



2017

YÜKSEK LİSANS

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

MURAT ÖZTÜRK

T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ (VETERİNER)  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
VHE-2017-0001

**FARELERDE *İN VİTRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO  
TRANSFERİNİN YETİŞKİN AKCİĞER DOKUSUNDA  
TOLL-BENZERİ RESEPTÖR (TLR)-9 EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Murat ÖZTÜRK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Levent KARAGENÇ**

AYDIN 2017

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ (VETERİNER)**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**VHE-2017-0001**

**FARELERDE *İN VİTRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO  
TRANSFERİNİN YETİŞKİN AKCİĞER DOKUSUNDA  
TOLL-BENZERİ RESEPTÖR (TLR)-9 EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Murat ÖZTÜRK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Levent KARAGENÇ**

Sunulan tez çalışması Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17018 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN 2017**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Murat ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer dokusunda toll-benzeri reseptör (TLR)-9 ekspresyonu üzerine etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/06/2017

Üye (T.D.): Prof. Dr. Levent KARAGENÇ

Adnan Menderes Üniversitesi 

Üye: Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI

Adnan Menderes Üniversitesi 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Duygu MUTLUAY

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi 

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, maddi ve manevi desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bana her konuda yol gösteren, değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Levent KARAGENÇ'e; tez çalışması süresince yardımlarını bizden esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI'ya; istatistiksel analizlerdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Mehmet Nurullah ORMAN'a; tez çalışması süresince laboratuvar çalışmalarında bilgi ve yardımlarından dolayı Göksel DOĞAN'a; her zaman maddi ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
RESİMLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Uygulamaları .....	3
2.2. ÜYTE Uygulamalarına Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Sağlık Problemleri.....	4
2.3. ÜYTE Uygulamalarının Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi .....	5
2.4. Akciğer Dokusu.....	6
2.5. Bağışıklık Sistemi.....	8
2.6. Toll Benzeri Reseptörler.....	9
2.6.1. Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı .....	10
2.6.2. Toll Benzeri Reseptörlerin Fonksiyonu ve Özellikleri.....	11
2.6.3. Toll Benzeri Reseptörlerin Ligandları .....	13
2.6.4. Toll Benzeri Reseptörlerde Sinyal Yolakları.....	15
2.6.4.1. MyD88-bağımlı yolak .....	16
2.6.4.2. MyD88-bağımsız yolak (TRIF-bağımlı yolak) .....	17
2.6.5. Toll Benzeri Reseptör 9.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Çalışma Materyali .....	20
3.2. Üçlü Boyama Metodu.....	21
3.3. İmmunofloresan Boyama Metodu .....	21
3.4. Double (Çift)-immunofloresan Boyama Metodu .....	22
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Metodu.....	23

3.6. Western Blot Metodu .....	24
3.7. Total RNA İzolasyonu.....	28
3.8. İzole Edilen Total RNA Örneklerinin Kalitesi .....	28
3.9. Real-Time PCR (qRT-PCR) (Taqman Metodu).....	29
3.9.1. TaqMan Metodu İçin cDNA (Komplementer DNA) Sentezi .....	29
3.9.2. TaqMan Metodu İle Kantitatif Real-Time PCR Analizi .....	30
3.10. İstatistiksel Analizler .....	32
4. BULGULAR .....	33
4.1. Yetişkin Akciğer Dokusunun Genel Histolojik Görüntüsü.....	33
4.2. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde İmmunohistokimya ve İmmunofloresan Boyama Yöntemiyle TLR-9 Ekspresyonunun Belirlenmesi .....	34
4.3. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde Western Blot Tekniğiyle TLR-9 Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	42
4.4. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA Örneklerinin Kalitesinin Belirlenmesi .....	43
4.5. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde Real-Time PCR Tekniğiyle TLR-9 Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	44
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	59
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	78

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µg</b>	: Mikro gram
<b>µl</b>	: Mikro litre
<b>µm</b>	: Mikro metre
<b>nm</b>	: Nano metre
<b>ART</b>	: Assisted reproductive technology
<b>AU</b>	: Arbitrary unit
<b>BCA</b>	: Bicinchoninic acid / Bisinkoninik asit
<b>BCG</b>	: Basil calmette guerin
<b>BSA</b>	: Bovine serum albumin
<b>CpG</b>	: Cytosine phosphate guanosine / Sitozin fosfat guanosin
<b>CpG-DNA</b>	: CpG dinükleotid içeren DNA / CpG motifleri içeren DNA
<b>CpG-ODN</b>	: CpG motifleri içeren oligodeoksinükleotid
<b>DAB</b>	: 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride
<b>DAMP</b>	: Damage-associated molecular pattern / Tehlike-bağlantılı moleküler kalıp
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>ET</b>	: Embriyo transferi
<b>Ig</b>	: İmmunoglobulin
<b>ICSI</b>	: Intracytoplasmic sperm injection / İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IFN-β</b>	: interferon β
<b>IκB</b>	: NF-κB inhibitör protein
<b>IKK</b>	: IκB kinaz
<b>IL</b>	: Interleukin / İnterlökin
<b>IL-1R</b>	: Interleukin-1 receptor / İnterlökin-1 reseptör
<b>IRK</b>	: Interferon regulatory factors / İnterferon düzenleyici faktör
<b>IRAK</b>	: IL-1R associated kinase / IL-1R ilişkili kinaz
<b>IVF</b>	: In vitro fertilization / İn vitro fertilizasyon
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>GAPDH</b>	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<b>GIFT</b>	: Gamete intrafallopian transfer
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide

<b>LRR</b>	: Leucine rich repeat / Lösinden zengin tekrar
<b>MAL</b>	: MyD88 adaptor like protein
<b>MAPK</b>	: Mitogen activated protein kinases / Mitojen-aktive edici protein kinaz
<b>MyD88</b>	: Myeloid differentiation primary response gene
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>NK</b>	: Natural killer / Doğal öldürücü hücreler
<b>NLR</b>	: NOD like receptor / NOD benzeri reseptör
<b>NOD</b>	: Nucleotide binding oligomerization domain
<b>PAMP</b>	: Pathogen associated molecular pattern / Patojene bağlı moleküler kalıp
<b>PRR</b>	: Pattern recognition receptor / Patojen kalıplarını tanıyan reseptör
<b>PMSF</b>	: Fenil metil sülfonil fulorid
<b>RIP</b>	: Receptor interacting protein
<b>RIG-1</b>	: Retinoik asit ile uyarılabilen gen-1
<b>RLR</b>	: RIG-1 like receptor / RIG-1 benzeri reseptör
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>SARM</b>	: Sterile-alpha and armadillo motif containing protein
<b>SDS-PAGA</b>	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
<b>TET</b>	: Tubal embryo transfer
<b>TIR</b>	: Toll/Interlökin-1 reseptör
<b>TLR</b>	: Toll like receptor / Toll benzeri reseptör
<b>TNF-a</b>	: Tümör nekrozu faktörü-a
<b>TRIF</b>	: Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN-β
<b>TRAM</b>	: TRIF-related adaptor molecule
<b>TRAF-6</b>	: TNF receptor associated factors / TNF reseptör ilişkili faktör 6
<b>TAK-1</b>	: TGF-β-activated kinase 1
<b>TAB-1</b>	: TAK-1 binding protein / TAK-1 bağlanma proteini 1
<b>TANK</b>	: TRAF family member-associated NF-κB activator
<b>TBS</b>	: Tris buffer saline
<b>TBST</b>	: Tris buffer saline Twen-20
<b>Th1</b>	: T helper 1
<b>ÜYTE</b>	: Üremeye yardımcı tedavi
<b>WHO</b>	: World health organization / Dünya sağlık örgütü
<b>γHV68</b>	: Gama-herpesvirüs 68
<b>ZIFT</b>	: Zigot intrafallopian transfer

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Akciğer lobları ve bronş dallanması .....	7
Şekil 2. TLR'lerin genel yapısı .....	11
Şekil 3. TLR'lerin lokalizasyonları .....	12
Şekil 4. TLR'lerin sinyal yolları.....	16
Şekil 5. MyD88-bağımsız yolak (TRIF-bağımlı yolak).....	18
Şekil 6. BSA-Protein standart eğrisi .....	25
Şekil 7. Yetişkin akciğer dokusunun genel histolojik görünümü.....	33
Şekil 8. Yetişkin akciğer dokusunda immunohistokimya ve immunofloresan boyama yöntemi ile TLR-9 ekspresyonunun belirlenmesi.....	35
Şekil 9. Yetişkin akciğer dokusunda alveol duvarında TLR-9 ekspresyonu .....	36
Şekil 10. Yetişkin akciğer dokusunda alveol lümeninde TLR-9 ekspresyonu.....	37
Şekil 11. Yetişkin akciğer dokusunda damar çevresi ve damar lümeninde TLR-9 ekspresyonu .....	38
Şekil 12. Yetişkin akciğer dokusunda hava yollarında TLR-9 ekspresyonu .....	39
Şekil 13. Yetişkin akciğer dokusunda immunohistokimya boyama yöntemi ile TLR-9 ekspresyonu gösteren Tip II pnömosit hücrelerinin belirlenmesi .....	40
Şekil 14. Yetişkin akciğer dokusunda immunohistokimya boyama yöntemi ile TLR-9 ekspresyonu gösteren makrofaj hücrelerinin belirlenmesi .....	41
Şekil 15. Western blot yöntemiyle yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR-9 protein ekspresyonunun belirlenmesi .....	42
Şekil 16. Deneme ve Kontrol gruplarında $\beta$ -aktin geni için ortalama Ct değerleri .....	44
Şekil 17. Deneme ve Kontrol gruplarında GAPDH geni için ortalama Ct değerleri.....	45
Şekil 18. Deneme ve Kontrol gruplarında TLR-9 geni için ortalama Ct değerleri.....	45
Şekil 19. Kontrol grubuna ait TLR-9 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri ...	46
Şekil 20. Kontrol grubuna ait TLR-9 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri ...	47
Şekil 21. Kontrol grubuna ait TLR-9 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri.....	48

## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 1.** Total RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bandlarının agaroz jelde görüntüsü.....44



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> TLR'lerin ekzojen ve endojen ligandları.....	14
<b>Tablo 2.</b> Her bir grup için 60 µg protein içeren total hacim .....	26
<b>Tablo 3.</b> Her bir gruba ait 500 ng total RNA içeren miktarlar.....	29
<b>Tablo 4.</b> 2X reverse transkripsiyon master karışımı .....	30
<b>Tablo 5.</b> Her bir örnek için real-time PCR karışımı .....	30
<b>Tablo 6.</b> TaqMan problemleri .....	31
<b>Tablo 7.</b> Real-time PCR termal döngü protokolü .....	31
<b>Tablo 8.</b> Tüm gruplara ait RNA örneklerinin $A_{260}$ , $A_{280}$ , $A_{260}/A_{280}$ ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri .....	43

## ÖZET

### FARELERDE *İN VİTRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO TRANSFERİNİN YETİŞKİN AKCİĞER DOKUSUNDA TOLL-BENZERİ RESEPTÖR (TLR)-9 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Öztürk M. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Programı (Veteriner) Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

*In vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi başta olmak üzere çeşitli üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) uygulamaları tüm dünyada infertilite tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar, ÜYTE uygulama sonucu dünyaya gelen çocukların normal gebelik ile dünyaya gelmiş çocuklara oranla enfeksiyonlara ve astım gibi alerjik solunum yolları hastalıklarına karşı daha fazla duyarlı olduklarını göstermektedir. Doğal bağışıklık sistemi, patojenlere ve yabancı antijenlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Toll-benzeri reseptörler, doğal bağışıklık sisteminde önemli bir yer tutmaktadır. Bununla birlikte doğal bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olan TLR-9, bakteriyel/viral CpG-DNA'nın algılanmasında ve immün yanıtın şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır. Sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin dönemde akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, bir adet Kontrol grubu ve bir adet Deneme grubuna yer verilmiştir. Kontrol grubu, PMSG+hCG uygulaması yapılmamış olan dişilerin, aynı yaştaki erkeklerle çiftleştirilmelerinden elde edilen yetişkin bireylerden; Deneme grubu ise PMSG+hCG uygulamasını takiben çiftleştirilen dişilerden elde edilen döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen konsantrasyonunda büyütülmesiyle elde edilen, dolayısıyla *in vitro* ortamda gelişen blastosistlerin yalancı gebelere transferiyle elde edilen yavruların büyütülmesiyle elde edilen bireylerden oluşturulmuştur. Elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer dokusunda, dokunun genel histolojik yapısını incelemek amacıyla Crossman'ın üçlü boyama yöntemi uygulanmıştır. Dokularda, TLR-9'un hangi hücreler tarafından eksprese edildiğini belirlemeye yönelik olarak immunohistokimya ve immunofloresan analizleri gerçekleştirilmiştir. TLR-9 ekspresyonunun mRNA ve protein düzeylerinde ekspresyonunu belirlemek amacıyla real-time PCR ve western blot tekniklerinden yararlanılmıştır. İmmunohistokimya/immunofloresan analiz sonuçları, TLR-9'un hava yollarında, alveol duvarında, alveol lümeninde, damar çevresinde, damar lümeninde eksprese edildiğini ve boyanmanın her iki grupta da benzer olduğunu göstermiştir. Western blot

analizlerinden elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9 proteinine ait ekspresyon düzeyinin 1,25 kat arttığını göstermiştir ( $p=0,015$ ). Diğer yandan, real-time PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,38 kat azaldığını göstermiştir ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak elde edilen veriler, TLR-9'un yetişkin farelerde akciğer dokusunda Tip II pnömositler ve makrofajlar da dahil olmak üzere belirli hücreler tarafından eksprese edildiğini göstermekte ve *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonunun değiştirerek akciğer immun yanıtını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Akciğer dokusu, toll benzeri reseptör 9, fare, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi, ÜYTE.



## ABSTRACT

### EFFECT OF *IN VITRO* EMBRYO CULTURE AND EMBRYO TRANSFER ON THE EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR)-9 IN ADULT MOUSE LUNG TISSUE

Öztürk M. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology-Embryology Master of Science Program (Veterinary) Master Thesis, Aydın, 2017.

Various assisted reproductive technologies (ART), mainly *in vitro* fertilization and embryo transfer, are widely used in infertility treatment all over the world. However, recent studies have indicated that children born following ART are more sensitive to infections and allergic respiratory diseases like asthma compared with children born through normal pregnancy. Innate immune system is the first line of defense against pathogens and foreign antigens. It is known that toll-like receptors are an important component of the innate immune system. Among these, TLR-9 plays an important role in the detection of bacterial/viral CpG-DNA and in the establishment of an immune response. The aim of the present study was to examine if there is any effect of *in vitro* embryo culture and embryo transfer on the expression of TLR-9 in adult lung tissue. Two groups were included in the study: The Control group consisted of adult mice obtained through mating of female mice that did not receive PMSG + hCG administration with male mice of the same age. The Experimental group consisted of adults derived from the transfer of *in vitro* produced blastocysts. To this end, fertilized egg cells (zygotes) were cultured under atmospheric oxygen concentration until the blastocysts stage of development, blastocysts were transferred to pseudo-pregnant mice and pups born were reared to adulthood to be included in the Experimental group. Crossman's triple staining method was used to demonstrate the general histological structure of the adult lung tissue. Immunohistochemistry and immunofluorescence methods were used to determine cell types that express TLR-9 in both Control and Experimental groups. In addition to those methods, real-time PCR and western blot techniques were used to determine expression level of TLR-9 at the mRNA and protein levels, respectively. The results of immunohistochemistry/immunofluorescence analyses demonstrated that cells within and around the air ways, epithelium lining the alveoli and blood vessels express TLR-9 and that the pattern of staining was similar between the two groups. Results obtained from western blot analysis indicated that the expression level of the TLR-9 protein in the Experimental group was 1.25 fold higher compared to the Control group (p=0,015). On the other hand, real-time PCR analyses demonstrated that the expression of

TLR-9 transcripts decreased 1.38 fold in the Experimental group when compared to the Control group ( $p>0,05$ ). Taken together, results obtained from the present study demonstrate that TLR-9 is expressed in certain cell types including Type II pneumocytes and macrophages in the adult lung tissue and suggest that *in vitro* embryo culture and embryo transfer may affect the immune response of the lung by altering expression of TLR-9.

**Keywords:** Lung tissue, toll like receptor 9, mouse, *in vitro* embryo culture and embryo transfer, ART.



# 1. GİRİŞ

İnfertilite, üreme çağına gelmiş çiftlerin on iki ay boyunca korunmaksızın cinsel ilişkiye girmelerine rağmen çocuk sahibi olamamaları durumu olarak tanımlanmaktadır (Cloonan ve ark, 2007). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen infertilite, üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkilemektedir (Cloonan ve ark, 2007; Nayak ve ark, 2013). Günümüzde infertilite tedavisinde çeşitli üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemleri kullanılmaktadır. ÜYTE yöntemlerinden *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi en yaygın kullanılan yöntemlerdir. İlk tüp bebek olarak tıp tarihine geçen Louise Brown'un doğumunu takiben (1978), ÜYTE uygulamaları giderek tüm dünyada yaygın hale gelmiştir. Günümüzde ÜYTE yöntemi uygulanarak doğan bebek sayısının 6.5 milyona ulaştığı tahmin edilmektedir (Feuer ve Rinaudo, 2017). Söz konusu ÜYTE uygulamalarında gebelik oranını artırmak amacıyla bazı durumlarda birden fazla embriyo transferi yapılmaktadır. Bu durum, çoğul gebelik riskini artırmakta ve buna bağlı olarak erken doğum, düşük doğum ağırlığı, konjenital malformasyonlar gibi çeşitli sağlık sorunlarına sebep olabilmektedir. Ayrıca, ÜYTE uygulamaları sonucu dünyaya gelen çocukların, spontan gebelik sonucu dünyaya gelen çocuklara kıyasla çeşitli sağlık sorunları bakımından daha fazla risk taşıdıkları düşünülmektedir (Spellacy ve ark, 1990; Gardner ve ark, 1995; Basatemur ve ark, 2008). ÜYTE uygulamalarının bağışıklık sistemi üzerinde doğrudan bir etkisinin olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın, yapılan çalışmalar astım ve enfeksiyöz hastalıkların, ÜYTE uygulaması sonucunda dünyaya gelen çocuklarda daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (Ericson ve ark, 2002; Carson ve ark, 2012).

Memelilerde bağışıklık sistemi doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık olmak üzere iki ana unsurdan oluşmaktadır. İlk olarak doğal bağışıklık sisteminin aktive edilmesi ve devamında edinsel bağışıklık sisteminin harekete geçebilmesi için vücudun patojenleri tanıması gerekmektedir. Bu olay, doğal bağışıklık hücrelerinde bulunan patojen kalıplarını tanıyan reseptörler (PRR) aracılığı ile vücuda giren patojenlerin yapısında bulunan patojene bağlı moleküler kalıpların (PAMP) algılanması ile gerçekleşmektedir (Janeway ve Medzhitov, 2002; Akira ve ark, 2006). Bu reseptörlerin (PRR) en geniş ve en kapsamlı olarak incelenen grubunu Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) oluşturmaktadır. TLR'ler mikrobiyal ajanların yapısında bulunan PAMP'ları tanıyarak, yangısal ve immun yanıtın başlatılmasında önemli rol oynamaktadır (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2009). Günümüzde memelilerde tanımlanmış 13 TLR üyesi bulunmaktadır. Bunlardan TLR 1,2,4,5,6 ve 10 hücre yüzeyinde ekspresyon

gösterirken, TLR 3,7,8 ve 9 ise hücre içerisinde ekspresyon göstermektedir (Uematsu ve Akira, 2008; Kumar ve ark, 2011). Ayrıca TLR'lerin aktifleşip hücre içi sinyalizasyonu başlatabilmeleri amacıyla bazı ligandlar ile etkileşime girmeleri gerekmektedir. Bu ligandlar arasında bakteriyel ve viral DNA'larda bulunan metillenmemiş CpG motifleri, TLR-9 tarafından tanınmaktadır. Dolayısıyla TLR-9 bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı konak savunmasının aktifleştirilmesinde ve tip 1 interferon (IFN) gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesinde büyük bir öneme sahiptir (Yao ve ark, 2009; Mogensen, 2009). Yapılan çalışmalar akciğer dokusunda, TLR-9'un konak savunması için önemli rol oynadığını göstermektedir. Örneğin, TLR-9 geni bloke edilmiş (knock-out) farelerin pnömokokal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Albiger ve ark, 2007). Ayrıca, TLR-9 geni bloke edilmiş (knock-out) fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, TLR-9'a bağlı olarak üretilen tümör nekrozu faktörü-a (TNF-a), İnterlökin-6 (IL-6) ve İnterlökin-12 (IL-12) gibi sitokinlerin üretimini saptanabilir bir düzeyde gerçekleştirmediği gösterilmiştir (Hemmi ve ark, 2000).

Solunum sisteminin hayati organlarından biri olan akciğer dokusu geniş bir yüzey alanına sahip olup, gaz değişimi gibi önemli bir fonksiyonu üstlenmektedir. Solunum organları dış ortamla sürekli temas halinde olduğundan, akciğer dokusu sürekli olarak solunan havayla birlikte vücuda alınan patojenlere ve yabancı antijenlere maruz kalmaktadır (Wright, 2003; Martin ve Frevert, 2005). Bu nedenle akciğer dokusu, patojenlerin ve yabancı antijenlerin üstesinden gelebilmek amacıyla koruyucu bağışıklık mekanizmalarını devreye sokmaktadır. Bu savunma mekanizmalarından olan doğal bağışıklık sistemi ve edinsel bağışıklık sisteminin akciğer dokusunun savunmasında önemli işlevleri olduğu bilinmektedir (Whitsett, 2002; Beisswenger ve ark, 2006). Sunulan tez çalışmasının amacı, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin farelerin akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Uygulamaları

Günümüzde toplumunun ihtiyaçlarına paralel olarak gelişen teknolojilerle birlikte gamet ve embriyo kültürünün, tıp, veteriner ve biyoteknoloji uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılması üreme biyolojisine olan ilgiyi artırmıştır. ÜYTE uygulamaları, zirai bilimlerde artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamak ve hayvancılık sektöründe üretim verimliliğini artırmak amacıyla kullanılırken, tıp biliminde ise infertilite tedavisinde kullanılmaktadır (Elder ve Dale, 2000). Son yıllarda infertilite tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmesi ile birlikte, elde edilen bilgiler sayesinde infertilite sorunu daha iyi tanımlanmış ve infertil çiftlerin büyük ölçüde faydalanabileceği çeşitli ÜYTE uygulamalarının geliştirilmesinin yolu açılmıştır (Penzias, 2011). Erkek ve kadın faktörlü ya da her ikisinden kaynaklı bir sorun olan infertilite (Chowdhury ve Chowdhury, 2009), korunmaksızın çiftlerin 12 ay boyunca düzenli olarak cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamamaları olarak tanımlanmaktadır (Cloonan ve ark, 2007). İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tüm dünyayı ilgilendiren bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (Boivin ve ark, 2007).

Günümüzde infertilite tedavisinde çeşitli ÜYTE yöntemleri kullanılmaktadır. Bugüne kadar, tubal embryo transfer (TET), zigot intrafallopian transfer (ZIFT), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), gamete intrafallopian transfer (GIFT), *in vitro* fertilizasyon (IVF), embriyo dondurma, pre-implantasyon genetik tanı (PGT) ve embriyo transferi (ET) gibi çeşitli ÜYTE yöntemleri geliştirilmiştir (Arora, 2014). ÜYTE yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılan *in vitro* fertilizasyon (Tüp Bebek) ve embriyo transferi yöntemlerinde, ovaryumdan toplanan oositlerin bir laboratuvar ortamında uygun koşullar altında sperm ile bir araya getirilmekte ve fertilizasyon sonucu oluşan embriyolar belirli bir gelişim aşamasında anne adayının uterusuna transfer edilmektedir (Saxena, 2013).

Tüp bebek yöntemi, öncelikle çeşitli hayvan türlerinde uygulanmış ve önemli başarılar elde edilmiştir (Bavister, 2002). İnsan embriyoları ile yapılan çalışmalarda ise, ilk kez İngiltere’de Dr. Steptoe, Dr. Edwards ve ekip arkadaşları tarafından *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi yöntemi uygulanarak gebelik elde edilmiş ve dünyanın ilk tüp bebeği olan Louise Brown'nun 25 Temmuz 1978’de başarılı bir şekilde doğumu gerçekleştirilmiştir (Edwards ve Steptoe, 1978). Başarı ile sonuçlanan bu olayı takiben *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi çalışmaları hızla artış göstermiştir. ÜYTE yöntemleri sonucu doğan bebek sayısının tüm dünya genelinde 6.5 milyona ulaştığı tahmin edilmektedir (Feuer ve Rinaudo,

2017). Ülkemizde ilk *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi çalışmaları 1988 yılında Ege Üniversitesinde Prof. Dr. Refik Çapanoğlu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş ve *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi işlemleri sonucunda ülkemizin ilk tüp bebeği 16.04.1989 tarihinde dünyaya gelmiştir (WEB\_1, 2017). Bu gelişmelerin ışığında tüp bebek merkezlerinin sayısı da her geçen gün artış göstermektedir (Sadeghi, 2015). Ülkemizde 2014 verilerine göre 146 adet tüp bebek merkezinin faaliyet gösterdiği ve her yıl yaklaşık 45 bin çiftin ÜYTE için başvuruda bulunduğu bildirilmiştir (Güngör ve Beji, 2015).

## 2.2. ÜYTE Uygulamalarına Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Sağlık Problemleri

ÜYTE uygulamalarında kullanılan birçok yapay yöntem, ÜYTE ile dünyaya gelmiş çocukların spontan gebelik sonucu dünyaya gelen çocuklardan daha fazla sağlık riskine maruz kalabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. ÜYTE işlemleri sırasında, ovülasyon indüksiyonu için çeşitli ilaçların kullanılması, gametlerin toplanması, embriyoların *in vitro* ortamdaki kültürü ve dondurulması ve daha sonra çözdürülmesi gibi birçok işlem gametlere ve embriyolara zarar verebilmektedir (Lu ve ark, 2013). Nitekim, çeşitli hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, *in vitro* ortamda yapılan işlemlerin gametlere ve embriyolar üzerinde ek bir strese neden olduğunu göstermektedir (Giritharan ve ark, 2007). Daha da önemlisi, implantasyon öncesi dönemde oluşan stres, prenatal ve postnatal gelişimi de etkileyebilmektedir (Farin ve ark, 2004; Ceelen ve ark, 2008).

İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen verilere göre, ÜYTE uygulamalarının erken embriyogenez aşamasındaki genomun epigenetik özelliklerini etkileyebileceği ve doğum kusurlarına neden olabileceği belirtilmektedir (DeBaun ve ark, 2003). Gerçektende, ÜYTE uygulamalarına bağlı olarak doğan bireylerde imprinting özelliği gösteren genlerin ekspresyonunun değişebildiği ve Beckwith-Wiedemann sendromu, Prader-Willi sendromu ve Angelman sendromu gibi ender görülen çeşitli genetik hastalıkların ortaya çıkma oranının arttığı bildirilmiştir (Falls ve ark, 1999; DeBaun ve ark, 2003; Weksberg ve ark, 2003). Ayrıca Gicquel ve ark (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, ÜYTE uygulamalarının, 11p15 lokusundaki imprinting genlerin mutasyonuna yol açtığını ve aşırı büyüme sendromu olarak bilinen Beckwith-Wiedemann Sendromu insidansını artırdığını belirtmişlerdir. Cox ve ark (2002) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemiyle dünyaya gelmiş iki çocukta Angelman Sendromu geliştiğini bildirmişlerdir.

ÜYTE ile dünyaya gelen çocuklar arasında otizm teşhisi konan çocuk sayısında ciddi bir artış olduğu rapor edilmiştir (Fountain ve ark, 2015). Ayrıca, ÜYTE uygulamaları sonrası doğan çocukların kanser riski bakımından daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Källén ve ark, 2010). Moll ve ark (2003), yapmış oldukları bir çalışmada, ÜYTE uygulaması sonucunda doğan çocuklarda göz kanseri olarak bilinen retinoblastoma riskinin arttığını bildirmişlerdir.

ÜYTE uygulamalarında gebelik oranını en üst düzeye çıkarmak amacıyla bazı durumlarda birden fazla embriyo transferi yapılmaktadır. Fakat bu uygulama çoğul gebelik riskini artırmaktadır (Schieve ve ark, 1999). Çoğul gebelikler ise erken doğum, düşük doğum ağırlığı, konjenital malformasyon, fötüs ve bebek ölümleri ve gebelikle ilgili diğer komplikasyonlara neden olabilmektedir (Gardner ve ark, 1995; Spellacy ve ark, 1990). Ayrıca, düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde yetişkin dönemde, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi problemlerin görülme riskinin daha fazla olabileceği belirtilmektedir (Valdez ve ark, 1994; Curhan ve ark, 1996; Barker ve ark, 2002). ÜYTE uygulamaları sonucu oluşan gebeliklerde erken doğum oranının daha yüksek olduğu kabul edilmektedir (Koivurova ve ark, 2002; McGovern ve ark, 2004; Wisborg ve ark, 2010). Bu durum, normal doğum sonucu dünyaya gelen çocukların aksine ÜYTE uygulamaları sonucu doğan çocukları, solunum yolu enfeksiyonlarına karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Koivurova ve ark, 2002). Ayrıca, erken doğumun respiratuar sinsityal virus enfeksiyonu ve kronik akciğer hastalığı için büyük bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Law ve ark, 2002).

Söz konusu ÜYTE uygulamalarına yönelik yapılan birçok epidemiyolojik çalışmada, doğum öncesi olayların, organların gelişiminde ve işlevlerinde kalıcı değişikliklere neden olabildiğini ve bu nedenle yaşamın ilerleyen dönemlerinde de hastalıklara neden olabileceğini ortaya koymaktadır (Ceelen ve ark, 2008).

### **2.3. ÜYTE Uygulamalarının Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi**

Yukarıda da bahsedildiği gibi ÜYTE uygulaması sonucunda dünyaya gelen çocukların, spontan gebelik sonucu dünyaya gelen çocuklara oranla daha fazla sağlık riskine maruz kaldıkları yapılan çok sayıda çalışmayla ortaya konmuştur (Shevell ve ark, 2006; Klemetti ve ark, 2006; Basatemur ve ark, 2008; Hediger ve ark, 2013). Ancak, ÜYTE uygulamalarının bağışıklık sistemi üzerinde doğrudan bir etkisinin olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda astım, romatoid artrit ve enfeksiyöz hastalıkları gibi immünolojik kökene sahip hastalıkların, ÜYTE uygulaması sonucu dünyaya gelen çocuklarda daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Ericson ve ark, 2002; Koivurova ve ark, 2007; Carson ve

ark, 2012). Ayrıca yapılan retrospektif bir kohort çalışmasında, ÜYTE uygulaması sonucunda doğan çocukların üst solunum yolu enfeksiyonu, astım ve bronşit gibi enfeksiyöz hastalıklara karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir (National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2013). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, ICSI yöntemiyle elde edilen farelerde pnömoni insidansının arttığı bildirilmiştir (Fernández-Gonzalez ve ark, 2008). Ayrıca, Kettner ve ark (2015)'nin yaptığı bir çalışmada, ÜYTE uygulanmasından önce gametlere ve embriyolara yönelik yapılan mekanik ve hormonal manipülasyonların bazı epigenetik değişikliklere neden olduğunu, bu epigenetik değişikliklerin bağışıklık sistemini etkileyebileceğini ve çeşitli hastalıklara karşı direnci azaltabileceğini bildirmişlerdir.

Konuyla ilgili olarak Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından yürütülen TÜBİTAK projesinden (Proje no: 112O259) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen farelerde fetal dönemde akciğer dokusunda doğal bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından birisini oluşturan Toll-benzeri reseptörlerden TLR-2, -3, -4, -5, -7, -8, -9 ve -13 genlerine ait mRNA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını göstermiştir.

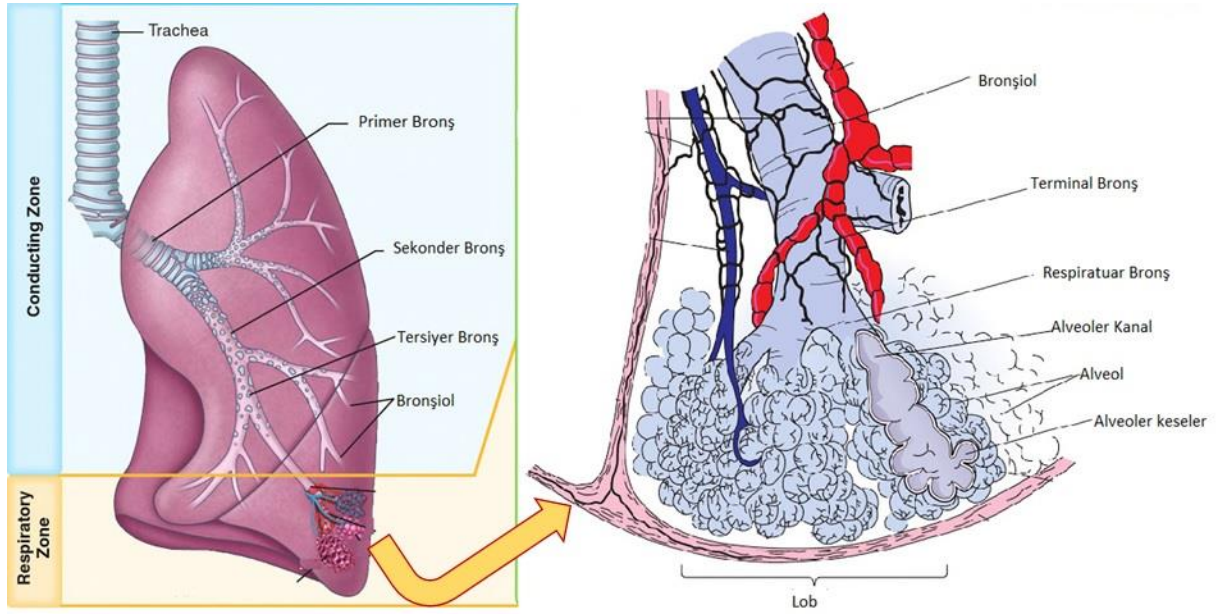
Bütün bu veriler ışığında, ÜYTE uygulamaları sonucunda dünyaya gelen bebeklerin bağışıklık sistemlerinin tam olarak gelişmemiş olabileceği ve buna bağlı olarak çeşitli enfeksiyöz ve alerjik hastalıklara karşı daha duyarlı olabileceği düşünülmektedir.

## 2.4. Akciğer Dokusu

Solunum sistemi organları, embriyonik dönemde ön bağırsağın ventral duvarından gelişir ve bu bölgede iki primer akciğer tomurcuğu şekillenir. Bu olay farelerde 9,5. embriyonik günde (E9.5), insanda ise 28. günde meydana gelir (Morrisey ve Hogan, 2010). İnsanlarda primer akciğer tomurukları daha sonra sağ akciğere üç, sol akciğere iki ana bronş ile dallanırlar ve böylece sağda üç lob ve solda iki lob meydana gelir (Kumar ve ark, 2012). Farelerde insanlardan farklı olarak sağda dört lob (kraniyal, medial, kaudal ve aksesuar lob), solda ise bir akciğer lobu bulunmaktadır (Chao ve ark, 2014).

Akciğer dokusunun gelişim süreci içerisinde sağ ve sol ana bronşlar ikili olarak dallara ayrılır ve daha fazla dallanarak küçülen, bronşiyol adı verilen iletici hava yollarını oluştururlar. Bronşiyoller, duvarlarında kıkırdak ve submukozal bezlerin bulunmaması açısından bronşlardan farklılık gösterirler. Bronşiyoller ek dallanmalar meydana getirerek terminal bronşiyoller meydana getirirler. Terminal bronşiyollerin distalinde bulunan akciğer bölgelerine asinüs adı verilir. Pulmoner asinuslar respiratuar bronşiyollerden oluşur. Respiratuar

bronşiyoller de alveolar keselere dallanırlar. Alveoler keseler, duvarları (alveoler septum) alveollerden oluşan ve gaz değişiminin yapıldığı solunum yollarının kör uçlarıdır. Bu kör uçları şekillendiren alveolar septumlar, iki komşu alveolün duvarında gaz değişimi için geniş bir yüzey alanı sağlarlar. Alveoler epitelde, yassı biçimli Tip I pnömosit hücreleri ve yuvarlak ya da kübik biçimli Tip II pnömosit hücreleri bulunur. Tip I ve Tip II pnömositlerin çevrelediği alveoler boşlukta ise çoğunlukla serbest halde dolaşan alveoler makrofajlar yer alır (Kawanami, 1994; Kumar ve ark, 2012; Krstic, 2013).



**Şekil 1.** Akciğer lobları ve bronş dallanması (Rizzo, 2015; Porcari ve ark, 2015).

Akciğer dokusunun en önemli fonksiyonu vücut ile dış ortam arasında gaz alış-verişini gerçekleştirebilmesidir. Dolayısıyla akciğer dokusu, sürekli olarak dış ortamdan alınan havayla birlikte gelen patojenlere ve çeşitli yabancı maddelere maruz kalmaktadırlar (Morrisey ve Hogan, 2010). Bu nedenle vücudun kendini koruyabilmesi amacıyla çeşitli savunma mekanizmalarının harekete geçmesi gerekmektedir. Bu savunma mekanizmalarından doğal ve edinsel bağışıklık sistemi akciğer dokusunda, yabancı maddelerin ve patojenlerin yok edilmesinde hayati bir rol üstlenmektedir (Whitsett, 2002; Beisswenger ve ark, 2006).

## 2.5. Bağışıklık Sistemi

Omurgasızlar, bitkiler ve omurgalıları gibi tüm çok hücreli organizmalar evrimleri boyunca mikrobiyal enfeksiyonlara karşı kendilerini savunmak ve aynı zamanda hasarlı hücreleri yok etmek amacıyla çeşitli savunma mekanizmaları geliştirirler (Abbas ve ark, 2012). İlk olarak geliştirdikleri savunma mekanizmaları organizmalarda doğal olarak bulunmaktadır. Ayrıca yabancı mikroorganizmalarla birlikte ölü hücreleri de tespit edebilen ve yok etmeye hazır halde bulunan yapılardır. Bundan dolayı bu savunma mekanizmalarına doğal bağışıklık adı verilmektedir (Abbas ve ark, 2012).

Mikroorganizmaların vücuda girişini önleyen deri, ürogenital yollar, sindirim ve solunum sistemlerinin mukoza epitel bariyerleri, kompleman proteinleri, doğal öldürücü hücreler (NK), miyeloid kökenli hücreler [granülositler (eozinofiller, bazofiller ve nötrofiller) ve agranülositler (monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler)], inflamasyonun düzenlenmesinde rol alan sitokinler, kemokinler ve plazma proteinleri doğal bağışıklık sisteminin başlıca bileşenlerini oluşturmaktadır (Doan ve ark, 2012).

Doğal bağışıklık sistemi mikroorganizmalarla mücadelede ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Kielian ve ark, 2009). Doğrudan zararlı mikroorganizmaları etkili bir şekilde hedef alan bu sistem, enfeksiyonları kontrol altına alabilme ve gerektiğinde ortadan kaldırabilme yeteneğine sahiptir (Abbas ve ark, 2012). Ancak, bazı durumlarda enfeksiyonla başa çıkılamaz ve bu nedenle edinsel bağışıklık sisteminin aktif hale getirilmesi gerekmektedir. Bu durumlarda doğal bağışıklık sistemi, edinsel bağışıklık sistemine istilacı mikroorganizmalara karşı mücadele etmek amacıyla çeşitli sinyaller gönderir (Janeway Jr ve Medzhitov, 2002).

Edinsel bağışıklık, T lenfositlerin hücre içi patojenlere karşı (hücresel bağışıklık) oluşturduğu bağışıklık yanıtı ve B lenfositlerinin hücre dışı patojenlere ve onların toksinlerine karşı (humoral bağışıklık) oluşturduğu bağışıklık yanıtı olmak üzere genel olarak iki şekilde incelenmektedir (Zachary ve McGavinark, 2013). Doğal bağışıklığın aksine edinsel bağışıklık spesifiktir ve belleğe sahiptir. Antijen ile ikinci kez veya daha sonraki karşılaşmalarında ilk verdiği bağışıklık yanıtından daha hızlı ve daha etkili bir yanıt oluşturur. Edinsel bağışıklık yanıtı, lenfositlerin sahip oldukları antijen reseptörleri aracılığıyla, ilgili antijenin algılanması ile aktive olmaktadır (Abbas ve ark, 2014).

B lenfositlerinde hücre membranı üzerinde bulunan ve immunoglobulin karakterine sahip olan antijen reseptörleri, polisakkarid, lipid, nukleik asit ve protein gibi çeşitli makromolekülleri, çözünür formda ya da hücre yüzeyinde tanıyabilmektedirler. Bu nedenle, B

hücreleri, mikrobiyal kaynaklı hücre duvarı ve çözünebilir antijenlere karşı humoral bağışıklık yanıtı oluşturabilmektedirler (Abbas ve ark, 2012). T hücreleri ise antijen sunan hücreler tarafından kendilerine sunulan antijenik peptit fragmanlarını, yüzeylerinde bulunan spesifik T hücre reseptörleri aracılığıyla tanıyabilmektedir (Alberts ve ark, 2002). Bu nedenle, T hücreleri aracılığı ile oluşan bağışıklık yanıtları sadece konakçı hücreler tarafından üretilen veya konakçı hücreler tarafından alınan protein antijenlerine karşı oluşturulabilmektedir (Abbas ve ark, 2012).

Her ne kadar doğal ve edinsel bağışıklık sistemlerinin görevleri konağı istilacı mikroorganizmalara karşı korumak olsa da birtakım farklılıklara sahip oldukları açıkça görülmektedir. Bu önemli farklılıklardan birisi de bağışıklık sisteminin aktivasyonunda farklı mekanizmaların rol oynamasıdır (Paulsen ve ark, 2013). Doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonunda PRR'ler olarak adlandırılan germ-line kodlu reseptörler önemli rol oynamaktadır. Günümüzde PRR'ler immun yanıt veren hücrelerdeki lokalizasyon ve yapılarına göre dört sınıfta incelenmektedir. Bunlar; Toll benzeri reseptörler (TLRs), Nükleotit bağlayan Oligomerizasyon Domain (NOD) benzeri reseptörler (NLRs), retinoik asit ile uyarılabilen gen 1 (RIG)-1 benzeri reseptörler (RLRs) ve DNA sensörleridir (Goutagny ve ark, 2012). Bunlar arasında, PRR'lerin en çok çalışılan grubu olarak bilinen TLR'ler, enfeksiyonlara karşı konak savunmasındaki rollerinden dolayı önem arz etmektedir (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2009). Dolayısıyla patojenleri tanıma yeteneğine sahip olan TLR'ler, vücudun patojen istilasını nasıl algıladığını ve doğal/edinsel bağışıklık yanıtının nasıl tetiklendiğini anlamamıza büyük ölçüde yardımcı olmaktadır (Janeway Jr ve Medzhitov, 2002; Kawai ve Akira, 2010).

## 2.6. Toll Benzeri Reseptörler

Alman biyolog Christiane Nüsslein-Volhard, 1985 yılında Max Planck Enstitüsü'nde bir meyve sineği olan *Drosophila Melanogaster*'de saptanan bir mutasyonu incelemesi sonucunda, sineğin larvasının vücuduna göre karın bölgesinin az gelişmiş olduğunu fark etmiştir. Bu gözlem üzerine, heyecanla ilk söylediği "büyüleyici", "inanılmaz" anlamına gelen "Das war ja toll!" olmuştur. Bu olayın ardından, Nüsslein-Volhard mutasyona uğramış olan bu gene Toll adını vermiştir. Toll'un keşfi erken embriyogenezi kontrol eden bir dizi genin keşfi sonucunda ortaya çıkmış ve 1995 yılında Alman biyolog Nüsslein-Volhard bu buluşundan dolayı Nobel ödülüne layık görülmüştür (Hansson ve Edfeldt, 2005). Daha sonra yapılan çalışmalarda, Hoffmann ve arkadaşları 1996'da Toll geninden yoksun mutant sineklerin mantar enfeksiyonuna karşı son derece duyarlı olduklarını göstermiştir (Lemaitre ve ark, 1996).

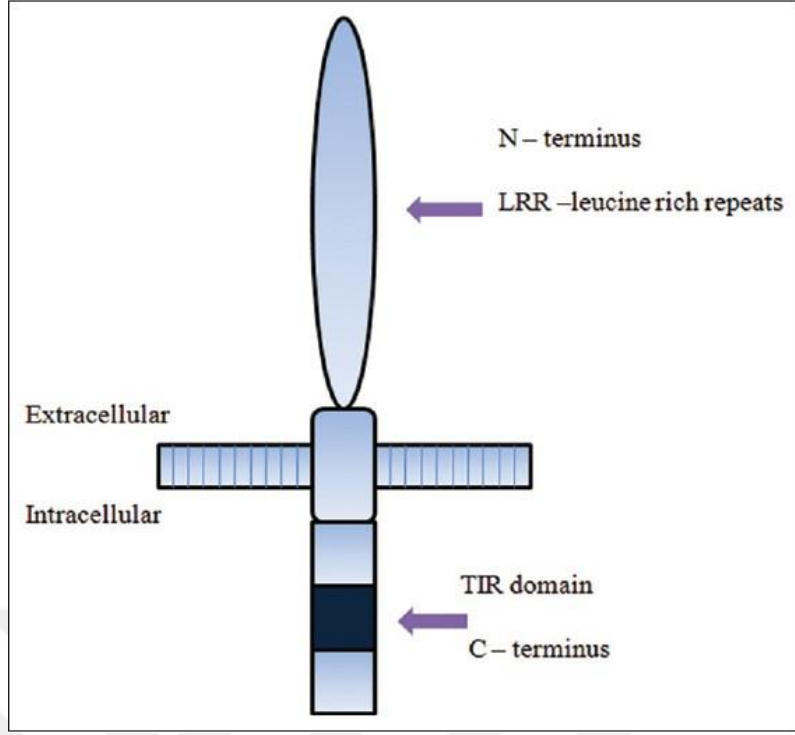
Böylece Jules Hoffmann, Toll'un *Drosophila* da sadece embriyogenez sırasında dorso-ventral polaritede değil, aynı zamanda bağışıklık yanıtında da önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Hansson ve Edfeldt, 2005). Toll geninin memelilerdeki homoloğu ise, ilk kez 1997 yılında Medzhitov ve ark. tarafından tanımlanmıştır (Medzhitov ve ark, 1997).

### 2.6.1. Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı

Interlökin-1 reseptör (IL-1R), *Drosophila* Toll'unun homolojisine sahip olduğu gösterilen ilk protein olarak belirtilmiştir. IL-1R'nin sitoplazmik bölümü *Drosophila* Toll ile benzerlik gösterdiğinden (Toll/Interlökin-1 reseptör) TIR domain olarak isimlendirilir (Takeuchi ve Akira, 2002). Bu nedenle TLR'ler ve IL-1R'ler, TIR domain içeren bir protein ailesi olarak tanımlanmıştır (O'Neill, 2008).

TLR'ler, dendritik hücreler ve makrofajları da kapsayan çok sayıda hücrede ekspresyon gösteren tip 1 transmembran reseptörleridirler. TLR'ler, ekstrasellüler bölgede leucin amino asitinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler bölgede TIR domainin yer almasıyla karakterizedirler (Carpenter ve O'Neill, 2007). TLR'lerin LRR bölgeleri, 20-29 amino asitten oluşan kısa protein modüllerine sahiptir ve ligand bağlamada görev aldıkları düşünülmektedir (Takeuchi ve Akira, 2002).

TLR'lerin intraselüler bölgesinde yer alan TIR domaini, 200 aminoasit içerir ve TIR domainin bir kısmı hücre içi sinyalizasyonda görev alır (Carpenter ve O'Neill, 2007). TIR domaini protein-protein etkileşiminde önemlidir ve bağışıklık sisteminin evrimsel olarak korunmuş yapı taşlarından birisi olduğu kabul edilmektedir (Hans ve Hans, 2011). Ayrıca, TLR'lerin TIR domaini 3 alt gruba ayrılır. Alt grup 1 proteinleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından üretilen interlökin (IL) reseptörleridir ve tüm bu reseptörlerin hücre dışı kısımlarında immunoglobulin (Ig) alanları bulunur. Alt grup 2 proteinleri de klasik bir TLR türü olarak kabul edilirler ve doğrudan veya dolaylı olarak mikrobiyal orijinli molekülleri bağlarlar. Alt grup 3 proteinleri ise, 1. ve 2. alt grupların proteinlerinden gelen sinyallere aracılık eden, özellikle sitozolik olan adaptör proteinlerden meydana gelirler (Frosali ve ark, 2015). Şekil 2'de TLR'lerin genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2. TLR'lerin genel yapısı (Shah ve ark, 2013).

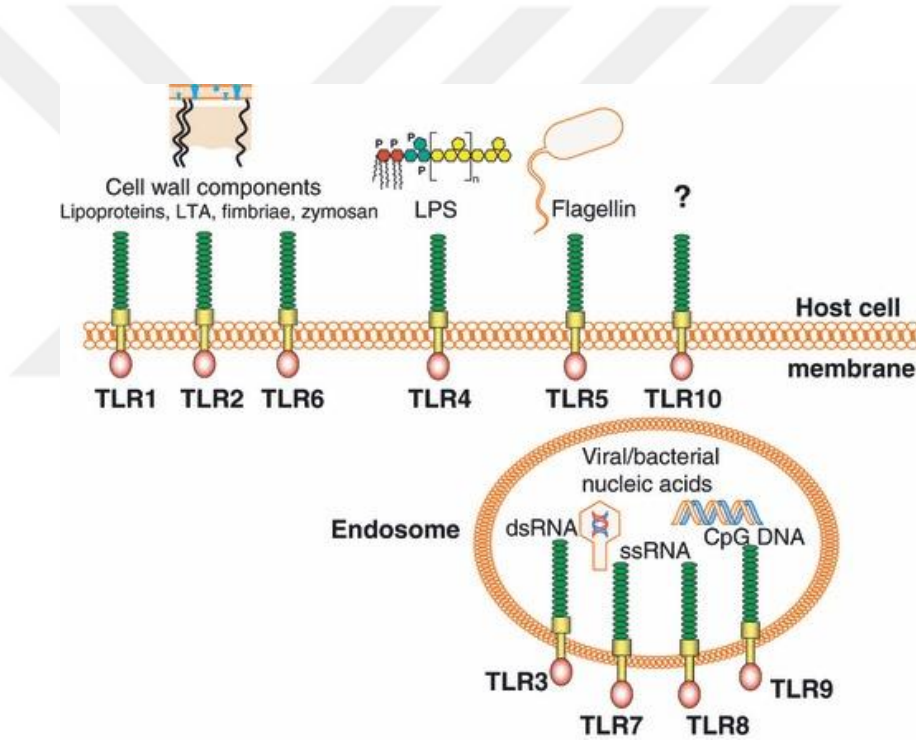
### 2.6.2. Toll Benzeri Reseptörlerin Fonksiyonları ve Özellikleri

TLR'ler, mikrobiyal parçaların belirli kalıplarını tanıyarak doğal bağışıklığın aktivasyonunda önemli bir görev alır (Takeda ve Akira, 2004). Ayrıca TLR'ler bakteri, mantar ve virüsler de dâhil birçok istilacı patojenlere karşı immun cevabın başlamasında çok önemli bir rol oynayan membran reseptör ailesidir. TLR'ler hem doğal bağışıklığın hem de edinsel bağışıklığın temel düzenleyicisi olarak işlev göstermektedirler. Doğal bağışıklık sisteminde, patojenlere karşı ilk yanıt PRR'ler tarafından başlatılır ve PRR'ler, DNA, RNA, bakteriyel toksinler, hücre zarı ve hücre duvarı bileşenleri gibi PAMP'ları bağlama yeteneğine sahiptir (Arancibia ve ark, 2007; Oliviera Nascimento ve ark, 2012).

PAMP'ların tanınmasıyla oluşan doğal bağışıklık yanıtı, kendinden olan (self) ve kendinden olmayan (non-self) arasındaki ayrımı yapabilme özelliğine sahiptir (Carpenter ve O'Neill, 2007). Kendinden olan ile olmayan arasındaki ayrımı yapabilme yeteneği, organizmanın istilacı patojenlere karşı korunmasında ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında son derece önemlidir (Paulsen ve ark, 2013). Ayrıca her bir TLR farklı PAMP'lara yanıt vererek spesifik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (Carpenter ve O'Neill, 2007). PRR'lerin PAMP'ları tanımasıyla birlikte, enfeksiyonla mücadele eden ya da

enfeksiyonu önleyen ve edinsel bağışıklık yanıtını devreye sokan konak savunma mekanizması etkinleşir (Oliviera Nascimento ve ark, 2012).

TLR'ler yapısal özelliklerine ve sekans benzerliklerine göre aynı aile içerisinde gruplandırılmıştır (Muzio ve ark, 2012). Memelilerde TLR ailesi içerisinde, 13 üye tanımlanmıştır (Schauvliege ve ark, 2007). Bu reseptörlerden bazıları [TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10] hücre yüzeyinde ekspresyon gösterirken, diğerleri [TLR 3, 7, 8 ve 9] hücre içi komponentlerde ekspresyon göstermektedir (Kumar ve ark, 2011). Ayrıca, TLR-10 ekspresyonu insanlarda mevcut iken, farelerde TLR-10 ekspresyonu yoktur (Kumar ve ark, 2011). TLR-10 farelerde yalancı gen (pseudogene) olarak kabul edilmektedir (Hasan ve ark, 2005; Lee ve ark, 2014). Yapılan çalışmalar, retroviral insersiyonlara bağlı olarak evrimsel süreçte farelerde TLR-10 geninin kaybolduğunu göstermektedir (Hasan ve ark, 2005).



Şekil 3. TLR'lerin lokalizasyonları (Krauss ve ark, 2010).

TLR üyelerinin pek çoğu doğal bağışıklık hücreleri tarafından eksprese edilmektedirler. Örneğin, patojenlere karşı hızlı cevap tetikleyebilen mast hücreleri, NK hücreleri, dentritik hücreler, monosit/makrofaj ve polimorf nükleer nötrofiller çeşitli TLR'leri eksprese etmektedirler (Hemmi ve Akira, 2005; Adib-Conquy ve ark, 2014). Bununla birlikte yapılan son çalışmalar, çoğu TLR'nin T ve B lenfositlerde, endotel hücrelerinde, epitel hücrelerinde,

keratinositlerde, fibroblastlarda ve kanser hücrelerinde de eksprese edildiklerini göstermektedir (Pegu ve ark, 2008; Miller, 2008; Palladino ve ark, 2008; Chang, 2008; Sato ve ark, 2009).

### **2.6.3 Toll Benzeri Reseptörlerin Ligandları**

Görüldüğü üzere TLR'ler, doğal bağışıklık sisteminin, protozoa, bakteri, mantar ve virüs gibi sayısız patojen tarafından aktif hale getirilmesinde kritik bir tamamlayıcı olarak görev yapmaktadırlar (Liu ve Zhao, 2007). Bu işlevlerini, ligand olarak patojenlerin PAMP'larını tanımakla gerçekleştirirler. Moleküler olarak çeşitlilik gösteren ve ekzojen ligandlar olarak tanımlanan PAMP'lar, nükleik asitler, protein, lipitler ve polisakkaritleri içerirler (Kumar ve ark, 2009). TLR'ler ayrıca, endojen liganlar ya da DAMP'lar (Tehlikeli ile bağlantılı Moleküler Kalıplar) olarak adlandırılan çeşitli moleküller tarafından da aktive edilirler (Muzio ve ark, 2012). DAMP'lar, doku inflamasyonunda, oksidatif strese, nekroz veya homeostazı bozan diğer koşullar altında, ölmüş ya da ölmekte olan hücreler tarafından salınmaktadırlar (Yu ve ark, 2010). Bu durumda TLR ligandları, ya mikrobik (ekzojen) ya da konak-türevli (endojen) olabilir (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2009). TLR'lerin endojen ve ekzojen ligandları Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** TLR'lerin ekzojen ve endojen ligandları (Liu ve Zhao, 2007).

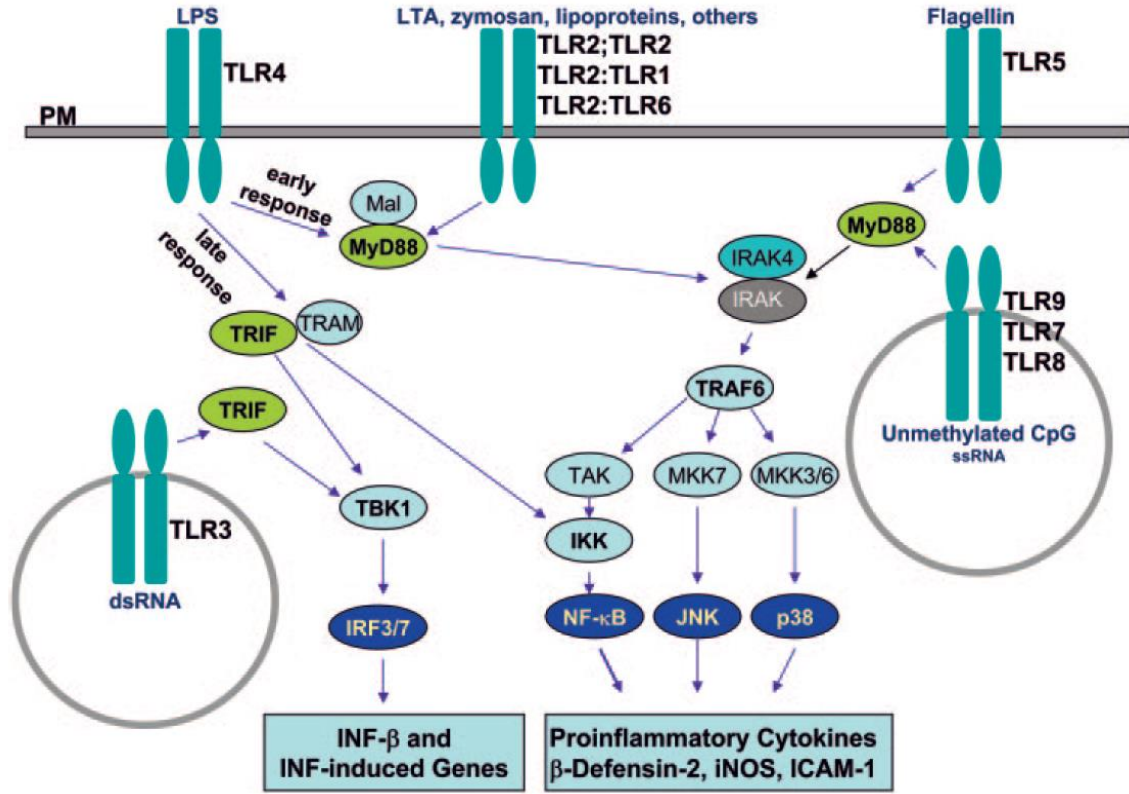
<b>TLR</b>	<b>Ekzojen Ligandlar</b>	<b>Endojen Ligandlar</b>
TLR1	Bakteriyel diaçil lipopeptidler ve parazitlerdeki proteinler	Bilinmiyor
TLR2	Bakteriyel diaçil lipopeptidler, gram-pozitif bakterilerden lipoteik asit ve mayanın hücre duvarından zimosan	hsp70, gp96 HMGB1 Nekrotik hücreler
TLR3	Virüslerden çift sarmallı RNA (dsRNA)	mRNA
TLR4	Gram-negatif bakterilerden lipopolisakkaritler	hsp60, hsp70 Hyaluronan Akciğer-sülfaktan-protein-A Fibronejen Heparan Fibronektin HMGB1 $\beta$ -defensin-2
TLR5	Mobil bakterilerden Flagellin	Bilinmiyor
TLR6	Diaçil lipopeptitler	Bilinmiyor
TLR7	Virüslerde tek sarmallı RNA (ssRNA)	Bilinmiyor
TLR8	Virüslerde tek sarmallı RNA (ssRNA)	Bilinmiyor
TLR9	Bakteri ve virus: CpG içeren DNA	Kromatin-IgG kompleksleri
TLR10	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR11	<i>Toxoplasma gondii</i> : Profilin Üropatojenik bakteriler	Bilinmiyor
TLR12	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR13	Bilinmiyor	Bilinmiyor

#### 2.6.4. Toll Benzeri Reseptörlerde Sinyal Yolağı

Mikrobiyal bileşenler ile TLR'lerin uyarılması, immun yanıtta rol oynayan birtakım genlerin ekspresyonunu tetikler. TLR'lerin uyarılması sonucu, gen ekspresyonuna sebep olan moleküler mekanizmalar, TLR aracılı sinyal yolaklarının incelenmesiyle açıklanmıştır (Akira ve Takeda, 2004).

TLR'lerin ilgili ligandlar ile uyarılmasına takiben bir dizi sinyal yolağı aktif hale geçer ve bunun sonucunda kemokinler, interferonlar ve inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu gerçekleşir (Kawai ve Akira, 2006). TLR'lerdeki sinyalizasyon, ligandların bağlanmasını takiben TLR'lerin dimerize olmasıyla başlar. Dimerizasyonu takiben, TLR'lerin korunmuş intrasellüler TIR domainleri, TIR domain içeren adaptör moleküllerle etkileşime girer (O'Neill ve ark, 2013). TIR domain içeren adaptör moleküller, Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN beta (TRIF), TRIF-related adaptor molecule (TRAM), MyD88 adaptor-like protein (MAL) ve Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein (SARM) molekülleridir (Goutagny ve ark, 2012). Bu adaptör moleküller ile etkileşim sonucunda, inflamatuvar stikonlerin ve tip 1 interferonların üretimini başlatmak amacıyla, Nükleer faktör kappa B (NF-κB), interferon düzenleyici faktör-3/7 (IRK3/7) ve mitojen-aktive edici protein (MAP) kinazlar gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri aktivite olurlar (Kumar ve ark, 2011).

Yukarıda bahsedilen adaptör moleküllerden MyD88 molekülü, TLR-3 dışındaki tüm TLR'lerde sinyal iletiminin meydana gelmesi amacıyla gereklidir (Goutagny ve ark, 2012). TLR-3 ise, sinyal iletiminde TRIF molekülünü kullanır. Buna karşın, TLR-4 sinyal iletiminde hem MyD88 molekülünü hem de TRIF molekülünü kullanabilmektedir (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2009). Bu durum, TLR'lerin MyD88-bağımlı ve MyD88-bağımsız (TRIF-bağımlı) yolak olmak üzere iki farklı sinyal yolağını kullandığını göstermektedir (Takeda ve Akira, 2005).



Şekil 4. TLR'lerin sinyal yolları (Fu-Shin ve Hazlett, 2006).

#### 2.6.4.1. MyD88-bağımlı yolak

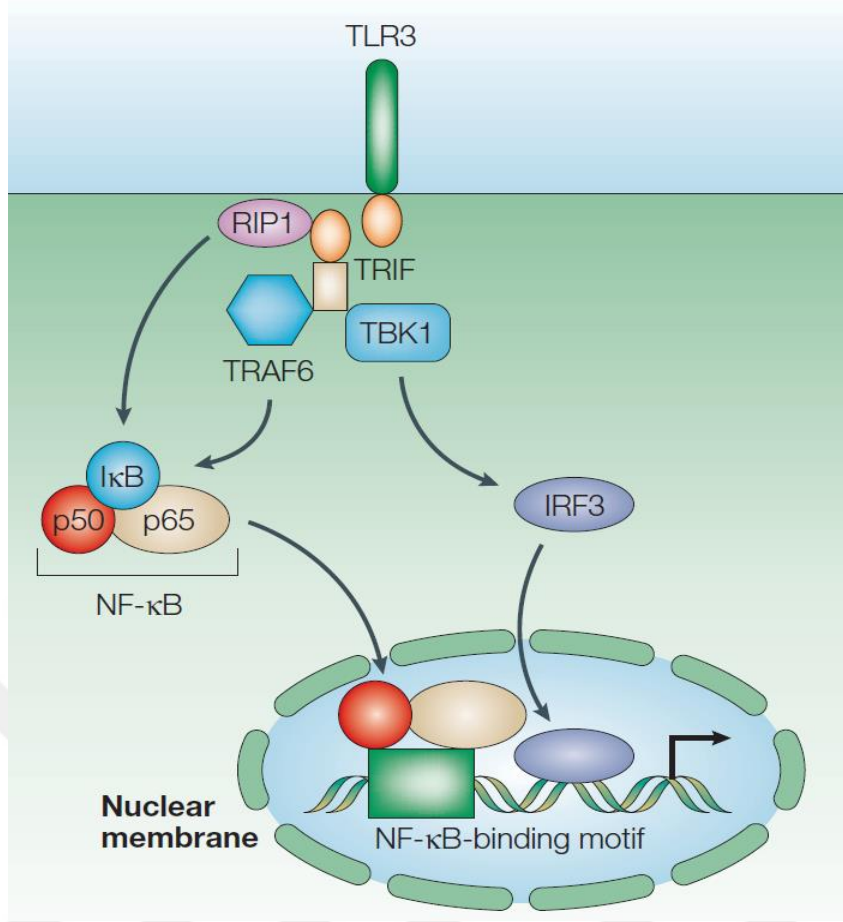
MyD88 adaptör molekülü parçalı bir yapıya sahip olup, IL-1R ilişkili kinazlara (IRAK'a) bağlanan "TIR domain" olarak adlandırılan bir C-terminal kısmı ve "ölüm domain" (Death Domain) olarak adlandırılan N-terminal kısmını içerir (Avbelj ve ark, 2011). MyD88'in "ölüm domain" kısmında apoptotik sinyalle ilgili birçok protein ve aynı zamanda IRAK yer alır (Lin ve ark, 2010). Ligand bağlanması gerçekleştiğinde, TLR'ler MyD88'in C-terminalindeki TIR domaini ile homotipik bir etkileşim kurar (Ulrichs ve ark, 2007). Diğer yandan MyD88'in "ölüm domain" kısmı sırasıyla, IRAK ve IRAK-4'ün "ölüm domain" kısımlarıyla birleşir. IRAK'lar bir N-terminal kısmını ve baş bölgesinde serin/threonin-kinaz kısmını içerir. IRAK-4 ve IRAK'ın MyD88'e bağlanması fosforilasyona ve aktivasyona neden olur. Fosforile olmuş IRAK, MyD88 den ayrıldıktan sonra TRAF-6 (TNF reseptör assosiyasyon faktör 6) ile etkileşir (Fu-Shin ve Hazlett, 2006). Bu olayı takiben TRAF-6, TAK-1'in (TGF-β-activated kinase 1) aktivasyonunu tetikler. TAK-1'in aktivasyonundan sonra, IKK (IκB kinaz) kompleksi-NF-κB yolağı ve MAPK yolağı olmak üzere iki ayrı sinyal yolağı aktif hale geçer (Kawasaki ve Kawai, 2014). Bununla birlikte TAK-1, TAB-1 (TAK-1 bağlanma proteini 1) ve TAB-2 (TAK-1

bağlanma proteini 2) ile TRAF-6-IRAK kompleksini oluşturmak üzere etkileşir (Fu-Shin ve Hazlett, 2006). Bu olaya takiben sitoplazma içerisinde aktif hale geçen TAK-1, IKK'nin aktivasyonunu sağlar (Akira, 2003). İnaktif durumdaki IKK, sitoplazmadaki NF- $\kappa$ B'yi tutar. Fakat IKK'nin aktivasyonu I $\kappa$ B'nin (NF- $\kappa$ B inhibitör protein) fosforile olmasına ve bozulmasına yol açar. Bu olayı takiben NF- $\kappa$ B sitoplazmadan ayrılır (Akira, 2003). Bu olay sonucunda, NF- $\kappa$ B'nin nükleusa translokasyonu gerçekleşir. Böylece gen transkripsiyonu başlatılmış olur (Means ve ark, 2000) ve proinflamatuvar sitokin genlerinin ekspresyonu gerçekleşir (Takeuchi ve Akira, 2010).

#### **2.6.4.2. MyD88-bağımsız yolak (TRIF-bağımlı yolak)**

TLR sinyal yollarının çeşitliliği, ilk olarak MyD88'den yoksun olan farelerde, TLR-4'ün ligandı olan LPS'ye karşı oluşturulan sitokin yanıtı ile ortaya çıkmıştır (Kaisho ve Akira, 2006). MyD88'den yoksun makrofajlarda LPS ile indüklemiş inflamatuvar stokinlerin üretimine rastlanmamış, ancak gecikmeli de olsa NF- $\kappa$ B ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu durum, TLR-4 sinyalizasyonunun MyD88-bağımlı yolağına bağlı olduğu halde, TLR-4'ün sinyalizasyonunda rol oynayan MyD88-bağımsız bir yolağın varlığını da ortaya çıkarmıştır (Kawai ve ark, 1999).

TLR ailesine bağlı üyelerden TLR-3 ve TLR-4, TRIF-bağımlı yolak olarak da adlandırılan MyD88-bağımsız yolağı kullanırlar (Fu-Shin ve Hazlett, 2006). Böyle olmakla birlikte, TLR-4 MyD88-bağımlı sinyal yolağının yanı sıra TRIF-bağımlı sinyal yolağına da kullanabilmektedir (Takeuchi ve Akira, 2010). Ayrıca TLR-4, TRIF'in aktivasyonu için TRAM adaptor molekülüne ihtiyaç duyar. Fakat TLR-3 TRAM adaptör molekülünü kullanamaz (Fu-Shin ve Hazlett, 2006) ve doğrudan TRIF ile etkileşir (Kaisho ve Akira, 2006). TRIF'in amino terminal bölgesiyle, TRAF-6 ve TBK-1 (TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) binding kinase-1) etkileşime girer. TBK1'in TRIF-bağımlı aktivasyonu, IRF-3'ün fosforilasyonuna yol açar. Ayrıca, TRAF-6 aracılı NF- $\kappa$ B aktivasyonu da gerçekleşir. RIP-1 (reseptör-etkileşimli protein 1) ise, TRIF'in karboksi-terminal bölgesiyle etkileşime girerek NF- $\kappa$ B aktivasyonuna aracılık eder (Akira ve Takeda, 2004). Aktive olan IRF-3, IFN- $\beta$  geni de dâhil birçok hedef genin ekspresyonunu indükler (Kaisho ve Akira, 2006).



Şekil 5. MyD88-bağımsız yolak (TRIF-bağımlı yolak) (Akira ve Takeda, 2004).

### 2.6.5. Toll Benzeri Reseptör 9

Bakteriyel DNA'lar, omurgalılarda doğal bağışıklık sistemini uyarabilmektedir. Bakterilerin doğal bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi, bakteri DNA'sında yüksek sıklıkta bulunan metillenmemiş CpG dinükleotidlerine (CpG-DNA) bağlıdır (Suzuki ve ark, 2005).

Bakteri DNA'sının immunostimülatör aktivitesi ilk olarak Tokunaga ve ark. tarafından bildirilmiştir. Tokunaga ve ark (1984), Basil Calmette-Guerin'den (BCG) saflaştırılmış DNA'nın, çeşitli hayvan tümörlerinin büyümesini engellediğini ve fare dalak hücrelerinde NK hücre aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Daha sonra Krieg ve ark (1995), fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bakteri DNA'sının yanı sıra metillenmemiş CpG dinükleotitleri içeren sentetik oligodeoksinükleotidlerin (CpG-ODN), B hücrelerinin çoğalması ve immunoglobülin salgılamasını indüklediklerini bildirmişlerdir. Bu bağışıklık yanıtı, metillenmemiş CpG motiflerini (CpG-DNA) içeren çeşitli patojenlere karşı koruma sağlamaktadır. Metillenmemiş CpG motifleri, monositler, makrofajlar, dentritik hücreler ve B hücrelerinde ekspresyon gösteren TLR-9 tarafından tanınmaktadır (Suzuki ve ark, 2005). Dolayısıyla TLR9, bakteriyel

ve viral DNA'larda yaygın olarak bulunan metillenmemiş CpG motifleri tarafından uyarılabilmektedir (Krieg, 2007).

TLR-9, monositler, makrofajlar, B hücreleri ve dendritik hücrelerin endosomal kompartmanı içerisinde lokalize olmuştur (Qin ve ark, 2014). TLR-9'un endosomal lokalizasyonu, hücre içi patojenleri etkin bir şekilde tespit edilmesini sağlarken, konağın kendisine ait olan ve kendisine ait olmayan nükleik asitlerin ayırımını yapabilmesine olanak tanımaktadır (Barton ve ark, 2006; Park ve ark, 2008). Yapılan çalışmalarda, TLR-9'un CpG-DNA ile uyarılmadan önce endoplazmik retikulumda tutulduğu ancak TLR-9'un CpG-DNA ile uyarıldıktan sonra lizozomlara göç ettiği gösterilmiştir (Latz ve ark, 2004). Buna ek olarak, TLR-9'un ilgili ligandlar ile uyarılması sonucunda, meydana gelen hücre içi sinyal döğüsünde MyD88 adaptör molekülünün gerekli olduğu bildirilmiştir (Johnson ve ark, 2005). TLR-9'un MyD88 adaptör molekülü aracılığı ile doğal bağışıklık yanıtını başlatmak üzere çeşitli adaptör moleküllerle etkileşime girerek, gerekli proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunu ve tip I interferonların üretimini tetiklemektedir (Wagner, 2002). Ayrıca edinsel bağışıklık yanıtının şekillenmesinde de kritik bir öneme sahiptir (Huang ve Yang, 2010). Bu nedenle çeşitli TLR-9 agonistleri, patojen enfeksiyonlarında, alerjilerde, malign neoplazmalarda ve otoimmüniteye karşı kullanılan klinik öncesi ve klinik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Krieg, 2006; Gosu ve ark, 2012; Qin ve ark, 2014). Yapılan çalışmalar, TLR-9 agonistlerinden biri olan CpG-ODN'nin hücre içi enfeksiyonlara karşı gelişen doğal ve edinsel bağışıklık yanıtını harekete geçirdiğini göstermiştir (Krieg, 2001). Ayrıca CpG-ODN'lerin aşı adjuvanı olarak kullanıldıklarında bulaşıcı hastalıklara ve kansere yönelik geliştirilen aşuların aktivitesini arttırdıkları bildirilmiştir (Bode ve ark, 2011). Örneğin, Verthelyi ve ark (2002) tarafından yapılan bir çalışmada farelere uygulanan CpG-ODN'nin bakteriyel, viral ve parazitik patojenlere karşı geliştirilen aşuların koruyucu etkisini arttırdıkları gösterilmiştir. Yine fareler üzerinde yapılan çalışmalar, CpG-ODN uygulanması sonucu, aktive olan doğal bağışıklık savunmasının koruyucu etkisinin arttığı gösterilmiştir (Elkins ve ark, 1999; Freidag ve ark, 2000; Krieg ve ark, 2007). Ayrıca Choudhury ve ark (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, intrapulmoner CpG-ODN uygulamasının, fare akciğerinde Th1 (T helper 1) bağışıklık yanıtına neden olan IL-12 üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar TLR-9'un CpG tanıma sisteminin, akciğer doğal bağışıklığında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Knuefermann ve ark, 2007; Bhan ve ark, 2008).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Materyali

Sunulan tez çalışması, 2016-2017 bahar döneminde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Sunulan tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 30.11.2016 tarihli 64583101/2016/178 sayılı karar ile onay alınmıştır.

Sunulan tez çalışmasında çalışma materyali olarak, yürütücülüğü Prof. Dr. Levent KARAGENÇ tarafından yapılmakta olan " Farelerde *In vitro* Embriyo Kültürü ve Embriyo Transferinin Solunum Sisteminde Epitel Hücre Sayıları Üzerine Etkisi " isimli VTF-15057 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi'nden elde edilmiş olan yetişkin akciğer doku örnekleri kullanılmıştır.

VTF-15057 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi'nde çalışma materyali olarak kullanılan F1 hibrid fareler, C57BL/6 erkek farelerin BALBc dişi fareler ile çiftleştirilmesi sonucu elde edilmişlerdir. Deney süresince tüm F1 hibrit fareler, 14 saat aydınlık: 10 saat karanlık ışık siklusunda barındırılmış olup yem ve su ad *libitum* olarak verilmiştir. Tüm çalışma boyunca farelerin beslenmesi ve barınması Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Sunulan tez çalışmasında, bir Kontrol grubu ve bir Deneme grubu olmak üzere iki farklı grup yer almaktadır. Kontrol grubunu oluşturan yetişkin fareler, PMSG+hCG uygulaması yapılmamış olan 8-12 haftalık F1 hibrit dişi farelerin aynı yaştaki F1 hibrit erkek farelerle çiftleştirilmesi sonucu elde edilen yavruların büyütülmesiyle oluşturulmuştur. Deneme grubu ise PMSG+hCG uygulamasını takiben çiftleştirilen dişilerden elde edilen döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen konsantrasyonunda büyütülmesiyle elde edilen, dolayısıyla *in vitro* ortamda gelişen blastosistlerin yalancı gebelere transferiyle elde edilen yavruların büyütülmesiyle elde edilen bireylerden oluşturulmuştur.

VTF-15057 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında yetişkin akciğer dokuları izole edilmiş ve uygun koşullarda muhafaza edilmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, histokimyasal ve immunohistokimyasal/immunofloresan boyama yöntemlerini gerçekleştirmek amacıyla parafast içerisinde bloklanmış olan ve +4 °C'de muhafaza edilmiş olan yetişkin akciğer doku örnekleri kullanılmıştır. Western blot ve real-time PCR (qRT-PCR) tekniklerinin uygulanmasında ise -80 °C'de muhafaza edilmiş olan yetişkin akciğer doku örnekleri kullanılmıştır.

Yetişkin akciğer doku örneklerinden bir mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında 100 µm aralıklarla alınan seri kesitler üzerinde, üçlü boyama, histokimyasal, immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama metotları uygulanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, her bir hayvan için toplam 6 adet kesit kullanılmıştır.

Tüm gruplarda -80 °C’de muhafaza edilmiş olan yetişkin akciğer doku örneklerinden TLR-9’un translasyonel düzeyde eksprese edilip edilmediğinin semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla western blot tekniğinden yararlanılmıştır. Ayrıca, TLR-9 reseptörünün mRNA düzeyini ölçmek amacıyla kantitatif real-time PCR yönteminden yararlanılmıştır. Sunulan tez çalışmasında, western blot ve real-time PCR analizlerinde kullanılmak üzere, Kontrol grubunu oluşturmak amacıyla Kontrol grubuna ait 15 adet yetişkin akciğer dokusu ve Deneme grubunu oluşturmak amacıyla da Deneme grubuna ait 15 adet yetişkin akciğer dokusu kullanılmıştır. Her bir grup için ayrı ayrı ortak doku havuzları (pool)'lar oluşturulmuştur. Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer doku örnekleri rastgele seçilerek her bir doku havuzunda beş adet örnek olacak şekilde Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3 grupları oluşturulmuştur. Aynı şekilde, Deneme grubu içinde, Deneme grubuna ait yetişkin akciğer doku örnekleri rastgele seçilerek her bir doku havuzunda beş adet örnek olacak şekilde Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3 biyolojik replikasyonları elde edilmiştir. Böylece gerek Kontrol, gerekse Deneme grubunda üç ayrı biyolojik replikasyon grubu oluşturulmuştur.

### **3.2. Üçlü Boyama Metodu**

Sunulan tez çalışmasında paraplast içerisinde gömülü dokuların genel histolojik yapısını incelemek amacıyla Crossman’ın üçlü boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri deparafinizasyon işleminden sonra Crossman’ın üçlü boyama yöntemiyle boyanmış ve daha sonra incelenmek amacıyla entellan ile kapatılmıştır.

### **3.3. İmmunofloresan Boyama Metodu**

Mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında alınan kesitler 35–40 °C su banyosunda yüzdürüldükten sonra APES (Sigma) ile kaplanmış lamlara alınmıştır. Alınan kesitler 37 °C etüvde bir gece kurutulmaya bırakılmışlardır. Daha sonra kesitlere immunofloresan boyama tekniğini uygulamak amacıyla, deparafinizasyon işlemi uygulanmış, kesitler alkol serilerinden geçirilerek distile suya alınmışlardır. Doku tespit solusyonuyla bloke edilen antijen epitoplarını

açığa çıkarmak amacıyla %0,05 oranında Tween-20 içeren sodyum sitrat buffer (pH 6) içerisinde 20 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat süreyle soğutulan kesitler 3 kez 5'er dakika Tris buffer solüsyonu (TBS, pH 7.6) ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Yıkama işleminde sonra, kesitlerin kurumamasına özen gösterilerek, kesitler silkelenip bir peçete yardımıyla TBS uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardından, kesitlere mouse monoklonal primer antikor TLR-9 (NBP2-24729, Novus, 1/100) uygulanmış ve kesitler bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Eş zamanlı olarak aynı işlemlere tabi tutulan, fakat primer antikor ilave edilmeksizin (primer antikor yerine TBS kullanıldı) boyanan doku kesitleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Primer antikorların uzaklaştırılması amacıyla kesitler 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Ardından primer antikora bağlanması amacıyla, kesitlere sekonder antikor (Alexa-Fluor -A21127 / A21121, Invitrogen) uygulanmış ve kesitler bir saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi tamamlandığında, kesitler yıkanmak üzere 3 kez 5'er dakika TBS ile tekrar muamele edilmişlerdir. Hücre çekirdeklerini boyamak amacıyla, kesitler DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile 1-2 dakika muamele edilmişlerdir. Yıkama işlemi karanlıkta, 3 kez 5'er dakika süreyle tekrar edilmiştir. Kesitler incelenmek üzere kapatma solüsyonu (Mounting medium, Invitrogen) ile kapatılarak floresan mikroskopta (Olympus, BX51) incelenmiştir. İmmunpozitif hücrelerin görüntülenmesinde BX51 (Olympus) araştırma mikroskopu ve DP70 kamera/görüntü analiz sisteminden yararlanılmıştır.

### **3.4. Double (Çift)-immunofloresan Boyama Metodu**

Yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonu gösteren makrofajları ve Tip II pnömosit hücrelerini belirlemek amacıyla double-immunofloresan boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, TLR-9 belirteci olan TLR-9 primer antikor (NBP2-24729, Novus, 1/100), makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikor (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100) ve Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikor (FL-197, sc:13970, SantaCruz, 1/100) kullanılmıştır. Double-immunofloresan boyama işlemi +4 °C'de muhafaza edilen yetişkin akciğer doku bloklarından alınan 4-5 µm kalınlığındaki ardışık kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir. APES (Sigma) ile kaplanmış lamlara alınan kesitlere, deparafinizasyon işlemi uygulanmış, kesitler alkol serilerinden geçirilerek distile suya alınmışlardır. Doku tespit solüsyonuyla bloke edilen antijen epitoplarını açığa çıkarmak amacıyla %0,05 oranında Tween-20 içeren sodyum sitrat buffer (pH 6) içerisinde 20 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat süreyle soğutulan kesitler 3 kez 5'er dakika TBS

(pH 7.6) ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Yıkama işleminin ardından non-spesifik antijenik bağlanmaları bloke etmek amacıyla blokaj solüsyonu (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) ile kesitler oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra primer antikörle işaretleme işlemine geçilmiştir. İlk olarak kesitler anti-TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus, 1/100) ile 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Daha sonra kesitler, 3 kez 5'er dakika süre ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Yıkama işlemine takiben kesitler, sekonder antikör (Alexa-Flour A21127, Invitrogen, 1/100) ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmişlerdir. Spesifik bağlanma göstermeyen sekonder antikörlerin uzaklaştırılması amacıyla kesitler 3 kez 5'er dakika süreyle TBS içerisinde yıkanmışlardır. Bu işleme takiben, aynı kesitler bu kez makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikoru (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100) ile 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Spesifik bağlanma göstermeyen primer antikörlerin uzaklaştırılması amacıyla kesitlere 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş, bunu takiben kesitler sekonder antikör (Alexa-Flour A11034, Invitrogen, 1/100) ile 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Spesifik bağlanma göstermeyen sekonder antikörlerin uzaklaştırılması amacıyla kesitler 3 kez 5'er dakika süreyle TBS içerisinde yıkanmışlardır. Süre dolduğunda, kesitler 3 kez 5'er dakika süreyle TBS ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Hücre çekirdeklerini boyamak amacıyla, kesitler DAPI ile 1-2 dakika muamele edilmişlerdir. Yıkama işlemi karanlıkta, 3 kez 5'er dakika süreyle tekrar edilmiştir. Kesitler incelenmek üzere kapatma solüsyonu (Mounting medium, Invitrogen) ile kapatılarak floresan mikroskopta (Olympus, BX51) incelenmiştir. Benzer işlemler, makrofaj belirteci olan F4/80 (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100) primer antikoru yerine Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikoru (FL-197, sc:13970, SantaCruz, 1/100) kullanılarak da gerçekleştirilmiştir.

### **3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Metodu**

Mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında alınan kesitler 35–40 °C su banyosunda yüzdürüldükten sonra APES (Sigma) ile kaplanmış lamlara alınmıştır. Alınan kesitler 37 °C etüvde bir gece kurutulmaya bırakılmışlardır. Daha sonra kesitlere immunohistokimyasal boyama tekniğini uygulamak amacıyla, deparafinizasyon işlemi uygulanmış, kesitler alkol serilerinden geçirilerek distile suya alınmışlardır. Doku tespit solüsyonuyla bloke edilen antijen epitoplarnı açığa çıkarmak amacıyla %0,05 oranında Tween-20 içeren sodyum sitrat buffer (pH 6) içerisinde 20 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesitler oda sıcaklığına geldikten sonra 3 kez 5'er dakika süreyle TBS içerisinde yıkanmış, endojen

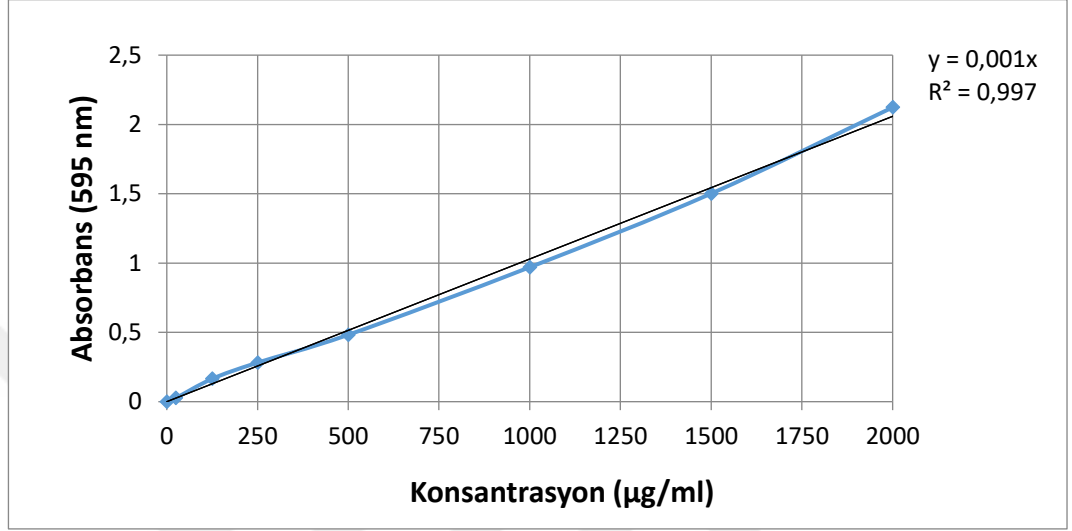
peroksidaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla %5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren TBS ile 5 dakika muamele edilmişlerdir. Üç kez 5'er dakika TBS ile yıkanan kesitler mouse monoklonal primer antikoru TLR-9 ile (NBP2-24729, Novus, 1/100) bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Ertesi gün tüm kesitlere 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş, bunu takiben kesitler biyotin ile işaretli sekonder antikor (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) solüsyonuyla 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Spesifik bağlanma göstermeyen sekonder antikoları uzaklaştırmak amacıyla TBS ile yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Daha sonra kesitler HRP (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) solüsyonu içerisinde 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. TBS içerisinde yıkama işlemi (3 kez 5'er dakika) takiben, antikora bağlanma gösteren immunpozitif hücreleri saptamak amacıyla kesitler %3 oranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 3 mg/ml) içeren Tris-HCl (pH 7.6) solüsyonla 1-3 dakika arasında muamele edilmişlerdir. Hücre çekirdeklerinin görülebilmesi amacıyla kesitler aynı zamanda, Harris hematoksilen ile 1-3 dakika süre ile boyanmışlardır. Kesitler etanol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatılmışlardır. Tüm analizlerde immunpozitif hücrelerin görüntülenmesinde BX51 (Olympus) araştırma mikroskobu ve DP70 kamera/görüntü analiz sisteminden yararlanılmıştır.

Aynı zamanda yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonu gösteren hücrelerin makrofaj ya da Tip II pnömosit hücreleri olup olmadığını belirlemek amacıyla immunohistokimya boyama metodu uygulanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, APES ile kaplanmış lamlara alınan 4-5 µm kalınlığındaki ardışık kesitlerden birincisi TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus, 1/100), ikincisi ise makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikoru (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100) ya da Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikoru (FL-197, sc:13970, SantaCruz, 1/100) kullanılarak eş zamanlı olarak boyanmıştır.

### **3.6. Western Blot Metodu**

Western blot analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilen yetişkin akciğer doku örnekleri (Kontrol-R1, Kontrol-R2, Kontrol-R3, Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) TissueLyserLT homojenizasyon cihazında (Qiagen) homojenize (3x2 dakika, 50 MHz) edilmişlerdir. Dokuların homojenizasyon işlemi PMSF (fenil metil sülfonil fulorid), orthovanadate ve proteaz inhibitörleri içeren RIPA Lysis tamponu (SantaCruz) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon işlemi takiben homojenatlar 13,000xg'de 15 dakika süre ile +4 °C'de santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlar küçük miktarlara bölünerek -20

°C’de muhafaza edilmişlerdir. Total protein miktarını belirlemek amacıyla, Smart TM BCA Protein Assay kitinden (İntron Biyoteknoloji) yararlanılmıştır. Standart olarak kit ile birlikte gelen BSA (bovine serum albumin) solüsyonu (2mg/ml) kullanılmış, her bir doku örneğine ait total protein miktarı BSA-protein standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 6. BSA-Protein standart eğrisi.

Tüm grupların protein tayini işlemi sonrası, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) jelleri hazırlanarak western blot protokolü uygulanmıştır. İlk olarak % 10'luk ayırma jeli (separating gel) hazırlanıp yükleme tankındaki cam tabakalar arasına dökülmüştür. Jelin polimerleşmesini takiben %5'lik paketleyici jel (stacking gel) hazırlanarak hızlı bir şekilde ayırma jelin üzerine dökülmüş ve üzerine 10 kuyucuk içeren tarak yerleştirilmiştir. Paketleyici jelin polimerleşmesini takiben tarak çıkarılarak, kuyucuklar elde edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan jel, dikey elektroforez tankına yerleştirilerek tankın içerisine jel kasetinin yarısını geçmeyecek şekilde 1x yürütme tamponu (running buffer) ilave edilmiştir. SDS-PAGE jeli, Kontrol ve Deneme gruplarına ait protein örneklerini yüklemek amacıyla hazır duruma getirilmiştir.

**Tablo 2.** Her bir grup için 60 µg protein içeren total hacim.

<b>Gruplar</b>	<b>Örnek Volümü</b>	<b>2x Loading Dye</b>	<b>Lizis Buffer</b>	<b>Total Hacim</b>
<b>Kontrol-R1</b>	10 µl	10 µl	10 µl	30 µl
<b>Kontrol-R2</b>	10 µl	10 µl	10 µl	30 µl
<b>Kontrol-R3</b>	10 µl	10 µl	10 µl	30 µl
<b>Deneme-R1</b>	12,5 µl	12,5 µl	5 µl	30 µl
<b>Deneme-R2</b>	13 µl	13 µl	4 µl	30 µl
<b>Deneme-R3</b>	14 µl	14 µl	2 µl	30 µl

Jelde yürütülecek olan her bir örnekte Tablo 2’de gösterilen volümler dikkate alınarak yüklenecek olan proteinler ependorf tüplere konularak üzerlerine 2X Loading dye ve Lizis buffer (RİPA lysis buffer) eklenmiştir. Ependorf tüpler hızlıca santrifüj edilerek 10 dakika süre ile 65°C’de ısıtma tablasında (heating blok) bekletilmişlerdir. Bu sürenin ardından tüpler yine hızlı bir santrifüj ile yüklenmeye hazır hale getirilmişlerdir. Yükleme gerçekleştirmek amacıyla her bir grup için 60 µg protein içeren protein karışımı yükleme kuyucuklarına yüklenmiştir. Protein bantlarının büyüklüklerinin belirlenmesinde Pre-stained protein lader V protein belirtecinden (GeneAid) 3 µl olarak tek bir kuyucuğa yükleme yapılmıştır. Yükleme işleminin ardından, örnekler 200 volt, 50 mA’de 60 dakika süreyle yürütülerek proteinler ayrıştırılmışlardır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere yükleme tankından çıkarılmıştır. Daha sonra proteinlerin nitroselüloz membrana (İmmobilon-P, Millipore) transferi amacıyla, blotlama kasetleri arasına Wattman No1 kâğıtları, bunların üzerine poliakrilamid jel ve jelin üzerine de nitroselüloz membran yerleştirilmiştir. Son olarak membranın üzerine tekrar Wattman No1 kâğıtları yerleştirilmiş, bu işlemi takiben hava kabarcıklarının bulunmamasına özen gösterilmiştir. Kasetler uygun bir biçimde kapatılarak, blotlama tankına yerleştirilmiştir. Blotlama tankı transfer tamponu (blotting buffer) ile doldurularak içerisine buz kaseti konulmuştur. Transfer işlemi bir saat süre ile 100 V ve 350 mA akım uygulanarak gerçekleştirilmiş ve jelde bulunan proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması sağlanmıştır. Transfer işleminden sonra nitroselüloz membran, bloklama solüsyonu olan %5’lik süt tozu çözeltisi (skim milk powder içeren TBS pH7,6) içerisinde bir çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında bir saat süre ile muamele edilmiştir. Bloklama işleminden sonra membran 3 kez 5'er dakika süreyle %0,1 oranında Tween-20 içeren TBS solüsyonu (TBST) ile yıkanmıştır. Daha sonra membran, anti-TLR-9 (NBP2-24729) primer antikoru eklenmiş

(sulandırma oranı:1:1000) %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde bir gece boyunca ve bir çalkalayıcı üzerinde +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün membran 3 kez 5'er dakika süreyle bir çalkalayıcı üzerinde TBST solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Böylece zayıf bağlanan veya bağlanamayan antikörlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından membran, %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde 1:5000 oranında sulandırılan sekonder antikör (Goat anti-Mouse IgG-HRP, sc-2005) ile bir saat oda sıcaklığında bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Yine 3 kez 5'er dakika süreyle TBST solüsyonu ile bir çalkalayıcı üzerinde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran, kurutma kâğıdına alınarak yıkama solüsyonunun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Belirteçlerin, EC3 Imaging System'de floresan ışığa göstermesi amacıyla her bir belirteç WesternSure Pen (Li-Cor) kalemiyle çizilmiştir. Bu işlemi takiben membran bir pens yardımıyla alınıp steril bir kaptaki 1-2 dakika süreyle Enhanced Chemiluminescence solüsyonu (Novex® ECL, İnvitrogen ya da Luminata Crescendo, Millipore) ile karanlık bir ortamda muamele edilmiştir. Daha sonra antikora bağlanma gösteren bantlar görüntüleme cihazında (EC3 Imaging System, UVP) görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir. Bu işlemin ardından, membran 3 kez 5'er dakika süreyle TBST solüsyonu ile bir çalkalayıcı üzerinde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından aynı membran endojen kontrolü tespit etmek amacıyla aynı işlemlere tabi tutulmuş, ancak primer antikör olarak anti-β-aktin (SantaCruz, sc-47778) antikörü kullanılmıştır. Elde edilen ve beklenen bantlarda maksimum bant yoğunluğu (Imax) VisionWorks®LS analiz programında (UVP) hem TLR-9 hem de endojen kontrol olarak kullanılan β-aktin proteini için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Hesaplanan TLR-9 İmax değeri, aynı membranda hesaplanan β-aktin İmax değerine bölünerek normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Western blot analizlerinden elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırmak amacıyla analizler tüm gruplarda her bir biyolojik replikasyon (Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3) için üç defa tekrar edilmiştir. Bu şekilde, tüm gruplarda TLR-9 geni için toplam dokuz analiz (3 biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) gerçekleştirilmiştir. Sonuçları analiz etmek amacıyla her bir grup için elde edilen verilerin ortalamaları alınmıştır.

### 3.7. Total RNA İzolasyonu

Tüm gruplara (Kontrol-R1, Kontrol-R2, Kontrol-R3, Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) ait yetişkin akciğer doku örneklerinden total RNA izolasyonu, Trizol solüsyonu ve PureLink RNA izolasyon kiti (Ambion) kullanılarak üretici firmanın önermiş olduğu RNA izolasyon protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinde olası DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla tüm örnekler DNase solüsyonu ile (PureLink DNase, Invitrogen) muamele edilmiştir. Tüm gruplara ait total RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80 °C' de muhafaza edilmiştir. İzole edilmiş RNA örneklerinde, total RNA konsantrasyonunu belirlemek için, örnekler 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) içerisinde 1/10 oranında sulandırılmış ve total RNA konsantrasyonu MultiskanGo (Thermo) spektrofotometri cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Total RNA konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ ),  $[A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \mu\text{g/ml}]$  denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır.

### 3.8. İzole Edilen Total RNA Örneklerinin Kalitesi

Total RNA örneklerinin kalitesini ve miktarını belirlemek, gen ekspresyon çalışmalarında önemli bir adımdır. Yapılan birçok çalışmada, real-time PCR veya mikro-array analizlerinde kullanılan total RNA kalitesinin gen ekspresyon profillemeye çalışmalarını üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Auer ve ark, 2003; Fleige ve ark, 2006; Becker ve ark, 2010). RNA molekülleri çok hassas yapılardır ve nükleazların her yerde bulunması RNA moleküllerinin degradasyonunda önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (Becker ve ark, 2010). Bu nedenle PCR öncesi basamaklarda (RNA örneklerinin izolasyonu, dondurulması ve saklanması gibi) total RNA örneklerine yönelik gerçekleştirilen işlemlerin, RNA'nın bozulmaya karşı duyarlılığı göz önüne alındığında, RNA kalitesinin değerlendirilmesi, gen ekspresyon analizlerinden elde edilecek verilerin güvenilirliği bakımından son derece önem taşımaktadır (Li ve Reilly, 2008). Söz konusu RNA kalitesinin değerlendirilmesinde total RNA örneklerinin saflığı ve bütünlüğü dikkate alınmaktadır. Örneğin, spektrofotometrik yöntemle elde edilen 260 ve 280 nm'de absorbanların oranı ( $A_{260}/A_{280}$ ), genellikle RNA saflığını kabul edilebilir bir göstergesi olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte araştırmacılar saf bir RNA örneğinin 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) solüsyonu içerisinde  $A_{260}/A_{280}$  oranının 1,9-2,1 arasında olması gerektiğini önermektedir (Tuzmen ve ark, 2007). Diğer önemli bir husus total RNA örneklerinin bütünlüğünü test etmektir. Total RNA örneklerinin agaroz jelde koşturulmasını takiben, jelde görülen 28S ve 18S rRNA bandlarında herhangi bir yapısal bozulmanın

görülmemesi ve 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak da 2:1 oranında olması tavsiye edilmektedir (Skrypina ve ark, 2003).

### 3.9. Real-Time PCR (qRT-PCR) (Taqman Metodu)

#### 3.9.1. TaqMan Metodu İçin cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

TaqMan Metodu ile gerçekleştirilen real-time PCR analizleri için her bir gruba ait (Kontrol-R1, Kontrol-R2, Kontrol-R3, Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) total RNA örneklerinden cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezi, SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) kiti kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen protokole bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, her bir gruba ait örnek için, total hacim 20 µl olacak şekilde 500 ng total RNA hazırlanmıştır (Tablo 3).

**Tablo 3.** Her bir gruba ait 500 ng total RNA içeren miktarlar.

Gruplar	500 ng RNA (µl)	Nuclease- free H <sub>2</sub> O	Total Hacim
<b>Kontrol-R1</b>	1,60 µl	18,40 µl	20 µl
<b>Kontrol-R2</b>	1,30 µl	18,70 µl	20 µl
<b>Kontrol-R3</b>	1,11 µl	18,89 µl	20 µl
<b>Deneme-R1</b>	2,45 µl	17,55 µl	20 µl
<b>Deneme-R2</b>	1,69 µl	18,31 µl	20 µl
<b>Deneme-R3</b>	1,54 µl	18,46 µl	20 µl

Daha sonra Tablo 4’de belirtilen kite ait bileşenler bir araya getirilerek toplam hacim 20 µl olacak şekilde 2X reverse transkripsiyon master karışımı elde edilmiştir. Ardından her bir gruba ait RNA (20 µl=500 ng) miktarı master karışımına eklenerek 1X reverse transkripsiyon master karışımı elde edilmiştir. Böylece total hacmin 40 µl olması sağlanmıştır. Karışım kısa süreli bir santrifüj işleminden geçirilerek, PCR cihazı (Veriti, Applied Biosystems) yardımı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 4.** 2X reverse transkripsiyon master karışımı.

<b>Bileşenler</b>	<b>Volüm/Reaksiyon (2X)</b>
<b>10XRT Buffer</b>	4 µl
<b>25XdNTP Mix (100mM)</b>	1.6 µl
<b>10X RT Random Primers</b>	4 µl
<b>MultiScribe™ Reverse Transkriptase</b>	2 µl
<b>Nuclease- free H<sub>2</sub>O</b>	8.4 µl
<b>Total/Reaksiyon</b>	20 µl

cDNA sentezi, 25 °C’de 10 dakika, 37 °C’de 120 dakika, 85 °C’de 5 dakika ve 4 °C’de ∞ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri, real-time PCR analizlerinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmişlerdir.

### **3.9.2. TaqMan Metodu İle Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) Analizi**

Her bir gruba ait cDNA örnekleri real-time PCR tekniğinde kullanılmak üzere TaqMan problemleriyle Tablo 5’de belirtilen miktarlarda reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Real-time PCR reaksiyonu 20 µl total hacimde gerçekleştirilmiştir. Hedef gen (TLR-9) ve referans genler (β-aktin ve GAPDH) için kullanılan TaqMan problemleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Her bir örnek için real-time PCR karışımı.

<b>Bileşenler</b>	<b>Volüm/Reaksiyon</b>
<b>Assay (TLR-9)</b>	1 µl
<b>Master mix (2X)</b>	10 µl
<b>RNase free su</b>	7 µl
<b>cDNA örneği</b>	2 µl
<b>Total Hacim</b>	20 µl

**Tablo 6.** TaqMan problemleri.

<b>Gen</b>	<b>Prob Kodu (Applied Biosystems)</b>
<b><math>\beta</math>-aktin (ACTB)</b>	Mm00607939-S1
<b>GAPDH</b>	Mm99999915-G1
<b>TLR-9</b>	Mm0044446193-M1

Analizlerde StepOne (Applied Biosystems) real-time PCR cihazından yararlanılmıştır ve termal döngü protokolü Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** Real-time PCR termal döngü protokolü.

<b>Basamak</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
<b>AmpErase® uracil-N-glycosylase (UNG) aktivasyonu</b>	50 °C	2 dakika	
<b>AmpliTaQ Gold enzim aktivasyonu</b>	95°C	10 dakika	1
<b>Denatürasyon</b>	95°C	15 saniye	40
<b>Bağlanma/Uzama</b>	60°C	1 dakika	

Tüm real-time PCR analizlerinde, cDNA içermeyen ve reverse transkriptase içermeyen (sadece su) örnekler negatif kontrol olarak (No-RT) kullanılmıştır. Tüm gruplarda, analiz edilen hedef gen (TLR-9) ve referans genler ( $\beta$ -aktin ve GAPDH) için ortalama Threshold cycle (Ct) değerleri hesaplanarak elde edilen Ct değerleri,  $\beta$ -aktin ve GAPDH genleri ile normalizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta Ct$  (comparative Ct) metodu gruplar arası farklılıkların hesaplanmasında kullanılmıştır. Real-time PCR analizlerinden elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırmak amacıyla analizler tüm gruplarda her bir biyolojik replikasyon (Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3) için iki defa tekrar edilmişlerdir. Bu şekilde tüm gruplarda TLR-9 geni için toplam altı analiz (3 biyolojik replikasyon x 2 teknik replikasyon) gerçekleştirilmiştir.

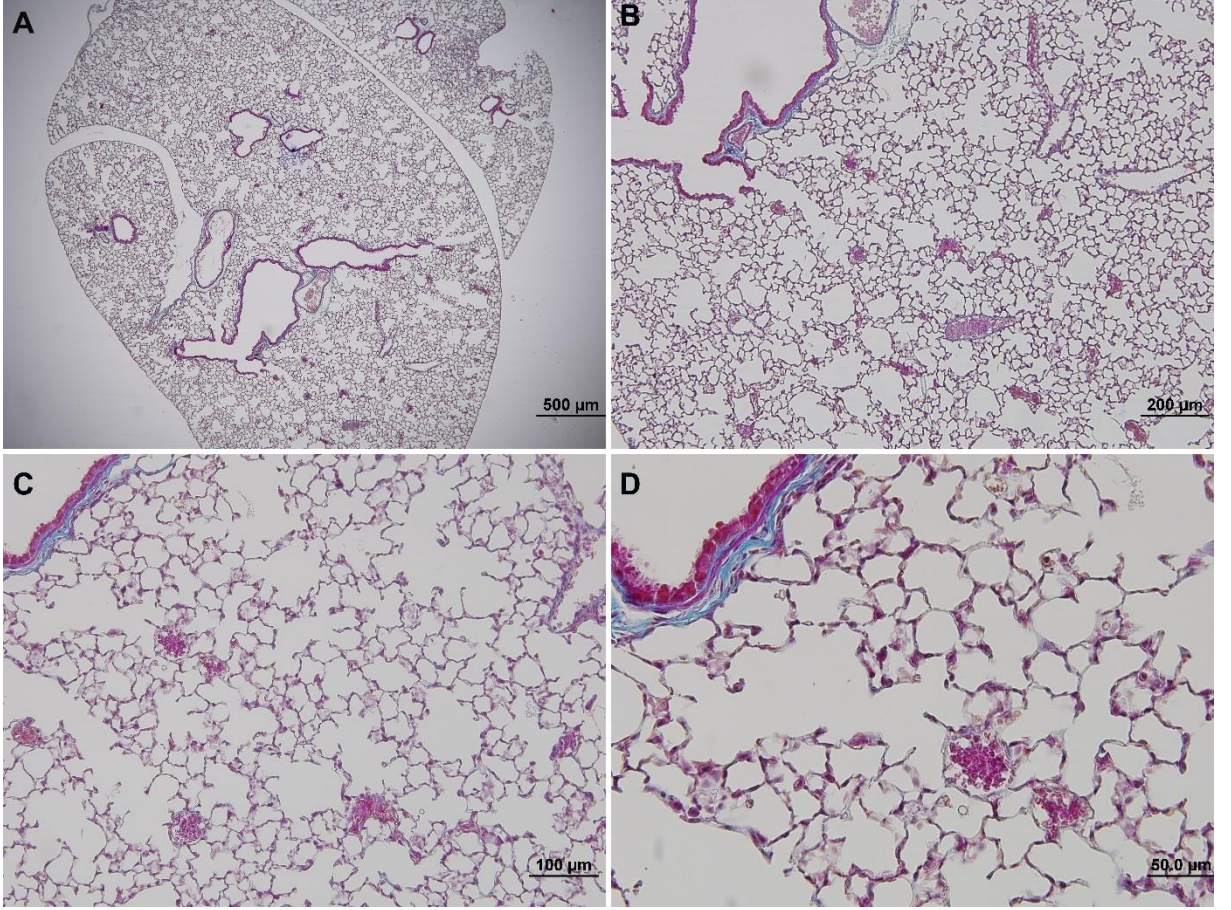
### 3.10. İstatistiksel Analizler

İstatistik analizler için, SPSS paket programı (IBM SPSS Statistics 21.0) kullanılmıştır. Sonuçlar, ortalama  $\pm$  Standart Sapma olarak verilmiştir. İki grup karşılaştırılması için bağımsız t-testi uygulanmıştır.  $p \leq 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Yetişkin Akciğer Dokusunun Genel Histolojik Görüntüsü

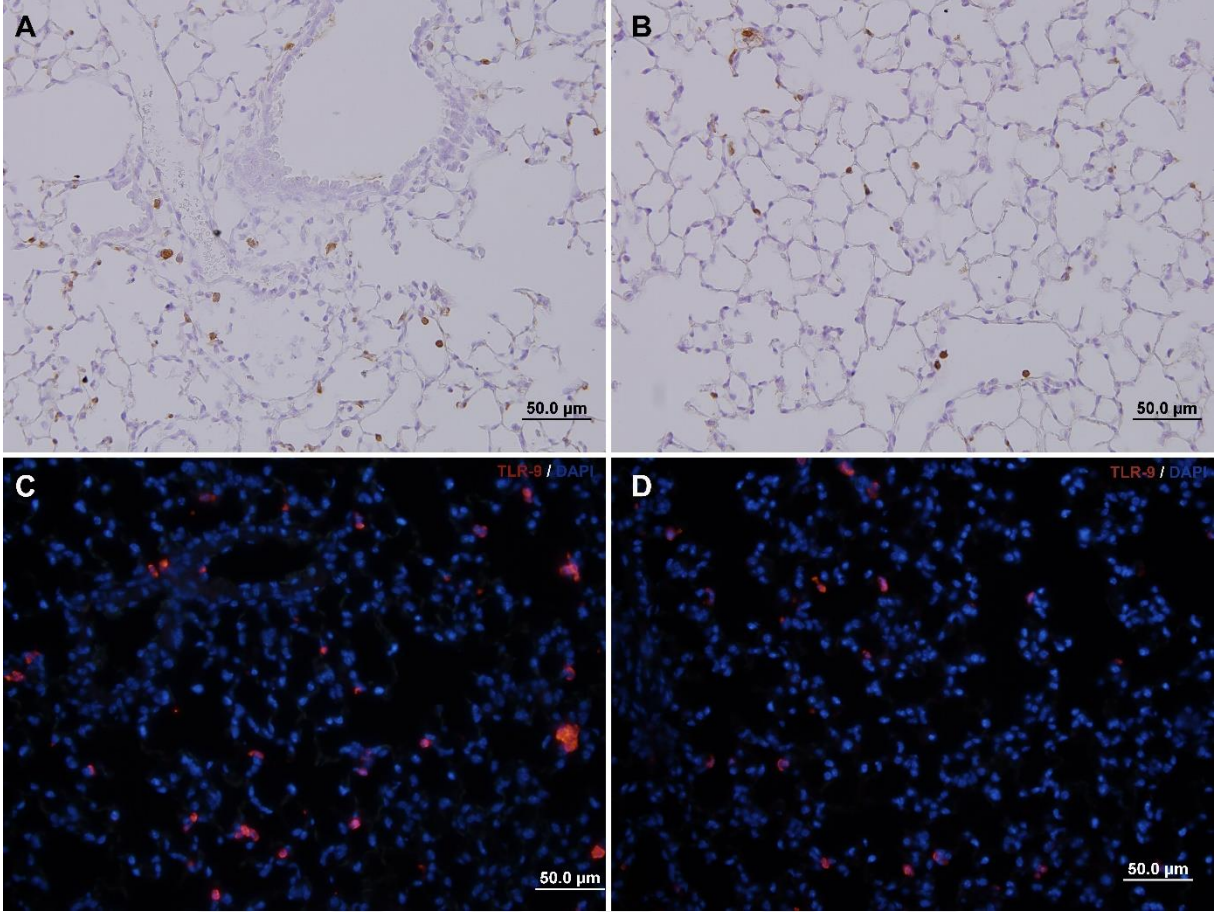


**Şekil 7.** Yetişkin akciğer dokusunun genel histolojik görünümü. Kesitler, Crossman'ın üçlü boyama yöntemi ile boyanmıştır.

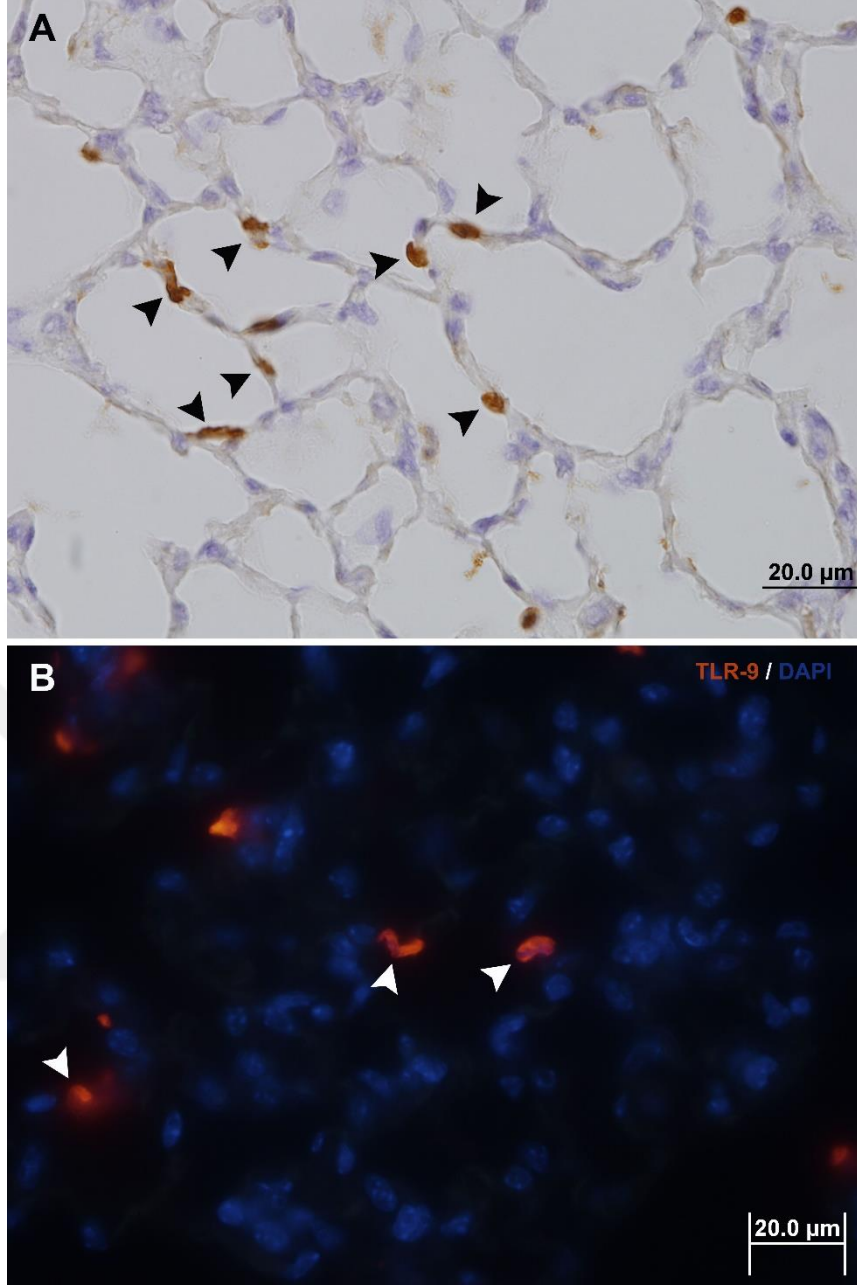
## 4.2. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde İmmunohistokimya ve İmmunofloresan Boyama Yöntemiyle TLR-9 Ekspresyonunun Belirlenmesi

Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer doku örneklerinde, TLR-9'un ekspresyon profillerinin belirlenmesi amacıyla immunohistokimya ve immunofloresan boyama yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar primer antikör ilave edilmeksizin gerçekleştirilen analizlerde herhangi bir boyanmanın oluşmadığını göstermiştir. Gerek immunohistokimya analizlerinden elde edilen sonuçlar (Şekil 8A ve Şekil 8B), gerekse immunofloresan analizlerden elde edilen sonuçlar (Şekil 8C ve Şekil 8D), TLR-9'un Kontrol ve Deneme gruplarında benzer bir ekspresyon profiline sahip olduğunu göstermiştir. Gerek immunohistokimya (Şekil 9A), gerekse immunofloresan (Şekil 9B) analizlerden elde edilen sonuçlar, TLR-9'un alveol duvarında eksprese edildiğini göstermiştir. Alveol duvarının yanı sıra, alveol lümeninde de immunpozitif hücrelerin varlığı saptanmıştır (Şekil 10A). Elde edilen sonuçlar, immunofloresan boyama yöntemiyle doğrulanmıştır (Şekil 10B). Benzer şekilde, interstisyel alanda damar lümeni ve damar çevresinde immunpozitif hücrelerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 11). Her iki grupta da TLR-9'un bazı hava yolu epitel hücreleri tarafından eksprese edildikleri gözlemlenmiştir (Şekil 12).

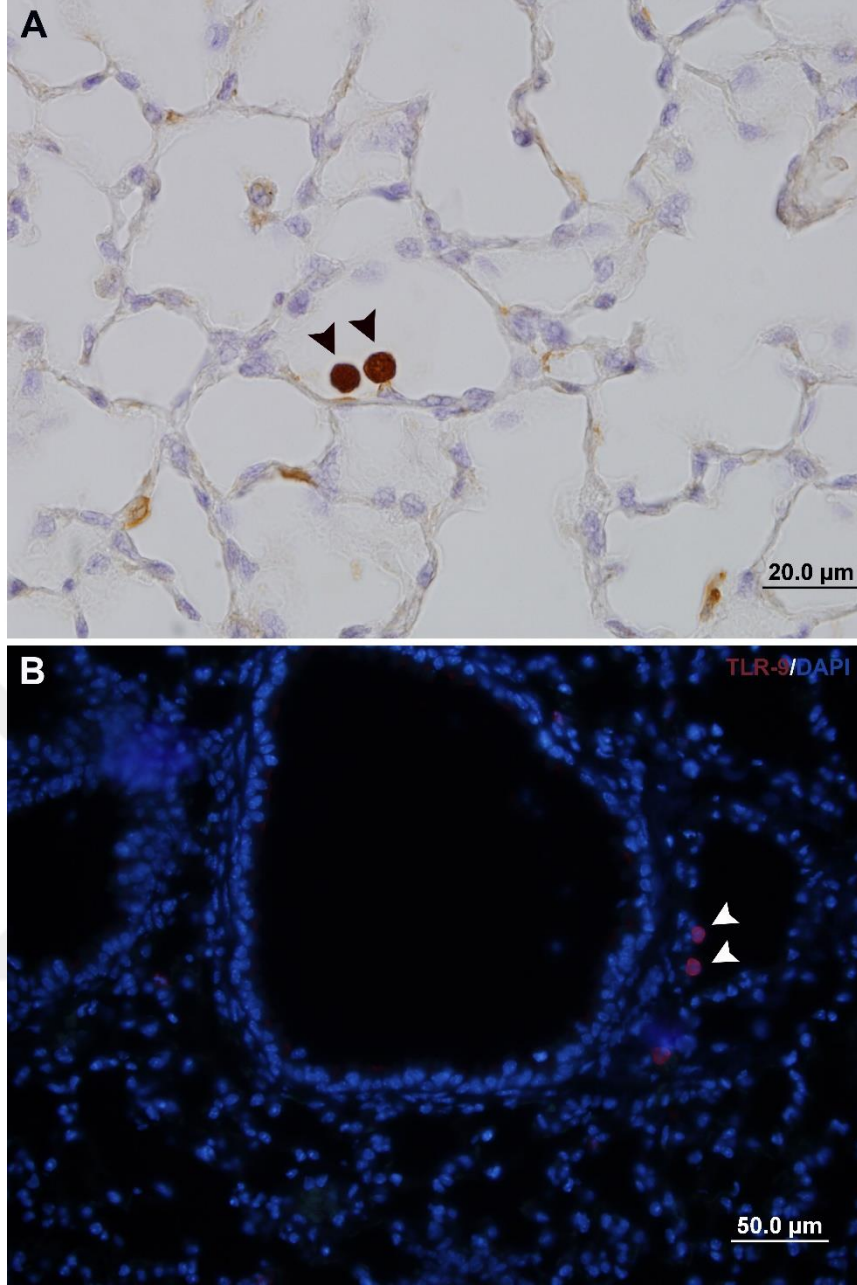
Ardışık kesitlerin TLR-9 ile paralel olarak Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikoru (FL-197, sc:13970, SantaCruz, 1/100) ile boyanması sonucu elde edilen bulgular alveol duvarında TLR-9 ekspresyonu gösteren immunpozitif hücrelerin Tip II pnömosit hücreler olduğunu göstermiştir (Şekil 13). Benzer şekilde, ardışık kesitlerin TLR-9 ile paralel olarak makrofaj hücre belirteci olarak kullanılan F4/80 primer antikoru (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100) ile boyanması sonucu elde edilen bulgular hava yolunda gözlenen bu hücrelerin makrofaj olduğunu göstermiştir (Şekil 14).



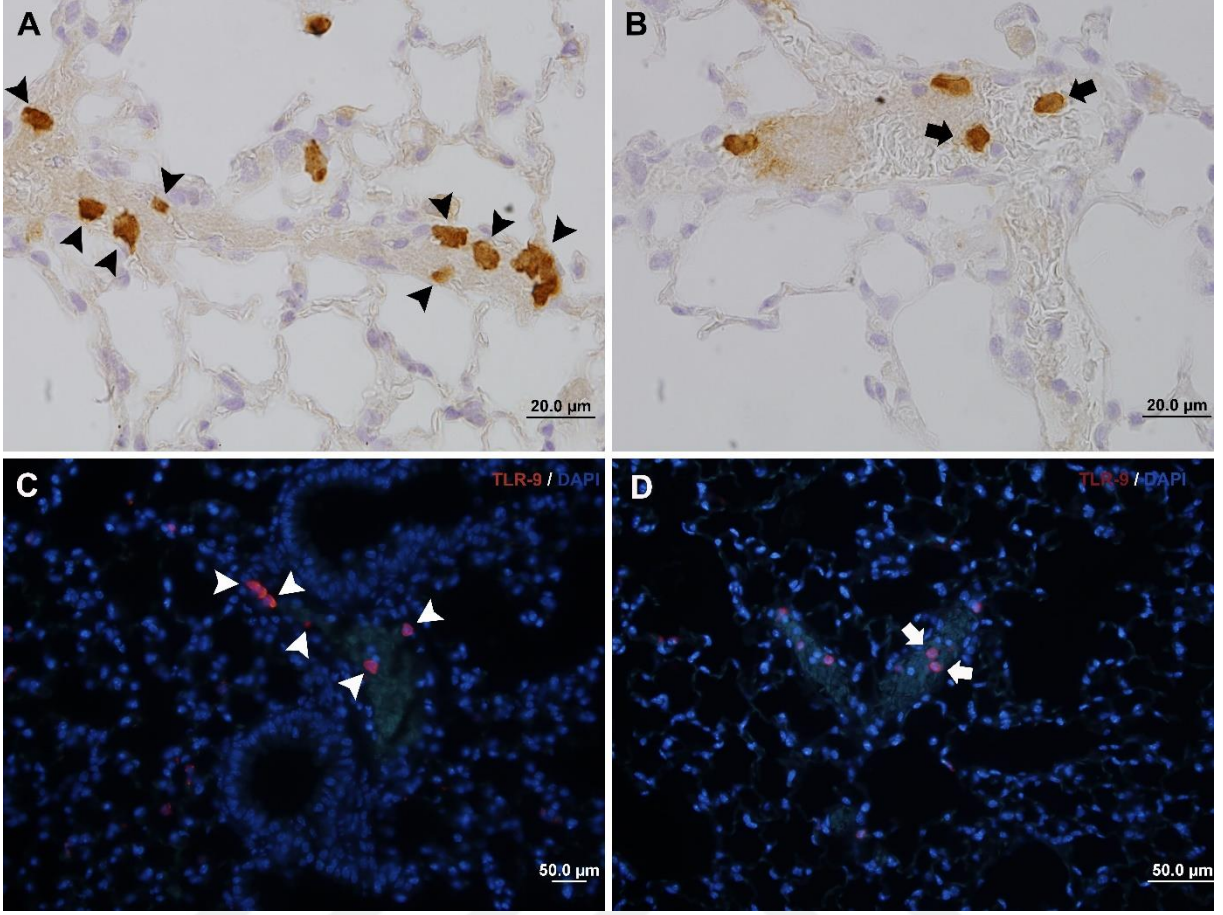
**Şekil 8.** Yetişkin akciğer dokusunda immunohistokimya ve immunofloresan boyama yöntemi ile TLR-9 ekspresyonunun belirlenmesi. Kesitler, TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilin ile gerçekleştirilmiştir (A), (B). İmmunofloresan yöntemin uygulanmasında, immunopozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A21127, Invitrogen) sekonder antikoru kullanılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile boyanmıştır (C), (D). Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar TLR-9'un Kontrol (A-C) ve Deneme (B-D) gruplarında benzer bir ekspresyon profiline sahip olduğunu göstermektedir.



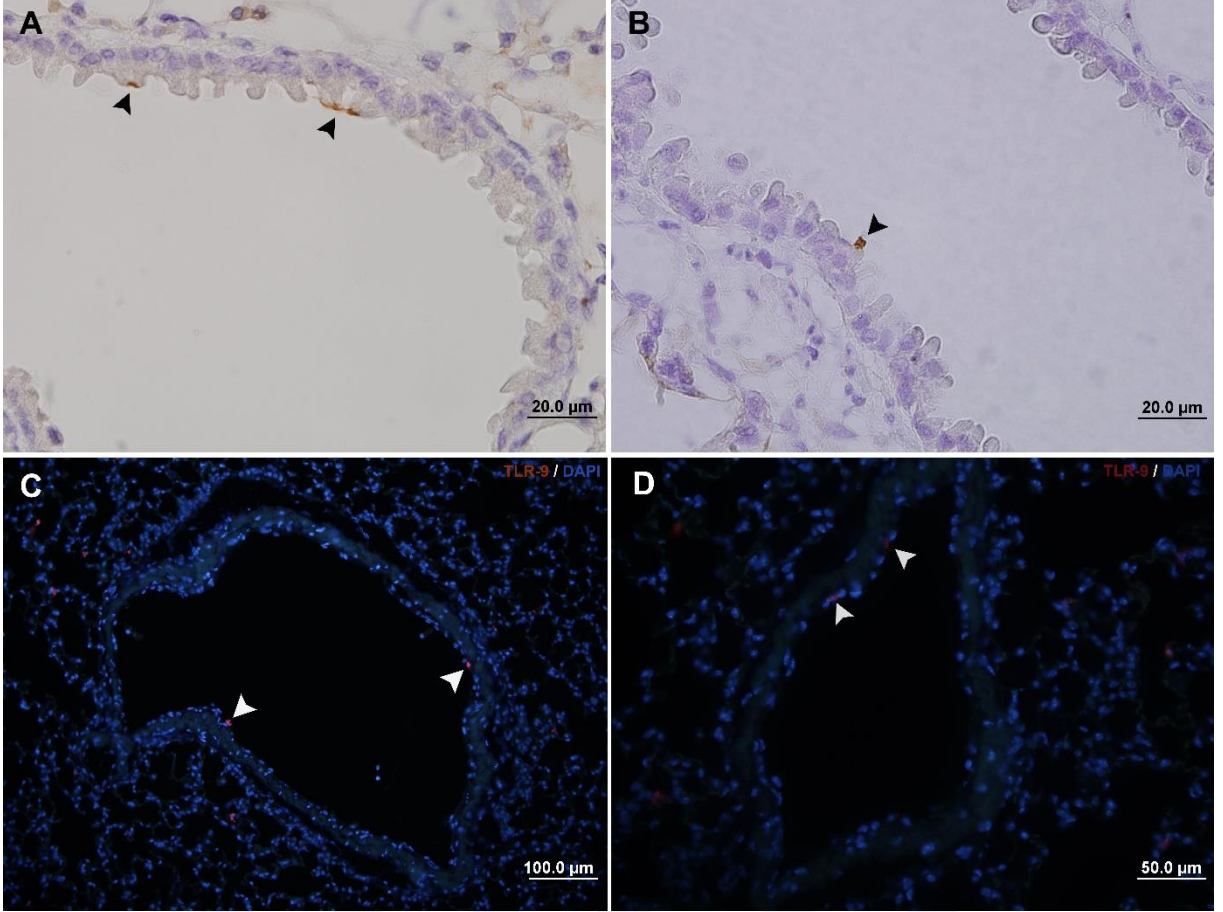
**Şekil 9.** Yetişkin akciğer dokusunda alveol duvarında TLR-9 ekspresyonu. Kesitler, TLR-9 primer antikorunu (NBP2-24729, Novus) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir. Alveol duvarında saptanan immunopozitif hücreler (siyah ok başları) kahverengi görülmektedir (A). İmmunofloresan yöntemin uygulanmasında, immunopozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A21127, Invitrogen) sekonder antikorunu kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile gerçekleştirilmiştir. Alveol duvarında saptanan immunopozitif hücreler (beyaz ok başları) kırmızı, hücre çekirdekleri ise mavi floresan renkte görülmektedir (B).



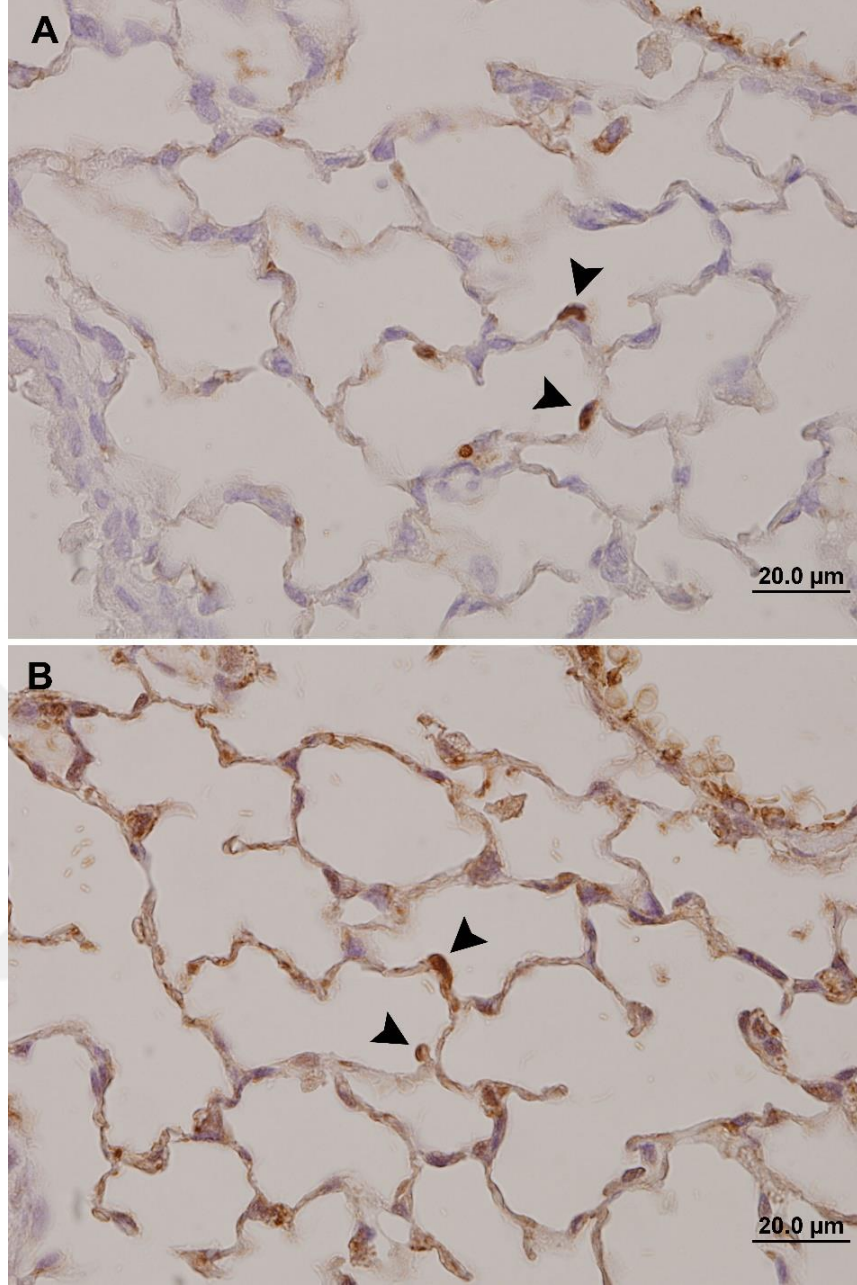
**Şekil 10.** Yetişkin akciğer dokusunda alveol lümeninde TLR-9 ekspresyonu. Kesitler, TLR-9 primer antikorunu (NBP2-24729, Novus) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir. Alveol lümeninde saptanan immunopozitif hücreler (siyah ok başları) kahverengi görülmektedir (A). İmmunofloresan yöntemin uygulanmasında, immunopozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A21127, Invitrogen) sekonder antikorunu kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile gerçekleştirilmiştir. Alveol lümeninde saptanan immunopozitif hücreler (beyaz ok başları) kırmızı, hücre çekirdekleri ise mavi florasan renkte görülmektedir (B).



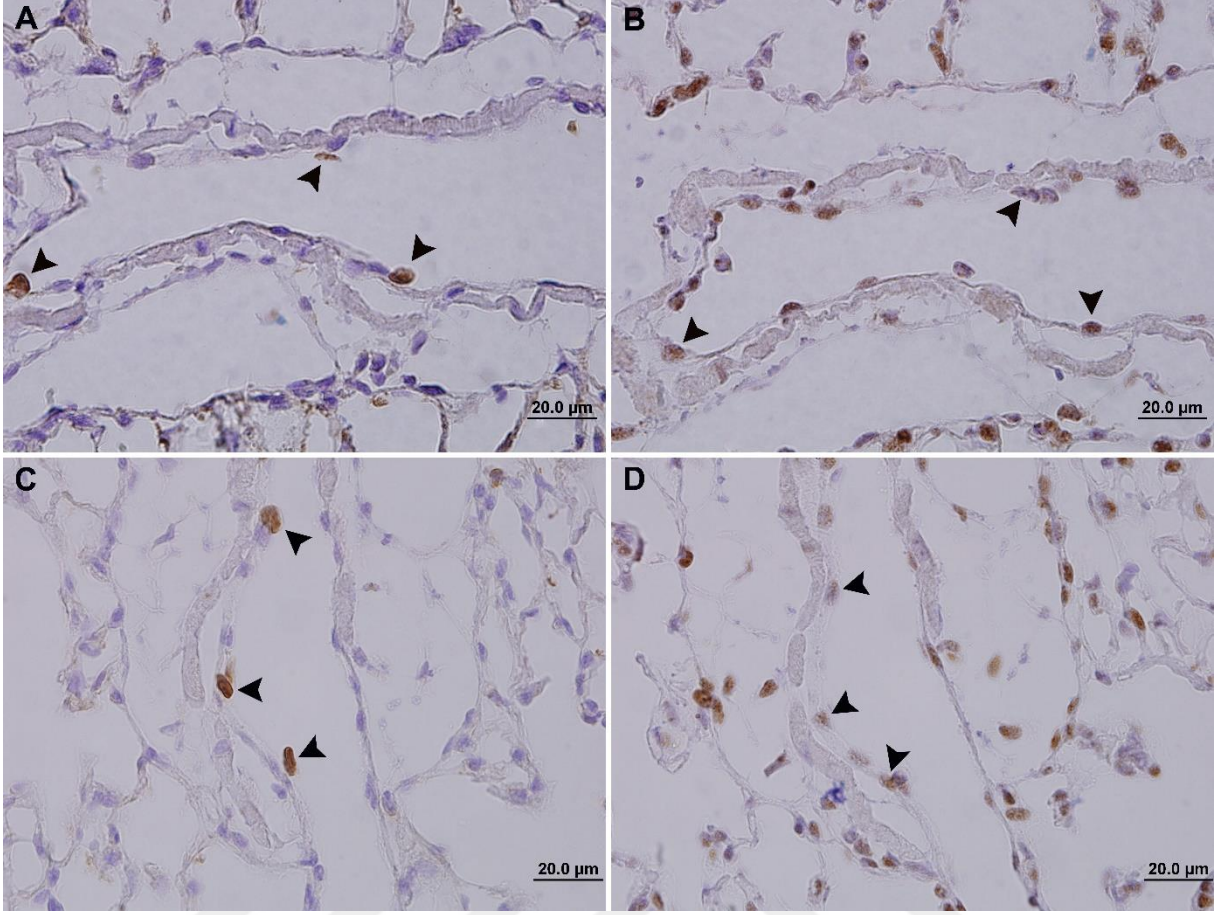
**Şekil 11.** Yetişkin akciğer dokusunda damar çevresi ve damar lümeninde TLR-9 ekspresyonu. Kesitler, TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir. Damar çevresinde (siyah ok başları) (A) ve damar lümeninde (siyah oklar) (B) saptanan immunopozitif hücreler kahverengi görülmektedir. İmmunofloresan yöntemin uygulanmasında, immunopozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A21127, Invitrogen) sekonder antikoru kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile gerçekleştirilmiştir. Damar çevresinde (beyaz ok başları) (C) ve damar lümeninde (beyaz oklar) (D) saptanan immunopozitif hücreler kırmızı, hücre çekirdekleri ise mavi floresan renkte görülmektedir.



**Şekil 12.** Yetişkin akciğer dokusunda hava yollarında TLR-9 ekspresyonu. Kesitler, TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoxilen ile gerçekleştirilmiştir. Hava yolu epitelinde saptanan immunopozitif hücreler (siyah ok başları) kahverengi görülmektedir (A), (B). İmmunofloresan yöntemin uygulanmasında, immunopozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A21127, Invitrogen) sekonder antikoru kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile gerçekleştirilmiştir. Hava yolu epitelinde saptanan immunopozitif hücreler (beyaz ok başları) kırmızı, hücre çekirdekleri ise mavi floresan renkte görülmektedir (C), (D).



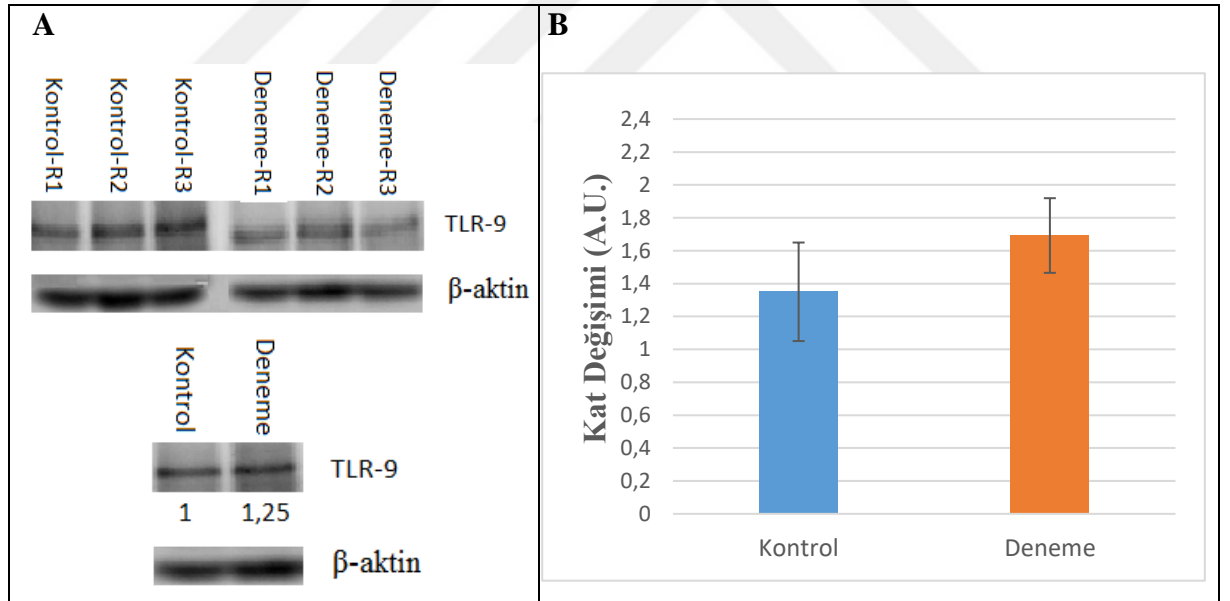
**Şekil 13.** Yetişkin akciğer dokusunda immunohistokimya boyama yöntemi ile TLR-9 ekspresyonu gösteren Tip II pnömosit hücrelerinin belirlenmesi. Ardışık kesitlerden ilki TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus) (**A**), ikincisi ise Tip II pnömosit hücre belirteci olarak kullanılan SP-C primer antikoru (FL-197, sc:13970, SantaCruz, 1/100) (**B**) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir. Alveol duvarında saptanan ve SP-C ekspresyonu gösteren Tip II pnömosit hücrelerinin (**B**) TLR-9'u eksprese ettiği görülmektedir (**A**).



**Şekil 14.** Yetişkin akciğer dokusunda immunohistokimya boyama yöntemi ile TLR-9 ekspresyonu gösteren makrofaj hücrelerinin belirlenmesi. Ardışık kesitlerden ilki TLR-9 primer antikoru (NBP2-24729, Novus) (A), (C), ikincisi ise makrofaj belirteci olarak kullanılan F4/80 primer antikoru (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100) (B), (D) ile muamele edilmiştir. İmmunopozitif hücrelerin belirlenmesinde DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoxilen ile gerçekleştirilmiştir. Hava yolunda saptanan ve F4/80 ekspresyonu gösteren makrofaj hücrelerinin (B), (D) TLR-9'u eksprese ettiği görülmektedir (A), (C).

### 4.3. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde Western Blot Tekniğiyle TLR-9 Ekspresyonunun Belirlenmesi

Yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR-9 proteininin ekspresyonunu belirlemeye yönelik yapılan analizler sonucunda hem Kontrol grubunda (Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3) hem de Deneme grubunda (Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) 96-116 kDa aralığında olan ve TLR-9'a karşılık gelen spesifik bir bandın varlığı saptanmıştır. Endojen kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktin proteininin ekspresyonu, kuyucuklara yüklenen protein miktarının eşit olduğunu göstermiştir. Dansitometre analizi sonucu elde edilen TLR-9 proteinine karşılık gelen bant yoğunlukları  $\beta$ -aktin ile normalize edilerek hesaplanmıştır. Kontrol (Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3) ve Deneme (Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) gruplarına ait normalize değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları sırasıyla  $1,35 \pm 0,2995$  ve  $1,69 \pm 0,2269$  olarak belirlenmiştir. Tüm gruplar için gerçekleştirilen normalizasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar, Deneme grubunun Kontrol grubuna göre TLR-9 proteinine ait ekspresyon düzeyinin 1,25 kat arttığını göstermiştir ( $p=0,015$ ).



**Şekil 15.** Western blot yöntemiyle yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR-9 protein ekspresyonunun belirlenmesi. Western blot işlemi sonrası tüm gruplarda 96-116 kDa aralığında olan ve TLR-9 proteinine karşılık gelen spesifik bir bandın varlığı görülmektedir (A). Endojen kontrol amacıyla kullanılan  $\beta$ -aktinin hem kontrol hem de deneme grubunda eksprese edildiği görülmektedir (A). Normalizasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar sonucunda, Deneme grubunun Kontrol grubuna göre TLR-9 proteinine ait ekspresyon düzeyinin 1,25 kat arttığı görülmektedir (B). Kontrol ve Deneme grupları için Arbitrary Unit (a.u.) cinsinden verilen kat değişim sonuçları, tüm biyolojik replikasyonlar için gerçekleştirilen normalizasyon işlemleri sonrasında elde edilen ortalama kat değişimi değerlerini ifade etmektedir.

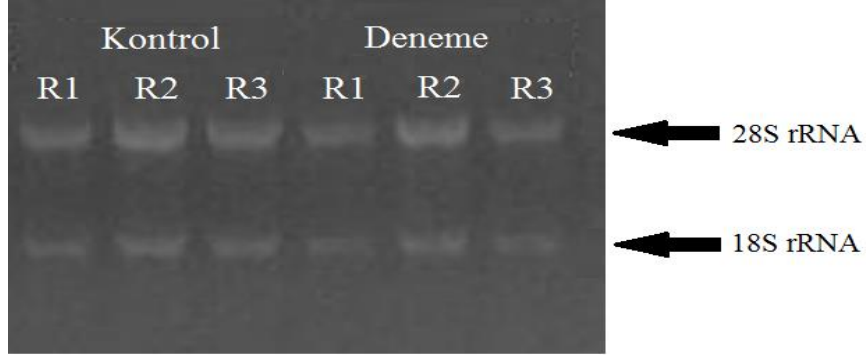
#### 4.4. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA Örneklerinin Kalitesinin Belirlenmesi

Sunulan tez çalışmasında uygun koşullar altında Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer dokularından izole edilerek -80 C’de muhafaza edilen total RNA örneklerinin miktarlarını ve kalitelerini test etmek amacıyla spektrofotometrik ölçümler (MultiskanGo, Thermo) yapılmıştır. Spektrofotometrike ölçüm sonuçları ve elde edilen total RNA örneklerine ait konsantrasyonu,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  ve  $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$  değerleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Tüm gruplara ait RNA örneklerinin  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  ve  $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$  değerleri.

Örnek No	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{320}$	$A_{260}/A_{280}$	$(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Kontrol-R1</b>	0,3910	0,1911	0,0136	2,05	2,15	312
<b>Kontrol-R2</b>	0,4829	0,2235	0,0035	2,16	2,18	386
<b>Kontrol-R3</b>	0,5658	0,2703	0,0180	2,09	2,17	452
<b>Deneme-R1</b>	0,2561	0,1280	0,0163	2,00	2,15	204
<b>Deneme-R2</b>	0,3690	0,1728	0,0035	2,14	2,16	296
<b>Deneme-R3</b>	0,4038	0,1895	0,0070	2,13	2,17	324

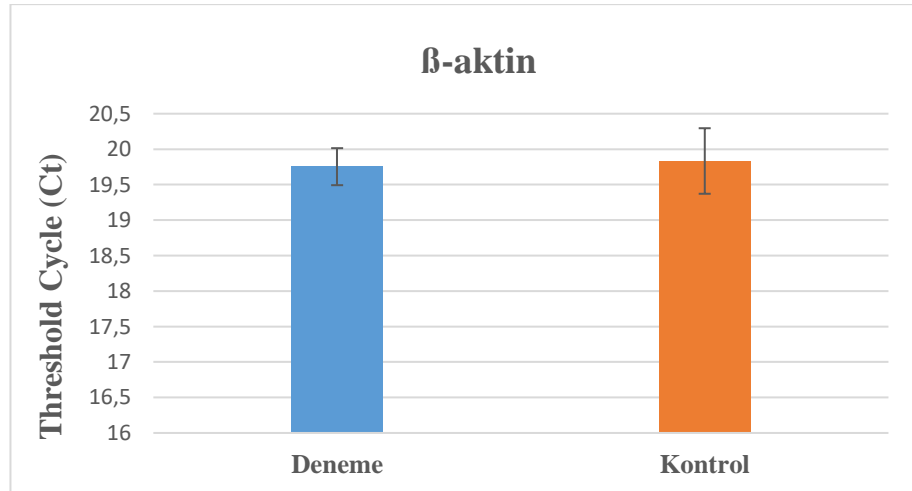
Kaliteleri ve miktarları spektrofotometrik olarak belirlenen total RNA örnekleri ayrıca, Redsafe nükleik asit boyası içeren %1’lik denature agaroz jelde 60V’da 4 saat koşturulmuştur. Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre tüm RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bandlarında herhangi bir yıkımlanmanın ve buna bağlı olarak ortaya çıkan smear’in bulunmadığı ve 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında olduğu belirlenmiştir (Resim 1). Elde edilen sonuçlar RNA örneklerinin saf olduğunu ve RNA bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir.



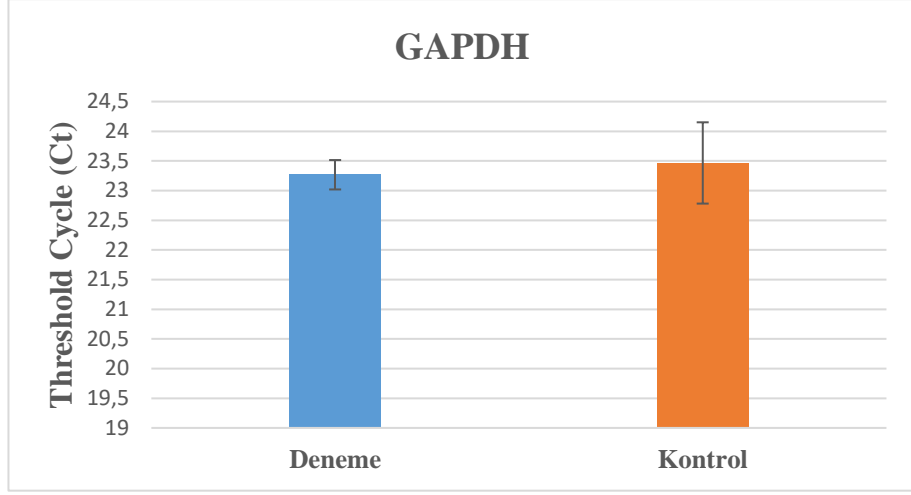
**Resim 1.** Total RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bandlarının agaroz jelde görüntüsü. Her örnekten 1 µg total RNA %1'lik denature agaroz jelde koşturulmuştur. Tüm RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bandlarında herhangi bir yıkımlanmanın ve buna bağlı olarak ortaya çıkan smear'in bulunmadığı ve 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında olduğu belirlenmiştir.

#### 4.5. Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde Real-Time PCR Tekniğiyle TLR-9 Ekspresyonunun Belirlenmesi

Yukarıda belirtildiği şekilde saflık ve bütünlüğü belirlenmiş olan total RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmış, elde edilen cDNA örnekleri real-time PCR analizlerinde kullanılmıştır. Real-time PCR sonrası tüm örneklerde TLR-9 ve endojen kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Threshold Cycle (Ct) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar,  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin tüm gruplarda birbirine son derece yakın olduğunu, dolayısıyla söz konusu genlerin gruplar arasında eşit düzeyde eksprese edildiklerini göstermektedir (Şekil 16 ve Şekil 17).

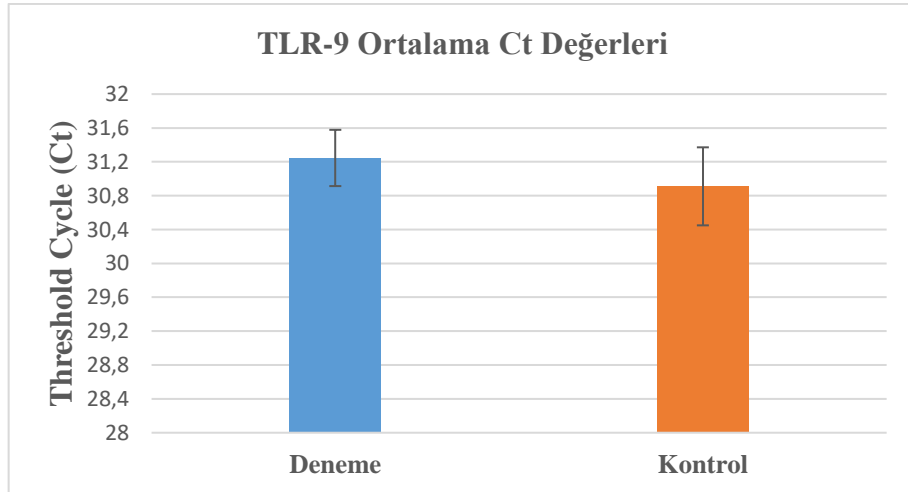


**Şekil 16.** Deneme ve Kontrol gruplarında  $\beta$ -aktin geni için ortalama Ct değerleri.



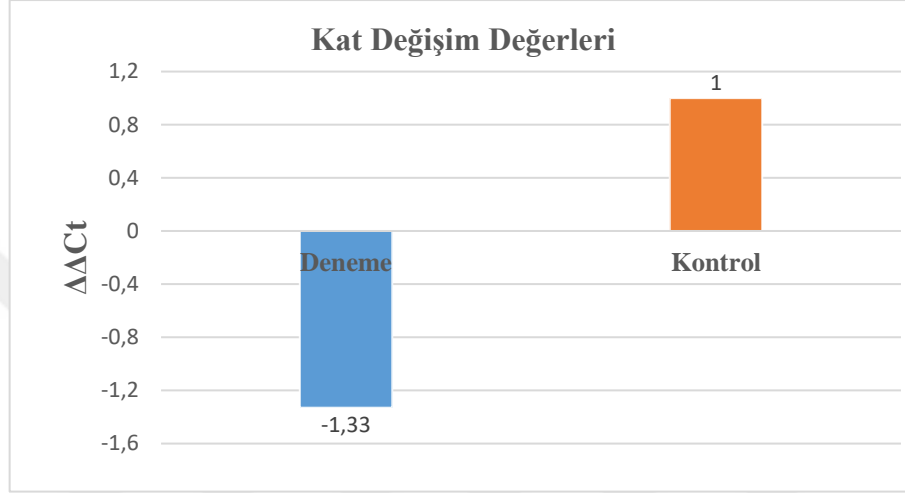
**Şekil 17.** Deneme ve Kontrol gruplarında GAPDH geni için ortalama Ct değerleri.

Bu sonuçlar doğrultusunda normalizasyonlar, endojen referans olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ve GAPDH genleri için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanmasında, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta Ct$  metodu kullanılmıştır. Gerçekleştirilen tüm analizlerde Kontrol grubu ekspresyon değeri “1” alınarak Deneme grubuna ait ekspresyon miktarı Relative Quantification değerleri üzerinden hesaplanmıştır. Kontrol ve Deneme gruplarında TLR-9 geni için elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapmaları sırasıyla  $30,91 \pm 0,46$  ve  $31,24 \pm 0,33$  olarak belirlenmiştir (Şekil 18).



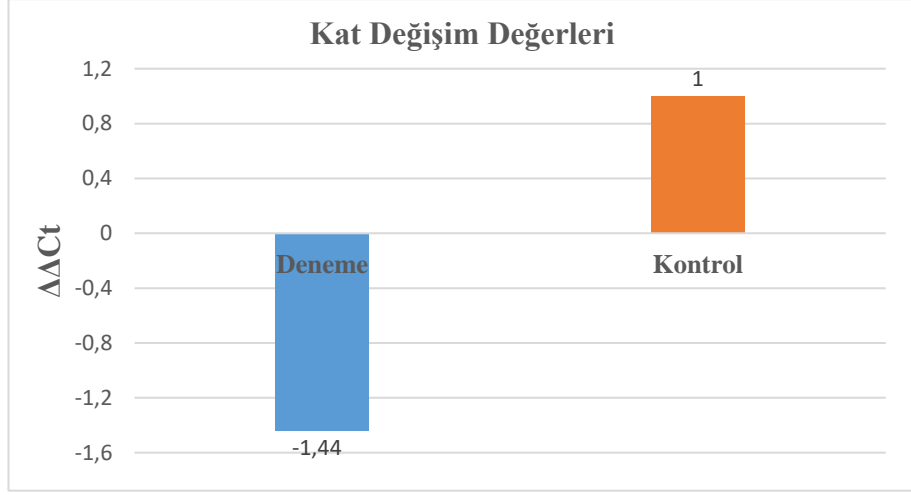
**Şekil 18.** Deneme ve Kontrol gruplarında TLR-9 geni için ortalama Ct değerleri.

İlk olarak kat değişimi hesaplamaları endojen referans olarak kullanılan  $\beta$ -aktin genine göre yapılmıştır.  $\beta$ -aktin geninin kullanılması durumunda elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,33 kat azaldığını göstermiştir. Buna karşın, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir. Kontrol ve Deneme grubu arasında hesaplanan TLR-9 genine ait kat değişim değerleri Şekil 19'da gösterilmiştir.



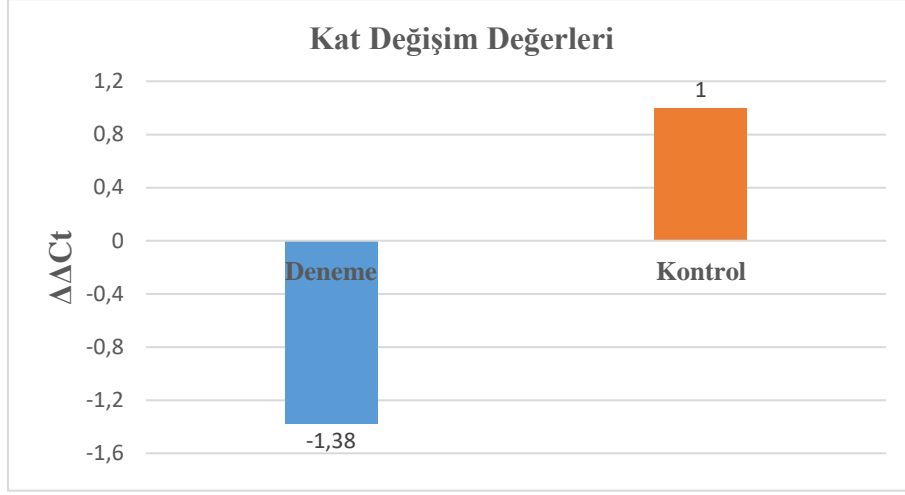
**Şekil 19.** Kontrol grubuna ait TLR-9 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen referans olarak kullanılan  $\beta$ -aktin geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta C_t$  metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu "1" olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri,  $<1$  bulunan değerler, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını,  $1 <$  değerler ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri, endojen referans olarak kullanılan GAPDH genine göre de kat değişimi hesaplamaları yapılmıştır. Endojen referans olarak GAPDH geninin kullanılması durumunda, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,44 kat azaldığı saptanmıştır (Şekil 20). Buna karşın, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 20.** Kontrol grubuna ait TLR-9 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen referans olarak kullanılan GAPDH geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta Ct$  metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu "1" olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 bulunan değerler, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerler ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

Real-time PCR analizlerinde, normalizasyon işlemlerinde farklı endojen kontrol genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalamasının kullanılması durumunda elde edilen verilerin güvenilirliğini arttırdığı ifade edilmektedir (Vandesompele ve ark, 2002). Bu durum göz önüne alınarak,  $\beta$ -aktin ve GAPDH kullanılarak gerçekleştirilen kat değişim hesaplamalarına ek olarak  $\beta$ -aktin/GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalamasına göre de kat değişim hesaplamaları yapılmıştır. Elde edilen veriler, endojen referans olarak  $\beta$ -aktin ve GAPDH genine ait Ct değerlerinin geometrik ortalaması kullanılması durumunda, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,38 kat azaldığını göstermiştir (Şekil 21). Buna karşın, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 21.** Kontrol grubuna ait TLR-9 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen referans olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalaması ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta C_t$  metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu '1' olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri,  $<1$  bulunan değerler, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını,  $1 <$  değerler ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

ÜYTE yöntemlerinden *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi yöntemi ile dünyaya gelen ve ilk tüp bebek olarak bilinen Louis Brown'un doğumundan (Edwards ve Steptoe, 1978) günümüze kadar geçen sürede, ÜYTE yöntemleri ile dünyaya gelen bebek sayısının dünya genelinde 6.5 milyona ulaştığı tahmin edilmektedir (Feuer ve Rinaudo, 2017). Bununla birlikte gelişmiş ülkelerde ÜYTE uygulanarak doğan bebekler, gerçekleşen doğumların %1-4'ünü temsil etmektedirler (Kondapalli ve Perales-Puchalt, 2013). Dünya nüfusunda önemli bir yere sahip olan ÜYTE uygulamasından sonra dünyaya gelen çocukların sağlık durumları hakkında giderek artan endişeler, ÜYTE uygulamalarının sağlık üzerinde etkilerinin araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır (Sutcliffe ve Ludwig, 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar ÜYTE uygulamasından sonra dünyaya gelen bebeklerin, normal gebelikle dünyaya gelen bebeklere oranla daha fazla sağlık riski taşıdıklarını göstermektedir (Shevell ve ark, 2006; Klemetti ve ark, 2006; Basatemur ve ark, 2008; Hediger ve ark, 2013). Örneğin, ÜYTE yöntemleriyle oluşan gebeliklerde, normal gebeliklere kıyasla erken doğum, düşük doğum ağırlığı, konjenital anomaliler, perinatal mortalite ve gebelikle ilgili diğer komplikasyonların görülme olasılığının daha fazla olduğu belirtilmektedir (Shih ve ark, 2008; Fernando ve ark, 2012; Kondapalli ve ark, 2013). Bununla birlikte, düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerin erişkin dönemlerinde tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi sağlık sorunlarının görülme riskinin daha fazla olduğu belirtilmektedir (Barker, 1998). Ayrıca ÜYTE uygulanarak doğan bebeklerde erken doğum olasılığı artmakta ve buna bağlı olarak erken doğum ile dünyaya gelmiş bebeklerin solunum yolu enfeksiyonlarına karşı daha duyarlı oldukları belirtilmektedir (Koivurova ve ark, 2002). Yapılan kohort çalışmalarında ise, ÜYTE uygulamaları sonucu dünyaya gelen çocuklarda otizm (Fountain ve ark, 2015), astım (Carson ve ark, 2012), Beckwith-Wiedemann sendromu, Prader-Willi sendromu ve Angelman sendromu gibi genetik anomaliler (Debaun ve ark, 2003; Weksberg ve ark, 2003; Ludwig ve ark, 2005), kanser (Källén ve ark, 2010), Serebral palsi (Strömberg ve ark, 2002) ve epilepsi (Sun ve ark, 2007) gibi hastalıkların normal gebelik sonucunda dünyaya gelmiş bireyler ile karşılaştırıldığında daha fazla görüldüğünü oraya koymaktadır. Araştırmacılar, ÜYTE uygulamasından sonra doğan bebeklerin hastalıklara karşı daha duyarlı olmasının nedenlerinden birinin, *in vitro* ortamda gerçekleşen ÜYTE işlemlerinden kaynaklanmış olabileceğini ileri sürmektedirler (Shih ve ark, 2008; Katari ve ark, 2009). Özellikle ÜYTE uygulamaları sırasında, ovülasyon indüksiyonu amacıyla çeşitli ilaçların kullanılması,

gametlerin/embriyoların *in vitro* ortamda kültüre edilmesi, dondurulması ve daha sonra çözdürülmesi gibi birçok işlem gametlere/embriyolara zarar verebilmektedir (Lu ve ark, 2013). Dolayısıyla *in vitro* ortamda gamet/embriyolara yönelik yapılan çeşitli manipülasyonlar hem prenatal hem de postnatal olarak fetal gelişimde değişikliklere neden olabilmektedir (Farin ve ark, 2004). Daha da önemlisi, yapılan çalışmalar doğum öncesi olayların organların gelişiminde ve işlevlerinde kalıcı değişikliklere neden olabildiğini ve bu nedenle yaşamın ilerleyen dönemlerinde çeşitli hastalıklara zemin hazırlayabildiğini ortaya koymaktadır (Barker, 1995; Barker, 1998; Ceelen ve Vermeiden, 2001). Konuyla ilgili olarak Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından gerçekleştirilen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda toll-benzeri reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi” isimli TÜBİTAK projesinden (Proje no: 112O259) elde edilen verilere göre, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen farelerde fetal gelişim geriliği ve akciğer gelişiminin geri kaldığını ve buna bağlı olarak akciğer dokusunda bulunan TLR-9 ekspresyon düzeyinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu verilerin ışığında, sunulan tez çalışmasında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi yöntemiyle elde edilen farelerde yetişkin dönemde akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Akciğer dokusu, gaz alış-verişini gerçekleştirebilmek amacıyla dış ortama maruz kalan, vücudun en büyük epitelyal yüzeyini temsil etmektedir (Mason ve Nelson, 1992). Canlının doğduğu anda aldığı ilk nefesten itibaren akciğer dokusu dış çevreden gelen patojenik mikroorganizmalara, allerjenlere ve partikül halindeki kirleticiler gibi zararlı ajanlara maruz kalmaktadır (Suzuki ve ark, 2008; Saluzzo ve ark, 2017). Bu nedenle yabancı maddelere karşı dokunun steril yapısını korumak amacıyla, akciğer dokusunda birçok savunma mekanizması aktif olarak rol oynamaktadır. Bu savunma mekanizmalarından anatomik bariyerler, öksürük refleksi, mukosilliyer temizleme gibi non-spesifik faktörler görev alırken, doğal ve edinsel bağışıklık sistemi akciğer enfeksiyonlarına karşı tam bir koruma sağlamaktadır (Zaas ve Schwartz, 2005). Akciğer dokusunun savunma mekanizmalarının önemli bir parçası olan doğal bağışıklık sistemi, patojenle ve yabancı antijenle karşılaştığında ilk bağışıklık yanıtını doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait (self) olan ve kendisine ait olmayan (non self) antijenik yapıları tanıyabilme yeteneğine sahiptir (Turul ve Ersoy, 2004; Zaas ve Schwartz, 2005). Doğal bağışıklık sistemi bu işlevini, mikroorganizmaların yapısında bulunan ve PAMP adı verilen evrimleri boyunca korunmuş yapıları algılayarak gerçekleştirmektedir. PAMP’lar immun ve immun olmayan hücrelerin yüzeyinde ya da hücre içi kompartmanlarında

yer edinmiş ve PRR ailesi üyelerinden biri olan TLR reseptörleri aracılığıyla tanınmaktadırlar (Crack ve Bray, 2007; Thompson ve ark, 2011). Dolayısıyla, TLR'lerin PAMP'lar ile etkileşimini takiben bir dizi sinyal yolağının aktive olması ile proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve tip 1 interferonların üretimi indüklenmekte ve patojenlere/yabancı antijenlere karşı konak savunma mekanizması aktif hale gelmektedir (Olive, 2012). Yapılan çalışmalar, bakteriyel ve viral DNA'da bulunan metillenmemiş CpG motiflerinin TLR-9 aracılığıyla tanındığını göstermektedir (Hemmi ve ark, 2000). Bakteriyel ve viral DNA'daki CpG motiflerinin sıklığı omurgalı hayvanların DNA'sına göre daha düşüktür ve metillenmemiştir. Dolayısıyla genom yapısındaki bu farklılık, omurgalıların doğal bağışıklık sisteminin bakteriyel/viral DNA'yı kendi DNA'sından ayırt etmesine ve dolayısıyla bakteriyel/viral DNA'larla karşılaştığında tehlike sinyali olarak algılamasına olanak sağlamaktadır (Hemmi ve ark, 2000; Chaung, 2006). Bununla birlikte metillenmemiş CpG motiflerini taklit edebilen ve CpG motifleri içeren sentetik oligodeoksinükleotitlerin (CpG-ODN) de TLR-9'u uyarabildiği ve bunun sonucunda IL-12, IL-6 veya TNF-a gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini desteklediği bildirilmiştir (Verthelyi ve ark, 2002; Krieg, 2007). Örneğin, CpG-ODN'nin intraperitoneal olarak uygulanması sonrasında normal (wild-type) farelerde akciğerde yangı şekillendiğini, buna karşın TLR-9'dan yoksun (knock-out) farelerde benzer bir yangısal reaksiyonun ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Knuefermann ve ark, 2007). Bununla birlikte, akciğer tüberkülozunda CpG-ODN'lerin immun uyarıcı etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olmuş farelerin CpG-ODN uygulaması sonrası akciğer dokusunda makrofajların ve T hücrelerinin aktivasyonundan sorumlu olan IFN- $\gamma$  sitokin konsantrasyonunu arttığı ve buna bağlı olarak akciğer dokusundaki mikobakteri oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (Juffermans ve ark, 2002). Ayrıca Bafica ve ark (2005), fareler ile yaptıkları bir çalışmada TLR9'un *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu sırasında mikobakteri kaynaklı Th1 yanıtlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Literatürde pek çok çalışmada TLR-9'un kronik enflamatuvar, otoimmün ve enfeksiyöz hastalıklar ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Juffermans ve ark, 2002; Krieg ve Vollmer, 2007; Schneberger ve ark, 2016). Örneğin, Albiger ve ark (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, TLR-9 geni bloke edilmiş farelerin pnömokokal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir. Ayrıca, Bhan ve ark (2008) akciğer enfeksiyonuna neden olan *Legionella pneumophila*'nın fare modeli ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, normal fareler (wild-type) ile kıyaslandığında TLR-9'dan yoksun (knock-out) farelerde artan mortalite oranı ve akciğer dokusunda azalan bakteriyel arındırma (bacterial clearance) ile kendisini gösteren pulmoner pnömoni enfeksiyonuna karşı duyarlılığın arttığı bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalar, TLR-9'un bakterilerin yanı sıra bazı mantar türlerine karşı da konak savunmasında etkin bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Ramirez-Ortiz ve ark, 2008; Zhang ve ark, 2010). Örneğin *Aspergillus fumigatus*'a duyarlı fareler (*A. fumigatus* ile duyarlaştırılmış astım modeli) ile yapılan bir çalışmada TLR-9'dan yoksun olan farelerin akciğer dokusunda normal (wild type) farelere kıyasla dectin-1 ekspresyonunun daha düşük olduğu bildirilmiştir (Ramaprakash ve ark, 2009). Söz konusu çalışmada TLR-9'un dectin-1 ekspresyonunu etkilemek suretiyle antifungal immun yanıtları düzenlediği gösterilmiştir (Ramaprakash ve ark, 2009). Yine fungal astım modeliyle yapılan bir diğer çalışmada TLR-9'dan yoksun (knock-out) olan fareler, normal (wild-type) fareler ile karşılaştırılmış ve intranazal CpG uygulamasının, normal (wild-type) farelerde Th2 ile ilişkili sitokin düzeyini, hava yolu inflamasyonunu ve hava yolu aşırı duyarlılığını önemli derecede inhibe ettiği bildirilmiştir (Ramaprakash ve Hogaboam, 2009). Söz konusu çalışmada ayrıca CpG tedavisinin akciğerde IL-12 ve IL-10 sitokin düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Ramaprakash ve Hogaboam, 2009). Elde edilen veriler, antijen kaynaklı astımın önlenmesinde CpG-DNA'nın TLR-9 aracılığıyla gerçekleşen akciğer konak savunmasında önemli işlevleri olduğu göstermektedir. Ayrıca klinik öncesi ve klinik araştırmalarda, TLR-9 agonistlerinin, immun stimülatör özelliklerinden dolayı enfeksiyöz ve alerjik astım gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Kline ve ark, 2008; Beeh ve ark, 2013; Shirota ve Klinman, 2014; Casale ve ark, 2015).

Viral solunum yolu enfeksiyonları hem çocukları hem de yetişkinleri etkileyen en yaygın bulaşıcı hastalıklar arasında yer almaktadır. Virüslerin hızlıca tanınması ve gerekli doğal bağışıklık yanıtının ve devamında edinsel bağışıklık yanıtının oluşması konak savunması için gereklidir (See ve Wark, 2008). Yapılan çalışmalar DNA virüslerinin TLR-9 tarafından tanındığını göstermektedir (Krug ve ark, 2004; Delale ve ark, 2005; Tabeta ve ark, 2004). Örneğin TLR-9'dan yoksun (knock-out) fareler ile yapılan bir çalışmada *Herpes simplex* virüsüne yanıt olarak tip 1 IFN ve IL-12 üretiminin TLR-9 aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Krug ve ark, 2004). Benzer şekilde, TLR-9'dan yoksun (knock-out) olan farelerin *Ectromelia* virüs enfeksiyonuna karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Samuelsson ve ark, 2008). Ayrıca Guggemoos ve ark (2008), dentritik hücrelerin TLR-9'dan yoksun (knock-out) olan farelerde normal (wild-type) farelere kıyasla *Gama-herpes* virüs enfeksiyonuna karşı daha az sitokin (IL-12, IFN-a ve IL-6) ürettiği ve buna bağlı olarak TLR-9'dan yoksun farelerde hem litik hem de latent enfeksiyon boyunca viral yük miktarının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte Luckhardt ve ark (2011), *Gama-herpesvirüs-68* ( $\gamma$ HV68) ile ilişkilendirilmiş pulmoner fibrozis fare modeli ile yaptıkları bir çalışmada, TLR-9'dan yoksun

(knock-out) farelerin normal (wild-type) farelere kıyasla viral enfeksiyonlara karşı fibroblastlar tarafından salgılanan IFN-b sitokin konsantrasyonunun daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Özet olarak, TLR-9'un bakteriyel, mantar ve viral enfeksiyonlara karşı konak bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynadığı açık bir şekilde görülmektedir. Dolayısıyla TLR-9'un yapısında ya da ekspresyon düzeyinde olabilecek değişiklikler, konağın immun yanıtını zayıflatabilmekte ve çeşitli enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olabilmektedir.

TLR-9, ağırlıklı olarak hücre içi endozomlarda eksprese edilmektedir (Latz ve ark, 2004). Ancak, yapılan çalışmalarda TLR-9'un hücre yüzeyinde de ekspresyon gösterdiği rapor edilmiştir (Eaton-Bassiri ve ark, 2004; Ewaschuk ve ark, 2007). TLR-9 hem immun hücrelerde hem de immun olmayan hücrelerde ekspresyon göstermektedir. Yapılan çalışmalar farelerde ve insanlarda bulunan immun hücrelerden; nötrofillerde (Hayashi ve ark, 2003; József ve ark, 2004), NK hücrelerinde (Roda ve ark, 2005), eozinofillerde (Nagase ve ark, 2003; Månsson ve Cardell, 2009), mast hücrelerinde (Ikeda ve ark, 2003; Kulka ve ark, 2004), B hücrelerinde (Bernasconi ve ark, 2003; Cognasse ve ark, 2008), T hücrelerinde (Babu ve ark, 2006; Cottalorda ve ark, 2006), monositlerde ve alveolar makrofajlarda TLR-9 ekspresyonunun olduğunu göstermektedir (Suzuki ve ark, 2005; Juarez ve ark, 2010). Ayrıca, TLR-9'un immun sistem içerisinde yer almayan mide epitel hücrelerinde (Schmausser ve ark, 2004), burun mukozasında (Fransson ve ark, 2007), ince bağırsakta bulunan paneth hücrelerinde (Rumio ve ark, 2004), fibroblast hücrelerinde (Fischer ve ark, 2005; Luckhardt ve ark, 2011), kan plateletlerinde (Cognasse ve ark, 2005; Aslam ve ark, 2006; Thon ve ark, 2012), solunum yolu epitel hücrelerinde (Platz ve ark, 2004), vasküler endotelde, Tip I pnömosit ve Tip II pnömosit hücreleri tarafından da eksprese edildiği bilinmektedir (Li ve ark, 2004; Schneberger ve ark, 2013).

Sunulan tez çalışmasında, TLR-9 ekspresyon profilini belirlemek amacıyla immunohistokimya ve immunofloresan boyama tekniklerinden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR-9'un benzer bir ekspresyon profiline sahip olduğunu göstermiştir. Gerek immunohistokimya, gerekse immunofloresan analizlerinden elde edilen sonuçlar, yetişkin akciğer dokusunda TLR-9'un hava yolu epitel hücrelerinde, damar lümeninde, damar çevresinde ve alveol duvarında eksprese edildiğini göstermiştir. Alveol duvarının yanı sıra, TLR-9-pozitif hücrelere alveol lümeninde de rastlanmıştır. Alveol duvarında saptanan immunpozitif hücrelerin karakterizasyonuna yönelik olarak TLR-9 ve Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikoru kullanılarak double-immunofloresan çalışmaları yapılmıştır. Ancak, immunofloresan

yönteminde SP-C primer antikoru ile herhangi bir spesifik boyanma saptanamamıştır. Sorunun giderilmesine yönelik olarak immunohistokimya yöntemi ile ardışık kesitlerin TLR-9 ile paralel olarak Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikoru ile boyanması gerçekleştirilmiştir. Ardışık kesitlerin her iki antikoru ile boyanması sonucu elde edilen veriler, alveol duvarında TLR-9 ekspresyonu gösteren bazı immunpozitif hücrelerin Tip II pnömosit hücreler olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, TLR-9'un Tip II pnömosit hücreleri tarafından eksprese edildiğini gösteren immuno elektron mikroskop çalışmalarından (Schneberger ve ark, 2013) elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Benzer şekilde, hava yollarında saptanan immunpozitif hücrelerin karakterizasyonuna yönelik olarak TLR-9 ve makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikoru kullanılarak double-immunofloresan çalışmaları yapılmıştır. Ancak, immunofloresan yönteminde F4/80 primer antikoru ile güçlü bir background boyanması görülmüş, sorunun giderilmesine yönelik olarak yapılan çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu durum dikkate alınarak, immunohistokimya yöntemi ile ardışık kesitler, TLR-9 ile paralel olarak makrofaj hücre belirteci olan F4/80 primer antikoru ile boyanmıştır. Elde edilen sonuçlar, hava yollarında gözlenen bazı TLR-9-pozitif hücrelerin makrofaj olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, TLR-9'un gerek insan gerekse farelerde makrofaj hücreleri tarafından eksprese edildiğini gösteren çalışmalardan (Suzuki ve ark, 2005; Schneberger ve ark, 2013) elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte, TLR-9'un söz konusu hücreler tarafından eksprese edildiğinin double-immunofloresan yöntemi ile gösterilebilmesine yönelik olarak çalışmaların, Tip II ve alveolar makrofaj hücrelerine spesifik farklı belirteçler kullanılarak tekrar edilmesi gerekmektedir.

Yapılan çalışmalar, TLR-9'un insanlarda (Schneberger ve ark, 2013), farelerde (Schneberger ve ark, 2013; Verma ve ark, 2016), domuzlarda (Kuzemtseva ve ark, 2015), köpeklerde (Schneberger ve ark 2011), sığırlarda (Schneberger ve ark, 2011) ve atlarda (Schneberger ve ark, 2009) akciğer dokusunun çeşitli hücreleri tarafından eksprese edildiğini göstermektedir. Elde edilen veriler, akciğer dokusunda TLR-9 eksprese eden hücrelerin türlere göre farklılık gösterebildiğini göstermektedir. Örneğin, insan akciğer dokusunda plazmasitoid dendritik hücrelerinin TLR-9'u eksprese ettikleri görülürken (Droemann ve ark, 2005) farelerde aynı hücrelerin, TLR-9 ekspresyonu göstermedikleri bilinmektedir (Chen ve ark, 2006; Schneberger ve ark, 2009). TLR-9 ekspresyonu görülen hücrelerin türler arasında farklılık göstermesinin, enfeksiyonlara karşı türe özgü bağışıklık yanıtlarının altında yatan temel nedenlerden birisi olabileceğini düşündürmektedir (Kuzemtseva ve ark, 2015). Yapmış olduğumuz literatür çalışmalarında, farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyon düzeyi ve ekspresyon profili

üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair bir bilgiye rastlanılmamıştır. Dolayısıyla sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen yetişkin farelere ait akciğer dokularında TLR-9 ekspresyon profilinin belirlenmesi, ileride yapılacak olan çalışmalarda özellikle *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi uygulamalarının farklı türlere ait akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyon profili bakımından olası farklılıkların ortaya çıkarılmasında önemli olabileceği düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, TLR-9'un akciğer dokusunda hangi hücreler tarafından eksprese edildiğini belirlemeye yönelik olarak immunohistokimya/immunofloresan analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, Kontrol ve Deneme gruplarında TLR-9 ekspresyon profilinin benzer olduğunu göstermektedir. İmmunofloresan/immunohistokimya çalışmalarına ek olarak, TLR-9 ekspresyon düzeyinin Deneme ve Kontrol grupları arasında farklı olup olmadığını test etmek amacıyla real-time PCR ve western blot tekniklerinden yararlanılmıştır. Endojen referans olarak kullanılan  $\beta$ -aktin geninin kullanılması durumunda, real-time PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,33 kat azaldığını göstermiştir. İkinci bir endojen referans olarak GAPDH geninin kullanılması durumunda ise Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,44 kat azaldığı görülmüştür. Elde edilen verilerin güvenilirliğini artırmak amacıyla endojen kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalamasına göre de kat değişim hesaplamaları yapılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9'a ait mRNA düzeyinin 1,38 kat azaldığını göstermektedir. Buna karşın, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir. İlerde yapılması düşünülen çalışmalarda, farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer dokusunda doğal bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olan TLR-9 geninin ekspresyon düzeyini belirlemek ve real-time PCR yöntemiyle elde etmiş olduğumuz verileri doğrulamak amacıyla ikinci bir test olarak Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing) analizlerinin de yapılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Real-time PCR analizine ek olarak yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR-9 gen ekspresyonunun protein (translasyonel) düzeyinde semi-kantitatif olarak saptanması amacıyla western blot analizleri de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR-9 proteinine ait ekspresyon düzeyinin 1,25 kat arttığını göstermektedir. TLR-9'un mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde saptanan bu farklılığın, western blot analiz yönteminin real-time PCR yöntemi ile kıyaslandığında daha az duyarlı olmasından kaynaklanmış olma ihtimali bulunmaktadır. TLR-9 protein ekspresyon düzeyinin,

ELISA ya da mass spektrofotometri temelli kantitatif proteomiks analiz yöntemleri gibi daha duyarlı analiz yöntemleri kullanılarak incelenmesinde yarar bulunmaktadır.

Gerek çeşitli memeli hücre hatları, gerekse akciğer dokusu da dahil olmak üzere çeşitli dokular kullanılarak yapılan pek çok çalışma mRNA ve protein konsantrasyonları arasında var olan korelasyon katsayısının  $0.40 \pm -0.06$  olduğunu göstermektedir (Chen ve ark, 2002; Maier ve ark, 2009; Vogel ve Marcotte, 2012). Bir genin ekspresyonu, transkripsiyonel (mRNA) ve translasyonel (protein) olmak üzere iki temel düzeyde kontrol altında tutulmaktadır. Belirli bir gene ait mRNA molekülünün hangi hücrede ne miktarda ve ne zaman sentezleneceğinin belirlenmesinde ilgili gen bölgesinin bulunduğu kromatinin yapısı, histon ya da DNA üzerinde gerçekleştirilen çeşitli modifikasyonlar, transkripsiyonda rol oynayan tüm faktörlerin (transcription machinery) miktarı/etkinliği son derece önemli rol oynamaktadır. Ancak, ökaryotik hücrelerde sentezlenen mRNA molekülleri translasyon öncesinde önemli bazı değişikliklere uğramaktadırlar. Örneğin, mRNA molekülünün 5'-ucuna kep, 3'-ucuna ise poliA kuyruğu eklenmekte, splicing adı verilen bir işlemle intron dizileri çıkarılmakta ve geride kalan exon bölgeleri birleştirilerek olgun bir mRNA molekülü oluşturulmaktadır. Bütün bu aşamalar, bir gene ait ekspresyon düzeyinin belirli bir seviyede tutulabilmesi için birer kontrol noktası olarak işlev görebilmekte ve transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonel) regülasyon mekanizmalarını oluşturmaktadırlar. mRNA splicing, mRNA poli-adenilasyonu, mRNA stabilitesi ve son olarak translasyonun başlatılması/devamı, post-transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarının ana unsurları arasında yer almaktadır. Dolayısıyla, TLR-9 geninin ekspresyonuna ilişkin olarak transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde saptanan farklılığın ortaya çıkmasında, yukarıda sözü edilen post-transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarından herhangi birisinin rol oynayıp oynamadığının araştırılması gerekmektedir.

TLR'lerin doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonundaki rolü sadece PAMP'ları ligand olarak algılamasına dayalı değildir aynı zamanda ölmüş ya da ölmekte olan hücreler tarafından salınan ve tehlike sinyali olarak algılanan moleküler yapıları da ligand olarak algılayabilmektedir (Seong ve Matzinger, 2004). Dolayısıyla TLR'ler PAMP'ların yanı sıra endojen liganlar ya da DAMP'lar olarak da adlandırılan mikrobik kökenli olmayan çeşitli moleküller yapıları tarafından da aktive edilebilmektedirler (Muzio ve ark, 2012). DAMP'lar, doku inflamasyonunda, oksidatif strese, nekroz veya homeostazı bozan diğer koşullar altında, ölmüş veya ölmekte olan hücreler tarafından salgılanmaktadırlar (Yu ve ark, 2010). Sınırlı olmakla birlikte yapılan çalışmalar, TLR-9'un endojen liganının kromatin-IgG kompleks molekülleri olduğunu göstermiştir (Leadbetter ve ark, 2002; Barra ve ark, 2005). Örneğin Leadbetter ve ark (2002), kromatin-IgG kompleks moleküllerinin TLR-9 aracılığıyla B

hücrelerinin aktivasyonunu sağladığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte hücre ölümüne bağlı olarak serbest hale geçen mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) bazı immün hücrelerde TLR-9 aracılığıyla inflamatuvar yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (Ding ve ark, 2013; Tsuji ve ark, 2016). Ayrıca oksidatif stresin, TLR-9 aracılığı ile NF- $\kappa$ B'yi aktive edebileceği de bildirilmiştir (Loomis ve ark, 2017). Konuyla ilgili olarak Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından yapılan TÜBİTAK, projesinden (Proje no: 112O259) elde edilen verilere göre, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen farelere ait fetal akciğer dokusunda oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğu ve bunun sonucunda fetal akciğer dokularının oksidatif strese maruz kaldıkları gösterilmiştir. Benzer bir durumun yetişkin akciğer dokusunda da var olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir. Sunulan tez çalışmasında, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubuna ait yetişkin akciğer dokularında TLR-9 transkript düzeyindeki azalmanın oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkmış olma ihtimali bulunmaktadır. Dolayısıyla, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen yetişkin akciğer dokularında TLR-9'a ait transkript düzeyinin azalmasının, oksidatif stres ve hücre ölümüyle ilgili olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Son derece karmaşık olan TLR-9 sinyal yolağında, adaptör molekül olarak görev yapan MyD88'in IRAK ve TRAF-6 molekülleri ile bir kompleks oluşturmakta ve buna bağlı olarak NF- $\kappa$ B ve MAPK aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum, IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesiyle sonuçlanmaktadır (Wagner, 2002). Yapılan çalışmalar, CpG-DNA'nın TLR-9 aracılığıyla gerçekleşen hücre içi sinyal döngüsünde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Takeshita ve ark, 2001; Chuang ve ark, 2002). Örneğin Hemmi ve ark (2000), *in vitro* ortamda CpG-DNA ile uyarılmış fare makrofajları ile yaptıkları bir çalışmada, TLR-9'dan yoksun (knock-out) farelerin makrofajlarındaki NF- $\kappa$ B aktivitesinin azaldığını, buna karşın normal (wild type) farelerin makrofajlarındaki NF- $\kappa$ B aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte TLR-9'dan yoksun (knock-out) farelerin makrofajlarının LPS (TLR-4'ün ligandı) ile uyarımı sonucunda, normal (wild type) farelerin makrofajlarındaki gibi NF- $\kappa$ B aktivasyonunun aynı seviyede olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, CpG-DNA'nın neden olduğu NF- $\kappa$ B aktivasyonunun TLR-9'dan yoksun (knock-out) farelerin makrofajlarında bozulduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bununla birlikte, TLR-9, hücre içi sinyal döngüsünü harekete geçirip gerekli olan bağışıklık yanıtlarını başlatabilmesi amacıyla MyD88-bağımlı sinyal yolağına gereksinim duymaktadır. Örneğin Johnson ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, TLR-9'un ligandla etkileşimi sonucunda TLR-9 aktivasyonunun normal farelerin (wild type) kornea stromasına göç eden nötrofil sayısını artırdığını, bunun aksine MyD88 geni

bloke olmuş farelerin kornea stromasına göç eden nötrofil sayısının tamamen durduğunu göstermektedir. Söz konusu çalışma, TLR-9 aracılığıyla gerçekleşen sinyal döngüsünde MyD88-bağımlı sinyal yolağının gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca MyD88-bağımlı sinyal yolağında görev alan TRAF-6 adaptör molekülünün de TLR-9 sinyal döngüsünde gerekli olduğu gösterilmiştir. Örneğin Gohda ve ark (2004), TRAF-6'dan yoksun (knock-out) farelerde bulunan makrofajların, TLR-9 aracılığıyla gerçekleşen NF- $\kappa$ B ve MAPK'ların aktive olmadığını ve buna bağlı olarak sitokin üretiminin de gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında, Kontrol grubu ile kıyaslandığında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen yetişkin farelere ait akciğer dokularında TLR-9 transkript düzeyinde saptanan azalmanın yanısıra TLR-9 sinyal yolağında görev alan molekülleri de etkilemiş olabileceği hipotezi göz ardı edilmemelidir. Dolayısıyla, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin, yetişkin akciğer dokusunda MyD88-bağımlı sinyal yolağı ve bu yolda görev alan aktivatörlerden IRAK, IRAK-4, TAK-1, MAPK, JNK, p38 gibi kinazlar, NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörü ve TRAF-6 gibi adaptör moleküller üzerinde de herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Yapmış olduğumuz literatür çalışmalarında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 geninin ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 gen ekspresyonunu değiştirdiğini gösteren verilerin konuyla ilgili literatüre özgün ve önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez projesi, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin dönemde akciğerde TLR-9 ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test etmeye yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler, farklı düzeylerde olmakla birlikte TLR-9'un Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer dokularında eksprese edildiğini göstermiştir. İmmunohistokimya ve immunofloresan analiz sonuçları, TLR-9 ekspresyon profilinin Kontrol ve Deneme gruplarında benzer olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile oluşturulan Deneme grubuna ait bireylerden elde edilen yetişkin akciğer dokularında, TLR-9 ekspresyonu üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Mevcut literatürde, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 geninin ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasından elde edilen verilerin konu ile ilgili literatüre özgün ve önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transfer işlemleri ile elde edilen yetişkin akciğer dokusunda TLR-9 ekspresyonuna ilişkin olarak saptamış olduğumuz değişimin herhangi bir immun fonksiyon değişikliğine neden olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Basic immunology: Functions and disorders of the immune system (4 th ed). Elsevier Health Sciences, 2012.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Cellular and molecular immunology (8 th ed). Elsevier Health Sciences, 2014.
- Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavaillon JM, Souza-Fonseca-Guimaraes F.** TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunology and cell biology* 2014, 92(3), 256-262.
- Akira S.** Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(40), 38105-38108.
- Akira S, Takeda K.** Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology* 2004, 4(7), 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124(4), 783-801.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Molecular Biology of the Cell (4 th ed). Garland Science, New York, 2002, 1569-1570.
- Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, Henriques-Normark B.** Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular microbiology* 2007, 9(3), 633-644.
- Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA.** Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biological research* 2007, 40(2), 97-112.
- Arora S.** Clinical infertility and in vitro fertilization. *IVF Lit* 2014, 1(1), 46.
- Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KA, Nestel FP, Semple JW.** Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in vivo. *Blood* 2006, 107(2), 637-641.
- Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Kornacker K.** Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nature genetics* 2003, 35(4), 292-293.
- Avbelj M, Horvat S, Jerala R.** The role of intermediary domain of MyD88 in cell activation and therapeutic inhibition of TLRs. *The Journal of Immunology* 2011, 187(5), 2394-2404.

**Babu S, Blauvelt CP, Kumaraswami V, Nutman TB.** Cutting edge: Diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *The Journal of Immunology* 2006, 176(7), 3885-3889.

**Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A.** TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 2005, 202(12), 1715-1724.

**Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R.** Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature immunology* 2006, 7(1), 49-56.

**Barker DJ.** Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal* 1995, 311(6998), 171.

**Barker DJ.** In utero programming of chronic disease. *Clinical science (London, England: 1979)* 1998, 95(2), 115-128.

**Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C.** Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology* 2002, 31(6), 1235-1239.

**Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Coffman RL.** Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine* 2005, 202(8), 1131-1139.

**Basatemur E, Sutcliffe A.** Follow-up of children born after ART. *Placenta* 2008, 29, 135-140.

**Bavister BD.** Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002, 124(2), 181-196.

**Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Bals R.** Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *The Journal of Immunology* 2006, 177(3), 1833-1837.

**Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW.** mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* 2010, 50(4), 237-243.

**Beeh KM, Kanniess F, Wagner F, Schilder C, Naudts I, Hammann-Haenni A, Renner WA.** The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013, 131(3), 866-874.

**Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A.** A role for Toll-like receptors in acquired immunity: Up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003, 101(11), 4500-4504.

**Bhan U, Trujillo G, Lyn-Kew K, Newstead MW, Zeng X, Hogaboam CM, Standiford TJ.** Toll-like receptor 9 regulates the lung macrophage phenotype and host immunity in murine

pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity* 2008, 76(7), 2895-2904.

**Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM.** CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines* 2011, 10(4), 499-511.

**Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren, KG.** International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction* 2007, 22(6), 1506-1512.

**Carpenter S, O'Neill LA.** How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses ?. *Cellular microbiology* 2007, 9(8), 1891-1901.

**Carson C, Sacker A, Kelly Y, Redshaw M, Kurinczuk JJ, Quigley MA.** Asthma in children born after infertility treatment: Findings from the UK Millennium Cohort Study. *Human Reproduction* 2012, 28(2), 471-479.

**Casale TB, Cole J, Beck E, Vogelmeier CF, Willers J, Lassen C, Wechsler ME.** CYT003, a TLR9 agonist, in persistent allergic asthma—a randomized placebo-controlled Phase 2b study. *Allergy* 2015, 70(9), 1160-1168.

**Ceelen M, Vermeiden JP.** Health of human and livestock conceived by assisted reproduction. *Twin Research* 2001, 4(05), 412-416.

**Ceelen M, van-Weissenbruch MM, Vermeiden JP, van-Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA.** Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertility and sterility* 2008, 90(5), 1662-1673.

**Chang ZL.** Role of toll-like receptors in regulatory functions of T and B cells. *Chinese Science Bulletin* 2008, 53(8), 1121-1127.

**Chao CM, El Agha E, Tiozzo C, Minoo P, Bellusci S.** A breath of fresh air on the mesenchyme: Impact of impaired mesenchymal development on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Frontiers in medicine* 2014, 2, 27-27.

**Chaug HC.** CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy. *International immunopharmacology* 2006, 6(10), 1586-1596.

**Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG.** Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 304-313.

**Chen L, Arora M, Yarlagadda M, Oriss TB, Krishnamoorthy N, Ray A, Ray P.** Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *The Journal of Immunology* 2006, 177(4), 2373-2383.

**Choudhury BK, Wild JS, Alam R, Klinman DM, Boldogh I, Dharajiya N, Sur S.** In vivo role of p38 mitogen-activated protein kinase in mediating the anti-inflammatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in murine asthma. *The Journal of Immunology* 2002, 169(10), 5955-5961.

**Chowdhury TA, Chowdhury, TS.** An overview of infertility. *ORION*, 2009, 32(1).

**Chuang TH, Lee J, Kline L, Mathison JC, Ulevitch RJ.** Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *Journal of leukocyte biology* 2002, 71(3), 538-544.

**Cloonan YK, Holt VL, Goldberg J.** Male factor infertility: A twin study. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2007, 21(3), 229-234.

**Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O.** Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunology and cell biology* 2005, 83(2), 196-198.

**Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Pozzetto B, Richard Y, Garraud O.** Identification of two subpopulations of purified human blood B cells, CD27<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup> and CD27<sup>high</sup>CD80<sup>+</sup>, that strongly express cell surface Toll-like receptor 9 and secrete high levels of interleukin-6. *Immunology* 2008, 125(3), 430-437.

**Cottalorda A, Vershelde C, Marçais A, Tomkowiak M, Musette P, Uematsu S, Bonnefo-Berard N.** TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *European journal of immunology* 2006, 36(7), 1684-1693.

**Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B.** Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *The American Journal of Human Genetics* 2002, 71(1), 162-164.

**Crack PJ, Bray PJ.** Toll-like receptors in the brain and their potential roles in neuropathology. *Immunology and cell biology* 2007, 85(6), 476-480.

**Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer, MJ.** Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 1996, 94(12), 3246-3250.

**DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg, AP.** Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *The American Journal of Human Genetics* 2003, 72(1), 156-160.

**Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EE, Biron CA.** MyD88-dependent and-independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- $\alpha$  release and initiation of immune responses in vivo. *The Journal of Immunology* 2005, 175(10), 6723-6732.

**Ding Z, Liu S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Mehta JL.** Oxidant stress in mitochondrial DNA damage, autophagy and inflammation in atherosclerosis. *Scientific reports* 2013, 3, 1077.

- Doan T, Melvold R, Viselli S, Valtenbaugh C.** Lippincott Illustrated Reviews: Immunology (2 nd ed), Lippincott Williams ve Wilkins, Baltimore, 2012, 11-26.
- Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Goldmann, T.** Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respiratory research* 2005, 6(1), 1.
- Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Ryczyn MA, Mills J, Sarisky RT, Mbow ML.** Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and immunity* 2004, 72(12), 7202-7211.
- Edwards RG, Steptoe PC.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 1978, 381(9878), 366.
- Elder K, Dale, B.** In-vitro fertilization (2 nd ed). Cambridge University Press, Cambridge, 2000, 1-7.
- Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM.** Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *The Journal of Immunology* 1999, 162(4), 2291-2298.
- Ericson A, Nygren KG, Olausson PO, Källén B.** Hospital care utilization of infants born after IVF. *Human Reproduction* 2002, 17(4), 929-932.
- Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL.** Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infection and immunity* 2007, 75(5), 2572-2579.
- Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL.** Genomic imprinting: implications for human disease. *The American journal of pathology* 1999, 154(3), 635-647.
- Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA.** Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *Journal of animal science* 2004, 82(13\_suppl), E53-E62.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Gutiérrez-Adán A.** Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction* 2008, 78(4), 761-772.
- Fernando D, Halliday JL, Breheny S, Healy DL.** Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *Fertility and sterility* 2012, 97(3), 579-584.

- Feuer SK, Rinaudo PF.** Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2017, 1-8.
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW.** Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnology letters* 2006, 28(19), 1601-1613.
- Fischer SF, Rehm M, Bauer A, Höfling F, Kirschnek S, Rutz M, Häcker G.** Toll-like receptor 9 signaling can sensitize fibroblasts for apoptosis. *Immunology letters* 2005, 97(1), 115-122.
- Fountain C, Zhang Y, Kissin DM, Schieve LA, Jamieson DJ, Rice C, Bearman P.** Association between assisted reproductive technology conception and autism in California, 1997–2007. *American journal of public health*, 2015, 105(5), 963-971.
- Fransson M, Benson M, Erjefält JS, Jansson L, Uddman R, Björnsson S, Adner M.** Expression of Toll-like receptor 9 in nose, peripheral blood and bone marrow during symptomatic allergic rhinitis. *Respiratory research* 2007, 8(1), 17.
- Freidag BL, Melton GB, Collins F, Klinman DM, Cheever A, Stobie L, Seder RA.** CpG oligodeoxynucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of Mycobacterium bovis BCG vaccination in mice challenged with M. tuberculosis. *Infection and immunity* 2000, 68(5), 2948-2953.
- Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R.** How the intricate interaction among toll-like receptors, microbiota, and intestinal immunity can influence gastrointestinal pathology. *Journal of immunology research* 2015, 2015, 1-12.
- Fu-Shin XY, Hazlett LD.** Toll-like receptors and the eye. *Investigative ophthalmology and visual science* 2006, 47(4), 1255-1263.
- Gardner MO, Goldenberg RL, Cliver SP, Tucker JM, Nelson KG, Copper RL.** The origin and outcome of preterm twin pregnancies. *Obstet Gynecol* 1995, 85(4), 553-557.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y.** In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCNQ1OT gene. *American journal of human genetics* 2003, 72(5), 1338.
- Giritharan G, Talbi S, Donjacour A, Di Sebastiano F, Dobson AT, Rinaudo PF.** Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction* 2007, 134(1), 63-72.

- Guggemoos S, Hangel D, Hamm S, Heit A, Bauer S, Adler H.** TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *The Journal of Immunology* 2008, 180(1), 438-443.
- Gohda J, Matsumura T, Inoue JI.** Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *The Journal of Immunology* 2004, 173(5), 2913-2917.
- Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C.** Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Targeted oncology* 2012, 7(1), 29-54.
- Gosu V, Basith S, Kwon OP, Choi S.** Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in Toll-like receptor signaling. *Molecules* 2012, 17(11), 13503-13529.
- Güngör İ, Beji NK.** İnfertilite Hemşirelerinin Gelişen Roller ve Sertifi kasyon Gereksinimi. *Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi* 2015, 23(2), 152-159.
- Hans M, Hans VM.** Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *Journal of oral science* 2011, 53(3), 263-271.
- Hansson GK, Edfeldt K.** Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005, 25(6), 1085-1087.
- Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guiet C, Brière F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE.** Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *Journal of Immunology* 2005, 174, 2942-2950.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD.** Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003, 102(7), 2660-2669.
- Hediger ML, Bell EM, Druschel CM, Louis GMB.** Assisted reproductive technologies and children's neurodevelopmental outcomes. *Fertility and sterility* 2013, 99(2), 311-317.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Akira S.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408(6813), 740-745.
- Hemmi H, Akira S.** TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chemical immunology and allergy* 2005, 86, 120-135.
- Huang X, Yang Y.** Targeting the TLR9–MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert opinion on therapeutic targets* 2010, 14(8), 787-796.
- Ikeda RK, Miller M, Nayar J, Walker L, Cho JY, McElwain, K, Broide DH.** Accumulation of peribronchial mast cells in a mouse model of ovalbumin allergen induced chronic airway

inflammation: modulation by immunostimulatory DNA sequences. *The Journal of Immunology* 2003, 171(9), 4860-4867.

**Janeway Jr CA, Medzhitov R.** Innate Immune Recognition. *Annual review of immunology* 2002, 20, 197-216.

**Johnson AC, Heinzl FP, Diaconu E, Sun Y, Hise AG, Golenbock D, Pearlman E.** Activation of toll-like receptor (TLR) 2, TLR4, and TLR9 in the mammalian cornea induces MyD88-dependent corneal inflammation. *Investigative ophthalmology and visual science* 2005, 46(2), 589-595.

**József L, Khreiss T, Filep JG.** CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *The FASEB journal* 2004, 18(14), 1776-1778.

**Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M.** Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respiratory research* 2010, 11(1), 2.

**Juffermans NP, Leemans JC, Florquin S, Verbon A, Kolk AH, Speelman P, Van Der Poll T.** CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infection and immunity* 2002, 70(1), 147-152.

**Kaisho T, Akira S.** Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, 117(5), 979-987.

**Källén B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO.** Cancer risk in children and young adults conceived by in vitro fertilization. *Pediatrics* 2010, 126(2), 270-276.

**Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, Sapienza C.** DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Human molecular genetics* 2009, 18(20), 3769-3778.

**Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999, 11(1), 115-122.

**Kawai T, Akira S.** TLR signaling. *Cell Death and Differentiation* 2006, 13(5), 816-825.

**Kawai T, Akira S.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010, 11(5), 373-384.

**Kawanami O.** Ultrastructure of the lung in health and in fibrotic diseases. In: Takishima T (Eds), Basic and Clinical aspects of pulmonary fibrosis. CRC Press, USA, 1994, 30-64.

**Kawasaki T, Kawai T.** Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* 2014, 5, 461.

- Kettner LO, Henriksen TB, Bay B, Ramlau-Hansen CH, Kesmodel US.** Assisted reproductive technology and somatic morbidity in childhood: a systematic review. *Fertility and sterility* 2015, 103(3), 707-719.
- Kielian T.** Overview of toll-like receptors in the CNS. *Current topics in microbiology and immunology* 2009, 336, 1-14.
- Klemetti R, Sevón T, Gissler M, Hemminki E.** Health of children born as a result of in vitro fertilization. *Pediatrics* 2006, 118(5), 1819-1827.
- Kline JN, Krieg AM.** Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect* 2008, 21(8), 434-439.
- Knuefermann P, Baumgarten G, Koch A, Schwederski M, Velten M, Ehrentraut H, Grohé C.** CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respiratory research* 2007, 8(1), 72.
- Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, Hemminki E, Sovio U, Järvelin MR.** Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in-vitro fertilization. *Human reproduction* 2002, 17(5), 1391-1398.
- Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, Hemminki E, Järvelin MR.** Post-neonatal hospitalization and health care costs among IVF children: a 7-year follow-up study. *Human reproduction* 2007, 22(8), 2136-2141.
- Kondapalli LA, Perales-Puchalt A.** Low birth weight: is it related to assisted reproductive technology or underlying infertility? *Fertility and sterility* 2013, 99(2), 303-310.
- Krauss JL, Potempa J, Lambris JD, Hajishengallis G.** Complementary Tolls in the periodontium: how periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontology 2000* 2010, 52(1), 141-162.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Klinman DM.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995, 374(6522), 546-549.
- Krieg AM.** From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 2001, 11(3), 181-188.
- Krieg AM.** Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature reviews Drug discovery* 2006, 5(6), 471-484.
- Krieg AM.** Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2007, 4(3), 289-294.

**Krieg AM, Vollmer J.** Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunological reviews* 2007, 220(1), 251-269.

**Krstic RV.** Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology. Springer-Verlag, Tokyo, 2013, 148-157.

**Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M.** Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004, 103(4), 1433-1437.

**Kulka M, Alexopoulou L, Flavell RA, Metcalfe DD.** Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, 114(1), 174-182.

**Kumar H, Kawai T, Akira S.** Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* 2009, 388(4), 621-625.

**Kumar H, Kawai T, Akira S.** Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 2011, 30(1), 16-34.

**Kumar V, Abbas AK, Aster JC.** Robbins basic pathology. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 2012, 459-460.

**Kuzemtseva L, Pérez M, Mateu E, Segalés J, Darwich L.** Expression of Toll-like receptor 9 (TLR9) in the lungs and lymphoid tissue of pigs. *The Veterinary Journal* 2015, 203(2), 259-261.

**Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Golenbock DT.** TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology* 2004, 5(2), 190-198.

**Law BJ, Carbonell-Estrany X, Simoes EAF.** An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. *Respiratory medicine* 2002, 96, S1-S7.

**Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein, A.** Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002, 416(6881), 603-607.

**Lee SM, Kok KH, Jaume M, Cheung TK, Yip TF, Lai JC, Peiris JM.** Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, 111(10), 3793-3798.

**Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA.** The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996, 86(6), 973-983.

- Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S.** CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2004, 287(3), L552-L558.
- Li M, Reilly C.** Assessing the quality of hybridized RNA in Affymetrix GeneChips using linear regression. *Journal of biomolecular techniques* 2008, 19(2), 122.
- Lin SC, Lo YC, Wu H.** Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010, 465(7300), 885-890.
- Liu G, Zhao Y.** Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 2007, 122(2), 149-156.
- Livak KJ, Schmittgen, TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *Methods* 2001, 25(4), 402-408.
- Loomis Z, Eigenberger P, Redinius K, Lisk C, Karoor V, Nozik-Grayck E, Buehler P.** Hemoglobin induced cell trauma indirectly influences endothelial TLR9 activity resulting in pulmonary vascular smooth muscle cell activation. *PloS one* 2017, 12(2), e0171219.
- Lu YH, Wang N, Jin F.** Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. *Journal of Zhejiang University Science B* 2013, 14(5), 359-371.
- Luckhardt TR, Coomes SM, Trujillo G, Stoolman JS, Vannella KM, Bhan U, Moore, BB.** TLR9-induced interferon β is associated with protection from gammaherpesvirus-induced exacerbation of lung fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2011, 4(1), 18.
- Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B.** Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *Journal of medical genetics* 2005, 42(4), 289-291.
- Maier T, Güell M, Serrano L.** Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 2009, 583, 3966-3973.
- Martin TR, Frevert CW.** Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005, 2(5), 403-411.
- Månsson A, Cardell LO.** Role of atopic status in Toll-like receptor (TLR) 7-and TLR9-mediated activation of human eosinophils. *Journal of leukocyte biology* 2009, 85(4), 719-727.
- Mason CM, Nelson S.** Normal host defenses and impairments associated with the delayed resolution of pneumonia. *Seminars in respiratory infections* 1992, 7(4), 243-255.
- McGovern PG, Llorens AJ, Skurnick JH, Weiss G, Goldsmith LT.** Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis. *Fertility and sterility* 2004, 82(6), 1514-1520.

- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ.** The biology of Toll-like receptors. *Cytokine and growth factor reviews* 2000, 11(3), 219-232.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA.** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, 388(6640), 394-397.
- Miller LS.** Toll-like receptors in skin. *Advances in dermatology* 2008, 24, 71.
- Mogensen TH.** Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 2009, 22(2), 240-273.
- Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE.** Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *The Lancet* 2003, 361(9354), 309-310.
- Morrisey EE, Hogan BL.** Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental cell* 2010, 18(1), 8-23.
- Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F.** Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 2012, 4(1).
- Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Hirai K.** Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *The Journal of Immunology* 2003, 171(8), 3977-3982.
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health.** Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* 2013, s 427. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/evidence/full-guideline-188539453> (20.04.2017).
- Nayak PK, Mahapatra PC, Mallick JJ, Swain S, Mitra S, Sahoo J.** Role of diagnostic hystero-laparoscopy in the evaluation of infertility: A retrospective study of 300 patients. *Journal of human reproductive sciences* 2013, 6(1), 32.
- Olive C.** Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines* 2012, 11(2), 237.
- Oliviera Nascimento L, Massari P, Wetzler LM.** The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in immunology* 2012, 3, 79.
- O'Neill LA.** The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological reviews* 2008, 226(1), 10-18
- O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG.** The history of Toll-like receptors [mdash] redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2013, 13(6), 453-460.

- Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi MK, Plaska D.** Localization of toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *American journal of reproductive immunology* 2008, 60(6), 541-555.
- Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL.** Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nature immunology* 2008, 9(12), 1407-1414.
- Paulsen F, Garreis F, Bräuer L.** Role of the innate immune system. In: Zierhut M, Paulsen F, Niederkorn JY, Schraermeyer U (eds), *Innate Immunity and the Eye*. Jaypee Brothers Medical Publishers, 2013, 1-10.
- Pegu A, Qin S, Junecko BAF, Nisato RE, Pepper MS, Reinhart TA.** Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs. *The Journal of Immunology* 2008, 180(5), 3399-3405.
- Penzias AS.** Overview of infertility. In: Bayer SR, Alper MM, Penzias AS (eds), *The Boston IVF handbook of infertility: A practical guide for practitioners who care for infertile couples*. CRC Press 2011, s 1-12.
- Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R.** Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *The Journal of Immunology* 2004, 173(2), 1219-1223.
- Porcari J, Bryant C, Comana F.** *Exercise Physiology*, F.A. Davis Company, USA, 2015, 132.
- Qin M, Li Y, Yang X, Wu H.** Safety of Toll-like receptor 9 agonists: a systematic review and meta-analysis. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2014, 36(4), 251-260.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R.** Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2009, 9(1), 57-63.
- Ramaprakash H, Hogaboam CM.** Intranasal CpG therapy attenuated experimental fungal asthma in a TLR9-dependent and-independent manner. *International archives of allergy and immunology* 2009, 152(2), 98-112.
- Ramaprakash H, Ito T, Standiford TJ, Kunkel SL, Hogaboam CM.** Toll-like receptor 9 modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and allergic mice. *Infection and immunity* 2009, 77(1), 108-119.
- Ramirez-Ortiz ZG, Specht CA, Wang JP, Lee CK, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Levitz SM.** Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infection and immunity* 2008, 76(5), 2123-2129.
- Rizzo DC.** *Fundamentals of anatomy and physiology* (4 th ed). Cengage Learning. Boston, 2015, 417.

**Roda JM, Parihar R, Carson WE.** CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. *The Journal of Immunology* 2005, 175(3), 1619-1627.

**Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, Balsari A.** Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *The American journal of pathology* 2004, 165(2), 373-381.

**Sadeghi MR.** Access to infertility services in Middle East. *Journal of reproduction and infertility* 2015, 16(4), 179.

**Saluzzo S, Gorki AD, Rana BM, Martins R, Scanlon S, Starkl P, Warszawska JM.** First-Breath-Induced Type 2 Pathways Shape the Lung Immune Environment. *Cell Reports* 2017, 18(8), 1893-1905.

**Samuelsson C, Hausmann J, Lauterbach H, Schmidt M, Akira S, Wagner H, Hochrein H.** Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *The Journal of clinical investigation* 2008, 118(5), 1776-1784.

**Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DS.** Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment* 2009, 2(1), 205-214.

**Saxena R.** Evidence Based Color Atlas of Obstetrics and Gynecology: Diagnosis and Management, Jaypee Brothers Medical Publishers, India, 2013, 527.

**Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R.** Pellino Proteins: Novel Players in TLR and IL-1R Signalling. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007, 11(3), 453-461.

**Schieve LA, Peterson HB, Meikle SF, Jeng G, Danel I, Burnett NM, Wilcox LS.** Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *Jama* 1999, 282(19), 1832-1838.

**Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, Eck M.** Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 2004, 136(3), 521-526.

**Schneberger D, Caldwell S, Suri SS, Singh B.** Expression of Toll-Like Receptor 9 in Horse Lungs. *The Anatomical Record* 2009, 292(7), 1068-1077.

**Schneberger D, Lewis D, Caldwell S, Singh B.** Expression of toll-like receptor 9 in lungs of pigs, dogs and cattle. *International journal of experimental pathology* 2011, 92(1), 1-7.

**Schneberger D, Caldwell S, Kanthan R, Singh B.** Expression of Toll-like receptor 9 in mouse and human lungs. *Journal of anatomy* 2013, 222(5), 495-503.

**Schneberger D, Aulakh G, Channabasappa S, Singh B.** Toll-like receptor 9 partially regulates lung inflammation induced following exposure to chicken barn air. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 2016, 11(1), 31.

**See H, Wark P.** Innate immune response to viral infection of the lungs. *Paediatric respiratory reviews* 2008, 9(4), 243-250.

**Seong SY, Matzinger P.** Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2004, 4(6), 469-478.

**Shevell T, Malone FD, Vidaver J, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Craig S.** Assisted Reproductive Technology and Pregnancy Outcome. *Obstetrics and Gynecology* 2005, 107(4), 953-954.

**Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, Baker HWG.** Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Human reproduction* 2008, 23(7), 1644-1653.

**Shirota H, Klinman DM.** Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines* 2014, 13(2), 299-312.

**Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP, Beabekashvili RS.** Total RNA suitable for molecular biology analysis. *Journal of biotechnology* 2003, 105(1), 1-9.

**Spellacy WN, Handler A, Ferre CD.** A case-control study of 1253 twin pregnancies from a 1982-1987 perinatal data base. *Obstetrics and Gynecology* 1990, 75(2), 168-171.

**Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist K.** Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *The Lancet* 2002, 359(9305), 461-465.

**Sun Y, Vestergaard M, Christensen J, Zhu JL, Bech BH, Olsen J.** Epilepsy and febrile seizures in children of treated and untreated subfertile couples. *Human reproduction* 2007, 22(1), 215-220.

**Sutcliffe AG, Ludwig M.** Outcome of assisted reproduction. *The Lancet* 2007, 370(9584), 351-359.

**Suzuki K, Suda T, Naito T, Ide K, Chida K, Nakamura H.** Impaired toll-like receptor 9 expression in alveolar macrophages with no sensitivity to CpG DNA. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005, 171(7), 707-713.

**Suzuki T, Chow CW, Downey GP.** Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2008, 40(6), 1348-1361.

- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Alexopoulou L.** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(10), 3516-3521.
- Takeda K, Akira S.** TLR signaling pathways. *In Seminars in immunology* 2004, 16(1), 3-9.
- Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 2005, 17(1), 1-14.
- Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM.** Cutting edge: role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *The Journal of Immunology* 2001, 167(7), 3555-3558.
- Takeuchi O, Akira S.** Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes and infection* 2002, 4(9), 887-895.
- Takeuchi O, Akira S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010, 140(6), 805-820.
- Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA.** Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 2011, 3(6), 920-940.
- Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, Flaumenhaft R.** T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol* 2012, 198(4), 561-574.
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Makiguchi N.** Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *Journal of the National Cancer Institute* 1984, 72(4), 955-962.
- Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, Kato A, Fujigaki Y, Yasuda H.** Role of Mitochondrial DNA in Septic AKI via Toll-Like Receptor 9. *Journal of the American Society of Nephrology* 2016, 27(7), 2009-2020.
- Turul T, Ersoy F.** Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll like reseptörler (TLR). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004, 35, 114–118.
- Tuzmen S, Kiefer J, Mousses S.** Validation of short interfering RNA knockdowns by quantitative real-time PCR. *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes* 2007, 177-203.
- Uematsu S, Akira S.** Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands. *Handbook of experimental pharmacology* 2008, 183, 1-20.

**Ulrichts P, Peelman F, Beyaert R, Tavernier J.** MAPPIT analysis of TLR adaptor complexes. *FEBS letters* 2007, 581(4), 629-636.

**Valdez R, Athens MA, Thompson GH, Bradshaw BS, Stern MP.** Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 1994, 37(6), 624-631.

**Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002, 3(7), 1-12.

**Verma G, Ramneek CS, Sethi RS.** Acute Ethion Exposure Alters Expression of TLR 9 in Lungs of Mice. *Indian Journal of Veterinary Anatomy* 2006, 28(1), 40-43.

**Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM.** CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *The journal of immunology* 2002, 168(4), 1659-1663.

**Vogel C, Marcotte EM.** Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 2012, 13(4), 227-232.

**Wagner H.** Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Current opinion in microbiology* 2002, 5(1), 62-69.

**Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P.** Beckwith–Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Human molecular genetics* 2003, 12, R61-R68.

**Whitsett JA.** Series Introduction: Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *The Journal of clinical investigation* 2002, 109(5), 565-569.

**Wisborg K, Ingerslev HJ, Henriksen TB.** In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertility and sterility* 2010, 94(6), 2102-2106.

**Wright JR.** Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *The Journal of clinical investigation* 2003, 111(10), 1453-1455.

**Yao M, Liu X, Li D, Chen T, Cai Z, Cao X.** Late endosome/lysosome-localized Rab7b suppresses TLR9-initiated proinflammatory cytokine and type I IFN production in macrophages. *The Journal of Immunology* 2009, 183(3), 1751-1758.

**Yu L, Wang L, Chen S.** Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of cellular and molecular medicine* 2010, 14(11), 2592-2603.

**Zaas AK, Schwartz DA.** Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends in cardiovascular medicine* 2005, 15(6), 195-202.

**Zachary JF, McGavin MD.** Pathologic basis of veterinary disease (5 th eds). Elsevier Health Sciences, China, 2013, 1047-1048.

**Zhang Y, Wang F, Bhan U, Huffnagle GB, Toews GB, Standiford TJ, Olszewski MA.** TLR9 signaling is required for generation of the adaptive immune protection in *Cryptococcus neoformans*-infected lungs. *The American journal of pathology* 2010, 177(2), 754-765.

**WEB\_1. (2017).** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. <http://kadinhastdogum.med.ege.edu.tr/d-2/tarihce.html> (18.04.2017).



## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : ÖZTÜRK, Murat  
**Uyruk** : T.C  
**Doğum yeri ve tarihi** : Bayburt / 17.05.1988  
**E-mail** : murat.oztturk@gmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	14.06.2013

### BURSLAR ve ÖDÜLLER:

TÜBİTAK araştırma projesi lisansüstü öğrenci bursiyeri (2015-2017)

### PROJELER

*In vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen erişkin farelerde karaciğer dokusunda glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'ların incelenmesi, TÜBİTAK Projesi, Proje No: 114O743.

Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin solunum sisteminde epitel hücre sayıları üzerine etkisi, ADÜ BAP Projesi, Proje No: VTF-15057.