

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**KEDİ EPİDİDİMİS'İNDE TOLL-BENZERİ RESEPTÖR
PROTEİNLERİNİN LOKALİZASYONLARI VE EKSPRESYONLARI**

Proje No: TSA-2014-5190

Proje Türü: Normal Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
PROF. DR. NARİN LİMAN
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Araştırmacının Adı Soyadı
YRD. DOÇ. DR. EMEL ALAN
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Araştırmacının Adı Soyadı
DOÇ. DR. NUSRET APAYDIN
VETERİNER FAKÜLTESİ
CERRAHİ ANABİLİM DALI

EYLÜL 2016

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5–6
ABSTRACT	7–8
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	9–12
2. GENEL BİLGİLER	13–22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23–27
4. BULGULAR	28–45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46–55
6. KAYNAKLAR	56–64

TEŞEKKÜR

“Kedi epididimisinde Toll-benzeri reseptör proteinlerinin lokalizasyonları ve ekspresyonları” başlıklı ve TSA-2014-5190 nolu projeyi destekleyen ERÜ BAP Koordinasyon Birimi’ne teşekkürlerimizi sunarız.

ÖZET

Toll benzeri reseptörler (TLR) kalıp tanıma reseptörleri (PRR)'nin bir ailesi olup, bakteri, virüs, mantar ve parazitlerde bulunan farklı patojenle ilişkili moleküler yapıları (PAMPS) tanırlar. Epididimis ve vaz deferens (VD) içinde olgunlaşan ve taşınan spermiyumların mikroorganizmalardan korunması üreme fizyolojisi çalışmalarının önemli bir yönü olmasına rağmen, erkek evcil hayvanların üreme sisteminde TLR'nin ekspresyonları yeterince araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, kedi epididim ve VD'sinde TLR proteinlerinden TLR2, 4, 5 ve 9'un eksprese edilip edilmediğini ve bu reseptörlerin epididimisin kaput, korpus ve kauda segmentleri ve bölümlerindeki ekspresyon ve lokalizasyonlarını immünohistokimya (IHC) ve western blot (WB) analizleri ile ortaya koymaktır. WB analizi epididimisin tüm segmentlerde TLR2, 4, 5 ve 9 proteinlerinin nispeten eşit düzeylerde olduğunu, ancak VD içinde TLR2 ve TLR4 protein düzeylerinin kaput segmentininkine göre anlamlı ölçüde yüksek olduğunu gösterdi ($p < 0.05$). Bununla birlikte, IHC sonuçları epididimal kanalı ve VD'de bölge ve hücreye özgü immunboyanmaların olduğunu ortaya koydu. Tüm epididimal segmentler ile VD epitelindeki principal hücrelerin sitoplazmaları TLR4, TLR5 ve TLR9 için zayıf boyanma sergilerken, TLR4 için bu hücrelerin sterosilyumları zayıf (bölüm I, II, and III), negatif (bölüm IV and V) ve kuvvetli (bölüm VI and VD) boyanmalar gösterdi. TLR2 immunreaksiyonunun prinsipal hücrelerin supranükleer sitoplazma bölgelerinde yerleştiği ve bölüm I, II ve III'de kuvvetli, bölüm IVV, V, VI ve VD'de orta derecede olduğu belirlendi. Bazal hücreler farklı epididim segmentlerinde ve VD içinde sadece TLR2 ve TLR9 için yoğun immünreaksiyon gösterdi. Damarların endotel ve düz kas hücrelerinde tüm TLR'i için pozitif reaksiyonlar tespit edildi. Peritübüler düz kas hücreleri TLR4 ve TLR9 için orta, TLR2 ve TLR5 için zayıf immunoreaktivite sergiledi. Tüm TLR'i için immunreaksiyonlar epididimal olgunlaşma sürecindeki spermiyumların kuyruk,

proksimal veya distal sitoplazmik damlacıklarında tespit edildi. Bu sonuçlar TLR'nin sadece epididim, VD ve spermium korunması açısından değil, aynı zamanda epididimide spermiyumların dölleme yeteneği ve motilite kazanarak olgunlaşması ve VD'de taşınması ve depolaması için önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Toll-benzeri reseptör, epididimis, Vaz deferens, evcil kedi

ABSTRACT

Toll-like receptor (TLRs) family, which is one of the pattern-recognition receptors (PPRs), recognize different pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) present in bacteria, viruses, yeasts and parasites. Although protecting maturing and transporting of spermatozoa in the epididymis and vas deferens from microbial damage is an emerging aspect of research in reproductive physiology, the study of TLR expression in the reproductive system of male domestic animals has been poorly investigated. The aim of this study was to determine if the epididymis and vas deferens of cat express TLR proteins, to characterize expression and localization patterns for TLR2, 4, 5, and 9 in the vas deferens (VD) and the caput, corpus and cauda segments and regions of epididymis using immunohistochemistry and western blotting. Immunoblot analysis revealed relatively equal levels of protein for TLRs 2, 4, 5, and 9 in all segments of the epididymis, but the protein levels of TLR2 and TLR4 in the VD was significantly higher than that of the caput segment ($P < 0.05$). However, immunostainings showed region- and cell-specific localization in the epididymal duct and VD. The cytoplasm of principal cells of the all epididymal segments and VD displayed weak immunostaining for TLR4, 5 and 9, while immunostaining for TLR4 in their stereocilia was weak (regions I, II, and III), negative (regions IV and V) and intense (region VI and VD). Immunostaining for TLR2 protein expression was localized in the supranuclear cytoplasm of principal cells and was intense (regions I, II, and III) and moderate (regions IV, V VI and VD). Basal cells showed intense immunostaining for TLR2 and TLR9 in different epididymal segments and VD. Intense immunostaining for all TLRs was found respectively in the endothelium and smooth muscle cells of blood vessels. The peritubular smooth muscle cells displayed moderate (for TLR2 and TLR5) and weak (for TLR4 and TLR9) immunoreactivity. TLRs were detected on the tail, proximal or cytoplasmic droplets of spermatozoa during

epididymal maturation. These results suggest that TLRs might be of importance not only for the protection of the epididymis, VD and spermium, but also for maturation in sperm motility and fertility in the epidididymis and for sperm transport and storage in the VD.

Key words: Toll-like receptor, epididymis, vas deferens, domestic cat

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Epididimis testiste üretilmiş olan spermatozoonların transportu, olgunlaşması ve depolanmasından sorumlu androjen bağımlı bir tubuler organdır (Orgebin-crist, 1967; Robaire et al. 2006). Testis ve vas deferens arasındaki bağlantıyı sağlayan epididimisin duvar yapısı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile bunu kuşatan tek katlı sirküler seyirli düz kas hücrelerinden oluşur. Epididimisi örten epitel prinsipal, apikal, bazal hücreler vs gibi farklı hücre tiplerini içerir. Bu hücre tiplerinin morfoloji ve miktarlarındaki farklılıklar epididimisin yapısal olarak farklı bölgelere (kaput, korpus ve kauda) ayrılmasına neden olur (Robaire et al. 2006) ve bu hücreler epididimis fonksiyonunda önemli rol oynarlar. İlk olarak, epitel hücreleri spermatozoonların transportunda epididimisin spontan kontraksiyonları için gereklidirler (Mewe et al. 2006). İkinci olarak epitelin emilim, sekresyon, sentez ve metabolik fonksiyonları spermatozoonun hareket ve fertilizasyon kapasitesi kazanımı için uygun bir luminal ortam oluşturur (Hinton and Palladino, 1995; Turner, 1991). Epitel hücrelerinin üçüncü ve en önemli fonksiyonu patojenleri inaktive etmek ve uzaklaştırmak ve böylece patojen invazyonundan epididimisi koruyarak epididimitisi önlemektir.

Diğer organ ve sistemlerdeki epitel hücrelerine benzer olarak epididimisi örten epitel hücrelerinin de defensin, musin, katyonik antimikrobiyal protein 18, lipopolisakkarid bağlayan protein ve sperm antijen 11 gibi çeşitli antimikrobiyal peptid ve proteinleri eksprese ettikleri ve salgıladıkları bilinmektedir. Bu efektör moleküller antimikrobiyal aktivasyon aracılığıyla işgalci patojenlere karşı spermatozoonları koruyarak konak savunmasında önemli rol oynamaktadırlar (Hall et al. 2002; Russo et al. 2006; Com et al. 2003; Yamaguchi et al. 2002; Yenugu, et al. 2004; Malm et al. 2000).

Epididimisin hem idiyopatik ve hem de non-infeksiyöz nedenlerle inflamasyona açık bir organ olduğu bilinmektedir. Erkek üreme organlarının ve spermatozoonların testiste üretilme aşamalarında ve takiben epididimide olgunlaşma, taşınma ve depolanma

süreçlerinde mikrobiyel ajanlara karşı korunması erkek üreme fizyolojisi açısından oldukça önemlidir (Haidl et al., 2008; Tracy et al., 2008). *Chlamydia trachomatis* (Zdrodowska-Stefanow et al., 2000) ve *Escherichia coli* (Kang et al., 2006) infeksiyonları testiste inflamasyon ve epididimal kanalların tıkanmasına neden olan akut ve kronik epididimitis oluştururlar. Epididimitis oluşturan diğer patojenler arasında *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Brucella mellitensis*, *Mycoplasma* türleri ve *Ureaplasma urealyticum* ve çok sayıda virus sayılabilir (Tracy et al., 2008; Luzzi and O'Brien, 2001; Hagley, 2003; Navarro-Martinez et al., 2001). Epididimisin yangısı olarak tanımlanan epididimitis, epitelin rejeneratif yeteneğinin bulunmamasından ötürü bozulmuş fertilite ve kalıcı steriliteye neden olabilir (Dohle et al., 2005). Bilindiği üzere yangı (inflamasyon) dokunun her türlü canlı, cansız yabancı etkene veya içsel/dışsal doku hasarına verdiği sellüler (hücresel), humoral (sıvısal) ve vasküler (damarsal) bir seri biyolojik yanıtı içine alır. Yangıda ilk olarak konakçının infeksiyonun yayılmasını sınırlaması ve hızlı bir cevap oluşturması gerekir ki, bu invaze olan patojenlerin tanınması ile sağlanır. Potansiyel patojenik mikroorganizmaların tanınması, Toll-benzeri reseptörleri (TLR) de içine alan patojenleri tanıyan reseptörler (PRR) olarak bilinen hücresel reseptörler sınıfının önemli bir fonksiyonudur. TLR Interleukin 1 reseptör (IL-1R) süper ailesinin bir üyesi olup, doğuştan gelen bağışıklıkta sensörler olarak önemli rol oynayan bir protein sınıfıdır (Medzhitov, 2001). TLR nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, dentritik hücreler, dermal endotel hücreleri, mast hücreleri ve mukoza epitel hücrelerini içine alan konakçı savunmasında birincil fonksiyona sahip olan hücrelerde bulunurlar (Muzio et al. 2000; Underhill 2003). Bu hücreler endotoksin, peptidoglikan, flagellin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyel komponentleri TLR aracılığıyla tanırırlar. (Underhill and Ozinsky, 2002; Takeda, et al. 2003). TLR'in fonksiyonu mikroorganizmaların varlığında immun sistemi uyarmak, immun sistem hücrelerinin antimikrobiyal öldürme mekanizmalarını ve antijen

sunma kapasitelerini artırmaktır. TLR ailesinin farklı üyeleri aktive edilen hücre tipine bağlı olarak tümör nekrozis faktör- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) ve IL'leri (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) içeren sitokinleri, şemokinler ve effektör moleküller (CD80, CD86 ve CD40) gibi çeşitli yangı öncesi moleküllerin üretimine neden olarak doğal ve adaptif immun sistem arasında bağ kurar (Schaefer et al., 2004). TLR ekspresyonu sadece bu hücre tipleri ile sınırlı değildir; adrenal bez, testis, timus, karaciğer, dalak gibi organların yanı sıra, gastrointestinal sistem, trakeya ve akciğer gibi dış ortamlarla ilişkili olan dokularda da yüksek miktarlarda ekspresedirler (Zarembek and Godowski, 2002). Epididimide de çeşitli TLR 'nin eksprese edildikleri ve TLR'nin epididimal kanalda spermatozonların korunmasında önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Palladino et al., 2008; Palladino et al., 2007; Zhao et al., 2008; Zhang et al., 2012; Anastasiadou et al., 2013). Ancak bugüne kadar sınırlı sayıda çalışma yapılmış olup bu çalışmalarda da hayvan modeli olarak sıçan (Palladino et al., 2008; Palladino et al., 2007; Zhao et al., 2008) ve horoz (Anastasiadou et al., 2011; Zhang et al., 2012; Anastasiadou et al., 2013) kullanılmıştır. İnsanların epididimisinde TLR ekspresyonunu gösteren sadece bir çalışma bulunmaktadır (Saeidi et al., 2013). Kedileri de içine alan evcil memelilerin epididimislerinde TLR ekspresyon ve lokalizasyonunu gösteren ve epididimisin immünolojisine ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Morfolojik olarak kaput, korpus ve kauda bölümlerine ayrılan epididimisin hayvan türlerine göre farklılıklar gösteren ve bağdoku bölmeleriyle de sınırlanan intraregional segmentlere de ayrıldığı ve bu segmentlerin her birinin farklı gen ekspresyon örnekleri sergiledikleri bilinmektedir (Turner et al., 2003; Jelinsky et al., 2007). Hücre ve region spesifik gen ekspresyonu epididimal hücreler tarafından salgılanan luminal sıvının transportu, salgılanması ve emilimini etkilediği kadar, epididimis boyunca spermiyumun olgunlaşması ve korunmasını sağlayan bu luminal sıvının bileşiminde de önemli değişikliklere neden olmaktadır (Turner, 1991; Cornwall and Hann, 1995; Dacheux et al., 2003; Shum et al.,

2009). Kedilerde epididimisi oluşturan duktus epididimisin yapısal özelliklerine göre 6 bölüme (regiyon) ayrıldığı ve her bir bölümün aynı zamanda farklı fonksiyonlar üstlendiği ortaya konmuştur. Kedi epididimisinde bölüm I ve IV lumenden sıvı Emilimi ile spermatozoon olgunlaşmasında aktif rol üstlenirken, bölüm V ve VI'nın spermatozoonların depolanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Axnér et al., 1999; Axner, 2006).

Çalışmamızın hipotezi kedi epididimisinde yapısal ve fonksiyonel açıdan farklı olan epididimis bölümlerinde doğal bağışıklığın önemli sensör molekülleri olan TLR'nin farklı ekspresyon ve lokalizasyon örnekleri sergileyebileceğidir. Buradan yola çıkılarak hazırlanan bu çalışmanın amacı sağlıklı kedilerin epididimislerinde TLR'lerinden TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un lokalizasyonları ile ekspresyonlarında epididimis bölümlerine bağlı olası farklılıkların belirlenerek spermin korunmasında hangi TLR proteininin daha etkin olduğunu ortaya koymak ve bu bağlamda kedi epididimisinin immüno-fizyolojik profiline ışık tutacak veriler elde etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

TLR'leri farklı patojenlere karşı doğal immun yanıtı başlatan anahtar moleküllerdir (Pandey and Agrawal, 2006). Bu reseptörler ayrıca enfeksiyona karşı kazanılmış immun yanıtı da düzenlerler (Pasare and Medzhitov, 2004). Toll-like reseptörler (TLR) bakteriyel, fungal ve viral patojenler tarafından üretilen PAMP'ları tanıma yeteneğinde olan transmembran proteinlerdir. TLR'in fonksiyonu mikroorganizmaların varlığında immun sistemi uyarmak, immun sistem hücrelerinin antimikrobiyal öldürme mekanizmalarını ve antijen sunma kapasitelerini artırmaktır (Takeda et al. 2003; Takeda and Akira, 2005).

TLR, IL-1R süper ailesinin bir üyesi olup amino asit sıralarında benzerlikler ve intrasellüler sinyallerine göre beş alt aileye ayrılır: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR9'dur. TLR2 alt ailesi TLR1, TLR2, TLR6 ve TLR10'dan oluşur. TLR9 alt ailesi ise TLR7, TLR8 ve TLR9'dan oluşmaktadır (Armant and Fenton, 2002). TLR ailesinin farklı üyeleri aktive edilen hücre tipine bağlı olarak, tümör nekrozis faktör- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) ve interleükinleri (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) içeren sitokinler, şemokinler ve efektör moleküller (CD80, CD86 ve CD40) gibi çeşitli proinflamatuar moleküllerin üretimine neden olarak doğal ve adaptif immun sistem arasında bağ kurarlar (Werling and Jungi 2003; Pasare and Medzhitov, 2004).

İnsanlarda 11 adet TLR tipi tanımlanmıştır ve bu reseptörler koyun hariç fare, tavuk, domuz, sığır, kedi ve köpek gibi çeşitli türlerde klonlanmıştır. TLR1-9 fare ve insanda homolog olduğu halde, insan genomu TLR10'a sahiptir, fakat TLR11, 12 ve 13 bulunmaz. Oysa fare genomu TLR11, 12 ve 13'e sahiptir, ancak TLR10 içermez (Armant and Fenton, 2002). Bakteriyel ve diğer mikrobiyal hücre duvarı komponentlerini tanıyan TLR1, 2, 4, 5 ve 6 ve 10 hücre yüzeyinde bulunurken, bakteri ve virusların nükleotid komponentlerini tanıyan TLR3, 7, 8 ve 9 sitoplazmik organellerde özellikle de endozomlarda intrasellüler olarak bulunur (Dunne and O'Neill 2005). TLR nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, dentritik hücreler,

dermal endotel hücreleri, mast hücreleri ve mukoza epitel hücrelerini içine alan konakçı savunmasında birincil fonksiyona sahip olan hücrelerde bulunurlar (Muzio et al. 2000; Underhill 2003). Bu hücreler endotoksin, peptidoglikan, flagellin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyal komponentleri TLR aracılığıyla tanırırlar. (Underhill and Ozinsky, 2002; Takeda, et al. 2003). TLR ekspresyonu sadece bu hücre tipleri ile sınırlı değildir; adrenal bez, testis, timus, karaciğer, dalak gibi organların yanısıra gastrointestinal sistem, trakeya ve akciğer gibi dış ortamlarla ilişkili olan dokularda da yüksek miktarlarda ekspresedirler (Zarembler and Godowski, 2002).

TLR1 84 kDa moleküler ağırlığında olup makrofajlar, dendritik hücreler, polimorf nükleer lökositler, NK hücreler, B- ve T-lenfositler gibi hücreler ile özellikle monositlerde eksprese olurlar. Doku olarak ise; böbrek, akciğer ve dalakta eksprese edilir. TLR1 seviyesi, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerle temastan etkilenmez. Canlı ortam dışında hem monositler hem de granülositler, Gram-negatif bakterilere maruz kalındığında TLR1 ekspresyonuna zıt yönde etki yapar (Zarembler and Godowski, 2002). TLR1, TLR2 ile heterodimer oluşturur. TLR heterodimerizasyonun önemi tam olarak anlaşılmazken, TLR1 gibi bazı TLR, TLR2'nin PAMP'a karşı duyarlılığını ve spesifitesini artırdığı düşünülür. Ancak TLR2'nin bir homodimer olarak sinyal vermeyip bu fonksiyon için TLR1'e gerek duyduğuna dair kanıtlar da vardır. TLR1 aynı zamanda TLR4 ile de heterodimer oluşturur. Fakat TLR4'ün fonksiyonunu artırmaz tam tersine aktivitesini inhibe eder (Wyllie et al. 2000).

TLR'inden TLR2 mRNA ekspresyonu, beyin, akciğer, kas, kalp ve dalak gibi dokularda gözlenirken en çok da periferik kan lökositlerinde özellikle de myelomonositik orijinli olanlarında incelenmiştir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında TLR2 mRNA ekspresyonu artar (Zarembler and Godowski, 2002). TLR2, TLR1 ve TLR6 ile birlikte ve daha nadir olarak da TLR10 ile (Barton and Medzhitov 2002) heterodimerler oluşturur. Gram-pozitif bakteriler (PGN, LTA, lipoprotein), Gram-negatif

bakteriler (lipoprotein), mantarlar (zymosan) sentetik lipoprotein, mikobakteriler [LAM (lipidden zengin mikobakteriyal hücre duvarının major bir immunstimulatör komponentidir)], spiroketlere ait lipopolisakkarid (LPS), glikolipid ve glikoprotein gibi patojenle ilişkili moleküler yapıları tanır. TLR2/TLR6 heterodimeri LTA, TLR2/TLR1 heterodimeri bakterilerin hücre duvarının triaçil lipoprotein/peptidlerini, TLR1/TLR6 ise mikoplazmanın diaçil lipoproteinlerin tanınmasından sorumludur (Takeda et al. 2002). TLR2 vasıtasıyla bakteriyal lipoproteinler pro-inflamatuvar sitokin IL-1 β prekürsörünün sentezini indükler. Bakteriyal lipoproteinler aynı zamanda TLR2 yoluyla kaspaz 1'i aktive ederek IL-1 β sekresyonuna ve proteolizisine neden olur (Aliprantis et al. 2000). 84 kDa moleküler ağırlığında olan TLR2, aynı zamanda kızamık virusu, insan sitomegalivirus, hepatit C virusu gibi virusları da tanıma yeteneğine sahiptir (Barton and Medzhitov, 2002).

TLR3 plasenta ve pankreas gibi dokularda yüksek miktarlarda, daha az oranda da farenin akciğer, beyin ve böbrek dokularında eksprese edilmiş olup 97 kDa moleküler ağırlığındadır (Rock et al., 1998). TLR3 ayrıca epitel, granülosit, monosit, T- ve B-hücrelerinde de eksprese edilmektedir. TLR3 mRNA ekspresyonu Gram-negatif bakterilere maruz kalındığında artarken, Gram-pozitif bakterilerle temasta da belli bir miktar artar. Canlı dışında TLR3 mRNA ekspresyonu, Gram-negatif bakterilere maruz kalındığında hem monositlerde hem de granülositlerde artmaktadır (Zarembek and Godowski, 2002). TLR3 homodimer formda bulunur, viral veya hücreli orijinli çift sarmallı RNA (dsRNA) molekülünü tanır (Alexopoulou et al., 2001). Genellikle TLR'i hücre yüzeyinde eksprese edilmesine karşın viral yaşam siklusunun bir ürünü olan dsRNA gibi internal PAMP'a duyarlı TLR3, hücre içinde bazen de lizozomal kısımda yer alabilir (Zhang et al., 2002). TLR3 sinyal yolağının dsRNA ile uyarılması sonucunda NF- κ B ve interferon regülasyon faktör 3 gibi transkripsiyon faktörleri aktif hale geçer ve bunun sonucunda yangı öncesi ve antiviral sitokinler salgılanır (Alexopoulou et al., 2001). TLR3, miyeloid farklılaşma faktör 88'e

(Myeloid Differentiation Factor 88, MyD88) bağılı olmadan fonksiyonunu sürdürür ve çekirdeğe sinyal göndermek için sadece adaptör TIR domaini içeren adaptör indükleyici interferona (Toll Interleukin-1 Receptor Containing Adapter Inductive Interferon, TRIF) ihtiyaç duyar. Aynı zamanda fare Sitomegalovirus, Reovirus ve influenza virusun neden olduğu enfeksiyonlarda görev almaktadır (Sen and Sarkar 2005).

Memelilerde TLR ailesinin ilk tespit edilen üyesi olan TLR4'ün, LPS'e bağlanması üzerine pro-inflamatuvar NF- κ B yolağını başlattığı gösterilmiştir. İn vivo TLR4 mRNA, en yüksek seviyede dalakta ve periferel kan lökositlerinde (B-lenfositler, dendritik hücreler, monositler, makrofajlar, granulositler ve T-lenfositler) eksprese edilmektedir (Medzhitov et al. 1997). Diğer çalışmalar ise TLR4'ün sadece myelomonositik hücrelerde eksprese edildiğini ve en yüksek miktarda da mononükleer hücrelerde bulunduğunu ileri sürmektedir (Zarembek and Godowski 2002). TLR5 ile TLR4 kompleksi respiratorik sinsityal virus, hepatit C virusu ve fare meme tümör virusu gibi virusları; fibrinojen, fibronektin, surfaktan protein A ve β -defensinler gibi endojen ligandları da tanıma kapasitesine sahiptir (Barton and Medzhitov, 2002). 90 kDa moleküler ağırlığında olan TLR4, yangısal bölgelerde üretilen fibronektinin bir başka biçimidir. Bazı TLR doğal immun ligandlarına direkt bağlanırken, TLR4 gibi reseptörler bu işlem için yardımcı moleküllere ihtiyaç duyarlar. TLR4, sadece ikinci bir polipeptid olan MD-2 varlığında LPS'lere cevap verir. Bu molekül TLR4'ün ekstrasellüler domainine bağlanır ve LPS'in lipid içeren bölgesine TLR4'ün bağlanmasını sağlar. Bütün bakterilerde bulunmayan LPS formlarına cevap ikinci bir yardımcı molekül varlığında artar. CD14 olarak adlandırılan bu molekül monosit, makrofaj ve nötrofiller tarafından eksprese edilen bir membran proteindir. CD14 molekülünün görevi LPS-bağlayan protein (Lipopolysaccharide Binding Protein, LBP) olarak adlandırılan bir serum lipid transfer proteinden LPS'i kabul eder. Lipidlerin çoğunda olduğu gibi LPS de çok küçük miktarlarda hücrelerden salgılanır. Doğal immun sistem hücreleri tarafından LPS'in tanınmasında bu

nedenle LPS monomerlerinin ekstraksiyonunu sağlayan bir mekanizmaya ihtiyaç duyulur. Bu durum lipid bağlayan alanlarında bulunan diğer lipidlerden LPS monomerlerini ayıran LBP'in görevidir ve daha sonra bu protein LPS monomerlerinin CD14'e transfer edildiği hücrelere taşır. CD14 de bu monomerleri TLR4-MD2 kompleksine sunar. CD14'n genetik olarak bulunmaması veya monoklonal antikorlar tarafından fonksiyonunun engellenmesi, LPS'e karşı makrofajların ve nötrofillerin duyarlılığını azaltır. Buna rağmen bazı bakterilerde bulunan LPS'ye karşı hala bir cevap oluşabilir. CD14, *Mycobacterium tuberculosis*'in LAM ve Gram-pozitif bakterilerin LTA gibi diğer bakteriyel hücre duvarı bileşenlerine de cevap geliştirebilir (Shimazu et al. 1999, Gluck et al. 2001).

TLR4'n subsellüler lokalizasyonu makrofajlarda ve intestinal epitel hücrelerinde farklıdır. Makrofajlarda TLR4, hücre yüzeyinde eksprese edilirken liganda bağlanmasını takiben internal pozisyona geçer. Buna karşın epitel hücrelerinde Golgi aygıtının yanında bulunur (Hornef et al. 2002).

Ovaryum, prostat ve periferel kan lökositlerinde, en yüksek seviyede de monositlerde eksprese edilen (Rock et al. 1998) TLR5 mRNA ekspresyonu, hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında artar. TLR5, 91 kDa moleküler ağırlığında homodimer formda bulunmakla birlikte TLR4 ile heterodimer de oluşturabilir ve flagellalı bakterilerin flagellin proteinini tanır (Hayashi et al. 2001; Andersen-Nissen et al. 2005). TLR5'in flagellin ile bağlanması sonucu TNF- α gibi inflamatuvar sinyal oluşur. İn vitro yapılan alışmalar TLR5'in Gram-negatif bakterileri tanımada epitel hücrelerinin major bir sensörü olduğunu, intestinal ve korneal epitel hücrelerinde NF- κ B ve proinflamatuvar gen aktivasyonuna öncülük eden anahtar sinyal yolaklarını aktive ettiğini ortaya çıkarmıştır. TLR2, TLR4 ve TLR6 birçok farklı mikrobiyal ajana cevap verebilirken, TLR5 ve TLR9 tek bir yapıyı spesifik olarak tanıyan reseptörlerdir (Underhill and Ozinsky, 2002).

İn vivo TLR6 timus, dalak ve akciğerde özellikle de B-lenfositler ve monositlerde eksprese edilmektedir. TLR6 91 kDa moleküler ağırlığında olup TLR2 ile heterodimer oluşturur. TLR1 gibi TLR6 da TLR2'nin PAMP molekülüne karşı duyarlılığını ve spesifitesini artırır. Aynı zamanda heterodimerizasyon yoluyla sinyal verme kapasitesine de katkıda bulunur (Zhang et al., 2002). TLR6, Mikoplazma türevli lipoproteinleri ve peptidoglikanları tanır (Takeuchi et al. 2002).

TLR7 insanlarda, memeli hayvanlarda ve kanatlı türlerinde antiviral immun yanıtın başlatılmasında önemli bir rol oynayan immun bir gendir. İn vivo TLR7 mRNA kalp, kemik iliği, akciğer, plasenta, dalak, lenf düğümü ve tonsil gibi organlarda eksprese edilmesine karşın en yüksek düzeyde monosit, B-lenfosit ve dendritik hücrelerde eksprese edilir. 121 kDa moleküler ağırlığında olan TLR7'nin ekspresyonu in vitro ortamda Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında monositler ve granülositlerde artar (Zarembek and Godowski, 2002). TLR3 gibi TLR7 de intrasellüler olarak lokalize olmuştur. Doğal ligandları hala bilinmemesine karşın, TLR7 imidazoquinolin olarak adlandırılan bir grup küçük sentetik antiviral bileşiklere (Hemmi et al. 2002), tek sarmallı RNA'ya (Lund et al., 2004) ve sentetik nükleotid türevlerine (Hemmi et al. 2002; Heil et al., 2004) bağlanır. Anti-viral ve anti-tümör özelliklere sahip olan imiquimod ve R-848 gibi imidazoquinolin bileşikler düşük moleküler ağırlıkta olup, çeşitli hücrelerde IFN- α , IL-12 ve diğer sitokinlerin sentezini uyarırlar (Hemmi et al. 2002). TLR7 influenza virus ve vezikular stomatitis virusu gibi tek sarmallı RNA viruslarının neden olduğu enfeksiyonlar tarafından aktive edilir. Viral nükleik asitler tarafından TLR7'nin stimülasyonu, tip 1 IFN cevabına, büyük miktarlarda IFN- α salgılanmasına ve inflamatuvar sitokinlerin (IFN- β , IL-6, IL-12, TNF- α) üretimine neden olur (Philbin et al. 2005). TLR7 tarafından nükleik asitlerin tanınmasını takiben MyD88 olarak adlandırılan ve TIR- içeren adaptörün toplanmasına yol açar. MyD88, IL-1 reseptör ilişkili kinaz (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase, IRAK) ailesinin üyeleri (IRAK1 ve IRAK4)

ve dönüştürücü büyüme faktör kinazın (Transforming Growth Factor Kinase, TAK1) aktivasyonunu başlatan tümör nekrozis faktör (TNF)–ilişkili faktör 6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor, TRAF6) ile bir kompleks oluşturur ve bu durumda NF- κ B’nin aktivasyonu ile sonuçlanır. TLR7’nin loxoribine ve broprimine gibi diğer sentetik kimyasalları da tanıdığı gösterilmiştir (Akira, 2003).

TLR8 120 kDa moleküler ağırlığında olup TLR7 ve TLR9 ile yakından ilişkilidir. TLR8 mRNA akciğer, dalak, plasenta, lenf düğümü, kemik iliği ve periferel kan lökositlerinde en çok da monositlerde eksprese edilir. İn vitro ortamda Gram-negatif bakterilerle temasa gelindiğinde monosit TLR8 ekspresyonu artarken, granülosit TLR8 ekspresyonu azalır (Zarembler and Godowski, 2002). TLR8 intrasellüler olarak lokalize olmuştur ve TLR7 gibi doğal ligandları bilinmemesine rağmen imidazoquinolinlere (Li and Qin, 2005), tek sarmallı RNA’ya (Lund et al., 2004) ve sentetik nükleotid türevlerine (Hemmi et al., 2002; Heil et al. 2004) bağlanır ve sitokin salınımına neden olur.

TLR9 116 kDa moleküler ağırlığında olup, TLR7 ve TLR8 ile yakından ilişkilidir. İn vivo TLR9 mRNA dalak, iskelet kası, lenf düğümü, kemik iliği ve periferel kan lökositlerinde, özellikle de B-lenfositler ve dendritik hücrelerde ekspresedir (Chuang and Ulevitch, 2000). TLR9 homodimer formda bulunur; bakteriyel ve bazı viral nükleik asitlerde bulunan non-metilli deoksisitidil-fosfat-deoksiguanozin (CpG) dinükleotidleri tanır (Hemmi et al. 2000). Metillenmemiş DNA’yı içeren PAMP’ların bulunduğu lizozomik ve endositik kompartımanlarda intrasellüler olarak bulunur. Diğer TLR’i hücre yüzeyinde eksprese edilmesine karşın, TLR9 (TLR3, TLR7 ve TLR8 dahil) bir intrasellüler reseptördür.

TLR10 95 kDa moleküler ağırlığında olup, TLR1 ile TLR6’nın homologudur ve farelerde sadece psödyogen olarak bulunmasına rağmen çoğunlukla immun sistem ile ilişkili dokularda (dalak, lenf düğümü, timus, tonsil) (Beutler and Rehli, 2002) ve özellikle de B-lenfositlerde (Zarembler and Godowski, 2002) eksprese olur. TLR10 ligandları ve ilişkilerine

dair çok az şey bilinmesine karşın TLR1 ve TLR6 gibi, TLR2 ile heterodimer oluşturduğu ve benzer PAMP'a karşı duyarlı olduğu ileri sürülmektedir (Wyllie et al. 2000).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar farelerde bulunan TLR11'in protozoon bir parazit olan *Toxoplasma gondii*'deki profilin benzeri proteine ve üropatojenik *Escherichia coli*'ye bağlandığını, insanlarda ise TLR11'in psöydojen olarak bulunduğunu göstermiştir. Bu profilin benzeri protein TLR11 vasıtasıyla fareye ait dendritik hücreleri aktive ederek IL-12 üretimini başlatır. Aynı zamanda in vivo ortamda parazitin indüklediği IL-12 üretimi ve paraziter enfeksiyona direnç için TLR11'e ihtiyaç duyulur (Yarovinsky et al., 2005; Zhang et al., 2004).

TLR12 yüksek oranda karaciğer, sidik kesesi ve böbrekte zayıf olarak da dalakta eksprese edilmiştir. TLR12 de üropatojenik bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlara yanıt vermede görevlidir (Takeda and Akira, 2005).

TLR13 faredeki TIR domaine homolog olarak tanımlanmıştır. TLR13'ün TLR3 ile yakın ilişkide olduğu bilinmektedir (Kumagai et al., 2008).

Erkek üreme organlarının patojenlere karşı korunması (Hall et al. 2002) ve spermatozoonların testis içinde oluşumları sırasında ve takiben epididimis içindeki olgunlaşma, taşınma ve depolanmaları sırasında mikroorganizmalara karşı korunmaları (Hinton et al. 1996) üreme fizyolojisinde önemli aşamalardır. Spermatozoonların olgunlaşması ve depolanmasıyla görevli bir organ olan epididimide epitelin cinsel yolla bulaşan hastalıklara neden olan patojenlere karşı korunması da oldukça önemlidir. Nitekim son 10 yılda yapılmış olan bir dizi çalışma epididimide birçok antimikrobiyel savunma sisteminin varlığı üzerine odaklanmış ve bunların hem epididimis epitelinin, hem de spermiyumların erkek genital sistemde patojenlerden korunmasında önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (Li et al. 2001; Com et al. 2003). Ayrıca spermiyumlar tarafından eksprese edilen antimikrobiyel proteinlerin dişi genital sistem içinde spermiyumların patojenlerden

korunmasında da rol oynayabileceğini göstermiştir (Zanich et al. 2003; Wang et al. 2005; Yudin et al. 2005). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar TLR'nin erkek üreme organlarında doğuştan bağışıklık için önemli olduğunu ortaya koymuştur. TLR proteinlerinin insan, sıçan ve horozların epididimisinde lokalize olduğu ve çeşitli bakteriyel ajanlara karşı epididimis ile ilişkili immun yanıtların oluşturulmasında rol oynadığı bilinmektedir (Palladino et al., 2007; Palladino et al., 2008; Zhao et al., 2008; Anastasiadou et al., 2011; Zhang et al., 2012; Anastasiadou et al., 2013; Saeidi et al., 2013).

Sıçanlarda TLR1'in kauda epidididymis boyunca inisyal segmentte çoğu hücre tipinde lokalize olduğu, ayrıca interstisyel hücreler, açık hücreler ve spermatozoonlarda da zayıf boyanmanın olduğu, TLR2'nin inisyal segment ile kauda bölümünde zayıf, kaput ve korpus bölümlerinde ve daha yoğun boyanma sergiledikleri bildirilmektedir. TLR3, TLR4 ve TLR 5 için inisyal segmentten kauda epididimise kadar epididimal epitelde güçlü boyanmanın olduğu, TLR6 immunreaktivitesinin inisyal segment epitelinde endozomal ve lizozomal kompartımanlarda yoğun olduğu, prinsipal hücrelerde ise Golgi bölgesinde bulunduğu belirtilmektedir. İnisyal segmentte TLR8 lokalizasyonunun TLR6'ninkine benzer olarak endozomal veya lizozomal kompartımanlarda bulunduğu, TLR7, TLR9 ve TLR11'in ise inisyal segmentten kaudaya kadar tüm epitelde lokalize olduğu, ayrıca TLR10 immunoreativitesinin epididimis boyunca bulunmadığı ifade edilmektedir (Palladino et al., 2008). Palladino ve ark. (2008) sıçan epididimisinde TLR1-9 mRNA ekspresyonlarının bol olduğunu TLR1, 2, 4 ve TLR6 proteinlerinin eşit seviyelerde, TLR3, 5, 8 ve 11'in ise testisdekinden daha düşük düzeylerde eksprese olduğunu rapor etmektedirler. İnsan epididimisinde Reverse-transcriptase PCR sonuçları TLR1-10 'un gen ekspresyonlarının varlığını ortaya koymaktadır. Zhao ve ark (2008) horozlarda epididimide TLR2 ve 4'ün eksprese edildiğini, S aureus infeksiyonundan 24 saat sonra TLR2 ekspresyonun arttığını, TLR4 ekspresyonunun ise değişmediğini ve TLR'nin epididimal epitel hücrelerinin doğal

bağışıklığında anahtar rolleri olduğunu bildirmektedirler. Anastasiadou ve ark (2013) horozlarda quanti-tative real-time PCR analiz sonularının TLR 2-1, 2-2, 4 and 21 genlerinin ekspresyonlarının yaşlanmaya bağlı bir azalma gösterdiklerini, 28 hafta yaşlı seksüel olarak olgun horozlarda salmonella enfeksiyonu sonrasında TLR 1-2, 2-1, 2-2, 4, 5, ve 7 genlerinin ekspresyonlarında önemli bir artış olduğu, bununla birlikte TLR2-1 geni için bu artışın 10 kat kadar olduğu ifade etmektedirler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Veteriner Fakültesi Cerrahi kliniğine hayvan sahipleri tarafından kısırlaştırılmak üzere getirilen ve Orchidektomi (kastrasyon) operasyonu uygulanan toplam 20 adet sağlıklı erişkin erkek kediye ait epididimisler kullanıldı. Operasyonlar Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Nusret Apaydın tarafından yapıldı.

3.2. Olgulara uygulanan operasyonun anestezi protokolü;

Premedikasyon, Domitor® (medetomidin hidroklorid 80 µg/kg) im. uygulandıktan sonra indüksiyon (% 6-8) ve anestezinin idamesi (%1-2) Sevofluran ile sağlandı. Operasyon tamamlandıktan sonra Antisedan® (atipamezol hidroklorid) im. uygulanarak uyanma işlemi gerçekleştirildi.

3.3. Operasyon;

Bölgenin temizliği yapıldıktan sonra asepti ve antisepsinin sağlanması ile ayrı olacak şekilde scrotumlar üzerine ensizyon yapıldıktan sonra testis ortaya çıkarıldı. Bütün katmanlarından diseke edildikten sonra 4.0 vicrly iplik ile ligatür uygulanan testisler ekstirpe edildi. Bölge antiseptik solüsyon ile temizlendikten sonra post-operatif antibiyotik olarak Prokain penisilin 400.000 İU im. uygulanarak operasyonlandırıldı.

Operasyonda alınan epididimisler testise bitişik olduklarından öncelikli olarak testisten ayrıldı. 10 adet hayvana ait sağ ve sol epididimisler immunohistokimyasal yöntemler için, diğer 10 adet hayvana ait sağ ve sol epididimisler ise western blot analizi için uygun prosedüre tabi tutuldu. Kedi epididimisleri kaput, kauda ve korpus olarak üç bölümde inceleneceğinden ve Western blot analizinde yeterli miktarda protein elde etmek için bir havana ait sağ ve sol epididimislerin bölümleri birleştirildi. Western blot Analizi için epididimis örnekleri alüminyum folyolar içerisinde sarılı olarak likit nitrojende $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hemen donduruldu ve analiz yapılana kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik bir derin dondurucuda saklandı.

3.4. Histolojik ve İmmunohistokimyasal analiz

Epididimis örnekleri kaput, korpus ve kauda bölümlerine ayrılarak Bouine solüsyonunda 6 saat süreyle tespit edildi ve takiben %50'lik alkolden başlayarak dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirilerek paraplastta bloklandı. Her bir hayvanın epididimis bölümlerine ait bloklardan 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı ve toplam 5 seri preparat hazırlandı. Her bir preparata belirli aralıklarla alınmış en az 6 kesit yerleştirildi. Preparatların birinci serisi genel yapıyı belirlemek amacıyla Crossman'ın üçlü boyaması ile boyanacaktır. Diğer serilere ise immunohistokimyasal incelemeler için Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı.

İmmunohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden fosfat buffer salin'de (PBS) çalkalandı ve endojen peroksidaz aktivitelerini bloke etmek için metanol'de hazırlanmış %3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 15 dak. muamele edildi ve tekrar PBS'de iki kez 5'er dak. yıkandı. Takiben dokular sitrat bufferda 80 °C'de 30 dakika süreyle kaynatıldı ve aynı solüsyon içinde 20 dak. soğutulularak doku antijeninin yeniden kazanımı sağlandı. Tekrar PBS ile dört kez 5'er dak. yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika bloking solüsyonu ile bir nem odası içinde inkube edildi. Uygun dilasyonlarda hazırlanmış primer antikolar kesitler üzerine eklendi ve 4 °C'de bir gece inkube edildi. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi. İnkubasyonu takiben PBS'te 3 kez 5'er dak. yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor ile 15 dakika oda ısısında inkube edilip, tekrar 3 kez 5'er dak. PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepavidinde 15 dakika muamele edildi. Tekrar 3 kez 5'er dak. PBS ile yıkandıktan sonra 5-10 dakika kromojen solüsyonunda (DAB) bekletildi. Takiben kesitler Gill'in Hematoksilen'inde 3 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı ve alkollerden geçirilip direkt olarak üzerine yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi

sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.

Preparatlar semikantitatif olarak boyanma yoğunluğuna göre negatif (-), zayıf (+), orta şiddette (++) ve kuvvetli (+++) olarak derecelendirme yapılarak değerlendirildi.

3.5. Western blot Analizi

1-Numunelerin hazırlanması:

a) -80 C⁰'lık derin dondurucuda dondurulan örneklerin her biri terazide tartılarak ağırlıkları hesaplandı.

b) Hücre veya dokular, “ proteaz ve fosfataz inhibitörleri katılan Ripa lysis buffer” tampon solüsyonunda sonikatör kullanılarak parçalandı ve homojenize edildi.

c) Homojenatlar ultrasantrifüjde 12,000 g de 20 dakika santrifüjlendi ve elde edilen süpernatant protein analizi için kullanıldı.

2- Protein miktarının tayin edilmesi (protein kantitasyonu):

Lizatın içerdiği total protein miktarının belirlenmesinde Lowry metodu kullanıldı. Bu işlemde ise standart BSA solüsyonları, kör ve numuneler tüplerde hazırlandıktan sonra spektrofotometrik olarak okutulduktan sonra excel programı aracılığıyla gerekli sütun ve satırlara girildi. Daha sonra katsayı hesaplanarak ANA numuneler (süpernatant) içindeki protein miktarı belirlendi.

3- Hazırlanan protein lizatlarının jel üzerinde yürütülmesi (jel elektroforezi):

Proteinlerin elektroforetik ayrımında, SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği kullanıldı. Öncelikle araştırılan proteinin kDa ağırlığına göre jel (ayırıştırıcı %7 ve toplayıcı % 4.5 jeller) hazırlandı. Jel elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine de elektroforez solüsyonu (Running Buffer) döküldü. Numuneler Laemmli sample buffer da hazırlanarak ve 95°C'de 5 dak. kaynatıldıktan sonra jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Yükleme yaparken moleküler ağırlığı bilinen bir belirteç (marker) (Broad range markers) jelin

ilk kutucuğuna yüklendi. Numunelerle birlikte ayrıca her bir protein için uygun olan pozitif kontrol (TLR2 ve TLR5 için Namalwa Cell lysate, TLR4 ve TLR9 için HeLa Whole Cell lysate) örnekleri de jel kuyucuklarına yüklendi. Güç Kaynağı ile 90 dak süreyle 120 V'luk akım verilerek proteinlerin jelde yürütülmesi sağlandı.

4- Jel üzerinde yürüyen proteinlerin membrana aktarılması (membran blotting):

Elektrofez işleminden sonra jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için Wet transfer yöntemi ile 30 voltta ve sabit 90mAmpere akımda gece boyu (16 saat) blotlama işlemi gerçekleştirildi. Transfer işleminde PVDF membranlar kullanıldı. Transfer sonrası membranlar marker üzerinde işaretli bulunan 50 kDa bandı hizasında kesilerek ikiye ayrıldı. Bunlardan 50 kDa'nun altında kalan membran internal kontrol olan beta actin antikoru için, 50 kDa'nun üzerinde kalan membran ise TLR antikorları için kullanıldı. Her bir membran 1 saat süre ile oda ısısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile blokladı. Ardından membranlar, TBS-T içinde hazırlanmış %5'lik yağsız süttozunda sulandırılmış antikorlar [TLR2 (1/200), TLR4 (1/400), TLR5 (1/100) ve TLR9 (1/100), beta-actin (1/500)] ile + 4°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran TBS-T ile her birinde 5 dak olmak üzere 6 kez toplam 30 dakika yıkandı. Takiben membran, TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile 1/4500 oranında sulandırılmış sekonder antikorla (goat anti-rabbit, santa cruz, sc-2004,0.5 ml) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi ve sekonder antikor her zaman taze hazırlandı. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 4 kez toplam 20 dak ve TBS ile 2 kez toplam 10 dakika yıkama yapıldı. Daha sonra membranlar 5 dak. Clarity™ western ECL blotting substrat ile muamele edildi. Ardından Ünivesitemizin Genkök biriminde bulunan Chemidoc™ Imaging system kullanılarak görüntülendi.

5- Miktarı belirlenmek istenen proteinin “primer antikoru” ile inkübasyonları ve görüntüleme:

a) Bloklama: Her bir membran non-spesifik (özgül olmayan) bağlanmayı engellemek amacıyla %1 oranında Tween-20 eklenmiş TBS (Tris Buffer Saline) (TBS-T) içinde hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu içeren bloking solüsyonunda 1 saat süreyle tutuldu.

b) Primer antikor ile inkübasyon: Bloklama işleminden sonra membranlar, TBS-T içinde hazırlanmış %5'lik yağsız süttozunda sulandırılmış antikorlar [TLR2 (1/200), TLR4 (1/400), TLR5 (1/100) ve TLR9 (1/100), beta-actin (1/500)] ile + 4°C'de gece boyu inkübe edildi.

c) Yıkama: Primer antikor muamelesinden sonra 3 kez 10'ar dak süreyle TBS-T'de yıkama yapıldı.

d) Sekonder antikor ile inkübasyon: Takiben membranlar, TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile 1/4500 oranında sulandırılmış sekonder antikorla (goat anti-rabbit veya goat anti-mouse) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi ve sekonder antikor her zaman taze hazırlandı.

e) ECL ile görüntüleme: Sekonder antikorla inkübasyon sonrasında TBS-T ile 4 kez toplam 20 dak ve TBS ile 2 kez toplam 10 dakika yıkama yapıldı. Daha sonra membranlar 5 dak. Clarity™ western ECL blotting substrat ile muamele edildi. Ardından Üniversitemizin Genkök biriminde bulunan Chemidoc™ Imaging system kullanılarak görüntülendi.

3.6. İstatistiksel analiz

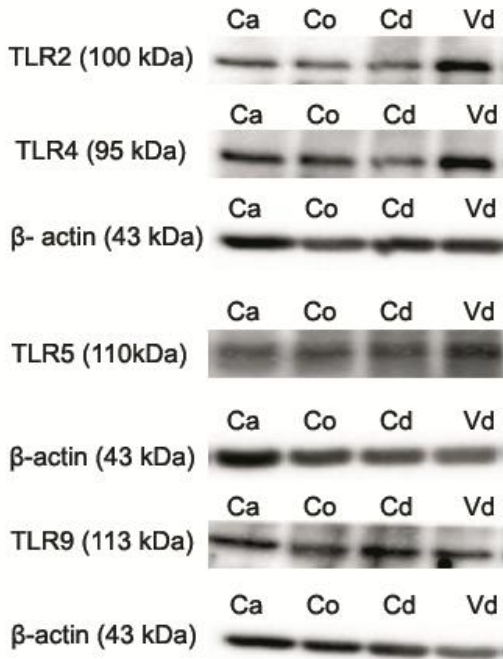
Western blot analizleri sonucunda her bir antikor için epididimis bölümleri (kaput, korpus ve kauda) arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi ve farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için ise Kruskal-Wallis testi uygulandı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. TLR'nin Western blot analizi

Çalışmada western blot analiz sonuçları kullanılan TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9 antikorlarının kedi TLR'leri için de spesifik olduğunu ortaya koymaktadır.

Şekil 1'de TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un kedide epididimisin kaput, korpus ve kauda segmentleri ile vaz deferensde eksprese edildiği gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere TLR'nin moleküler ağırlıkları sırasıyla TLR2 için 100 kDa, TLR4 için 95 kDa, TLR5 için 110 kDa, TLR9 için ise 113 kDa olarak saptandı.

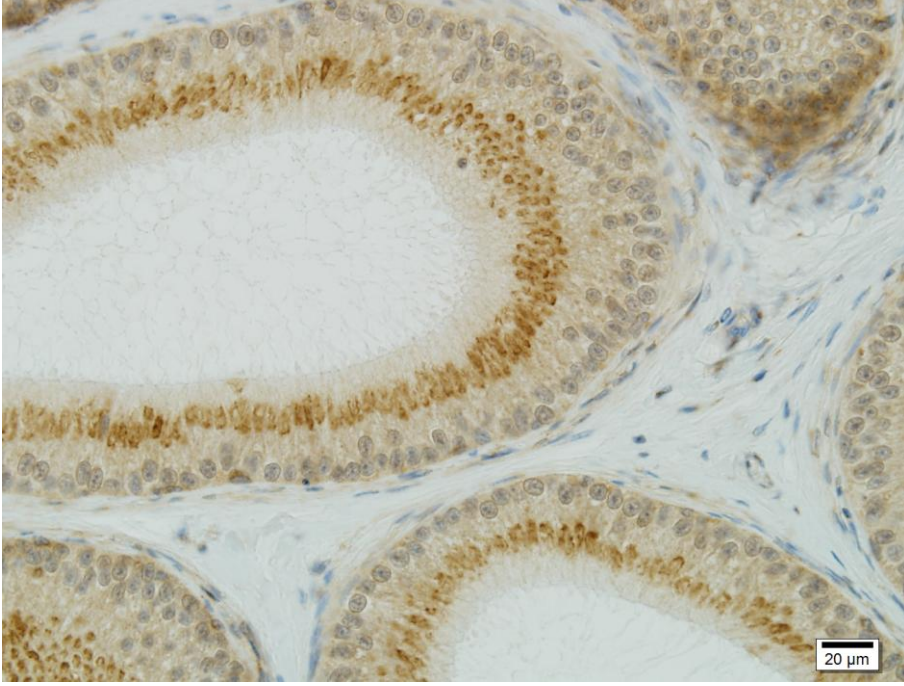


Şekil 1. Kedi epididimisinin kaput (Ca), korpus (Co) ve kauda (Cd) segmentleri ile vaz deferensinde (Vd) TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9 proteinlerine ait bantların gösterimi.

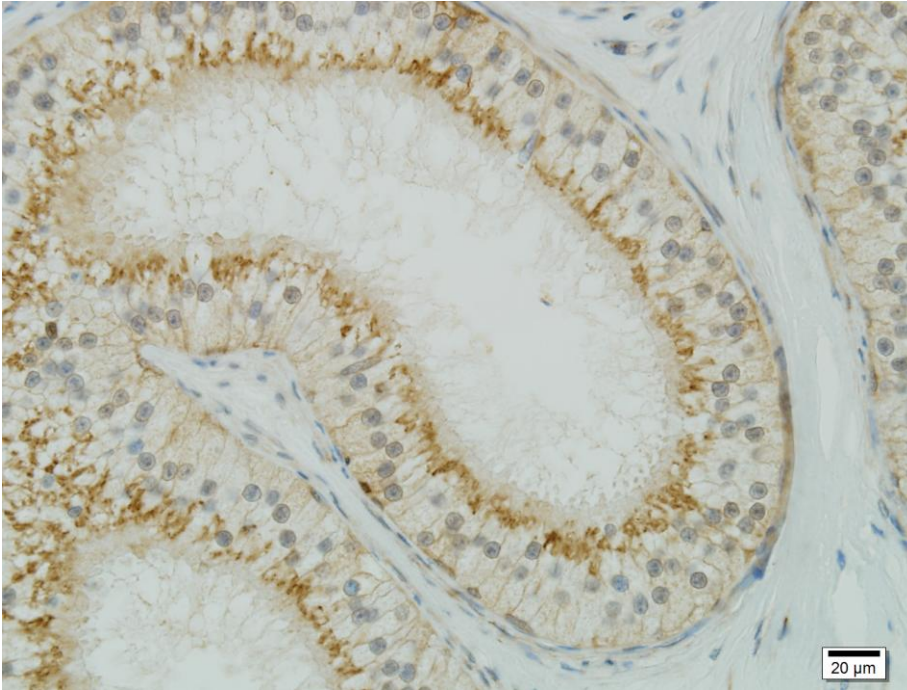
Yapılan istatistik analizi sonucunda TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9 proteinlerin ekspresyonunun epididimis segmentleri arasında farklılık göstermediği ancak vaz deferensdeki TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun epididimisin kaput segmentindekinden anlamlı olarak ($P<0,05$) farklı olduğu tespit edildi.

4.2. TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un epididimis bölümleri ve vas deferensde immunohistokimyasal lokalizasyonu

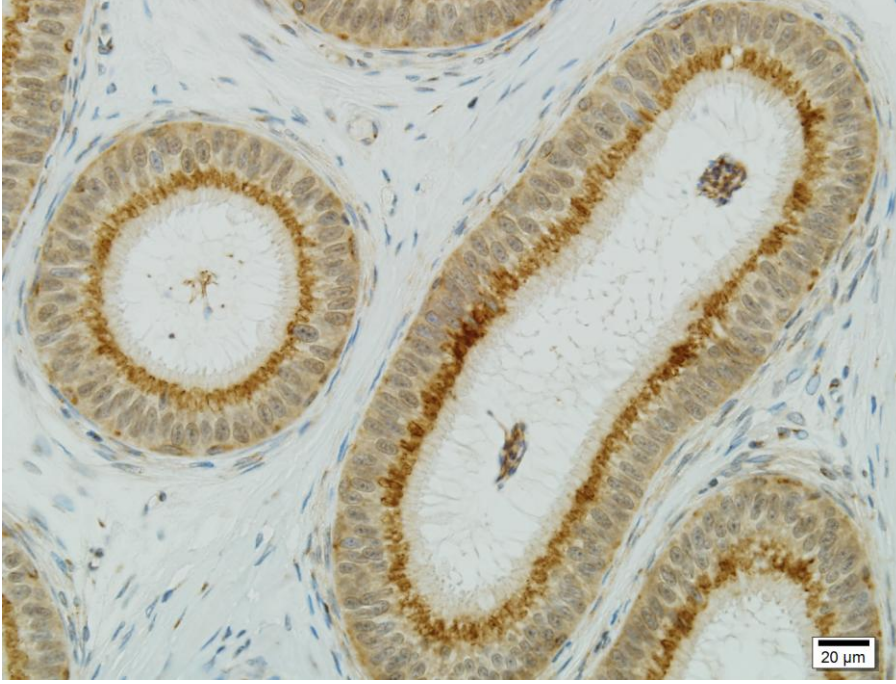
Çalışmada kullanılan negatif kontrollerde boyanmanın olmaması antikorların ve immunohistokimyasal boyanmaların spesifikliğini göstermektedir. Çalışmada epididimis Axner (1999) tarafından rapor edildiği gibi 6 bölüme ayrıldı ve immunohistokimyasal değerlendirmeler bu bölümlere göre yapıldı. İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda TLR'nin kedide epididimis bölümleri ve vas deferens epitellerinde genelde yapısal olarak eksprese olduğu ve TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un farklı hücresel yerleşimler sergilediği gözlemlendi. Kedide ve diğer memeli hayvanlarda epididimis bölümlerini örten epitelde ana hücre tipi prinsipal hücrelerdir. TLR2'nin epididimisin I., II., ve III. bölümlerinde prinsipal hücrelerde supranükleer sitoplazma bölümünde yoğun boyanmış olarak bulunduğu, diğer sitoplazma bölümlerinin zayıf reaksiyon sergilediği tespit edilmiştir. Bölüm IV, V ve VI'da supranükleer sitoplazmadaki boyanmanın azaldığı ve orta derecede olduğu gözlenirken, vas deferensde de supranükleer sitoplazma bölümünde orta derecede, diğer sitoplazma bölümlerinde ise zayıf pozitif TLR2 immunreaksiyonu tespit edildi. Ayrıca TLR2'nin epididimis ve vas deferensi örten epitelde bazal membran üzerine yerleşmiş bulunan bazal hücrelerde kuvvetli reaksiyon sergilediği tespit edildi. TLR2 pozitif bazal hücrelerin sayısının epididimisin I., II., ve III. bölümlerinde oldukça az olduğu, IV. bölümden itibaren arttığı ve vas deferensde en yüksek orana ulaştığı görüldü. TLR2 immunreaksiyonu ayrıca vas deferensin tunika muskularisini oluşturan düz kas hücrelerinde de orta dereceli olarak saptandı. Epididimis ve vas deferensin etrafındaki interstisyel bağdokuda bulunan kan damarlarının endotel katmanlarında da pozitif TLR2 immunreaksiyonu görüldü.



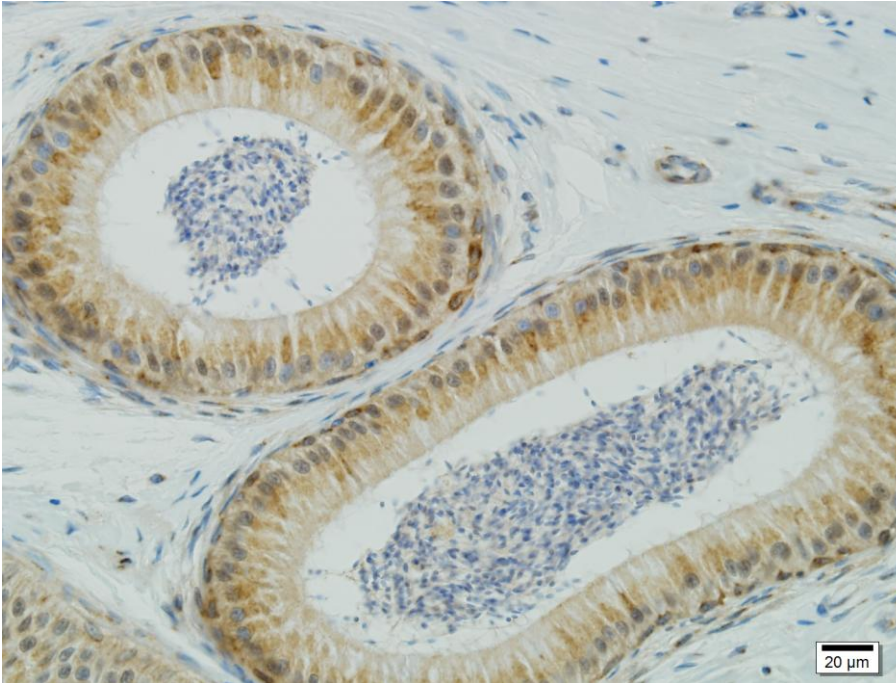
Şekil 2. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm I’de TLR2 immunlokalizasyonu.



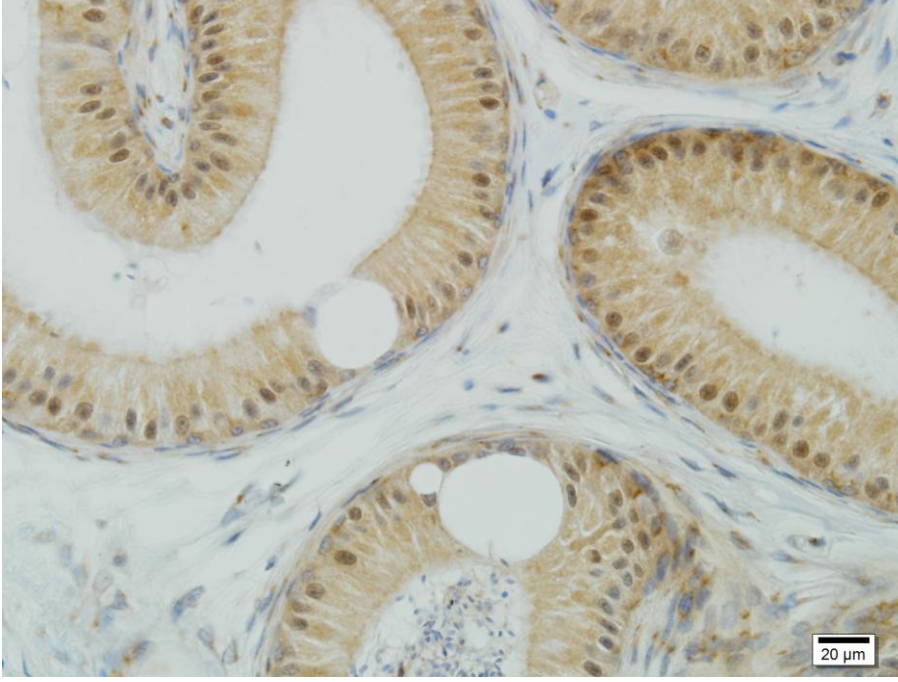
Şekil 3. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm II’de TLR2 immunlokalizasyonu.



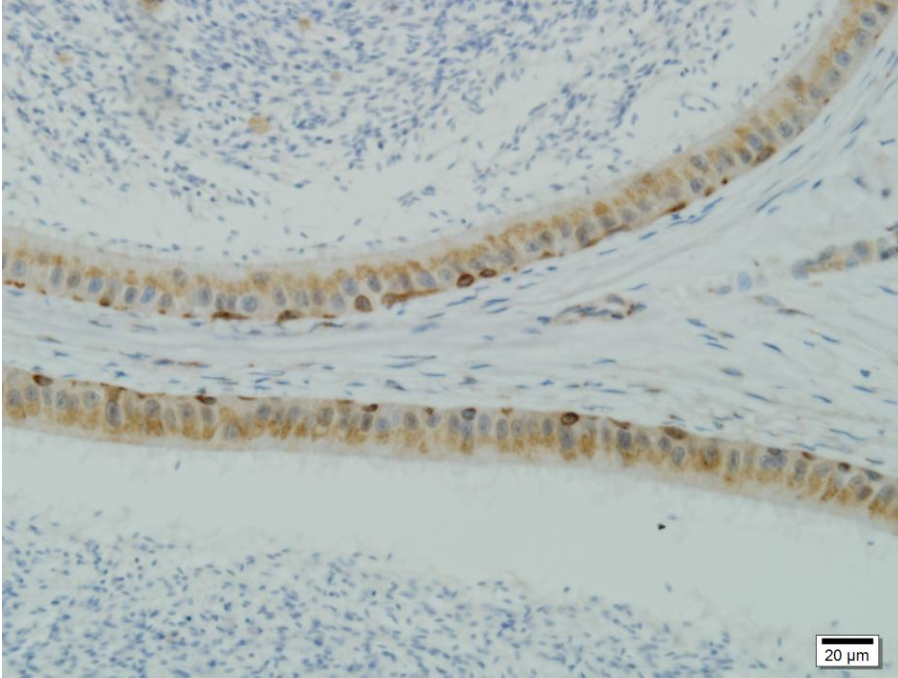
Şekil 4. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm III’de TLR2 immunlokalizasyonu.



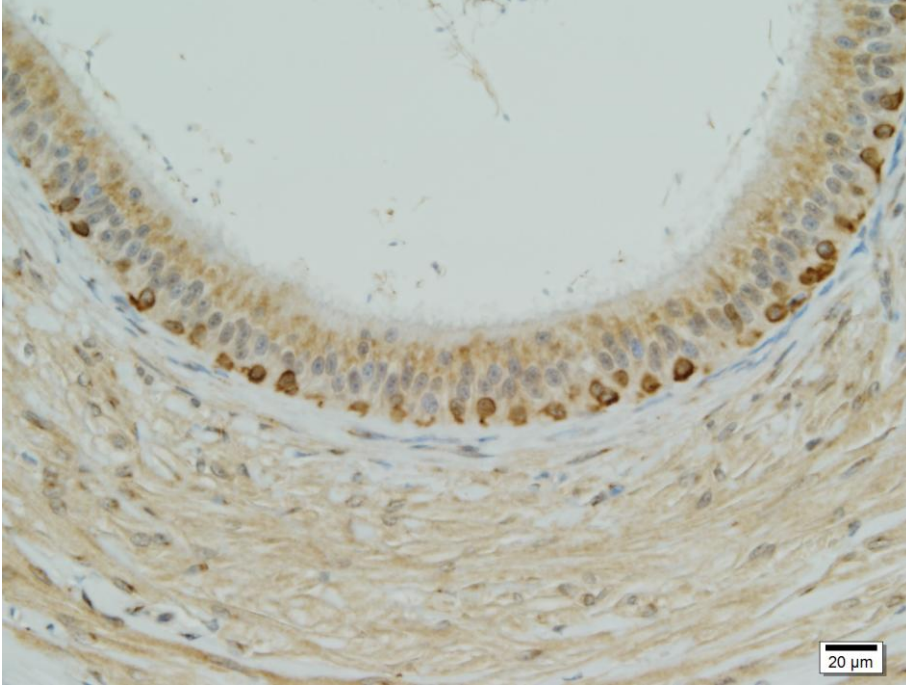
Şekil 5. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm IV’de TLR2 immunlokalizasyonu.



Şekil 6. Duktus epididimisin korpus segmentinde bölüm V’de TLR2 immunlokalizasyonu.

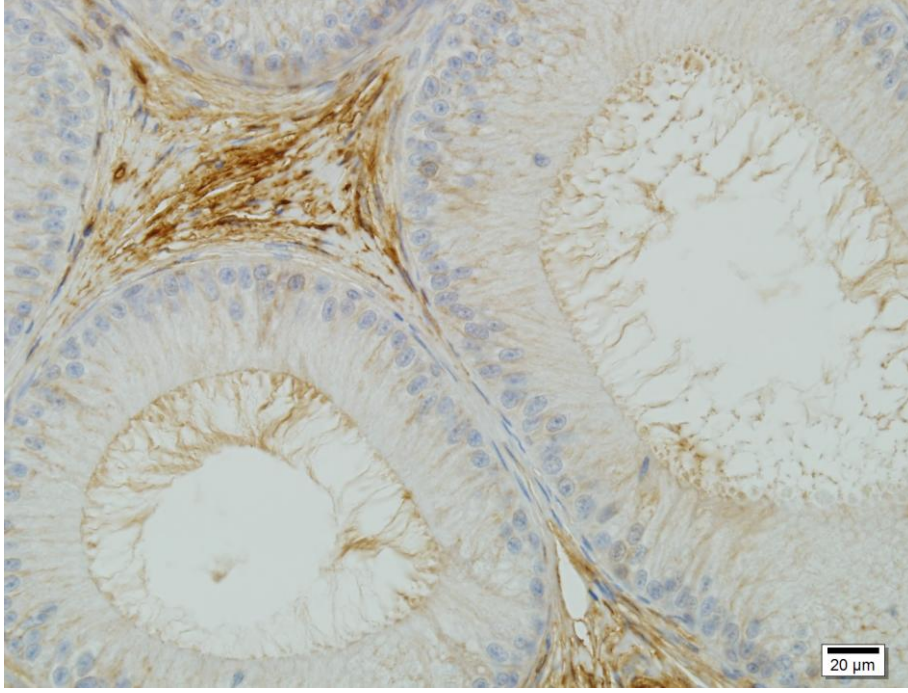


Şekil 7. Duktus epididimisin kauda segmentinde bölüm VI’de TLR2 immunlokalizasyonu.

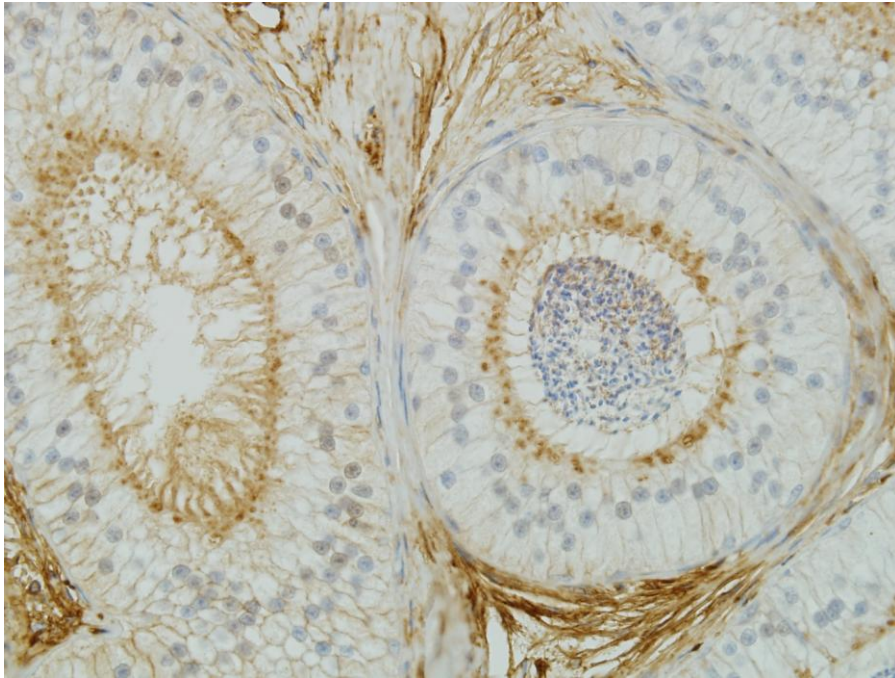


Şekil 8. Vaz deferens’de TLR2 immunlokalizasyonu.

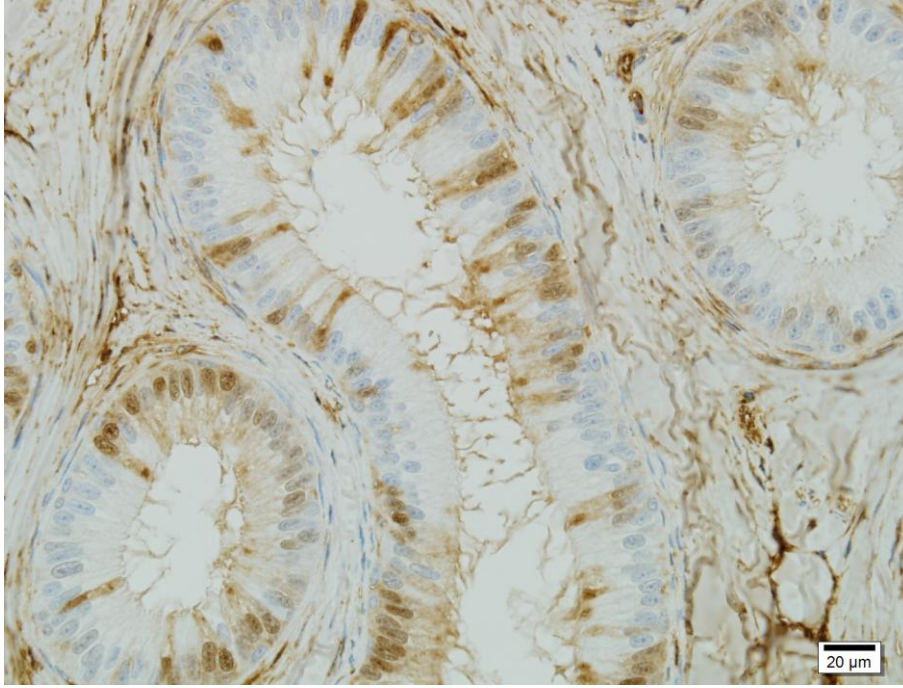
TLR4 immunreaksiyonunun epididimisin I. ve II. bölümlerinde prinsipal hücrelerin lateral membranlarında, stereosilyumlarında ve özellikle II. bölümde apikoluminal sitoplazmada çok dar bir alanda yerleştiği ve orta şiddette olduğu tespit edildi. Bölüm III’de dar sitoplazmalı hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinin de orta derecede TLR4 reaksiyonu sergiledikleri gözlenirken epididimisin IV. ve V. bölümlerinde epiteldeki reaksiyonunun negatif olduğu tespit edildi. Epididimisin VI. bölümü ve vas deferensde ise epitelin stereosilyumlarla donatılmış olan luminal yüzeyinin güçlü TLR4 reaksiyonu gösterdikleri belirlendi. Bunun yanı sıra epididimis ve vas deferensin etrafındaki interstisyel bağdokunun şekilsiz temel maddesinde ve kan damarlarının endotel katmanlarında da pozitif TLR4 immunreaksiyonu görüldü.



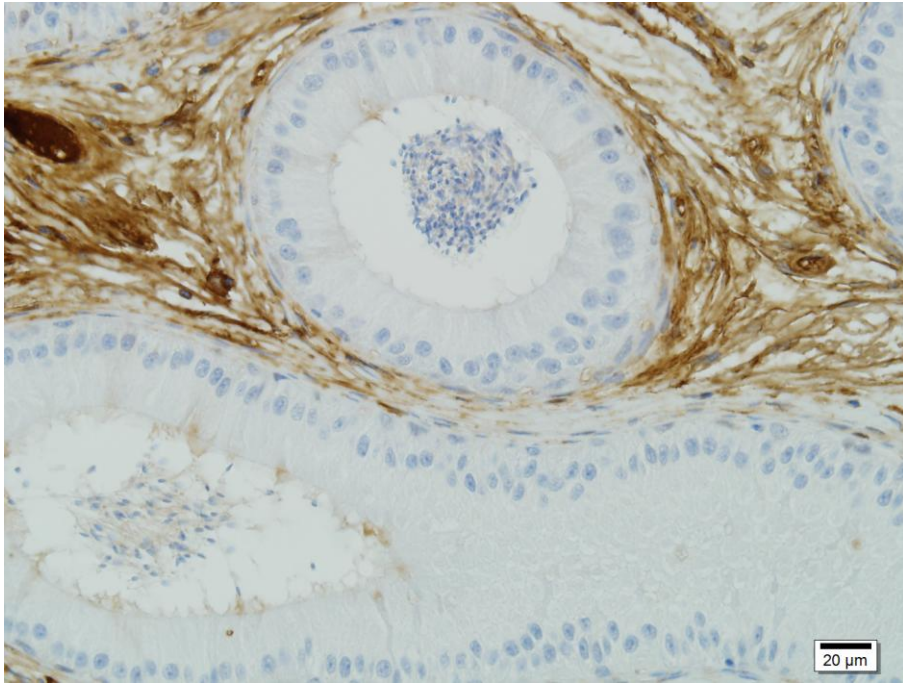
Şekil 9. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm I’de TLR4 immunlokalizasyonu.



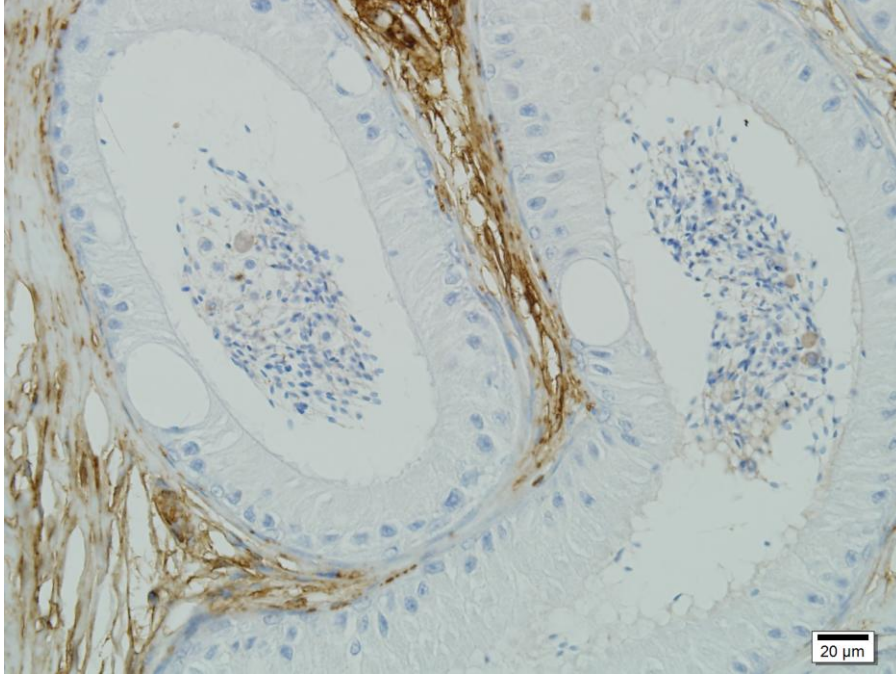
Şekil 10. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm II’de TLR4 immunlokalizasyonu.



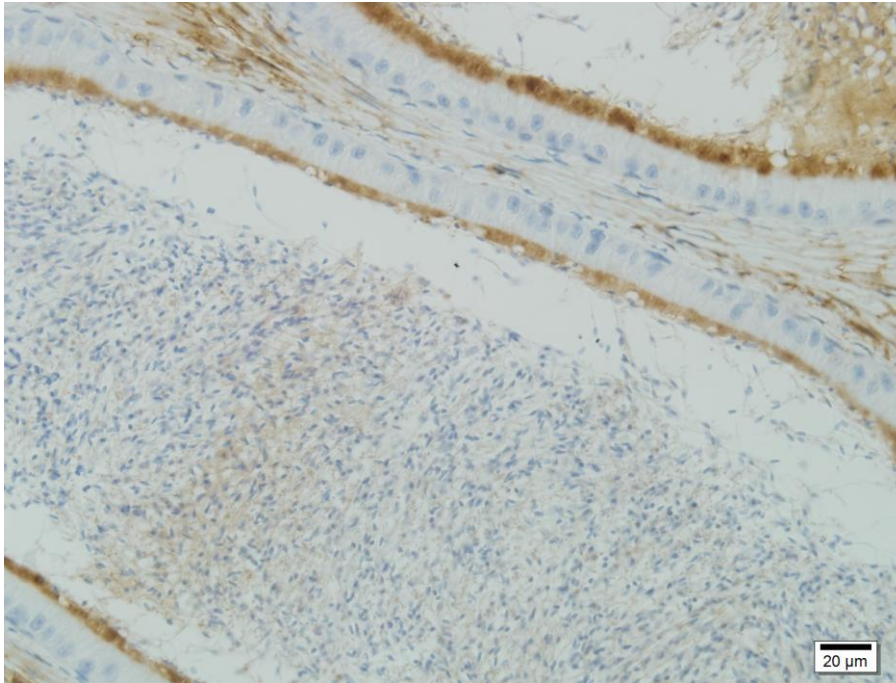
Şekil 11. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm III’de TLR4 immunlokalizasyonu.



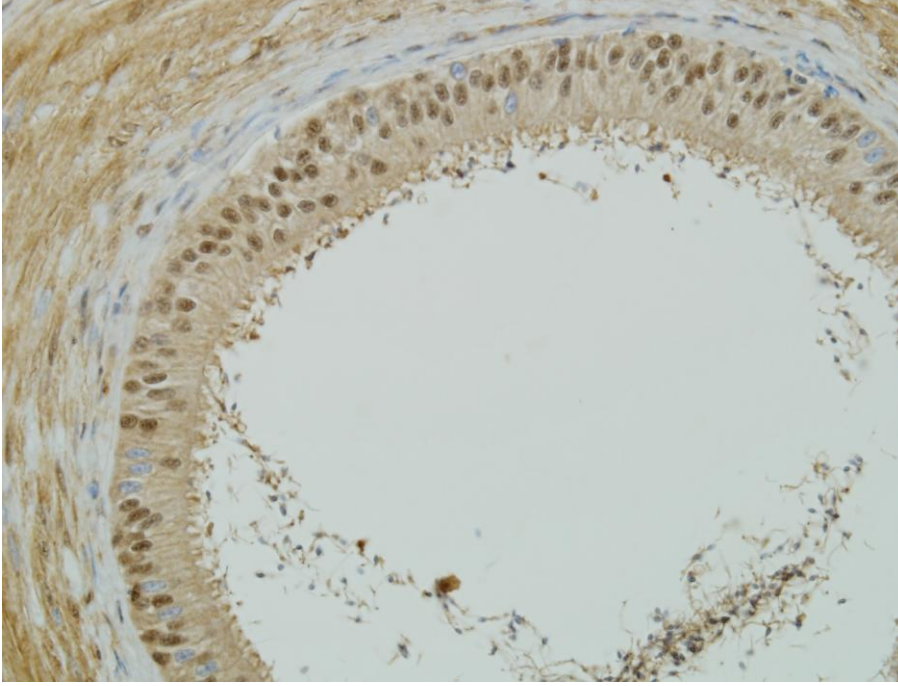
Şekil 12. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm IV’de TLR4 immunlokalizasyonu.



Şekil 13. Duktus epididimisin korpus segmentinde bölüm V’de TLR4 immunlokalizasyonu.

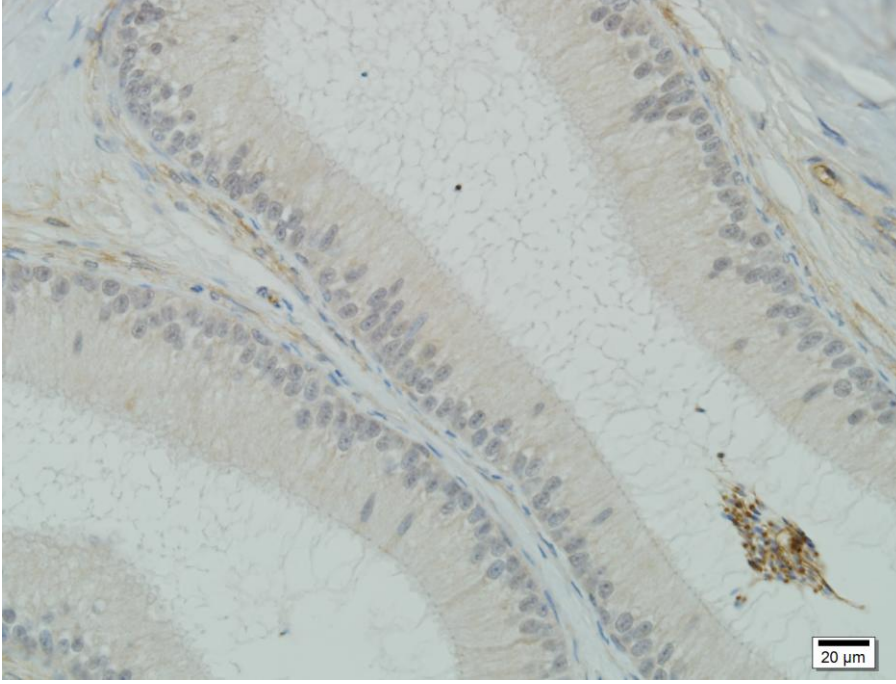


Şekil 14. Duktus epididimisin kauda segmentinde bölüm VI’da TLR4 immunlokalizasyonu.

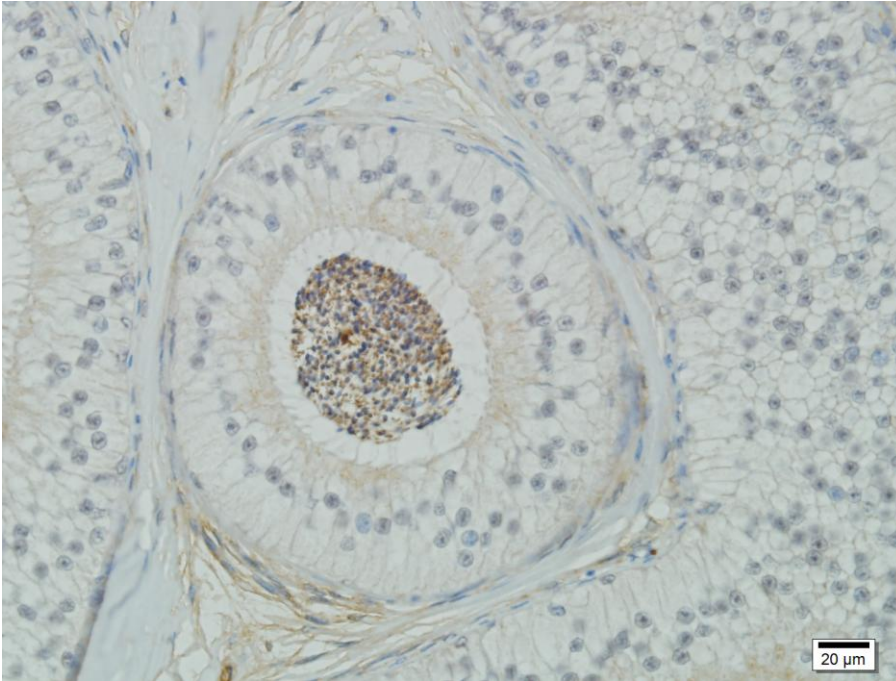


Şekil 15. Vaz deferens’de TLR4 immunlokalizasyonu.

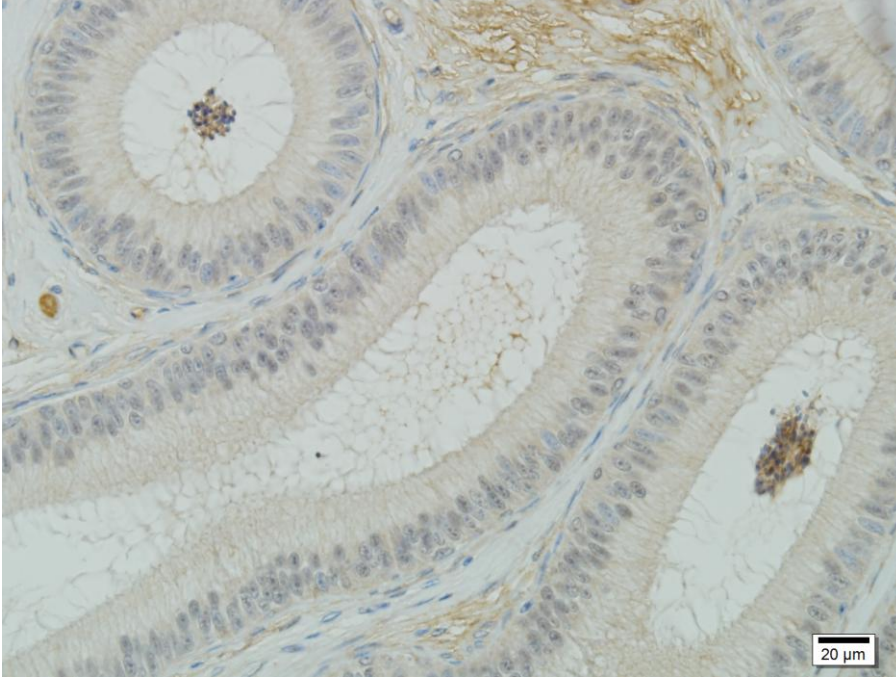
TLR5 immunreaksiyonunun epididimisin I., II., III. ve IV. bölümlerinde prinsipal hücrelerde zayıf sitoplazmik olduğu tespit edildi. Bölüm V’de sitoplazmik reaksiyonun artarak zayıftan orta dereceye doğru değiştiği aynı zamanda hücrelerin lateral membranlarında yerleştiği gözlenirken epididimisin VI. bölümünde ve vas deferensde orta dereceli bir sitoplazmik ve membransel reaksiyonun yanı sıra kuvvetli nüklear reaksiyonun varlığı dikkati çekti. Epididimisin tüm bölümlerinde peritubuler miyoid hücrelerde vas deferensin tunika muskularisini oluşturan düz kas hücrelerinde de orta dereceli TLR5 immunreaksiyonu gözlemlendi. Bunun yanı sıra epididimis ve vas deferensin etrafındaki interstisyel bağdokudaki kan damarlarının endotel katmanlarında da pozitif TLR5 immunreaksiyonu görüldü.



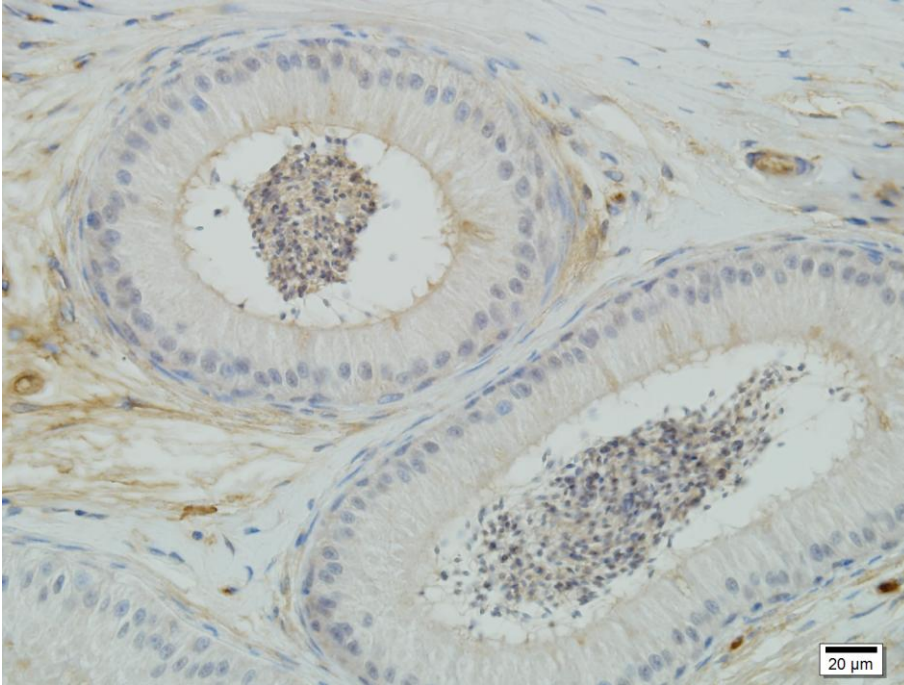
Şekil 16. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm I’de TLR5 immunlokalizasyonu.



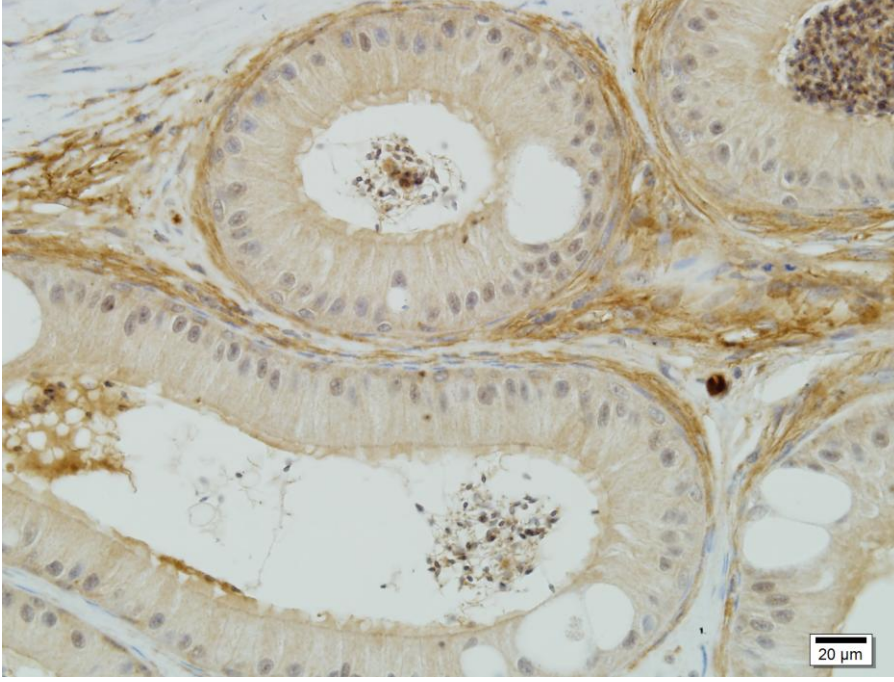
Şekil 17. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm II’de TLR5 immunlokalizasyonu.



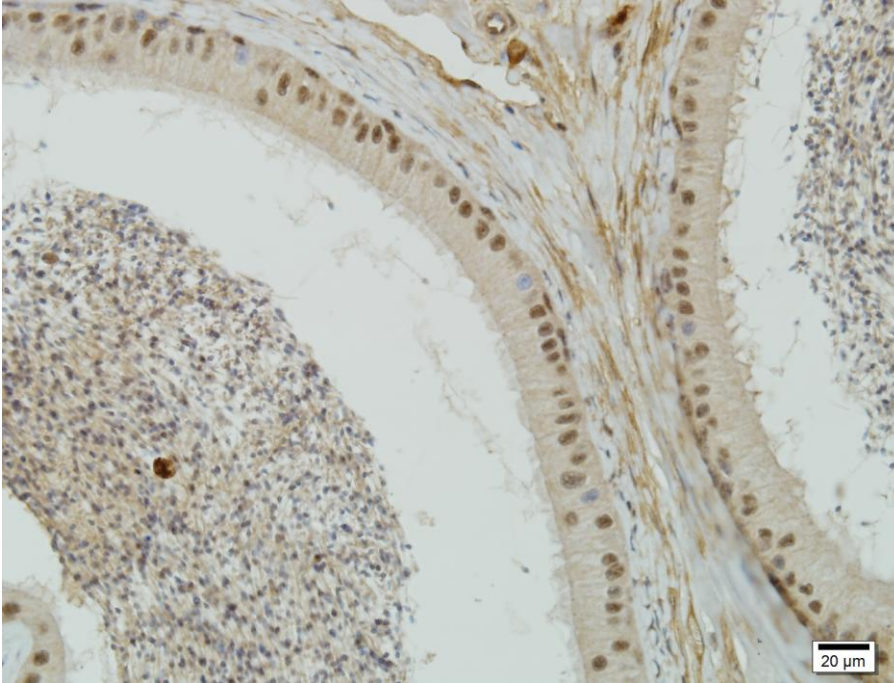
Şekil 18. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm III’de TLR5 immunlokalizasyonu.



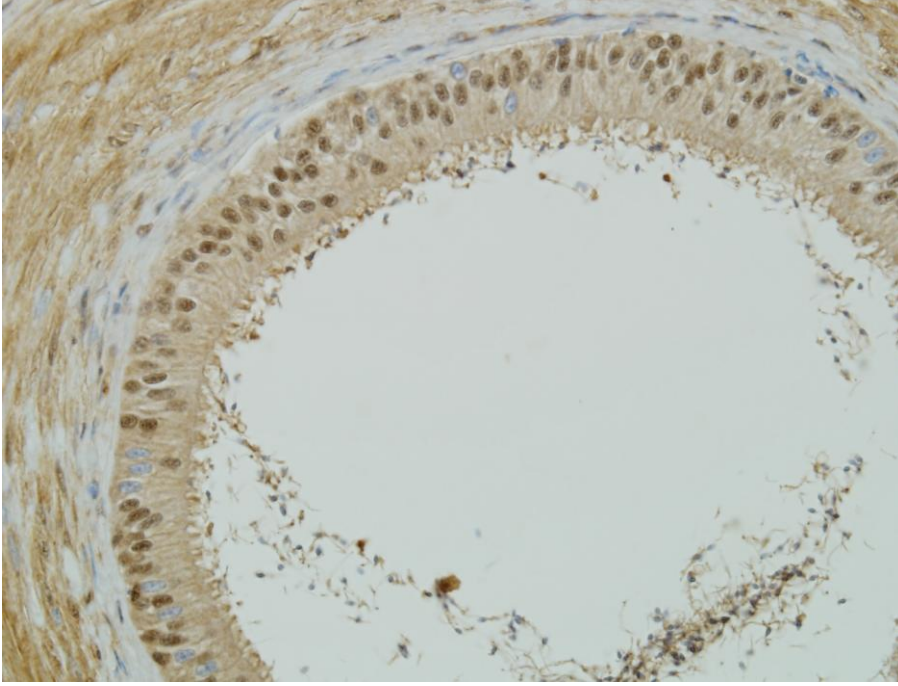
Şekil 19. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm IV’de TLR5 immunlokalizasyonu.



Şekil 20. Duktus epididimisin korpus segmentinde bölüm V’de TLR5 immunlokalizasyonu.

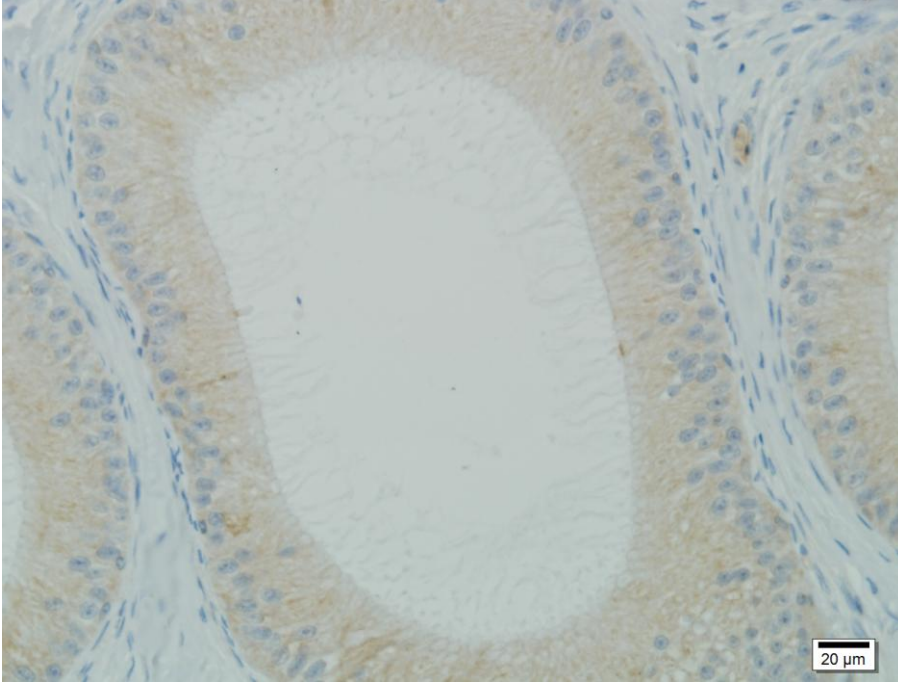


Şekil 21. Duktus epididimisin kauda segmentinde bölüm VI’da TLR5 immunlokalizasyonu.

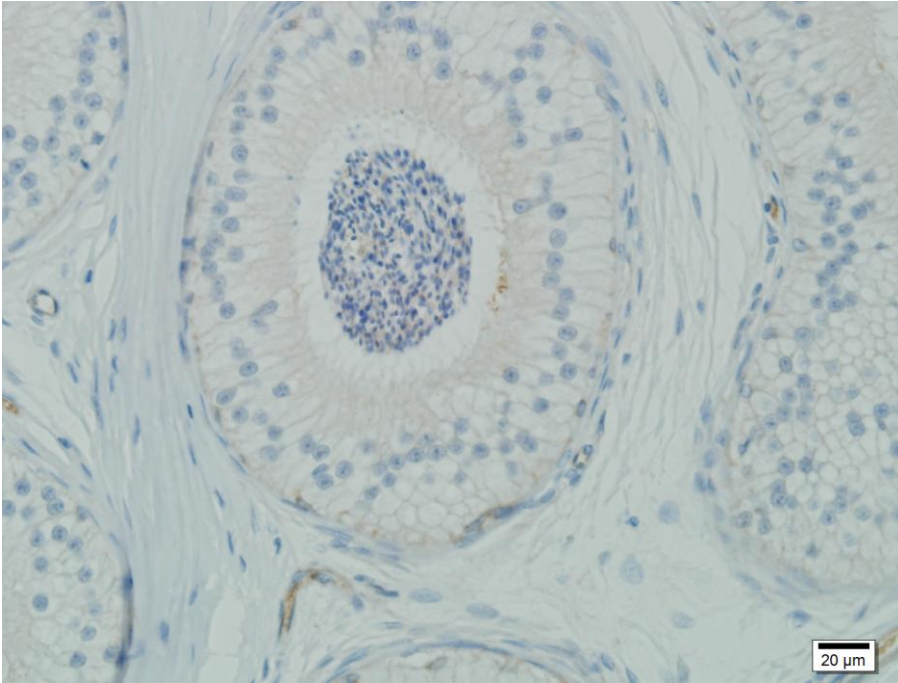


Şekil 22. Vaz deferens’de TLR5 immunlokalizasyonu.

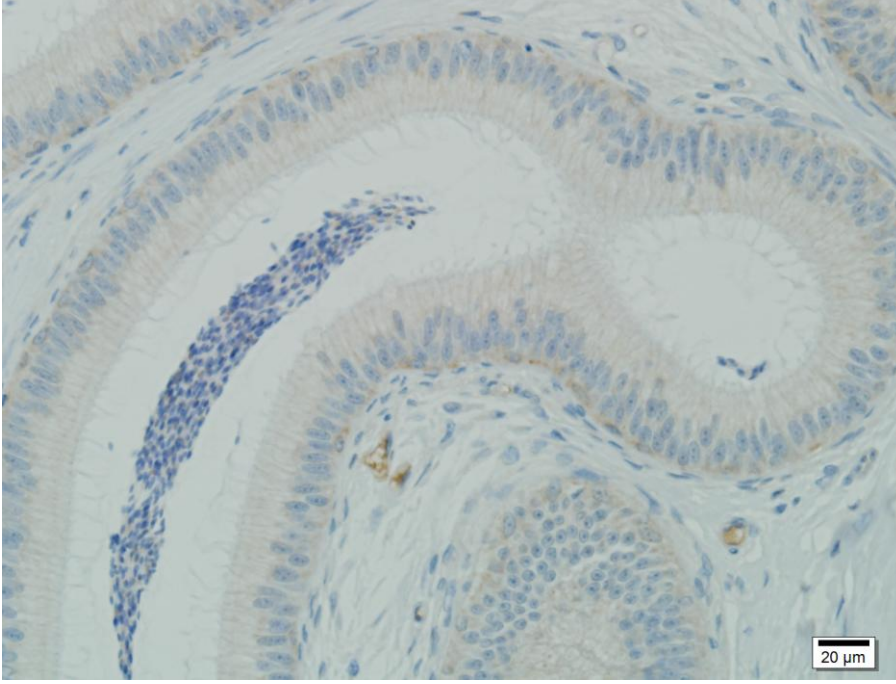
TLR9 immunreaksiyonunun epididimisin tüm bölümlerinde ve vas deferensde prinsipal hücrelerde zayıf sitoplazmik ve membransel yerleşim gösterdiği tespit edildi. Ayrıca TLR9’un epididimis ve vas deferensi örten epitelde bazal membran üzerine yerleşmiş bulunan bazal hücrelerde kuvvetli reaksiyon sergilediği tespit edildi. TLR9 pozitif bazal hücrelerin sayısının epididimisin I., II. ve III. bölümlerde oldukça az olduğu, IV. bölümden itibaren arttığı ve vaz deferensde en yüksek orana ulaştığı görüldü. Vas deferensin tunika muskularisini oluşturan düz kas hücrelerinde de zayıf sitoplazmik TLR9 immunreaksiyonu gözlemlendi. Bunun yanı sıra epididimis ve vas deferensin etrafındaki interstisyel bağdokudaki kan damarlarının endotel katmanlarında da pozitif TLR9 immunreaksiyonu görüldü.



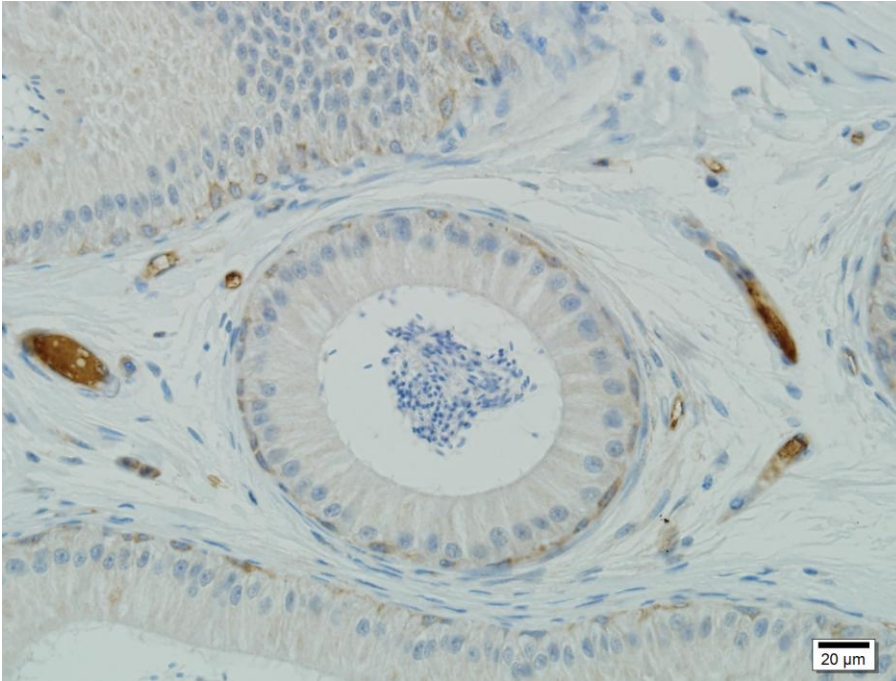
Şekil 23. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm I’de TLR9 immunlokalizasyonu.



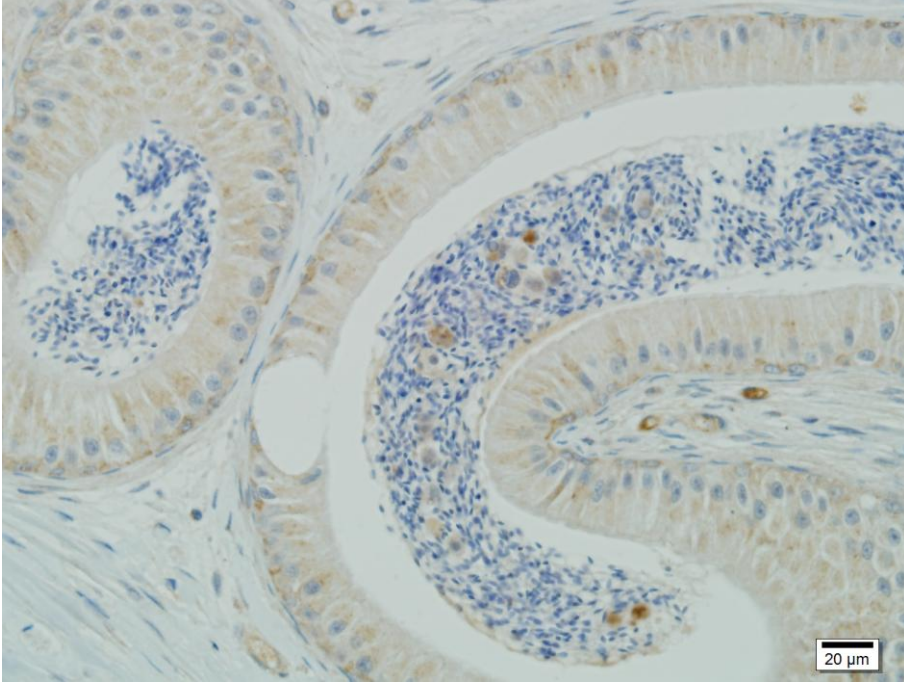
Şekil 24. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm II’de TLR9 immunlokalizasyonu.



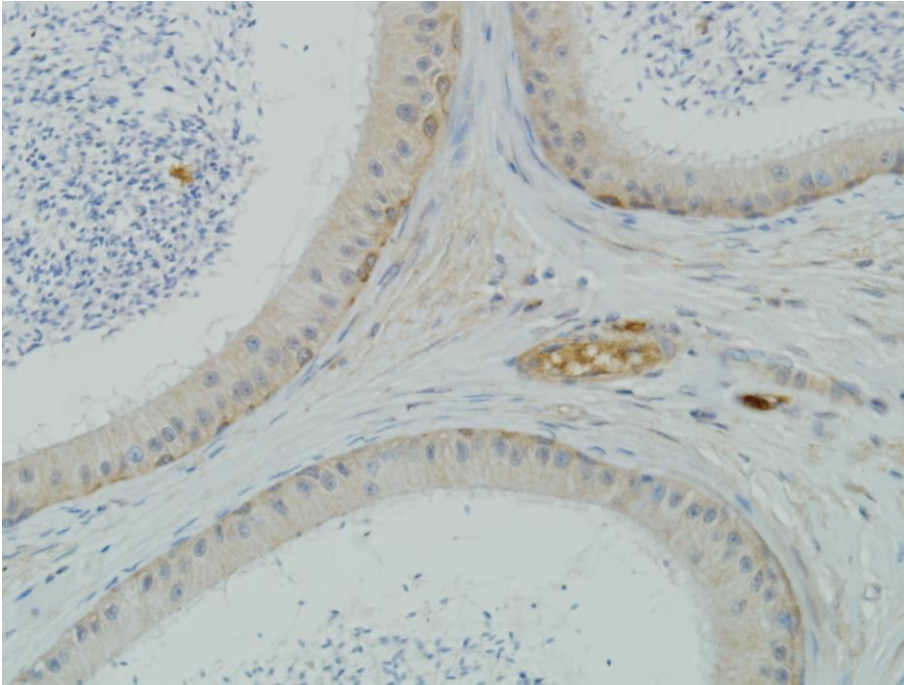
Şekil 25. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm III'de TLR9 immunlokalizasyonu.



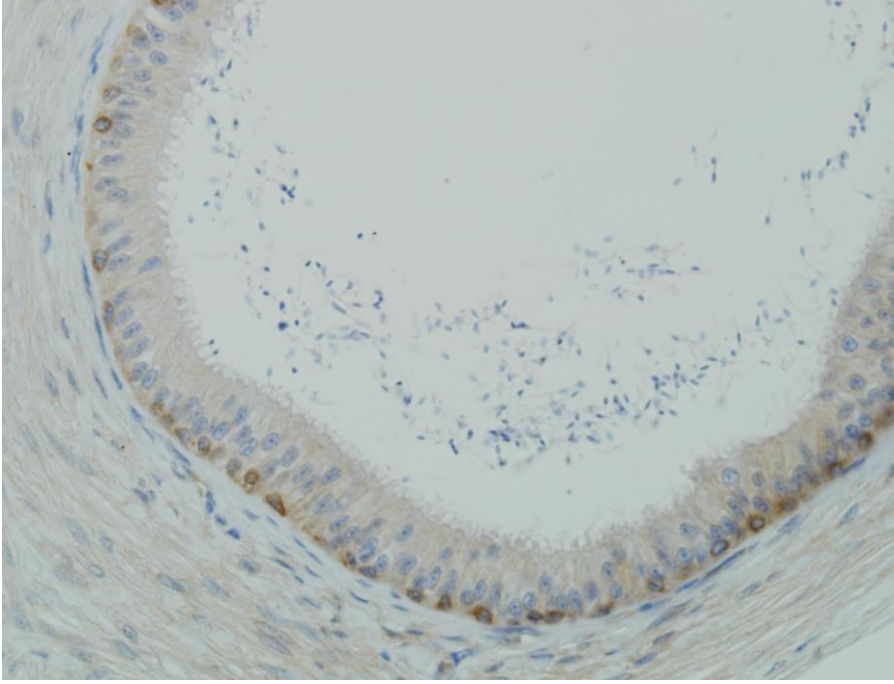
Şekil 26. Duktus epididimisin kaput segmentinde bölüm IV'de TLR9 immunlokalizasyonu.



Şekil 27. Duktus epididimisin korpus segmentinde bölüm V’de TLR9 immunlokalizasyonu.



Şekil 28. Duktus epididimisin kauda segmentinde bölüm VI’da TLR9 immunlokalizasyonu.



Şekil 29. Vaz deferens’de TLR9 immunlokalizasyonu.

4.3. TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9’un spermiyumlardaki immunohistokimyasal lokalizasyonu

Genel olarak epididimis bölümleri ve vas deferens içindeki spermiyumların kuyruklarının incelenen tüm TLR için pozitif reaksiyon sergiledikleri tespit edildi. Epididimisin I., II., III. ve IV. bölümlerindeki spermiyumların boyun bölgesinde yerleşmiş olan proksimal sitoplazmik damlacıklarında TLR2, TLR4, TLR5 immunreaksiyonlarının kuvvetli olduğu gözlenirken TLR9 reaksiyonunun orta derecede olduğu gözlemlendi. Bölüm V ve VI ile vaz deferende bulunan spermiyumların kuyruğun orta prinsipal parçasında yerleşmiş olan distal sitoplazmik damlacıklarda incelenen tüm TLR için zayıf-orta dereceli immunreaksiyonlar dikkati çekti.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

TLR'leri farklı patojenlere karşı doğal immun yanıtı başlatan (Pandey and Agrawal, 2006) ve ayrıca enfeksiyona karşı kazanılmış immun yanıtı da düzenleyen (Pasare and Medzhitov, 2004) anahtar moleküllerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar TLR proteinlerinin insan, sıçan ve horozların epididimisinde eksprese edildiğini ve çeşitli bakteriyel ajanlara karşı epididimis ile ilişkili immun yanıtların oluşturulmasında rol oynadığını ve bu bağlamda TLR proteinlerinin erkek üreme organlarında doğuştan bağışıklık için önemli olduğunu ortaya koymuştur (Palladino et al. 2007; Palladino et al. 2008; Zhao et al. 2008; Zhang et al. 2012; Anastasiadou et al. 2013; Anastasiadou et al. 2011; Saeidi et al. 2013). Sunulan çalışma diğer memelilerde olduğu gibi erkek kedilerde de hem idiyopatik ve hem de non-infeksiyöz nedenlerle inflamasyona açık bir organ olduğu bilinen epididimis ve vaz deferensde TLR2, 4, 5 ve 9'un lokalizasyon ve ekspresyonlarını ortaya koyan ilk çalışmadır. Gerek immunohistokiyasal ve gerekse western blot analiz sonuçları incelenen TLR proteinlerinden TLR2, 4, 5 ve 9'un insan, sıçan ve horozların epididimisinde bildirildiği (Palladino et al. 2007; Palladino et al. 2008; Zhao et al. 2008; Zhang et al. 2012; Anastasiadou et al. 2013; Anastasiadou et al. 2011; Saeidi et al. 2013) gibi kedide de epididimis ve vaz deferens epiteli ile interstisyumun çeşitli bileşenleri ve duktus epididimis ve vaz deferens lumenindeki spermiyumlar tarafından eksprese edildiğini göstermektedir.

Erkek üreme sisteminde her bir organın spermiyumların üretimi, olgunlaşması, depolanması ve emisyonu gibi özelleşmiş rolleri vardır ve her bir organ bölümünün maruz kaldığı mikroorganizma türü de farklıdır. Bu nedenle çalışmaların çoğunun dayandığı hipotez TLR ekspresyonlarının erkek üreme sistemi organlarında farklı olabileceğidir. Örneğin, sıçanlarda RT-PCR ile TLR1-TLR9 mRNA'larının testis, epididimis ve vaz deferensde yüksek düzeylerde, ancak TLR10 ve TLR11 mRNA'larının diğer TLR'inden daha az ifadelendiği ve epididimis kaput, korpus ve kauda bölümlerinde TLR mRNA'larının

ekspresyon düzeylerinin farklı olmadığı gösterilmiştir. Sıçanlarda western blot analiz sonuçları ise TLR proteinlerinden TLR 1, 2, 4, ve 6'nın testis, epididimis bölümleri ve vaz deferensde nispeten eşit miktarlarda eksprese edilirken, TLR 3, 5 ve 9-11'in epididimisinde düşük seviyelerde eksprese edildiğini ve TLR7'nin primer olarak testiste bulunduğunu ortaya koymuştur (Palladino et al., 2007). İnsanda TLR'lerinin erkek genital sistemin epididimisi de içine tüm ögelerinde eşit miktarda eksprese edildiği tespit edilmiş ve tüm ögelerin mikrobik saldırılara karşı spermilerin korunmasına eşit katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Saeidi et al., 2013). Diğer çalışmalarla aynı hipoteze dayanarak hazırlanan bu çalışmada western blot analiz sonuçları TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9 proteinlerinin ekspresyonlarının epididimis bölümleri arasında değişmediğini, ancak TLR2 ve TLR4 proteinlerinin vaz deferensdeki ekspresyonlarının epididimisin özellikle kaput bölgesindeki ekspresyonlarından anlamlı olarak ($P<0.05$) yüksek olduğunu, epididimis ve vaz deferensdeki TLR5 ve TLR9 proteinlerinin ekspresyonlarının ise farklı olmadığını ($P>0.05$) göstermektedir.

Zhao ve ark. (2008) horozlarda epididimisinde TLR2 ve 4'ün eksprese edildiğini, *S. aureus* enfeksiyonundan 24 saat sonra TLR2 ekspresyonunun arttığını, TLR4 ekspresyonunun ise değişmediğini ve TLR'nin epididimal epitel hücrelerinin doğal bağışıklığında anahtar rolleri olduğunu bildirmektedirler. Anastasiadou ve ark. (2013) horozlarda quantitative real-time PCR analiz sonuçlarına dayanarak TLR 2-1, 2-2, 4 and 21 genlerinin ekspresyonlarının yaşlanmaya bağlı bir azalma gösterdiklerini, 28 hafta yaşlı seksüel olarak olgun horozlarda salmonella enfeksiyonu sonrasında TLR 1-2, 2-1, 2-2, 4, 5, ve 7 genlerinin ekspresyonlarında önemli bir artış olduğu, bununla birlikte TLR2-1 geni için bu artışın 10 kat kadar olduğu ifade etmektedirler. Çalışmamızda materyal olarak kullanılan epididimis ve vaz deferensler sağlıklı normal fizyolojik süreçteki kedilere ait olup elde edilen bulgularımız kedi epididimis ve vaz deferensinde TLR proteinlerinin normal fizyolojik koşullarda yapısal olarak eksprese edildiğini ve olası mikrobik saldırılara karşı spermilerin korunmasına katkıda bulunduğunu, ve

ayrıca epididimis ve vaz deferensde TLR proteinlerin ekspresyon düzeylerinin reseptör tipine bağlı olarak farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Memelilerde epididimis prinsipal, bazal, açık, dar, apikal ve halo hücreleri olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşan yalancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülüdür. Epididimal epitel spermiyumun olgunlaşması için lumeni çevreleyen bir immunolojik bariyer oluşturur. Morfolojik olarak kaput, korpus ve kauda segmentlerine ayrılan epididimisin hayvan türlerine göre yapısal farklılıklar gösteren ve bağdoku bölmeleriyle de sınırlanan bölümlere (regiyon) de ayrıldığı ve bu bölümleri örten epitel hücrelerinin farklı gen ekspresyon örnekleri sergiledikleri bilinmektedir (Turner et al. 2003; Jelinsky et al. 2007). Ancak farklı epididimis bölümlerini örten epitel hücrelerinin farklı TLR protein ekspresyon örnekleri sergilediklerine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamız TLR proteinlerinden TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un kedi epididimis ve vaz deferensinde epitel ve interstisyumda sellüler ve subsellüler lokalizasyonunu gösteren ilk çalışma niteliğindedir.

Glover ve Nicander (1971) ve Malqvist (1978) kedilerde epididimisi inisyal, orta veya intermediyer ve terminal segmentlere ayırmıştır. Axnér ve ark. (1999) kedilerde de epididimis morfolojik olarak kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç segmente ayrılırken epididimisi oluşturan duktus epididimisin epitelin morfolojik ve histolojik özelliklerine göre 6 bölüme (regiyon) ayırmış ve her bir bölümün aynı zamanda farklı fonksiyonlar üstlendiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca Axnér (2006) bölüm I, II, III ve IV'ün kaput, bölüm V'in korpus, bölüm VI'nın ise kauda epididimisinde bulunduğunu bildirmiştir. Kedi epididimisinde bölüm I-IV lumeniden sıvı Emilimi ile spermatozoon olgunlaşmasında aktif rol üstlenirken, bölüm V ve VI'nın spermatozoonların depolanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Axnér et al. 1999; Axner 2006). Sunulan çalışmada da kedi epididimisleri öncelikle morfolojik olarak kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç segmente ayrılmış, histolojik incelemeler sonucunda ise

duktus epididimis epitelin yapısal özellikleri dikkate alınarak 6 bölüme (bölüm I-VI) ayrıldı. Çalışma bulgularımız TLR2, 4, 5 ve 9'un TLR'nin kedide epididimis bölümleri ve vas deferens epitellerinde genelde yapısal olarak eksprese olduğunu ve TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un farklı hücresel yerleşimler sergilediği gösterdi. Kedide ve diğer memeli hayvanlarda epididimis bölümlerini örten epitelde ana hücre tipi olan prinsipal hücrelerde TLR2'nin epididimisin I., II., ve III. bölümlerinde hücrelerin supranükleer sitoplazma bölümünde yoğun boyanmış olarak bulunduğu, diğer sitoplazma bölümlerinin zayıf reaksiyon sergilediği görüldü. Bölüm IV, V ve VI'da supranükleer sitoplazmadaki boyanmanın azaldığı ve orta derecede olduğu gözlenirken, vas deferensde de supranükleer sitoplazma bölümünde orta derecede, diğer sitoplazma bölümlerinde ise zayıf pozitif TLR2 immunreaksiyonu tespit edildi. Sıçan epididimisinde TLR2'nin inisiyal segment ile kauda bölümünde zayıf, kaput ve korpus bölümlerinde ve daha yoğun boyanma sergiledikleri bildirilmiş (Palladino et al., 2008) olup çalışma bulgumuz TLR2'nin tür spesifik hücresel lokalizasyona sahip olduğunu göstermektedir.

Epididimide prinsipal hücreler epididimisin tüm bölümlerinde ve vaz deferens epitelinde bulunan hücreler olup en çarpıcı özellikleri sentez, sekresyon ve absorpsiyonla görevli organellerden yana zengin olmaları ve hücrenin bazalinde yerleşmiş çekirdeğe sahip olmalarıdır. Epididimis bölümüne bağlı olarak bu hücrelerin miktarı total epitel hücre popülasyonunun %65-80'inini oluşturur. Aynı zamanda bu hücrelerin yapısal özellikleri ve fonksiyonları da epididimis bölümüne göre farklılık gösterir. Yapısal farklılıklar endoplazmik retikulum (ER), Golgi aygıtı ve salgı granüllerini içine alan sekretorik aparatlarında ve örtülü çukurluklar (coated pits) ve endozomlar, multiveziküler cisimcikler ve lizozomlardan oluşan endositik aparat ile ilişkilidir (Hermo and Robaire 2002). Büyük Cane sıçanlarında inisiyal segmentteki prinsipal hücrelerde granüllü ER'un ve gelişmiş Golgi aygıtının küçük veziküller, multiveziküler cisimcikler ve dense granüllerin apikal sitoplazmada supranükleer konumlu

olarak yerleştiği, kaput epididimisinde prinsipal hücrelerin daha fazla yağ içerdiği, oysa korpus bölümünde çeşitli b y k kteki dens cisimciklerin supran klear bölgede yerleştikleri belirtilmiştir (Adebayo et al. 2016).

Glover ve Nicander (1971) ve Malqvist (1978) kedilerde epididimisi inisyal, orta veya intermediyer ve terminal segmentlere ayırmıştır. Kedilerde inisyal segmentteki prinsipal hücrelerin orta derecede pinositik aktiviteye, az sayıda vakuole ve göze çarpan bir Golgi aygıtına sahip olduğu, orta segmentteki hücrelerin ise belirgin pinositik aktiviteye ve gelişmiş bir Golgi kompleksine, teminal segmentteki hücrelerde ise pinositik aktivitenin az ve Golgi aygıtının da inaktif olduğu bildirilmiştir (Nicander and Malmqvist 1977; Malmqvist 1978; Arrighi et al. 1986). Sunulan çalışmada her ne kadar TLR proteinlerinin subsellüler lokalizasyonları ultrastrüktürel düzeyde incelenmemiş olsa da prinsipal hücrelerin ultrastrüktürel özelliklerinin incelendiği çalışmalara (Nicander and Malmqvist 1977; Malmqvist 1978; Arrighi et al. 1986) ve TLR2'nin monositler, dentritik hücreler gibi hücrelerde Golgi aygıtı (Uronen-Hansson et al. 2004), endozom ve endolizozomlarda (Nilsen et al., 2008) lokalize olduğunu gösteren raporlara dayanarak TLR2'nin kedi epididimis ve vas deferensinde prinsipal hücrelerin supran klear sitoplazmasında yerleşim göstermesi TLR2'nin prinsipal hücrelerin sekretorik ve endositik aparatlarında bulunduğu hipotezi ileri sürülebilir. Ayrıca prinsipal hücrelerin supran klear sitoplazmasındaki TLR2 immunreaksiyonunun I., II., III. ve IV. bölümlerde kuvvetli, V. ve VI. bölümler ile vaz deferensde orta şiddette olduğunu gösteren immunohistokimyasal bulgular ise TLR2'nin kaput epididimisinde gere ekleşen lumenden sıvı emilimi ile spermatozoon olgunlaşması sürecinde aktif rol üstlendiği fikrini destekleyebilir.

Sıçan epididmisinde TLR4 proteinin inisyal segmentten kauda epididimise kadar epididimal epitelde güçlü boyanma sergilediği bildirilirken, TLR4 immunreaksiyonunun epididimis epitelindeki lokalizasyonuna ilişkin bulgularımız I. ve II. bölümlerde prinsipal

hücrelerin lateral membranlarında, stereosilyumlarında ve özellikle II. bölümde apikoluminal sitoplazmada çok dar bir alanda yerleştiği ve orta şiddette olduğu tespit edildi. Bölüm III'de dar sitoplazmalı hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinin de orta derecede TLR4 reaksiyonu sergiledikleri gözlenirken, epididimisin IV. ve V. bölümlerinde epiteldeki reaksiyonunun negatif olduğu tespit edildi. Epididimisin VI. bölümü ve vas deferensde ise epitelin stereosilyumlarla donatılmış olan luminal yüzeyinin güçlü TLR4 reaksiyonu gösterdikleri belirlendi. Yapılan çalışmalar (Hornet et al. 2002) TLR4'ün subsellüler lokalizasyonunun makrofajlarda ve intestinal epitel hücrelerinde farklı olduğunu, makrofajlarda hücre yüzeyinde eksprese edilirken liganda bağlanmasını takiben internal pozisyona geçtiğini, epitel hücrelerinde ise Golgi aygıtının yanında bulunduğunu ortaya koymuştur. Kedi epididimis ve vaz deferensinde TLR4'ün prinsipal hücrelerdeki subsellüler lokalizasyonunun intestinal epiteldekinden ve sıçan epididmisindeki prinsipal hücrelerdekinden farklı yerleşim göstermesi TLR4'ün hücre ve tür spesifik lokalizasyonunun bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Ayrıca, kedide kauda segmentini oluşturan bölüm VI ve vaz deferensde TLR4'ün stereosilyumlardaki immunlokalizasyonu da spermatozonların depolanması sırasında olası mikrobiyel enfeksiyona karşı spermatozonların korunmasında TLR4'ün aktif rol oynadığının göstergesi olabilir.

TLR5 immunreaktivitesinin sıçan epididmisinde inisyal segmentten kauda epididimise kadar epitelde kuvvetli olduğu bildirilmiştir (Palladino et al. 2008). TLR5 kedi epididmisindeki immunlokalizasyonuna ilişkin bulgularımız sıçan epididmisinde bildirilenden farklı olarak epididimisin I., II., III. ve IV. bölümlerinde prinsipal hücrelerde zayıf sitoplazmik olduğunu, bölüm V'de sitoplazmik reaksiyonun artarak zayıftan orta dereceye doğru değiştiğini, aynı zamanda hücrelerin lateral membranlarında yerleştiği gözlenirken epididimisin VI. bölümünde ve vas deferensde orta dereceli bir sitoplazmik ve membransel reaksiyonun yanı sıra kuvvetli nüklear reaksiyonun bulunduğunu gösterdi. Bu bulgu epididmisin kaput ve kauda segmentlerinde ve vaz deferensde spermatozonların

depolanması sırasında olası mikrobiyel enfeksiyona karşı spermatozonların korunmasında TLR5'in kaput segmentine kıyasla daha aktif rol oynadığını ifade edebilir.

Sıçan epididmisinde TLR9 'un inisyel segmentten kaudaya kadar tüm epitelde lokalize olduğu gösterilmiş (Palladino et al. 2008) olmasına karşılık, immunohistokimyasal bulgularımız TLR9 immunreaksiyonunun epididimisin tüm bölümlerinde ve vas deferensde prinsipal hücrelerde zayıf sitoplazmik ve membransel yerleşimli olduğunu göstermektedir.

İnsan dahil tüm memelilerde epididimis ve vaz deferensi örten epitelde bulunan bir diğer hücre tipi bazal hücrelerdir. Bir yarım küre şeklinde olan ve bazal membran üzerine oturmuş olan bu hücrelerin gövdeleri duktus epididimis lumenine ulaşamazla, ancak bazen uzantıları lumene ulaşabilir. Bazal hücrelerin prinsipal hücrelere benzer olarak erişkinlerde bölünmedikleri ve prinsipal hücrelere köken oluşturmadıkları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar bazal hücrelerin ekstratubuler orjinli olduğunu (Holschbach and Cooper 2002), lumendeki spermatoantijenlerine karşı bazı makrofaj antijenelerini eksprese ettikleri için immun hücreler olarak işlev gördükleri ve ayrıca lumendeki sperm sayısının bazal hücre sayısını etkilediğini ve sperm otoantijenlerinin immunsistem ile etkileşimini minimize etmek üzere bazal hücre sayısının arttığını ortaya koymuştur (Seiler et al. 2000). TLR'lerinin epididmisdeki immunlokalizasyonu memelilerden sadece sıçanda gösterildiği halde bu proteinlerin bazal hücrelerde varlığına ilişkin herhangi veri bulunmamaktadır. Çalışmamız kedi epididmis ve vaz deferensinde TLR proteinlerinden TLR2 ve TLR9'un bazal hücrelerde eksprese edildiğini gösteren ilk çalışma niteliğindedir. Immunohistokimyasal bulgularımız TLR2 ve TLR9'un bazal hücrelerde kuvvetli reaksiyon sergilediğini TLR2 ve TLR9 için pozitif olan bazal hücre sayısının epididimisin I., II. ve III. bölümlerde oldukça az olduğunu, ancak IV. bölümden itibaren artarak vaz deferensde en yüksek orana ulaştığını ortaya koymaktadır. Bu bulgular immun hücreler olarak bazal hücrelerin spermin korunmasında TLR2 ve TLR9 'u aracı olarak kullandığını göstermektedir.

Epididimide bulunan bir diğ er hücre tipi dar (kalem) hücrelerdir. Prinsipal hücrelerden daha dar bir sitoplazmaya sahip olan ve ince bir sitoplazma uzantısını bazal membrana ulaştıran bu hücreler sıçan ve farede inisy al ve intermediyer segmentlerde bulunurlar. Dar hücreler endositozda görevli olan ve apikalde yerleşen çanak şekilli veziküller içerirler ve H⁺ iyonlarının apikal plazma membranından lumene aktarımında fonksiyon g r rl r (Hermo and Robaire 2002). Sıçan epididimisinde TLR proteinlerinin tüm epitel hücrelerinde eksprese olduğu bildirilmiş, epiteli oluşturan hücrelerin her birinde bu reseptör proteinlerinin subsellüler lokalizasyonları hakkında bilgi verilmemiştir. Kedi epididimisindeki bulgularımız bölüm 3’de dar sitoplazmalı hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinin de orta derecede TLR4 reaksiyonu sergilediklerini göstermektedir. Sunulan çalışmada gerek duktus epididimisin peritubuler miyoid hücrelerinde ve gerekse vaz deferensin tunika muskularisini oluşturan düz kas hücrelerinde de orta dereceli TLR2 ve TLR5, zayıf dereceli TLR9 immunreaksiyonunun bulunduğu, ayrıca incelenen tüm TLR proteinlerinin interstisyel bağdokuda bulunan kan damarlarının endotel katmanlarında pozitif immunreaksiyon verdiği gözlendi.

Bugüne değin insan (Fujita ve ark. 2011; Saeidi et al. 2013), fare (Mihara et al. 2010; Fujita et al. 2011), sıçan (Palladino et al. 2008), horozda (Das et al. 2011) ve domuzda (Okazaki et al. 2014) yapılan çalışmalar spermiyumlarda TLR’nin ifadelendiğini ve bu nedenle spermiyumların immun hücreler benzeri fonksiyona sahip olabileceklerini ortaya koymuştur. İnsan ve fare spermiyumlarında (Fujita et al. 2011) ve domuzda (Okazaki et al. 2014) TLR2 ve TLR4 mRNA ve proteinlerinin eksprese edildiği, insanda spermiyumun akrozom ve kuyruklarında lokalize olduğu belirlenen bu reseptör proteinlerin bakteriyel endotoksinleri tanıyabildikleri ve apoptoza aracılık ettikleri (Fujita et al. 2011) ileri s r lm ştir. Saeidi ve ark. (2013) insanda testicular spermiyum örneklerinde ve spermiyumda TLR1–10 mRNA’larının eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Mihara ve ark. (2010) fare spermiyumunda TLR9’un eksprese edildiğini ve spermiyumun akrozomal bölgesinde yerleşen

bu reseptörün sperma içindeki patojen virusları tanıma yeteneğinde olduğunu ifade etmişlerdir. Das ve ark. (2011) da horoz spermiyumlarında TLR2-5, TLR-7, TLR-15 ve TLR-21'in eksprese olduğunu saptamışlardır. Sıçanlarda testiküler spermiyumlarda TLR proteinlerinden TLR2-4 ve 7'nin, epididimal taşınma sırasında ise inisyal segmentteki spermatozoonlarda TLR1, 5, 8 ve 11'in eksprese edildiği ve bu TLR'nin epididimal taşınım sırasında spermiyumlara eklenmiş olabileceği ileri sürülmüştür (Palladino et al. 2008). TLR9'un kauda epididimisdeki spermiyumlarda, TLR4'ün testiküler ve inisyal segmentteki spermiyumlarda bulunduğu oysa kauda epididimisdeki spermiyumlarda bulunmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda genel olarak epididimis bölümleri ve vas deferens içindeki spermiyumların kuyruklarının incelenen tüm TLR için pozitif reaksiyon sergiledikleri tespit edildi. Epididimisin I., II., III. ve IV. bölümlerindeki spermiyumların boyun bölgesinde yerleşmiş olan proksimal sitoplazmik damlacıklarında TLR2, TLR4, TLR5 immunreaksiyonlarının kuvvetli olduğu gözlenirken, TLR9 reaksiyonunun orta derecede olduğu gözlemlendi. Bölüm V ve VI ile vaz deferensde bulunan spermiyumların kuyruğun orta prinsipal parçasında yerleşmiş olan distal sitoplazmik damlacıklarda incelenen tüm TLR için zayıf-orta dereceli immunreaksiyonlar dikkati çekti. Bu bulgular spermiyumların epididimisdeki olgunlaşma süreci boyunca TLR proteinleriyle donatıldığının ve spermiyumların fonksiyonel yaşamları boyunca korunabilmesi için bağışıklık ve üreme sistemleri arasında işbirliğinin bulunduğu önemli bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Sonuç olarak kedi epididimis ve vaz deferensinde epitel ile interstisyel doku bileşenlerinin ve epididimal olgunlaşmanın farklı aşamalarındaki spermiyumların normal fizyolojik şartlarda TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9 ile donatılmış olduğu ve bu bağlamda TLR'nin hem epitelin hem de spermiyumların olası herhangi bir patojenik enfeksiyona karşı korunmasında önemli rol oynayabileceği ileri sürülebilir. Bununla birlikte, epididimisdeki immun yanıtta TLR proteinlerinin rollerini belirlemek için epididimisin mikrobiyal içeriğini

değiştirerek TLR proteinlerin ekspresyonlarının inceneceği yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

6. KAYNAKLAR

- Adebayo AO, Akinloye AK, Ihunwo AO, Taiwo VO, Oke BO. (2016) Zonal Changes in the Ultrastructure of the epididymal principal cell of the greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*). *AJVS* 48: 99–106.
- Akira S. (2003) Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 15: 5–11.
- Alexopoulou L, Hold AC, Medzhitov R, Flavell RA. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732–738.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO* 19: 3325–3336.
- Anastasiadou M, Theodoridis A, Avdi M, Michailidis G. (2011) Changes in the expression of Toll-like receptors in the chicken testis during sexual maturation and *Salmonella* infection. *Animal Reproduction Science* 128: 93–99.
- Anastasiadou M, Avdi M, Michailidis G. (2013) Expression of avian β -defensins and Toll-like receptor genes in the rooster epididymis during growth and *Salmonella* infection. *Animal Reproduction Science* 140: 224–231.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9247–9252.
- Armant MA, Fenton MJ. (2002) Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 3: REVIEWS 3011.
- Arrighi S, Romanello MG, Domenighini C. (1986) Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymidis in adult cats (*Felis catus*). *Arch Biol* 97: 7–24.
- Axnér E, Malmqvist M, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. (1999) Regional histology of the ductus epididymidis in the domestic cat. *J Reprod Dev* 45: 151–160.
- Axner E. (2006) Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 66: 14–24.

- Barton GM, Medzhitov R. (2002) Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 81–92.
- Beutler B, Rehli M. (2002) Evolution of the TIR, toll and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 1–21.
- Chuang TH, Ulevitch RJ. (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11: 372-378
- Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Collet D, Jégou B. *et al.* (2003) Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol Reprod* 68: 95–104.
- Cornwall GA, Hann SR. (1995) Specialized gene expression in the epididymis. *J Androl.* 16: 379–383.
- Dacheux J-L, Gatti JL, Dacheux F. (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech.* 61: 7–17.
- Das SC, Isobe N, Yoshimura Y. (2011) Expression of Toll-like receptors and avian β -defensins and their changes in response to bacterial components in chicken sperm. *Poult Sci* 90: 417-425.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. (2005) EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 48: 703–711.
- Dunne A, O’neill LA. (2005) Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 579: 3330–3335.
- Fujita Y, Mihara T, Okazaki T, *et al.* (2011) Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum Reprod* 26: 2799–2806.
- Glover TD, Nicander L (1971) Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J Reprod Fertil* 13: 39–50.

- Gluck T, Silver J, Epstein M, et al. (2001) Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* 6: 351–358.
- Hagley M. (2003) Epididymo-orchitis and epididymitis: a review of causes and management of unusual forms. *Int J STD AIDS* 14: 372–377.
- Haidl G, Allam JP, Schuppe H-C. (2008) Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia*. 40: 92–96.
- Hall SH, Hamil KG, French FS. (2002) Host defense proteins of the male reproductive tract. *J Androl*. 23: 585–597.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H. et al. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526–1529.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T. et al. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology* 3: 196–200.
- Hermo L, Robaire B. (2002) Epididymis cell types and their function. In *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice* (B. Robaire and B. T. Hinton, Eds.), pp. 81–102. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Hinton BT, Palladino MA. (1995) Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech*. 30: 67–81.
- Hinton BT, Palladino MA, Rudolph DB, Lan ZJ, Labus JC. (1996) The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Curr Top Dev Biol* 33: 61–102.
- Holschbach C, Cooper TG. (2002). A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. *Reproduction* 123: 517–525.

- Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. (2002) Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 195: 559–570.
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS, Johnston DS. (2007) The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biol Reprod.* 76: 561–570.
- Kang TW, Lee KH, Piao CZ, Yun KJ, Joo HJ, Park KS, Choi YD, Juhng SW, Choi C. (2006) Three cases of xanthogranulomatous epididymitis caused by *E. coli*. *J Infect.* 54: e69–e73.
- Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. (2008) Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 14: 86–92.
- Li X, Qin J. (2005) Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* 83: 258–266.
- Li P, Chan HC, He B, So SC, Chung YW, Shang Q, Zhang YD, Zhang YL. (2001) An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats. *Science* 291:1783–1785.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *PNAS* 101: 5598–5603.
- Luzzi GA, O'Brien TS. (2001) Acute epididymitis. *BJU Int* 87: 747–755.
- Malm J, Sørensen O, Persson T, et al. (2000) The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect Immun.* 68: 4297–4302.
- Malmqvist M (1978) Regional cytology of the epididymal duct in the cat. *J Ultrastruct Res* 63: 96 [abstract].
- Medzhitov R, PrestonHurlburt P, Janeway CA. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394–397

- Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135–145.
- Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R. (2006) Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. *Biol Reprod* 75: 651–659.
- Mihara T, Fukumoto K, Okazaki T, Shimada M (2010) Murine Sperm Expresses Toll-Like Receptor (TLR) Family that Responds to the Pathogens Released from Virus, and Decreases Fertilization Ability by the Stimuli. *J Mamm Ova Res* 27: 136–143.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164: 5998–6004.
- Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martinez-Alfaro E, Atienzar M, Ariza J. (2001) Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis* 33: 2017–2022.
- Nicander L, Malmqvist M (1977) Ultrastructural observations suggesting merocrine secretion in the initial segment of the mammalian epididymis. *Cell Tiss Res* 184: 487–490.
- Nilsen NJ, Deininger S, Nonstad U, Skjeldal F, Husebye H, Rodionov D, von Aulock S, Hartung T, Lien E, Bakke O, Espevik (2008) Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol* 84: 280–291.
- Okazaki T, Akiyoshi T, Sato K, Kawabe T, Shimada M. (2014) Cryopreservation of Boar spermatozoa: the curious functions of seminal plasma during freezing or thawing. National Agriculture and Food Research Organization (NARO) International Symposium on Cutting-Edge Reproductive Technologies and Perspectives for their Usage in Swine. June 5, LRI, Tainan, Taiwan ROC. <http://www.angrin.tlri.gov.tw/English/2014NARO/p12-22.pdf>
- Orgebin-crist M.C. (1967) Sperm maturation in rabbit epididymis *Nature*. 206: 816–818.

Palladino MA, Johnson TA, Gupta R, Chapman JL, Ojha P. (2007) Members of the Toll-Like Receptor Family of Innate Immunity Pattern-Recognition Receptors Are Abundant in the Male Rat Reproductive Tract. *Biol Reprod* 76: 958–964.

Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi M-K, Plaska D. (2008) Localization of Toll-Like Receptors on Epididymal Epithelial Cells and Spermatozoa. *American Journal of Reproductive Immunology* 60: 541–555.

Pandey S, Agrawal DK. (2006) Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol* 84: 333–341.

Pasare C, Medzhitov R. (2004) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 6: 1382–1387.

Philbin VJ, Iqbal M, Boyd Y, et al. (2005) Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 114: 507–521.

Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist M-C. The epididymis. In: Knobil E, Neill JD, eds. *Physiology of Reproduction*. 3rd ed. St Louis, MO: Academic Press; 2006: 1071–1148.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. (1998) A family of human receptor structurally related to *Drosophila* Toll. *PNAS* 95: 588–593.

Russo CL, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Pudney J, Anderson D, Gipson IK. (2006) Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. *Hum Reprod*. 21: 2783–2793.

Saeidi S, Shapouri F, Amirchaghmaghi E, Hoseinifar H, Sabbaghian M, Sadighi Gilani MA, Pacey AA, Aflatoonian R. (2013) Sperm protection in the male reproductive tract by Toll-like receptors. *Andrologia* 2013, xx, 1–7, doi: 10.1111/and.12149.

Schaefer TM, Desouza K, Fahey JV, Beagley KW, Wira CR. (2004) Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology* 112: 428–436.

- Seiler P, Cooper TG, Nieschlag E. (2000). Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl* 23: 65–76.
- Sen GC, Sarkar SN. (2005) Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth FR* 16: 1–14.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777–1782.
- Shum WW, Da Silva N, Brown D, Breton S. (2009) Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol* 212: 1753–1761.
- Takeda K, Takeuchi O, Akira S. (2002) Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 8: 459–463.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335–376.
- Takeda K, Akira S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1–14.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. (2002) Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 169: 10–14.
- Tracy CR, Steers WD, Costabile R. (2008) Diagnosis and management of epididymitis. *Urol Clin N Am*. 35: 101–108.
- Turner TT. (1991) Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. *Ann NY Acad Sci*. 637: 364–383.
- Turner T, Bomgardner D, Jacobs J, Nguyen Q. (2003) Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*. 125: 871–887.
- Underhill DM, Ozinsky A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14: 103–110.

- Underhill DM. (2003) Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 33: 1767–1775.
- Uronen-Hansson H, Allen J, Osman M, Squires G, Klein N, Callars RE. (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunol* 111: 173–178.
- Wang Z, Widgren EE, Sivashanmugam P, O’Rand MG, Richardson RT. (2005) Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa. *Biol Reprod* 72: 1064–1070.
- Werling D, Jungi TW. (2003) Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91: 1–12.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. (2000) Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165: 7125–7132.
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, et al. (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 169: 2516–2523.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, et al. (2005) TLR 11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308: 1626–1629.
- Yenugu S, Hamil KG, Radhakrishnan Y, French FS, Hall SH. (2004) The androgen-regulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin. *Endocrinology*. 145: 3165–3173.
- Yudin AI, Generao SE, Tollner TL, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. (2005) Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biol Reprod* 73: 1243–1252.

- Zanich A, Pascall JC, Jones R. (2003) Secreted epididymal glycoprotein 2D6 that binds to the sperm's plasma membrane is a member of the {beta}-defensin superfamily of pore-forming glycopeptides. *Biol Reprod* 69: 1831–1842.
- Zarembek KA, Godowski PJ. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J Immunol* 168: 554–561.
- Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska I, Darewicz B, Darewicz J, Badyda J, Puciło K, Bułhak V, Szczurkowski M. (2000) Role of *Chlamydia trachomatis* in epididymitis. Part I: Direct and serologic diagnosis *Med Sci Monit* 6: 1113–1118.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. (2004) A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303: 1522–1526.
- Zhang M, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y. (2012) Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the testis and epididymis of roosters. *Poult Sci*. 91: 1997–2003.
- Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. (2002) Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Letters* 532: 171–176.
- Zhao Y-T, Guo J-H, Wu Z-L, Xiong Y, Zhou W-L. (2008) Innate immune responses of epididymal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Immunology Letters* 119: 84–90.