

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**POSTNATAL GELİŞİM SÜRECİNDEKİ SIÇANLARIN AKCİĞERİNDE
TOLL-LIKE 2, 4, 5 VE 9 RESEPTÖR PROTEİNLERİNİN
LOKALİZASYONLARI VE EKSPRESYONLARI**

Proje No: TSA-11-3604

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. NARİN LİMAN
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Araştırmacının Adı Soyadı
Öğrt. Gör. Dr. EMEL ALAN
Yrd. Doç.Dr. Aydın ALAN
Tez öğrencisi Gökhan ŞENEN

ŞUBAT 2013

KAYSERİ

**POSTNATAL GELİŞİM SÜRECİNDEKİ SIÇANLARIN AKCİĞERİNDE
TOLL-LIKE 2, 4, 5 VE 9 RESEPTÖR PROTEİNLERİNİN
LOKALİZASYONLARI VE EKSPRESYONLARI
ÖZET**

Bu araştırma, patojenleri tanıyan reseptörler ailesine ait olan Toll-like reseptör 2, 4, 5 ve 9'un postnatal gelişim periyodunun neonatal evresi ile erişkin sıçan akciğerindeki yerleşimi ve ekspresyonlarında oluşabilecek değişiklikleri immunohistokimyasal ve western blot analizleri ile ortaya koymak amacıyla yapıldı. Çalışmada 40 adet neonatal dönemin 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerindeki yavru sıçanlar ile 5 adet erişkin sıçanlar kullanıldı. Doğum sonrası 1-3. günler sakkular, 5, 10 ve 15. günler ise alveolar periyod olarak tanımlandı. Sakkuler ve alveolar periyodlardaki sıçan akciğerinde TLR2, TLR5 ve TLR9'un membransel, sitoplazmik ve nüklear, TLR4'ün ise membransel lokalizasyon gösterdikleri belirlendi. Doğum sonrası birinci günden itibaren TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un akciğer dokusunda eksprese olduğu neonatal süreçte ekspresyonda herhangi bir değişikliğin bulunmadığı saptandı. Erişkin sıçanlardan alınan örneklerde ise TLR2, TLR5 ve TLR9 ekspresyonunda çok belirgin bir azalma gözlemlendi. Bununla birlikte, TLR4'ün akciğer lokalizasyonu ve ekspresyonlarında yaşa bağlı herhangi bir değişikliğin bulunmadığı tespit edildi. Sakkular ve alveolar evrelerdeki sıçanların akciğerlerinde sakkulus/alveol epitel hücrelerinde, bronşiyollerin epitelinde, fibroblastlar gibi interstisyel bağdoku hücrelerinin çekirdeklerinde, ayrıca kan damarı endoteli ile medya katmanlarında ve alveol duvarındaki kapillar damar endotellerinin çekirdekleri ile hücre membranlarında TLR2, TLR5 ve TLR9 için pozitif reaksiyon gözlemlendi. Oysa erişkin akciğerinde alveol duvarındaki ve interstisyumdaki bazı hücrelerinin çekirdeklerinde bu reseptörler için pozitif reaksiyon tespit edildi. TLR4'ün sakkulus ve alveol epiteli ile endotel hücrelerinin membranlarında, bronşiyol epitel hücrelerinin bazal sitoplazmaları ile apikal yüzeylerinde pozitif reaksiyon verdiği gözlemlendi. Sonuçlarımız sıçan akciğerinin postnatal döneme adaptasyonu için prenatal dönemde TLR'leri ile donatıldığını düşündürmektedir.

**THE EXPRESSION AND LOCALIZATION OF TOLL-LIKE RECEPTORS 2, 4, 5,
AND 9 IN RAT LUNG DURING THE POSTNATAL DEVELOPMENT PERIOD
ABSTRACT**

This study was conducted to demonstrate the possible changes in expression and localization of Toll-like receptors 2, 4, 5, and 9 belonging to pathogen recognition receptors family in rat lung during the neonatal stage of postnatal development period and adult using immunohistochemical and western blotting techniques. In this study, 40 neonatal rat at 1st, 3rd, 5th, 10th and 15th days of postnatal period and 5 adult rat were used. After birth, the 1st and 3rd days of neonatal stage is defined as saccular stage, whereas the 5th, 10th and 15th days is defined as alveolar stage. In rat lungs during the saccular and alveolar periods, it was determined that TLR2, TLR5 and TLR9 immunoreactivity exhibited membranous, cytoplasmic and nuclear localization, whereas TLR4 immunoreactivity showed membranous localization. Following the first day after birth, it was established that TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 signaling is expressed in the lung tissue and the absence of any change in the expressions of them during the neonatal period. In samples taken from adult rats, it was observed significant reduction of expressions of TLR2, TLR5 and TLR9. However, the localization and expressions TLR4 in the lung was not found any change with age.

In the rat lung of saccular and alveolar stage the nuclei and membranes of saccular/alveolar epithelium, bronchiolar epithelium and interstitial connective tissue cells as well as smooth muscle cells and endothelium of blood vessels and alveolar capillary endothelium exhibited for TLR2, TLR5 and TLR9 positive reaction. While in the adult rat lung, some cell nuclei in the alveolar epithelium and interstitial tissue were positive for these receptors. TLR4 immunoreactivity was found in the membranes of saccular and alveolar epithelial cells as well as endothelial cells and in the basal cytoplasm and apical surfaces of bronchiolar epithelial cells. Our results suggest that, for the adaptation to postnatal life, the rat lung was equipped by TLRs during the prenatal period.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK.....	2
ÖZET.....	3
ABSTRACT.....	4
İÇİNDEKİLER.....	5
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI.....	21
3.1.1 Doku Temini.....	21
3.1.2. İmmunohistokimya için doku hazırlanması.....	22
3.1.3. Western Blot tekniği için doku hazırlanması.....	22
3.1.3.1. Lizat hazırlama.....	22
3.1.3.2. Protein miktarının belirlenmesi.....	22
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	24
3.3. SDS-PAGE WESTERN BLOT PROTOKOLÜ.....	27
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	31
3.4.1. Western Blot Analizleri.....	31
3.4.2. Semikantitatif Değerlendirme.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Histolojik Bulgular.....	33
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	38
4.3. Western Blot Analizi.....	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
6. KAYNAKLAR.....	77

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğerler dış ortamla ilişkili olan geniş yüzeye sahip organlar sıralamasında gastrointestinal sistemden sonra ikinci sırada yer alırlar. Akciğerler solunum yoluyla çeşitli partiküller, mikrobiyel ajanlar ve alerjenlerle devamlı olarak temas halindedirler. Birçok mekanik ve immunolojik mekanizma akciğerlerin enfekte olmasını önler ve alveolar yapıları koruyarak gaz değişim birimlerinin steril kalmasını sağlar.

Doğumdan sonra canlının yaşaması akciğerin uterusdaki gelişimine, yani olgunlaşma derecesine bağlıdır. Prenatal dönemde yeni doğan akciğerinin gaz değişimi için plasentanın görevini devralmaya hazır olması gereklidir (Mortola, 2001) Bu nedenle doğum akciğer için kritik bir olaydır ve takiben erken postnatal dönem (neonatal dönem) de akciğer ve immun sistemin gelişiminin tamamlanması için dinamik bir periyottur. Birçok memelide neonatal dönemde akciğer alveolleri yetişkindeki sayıya henüz ulaşamadığından ve akciğerin doğal immun sistemleri yeterli olmadığından akciğer çevresel faktörlere karşı oldukça duyarlıdır (Finkelstein and Johnston 2004). Memelilerde erken postnatal gelişim sırasında akciğer savunma sistemlerinin tehlikede olduğunu gösteren pek çok kanıt vardır (Bakker et al. 1998; Bellanti and Zeligs 1995; Goldman et al. 2004; Jackson et al. 1988; Kojima et al. 1994; Coonrod et al. 1987; Kurland et al. 1988; Tasat et al. 2003; Weiss et al. 1986; Yeo et al. 1993; Zeidler and Kim 1985; Zink and Johnson 1984). Doğumdan sonra akciğerlerin patojenlere, alerjenlere ve toksik maddelere karşı adaptasyonu doğal ve kazanılmış immun sistem komplekslerinin indüklenmesiyle sağlanır (Chen et al. 2010). Yeni doğanlarda Th1 tip immun yanıt baskılanırken, Th2 tip immun yanıtın geliştiği ve TNF, IFN- α , IFN γ , IL-12, IL-1b gibi Th1 tip sitokinler azalırken IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-23 gibi Th2 tip sitokinlerin arttığı bilinmektedir. Ayrıca neonatal dönemde complement düzeylerinin düşük, lökosit ve makrofajların sayılarının az olduğu ve fonksiyonlarının bozulduğu, çoğu T hücrelerinin fenotip ve fonksiyonlarının yetersiz olduğu, immunoregulator sitokin ekspresyonunun zayıf

olduğu belirtilmektedir (Kollmann et al. 2009; Levy et al. 2004).

Omurgalılarda doğal immün yanıt patojenlere karşı savunmanın ilk basamağıdır. Patojenlerin tanınması, alınması ve işlenmesiyle görevli olan doğal immün yanıtın en önemli bileşenleri Patojen tanıyan reseptörler (Pathogen Recognition Receptor, PRR)'dir. Patojen tanıyan reseptörler tarafından tanınan mikroorganizmalara özgün olan moleküller“ise patojenle ilişkili moleküler yapılar (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP)” olarak adlandırılırlar. Bakteriyal karbonhidratlar (örneğin lipopolisakkaritler veya LPS) mannoz, nükleik asitler (örn. bakteriyal ya da viral DNA veya RNA), peptidoglikanlar, lipoproteoik asitler, N-formilmetiyonin, lipoproteinler ve fungal glukanlar bu molekülleri teşkil ederler. Akciğerde patojen tanıyan reseptör olarak surfaktan proteinler (SP-A ve SP-D) ve Toll-like reseptörler bulunur (Medzhitov and Janeway, 2000). SP-A ve SP-D proteinleri akciğer alveollerinde pnömosit II'ler tarafından, TLR ise antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilirler (Awasthi et al. 2001). TLR'ler farklı patojenlere karşı doğal immün yanıtı başlatan anahtar moleküllerdir (Underhill and Ozinsky, 2002). Bu reseptörler ayrıca enfeksiyona karşı kazanılmış immün yanıtı da düzenlerler (Pasare and Medzhitov, 2004). Toll-like reseptörler (TLR) bakteriyal, fungal ve viral patojenler tarafından üretilen PAMP'ları tanıma yeteneğinde olan transmembran proteinlerdir. TLR'in fonksiyonu mikroorganizmaların varlığında immün sistemi uyarmak, immün sistem hücrelerinin antimikrobiyal öldürme mekanizmalarını ve antijen sunma kapasitelerini artırmaktır (Takeda, et al. 2003, Pandey and Agrawal, 2006).

TLR nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, dentritik hücreler, dermal endotel hücreleri, mast hücreleri ve mukoza epitel hücreleri gibi konakçı savunmasında birincil fonksiyona sahip olan hücrelerde bulunurlar (Muzio et al. 2000; Underhill, 2003). Bu hücreler endotoksin, peptidoglikan, flagellin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyal komponentleri TLR aracılığıyla tanırırlar. (Underhill and Ozinsky, 2002; Takeda, et al. 2003). TLR ekspresyonu sadece bu hücre tipleri ile sınırlı değildir; adrenal bez, testis, timus, karaciğer, dalak gibi organların

yanısıra gastrointestinal sistem, trakeya ve akciğer gibi dış ortamlarla ilişkili olan dokularda da yüksek miktarlarda ekspresedirler (Zarembek and Godowski, 2002).

TLR proteinlerinin insan ve memeli hayvanların akciğerlerinde lokalize olduğu ve çeşitli akciğer hastalıklarında akciğer ile ilişkili immün yanıtların oluşturulmasında rol oynadığı bilinmektedir (Janardhan et al. 2006; Maris et al. 2006; Muir et al. Petrikin et al. 2010; Schneberger et al. 2009; Schneberger et al. 2011; Sethi et al. 2011; Suri et al. 2006; Sukkar et al. 2006; Wassef et al. 2004). TLR arasında TLR2, TLR4 ve TLR5 en çok incelenen reseptörler olup bunların akciğer dokusundaki ekspresyonları farklılıklar göstermektedir. TLR'inden TLR2 mRNA ve proteininin insan akciğerinde alveol epitel hücrelerinden pnömosit II ve alveolar makrofajlarda eksprese olduğu rapor edilmektedir(Droemann et al. 2003). Bazal şartlar altında TLR8 ve TLR9 hariç TLR1-10 mRNA'larının hava yolu düz kas hücrelerinde eksprese olduğu, yine bazal şartlarda TLR4'ün mRNA ekspresyonunun diğerk TLR'ne göre oldukça düşük düzeyde olduğu, stimule edildiğinde de TLR2 ve TLR3'ün düzeylerinden düşük olduğu, TLR8 ve TLR9 ekspresyonlarının ancak Tümör nekrotik faktör alfa (TNF- α) tarafından artırıldığı bildirilmektedir (Sukkar et al. 2006). Ayrıca bazal şartlardaki hava yolu düz kas hücrelerinde, sadece TLR2 ve TLR3 proteininin eksprese olduğu (Berndt et al. 2007; 2006; Basu and Fenton, 2004; Chaudhuri, et al. 2005; 2007; Janardhan 2006; Wassef et al. 2004; Suri et al. 2006; Sukkar et al. Wassef et al. 2004) belirtilmektedir. Akciğerde TLR'lerinden TLR5'in predominant olarak pulmonar ve alveolar epitel hücrelerinde eksprese olduğu (Sha et al. 2004) ve flagella stimulasyonundan sonra epitel hücrelerinin özellikle apikal yüzeyine yerleştikleri (Adamo et al. 2004) bilinmektedir. Ayrıca TLR5'in kistik fibrozisli akciğer dokusunda yangının azaltılmasında antienflamatuvar etkinliğinin olduğu ileri sürölmektedir (Blohmke et al. 2008). TLR'lerinden TLR9 da akciğerde alveolar makrofajlar, pulmonar intravaskular makrofajlar, nötrofil granülositler bronşiyal epitel hücreleri, pnömosit II'ler gibi birçok hücre tipinde eksprese olmaktadır (Bhan

et al. 2008; Hoppstadter et al.2010;Schneberger et al. 2009; 2011).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğu erişkin hayvan modellerinde akciğerde TLR'nin rollerinin keşfine odaklanmıştır. Fötal gelişim sürecinde TLR'nin fonksiyonu ise henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Fare ((Harju et al. 2001), koyun (Meyerholz et al. 2006), insan (Petrikin et al. 2010) ve Habeş maymunu (Awasthi et al. 2008) fötüslerinde yapılan çalışmalar akciğerde TLR'lerin ekspresyonlarının gebelik yaşına bağlı olduğunu ve doğum öncesi respiratorik enfeksiyona bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bununla birlikte postnatal gelişim sürecinde akciğerlerde TLR ekspresyonuna ilişkin herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Tüm bu bilgiler birlikte ele alındığında yeni doğanların akciğerinde TLR proteinlerinin ekspresyonlarının postnatal yaşa bağlı olarak değişebileceği hipotezi akla gelmektedir.

Bu çalışmanın amacı immunolojik fonksiyonların henüz gelişimlerini tamamlamadığı periyod olan neonatal dönemdeki sıçanların akciğerlerinde TLR'lerinden TLR2, TLR4 ve TLR5 ve TLR9'un lokalizasyonları ile ekspresyonlarındaki olası değişikliklerin belirlenerek postnatal süreçte adaptasyonda pulmonar savunma sisteminde hangi TLR proteininin etkin olduğunu ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Doğumdan sonra yeni doğanın yaşaması akciğerin uterusdaki gelişimine, yani olgunlaşma derecesine bağlıdır. Dolayısıyla doğum sonrası gaz değişimini sağlamak üzere yeni doğan akciğerinin plasentanın görevini üstelenmesi için prenatal dönemde hazır olması gereklidir (Mortola, 2001). Placenta prenatal dönemde fötüsün oksijen gereksinimini sağlamakla görevlidir. Placentadaki gaz değişimi akciğerdekinden daha az etkindir. Çünkü placentada minimum difüzyon aralığı daha büyüktür ve kan-kan bariyerinin geçirgenliği akciğerdeki kan-gaz bariyerinin geçirgenliğinden daha azdır (Carter, 2009). Doğum, akciğer için kritik bir olay olmasına rağmen, akciğerin olgunlaşması (maturasyonu) insanlarda (Burri, 1984), sıçanda (Bakker et al. 1998; Buri, 1974; Burri et al. 1974; Randell et al. 1989; Scheuermann et al. 1988) ve çoğu hayvanda (Jackson et al. 1988; Weiss et al. 1986) doğumdan sonra tamamlanır. Memelilerde akciğer gelişimi embriyonik, psöydoglanduler, kanaliküler, sakküler ve alveoler evre olmak üzere beş aşamada gerçekleşir (Tschanz, 2007). Sakkuluslardan alveollerin şekillendiği alveoler evrede görülen morfolojik değişiklikler postnatal süreçte meydana gelir (Barlett, 1970). İnsanlarda doğumda akciğer işlevsel olmasına rağmen, erişkin akciğerinde gaz alış-verişinin birimleri olan alveoller yapısal olarak olgunlaşmamıştır. Kalın ve çift kapılar ağ içeren ilkel septumlarla ayrılan alveolar keseciklerden oluşan sakkulus alveolarisler düzgün duvarlıdır. Gebeliğin 36. haftasından doğumdan sonrası 36. aya kadar olan süreç akciğer gelişiminin alveolar evresi olarak tanımlanır ve bu evrede gaz değişim yüzeyi büyük ölçüde artar (Burri, 1984). Yeni doğan sıçanlarda alveol yapısı bulunmaz. Sıçanlar düzgün duvarlı hava kanalları ve kalın sığ olan sakkuluslar ile nefes alırlar. Postnatal yaşamın ilk 4 günü içerisinde birkaç morfolojik değişiklik meydana gelir. Postnatal yaşamın 4.- 7. günleri arasında kalın duvarlı sekonder septumların aniden proliferer oldukları görülür. Bu sekonder septumlar primer septumlarda olduğu gibi çift kapılar sistemine sahiptirler. Dolayısıyla sıçanlarda alveol oluşumu doğumdan sonraki 4-10 günler arasında gerçekleşir ve

bu dönem insanlarda olduğu gibi gaz değişim yüzeyinin artmasıyla sonuçlanır (Weibel, 1967). Gaz değişim yüzeyinin artması 13. güne kadar devam eder. Postnatal 10. günden sonra bronşiyoller görülmeye başlar ve 13. günden 21. güne kadar olan dönemde sekonder septumlar uzayarak inceler. Bunlar içindeki çift kapılar ağ sistemi tek kapılar ağa dönüşür. Bu değişiklikler akciğer hacmindeki artışla beraber seyreder. Fakat interstisyum dahil toplam doku hacminin yoğunluğu azalır. Böylece sıçanda doğum sonrası akciğer gelişiminin dramatik aşaması sona erer (Burri, 1974; Burri et al. 1974; Randell et al. 1989; Scheuermann et al. 1988).

Akciğerler dış ortamla ilişkili olan geniş yüzeye sahip organlar sıralamasında gastrointestinal sistemden sonra ikinci sırada yer alır. Akciğerler solunum yoluyla çeşitli partiküller, mikrobiyel ajanlar ve alerjenlerle devamlı olarak temas halindedirler. Birçok mekanik ve immunolojik mekanizma akciğerlerin enfekte olmasını önler ve alveolar yapıları koruyarak gaz değişim birimlerinin steril kalmasını sağlar.

Birçok memelide erken postnatal dönemde akciğer alveolleri yetişkindeki sayıya henüz ulaşmadığından ve akciğerin hücresel savunma sistemi yeterli olmadığından akciğer çevresel faktörlere karşı oldukça duyarlıdır (Finkelstein and Johnston, 2004). Mukozal bağışıklık sisteminin olgunlaşması ve koruyucu bağışıklık kurulması bireyler arasında değişmekle birlikte gebelik süresi ne olursa olsun genellikle yaşamın ilk yılında tamamlanır (Gleeson and Cripps, 2004).

Memelilerde mukozal yüzeylerin ana fonksiyonu konakçı ve dış çevre arasındaki aktif iletişimi sağlamaktır. İntrauterin (prenatal) periyod sırasında gelişen fötüs bir taraftan amniyon sıvısını yutarken, diğer taraftan da atıklarını bu sıvıya boşaltır. Bu nedenle amniyon sıvısının bileşimindeki hücresel ve çözünür halde bulunan bileşenleri fötüsün gastrointestinal, respiratorik ve üriner sistemine ait olan salgı ürünlerinin bir yansımasıdır. Doğumdan önceki ve doğumdan hemen sonraki periyod sırasında mukozal yüzeyler başta maternal genital

kanal olmak üzere, takiben dış mikrobiyal flora, besinlerdeki antijenler ve bir dizi diğer çevresel makromoleküllere maruz kalırlar. Postnatal yaşamın ilk birkaç haftası içinde yeni doğanın karşılaştığı mikrobiyal floranın kalitatif ve kantitatif yapısı mukozal ve sistemik immunolojik homeostazisin sağlanmasında kritik bir rol oynar. Yeni doğanlarda mukozal savunma, mukozal yüzeylerin anatomik bütünlüğü ve bir çok non-spesifik bariyerler ile doğal ve kazanılmış immun yanıtları içerir. Mukozal immun savunmanın fonksiyonel olgunluğu postnatal çevreye maruz kaldıktan sonra artar. Mukozal bariyerlerin fonksiyonel olgunluğunu etkileyen faktörler arasında yeni doğanın gebelik yaşı, genetik etmenler, mukozal epitelin bütünlüğü, nöropeptidler, müsin, trefoil faktörler, defensinler ve konakçı tarafından indüklenen koruyucu peptidler bulunur (Levy, 2007) Bu komponentler doğal ve kazanılmış immun fonksiyonların özgün mekanizmalarının gelişimiyle tamamlanır (Medzhitov and Janeway 2000). Doğal mukozal immunitenin önemli bir aşaması olan potansiyel patojenik mikroorganizmaların tanınması, Toll-like reseptörlerini (TLR) de içine alan patojenleri tanıyan reseptörler (Pathogen Recognition Receptor, PRR) olarak bilinen hücrel reseptörler sınıfının önemli bir fonksiyonudur. Konakçıya ait olan bu hücrel reseptörler eşsiz ve korunmuş patojenler ile diğer mikroplarla ilişkili moleküler yapıları (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP) tanımak üzere tasarlanmışlardır (Armant and Fenton, 2002).

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

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

İnsanlarda 11 adet TLR tipi tanımlanmıştır ve bu reseptörler koyun hariç fare, tavuk, domuz, sığır, kedi ve köpek gibi çeşitli türlerde klonlanmıştır. TLR1-9 fare ve insanda homolog olduğu halde, insan genomu TLR10'a sahiptir, fakat TLR11, 12 ve 13 bulunmaz. Oysa fare genomu TLR11, 12 ve 13'e sahiptir, ancak TLR10 içermez (Armant and Fenton, 2002). Bakteriyal ve diğer mikrobiyal hücre duvarı komponentlerini tanıyan TLR1, 2, 4, 5 ve 6 ve 10 hücre yüzeyinde bulunurken, bakteri ve virusların nükleotid komponentlerini tanıyan TLR3, 7, 8 ve 9 sitoplazmik organellerde özellikle de endozomlarda intrasellüler olarak bulunur (Dunne and O'Neill 2005). TLR nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, dentritik hücreler, dermal endotel hücreleri, mast hücreleri ve mukoza epitel hücrelerini içine alan konakçı savunmasında birincil fonksiyona sahip olan hücrelerde bulunurlar (Muzio et al. 2000; Underhill 2003). Bu hücreler endotoksin, peptidoglikan, flagellin ve lipopolisakkarit gibi bakteriyal komponentleri TLR aracılığıyla tanırlar. (Underhill and Ozinsky, 2002; Takeda, et al. 2003). TLR ekspresyonu sadece bu hücre tipleri ile sınırlı değildir; adrenal bez, testis, timus, karaciğer, dalak gibi organların yanı sıra gastrointestinal sistem, trakeya ve akciğer gibi dış ortamlarla ilişkili olan dokularda da yüksek miktarlarda ekspresedirler (Zarembek and Godowski, 2002).

TLR'inden TLR2 mRNA ekspresyonu, beyin, akciğer, kas, kalp ve dalak gibi dokularda gözlenirken en çok da periferel kan lökositlerinde özellikle de myelomonositik orijinli olanlarında incelenmiştir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere maruz kalındığında TLR2 mRNA ekspresyonu artar (Zarembler and Godowski, 2002). TLR2, TLR1 ve TLR6 ile birlikte ve daha nadir olarak da TLR10 ile (Barton and Medzhitov 2002) heterodimerler oluşturur. Gram-pozitif bakteriler (PGN, LTA, lipoprotein), Gram-negatif bakteriler (lipoprotein), mantarlar (zymosan) sentetik lipoprotein, mikobakteriler [LAM (lipidden zengin mikobakteriyel hücre duvarının major bir immunstimulatör komponentidir)], spiroketlere ait lipopolisakkarid (LPS), glikolipid ve glikoprotein gibi patojenle ilişkili moleküler yapıları tanıır. TLR2/TLR6 heterodimeri LTA, TLR2/TLR1 heterodimeri bakterilerin hücre duvarının triaçil lipoprotein/peptidlerini, TLR1/TLR6 ise mikoplazmanın diaçil lipoproteinlerin tanınmasından sorumludur (Takeda et al. 2002). TLR2 vasıtasıyla bakteriyel lipoproteinler pro-inflamatuvar sitokin IL-1 β prekürsörünün sentezini indükler. Bakteriyel lipoproteinler aynı zamanda TLR2 yoluyla kaspaz 1'i aktive ederek IL-1 β sekresyonuna ve proteolizisine neden olur (Aliprantis et al. 2000). 84 kDa moleküler ağırlığında olan TLR2, aynı zamanda kızamık virusu, insan sitomegalivirus, hepatit C virusu gibi virusları da tanıma yeteneğine sahiptir (Barton and Medzhitov, 2002).

Memelilerde TLR ailesinin ilk tespit edilen üyesi olan TLR4'ün, LPS'e bağlanması üzerine pro-inflamatuvar NF- κ B yolağını başlattığı gösterilmiştir. İn vivo TLR4 mRNA, en yüksek seviyede dalakta ve periferel kan lökositlerinde (B-lenfositler, dendritik hücreler, monositler, makrofajlar, granulositler ve T-lenfositler) eksprese edilmektedir (Medzhitov et al. 1997). Diğer çalışmalar ise TLR4'ün sadece myelomonositik hücrelerde eksprese edildiğini ve en yüksek miktarda da mononükleer hücrelerde bulunduğunu ileri sürmektedir (Zarembler and Godowski 2002). TLR5 ile TLR4 kompleksi respiratorik sinsityal virus, hepatit C virusu ve fare meme tümör virusu gibi virusları; fibrinojen, fibronektin, surfaktan protein A ve β -

defensinler gibi endojen ligandları da tanıma kapasitesine sahiptir (Barton and Medzhitov, 2002). 90 kDa moleküler ağırlığında olan TLR4, yangısal bölgelerde üretilen fibronektinin bir başka biçimidir. Bazı TLR doğal immun ligandlarına direkt bağlanırken, TLR4 gibi reseptörler bu işlem için yardımcı moleküllere ihtiyaç duyarlar. TLR4, sadece ikinci bir polipeptid olan MD-2 varlığında LPS'lere cevap verir. Bu molekül TLR4'ün ekstrasellüler domainine bağlanır ve LPS'in lipid içeren bölgesine TLR4'ün bağlanmasını sağlar. Bütün bakterilerde bulunmayan LPS formlarına cevap ikinci bir yardımcı molekül varlığında artar. CD14 olarak adlandırılan bu molekül monosit, makrofaj ve nötrofiller tarafından eksprese edilen bir membran proteinidir. CD14 molekülünün görevi LPS-bağlayan protein (Lipopolysaccharide Binding Protein, LBP) olarak adlandırılan bir serum lipid transfer proteinden LPS'i kabul eder. Lipidlerin çoğunda olduğu gibi LPS de çok küçük miktarlarda hücrelerden salgılanır. Doğal immun sistem hücreleri tarafından LPS'in tanınmasında bu nedenle LPS monomerlerinin ekstraksiyonunu sağlayan bir mekanizmaya ihtiyaç duyulur. Bu durum lipid bağlayan alanlarında bulunan diğer lipidlerden LPS monomerlerini ayıran LBP'in görevidir ve daha sonra bu protein LPS monomerlerinin CD14'e transfer edildiği hücrelere taşır. CD14 de bu monomerleri TLR4-MD2 kompleksine sunar. CD14'ün genetik olarak bulunmaması veya monoklonal antikorlar tarafından fonksiyonunun engellenmesi, LPS'e karşı makrofajların ve nötrofillerin duyarlılığını azaltır. Buna rağmen bazı bakterilerde bulunan LPS'ye karşı hala bir cevap oluşabilir. CD14, *Mycobacterium tuberculosis*'in LAM ve Gram-pozitif bakterilerin LTA gibi diğer bakteriyel hücre duvarı bileşenlerine de cevap geliştirebilir (Shimazu et al. 1999, Gluck et al. 2001).

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

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

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

TLR proteinlerinin insan ve memeli hayvanların akciğerlerinde lokalize olduğu ve çeşitli akciğer hastalıklarında akciğer ile ilişkili immün yanıtların oluşturulmasında rol oynadığı bilinmektedir (Janardhan et al. 2006; Maris et al. 2006; Muir et al. Petrikin et al. 2010; Schneberger et al. 2009; Schneberger et al. 2011; Sethi et al. 2011; Suri et al. 2006; Sukkar et al. 2006; Wassef et al. 2004).

Akciğerdeki bronşiyal ve alveolar epitel hücrelerinin, makrofajlar ve nötrofil granülositler ile

dentritik hücrelerin hücrelerin TLR'ini eksprese ettikleri ve TLR ekspresyonlarının hayvan türlerine göre farklılık gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Droemann et al. 2003; Basu and Fenton, 2004; Sha et al. 2004; Wassef et al. 2004; Chaudhuri et al. 2005; 2007; Berndt et al. 2007; Janardhan et al. 2006; Suri et al. 2006; Sukkar et al. 2006; Bhan et al. 2008; Schneberger et al. 2009; 2011; Hoppstadter et al. 2010). Primer bronş epitel hücreleri TLR1-10 mRNA'larını eksprese eder ve çeşitli TLR ligandlarına yanıt olarak kemokin CXCL8 (IL-8) salgırlar. Keza akciğer epitel hücre kültürlerinde de TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR5 mRNA ve proteinlerinin eksprese olduğu bilinmektedir (Sha et al.2004). Muir ve arkadaşları normal ve kistik fibrozisli akciğerlerde respiratorik epitel hücrelerinin TLR1-10 mRNA'larını eksprese ettiklerini, konfokal mikroskopik incelemelerde TLR2 proteininin bu hücrelerin apikal yüzeyinde, oysa TLR4 ve TLR5'in bazolateral yüzeylerinde bulunduklarını göstermişlerdir (Muir et al. 2004).

Primer bronş epitel hücrelerinde TLR'inden özellikle TLR2, TLR3, TLR5 ve TLR6'nın yüksek düzeyde eksprese olduğu bildirilmektedir. Oysa TLR2 agonisti (zymosan A ve PGN), TLR4 agonisti (LPS) ve TLR5 agonisti (flagellin) ile epitel hücreleri aktive edildiklerinde epitelin fonksiyonal TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR5'i eksprese ettikleri belirtilmektedir (Sha et al. 2003). TLR'inden TLR2 mRNA ve proteininin insan akciğerinde alveol epitel hücrelerinden pnömosit II ve alveolar makrofajlarda eksprese olduğu (Droemann et al. 2003), bazal şartlar altında ise TLR8 ve TLR9 hariç TLR1-10 mRNA'larınınhava yolu düz kas hücrelerinde eksprese olduğu rapor edilmektedir. Yine bazal şartlarda TLR4'ün mRNA ekspresyonunun diğer TLR'ne göre oldukça düşük düzeyde olduğu, stimule edildiğinde de TLR2 ve TLR3'ün düzeylerinden düşük olduğu, TLR8 ve TLR9 ekspresyonlarının ancak Tümör nekrotik faktör alfa (TNF- α) tarafından artırıldığı bildirilmektedir. Ayrıca bazal şartlarda hava yolu düz kas hücrelerinde, sadece TLR2 ve TLR3 proteinin eksprese olduğu belirtilmektedir (Sukkar et al. 2006).

Sağlıklı mandaların akciğerinde TLR4'ün alveolar septumlarda, hava yolu epitellerinde ve büyük kan damarlarının endotelinde lokalize olduğu, TLR9 ekspresyonunun da TLR2'üne benzediği ancak TLR9'un arter ve venlerin endotelinde eksprese olmadığı bildirilmektedir. Normal akciğere kıyaslandığında *Pasteurella multocida* ile efekte edilmiş manda akciğerlerinde TLR9 ekspresyonunun arttığı, TLR4 ekspresyonunun ise değişmediği veya azaldığı ifade edilmektedir (Sethi et al. 2011). Sağlıklı at akciğerinde TLR2'nin bulunmadığı, TLR4'ün septumlarda büyük kan damarlarının endotelinde, alveolar makrofajlarda ve bronşiyoler epitelin bazal membranı ile intravasküler makrofajlarda lokalize olduğu rapor edilmektedir (Suri et al. 2006). Sığır, domuz ve köpek akciğerinde ise TLR4'ün bronşiyolar epitelde, pulmonar monosit ve makrofajlarda, intravascular ve alveolar makrofajlarda, büyük kan damarlarının endotelinde eksprese olduğu bildirilmektedir (Wassef et al. 2004).

Akciğerde TLR'lerinden TLR5'in predominant olarak pulmonar ve alveolar epitel hücrelerinde eksprese olduğu (Sha et al. 2004) ve flagella stimülasyonundan sonra epitel hücrelerinin özellikle apikal yüzeyine yerleştikleri (Adamo et al. 2004) bilinmektedir. Ayrıca TLR5'in kistik fibrozisli akciğer dokusunda yangının azaltılmasında antiinflamatuvar etkinliğinin olduğu ileri sürülmektedir (Blohmke et al. 2008). İnsanda alveolar makrofajların TLR3, TLR5 ve TLR9'u düşük düzeylerde, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 ve TLR8'i yüksek düzeyde eksprese ettikleri gösterilmiştir (Maris et al.2006; Hoppstadter et al.2010). Akciğer endotel hücreleri sistemik LPS uygulamasını takiben nötrofillerin toplanması ve kapılarla başka yerlere taşınması için gerekli olan TLR4'ü eksprese ederler (Andonegui et al.2003). Akciğer damarlarında yerleşen nötrofiller LPS'ye yanıt olarak TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'u eksprese ederler (Koller et al. 2008). Fare ve insan akciğerinde anatomik yerleşimlerine ve yüzey belirteç ekspresyonlarına göre dentritik hücrelerin alt tipleri saptanmıştır (GeurtsvanKessel and Lambrecht, 2008; Wikstrom and Stumbles, 2007). TLR ligasyonu ile aktive olan akciğer dentritik hücreleri doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki

köprüyü sağlamayan askerler olarak rol oynarlar. Akciğerdeki damarlarda bulunan plasmacytoid dentritik hücreler (pDCs) alerjik yanıtı baskılayan TLR7 ve TLR9' u yüksek düzeylerde eksprese ederler ve düzenleyici akciğer dentritik hücreleri ise T hücrelerinin düzenlenmesine neden olurlar (Plantinga et al. 2010). Özellikle, bazı durumlarda hücrelerde TLR transkripsiyon seviyesi fonksiyonel yanıtlar ile ilişkili değildir (Hoppstadter et al.2010; Maris et al. 2006). Örneğin, LPS veya mikobakteriyel DNA ile stimülasyon sonrasında, insan alveolar makrofajları yüksek düzeylerde inflamatuvar sitokin TNF- α üretirler, oysa interstisyel makrofajlar interstisyel makrofajlar TLR mRNA'ların aynı düzeyde üretirken immunregülatör sitokin IL-6 ve IL-10 'u yüksek üretirler (Hoppstadter et al.2010). Sonuç olarak örneğin LPS ile stimule edilmiş monositler tarafından salgılanan IL-1 β yoluyla aktive olan hava yolu düz kas hücrelerinde olduğu gibi, akciğer dokusundaki hücreler TLR duyarlı lenfoid hücreler ile etkileşim yoluyla aktive olabilirler (Morris et al. 2005). Bu nedenle akciğerde TLR ligandlarına yanıt verme yerleşik ve infiltre olan hücrelerin işbirliği ile şekillenir.

TLR'lerinden TLR9'un genel olarak akciğerde alveolar makrofajlar, pulmonar intravaskular makrofajlar, nötrofil granülositler bronşiyal epitel hücreleri, pnömosit II'ler gibi birçok hücre tipinde eksprese olmaktadır (Bhan et al. 2008; Schneberger et al. 2009; 2011; Hoppstadter et al.2010). Sağlıklı mandaların akciğerinde TLR9 ekspresyonunun septal makrofajlarda olduğu gibi alveolar septumlarda zayıf eksprese olduğu, hava yolu epitellerinin de zayıf boyandığı vasküler endotelin ise çoğunlukla negatif olduğu, oysa damarlardaki monositlerde TLR9 ekspresyonunu n kuvvetli pozitif olduğu ifade edilmektedir (Sethi et al. 2011).

Fötal gelişim sürecinde TLR'nin fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılamamıştır. İnsan fötüslerinde sadece TLR2'nin akciğer gelişiminin erken psöydoglandular evresinden kanaliküler evresine geçişte gelişime bağlı olarak eksprese olduğu, fakat TLR4 ekspresyonunun değişmediği saptanmıştır (Petrikin et al. 2010). Farelerdeki çalışmalar TLR2

ve TLR4 ekspresyonlarının gebeliğin 14-15. günlerinde (insanda gebeliğin 30. haftasına karşılık gelmektedir) görülmediği, fakat prenatal gelişimin devamında ve doğumdan sonra birkaç kat arttığını göstermektedir (Harju et al. 2001). Koyun fötüslerinde TLR2 ve TLR4 mRNA ekspresyonları farklıdır. TLR4 mRNA akciğer parenşiminde, epitelde, mezenşimde ve yangı hücrelerinde uniform olarak eksprese olurken, intraamniotik LPS injeksiyonu sonrasında belirgin bir artış görülür. Oysa TLR2 mRNA parenşimde düşük düzeydedir, intraamniotik LPS injeksiyonu sonrasında yangı hücrelerindeki TLR mRNA ekspresyonunda belirgin bir artış görülür. Yangı hücrelerinde TLR4 ekspresyonundaki artış TLR2 mRNA ekspresyonundaki artıştan daha çarpıcı değildir (Hillman et al.2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

3.1.1. Doku Temini

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi deney hayvanları merkezinde yetiştirilen erişkin dişi sıçanlardan elde edilen yeni doğan yavru sıçanlar ile ayrıca dişileri çiftleştirmek amaçlı olarak erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Dişi sıçanlardan vaginal smearlar sabah 09.00-10.00 saatleri arasında alınarak östrus siklusu belirlendi ve östrusdaki dişi sıçanlar erkek sıçanla çiftleştirildi. Vaginal smearde ilk spermiyumların görüldüğü gün gebeliğin birinci günü olarak değerlendirildi. Gebeliğin 20. gününden itibaren doğumlar izlendi ve doğum sonrası anne sıçanların yavru sıçanları bakım ve besleme işlemlerini gerçekleştirmesine izin verildi. Doğumun 1. (Grup I), 3. (Grup II), 5. (Grup III), 10. (Grup III), 15. (Grup IV) günlerinde olan yavru sıçanlar annelerinden ayrıldı. Daha sonra yavru sıçanların anestezi altında (Xylazine(2mg/kg)- ketamin hydrochloride (15 mg/kg)) akciğer dokuları alındı ve hayvanlar kanları boşaltılarak ötenazi edildi. Her gün için 8'şer adet olmak üzere 40 adet yavru sıçandan ayrıca 5 adet erişkin sıçandan alınan akciğer dokuları Western blot ve immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmek üzere işlendi. Western blot Analizi için akciğer örnekleri alüminyum folyolar içerisinde sarılı olarak likit nitrojende -196 C^0 'de hemen donduruldu ve analiz yapılana kadar -80 C^0 'lik bir derin dondurucuda saklandı.

3.1.2. İmmunohistokimya tekniği için doku hazırlanması

Her bir hayvandan alınan akciğer örnekleri formol-alkol solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildikten sonra %96 ve %100'lük alkol serilerinde 1'er saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Daha sonra metil benzoat ve benzol solüsyonlarında şeffaflaştırma işlemi yapılarak parafinde bloklandı. Bu parafin bloklardan Leica RM 2125 rotary miktomu ile belirli aralıklarla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve her birinde en az 4 kesit içeren 5 seri

preparat hazırlandı. Preparatların birinci serisi genel yapıyı belirlemek amacıyla Crossman'ın üçlü boyaması ile diğer serileri ise TLR'nin lokalizasyonlarını belirlemek için ise Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz yöntemi ile boyandı.

3.1.3. Western Blot tekniği için doku hazırlanması

3.1.3.1. Lizat hazırlama

Alüminyum folyo içine alınan ve sıvı nitrojende (-196°C) dondurulan akciğer örneklerinden şu şekilde lizatlar hazırlandı:

1. Çalışılacak doku sayısına göre, 10 ml'lik tüplerin üzerine kontrol ve deney gruplarının isimleri yazıldı ve tüpler spor üzerine yerleştirildi.
2. Akciğer doku örnekleri bir camın üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
3. Darası alınan tüplere bu parçalanmış akciğer örnekleri konarak ağırlıkları tartıldı.
4. Ependorflara gram doku başına 3 ml RIPA lizis buffer olacak şekilde lizis buferler kondu. Dokuların lize edilmesi öncesinde RIPA lizis buffer hazırlamak için 1 ml 1XRIPA buferi içine 10 µl PMSF solüsyonu, 10 µl sodium orthovanadate solüsyonu ve 10-20 µl protease inhibitor cocktail (PIK)solüsyonu konuldu.
5. Ezilmiş doku, lysis buffer ve PIK karışımı ile vorteksenerek buz üzerine aktarıldı.
6. Tüpler içindeki bu dokuların homojenizatör yardımıyla homojen bir biçimde lizise uğraması sağlandı.
7. Daha sonra 15.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı -80°C'ye alındı. Bu şekilde hazırlanan lizatlar analizler yapılınca kadar -20°C de muhafaza edildi.

3.1.3.2. Protein miktarının belirlenmesi

Lizatların içerdiği protein miktarı Lowry yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde standart olarak protein içeriği 1mg/ml olan Sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin, BSA (Fraction V, Sigma Katalog No: B4287, 5 g) kullanıldı.

1. BSA'nın (1000µg/ml), 1:1 (500µg/ml protein), 1:2 (250µg/ml), 1:3 (125µg/ml), 1:5 (62,5µg/ml) dilüsyonları yapılarak 5 adet BSA standart protein aralığı hazırlandı ve BSA-1, BSA-2, BSA-3, BSA-4, BSA-5 şeklinde kodlandı.
2. 10 ml'lik tüplere akciğer lizatlarının, standartların ve körün adları yazıldı. Her bir numune, kör ve standart çift çalışılacağı için A ve B tüpleri olarak hazırlandı.

Akciğer lizatlarından 1/10 dilüsyonlar hazırlanılarak çalışıldı ve bu 1/10'luk dilüsyonları hazırlamak için bir tüp içerisine 900 µl fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline, PBS) ve 100 µl akciğer lizatı konuldu. Daha sonra hazırlanan bu 1/10'luk dilüsyondan A ve B yazılı tüplere 30'ar µl pipetlendi. Bu numuneler kısa süreli olarak vortekslendiktikten sonra buz üzerine alındı.

0.01 M pH 7.2 Fosfat Buffer Saline (PBS)'in Hazırlanması: 3.74 gr Disodyum hidrojenfosfat dodehidrat (Merck, Katalog No: 106579, 1 kg) + 0.43 gr Monobazik potasyum fosfat anhidroz (Merck, Katalog No: 104873, 1 kg) + 7.2 gr Sodyum klorür (Merck, Katalog No: 106404, 1 kg) tartılarak bir litre distile suda eritildi.

1. Aynı şekilde ml'sinde 1 mg BSA olan ana standartımızdan BSA-1A ve BSA-1B yazılı tüplere 30'ar µl pipetlendi ve bu işlem 2. 3. 4. 5. BSA-A ve BSA-B tüpleri için de tekrarlandı (BSA-2A, BSA-2B, BSA-3A, BSA-3B, BSA-4A, BSA-4B, BSA-5A, BSA-5B). BSA-1A ve BSA-1B deki miktar (30'ar µl) sabit kalırken BSA-2A ve BSA-2B'ye 30'ar µl PBS, BSA-3A ve BSA-3B'ye 60'şar µl PBS, BSA-4A ve BSA-4B'ye 90'ar µl PBS, BSA-5A ve BSA-5B'ye 150'şer µl PBS eklendi. Daha sonra bu miktarlardan 30'ar µl alınarak aynı numaralı tüplere aktarıldı.
2. Akciğer lizatları PBS içerisinde dilue edildiği için kör1 ve kör2'ye sadece 30'ar µl PBS eklendi.
3. 30'ar µl konulmuş olan bütün numunelerin, standartların ve körlerin üzerine 900 mikrolitre Lowry solüsyonu konuldu. Lowry solüsyonu 100:1:1 oranında Lowry A:

Lowry B: Lowry C solüsyonlarının karıştırılmasıyla hazırlandı. İlk önce Lowry B ve C solüsyonları karıştırılıp ardından Lowry A solüsyonu ilave edildi. Kısa süreli olarak vortekslenen numuneler, standartlar ve körler buz üzerinde 10 dakika bekletildi.

Lowry Solüsyonlarının Hazırlanması:

Lowry A: 1 gr NaOH (Sodyum Hidroksit, Merck, Katalog No: 106462, 1 kg) ve 5.3 gr Na_2CO_3 (Sodyum karbonat, Merck, Katalog No: 106392, 1kg) 250 ml distile suda eritildi.

Lowry B: 0.5 gr $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Sodyum potasyum tartarat, Merck, Katalog No: 108087, 1 kg) 50 ml distile suda eritildi.

Lowry C: 0.5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Bakır sülfat pentahidrat, Merck, Katalog No: 102790, 1 kg) 50 ml distile suda çözüldü.

4. Lowry solüsyonu ile 10 dakika inkübasyonun ardından tüm tüplere 90 mikrolitre folin pipetlendi. Folin solüsyonu (Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Merck, Katalog No: 109001, 100 ml) 1:1 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanıldı. Böylelikle toplam hacim 1020 μl oldu.
5. Folin eklenmiş olan tüpler 30 dakika buz üzerinde ve karanlıkta inkübe edildi.
6. Spektrofotometrik (Thermo, Helios alfa) ölçüm için tüm tüpler teker teker kuartz küvetlere boşaltılarak 540 nm dalga boyunda okunması sağlandı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Daha sonra verilerin hepsi Excel programına aktarıldı. Tüm numunelerin protein miktarlarının eşit olması sağlanarak western blot analizlerinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

APES [(3-Aminopropyl) triethoxysilane, minimum % 98, Sigma, A3648, 100 ml) ile kaplı lamlara alınan 5 mikrometre (μm) kalınlığındaki parafin kesitlere Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı.

1. Bu tekniğe göre parafin bloklardan alınan kesitler 1 gece boyunca 50 °C'de etüvde tutuldu.
2. Bir gün sonra deparafinizasyon için parafin kesitler 2 defa 5'er dakika ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 3'er dakika (%100, %96, %80, %70) bekletildi.
3. Distile su ile çalkalanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için mehanolde (Merck, Katalog No: 106009.2511) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (%30 Hidrojen peroksit, Merck, Katalog No: 108597, 2.5 lt) içinde 15 dakika bekletildi.
4. Takiben kesitler 0,01 M PBS'de 2 kez 5'er dakika yıkandı.
5. Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler sitrat tamponu [2300 ml distile su içerisinde 4.8 gr sitrik asit (Anhidroz, Sigma, C0759, 500 gr) eritildi ve 12N NaOH ile pH 6.0'e ayarlanarak son hacim distile su ile 2500 ml'ye tamamlandı] içinde bir su banyosunda 80°C'de 30 dakika kaynatıldı ve takiben aynı tampon içinde oda ısısında 20 dakika bekletildi.
6. PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları yani dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek için kesitler 5 dakika bloklama solüsyonu (Ultra UV Block, LabVision Corporation TA-125UB) ile bir nem kamarası içinde inkübe edildi.
7. Hemen sonrasında, serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldı ve TLR2 (1:50), TLR4 (1:200), TLR5 (1:50), TLR9 (1:75), TLR10 (1:100) primer antikorlarıyla +4 °C'de gece boyunca inkübe edildi.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlara ait bilgiler

Antikorum A	Antikorum Türü	Katalog Numarası
Toll-like reseptör 2(TLR2)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 10739
Toll-like reseptör 4(TLR4)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30002
Toll-like reseptör 5(TLR5)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 30003
Toll-like reseptör 9(TLR9)	rabbit poliklonal	Santa cruz, sc- 25468

8. Kesitler primer antikorlar ile inkübasyondan sonra, 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
9. Daha sonra kesitler, biyotinle işaretlenmiş keçi anti-tavşan (Labvision Corporation TR-125-BN) sekonder antikoru ile 20 dakika oda ısısında muamele edildi.
10. PBS de 4 defa 5'er dakika ile yıkandı.
11. Horseradish peroksidaz konjugatlı streptavidinle (Labvision Corporation TS-125-HR) 20 dakika muamele edildi.
12. Tekrar 4 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
13. Diamino benzidin (DAB)kromojeni (DAB Chromogen Substrate System Thermo TA-125-HD) ile dokular 3-5 dakika muamele edildi. Enzim substrat etkileşimi sonucunda oluşan ürün kahverengi olarak mikroskopta gözlemlendi.
14. Kesitler 2-3 kez distile suda çalkalandı.
15. Gill'in Hematoksilen solüsyonu ile 4 dakika zıt boyama yapıldı ve kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı.
16. Daha sonra sırasıyla %96, %100'lük alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitlerin üzerine yapıştırıcı (entellan) damlatılıp lamelle kapatıldı.

Pozitif Kontrol olarak insan dalağı, insan plasentas ve erişkin sıçan akciğeri kullanıldı.

Negatif kontrol olarak alınan doku örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi.

Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve

ışık mikroskobunda (Olympus BX51, Japan) incelenerek fotoğraflandı.

3.3. SDS-PAGE (POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİS) WESTERN BLOT PROTOKOLÜ

1. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdede ayırıştırma jeli seçildi. Buna göre TLR yüksek moleküler ağırlıkta protein olduğu için por çapı geniş olan %7,5'luk poliakrilamit jel tercih edildi.
2. Ayırıştırma jeli [3.75 ml akrilamit-bisakrilamit (Acrylamide Bisacrylamide, AB) (%30 akrilamit-bisakrilamit 37.5:1, Merck, Katalog No: 100639, 1 lt) + 3.75 ml Tris-SDS pH8.8 + 7.5 ml deiyonize su + 50 mikrolitre %10 luk Amonyum persülfat (APS, Sigma, Katalog No: A3678, 25 gr) + 10 mikrolitre TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin, Merck, Katalog No: 110732, 100 ml)] hazırlanarak tutucular arasında sıkıştırılan dikey elektroforezis (Biorad, Mini Protean Tetra Cell, 10-well, 1mm thickness) camları arasına döküldü.

Jel Solüsyonlarının Hazırlanması:

4Xtris-HCl/SDS, pH 8.8: 18.15 gr Tris tartıldı ve 40 ml distile suda çözüldü. HCl asit ile pH 8.8'e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve daha sonra 0.4 gr Sodyum dodesil sülfat (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS) eklendi.

4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8: 6.05 gr Tris tartıldı ve 40 ml distile suda çözüldü. HCl asit ile pH 6.8'e ayarlanarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve daha sonra 0.4 gr SDS eklendi.

%10'luk APS: 0.1 gr toz APS tartılarak 1 ml distile suda eritildi.

3. Üzerindeki hava kabarcıklarını önlemek için n-butanol (50 ml butanol + 5 ml distile su) ile doldurularak polimerizasyon işlemi için 45 dakika bekletildi.
4. Polimerizasyon işleminden sonra n-butanol boşaltılarak jelin üstü birkaç kez distile su ile yıkandı.

5. Daha sonra toplama jeli (650 µl akrilamit-bisakrilamit+1.25 ml pH 6.8 Tris-SDS + 3050 µl deiyonize su + 25 µl %10'luk Amonyum persülfat + 5 µl TEMED) hazırlanarak ayrıştırma jelinin üzerine döküldü ve 10'lu tarak yerleştirildi.
6. Polimerizasyon için 45 dakika bekletildi.
7. Polimerizasyon işlemi tamamlanan jeller elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine 1X'lik elektroforez tamponu (150 ml stok solüsyondan (10X) alınarak üzerine 1350 ml deiyonize su eklendi) döküldü ve bu tampon içinde taraklar çıkartıldı.
8. Her kuyucuğa 60 mikrogram/ml oranında protein içeren ve protein miktarları distile su, numune ve laemmlı buffer (Sample Buffer 2X, Laemmlı electrophoresis Reagent, Sigma, Katalog No: S3401, 10 vial) oranları ile eşitlenen numunelerin ağzı parafilmle sıkıca kapatılarak su banyosunda 5 dakika 95 °C'de kaynatıldı.
9. Yükleme yaparken moleküler ağırlığı bilinen bir belirteç (Broad range markers, 500 µl, Santa cruz sc-2361) 1:1 oranında sample buffer ile sulandırılarak kaynatma yapmadan jelin ilk kuyucuğuna 5 µl olarak yüklendi.
10. 10'luk tarak kullanıldığı için numuneler 20 µl olarak yüklendi ve hangi kuyucuğa hangi numunenin yüklendiğini anlamak için bir kağıda haritalama işlemi yapıldı.
11. Elektroforezde numuneler ilk önce 120 Voltta 1 saat, sonrasında ise 100 Voltta jelin sonuna kadar yürütüldü.
12. Elektrofez işleminden sonra ise jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için immunoblotting yapıldı. Blotlama işleminde semi-dry yöntemi kullanıldı.
13. Elektroforez tankından çıkarılan jeller direk 1X transfer solüsyonuna (50 ml transfer stok solüsyonundan alınarak üzerine 350 ml deiyonize su ve 100 ml metanol eklenir) alınarak 15 dakika bu solüsyon içinde bekletildi.
14. Jel transfer solüsyonu içinde beklerken polivinilidenflorid (Polyvinylidenfluorid, PVDF) membran (Immobilon-PSQ Katalog No: ISEQ00010, 26.5 cm X 3.75 m 1 roll)

metanolde 3 saniye ıslatılarak önce deiyonize suda 2 dakika, daha sonra 1X'lik transfer solüsyonunda 3 dakika yıkanarak immunoblotting için hazır hale getirildi.

15. Bir membran için dört adet olmak üzere transfer solüsyonu ile ıslatılmış filtre kağıtları (Whatman Katalog No: 10426972, GB005, 15X15 cm) içinde altta PVDF membran üstte jel olacak şekilde 10 V akım verilerek 55 dakikada transfer işlemi gerçekleşti.

16. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, Ponceau S (Ponceau S Solution, Sigma, Katalog No: P-7170, 1 lt) boyaması yapılarak proteinlerin membrana transfer olup olmadığı kontrol edildi.

17. Ponceau S membrandan uzaklaşınca kadar pH'sı 7.4 olan, %0.1 Tween-20 (Merck, Katalog No: 822184, 500 ml) ilaveli Tris-tuz tamponu (Tris Buffer Saline, TBS-T) ile yıkama yapıldı.

Tris Buffer saline (TBS) Solüsyonunun hazırlanması (10X): 60.55 gr Tris ve 87.66 gr NaCl tartılarak 800 ml distile suda eritildi. Daha sonra saf HCl ile pH 7.4 ayarlanarak son hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

TBS-T Hazırlanması: 100 ml bu stok (10X) TBS solüsyonunda alınarak üzerine 900 ml distile su ve 1000 µl Tween-20 eklendi.

18. Ardından membran 1 saat süre ile oda ısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu (Skim milk powder, Fluka, Katalog No: 70166, 500 gr) ile bloklandı.

%5'lik yağsız süt tozunun hazırlanması: 100 ml TBS-T içinde 5 gr süt tozu eritilerek hazırlandı.

19. Membran, süt tozu ya da TBS-T içinde sulandırılmış antikorlar [TLR2 (1/100), TLR4 (1/400), TLR5 (1/50), TLR9 (1/100)] ile + 4⁰C'de gece boyu inkübe edildi.

20. İnkübasyon sonrasında membran TBS-T ile 4 kez 15 dakika yıkandı.

21. Takiben membran, TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile 1/6400 oranında sulandırılmış sekonder antikorla (goat anti-rabbit, santa cruz, sc-2004, 0.5 ml) oda

sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi ve sekonder antikör her zaman taze hazırlandı.

22. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 4 kez 15 dakika yıkandı.

23. Ardından 5 dakika TBS ile muamele eden membranlar 1 dakika western blotting Luminol Reagent (Santa cruz, Katalog No: sc-2048) ile temas ettirildi.

24. Hiperkaset (Amersham Autoradiography cassette, 24x30 cm, RPN11643) içine yerleştirilen membranlar 1-10 dakika karanlık odada inkübe edilip membrandaki protein bantları hiperfilme (Amersham Hyperfilm ECL, 50 sheets, 18x24 cm 28906836) aktarıldı.

25. Film developer (Developer, ILFORD Multigrade, Katalog No:757855) ve fiksatiften (Rapid Fixer, ILFORD Hypam, Katalog No:1758285) geçirildi, distile su ile yıkandı ve ardından kurutuldu. Daha sonra bu filmler Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarıldı.

26. Aynı membrana protein bantlarının eşit yüklenip yüklenmediğini anlamak için strip işlemi [20 ml TBS-T + 0.4 gr SDS + 1400 ml β -merkaptaethanol (Sigma, Katalog No: M3148, 250 ml) solüsyonunda 65 °C etüvde 30 dakika bekletildi] yapıldıktan sonra bol miktarda TBS-T içinde yıkama yapıldı.

27. Bu membrana süttozunda bloklama aşamasından itibaren aynı işlemler uygulandı.

28. Primer antikör olarak 1/400 oranında TBS-T sulandırılmış Beta aktin antikoru (Mouse monoclonal AC-15 to beta actin loading control, Santa Cruz, Katalog No: sc-69879, 1 ml) kullanıldı.

29. Sekonder antikör olarak ise goat anti mouse (Santa Cruz, Katalog No: sc-2005, 0.5 ml) tercih edildi (236).

Western blot metodunda pozitif kontrol olarak Namalwa cell lysate (Santa Cruz, Katalog No: sc-2234), Hela Whole Cell lysate (Santa-Cruz, Katalog No: sc-2200) kullanıldı.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

3.4.1. Western Blot Analizleri

Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarılan kontrol ve postpartum günlere ait bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçüldü. Her bir antikor için gruplar arasında farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, farklılık durumunda ise bunun hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için de Mann-Whitney U testi uygulandı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4.2. Semikantitatif Değerlendirme

İmmunohistokimyasal boyanmalar, yoğunluk (intensity score) ve oransal skordan (proportional score) oluşan total skor (Quick score) olarak isimlendirilen ikili derecelendirme yöntemi kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi. Yoğunluk skorunda (I), hücrelerdeki pozitif boyanma yoğunlukları değerlendirilirken, oransal skorda (P) ise pozitif boyanan hücrelerin yüzde oranı belirlendi.

İmmunohistokimyasal boyanma sonuçlarındaki skorlama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.

Yoğunluk skoru

- 0: Negatif (yüksek büyütmede hiçbir hücrede boyanma yok)
- 1: Zayıf (sadece yüksek büyütmede görülen boyanmış hücreler)
- 2: Orta (düşük büyütmelerde kolaylıkla görülen boyanmış hücreler)
- 3: Güçlü (çok düşük büyütmelerde görülen boyanmış hücreler)

Oransal skor

0: 0; %1<: 1; %1-10: 2; %11-33: 3; %34-66: 4; %67-100: 5 olarak tanımlandı.

Yoğunluk skoru ve oransal skor toplandığında 0-8 arasındaki “Quick score-total skor” elde edildi. Elde edilen bütün veriler bilgisayara girildi ve SPSS 11.5 programı ile istatistiksel analizleri yapıldı. Western blot analizlerinde olduğu gibi immunohistokimyasal analizlerde de

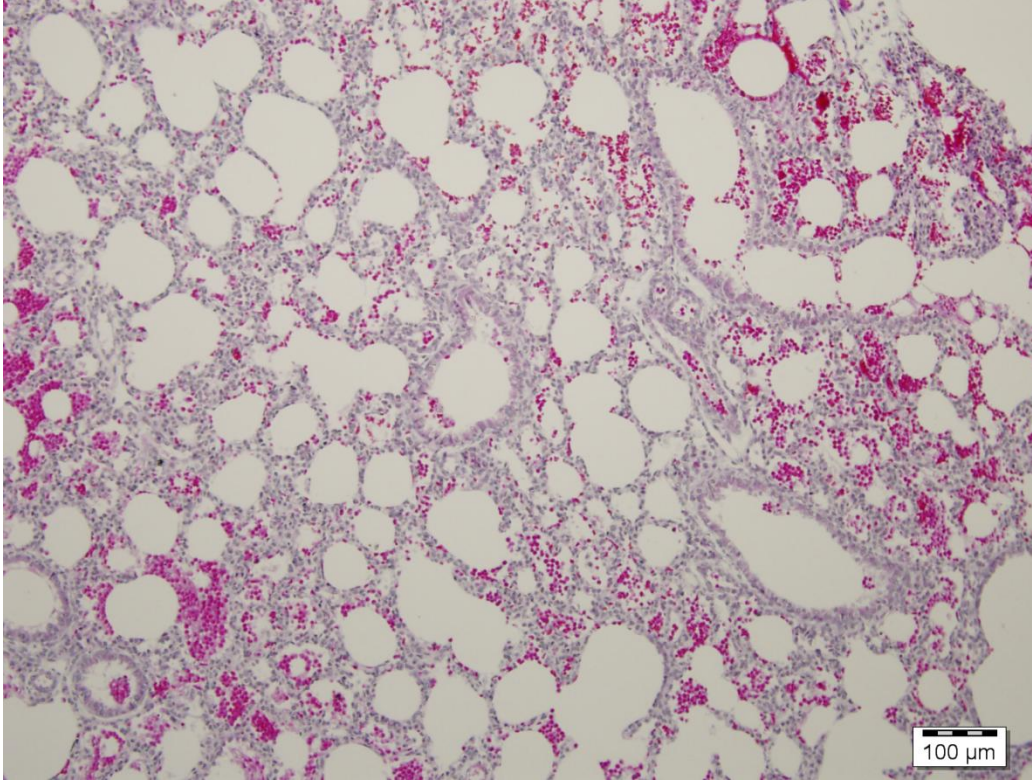
gruplar arasında farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, farklılık durumunda ise bunun hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için de Mann-Whitney U testi uygulandı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

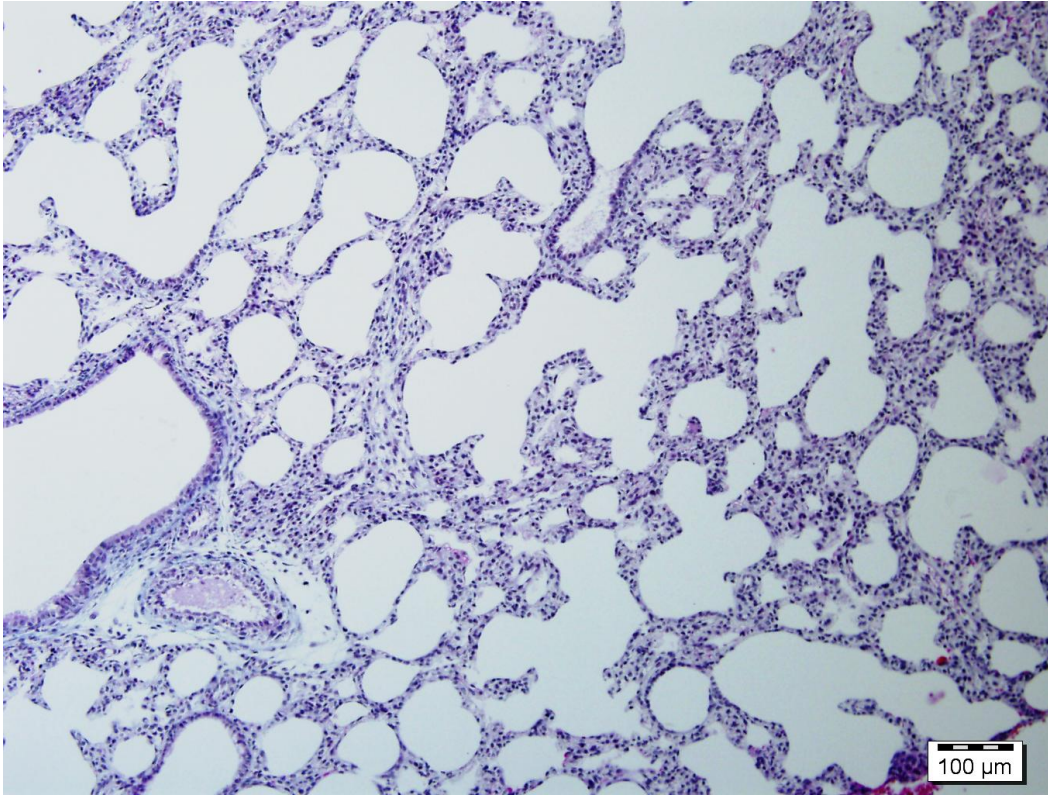
4.1. Histolojik Bulgular

Neonatal dönemdeki ve erişkin sıçan akciğerlerinin yapısal özellikleri Şekil 4.1–4.6’da gösterilmiştir.

Bu çalışmada doğum sonrası 1-3. günler sakkular, 5, 10 ve 15. günler ise alveolar periyod olarak tanımlandı. Ayrıca alveolar period erken (5. gün), orta (10.gün) ve geç (15. gün) alveolar periyod olarak bölümlendi. Yeni doğan sıçanlarda alveol yapısının bulunmadığı akciğerin düzgün duvarlı hava kanalları ile kalın duvarlı olan sığ sakkuluslardan oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.1A). Sakkular periyodtaki 1 ve 3 günlük sıçanlarda sakkulusların duvarının ince bir epitelle örtülü olduğu ve kan kapıllarlarının lumene doğru çıkıntı yaptığı saptandı (Şekil 4.1; Şekil 4.2). Ayrıca bazı sakkuluslarda az sayıda küçük primer septumların bulunduğu gözlemlendi. Bu septumlarda çift kapıllar sisteminin bulunduğu görüldü. Postnatal yaşamın 1. ve 3. günlerinde akciğer lopçuklarının özellikle periferlerinde septumların proliferasyon olarak sekonder septumları oluşturduğu ve sakkulusların alveollere dönüşmeye başladığı, ayrıca bu sekonder septumların primer septumlarda olduğu gibi çift kapıllar sistemine sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.1B)

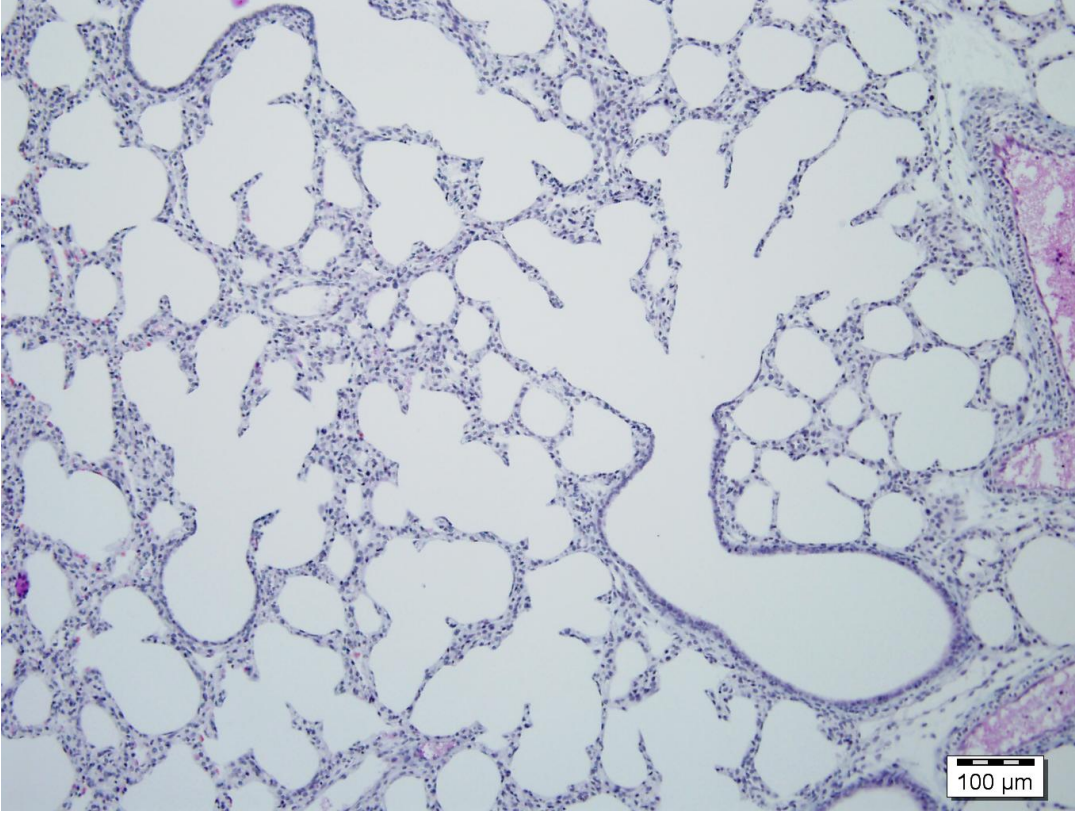


Şekil 4.1. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinin görünümü. Crossman'ın üçlü boyaması. Bar: 100 µm.

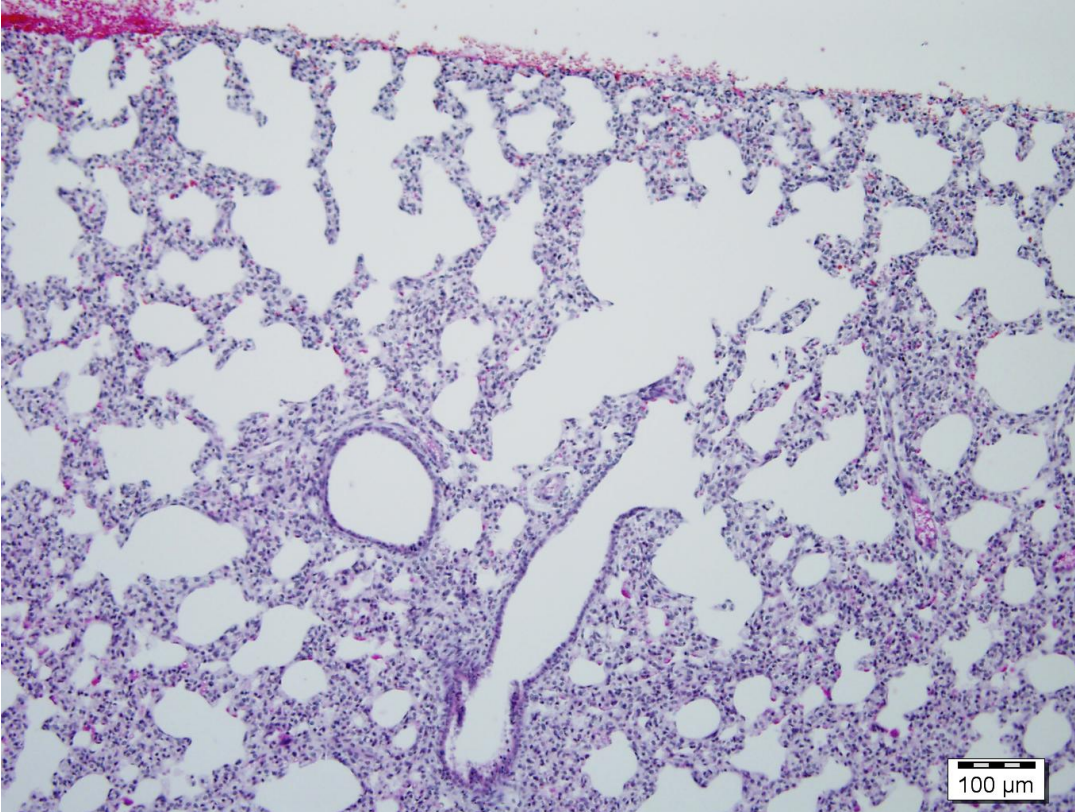


Şekil 4.2. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinin görünümü. Crossman'ın üçlü boyaması. Bar: 100 µm

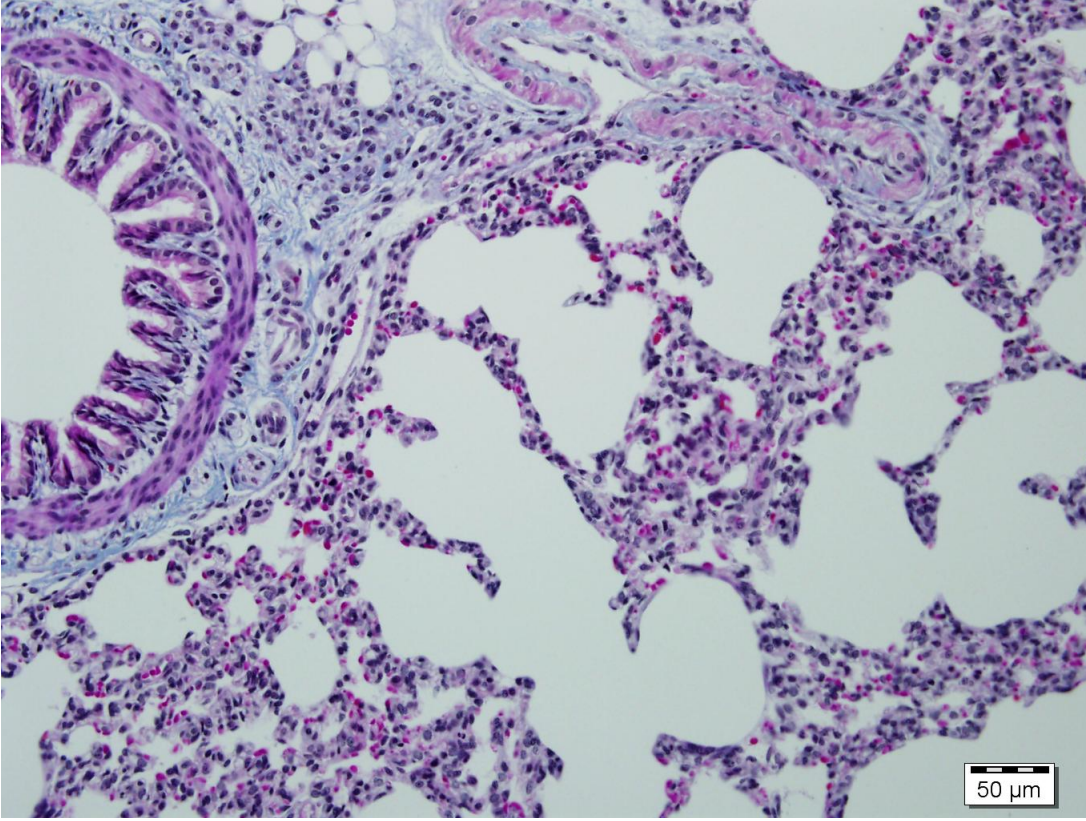
Postnatal yaşamın 5. (erken), 10 (orta), ve 15 (geç). günlerinde postnatal yaşa bağlı olarak alveolar septasyonun artarak devam ettiği saptandı (Şekil 4.3; Şekil 4.4, Şekil 4.5; Şekil 4.6). Sekonder septumların uzayarak incelmelerinin de postnatal yaşla artış gösterdiği belirlendi. Alveolar periyodun gerçekleştiği bu günlere ait olan akciğer örneklerinde hem sakkulusların hem de alveollerin bulunduğu akciğer dokusunun üniform bir yapı göstermediği izlendi. Sakkuluslardan oluşan alanlarda akciğer interstisyumunun bol miktarda bağdoku içerdiği, alveollardan oluşam alanlarda interstisyel hücrelerin azaldığı sekonder septum duvarının olukça ince olduğu ve kapillar ağ sisteminin bulunduğu tespit edildi. Postnatal yaşamın birinci gününden itibaren terminal bronşiyollerin (bronchulus verus) ve respiratorik bronşiyollerin (bronchulus respiratoryus) şekillenmiş olduğu bunların da postnatal yaşa bağlı olarak sayı ve çap bakımından arttıkları gözlemlendi. Termina bronşiyollerin çaplarına göre etraflarındaki sirküler seyirli kas tabakasının kalınlığının farklılık gösterdiği izlendi. Respiratorik bronşiyollerin direk alveollere açıldıkları ve duvarlarında kas tabakasının bulunmadığı gözlemlendi.



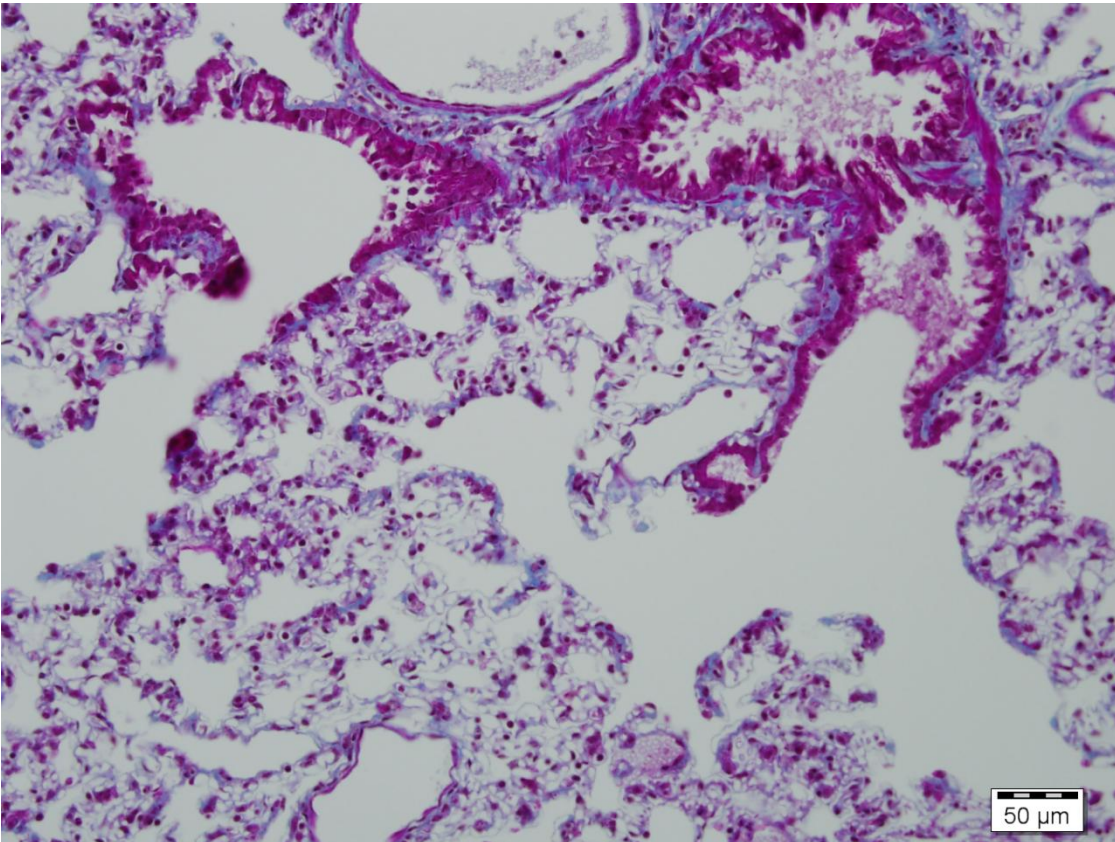
Şekil 4.3. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinin görünümü. Crossman'ın üçlü boyaması. Bar: 100 µm.



Şekil 4.4. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinin görünümü. Crossman'ın üçlü boyaması. Bar: 100 µm.



Şekil 4.5. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde hem sakkuluslar hem de alveoller bulunmaktadır. Crossman'ın üçlü boyaması. Bar: 50 µm

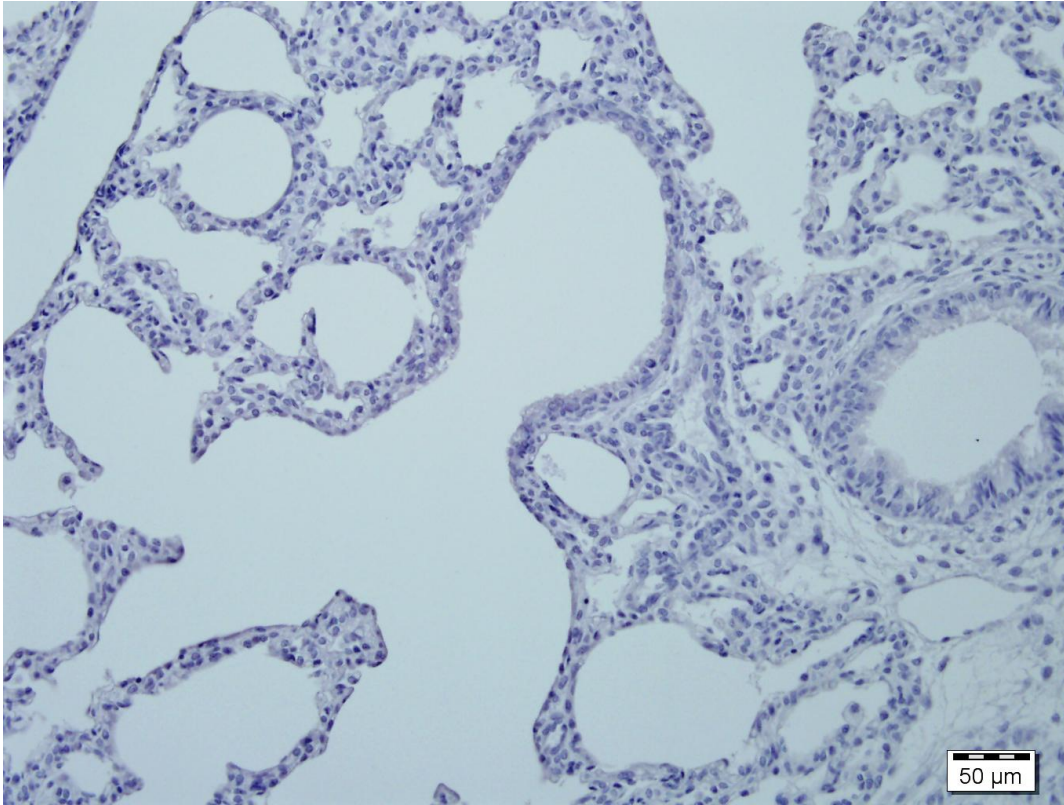


Şekil 4.6B. Erişkin akciğerinde bronşiyoller ve alveoller. Crossman'ın üçlü boyaması. Bar: 50 µm.

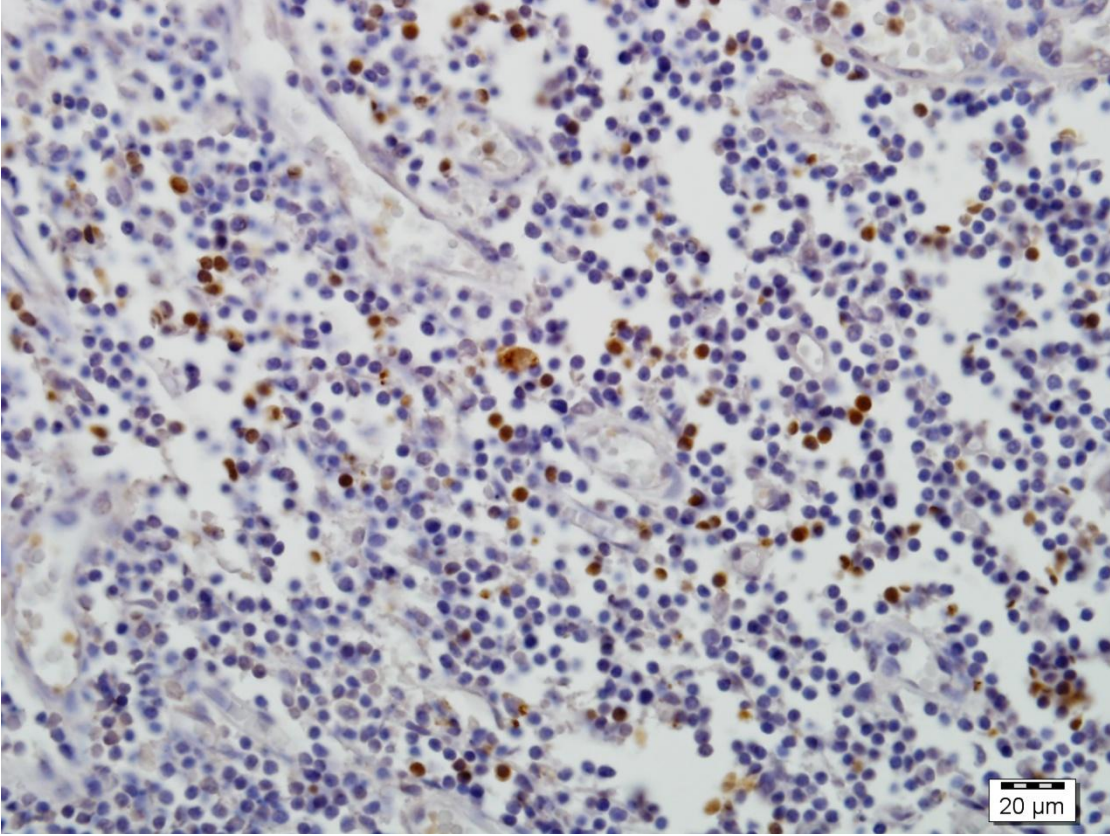
4.2. İmmunohistokimyasal bulgular:

Bu çalışmada primer antikorlar yerine PBS ile muamele edilen negatif kontrollerde boyanmanın olmadığı gözlenmiş olup bu immunreaksiyonun spesifik olduğunu göstermiştir. Ayrıca Toll-like reseptörlerinin western blot yöntemiyle ekspresyonlarının belirlenmesi de reaksiyonun spesifitesini gösteren bir bulgudur. Ayrıca her bir antikor için spesifik pozitif kontroller kullanıldı. TLR2 ve TLR9 için insan lenf düğümü, TLR4 için insan plasentası, TLR5 için insan dalağı pozitif kontrol olarak seçildi.

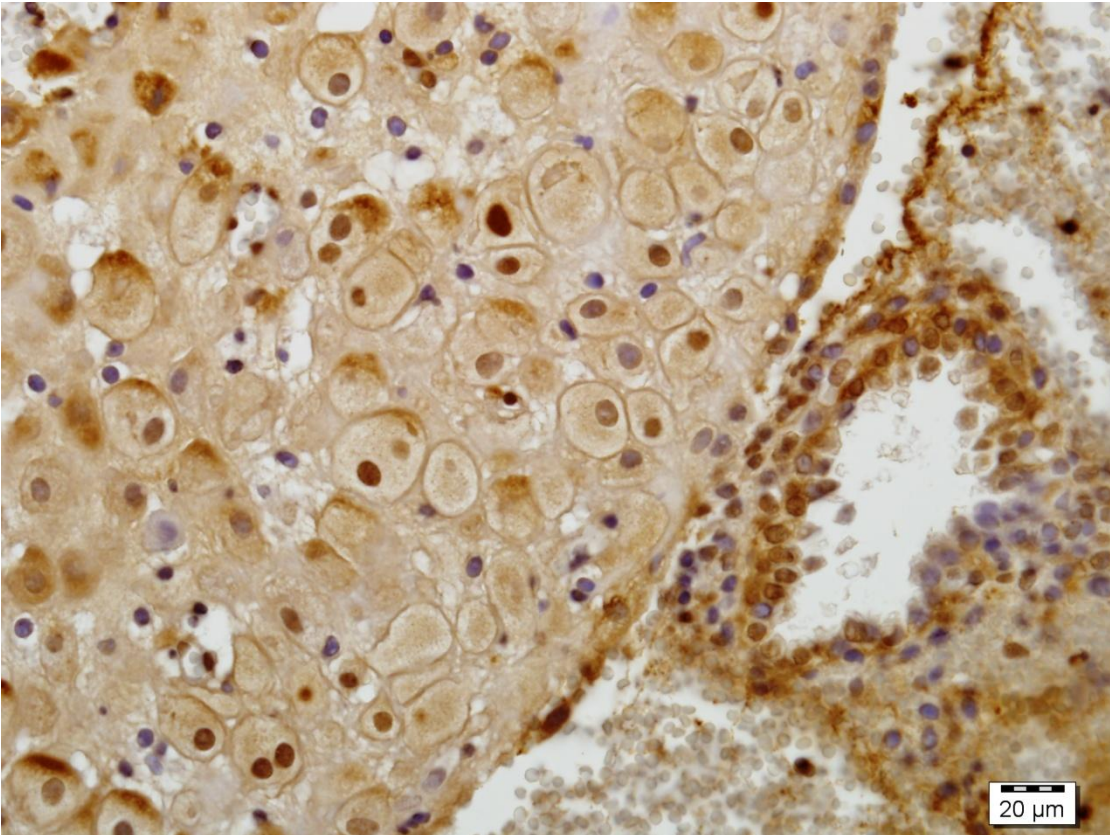
Negatif ait boyanmalar Şekil 4.7’de ve pozitif kontrollere ait boyanmalar Şekil 4.8–4.11’de gösterilmiştir.



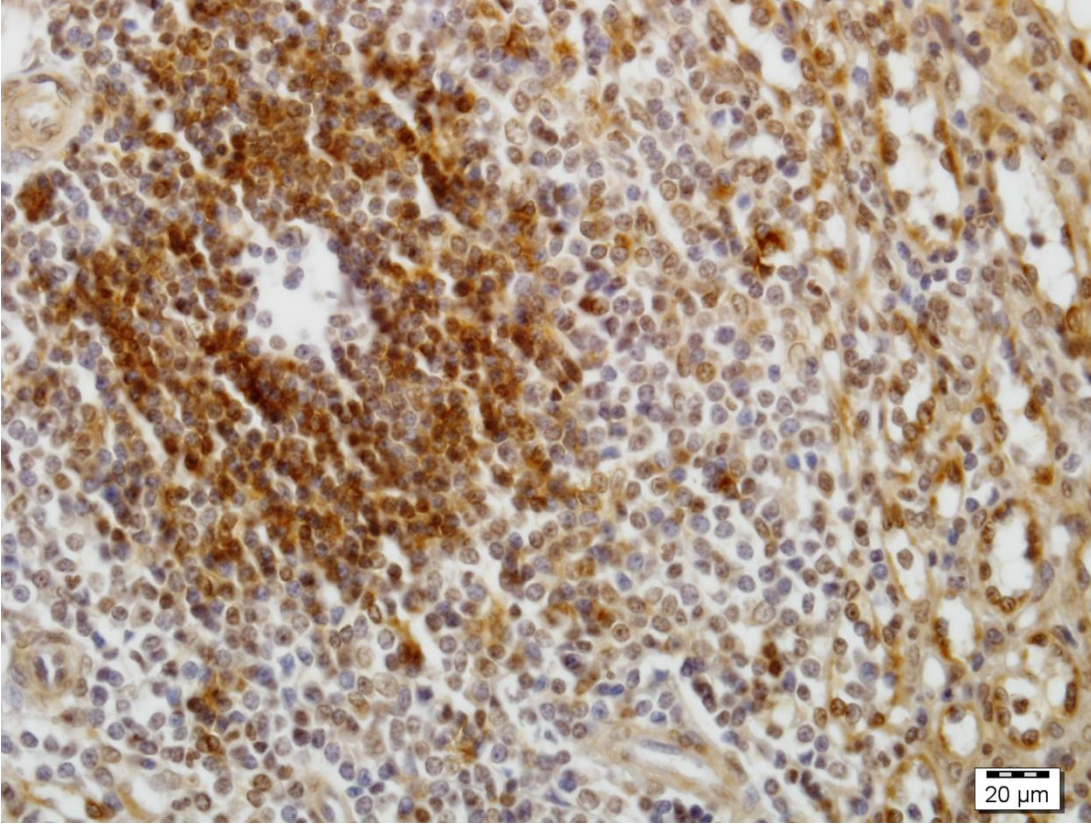
Şekil 4.7A. Neonatal 3. günde sıçan akciğeri primer antikorlar yerine PBS ile muamele edilen negatif kontrol. Bar: 50 µm.



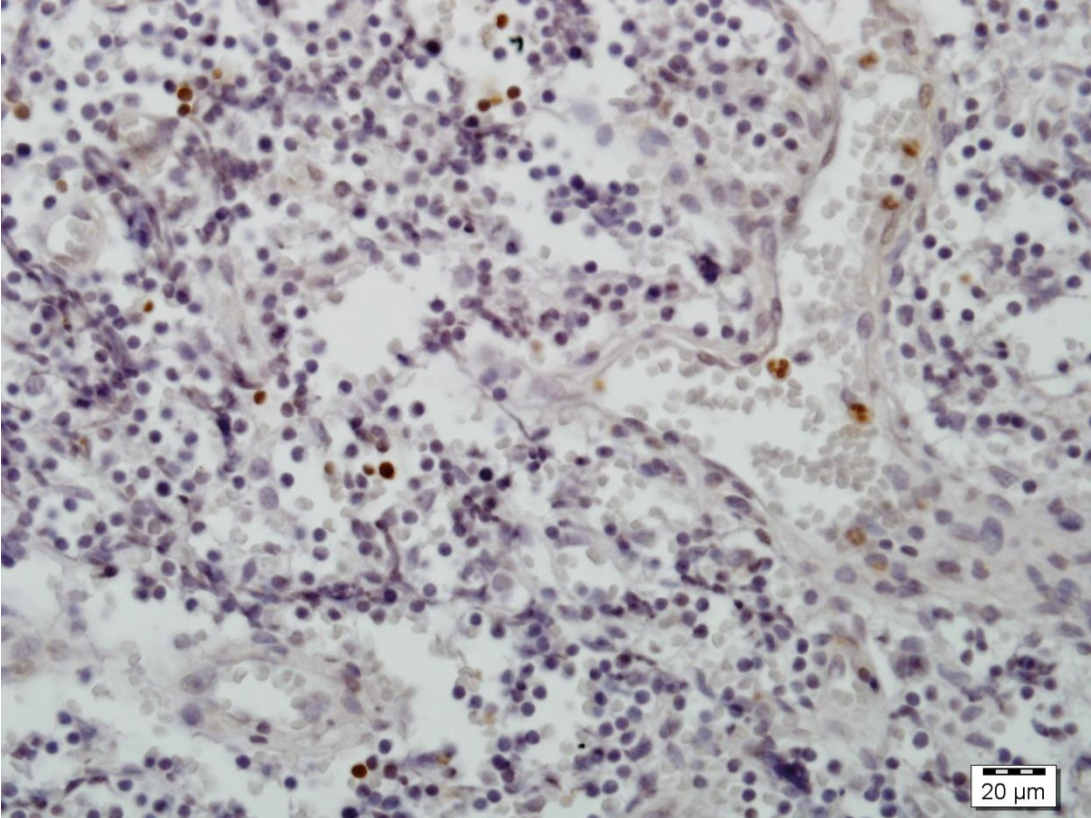
Şekil 4.8. İnsan lenf düğümünde TLR2 pozitif hücreler. Bar: 20 µm.



Şekil 4.9. İnsan plasentasında desidual hücrelerde membransel ve nüklear TLR4 pozitif immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm



Şekil 4.10. İnsan dalağında germinal merkez ve kan damarlarında TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



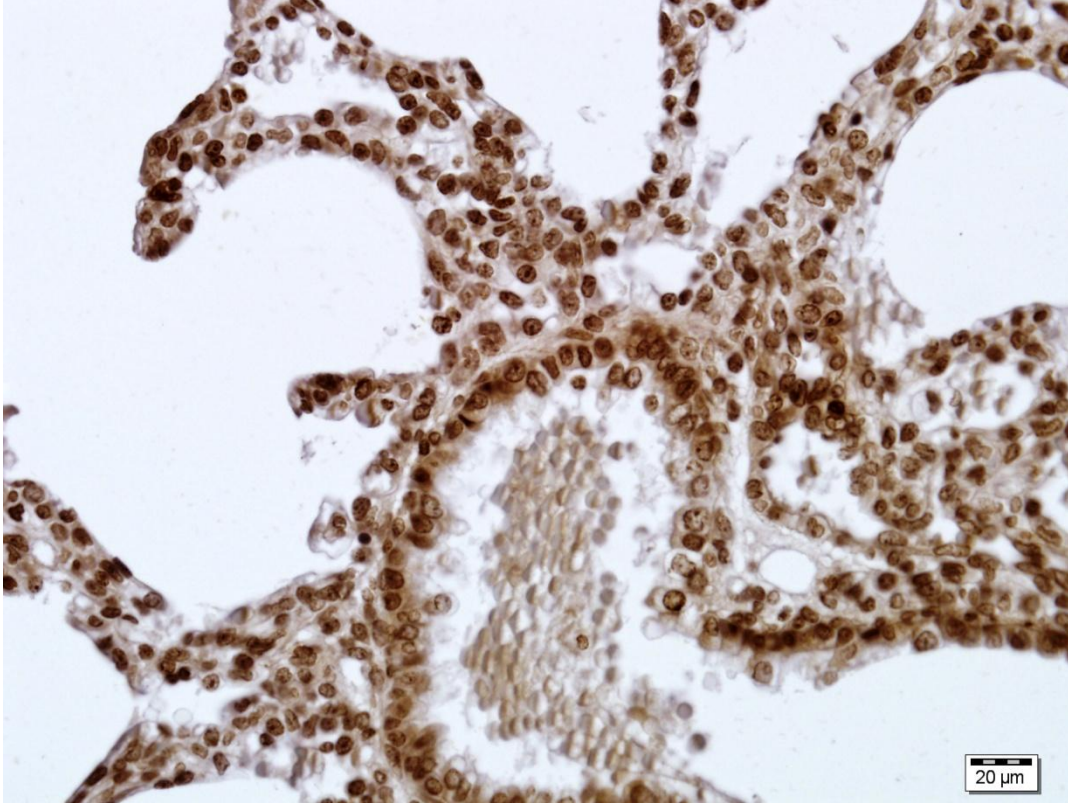
Şekil 4.11. İnsan lenf düğümünde TLR9 immunoreaktif hücreler. Bar: 20 µm.

Neonatal ve erişkin süreçteki sıçan akciğerinde TLR'lerinin lokalizasyonlarına ilişkin immunreaksiyonlar TLR2 için Şekil 4.12–4.17'de, TLR4 için Şekil 4.18–4.23'de, TLR5 için Şekil 4.24–4.29'de ve TLR9 için ise Şekil 4.30–4.36 Şekil 4.12–4.36' da gösterilmiştir.

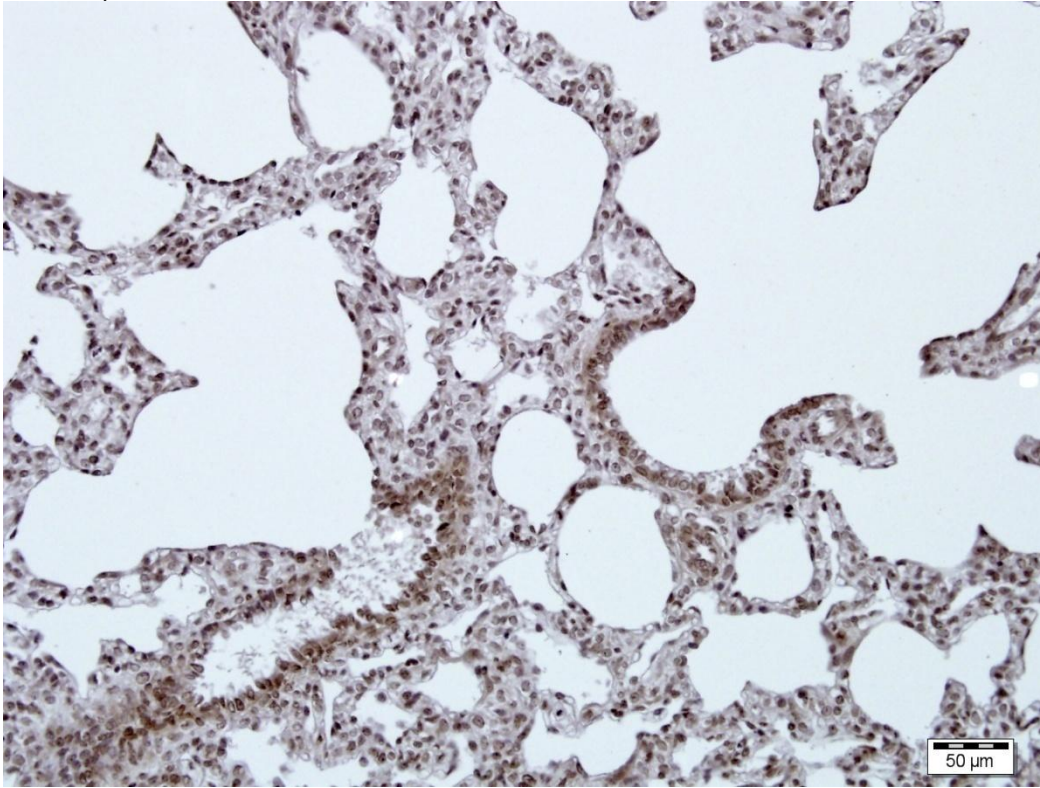
Çalışmada Toll-like reseptörlerinin gelişmekte olan sıçan akciğerindeki hücresel lokalizasyonları değerlendirildiğinde TLR2, TLR5 ve TLR9'un hem membransel ve hem de nüklear, TLR4'ün ise membransel lokalizasyon gösterdikleri belirlendi. TLR2, TLR5, TLR9'un bronchulus verus ve respiratoryusda lamina epiteliyalis katmanını oluşturan hücrelerde sitoplazmik ve nüklear reaksiyon verdikleri, TLR4'ün ise bronşiyol epitelinde reaksiyon vermediği tespit edildi. Erişkin akciğerinde TLR2, TLR5 ve TLR9'un alveol duvarındaki bazı hücrelerde eksprese olduğu görüldü. Bronşiyol epitelinde TLR'nin bazı hücrelerin çekirdeklerinde, TLR5'in bronş epitel hücrelerinin bazal sitoplazmasında, TLR9'un ise epitel hücrelerinin hem bazal hem de apikal sitoplazmalarında lokalize olduğu tespit edildi. Erişkin sıçan akciğerinde alveol duvarı, kan damarlarında membransel, bronşiyol epitel hücrelerinin bazal sitoplazmalarında ve apikal yüzeylerinde pozitif TLR4 immunoreaktivitesi gözlemlendi

Doğum sonrası birinci günden itibaren TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un akciğer dokusunda eksprese olduğu postnatal süreçte ekspresyonda herhangi bir değişikliğin bulunmadığı saptandı. Ancak Erişkin sıçanlardan alınan örneklerde TLR2, TL5 ve TLR9 ekspresyonunda çok belirgin bir azalma gözlemlendi. Gerek sakkuler ve gerekse alveolar evrelerin incelendiği, 1, 3, 5, 10 ve 15 günlük sıçanların akciğerlerinde alveol epitel hücrelerinde bronşiyollerin (hem bronchulus verus ve hem de bronchulus respiratorius) epitelinde, fibroblastlar gibi interstisyel bağdoku hücrelerinin çekirdeklerinde, ayrıca kan damarı endoteli ile medya katmanlarında ve alveol duvarındaki kapillar damar endotellerinin çekirdekleri ile hücre membranlarında, TLR2, TLR5 ve TLR9 için pozitif reaksiyon gözlenirken, erişkin akciğerinde alveol duvarındaki ve interstisyumdaki bazı hücrelerde bu reseptörler için pozitif reaksiyon tespit

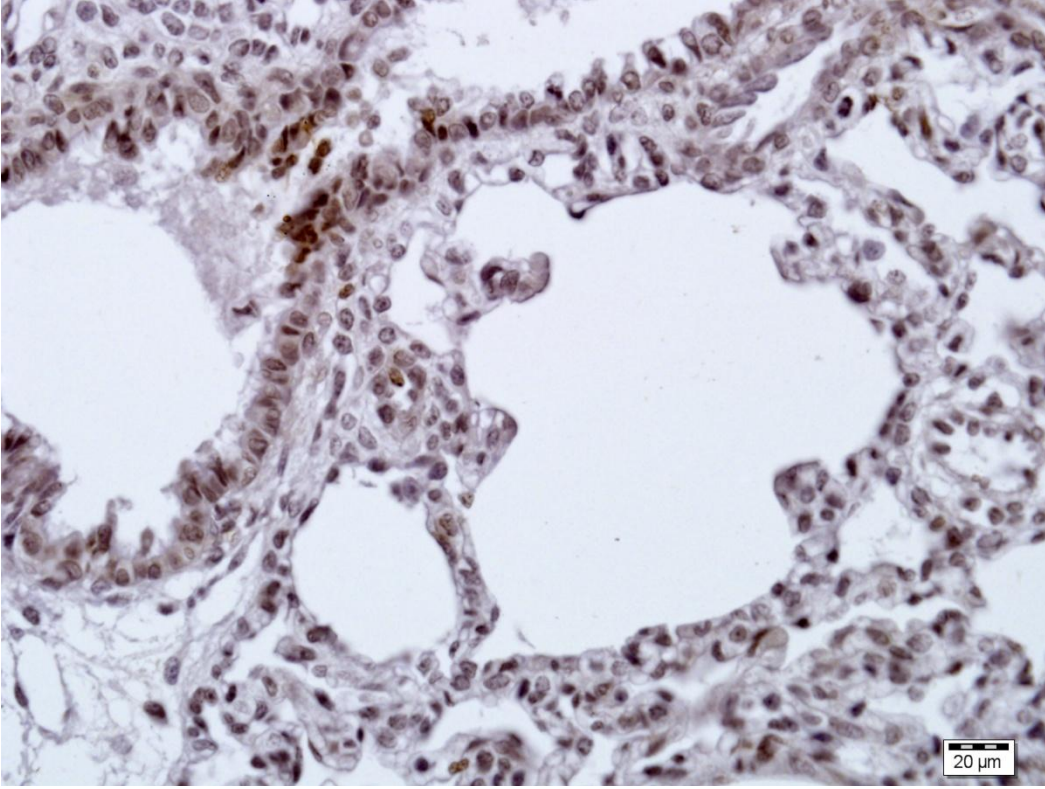
edildi. Bununla birlikte, TLR4'ün akciğer lokalizasyonu ve ekspresyonlarında yaşa bağlı herhangi bir değişikliğin bulunmadığı tespit edildi.



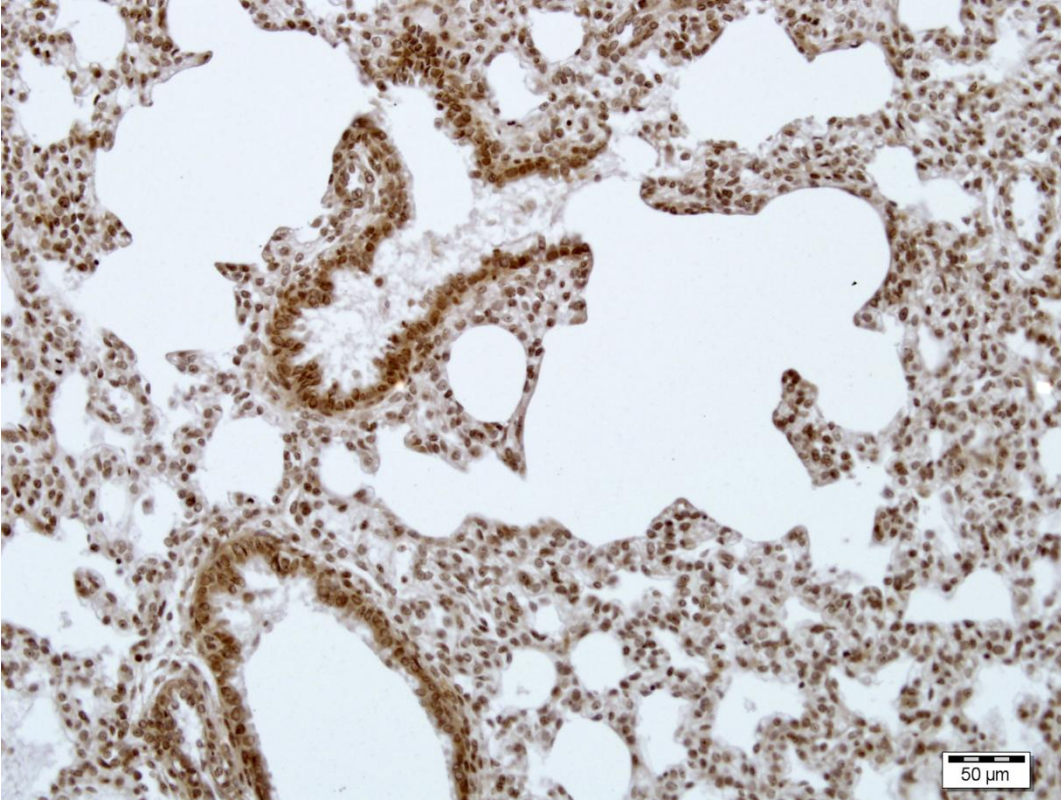
Şekil 4.12. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinde sakkulus duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



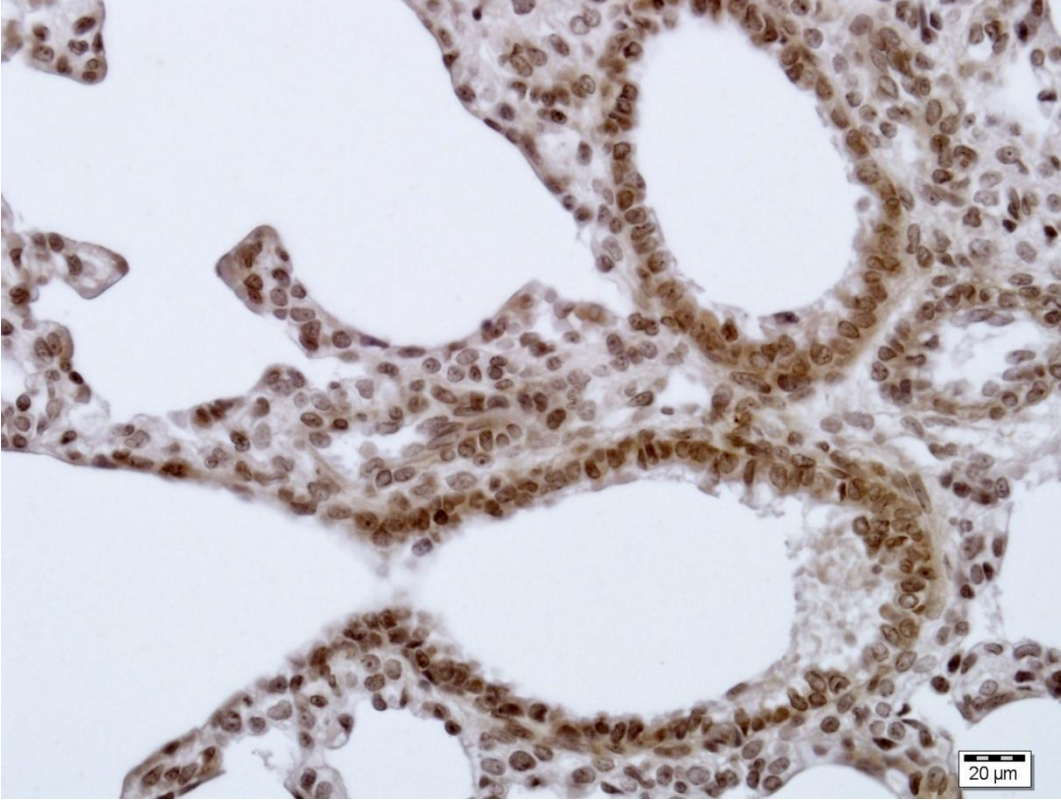
Şekil 4.13A. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



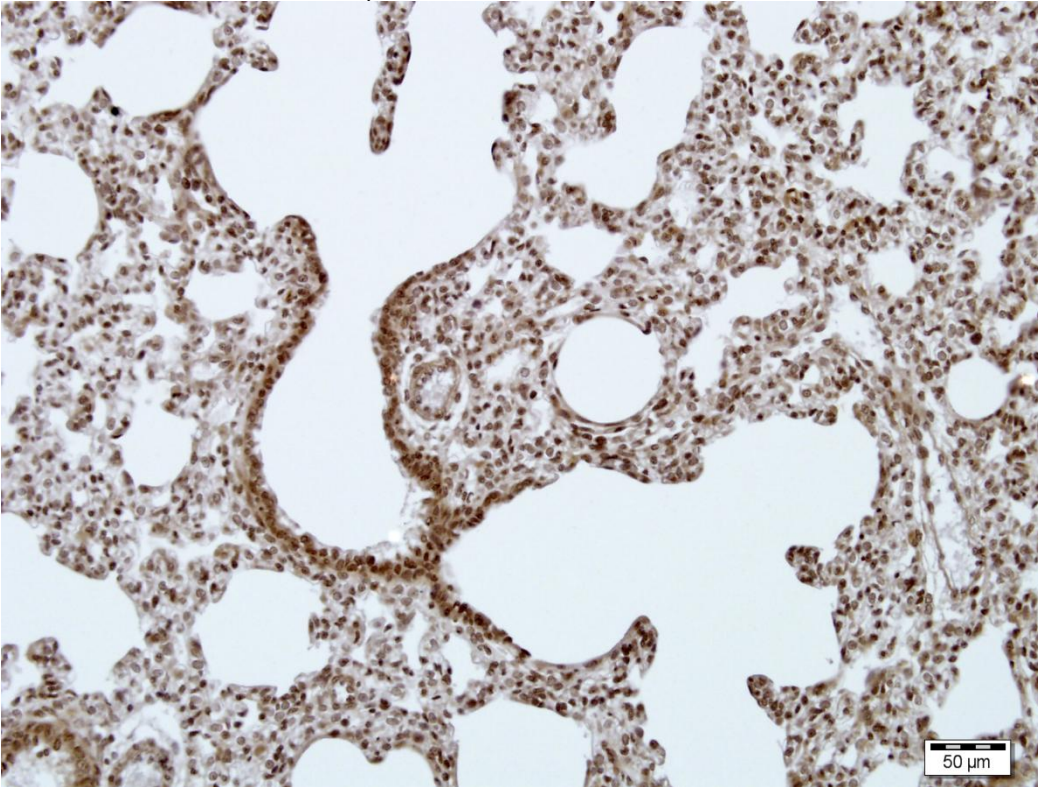
Şekil 4.13B. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm



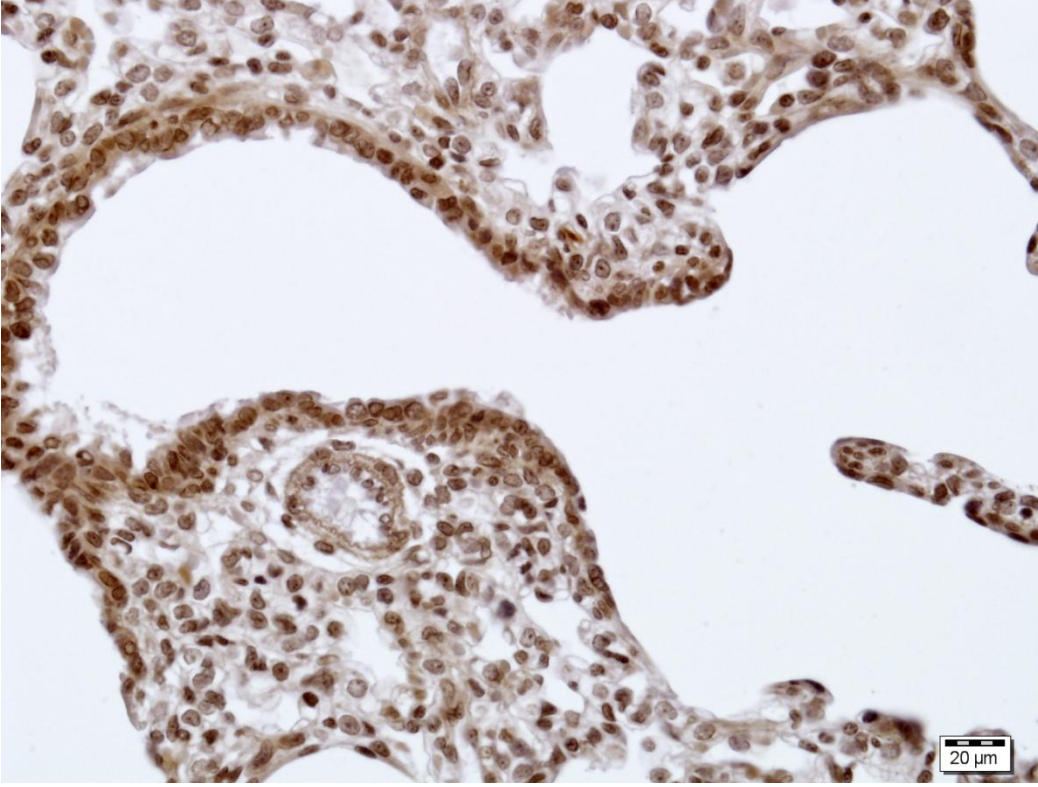
Şekil 4.14A. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm



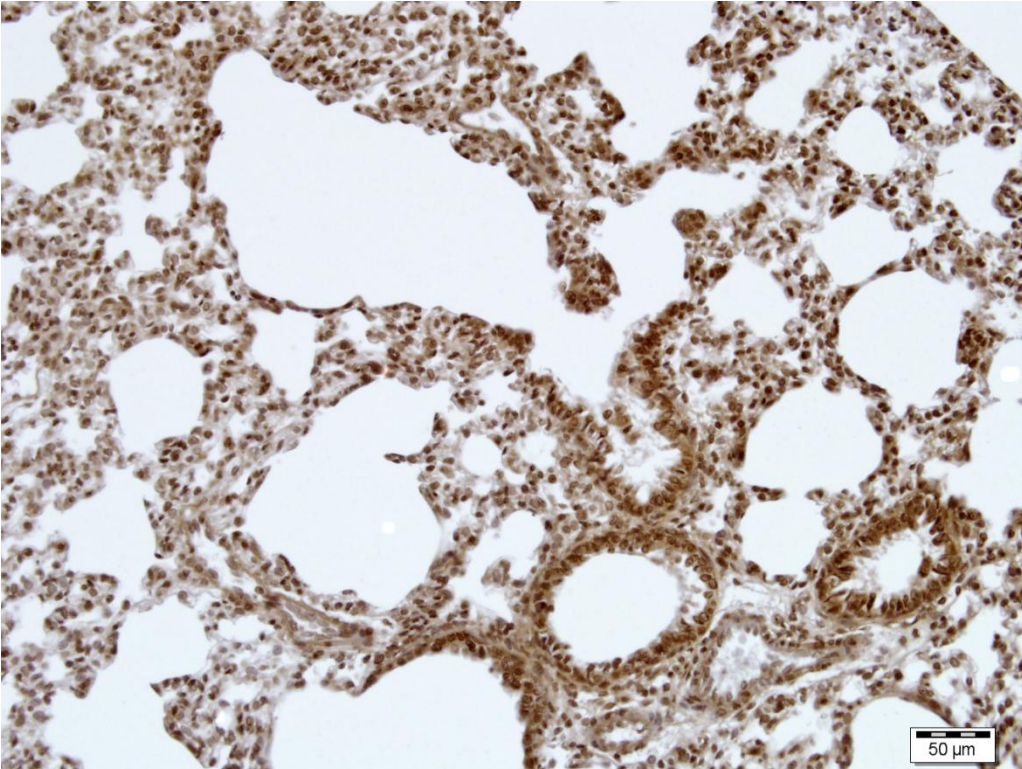
Şekil 4.14B. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm



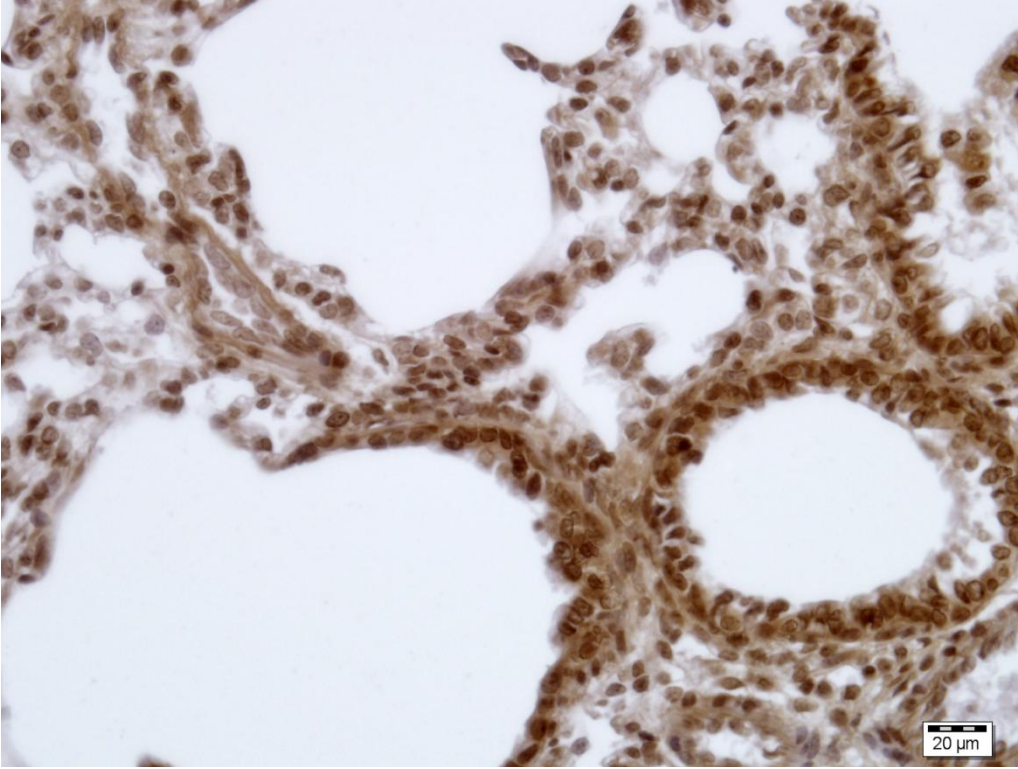
Şekil 4.15A. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



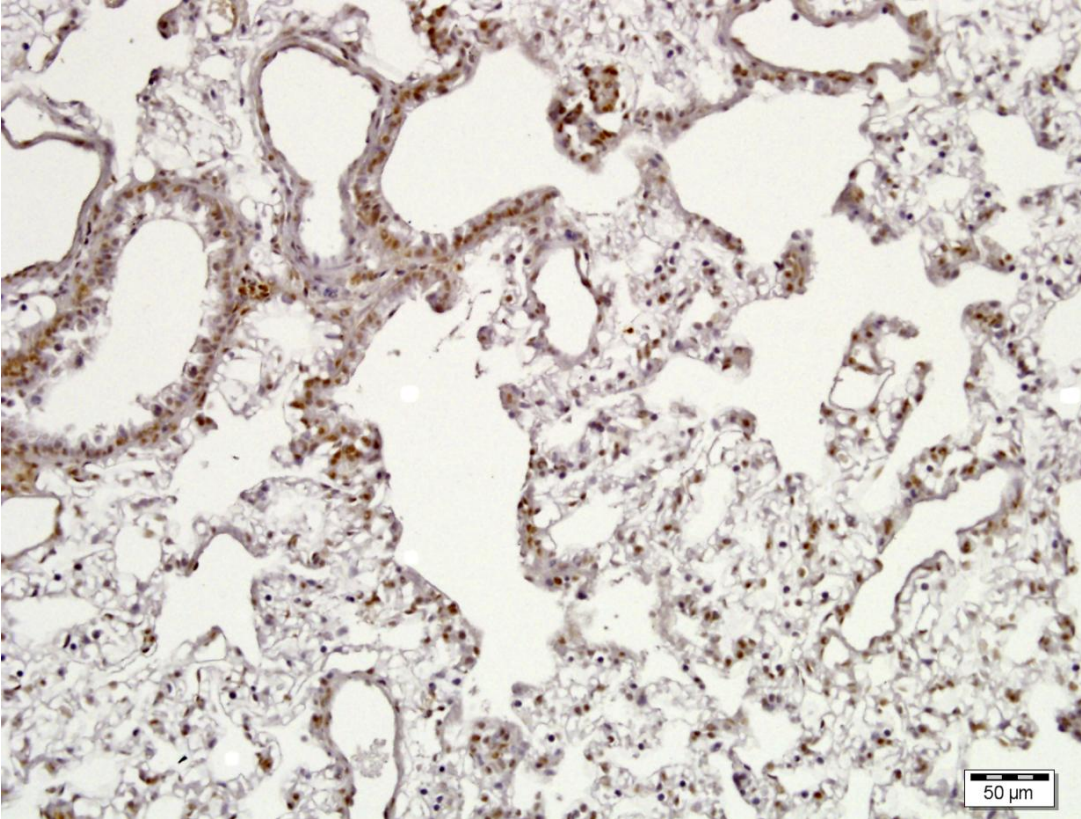
Şekil 4.15B. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



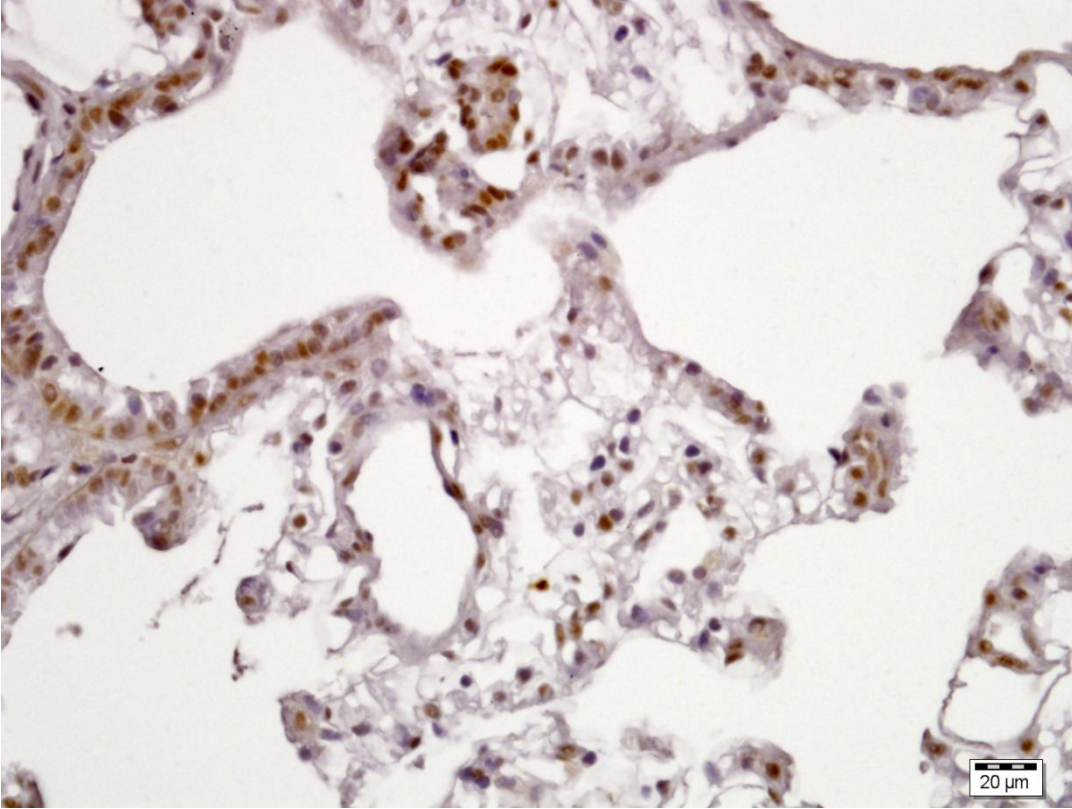
Şekil 4.16A. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



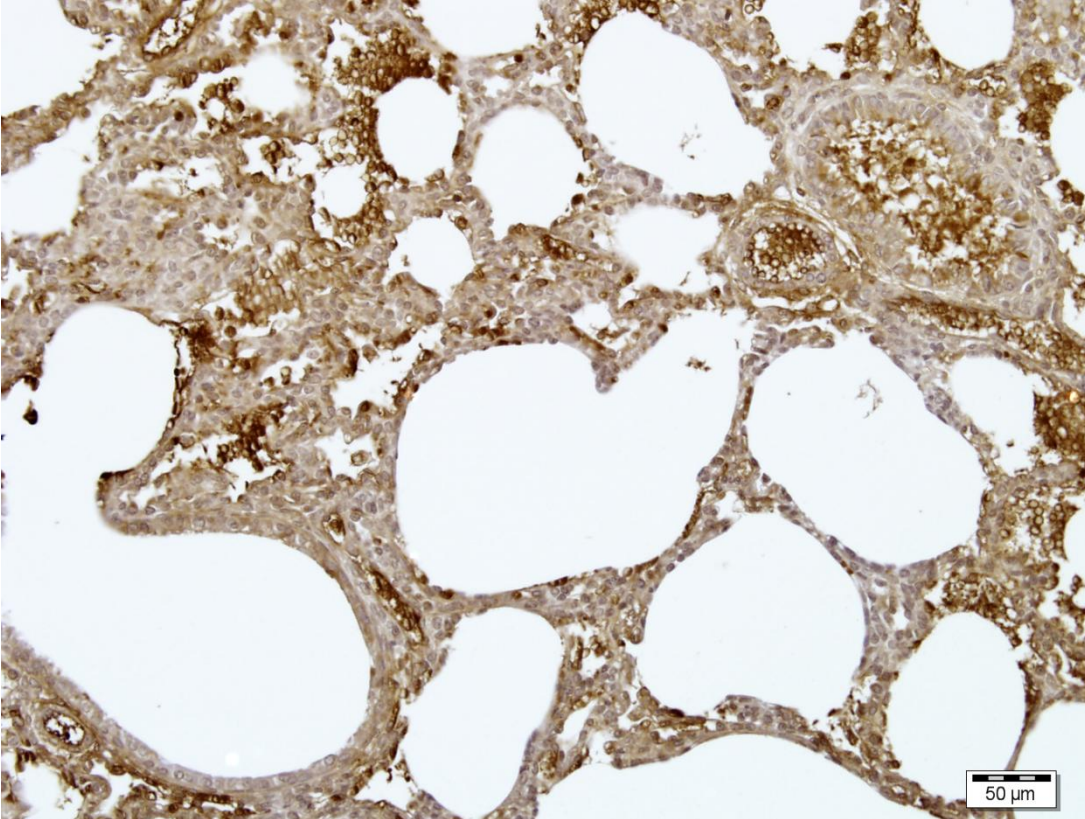
Şekil 4.16A. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



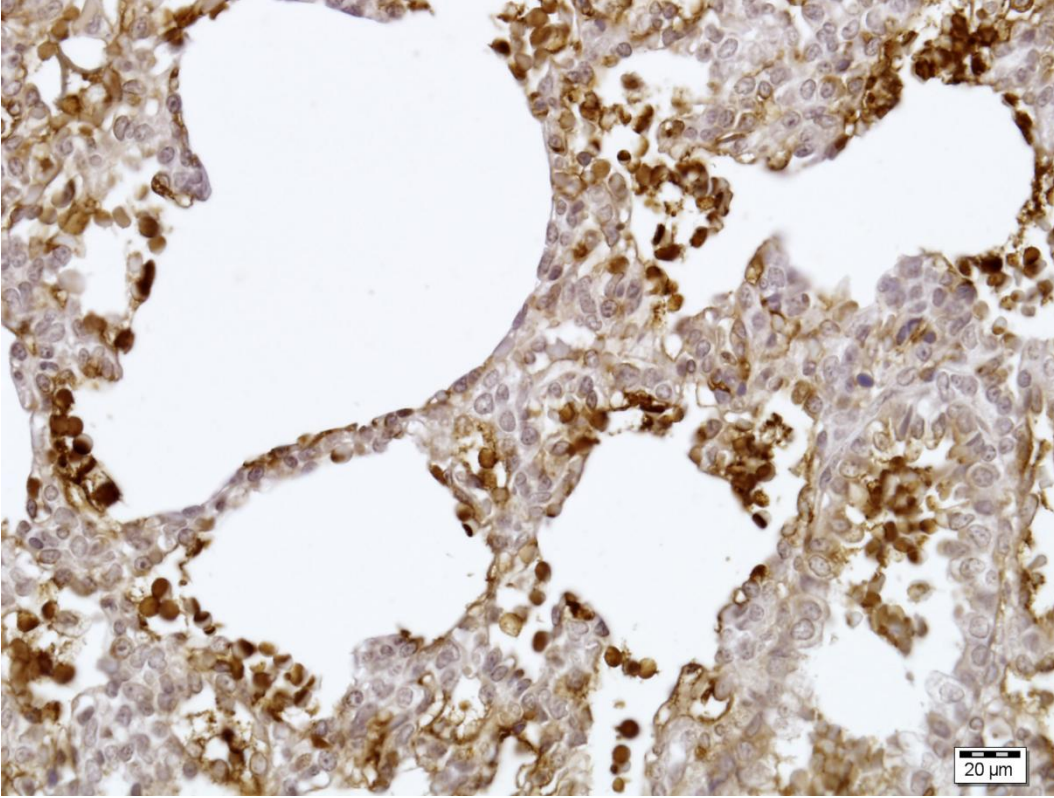
Şekil 4.17A. Erişkin sıçan akciğerinde alveol epiteli, bronşiyol epiteli, bazı interstisyel hücrelerde nüklear TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



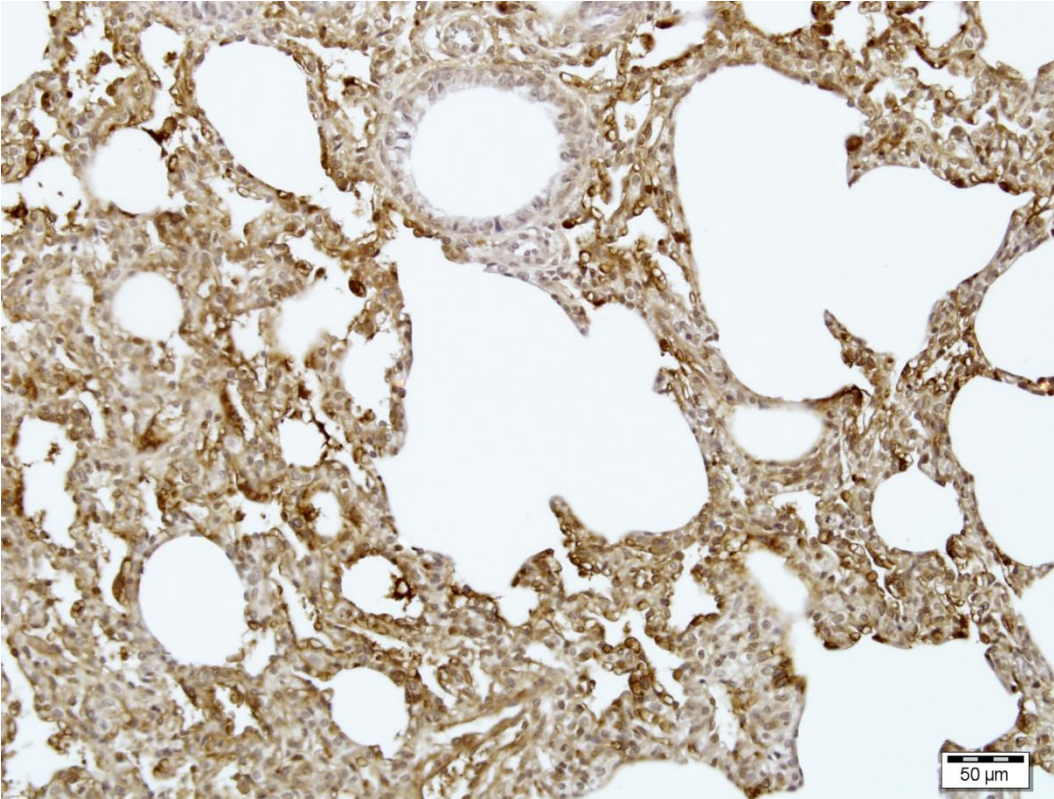
Şekil 4.17B. Erişkin sıçan akciğerinde sakkulus duvarı, bronşiyol epiteli, bazı interstisyel hücrelerde nüklear TLR2 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



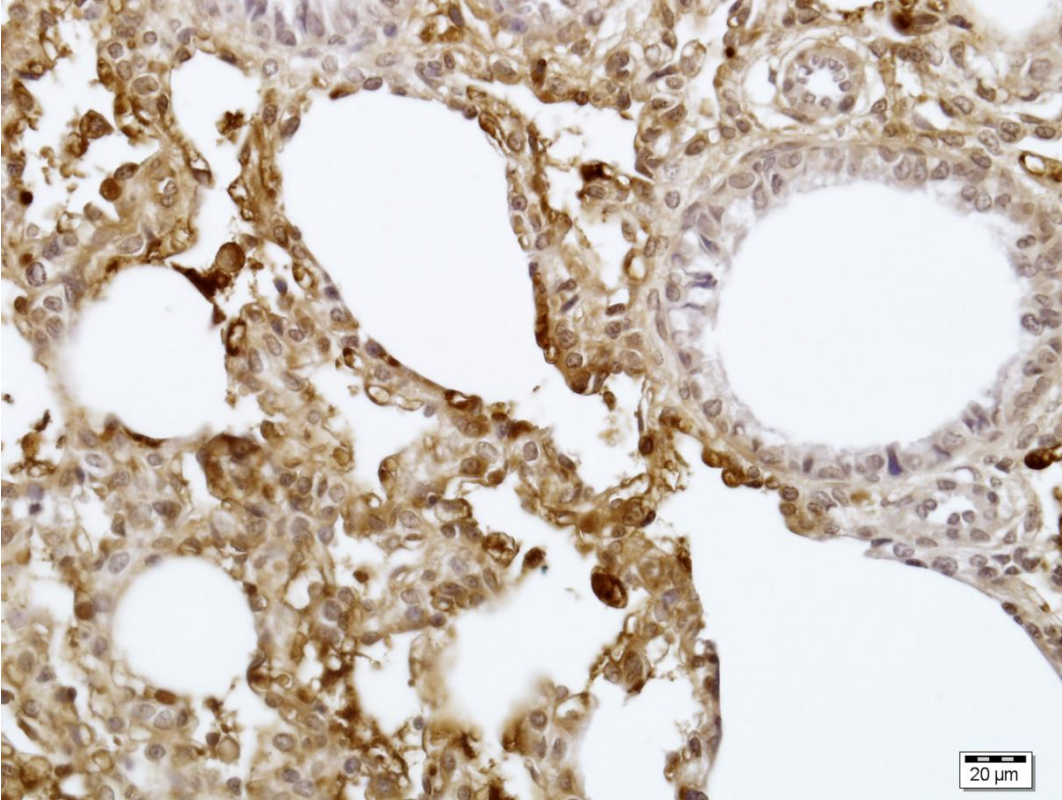
Şekil 4.18A. Neonatal 1 günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



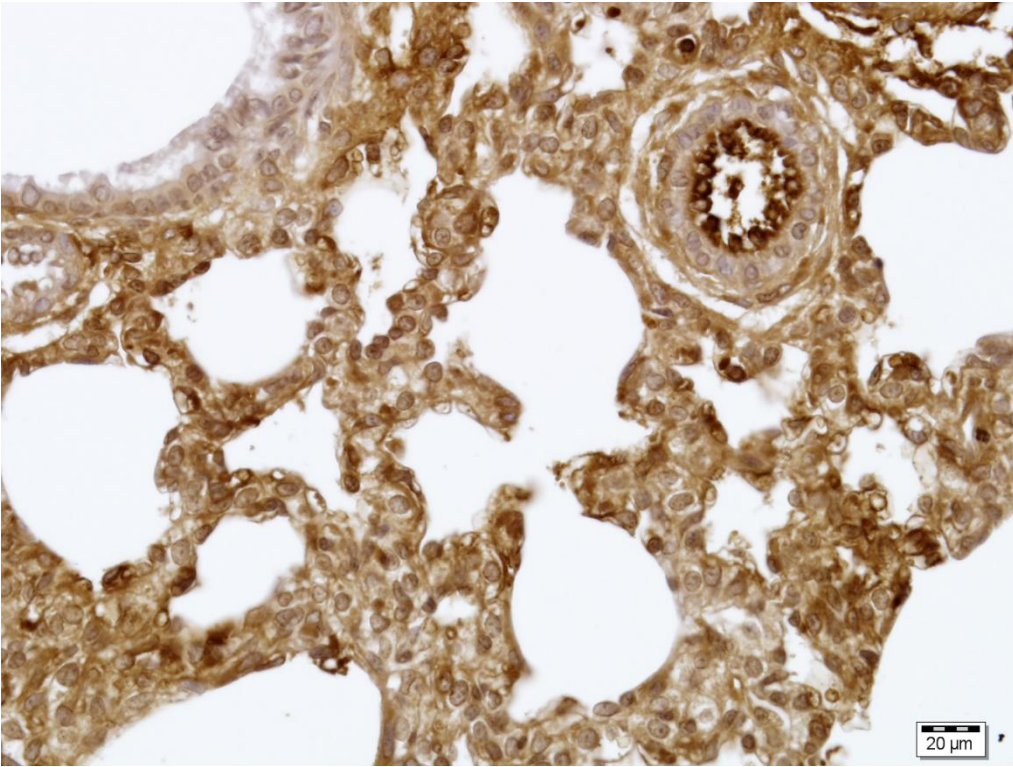
Şekil 4.18A. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



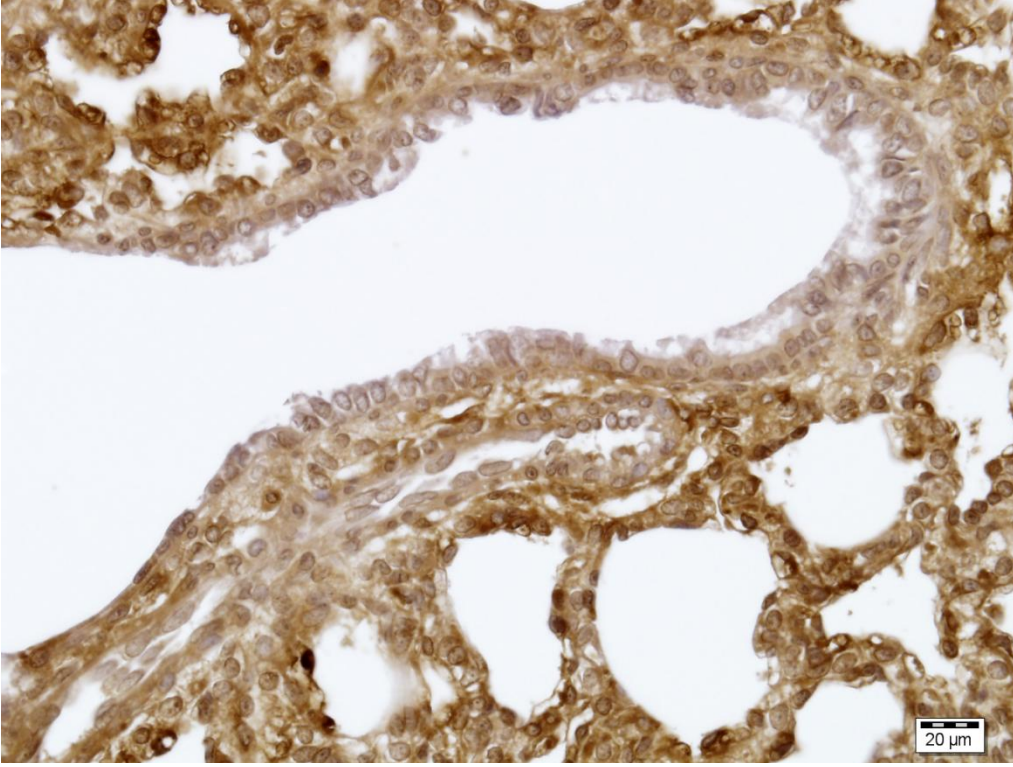
Şekil 4.19A. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronş epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



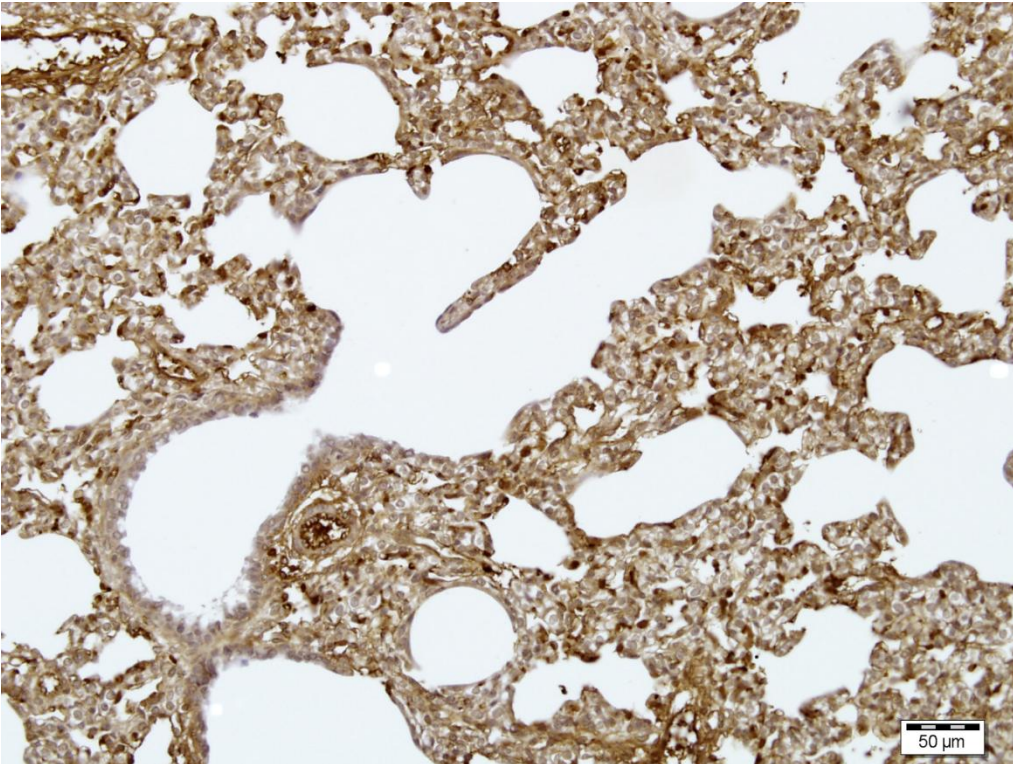
Şekil 4.19A. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



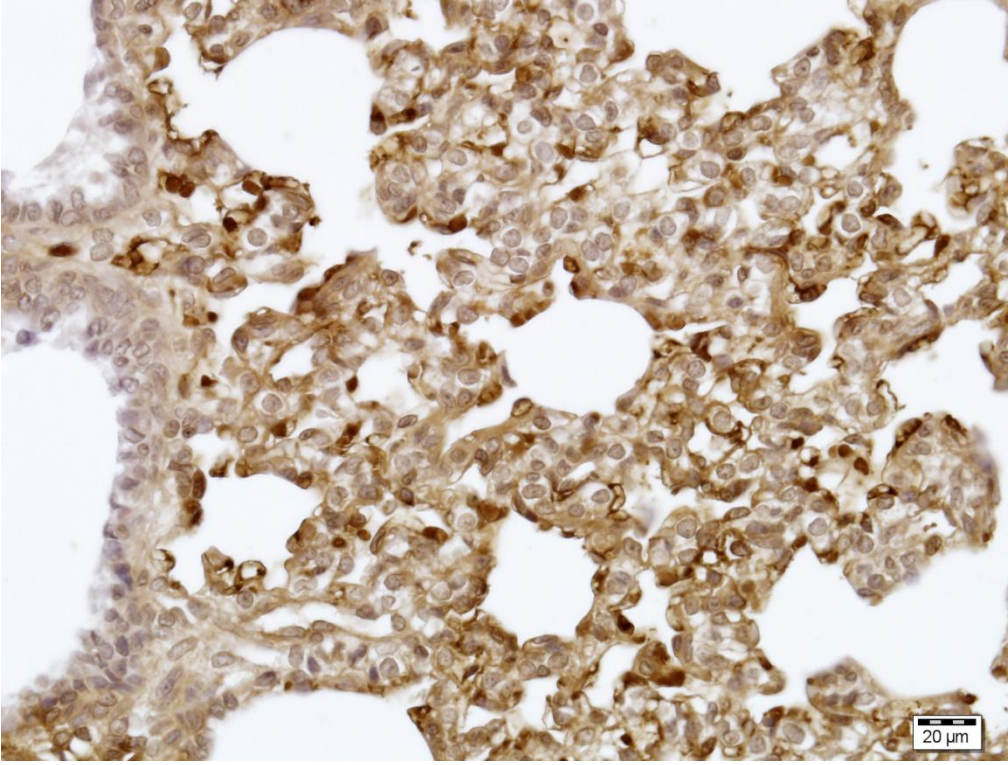
Şekil 4.20A. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



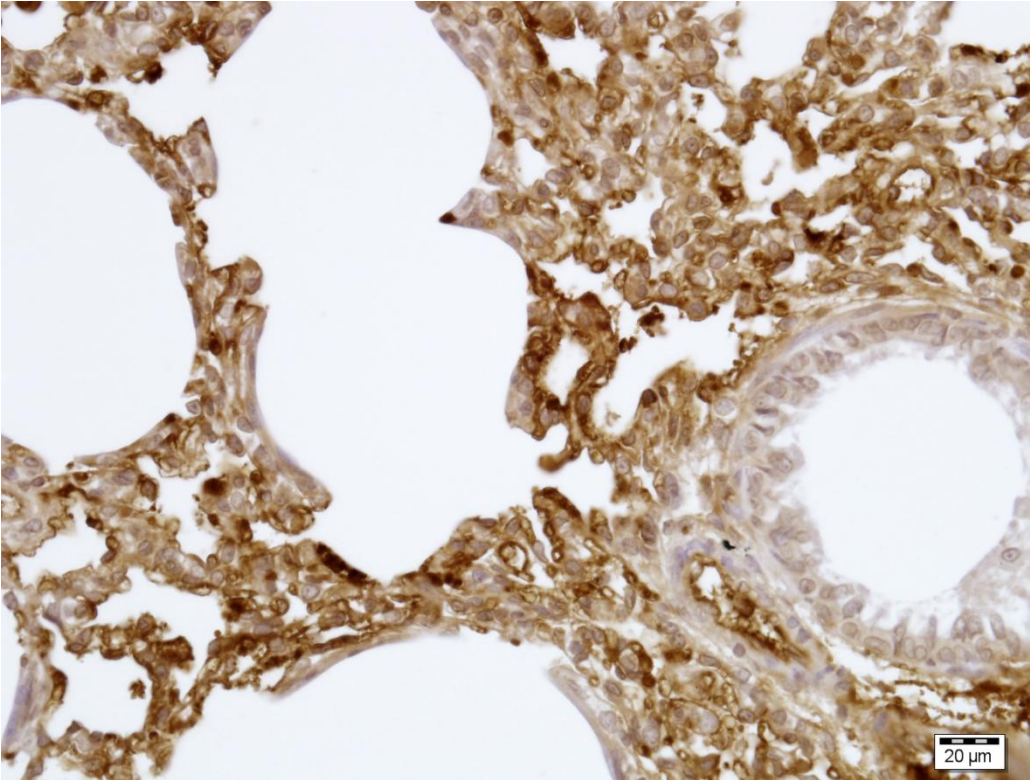
Şekil 4.20A. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



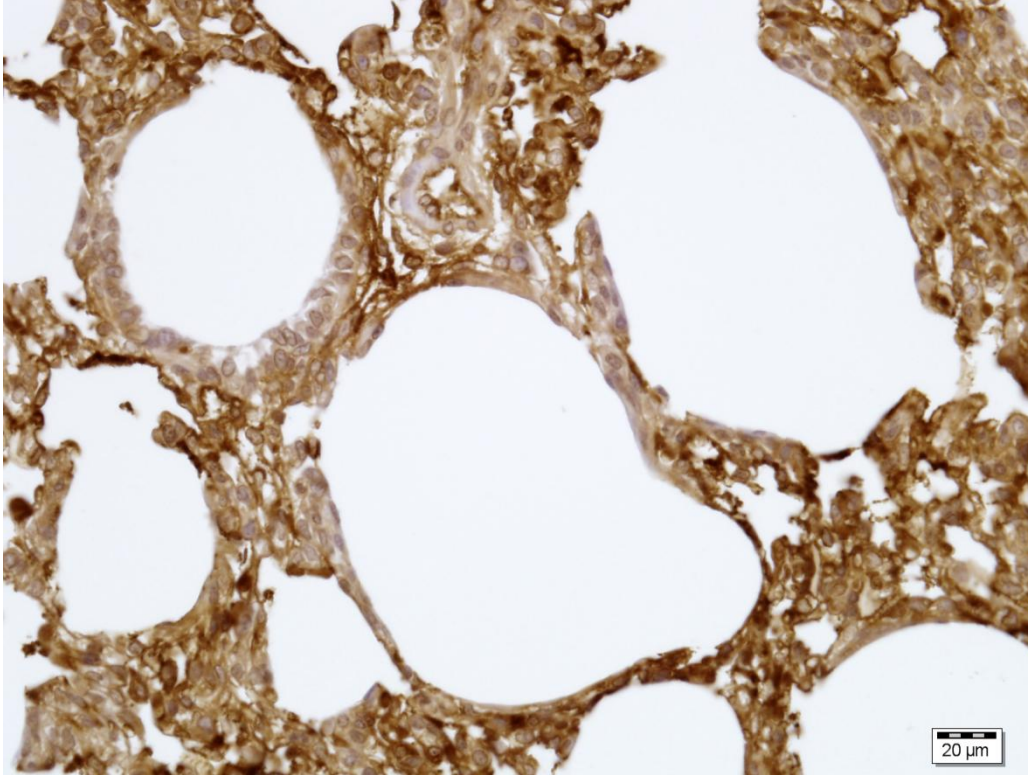
Şekil 4.21A. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



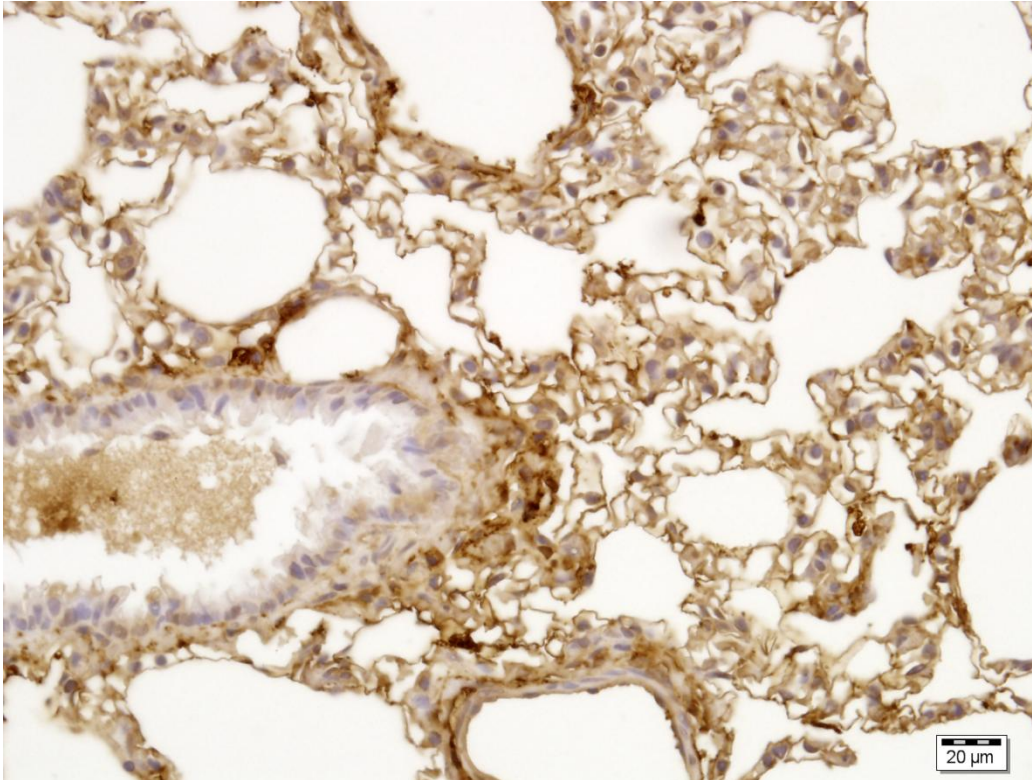
Şekil 4.21B. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



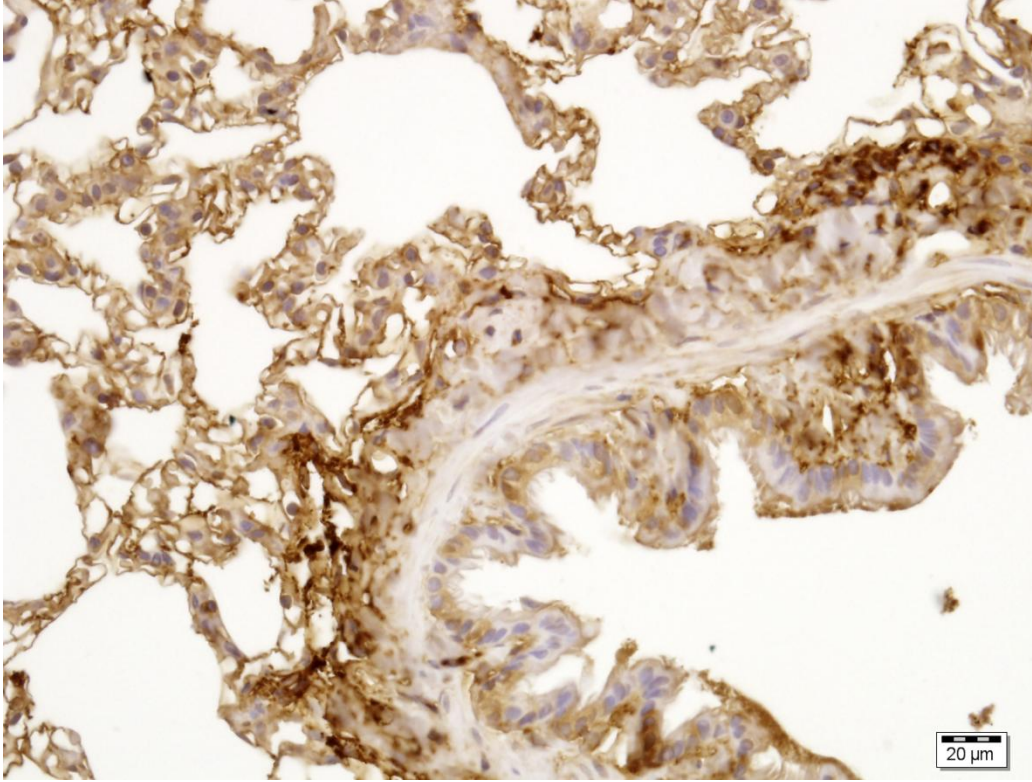
Şekil 4.22A. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



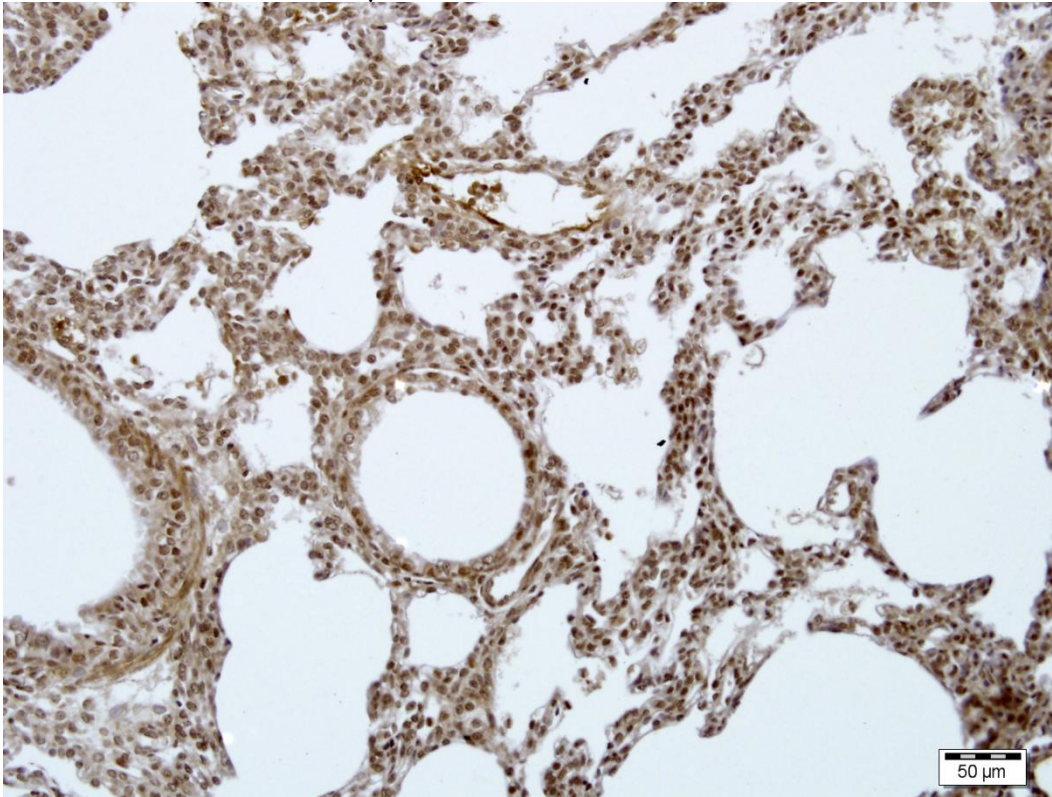
Şekil 4.22B. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli ve kan damarlarında membransel ve nüklear TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



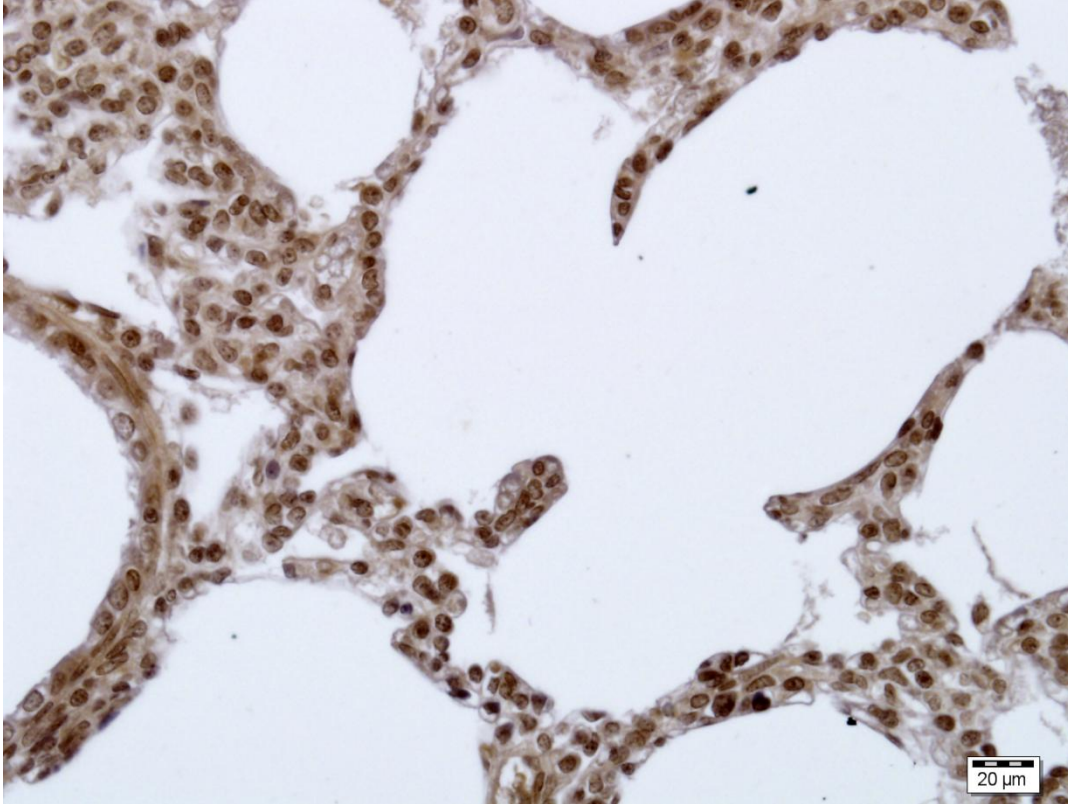
Şekil 4.23A. Erişkin sıçan akciğerinde alveol duvarı, kan damarlarında membransel, bronşiyol epitel hücrelerinin bazal sitoplazmalarında pozitif TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



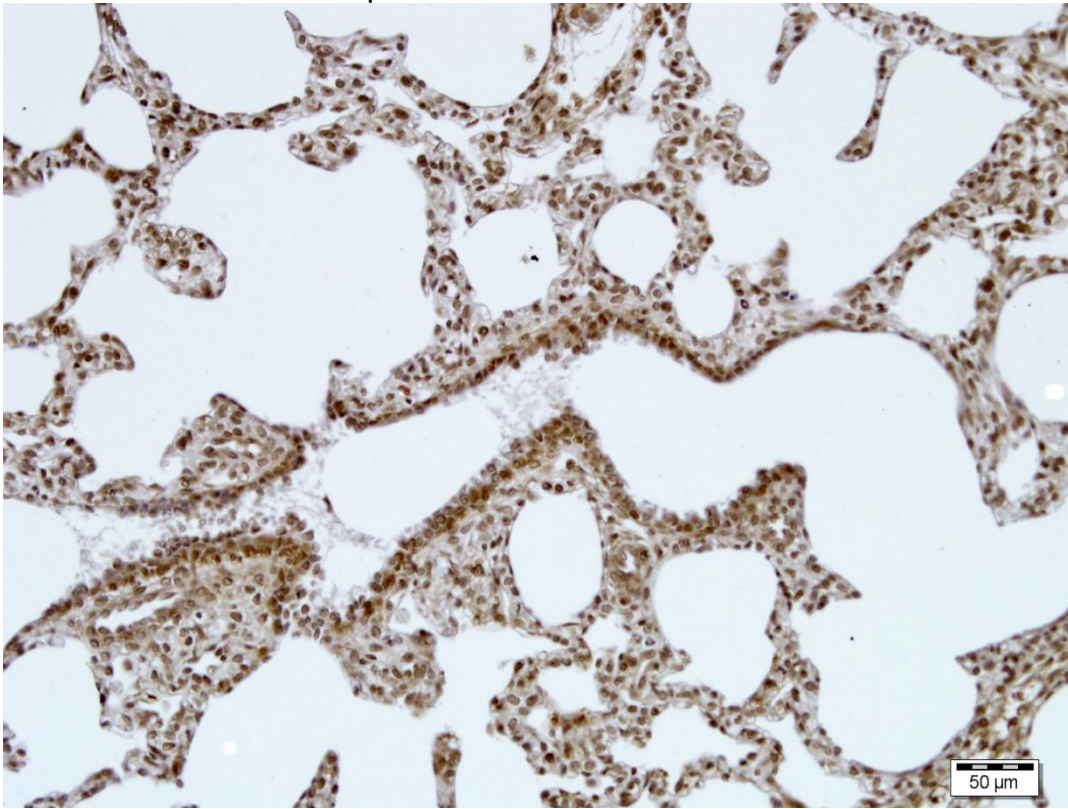
Şekil 4.23B. Erişkin sıçan akciğerinde alveol duvarı, kan damarlarında membransel, bronşiyol epitel hücrelerinin bazal sitoplazmalarında ve apikal yüzeylerinde pozitif TLR4 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



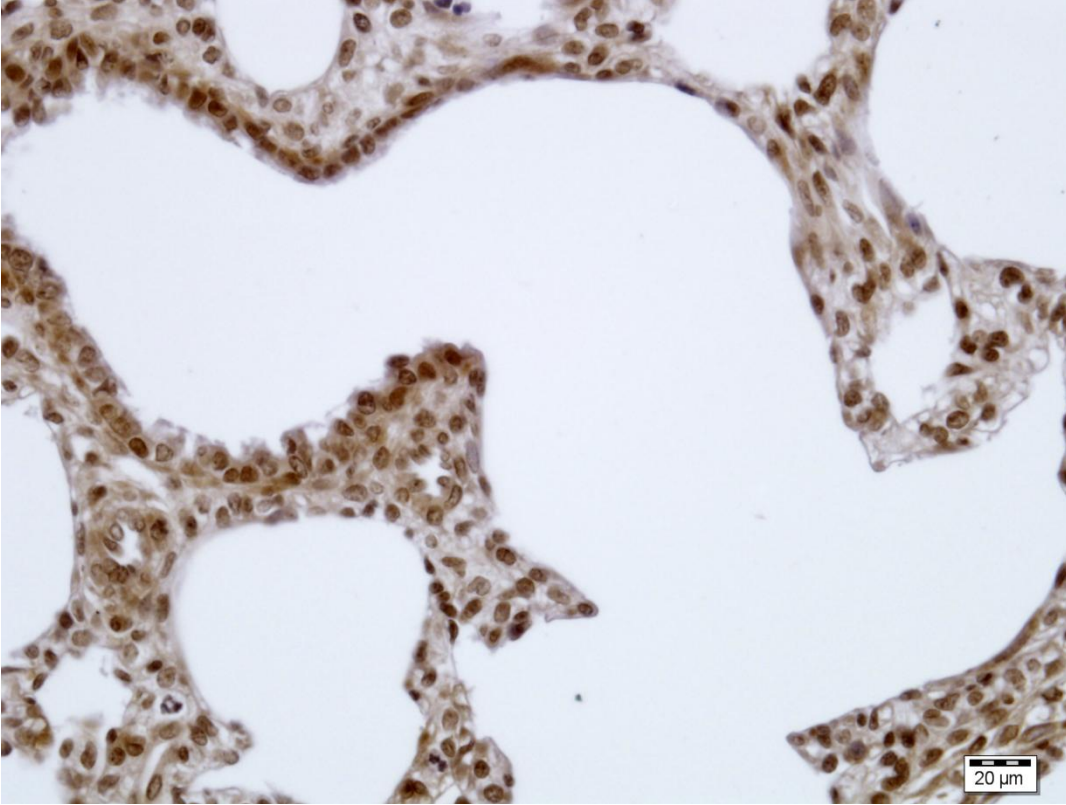
Şekil 4.24A. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



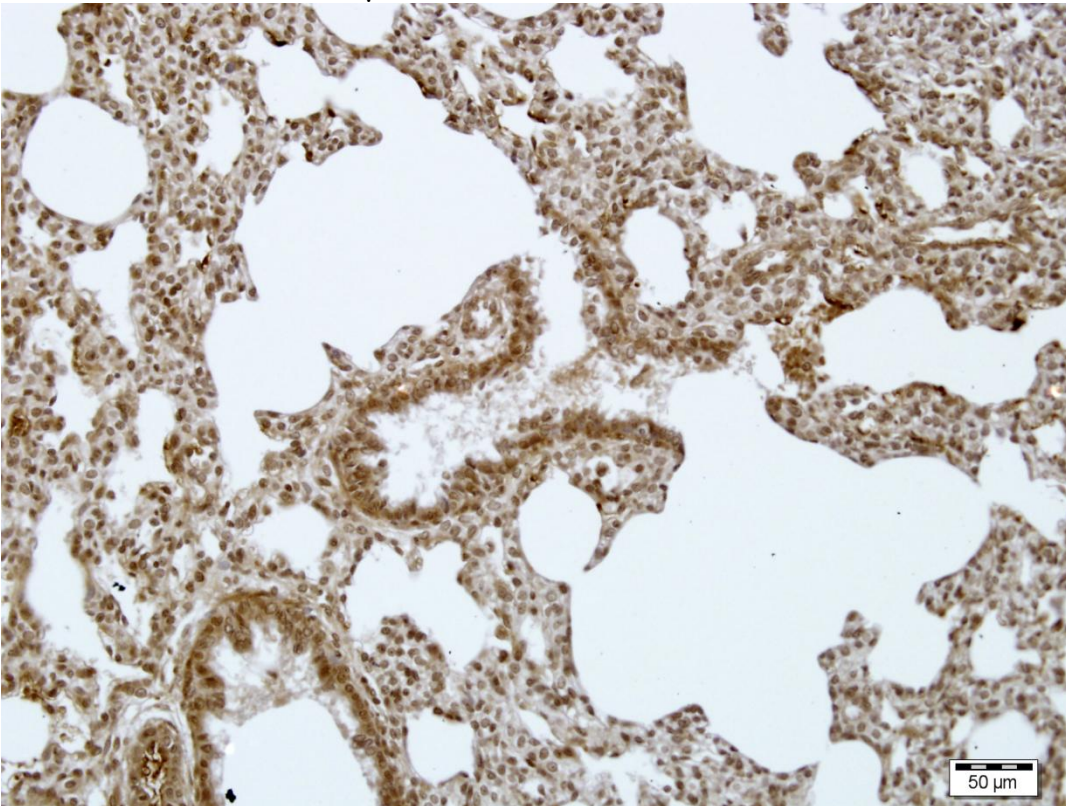
Şekil 4.24A. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



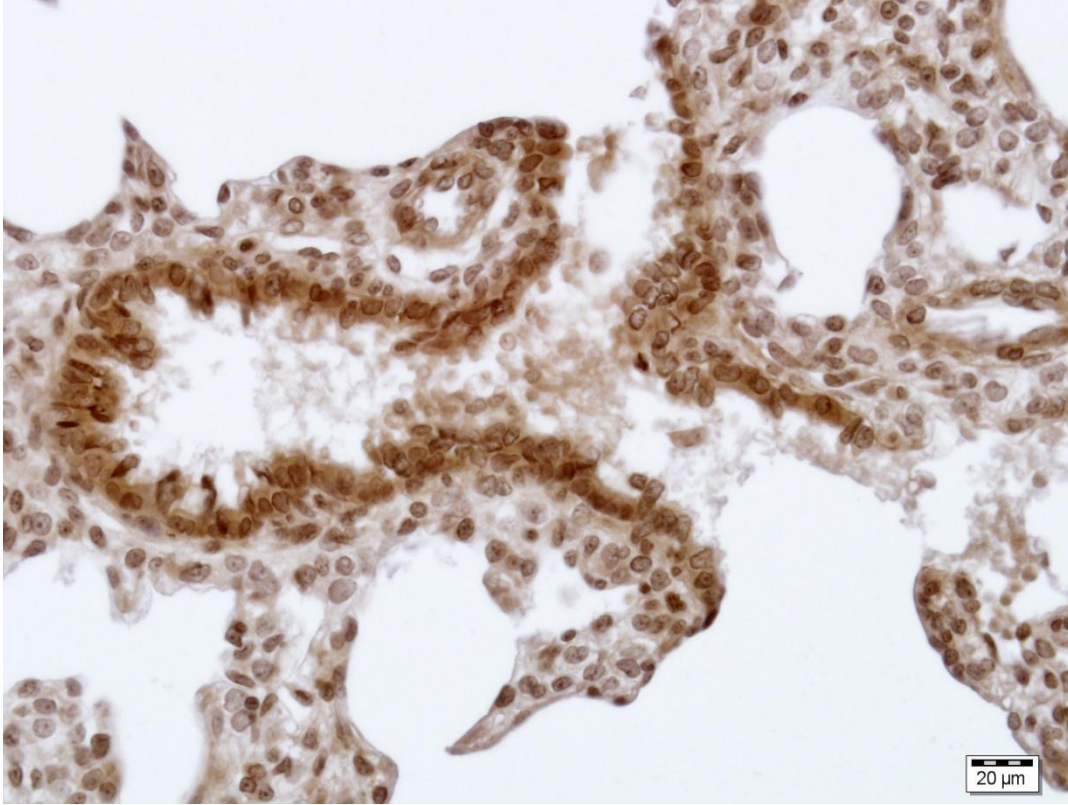
Şekil 4.25A. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



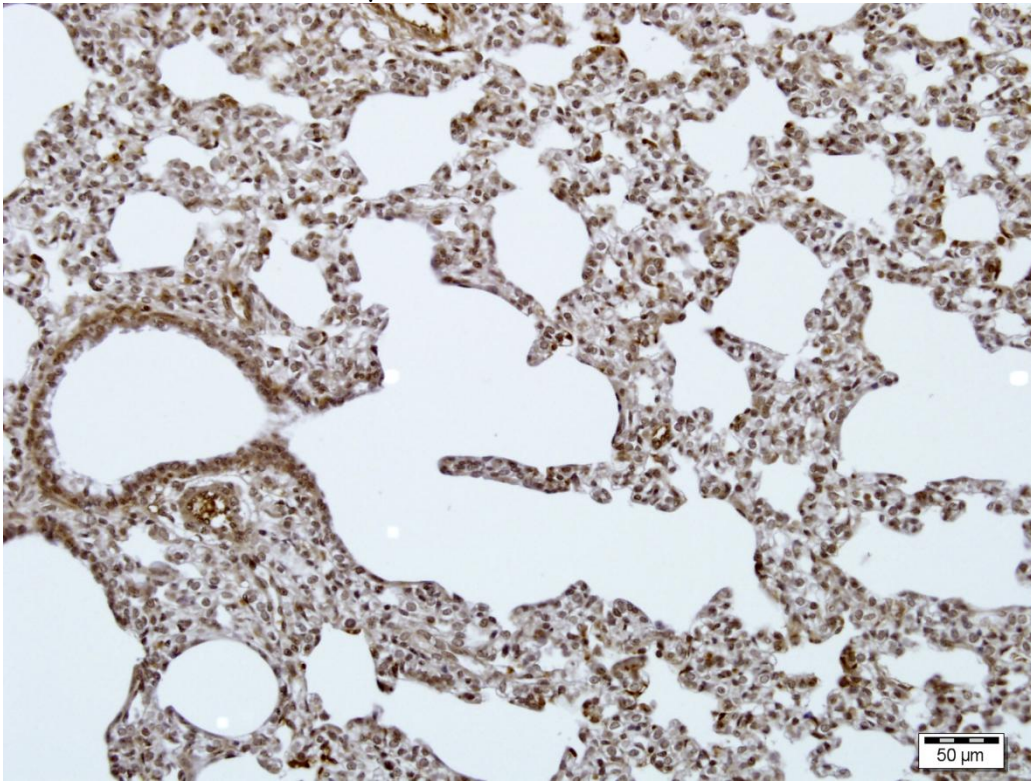
Şekil 4.25B. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



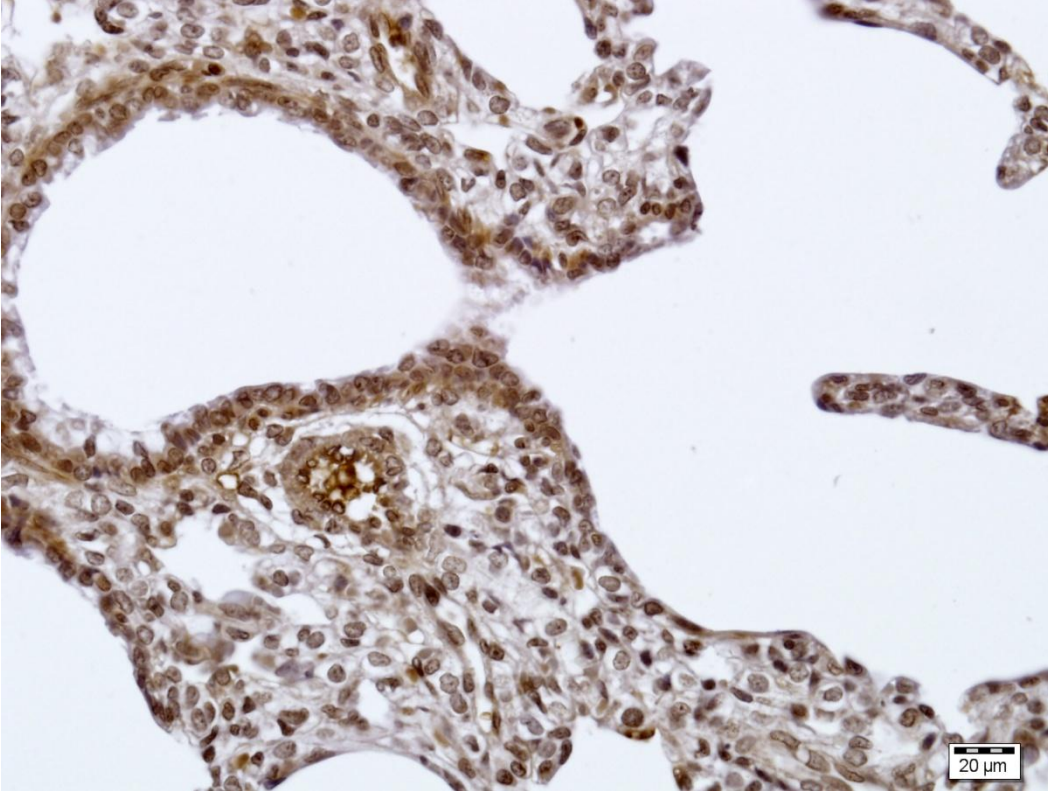
Şekil 4.26A. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



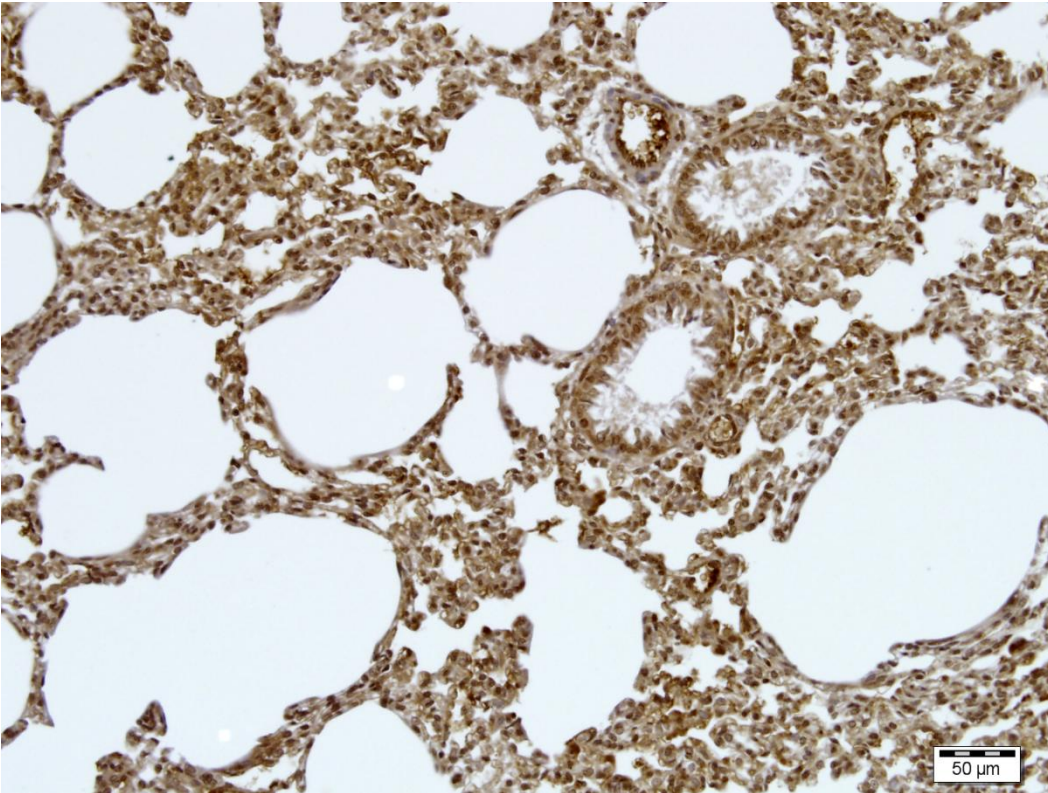
Şekil 4.26B. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



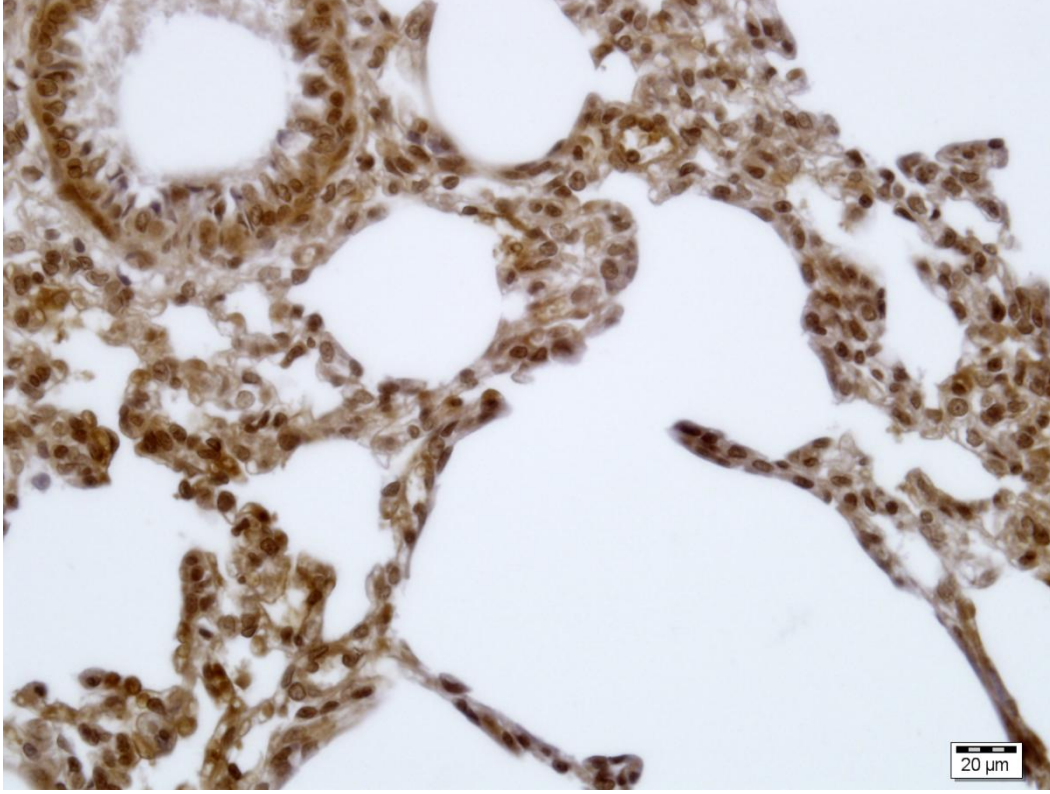
Şekil 4.27A. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



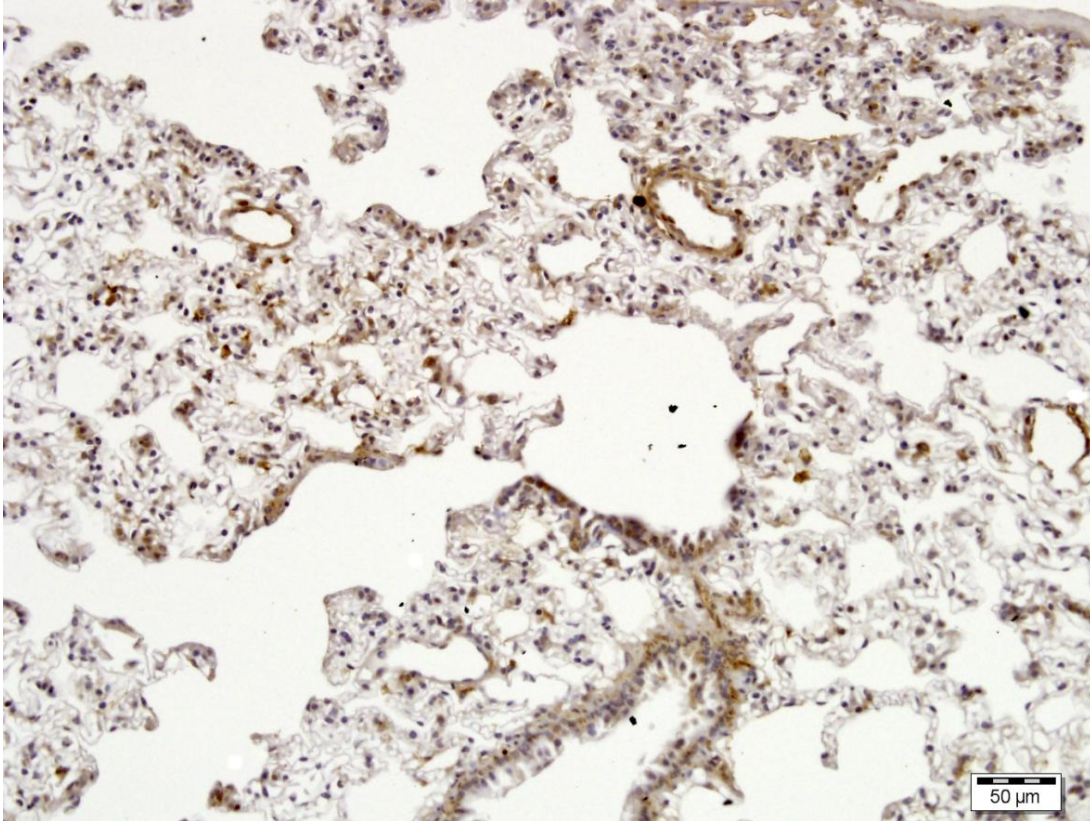
Şekil 4.27B. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



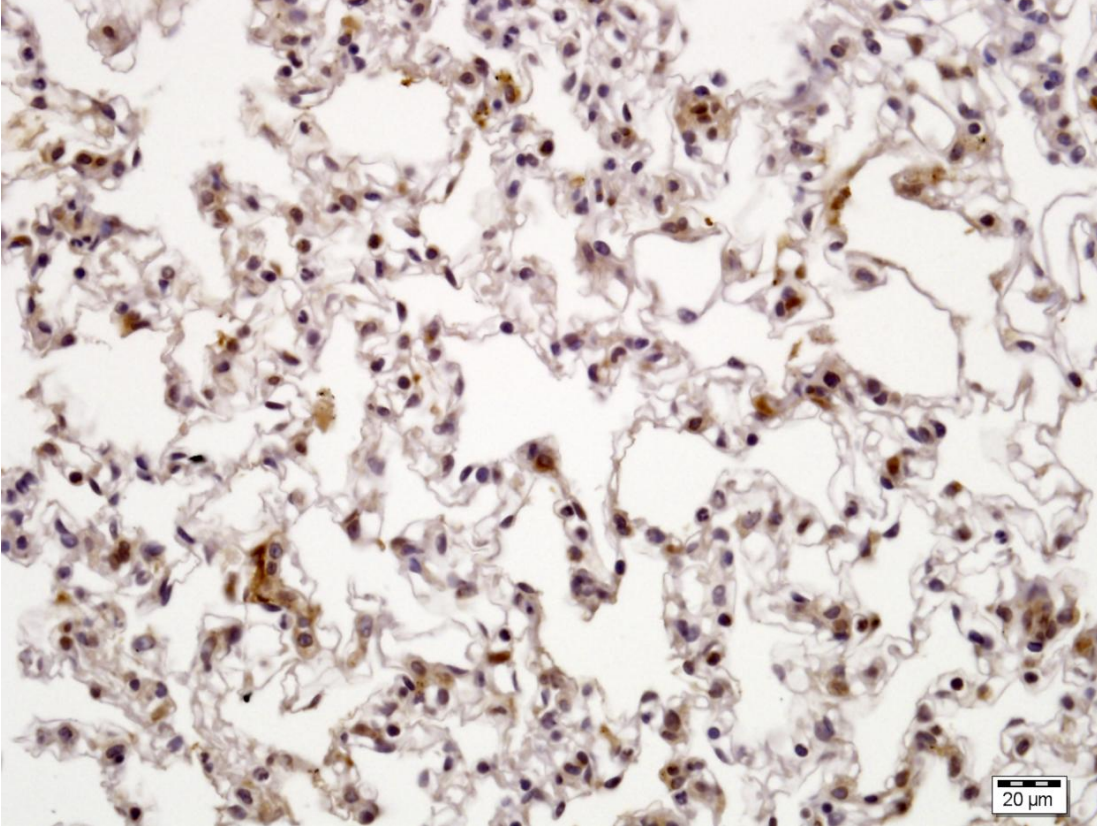
Şekil 4.28A. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



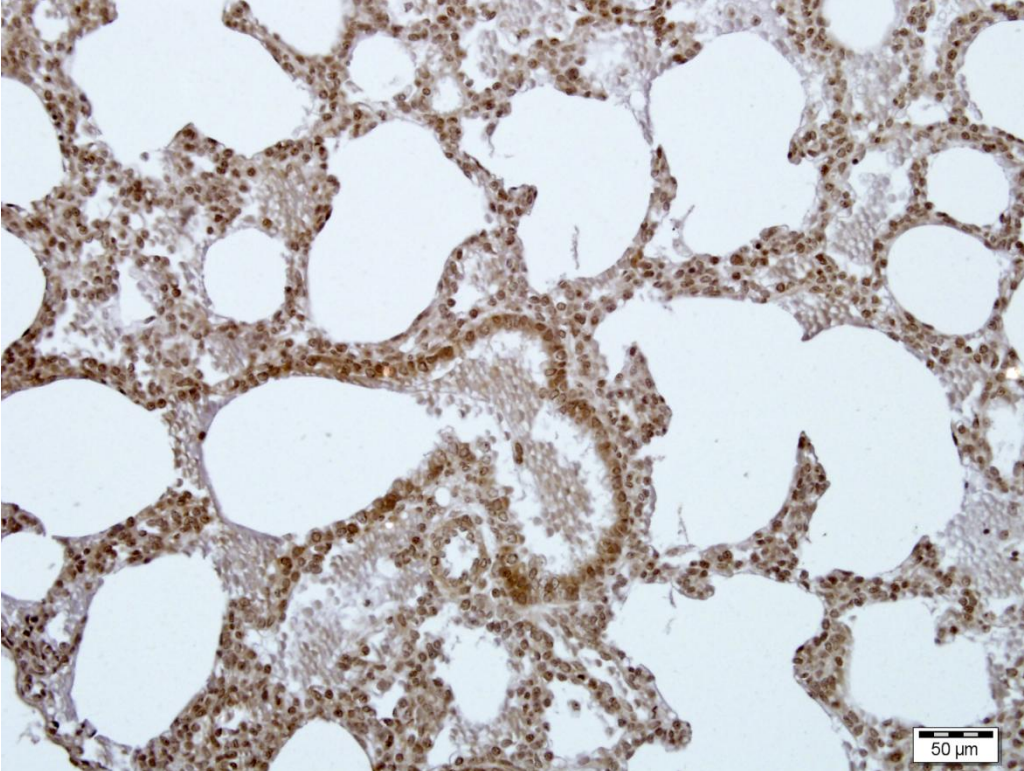
Şekil 4.28B. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



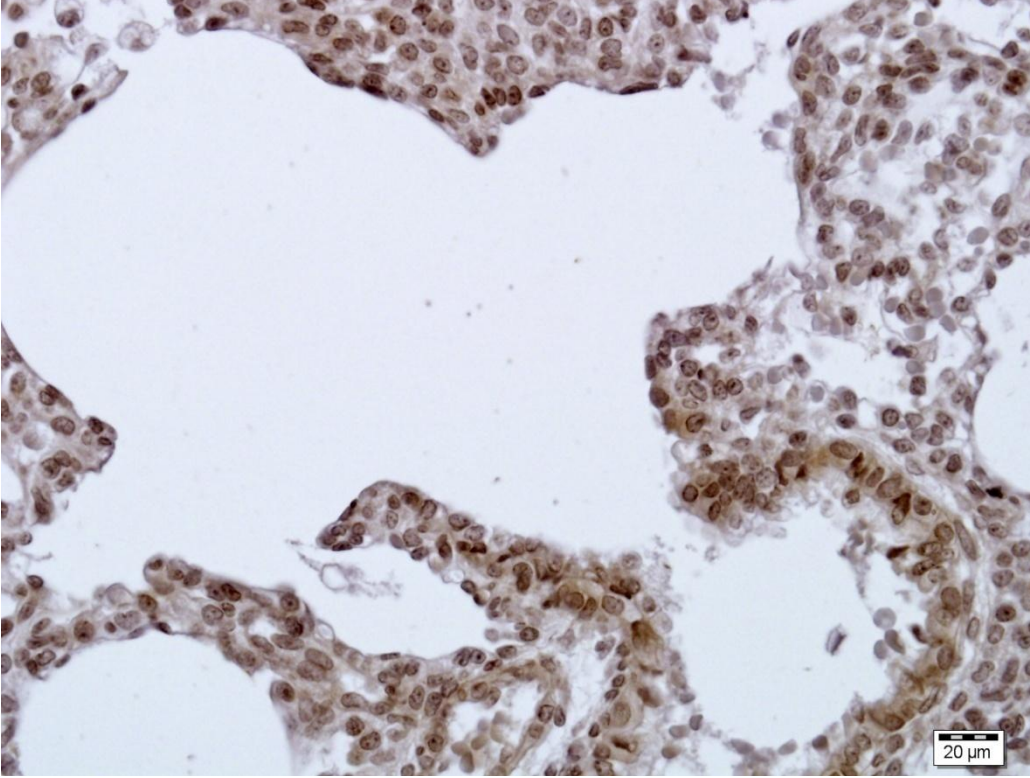
Şekil 4.29A. Erişkin sıçan akciğerinde alveol epiteli, bronşiyol epiteli, bazı interstisyel hücrelerde nüklear TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



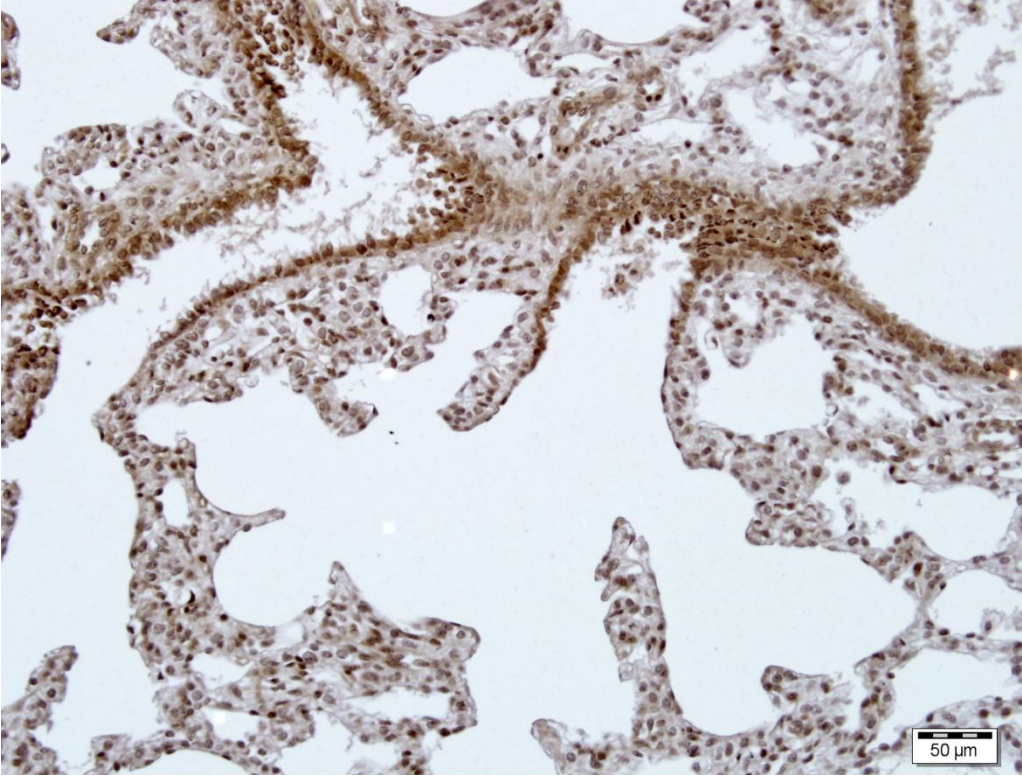
Şekil 4.29B. Erişkin sıçan akciğerinde alveol epiteli ile bazı interstisyel hücrelerde nüklear TLR5 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



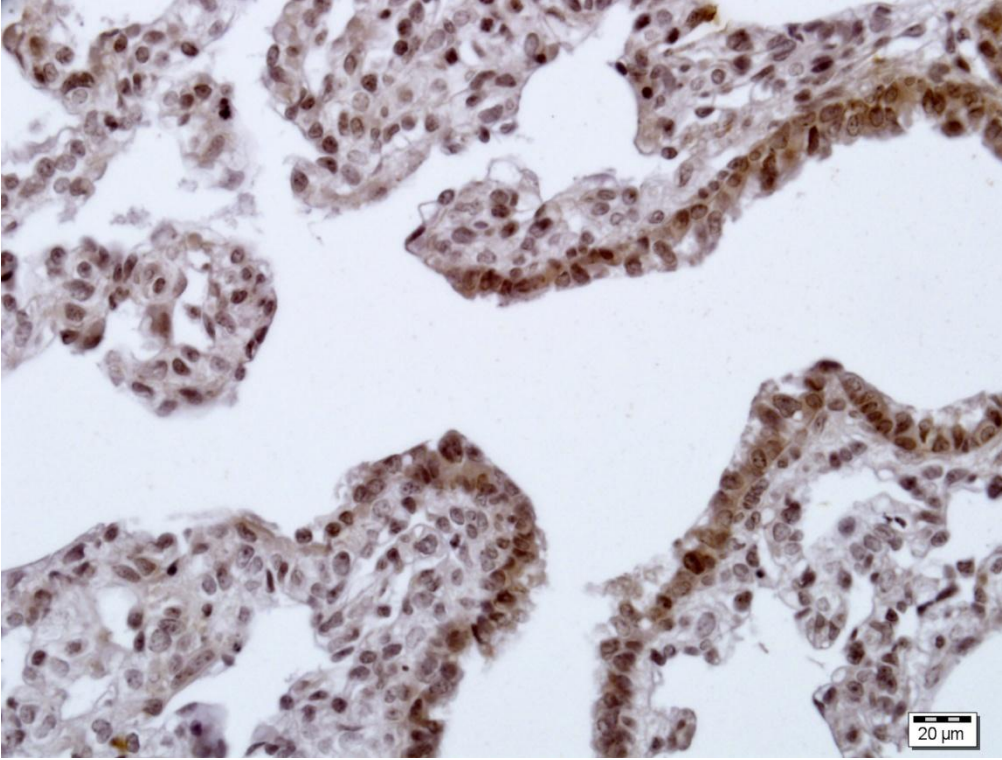
Şekil 4.30A. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



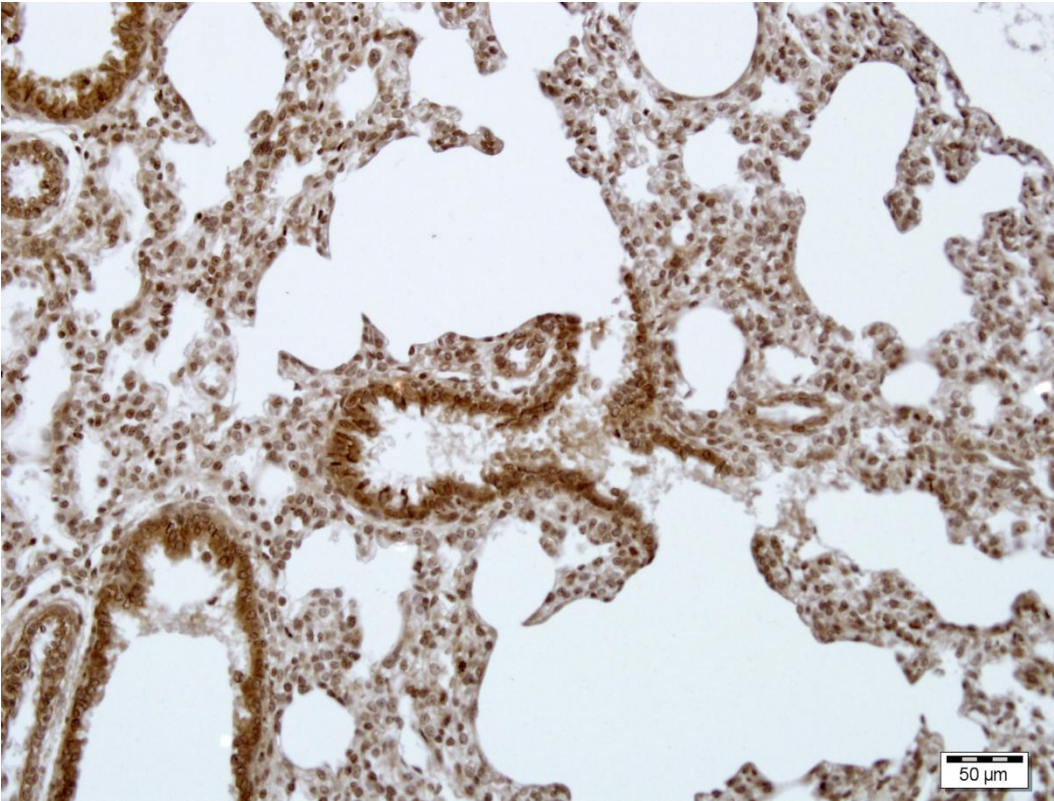
Şekil 4.30B. Neonatal 1. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



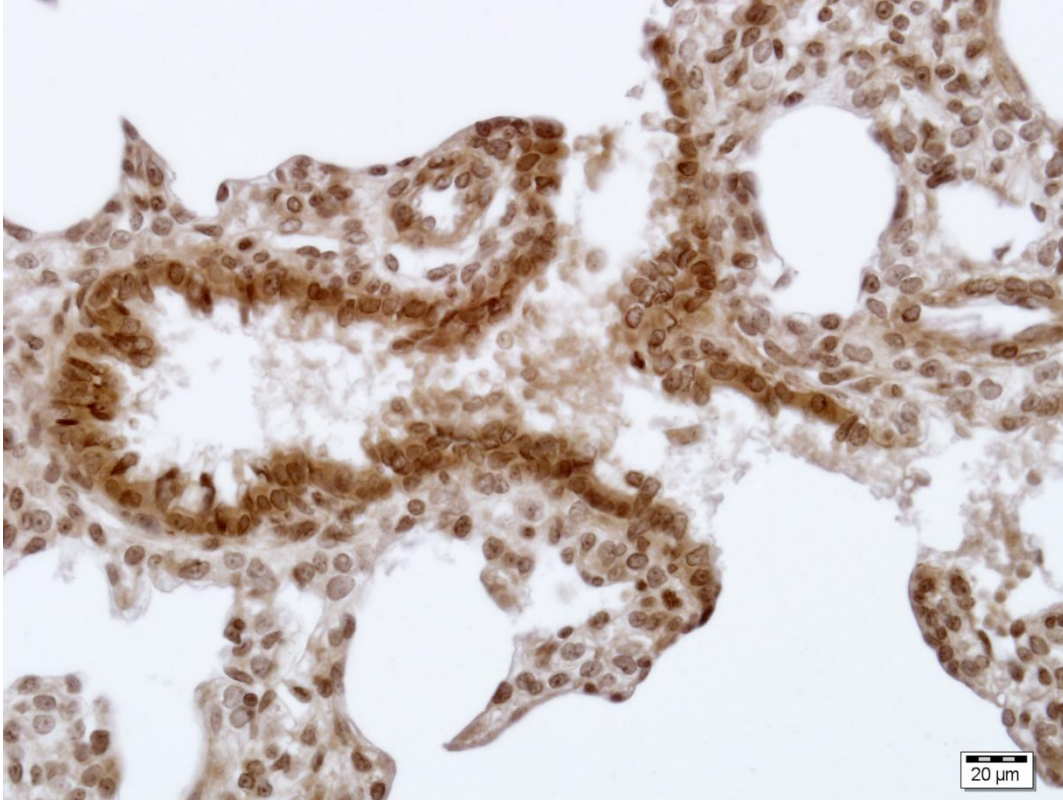
Şekil 4.31A. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



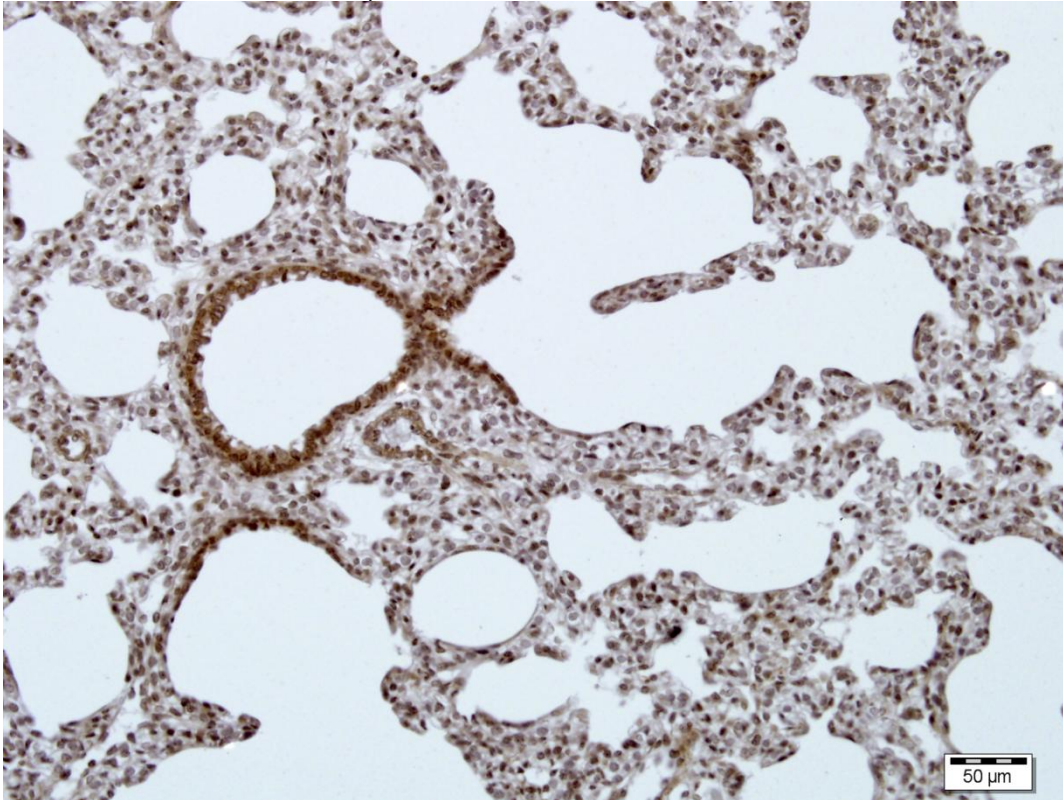
Şekil 4.31B. Neonatal 3. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



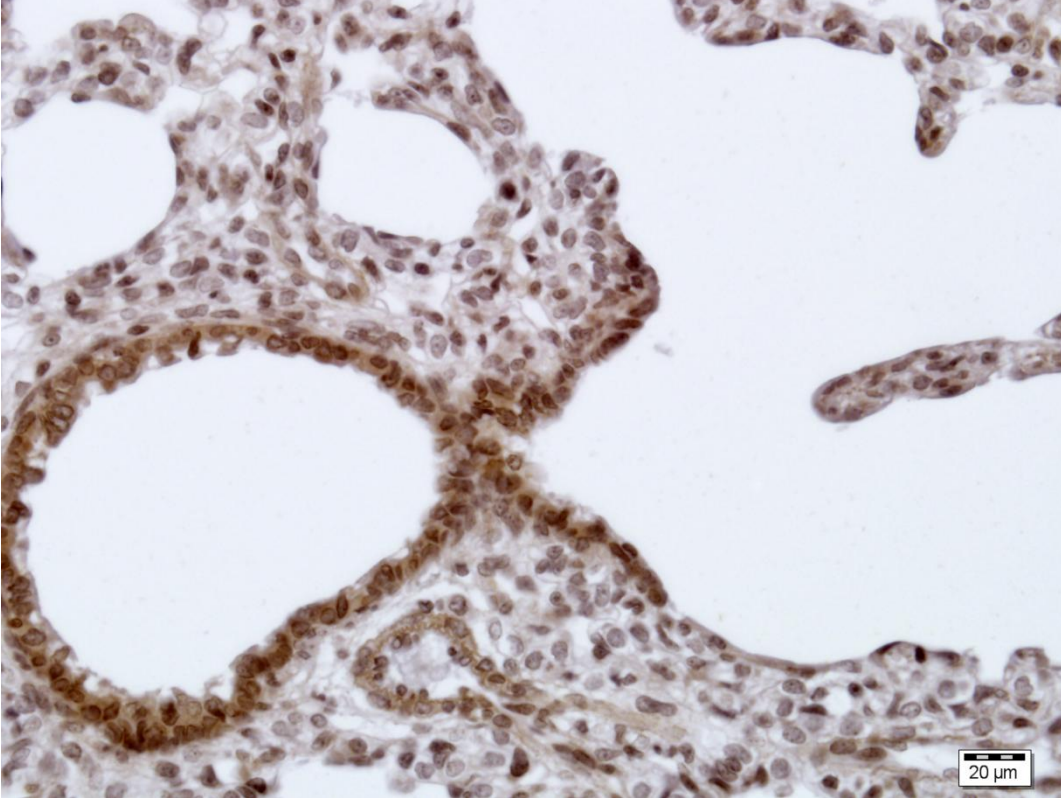
Şekil 4.32A. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



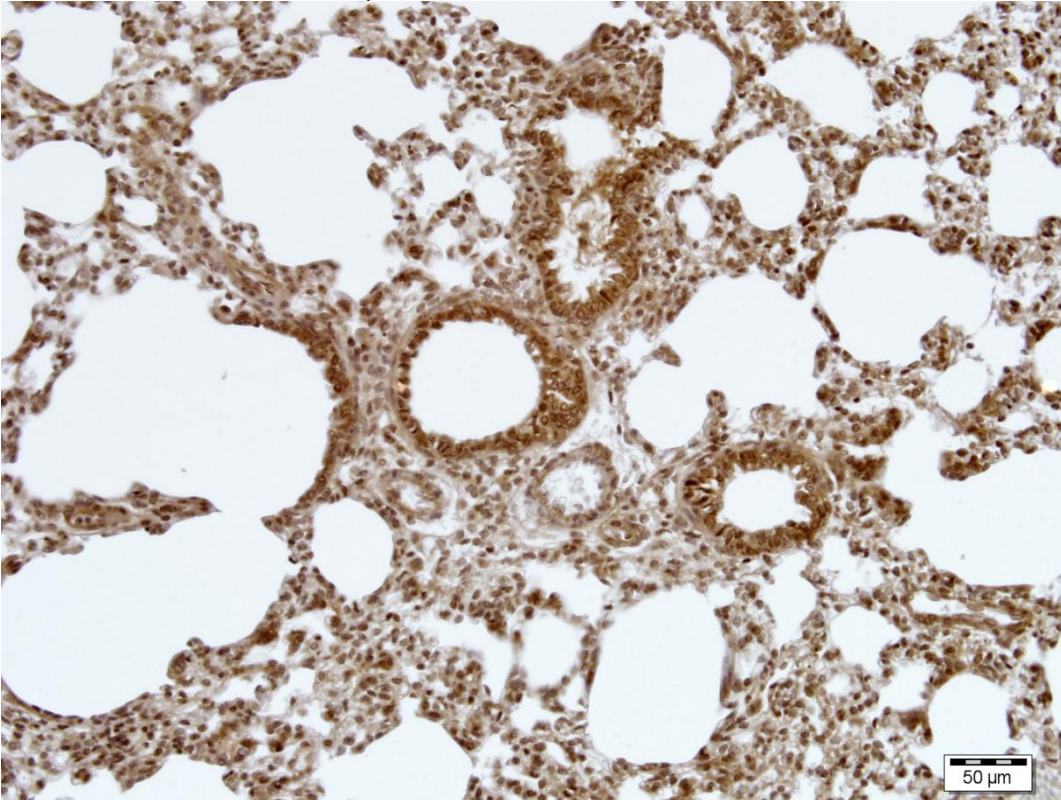
Şekil 4.32B. Neonatal 5. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



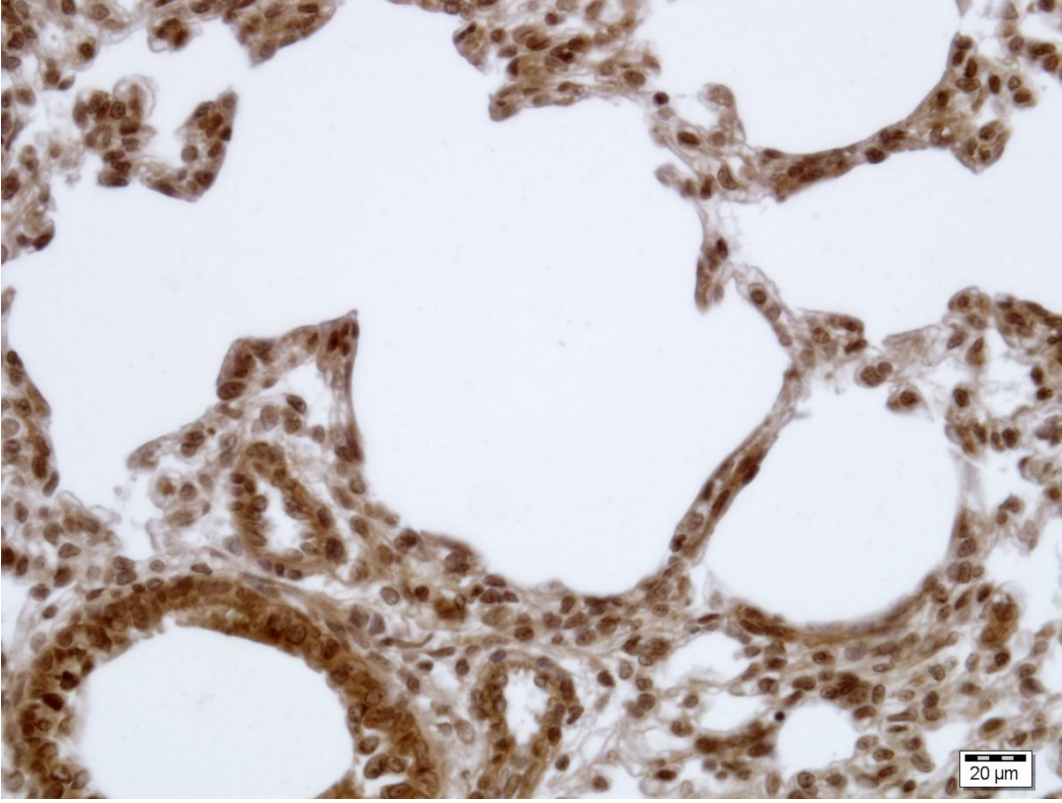
Şekil 4.33A. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



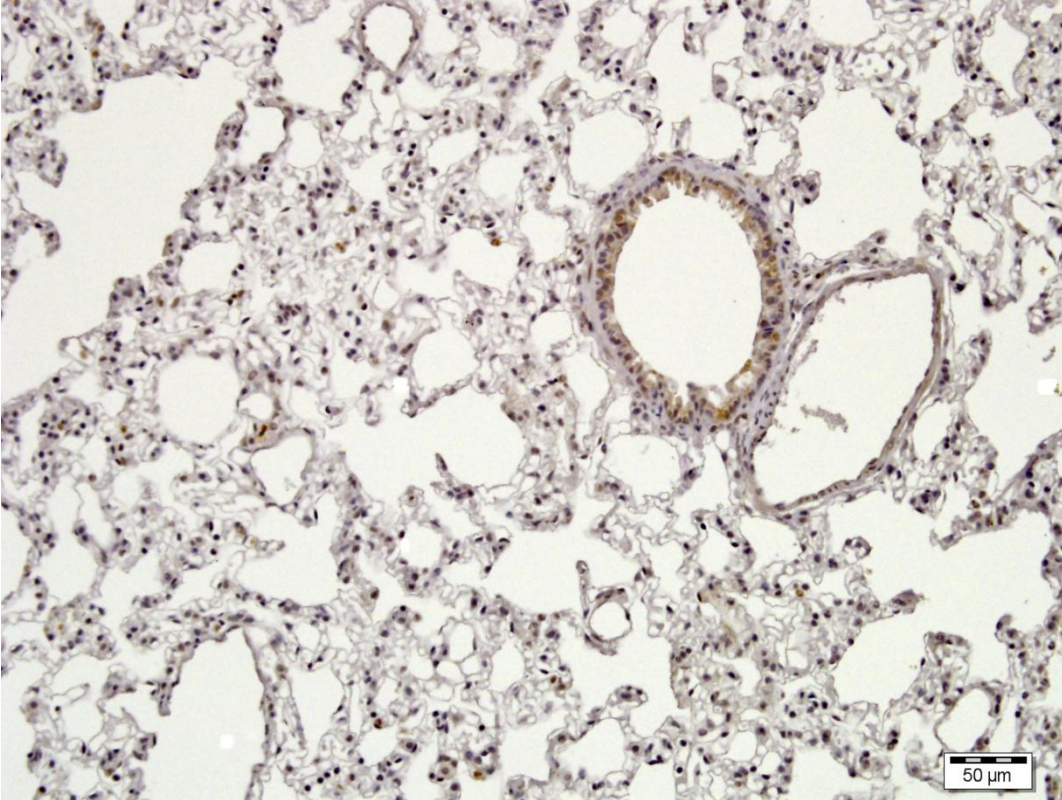
Şekil 4.33B. Neonatal 10. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



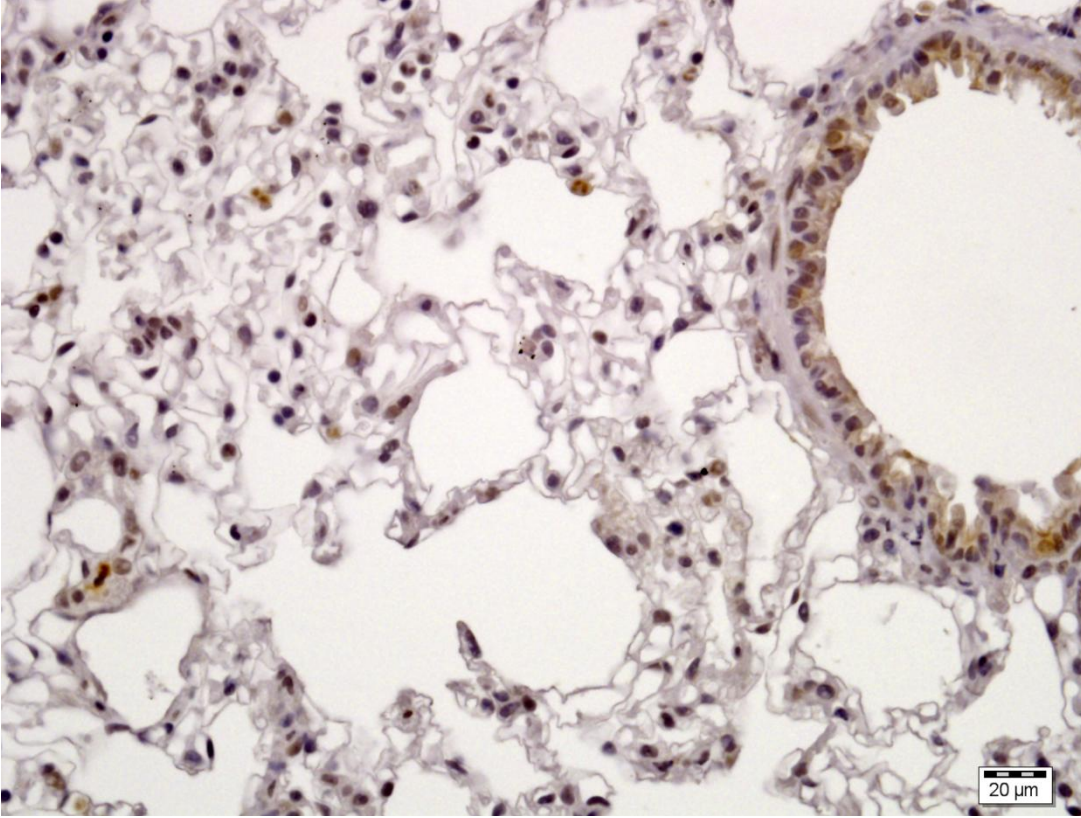
Şekil 4.34A. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm.



Şekil 4.34B. Neonatal 15. günde sıçan akciğerinde sakkulus ve alveol duvarı, bronşiyol epiteli, interstisyel hücreler ile kan damarlarında nüklear, membransel ve sitoplazmik TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 20 µm.



Şekil 4.35A. Erişkin sıçan akciğerinde alveol epiteli, bronşiyol epiteli, bazı interstisyel hücrelerde nüklear TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 50 µm

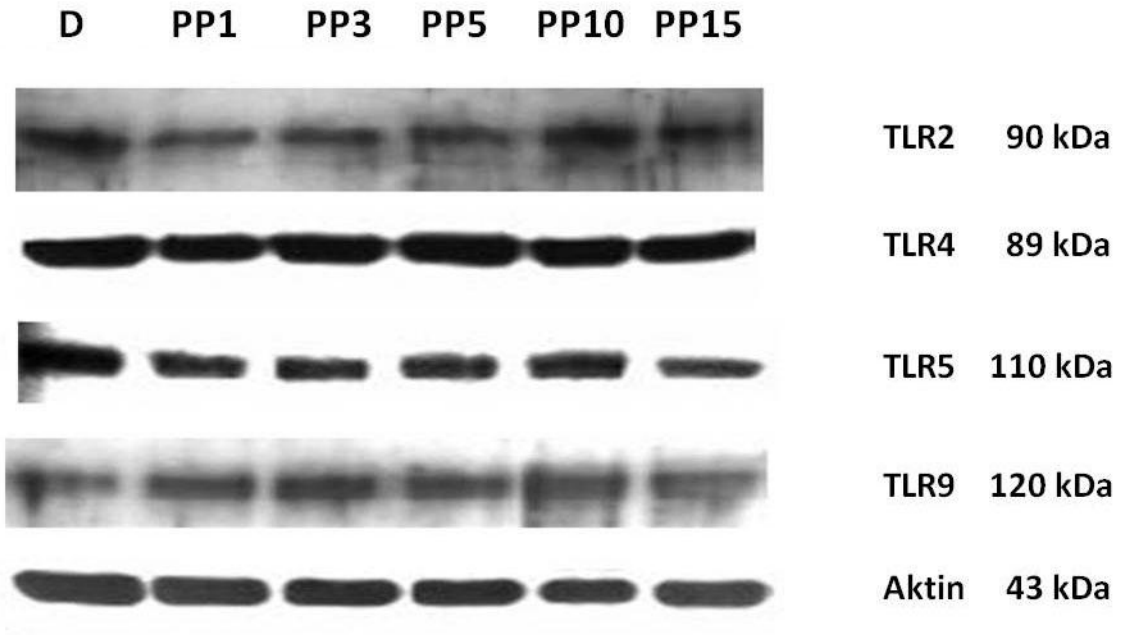


Şekil 4.35B. Erişkin sıçan akciğerinde alveol epiteli, bronşiyol epiteli, bazı interstisyel hücrelerde nüklear TLR9 immunoreaktivitesi. Bar: 20 μ m

4.3. Western blot analizi:

Neonatal periyodun 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerindeki sıçan akciğerinde ve erişkin sıçan akciğerinde western blot analizi ile belirlenen Toll-like reseptörler ve β -aktine ait protein bantları şekil.. de verilmiştir.

İmmunohistokimyasal analiz sonuçları ve Western blot analizleri sonuçlarına gruplar arasında farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığını belirlemek için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, farklılık durumunda ise bunun hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için de Mann-Whitney U testi uygulandığında, TLR reseptörlerinden TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un neonatal döneme ait değerleri arasında önemli bir farklılık ($P>0.05$) görülmediği halde neonatal dönemdeki TLR2, TLR5 ve TLR9 değerlerinin erişkin akciğerine ait değerlerden istatistiksel açıdan önemli farklılık ($P<0.05$) farklılık saptandı.



Şekil. Neonatal periyodun (PP) 1., 3., 5., 10. ve 15. günlerindeki sıçan akciğerinde ve erişkin sıçan (D) akciğerinde western blot analizi ile belirlenen Toll-like reseptörler ve β -aktine ait protein bantları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Postnatal gelişim sürecindeki sıçan akciğerinde Toll like reseptörlerinin ekspresyonlarının araştırıldığı bu çalışmada literatür bilgileri (Gomi et al. 1994) doğrultusunda doğum sonrası 1-3. günler sakkular, 5, 10 ve 15. günler ise alveolar periyod olarak tanımlanmıştır. Ayrıca alveolar periyod erken (5. gün), orta (10.gün) ve geç (15. gün) alveolar periyod olarak bölümlenmiştir. Doğumdan itibaren akciğerin yapısal özelliklerine ilişkin bulguların literatür bilgileriyle (Burri, 1975; Burri, 1984; Massaro et al. 1985; Gomi et al. 1994; Gewolb, 1996; Massaro and Massaro, 1996; Kresch et al. 1998; De Paepe et al. 1999; Luyet et al. 2002) paralellik gösterdiği ve alveolar septasyonun dolayısıyla alveolar periyod sürecinin postnatal 15. günde hala tamamlanmamış olduğu saptanmıştır. İncelenen tüm örneklerde çok sayıda mitotik figüre rastlanmıştır. Sıçanlarda postnatal sürecin 4-14. günü proliferasyon gerçekleştiği dönem 14-28. günler ise büyümenin olduğu dönem olarak tanımlanmaktadır (Burri, 1974). Bu çalışmada neonatal 15. güne kadar olan proliferasyon periyodu incelenmiş olup bulgularımız erken postnatal periyod sırasında akciğerdeki hücrelerin çoğalma ve farklılaşmalarının devam ettiğini ve hücre sayısı, hücre tipi ile hücre fonksiyonlarının devamlı değişime uğradığının göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Birçok memelide neonatal dönemde akciğer alveolleri yetişkindeki sayıya henüz ulaşamadığından ve akciğerin doğal immun sistemleri yeterli olmadığından akciğer çevresel faktörlere karşı oldukça duyarlıdır (Finkelstein and Johnston 2004). Memelilerde erken postnatal gelişim sırasında akciğer savunma sistemlerinin tehlikede olduğunu gösteren pek çok kanıt vardır (Bakker et al. 1998; Bellanti and Zeligs 1995; Goldman et al. 2004; Jackson et al. 1988; Kojima et al. 1994; Coonrod et al. 1987; Kurland et al. 1988; Tasat et al. 2003; Weiss et al. 1986; Yeo et al. 1993; Zeidler and Kim 1985; Zink and Johnson 1984). Doğumdan sonra akciğerlerin patojenlere, alerjenlere ve toksik maddelere karşı adaptasyonu doğal ve kazanılmış immun sistem komplekslerinin indüklenmesiyle sağlanır (Chen et al.

2010). Akciğer hastalıklarında akciğer ile ilişkili immun yanıtların oluşturulmasında TLR proteinlerinin rol oynadığı ve bu reseptörlerin insan ve memeli hayvanların akciğerlerinde lokalize olduğu bilinmektedir (Janardhan et al. 2006; Maris et al. 2006; Muir et al. Petrikin et al. 2010; Schneberger et al. 2009; Schneberger et al. 2011; Sethi et al. 2011; Suri et al. 2006; Sukkar et al. 2006; Wassef et al. 2004). TLR arasında TLR2, TLR4 ve TLR5 en çok incelenen reseptörler olup bunların akciğer dokusundaki ekspresyonları farklılıklar göstermektedir. Bugüne kadar trakeyal, bronşiyal ve alveolar tip II hücrelerini içine alan çeşitli akciğer epitel hücre tiplerinde TLR ekspresyonlarının incelendiği birçok çalışma yapılmıştır. Primer trakeya-bronşiyal epitel hücrelerinin TLR1-6 mRNA'larını eksprese ettikleri ilk kez Becker ve ark. (Becker et al. 2000) tarafından ortaya konmuştur. Daha sonra alveolar epitel hücre yüzeylerinde TLR2'nin eksprese olduğu (Hertz et al. 2003), bununla birlikte TLR4'ün bronşiyal epitel hücrelerinde intrasellüler olarak çoğunlukla da subapikal lokalizasyon gösterdiği (Guillot et al. 2004) belirlenmiştir. Adamo ve ark. (2004) TLR5'in polarize bronşiyal epitel hücrelerinde bazolateral yerleşim gösterdiğini ve flagellin ile stimülasyonu takiben hücrelerin apikal yüzeylerine hareket ettiğini bildirmektedirler. Muir ve ark. (2004) normal ve kistik fibrozisli akciğerlerde hava yolu epitel hücrelerinin TLR1-10'u eksprese ettiklerini ve TLR2 proteininin bu hücrelerin apikal yüzeylerinde oysa TLR4 ve TLR5'in bazolateral olarak yerleştiğini ifade etmektedirler. Greene ve ark. da (Greene et al. 2005) kistik fibrozisli ve normal trakeyal ve bronşiyal epitel hücrelerinin TLR1-6 ve TLR9 mRNA'larını eksprese ettiklerini belirtmektedirler. TLR9'un insanda B lenfositler, pulmonal dentritik hücreler ve makrofajlarda (Latz et al. 2004), farelerde ise miyeloid dentritik hücrelerde, pulmonal dentritik hücrelerde, monositlerde, B lenfositlerde ve makrofajlarda (Krieg, 2007). lokalize olduğu rapor edilmektedir. Sunulan çalışmada özellikle erişkin akciğerinde alveol epiteli ile interstisyumda TLR2, TLR5 ve TLR9 için pozitif reaksiyon veren hücrelerin spesifik antikorlarla gösterimi yapılmamış ancak bu pozitif hücrelerin

yerleşimleri dikkate alındığında insanda akciğerinde bildirilen TLR pozitif hücreler olabileceği kanısına varılmıştır.

Akciğerde TLR ekspresyonlarının ve lokalizasyonlarının hayvan türlerine ve akciğerin yapısal unsurlarına göre de farklılık gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Droemann et al. 2003; Basu and Fenton, 2004; Sha et al. 2004; Wassef et al. 2004; Chaudhuri et al. 2005; 2007; Berndt et al. 2007; Janardhan et al. 2006; Suri et al. 2006; Sukkar et al. 2006; Bhan et al. 2008; Schneberger et al. 2009; 2011; Hoppstadter et al. 2010). Primer bronş epitel hücreleri TLR1-10 mRNA'larını eksprese eder ve çeşitli TLR ligandlarına yanıt olarak kemokin CXCL8 (IL-8) salgırlar. Keza akciğer epitel hücre kültürlerinde de TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR5 mRNA ve proteinlerinin eksprese olduğu bilinmektedir (Sha et al.2004). Muir ve arkadaşları normal ve kistik fibrozisli akciğerlerde respiratorik epitel hücrelerinin TLR1-10 mRNA'larını eksprese ettiklerini, konfokal mikroskopik incelemelerde TLR2 proteininin bu hücrelerin apikal yüzeyinde, oysa TLR4 ve TLR5'in bazolateral yüzeylerinde bulunduklarını göstermişlerdir (Muir et al. 2004).

Primer bronş epitel hücrelerinde TLR'inden özellikle TLR2, TLR3, TLR5 ve TLR6'nın yüksek düzeyde eksprese olduğu bildirilmektedir. Oysa TLR2 agonisti (zymosan A ve PGN), TLR4 agonisti (LPS) ve TLR5 agonisti (flagellin) ile epitel hücreleri aktive edildiklerinde epitelin fonksiyonel TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR5'i eksprese ettikleri belirtilmektedir (Sha et al. 2003). TLR'inden TLR2 mRNA ve proteininin insan akciğerinde alveol epitel hücrelerinden pnömosit II ve alveolar makrofajlarda eksprese olduğu (Droemann et al. 2003), bazal şartlar altında ise TLR8 ve TLR9 hariç TLR1-10 mRNA'larınınhava yolu düz kas hücrelerinde eksprese olduğu rapor edilmektedir. Yine bazal şartlarda TLR4'ün mRNA ekspresyonunun diğer TLR'ne göre oldukça düşük düzeyde olduğu, stimule edildiğinde de TLR2 ve TLR3'ün düzeylerinden düşük olduğu, TLR8 ve TLR9 ekspresyonlarının ancak Tümör nekrotik faktör alfa (TNF- α) tarafından artırıldığı bildirilmektedir. Ayrıca bazal

şartlarda hava yolu düz kas hücrelerinde, sadece TLR2 ve TLR3 proteinin eksprese olduğu belirtilmektedir (Sukkar et al. 2006).

Sağlıklı mandaların akciğerinde TLR4'ün alveolar septumlarda, hava yolu epitellerinde ve büyük kan damarlarının endotelinde lokalize olduğu, TLR9 ekspresyonun da TLR2'üne benzediği ancak TLR9'un arter ve venlerin endotelinde eksprese olmadığı bildirilmektedir. Normal akciğere kıyaslandığında *Pasteurella multocida* ile efekte edilmiş manda akciğerlerinde TLR9 ekspresyonun arttığı, TLR4 ekspresyonunun ise değişmediği veya azaldığı ifade edilmektedir (Sethi et al. 2011). Sağlıklı at akciğerinde TLR2'nin bulunmadığı, TLR4'ün septumlarda büyük kan damarlarının endotelinde, alveolar makrofajlarda ve bronşiyoler epitelin bazal membranı ile intravasküler makrofajlarda lokalize olduğu rapor edilmektedir (Suri et al. 2006). Sığır, domuz ve köpek akciğerinde ise TLR4'ün bronşiyolar epitelde, pulmonar monosit ve makrofajlarda, intravascular ve alveolar makrofajlarda, büyük kan damarlarının endotelinde eksprese olduğu bildirilmektedir (Wassef et al. 2004).

Akciğerde TLR'lerinden TLR5'in predominant olarak pulmonar ve alveolar epitel hücrelerinde eksprese olduğu (Sha et al. 2004) ve flagella stimulasyonundan sonra epitel hücrelerinin özellikle apikal yüzeyine yerleştikleri (Adamo et al. 2004) bilinmektedir. Ayrıca TLR5'in kistik fibrozisli akciğer dokusunda yangının azaltılmasında antiinflamatuvar etkinliğinin olduğu ileri sürülmektedir (Blohmke et al. 2008). İnsanda alveolar makrofajların TLR3, TLR5 ve TLR9'u düşük düzeylerde, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 ve TLR8'i yüksek düzeyde eksprese ettikleri gösterilmiştir (Maris et al.2006; Hoppstadter et al.2010). Akciğer endotel hücreleri sistemik LPS uygulamasını takiben nötrofillerin toplanması ve kapılarla başka yerlere taşınması için gerekli olan TLR4'ü eksprese ederler (Andonegui et al.2003). Akciğer damarlarında yerleşen nötrofiller LPS'ye yanıt olarak TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'u eksprese ederler (Koller et al. 2008). Fare ve insan akciğerinde anatomik yerleşimlerine ve yüzey belirteç ekspresyonlarına göre dentritik hücrelerin alt tipleri

saptanmıştır (GeurtsvanKessel and Lambrecht, 2008; Wikstrom and Stumbles, 2007). TLR ligasyonu ile aktive olan akciğer dentritik hücreleri doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki köprüyü sağlamayan askerler olarak rol oynarlar. Akciğerdeki damarlarda bulunan plasmacytoid dentritik hücreler (pDCs) alerjik yanıtı baskılayan TLR7 ve TLR9' u yüksek düzeylerde eksprese ederler ve düzenleyici akciğer dentritik hücreleri ise T hücrelerinin düzenlenmesine neden olurlar (Plantinga et al. 2010). Özellikle, bazı durumlarda hücrelerde TLR transkripsiyon seviyesi fonksiyonel yanıtlar ile ilişkili değildir (Hoppstadter et al.2010; Maris et al. 2006). Örneğin, LPS veya mikobakteriyel DNA ile stimülasyon sonrasında, insan alveolar makrofajları yüksek düzeylerde inflamatuvar sitokin TNF- α üretirler, oysa interstisyel makrofajlar interstisyel makrofajlar TLR mRNA'ların aynı düzeyde üretirken immunregülatör sitokin IL-6 ve IL-10 'u yüksek üretirler (Hoppstadter et al.2010). Sonuç olarak örneğin LPS ile stimule edilmiş monositler tarafından salgılanan IL-1 β yoluyla aktive olan hava yolu düz kas hücrelerinde olduğu gibi, akciğer dokusundaki hücreler TLR duyarlı lenfoid hücreler ile etkileşim yoluyla aktive olabilirler (Morris et al. 2005). Bu nedenle akciğerde TLR ligandlarına yanıt verme yerleşik ve infiltre olan hücrelerin işbirliği ile şekillenir.

TLR'lerinden TLR9'un genel olarak akciğerde alveolar makrofajlar, pulmonar intravaskular makrofajlar, nötrofil granülositler bronşiyal epitel hücreleri, pnömosit II'ler gibi birçok hücre tipinde eksprese olmaktadır (Bhan et al. 2008; Schneberger et al. 2009; 2011; Hoppstadter et al.2010). Sağlıklı mandaların akciğerinde TLR9 ekspresyonunun septal makrofajlarda olduğu gibi alveolar septumlarda zayıf eksprese olduğu, hava yolu epitellerinin de zayıf boyandığı vasküler endotelin ise çoğunlukla negatif olduğu, oysa damarlardaki monositlerde TLR9 ekspresyonunun kuvvetli pozitif olduğu ifade edilmektedir (Sethi et al. 2011). Sunulan çalışmada erişkin akciğerinde TLR2, TLR5 ve TLR9'un alveol duvarındaki bazı hücrelerde eksprese olduğu görülmüştür. Bronşiyol epitelinde TLR'nin bazı hücrelerin çekirdeklerinde,

TLR5'in bronş epitel hücrelerinin bazal sitoplazmasında, TLR9'un ise epitel hücrelerinin hem bazal hem de apikal sitoplazmalarında lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu TLR'inin hayvan türlerine göre farklılık gösterdiğinin kanıtı olarak yorumlanmıştır.

Bugüne değin sadece insan, fare (Harju K, Glumoff V, Hallman M (2001) Ontogeny of toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatr Res* 49: 81-83) ve koyunda fetal akciğerlerde TLR ekspresyonu incelenmiş olup neonatal sürece ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle sunulan çalışma neonatal süreçte ratların akciğerinde TLR ekspresyonun gösteren ilk çalışmadır. İmmunohistokimyasal bulgular postnatal gelişim sürecindeki ratlarda TLR'lerinin hücrelerdeki lokalizasyonlarının reseptör tipine bağlı olarak membransel, sitoplazmik ve nuklear yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Bunlardan TLR2, TLR5 ve TLR9 membransel, sitoplazmik ve nuklear yerleşim gösterirken TLR4'ün membransel olarak eksprese olduğu gözlenmiştir. Doğum sonrası birinci günden 15. Güne kadar olan neonatal rat akciğer örnekleri incelendiğinde TLR'lerinden TLR2, 5 ve 9'un akciğerin bronşiyal epitel ile bronşiyal kaslar, alveolar epitel, intestisyumdaki hücreler, kan damar endoteli ile bazı kan hücreleri tarafından eksprese edildiklerini ortaya koymuştur. TLR4'ün bronşiyol epitelinde eksprese olmadığı tespit edilmiştir.

Bugüne değin yapılan çalışmalar predominant TLR tipinin TLR2 olduğunu, diğer TLR'nin (TLR3, TLR4 ve TLR5) ağırlıklı olarak intraselüler yerleşim gösterdikleri veya düşük seviyeli olarak yüzeyde eksprese olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte bu TLR'ler mikrobiyel faktörlerle stimülasyonu takiben membrana harekete edebilirler. Örneğin TLR4'ün hücre yüzeyine lokalizasyonu RSV ile sağlanır (Monick M. M. Yarovinsky T. O. Powers L. S. Butler N. S. Carter A. B. Gudmundsson G. and Hunninghake G. W. (2003): Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J. Biol. Chem.* 278, 53035–53044). Bu bilgilerin aksine çalışmamız sonuçları neonatal süreçteki sıçan akciğerinde TLR2'nin predominant reseptör tipi olmadığı, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un

dominant reseptörler olarak bulunduğunu göstermiştir. Erişkin akciğer örneklerin e ilişkin sonuçlarımız ise TLR4'ün diğer reseptör tiplerine göre predominant reseptör tipi olarak eksprese edildiğini göstermiştir.

TLR arasında TLR2, TLR4 ve TLR5 en çok incelenen reseptörler olup bunların akciğer dokusundaki ekspresyonları farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir. TLR'inden TLR2 mRNA ve proteininin insan akciğerinde alveol epitel hücrelerinden pnömosit II ve alveolar makrofajlarda (Droemann et al. 2003), ayrıca hava yolu düz kas hücrelerinde (Berndt et al. 2007; 2006; Basu and Fenton, 2004; Chaudhuri, et al. 2005; 2007; Janardhan 2006; Wassef et al. 2004; Suri et al. 2006; Sukkar et al. Wassef et al. 2004) eksprese olduğu rapor edilmektedir. Sunulan çalışmada da incelenen neonatal süreçte TLR2'nin bronşiyol ve alveol epitel hücreleri ile kan damarlarının endotel ve medya katmanlarında ve bunun yanı sıra interstisyel bağdokudaki bazı hücrelerde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bazal şartlar altında TLR8 ve TLR9 hariç TLR1-10 mRNA'larının hava yolu düz kas hücrelerinde eksprese olduğu, yine bazal şartlarda TLR4'ün mRNA ekspresyonunun diğer TLR'ne göre oldukça düşük düzeyde olduğu, stimule edildiğinde de TLR2 ve TLR3'ün düzeylerinden düşük olduğu, TLR8 ve TLR9 ekspresyonlarının ancak Tümör nekrotik faktör alfa (TNF- α) tarafından artırıldığı bildirilmektedir (Sukkar et al. 2006). Akciğerde TLR'lerinden TLR5'in predominant olarak pulmonar ve alveolar epitel hücrelerinde eksprese olduğu (Sha et al. 2004) ve flagella stimülasyonundan sonra epitel hücrelerinin özellikle apikal yüzeyine yerleştikleri (Adamo et al. 2004) bilinmektedir. Ayrıca TLR5'in kistik fibrozisli akciğer dokusunda yangının azaltılmasında antienflamatuvar etkinliğinin olduğu ileri sürülmektedir (Blohmke et al. 2008). TLR'lerinden TLR9 da akciğerde alveolar makrofajlar, pulmonar intravaskular makrofajlar, nötrofil granülositler bronşiyal epitel hücreleri, pnömosit II'ler gibi birçok hücre tipinde eksprese olmaktadır (Bhan et al. 2008; Hoppstadter et al. 2010; Schneberger et al. 2009; 2011). Çalışmamızın sonuçları neonatal süreçteki sıçanlarda

literatür bilgilere paralel olarak TLR2, TLR5 ve TLR9'un akciğerin tüm bileşenleri tarafından, TLR4'ü nise bronşiyol epiteli hariç diğer bileşenler tarafından eksprese edildiğini göstermiştir.

Çeşitli türlerde TLR2 ve 4 ekspresyonunun gelişime bağlı olarak arttığı ifade edilmektedir. Farelerde TLR2 ve 4'ün mRNA düzeyleri gebeliğin erken döneminde (embriyonik 14. gün) oldukça düşük olduğu pseudoglandular evreden sakkuler evreye geçişte 8 kat arttığı bildirilmektedir (Harju K, Glumoff V, Hallman M (2001) Ontogeny of toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatr Res* 49: 81-83). Petrikin ve ark. (2010) insan fetal akciğer dokularında TLR2 gen ekspresyonlarının erken psöydoglandular evreden geç psöydoglandular ve kanalikuler evreye doğru artış gösterdiğini ve kanalikuler evredeki TLR2 mRNA düzeylerinin erişkin düzeylerinininkine hemen hemen yaklaşık değerinde olduğunu ifade etmektedirler. Bununla birlikte, koyunda TLR2 için mRNA düzeyinin gebeliğin 108. gününde erişkin değerlerinin %20'si iken yeni doğanlarda %50'sine ulaştığı, TLR4 için mRNA düzeylerinin de TLR2'ye benzer olduğu belirtilmektedir. Sunulan çalışma akciğer gelişiminin alveolar evresi olup ratlarda da incelenen TLR'lerinden TLR2, TLR5 ve TLR9 ekspresyonlarının doğum sonrası birinci günden 15. güne kadar olan periyotta herhangi bir önemli değişiklik göstermediği, ancak erişkin akciğerinde alveol duvarındaki ve interstisyumdaki bazı hücrelerde bu reseptörler için pozitif reaksiyonunun bulunduğu tespit edilmiştir. TLR4'ün akciğer lokalizasyonu ve ekspresyonlarında ise yaşa bağlı herhangi bir önemli değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgular sıçan akciğerinin doğum sonrası döneme hazırlık olarak TLR'ini eksprese ettiklerinin önemli bir göstergesidir. Nitekim Yeni doğanlarda Th1 tip immun yanıt baskılanırken, Th2 tip immun yanıtın geliştiği ve TNF, IFN- α , IFN γ , IL-12, IL-1b gibi Th1 tip sitokinler azalırken IL-6, IL-8, IL-10 ve IL-23 gibi Th2 tip sitokinlerin arttığı bilinmektedir. Ayrıca neonatal dönemde komplement düzeylerinin düşük, lökosit ve makrofajların sayılarının az olduğu ve fonksiyonlarının bozulduğu, çoğu T hücrelerinin

fenotip ve fonksiyonlarının yetersiz olduğu, immunoregölatör sitokin ekspresyonun zayıf olduğu belirtilmektedir (Kollmann et al. 2009; Levy et al. 2004). Bu bilgiler ışığında çalışmamızın bulguları akciğer alveolleri yetişkindeki sayıya henüz ulaşmamış olan ve doğal immun sistemleri yeterli olmadığı düşünölen neonatal dönemdeki sıçan akciğerinin çevresel faktörlere karşı korunabilmek üzere tüm yapıdal bileşenleri ile TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'u eksprese ettiğini göstermiştir.

Sonuç olarak sıçan akciğerinin postnatal döneme adaptasyonu için patojenlere karşı doğal immun yanıtı başlatan anahtar moleküller olan TLR'leri ile donatılmalarının prenatal dönemde tamamlanmış olduğu kanısına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, and Prince A. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 627–634.
- Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO* 19: 3325-3336.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*,102: 9247-9252.
- Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytnuik L, Raharjo E, Kubes P. (2003) Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 111: 1011–1020.
- Armant MA, Fenton MJ. (2002) Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 3: REVIEWS3011.
- Awasthi S, Coalson JJ, Yoder BA, Crouch E, King RJ. (2001) Deficiencies in lung surfactant proteins A and D are associated with lung infection in very premature neonatal baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 389–397.
- Awasthi S, Cropper J, Brown KM. (2008) Developmental expression of Toll-like receptors-2 and -4 in preterm baboon lung. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 1088–1098.
- Bakker JM, Broug-Holub E, Kroes H, van Rees EP, Kraal G, van Iwaarden JF. (1998) Functional immaturity of rat alveolar macrophages during postnatal development. *Immunology* 94: 304–309.
- Barlett D Jr. (1970) Postnatal growth of the mammalian lung: Influence of exercise and thyroid activity. *Res Pysiol* 9: 50–57.
- Barton GM, Medzhitov R. (2002) Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol*

Immunol 270: 81-92.

Basu S, Fenton MJ. (2004) Toll-like receptors: function and roles in lung disease, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L887–L892.

Becker MN, Diamond G, Verghese MW, Randell SH. (2000) CD14-dependent lipopolysaccharide-induced β -Defensin-2 Expression in Human Tracheobronchial Epithelium. *J Biol Chem.* 275: 29731–29736.

Bellanti JA, Zeligs BJ. (1995) Developmental aspects of pulmonary defenses in children. *Pediatr Pulmonol Suppl* 11: 79–80.

Berndt A, Derksen FJ, Venta PJ, Ewart S, Yuzbasiyan-Gurkan V, Robinson NE. (2007) Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L936–L943.

Beutler B, Rehli M. (2002) Evolution of the TIR, toll and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 270: 1-21.

Bhan U, Trujillo G, Lyn-Kew K. et al. (2008) Toll-like receptor 9 regulates the lung macrophage phenotype and host immunity in murine pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 76: 2895–2904.

Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, Elias IM, Hancock DG, Lane CR, Davidson A, George F, Wilcox PG, Smith KD, Overhage J, Hancock REW; Turvey SE. (2008) Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 180: 7764–7773.

Burri PH. (1974) The Postnatal Growth of the Rat Lung. III. Morphology. *Anat Rec* 180, 77–98.

Burri P. (1975) Postnatal growth and maturation of the lung. *Chest* 67:2S–3S.

Burri PH. (1984) Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol*; 46: 617–

628.

Burri PH, Dbaly J, Weibel ER. (1974) The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry, *Anat Rec* 178: 711–730.

Carter AM. (2009) Factors affecting placental oxygen transfer, *Placenta* 30: S19–S25.

Chaudhuri N, Whyte MK, Sabroe I. (2007) Reducing the toll of inflammatory lung disease, *Chest* 131: 1550–1556.

Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. (2005) Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clin Sci* 109: 125–133.

Chen G, Wan H, Luo F, Zhang L, Xu Y, Lewkowich I, Wills-Karp M, Whitsett J A. (2010) *Foxa2* programs Th2 cell-mediated innate immunity in the developing lung. *J Immunol* 184: 6133–6141.

Chuang TH, Ulevitch RJ. (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11: 372-378.

Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor-2. *J Virol* 77: 4588–4596.

Coonrod JD, Jarrells MC, Bridges RB. (1987) Impaired pulmonary clearance of pneumococci in neonatal rats. *Pediatr Res* 22: 736–742.

De Paepe ME, Sardesai MP, Johnson BD, Lesieur-Brooks AM, Papadakis K, Luks FI. (1999) The role of apoptosis in normal and accelerated lung development in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 34: 863–870.

Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, et al. (2003) Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119: 103–108.

Dunne A, O’neill LA. (2005) Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 579: 3330–3335.

Finkelstein JN, Johnston CJ. (2004) Enhanced sensitivity of the postnatal lung to environmental insults and oxidant stress. *Pediatrics* 113:1092–1096.

GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. (2008) Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol* 1: 442–450.

Gleeson M, Cripps AW. (2004) Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome, *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 21–33.

Gluck T, Silver J, Epstein M, et al. (2001) Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *Eur J Med Res* 6: 351–358.

Goldman A, Rubin C, Gomez S, Palermo MS, Tasat DR. (2004) Functional age-dependent changes in bronchoalveolar lavage rat cells. *Cell Mol Biol* 50: 649–655.

Gomi T, Kimura A, Adriaensen D, Timmermans JP, Scheuermann DW, De Groodt Lasseel MH, Kitazawa Y, Kikuchi Y, Naruse H, Kishi K. 1994. Stages in the development of the rat lung: morphometric, light and electron microscopic studies. *Kaibogaku Zasshi* 69: 392–405.

Greene C M, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill SJ, McElvaney NG. (2005) TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol* 174: 1638–1646.

Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, Si-Tahar M. (2004) Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem* 279: 2712–2718.

Harju K, Glumoff V, Hallman M. (2001) Ontogeny of Toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatr Res* 49: 81–83.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T. et al. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.

Nature 408: 740–745.

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. *Nature Immunology* 3: 196–200.

Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismuller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH, Modlin RL. (2003) Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 171: 6820–6826.

Hillman NH, Moss TJ, Nitsos I, Kramer BW, Bachurski CJ, Ikegami M, Jobe AH, Kallapur SG. (2008) Toll-like receptors and agonist responses in the developing fetal sheep lung. *Pediatr Res* 63: 388–393.

Hoppstadter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, Meyerhans A, Gortner L, Lehr CM, Huwer H, Kiemer AK. (2010) Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir Res* 11: 124–139.

Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. (2002) Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 195: 559–570.

Jackson JC, Palmer S, Wilson CB, Standaert TA, Truog WE, Murphy JH, Hodson WA. (1988) Postnatal changes in lung phospholipids and alveolar macrophages in term newborn monkeys. *Respir Physiol* 73: 289–300.

Janardhan KS, McIsaac M, Fowlie J, Caldwell S, Shrivastav A, Sharma RK, Singh B. (2006) Toll-like receptor-4 expression in lipopolysaccharide induced lung inflammation *Histol Histopathol* 21: 687–696.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197–216.

Kaisho T, Akira S. (2003) Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* 3: 373–385.

Kojima T, Hattori K, Fujiwara T, Hirata Y, Kobayashi Y. (1994) Maturation changes in superoxide anion production of rabbit alveolar macrophages. *Life Sci* 55: 911–915.

Koller B, Kappler M, Latzin P, Gaggar A, Schreiner M, Takyar S, Kormann M, Kabesch M, Roos D, Griesse M, Hartl D. (2008) TLR expression on neutrophils at the pulmonary site of infection: TLR1/TLR2-mediated up-regulation of TLR5 expression in cystic fibrosis lung disease. *J Immunol* 181: 2753–2763.

Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, Blimkie D, Thommai F, Wang XY, Lavoie PM, Furlong J, Fortuno ES 3rd, Hajjar AM, Hawkins NR, Self SG, Wison CB. (2009) Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *J Immunol* 183: 7150–7160.

Kresch M, Christian C, Wu F, Hussain N. (1998) Ontogeny of apoptosis during lung development. *Pediatr Res* 43: 426–431.

Krieg, AM. (2007) Antiinfective applications of Toll-like receptor 9 agonists. *Proc. Am. Thorac Soc* 4: 289–294.

Kurland G, Cheung AT, Miller ME, Ayin SA, Cho MM, Ford EW. (1988) The ontogeny of pulmonary defenses: alveolar macrophage function in neonatal and juvenile rhesus monkeys. *Pediatr Res* 23: 293–297.

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5: 190–198.

Levy O. (2007) Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Reviews* 7: 379–390.

Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. (2004) Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF- α induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and

imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol.* 173: 4627–4634.

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *PNAS* 101: 5598-5603.

Luyet C, Burri P, Schittny J. (2002) Suppression of cell proliferation and programmed cell death by dexamethasone during postnatal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L477–L483.

Gewolb I. (1996) Effect of high glucose on fetal lung maturation at different times in gestation. *Exp Lung Res* 22: 201–211.

Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Jansen HM, Spek CA, van der Poll T. (2006) Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *Eur Respir J* 28: 622–626.

Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro G, Whitney P. (1985) Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest* 76: 1297–1305.

Massaro GD, Massaro D. (1996) Formation of pulmonary alveoli and gas-exchange surface area: quantitation and regulation. *Annu Rev Physiol* 58: 73–92.

Medzhitov R, PrestonHurlburt P, Janeway CA. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.

Medzhitov R, Janeway Jr C. (2000) Innate immunity. *N Engl J Med* 343: 338–344.

Meyerholz DK, Kawashima K, Gallup JM, Grubor B, Ackermann MR. (2006) Expression of select immune genes surfactant proteins A and D, sheep beta defensin 1, and toll-like receptor 4 by respiratory epithelia is developmentally regulated in the preterm neonatal lamb. *Dev Comp Immunol.* 30: 1060–1069.

Mizel SB, Honko AN, Moors MA, Smith PS, West AP. (2003) Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-Like receptor 5/Toll-Like receptor 4 complexes. *J Immunol* 170: 6217–6223.

Morris GE, Whyte MK, Martin GF, Jose PJ, Dower SK, Sabroe I. (2005) Agonists of toll-like receptors 2 and 4 activate airway smooth muscle via mononuclear leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 814–822.

Mortola JP. (2001) *Respiratory Physiology of Newborn Mammals—A Comparative Perspective*, John Hopkins University Press, Baltimore, pp.18

Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A, Prince A. (2004) Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 777–783.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164: 5998–6004.

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

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

Petrikin JE, Gaedigk R, Leeder JS, Troug WE. (2010) Selective Toll-Like receptor expression in human fetal lung. *Pediatr Res* 68: 335–338.

Plantinga M, Hammad H, Lambrecht BN. (2010) Origin and functional specializations of DC subsets in the lung. *Eur J Immunol* 40: 2112–2118.

Randell SH, Mercer RR, Young SL (1989) Postnatal growth of pulmonary acini and alveoli in normal and oxygen-exposed rats studied by serial section reconstructions. *Am J Anat* 186: 55–68.

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

- Scheuermann DW, Van Meir F, Adriaensen D, Timmermans JP, De Groodt-Lasseel MH. (1988) Development of alveolar septa and formation of alveolar pores during the early postnatal period in the rat lung. *Acta Anat* 131: 249–261.
- Schneberger D, Caldwell S, Suri SS, Singh B. (2009) Expression of toll-like receptor 9 in horse lungs. *Anat Rec* 292: 1068–1077.
- Schneberger D, Lewis D, Caldwell S and Singh B (2011) Expression of toll-like receptor 9 in lungs of pigs, dogs and cattle. *Int J Exp Path* 92: 1–7.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274: 17406-17409.
- Sethi RS, Brar RS, Singh O, Singh B. (2011) Immunolocalization of Pulmonary Intravascular Macrophages, TLR4, TLR9 and IL-8 in Normal and *Pasteurella multocida*-infected Lungs of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Comp Path* 144: 135–144.
- Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. (2004) Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 358–364.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189: 1777–1782.
- Sukkar MB, Xie S, Khorasani NM, Kon OM, Stanbridge R, Issa R, Chung KF (2006) Toll-like receptor 2, 3 and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 118: 641–648.
- Suri SS, Janardhan KS, Parbhakar O, Caldwell S, Appleyard G, Singh B. (2006) Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs. *Vet Res* 37: 541–551.
- Takeda K, Takeuchi O, Akira S. (2002) Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 8: 459-463.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335–376.

- Takeda K, Akira S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1–14.
- Tasat DR, Mancuso R, O'Connor S, Molinari B. (2003) Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. *Aging Cell* 2: 159–164.
- Tschanz SA (2007) Strukturelle Aspekte der prä- und postnatalen Lungenentwicklung, *Pneumologie* 61: 478–489.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811–815.
- Underhill DM, Ozinsky A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14: 103–110.
- Underhill DM. (2003) Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 33: 1767–1775.
- Wassef A, Janardhan K, Pearce JW, Singh B. (2004) Toll-like Receptor 4 in normal and inflamed lungs and other organs of pig, dog and cattle. *Histol Histopathol* 19: 1201–1208.
- Weibel ER. (1967) Development of the lung. Ciba Foundation Symposium London.
- Weiss RA, Chanana AD, Joel DD. (1985) The status of pulmonary host defense in the neonatal sheep: cellular and humoral aspects. *Ann N Y Acad Sci* 459: 40–55.
- Weiss RA, Chanana AD, Joel DD. (1986) Postnatal maturation of pulmonary antimicrobial defense mechanisms in conventional and germ-free lambs. *Pediatr Res* 20: 496–504.
- Werling D, Jungi TW. (2003) Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91: 1–12.
- Wikstrom ME, Stumbles PA. (2007) Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol Cell Biol* 85: 182–188.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. (2000) Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165: 7125–7132.

- Yeo SP, Stokes CR, Taylor FG, Bourne FJ. (1993) Maturation of cellular defence in the respiratory tract of young calves. *Res Vet Sci* 55: 292–297.
- Zarembek KA, Godowski PJ. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J Immunol* 168: 554–561.
- Zeidler RB, Kim HD. (1985) Phagocytosis, chemiluminescence, and cell volume of alveolar macrophages from neonatal and adult pigs. *J Leukoc Biol* 37: 29–43.
- Zerbe H, Schneider N, Leibold W, et al. (2000) Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54: 771-786.
- Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. (2002) Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Letters* 532: 171-176.
- Zink MC, Johnson JA. (1984) Cellular constituents of clinically normal foal bronchoalveolar lavage fluid during postnatal maturation. *Am J Vet Res* 45: 893–897.

TEŞEKKÜR

Bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TSA-11-3604 nolu proje olarak desteklenmiştir.