): 100-105.



Offenbacher, S., V. Katz, G. Fertik, J. Collins, D. Boyd, G. Maynor, R. McKaig and J. Beck (1996). "Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight." J Periodontol **67**(10 Suppl): 1103-1113.

Oshima, H., K. Oguma, Y. C. Du and M. Oshima (2009). "Prostaglandin E2, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models." Cancer Sci **100**(10): 1779-1785.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-13771.

Pasula, R., J. R. Wright, D. L. Kachel and W. J. Martin, 2nd (1999). "Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis." J Clin Invest **103**(4): 483-490.

Pison, U., M. Max, A. Neuendank, S. Weissbach and S. Pietschmann (1994). "Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system." Eur J Clin Invest **24**(9): 586-599.

Quaas, L., A. Goppinger and H. P. Zahradnik (1987). "The effect of acetylsalicylic acid and indomethacin on the catecholamine- and oxytocin-induced contractility and prostaglandin (6-keto-PGF1 alpha, PGF2 alpha)-production of human pregnant myometrial strips." Prostaglandins **34**(2): 257-269.

Radtke, F., N. Fasnacht and H. R. Macdonald (2010). "Notch signaling in the immune system." Immunity **32**(1): 14-27.

Radulovic, N. V., E. Ekerhovd, G. Abrahamsson and A. Norstrom (2009). "Cervical priming in the first trimester: morphological and biochemical effects of misoprostol and isosorbide mononitrate." Acta Obstet Gynecol Scand **88**(1): 43-51.

Refuerzo, J. S., J. F. Alexander, F. Leonard, M. Leon, M. Longo and B. Godin (2015). "Liposomes: a nanoscale drug carrying system to prevent indomethacin passage to the fetus in a pregnant mouse model." Am J Obstet Gynecol **212**(4): 508 e501-507.

Reznikov, L. L., G. Fantuzzi, C. H. Selzman, B. D. Shames, H. A. Barton, H. Bell, J. A. McGregor and C. A. Dinarello (1999). "Utilization of endoscopic inoculation in a mouse model of intrauterine infection-induced preterm birth: role of interleukin 1beta." Biol Reprod **60**(5): 1231-1238.

Rinaldi, S. F., S. Makieva, L. Frew, J. Wade, A. J. Thomson, C. M. Moran, J. E. Norman and S. J. Stock (2015). "Ultrasound-guided intrauterine injection of lipopolysaccharide as a novel model of preterm birth in the mouse." Am J Pathol **185**(5): 1201-1206.

Roberts, K. D., M. A. Azad, J. Wang, A. S. Horne, P. E. Thompson, R. L. Nation, T. Velkov and J. Li (2015). "Antimicrobial Activity and Toxicity of the Major Lipopeptide

Components of Polymyxin B and Colistin: Last-line Antibiotics against Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria." ACS Infect Dis **1**(11): 568-575.

Romero, R., S. K. Dey and S. J. Fisher (2014). "Preterm labor: one syndrome, many causes." Science **345**(6198): 760-765.

Romero, R., R. Gomez, M. Galasso, M. Mazor, S. M. Berry, R. A. Quintero and D. B. Cotton (1994). "The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic fluid compartments: the effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection." Am J Obstet Gynecol **171**(4): 912-921.

Royle, M. C., S. Totemeyer, L. C. Alldridge, D. J. Maskell and C. E. Bryant (2003). "Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live *Salmonella typhimurium* is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses." J Immunol **170**(11): 5445-5454.

Rudolph, M. I., I. G. Rojas and A. B. Penissi (2004). "Uterine mast cells: a new hypothesis to understand how we are born." Biocell **28**(1): 1-11.

Sakata, M., T. Kawai, K. Ohkuma, H. Ihara and C. Hirayama (1993). "Reduction of endotoxin contamination of various crude vaccine materials by gram-negative bacteria using aminated poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate) spherical particles." Biol Pharm Bull **16**(11): 1065-1068.

Salminen, A., R. Vuolteenaho, R. Paananen, M. Ojaniemi and M. Hallman (2011). "Surfactant protein A modulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response related to preterm birth." Cytokine **56**(2): 442-449.

Sangha, R. K., J. C. Walton, C. M. Ensor, H. H. Tai and J. R. Challis (1994). "Immunohistochemical localization, messenger ribonucleic acid abundance, and activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in placenta and fetal membranes during term and preterm labor." J Clin Endocrinol Metab **78**(4): 982-989.

Saohin, W. (1997). Studies on the stability and activity of polymyxin B solutions Doctor of Philosophy Thesis, Robert Gordon University.

Sato, M., H. Sano, D. Iwaki, K. Kudo, M. Konishi, H. Takahashi, T. Takahashi, H. Imaizumi, Y. Asai and Y. Kuroki (2003). "Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A." J Immunol **171**(1): 417-425.

Scanlon, S. T., T. Milovanova, S. Kierstein, Y. Cao, E. N. Atochina, Y. Tomer, S. J. Russo, M. F. Beers and A. Haczku (2005). "Surfactant protein-A inhibits *Aspergillus fumigatus*-induced allergic T-cell responses." Respir Res **6**: 97.

Schweisguth, F. (2004). "Regulation of notch signaling activity." Curr Biol **14**(3): R129-138.

- Seo, M. J. and D. K. Oh (2017). "Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis." Prog Lipid Res **66**: 50-68.
- Sessa, A., P. M. Allaria, F. Conte, A. Cioffi and G. D'Amico (1973). "Ultrastructural changes of the glomeruli of the rat induced by indomethacin." Nephron **10**(4): 238-245.
- Shah, P. L., D. Hansell, P. R. Lawson, K. B. Reid and C. Morgan (2000). "Pulmonary alveolar proteinosis: clinical aspects and current concepts on pathogenesis." Thorax **55**(1): 67-77.
- Shim, S. S., R. Romero, J. S. Hong, C. W. Park, J. K. Jun, B. I. Kim and B. H. Yoon (2004). "Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes." Am J Obstet Gynecol **191**(4): 1339-1345.
- Shynlova, O., T. Nedd-Roderique, Y. Li, A. Dorogin and S. J. Lye (2013). "Myometrial immune cells contribute to term parturition, preterm labour and post-partum involution in mice." J Cell Mol Med **17**(1): 90-102.
- Sieling, P. A. and R. L. Modlin (2002). "Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders." Curr Opin Microbiol **5**(1): 70-75.
- Sigma-Aldrich (2018). "Lipopolysaccharides from Escherichia coli O111:B4.Description."
- Silver, R. M., S. S. Edwin, M. S. Trautman, D. L. Simmons, D. W. Branch, D. J. Dudley and M. D. Mitchell (1995). "Bacterial lipopolysaccharide-mediated fetal death. Production of a newly recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide." J Clin Invest **95**(2): 725-731.
- Smith, J. and E. A. DeFranco (2015). "Tocolytics used as adjunctive therapy at the time of cerclage placement: a systematic review." J Perinatol **35**(8): 561-565.
- Snegovskikh, V. V., V. Bhandari, J. R. Wright, S. Tadesse, T. Morgan, C. Macneill, N. Foyouzi, J. S. Park, Y. Wang and E. R. Norwitz (2011). "Surfactant protein-A (SP-A) selectively inhibits prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) production in term decidua: implications for the onset of labor." J Clin Endocrinol Metab **96**(4): E624-632.
- Sones, J. L. and R. L. Davisson (2016). "Preeclampsia, of mice and women." Physiol Genomics **48**(8): 565-572.
- Sotiriadis, G., E. Dodagatta-Marri, L. Kouser, F. S. Alhamlan, U. Kishore and E. Karteris (2015). "Surfactant Proteins SP-A and SP-D Modulate Uterine Contractile Events in ULTR Myometrial Cell Line." PLoS One **10**(12): e0143379.
- Speroff, L., R. H. Glass and N. G. Kase (1994). Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Prostaglandins. Williams and Wilkins, 5 th Ed. 291 – 317.

Sprinzak, D., A. Lakhanpal, L. Lebon, L. A. Santat, M. E. Fontes, G. A. Anderson, J. Garcia-Ojalvo and M. B. Elowitz (2010). "Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states." *Nature* **465**(7294): 86-90.

Steinberg, T. H. (2009). *Methods in Enzymology. Protein Gel Staining Methods: An Introduction and Overview*. **Volume 463**: 546.

Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* **11**(4): 443-451.

Thamlikitkul, V., Y. Dubrovskaya, P. Manchandani, T. Ngamprasertchai, A. Boonyasiri, J. T. Babic and V. H. Tam (2017). "Dosing and Pharmacokinetics of Polymyxin B in Patients with Renal Insufficiency." *Antimicrob Agents Chemother* **61**(1).

ThermoFisher. (2018). "User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit." from [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf).

Timmons, B. C., J. Reese, S. Socrate, N. Ehinger, B. C. Paria, G. L. Milne, M. L. Akins, R. J. Auchus, D. McIntire, M. House and M. Mahendroo (2014). "Prostaglandins are essential for cervical ripening in LPS-mediated preterm birth but not term or antiprogestin-driven preterm ripening." *Endocrinology* **155**(1): 287-298.

Tonby, K., I. Wergeland, N. V. Lieske, D. Kvale, K. Tasken and A. M. Dyrhol-Riise (2016). "The COX- inhibitor indomethacin reduces Th1 effector and T regulatory cells in vitro in Mycobacterium tuberculosis infection." *BMC Infect Dis* **16**(1): 599.

Traub, W. H. and B. Leonhard (1995). "Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents." *J Antimicrob Chemother* **35**(1): 149-154.

van den Akker, F., K. R. Vrijssen, J. C. Deddens, J. W. Buikema, M. Mokry, L. W. van Laake, P. A. Doevendans and J. P. G. Sluijter (2018). "Suppression of T cells by mesenchymal and cardiac progenitor cells is partly mediated via extracellular vesicles." *Heliyon* **4**(6): e00642.

Van Iwaarden, J. F., J. C. Pikaar, J. Storm, E. Brouwer, J. Verhoef, R. S. Oosting, L. M. van Golde and J. A. van Strijp (1994). "Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides." *Biochem J* **303** ( Pt 2): 407-411.

Vanderhoeven, J. P., C. J. Bierle, R. P. Kapur, R. M. McAdams, R. P. Beyer, T. K. Bammler, F. M. Farin, A. Bansal, M. Spencer, M. Deng, M. G. Gravett, C. E. Rubens, L. Rajagopal and K. M. Adams Waldorf (2014). "Group B streptococcal infection of the choriodecidual induces dysfunction of the cyokeratin network in amniotic epithelium: a pathway to membrane weakening." *PLoS Pathog* **10**(3): e1003920.

Varayoud, J., J. G. Ramos, V. L. Bosquiazzo, M. Munoz-de-Toro and E. H. Luque (2004). "Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy." Reproduction **127**(3): 379-387.

Vermillion, S. T. and C. N. Landen (2001). "Prostaglandin inhibitors as tocolytic agents." Semin Perinatol **25**(4): 256-262.

Vieira, F., J. W. Johannes W.Kung and F. Bhatti (2017). "Structure, genetics and function of the pulmonary associated surfactant proteins A and D: The extra pulmonary role of these C type lectins." Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger **211**: 184-201.

Warner, T. D., F. Giuliano, I. Vojnovic, A. Bukasa, J. A. Mitchell and J. R. Vane (1999). "Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7563-7568.

Weber, C., B. Henne, F. Loth, M. Schoenhofen and D. Falkenhagen (1995). "Development of cationically modified cellulose adsorbents for the removal of endotoxins." ASAIO J **41**(3): M430-434.

Wenstrom, K. D., W. W. Andrews, J. C. Hauth, R. L. Goldenberg, M. B. DuBard and S. P. Cliver (1998). "Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery." Am J Obstet Gynecol **178**(3): 546-550.

White, R. T., D. Damm, J. Miller, K. Spratt, J. Schilling, S. Hawgood, B. Benson and B. Cordell (1985). "Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene." Nature **317**(6035): 361-363.

WHO (2012). "The Global Action Report on Preterm Birth." **Born to Soon**.

Willcockson, A. R., T. Nandu, C. L. Liu, S. Nallasamy, W. L. Kraus and M. Mahendroo (2018). "Transcriptome signature identifies distinct cervical pathways induced in lipopolysaccharide-mediated preterm birth." Biol Reprod **98**(3): 408-421.

Winkler, C. and J. M. Hohlfeld (2013). "Surfactant and allergic airway inflammation." Swiss Med Wkly **143**: w13818.

Wright, J. R. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." Nat Rev Immunol **5**(1): 58-68.

Xu, D. X., H. Wang, L. Zhao, H. Ning, Y. H. Chen and C. Zhang (2007). "Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor." Toxicology **234**(3): 167-175.

Yong, Z., W. D. Sacher, Y. Huang, J. C. Mikkelsen, Y. Yang, X. Luo, P. Dumais, D. Goodwill, H. Bahrami, P. G. Lo, E. Bernier and J. K. Poon (2017). "U-shaped PN

junctions for efficient silicon Mach-Zehnder and microring modulators in the O-band." Opt Express **25**(7): 8425-8439.

Yoon, B. H., S. Y. Oh, R. Romero, S. S. Shim, S. Y. Han, J. S. Park and J. K. Jun (2001). "An elevated amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 level at the time of mid-trimester genetic amniocentesis is a risk factor for spontaneous preterm delivery." Am J Obstet Gynecol **185**(5): 1162-1167.

Yoon, B. H., R. Romero, J. B. Moon, S. Y. Oh, S. Y. Han, J. C. Kim and S. S. Shim (2001). "The frequency and clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with a positive cervical fetal fibronectin." Am J Obstet Gynecol **185**(5): 1137-1142.

Zavascki, A. P., L. Z. Goldani, J. Li and R. L. Nation (2007). "Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review." J Antimicrob Chemother **60**(6): 1206-1215.

Zhang, J., Y. Gong and Y. Yu (2010). "PG F(2alpha) Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease." Front Pharmacol **1**: 116.

Zuckerman, H., E. Shalev, G. Gilad and E. Katzuni (1984). "Further study of the inhibition of premature labor by indomethacin. Part I." J Perinat Med **12**(1): 19-23.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Sema	Uyruğu	T.C
Soyadı	AVCI	e-posta	sema.avci@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum				Mezuniyet yılı
Lisans/Yüksek Lisans	Cumhuriyet Mikrobiyoloji	Ünv.	Tıbbi	2007
Doktora				

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Şube Müdürü	T.C Sağlık Bakanlığı /İl Sağlık Müdürlüğü	2010

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	72

### Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
İnsan Serviks Dokusunda Misoprostol İndüksiyonu Notch Sinyal Yolağı Reseptör ve Ligand Ekspresyonlarını Değiştirir	TUBİTAK-3001	14 Ay

### Burslar-Ödüller:

1. Servikte Notch Sinyalizasyonu Üzerinde İndometazin ile Surfaktan-A'nın Rolünün Belirlenmesi ve Preterm Doğumun Önlenmesi - TUBİTAK 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Burs Programı-2017/2-12 Ay

## Yayınlar :

1. Avcı S, Simsek M, Soylu H, Ustunel I. Misoprostol-Induced Modification of the Notch Signaling Pathway in the Human Cervix. Reprod Sci. 2018
2. Acar N, Parlak H, Ozkan A, Soylu H, Avcı S, Ustunel I, Izgut-Uysal VN, Agar A. The effect of docosahexaenoic acid on apelin distribution of nervous system in the experimental mouse model of Parkinson's disease. Tissue Cell. 2019
3. Izgut-Uysal VN, Acar N, Birsen I, Ozcan F, Ozbey O, Soylu H, Avcı S, Tepekoy F, Akkoyunlu G, Yucel G, Ustunel I. Apelin-APJ system is responsible for stress-induced increase in atrial natriuretic peptide expression in rat heart. Tissue Cell. 2018
4. Aslaner A, Çakır T, Tekeli SÖ, Avcı S, Doğan U, Tekeli F, Soylu H, Akyüz C, Koç S, Üstünel İ, Yılmaz N. Medical ozone treatment ameliorates the acute distal colitis in rat. Acta Cir Bras. 2016
5. Çakır T, Aslaner A, Tekeli SÖ, Avcı S, Doğan U, Tekeli F, Soylu H, Akyüz C, Koç S, Üstünel İ, Yılmaz N. Effect of ozone on colon anastomoses in rat peritonitis model. Acta Cir Bras. 2016
6. Avcı H, Pehlivan E, Avcı S, Selçuk E.B. Evaluation of Control Monitoring Results in Drinking Water from Aspect of Public Health in Malatya Province. J Turgut Ozal Med. Cent 2014.
7. Hülya Elbe, Feral Öztürk, Elif Taşlıdere, Aslı Çetin, Zümrüt Doğan, Sema Avcı, Yusuf Türköz. Therapeutic Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cape) In Streptozotocin- Induced Diabetic Pancreas Damage In Wistar Albino Rats. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi 2015
8. Avcı S, Bakıcı Z, Erandaç M. A Research on Drinking Water in Tokat in Terms of Coliform Bacteria. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2006.



## **Bildiriler:**

1. **Sema Avcı**, Hakan Soylu, Nuray Acar, Özlem Özbey, Münevver Kahraman, Ender Terzioğlu, İsmail Üstünel. *The Relation Between Mast Cells and Notch Signalization In The Salivary Glands of Patients Diagnosed With Sjogren's Syndrome*. International Court XIII. National Histology and Embryology Congress 30 April - 3 May 2016, Izmir, **Oral Presentation**.
2. **Sema Avcı**, Ilknur Birsen, Ayşe Ozkan, Hande Parlak, Hakan Soylu, Leyla Kilinc, Aysel Agar, V. Nimet Izgut Uysal, Ismail Ustunel. The Effect of Docosahexaenoic Acid on TNF- $\alpha$  Level and Mast Cell Number in the Stomach of Mice in 1-Methyl 4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine – Induced Parkinson's Disease. 10.5505/2017ichc. PP-212
3. Hakan Soylu, Mustafa Kirca, **Sema Avcı**, Leyla Kilinc, Ozlem Ozbey Unlu, Nuray Acar, Akin Yesilkaya, Ismail Ustunel. Effects of Abirateron Acetate and Docetaxel Therapy on Notch1, Jagged1 and Hes1 Expressions in Human Prostate Cancer Cell Lines. 10.5505/2017ichc.PP-134
4. Nuray Acar, Hakan Soylu, **Sema Avcı**, İsmail Üstünel. Expressions of Fbw7 and Hey2 on mice uterus and implantation sites during different pregnancy days. International Court XIII. National Histology and Embryology Congress 30 April - 3 May 2016, Izmir.
5. Hakan Soylu, **Sema Avcı**, Nuray Acar, Özlem Özbey Ünlü, İbrahim Türker Köksal, Betül Ünal, Akif Çiftçioğlu, İsmail Üstünel. Determination of Immunohistochemical localizations of Notch pathway members in normal, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and malignant prostate tissues. International Court XIII. National Histology and Embryology Congress 30 April - 3 May 2016, Izmir.