

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (VETERİNER)  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FARELERDE *İN VİTRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO  
TRANSFERİNİN YETİŞKİN AKCİĞER DOKUSUNDA  
TOLL-BENZERİ RESEPTÖR (TLR)-5 EKSPRESYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**DİDAR TUĞÇE BALGİR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Levent KARAGENÇ**

Sunulan tez çalışması Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17019 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN 2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince geçen iki yıлымda değerli bilgilerini bizlerle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam kıymetli zamanını sabırla ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden geleni yapan ve söylediği her kelimenin hayatıma kattığı değeri asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam 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 konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatlarında çok başarılı olacaklarına inandığım arkadaşlarım Göksel DOĞAN ve Murat ÖZTÜRK'e; her zaman maddi ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen, sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek bu güne getiren bu hayattaki en büyük şansım canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	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 Yöntemleri (ÜYTE).....	3
2.2 ÜYTE Uygulamalarından Kaynaklanan Sağlık Problemleri.....	4
2.3 Akciğer Dokusu ve Gelişimi .....	5
2.3.1 Pseudoglandular Evre .....	5
2.3.2 Kanalikular Evre.....	6
2.3.3 Sakkular Evre .....	6
2.3.4 Alveolar Evre.....	6
2.4 Bağışıklık Sistemi Ve Toll Benzeri (TOLL-LIKE) Reseptörler .....	7
2.5. Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı ve Özellikleri .....	8
2.6 TLR 5 ve Bağımlı Olduğu Sinyal Yolağı.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Çalışma Materyali .....	13
3.2 Crossman Üçlü Boyama Yöntemi .....	14
3.3. İmmunohistokimyasal ve İmmunofloresan Boyama Yöntemleri.....	15
3.4. Western Blot Methodu .....	17
3.5 Total RNA İzolasyonu.....	21

3.6 Real-Time PCR (qRT-PCR) Methodu .....	21
3.6.1 Taqman Metodu Kullanılarak Gerçekleştirilen Kantitatif Real-Time PCR (Qrt-PCR) Analizi .....	22
3.7 İstatiksel Analizler .....	23
4. BULGULAR .....	24
4.1 Crossman Üçlü Boyama Yöntemi İle Boyanan Yetişkin Akciğer Dokusunun Genel Histolojik Görüntüsü .....	24
4.2 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde TLR 5 Ekspresyonunun İmmunohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi.....	24
4.3 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde TLR 5 Ekspresyonunun Western Blot Tekniğiyle Belirlenmesi.....	30
4.4 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinden Elde Edilen Total RNA İzolasyonu.....	31
4.5 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde TLR 5 Ekspresyonunun Real-Time PCR Tekniğiyle Belirlenmesi .....	32
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	43
KAYNAKLAR.....	44
EKLER .....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	64

## 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 / Yardımcı üreme teknikleri
<b>AU</b>	: Arbitrary unit
<b>BCA</b>	: Bicinchoninic acid / Bisinkoninik asit
<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>DAB</b>	: 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>ET</b>	: Embriyo transferi
<b>FACS</b>	: Florescant Activated Cell Sorting
<b>Ig</b>	: İmmunoglobulin
<b>ICSI</b>	: Intracytoplasmic sperm injection / İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>IFN</b>	: İnterferon
<b>IκB</b>	: NF-κB inhibitör protein
<b>IKK</b>	: IκB kinaz
<b>IL</b>	: Interleukin / İnterlökin
<b>IRAK</b>	: IL-1R associated kinase / IL-1R ilişkili kinaz
<b>IVF</b>	: In vitro fertilization / <i>İn vitro</i> 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>LTA</b>	: Lipoteikoik asit
<b>MAL</b>	: MyD88 adaptor like protein / MyD88 adaptör benzeri protein
<b>MAPK</b>	: Mitogen activated protein kinases / Mitojen-aktive edici protein kinaz

<b>MyD88</b>	: Myeloid differentiation primary response gene / Myeloid farklılaşma primer yanıt protein-88
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>PAMP</b>	: Pathogen associated molecular pattern / Patojene bağlı moleküler kalıp
<b>PGN</b>	: Peptidoglikan
<b>PGT</b>	: Embriyo dondurma ve preimplantasyon genetik tanı
<b>PRR</b>	: Pattern recognition receptor / Patojen kalıplarını tanıyan reseptör
<b>PMSF</b>	: Fenil metil sülfonil fulorid
<b>RVS</b>	: Solunum sinsityal virüs / Respiratuar Sinsityal Virüs
<b>SDS-PAGA</b>	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
<b>TET</b>	: Tubal embriyo 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 / Toll/IL-1R domain içeren adaptör protein IFN-β
<b>TRAM</b>	: TRIF-related adaptor molecule / TRIF bağlı adaptör molekül
<b>TRAF-6</b>	: TNF receptor associated factors / TNF reseptör ilişkili faktör 6
<b>TAK-1</b>	: TGF-β-activated kinase 1 / TGF-β-aktive edici kinaz 1
<b>TAB-1</b>	: TAK-1 binding protein / TAK-1 bağlanma proteini 1
<b>TBS</b>	: Tris buffer saline
<b>TBST</b>	: Tris buffer saline Twen-20
<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. TLR 5'in sinyal yolağı (Gupta ve ark, 2014).....	11
Şekil 2. BSA-Protein standart eğrisi .....	17
Şekil 3. Western blot jel düzeneği.....	18
Şekil 4. Örneklerin kuyucuklara yüklenmesi .....	19
Şekil 6. Yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonunu.....	25
Şekil 7. Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu gösteren Clara hücrelerinin varlığı. ....	27
Şekil 8. Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu gösteren Tip II hücrelerinin varlığı .....	28
Şekil 9. Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu gösteren makrofajların varlığı.....	29
Şekil 10. Western blot yöntemiyle yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR 5 protein ekspresyonunun belirlenmesi .....	31
Şekil 11. Kontrol ve Deneme gruplarında $\beta$ -aktin genine ait ortalama Ct değerleri.....	33
Şekil 12. Kontrol ve Deneme gruplarında GAPDH genine ait ortalama Ct değerleri. ....	33
Şekil 13. Deneme ve Kontrol gruplarında TLR 5 genine ait ortalama Ct değerleri.....	34
Şekil 14. Referans olarak $\beta$ -aktin geninin kullanılması durumunda Kontrol grubuna ait TLR 5 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri grafikte gösterilmiştir .....	34
Şekil 15. Referans olarak GAPDH geninin kullanılması durumunda Kontrol grubuna ait TLR 5 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değeri .....	35
Şekil 16. $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalamasının kullanılması durumunda Kontrol grubuna ait TLR 5 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değeri .....	36



## RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1.** Kontrol (R1, R2, R3) ve Deneme (R1, R2, R3) gruplarında yetişkin akciğer dokularından izole edilen total RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bantları. Her örnekten elde edilerek, saflık ve konsantrasyonu belirlenen total RNA örneklerinin bütünlüğünün koruyup korumadığını belirlemek amacıyla her örnekten 1 µg total RNA %1'lik denature agaroz jelde koşturulmuştur. 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında bulunması total RNA örneklerinin bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir..... 32

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> TLR'ler, hücrede buldukları yerler ve ligandları (Gleiberman ve ark, 2016; İnci ve Bişkin, 2007) .....	9
<b>Tablo 2.</b> Her bir gruba ait 60 µg protein içeren total hacim. ....	18
<b>Tablo 3.</b> Her bir grup için 500 ng total RNA içeren miktarlar .....	22
<b>Tablo 4.</b> Her bir örneğe ait real-time PCR karışımı.....	23
<b>Tablo 5.</b> Tüm gruplara ait RNA örneklerinin konsantrasyon $A_{260}$ , $A_{280}$ , $A_{260}/A_{280}$ ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri. ....	31

## ÖZET

### FARELERDE *İN VİTRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO TRANSFERİNİN YETİŞKİN AKCİĞER DOKUSUNDA TOLL-BENZERİ RESEPTÖR (TLR)-5 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

**Balgir DT. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Programı (Veteriner) Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.**

Üremeye yardımcı tedavi yöntemleri (ÜYTE), infertilite tedavisinde tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. ÜYTE yöntemleri arasında *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak elimizdeki veriler çeşitli ÜYTE yöntemleri sonucu dünyaya gelen çocukların spontan gebeliklerle kıyaslandığında çeşitli sağlık sorunlarına ve astım gibi solunum yolları hastalıklarına karşı daha fazla duyarlı olduklarını göstermektedir. Doğal bağışıklık sistemi, patojenlere ve yabancı antijenlere karşı konakçı vücudunda ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Toll-benzeri reseptörler (TLR), doğal bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından birisidir. TLR'ler arasında önemli bir yere sahip olan TLR 5, bakteriyel flagellini tanıyarak immun yanıtın oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada, bir adet Kontrol grubu ve bir adet Deneme grubu olmak üzere iki gruba yer verilmiştir. Deneme grubu, PMSG+hCG uygulaması yapılan, F1 hibrit dişilerin aynı yaştaki F1 hibrit erkeklerle çiftleştirilmesi sonucu elde edilen döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen konsantrasyonunda geliştirilmesiyle elde edilen blastosist aşamasındaki embriyoların yalancı gebe dişilere transfer edilmeleri neticesinde büyütülen yavrulardan oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise, PMSG+hCG uygulaması yapılmadan, 8-12 haftalık F1 hibrit dişilerin aynı yaştaki F1 hibrit erkeklerle çiftleştirilmeleri sonucu doğan yavrulardan elde edilen yetişkin farelerden oluşturulmuştur. Kontrol ve Deneme gruplarına ait elde edilen yetişkin akciğer dokularında, dokunun genel histolojik yapısını incelemek amacıyla Crossman'ın üçlü boyama yöntemi uygulanmıştır. Dokularda, hangi hücreler tarafından TLR 5'in eksprese edildiğini göstermek amacıyla immunohistokimya ve immunofloresan analizleri gerçekleştirilmiştir. TLR 5 ekspresyonunun mRNA ve protein düzeylerinde ekspresyon düzeyini belirlemek amacıyla, real-time PCR ve western blot tekniklerinden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Kontrol ve Deneme gruplarında TLR 5 ekspresyon profilinin benzer olduğunu ve TLR 5'in hava

yollarında, alveol duvarında, damar çevresinde, damar lümeninde eksprese edildiğini göstermiştir. Ardışık kesitlerin TLR 5 ve hücre-spesifik belirteçler ile boyanması sonucunda, makrofaj, Clara ve Tip 2 hücreleri tarafından eksprese edildiği saptanmıştır. Real-time PCR ve western blot analizlerinden elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubunda TLR 5 mRNA düzeyinin 1,03 kat arttığını ( $p>0,05$ ), TLR 5 proteinine ait ekspresyon düzeyinin ise 1,30 kat azaldığını göstermiştir ( $p>0,05$ ). Elde edilen sonuçlar TLR 5'in yetişkin farelerde akciğer dokusunda Tip II pnömosit, makrofaj ve Clara hücreleri de dahil olmak üzere belirli hücreler tarafından eksprese edildiğini göstermekte ve *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonunu değiştirerek akciğer immun yanıtını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Akciğer dokusu, toll benzeri reseptör 5, 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)-5 IN ADULT MOUSE LUNG TISSUE

**Balgir DT. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology-Embryology Master of Science Program (Veterinary) Master Thesis, Aydın, 2018.**

Assisted reproductive technologies (ART) are widely used all over the world in the treatment of infertility. *In vitro* fertilization and embryo transfer are commonly used among ART methods. However, there is evidence suggesting that, compared with spontaneous pregnancies, children born through various ART methods are more susceptible to various health problems including respiratory diseases such as asthma. The innate immune system has created the first line of defense in the host body against pathogens and foreign antigens. Toll-like receptors (TLR) constitute one of the most important components of the innate immune system. Among TLRs, TLR 5 plays an important role in the development of the immune response by recognizing bacterial flagellin. The aim of the present thesis was to investigate whether or not there is any effect of *in vitro* embryo culture and embryo transfer on the expression of TLR 5 in the adult lung tissue. The present study consists of one Control and one Experimental group. The Experimental group consisted of adults generated by transfer of *in vitro*-developed blastocysts obtained through *in vitro* culture of zygotes. The control group was obtained from mating natural cycling females with F1 hybrid males of the same age. To examine the general histological structure of the adult lung tissues isolated from Control and Experimental groups, Crossman's trichrome method was used. Immunohistochemistry and immunofluorescence methods were performed to show expression of TLR 5 in the cells of lung tissue. Real-time PCR and western blott techniques were used to quantify the expression of TLR 5 at the mRNA and protein levels, respectively. Immunohistochemical analyses demonstrated that TLR 5 is expressed by cells located in the airways, alveol's wall, blood with a similar pattern of expression between the two groups. It was further demonstrated that macrophages, Type 2 pneumocytes and Clara cells are among the cells expressing TLR 5. qRT-PCR results indicated that the level of TLR 5 mRNA is increased 1.03-fold ( $p > 0.05$ ) in the Experimental group compared with the Control group. Results obtained from western blot analysis showed that expression level of TLR 5 protein was

decreased in Experimental group by 1.30-fold ( $p > 0,05$ ) compared with the Control group. Taken together, results obtained from the present study indicate that TLR 5 is expressed by certain cells in the adult mouse lung tissue including Type II pneumocytes, macrophages and Clara cells and *in vitro* embryo culture and embryo transfer procedures may alter the immune response in adult lung tissue by changing the expression of TLR 5.

**Keywords:** Lung tissue, toll like receptor 5, mouse, *in vitro* embryo culture and embryo transfer, ART.

# 1. GİRİŞ

Üreme çağına gelmiş çiftlerin on iki ay boyunca korunmaksızın ilişkiye girmelerine rağmen gebe kalamama durumu olarak adlandırılan infertilite, dünya genelinde üreme çağına gelmiş çiftlerin ortalama %10-15'ini etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. (Cloonan ve ark, 2007; Nayak ve ark, 2003). İlk tüp bebek olarak tıp tarihine geçen Luise Brown'ın doğumu ile üremeye yardımcı tedavi yöntemleri (ÜYTE) infertilite tedavisinde devrim niteliği taşımaktadır (Edwards ve Stepto, 1978). Louise Brown'un doğumunu takiben geçen süre içerisinde tüp bebek tedavilerinde çeşitli yardımcı üreme yöntemleri geliştirilmiştir (Olivennes ve Frydman, 1998). ÜYTE uygulamalarında annenin gebelik oranını arttırmak amacıyla bazı oluşan durumlarda birden fazla embriyo transferi yapılmakta ve bu durum sonucunda çoğul gebelik riski artmaktadır. Bu duruma bağlı olarak doğan çocuklarda prematüre doğum ve düşük doğum ağırlığı görülmektedir (Schieve ve ark, 2002). ÜYTE uygulamaları sonucunda dünyaya gelen çocuklar, spontan gebelik sonucu dünyaya gelen çocuklara kıyasla gelişimsel olarak daha geri kalmakta ve hastahane hizmetlerini daha fazla kullanmaktadırlar (Klemetti ve ark, 2006). Yapılan çalışmalar ÜYTE uygulaması sonucunda dünyaya gelen çocukların astım, rematroid artırt ve enfeksiyöz hastalıklarına daha fazla maruz kaldıkları gösterilmiştir (Ericson ve ark, 2002; Carson ve ark, 2012; Koivurova ve ark, 2007). Gelişmiş organizmalar, sürekli olarak mikroorganizmaların tehdidi altındadırlar. Buna bağlı olarak, patojenler tarafından tetiklenen enfeksiyonları ve virülans faktörleri nötralize edebilmek için organizmayı koruyacak çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bağışıklık sistemi doğal ve edinsel bağışıklık sistemi olarak iki ana kategoriye ayrılmıştır (Medzhitov ve Janeway, 1997). Patojen ve konakçı arasındaki karmaşık etkileşimleri ilk olarak doğal bağışıklık sistemi başlatır. Doğal bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunan evrimsel olarak korunmuş patojen tanıma reseptörleri (PRR), patojen üzerinde bulunan patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) tanırlar (Kumar ve ark, 2011). PRR reseptörlerinin en geniş ailesi olarak kabul edilen Toll-benzeri reseptörler (TLR), patojen üzerinde bulunan PAMP'ları tanıyarak, yangısal ve immün yanıt oluştururlar. (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2009). TLR'lerin aktif hale gelip hücre içi sinyalizasyonu başlatabilmesi için bazı ligandlar ile etkileşime girmeleri gerekmektedir (Medvedev ve ark, 2006). TLR 5 bu ligandlar arasında flagellini tanıyarak, bağışıklık tepkisini aktive eder (Cuadros ve ark, 2004). Hawn ve ark (2003) yılında yaptıkları çalışmada, insanlarda

*Legionella pneumophila* bakterisi ile uyarılan akciğer epitel hücrelerinde TLR 5'in IL-8 üretimini kontrol ettiğini ve enfeksiyona karşı tepki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra, Murthy ve ark (2013) yaptıkları çalışmada bakteriyal flagellinin, ökaryotik TLR 5 ile etkileşime girdiğini ve bu etkileşim sonucunda da nükleer faktör- $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) transkripsiyonu ile mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)'ı aktive ettiğini bildirmişlerdir.

Akciğer dokusu vücudun ve solunum sisteminin hayati organlarından birisi olup gaz değişimi gibi önemli işlevleri yerine getirmektedir. Sürekli olarak dış ortamla bağlantı halinde olan akciğer dokusu, patojenlerden ve yabancı antijenlerden kendisini koruyabilmek için bağışıklık sistemi ile etkileşim halindedir. (Whitsett ve ark, 2010; Beisswenger ve ark, 2006). Sunulan tez çalışmasının amacı, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin farelerin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonunu etkileyip etkilemediğini incelemektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

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

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın düzenli olarak ilişkiye girmelerine rağmen, annenin gebe kalamaması durumu olarak tanımlanmaktadır. Tüm dünyada yaygın bir halk sağlığı sorunu olarak gösterilmektedir (WHO, 1991). Buna karşın, yaklaşık son otuz yıl içerisinde geliştirilmiş olan çeşitli ÜYTE, tüm dünya genelinde üreme biyolojisine olan ilgiyi arttırmış ve buna bağlı olarak ÜYTE yöntemlerinin yaygın olarak kullanılmasını olanaklı kılmıştır (Elder ve Dale, 2000).

Tıp tarihine geçen ilk tüp bebek Louise Brown'un, 1978 yılında İngiltere'de doğumu ile yardımcı üreme teknikleri tüm dünya genelinde uygulanmaya başlanmıştır (Feuer ve Rinaudo, 2017). Louise Brown'un doğumu ile sonuçlanan klasik tüp bebek yönteminin uygulanmasını takiben, tüp bebek tedavilerinde başarı oranını arttırmak, çeşitli patolojik durumların üstesinden gelmek ve infertilite engellerini ortadan kaldırmak amacıyla, çeşitli yardımcı üreme yöntemleri geliştirilmiştir (Olivennes ve Frydman, 1998). Bu yöntemler arasında, yaygın olarak kullanılan yöntem, *in vitro* fertilizasyon (IVF, tüp bebek) ve embriyo transfer yöntemleridir. *In vitro* fertilizasyon yöntemi, uygun koşullar altında ovaryumdan toplanan oositlerin *in vitro* ortamda sperm ile bir araya getirilerek, fertilizasyon işleminin *in vitro* ortamda oluşmasını sağlamayı amaçlamaktadır. İşlem, belirli bir gelişim aşamasına ulaşan embriyoların anne adayının uterusuna transfer edilmesi ile tamamlanmaktadır (Saxena, 2013).

Ülkemizde, *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi yöntemleri uygulanarak doğan ilk tüp bebek olan Ece, 16.08.1989 tarihinde dünyaya gelmiştir (WEB\_1). Tedavi, Ege Üniversitesi Kadın Doğum ve Hastalıkları Anabilim Dalında Prof. Dr. Refik Çapanoğlu başkanlığında gerçekleştirilmiştir. Türkiye'de son verilere göre, Sağlık Bakanlığınca ruhsatlandırılmış toplam yüz kırk altı adet tüp bebek merkezi faaliyet göstermektedir. Bu merkezlere tedavi olmak amacıyla, yılda 20-40 bin çift başvurmaktadır (Güngör ve Beji, 2015).

## 2.2 ÜYTE Uygulamalarından Kaynaklanan Sağlık Problemleri

İnfertilite tedavi sırasında, ovulasyon indüksiyonu için ilaç kullanımı, spermin ve ovumun *in vitro* ortamda hazırlanarak bir araya getirilmeleri ve laboratuvar ortamında kültürü gibi birçok işlem gametlere ve embriyolara zarar verebilecek niteliktedir (Lu ve ark, 2013). Ayrıca, ÜYTE uygulamaları ile doğan çocukların sayısının giderek artıyor olması, yapılan işlemlerin uzun vadeli sağlık sorunlarına neden olup olmadığının izlenmesi son derece önemlidir (Min ve ark, 2004). ÜYTE uygulaması sonucu dünyaya gelen çocuklarla, spontan olarak dünyaya gelen çocuklar kıyaslandığında, çeşitli sağlık sorunlarının görülme riskinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Schieve ve ark, 2004; Alukal ve Lipshultz, 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ÜYTE uygulamalarıyla doğan bireylerde, Beckwith-Wiedeman, Prader Willi ve Angelman Sendromu gibi çeşitli epigenetik hastalıkların daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir (Lidegaard ve ark, 2005). Avrupa'nın beş farklı ülkesinden prospektif olarak elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle elde edilen veriler, ÜYTE ile dünyaya gelen çocuklarda, ürogenital sistem hastalıkları, çocukluk çağı hastalıkları ve bunun yanı sıra tıbbi tedavi gereksinimine ihtiyaç duyma oranlarının spontan olarak dünyaya gelen çocuklara nazaran daha fazla olduğu saptanmıştır (Bonduelle ve ark, 2005). Ceelen ve ark (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, IVF yöntemi ile dünyaya gelmiş çocukların kan basıncında ve açlık glikoz düzeylerinde spontan gebelik sonucu dünyaya gelen çocuklara göre anlamlı bir artışın olduğu saptanmıştır. Çocuklarda kanser hastalığının oluşmasında fetüs gelişimi ve gebe kalma noktasına kadar olan olayların rol alabileceği düşünülmekte ve bundan dolayı yardımcı üreme yöntemlerinin çocukluk çağı kanser insidansında önemli olabileceği belirtilmektedir (Lightfoot ve ark, 2005).

ÜYTE uygulanan çiftlerde birden fazla embriyo transferi yapılması sonucunda çoğul gebelikler görülmekte ve düşük doğum ağırlığına sahip bebekler dünyaya gelmektedir (Schieve ve ark, 2002). Düşük doğum ağırlığı ile dünyaya gelen bireylerin, yetişkin dönemlerinde Tip 2 diyabet, kalp krizi ve dislipidemi gibi hastalıklarla karşılaşma riskleri artmaktadır (Calkins ve Devaskar, 2011). ÜYTE yöntemleri kullanılarak elde edilen embriyoların laboratuvar ortamında büyütülmeleri ve anne adaylarına transfer edilmeleri sonucunda oluşan tekil gebeliklerde de fetüs ve plasenta gelişimi normal seyrini takip edememekte ve bu durum bireylerde bahsedilen hastalıklara yakalanma riskini arttırabilmektedir (Fleming ve ark, 2004). ÜYTE uygulamaları ile dünyaya gelen bebeklerde immun sistem üzerine bu uygulamaların etkisi olup olmadığı ile ilgili her hangi bir literatür çalışması bulunmamaktadır. Ancak Carson ve ark (2012) yaptıkları kohort çalışmasında

ÜYTE uygulamaları ile dünyaya gelen çocukların astım hastalığına daha fazla yakalandıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda ÜYTE uygulaması sonucu dünyaya gelmiş çocuklar, normal gebelik sonucu dünyaya gelmiş çocuklar ile kıyaslandığında rematoid artrit ve enfeksiyon hastalıkları gibi immunolojik kökene sahip hastalıkların daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Ericson ve ark, 2002; Koivurova ve ark, 2007).

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 ekspresyonu üzerine etkisi” adlı TÜBİTAK (Proje no: 112O259) projesinden elde edilen verilere göre *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll benzeri reseptörlerden TLR-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9 ve -13 genlerine ait mRNA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bütün bu veriler ışığında, ÜYTE uygulamaları sonucu dünyaya gelen bebeklerde bağışıklık sistemi gelişmelerinin tam olarak tamamlanmamış olabileceği ve ÜYTE uygulamaları ile dünyaya gelen bireylerin özellikle neonatal dönemde çeşitli hastalıklara karşı daha duyarlı olabilecekleri düşünülmektedir.

## **2.3 Akciğer Dokusu ve Gelişimi**

Föetal dönemde, ön bağırsağın anterior kısmının iki tüpe ayrılması ile başlayan solunum sistemi gelişimi, insanda yaklaşık olarak 28. günde, farelerde ise 9,5 günde görülmektedir (Morrisey ve Hogan,2010). Farelerde akciğer gelişimi, pseudoglandular evre, kanilikular evre, sakkular evre ve alveolar evre olmak üzere dört ana başlık altında incelenir. İnsanlarda akciğer gelişimi, tüm bu evrelerin içine ilk gelişim basamağı embriyonik evrenin de girmesiyle 5 ana başlık altında toplanır (Cardoso ve Lu, 2006; Rawlis ve ark, 2009).

### **2.3.1 Pseudoglandular Evre**

Farelerde 9,5. günde laringotrakeyal tüp olarak adlandırılan oluk şekillenir ve hücre poliferasyonu, hücre göçü ve hücre farklılaşmasını tetikleyen mezenkimal epitel hücre etkileşimleri başlar. Bu aşamada akciğer dokusu simetrik iki tomurcuk halindedir ve pleuroperitoneal kanalların içerisine doğru çıkıntılar meydana getirir. Bu dallanma sonucunda farelerde, bir adet sol akciğer lobu ve dört adet sağ akciğer lobu oluşur (Warburton ve

ark,2010). Bu evrede endotel kaynaklı splanchnik mezoderm, epitel hücrelerini örtetek etrafını sarar (Warburton ve ark, 2010; Costa ve ark, 2001).

### **2.3.2 Kanalikular Evre**

Bu evrede gaz değişim bölümleri şekillenerek damarlanmalar başlar (Warburton ve ark,2010). Akciğer bronşları, kendilerinden daha küçük dallara ayrılarak, iletici hava yolu olan bronşiyollerini oluştururlar. Bronşiyoller ise terminal bronşiyollerini meydana getirmek amacıyla ek dallanmalar oluştururlar (Kawanami, 1994; Kumar ve ark, 2012; Krstic, 2013). Hava yolu epitel hücreleri ise priferal skuamöz hücrelere ve proksimal kübik hücrelere farklılaşırlar (Waburton ve ark, 2010).

### **2.3.3 Sakkular Evre**

Bu evrede, bronşiyollerin son bölümlerini alveoller oluşturur. Oluşan alveoller birkaç kola ayrılarak duktus alveolarisleri oluştururlar. Oluşan duktus alveolarisler, alveollerin bir araya gelerek oluşturduğu sakkulus alveolarislere (alveol keseleri) bağlanır (McGeady ve ark, 2006). Oluşan alveolar keseler, daha sonra alveollerde pnömosit I ve pnömosit II hücrelerine farklılaşacak olan kübik epitel hücre ile örtülüdür (Waburton ve ark, 2010)

### **2.3.4 Alveolar Evre**

Bu evrede ise alveoller, akciğerin distalinde genişlemeye başlarken, komşu kılcallar alveollere iyice yaklaşarak alveolar epitelyal hücreleri sıkı bir biçimde sararlar. Oluşan bu ilişki hava kan bariyerinin fonksiyonel aktivitesi için önemli bir aşamadır (McGeady ve ark, 2006).

Akciğerler vücudun en büyük yüzey alanlarına sahiptir. Bu yüzden akciğerler her solunum yapıldığında, patojen mikroorganizmalar, allergenler ve partiküller kirleticeleri de içeren potansiyel olarak zararlı olan pek çok ajana maruz kalmaktadır. Dolayısı ile hayati bir öneme sahip akciğerler hem kendi işlevlerini yerine getirebilmek, hem de çeşitli zararlı

ajanlara karşı vücudu koruyabilmek için bağışıklık sistemi ile sürekli bir ilişki içerisinde oldukları (Suzuki ve ark, 2008).

#### 2.4 Bağışıklık Sistemi Ve Toll Benzeri (TOLL-LIKE) Reseptörler

Gelişmiş organizmalar, sürekli olarak bakteriler, parazitler, mantarlar gibi patojen özelliğe sahip daha küçük canlıların tehdidi altında bulunurlar. Bu nedenle, gelişmiş organizmalar kendilerine enfekte olan bu patojenlerin ortadan kaldırılması amacıyla bir savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bağışıklık (immun) sistemi olarak da isimlendirilen bu savunma mekanizmaları, doğal ve edinsel bağışıklık sistemi olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Her iki savunma sisteminin de amacı aynı olup konağı patojenlerden korumaktır. Ancak, her iki savunma sisteminin çalışma mekanizmaları ve bu sistemlerde rol alan hücre ve moleküller birbirinden farklıdır (Akira ve ark, 2006).

Edinsel bağışıklık sistemi, enfeksiyonun ileri evresindeki patojenleri tanıyarak onları immunolojik hafıza içerisine alır. T ve B lenfositleri kullanarak, antijen-antikor eşleşmesi yapıp patojenleri tanıyarak ve immun yanıt oluşturur. Bu yüzden de daha özgündür (Akira ve ark, 2001). Doğal bağışıklık sistemi ise, konağı mikrobik patojenlere karşı koruyan savunma mekanizmasının ilk basamağını oluşturmaktadır. Konağıya ait hücreler, lipidler, lipoproteinler, proteinler ve nükleik asitlerden oluşan patojenlerle ilişkili moleküler kalıpları (PAMPs) algılayan kalıp tanıma reseptörleri "Pathogen Recognition Receptor (PRR)" aracılığı ile algırlar (Kawai ve Akira, 2007). PRR'ler, patojen hücre yüzeyine bağlanarak makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositoz olmaları için patojeni duyarlı hale getirirler. PRR'ler, endositik, sekrete edilen ve sinyal edilen olmak üzere üç grupta sınıflandırılırken sinyal ileten grubu TLR ailesi oluşturmaktadır (Iwasaki ve Medzhitov, 2010). Endojen ve eksojen inflamatuvar mediatörlere yanıt oluşturabilen TLR ailesi PRR sınıfları içerisinde en kapsamlı incelenen gruptur (Chaudhuri ve Sabroe, 2008).

Max Planck Enstitüsünde bulunan Christiane Nüsslein-Volhard, 1985 yılında bir meyve sineği olan *Drosophilla melanogaster* larvalarında ventral bölgenin az gelişmesi ile karakterize bir mutasyon saptamış ve mutasyona uğrayan bu gene "Muhteşem" anlamına gelen "Toll" adını vermiştir (Hansson ve Edfeldt, 2005). Toll terimi, başlangıçta *Drosophilla melanogaster* larvalarında dorsal/ventral yönelimi yöneten ve hücre yüzeyinde bulunan bir reseptör olarak değerlendirilmiştir (Valanne ve ark, 2011). Daha sonra yapılan çalışmalar ile, embriyonik dönemde dorsal/ventral modelin oluşmasında merkezi bir rol oynayan

*Drosophilla* Toll geni, klonlanmış ve DNA dizisi belirlenmiştir. (Hashimoto ve ark, 1988). İzleyen çalışmalarda mutant Toll geninden yoksun *Drosophilla* sineklerinin, mantar enfeksiyonuna maruz bırakılmaları durumunda yaşamadıkları saptanmış ve Toll geninin bağışıklık sisteminde de önemli bir yeri olduğu gösterilmiştir (Hansson ve Edfeldt, 2005).

Ruslan Medzhitov ve arkadaşları, 1997 yılında, *Drosophilla*'da bulunan Toll geninin proteinlerinde ekstraselüler bölgede bulunan lösin açısından zengin tekrarlar (LRR) ve intrastoplazmik bölgede bulunan interlökin-1 (IL-1) proteini ile ilgili memelilerde de homolog bir yapı olduğunu göstererek bu yapıya Toll benzeri reseptör adını verdiler (Medzhitov ve Janeway, 1997).

## 2.5. Toll Benzeri Reseptörlerin Yapısı ve Özellikleri

TLR'ler tip-1 integral membran proteinleridir ve trimodüler bir yapıya sahiptirler (Barton ve Kagan, 2009). TLR'ler, değişen sayıda lösin amino asitince zengin tekrar motifleri ve interlökin-1 reseptörüne homolog olan, stoplazmik sinyalleme alanı içeren TOLL/IL-1 (TIR) domaininden oluşurlar (Bowie ve O'Neill, 2000).

Bağışıklık sisteminin evrimsel olarak korunmuş yapıtaşlarından birisi olarak kabul edilen TIR domaini, 200 adet amino asit içerir ve hücre içi sinyalizasyonunda görev alır. TLR yapısında bulunan TIR domaini üç gruptan oluşmaktadır. İlk grup, hücre dışı kısımlarında immunglobülin (Ig) alanı bulunduran interlökin reseptörü olarak adlandırılan reseptörlerden oluşur. İkinci grup, klasik bir TLR modeli olarak kabul edilir ve mikrobiyal kökenli molekülleri bağlar. Adaptör proteinlerinden meydana gelen son grup ise, birinci ve ikinci gruptan gelen sinyallere aracılık eder (Frosali ve ark, 2015).

Memelilerde, ligand özellikleri, ligandı ifade etme modelleri ve etkileşim halinde oldukları hedef genler dikkate alındığında birbirinden farklı on üç adet TLR üyesi bulunmaktadır (Janaway ve Medzhitov, 2002; Kawai ve Akira, 2006; Schavliege ve ark, 2007). Bunlardan TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 hücre yüzeyinde bulunurken, TLR 3, 7, 8 ve 9 stoplazmada endozomlarda bulunur (Takeda ve ark, 2003). Ayrıca, farelerde TLR 10 geninin ifade edilmediği, bu genin sadece insanlarda eksprese edildiği bildirilmiştir (Kumar ve ark, 2011; Hasan ve ark, 2005; Lee ve ark, 2014).

TLR'ler tanıdıkları PAMP'lara göre de alt ailelere ayrılmaktadırlar. TLR 1, 2 ve 6 alt aileleri lipidleri tanıırken, TLR 7, 8 ve 9 nükleik asitleri tanımaktadır. TLR 2, peptidoglikan (PGN) ve lipoteikoik asit (LTA) gibi lipoproteinleri tanıyarak cevap oluştururken, sinyal

iletimi oluşturabilmesi için TLR 1 ve TLR 6 ile dimer oluşturması gerekmektedir. Viral çift sarmallı RNA, TLR 3 tarafından algılanırken, tek sarmallı RNA'ı TLR 7 ve TLR 8 algılar (Werling ve ark, 2009). TLR 9'un ise bakteriyel DNA'da ki metilleştirilmemiş CpG dinükleotidlerine karşı tepki verdiği gösterilmiştir (Latz ve ark, 2007).

Bununla birlikte bazı TLR'ler yapısal olarak ilgisiz birkaç ligandı tanıyabilmektedir. Örneğin, TLR 4, lipopolissakarit (LPS), bitkilerde bulunan diterpen paklitaksel, solunum sinsitiyal virüs (RVS), füzyon proteini, fibronektin ve ısı şok (heat shock) proteinleri gibi çok farklı yapılara sahip ligandları tanıma özelliği vardır (Akira ve ark, 2006).

**Tablo 1.** TLR'ler, hücrede buldukları yerler ve ligandları (Gleiberman ve ark, 2016; İnci ve Bişkin, 2007)

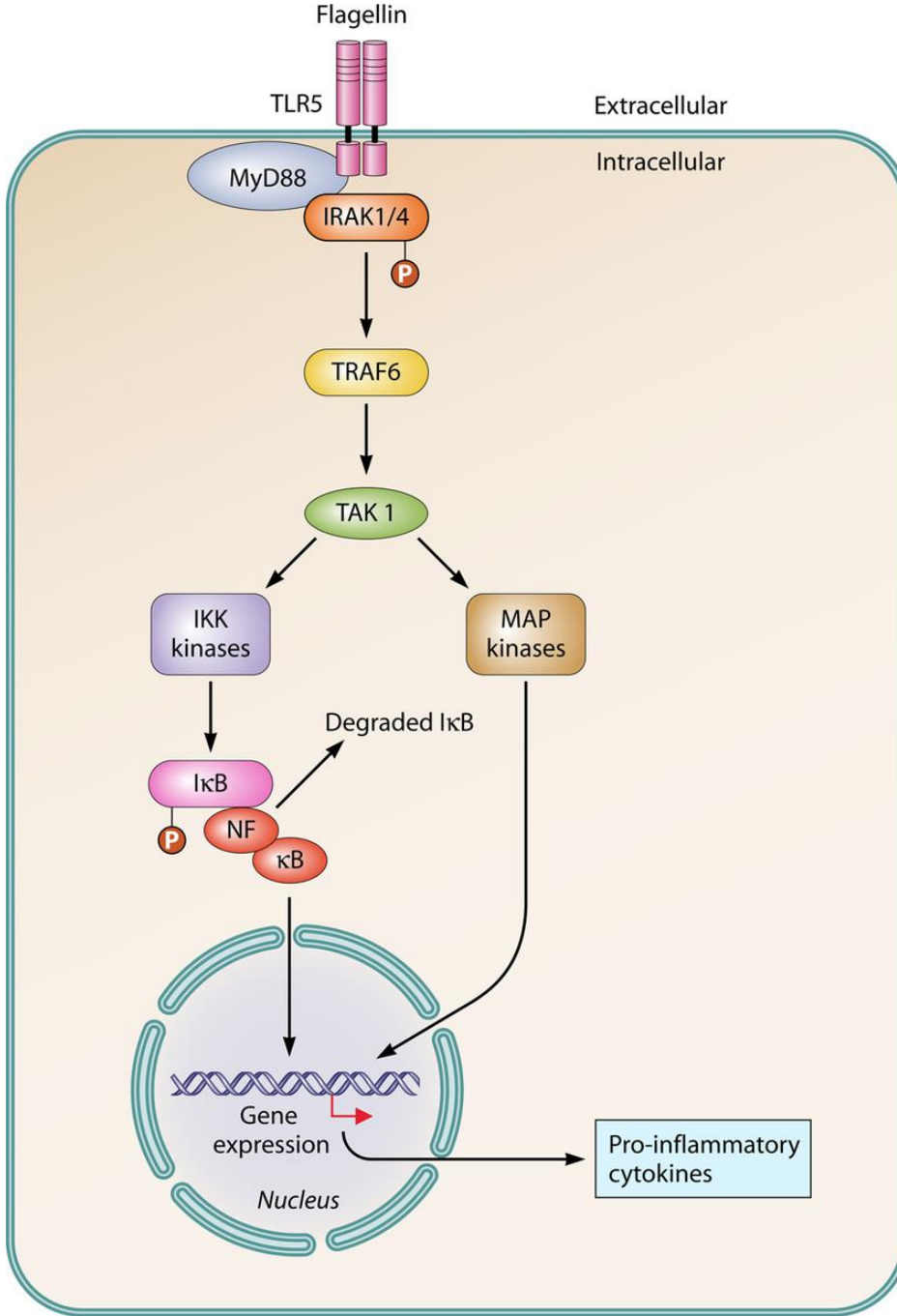
RESEPTÖRLER	HÜCREDEKİ YERLERİ	LİGANDLAR
TLR1	Hücre yüzeyi	Triaçil lipoprotein
TLR2	Hücre yüzeyi	Peptidoglikan Lipoprotein Lipoteikoik Asit Zymosan
TLR3	Sitoplazma	Viral dsRNA
TLR4	Sitoplazma	Heat Shock Protein (ısı şok protein) Lipopolisakarit Solunum Sinsitiyal Virüs (RSV) Paklitaksel Mouse Mammary Tumor Virüs
TLR5	Hücre yüzeyi	Flagellin
TLR6	Hücre yüzeyi	Lipoteikoik Asit Triaçil Lipoprotein Zymosan
TLR 7/8	Sitoplazma	Lipoteikoik Asit Triaçil Lipoprotein Zymosan
TLR9	Sitoplazma	Bakteriyel ve viral DNA
TLR 10	Hücre yüzeyi	Bilinmiyor
TLR 11	Hücre yüzeyi	Bilinmiyor
TLR 12 ve 13	Bilinmiyor	Bilinmiyor

## 2.6 TLR 5 ve Bağımlı Olduğu Sinyal Yolağı

Toll benzeri reseptörler (TLR), mikroorganizmalarda bulunan patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturarak doğuştan gelen bağışıklıkta önemli rol oynarlar (Yoon ve ark, 2012). TLR ailesi, PAMP'ların hücre içi ve hücre dışında algılanmasında önemli rol oynamaktadırlar (Akira ve Takeda, 2004). Her TLR farklı bir ligand bağlama mekanizması ile farklı bir antijen grubunu veya alt kümesini tanır (Liu ve Zhao, 2007). Flagella da bu farklı antijen gruplarından birisi olup, çeşitli bakteri türleri arasında iyi korunmuş kompleks bir bakteriyel organeldir. Aynı zamanda, birçok bakteri türü için virülans etkisi oluşturur (Way ve ark, 2004). Bakteriyel flagella, monomerik flagellin alt birimlerinden oluşarak güçlü yangı tetikleyici (proinflamatuvar) aktiviteye sahiptir (McDermott ve ark, 2000). Bakteriyel flagellin, organizmaları enfekte ettiğinde konağa ait inflamatuvar yanıt TLR 5 tarafından oluşturulur (Gerwitz ve ark, 2001). Balıklardan memelilere kadar tüm omurgalılarda evrimsel olarak korunan TLR 5, tek tip protein bağlayan bir TLR molekülüdür (Stockhammer ve ark, 2009). TLR 5, lokomasyondan sorumlu kamçı benzeri flagellar ipliği bulunduran  $\beta$ - ve  $\gamma$ -proteobakterilerde bulunan monomerik flagellin formuna cevap oluşturmaktadır (Yoon ve ark, 2012).

TLR 5, flagellin monomerinin konveks yüzünde bulunan kısımdan flagellayı tanır. Ancak flagellin üzerinde iyi tanımlanmış olan bu etkileşim bölgesi, TLR 5 molekülü üzerinde henüz tanımlanmamıştır (Andersen-Nissen ve ark, 2007). Flagellin, TLR 5'e bağlandığında MyD88-ilişkili (MyD88-dependent) sinyalizasyonuna neden olur. Bu sinyalizasyon sonucunda bağlanmanın gerçekleştiği epitel hücrelerinde, monositlerde ve dentritik hücrelerde immun yanıtta görev alan çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenleyen nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ve mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) yolları aktif hale gelir (Yoon ve ark, 2012; Ramos ve ark, 2004).





Şekil 1. TLR 5'in sinyal yolağı (Gupta ve ark, 2014)

TLR sinyal yolağı, intrasitoplazmik TIR alanına PAMP'ların ve sitokinlerin bağlanması ile başlatılır (Lin ve ark, 2010; Takeda ve ark, 2003). TLR aracılı hücre içi sinyaller, TIR domainini içeren sitozolik alan ve bu domaine bağımlı olarak meydana gelen heterofilik etkileşimler ile gerçekleştirilir. TIR domaini, Myeloid farklılaşma primer yanıt protein-88 (MyD88), TIR etki alanı içeren bağdaştırıcı protein (TIRAP)/MAL, TIR domain içeren TRIF (IFN $\beta$ ) ve TRIF'a bağlı adaptör protein (TRAM) olmak üzere 4 farklı adaptör protein içerir (Kawai ve Akira, 2006).

MyD88'in C-terminal kısmı, TIR domaini olarak adlandırılırken, N terminal kısmı ölüm domain (Death Domain) olarak adlandırılmaktadır (Takeda ve Akira, 2004). TLR ve patojen ligandı arasında bağlanma gerçekleştiğinde, TLR ve MyD88'in C terminalinde bulunan TIR domaini etkileşime geçer (Ulrichs ve ark,2007). MyD88'in N terminal kısmı ise interlökin-1 ilişkili kinaz (IRAK) ailesinin üyeleri olan IRAK-1 ve IRAK-4 ile birleşir (Fu-shin ve Hazlett, 2006). Serin/threonin protein kinaz aktivitesine sahip olan IRAK-1 ve IRAK-4 uyarıcılara tepki olarak sırası ile MyD88'den fosforilasyona uğrayarak ayrılırlar (Kawasaki ve Kawai, 2014). Fosforilize olan IRAK, TRAF-6 ile etkileşime girer. TRAF-6 ise, ubiquitine bağlı MAP kinaz kinaz kinaz (MAP3K) ailesinin bir üyesi olan transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ -aktive protein kinaze-1 (TAK-1)'i aktive eder (Fu-shin ve Hazlett, 2006). TAK-1 aktivasyonu ile iki ayrı sinyal yolağı olan IKK(I $\kappa$ B kinaz) kompleksi-NF- $\kappa$ B yolağı ve MAPK yolağı olarak aktif hale geçer (Kawasaki ve Kawai, 2014). Sitoplazmada aktif halde bulunan TAK-1, IKK'yı uyararak I $\kappa$ B'nin fosforile olmasını sağlar ve böylelikle NF- $\kappa$ B sitoplazmadan ayrılır (Akira, 2003). NF- $\kappa$ B'nin hücre çekirdeğine geçmesi ile birlikte ilgili genlerin transkripsiyonu başlatılır (Means ve ark, 2000). Benzer şekilde, TAK-1, MAPK ailesinin üyeleri olan Fos, ATF ve Maf proteinlerinin dimeri olan AP-1'i fosforilasyonunu sağlayarak aktive eder (Kawai ve Akira, 2006). TAK-1 geni bulunmayan (TAK-1 null) farelerden elde edilen hücrelerin, TLR ligandlarına verdikleri yanıtlarda bozulma olduğu gözlemlenmiş ve bu çalışma ile TAK-1'in NF- $\kappa$ B ve MAPK yolaklarının aktivasyonunda önemli bir işlevi olduğu gösterilmiştir (Sato ve ark, 2005). MyD88'den NF- $\kappa$ B ve AP-1'in aktive edilmesine kadar olan sinyal yolağı, neredeyse tüm TLR'ler tarafından kullanılmaktadır. MyD88-bağımlı bu sinyalizasyon, yangısal yanıtların kontrol edilmesinde son derece önemlidir.(Yamamoto ve ark, 2014).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Materyali

Sunulan tez çalışması, 2016-2018 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Sunulan tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 30.11.2016 tarihli 64583101/2016/177 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 ve VTF-15057 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi'nden elde edilmiş olan yetişkin akciğer doku örnekleri kullanılmıştır.

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında yürütülen VTF-15057 numaralı projede kullanılan F1 hibrid fareler, C57BL/6 erkek farelerin BALBc dişi fareler ile çiftleştirilmesi sonucu elde edilmişlerdir. Yürütülen proje kapsamında elde edilen F1 hibrit fareler, 14 saat aydınlık: 10 saat karanlık ışık siklusunda barındırılmış, yem ve su *ad libitum* olarak verilmiştir. Deneysel çalışma sürecinde, farelerin beslenmesi ve barınması Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Sunulan tez çalışmasının materyalleri, Kontrol grubu ve Deneme grubu olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Deneme grubu, PMSG+hCG uygulaması yapılan, F1 hibrit dişilerin aynı yaştaki F1 hibrit erkeklerle çiftleştirilmesi sonucu elde edilen döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen konsantrasyonunda geliştirilmesiyle elde edilen blastosist aşamasındaki embriyoların yalancı gebe dişilere transfer edilmeleri neticesinde büyütülen yavrulardan oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise, PMSG+hCG uygulaması yapılmadan, 8-12 haftalık F1 hibrit dişilerin aynı yaştaki F1 hibrit erkeklerle çiftleştirilmeleri sonucu doğan yavrulardan elde edilen yetişkin farelerden oluşturulmuştur.

VTF-15057 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında izole edilen yetişkin akciğer dokuları, çalışmalar gerçekleştirilene kadar uygun koşullarda muhafaza edilmişlerdir. Sunulan tez çalışmasını gerçekleştirmek amacıyla, histokimya, immunohistokimya, western blot ve real-time PCR (qRT-PCR) yöntemlerinden yararlanılmıştır. Histokimya ve immunohistokimya yöntemlerinin uygulanması amacı ile rutin histolojik takip işlemlerinin

ardından paraplast içerisinde gömülmüş olan ve +4 °C’de muhafaza edilen yetişkin akciğer doku blokları kullanılmıştır. TLR 5 ekspresyon düzeyinin semi-kantitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla, sırası ile western blot ve qRT-PCR tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, –80 °C’de muhafaza edilmiş olan yetişkin akciğer doku örnekleri kullanılmıştır.

Yetişkin akciğer doku örneklerinden bir mikrotom (Leica) yardımıyla 5 µm kalınlığında 100 µm aralıklarla alınan seri kesitler üzerinde, üçlü boyama, histokimyasal ve immunohistokimyasal boyama metotları uygulanmıştır. Her bir hayvan için toplam 6 adet kesit kullanılmıştır.

Tüm gruplarda -80 °C’de muhafaza edilmiş olan yetişkin akciğer doku örneklerinden TLR 5’in transkripsiyonel düzeyde eksprese edilip edilmediğinin semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla western blot tekniğinden yararlanılmıştır. Ayrıca, TLR 5 reseptörünün mRNA düzeyini ölçmek amacıyla kantitatif real-time PCR yönteminden yararlanılmıştır. Sunulan tez çalışmasında, western blot ve qRT-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.

### **3.2 Crossman Üçlü Boyama Yöntemi**

Sunulan tez çalışmasında paraplast içerisinde gömülü dokuların genel histolojik yapısını incelemek amacıyla Crossman’ın üçlü boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu boyama yöntemine yönelik olarak 5 µm kalınlığında alınan doku kesitlerine deparafinizasyon işlemi uygulanmış, Crossman’ın üçlü boyama yöntemi standart yöntemlere (Crossman, 1937 ) göre gerçekleştirilmiştir. Boyanan kesitler, alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek Entellan ile kapatılmıştır.

### 3.3. İmmunohistokimyasal ve İmmunofloresan Boyama Yöntemleri

Yetişkin akciğer doku kesitlerinde, TLR 5 ekspresyonunu gösteren immunpozitif hücrelerin karakterizasyonuna yönelik olarak immunohistokimya yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, makrofaj, Clara ve Tip II pnömosit hücrelerine özel monoklonal antikordardan yararlanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, APES ile kaplanmış lamlara 5 µm kalınlığında ardışık kesitler alınmış, ardışık kesitlerden birincisi TLR 5 primer antikoru, ikincisi ise makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikoru (M-17-R, sc-26643-R, SantaCruz, 1/100), Clara hücre belirteci olan Mouse Anti-Cloudin-10 primer antikoru (415100, invitrogen, 1/100), ve Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikoları (FL-197, sc:13970, SantaCruz, 1/100) ile eş zamanlı olarak boyanmışlardır.

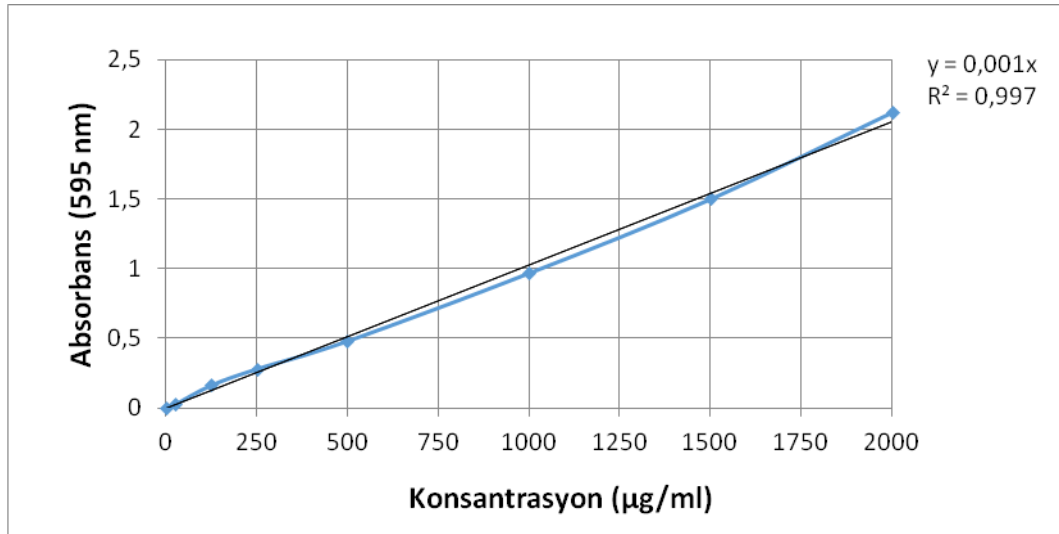
Alınan kesitler kırışıklıklarının giderilmesi amacıyla 35-40 °C su banyosunda yüzdürülmüş ve APES (Sigma) ile kaplanmış lamlara alınmıştır. Parafinin uzaklaştırılması amacıyla deparafinizasyon işlemi uygulanmış, kesitler alkol serilerinden geçirilerek distile suya aktarılmışlardır. Tespit işlemine bağlı olarak bloke edilen antijen epitoplarını ortaya çıkarmak amacıyla antijen retrieval işlemi uygulanmıştır. Antijen retrieval işlemi kesitlerin %0,005 oranında Tween-20 içeren sodyum sitrat buffer (Ph :6) solüsyonu içerisinde 15 dakika kaynatılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemi takiben, 1 saat süreyle oda sıcaklığına soğutulan kesitler, 3 kez 5'er dakika süreyle Tris buffer solüsyonu (TBS, ph:7,6) içerisinde yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla %5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren TBS ile 5 dakika muamele edilmiş ve bu işlemi takiben kesitler, 3'er kez 5'er dakika süre ile TBS içerisinde yıkanmıştır. Kesitler, 20 dakika oda sıcaklığında *blocking* serum (Histostain Plus Broad Spectrum, İnvitrogen) solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Üç kez 5'er dakika TBS ile yıkanan kesitler fare TLR 5 proteinine özgü bir antikor (H-127, sc-10742) ile bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Bu işlemleri takiben kesitler, biyotin-işaretli sekonder antikor (Histostain Plus Broad Spectrum, İnvitrogen) solüsyonu ile 37 °C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sekonder antikoru uzaklaştırmak amacıyla TBS ile yıkama işlemi (3 x 5 dakika) gerçekleştirilmiş ve kesitler HRP (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) solüsyonu içerisinde 37 °C'de 1 saat süre ile inkübasyona bırakılmışlardır. TBS içerisinde (3 kez 5'er dakika) yıkama işlemi yapıldıktan sonra TLR 5 ekspresyonu gösteren hücreleri göstermek 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) solüsyonu içerisinde 1-3 dakika muamele edilmişlerdir. Hücre çekirdeklerinin ortaya çıkarılması amacı ile kesitler, Harris hematoksilen içerisinde yaklaşık 1 dakika süre ile boyanmışlardır. Tüm bu işlemler uygulandıktan sonra

kesitler etanol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatılmışlardır. İmmunpozitif hücrelerin görüntülenebilmesi için BX51 (Olympus) araştırma mikroskopu ve DP70 kamera/görüntü analiz sisteminden faydalanılmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, immunohistokimyasal boyamaya ek olarak immunofloresan boyama yönteminden de yararlanılmıştır. Kesitlere ilk olarak deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem için kesitler sırası ile xylol ve alkol serilerinden geçirilerek, distile su içerisinde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemi takiben, yukarıda belirtildiği şekilde antijen retrival işlemi uygulanmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan kesitler yıkama işlemi için 3 kez 5'er dakika Tris buffer solüsyonu (TBS, pH 7.6) ile muamele edilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak amacıyla, kesitler 20 dakika süreyle oda sıcaklığında blocking serum (Histostain Plus Broad Spectrum, İnvitrogen) içerisinde inkübe edilmişlerdir. Bu işlemi takiben kesitler 5 dakika süreyle üç kez TBS solüsyonu (TBS, pH 7.6) içerisinde yıkama işlemine tabi tutulan kesitler, fare TLR 5 proteinine özel bir antikor (H-127, sc-10742) ile bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol amacıyla aynı işleme tabi tutularak sadece primer antikor ilave etmeden (primer antikor yerine TBS kullanıldı) boyanan doku kesitleri kullanılmıştır. Kesitler üzerinden primer antikoru uzaklaştırmak amacıyla dokular, 3 kez 5'er dakika TBS ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işleminden sonra, kesitler anti-mouse Alexa-Flour 488 (A11034, Invitrogen, 1/100) ile işaretli sekonder bir antikor ile 1 saat süreyle 37 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Bu işlemden sonra, kesitlerin yıkanması amacıyla 3 kez 5'er dakika TBS ile tekrar muamele edilmişlerdir. Yıkanan kesitlerin hücre çekirdeklerini boyamak amacıyla, dokular DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile 2 dakika muamele edilmiştir. TBS solüsyonu içerisinde yıkama işlemi (3 x 5 dakika) tekrar edilmiş ve kesitler, kapatma solüsyonu (Mounting medium, Invitrogen) ile kapatılmıştır. İmmunpozitif hücreleri görüntülemek amacıyla flöresan ataçmanlı BX51 (Olympus) araştırma mikroskopu ve DP70 kamera/görüntü analiz sisteminden yararlanılmıştır.

### 3.4. Western Blot Methodu

Western blot analizlerinde kullanılmak üzere  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen yetişkin akciğer doku örnekleri (Kontrol-R1, Kontrol-R2, Kontrol-R3, Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) kullanılmıştır. Yetişkin akciğer doku örnekleri, 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 sonrasında elde edilen homojenatlar  $13,000\times g$ 'de 15 dakika süre ile  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ortaya çıkan süpernatantlar ayrılmış ve küçük miktarlara bölünerek  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  muhafaza edilmişlerdir. Elde edilen süpernatantlarda total protein miktarını belirlemek amacıyla Smart TM BCA Protein Assay kiti (İntron Biyoteknoloji) kullanılmıştır. Kit ile birlikte gelen BSA (bovine serum albumin) solüsyonu ( $2\text{mg/ml}$ ) kullanılmış olup her bir doku örneğine ait total protein miktarı BSA-protein standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. BSA-Protein standart eğrisi

Tüm örneklerde protein miktar tayini işlemi gerçekleştirildikten sonra, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) jelleri hazırlanmıştır. Yükleme tankındaki cam tabakalar arasına %10'luk ayırma jeli (separating gel) dökülmüştür. Jelin polimerleşmesini takiben, %5'lik paketleyici jel (stacking gel) hazırlanarak 10 ml'lik cam pipet yardımı ile hızlı bir şekilde ayırma jeli üzerine dökülmüş ve jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Hazırlanan jel düzeneğinin üst kısmının düz olması için mikropipet yardımı ile

izopropil alkol konulmuş ve bir kurutma kâğıdı aracılığıyla izopropil alkol uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan jelin üzerine 10 adet kuyucuk içeren tarak yerleştirilmiştir. Paketleyici jelin polimerleşmesini takiben tarak çıkarılarak, kuyucuklar elde edilmiştir.



**Şekil 3.** Western blot jel düzeneği

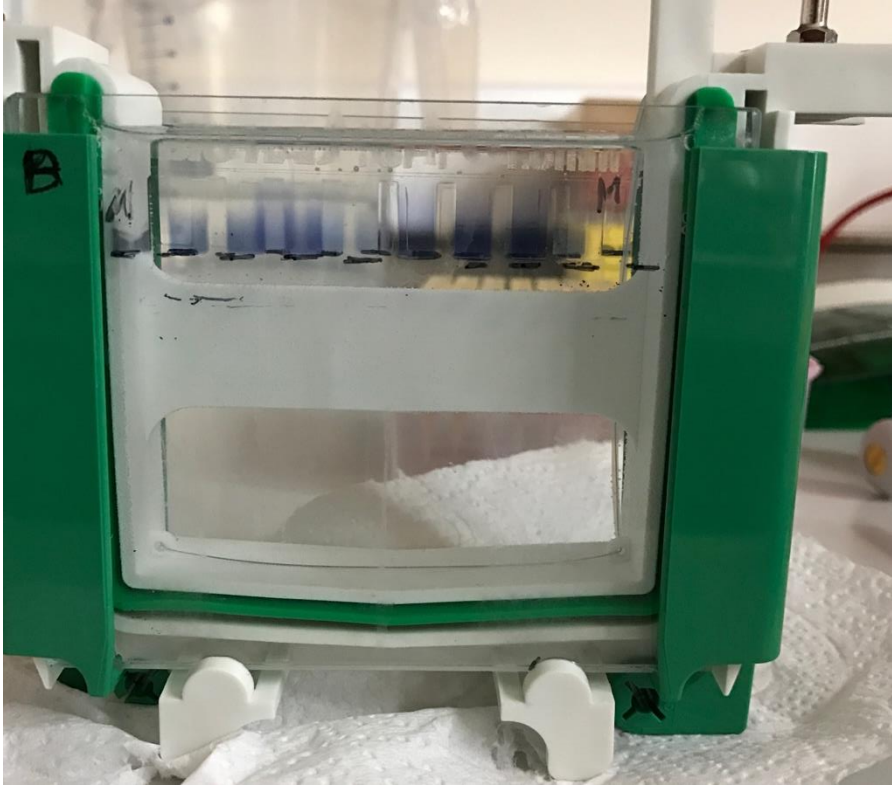
Bu şekilde hazırlanan jel, dikey elektroforez tankına yerleştirilmiş olup, tankın içerisine jel kasetinin yarısını geçmeyecek şekilde 1x yürütme tamponu (running buffer) ilave edilmiştir.

**Tablo 2.** Her bir gruba ait 60 µg protein içeren total hacim.

Gruplar	Örnek Volüm	2x Loading Dye	Lizis buffer	Total hacim
<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 örnek Tablo 2’de gösterilen volümler göz önüne alınacak şekilde ependorf tüplere sırası ile eklenerek hızlıca santrifüj edilmiştir. Örnekler, 10 dakika süre ile 65 °C’de ısıtma tablasında (heating blok) bekletilmiştir. Bu işlemin ardından tüpler tekrar hızlıca santrifüj edilmiştir. Her bir grup için 60 µg protein içeren süpernatant kuyucuklara yüklenmiştir. Protein bantlarının büyüklüklerini belirlemek amacıyla, her bir kuyucuğa 3 µl pre-stained protein lader V protein belirteci (GeneAid) yüklenmiştir.





**Şekil 4.** Örneklerin kuyucuklara yüklenmesi

Yapılan yükleme işlemi sonrasında, örnekler 200 volt, 50 mA'de 60 dakika süreyle yürütülerek proteinler ayrıştırılmışlardır. Bu işlem tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere yükleme tankından çıkarılmıştır. Sonraki aşamada ise blotlama kasetleri arasına Wattman kağıtları (No1), bunların üzerine poliakrilamid jel ve jelin üzerine tekrar nitroselüloz membran (İmmobilon-P, Millipore) yerleştirilmiştir ve son olarak membranın üzerine Wattman No1 kağıtları yerleştirilmiştir. Bütün bu işlemler sırasında, katmanlar arasında hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilmiştir. Proteinleri nitroselüloz membrana (İmmobilon-P, Millipore) transfer etmek için kasetler uygun bir biçimde kapatılmış ve blotlama tankına transferi sağlanmıştır. Blotlama tankı transfer tamponu (blotting buffer) ile doldurulmuş ve içerisine buz kaseti konulmuştur. Transfer işlemi 100 V ve 350 mA akım uygulanarak 1 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminden sonra nitroselüloz membran, bloklama solüsyonu (%5'lik yağsız süt tozu) içeren TBS pH (7,6) 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, %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde 1:1000 oranında sulandırılan anti-TLR 5 primer antikoru ((H-127, sc-

10742) 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. Yıkama işlemi sonrasında membran, %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde 1:5000 oranında sulandırılan HRP ile işaretli bir sekonder antikör (Goat anti-Mouse IgG-HRP, sc-2005) ile bir saat oda sıcaklığında bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Tekrar 3 kez 5'er dakika süreyle TBST solüsyonu ile bir çalkalayıcı üzerinde yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra, membran üzerindeki yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla, kurutma kâğıdı kullanılmıştır. Her bir belirteç, WesternSure Pen (Li-Cor) kalemiyle çizilmiştir. Elde edilen bantların flöresan görüntülenmesi amacıyla, EC3 Görüntüleme Sistemi'nden (EC3 Imaging System, Marka) yararlanılmıştır. Bu işlemi takiben membran steril bir kaba alınmıştır. Karanlık bir ortamda membranlar, 1-2 dakika süreyle Enhanced Chemiluminescence solüsyonu (Novex® ECL, İnvitrogen ya da Luminata Crescendo, Millipore) ile muamele edilmiştir. Antikora bağlanma gösteren bantlar görüntüleme cihazında (EC3 Imaging System, UVP) görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Bu işlemin ardından, membran 3 kez 5'er dakika süreyle TBST solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yapılan yükleme işlemi sonrasında, örnekler 200 volt, 50 mA'de 60 dakika süreyle yürütülerek proteinler ayrıştırılmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere yükleme tankından çıkarılmıştır. Sonraki aşamada ise blotlama kasetleri arasına Wattman kağıtları (No1), bunların üzerine poliakrilamid jel ve jelin üzerine tekrarlama işleminin ardından aynı membran endojen kontrolü tespit etmek amacıyla aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Ancak primer antikör olarak anti-β-aktin (SantaCruz, sc-47778) antikoru kullanılmıştır. Elde edilen ve beklenen bantlarda maksimum bant yoğunluğu (Imax), VisionWorks®LS analiz programında (UVP) hem TLR 5, hem de endojen kontrol olarak kullanılan β-aktin proteinleri için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Hesaplanan TLR 5 Imax değeri, aynı membranda hesaplanan β-aktin, Imax 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 5 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.

### 3.5 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 engellemek amacıyla tüm örnekler DNase solüsyonu (PureLink DNase, Invitrogen) ile muamele edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinde, total RNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla örnekler 10mM Tris-HCL (pH:7,5) içerisinde 1/10 oranında sulandırılarak, 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. Bu şekilde konsantrasyon ve saflığı belirlenen total RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  muhafaz edilmiştir.

### 3.6 Real-Time PCR (qRT-PCR) Methodu

TaqMan Metodu kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizleri için her bir gruba (Kontrol-R1, Kontrol-R2, Kontrol-R3, Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) ait total RNA örneklerinden cDNA (complementary DNA) sentezlenmiştir. Bu işlem, SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) kiti kullanılarak, üretici firma tarafından belirtilen protokole bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak, her bir örnek için 500 ng total RNA kullanılmıştır.

**Tablo 3.** Her bir grup için 500 ng total RNA içeren miktarlar

<b>Gruplar</b>	<b>500 ng RNA (ul)</b>	<b>Nuclease- free H<sub>2</sub>O</b>	<b>Total Hacim</b>
<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

SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) kitine ait bileşenler bir araya getirilerek toplam hacim 20 µl olacak şekilde 2X reverse transkripsiyon master karışımı elde edilmiştir. Yapılan bu işlem sonrasında, her bir gruba ait RNA miktarı master karışımına eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım ile 1X reverse transkripsiyon master karışımı elde edilmiştir. Böylelikle total hacmin 40 µl olması sağlanmıştır. Karışım kısa süreli olarak santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. PCR cihazı (Veriti, Applied Biosystems) yardımı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. 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.

### **3.6.1 Taqman Metodu Kullanılarak Gerçekleştirilen Kantitatif Real-Time PCR (Qrt-PCR) Analizi**

qRT-PCR analizleri, StepOne (Applied Biosystems) real-time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her gruba ait cDNA örnekleri real-time PCR tekniğinde kullanılmak üzere TaqMan problemleriyle Tablo 4’de görülen miktarlarda total hacmi 20 µl olan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hedef gen (TLR 5) ve referans genler (β-aktin ve GAPDH) için TaqMan problemleri kullanılmıştır.

**Tablo 4.** Her bir örneğe ait 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

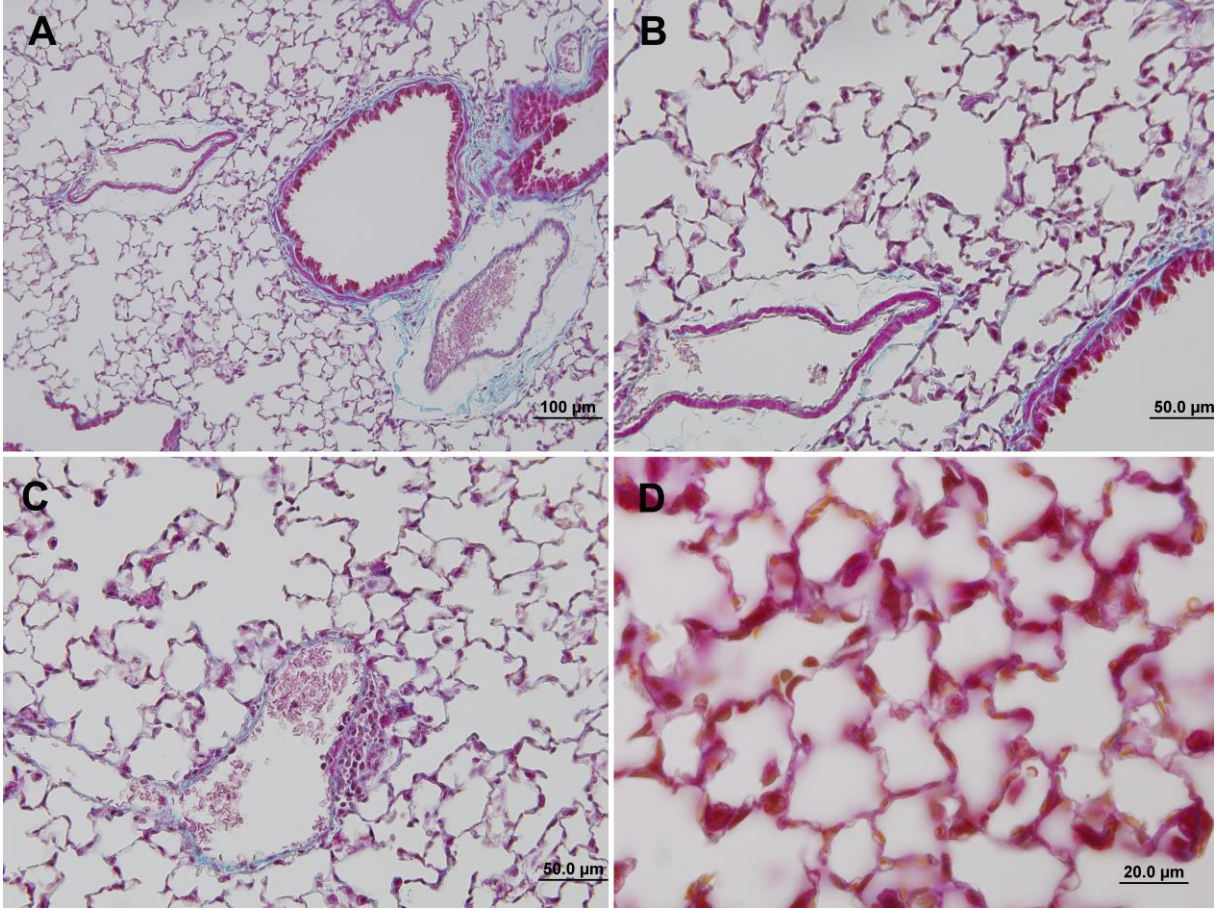
Real-time PCR analizinde, cDNA içermeyen ve reverse transkriptase içermeyen (sadece su) örnekler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. TLR 5 geni ve referans gen olarak kullanılan  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait ortalama Threshold cycle (Ct) değerleri hesaplanarak elde edilen Ct değerleri,  $\beta$ -aktin ve GAPDH genleri ile normalizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Gruplar arası farklılıkların hesaplanmasında Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilmiş olan  $\Delta\Delta$ Ct (comparative Ct) metodu kullanılmıştır. qRT-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 kez tekrar edilmiştir. Bu şekilde tüm gruplarda TLR 5 geni için toplam altı analiz (3 biyolojik replikasyon x 2 teknik replikasyon) gerçekleştirilmiştir.

### **3.7 İstatiksel Analizler**

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

## 4. BULGULAR

### 4.1 Crossman Üçlü Boyama Yöntemi İle Boyanan Yetişkin Akciğer Dokusunun Genel Histolojik Görüntüsü

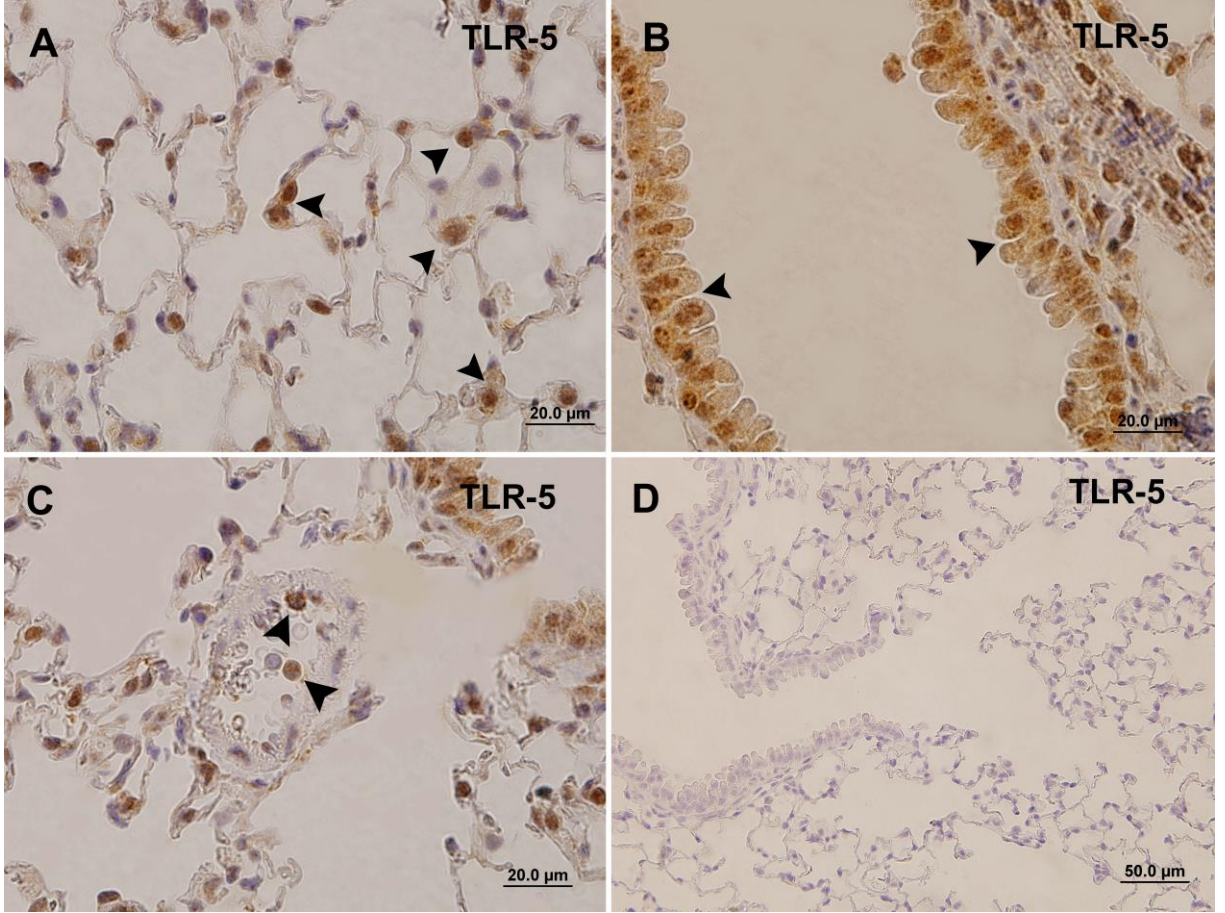


**Şekil 5.** Crossman'ın üçlü boyama yöntemi ile boyanmış akciğer dokusunun genel histolojik yapısı. Kontrol grubuna ait akciğer dokusunda bulunan alveoller, bronşlar, bronşioler ve havayolu epitellerinin genel görüntüsü görülmektedir (A, B, C ve D).

### 4.2 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde TLR 5 Ekspresyonunun İmmunohistokimya ve İmmünflöresan Yöntemi ile Gösterilmesi

TLR 5 ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla Kontrol ve Deneme gruplarına ait olan yetişkin akciğer doku örneklerinde immunohistokimya yöntemi kullanılmıştır. Tüm immunohistokimyasal analizlerde, eş zamanlı olarak primer antikor ilave edilmeksizin boyanan doku kesitleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol kesitlerinde

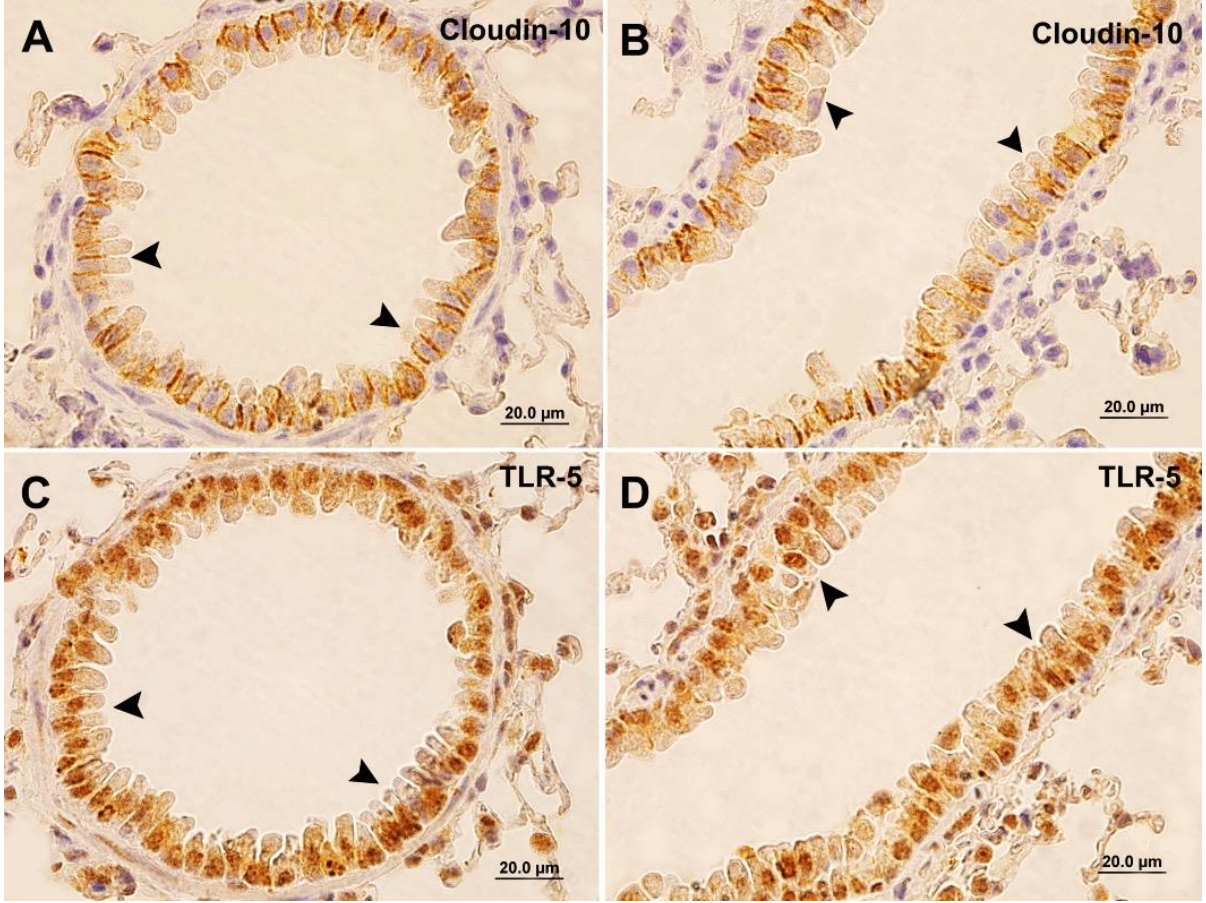
spesifik herhangi bir boyamanın oluşmadığı saptanmıştır (Şekil 6D). İmmunohistokimya analizlerinden elde edilen sonuçlar, Kontrol ve Deneme gruplarına ait akciğer doku örneklerinde benzer bir ekspresyon profili göstermiştir. TLR 5'in alveol duvarında (Şekil 6A), damar içerisinde bazı hücrelerde (Şekil 6C), ve havayolu epitel hücrelerinde (Şekil 6B) eksprese edildikleri gösterilmiştir.



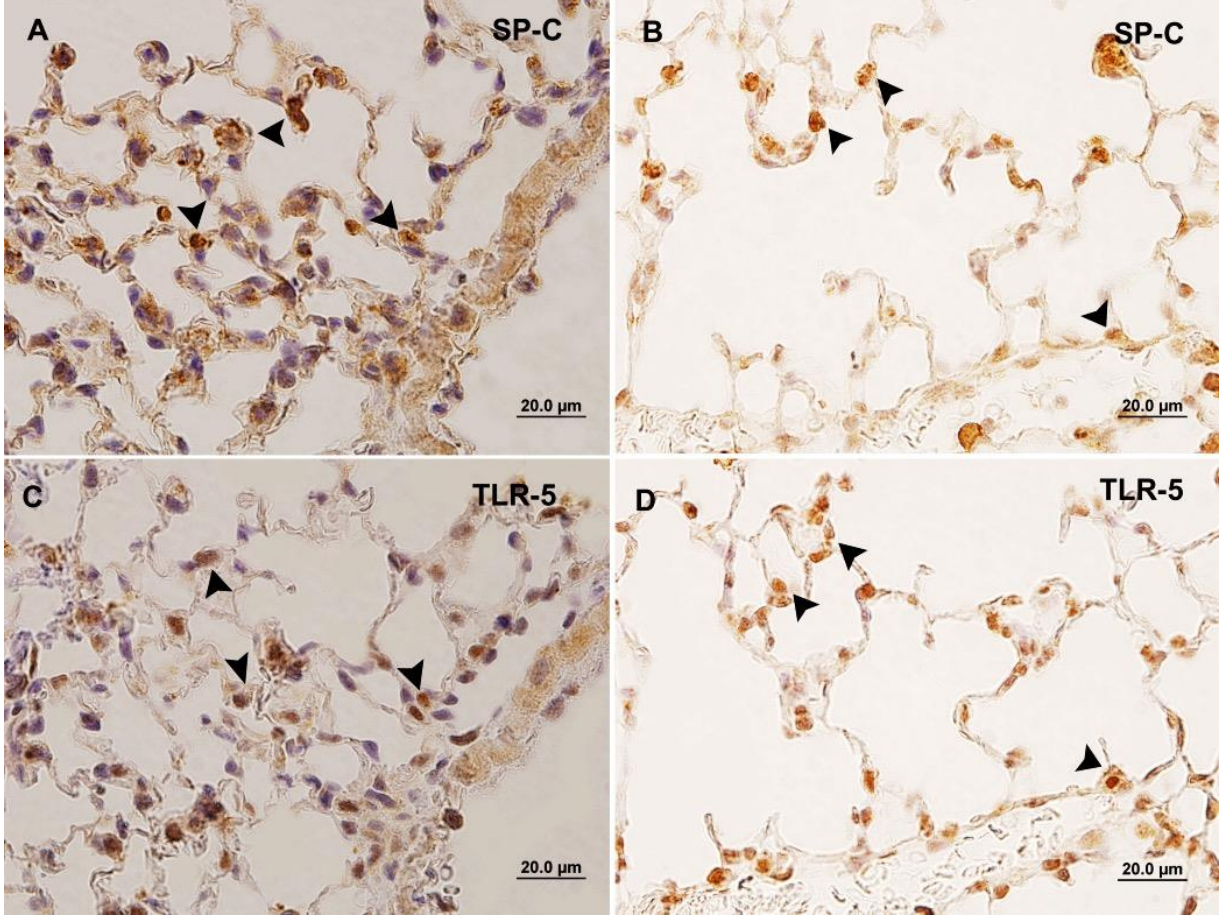
**Şekil 6.** Yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonunu. Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer doku kesitlerinde TLR 5 ekspresyonunu göstermek amacıyla immunohistokimya boyama yöntemi kullanılmıştır. İmmun pozitif hücrelerin saptanmasında 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir (A), (B), (C), (D). Yapılan incelemeler TLR 5'in alveol duvarında (A), bronşiol epitelinde (B) ve damar içerisinde bazı hücrelerde (C) eksprese edildiği ok başları ile gösterilmektedir. TLR 5 primer antikorunu ilave edilmeksizin kullanılan negatif kontrol kesitlerinde boyamanın olmadığı görülmektedir (D).

TLR 5 ekspresyonu saptanan immun pozitif hücrelerin karakterizasyonunu saptamak amacıyla, ardışık kesitler eş zamanlı olarak makrofaj, Clara ve Tip II pnömosit hücrelerine yönelik spesifik monoklonal antikor ile boyanmışlardır. TLR 5 ekspresyonu saptanan ardışık kesitlerin eş zamanlı olarak bir Clara hücre belirteci olan Claudin-10 primer antikor ile boyanması, TLR 5 ekspresyonu gösteren immunpozitif hücrelerin Clara hücreleri olduğunu göstermektedir (Şekil 7). Benzer şekilde, TLR 5 ekspresyonu saptanan ardışık kesitlerin eş zamanlı olarak bir Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikor ile boyanması, TLR 5'in Tip II pnömosit hücrelerinde de eksprese edildiğini göstermektedir (Şekil 8). TLR 5'in Clara ve Tip II pnömosit hücrelerin yanı sıra makrofajlar tarafından da eksprese edilip edilmediğini saptamak amacıyla, TLR 5 ekspresyonu gösteren ardışık kesitler bir makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikor ile boyanmıştır. Elde edilen sonuçlar, hava yollarında gözlenen bazı makrofaj hücrelerinin de TLR 5 eksprese ettiğini göstermiştir (Şekil 9).

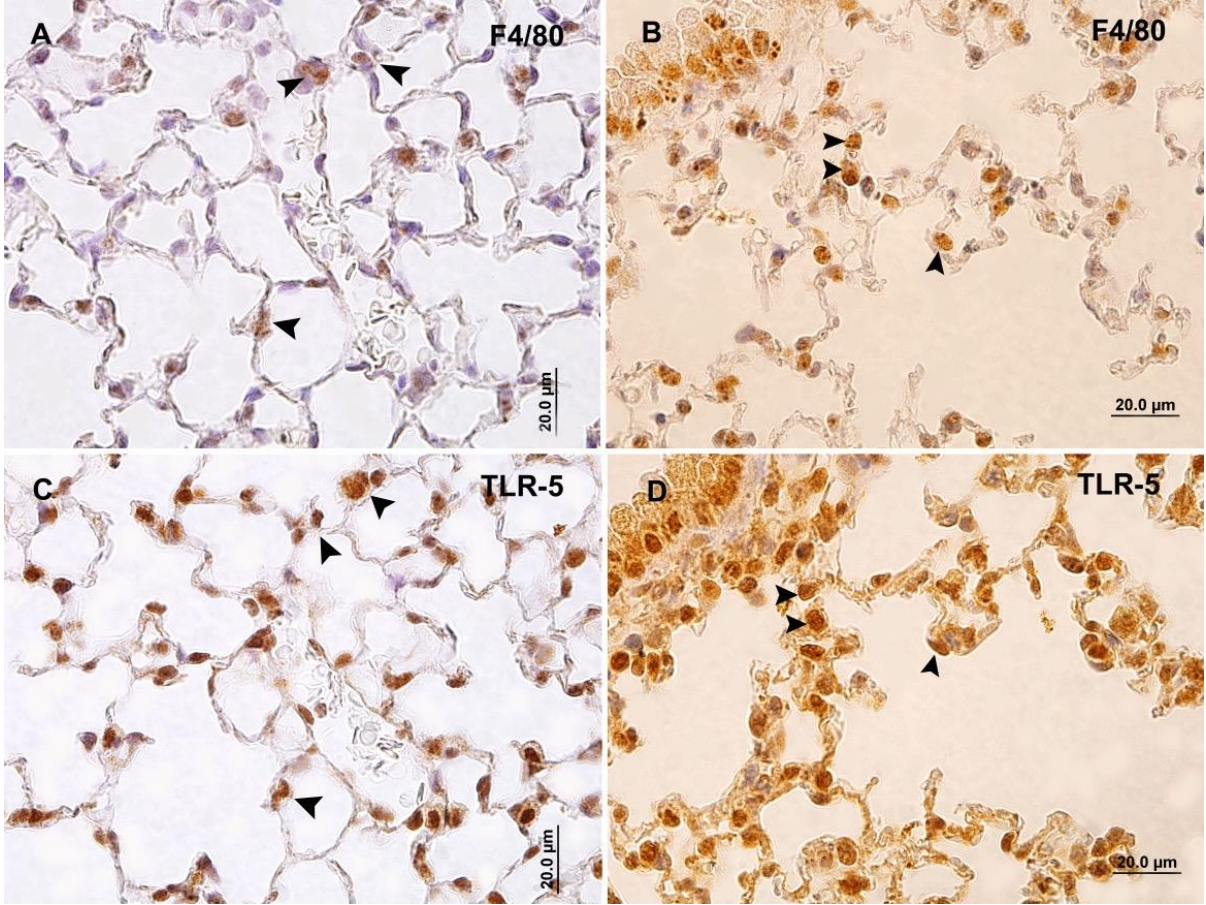




**Şekil 7.** Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu gösteren Clara hücrelerinin varlığı. A ve B kesitlerinde primer antikor olarak Clara hücre belirteci olan anti-Cloudin-10 primer antikor, 5 µm ara ile alınan ardışık C ve D kesitlerinde ise anti-Mouse TLR 5 primer antikor kullanılmıştır. İmmun pozitif hücrelerin saptanmasında 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir. TLR 5 ekspresyonunu gösteren bazı hücrelerin (C ve D ok başları) aynı zamanda cloudin-10 belirtecini de eksprese ettikleri (A ve B ok başları) görülmektedir.



**Şekil 8.** Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu gösteren Tip II hücrelerinin varlığı. A ve B kesitlerinde primer antikor olarak Tip II pnömosit hücre belirteci olan anti-SPC primer antikorunu, 5 µm ara ile alınan ardışık C ve D kesitlerinde ise anti-Mouse TLR 5 primer antikorunu kullanılmıştır. İmmun pozitif hücrelerin saptanmasında 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoksilen ile gerçekleştirilmiştir. TLR 5 ekspresyonunu gösteren bazı hücrelerin (C ve D ok başları) aynı zamanda SP-C belirtecini de eksprese ettikleri (A ve B ok başları) görülmektedir.

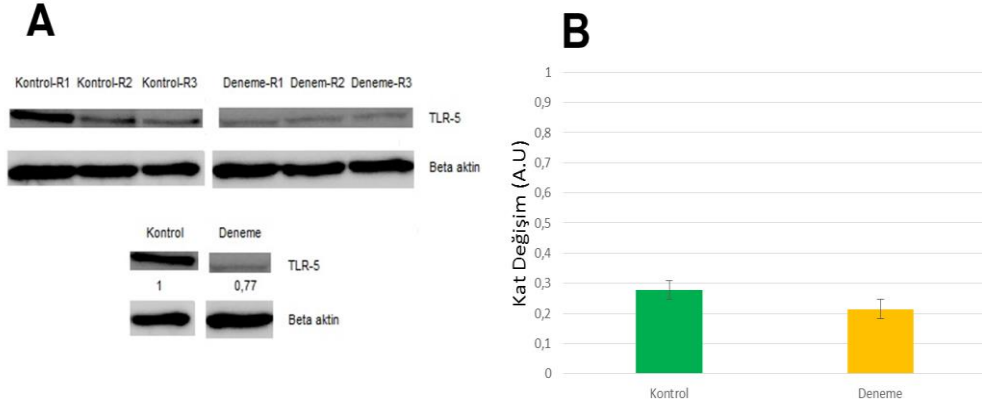


**Şekil 9.** Kontrol grubuna ait yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonu gösteren makrofajların varlığı. A ve B kesitlerinde bir makrofaj belirteci olan anti-F4/80 primer antikoru, 5 µm ara ile alınan ardışık C ve D kesitlerinde ise anti-Mouse TLR 5 primer antikoru kullanılmıştır. İmmun pozitif hücrelerin saptanmasında 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) kullanılmıştır. Hücre çekirdeklerinin boyanması Harris hematoxilen ile gerçekleştirilmiştir. TLR 5 ekspresyonunu gösteren bazı hücrelerin (C ve D ok başları) aynı zamanda SP-C belirtecini de eksprese ettikleri (A ve B ok başları) görülmektedir.

Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR 5 ekspresyonu saptanan immun pozitif hücrelerin karakterizasyonuna yönelik double-immunflöresan çalışmaları yapılmıştır. Aynı kesitler üzerinde anti-TLR 5 antikorunun yanı sıra clara, makrofaj ve Tip II pnömosit hücrelerinin belirteci olan primer antikorlar kullanılmıştır. Ancak, immunflöresan boyamalarda non-spesifik boyanmanın olduğu saptanmıştır.

### **4.3 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde TLR 5 Ekspresyonunun Western Blot Tekniğiyle Belirlenmesi**

Kontrol (Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3) ve Deneme gruplarında (Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) TLR 5 proteininin semi kantitatif analizlerini yapmak amacıyla western blot yöntemi kullanılmıştır. Yapılan analizler, tüm gruplarda TLR 5 proteinine ait olduğu düşünülen ve 110-120 kDa aralığında olan spesifik bir bandın varlığını göstermiştir. TLR 5 proteinin translasyonel düzeyde ekspresyon miktarını hesaplamak amacıyla, endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin proteini kullanılmış, normalizasyon işlemini takiben her bir grupta TLR 5 proteinine ait bant yoğunlukları hesaplanmıştır. Kontrol (Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3) ve Deneme (Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) gruplarına ait normalize edilmiş değerlerin (arbitrary Unit, au) ortalaması ve standart sapmaları sırasıyla  $0,28 \pm 0,09$  ve  $0,21 \pm 0,112$  olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen normalizasyon işlemleri sonucunda, Deneme grubunda TLR 5 ekspresyonunun Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 1,30 kat azaldığı belirlenmiştir. Yapılan istatistik analizler sonucunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 10.** Western blot yöntemiyle yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR 5 protein ekspresyonunun belirlenmesi. Western blot işlemi sonrası tüm gruplarda 110-120 kDa aralığında olan ve TLR-5 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 işleminden sonra yapılan hesaplamalar sonucunda, Deneme grubunun Kontrol grubuna göre 1.30 kat azaldığı görülmektedir (B). Kat değişim sonuçları Kontrol ve Deneme grupları için Arbitrary Unit (a.u.) cinsinden verilmiş olup, tüm biyolojik replikasyonlar için gerçekleştirilen normalizasyon işlemleri sonrasında elde edilen ortalama kat değişimi değerlerini ifade etmektedir

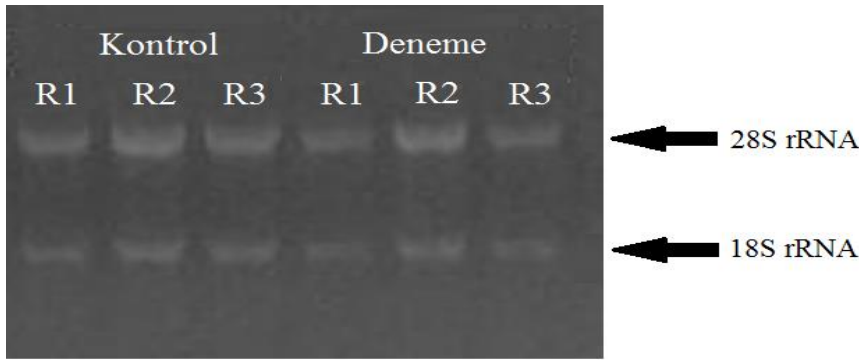
#### 4.4 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinden Elde Edilen Total RNA İzolasyonu

Yetişkin akciğer dokularından izole edilen total RNA örneklerinin miktar ve kalitelerini belirlemek amacıyla spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Her bir grupta elde edilen RNA konsantrasyonu,  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  ve  $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$  değerleri Tablo' da gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Tüm gruplara ait RNA örneklerinin konsantrasyon  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  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

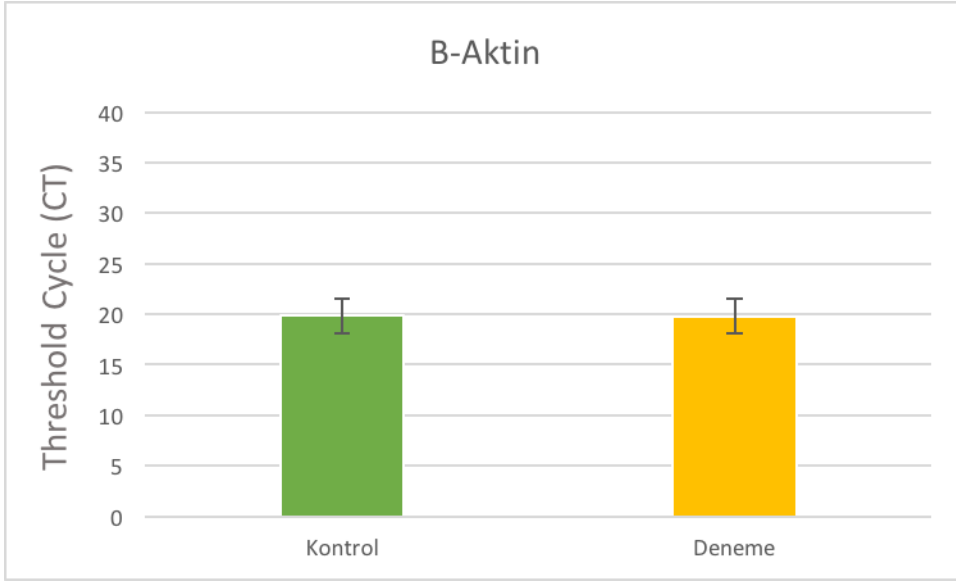
Spektrofotometrik ölçümlerin yanı sıra, total RNA örneklerinin bütünlüğünü koruyup korumadıklarını belirlemek amacıyla, total RNA örnekleri %1'lik denature agaroz jelde koşturulmuştur. Agoroz jelde görüntülenen tüm RNA örneklerine ait 28S ve 18S rRNA bantları saptanmış, her iki bantda da herhangi bir yıkımlanmanın olmadığı ve 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında olduğu tespit edilmiştir (Resim 1). Elde edilen sonuçlar, analiz edilen tüm RNA örneklerinde RNA moleküllerinin saflığını ve bütünlüğünü koruduğu belirlenmiştir.



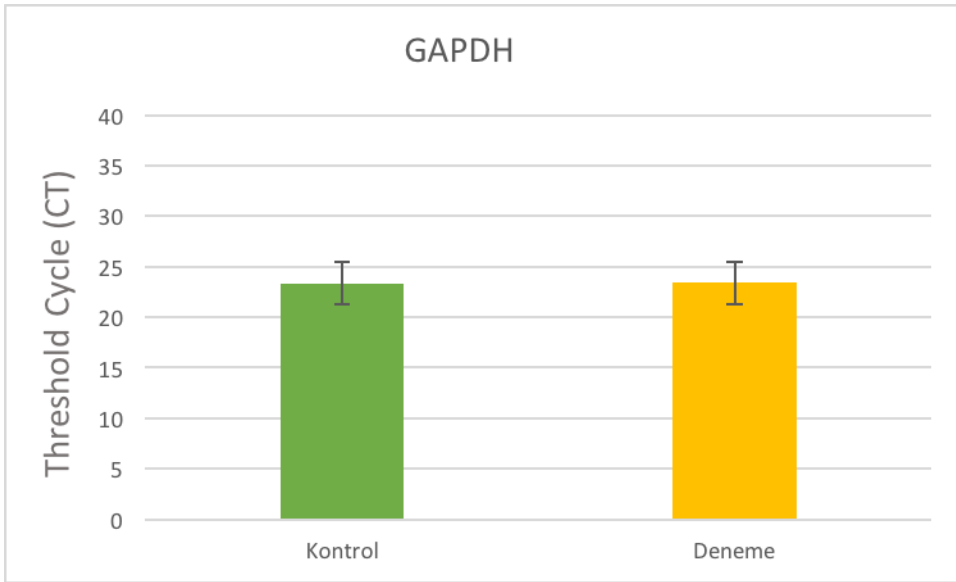
**Resim 1.** Kontrol (R1, R2, R3) ve Deneme (R1, R2, R3) gruplarında yetişkin akciğer dokularından izole edilen total RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bantları. Her örnekten elde edilerek, saflık ve konsantrasyonu belirlenen total RNA örneklerinin bütünlüğünün koruyup korumadığını belirlemek amacıyla her örnekten 1 µg total RNA %1'lik denature agaroz jelde koşturulmuştur. 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında bulunması total RNA örneklerinin bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir.

#### 4.5 Yetişkin Akciğer Doku Örneklerinde TLR 5 Ekspresyonunun Real-Time PCR Tekniğiyle Belirlenmesi

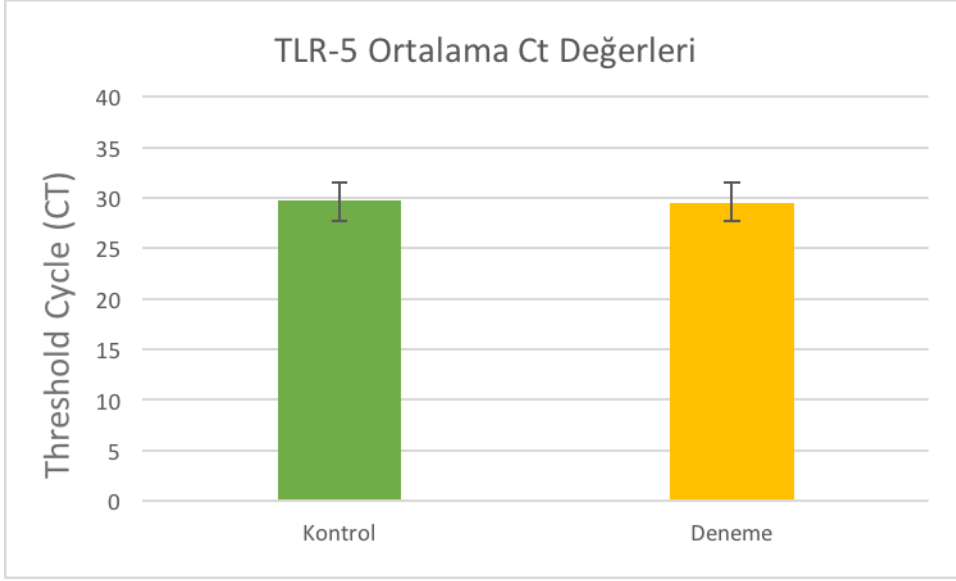
Yetişkin akciğer doku örneklerinde transkripsiyonel düzeyde TLR 5 ekspresyonunun qRT-PCR yöntemiyle belirlenmesine yönelik olarak kalitesi ve miktarları belirlenmiş olan total RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılmıştır. Real-time PCR metodu ile analiz edilen tüm örneklerde TLR 5 ve endojen kontrollerden β-aktin ve GAPDH genlerine ait Threshold Cycle (Ct) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, endojen kontrol genleri olarak kullanılan β-aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin tüm örneklerde birbirlerine yakın olduğunu ve buna bağlı olarak β-aktin ve GAPDH genlerinin gruplar arasında eşit miktarlarda ifade edildiklerini göstermiştir (Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13).



**Şekil 11.** Kontrol ve Deneme gruplarında  $\beta$ -aktin genine ait ortalama Ct değerleri

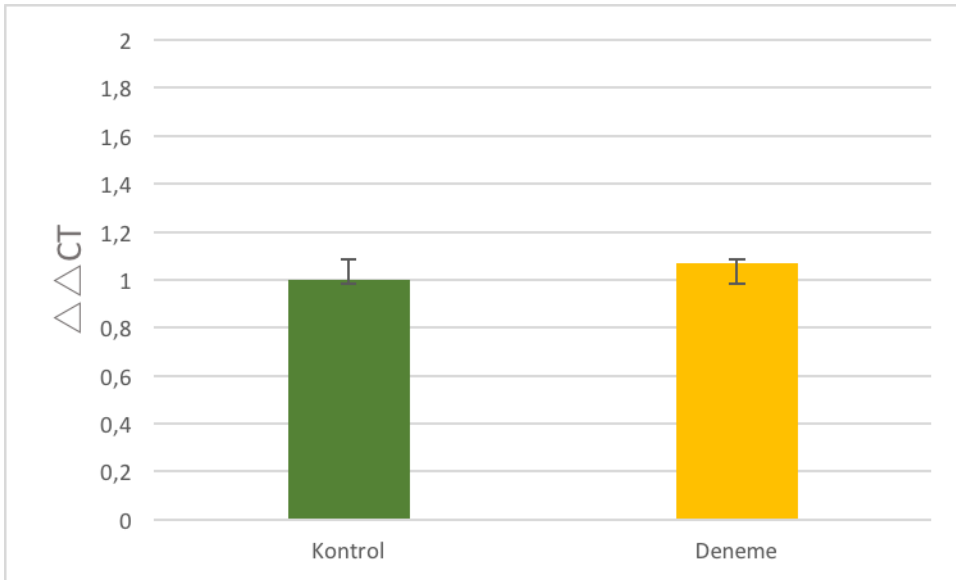


**Şekil 12.** Kontrol ve Deneme gruplarında GAPDH genine ait ortalama Ct değerleri.



**Şekil 13.** Deneme ve Kontrol gruplarında TLR 5 genine ait ortalama Ct değerleri

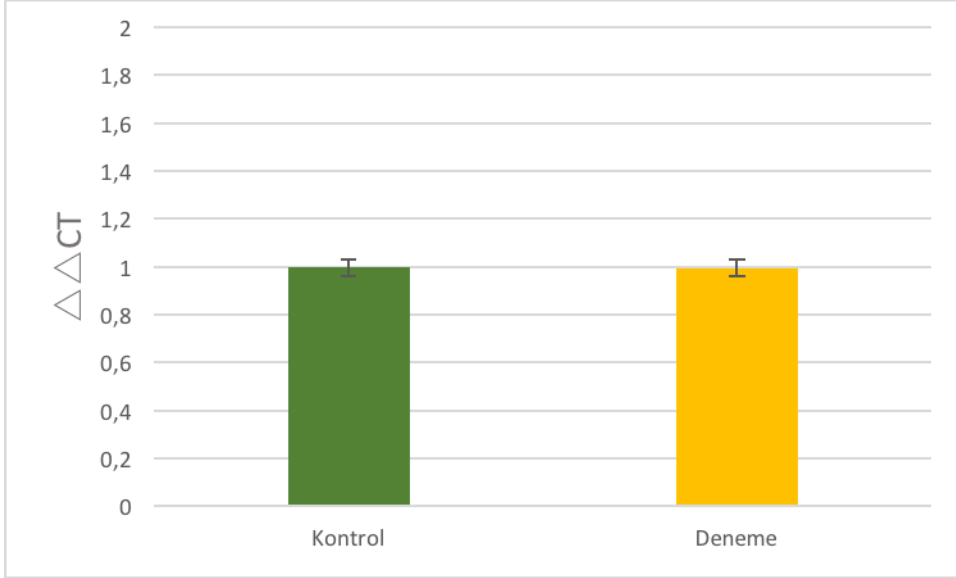
Elde edilen sonuçlar referans olarak  $\beta$ -aktin geninin kullanılması durumunda, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR 5'e ait mRNA düzeyinin 1,07 kat artığı saptanmıştır (Şekil 14). Yapılan istatistik analizler sonucunda bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,005$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 14.** Referans olarak  $\beta$ -aktin geninin kullanılması durumunda Kontrol grubuna ait TLR 5 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değerleri grafikte gösterilmiştir. Endojen referans olarak kullanılan  $\beta$ -aktin geni ile Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri normalize edilmiştir. Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta Ct$  metodu ile normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerleri hesaplanmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu "1" olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir.

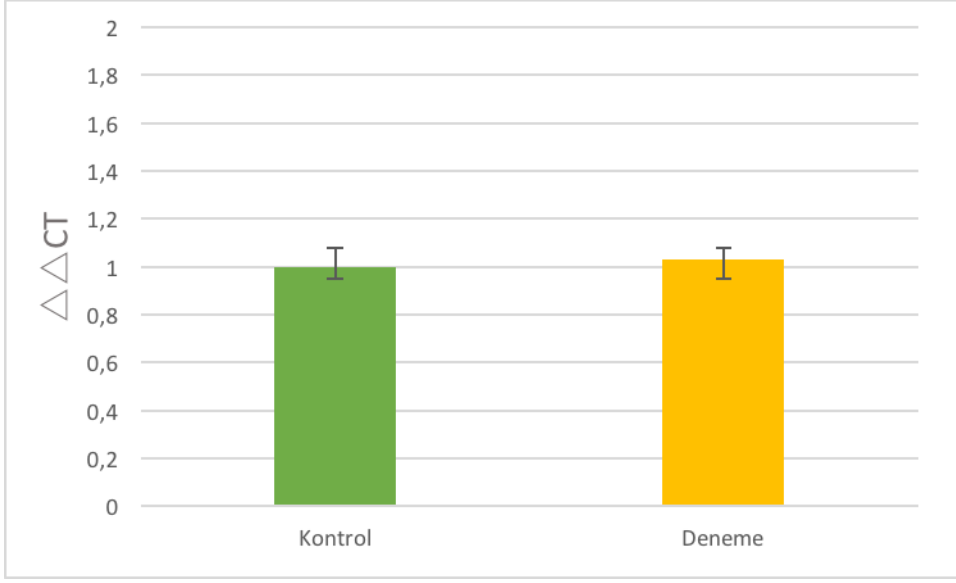


GABDH geni dikkate alınarak yapılan normalizasyon işlemine göre, elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR 5'e ait mRNA düzeyinin 1,01 kat araldığı görülmüştür (Şekil 15). Yapılan istatistik analizler sonucunda bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 15.** Referans olarak GAPDH geninin kullanılması durumunda Kontrol grubuna ait TLR 5 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değeri. Endojen referans olarak kullanılan GAPDH geni ile Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri normalize edilmiştir. Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta Ct$  metodu ile normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerleri hesaplanmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu '1' olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir.

Real-time PCR analizlerinde,  $\beta$ -aktin ve GABDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalaması alınarak yapılan normalizasyon işlemine göre, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR 5'e ait mRNA düzeyinin 1,03 kat arttığı görülmüştür (Şekil 16). Yapılan istatistik analizler sonucunda bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir.



**Şekil 16.**  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalamasının kullanılması durumunda Kontrol grubuna ait TLR 5 geninin Deneme grubuna göre kat değişim değeri. TLR 5 geni için Kontrol ve Deneme gruplarına ait Ct değerleri,  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalaması kullanılarak normalize edilmiştir. Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen  $\Delta\Delta Ct$  metodu ile normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerleri hesaplanmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu "1" olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Dünya genelinde, çiftlerin %8-12'sini etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunu olan infertilite, çiftlerin en az bir yıl süre ile korunmasız ilişkiye girmelerine rağmen gebe kalınmaması durumudur. Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren öncelikle hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda fertilizasyon işleminin *in vitro* olarak gerçekleştirilmesi mümkün olabilmıştır (Edwards, 2001). Tüp bebek ya da *in vitro* fertilizasyon (IVF) olarak adlandırılan bu yöntem, infertilite tedavisinde bir devrim niteliği taşımaktadır. Nitekim, İngiltere'de ilk tüp bebek olarak tarihe geçen Luis Brown'ın doğumuyla sonuçlanan öncü çalışmaları (Edwards ve Steptoe, 1978) nedeniyle Robert Edwards (1925-2013) 2010 yılında Fizyoloji/Tıp alanında Nobel ödülü ile onurlandırılmıştır (WEB\_2). Başlangıç aşamasında tüp bebek yöntemi ve embriyo transferi ile sınırlı kalan Üremeye Yardımcı tedavi yöntemleri zaman içerisinde tubal embriyo transferi (TET), intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), gamete intrafallopian transfer (GIFT), zigot intrafallopian transfer (ZIFT), *in vitro* fertilizasyon (IVF), embriyo dondurma ve pre-implantasyon genetik tanı (PGT) yöntemlerini de içerisine alacak şekilde gelişmiştir (Arora, 2014). ÜYTE uygulamaları kullanılarak dünyaya gelen çocukların gelişmiş ülkelerde nüfusun %1- 4'ünü oluşturduğu, tüm dünya genelinde ÜYTE uygulamaları ile doğan bebek sayısının yaklaşık olarak 6.5 milyona ulaştığı düşünülmektedir (Andersen ve ark, 2006; Feuer ve Rinaudo, 2017).

Bu veriler, ÜYTE uygulamalarının infertilite tedavisinde giderek artan bir oranda kullanıldığını ve toplumun önemli bir kesimini etkilediğini göstermesi açısından son derece önemlidir. Buna karşın, ovaryumda follikül gelişimini tetiklemek amacıyla zorunlu olarak uygulanan hormon tedavilerinin, elde edilen gametlerin ve embriyoların *in vitro* ortamda çeşitli manipülasyonlara maruz bırakılmasının ÜYTE uygulamaları ile dünyaya gelen çocukların sağlık durumları üzerinde her hangi bir olumsuz etkisinin olup olmadığını infertilite tedavisi gören çiftler ve konuyla ilgili bilim insanları tarafından sorgulanmaktadır (Sutcliffe ve Ludwig, 2007; Margaliot ve ark, 2006). Ne yazık ki elde edilen veriler, bu kaygının çok da yersiz olmadığını göstermektedir. Örneğin, Kuzey Finlandiya'da 1990-1995 yılları arasında gerçekleştirilen bir çalışma, IVF ile doğan çocukların spontan olarak dünyaya gelen çocuklara göre daha düşük doğum ağırlığına sahip olduklarını ve yaşamlarının ilk üç yılındaki gelişimlerinin daha geride olduğunu göstermektedir (Kouivurova ve ark, 2007).

Bunların yanı sıra IVF ile dünyaya gelen çocuklarda Serebral palsi ve epilepsi gibi nörolojik hastalıkların anlamlı olarak yükseldiği gözlemlenmiştir (Ericson ve ark, 2002). ÜYTE uygulamalarına bağlı olarak, embriyonik gelişim sürecinde ve davranışsal gelişimde son derece önemli işlevlere sahip olan ve imprinting özelliği gösteren genlerin etkilendiği düşünülmektedir. *Imprinting* özelliği gösteren genler, metilasyon durumuna bağlı olarak anne ya da babaya ait allellerden sadece bir tanesinin, monoallel olarak, eksprese edildiği genlerdir. Silver-Russell, Albright, Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann ve Wilms tümörü gibi pek çok hastalığın/sendromun, preimplantasyon gelişim sürecinde imprinting özelliği gösteren genlerin ekspresyonunda ortaya çıkan aksaklıklara bağlı olarak oluştuğu bilinmektedir (Ryke ve ark, 2002). Imprinting özelliği gösteren genlerin, otizim, bipolar affektif bozukluk ve şizofreni gibi diğer nöro-davranışsal bozukluklarda da rol oynadığı düşünülmektedir (Ryke ve ark, 2002). Prader-willi, Angelman sendromu, Beckwith-Wiedman sendromu ve otizim gibi hastalık/sendromların ÜYTE ile dünyaya gelen çocuklarda daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir (Debaun ve ark, 2003; Weksberg ve ark, 2003; Ludwig ve ark, 2005; Halliday ve ark, 2004; Fountain ve ark, 2015). Pek çok tüp bebek merkezinde anne adayına birden fazla embriyo transferi yapılması sonucunda ikiz, üçüz gibi çoğul gebeliklerin ortaya çıkma olasılığı artmakta ve bu duruma bağlı olarak prematüre doğum (37.haftadan önce gerçekleşen doğumlar) ve düşük doğum ağırlığı (bebeğin doğumda 2500 gramdan az olması durumu) riskinin arttığı görülmektedir (Kondapalli ve ark, 2013). Spontan olarak dünyaya gelen ikiz bebekler ile ÜYTE uygulamaları ile dünyaya gelen ikiz bebekler karşılaştırıldığı bir kohort çalışmasından (Zuppa ve ark, 2001) elde edilen veriler, ÜYTE yardımı ile dünyaya gelen ikizlerde solunum yolları hastalıkları insidansının spontan gebeliklere göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, yardımcı üreme teknikleri ile dünyaya gelen çocuklarda astım insidansının da arttığı bildirilmiştir (Carson ve ark, 2012).

Bu ve benzeri bulgular, ÜYTE ile dünyaya gelen bireylerin solunum sistemi enfeksiyonlara ve astıma karşı duyarlılığının artmış olabileceğini düşündürmektedir. Konuyla ilgili olarak, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Prof. Dr. Levent KARAGENÇ yürütücülüğünde gerçekleştirilmiş olan “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 veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi sonucu elde edilen farelerde fötüs ağırlığının önemli düzeyde azaldığını ve akciğer gelişiminin geri kaldığını göstermiştir. Bu durumun aynı zamanda, doğal bağışıklık sisteminin en önemli

unsurlarından birisini oluşturan Toll-benzeri reseptör (TLR) ekspresyonunda da da anlamlı değişikliklere neden olduğu saptanmıştır. İncelenen TLR'ler arasında, TLR 5 ekspresyon düzeyinin *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferiyle elde edilen fötuslarda anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Memeli hayvanlarda akciğer dokusu, solunum için hayati öneme sahip olan ve milyonlarca havayolunu içeren karmaşık bir dallanma yapısına sahiptir (Metzger ve ark, 2008). Gaz alışverişini gerçekleştiren ve buna bağlı olarak sürekli olarak dış ortama maruz kalan akciğer dokusu vücudun en geniş yüzey epitel alanına sahip olan bir organdır (Mason ve Nelson, 1992). Solunum yolu epitel yüzeyi çevresel kirleticiler, havadaki alergenler ve mikroorganizmalar gibi solunum yoluyla vücuda alınan maddelerin ilk temas noktasıdır (Bals ve Hiemstra, 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar, hava yolu epitel hücrelerinin sadece basit bir bariyer fonksiyonu sağlamakla kalmayıp aynı zamanda doğal bağışıklık sistemine aktif olarak katkı sağladığını göstermektedir (Diamond ve ark, 2000; Holgate ve ark, 2000).

Doğal bağışıklık sistemi, mikroorganizmalara karşı ilk korumayı sağlayarak, konağın kendisine ait olan veya olmayan antijenik yapıyı tanıma özelliğine sahip olan savunma sistemidir (Turul ve Ersoy, 2004; Medzhitov ve Janeway, 1997). Doğal bağışıklık sistemine ait kalıp tanıma reseptörleri (PRR), birçok patojen arasında korunmuş yapılar olan PAMP'ları tanırlar (Creagh ve O'Neill, 2006). Doğal bağışıklık sisteminin temel bileşenlerinden olan TLR'ler, memelilerde, bitkilerde ve böceklerde istilacı patojenlere karşı birincil bir savunma hattını oluşturmaktadırlar (Doyle ve O'Neill, 2006). TLR sinyal yolağında önemli bir rol oynadığı bildirilen TIR domaininin MyD88, TIRAP/MAL, TRIF ve TRAM adaptör proteinlerinden oluştuğu bildirilmektedir. Bu Adaptör proteinlerinin kendi aralarında sağladıkları farklı kombinasyonlar sonucunda, TLR'lerin birbirinden farklı ajanları tanıyarak, farklı tepkiler oluşturdıkları gösterilmiştir (Uematsu ve Akira, 2006).

TLR ailesinden biri olan TLR 5, bakteri flagellasının ana bileşeni olan flagellin proteinini tanıyarak, sinekler, bitkiler ve memeliler gibi çeşitli organizmalarda, bakteriyel flagelline karşı tepki oluştururlar (Hayashi ve ark, 2001). Memeli konakçıları, TLR 5 vasıtasıyla flagellin ailesinde evrimsel olarak korunan bir alana bağlanarak , immun yanıtı oluştururlar (Ramos ve ark, 2004). Farelerde yapılan bir çalışmada, *Legionella pneumophilla* bakterisinin alveolar makrofajlar tarafından tanınmasının TLR 5'e bağlı olarak gerçekleştiği ortaya konulmuştur (Hawn ve ark, 2003). Blohmke ve ark (2008)'nin yaptığı bir çalışmada ise TLR5- flagellin etkileşiminin inhibisyonu sonucunda, kistik fibrozis hastalarında solunum yolu epitel hücrelerince oluşturulan pro-inflamatuar yanıtın belirgin şekilde düştüğü gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, TLR 5 eksik farelerde yapılan çalışmada, metabolik sendrom

içerisinde gösterilen tip-2 diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklarda etkili olduğu gösterilmiştir (Vijay-Kumar, 2010). Cai ve ark (2011) yaptıkları çalışmada meme kanseri hücrelerini flagellinle uyarmış ve TLR 5 sinyal yolağını aktive etmişlerdir. Çalışmada elde ettikleri verilerde, Flagelli'in TLR 5 aktivasyonu sonucunda tümörün büyümesini önleyici aktiviteye sahip olduğunu ve insan göğüs kanseri tedavisi için yeni bir terapötik hedef olarak görev yapabileceğini, potansiyel antitümör aktivitelerini ortaya çıkarmak için doğuştan gelen bağışıklık tepkilerine aracılık ettiğini göstermişlerdir.

Sunulan tez çalışmasının amacı, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen yetişkin farelerin akciğer dokusunda TLR5 ekspresyonu üzerine etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, RT-PCR, immunohistokimya/immunoflüoresan ve western blot yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 proteinin ekspresyon profilini belirlemek amacıyla, immunohistokimya boyama tekniğinden yararlanılmıştır. Elde edilen veriler, TLR 5 proteininin yaygın olarak hava yolu epitel hücrelerinde, damar lümeninde, damar endotelinde, alveol duvarında ve bronşiyollerde eksprese edildiğini göstermiştir. Ayrıca TLR5'in, bağırsak epitel hücrelerinde, epitel hücrelerinde, monositlerde (Akira ve ark, 2006), makrofajlarda (Cho ve ark, 2011), lökositlerde ve dentrik hücrelerde (Suzuki ve ark, 2008) eksprese edildiği bildirilmiştir.

TLR 5 ekspresyonu saptanan immun pozitif hücrelerin karakterizasyonuna yönelik olarak öncelikle aynı kesitler üzerinde anti-TLR 5 antikorunun yanı sıra Clara, makrofaj ve Tip II pnömosit hücrelerinin belirteci olan spesifik primer antikorlar ile double-immunflüoresan çalışmaları yapılmıştır. Ancak, immunflüoresan boyamalarda spesifik bir boyanmanın olmadığı saptanmıştır. Bu sorunun giderilmesine yönelik olarak, 5 µm kalınlığında ardışık kesitler alınmış, ardışık kesitlerden birincisi TLR 5 primer antikoru, ikincisi ise makrofaj belirteci olan F4/80 primer antikoru, Clara hücre belirteci olan Cloudin-10 primer antikoru) ve Tip II pnömosit hücre belirteci olan SP-C primer antikorları ile eş zamanlı olarak boyanmışlardır. Elde edilen veriler, yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 proteininin Clara, Tip II pnömosit ve makrofaj hücreleri tarafından eksprese edildiğini göstermiştir. Yapmış olduğumuz literatür çalışmalarında, TLR 5'in Clara, Tip II pnömosit ve makrofaj hücreleri tarafından eksprese edildiğini gösteren bir bulguya rastlanmamıştır. Bu yönüyle elde edilen sonuçların, konuyla ilgili literatüre anlamlı ve özgün bir katkı sunma potansiyeli bulunmaktadır. Buna karşın, sonuçların her bir hücre tipi için double immunflüoresan ve/veya FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) yöntemleriyle doğrulanması gerekmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, Deneme ve Kontrol gruplarına ait yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR 5 ekspresyon düzeyini kantitatif olarak karşılaştırmak amacıyla qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Uygulanan yöntemde, endojen referans gen olarak  $\beta$ -aktin ve GAPDH genleri kullanılmıştır. qRT-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar, göre endojen referans olarak  $\beta$ -aktin geninin kullanılması durumunda Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR 5 mRNA düzeyinin 1,07 kat arttığı görülmüştür. Endojen referans olarak GAPDH geninin kullanılması durumunda ise, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda TLR 5'e ait mRNA düzeyinin 1,01 kat azaldığı görülmüştür. Elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırmaya yönelik olarak,  $\beta$ -aktin ve GAPDH genlerine ait Ct değerlerinin geometrik ortalamalarının kullanılması durumunda ise, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubuna ait akciğer dokularında TLR 5'e ait mRNA düzeyinin 1,03 kat arttığı saptanmıştır. Bütün durumlarda, gruplar arasındaki saptanan kat farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) göz önüne alındığında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen yetişkin farelerin akciğer dokularında TLR 5 ekspresyonunun değişmediği değerlendirilmektedir. Konuyla ilgili olarak gerçekleştirilmiş olan "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 veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi sonucu elde edilen fütüslara ait akciğer doku örneklerinde TLR 5 ekspresyonunun kontrol grubunu oluşturan fütüslar ile kıyaslandığında 2,30 kat azaldığını göstermiştir. Sunulan tez projesinden elde edilen veriler dikkate alındığında, fetal dönemde düşük olmasına karşın TLR 5 ekspresyonunun erişkin dönemde fizyolojik sınırlar içerisine ulaştığını göstermektedir.

Yapılan çalışmalar, TLR genleri de dâhil olmak üzere doğal bağışıklık sisteminde rol oynayan pek çok gene ait ekspresyon düzeyinin post-transkripsiyonel olarak düzenlendiğini ortaya koymaktadır (Carpenter ve ark, 2004). Bu durum dikkate alınarak, sunulan tez çalışmasında TLR 5'in transkripsiyonel düzeyde ekspresyonunu belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen qRT-PCR çalışmalarına ek olarak, TLR 5 proteinine ait ekspresyon düzeyinin semi-kantitatif olarak da değerlendirilmesi amacıyla western blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, TLR 5 proteinine ait ekspresyon düzeyinin, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda 1,30 kat azaldığını göstermiştir. İstatistiki olarak anlamlı olmamakla ( $p>0,05$ ) birlikte söz konusu azalmanın fonksiyonel sonuçlarının olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Sunulan tez çalışmasında kullanılan farelerin, TLR 5 reseptörünü aktive edebilme potansiyeline sahip bakteriyel/viral ajanlar ile enfekte olup olmadığı tespit edilmemiştir.

Dolayısıyla, ileride yapılabilir olan fonksiyonel çalışmaların TLR 5 reseptörünü aktive edebilme potansiyeline sahip bakteriyel/viral ajanlardan arı spesifik patojen free (SPF) hayvanlar ile yapılması konuyla ilgili daha aydınlatıcı verilerin elde edilmesinin yolunu açabilecektir.

TLR 5 reseptörüne ilgili ligandın bağlanması, NF-kB ve benzeri nükleer faktörler ile MyD88 adaptör molekülünü de içerisine alan son derece karmaşık bir sinyal yolağının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bir başka ifadeyle, ortaya çıkan immun yanıtın belirlenmesinde TLR 5'in tek başına belirleyici bir özelliğe sahip olamayabileceğinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Örneğin, insan bronşiyal epitelyal hücrelerinde *Brucella abortus* ile tetiklenmiş olan sinyal yollarında TLR 2, TLR 4 ve TLR 5'in işlevini anlamaya yönelik olarak yapılan bir çalışmada (Ventura ve ark, 2008), *Brucella abortus* ile enfekte epitel hücrelerinde TLR 2 ve TLR 4 ekspresyonunun arttığı (upregülasyon), TLR 5 ekspresyonunun ise değişmediği gösterilmiştir. *Brucella abortus* tarafından indüklenen ve akciğer epitel hücrelerince oluşturulan yangısal yanıtın oluşturulmasında, TLR 2 ve TLR 4'ün değil, TLR 5'in sorumlu olduğu göz önüne alındığında elde edilen sonuçlar son derece ilginçtir. Bu bulgulara benzer şekilde, sunulan tez çalışmasında TLR 5 ekspresyonunun değişmediği görülmektedir. Buna karşın, TLR 5'in herhangi bir ajan tarafından uyarılmasına bağlı olarak ortaya çıkacak olan yangısal yanıt açısından Kontrol ve Deneme gruplarında arasında herhangi bir farklılığın olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışmasında yetişkin akciğer doku örneklerinde TLR 5'in ekspresyonunun belirlenmesine yönelik olarak yapılan immunohistokimya çalışmalarından elde edilen veriler, TLR 5'in hava yolu epitel hücrelerinde, damar lümeninde, damar endotelinde, alveol duvarında ve bronşiyollerde yaygın olarak eksprese edildiğini ve Clara, makrofaj ve Tip II pnömosit hücrelerinin TLR 5 ekspresyonu gösteren immunpozitif hücreler arasında yer aldığını göstermiştir. Ayrıca, in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferiyle elde edilen yetişkin farelerin akciğer doku örneklerinde TLR 5 ekspresyonunun belirlenmesine yönelik olarak yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, Kontrol grubu ile kıyaslandığında TLR 5 ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde değişmediğini, buna karşın TLR 5 protein düzeyinde yaklaşık olarak 1,30 katlık bir azalmanın var olduğunu göstermektedir. Protein düzeyinde saptanan azalmanın TLR 5 aktivasyonu ile ortaya çıkan immun yanıtın şekillenmesinde herhangi bir azalmaya neden olup olmayacağını SPF hayvan modelleriyle yapılabilir olan fonksiyonel çalışmalar ile test edilmesi gerekmektedir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez projesi, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin yetişkin dönemde akciğerde TLR 5 ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmaya yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler, Kontrol ve Deneme gruplarına ait yetişkin akciğer dokularında TLR 5'in eksprese edildiğini göstermiştir. TLR 5 ekspresyon profilinin Kontrol ve Deneme gruplarında yapılan immunohistokimya analiz sonuçlarına göre benzer olduğu sunulan çalışmada gösterilmiştir. Sunulan tez projesinde, elde edilen veriler ışığında, Kontrol grubu ile Deneme grubu kıyaslandığında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer doku hücrelerinde TLR 5 ekspresyonu üzerine etkili olabileceğini düşünülmektedir. Mevcut literatürde, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 geninin ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu sebepten dolayı, yapılan tez çalışmasında elde edilen verilerin konu ile ilgili literatüre özgün bir katkı sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transfer işlemleri ile elde edilen yetişkin akciğer dokusunda TLR 5 ekspresyonunda ortaya çıkan değişimin immun sistemde herhangi bir fonksiyon değişikliğine neden olup olmadığının daha spesifik çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akira S, Takeda K, Kaisho T.** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2001, 2(8), 675-680.
- 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.
- Alukal JP, Lipshultz LI.** Safety of assisted reproduction assessed by risk of abnormalities in Children born after use of *in vitro* fertilization techniques. *Nature Clinical Practice Urology* 2008, 5, 140-150.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Bonneau R, Strong RK, Aderem A.** A conserved surface on toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(2), 393-403
- Andersen AN, Devroey P, Arce JC.** Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assesor-blind controlled trial, 2006, 21(12), 3217-3227.
- Arora S.** Clinical infertility and in vitro fertilization. *IVF Lit* 2014, 1(1), 46.
- Bals R, Hiemstra PS.** Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Journal*, 2004, 23, 327-333.
- Barton G, Kagan JC.** A cell biological view of toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9, 535-542
- 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.
- Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, Elias IM, Hancock DG, Lane CR, Davidson GF, Wilcox PG, Smith KD, Overhage SJ, Robert EW.** Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(11), 7764-7773.

- Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin- Cedequist A, Steirteghem AV, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG.** A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Human Reproduction*, 2005; 20(2): 413–19.
- Bowie A, O'Neill LA.** The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial product. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000, 67(4), 508-514.
- Cai Z, Sanchez A, Zhongcheng S, Zhang T, Liu M, Zhang D.** Activation off Toll-like Receptor on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Research*, 2011, 71(7), 2466-75.
- Calkins K, Devaskar MD.** Fetal origins of adulth disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Helth Care*, 2011, 41(6), 158-176.
- Cardoso WV, Lü J.** Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*, 2006, 133, 1611-1624.
- 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.
- Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA.** Post transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 14, 361-376.
- 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.
- Chaudhuri N, Sabroe I.** Basic science of the innate immune system and the lung. *Paediatric respiratory Reviews*, 2008, 9(4), 236-242.
- Cho HY, Choi EK, Lee SW, Kim KH, Park SJ, Lee CK.** All-trans retinoic acid induces TLR 5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell function in human THP-1 cells. *Immunology Letters* , 2011, 136 (1), 97-107.
- Cloonan YK, Holt VL, Goldberg J.** Male factor infertility: A twin study. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2007, 21(3), 229-234.
- Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L.** Transkription factors in Mouse lung development and function. *Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2001, 280(5), 823-38

- Creagh EM, O'Neill LAJ.** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends in Immunology*, 2006, 27(8), 352-357.
- Crossman GC.** A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion on the principles involved. *The Anatomical Record*, 1937, 69(1), 33-38.
- Cuadros C, Lopez-Hernandez FJ, Dominguez AL, McClelland M, Lustgarten J.** Flagellin Proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune response. *Infection and Immunity*, 2004, 72(5), 2810-2816.
- 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.
- Diamond G, Legarda D, Ryan LK.** The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunological Reviews*, 2000, 173(1), 27-38.
- Doyle SL, O'Neill LAJ.** Toll-like receptors: From the discovery of NF- $\kappa$ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 72(9), 1102-1113.
- Ericson A, Nygren KG, Olausson PO, Källén B.** Hospital care utilization of infants born after IVF. *Human Reproduction* 2002, 17(4), 929-932.
- Elder K, Dale, B.** In-vitro fertilization (2 nd ed). Cambridge University Press, Cambridge, 2000, 1-7.
- Edwards RG, Steptoe PC.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 1978, 381(9878), 366.
- Edwards RG.** The bumpy road to human in vitro fertilization. *Nature Med*, 2001, 7, 1091-4.
- 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.
- Fleming TP, Wilkins A, Mears A, Miller DJ, Thomas F, Ghassemifar MR, Fesenko I, Sheth B, Kwong WY, Eckert JJ.** Society for reproductive biology founders' lecture 2003. The making of an embryo: short-term goals and long-term implications. *Reproduction, fertility and Development*, 2004, 16(3), 1-13.
- 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.
- Fu-Shin XY, Hazlett LD.** Toll-like receptors and the eye. *Investigative ophthalmology and visual science* 2006, 47(4), 1255-1263.

**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.

**Gleiberman A, Burdelya L, Gudkov A.** Use of toll-like receptor agonist for treating cancer . United State Patent, 2016, Tittle number: 9376473.

**Gerwitz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madar JL. Cutting Edge:** Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce Epithelial proinflammatory gene expression. *The Journal of Immunology*, 2001, 167(4), 1882-1885.

**Gupta SK, Bajwa P, Deb R, Chellapa MM, Dey S.** Flagellin A Toll-Like Receptor 5 Agonist as an Adjuvant Chicken Vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2014, 21(3), 261-270.

**Güngör İ, Beji NK.** İnfertilite Hemşirelerinin Gelişen Roller ve Sertifi kasyon Gereksinimi. *Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi* 2015, 23(2), 152-159.

**Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor D J,** Bechwith-Wiedemann Syndrome and IVF: A Case-Control Study. *Am J Hum Genet.* 2004 sep;75(3):526-528.

**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.

**Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV** The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 1988, 52(2), 269-279.

**Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A.** A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198 (10), 1563.

**Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D.** Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, 162, 113-117.

- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.** The innate immun response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature*, 2001, 410, 1099-1103.
- Iwasaki A, Medzhitov R.** Regulation of immunity by the innate immun system. *Science*, 2010, 5963(327), 291-295.
- İnci A, Bişkin Z.** Toll like reseptörler ve protozoon enfeksiyonlarındaki rolleri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2007, 4(2), 121-128.
- Janaway CA, Medzhitow R.** Innate immun recognition. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20, 197-216.
- Kawai T, Akira S.** TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 2006, 13, 816-825.
- Kawai T, Akira S.** TLR signaling. *Seminars in Immunology*, 2007, 19(1), 24-32.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Krstic RV.** Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology. Springer-Verlag, Tokyo, 2013, 148-157.
- Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DCG, Monks BG, McKnight CJ, Lamphier MS, Duprex WP, Espevik T, Golenbock DT.** Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature Immunology*, 2007, 8, 772-779.

- 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.
- Lidegaard Ø, Pinborg A, Andersen AN.** Imprinting diseases and IVF: Danish national IVF cohort study. *Human Reproduction*, 2005, 20(4), 950-954
- Lightfoot T, Bunch K, Ansell P, Murphy M.** Ovulation induction, assisted conception and childhood cancer. *European Journal of Cancer*, 2005, 41(5), 715-724.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- McDermott PF, Clacci-Woolwine F, Snipes JA, Mizel SB.** High-affinity interaction between gram negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infection and Immunity*, 2000, 68, 5525-5529.
- McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT, Kilroy D, Lonergan P.** Respiratory System. *Veterinary Embryology*. John Wiley&sons,ltd, The Atrium southern gate, Chichester,West Sussex, UK, 2006, s 232-240.
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ.** The biology of Toll-like receptors. *Cytokine and growth factor reviews* 2000, 11(3), 219-232.
- Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN.** Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanism and relevance to disease. *Sage Journals*, 2006, 12(3), 133-150.
- Medzhitov R, Janeway CA.** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997, 9, 4-9.
- Medzhitov R, Janeway CA.** Innate immunity: The virtues of nonclonal system of recognition. *Cell*, 1997, 91(3), 295-298.

- Metzger R J, Klein O D, Martin G R, Krasnow M A.** The branching programme of Mouse lung development. *Nature*, 2008, 453, 745-750.
- Min JK, Breheny SA, MacLachlan V, Healy DL.** What is the most relevant standard of success assisted reproduction? The singleton, term gestation, live birth rate per cycle initiated: the BESST endpoint for assisted reproduction. *Human Reproduction*, 2004, 19(1), 3-7
- Morrissey EE, Hogan BLM.** Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental Cell*, 2010, 18(1), 8-23.
- Murty KGK, Deb A, Goonesekera S, Szabo C, Salzman AL.** Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and induce an inflammatory response *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, 279, 5667-5675.
- Nayak, PK, Mahapatra PC, Mallick JJ, Swain S, Mitra S, Sahoo J.** Role of diagnostic hystero-laparoscopy in evaluation of infertility: A retrospective study of 300 Patients. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2003, 6(1), 32-34.
- Olivennes F, Frydman R.** Friendly IVF: the way of the future?. *Human Reproduction*, 1998, 13(5), 1121-1124.
- Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC.** Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(11), 509-517.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R.** Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9, 57-63.
- Rawlis EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL.** The Id2<sup>+</sup> distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development*, 2009, 136, 3741-45.
- Ryke MD, Liebaers I, Steirteghem AV.** Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Human Reproduction*, 2002, 17(10), 2487-2494.
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S.** Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 2005, 11(6), 1087-1095.
- 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, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS.** Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *The New England Journal of Medicine*, 2002, 346, 731-737.
- Schieve LA, Cynthia F, Peterson HB, Maurizio M, Reynolds MA, Wright VC.** Perinatal outcome among singleton infants conceived through assisted reproductive technology in the United States. *Obstetrics & Gynecology*, 2004, 103(6), 1144-1153.
- Stephoe PC, Edwards RG.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978, 2:366.
- Sutcliffe AG, Ludwig M.** Outcome of assisted reproduction. *The Lancet* 2007, 370(9584), 351-359.
- Suzuki T, Chow CW, Downey GP.** Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40, 1348-1361.
- Stockhammer OW, Zakrzewska A, Hegedüs Z, Spaink HP, Meijer AH.** Transcriptome profiling and functional analyses of the Zebrafish embryonic innate immune response to *Salmonella* infection. *The Journal of Immunology*, 2009, 182(9), 5641-5653.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S.** Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 2003, 21, 335-376.
- Takeda K, Akira S.** TLR signaling pathways. *In Seminars in immunology* 2004, 16(1), 3-9.
- Turul T, Ersoy F.** Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: toll like reseptörler (TLR). *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004, 35, 114–118.
- Uematsu S, Akira S.** Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. In: Bauer S, Hartmann D (eds), *Toll-like receptors (TLRs) and innate immunity. Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008, 183.
- Ulrichs P, Peelman F, Beyaert R, Tavernier J.** MAPPIT analysis of TLR adaptor complexes. *FEBS letters* 2007, 581(4), 629-636.
- Uematsu S, Akira S.** Toll-like receptors and innate immunity, *Journal of Molecular Medicine*, 2006, 84(9), 712-725.
- Valanne S, Huan J, Rämetsä M.** The *Drosophila* Toll signaling pathway. *The Journal of Immunology*, 2011, 186(2), 649-656.
- Ventura GMC, Goffic RL, Balloy V, Plotkowski MC, Chingard M, Tahar MS.** TLR 5, but neither TLR 2 nor TLR 4, is involved in lung epithelial cell response to *Burkholderia cenocepacia*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 54(1), 37-44.

- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT.** Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-Like Receptor-5. *Science*, 2010, 5975(328), 228-231.
- Warburton D, El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, De Lange S, Kremp PJ, Riccardi D, Torday J, Bellusci S, Shi W, Lubkin SR, Jesudason E.** Lung organogenesis. *Current Topics in Development Biology*, 2010, 90, 73-158.
- Way SS, Thompson LJ, Lopes JE, Hajjar AM, Kollmann TR, Freitag NE, Wilson CB.** Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and innate immunity. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(3), 235-242.
- 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).
- WEB\_2. (2010).** Nobel Ödülleri. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2010/press.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2010/press.html)
- 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.
- Werling D, Jann OC, Offord V, Glass EJ, Coffey TJ.** Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends in Immunology*, 2009, 30(3), 124-130.
- Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE.** Alveolar surfactant homeostasis and pathogenesis of pulmonary disease. *Annual Review of medicine*, 2010, 61, 105-119.
- World Health Organization.** Infertility. Programme on maternal and child and family planning division of family health World health organization, Geneva, 1991.
- Yoon S, Kurnasov O, Natarajan, Hong M, Gudkov AV, Osterman AL, Wilson IA.** Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signalling. *Science*, 2012, 335(6070), 859-864.
- Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N.** Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Molecular Immunology*, 2014, 58(1), 66-76.
- Zuppa A Z, Maragliano G, Scapillati M E, Crescimbin B, Tortorolo G.** Neonatal outcome of spontaneous and assisted twin pregnancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2001, 95(1), 68-72.

## EKLER

### Ek 1. Araştırmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar

#### Tris-buffered saline (TBS) stok solüsyonu

- 0,2 M Trizma base (Sigma Aldrich), 24,23 g Tris, 1L distile suda çözdürülür.
- 0,1 M HCl (Merck), 8,5 ml konsantre HCl, 1L distile suda çözdürülür.
- % 0,9'luk fizyolojik tuzlu su, 9 g NaCl, 1L distile suda çözdürülür.

1L TBS (pH 7,6) hazırlamak için, stok solüsyonlardan sırası ile, 250 ml 0,2 M Tris çözeltisi, 375ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 375 ml % 0,9'luk fizyolojik tuzlu su çözeltisinden ilave edilir. Fizyolojik tuzlu su ilavesi yapılırken hacim 800 ml'ye ayarlanır. pH 7,6'ya ayarlandıktan sonra fizyolojik tuzlu su ile kalan hacim 1L'ye tamamlanır.

#### Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,4) solüsyonu

- 8 g NaCl (Sigma Aldrich)
- 0,2 g KCl (Sigma Aldrich)
- 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- 0,24 g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

800 ml distile suda çözdürülerek, pH değeri 7,4'e ayarlanır. Elde edilen solüsyonun volümü distile su ile 1L tamamlanır.

#### % 0,1'lik PBS-Tween-20 (PBT) solüsyonu

- 1ml Tween-20 (Merck)
- 1000 ml PBS

500 µl Tween-20, 1000 ml PBS içerisine eklenerek iyice karışana kadar karıştırılır. Oda sıcaklığında muhafaza edilebilir.

#### Sodyum Sitrat Buffer

10 mM tri-sodyum sitrat buffer hazırlamak için,

- 2,94 g tri-sodyum sitrat (Merc)
- 1000 ml distile su
- 0,5 ml Tween-20

2,94 g tri-sodyum sitrat, 800 ml distile suda çözdürülerek pH 6'ya ayarlanır. Daha sonra bu çözelti 1L'ye tamamlanır. 0,5 ml tween-20 çözeltiye eklenerek iyice karıştırılır. Oda sıcaklığında 3 ay ya da +4 C°'de daha uzun süre saklanabilir.

### **% 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu**

- 1 ml %30'luk stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merc)
- 9 ml PBS

1ml %30'luk stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alınarak üzeri PBS ile 10 ml tamamlandı.

### **3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Solüsyonu**

- 10 mg'luk DAB tableti (Sigma Aldrich)
- 16,6 ml TBS solüsyonu
- 10 µl % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

DAB tableti karanlık ortamda TBS solüsyonu içerisinde çözdürülerek filtre kağıdından geçirilerek süzdürülür. Oluşturulan çözeltilerden 990 µl alınarak ependorf tüplere aktarılır ve -20 C°'de muhafaza edilir. Gerekli olduğu zamanlarda çözdürülür ve kullanmadan önce üzerine 10 µl %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilir.

## **Ek 2. Üçlü (Triple) Boyama Solüsyonları**

### **Hematoksilen**

#### **Solüsyon A**

- 1 g hematoksilen kristal
- 100 ml %96 alkol

#### **Solüsyon B**

- 99 ml/95 ml distile su
- 1 g / 4 ml (sıvı ise) FeCL<sub>3</sub> (Merck)
- 1ml HCl

Solüsyon A ve solüsyon B hazırlandıktan sonra kullanılacak miktarın %50'sine solüsyon A, %50'si solüsyon B olacak şekilde her iki solüsyon birbirine karıştırılarak hazırlandı.

### **Metil Karbonat**

- 125 ml distile su
- 125 ml metanol
- Kullanılacak olan distile sudan biraz alınarak, çok az miktarda sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Merck) eritilir.

### **Asit Fuksin**

- 700 mg asit fuksin (Merck)
- 300 mg Orange G (Merck)
- 200 ml distile su
- 130 mg timol (Merck)
- 2 ml asetik asit (merck)

### **Fosfungustik Asit**

- 3 g fosfungustik asit (Fluka)
- 100 ml distile su

### **Aniline Blue**

- 2 g aniline blue (Carlo Erba)
- 100 ml distile su
- 2 ml asetik asit (Merck)

### **Asetik Asit**

- 2 ml glasiyal asetik asit (Merck)
- 100 ml distile su

## **Ek 3. Western Blot yönteminde kullanılan solüsyonlar**

### **Gerekli malzemeler**

- **Lower Buffer (Sperating Jel Buffer), pH 8.8**

18.15 gr Tris tartılarak, 40 ml deiyonize su içerisinde çözdürüldü. pH 8.8 olacak şekilde 1 Normal HCl (veya saf HCl) ile ayarlanarak üzerine %10'luk SDS'den 4ml eklendi (0,4 g SDS) ve çözelti hacmi deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan buffer +4 °C'de 30 gün boyunca saklanabilir.

- **Upper Buffer (Stacking Jel Buffer), pH 6.8**

6.05 gr Tris tartılarak 40 ml deiyonize su içinde çözdürüldü. 1M HCl (yada saf HCl) ile pH=6.8'e ayarlanarak üzerine %10'luk SDS'den 4ml eklendi (0,4 g SDS) ve çözelti hacmi deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan buffer +4 °C'de 30 gün boyunca saklanabilir.

- **%10'luk APS (amonyum-persülfat)**

0.1 gr toz APS tartılarak üzerine 1 ml deiyonize su eklendi. Hazırlanan çözelti +4 °C'de bir hafta saklanabilir.

- **TEMED**

Hazır bir solüsyondur, direk olarak kullanılır.

Bufferlar hazırlandıktan sonra jel tankı ayarlandı. Jel tankına jel tarağı konularak sperating jelin konulacağı kısım cam kalemi ile işaretlendi. Daha sonra %10'luk sperating jel hazırlandı.

- Sperating Jel hazırlamak için;

**Tablo 6.** Speratin jel hazırlamak için kullanılacak malzeme ve miktarları

Herbir hacim için hazırlanacak miktarlar								
Çözelti içeriği	5ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
<b>%6'lık Jel</b>								
Deiyonize Su	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Akril-bisakril	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
<b>%8'lik Jel</b>								
Deiyonize Su	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Akril-bisakril	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
<b>%10'luk Jel</b>								
Deiyonize Su	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Akril-bisakril	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
<b>%12'lik Jel</b>								
Deiyonize Su	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Akril-bisakril	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
<b>%15'lik Jel</b>								
Deiyonize Su	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Akril-bisakril	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Hazırlanan sperating jel tanka dökülerek jelin donması beklendi. Bu arada jelin üzerine izopropanol eklenerek hava kabarcıklarının oluşması engellendi. Daha sonra %5'lik Stacking jel hazırlandı.

- %5'lik Stacking Jel hazırlamak için;

**Tablo 7.** Stackin jel hazırlamak için kullanılacak malzeme ve miktarları

<b>Herbir hacim için hazırlanacak miktarlar</b>								
<b>Çözelti içeriği</b>	<b>1 ml</b>	<b>2 ml</b>	<b>3 ml</b>	<b>4 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>6 ml</b>	<b>8 ml</b>	<b>10 ml</b>
Deiyonize Su	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Akril-bisakril	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
%10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
%10Amonium persulfate	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Sperating jel donduktan sonra üzerindeki izopropanol alkol Watman No:1 filtre kağıdı ile çekildi. Hemen ardından jelin üst kısmı (stacking jel) döküldü ve tarak yerleştirilerek donması beklendi.

### **Örneklerin Hazırlanması**

- Örnek miktarları önceden hesaplanarak Laemli metoduna göre yükleme için hazır hale getirildi.
- Her örnekten gerekli miktarda alınarak üzeri eşit hacimde 2x Loading dye ile tamamlandı.

Daha sonra örnekler 10 dakika süre ile 65 °C'de denatüre edildiler.

### **Yürütme Tamponunun (Running Buffer, 5 L, 1X) hazırlanması**

- 15,125 g Tris
- 72 g glisin
- 50 ml %10'luk SDS

2000 ml distile su içerisinde katı bileşenler çözdürüldü ve üzerine 50 ml %10'luk SDS eklendi. Hazırlanan bu çözelti 5 L tamamlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir.

Stacking jeli donduktan sonra aparattan çıkarılarak elektroforezin yapılacağı tanka yerleştirildi. 1X elektroforez running buffer iç ve dış havuzcuklara döküldü. Bundan sonra tarak çıkarıldı ve örnekler kuyucuklara yüklendiler.

#### **Blotting Buffer (5 L, 1X) hazırlanışı**

- 15,125 g Tris
- 72 g glisin
- 1000 ml metanol
- 12,5 ml %10'luk SDS

2000 ml distile su içerisinde katı bileşenler çözdürüldü ve üzerine 12,5 ml %10'luk SDS ve 1000 ml metanol eklendi. Hazırlanan bu çözelti 5 L tamamlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan buffer +4 °C'de muhafaza edilir.

#### **Örneklerin Yüklmesi**

- Denatüre olan örnekler spin-santrifüj edilerek hava kabarcıklarının uzaklaştırılması sağlandı.
- İlk kuyucuğa Marker, diğer kuyucuklara ise örnekler yüklendi.
- Daha sonra örnekler 200 V, 50 mA'de 60 dakika yürütüldü.

#### **Proteinlerin membrana aktarılması**

- Membran, jel ile aynı boyutta kesilerek aktive olması için metanol içerisinde 5 dakika süre ile bekletildi.
- Metanol uzaklaştırılarak membran distile suda yıkandı.
- Blotlama aparatı (sandviçler) içerisinde blotting buffer bulunan bir kap içerisine konuldu.
- Hazırlanan sandviçlerin üzerine önce iki adet Watmann kâğıdı bunun üzerine jel, jelin üzerine ise membran koyuldu ve son olarak membran üzerinede iki adet daha Watmann kâğıdı koyuldu. Rulo yardımı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde düzeltildi.
- Sandviçler kitlenerek transfer cihazına yerleştirildi.
- Tankın içerisine ısınmayı engellemek amacı ile bir buz kalıbı yerleştirildi ve blotlama bufferi gerekli hizaya kadar konuldu. Tankın kapağı kapatılarak blotlama işlemi başlatıldı; Blotlama 100 V 350 mA'de 60 dakikada gerçekleştirilmiştir.
- Bu süre zarfında TBS-T hazırlandı.



- TBS-T hazırlanırken, 100 ml stok (10X) TBS'ten alınarak, 900ml deiyonize su eklendi 1000 µl Tween-20 eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

- Bloklama işlemi %5'lik taze hazırlanmış skim milk içinde yapıldı.

#### **%5'lik skim milk hazırlanması;**

- 5 gr skim milk tartılarak, 100 ml TBS-T içerisinde çözdürüldü.
- Süre bittikten sonra cihaz açılarak, membran TBS-ıslatılan plastik üzerine alındı. Protein bantlarını hızlı bir biçimde tespit edilmesi için Ponceau S boyası ile boyandı (Eğer kromojenik marker ile çalışılmış ise proteinlerin membrana geçip geçmediği zaten anlaşılır bu nedenle Ponceau S boyaması yapmaya gerek yoktur).

- Protein örnekleri daha sonra TBST ile boya uzaklaştırılana kadar yıkama yapıldı. Bloklama aşamasından itibaren işlemlere devam edildi.

- Membranlar plastik kap içerisine alınarak üzerlerine skim milk ilave edildi. Daha sonra 1 saat süre ile oda sıcaklığında shakerda inkübasyona bırakıldılar.

- Bu arada primer antikor hazırlandı. Bunun için %5'lik BSA tartılarak TBST içerisinde çözdürüldü. Primer antikor ( $\beta$  -aktin ) 1/5000 oranında BSA solüsyonunda hazırlandı.

- Süre dolduktan sonra membran 5 dakika süre ile 2-3 kez TBST ile yıkandıktan sonra plastik kaptaki bulunan primer antikor içerisine alındı. 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı.

- Primer antikor muamelesinden sonra 3 X 5 dakika süreyle TBST'de yıkama yapıldı.

- Yıkama aşamasından sonra, sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat süre ile shakerda inkübasyon yapıldı.

- Süre dolunca 3 X 5 dakika süreyle TBST'de yıkama yapıldı.

- Yıkama işleminden sonra görüntüleme cihazında HRP konjige ECL kullanılarak görüntü alınır. Membranın bu madde ile etkileşim süresi kullanılan primer antikora göre değişir, Membranı ECL ile en az bir dakika muamele etmek gerekir.

- Daha sonra bantların yoğunlukları hem incelenen faktör açısından hem de endojen kontrol için dansimetri programı ile ölçülür. Sonuçlar endojen kontrol ile normalize edilerek hesaplanır.

### Ek 3. c-DNA Sentezi ve materyalleri

Dikkat edilecek noktalar; çalışma steril kabinde yapılmalı, +4°C’de çalışılmalı (yada buz üzerinde), steril ve filtreli pipet uçları kullanılarak, mutlaka eldiven kullanılmalıdır. İyi bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta RNA ile çalışılmalıdır. RNA spektrofotometrik olarak ölçülerek saflık miktarı kontrol edilir. Ayrıca RNA çalışmaya uygun uzunlukta olmalı ve EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) yada SDS (Sodyumdodesilsülfat) gibi revers transkriptaz enzimini inhibe eden inhibitörleri içermemelidir.

### Gerekli materyaller

Tek zincirli cDNA sentezlemek amacıyla High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanılmıştır. Reaksiyon 40 µl total volümde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 8.** Kullanılan kite ait komponentler

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

- 1) İlk olarak yukarıdaki tabloda verildiği gibi 2X reverse Transkripsiyon Master Mix (20 µl) hazırlanmıştır.
- 2) Daha sonra 1X’lik karışım elde etmek amacıyla total RNA (20 µl=500 ng), hazırlanan 2X’lik bu karışıma eklenerek total volüm 40 µl olarak çalışılmıştır.
- 3) Karışım hızlı bir santrifüj edildikten sonra, bir Thermal Cycler’da reverse transkripsiyon gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 9.** Thermal Cyclus koşulları gösterilmiştir.

	1.Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4.Basamak
<b>Sıcaklık (°C)</b>	25	37	85	4
<b>Zaman (dakika)</b>	10	120	5	∞

5) Reaksiyon volümü 40 µl olarak ayarlanmıştır ve reaksiyon başlatılmıştır.

6) reaksiyon süresi dolduktan sonra cDNA örnekleri Q-RT Real Time PCR’da kullanılmak üzere, 1/1 oranında nuclease- free H<sub>2</sub>O ile dilüe edildikten sonra -20 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

#### **Ek 4. RT- PCR solüsyonları ve materyalleri**

##### **Gerekli Materyaller**

- Assay (TLR 5 geni)
- Master mix (2x)
- RNase/DNase free su
- c-DNA örneği (sample)
- 48’lik plate ve plate sealer
- Buz ve buzlu kalıplar
- Filtreli pipet uçları
- RNA pipetleri

Öncelikle çalışma steril kabinde yapılmalı, +4°C’de çalışılmalı (ya da buz üzerinde), steril ve filtreli pipet uçları kullanılmalı, mutlaka eldiven kullanılması gerekir.

TLR 5 assayi ve endojen kontroller ile birlikte toplam 3 assay için çalışma yapılacaktır. Bu amaçla her bir assay için ayrı ayrı mixler hazırlanmalıdır. Her bir kuyucukta 20’şer µ’lik total volümler ile çalışılacaktır;

**Tablo 10.** Bir adet örnek için gerekli volümler

<b>Materyaller</b>	<b>1 örneklilik volüm</b>
<b>Assay (TLR1-13)</b>	1 µl
<b>Master mix (2X)</b>	10 µl
<b>dh<sub>2</sub>O (DNase/RNase free su)</b>	7 µl
<b>Sample (c-DNA örneği)</b>	2 µl
<b>Total</b>	20 µl

- İlk olarak 500 µl'lik tüpler hazırlandı.
- 1) Assayler eritildikten sonra hızlı bir santrifüj edilerek tekrar buzun üzerine konulmuştur.
  - 2) Bu arada yazılan tüplere (mix hazırlama tüpleri), mixleri hazırlamak için her birine ilk önce DNase/RNase free su konulmuştur.
  - 3) İkinci olarak her bir tüpe master mix (UNG'li, 50 °C'de 2 dakikalık enzim aktivasyonu) eklenmiştir.
  - 4) Her bir assayden ayrı ayrı gerekli miktarlarda alınarak tüplere ilave edilmiştir. Her bir assay eklenince mixler pipete edilerek karışması sağlanmıştır.
  - 5) Mixler hazırlandıktan sonra yavaş bir vorteks ve hızlı bir santrifüj yapılarak (1500 rpmde 30 sn kadar) tekrar buzun üzerine alınmışlardır.
  - 6) Mixleri plate kuyucuklarına dağıtmak amacıyla, plate bir buz kalıbı üzerine konulan supportter üzerine konuldu ve mixler her bir kuyucuğa 18'er µl olarak dağıtılmışlardır.
  - 7) Son olarak da daha önceden hazırladığımız c-DNA örneklerinden 2'şer µl her bir örnek için ayrı ayrı plate konulmuşlardır.
  - 8) Daha sonra plate'in üzerini sealer ile düzgün bir biçimde kapatarak, sealerın hatlarını bir metal alet ile iyice belirlenmiştir. Kapandığından emin olduktan sonra, plate santrifüj ile plate hızlı bir santrifüj edilmiştir.

- 9) Q-RT-PCR cihazını çalıştırmak amacıyla önce bilgisayarı açılmıştır, ardından sırası ile cihaz ve programı açılmıştır.
- 10) Step One programını açtığımızda karşımıza çeşitli menüler çıkmaktadır, buradan advanced set up menüsü tıklanmıştır.
- 11) Ardından Experiment properties'den deney adı seçilerek örneklerin özelliklerini yazılmıştır.
- 12) Step-One Instrument (48 well) seçilerek, Quantitation-Comperative CT işaretlenmiştir ve Taqman Reagents'ı seçilmiştir (Sybergren ile çalışılıyorsa ayrıca include melt curve'i de seçmek gerekir, fakat burada gerekli değil). Altta yer alan Standart sekmesini tıklanmıştır.
- 13) Daha sonra plate için plate setup'a tıklanarak; Define Targets'dan genlerin isimlerini yazılmıştır. Hemen sonra Add New Sample kısmından örnek isimlerini eklenmiştir.
- 14) View plate layout'dan plate'i tanımlanmıştır. Yani girilen gen isimleri ve örnek isimlerini plate kuyucuklarında tanımlanmıştır.
- 15) Run'a tıklayarak run metoduna bakılmıştır; orada son kısımda okuma almak istenildiği için okuma sekmesini tıklanmıştır, yani aktif hale getirilmiştir.
- 16) Run setup da ayarladıktan sonra cihaza geçilerek plate yerleştirilmiştir ve cihazın kapağı kapatılarak çıt sesi duyulmuştur.
- 17) Run strart tıklanarak, sistem deneyimizi kaydetmiştir (Burada cihazın kalibresi bittiği için deneyi başlatmadan uyarı veriyor, kalibre değil devam etmek istiyor musunuz diye, evete tıklanmıştır) cihaz otomatik olarak kapağını yukarı çekmiştir ve deney başlatılmıştır.

# ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : BALGİR Didar Tuğçe  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Yenimahalle, 1991  
**Telefon** : 5424496560  
**E-mail** : didarblgr.91@gmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	ADU Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Halen
Lisans	Pamukkale Üniversitesi	2015

## BURSLAR ve ÖDÜLLER:

xxxx

## İŞ DENEYİMİ

xxx

## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

Xxx

### 2. PROJELER

2009-2015, Pamukkale Üniversitesi, Denizli

#### Lisans

Endüstriyel atık olarak melas ve peynir altı suyu tozunun *Bacillus licheniformis* (PAU5) ve *Bacillus pseudomycoides* (PAU9) bakterilerinin ekstraselüler polimerik madde (EPS) üretimi üzerine etkisi

### 3. BİLDİRİLER

#### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx

#### B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

xxx