

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMDE
DOĞAL LENFOİD HÜCRELERİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Hüseyin YİĞİT

Danışman
Prof. Dr. Erdoğan UNUR

Doktora Tezi

ARALIK 2024

KAYSERİ

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMDE
DOĞAL LENFOİD HÜCRELERİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Hazırlayan
Hüseyin YİĞİT

Danışman
Prof. Dr. Erdoğan UNUR

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2023-12483 kodlu proje ile desteklenmiştir.

ARALIK 2024

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı Soyadı: Hüseyin YİĞİT

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

Sıçanlarda Prenatal ve Postnatal Dönemde Doğal Lenfoid Hücrelerin Araştırılması adlı **Doktora Tezi** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Hüseyin YİĞİT

Danışman

Prof. Dr. Erdoğan UNUR

Anatomi ABD Başkanı

Prof. Dr. Harun ÜLGER

KABUL ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Erdoğan UNUR danışmanlığında **Hüseyin YİĞİT** tarafından hazırlanan “**Sıçanlarda Prenatal ve Postnatal Dönemde Doğal Lenfoid Hücrelerin Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

...../...../2024

JÜRİ:

İmza

Danışman	: Prof. Dr. Erdoğan UNUR	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER	
Üye	: Doç. Dr. Ahmet EKEN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Kadirhan DOĞAN	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ÖMERLİ	

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2024

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik hayatıma başladığım ilk günden beri, bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen, adeta bir “BABA” gibi her daim beni izleyen, geliştiren ve destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Erdoğan UNUR’a sonsuz şükranlarımı sunarım. Tezimin gerçekleştirilmesine engin bilgileri ve destekleriyle yön veren, kendi malzemelerini tereddüt etmeden kullanmamıza imkan tanıyan değerli Doç. Dr. Ahmet EKEN ve Dr. Şerife ERDEM hocalarıma teşekkür ederim. Anatomi eğitimimde büyük emekleri olan Anatomi Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Harun ÜLGER hocama da ayrıca teşekkür ederim. Hem akademik hayatımda hem de tezimin deneysel süreçlerinde bilgi ve fikir alışverişlerinde bulunup emeklerini esirgemeyen hocalarım; Doç. Dr. İlyas UÇAR’a, Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER’e, Dr. Öğr. Üyesi Kadirhan DOĞAN’a ve Öğr. Gör. Mustafa TAŞTAN’a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her zaman desteğini hissettiğim değerli abim beyin cerrahı Dr. Abdülkerim GÖKOĞLU’na da teşekkürü borç bilirim. Tezimin deneysel süreçlerine katılan Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 4. sınıf lisans öğrencileri Batuhan DENİZ ve Beyza Nur ÖZKURT’a da nazik destekleri için teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca ders aldığım Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine teşekkürü borç bilirim. Anatomi Anabilim Dalı çalışanları Kazım KARABULUT ve Ferhat ÇAKMAKKAYA’ya da emekleri için teşekkür ederim.

Bu yaşıma kadar desteklerini esirgemeyen sevgili anne ve babama, kardeşlerime teşekkür ederim. Varlığıyla değer katan, yaşam enerjimi arttıran hayat arkadaşım, eşim Gözde YİĞİT’e ve tezimin deneysel aşamalarında dünyaya gelen oğlum Oğuz Kağan YİĞİT’e teşekkür ederim. Eşimin ailesine de ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Hüseyin YİĞİT

Kayseri, Aralık 2024

SIÇANLARDA PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMDE DOĞAL LENFOİD HÜCRELERİN ARAŞTIRILMASI

Hüseyin YİĞİT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Aralık, 2024

Danışman: Prof. Dr. Erdoğan UNUR

ÖZET

Doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) son 15 yıl içinde keşfedilen bağışıklık hücre ailesidir. ILC'ler bakteri, virüs ve mantar gibi mikroorganizmalara yanıt olarak sitokin salgılayarak ve adaptif immün hücreleri düzenleyerek bağışıklığa katkıda bulunurlar. Bununla birlikte, gelişim sırasındaki dağılımları tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmanın amacı, embriyonik günlerden postnatal (PN) 30. güne kadar sıçan gelişimi boyunca dokuya özgü ILC popülasyonlarındaki değişiklikleri karakterize etmektir.

Bu çalışmada; karaciğer, akciğer, dalak, mezenterik lenf düğümleri (mLN), timus, ince bağırsak ve kolon dahil olmak üzere çeşitli organlardaki ILC alt kümelerini analiz etmek için akış sitometrisi kullanıldı.

Bulgular, ILC popülasyonlarında farklı dokular ve gelişim aşamaları arasında önemli değişimler olduğunu ortaya koydu. Karaciğerde, ILC3'ler doğum öncesi bol miktarda bulunurken, ILC1'ler doğumdan bir hafta sonra artmış ve ILC2'ler doğum sonrası ilk ayın sonunda artış göstermiştir. Akciğerde doğumdan sonra ILC1 ve NK progenitör hücrelerinde artış görülmüştür. ILC3'ler doğumdan sonraki ilk hafta boyunca akciğerde artmış olsa da, doğum sonrası ilk ayın sonunda dramatik bir şekilde azalmıştır. Dalak, fetal dönemdeki ILC3 baskınlığından PN30'da ILC2 baskınlığına geçiş göstermiştir. MLN'de ILC2'ler gelişim boyunca baskın kalmıştır. Timusta, ILC3'ler baskın alt tipti ve doğumdan sonra NK hücre temsilinde bir azalma gözlemlendi. İnce bağırsak ve kolon ILC2 baskınlığı gösterirken, postnatal kolonda ILC1'lerde kayda değer bir artış gözlemlenmiştir.

Bu çalışma, sıçan hematopoetik, lenfoid ve lenfoid olmayan organlarında prenatal ve postnatal gelişim sırasında ILC popülasyonlarındaki değişimleri aydınlatarak boşluğu doldurmaktadır. Sıçanlar immünolojik araştırmalarda fareler kadar yaygın olarak kullanılsa da, bulgularımızın ILC'leri inceleyen bilim insanları için değerli bilgiler sağlayacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Doğal lenfoid hücreler; Embriyo; Gelişim; Organlar; Sıçan.

INVESTIGATION OF INNATE LYMPHOID CELLS IN THE PRENATAL AND POSTNATAL PERIOD IN RATS

Hüseyin YİĞİT

Erciyes University Institute of Health Sciences

Department of Anatomy Doctoral Thesis, December, 2024

Supervisor: Prof. Dr. Erdoğan UNUR

ABSTRACT

Innate lymphoid cells (ILCs) are a family of immune cells discovered within the last 15 years. ILCs contribute to immunity by secreting cytokines and regulating adaptive immune cells in response to microorganisms such as bacteria, viruses, and fungi. However, their distribution during development remain incompletely understood. This study aimed to characterize the changes in tissue-specific ILC populations throughout rat development, from embryonic days to postnatal day (PN) 30.

We employed flow cytometry to analyze ILC subsets in various organs, including the liver, lung, spleen, mesenteric lymph nodes (mLN), thymus, small intestine, and colon.

Our findings revealed significant shifts in ILC populations across different tissues and developmental stages. In the liver, ILC3s were abundant prenatally, while ILC1s became prevalent one week after birth, and ILC2s increased by the end of the first month postnatally. The lung displayed an increase in ILC1s and NK progenitor cells postnatally. Although ILC3s increased in the lung during the first week after birth, they dramatically decreased by the end of the first postnatal month. The spleen exhibited a transition from ILC3 dominance in the fetal period to ILC2 dominance at PN30. In mLN, ILC2s remained dominant throughout development. In the thymus, ILC3s were the predominant subtype, and a decrease in NK cell representation was observed after birth. While the small intestine and colon showed ILC2 dominance, a notable increase in ILC1s was observed in the colon postnatally.

This study fills gap by elucidating the shifts in ILC populations during prenatal and postnatal development in rat hematopoietic, lymphoid, and non-lymphoid organs. Although rats are not as widely used as mice in immunological research, we believe our findings will provide valuable insights for scientists studying ILCs.

Keywords: Development, Embryo, Innate lymphoid cells, Organs, Rat.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doğal Lenfoid Hücreler	3
2.2. ILC'lerin keşfi	5
2.3. ILC'lerin Sınıflandırılması.....	6
2.3.1. NK hücreleri ve ILC1'ler	6
2.3.2. ILC2'ler	9
2.3.3. ILC3'ler	10
2.3.4. LT _i Hücreleri	11
2.4. ILC'lerin Gelişimi	11
2.5. ILC'lerin Hastalıklarda Rolü.....	14
2.5.1. Akciğer hastalıklarında ILC'lerin rolü	14
2.5.2. Bağırsak hastalıklarında ILC'lerin rolü	15
2.6. Sıçanlarda ILC'ler	16
2.7. Sıçanlarda organ gelişimi	17
2.7.1. Karaciğer	17
2.7.2. Timus	18
2.7.3. Akciğer	18
2.7.4. Bağırsaklar	18
2.7.5. Mezenterik Lenf Nodu	19

vii

2.7.6. Dalak.....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Deneysel Araştırma Grupları	23
3.1.1. Hayvan Seçimi.....	23
3.1.2. Grupların Oluşturulması.....	23
3.1.3. Gebe Sıçanlardan Yavruların İzolasyonu	24
3.1.4. Fetüs ve Yavrulardan Organ Elde Edilmesi	24
3.1.5. Organlardan Lenfosit İzolasyonu	24
3.2. Lenfositlerden ILC'lerin Elde Edilmesi	25
3.2.1. Lenfositler İçerisindeki ILC Popülasyonunun Total Yüzdesi ile Mutlak Sayılarının Belirlenmesi.....	25
3.2.2. TF Boyaması	25
3.2.3. Antikorlar, Katalog Numaraları ve Menşei	26
3.3. ILC'lerin Sitokin Üretim Kapasitesi	27
3.3.1. Lenfositler İçerisindeki ILC İşlevselliğinin Sitokin Üretim Kapasitelerine Göre Belirlenmesi.....	27
3.4. Flow Sitometri Cihazında Sıçan ILC'lerinin Tespit Edilmesi için Uygulanan Kapılama Stratejisi	28
3.5. Flow Sitometri Cihazında Sıçan ILC'lerinin Hücre İçi Sitokin Üretim Kapasitesinin Tespit Edilmesi için Uygulanan Kapılama Stratejisi.....	31
3.6. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Hepatik ILC'lerin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	33
4.2. Akciğer ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	44
4.3. Dalak ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	55
4.4. mLN ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	66
4.5. Timus ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	77

4.6. Colon ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	88
4.7. İnce Bağırsak ILC'lerinin E20.5'te Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular	97
4.8. ILC'lerin Lenfosit Yüzdesi Olarak Farklı Dokularda ve Günlerde Dağılımı.....	100
5. TARTIŞMA	104
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	131
7. KAYNAKÇA	132

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

Ahr	: Aril Hidrokarbon Reseptörü
BN	: Brown Norway
CCL3	: Makrofaj İnflamatuvar Proteini
CCL ₄	: Karbon Tetra Klorür
CD	: Cluster of Differentiation, Başkalaşım Kümesi
CD127	: IL-7 Reseptör Alfa
CHILP	: Ortak Yardımcı ILC Prekürsörü
CLP	: Ortak Lenfoid Progenitör
CXCL13	: Kemokin Ligand 13
DC	: Dentritik Hücre
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E	: Embriyonal
EILP	: Erken ILC Progenitörü
Eomes	: Eomesodermin
GATA-3	: GATA Bağlayıcı Protein 3
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HPC	: Hematopoetik Progenitör Hücreler
Id2	: DNA Bağlayıcı 2'nin Transkripsiyon Faktörü İnhibitörü
IEL	: Intraepitelyal Lamina
IFN- γ	: Interferon- γ
IgA	: Immünoglobülin A
IGF1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL	: Interlökin
IL-7R α	: IL-7 Reseptör Alfa

ILC	: Doğal Lenfoid Hücre
IRI	: İskemik Reperfüzyon Hasarı
iILC2	: inflamatuvar ILC2
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LEW	: Lewis
Lin/Lineage	: Soy belirteci
LMPP	: Lenfoid Eğilimli Multipotent Progenitör
LN	: Lenf düğümü
LP	: Lamina Propria
LTi	: Lenfoid Doku İndükleyici
LTiP	: Lenfoid Doku İndükleyici Progenitörü
LT α 1 β 1	: Lenfotoksin
LT β R	: Lenfotoksin- β Reseptörü
Ly49	: Membran C Tipi Lektin Benzeri Reseptör
MHC-I	: Major Histokompatibilite Kompleksi Sınıf I
MMP-9	: Matris Metaloproteinaz-9
NCR	: Doğal Sitotoksikite Reseptörü
Nfil3	: İnterlökin 3 Düzenlenmiş Nükleer Faktör
NK	: Naturel Killer; Doğal Öldürücü
Plzf	: Promyelositik Lösemi Zinc Transkripsiyon Faktörü
PN	: Postnatal
RAG	: Rekombinant Aktive Edici Gen
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa- β Ligandının Reseptör Aktivatörü
ROR γ t	: Nükleer Faktör Retinik Asit İlişkili Orfan Reseptör γ t
S1P	: Sfingozin-1-Fosfat

SLO	: Sekonder Lenfoid Organ
SPD	: Sprague Dawley
T-bet	: T-box Transkripsiyon Faktörü
TGF- β 1	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü β 1
T _h	: T yardımcı
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
tNK	: Timik NK
TRAIL	: TNF Süper Aile Üyesi İle İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
Treg	: Düzenleyici T Hücre
TSLP	: Timik Stromal Lenfopoietin
YS	: Yolk Kesesi
α LP	: α -Lenfoid Prekürsör

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	ILC grupları ile ILC'lere ait transkripsiyon faktörleri ve sitokinler.	4
Şekil 2.2	ILC'ler ile T hücrelerinin benzerlikleri ve farklılıkları.	5
Şekil 2.3.	İnsan ve farede ILC'lerin dokulara göre dağılımı.	9
Şekil 2.4.	Kök hücrelerden myeloid hücre ve lenfositlerin oluşum basamakları.	13
Şekil 2.5.	CLP'lerden ILC'lerin oluşum basamakları.....	14
Şekil 2.6.	Carnegie evreleri.....	17
Şekil 2.7.	Fare embriyosunda lenf nodu oluşum aşamaları.	20
Şekil 3.1.	Çalışmanın grafik özeti.....	22
Şekil 3.2.	TF Mix 1'e ait ILC2 ve ILC3'lerin tespiti için uygulanan kapılama stratejisi, colon örneği.....	30
Şekil 3.3.	TF Mix 2'ye ait NK hücreleri ile ILC1'lerin tespiti için uygulanan kapılama stratejisi, karaciğer örneği.	30
Şekil 3.4.	ILC'lerin hücre içi sitokin üretim tespiti için uygulanan kapılama stratejisi, colon örneği.	31
Şekil 4.1.	Hepatik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. .	34
Şekil 4.2.	Hepatik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. 35	
Şekil 4.3.	Hepatik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	36
Şekil 4.4.	Hepatik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları 37	
Şekil 4.5.	Hepatik NKp ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri ..	38
Şekil 4.6.	Hepatik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	39
Şekil 4.7.	Hepatik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	40

Şekil 4.8.	Hepatik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.	41
Şekil 4.9.	Hepatik ILC'lerin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri.....	41
Şekil 4.10.	IFN γ üreten hepatic ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	42
Şekil 4.11.	IL-17A üreten hepatic ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	43
Şekil 4.12.	Hepatik ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri.....	44
Şekil 4.13.	Akciğerdeki ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri ..	45
Şekil 4.14.	Akciğerdeki ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	46
Şekil 4.15.	Akciğerdeki ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	47
Şekil 4.16.	Akciğerdeki ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	48
Şekil 4.17.	Akciğerdeki NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri.....	49
Şekil 4.18.	Akciğerdeki NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	50
Şekil 4.19.	Akciğerdeki NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	51
Şekil 4.20.	Akciğerdeki ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	52
Şekil 4.21.	Akciğer ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri.....	52

Şekil 4.22.	IFN γ üreten akciğer ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	53
Şekil 4.23.	IL-17A üreten akciğer ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.	54
Şekil 4.24.	Akciğer ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri.	55
Şekil 4.25.	Splenik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. .	56
Şekil 4.26.	Splenik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları..	57
Şekil 4.27.	Splenik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	58
Şekil 4.28.	Splenik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları..	59
Şekil 4.29.	Splenik NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri	60
Şekil 4.30.	Splenik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	61
Şekil 4.31.	Splenik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	62
Şekil 4.32.	Splenik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. ...	63
Şekil 4.33.	Dalak ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri.....	63
Şekil 4.34.	IFN γ üreten dalak ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	64
Şekil 4.35.	IL-17A üreten dalak ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	65
Şekil 4.36.	Dalak ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri.....	66

Şekil 4.37.	mLN'deki ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. .67
Şekil 4.38.	mLN ILC2'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. 68
Şekil 4.39.	mLN ILC2'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. .69
Şekil 4.40.	mLN ILC3'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. .70
Şekil 4.41.	mLN'deki NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri.....71
Şekil 4.42.	mLN'deki NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....72
Şekil 4.43.	mLN'deki NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....73
Şekil 4.44.	mLN'deki ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....74
Şekil 4.45.	mLN ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri.....74
Şekil 4.46.	IFN γ üreten mLN ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....75
Şekil 4.47.	IL-17A üreten mLN ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....76
Şekil 4.48.	mLN'de tespit edilen ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri.77
Şekil 4.49.	Timik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri.....78
Şekil 4.50.	Timik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları79
Şekil 4.51.	Timik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları80
Şekil 4.52.	Timik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları81

Şekil 4.53. Timik NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri	82
Şekil 4.54. Timik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	83
Şekil 4.55. Timik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	84
Şekil 4.56. Timik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları	85
Şekil 4.57. Timus ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri.....	85
Şekil 4.58. IFN γ üreten timik ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	86
Şekil 4.59. IL-17A üreten timik ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	87
Şekil 4.60. Timusta tespit edilen ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri	88
Şekil 4.61. Colon'a ait ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri ..	89
Şekil 4.62. Colon'a ait ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	89
Şekil 4.63. Colon'a ait ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	90
Şekil 4.64. Colon'a ait ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	91
Şekil 4.65. Colon'a ait NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için E20.5 ve PN7'de uygulanan kapılama stratejileri	92

Şekil 4.66.	Colon'a ait NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	92
Şekil 4.67.	Colon'a ait NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	93
Şekil 4.68.	Colon'a ait ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.....	94
Şekil 4.69.	Colon'a ait ILC'lerin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri.....	94
Şekil 4.70.	IFN γ üreten colon'a ait ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları	95
Şekil 4.71.	IL-17A üreten colon'a ait ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları.	96
Şekil 4.72.	Colon'daki ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri	96
Şekil 4.73.	İnce bağırsağa ait ILC2, ILC2/ILC3, ILC3, NKp hücreleri, NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için uygulanan kapılama stratejileri	97
Şekil 4.74.	İnce bağırsağa ait E20.5'te tespit edilen ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lere ait tanımlayıcı grafikler.....	98
Şekil 4.75.	İnce bağırsağa ait E20.5'te tespit edilen NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lere ait tanımlayıcı grafikler.	99
Şekil 4.76.	İnce bağırsak ILC'lerinin sitokin üretim kapasiteleri ile ILC alt tiplerinin oranlarını gösteren tanımlayıcı grafikler.....	100
Şekil 4.77.	E20.5 embriyolarından elde edilen organlarda ILC alt tiplerinin total lenfositlere yüzdesel oranları	101
Şekil 4.78.	PN7 yavrulardan elde edilen organlarda ILC alt tiplerinin total lenfositlere yüzdesel oranları	102

Şekil 4.79. PN30 yavrulardan elde edilen organlarda ILC alt tiplerinin total lenfistlere yüzdesel oranları	103
---	-----



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Doğal Lenfoid Hücreler (ILC'ler), T hücrelerinin fenotip ve fonksiyonlarını yansıtan immün sistem ailesidir. ILC'ler fenotip ve fonksiyon açısından T hücrelerine benzese de, uyarıldıklarında klonal seçilime ve genişlemeye uğramazlar. Enfekte olan veya yaralanan dokuya hızlıca müdahale ederek bir dizi sitokin üretimi gerçekleştirir (Eberl ve ark., 2015). Lenfoid dokularda ve kanda oldukça nadir bulunur ve sıklıkla lenfoid olmayan organların mukozal yüzeylerinde lokalize olmaktadır (Gasteiger ve ark., 2015). Adaptif bağışıklığın regüle edilmesinde, dokunun yeniden şekillendirilmesinde ve tamirinde görev alır. Hematopoietik ve hematopoietik olmayan hücreleri regüle eder (Nagasawa ve ark., 2018). Adipoz dokunun metabolik ve termal homeostazisinde, akciğerde doku hasarının rejenerasyonunda, bağırsak hastalıkları ve bağırsak homeostazisinin diyetle etkileşiminin düzenlenmesinde (Xiong ve ark., 2022), tümör gelişiminin engellenmesinde (Yuan ve ark., 2021) ve daha birçok olayda ILC'ler doğrudan ve dolaylı olarak görev almaktadır. 2010 yılında üç farklı laboratuvarı bağımsız araştırmacılar tarafından keşfedilen bu hücreler, immünolojide yeni bir paradigma yaratmıştır (Eberl ve ark., 2015). ILC'leri hedefleyen farmakolojik terapiler geliştirilerek hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Ryu ve ark., 2023).

Embriyolojik çalışmalar konjenital, genetik ve diğer erken başlangıçlı hastalıkların arkasındaki mekanizmaların aydınlatılmasında önemli yer tutar. Son 15 yılda, ILC'ler immünolojide yeni bir paradigma yaratarak araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Çeşitli hayvan modellerinde embriyolojik dönemde ILC'lerin moleküler mekanizmalarının çözülmesi, bu hastalıkların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Farelerin sıçanlara kıyasla immünolojik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanıldığını kabul etmek önemlidir. Bununla birlikte, sıçan fizyolojisinin fare fizyolojisinden daha iyi anlaşıldığı ve insan fizyolojisine daha çok benzediği de bilinmelidir (Ellenbroek ve Youn, 2016; Iannaccone ve Jacob, 2009; "Rats!," 2010).

Keşfedildiği günden bugüne yaklaşık 15 yıl geçmesine rağmen, sadece beyin, akciğer ve bağırsaklardaki ILC'leri konu alan Web of Science indeksli 6070 araştırma makalesi, 2341 derleme makalesi yazılmıştır (Huang ve ark., 2024). ILC'ler fare modellerinde ve insanlarda kapsamlı olarak incelenmiştir (Huang ve ark., 2024), ancak sıçanlarda ILC'ler üzerine yapılan araştırmalar nispeten azdır. Son çalışmalar sıçanlarda ILC'leri araştırmış olsa da (Abidi ve ark., 2020; Sudworth ve ark., 2022), prenatal ve postnatal gelişim sırasında doku dağılımı, baskınlığı, sıklığı ve sitokin üretim kapasitesindeki değişiklikler büyük ölçüde keşfedilmemiştir. Bu çalışma, embriyonik dönemden doğum sonrası dönemlere kadar ILC durumunu inceleyerek sıçan dokularındaki bu değişiklikleri araştırmayı amaçlamıştır.

Çalışmamızın bu alanda gelecekte yapılacak araştırmalar için bir çerçeve sağlayacağına ve bulgularımızın sıçanlardaki ILC'lerin anlaşılmasına ve genel olarak bilimsel literatüre katkıda bulunacağına inanıyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

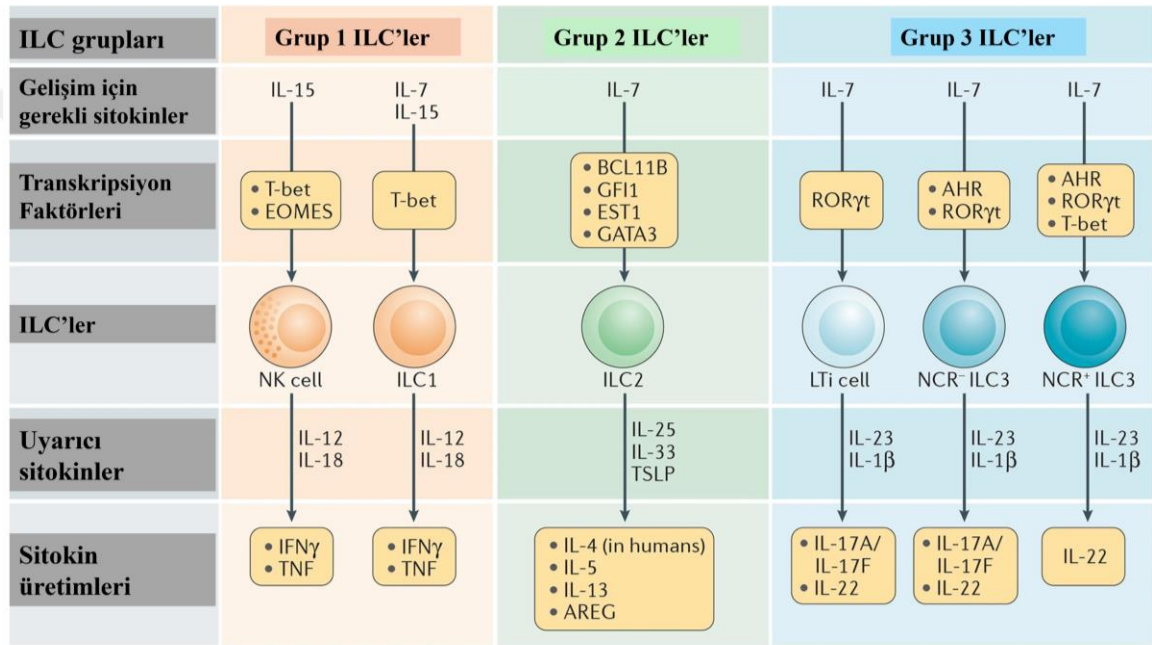
2.1. Doğal Lenfoid Hücreler

Doğal lenfoid hücreler (ILC'ler), ortak lenfoid progenitörlerden (CLP'ler) köken alan hücrelerdir. Son 15 yıl içinde keşfedilen bağışıklık hücre ailesidir. Patojenik doku hasarına yanıt olarak, ILC'ler sinyal moleküllerinin salgılanması ve hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesi yoluyla bağışıklığa katkı sağlar. ILC'ler primer olarak dokuda yerleşik hücrelerdir. Hem lenfoid (immün ilişkili) hem de lenfoid olmayan dokularda ve nadiren de kanda bulunurlar. Özellikle mukozal yüzeylerde bol miktarda bulunurlar ve mukozal bağışıklık ile homeostazda önemli rol oynarlar. Diğer bağışıklık hücrelerinden ayırt edilmelerini sağlayan özellikleri arasında düzenli lenfoid morfolojisi, T hücreleri ve B hücrelerinde bulunan yeniden düzenlenmiş antijen reseptörlerinin yokluğu (Rekombinant Aktive Edici Gen; RAG eksikliği nedeniyle) ve genellikle miyeloid veya dendritik hücrelerde (DC'ler) bulunan fenotipik belirteçler yer alır (Spits ve Cupedo, 2012). ILC'ler T hücreleri, B hücreleri, DC'ler, makrofajlar ve granülositlerle ilişkili hücre soyu (Lin) belirteçlerini ifade etmezler (barındırmazlar). Ancak CD90 (Thy1 antijeni), CD25 (interlökin [IL]-2R α) ve IL-7 reseptör alfa (CD127; IL-7R α) ifade ederler. ILC'ler CLP'lerden köken alarak, gelişimleri ortak γ zinciri (γ c veya CD132), IL-7, Notch ve DNA bağlayıcı 2'nin transkripsiyon faktörü inhibitörüne (Id2) bağlıdır (Spits ve ark., 2013).

ILC'ler 2013 yılına kadar fonksiyonlarından ötürü Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 şeklinde üç grupta incelenmekteydi (Spits ve ark., 2013) (Şekil 2.1). Ancak daha sonradan, Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği yalnızca işlevi değil aynı zamanda gelişimini de dikkate alarak beş grupta incelenmesini önermiştir. Bu öneri doğrultusunda ILC'ler; NK (natural killer = doğal öldürücü) hücreleri, ILC1, ILC2, ILC3 ve LTI (lenfoid doku indükleyici) hücreleri olmak üzere 5 farklı gruba ayrılarak

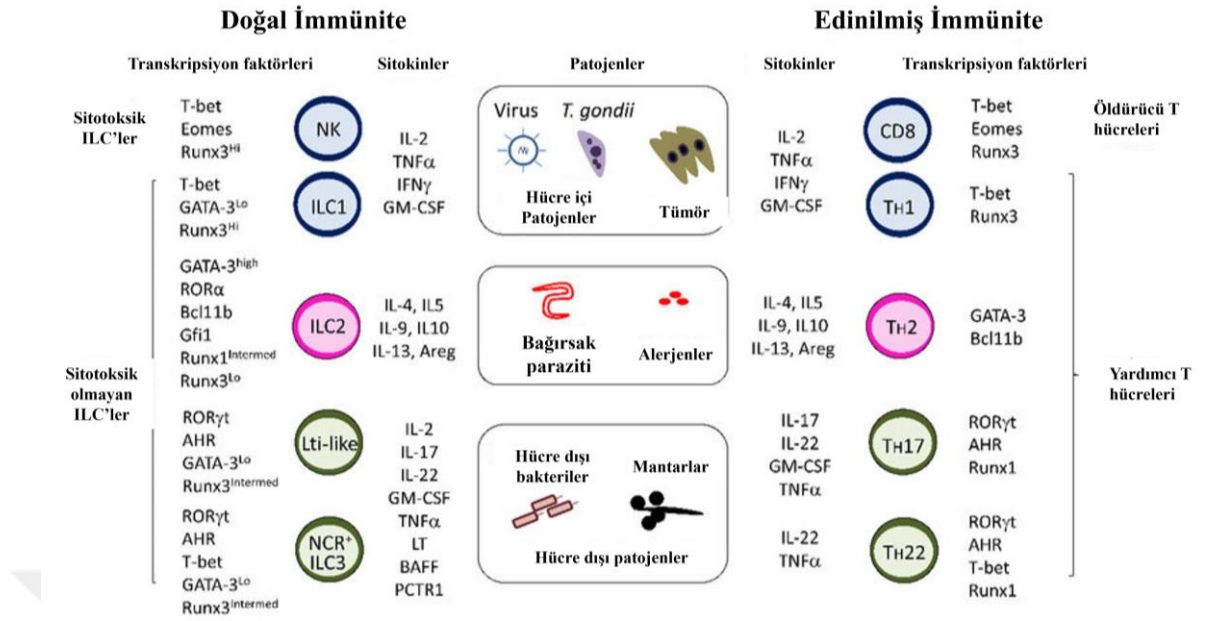
incelenmeye başlandı (Valle-Noguera ve ark., 2021). LTi hücrelerinin ILC3'lerin bir parçası olarak incelenmesi tartışma konusu olmaya devam etmektedir (Ishizuka ve ark., 2016).

ILC'ler morfosis, homeostaz, metabolizma ve doku onarımı gibi fizyolojik süreçlerde görev alır. Bu yüzden ILC'lerin eksikliği veya düzensizliklerinde bronşiyal astım, alerji ve otoimmün hastalıklar görülebilmektedir (Walker ve ark., 2013). Aynı zamanda T hücrelerine oldukça benzerdir. Bu yüzden T hücrelerinin doğuştan gelen karşılığı olarak telakki edilmiştir (Şekil 2.2) (Panda ve Colonna, 2019).



Nature Reviews | Immunology

Şekil 2.1. ILC grupları ile ILC'lere ait transkripsiyon faktörleri ve sitokinler (Ebbo ve ark., 2017).



Şekil 2.2. ILC'ler ile T hücrelerinin benzerlikleri ve farklılıkları (Ebihara, 2020).

2.2. ILC'lerin keşfi

Lenfositlerin tanınması, bağışıklığın anlaşılmasında tartışmasız önemli bir adım olmuştur. Bu çaba 19. yüzyılın ilk yarısında, Fransız tıp profesörü Gabriel Andral ve İngiliz tıp doktoru William Addison'ın 1843 yılında lökositlerin ilk tanımını birbirinden bağımsız olarak rapor etmesiyle başlamıştır (Addison, 1843; Andral, 1843). Sonrasında Paul Ehrlich, kan hücrelerini boyama ve sayma tekniğine öncülük ederek miyeloid hücreleri ve lenfoid hücreleri farklı beyaz kan hücresi soyları olarak tanımlamıştır (Ehrlich, 1879). Yüz yıl sonra ise kuşlarda ve memelilerde T ve B lenfositleri ayrı soylardan olduğu anlaşıldı (Cooper ve ark., 1965; DiGeorge, 1968; Nossal ve ark., 1968; Warner ve ark., 1962). 1997 yılında ise, Mebius ve arkadaşları, embriyonal dönemde Peyer plakları ve periferik lenf düğümlerinin (LN) oluşumu için elzem olan LTİ hücrelerini keşfetti (Mebius ve ark., 1997). Lenfoid ve miyeloid hücrelerin tanımlanmasından 130 yıl sonra, T ve B lenfositlerin tanımlanmasından ise 40 yıldan fazla bir süre sonra, dünya çapında 12 bağımsız laboratuvarında yapılan bir dizi çalışma sonucunda, lenfosit kompartımanı içinde beklenmedik yeni hücreler keşfedildi (Vivier, 2021). Bu hücreler ILC'ler olarak tanımlandı. 2010 yılında ise Moro ve arkadaşları adipoz dokuda ILC2'leri keşfetti (Moro ve ark., 2010). ILC'ler fonksiyon olarak T hücrelerine benzemelerine rağmen antijen reseptörlerini eksprese etmemeleri ve stimüle

edildiklerinde klonal seçim ve genişlemeye uğramamaları nedeniyle oldukça farklıdır. Enfeksiyon veya yaralanan dokuya derhal tepki vermeleri, sitokin olarak adlandırılan bağışıklık tepkilerini oluşturan bir dizi proteini hızlıca salgılamaları onları, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde eşsiz konuma yerleştirmektedir (Eberl ve ark., 2015).

2.3. ILC'lerin Sınıflandırılması

ILC'ler; NK hücreleri, ILC1, ILC2, ILC3 ve LT α hücreleri olmak üzere beş grupta sınıflandırılmaktadır.

2.3.1. NK hücreleri ve ILC1'ler

NK hücreleri onlarca yıldır kapsamlı bir şekilde incelenmiş olsa da ILC1'ler üzerindeki araştırmalar henüz emekleme aşamasındadır (Chen ve ark., 2022). Her iki hücre tipi interleukin 15 (IL-15), IL-12 ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlere duyarlı olup aktive edildiklerinde interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) üretirler (Zook ve Kee, 2016). IL-15 hem NK hücrelerinin hem de ILC1'lerin farklılaşması, homeostazı ve işlevi için gereklidir (Daussy ve ark., 2014). Her iki hücre tipi NK1.1 ve NKp46 hücre reseptörlerini eksprese etmektedir. Yine her iki hücre T hücrelerinde ifade edilen T-box transkripsiyon faktörünü (T-bet) eksprese eder. NK hücreleri 1970'lerin başında lösemi hücrelerini kendiliğinden öldürme yetenekleri ile tanımlanmıştır (Jiao ve ark., 2016). Günümüzde ise bu özelliğinden dolayı kanser-immün sistem ilişkisinde, transplantasyon reddinde ve erken viral bağışıklıkta anahtar konumunda kendine yer edinmiştir (Vivier ve ark., 2008). Örtüşen özelliklerine rağmen, NK hücreleri ve ILC1'ler fenotipik ve işlevsel olarak farklı iki bağışıklık hücresi alt kümesidir. ILC1'ler gelişimleri için T-bet'e ihtiyaç duyarken, NK hücreleri sadece olgunlaşma için T-bet ifadesine ihtiyaç duyar ve farklılaşma için transkripsiyon faktörü Eomesodermin'in (Eomes) ekspresyonunu gerektirir (Daussy ve ark., 2014; Gordon ve ark., 2012). Ancak ILC1'ler NK hücrelerinin aksine major histokompatibilite kompleksi sınıf I (MHC-I) moleküllerini tespit eden Ly49 ailesinin inhibitör reseptörlerinden yoksundur (Robinette ve ark., 2015). Dolayısıyla virüs ile enfekte olmuş veya MHC-I'li kanser hücrelerinin doğrudan tespit edilmesi NK hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Karre, 2002). NK hücreleri virüsle enfekte olmuş ve transforme olmuş hücreleri daha önce belirtilen yolla tanıır. Böylece hedef hücrelere karşı sitotoksisiteyi, aktivasyonu IFN- γ ve kemokinlerin

üretimini pozitif ve negatif olarak düzenleyen çeşitli aktive edici ve inhibe edici NK hücre reseptörlerini kullanarak uygular (Lanier, 2005; Vivier ve ark., 2011).

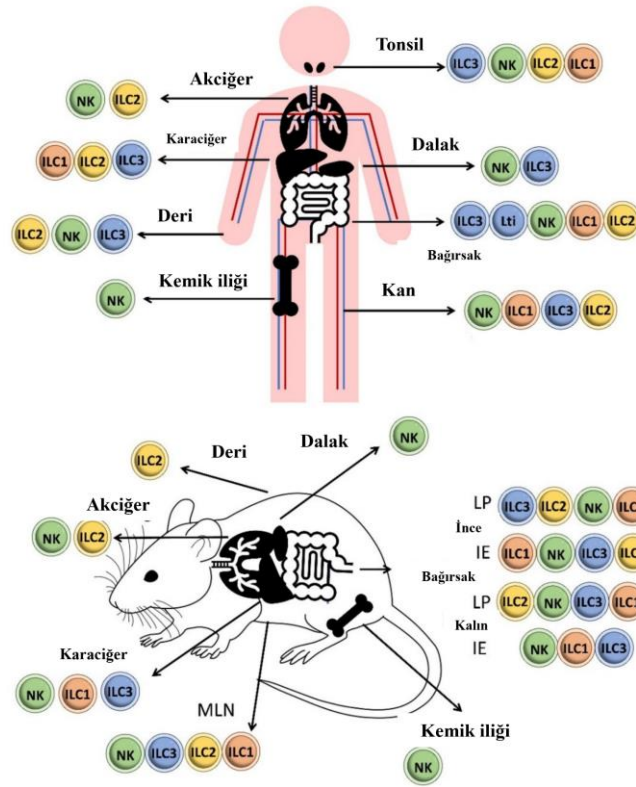
ILC1'ler fonksiyon olarak CD4⁺ T yardımcı (T_h) hücrelerinin karşılığıdır. Bu hücreler öncelikli olarak bulunduğu dokuda virüs, hücre içi bakteri, bazı parazitler ile hücre içi patojenlere tepki verir. Bu tepkisini IL-12'ye maruz kaldıktan hemen sonra IFN- γ üreterek gerçekleştirir (Nabekura ve Shibuya, 2021). Tarihsel olarak bakıldığında ILC1'ler, ilk olarak fare karaciğerinde, geleneksel NK hücre belirteci DX5'i ifade etmeyen ancak karşılıklı olarak büyük miktarlarda TNF süper aile üyesi ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) eksprese eden NK hücrelerinin atipik bir karaciğere özgü alt kümesi olarak keşfedilmiştir (Takeda ve ark., 2001). Bazı çalışmalarda NK hücrelerinin ILC1'leri aktive ettiği üzerine değinilmiş olsa da (Bouloumié ve ark., 2017; Nabekura ve ark., 2020), NK hücre reseptörleri aracılığıyla aktive edici ve inhibe edici sinyallerin ILC1'lerin aktivasyonunu ve işlevini düzenleyip düzenlemediği büyük ölçüde bilinmemektedir (Nabekura ve ark., 2020).

ILC1'ler ve NK hücrelerinin Grup 1 ILC'ler içerisinde beraber incelenmesi ve ortak özellikleri olmasına rağmen bu iki hücre tipi birbirinden ayrılır. En temel de bu iki hücre tipi farklı gelişimsel süreçlere sahiptir. ILC1'ler diğer ILC'ler de olduğu gibi öncü ILC'lerden gelişim gösterir. NK hücreleri ise kendi öncü NK hücrelerinden gelişim göstermektedir (Constantinides ve ark., 2014; Diefenbach ve ark., 2014; Klose ve ark., 2014). Bu konu ILC'lerin gelişiminde detaylı olarak ele alınacaktır. Ayrıca ILC1'lerin ve NK hücrelerinin gelişim esnasında, E4BP4 olarak bilinen interlökin 3 düzenlenmiş nükleer faktör (Nfil3) ve Eomes'e farklı ekspresyon ihtiyacından ötürü bu iki hücre birbirinden farklı tutulmaktadır (Kim ve ark., 2002; Seillet ve ark., 2014). NK hücreleri güçlü sitotoksik etki gösterirken ILC1'ler bu denli yüksek sitotoksik etki göstermemektedir. Yine NK hücreleri kan dolaşımı ve lenfatik sistem aracılığıyla lenfoid organlar arasında devir daim yapıyorken, ILC1'lerin ise dokuda yerleşik hücreler olduğu görülmektedir (Colonna, 2018; Jiao ve ark., 2016; Kim ve ark., 2016). NK hücreleri dolaşımdaki lenfositlerin %5-15'ini oluştururken, farelerde ise %2-5'ini oluşturmaktadır (Jiao ve ark., 2016).

ILC1 ve NK hücrelerinin fenotipleri türler arasında farklılık göstermektedir. Farelerde naif fenotipik durumda ILC1'ler NK1.1⁺NKp46⁺CD49a⁺DX5⁻Eomes⁻ olarak ifade

edilir. Farelerdeki ILC1'ler -inflamasyon olsa da olmasa da- kararlı biçimde CD200R'yi eksprese etmektedirler (Weizman ve ark., 2017). İnsanlarda ise ILC1'ler CD69, CD103 ve interlökin-7-reseptör-alfa (IL-7R α , CD127) ifade eden, T ve B lenfosit olmayan lenfositler olarak tanımlanmaktadır. Ancak burada insan ILC1'lerinde ilginç olarak diğer ILC'lerden eksprese edilen GATA-3, ROR γ t ile NK hücrelerinden eksprese edilen CD16, granzim, perforin ve Eomes'in de eksprese edildiğini belirtmek gerekir (Nabekura ve Shibuya, 2021). NK hücreleri klasik olarak CD3⁻NK1.1⁺ olarak tanımlanmıştır. Ancak LN ve dalak gibi sekonder lenf organları (SLO)'da olgunlaştıktan sonra daha spesifik bir belirteç olan NKp46'yı da eksprese etmektedir (Walzer ve ark., 2007).

Farelerde ve insanlarda ILC1'lerin bazı ortak ve ortak olmayan organlarda yer aldığı bilinmektedir. Hem insan hem de fare ILC1'leri karaciğer, bağırsaklar, lenf nodları, dalak, adipoz doku ve deri gibi organlarda ortak olarak yer alır. Ancak farelerde timus, tükürük bezleri, böbrek, peritoneal boşluk ve rahim de ILC1'ler yer alırken insanlarda yer almaz. Benzer şekilde insanda ise ILC1'ler akciğer ve kanda yer alırken farelerde yer almaz. Fare ILC1'leri ağırlıklı olarak karaciğerde lokalize iken insan ILC1'leri lenfoid organlar ve lenfoid olmayan organlara dağılım göstermiş vaziyettedir (Şekil 2.3) (Nabekura ve Shibuya, 2021).



Şekil 2.3. İnsan ve farede ILC'lerin dokulara göre dağılımı (Saez ve ark., 2021).

2.3.2. ILC2'ler

ILC2'ler ilk kez 2001'de IL-25'e yanıt olarak IL-5 ve IL-13 (goblet hücrelerinden mukoza salgılanmasını ve parazitlere karşı bağışıklığa katkıda bulunan düz kas kasılmasını teşvik eder) üreten, MHC-II ve CD11c eksprese eden B ve T lenfosit olmayan lenfositler olarak tanımlanmıştır (Fort ve ark., 2001). 2006 da ise bu hücre tipinin parazitlere karşı bağışıklıkta görev aldığı ifade edilmiştir (Fallon ve ark., 2006). 2010'da fare bağırsağında *Nippostrongylus brasiliensis* parazitinin karşı koruyucu bağışıklığı oluşturmasıyla kilit unsur olarak tanımlanmıştır (Moro ve ark., 2010; Neill ve ark., 2010; Price ve ark., 2010). 2011'de insanlarda ilk kez net olarak tanımlanmıştır (Mjösberg ve ark., 2011; Monticelli ve ark., 2011). ILC2'ler parazit bağışıklığı, hava yolu epitel onarımında ve metabolik homeostazide kritik rol oynar. Son zamanlarda üst ve alt solunum yolu, deri ve bağırsak gibi çoklu bariyer yüzeylerinin bulunduğu organlarda da önemli rol oynadığı ifade edilmektedir. Kemik iliğinde yer alan CLP'lerden köken alarak tip 2 sitokinleri üretmektedir (Kim ve Artis, 2015).

İnsanlarda ILC2'ler T_H2 hücreleri için kemoatraktan reseptör (CRTH2) ve CD161 yüzey moleküllerinin ekspresyonu ve transkripsiyon faktörü GATA-3 ile tanımlanmaktadır. Epitelyal ve myeloid kökenli IL-25, IL-33 ve timik stromal lenfopoietin (TSLP) sitokinlerine yanıt vermektedir. Bu sitokinlere verdiği yanıtlar, insanlarda solunum bozukluklarında görülen IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi tip 2 sitokinlerdir. Ayrıca farelerde parazit eliminasyonu ve doku onarımında da bu tip 2 sitokinler görülmektedir (Kokkinou, 2022). ILC2'ler farelerde baskın olan ILC alt tipidir (Mjosberg ve Spits, 2016). Farelerde iki tip ILC2 alt grup tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi dokuda yerleşik doğal ILC2'ler olarak tanımlanmaktadır. İkinci alt grup ise inflamatuvar sitokine maruz kaldığında göç edebilen inflamatuvar ILC2'ler (iILC2) olarak tanımlanmıştır (Huang ve ark., 2015). Homeostatik koşullarda ve akut parazit enfeksiyonu esnasında lokal olarak kalmaya devam eden ILC2'ler, enfeksiyonun kronik fazında hematolojik kaynaklardan gelen ILC2'lerle zenginleştirilir. Böylece enfeksiyonun temizlenmesi ve doku iyileşmesi sağlanır (Gasteiger ve ark., 2015). IL-25'e yanıt olarak iILC2'ler çoğalır, lenfatik ve kan dolaşımına katılarak sfingozin-1-fosfat'a (S1P) bağlı akciğer ve diğer periferik dokulara dağılır (Huang ve ark., 2018). Dolayısıyla ILC2'ler her ne kadar dokuda yerleşik hücreler olsa da bazı şartlarda dokudan dokuya göç ederek lokal inflamasyonu sistemik inflamasyona dönüştürebilirler (Naito ve Kumanogoh, 2023).

2.3.3. ILC3'ler

İki alt tipi bulunan ILC3'ler, gelişimleri için nükleer faktör retionik asit ilişkili orfan reseptör γ t (ROR γ t) ve aril hidrokarbon reseptörü'nü (Ahr) eksprese etmektedir (Qiu ve ark., 2012; Sanos ve ark., 2009). İnsanlarda akciğerde baskın olan ILC alt tipidir (Mjosberg ve Spits, 2016). Hücre yüzeyinde doğal sitotoksiste reseptörü (NCR) bulunan (NCR⁺ILC3) ve bulunmayan (NCR⁻ILC3) şeklinde birbirinden ayrılmaktadır. NCR, NK hücreleri ile adaptif ve doğuştan bağışıklık hücrelerinde yaygın bulunan hücre resptörüdür. NCR⁺ILC3'ler insanlarda IL-22'yi primer olarak sekrete ederken IL-17'yi az miktarda sekrete etmektedir. NCR⁻ILC3'ler IL-17'yi primer olarak sekrete ederken IL-22'yi az miktarda sekrete etmektedir (Hoorweg ve ark., 2012). T_H17 'nin doğuştan immünitadaki karşılığı olan bu hücreler, enfeksiyonlara karşı IL-17 ve IL-22'yi sekrete etmektedir. Düzenleyici T hücrelerini (Treg) koruyan makrofaj ve DC'lerin IL-10 salgılamasını indüklemektedir. Bu da bağırsak tolerasyonunda görevli granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör'e (GM-CSF) dolaylı olarak katkıda

bulunduğunu göstermektedir (Mortha ve ark., 2014). Farelerde $\text{NCR}^+\text{ILC3}^+$ ler $\text{Nkp46}^+\text{ILC3}$ ve $\text{Nkp44}^+\text{ILC3}$ şeklinde eksprese edilmektedir (Cupedo ve ark., 2009; Sanos ve ark., 2009). Farelerde $\text{Nkp46}^+\text{ILC3}^+$ ler T-bet ekspresyonu ve $\text{IFN-}\gamma$ üretimi ile bilinmektedir (Klose ve ark., 2013; Rankin ve ark., 2013). $\text{ROR}\gamma\text{t}^+\text{NCR}^+$ olan bu hücreler ilk keşfedildiklerinde NK hücrelerine benzetilerek NK hücrelerinin bir alt grubu olarak değerlendirilmiştir. Ancak hücre fate-mapping çalışmaları ile gelişimsel süreçleri farklı olan bu hücrelerin ayrı olduğu anlaşılmıştır (Koprivica ve ark., 2023).

2.3.4. LTi Hücreleri

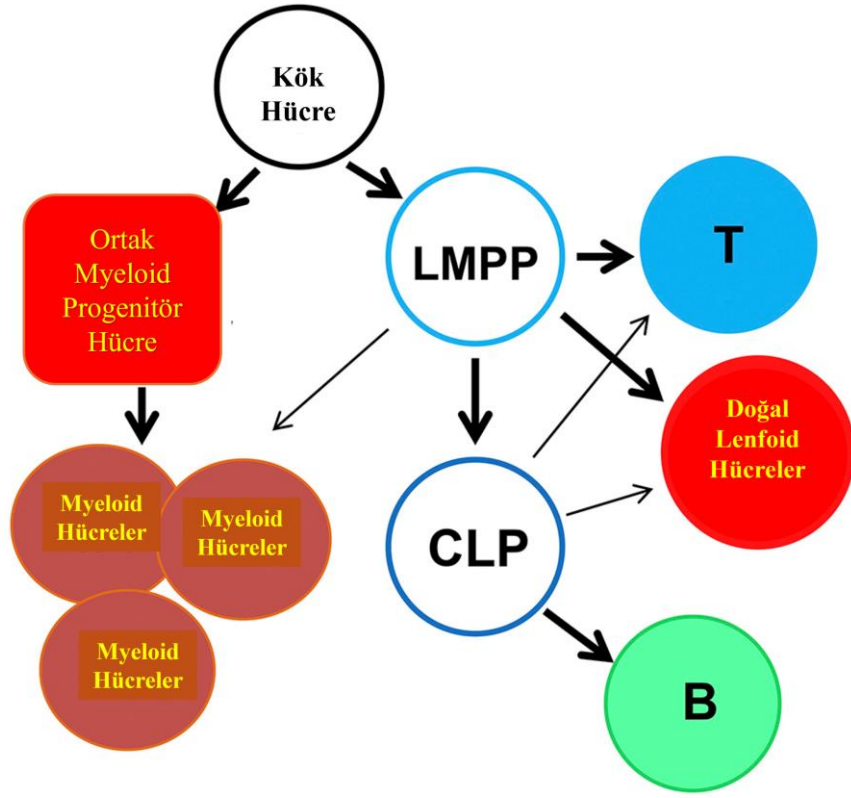
LTi'ler primitif lenfoid organlarda görülen, lenfotoksin ($\text{LT}\alpha\text{1}\beta\text{1}$) ve TNF üreten hücrelerdir. Lenfoid organogenez için gerekli kemokinleri, adezyon moleküllerini ve mezenkimal hücre üretimini uyarırlar (Mebius, 2003). $\text{ROR}\gamma\text{t}$ ve $\text{IL-7R}\alpha$ eksprese eden LTi hücreleri embriyogenez esnasında mezenterik ve periferik lenf nodları ile Peyer plakları gibi SLO'nun oluşumu için gereklidir. Hem farelerde (Eberl ve ark., 2004) hem de insanlarda (Okada ve ark., 2015) $\text{ROR}\gamma\text{t}$ mutasyonu veya delesyonu sonucu LTi hücreleri oluşamayacağından LN'lerde de kayıplar meydana geldiği bilinmektedir. LTi hücreleri, LN anlağı olarak adlandırılan LN agregatlarının oluşumu için embriyo içerisindeki lenfoid doku düzenleyici hücrelerle etkileşime girmektedir. Embriyogenez sürecinde ilk gözlenen ILC'ler olması onları benzersiz bir konuma getirmektedir (Van de Pavert ve Mebius, 2010).

Embriyonal dokularda bol miktarda tespit edilebilen LTi hücreleri, yetişkin dokularında nadiren bulunmaktadır. Bu da yetişkinlerde lenfoid doku oluşturma ihtiyacının embriyonal döneme göre azaldığına işaret etmektedir. Ancak bağırsak kriptleri ve bağırsak folikülleri gibi lenfoid dokuya ihtiyaç duyan bazı organlarda LTi hücrelerinin bol miktarda bulunduğu söylenebilir (Colonna, 2009; Vivier ve ark., 2009).

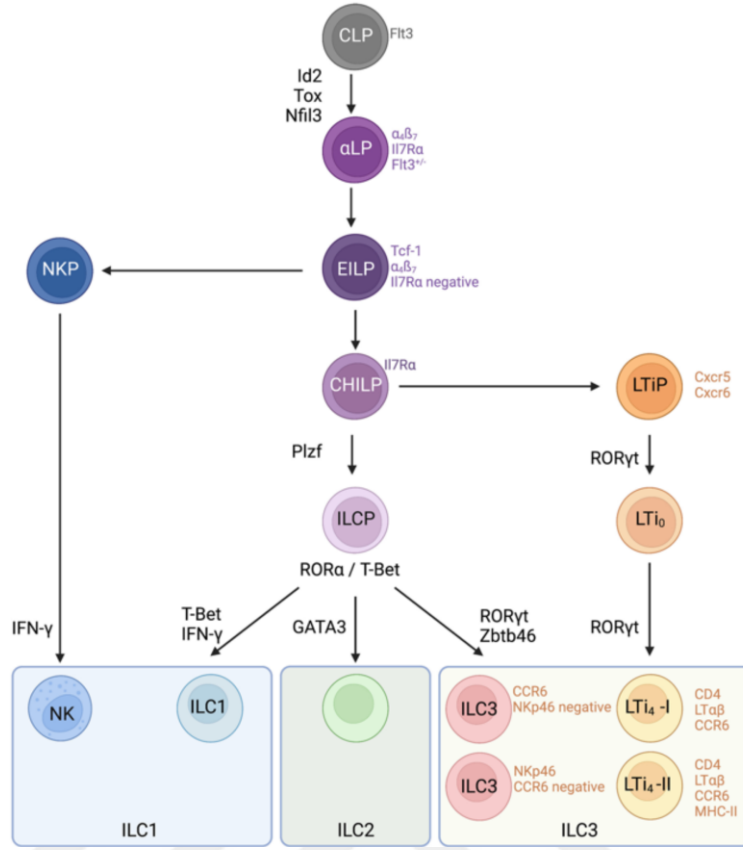
2.4. ILC'lerin Gelişimi

Lenfositlerin ortaya çıkış sürecine lenfopoez adı verilir. Lenfopoez sürecini, kademe kademe geçiren hematopoetik progenitör hücreler (HPC'ler) nihayetinde tek bir soy olarak karşımıza çıkmaktadır (Golub ve Cumano, 2013). Farelerdeki ilk progenitör oluşum aşaması, embriyonal hayatın 7. gününde (E7) yolk kesesinde (YS) ve E10.5'te aorta-gonad-mezonefroz'da meydana gelir. Bu iki organda yer alan hemojenik endotelial hücreler, hematopoetik potansiyele sahip hücrelere dönüşür. Ardından bu

hücreler hematopoezin primer organı karaciğere doğru vasküler yapılar içerisinde göç eder (Hernández-Torres ve Stehle, 2022). İnsanlarda bu süreç gebeliğin 3.-4. haftalarına denk gelmektedir (Mebius ve ark., 2001). HPC'lerden myeloid karakterini kaybetmiş ve hem ILC hem de T ve B lenfositleri üretme potansiyeline sahip CLP'ler meydana gelir (Palis ve Yoder, 2001). CLP'lerin yanı sıra lenfoid eğilimli multipotent progenitör (LMPP) hücrelerin, T hücreleri ve ILC2'lere daha etkin bir şekilde farklılaştığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Ghaedi ve ark., 2016). Farelerde HPC'lerin CLP'lere dönüşümü IL-7 sitokinine bağımlı bir şekilde gerçekleşmektedir. IL-7'yi ise E9.5'te YS'de tespit etmek mümkündür (Elsaid ve ark., 2021). CLP'lerden ILC'lerin meydana gelmesi farklı zamanlarda, farklı transkripsiyon faktörlerinin eksprese edilmesiyle şekillendirilir. ILC'leri oluşturan prekürsör hücreler, α -lenfoid prekürsör (α LP), erken ILC progenitörü (EILP) ve ortak yardımcı ILC prekürsörler (CHILP) olarak tanımlanmıştır. α LP, Nfil3 ve CD127 ekspresyonu ile tanımlanırken EILP, transkripsiyon faktörü 7'yi eksprese eden ancak CD127'yi eksprese etmeyen hücreler olarak tanımlanmaktadır. CHILP ise ID2 ve promyelositik lösemi zinc transkripsiyon faktörü (plzf) ekspresyonu ile tanımlanan; ILC1, ILC2, ILC3 ve LTi hücrelerini meydana getirmesiyle bilinen prekürsör olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.5) (Kokkinou, 2022).



Şekil 2.4. Kök hücrelerden myeloid hücre ve lenfositlerin oluşum basamakları, Ghaedi ve arkadaşlarının özet grafiğinden uyarlanmıştır (Ghaedi ve ark., 2016).



Şekil 2.5. CLP’lerden ILC’lerin oluşum basamakları (van de Pavert, 2023).

2.5. ILC’lerin Hastalıklarda Rolü

ILC’ler vücudumuza giren patojen ve zararlı organizmalara karşı ilk tepkiyi veren bağışıklık hücreleridir. Hemen hemen tüm organlarda olmasına rağmen, vücudun ilk bariyeri olarak kendini gösteren mukozal dokularda daha yoğun şekilde bulunmaktadır. Doku homeostazı ve inflamasyonda oynadığı anahtar roller nedeniyle araştırmacıların son yıllarda üzerine sıklıkla çalıştığı hücre grubu olmayı başarmıştır.

2.5.1. Akciğer hastalıklarında ILC’lerin rolü

ILC’ler bronş, bronşiol ve alveollerden oluşan alt solunum yolu rahatsızlıklarında doğrudan veya dolaylı olarak görev almaktadır. Akciğer epiteline zarar veren alerjenlerin meydana getirdiği alerjik astımda hasar alan epitel IL-33, IL-25 ve TSLP gibi alarminleri salgılar. Bu alarminler ise ILC2’leri harekete geçirerek, ILC2’lerin eozinofil ve M2 makrofajları toplamasını ve solunum yolunun inflamasyonunu sağlar (Ryu ve ark., 2023). ILC1’lerin ise kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOAH) akciğerde daha fazla olduğu rapor edilmiştir. ILC1’ler, T_H1 ve CD8⁺ T hücreleriyle

beraber alveolar makrofaj hücrelerine elastolitik proteazlar ve nitrik oksit salgılatan IFN- γ sekresyonu yapmaktadır. Bu sitokin ise KOAH patogeneğinde amfizeme yol açmaktadır (Hsu ve ark., 2021). Ayrıca sigara maruziyeti ve KOAH semptomları arttıkça ILC'lerin C57BL/6J farelerde arttığı rapor edilmiştir (Blomme ve ark., 2021). KOAH'ta sadece ILC1'lerin değil aynı zamanda ILC3'lerin de miktarında artış olduğu bilinmektedir (Bal ve ark., 2016). Sağlıklı insanlarda ILC'ler akciğer parankiminde lokalizeyken KOAH hastalarında ise akciğer içerisindeki lenfoid agregatlarda birikmeye başlamaktadır (Blomme ve ark., 2021). İlginç bir şekilde, NK hücrelerinin KOAH'ta otolog akciğer hücrelerini öldüren farklı bir fenotip özelliği kazandığı bildirilmektedir (Freeman ve ark., 2014). Finch ve arkadaşlarına göre bu özellik akciğer DC'lerinin salgıladığı IL-15R α 'nın NK hücrelerini yönlendirmesi ile gerçekleştirilmektedir (Finch ve ark., 2018). Dolayısıyla Ryu ve arkadaşları, KOAH semptomları ve akciğer dokusundaki ILC popülasyonunun birbiriyle bağlantılı olduğunu ifade etmektedir (Ryu ve ark., 2023).

2.5.2. Bağırsak hastalıklarında ILC'lerin rolü

Bağırsaklar diyetle alınan antijenler, komensal bakteriler ve patojenlerle sürekli etkileşim içerisinde olan organlardır. Bağırsaktaki bağışıklık sistemi komensal bakterilere, mikrobiyotaya ve besinlerle alınan antijenlere ve patojenlere karşı farklı tepkiler vermektedir. İşte bu noktada bağırsak içerisindeki inflamasyon ve homeostazinin düzenlenmesinde ILC'ler çok sayıda farklı hücrelerle etkileşime girer. Gastrointestinal sistem boyunca ILC'lerin miktarı azdan çoğa doğru değişir; ağızdan başlayarak ileum ve kolona kadar sayıca artış görülür (Saez ve ark., 2021). Bağırsaklarda bol miktarda bulunan ILC3'ler villusta sabit durumda ve büyük ölçüde hareketsiz şekilde beklemektedir. Ancak inflamasyon durumunda bu hücreler aniden tepki vererek “devriye atmaya” başlar, sitokin ekspresyonunu da artırır (Jarade ve ark., 2022). ILC'ler genellikle sitokine daha fazla sitokin üreterek cevap verir. ILC miktarı dokuda nispeten az olsa bile, hücre başına çok yüksek miktarlarda sitokin üreterek farklı sitokin kombinasyonlarına yol açarak ortamdaki sitokin miktarını keskin biçimde değiştirebilmektedir. Bu özelliklerinin yanı sıra immün olmayan stromal ve epitelyal hücrelerle de etkileşime girerek dokunun yeniden yapılanmasına katkıda bulunur. Üstelik T_h hücre farklılaşmasını sağlaması, T_h hücrelerine antijen sunması, T_h hücrelerinin efektör fonksiyonlarını teşvik edici aktiviteleri ile Treg hücreleriyle de

etkileşime girebilmesi ILC'leri eşsiz bir konuma yerleştirmektedir (Geremia ve Arancibia-Cárcamo, 2017) Bazı ILC popülasyonları inflamatuvar sinyallere ("eğitilmiş bağışıklık") yanıt olarak, yeni ve uzun vadeli fenotipler kazanabilmektedir. Serafini ve arkadaşları, farelerin *Citrobacter rodentium* ile enfekte edilmesinden sonra, aktive edilmiş ILC3'lerin bir alt kümesinin varlığını aylarca devam ettirdiğini bildirmiştir. Bu "eğitilmiş" ILC3'ler üstün aktivasyon göstermiş ve patojenle yeniden karşılaştıktan sonra enfeksiyonu "naif" ILC3'lerden daha iyi kontrol etmiştir. *Citrobacter rodentium* ile ilk karşılaşma, eğitilmiş ILC3'lerin metabolik yollarını kalıcı olarak yeniden düzenleyerek onlara çoğalma ve interlökin-22 gibi sitokinleri salgılama konusunda gelişmiş bir kapasite kazandırmaktadır (Serafini ve ark., 2022).

ILC'lerin bağırsak homeostazını sağlaması ve devam ettirmesi rollerinin yanı sıra hayvan modelleri ile insanlarda kronik bağırsak inflamasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. ILC'ler inflamasyon artırıcı (proinflamasyon) ajanların olduğu mikro çevrede hem proinflamatuvar hem de patojen özelliği gösteren ILC alt gruplarına dönüşebilmektedir. Graft versus host disease'de IL22 üreten ILC3'ler epitelyal proliferasyon ve doku onarımını sağlayarak intestinal inflamasyondan koruyucu özellik gösterir. Jarade ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada T hücreleri, CCL25 kemokini ve bakteriyel ligandların ILC3'lerin davranışını düzenlediği, ancak IL22 üreten ILC3'lerin "devriye atma" özelliğinin azalmasıyla epitel ölümüne bağlı bağırsak bariyerinin bozulduğu saptanmıştır (Jarade ve ark., 2022). Buna karşın uzun süre IL22'ye maruz kalmak epitelyal hücrelerde bozulmayla neoplaziye yani kolitle ilişkili kolon kanser riskini de arttırabilmektedir (Geremia ve Arancibia-Cárcamo, 2017).

2.6. Sıçanlarda ILC'ler

İnsanlarda ve farelerde ILC'ler iyi çalışılmış bir konudur. Ancak sıçanlarda ILC'ler hakkında yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Sıçanlarda ILC'ler ilk kez Cho ve arkadaşları tarafından orta kulak enfeksiyonunda ILC'lerin etkinliğinin bahsedildiği bir çalışmada rapor edilmiştir (Cho ve ark., 2016). Orta kulak boşluğu *Haemophilus influenzae* ile enfekte edilen sıçanlarda IL-17 ve IL-22 miktarları artmış, bu da araştırmacılara enfeksiyonun ilk günlerinde LTİ hücrelerinin bağışıklık tepkilerini verdiğini düşündürmüştür. Sıçanlarda geniş kapsamlı ILC'lerin araştırıldığı ilk çalışma 2020 yılında Abidi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar,

ILC3'lerin incelenen SLO'larda baskın alt tür olduğunu tespit ederken, bağırsakta ise - insan ve farelerin aksine- ILC2'lerin baskın alt tür olduğunu saptamıştır (Abidi ve ark., 2020). 2022 yılında ise Sudworth ve arkadaşları sıçanlarda ILC'leri daha geniş kapsamlı araştırmıştır. Araştırmacılar, ILC'lerin baskın alt türlerini organlara göre analiz etmiştir. Diğer dokulara göre karaciğerde ILC1'in, bağırsaklarda ILC3'ün daha fazla ve baskın olduğunu ortaya koymuşlardır (Sudworth ve ark., 2022).

2.7. Sıçanlarda organ gelişimi

Sıçanlarda organ gelişimi farelere göre yaklaşık bir gün geç ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla farelerde organogenezis sürecinde ortaya çıkan organın yaklaşık bir gün sonra sıçanlarda da görülebileceği düşünülebilir. Vertebralı memelilerin embriyonal aşamalarını kıyaslayan Carnegie Evreleri insan, fare ve sıçanların fetal gelişimlerindeki benzer zamanlar hakkında bilgi verebilir (Şekil 2.6) (Hill, 2019).

Carnegie Aşamaları		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
İnsan	Günler	1	2-3	4-5	5-6	7-12	13-15	15-17	17-19	20	22	24	28	30	33	36	40	42	44	48	52	54	55	58
Fare	Günler	1	2	3	E4.5	E5.0	E6.0	E7.0	E8.0	E9.0	E9.5	E10	E10.5	E11	E11.5	E12	E12.5	E13	E13.5	E14	E14.5	E15	E15.5	E16
Sıçan	Günler	1	3.5	4-5	5	6	7.5	8.5	9	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5

Şekil 2.6. Carnegie evreleri, embriyologlar tarafından embriyoların morfolojik olgunluğunu tanımlamak için kullanılan bir sistemdir. Bir embriyoya morfolojik özelliklerine göre bir Carnegie evresi (1'den 23'e kadar numaralandırılmış) atanır (Hill, 2019).

2.7.1. Karaciğer

Sıçan karaciğeri E10.5'te gelişmeye başlar. E11.5'te ise, hepatoblastlar henüz olgunlaşmasa da morfolojik olarak normal hücre görünümünü kazanmaya başlar. Ön bağırsakta yer alan primitif epitel hücreleri pars cystica (kaudal kısım) ve pars hepatica (sefalik kısım) adlı iki tomurcuk oluşturur. Bu tomurcuklardan kaudal kısım safra kesesi (sıçanlarda yok) ve sistik kanalı, sefalik kısım ise karaciğer parankimi, intrahepatik kanallar ile sağ ve sol hepatik kanalı meydana getirir. E13'te karaciğer genişleyerek diaphragma'nın kaudalinde konumlanır. E15'te olgunlaşmaya devam eden hepatositler, E17'de daha da olgunlaşarak, E19'da sayı ve boyut olarak belirgin farklılık gösterir. E21'de ise karaciğer yetişkin karaciğerine oldukça benzerdir (Moawad ve ark., 2014; Vdoviaková ve ark., 2016).

2.7.2. Timus

Kemirgen timusları üçüncü pharyngeal ark ektodermi ile ventral endodermden köken alır. E12.5'te timus'u meydana getiren primordial taslaklar sıçanlarda görülmektedir. ~E13'te bu taslaklar (boynun sağında ve solunda) kaudal yönde göç etmeye başlar. E15'te toraks içerisinde birbiriyle buluşan sağ ve sol timus taslakları birbirinden ayrılmaya başlar. Bu süreçte timus taslaklarının lenfosit ihtiva ettiği bilinmektedir. İlerleyen embriyonal günlerde lenfosit sayısı gittikçe artar. Timus'un E19 ve E21'de korteks ve medulla'sı birbirinden ayırt edilebilir şekilde netleşir. Lenfositlerin proliferasyonu kortekste oldukça aktif olup, korteks ve medulla arasındaki ayrımın kesin bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Lenfosit proliferasyonu ise doğumdan sonraki birkaç ay daha devam eder. Timus doğumdan sonraki 1 ay içerisinde tamamen olgunlaşır (Kuper ve ark., 1990).

2.7.3. Akciğer

Sıçanlarda akciğer gelişimi, embriyonal (E11-13), fetal [E13-postnatal 4. gün (PN)] ve postnatal olmak üzere üç evrede incelenmektedir. Bu evreler temel olarak morfolojik kriterlere dayanmaktadır. E11 ile E13 arasında ön bağırsağın öne doğru genişlemesiyle akciğer tomurcukları oluşur, her iki akciğer anlage (primitif taslak) uğrar, major hava yolları ve plevra şekillenir. Ardından dallanma morfogenezi olarak adlandırılan, akciğer tomurcuklarından başlayan solunum yollarının dallanması ve büyümesi başlar. Fetal akciğer gelişim evresinde psödoglandüler, kanaliküler ve sakküler aşamalar gözlenir. Postnatal akciğer gelişiminde ise alveolarizasyon ve mikrovasküler olgunlaşma gözlemlenir. Akciğer gelişimi sırasındaki çoğu süreç proksimalde başlayıp periferde doğru uzandığından, akciğer gelişiminin tüm evreleri birbiriyle iç içe geçmiş vaziyettedir (Habberthür, 2010; Schittny, 2017).

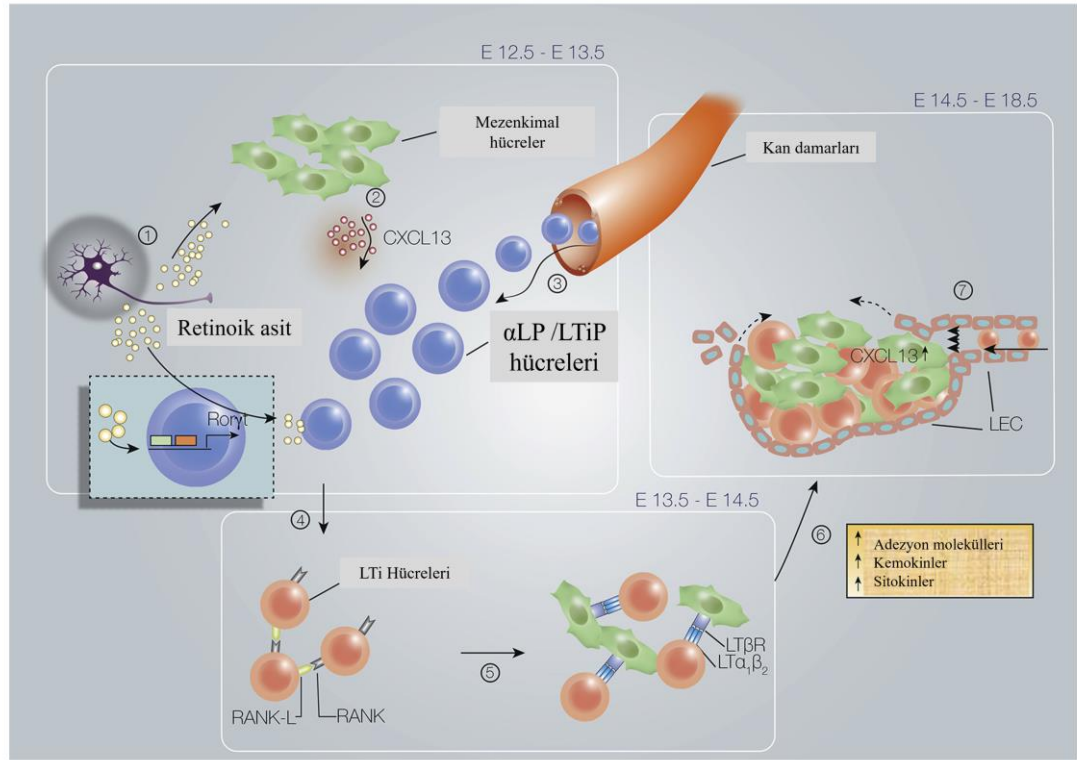
2.7.4. Bağırsaklar

Bağırsaklar embriyonal dönemden nihai formuna ulaşmaya dek bir dizi gelişimsel süreci takip etmektedir. Bu süreç, umblicus'un meydana gelmesi, orta bağırsağın plasentaya "fizyolojik herniasyonu", bağırsak rotasyonu ve bağırsağın tekrar karın boşluğuna dönüşü aşamalarıyla tamamlanmaktadır. Sıçan embriyosunda E10'da ön ve arka bağırsak divertikülleri meydana gelir. Embriyodaki bağırsak epiteli ventral yönde uzanarak YS ile devamlılık göstermektedir. E10 ila E11 arasında embriyo gövdesi

rotasyona başlamaktadır. Bu rotasyon sonucu, preumblikal halka olarak adlandırılan, gövde yanında bulunan epitel doku ise ventrale doğru yer değiştirmektedir. E11 ile E12 arasında, ductus omphaloentericus'un (YS'yi embriyonik bağırsak tüpüne bağlayan kanal) kaybolmasıyla ilk bağırsak halkası meydana gelmektedir. E12'de caecum ortaya çıkarak ince ve kalın bağırsak arasındaki ayrımı meydana getirir. E12'den E13'e kolon ve ince bağırsak 90° kadar dönüş gerçekleştirerek yan yana gelir. E15'te rastgele halkalar meydana gelerek bağırsakların büyümesi devam eder (Ginzel ve ark., 2021; Kluth ve ark., 2003).

2.7.5. Mezenterik Lenf Nodu

Farelerde lenf nodları ilk olarak E10.5'te gelişmeye başlar (Brendolan ve Caamaño, 2012). Sıçanlarda lenf nodlarının embriyonik gelişimi hakkında yeterli bilgi bulunmaması nedeniyle, Carnegie Evrelerine göre E11.5 ile E12.5 arasında geliştiği varsayılabilir. Lenf nodlarının gelişimi bir hat boyunca (anterior-posterior eksen) devam eder. Bu gelişim sürecinde progenitor hücreler belirginleşir, çoğalır ve organ oluşumu için gerekli moleküler ve hücreler etkileşimleri gerçekleştirir. İlk aşamada, sinir lifleri tarafından üretildiği düşünülen retinoik asit, mezenkimal hücrelerden kemokin ligand 13 (CXCL13) üretimini indüklemektedir. CXCL13 ise kandan LT_i ve LT_i progenitorlarını (LT_iP) lenf nodunun oluşacağı yere çeker. Bu esnada retinoik asit LT_iP'leri LT₀ hücrelerine dönüştürerek olgunlaştırır. Ortamda agregasyon yeterli seviyeye geldiğinde LT_i hücreleri olgun LT₄ hücrelerine LT α 1 β 2 eksprese ettirir. LT α 1 β 2 eksprese eden LT₄ hücreleri de lenfotoksin- β reseptörü (LT β R) eksprese eden stromal hücrelerle etkileşime girerek farklılaşır. Stromal organizatör olarak adlandırılan bu hücreler daha fazla ve daha farklı kemokin, adezyon molekülleri ve sitokinleri eksprese eder. Bu faktörler ise daha fazla LT_i hücrelerinin bölgeye çekilerek tutulmasını sağlar. Tüm bu sinyalizasyon sonrasında lenfatik endotel hücreleri LN anlagesine katılmak üzere göç eder ve kapsül içerisindeki sinüsü çevrelemeye başlar. Deri gibi yapılarda yer alan LT_i hücreleri yeni oluşan LN anlagesine drene edilir. Yeni LT_i hücreleri anlagenin devamlılığı ve büyümesi için gereklidir (Şekil 2.7) (van de Pavert, 2021, 2023).



Şekil 2.7. Fare embriyosunda lenf nodu oluşum aşamaları (van de Pavert, 2021).

2.7.6. Dalak

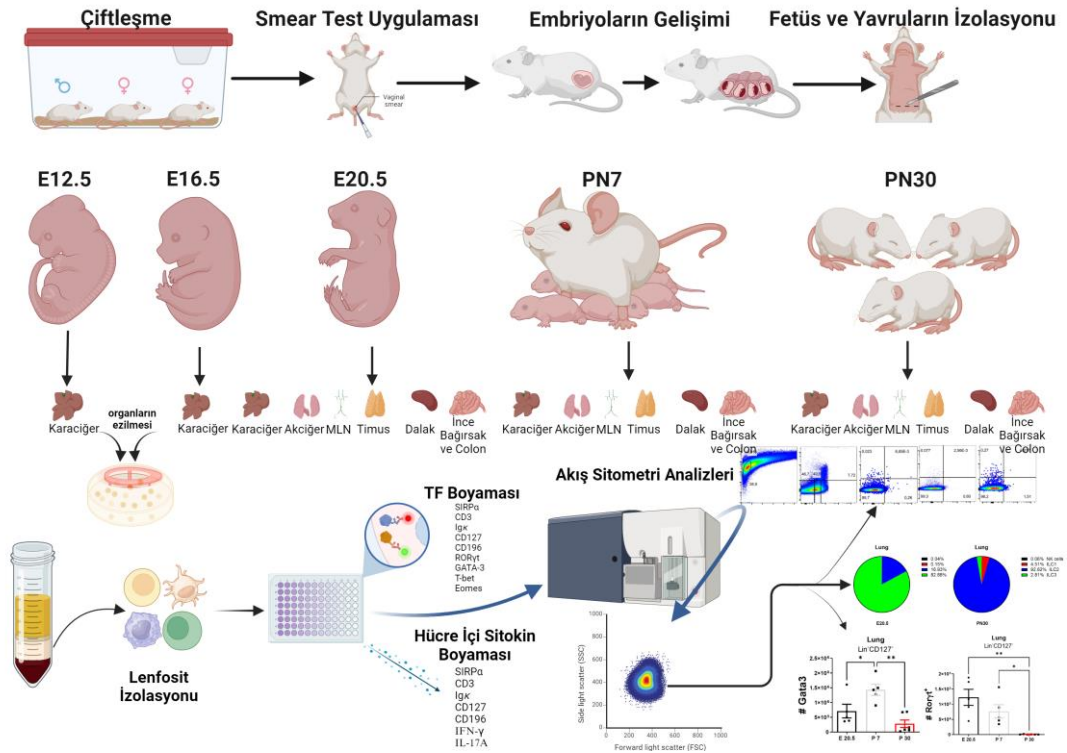
İnsanlarda dalak, 1927 yılında anatomist Ian M. Thompson'un belirttiği üzere splanknik mezoderminden köken alır (Thompson, 1926). İnsanlarda E30'da dorsal mesogastrium'da henüz yoğunlaşmamışken, midenin gevşek mezenkiminden tespit edilebilir. Farelerde ise E10.5'te dorsal spleno-pankreatik bölgede splanknik mezoderm'den gelişir (Weinzirl ve ark., 2020). E10.5-E11 arasında mideye ve dorsal pankreasa bağlı, dorsal mesogastrium'un ise sol tarafında görülebilir. Bapx1, Nkx2-5, Tlx1 (Hox11), Pod1 (Capsulin), Wt1 ve Pbx1 genlerinin hepsi hem yoğunlaşmış dalak mezenkimin de hem de olgunlaşmakta olan dalakta eksprese edilmektedir. Dalak SLO organlarından birisidir. Dolayısıyla gelişiminde LTi hücreleri diğer LN'lerde olduğu gibi elzemdir. Ancak LN'lerde gelişim için gerekli lenfotoksin sinyalizasyonu embriyonal dönemde dalakta görülmemektedir (Tan ve Watanabe, 2018). Ayrıca dalak yapısal ve işlevsel olarak diğer SLO'lardan farklıdır. Kırmızı pulpada gerçekleştirilen kırmızı kan hücrelerinin filtrasyonu ile beyaz pulpada gerçekleştirilen bağışıklık fonksiyonu dalağı farklı bir konuma yerleştirmektedir. Bu yüzden dalak organogenezi, lenfotoksin sinyalizasyonuna ihtiyaç duyulmayan primitif kırmızı pulpa gelişimi (E15'e kadar) ile

lenfotoksin sinyalizasyonuna ihtiyaç duyulan postnatal dönemde gerçekleşen beyaz pulpa gelişimi olarak iki safhada ele alınır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.01.2022 tarih ve 22/001 karar numarası ile onaylandı. Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının bakım, beslenme ve sakrifikasyonu Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) gerçekleştirildi. Sakrifikasyon sonrası gerçekleştirilen deneysel çalışmalar Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezi'nde (GENKÖK) yürütüldü. Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun şekilde tamamlandı. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2023-12483 kodlu proje ile desteklendi. Çalışmanın grafik özeti Şekil 3.1'de verildi.



Şekil 3.1. Çalışmanın grafik özeti (BioRender.com ile oluşturuldu).

3.1. Deneysel Araştırma Grupları

3.1.1. Hayvan Seçimi

Prenatal ve postnatal dönemde ILC'lerin araştırılması amacıyla fetal, yenidoğan ve olgun sıçan organları gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda; ortalama 180-220 g ağırlığında, daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış ve doğum ile enfeksiyon öyküsü bulunmayan 15 adet Wistar Albino (WA) cinsi dişi sıçan DEKAM'dan temin edildi. Dişi WA sıçanlar erkek sıçanlardan 20 gün süre ile ayrı tutuldu. Gebe olmadığı anlaşılan dişi WA sıçanlar, gebe kalmaları amacıyla saat 19:00'da erkek WA sıçanlarla birlikte aynı kafese alındı. Her kafeste iki dişi WA'ya bir adet damızlık erkek WA düşecek şekilde sekiz kafes oluşturuldu. Son kafeste 1 dişi 1 erkek WA sıçan yer aldı. Tüm WA sıçanlar, çiftleşmeleri maksadıyla ertesi gün 07:00'a kadar aynı kafeste tutuldu. Belirtilen saatte kafeslerden alınan dişi WA sıçanlar, gebelik tayini amacıyla vaginal smear testine tabi tutuldular. Vaginal smear testinde spermium gözlenen sıçanlar 0.5 günlük gebe kabul edildi.

3.1.2. Grupların Oluşturulması

Vaginal smear testinde sperm gözlenen gebe sıçanlar her kafeste üç adet olacak şekilde beş ayrı kafese alındı. ILC'lerin prenatal (fetal) ve postnatal organlarda tespit edilmesi amaçlandığından gruplar aşağıda belirtilen şekilde tasarlandı.

E12.5 grubu: Bu grupta yer alan gebe sıçanların yavrularına ait karaciğer gebeliğin 12,5. gününde (E12.5) alındı.

E16.5 grubu: Bu grupta yer alan gebe sıçanların yavrularına ait karaciğer gebeliğin 16,5. gününde (E16.5) alındı.

E20.5 grubu: Bu grupta yer alan gebe sıçanların yavrularına ait organlar gebeliğin 20,5. gününde (E16.5) alındı.

PN7 grubu: Bu grupta yer alan gebe sıçanların yavrularına ait organlar yavrular doğduktan sonraki 7. günde (PN7) alındı.

PN30 grubu: Bu grupta yer alan gebe sıçanların yavrularına ait organlar yavrular doğduktan sonraki 30. günde (PN30) alındı.

3.1.3. Gebe Sıçanlardan Yavruların İzolasyonu

E12.5, E16.5 ve E20.5 grubuna dahil edilen gebe sıçanlara, gebeliğinin daha önce belirtilen günlerinde, saat 07:00'da ketamin (75 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kullanılarak anestezi uygulandı. Gebe sıçanların abdominal bölgesi %70'lik etil alkol ve jilet yardımıyla tıraş edilerek temizlendi. Temizlenen abdomene bisturi ile transvers kesi atılarak, karın ön duvarı açıldı. Rahim (uterus) içerisinde yer alan fetüsler plasentaları ile diseke edilerek anne sıçandan izole edildi. İzolasyon işlemi biter bitmez anne sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. PN7 ve PN30 gruplarında bulunan gebe sıçanların normal doğum yapması beklendi. Gebeliğin 20,5. gününde her gebe sıçan ayrı kafese alındı. PN7 grubunda bulunan anne sıçan ve yavruları doğumdan sonra 7 gün aynı kafeste tutuldu. PN30 grubunda bulunan anne sıçan ve yavruları da 30 gün aynı kafeste tutuldu. 7. ve 30. günde anne sıçanlar DEKAM'a iade edilirken yavru sıçanlar deneysel prosedüre tabii tutuldu.

3.1.4. Fetüs ve Yavrulardan Organ Elde Edilmesi

Tüm gruplarda yer alan fetüs ve yavrulara daha önce belirtilen şekilde anestezi uygulandı. E12.5, E16.5 ve E20.5 gruplarındaki embriyolar petri kabına alınarak Leica S8 APO stereo mikroskoba alındı. Embriyoların servikal bölgesinden pelvik bölgesine kadar bisturi ile dikey kesi atıldı. E12.5 ve E16.5 gruplarındaki fetüslerden karaciğer alındı. E20.5, PN7 ve PN30 gruplarından elde edilen fetüs ve yavrulardan ise karaciğer, akciğer, dalak, timus, mezenterik lenf nodu (mLN), colon ve ince bağırsak alındı.

3.1.5. Organlardan Lenfosit İzolasyonu

Fetüs ve yavrulardan elde edilen organlar 5 ml 1X PBS ile yıkanarak, bekletilmeden 5 ml 1X PBS ihtiva eden eppendorf ve falcon tüplerine alındı. Organları içeren eppendorf ve falcon tüpleri buz aküleri içerisine saplandı. Her bir eppendorf ve falcon tüpünde bulunan organ 1X PBS'li petri kaplarına aktarıldı. Görece büyük olan organlar bağ dokularından bisturi ile dikkatlice ayrıldı. Organlar petri kabının içine konulan 70 µm porlu Falcon strainer (hücre süzgeci) içine alındı. 1 ml'lik şırınga saplarının başlık kısımları ile 70 µm içerisindeki organlar 1x PBS'le beraber yavaşça ezilmeye başlandı. Bu esnada organ ezmenin hücre ölümüne sebep vermemesi için ezme işlemi nazıkçe yapıldı. Hücre süzgecinden geçen hücreler 50 ml'lik Falcon tüpleri içerisine toplandı. PN7 ve PN30 gruplarındaki karaciğerde eritrositlerin parçalanması için 1X RBC Lysis

Buffer kullanıldı. PN7 ve PN30 gruplarındaki ince bağırsak ve colon numuneleri % 40'lık 3 ml Percoll Percoll (GE17-0891-01, Sigma-Aldrich, Dr. Eken'in katkılarıyla) içinde çözüldü. Ardından %90'lık 5 ml Percoll içeren tüpe aktarıldı. E12.5, E16.5 ve E20.5 gruplarına ait numunelere Lysis Buffer veya Percoll uygulaması yapılmadı. Tüpler içerisinde tek hücre süspansiyonu oluştu. Tüpler oda sıcaklığında, 400 g'de 30 dk santrifüj edildi. Tüp içerisindeki sarımtırak haleden lenfositler elde edilerek diğer aşamaya geçildi. Ancak PN30'a ait colon'lar ile PN7 ve PN30'a ait ince bağırsaklardan lenfosit izolasyonu yapılırken süspansiyonda lenfositler iyice ayrıışmamıştı. Daha önce belirtilen günlerde colon ve ince bağırsaklara ait lenfosit halesi homojen olarak elde edilemediğinden bu numunelerde ILC frekansları saptanmadı.

3.2. Lenfositlerden ILC'lerin Elde Edilmesi

3.2.1. Lenfositler İçerisindeki ILC Popölasyonunun Total Yüzdesi ile Mutlak Sayılarının Belirlenmesi

Lenfositler (her kuyucukta 2 organdan elde edilen şekilde) 96 kuyucuklu yuvarlak tabanlı plaka'ya (96-well round bottom plate) yerleştirildi. Hücreler oda sıcaklığında 400 g'de santrifüj edilerek, süpernatantları uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklarda bulunan hücreler staining buffer (PBS ve %2 fetal bovin serum [FBS]) ile çözümlenerek transkripsiyon faktör (TF) boyamasına hazır hale getirildi.

3.2.2. TF Boyaması

Kuyucuktaki hücrelere 1µl Fc-block kullanılarak 5 dk bloklama yapıldı. ILC1 ve NK hücrelerini beraber boyamak için TF-Mix (karışım) 2, ILC2 ve ILC3'leri boyamak için de TF-Mix 1 hazırlandı. Her iki karışım da ortak olarak yüzey boyama antikorları bulunmaktaydı. ILC'ler aşağıda belirtilen Mix 1 ve Mix 2 lineage kokteyli ile karanlık ortamda, +4 °C'de 30 dk boyandı. Hücre içi transkripsiyon faktörlerinin tespit edilmesi için True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Cat# 424401, Biolegend, Dr. Eken'in katkılarıyla) üreticinin talimatlarına uygun şekilde kuyucuklara uygulanarak; hücre içi Eomes, T-bet, GATA-3 ve RORγt antikorları ile boyandı. Sonrasında boyanan hücreler stain buffer ile 2 kez yıkandı. 400 g'de 3 dk santrifüj yapılarak üzerinde biriken süpernatant atıldı. Elde edilen numuneler flow sitometri (akış sitometri) FACS Aria III (BD Accuri™ C6) cihazında incelendi. Kullanılan antikorlar ile Mix'ler aşağıda verilmiştir.

3.2.3. Antikorlar, Katalog Numaraları ve Menşei

Çalışmada kullanılan antikorlar ile hücre içi TF ve sitokin kitlerine ait katalog numaraları ile menşei şu şekildedir; PE anti-rat CD3 Antibody (Cat#550353, BD Biosciences), PE anti-rat Ig light chain κ Antibody (Cat#553873, BD Biosciences), PE anti-rat CD172a (SIRP α) Antibody (Cat#204706, Biolegend), Rat IL-7R alpha/CD127 Alexa Fluor® 488-conjugated Antibody (Cat#FAB8484G100UG, R&D systems), BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse anti-GATA3 (Cat#560405, BD Biosciences), ROR gamma (t) Monoclonal Antibody (AFKJS-9), APC, eBioscience™ (Cat#17-6988-82, ThermoFisher), PerCP-Cy™5.5 Mouse anti-T-bet (Cat#561316, BD Biosciences), EOMES Monoclonal Antibody (Dan11mag), PECyanine7, eBioscience™ (Cat#25-4875-82, Thermo Fisher), PE/Dazzle™ 594 anti-mouse CD196 (CCR6) Antibody (Cat#129822, Biolegend), APC anti-rat CD335 (NKp46) Antibody (Cat#250808, Biolegend), Alexa Fluor® 647 anti-rat IFN- γ Antibody (Cat#562213, BD Biosciences), IL-17A Monoclonal Antibody (eBio17B7), PerCPCyanine5.5 (Cat# 45-7177-82, ThermoFisher), True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Cat# 424401, Biolegend, Dr. Eken'in katkılarıyla), BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (with BD GolgiStop™ protein transport inhibitor) (Cat. No. 554715, BD Biosciences, Dr. Eken'in katkılarıyla).

TF Mix 1

PE anti-rat CD172a (SIRP α)

PE anti-rat CD3

PE anti-rat Ig light chain kappa
boyaması)

Rat IL-7R alpha/CD127 Alexa Fluor® 488-conjugated

PE/Dazzle™ 594 anti-mouse CD196 (CCR6)

ROR gamma (t) Monoclonal Antibody (AFKJS-9), APC, eBioscience™

BD Pharmingen™ PE-Cy™7 Mouse anti-GATA3



Surface Mix (yüze

TF Mix 2

PE anti-rat CD172a (SIRP α)

PE anti-rat CD3

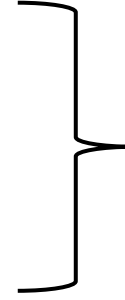
PE anti-rat Ig light chain kappa
boyaması)

Rat IL-7R alpha/CD127 Alexa Fluor® 488-conjugated

PE/Dazzle™ 594 anti-mouse CD196 (CCR6)

PerCP-Cy™5.5 Mouse anti-T-bet

EOMES Monoclonal Antibody (Dan11mag), PECyanine7, eBioscience™



Surface Mix (yüzey boyaması)

3.3. ILC'lerin Sitokin Üretim Kapasitesi

ILC'lerin sitokin üretim kapasiteleri IFN- γ ve IL-17A sitokinlerine göre belirlendi.

3.3.1. Lenfositler İçerisindeki ILC İşlevselliğinin Sitokin Üretme Kapasitelerine Göre Belirlenmesi

ILC'lerin sekrete ettiği IFN- γ ve IL-17A sitokinlerinin düzeylerini ölçmek için hücre içi sitokin boyaması yapıldı. Bu boyama yapılmadan önce hücreler Mix1 ve Mix2'de belirtilen ortak hücre yüzey boyamalarına (CD172a (SIRP α , CD3, Igk, CD127) tabii tutuldu. Hücre içi sitokin boyaması için her kuyucuk phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/Ionomycin/Golgi Plug ile toplamda 4 saat indüklendi. Özetle, IFN- γ ve IL-17A sitokinlerinin tespit edilmesi amacıyla hücreler 1 μ g/mL ionomisin ve 10 ng/mL PMA ile 4 saat inkübe edildi. Inkübasyonun son 3 saatinde Golgi Stop eklendi. Hücrelerin fiksasyonunu ve permeabilizasyonunu sağlamak için “BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (with BD GolgiStop™ protein transport inhibitor)”, (Cat. No. 554715, BD Biosciences, Dr. Eken'in katkılarıyla) kullanıldı. Kısacası bu kit hücre içi sitokinlerin florokrom konjuge anti-sitokin antikorlarını boyadı. Önce fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. 4X fiksasyon buffer 1X fiksasyon buffere seyreltildi. Her kuyucukta 100 μ l fiksasyon buffer olacak şekilde oda sıcaklığında, 30 dk karanlıkta bekletildi. 96 kuyucuklu yuvarlak tabanlı plaka 400 g'de 3 dk santrifüj edilerek, süpernatant atıldı. 10X permeabilizasyon buffer distile su ile 1X permeabilizasyon buffere seyreltildi. Her kuyucukta 150 μ l olacak şekilde permeabilizasyon buffer

eklendi. Hücreler oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletildi. 400 g'de 3 dk santrifüje edildikten sonra süpernatant atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Ardından her kuyucuğa lineage antikör kokteyli ile permeabilizasyon buffer -her kuyucukta 20 µl olacak şekilde- dağıtıldı. 96 kuyucuklu yuvarlak tabanlı plaka oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk bekletildi. Son olarak numuneler 200 µl staining buffer ile yıkanarak flow sitometri cihazında incelendi. Bu işlemde kullanılan lineage kokteyli ile sitokin düzeylerini belirleyen antikorlar aşağıda verilmiştir.

Hücre içi sitokin boyama mixi

PE anti-rat CD172a (SIRPα)

PE anti-rat CD3

PE anti-rat Ig light chain kappa

Rat IL-7R alpha/CD127 Alexa Fluor® 488-conjugated

PE/Dazzle™ 594 anti-mouse CD196 (CCR6)

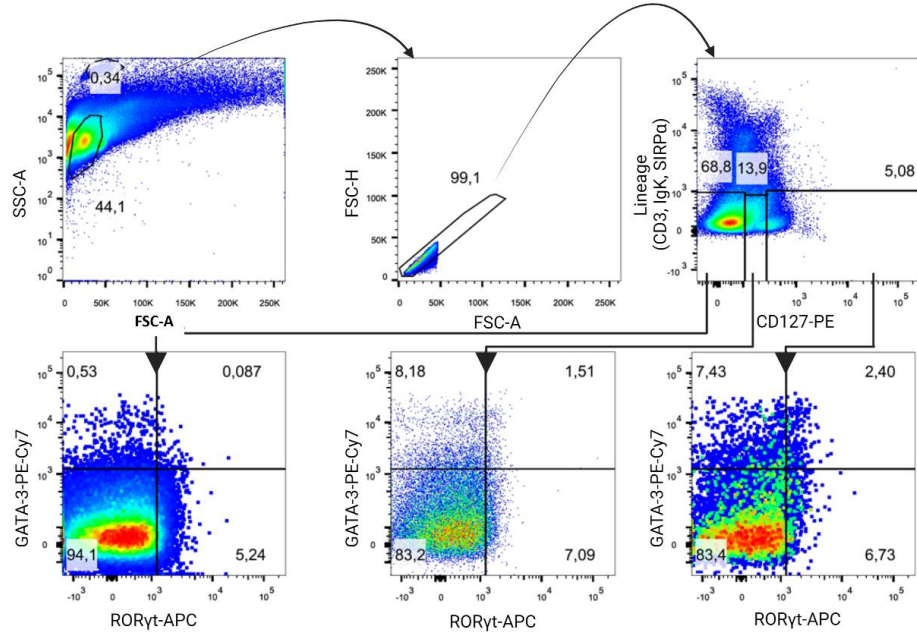
IL-17A Monoclonal Antibody (eBio17B7), PerCPCyanine5

Alexa Fluor® 647 anti-rat IFN-γ

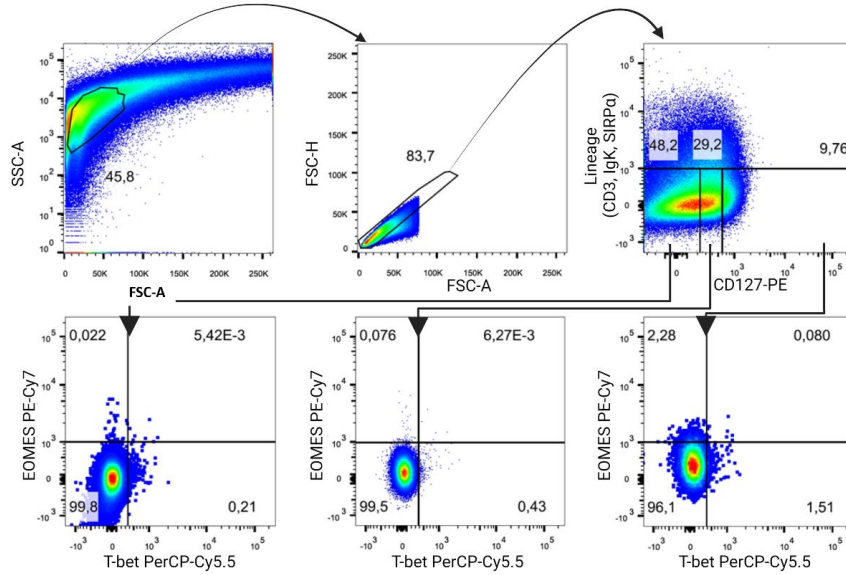
3.4. Flow Sitometri Cihazında Sıçan ILC'lerinin Tespit Edilmesi için Uygulanan Kapılama Stratejisi

Flow sitometri cihazı, floresan boyalarla görünür hale gelen hücrelerin içi ile yüzeyinin belirlenmesi işlemini yani immunofenotiplemeyi sağlar. Bu cihazda akıntı içerisinde ilerleyen hücreler boyanmış antikorlar vasıtasıyla sayı ve yüzde olarak belirlenir. Flow sitometri cihazında incelenen hücreler; büyüklük (FSC), granüler yapı (SSC), yüzey antijenlerine göre tespit edilir. Hücrelerin yüzey antijenleri “Cluster of Differentiation (Başkalaşım Kümesi)” yani “CD” ile ifade edilir. Çalışmada TF Mix 1 ve TF Mix 2’de yer alan ILC’leri tespit etmek amacıyla önce lenfositlerin bulunduğu alan seçildi. Burada yapılan kapılama içerisinde “single cells” seçildi. Single cells içerisinde yapılan kapılama ile CD3⁺IgK⁺SIRPα⁺ (Lin⁻) CD127 hücrelerin bulunduğu alana geçildi. Burada iki farklı kapılama yapıldı. Kapılamalar daha önce yapılan sıçan çalışmasındaki CD127 ekspresyonuna göre belirlendi (Sudworth ve ark., 2022). Bu kapılamalar CD127’yi iyi/yüksek eksprese eden (^{hi}) ve orta derecede ifade eden (^{dim}) şeklindeydi.

Lin⁻CD127^{dim} ve Lin⁻CD127^{hi} kapılamalarında TF Mix 1’de ROR γ t ve GATA-3 ekspresyonuna göre hücrelerin yüzdesi belirlendi (Şekil 3.2). Benzer şekilde TF Mix 2 için daha önce belirtilen kapılamalar uygulanarak T-bet ve EOMES ekspresyonlarına göre NK hücreleri ile ILC1 yüzdesi belirlendi (Şekil 3.3). Şekil 3.2 ve 3.3’te, ilk grafikte görülen lenfosit içeren alanın hemen üstünde beads (boncuk) yüzdesi bulunmaktadır. Bu alanda bulunan hücre benzeri yapılar aslında hücrelerin mutlak sayılarının (absolute number) edilmesini sağlayan mikro boncuklardır. Mutlak sayım boncukları ILC içeren örneklerle karıştırılır, tespit edilen alandaki yüzdeyle oran orantı yapılarak hem lenfosit hem de incelenen alandaki hücre sayısı tespit edilmiş olur. Bu çalışmada kullanılan beads sayısı 2000 adet olduğundan Şekil 3.2’deki colon’a ait numune deki lenfositlerin mutlak sayısı $(2000 \times 44,1) / 0,34 = 259.411$ olarak elde edilir. Benzer denklem tüm kapılamalara uygulanarak, hücre yüzdesinden mutlak hücre sayılarını elde etmek mümkün olur. ILC’lerin tespit edilmesi ise daha önce belirtilen transkripsiyon faktörlerine göre yapılır. Kabaca eğer bir hücre daha önce bahsedilen üç kapılamadan birinde yer alıyor -varsayalım CD127^{dim}’de yer alsın- ve ROR γ t eksprese ederken (+), Gata-3 eksprese etmiyorsa (-) bu hücre ILC3’tür denilebilir. Bu analiz ettiğimiz hücreyi ise “CD3⁻IgK⁻SIRP α ⁻CD127^{dim}Gata-3⁻ROR γ t⁺” veya “Lin⁻CD127^{dim}Gata-3⁻ROR γ t⁺” olarak tanımlayabiliriz. Lin⁻ ‘nin daha önceden belirtildiği gibi hücre belirteci olduğu ve çalışmada CD3, IgK ve SIRP α ’nın belirteçlerini kullandığımızı belirtmekte fayda var. Sıçanların daha önceki çalışmalarda bu üç belirteci eksprese etmediği gösterilmiştir (Sudworth ve ark., 2022).



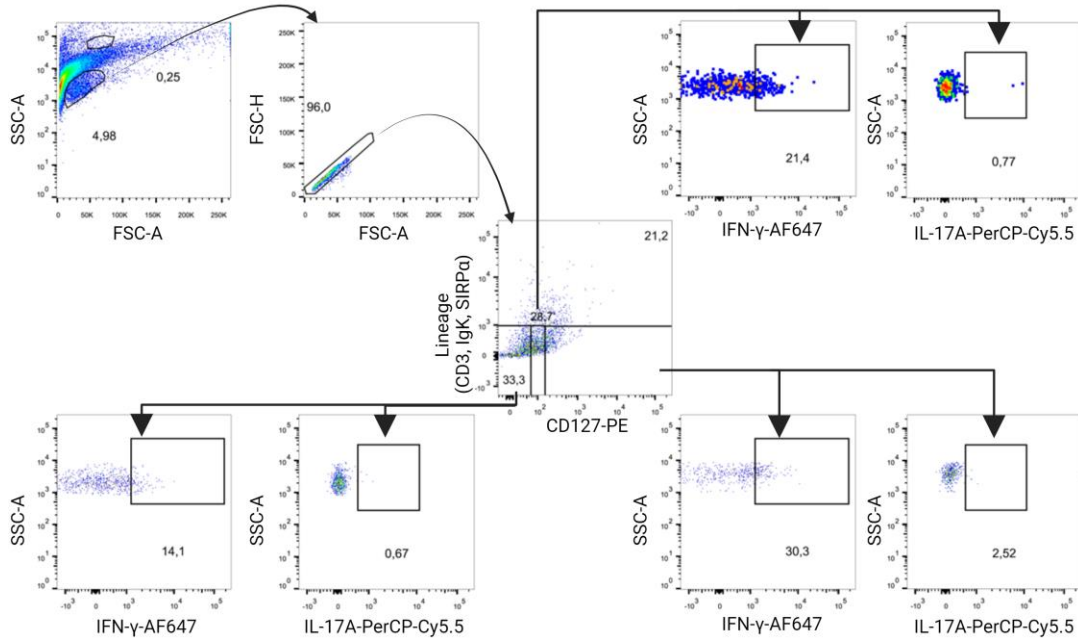
Şekil 3.2. TF Mix 1'e ait ILC2 ve ILC3'lerin tespiti için uygulanan kapılama stratejisi, colon örneği (Kapılama stratejisi Flow Jo ile tasarım ise BioRender.com ile oluşturuldu).



Şekil 3.3. TF Mix 2'ye ait NK hücreleri ile ILC1'lerin tespiti için uygulanan kapılama stratejisi, karaciğer örneği (Kapılama stratejisi Flow Jo ile tasarım ise BioRender.com ile oluşturuldu).

3.5. Flow Sitometri Cihazında Sıçan ILC'lerinin Hücre İçi Sitokin Üretim Kapasitesinin Tespit Edilmesi için Uygulanan Kapılama Stratejisi

Hücre içi sitokin üretim kapasitesinin belirlenmesi için TF Mix1 ve TF Mix2 kısmında bahsedilen yol izlendi. Numuneler TF boyamasına tabii tutulmayarak, ILC'leri lenfositlerden ayıran antikorlar ile sitokin üretimlerini belirleyen IFN- γ ve IL-17A antikorları kullanıldı. Şekil 3.4'te belirtilen ilk grafikte lenfositler seçilerek kapılama yapılarak single cells görüldü. Ardından single cells içinde kapılama yapılarak Lin⁻CD127 eksprese eden hücrelere ulaşıldı. Burada CD127'yi eksprese eden hücreler içerisinde Lin⁻CD127^{dim} ve Lin⁻CD127^{hi} şeklinde iki kapılama daha yapıldı. Her kapılama içerisinde hem IFN- γ hem de IL-17A sekrete eden hücrelerin yüzdesi tespit edildi. Bu tespit Flow Jo analiz programında X ekseninin antikora göre değiştirilmesi ile yapıldı. Mutlak sayım boncuklarının lenfosit yüzdesine oran-orantı ile hesabı yapılarak IFN- γ ve IL-17A sekrete eden hücrelerin mutlak sayılarına ulaşıldı. Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4'te belirtilen kapılama stratejisinde colon ve karaciğer örneği kullanıldı. Diğer organların tamamında kapılama stratejisi ayrı ayrı belirlenerek uygulandı.



Şekil 3.4. ILC'lerin hücre içi sitokin üretim tespiti için uygulanan kapılama stratejisi, colon örneği (Kapılama stratejisi Flow Jo ile tasarım ise BioRender.com ile oluşturuldu).

3.6. İstatistiksel Analiz

Örnekler akış sitometrisi ile analiz edilmiş ve FlowJo Tristar yazılımı kullanılarak kapılama stratejileri uygulanarak mutlak hücre sayıları ve hücre frekansları saptanmıştır. FlowJo Tristar'dan elde edilen veriler GraphPad Prism 9 yazılımına aktarılmıştır. Verilerin normallik testleri Shapiro-Wilk testi kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılmadığı iki gruplu örnekler için two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen ikiden fazla gruplu örneklerle Kruskal-Wallis H testi uygulanmıştır. Gruplar arası çoklu karşılaştırmalarda anlamlılık post hoc Dunn's testi ile belirlenmiştir. **p** değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p \leq 0,05$).



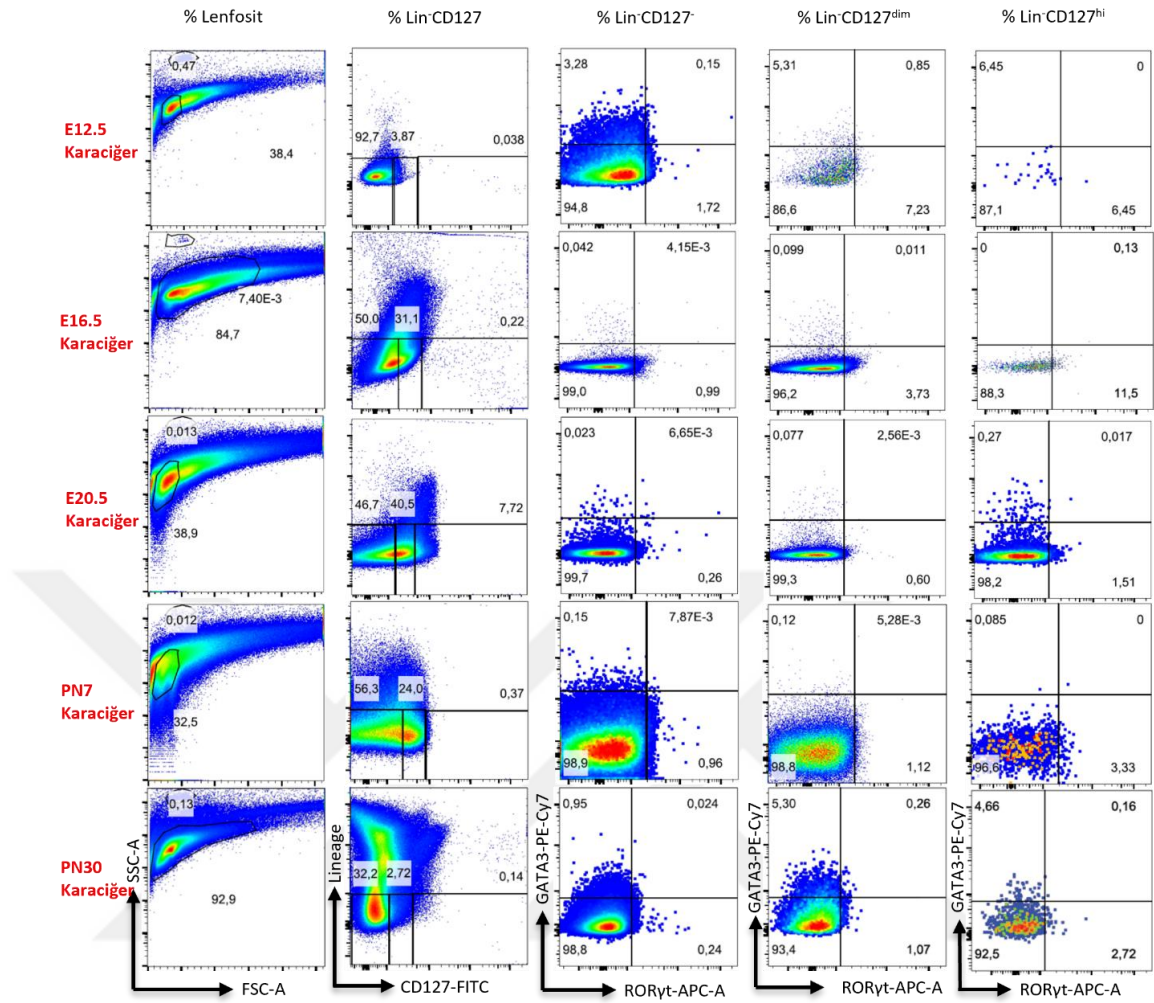
4. BULGULAR

Sıçanlardaki lenfosit popülasyonu içinde ILC'leri tanımlamak için kullanılan strateji, sıçanlarda daha önce yapılan çalışmalara dayanarak belirlenmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Sıçanlarda T hücreleri $CD3^+$, B hücreleri Ig kappa zinciri⁺ ve monositler, makrofajlar, granülositler ve dendritik hücreler SIRP- α ifade eder. Bu soy belirteçlerini (Lin⁻) ifade etmeyen ancak CD127, Eomes, T-bet, ROR γ t ve GATA-3'ü ifade eden hücreler, ILC'leri tanımlamak için kullanılmıştır. Literatürdeki önceki çalışmalardan esinlenerek, NK hücreleri Lin⁻CD127^{dim/hi}T-bet⁺Eomes⁺, ILC1'ler Lin⁻CD127^{dim/hi}T-bet⁺Eomes⁻, ILC2'ler Lin⁻CD127^{dim/hi}Gata-3⁺ ve ILC3'ler Lin⁻CD127^{dim/hi}ROR γ t⁺ olarak tanımlanmıştır (Sudworth ve ark., 2022).

Lin⁻CD127^{dim/hi} kapılımlarında, özellikle postnatal dalakta bol rezervuarlara sahip Lin⁻CD127^{dim/hi}T-bet⁺Eomes⁺ hücreleri tespit edilmiştir. Sıçanlarda daha önce rapor edilmeyen bu hücreler, literatürdeki fare çalışmalarına dayanarak NK öncü hücreleri (NKp hücreleri) olarak kabul edilmiştir (Liang ve ark., 2024; Townsend ve ark., 2004). Ayrıca, akış sitometrisi analizlerinde, hem ILC2 hem de ILC3 soy belirteçlerini ifade eden Lin⁻CD127^{dim/hi}GATA3⁺ROR γ t⁺ hücreleri tespit edilmiştir. Sıçanlarda daha önce rapor edilmemiş olmasına rağmen, bu hücreler, her iki ILC soy belirtecini de ifade etmeleri nedeniyle ILC2/ILC3 olarak adlandırılmıştır.

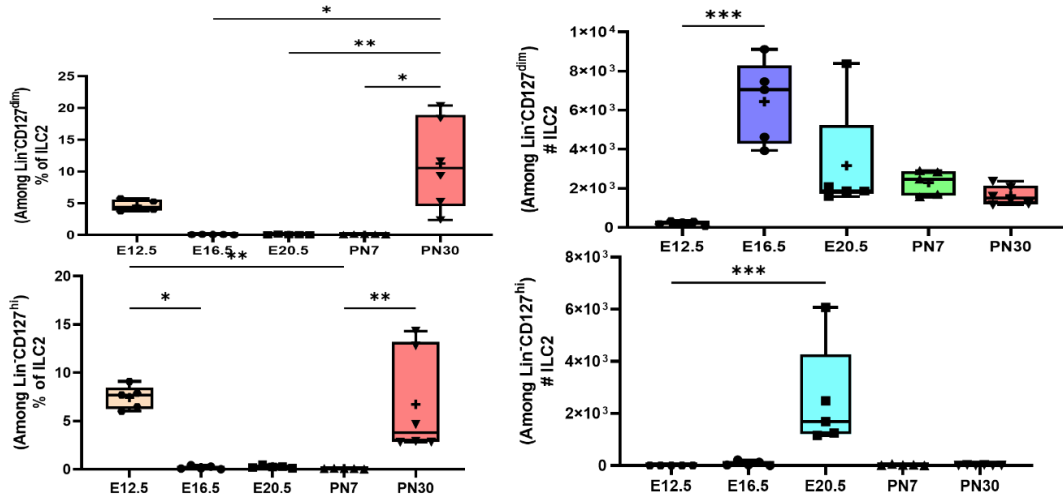
4.1. Hepatik ILC'lerin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

Farklı zaman noktalarına ait karaciğerlerden elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Karaciğerde ILC'ler E12.5, E16.5, E20.5, PN7 ve PN30'da incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.1'de gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



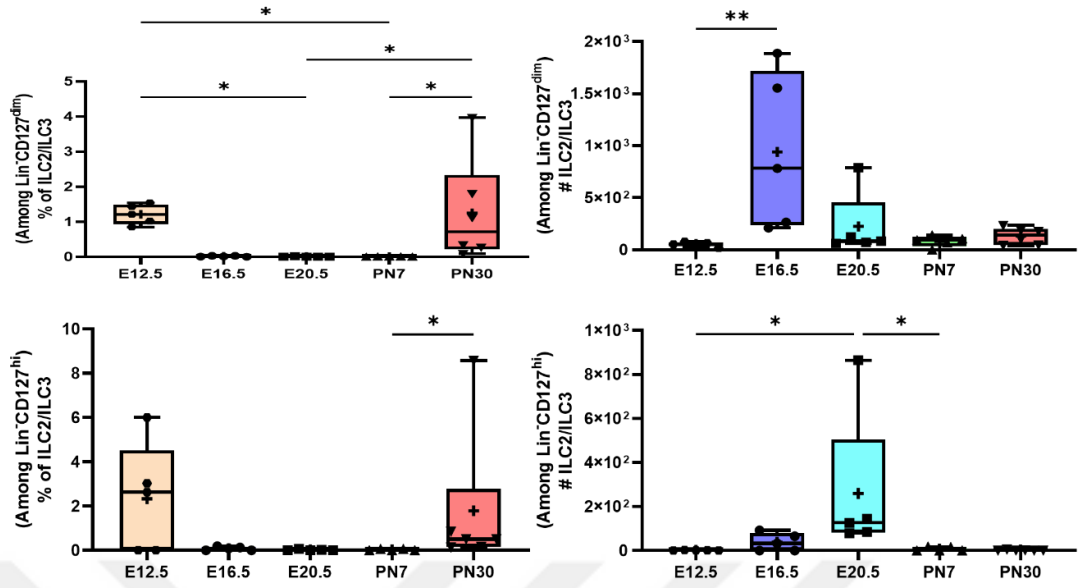
Şekil 4.1. Hepatik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Hepatik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.2'de verildi. Lin⁺CD127^{dim} kapılamasındaki hepatic ILC2 frekansı, PN30'da PN7, E20.5 ve E16.5'e göre anlamlı artış gösterdi. Aynı kapılamadaki hepatic ILC2 sayısı E12.5'ten E16.5'e doğru anlamlı azalma gösterdi. Lin⁺CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2 frekansı E12.5'ten E16.5'e doğru anlamlı azalma gösterirken, PN7'den PN30'a doğru anlamlı artış gösterdi. Bu kapılamadaki ILC2 sayısı E20.5'te E12.5'e göre anlamlı olarak daha fazlaydı.



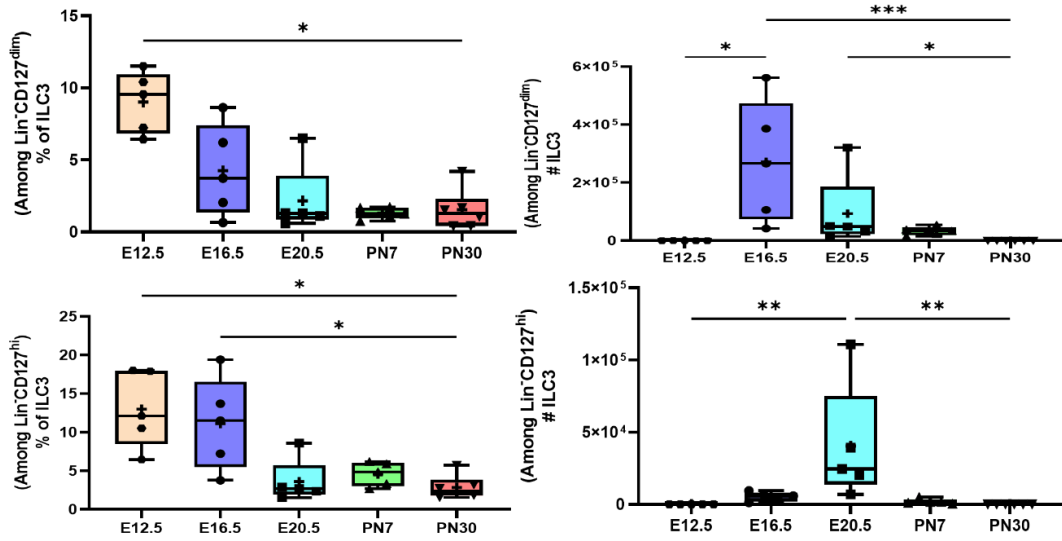
Şekil 4.2. Hepatik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

Hepatik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.3'te verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki hepatic ILC2/ILC3 frekansı E12.5'te hem E20.5 hem de PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada E16.5'teki ILC2/ILC3 sayısı E12.5'e göre anlamlı artış gösterdi. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2/ILC3 frekansında PN7'den PN30'a doğru anlamlı artış saptandı. Bu kapılamadaki ILC2/ILC3 sayısı E20.5'te hem E12.5 hem de PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı.



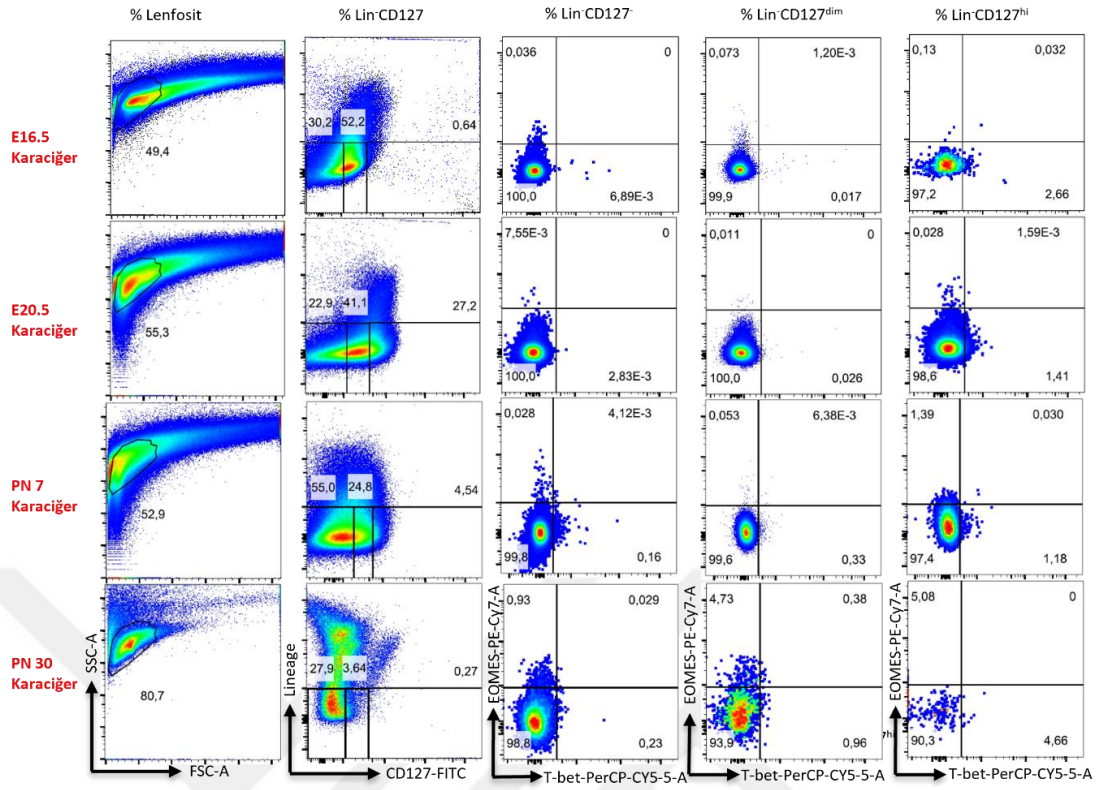
Şekil 4.3. Hepatik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

Hepatik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.4'te verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki hepatic ILC3 frekansı E12.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada ILC3 sayısı E12.5'ten E16.5'e doğru anlamlı azalma gösterirken, E16.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Aynı kapılamadaki ILC3 sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki hepatic ILC3 frekansı PN30'da hem E16.5 hem de E12.5'ten anlamlı olarak daha azdı. Bu kapılamada ILC3 sayısının E20.5'te hem PN30 hem de E12.5'ten anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı.



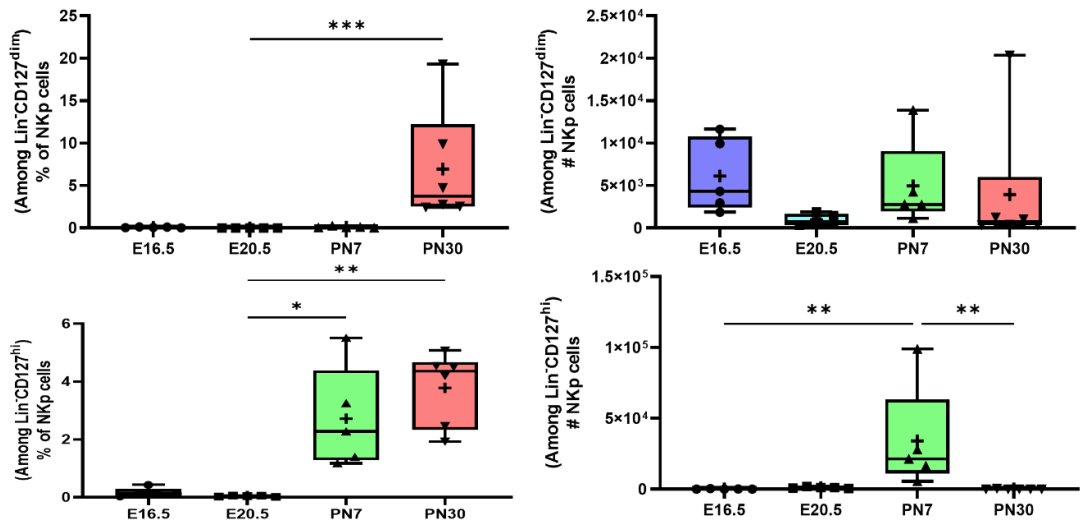
Şekil 4.4. Hepatik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

Farklı zaman noktalarına ait karaciğerlerden elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.5'te gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi. E12.5'te yetersiz antikor miktarından dolayı NKp ve NK hücreleri ile ILC1'ler incelenemedi.



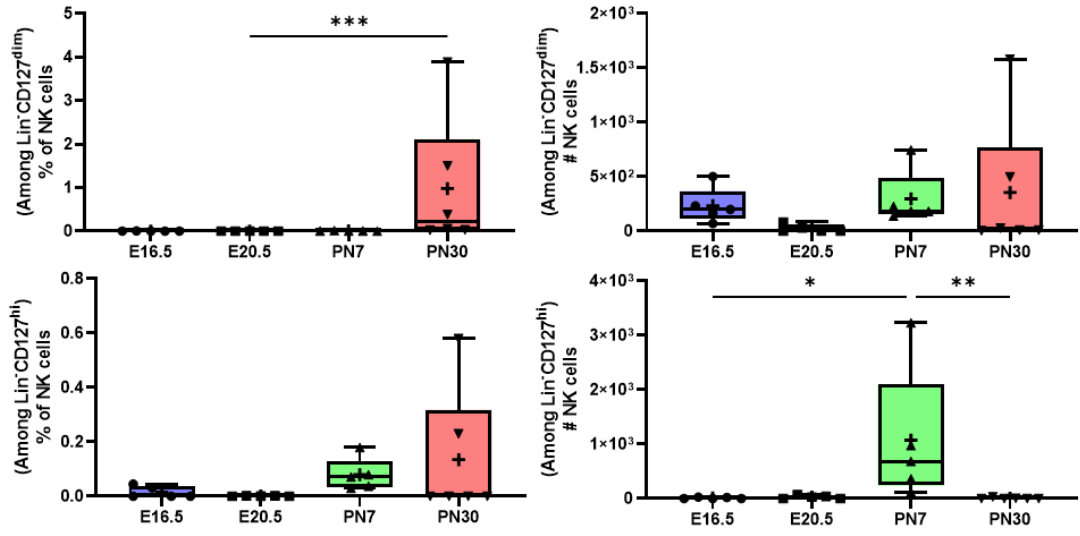
Şekil 4.5. Hepatik NKp ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Hepatik NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.6'da verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki hepatic NKp hücre frekansı PN30'da E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki hepatic NKp hücre frekansı E20.5'te hem PN7 hem de PN30'dan anlamlı olarak daha azdı. Bu kapılamadaki NKp hücre sayısı PN7'de hem PN30 hem de E16.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı.



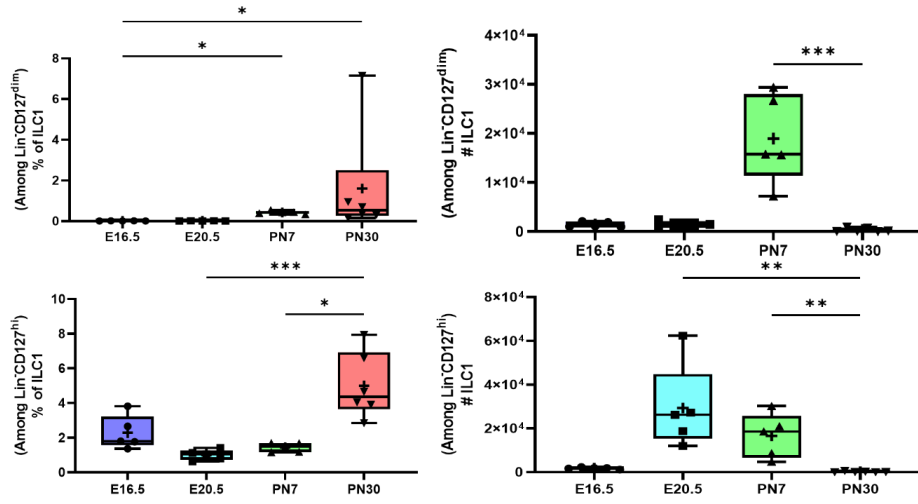
Şekil 4.6. Hepatik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Hepatik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.7'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki hepatic NK hücre frekansı PN30'da E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki hepatic NK hücre sayısı PN7'de hem PN30 hem de E16.5'ten anlamlı olarak daha fazla saptandı.



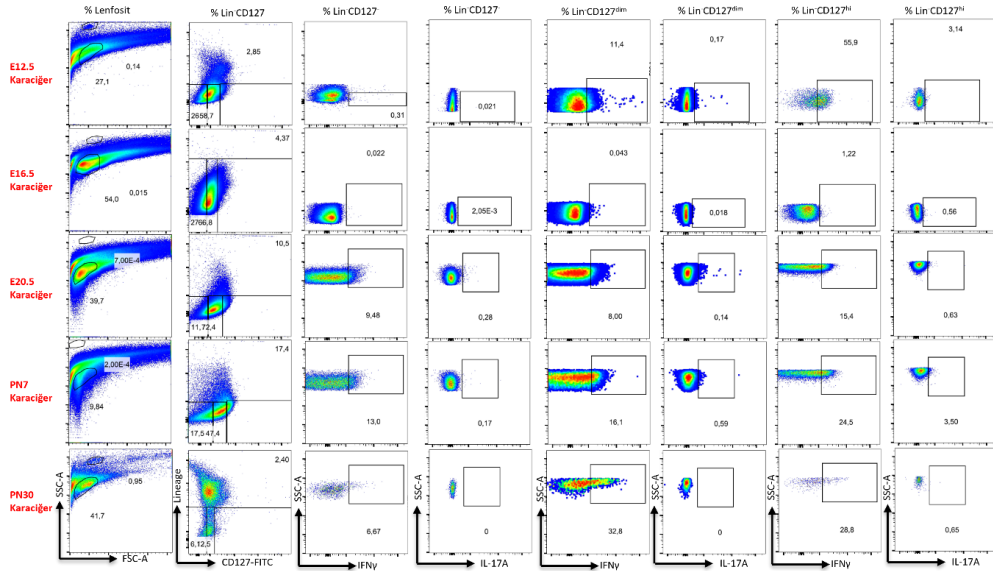
Şekil 4.7. Hepatik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Hepatik ILC1'lerin frekans ve hücre sayılarına ilişkin analizler Şekil 4.8'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki hepatic ILC1 frekansı PN7 ve PN30'da E16.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada ILC1 sayısı PN30'da PN7'den anlamlı olarak azdı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki hepatic ILC1 frekansı PN7'den PN30'a doğru anlamlı olarak artış gösterdi. Bu kapılamadaki ILC1 sayısı PN30'da hem PN7 hem de E20.5'ten anlamlı olarak daha azdı.



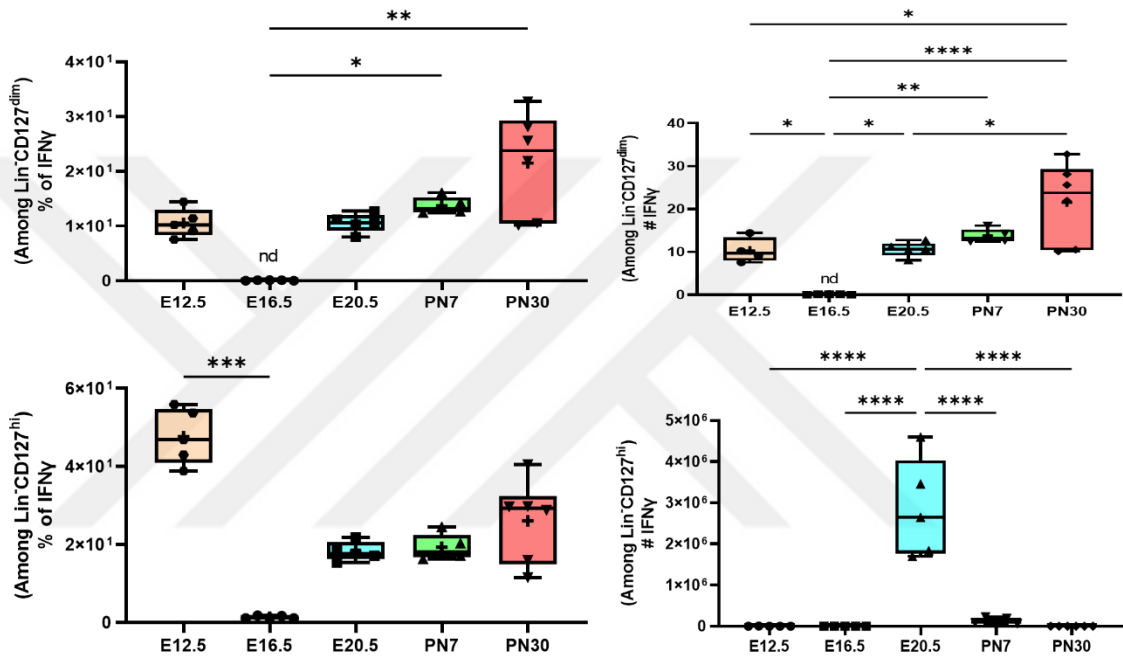
Şekil 4.8. Hepatik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Hepatik ILC'lerin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda sitokin üretim kapasitlerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri Şekil 4.9'da verildi.



Şekil 4.9. Hepatik ILC'lerin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitokin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-5-A, IFN γ -APC-A.

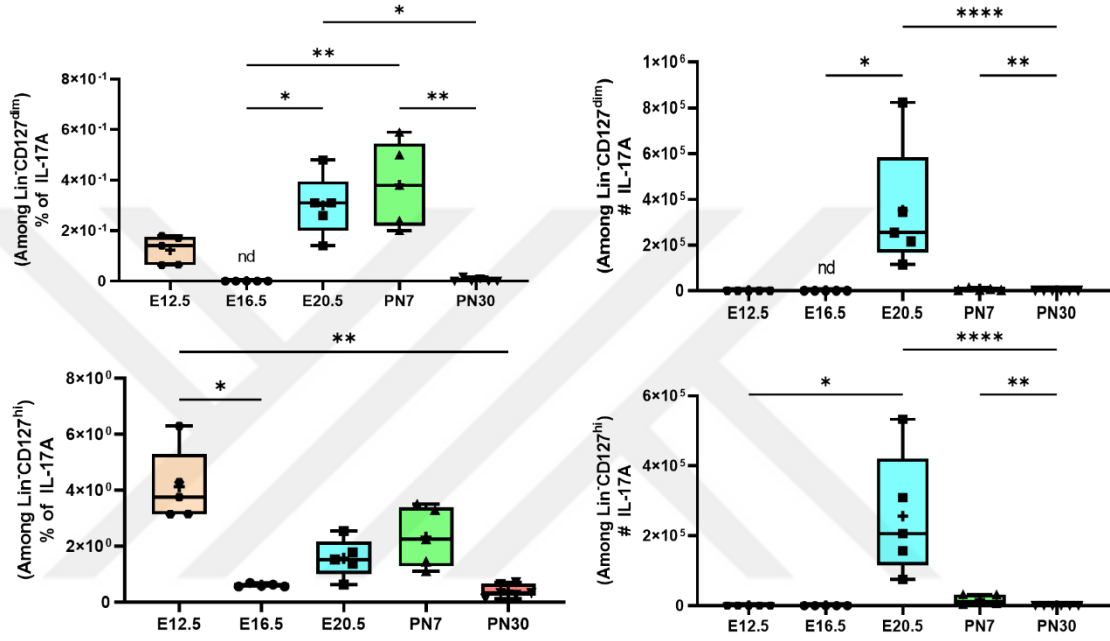
Hepatik ILC'lerin IFN γ üretim frekansı ile IFN γ üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.10'da verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında E16.5'te IFN γ üreten hücre saptanmadı. Bu kapılamada IFN γ üreten hepatik ILC frekansı PN7 ve PN30'da E16.5'e göre anlamlı artış gösterdi. Bu kapılamada IFN γ üreten hücre sayısı E12.5'ten E16.5'e doğru anlamlı olarak azaldı. Buna karşın E16.5'ten E20.5, PN7 ve PN30'a doğru anlamlı artış gösterdi. Aynı zamanda bu kapılamada IFN γ üreten hücre sayısı PN30'da hem E12.5 hem de E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı.



Şekil 4.10. IFN γ üreten hepatik ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını ve "nd" hücre veya frekans tespit edilemediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Hepatik ILC'lerin IL-17A üretim frekansı ile IL-17A üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.11'da verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında E16.5'te IL-17A üreten hücre saptanmadı. Bu kapılamada hepatik ILC'lerin IL-17A üretim frekansı E16.5'e göre E20.5 ve PN7'de anlamlı olarak daha fazlaydı. Ayrıca E20.5 ve PN7'de IL-17A üretim frekansı PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IL-17A üreten hepatik ILC sayısı PN30'da hem PN7 hem de E20.5'ten

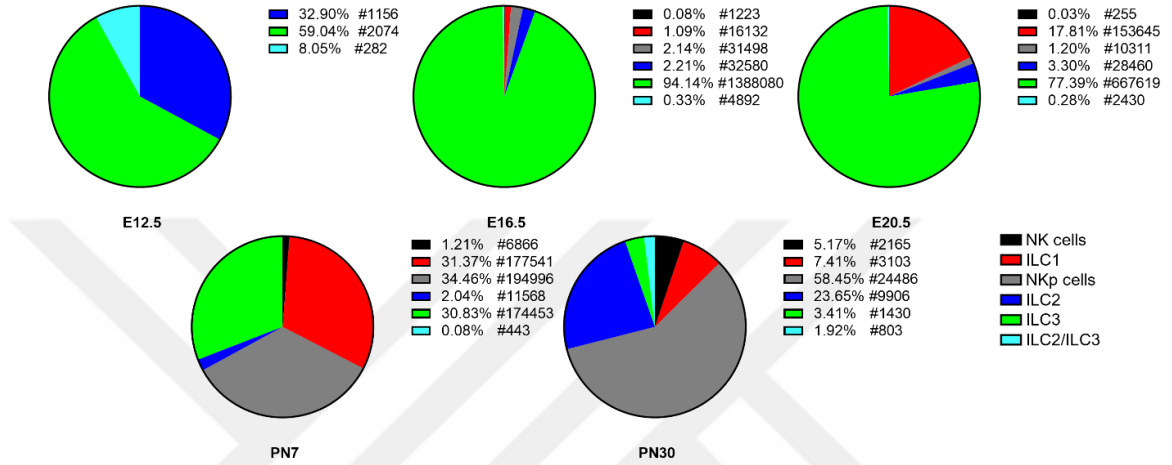
daha azdı. Bu kapılamada IL-17A üreten hepatik ILC sayısı E20.5'te E16.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki hepatik ILC'lerin IL-17A üretim frekansı E12.5'te E16.5 ve PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada IL-17A üreten hepatik ILC sayısı E20.5'te hem E12.5 hem de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Benzer şekilde aynı kapılamada IL-17A üreten hepatik ILC sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma göstermekteydi.



Şekil 4.11. IL-17A üreten hepatik ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını ve "nd" hücre veya frekans tespit edilemediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Farklı zaman noktalarında ILC alt tiplerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdesini ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri Şekil 4.12'de verildi. E12.5'te NKp ve NK hücreleri ile ILC1'lerin tespit edilememesinin nedeni gereç ve yöntem bölümünde detaylı olarak belirtildi. E12.5'te hepatik ILC3'ler baskın ILC alt tipiydi. E16.5'te hepatik ILC3'lerin total ILC'ler arasındaki yüzdesinde artış görüldü. E20.5'te de hepatik ILC3'ler karaciğerin baskın ILC alt tipi olmaya devam etti. Buna karşın ILC1'lerin total ILC'ler arasındaki oranında bariz artış olduğu saptandı. PN7'de NKp

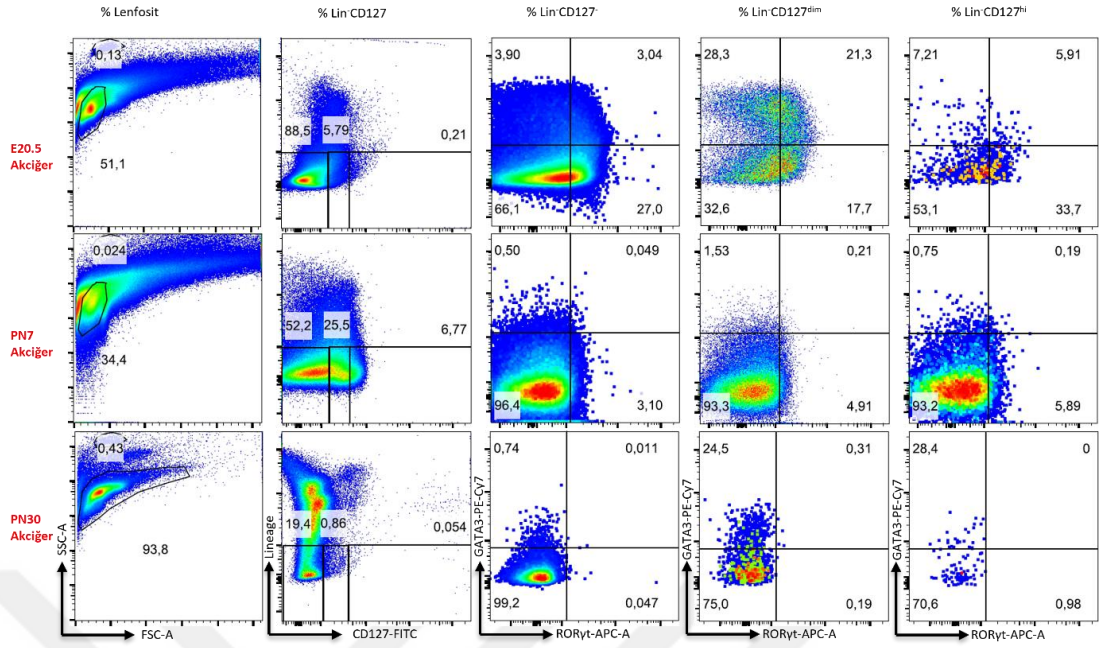
hücreleri sürpriz bir şekilde karaciğerin baskın ILC alt tipi olarak saptandı. PN30'da NKp hücreleri karaciğerin baskın ILC alt tipi olmaya devam etti. Buna karşın ILC2'lerin yüzdelilerindeki bariz artış göze çarpmaktaydı. Öncül hücreler dahil edilmediğinde, hepatik ILC3'lerin prenatal dönem ile doğumdan sonraki ilk haftada karaciğerin baskın ILC alt tipi olduğu saptandı. Ancak PN30'da karaciğer baskın ILC alt tipi ILC2 olarak saptandı.



Şekil 4.12. Hepatik ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri. Pasta grafikleri farklı zaman noktalarındaki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC'ler içerisinde kapladığı yüzdelere baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiklerindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Her pasta grafiğinde saptanan hücre sayısı, kendine ait zaman noktasındaki tüm kuyucuklardan gelen toplam hücre sayısını göstermektedir. PN30'da altı kuyucuk, diğer günlerde beş kuyucuk yer almaktadır.

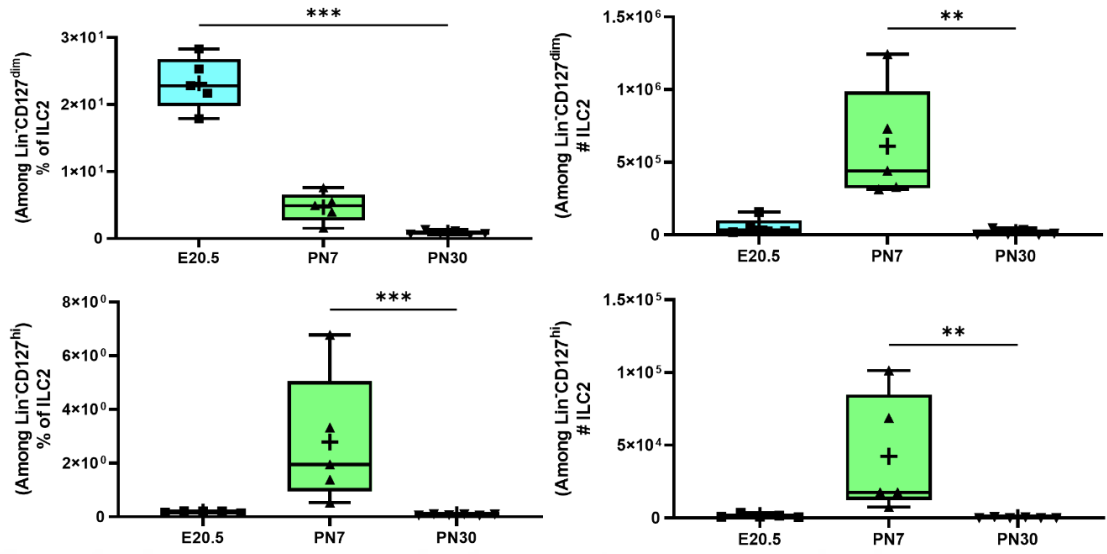
4.2. Akciğer ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

Farklı zaman noktalarına ait akciğerlerden elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Akciğerde ILC'ler sadece E20.5, PN7 ve PN30'da incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.13'de gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



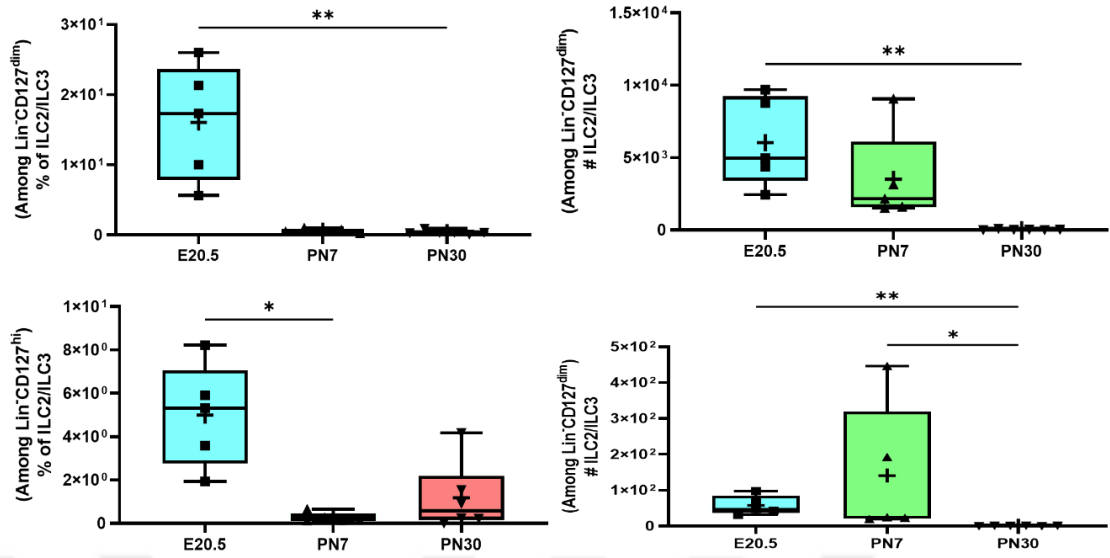
Şekil 4.13. Akciğerdeki ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Akciğerdeki ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.14'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki ILC2 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamadaki ILC sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazla saptandı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2 frekansı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak fazlaydı. Bu kapılamada ILC2 sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



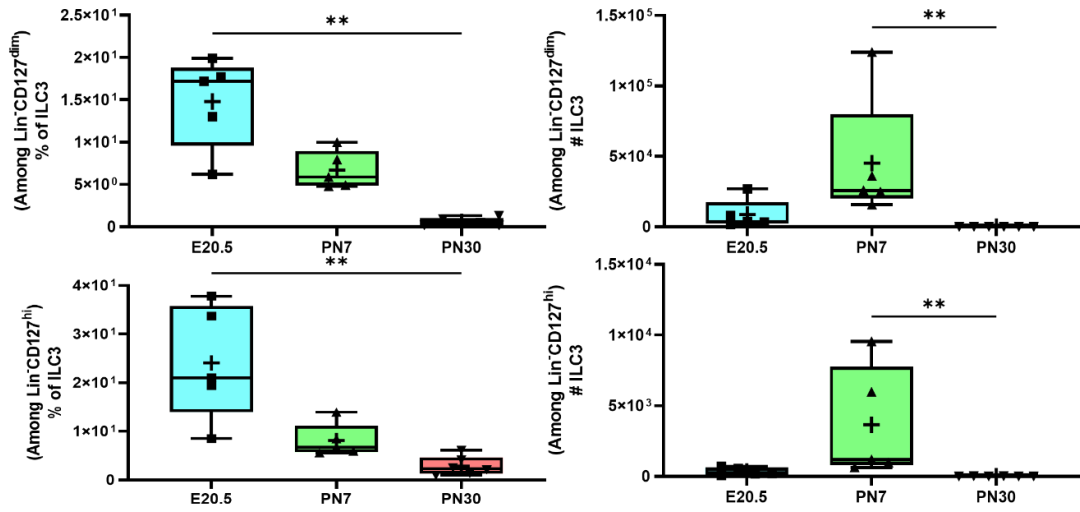
Şekil 4.14. Akciğerdeki ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Akciğerdeki ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.15'te verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki ILC2/ILC3 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamadaki ILC2/ILC3 sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazla saptandı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2/ILC3 frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada ILC2/ILC3 sayısı PN30'da hem PN7 hem de E20.5'ten anlamlı olarak daha azdı.



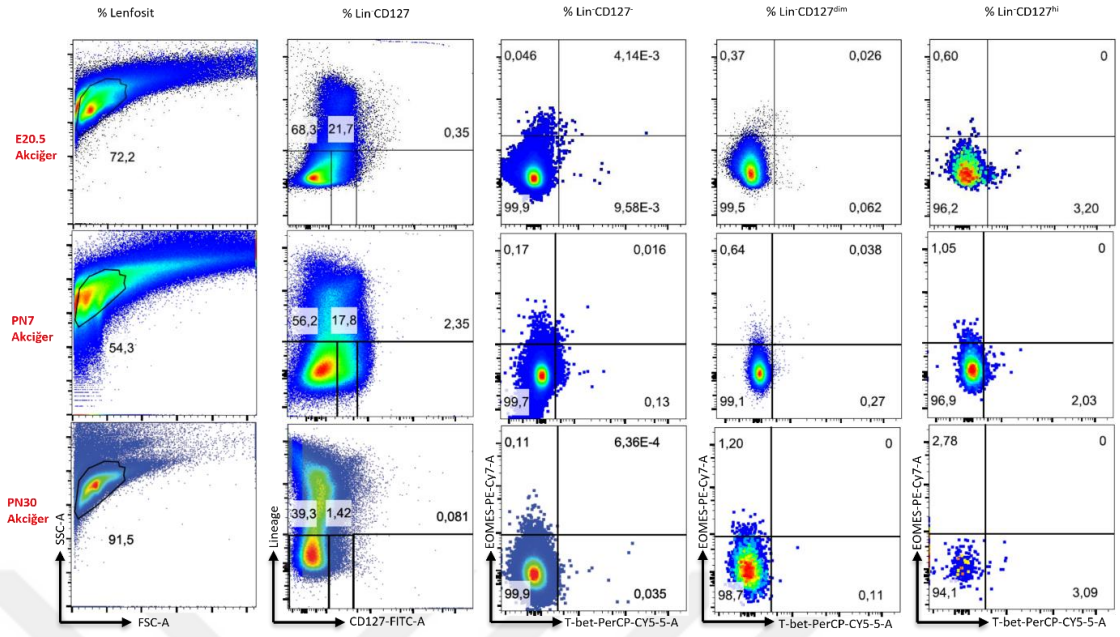
Şekil 4.15. Akciğerdeki ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Akciğerdeki ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.16'da verildi. İncelenen iki kapılamada ILC3 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazla saptandı. Bu kapılamalardaki hücre sayıları PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazla saptandı.



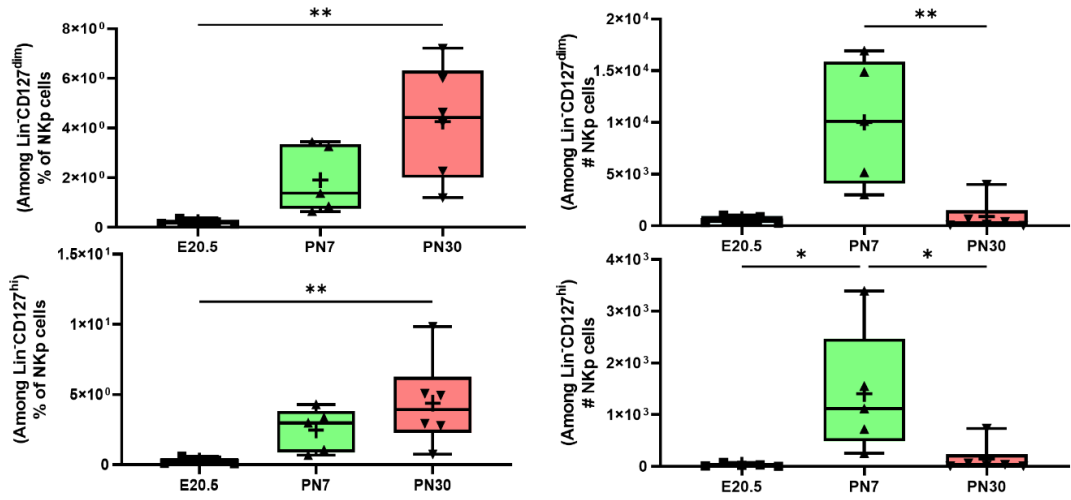
Şekil 4.16. Akciğerdeki ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Farklı zaman noktalarına ait akciğerlerden elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.17'de gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



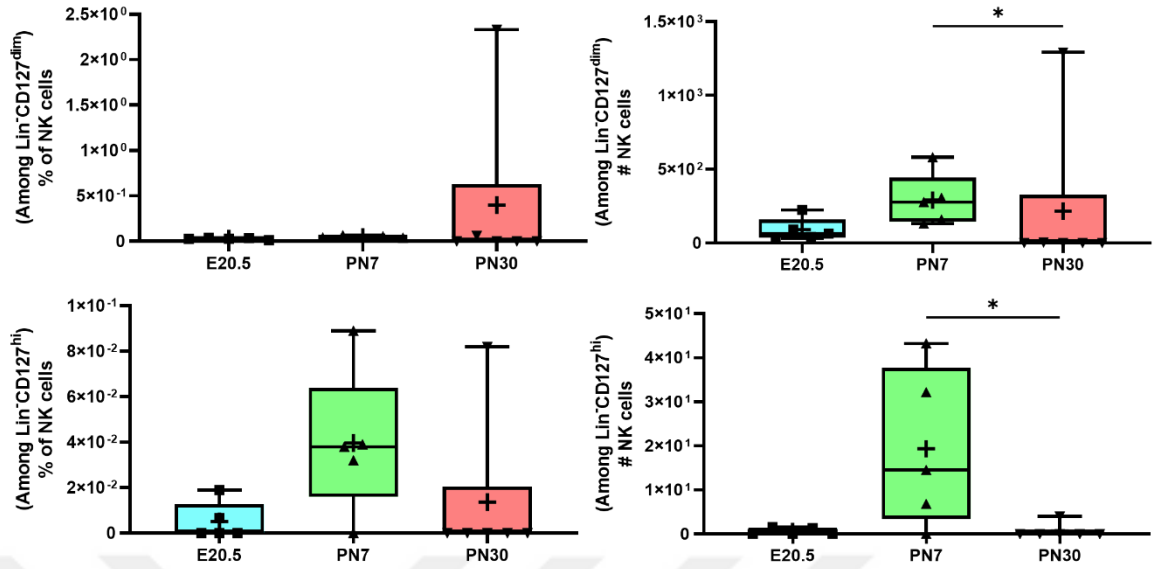
Şekil 4.17. Akciğerdeki NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Akciğerdeki NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.18'de verildi. İncelenen iki kapılamada akciğerdeki NKp hücre frekansı PN30'da E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki NKp hücre sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki NKp hücre sayısı PN7'de hem E20.5 hem de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



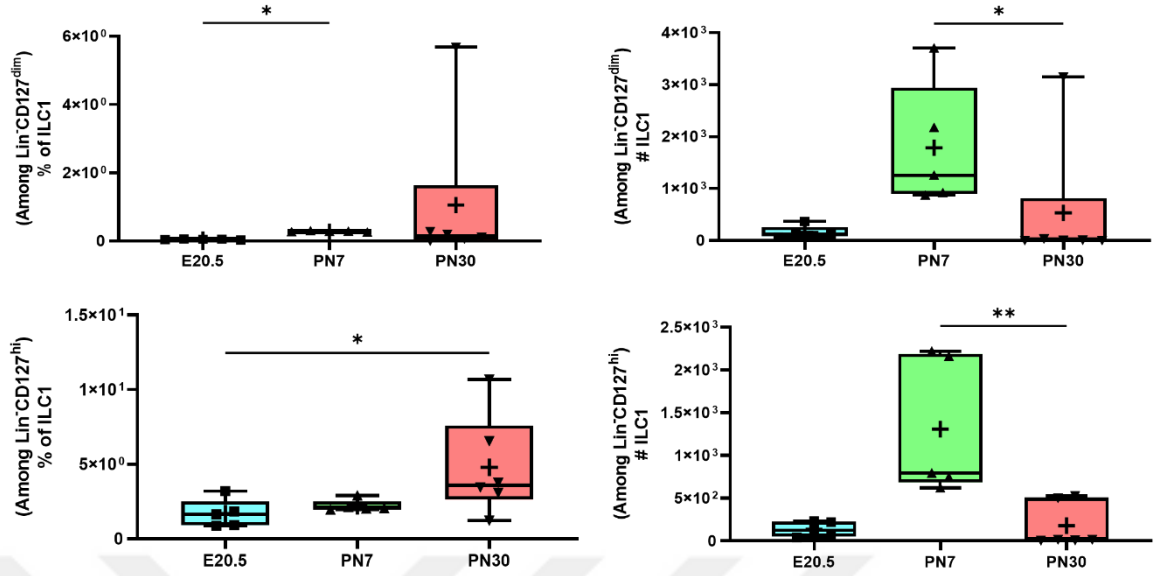
Şekil 4.18. Akciğerdeki NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Akciğerdeki NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.19'da verildi. İncelenen iki kapılamada NK hücre sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azaldı.



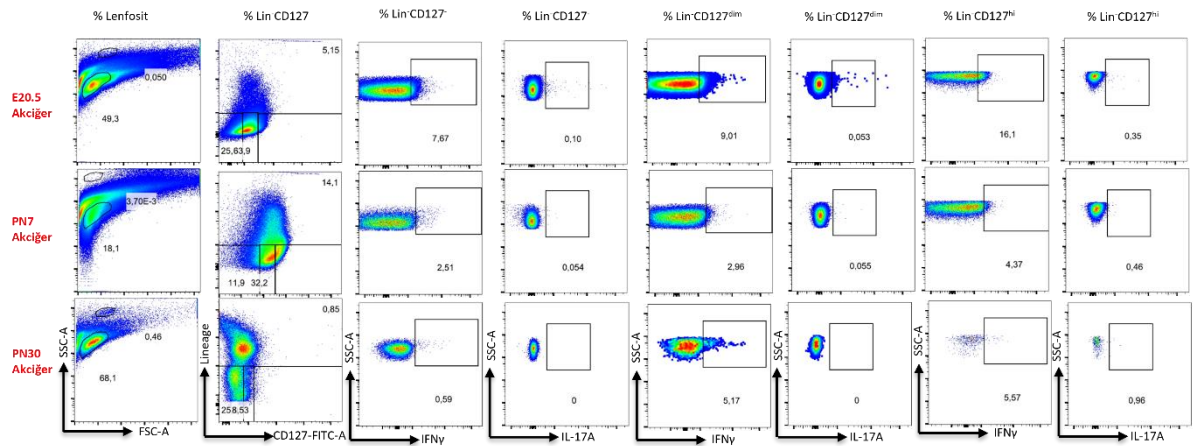
Şekil 4.19. Akciğerdeki NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Akciğerdeki ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.20'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki ILC1 frekansı PN7'de E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC1 frekansının PN30'da E20.5'ten anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. İncelenen iki kapılamada ILC1 sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma gösterdi.



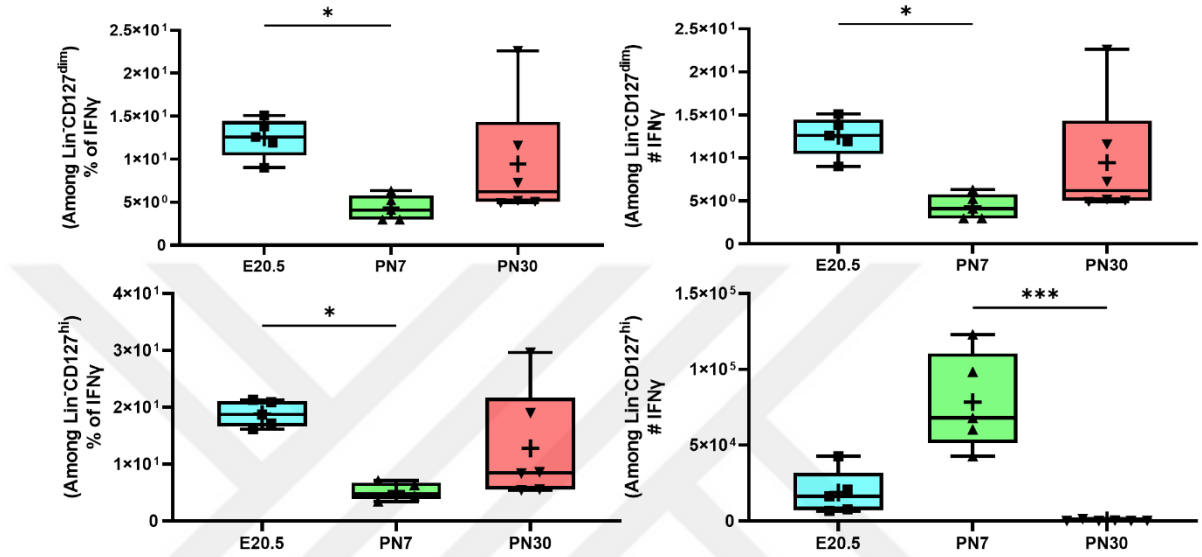
Şekil 4.20. Akciğerdeki ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Akciğer ILC'lerinin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda sitokin üretim kapasitelerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri Şekil 4.21'de verildi.



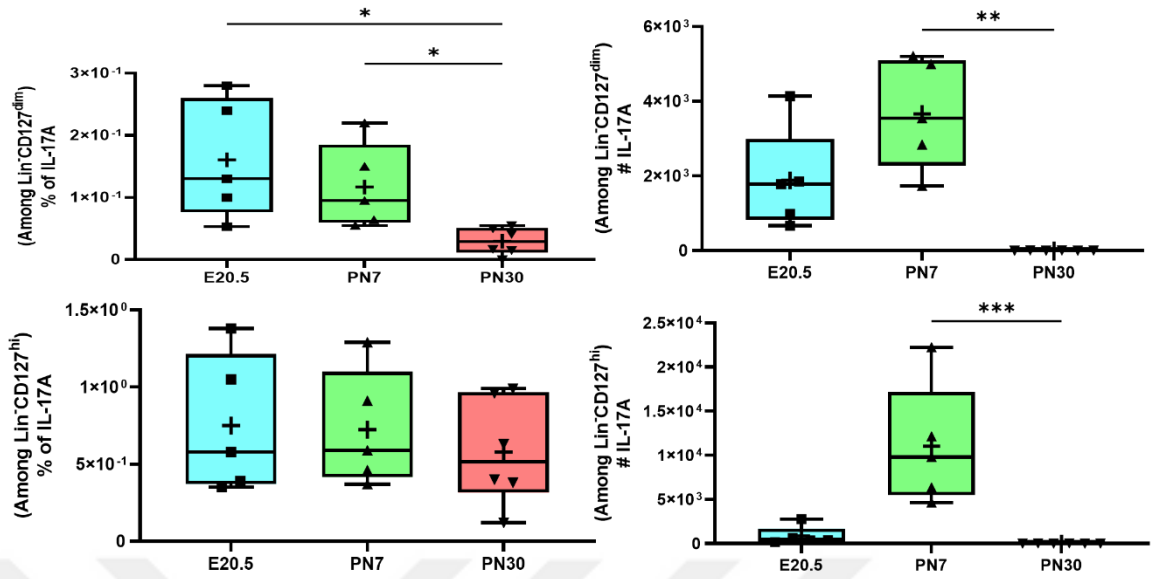
Şekil 4.21. Akciğer ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitokin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-5-A, IFN γ -APC-A.

Akciğer ILC'lerinin IFN γ üretim frekansı ile IFN γ üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.22'de verildi. İncelenen kapılamalarda IFN γ üreten ILC frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı azalma gösterdi. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı olarak azaldı.



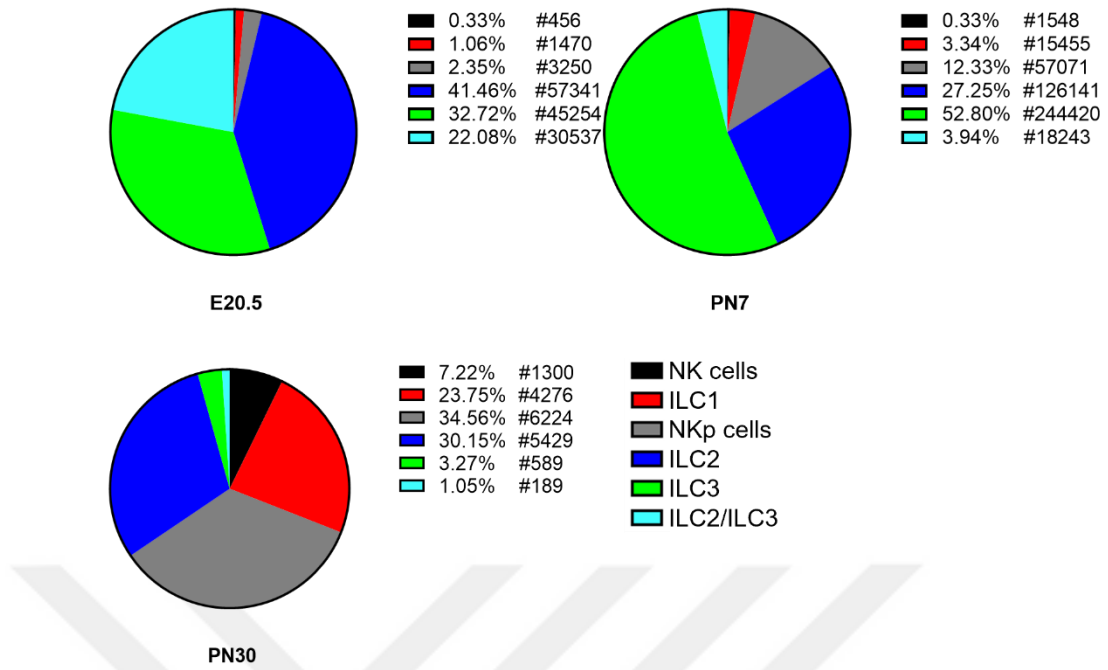
Şekil 4.22. IFN γ üreten akciğer ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını ve "nd" hücre veya frekans tespit edilemediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Akciğer ILC'lerinin IL-17A üretim frekansı ile IL-17A üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.23'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IL-17A üreten ILC frekansı PN30'da E20.5 ve PN7'ye göre anlamlı azalma gösterdi. İncelenen iki kapılamada IL-17A üreten ILC sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı olarak azaldı.



Şekil 4.23. IL-17A üreten akciğer ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için $n=6$, diğer zaman noktaları için $n=5$). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını ve "nd" hücre veya frekans tespit edilemediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

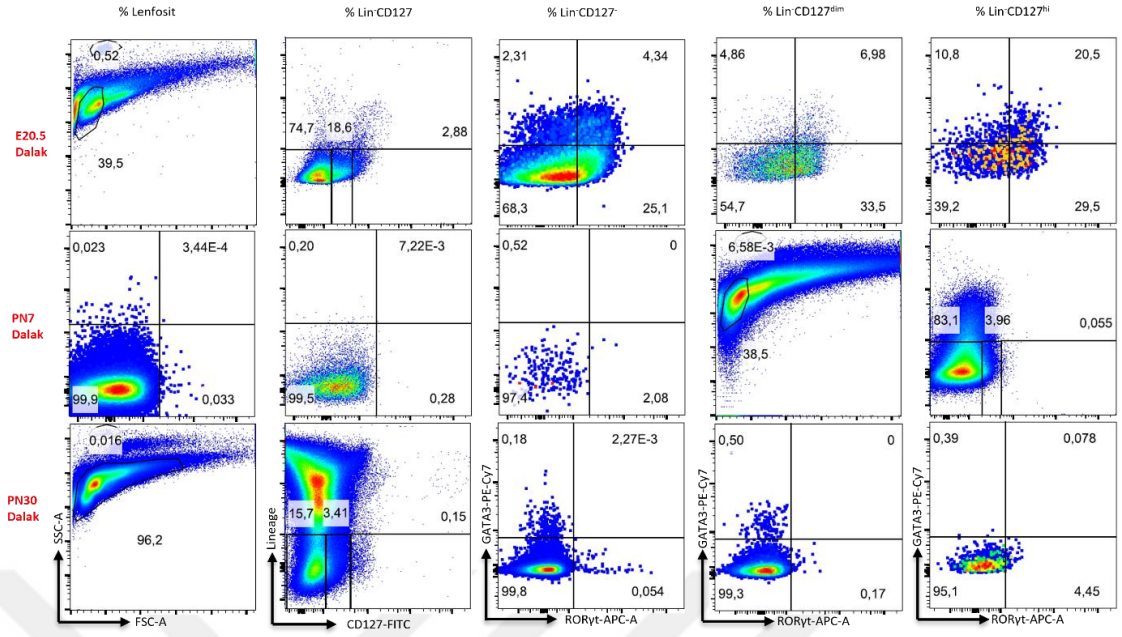
Farklı zaman noktalarında akciğerdeki ILC alt tiplerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdelere ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri Şekil 4.24'te verildi. E20.5'te akciğerde ILC2'ler baskın ILC alt tipiydi. PN7'de ILC3'ler akciğerdeki baskın ILC alt tipi oldu. PN30'da NKp hücreleri baskın ILC alt tipi olarak saptandı. ILC1'ler PN30'da sürpriz bir şekilde total ILC'lerin %24'ünü oluşturmaktaydı.



Şekil 4.24. Akciğer ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri. Pasta grafikleri farklı zaman noktalarındaki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC'ler içerisinde kapladığı yüzdelere baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiklerindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Her pasta grafiğinde saptanan hücre sayısı, kendine ait zaman noktasındaki tüm kuyucuklardan gelen toplam hücre sayısını göstermektedir. PN30'da altı kuyucuk, diğer günlerde beş kuyucuk yer almaktadır.

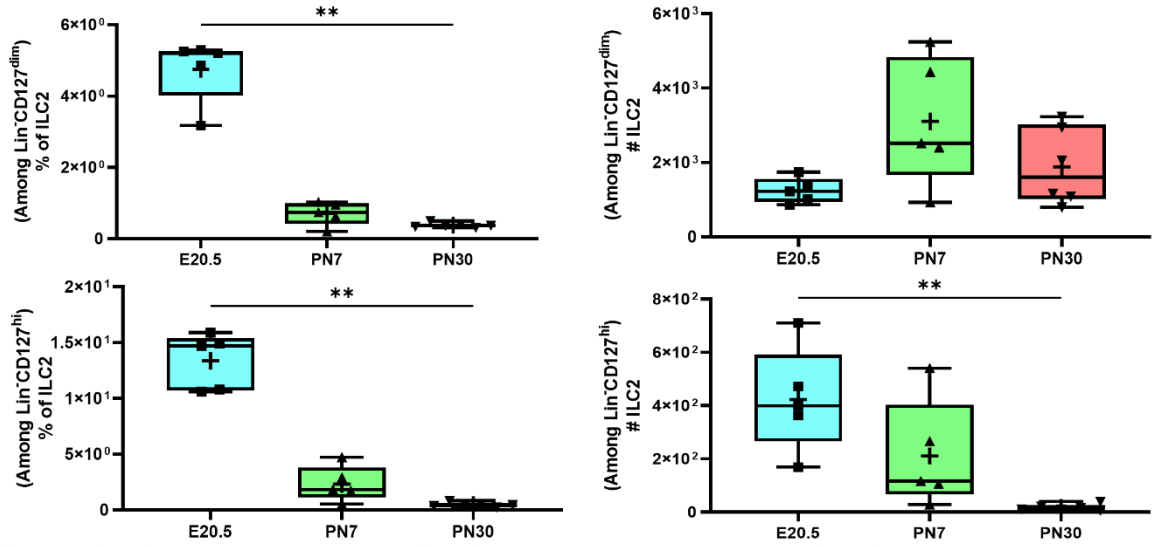
4.3. Dalak ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

Farklı zaman noktalarına ait dalaklardan elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Dalakta ILC'ler sadece E20.5, PN7 ve PN30'da incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.25'te gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde splenik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



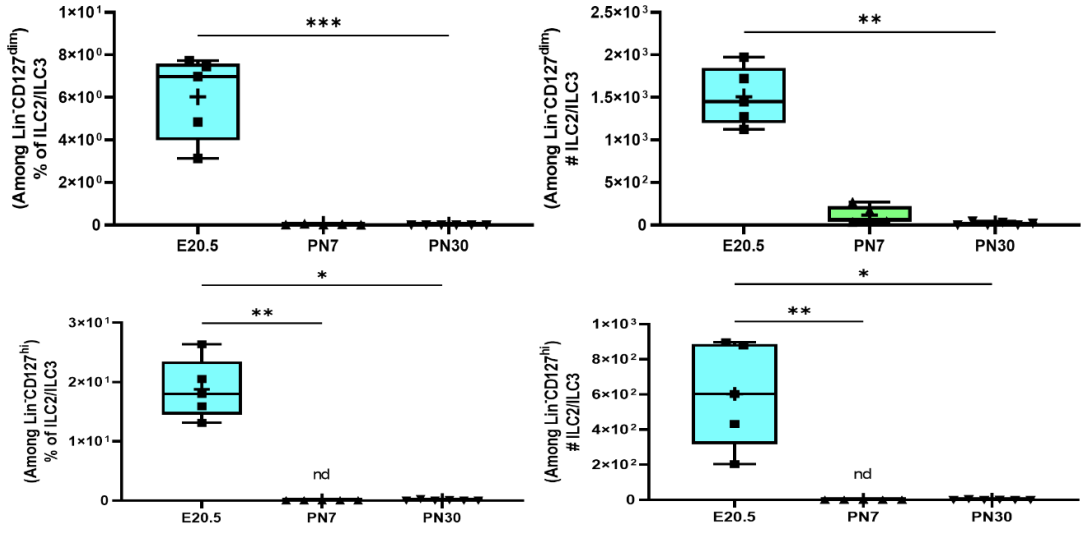
Şekil 4.25. Splenik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Splenik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.26'da verildi. İncelenen kapılamalarda ILC2 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2 sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



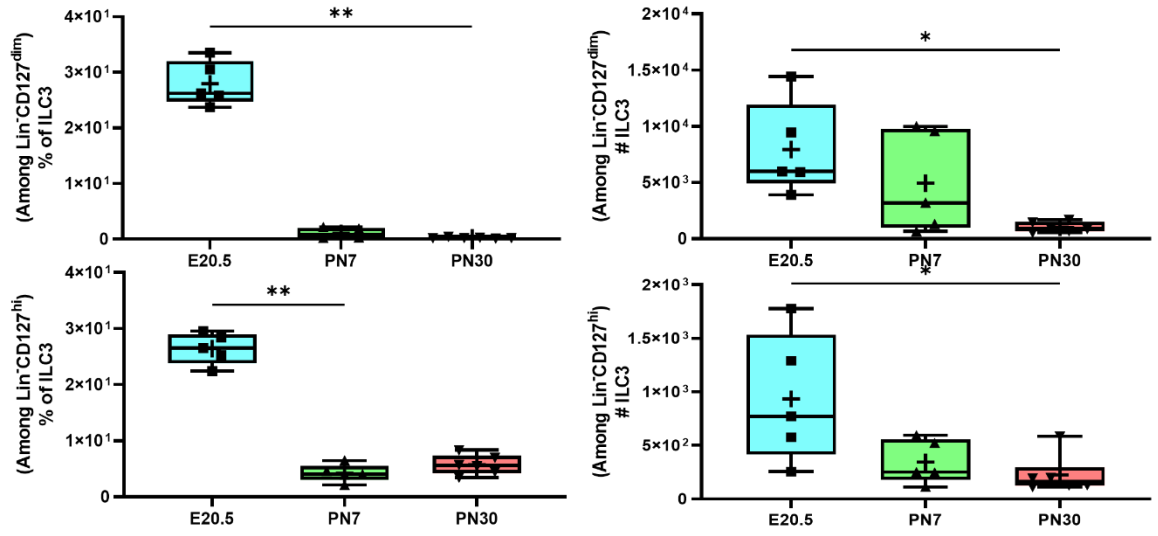
Şekil 4.26. Splenik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Splenik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.27'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC2/ILC3 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Benzer anlamlılık bu kapılamadaki ILC2/ILC3 sayısı için geçerliydi. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2/ILC3 sayısı E20.5'te PN7 ve PN30'dan anlamlı olarak fazlaydı. Benzer anlamlılık bu kapılamadaki ILC2/ILC3 sayısı için de geçerliydi.



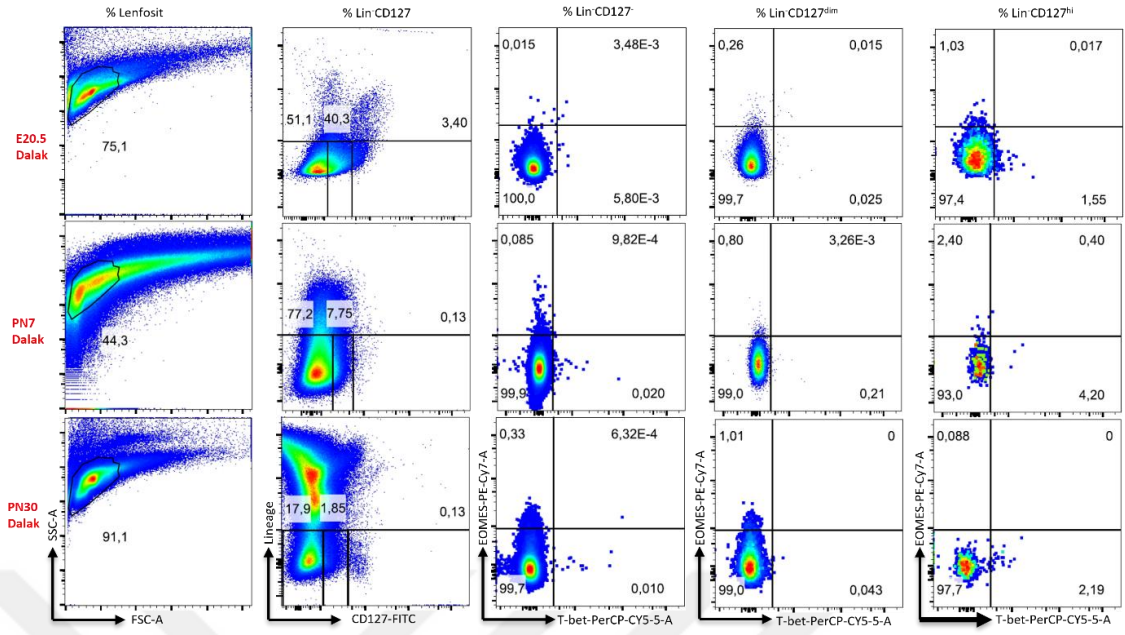
Şekil 4.27. Splenik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını, "nd" frekans veya hücre saptanmadığını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Splenik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.28'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC3 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Benzer anlamlılık bu kapılamadaki ILC3 sayısı için geçerliydi. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC3 frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak fazlaydı. Bu kapılamadaki ILC3 sayısı E20.5'ten PN30'a doğru anlamlı olarak daha azdı.



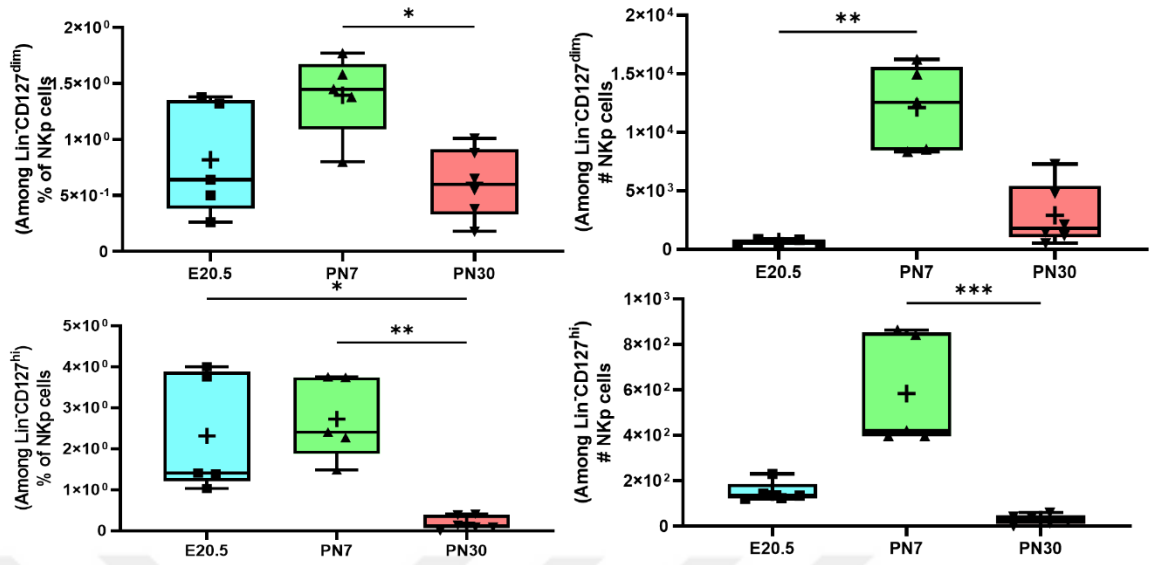
Şekil 4.28. Splenik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Farklı zaman noktalarına ait dalaklardan elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.29'da gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



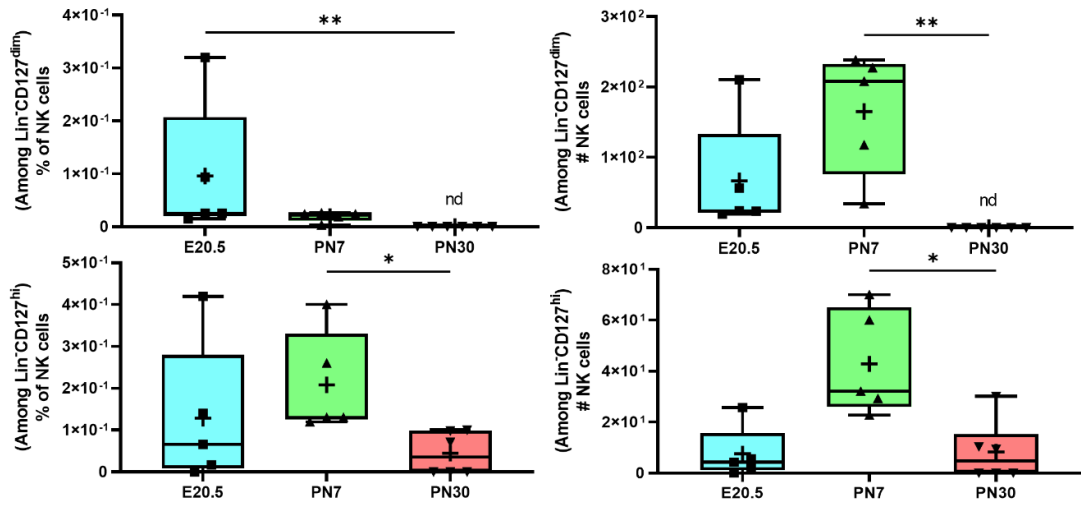
Şekil 4.29. Splenik NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Splenik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.30'da verildi. Lin⁺CD127^{dim} kapılamasında NKp hücre frekansı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma gösterdi. Bu kapılamada NKp hücre sayısı E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı artış gösterdi. Lin⁺CD127^{hi} kapılamasında NKp hücre frekansı PN30'da E20.5 ve PN7'den anlamlı olarak daha azdı. Bu kapılamada NKp hücre sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma gösterdi.



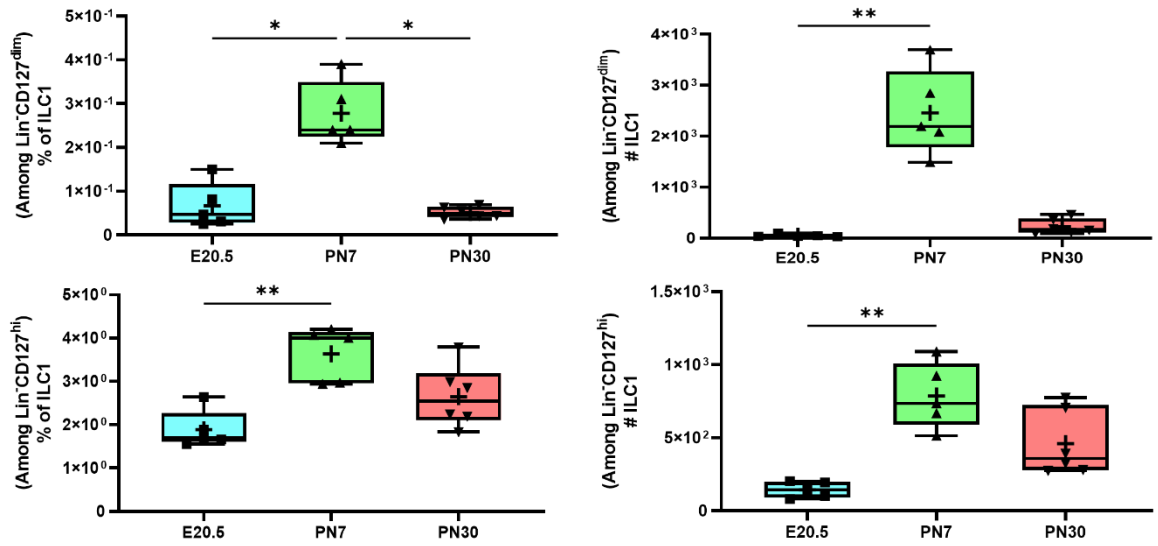
Şekil 4.30. Splenik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Splenik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.31'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında NK hücre frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada NK hücre sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma gösterdi. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında NK hücre frekansı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma gösterdi. Bu kapılamadaki NK hücre sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



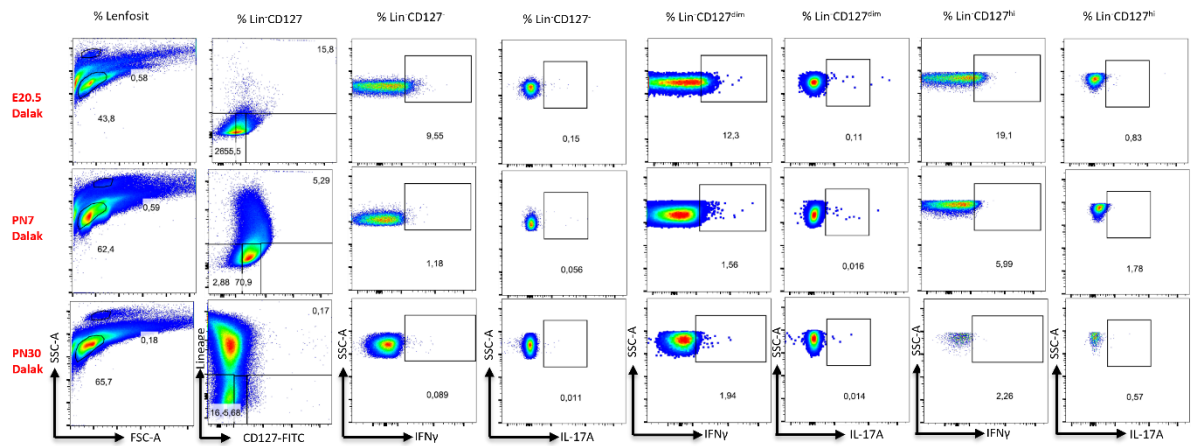
Şekil 4.31. Splenik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanyı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını, "nd" frekans veya hücre tespit edilmediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Splenik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.32'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC1 frekansı PN7'de hem E20.5 hem de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında ILC1 frekansı E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı artış gösterdi. İncelenen kapılamalardaki ILC1 sayısı E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı artış gösterdi.



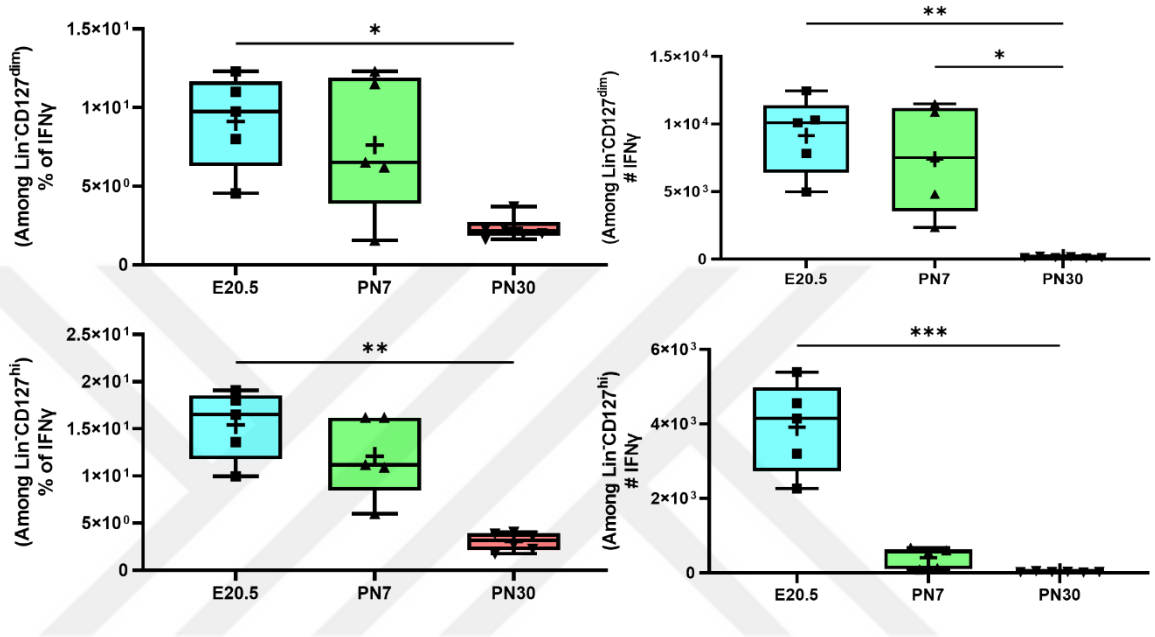
Şekil 4.32. Splenik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Dalak ILC'lerinin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda sitokin üretim kapasitlerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri Şekil 4.33'te verildi.



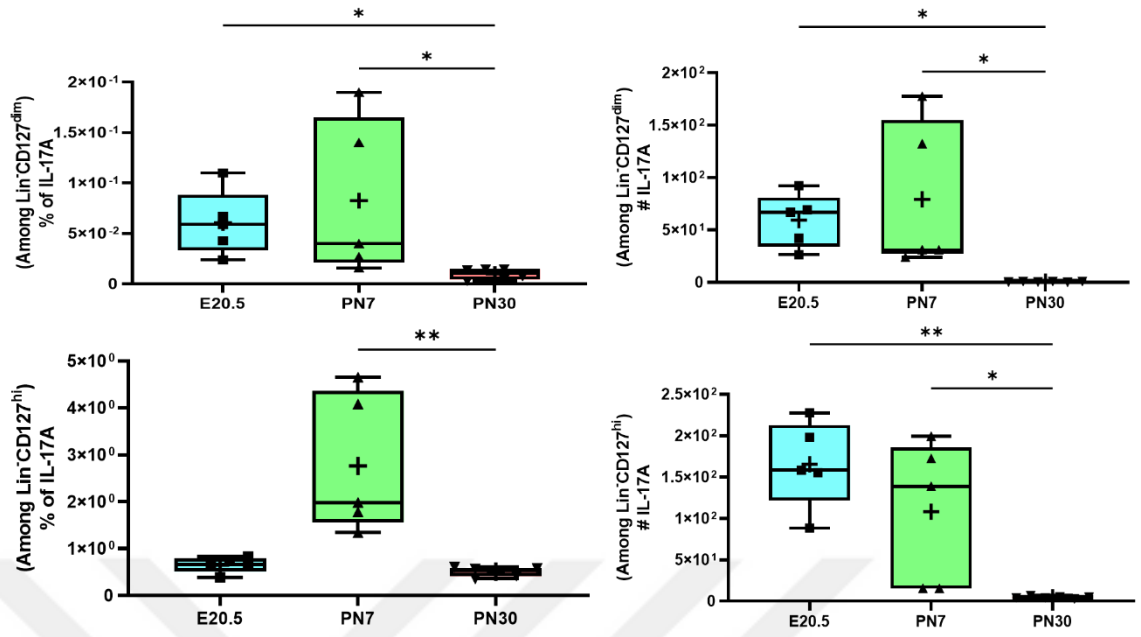
Şekil 4.33. Dalak ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitokin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-5-A, IFN γ -APC-A.

Dalak ILC'lerinin IFN γ üretim frekansı ile IFN γ üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.34'te verildi. İncelenen kapılamalarda IFN γ üreten ILC frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı PN30'da E20.5 ve PN7'den anlamlı olarak daha azdı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı PN30'da E20.5'ten anlamlı olarak daha azdı.



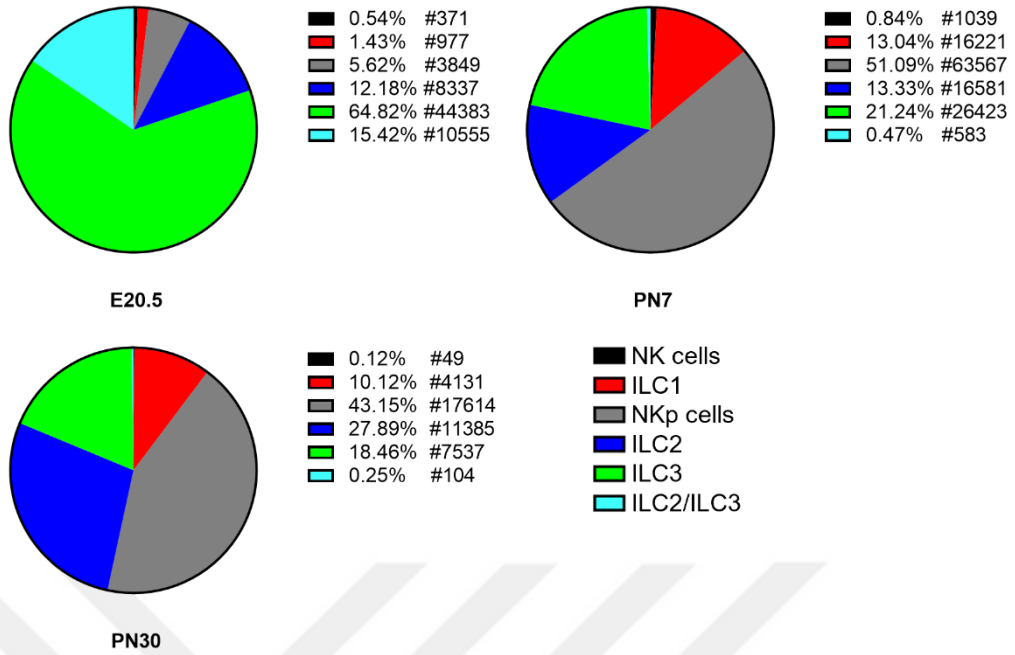
Şekil 4.34. IFN γ üreten dalak ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Dalak ILC'lerinin IL-17A üretim frekansı ile IL-17A üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.35'te verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IL-17A üreten ILC frekansı PN30'da E20.5 ve PN7'ye göre anlamlı azalma gösterdi. İncelenen iki kapılamada IL-17A üreten ILC sayısı PN30'da hem PN7 hem de E20.5'ten anlamlı olarak daha azdı.



Şekil 4.35. IL-17A üreten dalak ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

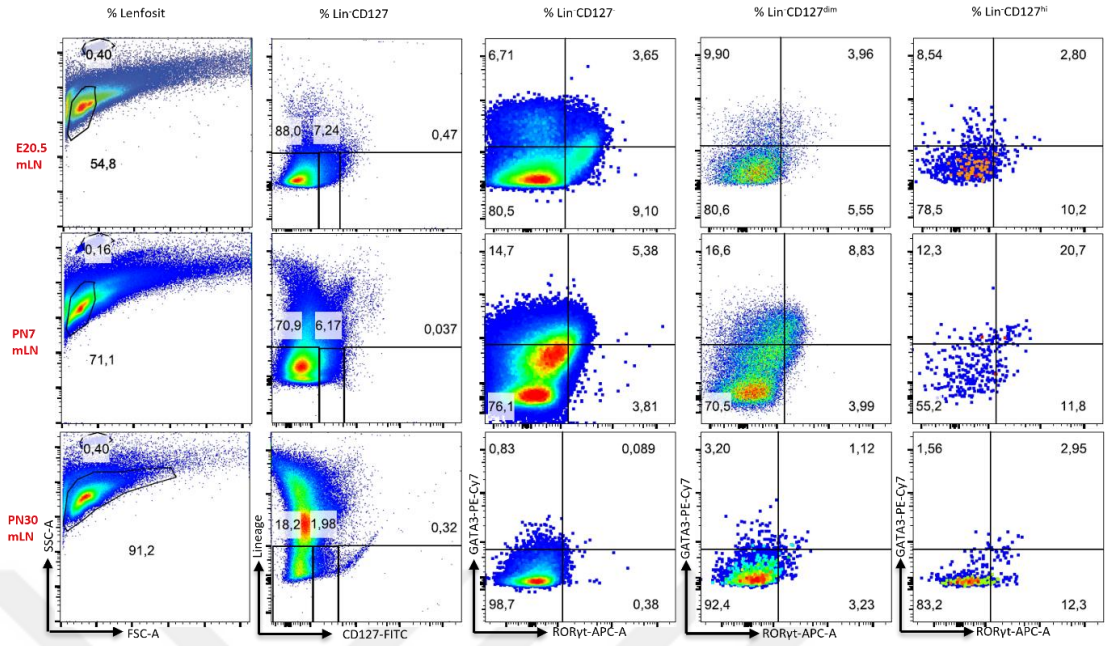
Farklı zaman noktalarında dalaktaki ILC alt tiplerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdeliklerini ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri Şekil 4.36'da verildi. E20.5'e ait dalakta splenik ILC3'ler baskın ILC alt tipiydi. PN7'de NKp hücreleri dalakta baskın ILC alt tipi oldu. PN30'da NKp hücreleri baskın ILC alt tipi olmaya devam etti. ILC2'ler prenatal dönemden postnatal döneme göre total ILC'ler arasında daha fazla temsil ediliyordu.



Şekil 4.36. Dalak ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri. Pasta grafikleri farklı zaman noktalarındaki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC'ler içerisinde kapladığı yüzdelere baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiklerindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Her pasta grafiğinde saptanan hücre sayısı, kendine ait zaman noktasındaki tüm kuyucuklardan gelen toplam hücre sayısını göstermektedir. PN30'da altı kuyucuk, diğer günlerde beş kuyucuk yer almaktadır.

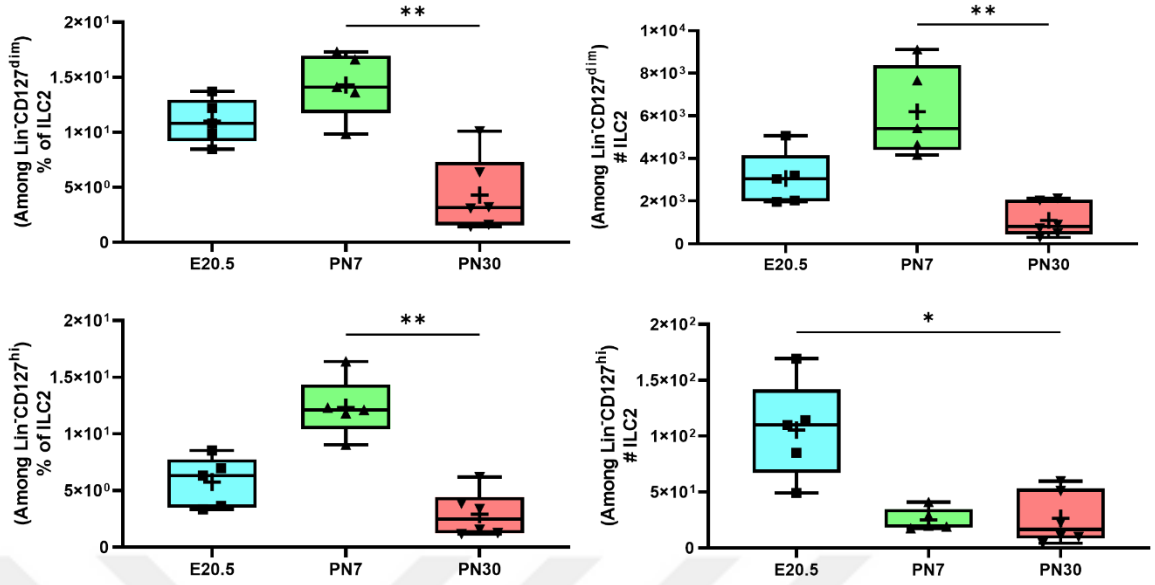
4.4. mLN ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

Farklı zaman noktalarına ait mLN'lerden elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. mLN'lerde ILC'ler sadece E20.5, PN7 ve PN30'da incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.37'de gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



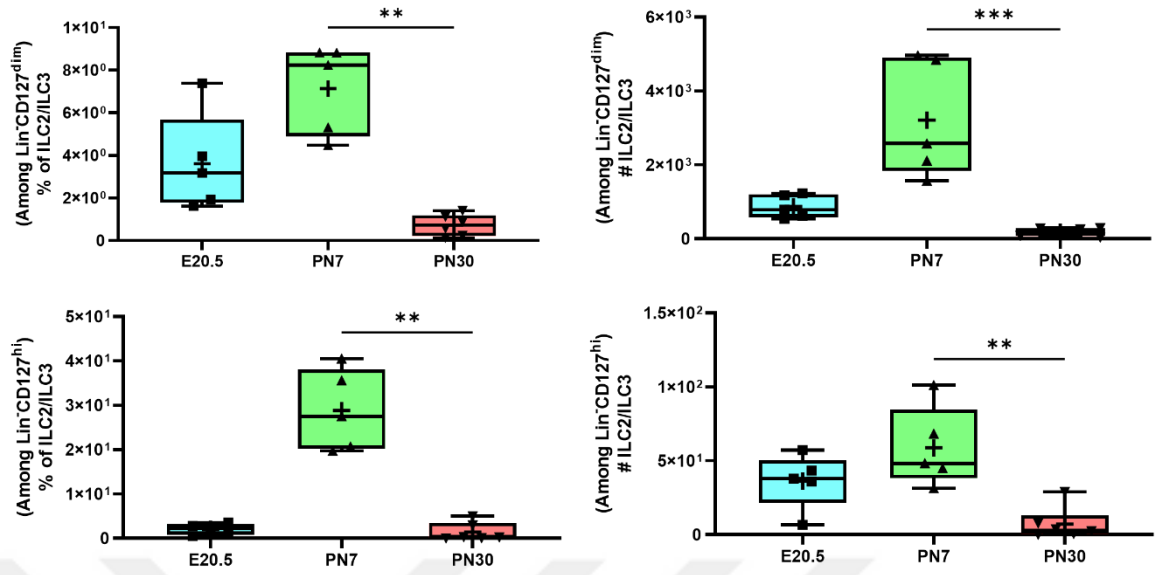
Şekil 4.37. mLN'deki ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

mLN ILC2'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.38'de verildi. İncelenen kapılamalarda ILC2 frekansı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki ILC2 sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2 sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



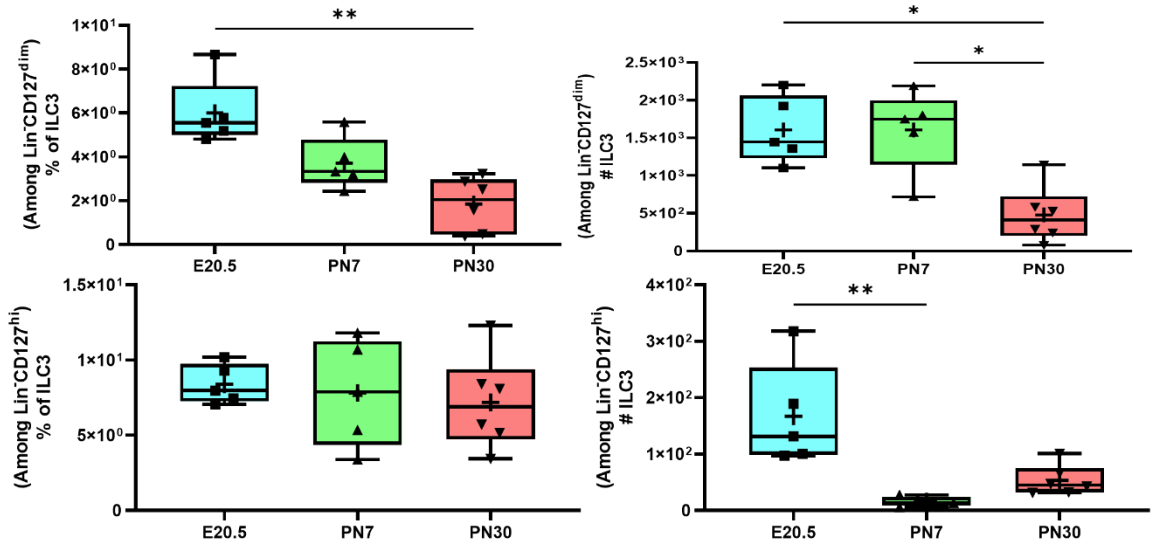
Şekil 4.38. mLN ILC2'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

mLN ILC2/ILC3'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.39'da verildi. İncelenen kapılamalarda ILC2/ILC3 frekansı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. İncelenen kapılamalarda ILC2/ILC3 sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



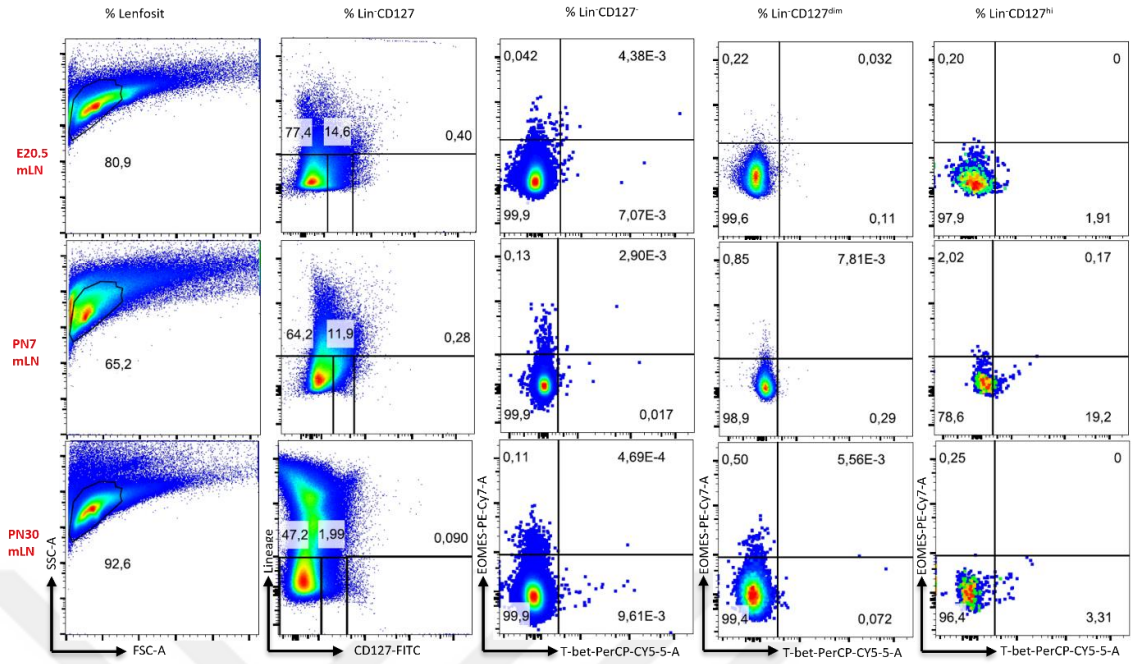
Şekil 4.39. mLN ILC2/ILC3'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

mLN ILC3'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.40'da verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki ILC3 frekansı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazla saptandı. Bu kapılamada ILC3 sayısı PN30'da PN7 ve E20.5'ten anlamlı olarak daha az saptandı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında ILC3 sayısı E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı olarak azaldı.



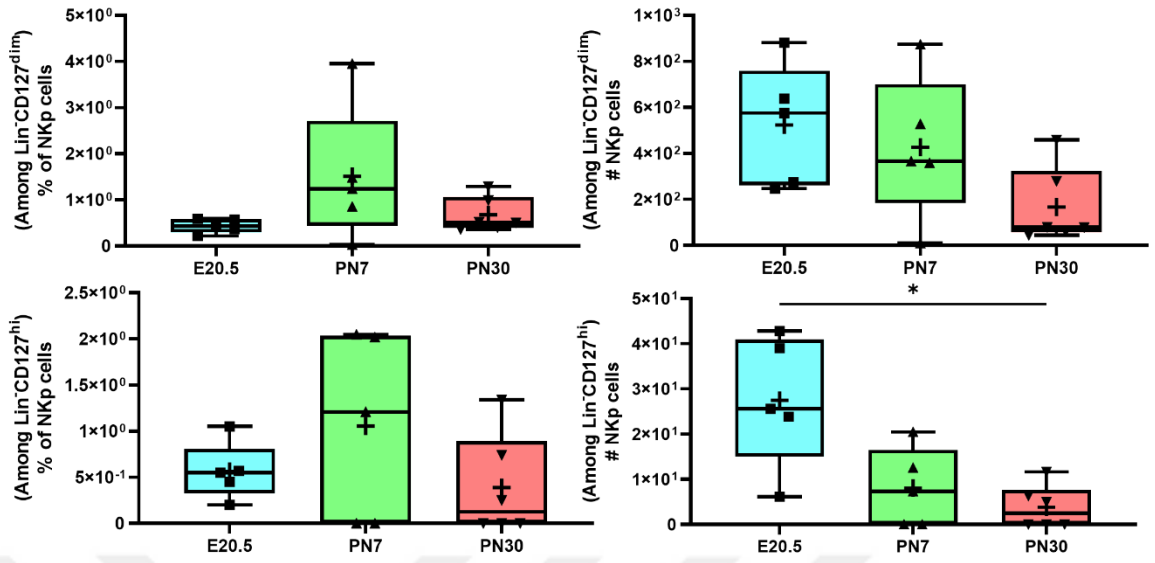
Şekil 4.40. mLN ILC3'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Farklı zaman noktalarına ait mLN'lerden elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.41'de gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



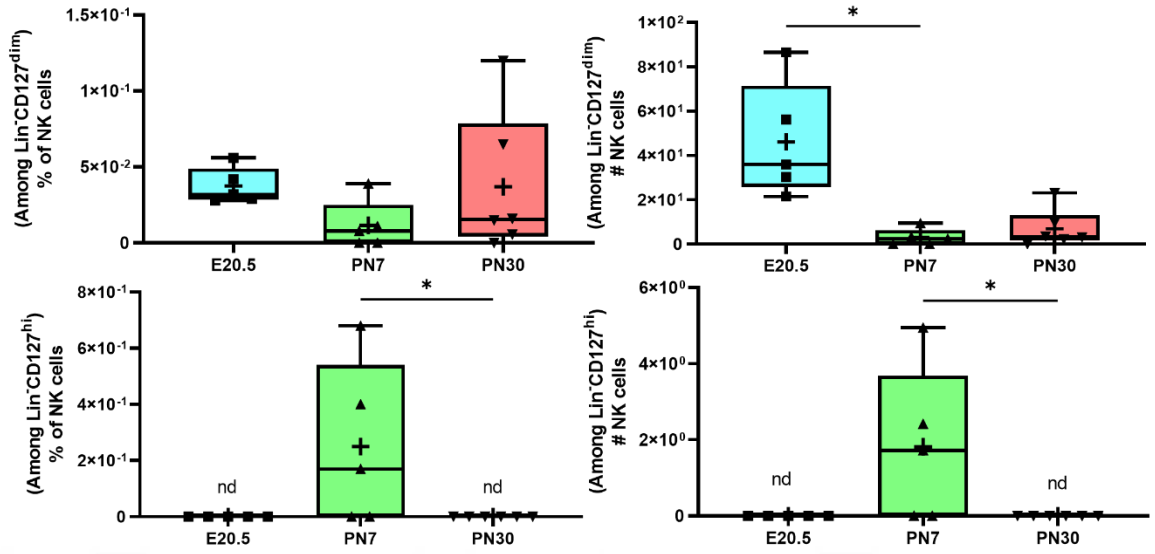
Şekil 4.41. mLN'deki NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

mLN'deki NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.42'de verildi. Lin⁻CD127^{hi} kapılmasında NKp hücre sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



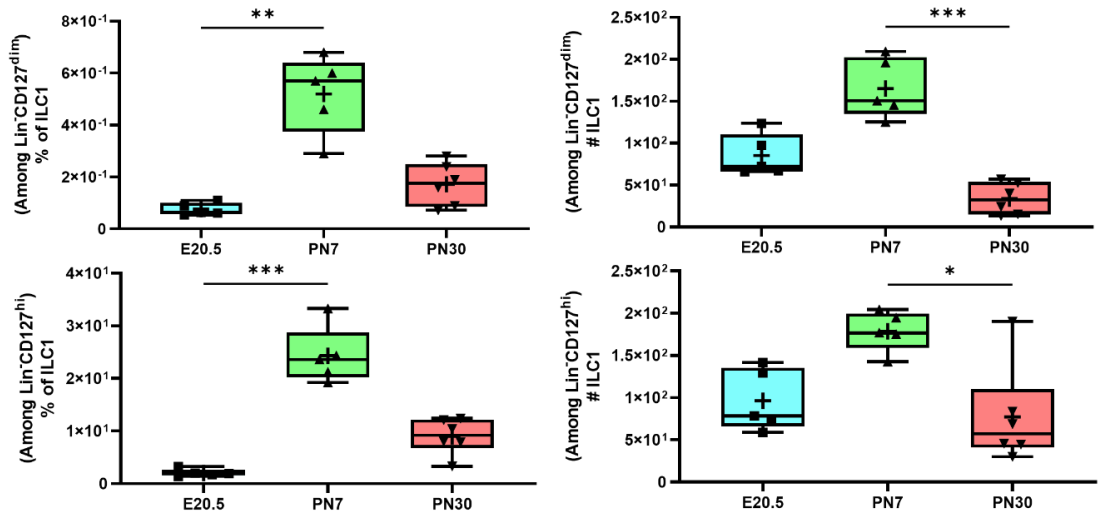
Şekil 4.42. mLN'deki NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

mLN'deki NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.43'te verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında NK hücre sayısı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki NK hücre frekansı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu kapılamada E20.5 ve PN30'da frekans ve hücre tespit edilmedi.



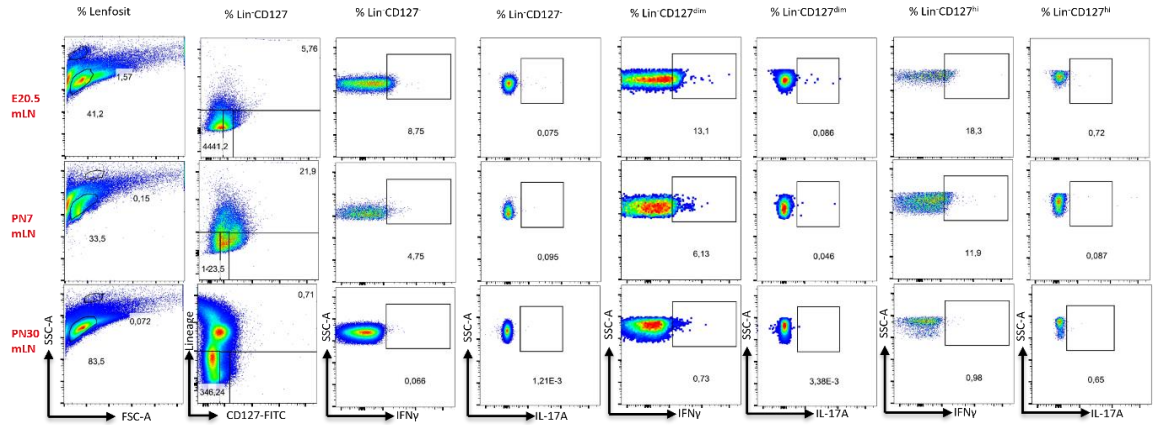
Şekil 4.43. mLN'deki NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını ve "nd" frekans veya hücre tespit edilmediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

mLN'deki ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.44'te verildi. Hem Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında hem de Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında ILC1 frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha azdı. Yine bu iki kapılamada ILC1 sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



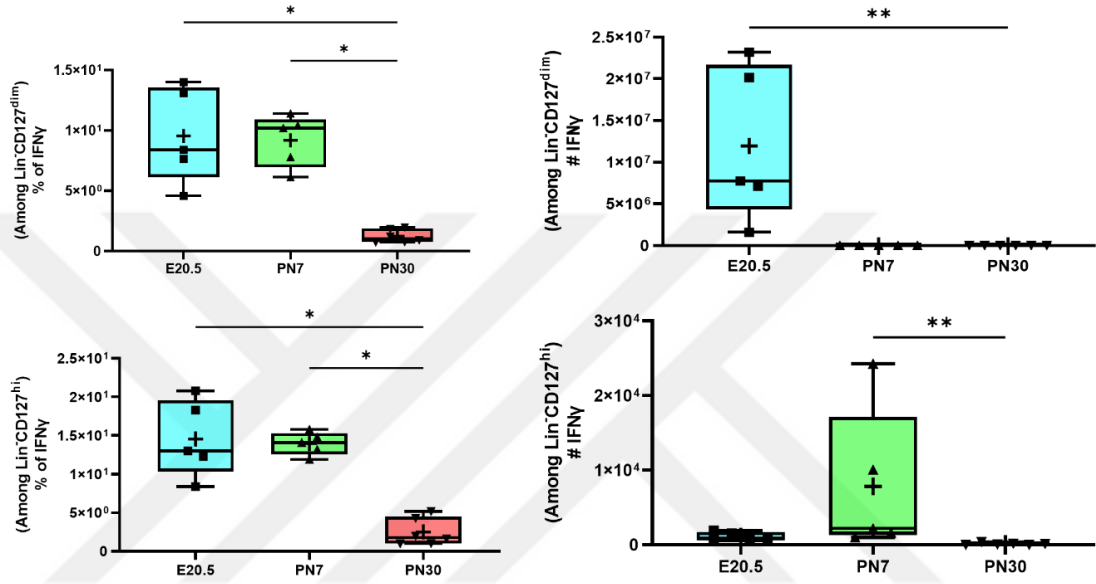
Şekil 4.44. mLN'deki ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

mLN ILC'lerinin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda sitokin üretim kapasitelerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri Şekil 4.45'te verildi.



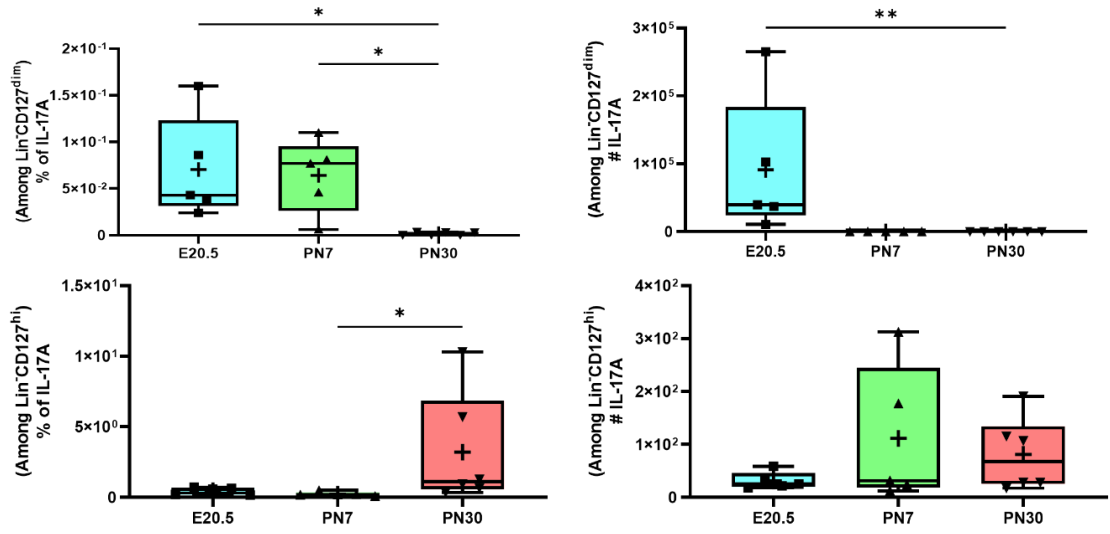
Şekil 4.45. mLN ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitokin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-5-A, IFN γ -APC-A.

mLN ILC'lerinin IFN γ üretim frekansı ile IFN γ üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.46'da verildi. İncelenen kapılamalarda IFN γ üreten ILC frekansı PN30'da hem PN7 hem de E20.5'ten anlamlı olarak daha azdı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



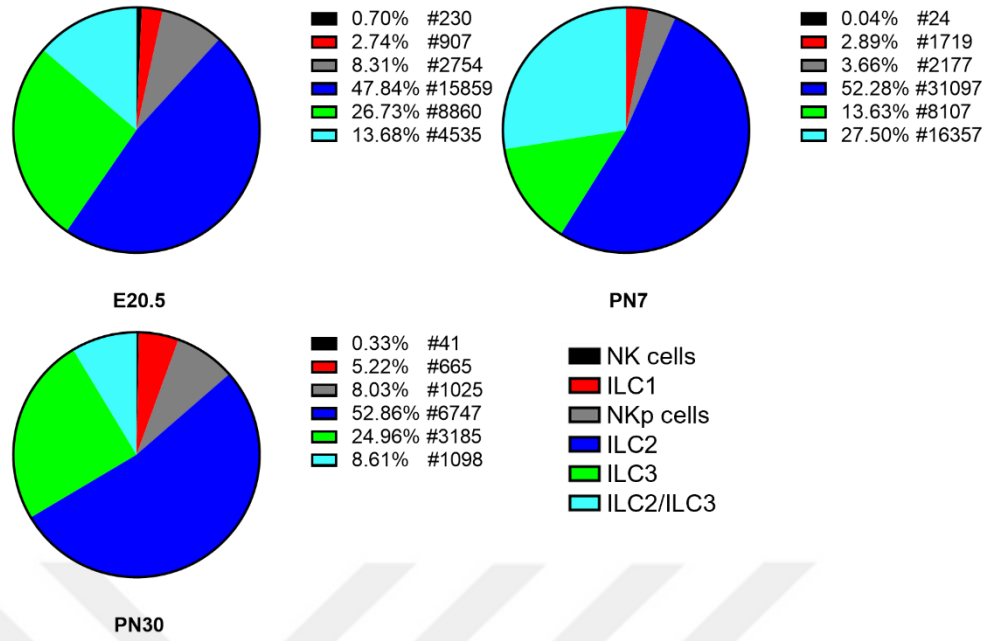
Şekil 4.46. IFN γ üreten mLN ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

mLN ILC'lerinin IL-17A üretim frekansı ile IL-17A üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.47'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IL-17A üreten ILC frekansı PN30'da E20.5 ve PN7'ye göre anlamlı olarak daha azdı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında IL-17A üreten ILC frekansı PN30'da PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IL-17A üreten ILC sayısı E20.5'te PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



Şekil 4.47. IL-17A üreten mLN ILC'lerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

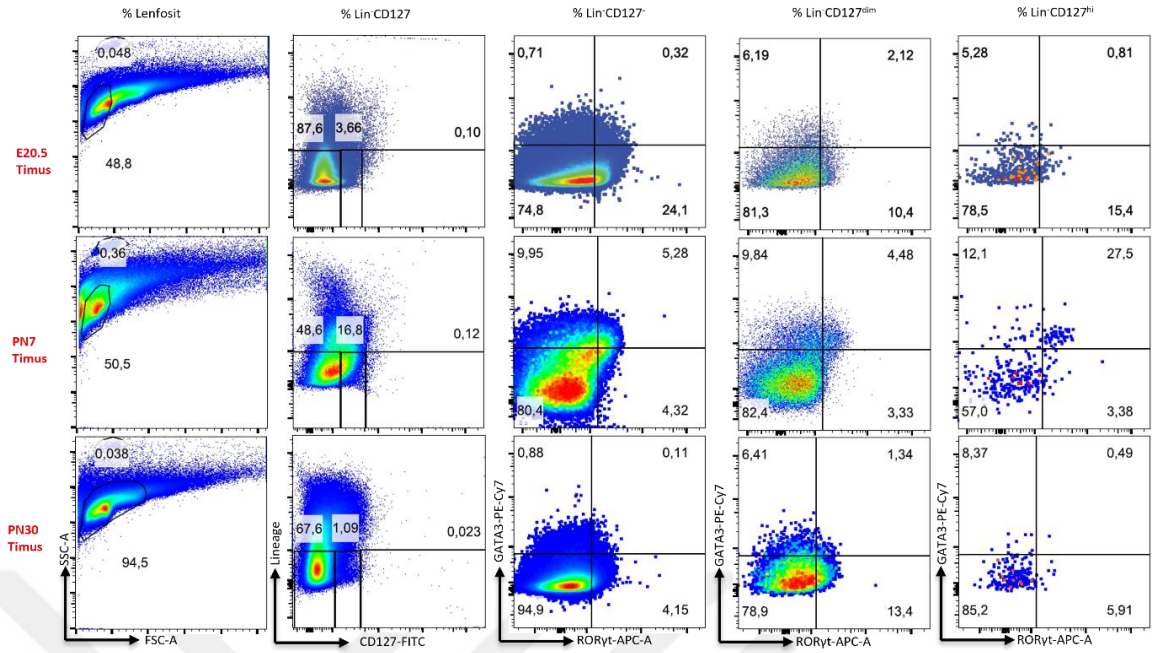
Farklı zaman noktalarında mLN'de tespit edilen ILC alt tiplerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdelerini ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri Şekil 4.48'de verildi. İncelenen tüm zaman noktalarında ILC2'ler baskın ILC alt tipi idi. ILC3'ler E20.5'te total ILC'lerin yaklaşık %27'sini oluştururken bu oran PN7'de %14, PN30'da %25 civarıydı. Doğumdan bir hafta sonra ILC2/ILC3 oranı artarken bu oran doğumdan bir ay sonra azalma göstermekteydi. mLN'de tespit edilen ILC1'lerin total ILC'ler arasındaki yeri prenatal dönemden postnatal döneme geçişte düşük bir artış göstermekteydi.



Şekil 4.48. mLN’de tespit edilen ILC alt tiplerinin total ILC’ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri. Pasta grafikleri farklı zaman noktalarındaki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC’ler içerisinde kapladığı yüzdeler baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiklerindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Her pasta grafiğinde saptanan hücre sayısı, kendine ait zaman noktasındaki tüm kuyucuklardan gelen toplam hücre sayısını göstermektedir. PN30’da altı kuyucuk, diğer günlerde beş kuyucuk yer almaktadır.

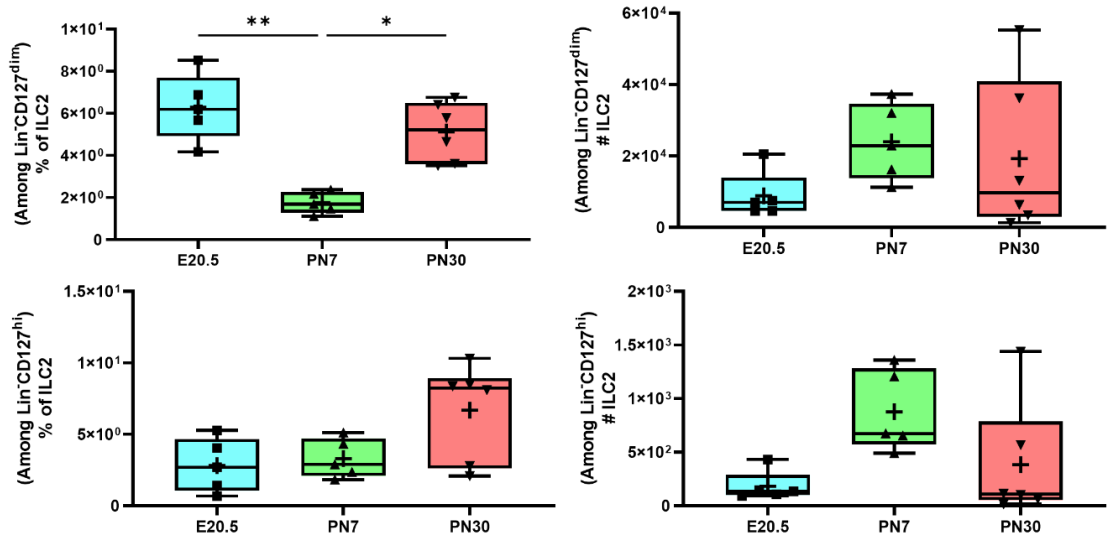
4.5. Timus ILC’lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

Farklı zaman noktalarına ait timuslardan elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Timusta ILC’ler E20.5, PN7 ve PN30’da incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.49’da gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde timik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3’lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



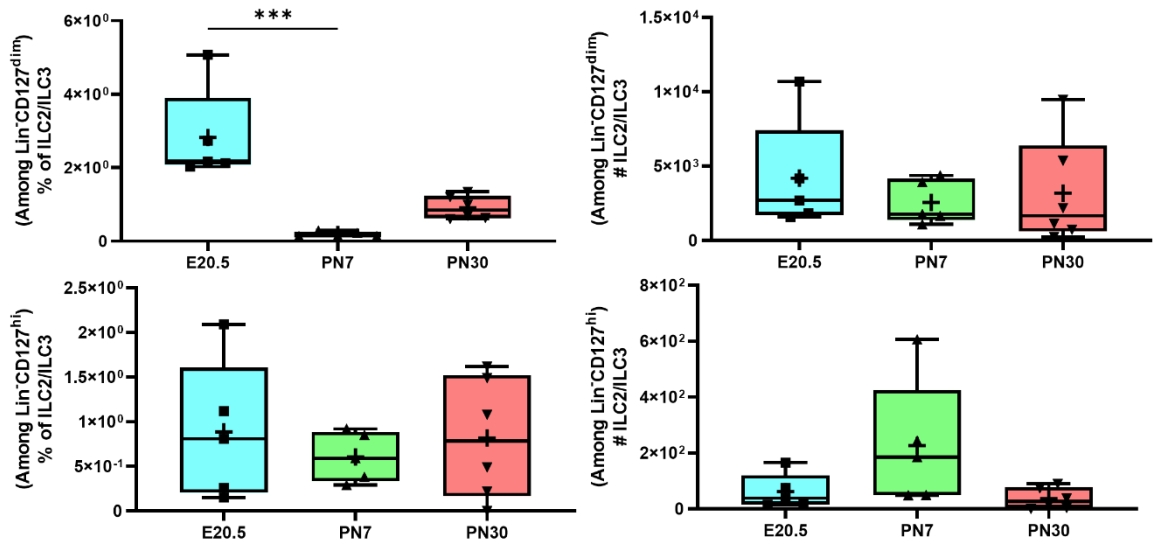
Şekil 4.49. Timik ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Timik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.50'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC2 frekansı PN7'de hem E20.5 hem de PN30'dan anlamlı olarak daha azdı.



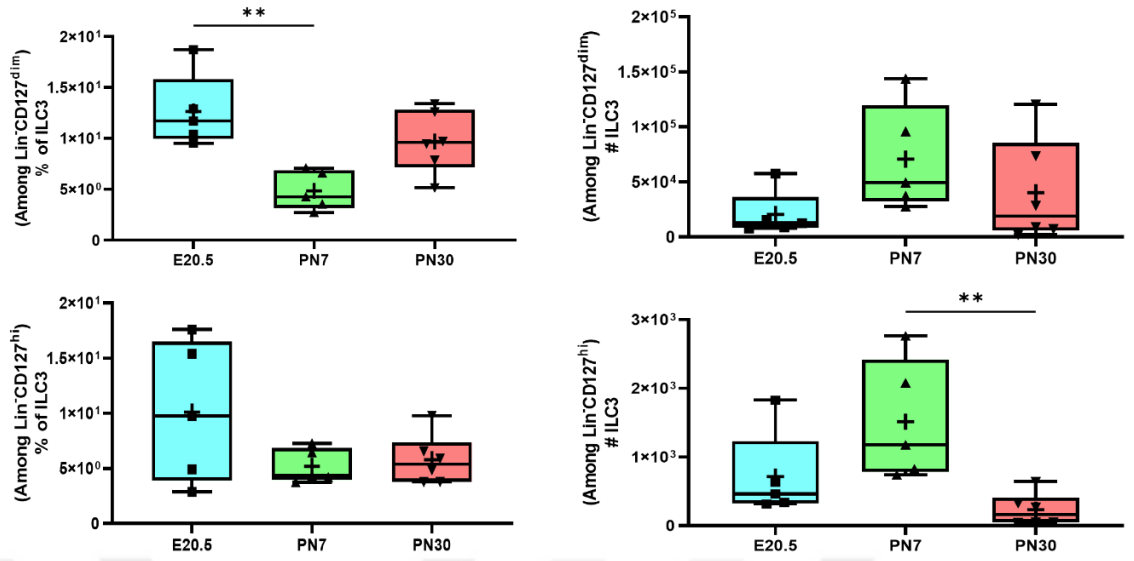
Şekil 4.50. Timik ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

Timik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.51'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC2/ILC3 frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı.



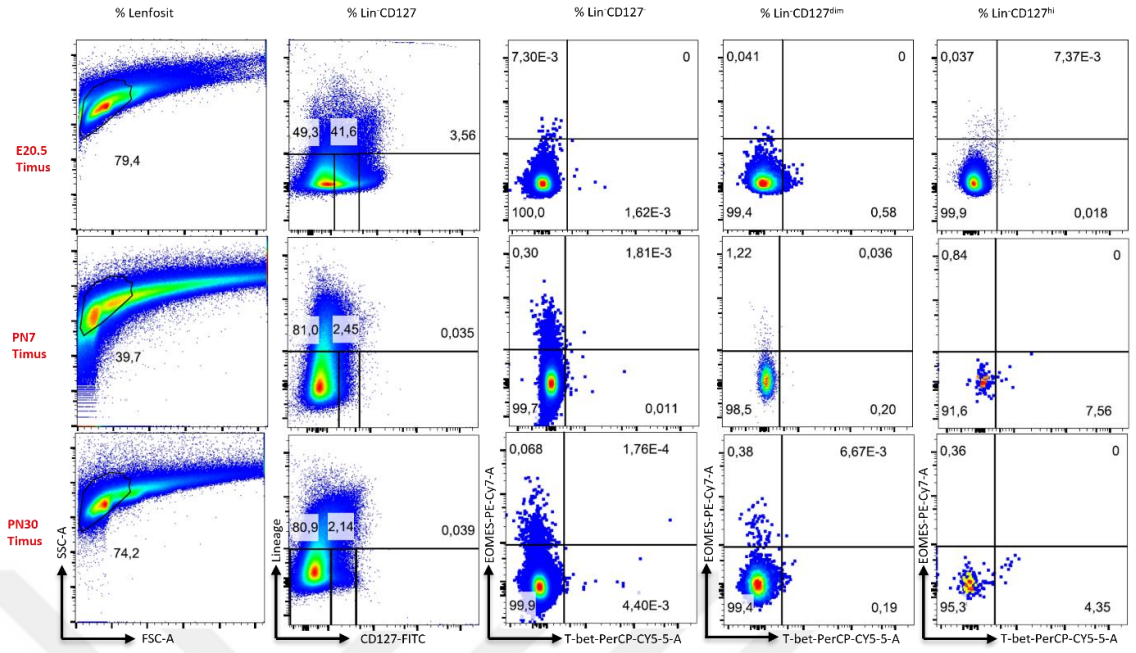
Şekil 4.51. Timik ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (***: $p \leq 0.001$).

Timik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.52'de verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC3 frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC3 sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı.



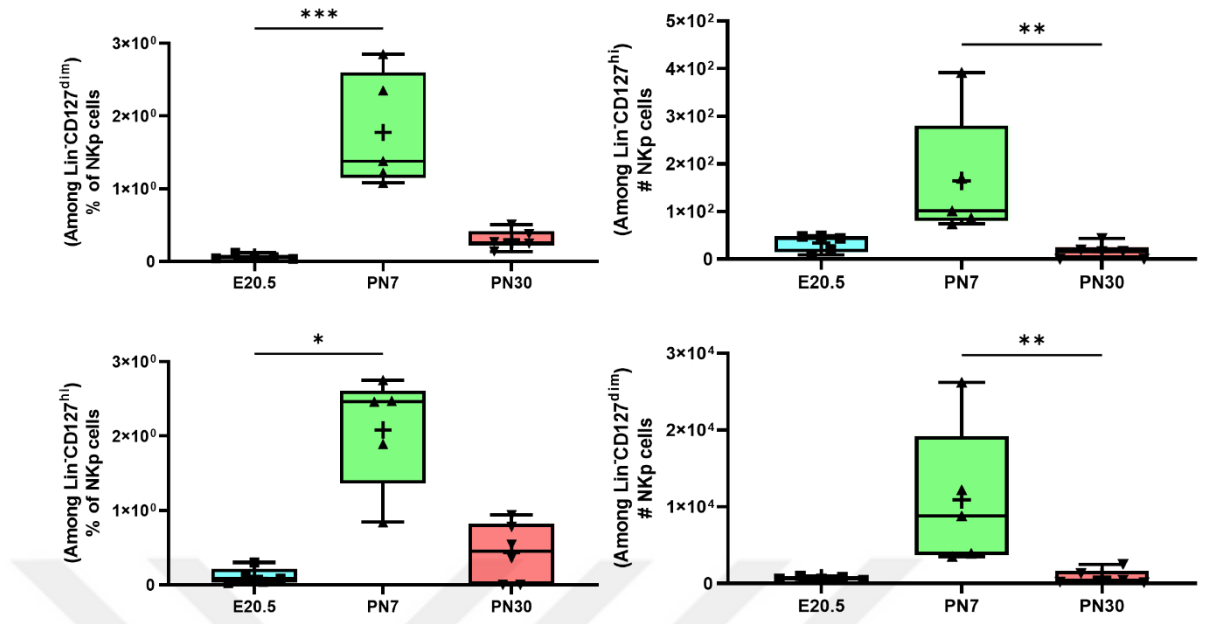
Şekil 4.52. Timik ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalama, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (**: $p \leq 0.01$).

Farklı zaman noktalarına ait timuslardan elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.53'te gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



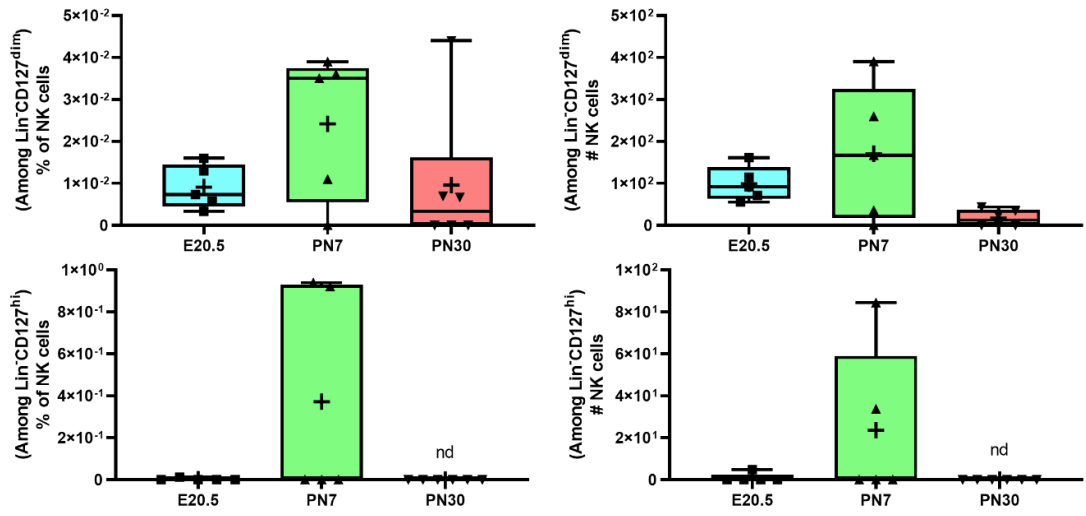
Şekil 4.53. Timik NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Timik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.54'te verildi. İncelenen her iki kapılamada NKp hücre frekansı E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı artış gösterdi. Yine her iki kapılamada NKp hücre sayısı PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma göstermekteydi.



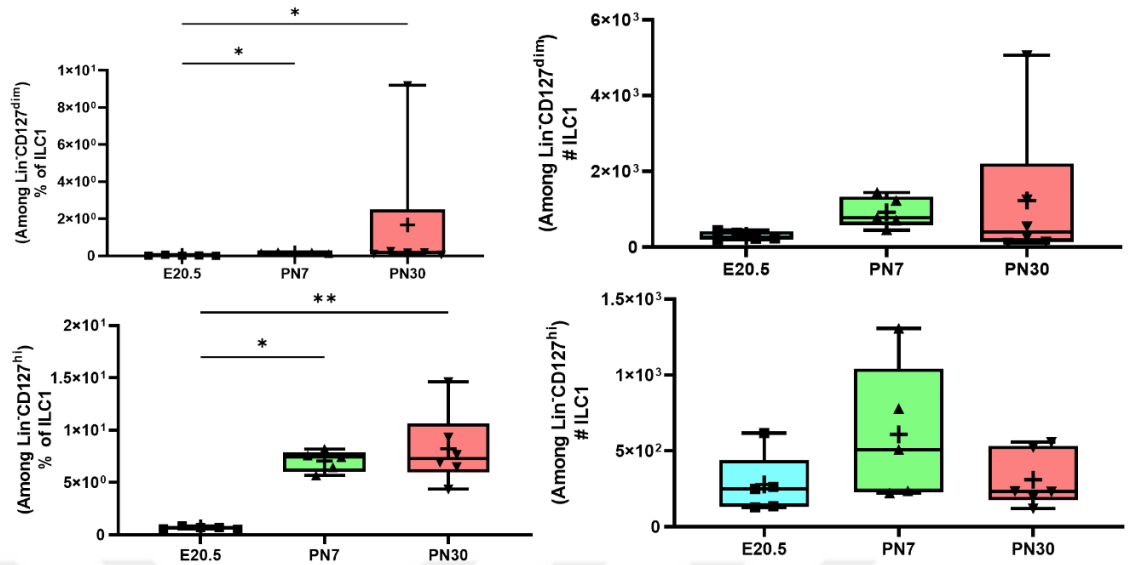
Şekil 4.54. Timik NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

Timik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.55'te verildi. İncelenen kapılamalarda frekans ve hücre sayısı açısından anlamlı farklılıklar saptanmadı. Ayrıca PN30'a ait Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında timik NK hücresi saptanmadı.



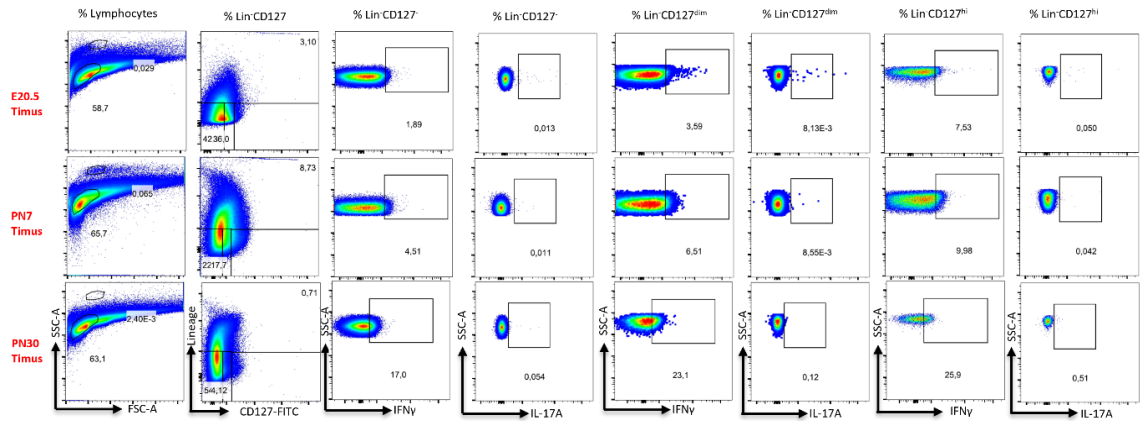
Şekil 4.55. Timik NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını, "nd" frekans veya hücre tespit edilmediğini belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır.

Timik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.56'da verildi. Lin⁻CD127^{dim} ve Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında E20.5'te ILC1 frekansı PN7 ve PN30'dan anlamlı olarak daha azdı.



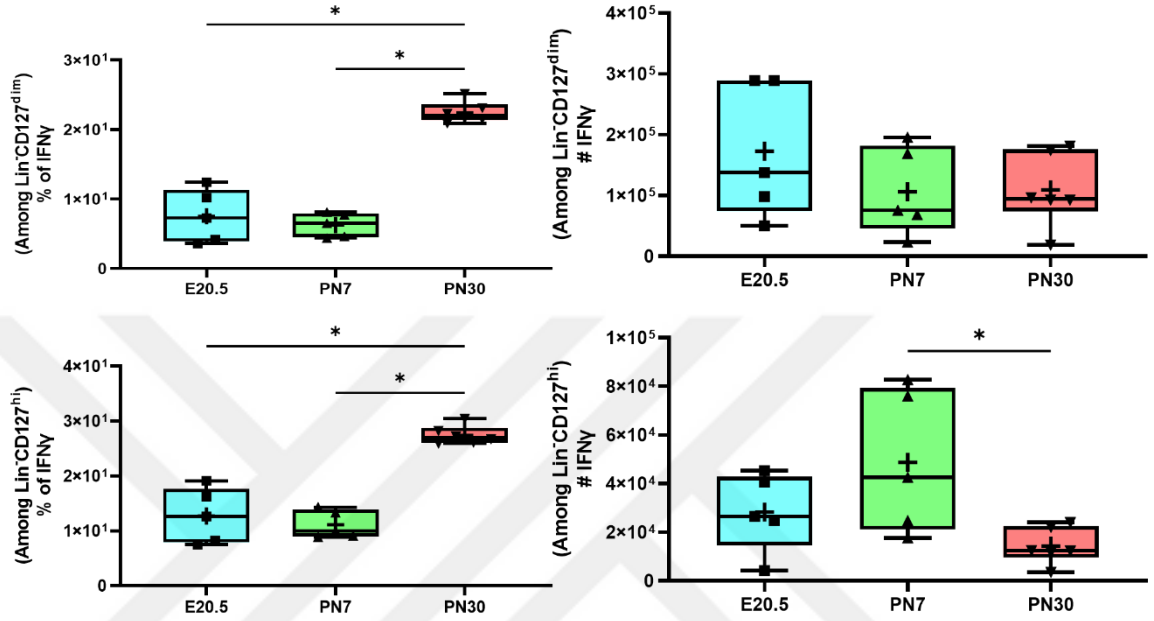
Şekil 4.56. Timik ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

Timus ILC'lerinin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda sitokin üretim kapasitlerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri Şekil 4.57'de verildi.



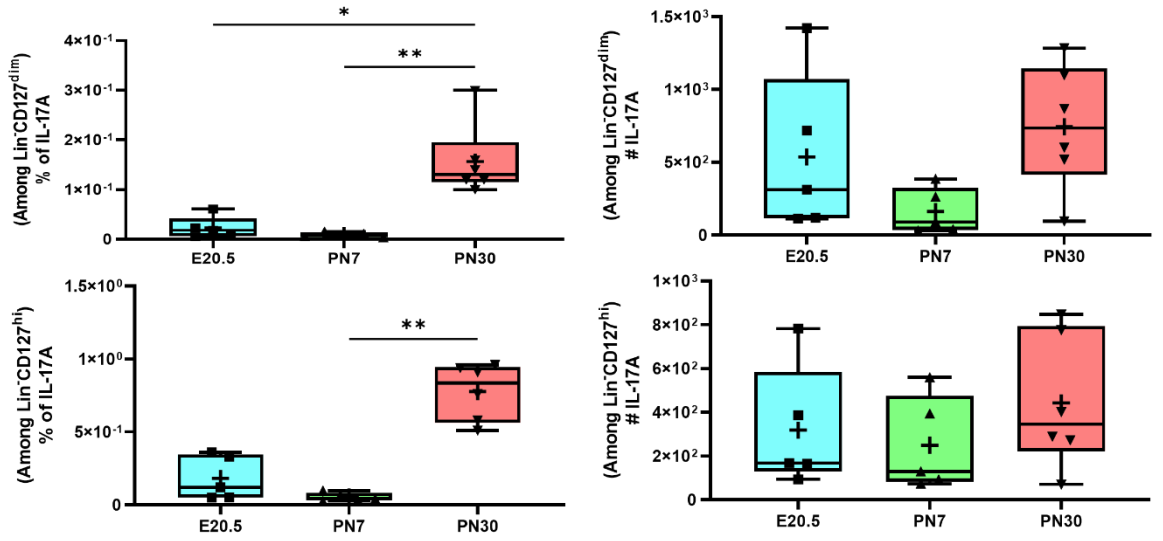
Şekil 4.57. Timus ILC'lerinin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitosin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-A, IFN γ -APC-A.

Timik ILC'lerin IFN γ üretim frekansı ile IFN γ üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.58'de verildi. İncelenen kapılamalarda IFN γ üreten ILC frekansı PN30'da PN7 ve E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında IFN γ üreten ILC sayısı PN30'da PN7'den anlamlı olarak daha azdı.



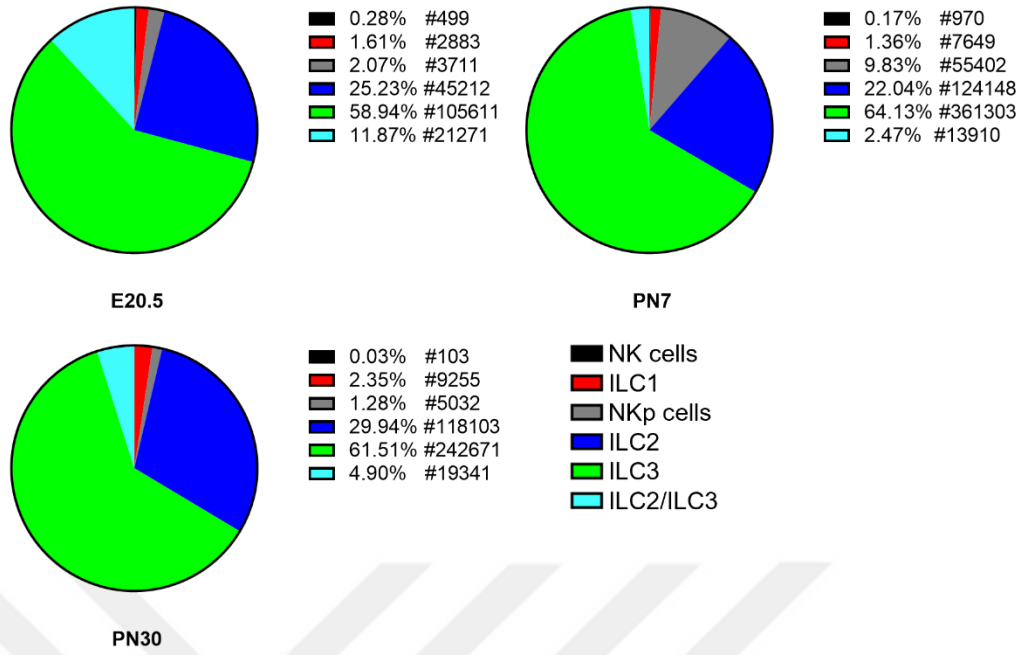
Şekil 4.58. IFN γ üreten timik ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$).

Timik ILC'lerin IL-17A üretim frekansı ile IL-17A üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.59'da verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında IL-17A üreten ILC frekansı PN30'da E20.5 ve PN7'ye anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında IL-17A üreten ILC frekansı PN30'da PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı.



Şekil 4.59. IL-17A üreten timik ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Kutu grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (PN30 için n=6, diğer zaman noktaları için n=5). Kutu grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "+" ortalamayı, "%" hücre frekansını, "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal Wallis-H testi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar post-hoc Dunn testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

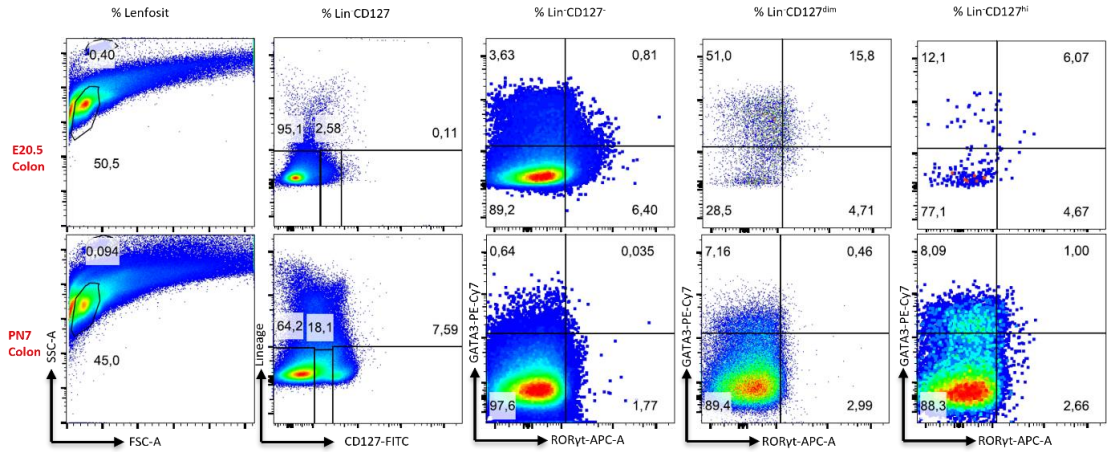
Farklı zaman noktalarında timustaki ILC alt tiplerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdelerini ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri Şekil 4.60'ta verildi. İncelenen tüm zaman noktalarında ILC3'ler timus'un baskın ILC alt tipiydi. ILC3'lerden sonra en fazla oranda saptanan ILC alt tipi ILC2'lerdi.



Şekil 4.60. Timusta tespit edilen ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri. Pasta grafikleri farklı zaman noktalarındaki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC'ler içerisinde kapladığı yüzdelere baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiklerindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Her pasta grafiğinde saptanan hücre sayısı, kendine ait zaman noktasındaki tüm kuyucuklardan gelen toplam hücre sayısını göstermektedir. PN30'da altı kuyucuk, diğer günlerde beş kuyucuk yer almaktadır.

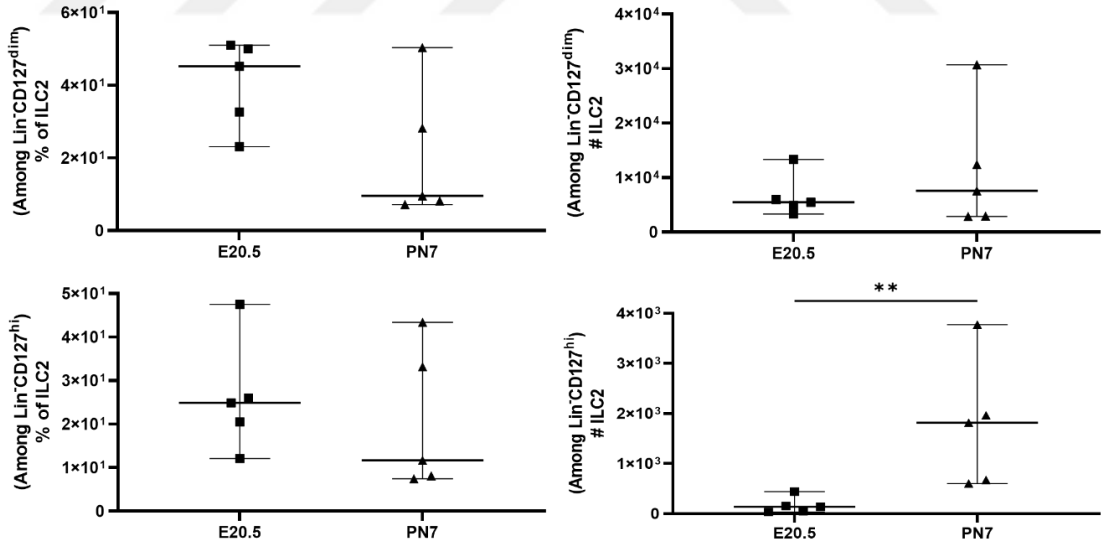
4.6. Colon ILC'lerinin Farklı Zaman Noktalarındaki Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

Farklı zaman noktalarına ait colon'lardan elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Gereç ve Yöntem bölümünde detaylı olarak belirtilen nedenlerden ötürü colon'da ILC'ler sadece E20.5 ve PN7'de incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.61'de gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde colon'a ait ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



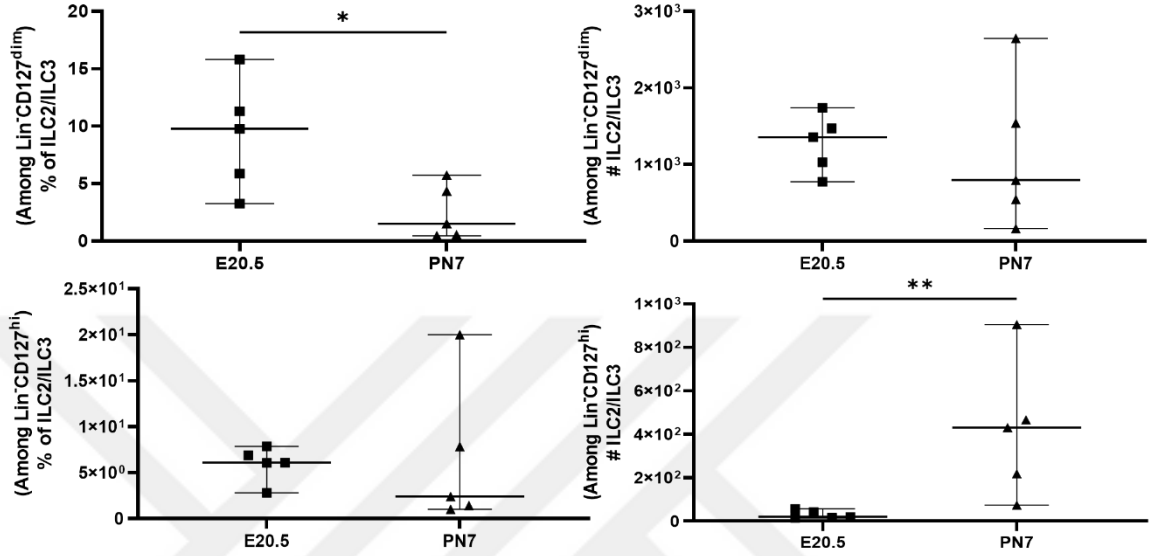
Şekil 4.61. Colon'a ait ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için farklı zaman noktalarında uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Colon'a ait ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.62'de verildi. Lin⁺CD127^{hi} kapılmasındaki ILC2 sayısı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha azdı.



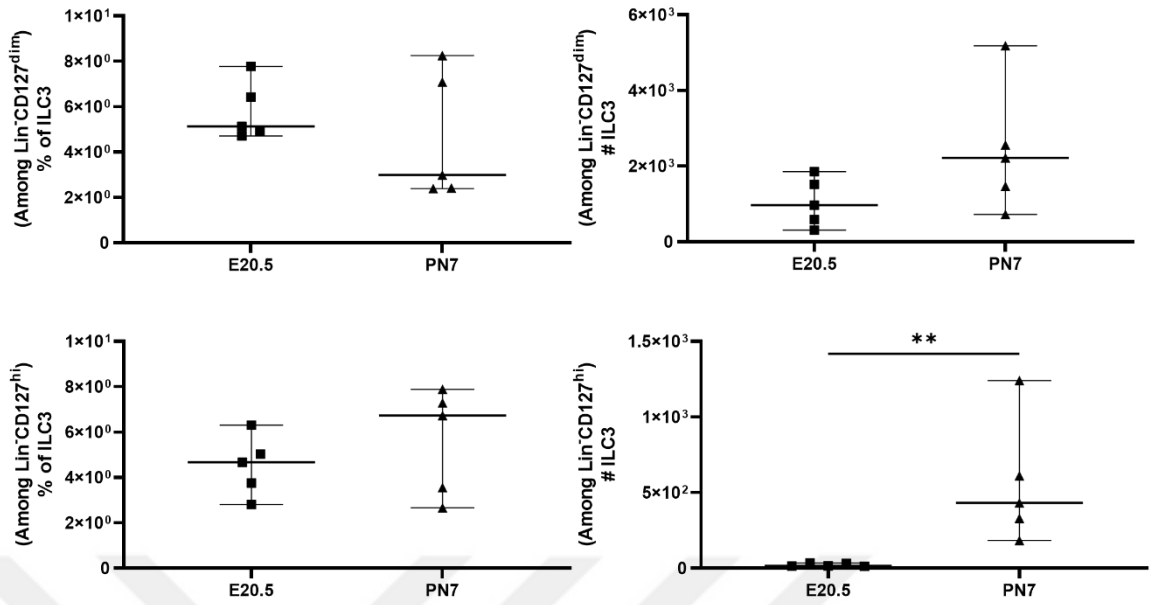
Şekil 4.62. Colon'a ait ILC2'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (**: $p \leq 0.01$).

Colon'a ait ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.63'te verildi. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında ILC2/ILC3 frekansı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC2/ILC3 sayısı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha azdı.



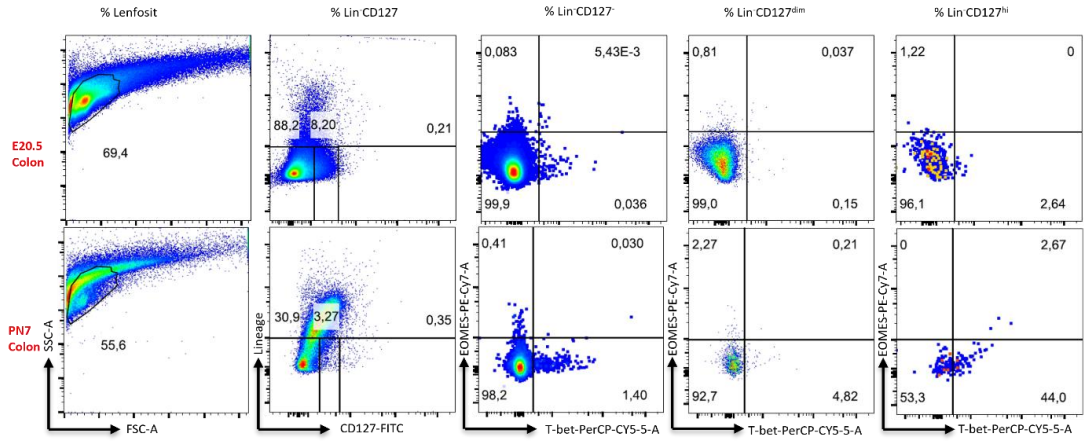
Şekil 4.63. Colon'a ait ILC2/ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

Colon'da tespit edilen ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.64'te verildi. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasındaki ILC3 hücre sayısı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha azdı.



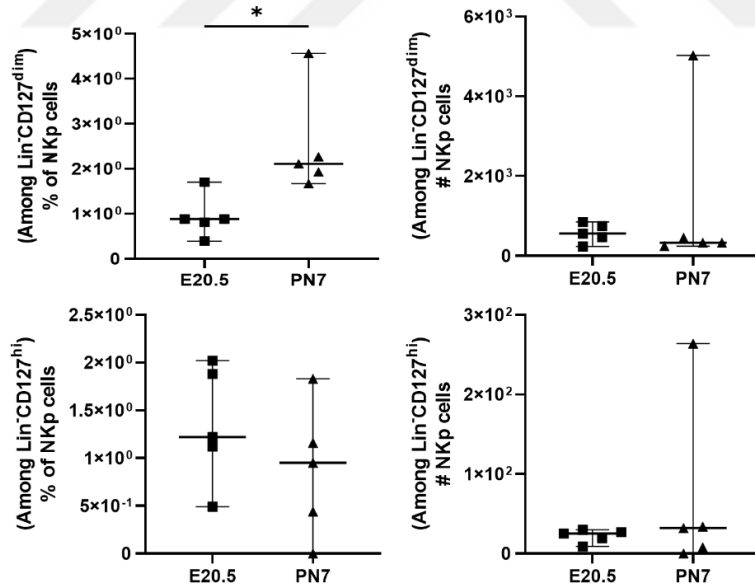
Şekil 4.64. Colon'a ait ILC3'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

E20.5 ve PN7 zaman noktalarından elde edilen colon'a ait lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.65'te gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile farklı zaman noktalarındaki lenfositler içerisinde NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



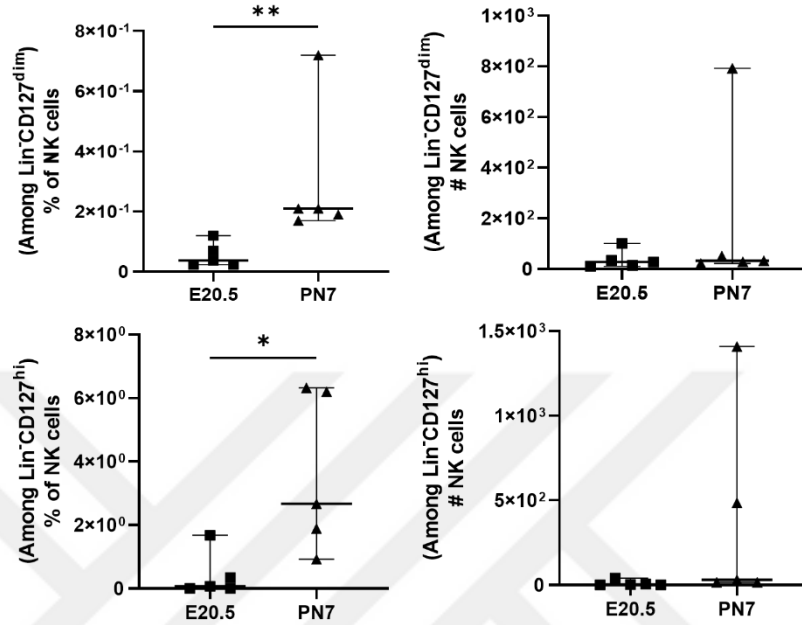
Şekil 4.65. Colon'a ait NKp hücreleri ve NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için E20.5 ve PN7'de uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α .

Colon'a ait NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.66'da verildi. Lin⁺CD127^{dim} kapılmasında NKp hücre frekansı PN7'de E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı.



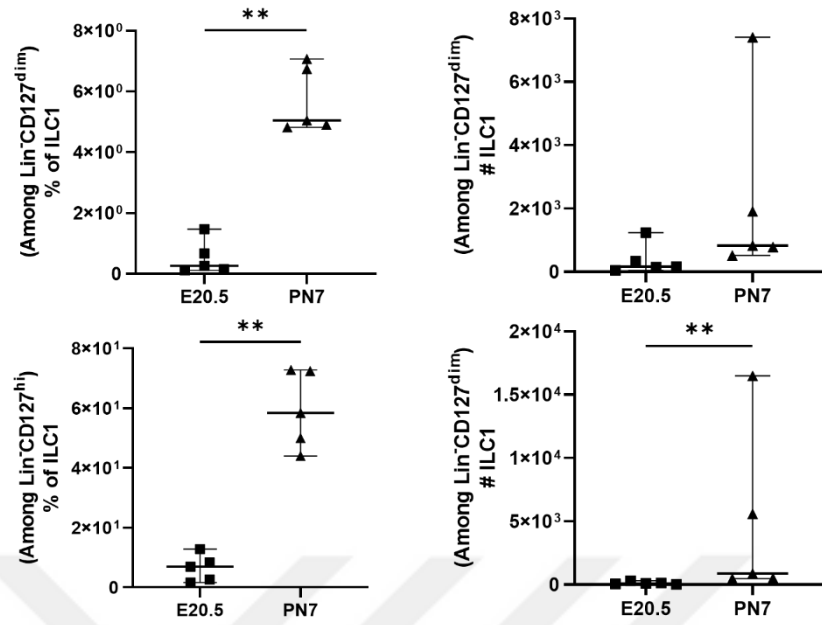
Şekil 4.66. Colon'a ait NKp hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$)

Colon'a ait NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.67'de verildi. Her iki kapılamada NK hücre frekansı, PN7'de E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı.



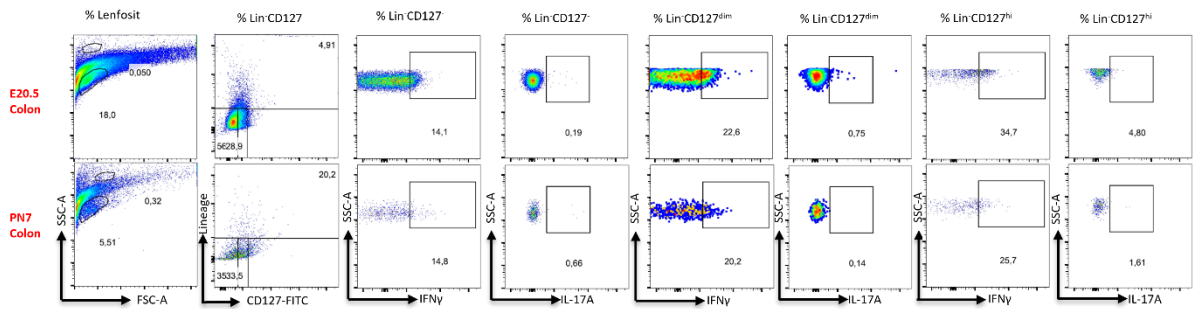
Şekil 4.67. Colon'a ait NK hücrelerinin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

Colon'a ait ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.68'de verildi. İncelenen kapılamalarda ILC1 frekansı PN7'de E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında ILC1 sayısı PN7'de E20.5'ten anlamlı olarak daha fazlaydı.



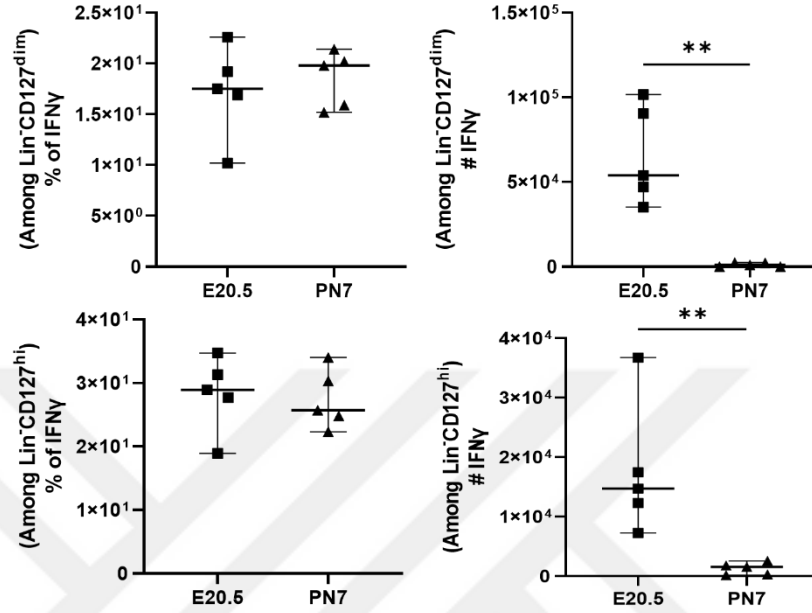
Şekil 4.68. Colon'a ait ILC1'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (**: $p \leq 0.01$)

Colon ILC'lerinin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda sitokin üretim kapasitlerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri Şekil 4.69'da verildi.



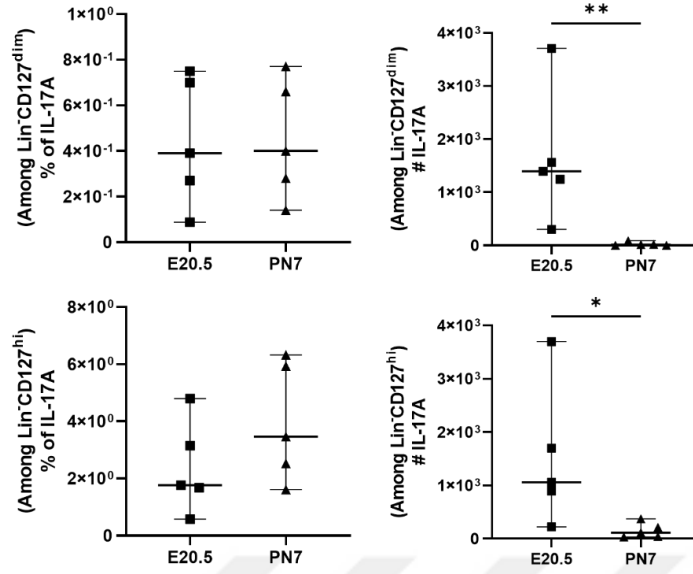
Şekil 4.69. Colon'a ait ILC'lerin sitokin üretim kapasitesini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejileri. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Her zaman noktasına ait grafik satırı, bağımsız beş-altı deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitosin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-5-A, IFN γ -APC-A.

Colon'a ait ILC'lerin IFN γ üretim frekansı ile IFN γ üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.70'te verildi. İncelenen kapılamalarda IFN γ üreten ILC sayısı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı.



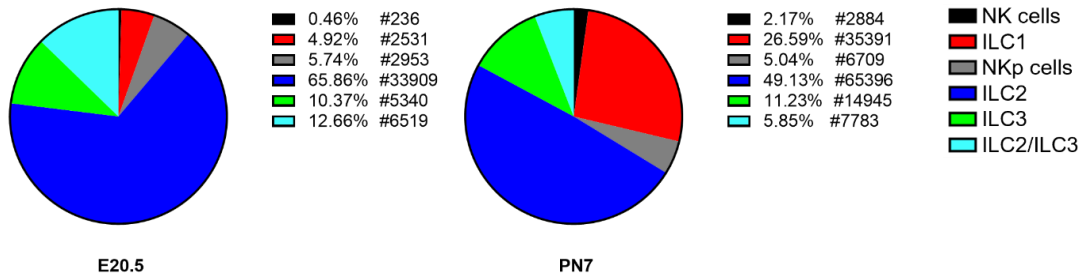
Şekil 4.70. IFN γ üreten colon'a ait ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (**: $p \leq 0.01$).

Colon'a ait ILC'lerin IL-17A üretim frekansı ile IL-17A üreten hücre sayılarına ilişkin analiz sonuçları Şekil 4.71'de verildi. İncelenen kapılamalarda IL-17A üreten ILC sayısı E20.5'te PN7'den anlamlı olarak daha fazlaydı.



Şekil 4.71. IL-17A üreten colon'a ait ILC'lerin frekans ve mutlak sayılarına ilişkin analiz sonuçları. Saçılım grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Saçılım grafiği, minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Normal dağılım göstermeyen verilere two-tailed Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık siyah yıldız işaretleriyle gösterilmiştir (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$).

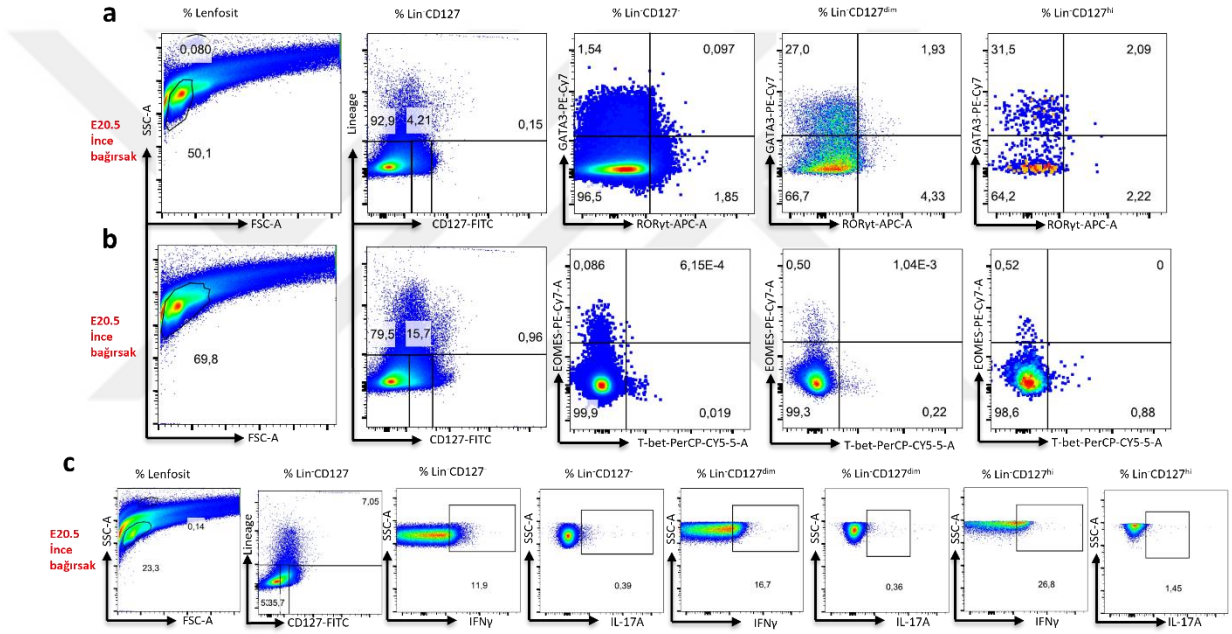
Farklı zaman noktalarında colon'a ait ILC alt tiplerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdeleri ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri Şekil 4.72'de verildi. E20.5 ve PN7'ye ait colon'da ILC2'ler baskın ILC alt tipiydi. PN7'de ILC1'lerin total ILC'ler arasındaki oranı yaklaşık 5 kat artış göstermekteydi. ILC2 ve NKp hücre oranında prenatal ve postnatal dönemde benzerlik söz konusuydu.



Şekil 4.72. Colon'daki ILC alt tiplerinin total ILC'ler arasındaki yüzde ve hücre sayılarını gösteren pasta grafikleri. Pasta grafikleri farklı zaman noktalarındaki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC'ler içerisinde kapladığı yüzdelere baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiklerindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Her pasta grafiğinde saptanan hücre sayısı, kendine ait zaman noktasındaki tüm kuyucuklardan gelen toplam hücre sayısını göstermektedir. E20.5 ve PN7 gruplarında beşer kuyucuk yer almaktadır.

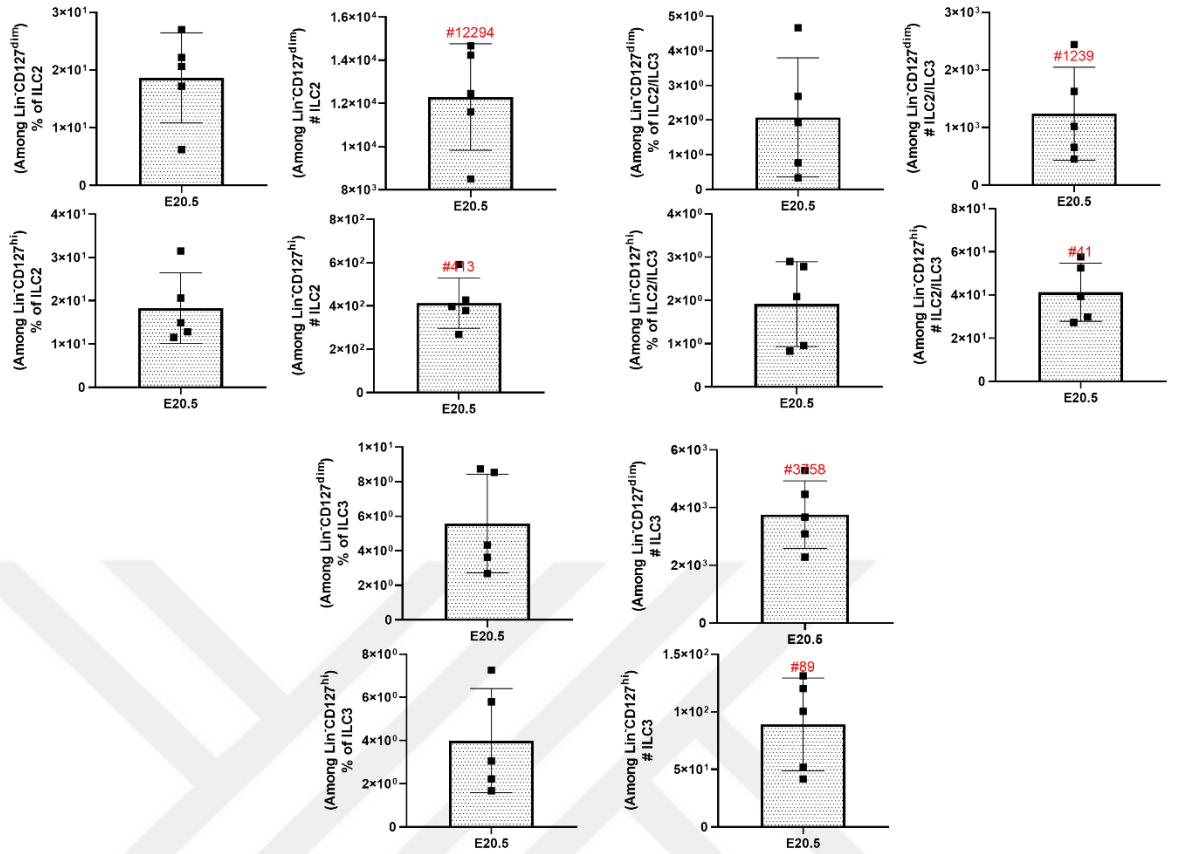
4.7. İnce Bağırsak ILC'lerinin E20.5'te Frekans ve Mutlak Sayılarına İlişkin Bulgular

E20.5'e ait ince bağırsaklardan elde edilen lenfositler, gereç ve yöntem bölümünde belirtilen deneylere tabi tutuldu. Gereç ve Yöntem bölümünde detaylı olarak belirtilen nedenlerden ötürü ince bağırsakta ILC'ler sadece E20.5'te incelendi. Boyama prosedürlerinden sonra FlowJo Tristar adlı flow sitometri analiz programında Şekil 4.73'te gösterilen kapılama stratejileri uygulandı. Bu kapılama stratejileri ile E20.5'e ait ince bağırsaktaki lenfositler içerisinde ILC2, ILC2/ILC3, ILC3, NKp hücreleri, NK hücreleri ile ILC1'lerin frekans ve mutlak sayıları belirlendi.



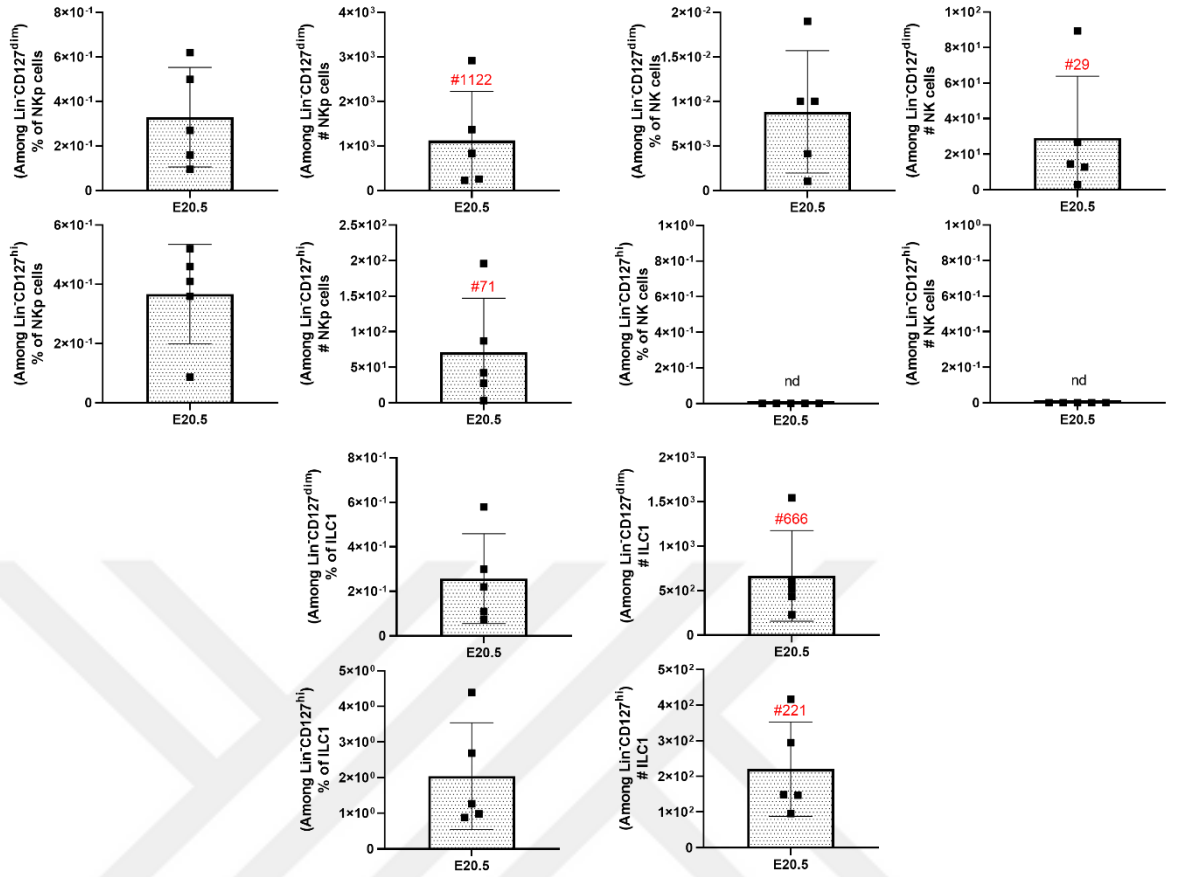
Şekil 4.73. İnce bağırsağa ait ILC2, ILC2/ILC3, ILC3, NKp hücreleri, NK hücreleri ile ILC1'lerin lenfositler içerisinde tespit edilmesi için uygulanan kapılama stratejileri. **a.** ILC2, ILC2/3 ve ILC3'lerin tespiti için uygulanan kapılama stratejisi. **b.** NKp hücreleri, NK hücreleri ile ILC1'lerin tespiti için uygulanan kapılama stratejisi. **c.** ILC'lerin IFN γ ve IL17-A sitokin üretim kapasitelerini tespit etmek için uygulanan kapılama stratejisi. Kapılama stratejileri canlı hücreleri dahil eden, ölü hücreleri dışlayan prensiple oluşturuldu. Grafik satırı, bağımsız beş deneyi temsil etmektedir. Lin: CD3, Igk, Sırp- α . Sitokin belirteçleri: IL17A-PerCP-Cy5-5-A, IFN γ -APC-A.

İnce bağırsakta tespit edilen ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lere ait tanımlayıcı grafikler Şekil 4.74'te verildi.



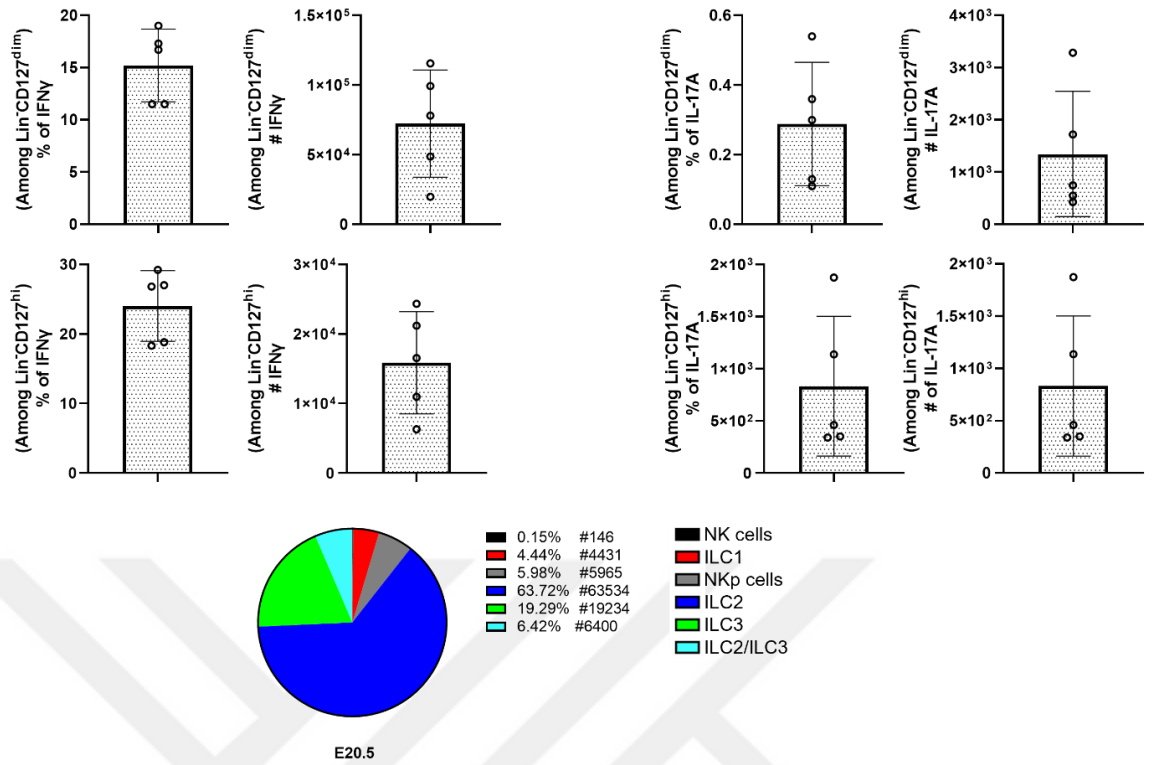
Şekil 4.74. İnce bağırsağa ait E20.5'te tespit edilen ILC2, ILC2/ILC3 ve ILC3'lere ait tanımlayıcı grafikler. Bar grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Bar grafiği minimum-maksimum aralığı ve medyanyı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir.

İnce bağırsakta tespit edilen NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lere ait tanımlayıcı grafikler Şekil 4.75'te verildi.



Şekil 4.75. İnce bağırsağa ait E20.5'te tespit edilen NKp hücreleri, NK hücreleri ve ILC1'lere ait tanımlayıcı grafikler. Bar grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Bar grafiği minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir.

İnce bağırsak ILC'lerinin PMA/ionomycine uyarımı doğrultusunda IFN- γ ve IL17-A sitokin üretim frekansı ile sitokin üreten hücre sayılarına ilişkin tanımlayıcı grafikler ile E20.5'te ILC alt tiplerinin oranlarını gösteren pasta grafiği Şekil 4.76'da verildi.

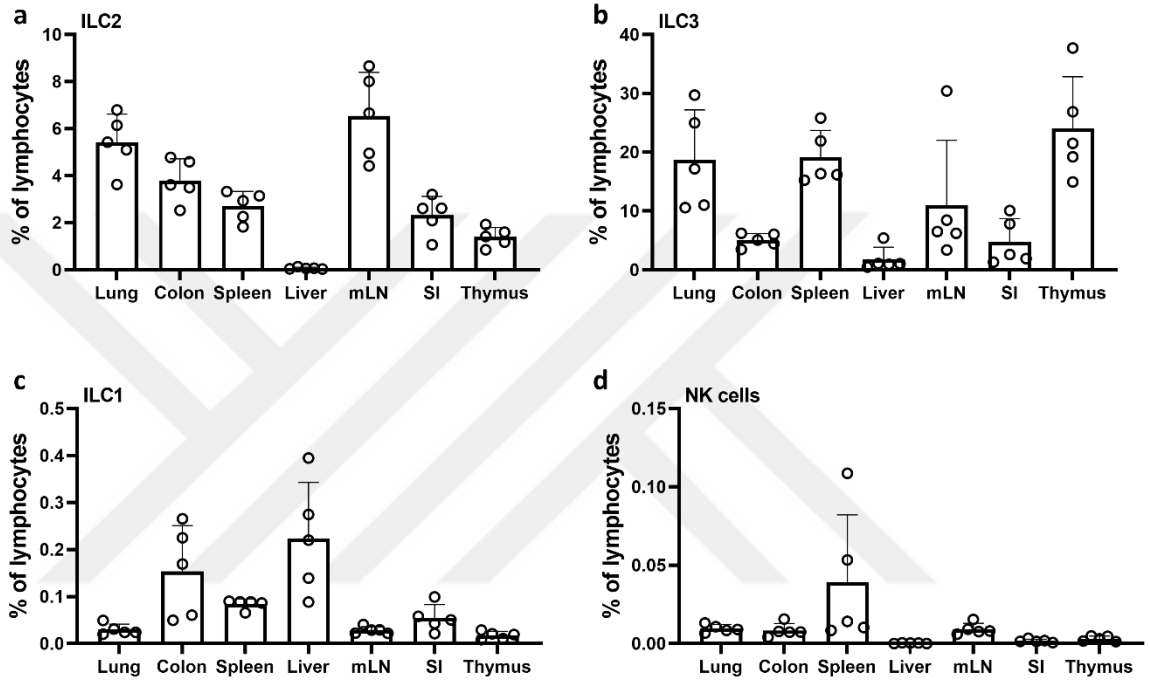


Şekil 4.76. İnce bağırsak ILC'lerinin sitokin üretim kapasiteleri ile ILC alt tiplerinin oranlarını gösteren tanımlayıcı grafikler. Bar grafiğinde, her bir sembol bir kuyucuğu temsil etmektedir (n=5). Bar grafiği minimum-maksimum aralığı ve medyanı gösterir. "%" hücre frekansını ve "#" hücre sayısını belirtir. Pasta grafiği E20.5'teki tüm kuyucuklarda tespit edilen ILC alt tiplerinin toplam sayılarının toplam ILC'ler içerisinde kapladığı yüzdelere baz alınarak oluşturulmuştur. Pasta grafiğindeki her renk farklı ILC alt tipini temsil etmektedir. Pasta grafiğinde gösterilen hücre sayısı, E20.5'te elde edilen beş kuyucuktaki toplam hücre sayısını ifade eder.

4.8. ILC'lerin Lenfosit Yüzdesi Olarak Farklı Dokularda ve Günlerde Dağılımı

E20.5'e ait embriyolardan elde edilen akciğer, colon, dalak, karaciğer, mLN, ince bağırsak ve timus'ta saptanan ILC'lerin tüm lenfositlerin % kaçını oluşturduğuna dair (% of lymphocytes) grafik Şekil 4.77'de verildi. ILC2'lerin total lenfositlere oran yüzdesi incelenen dokular arasında en fazla mLN'de görüldü. ILC2'ler mLN'de tüm lenfositlerin %6.5'ini oluşturmaktaydı. ILC2'lerin tüm lenfositlere oran yüzdesi; akciğerde %5.4, colon'da %3.8, dalakta %2.7, ince bağırsakta %2.3, timus'ta %1.3 ve karaciğerde %0.07 şeklindeydi (Şekil 4.77a). ILC3'lerin total lenfositlere oran yüzdesi incelenen dokular arasında en fazla %24 ile timusta saptandı. Bu yüzdesel oranı timustan sonra sırasıyla dalak (%19.1), akciğer (%18.7), mLN (%11), colon (%5.04), ince bağırsak (%4.7) ve son olarak karaciğer (%1.8) takip etti (Şekil 4. 77b). ILC1'lerin

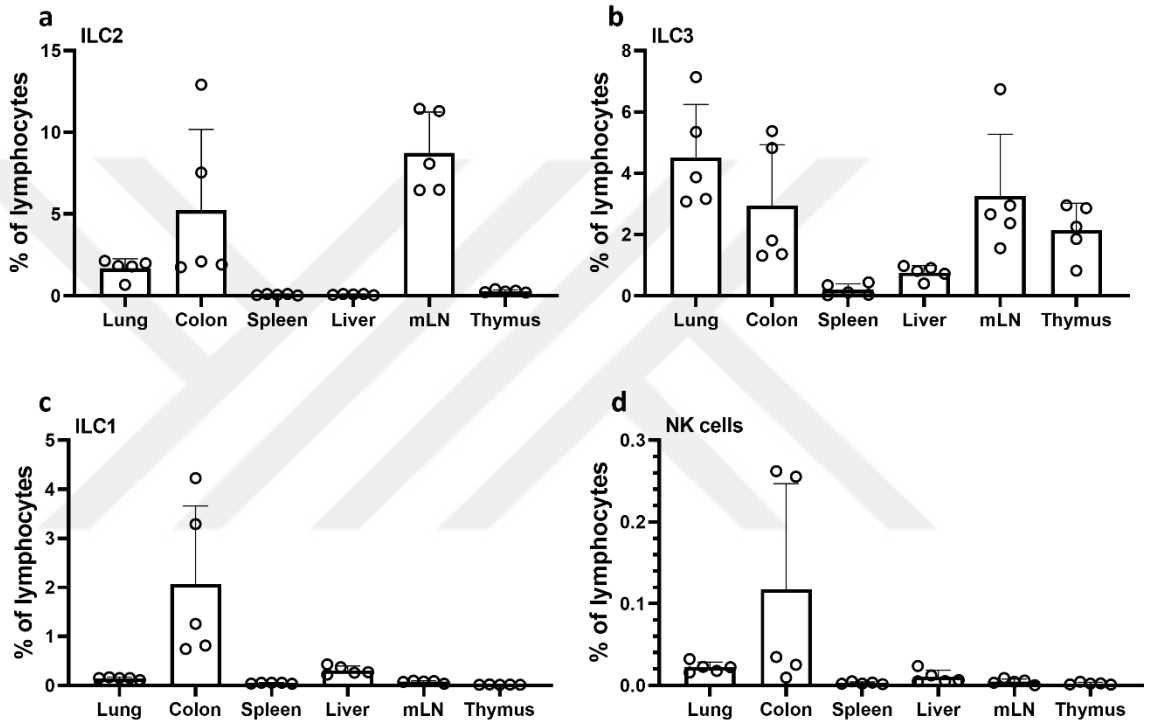
total lenfositlere oran yüzdesi incelenen dokular arasında en fazla karaciğerde (%0.22) saptandı. Bu organı sırasıyla colon (%0.15), dalak (%0.08), ince bağırsak (%0.05), akciğer (%0.03), mLN (%0.028) ve son olarak timus (%0.017) takip etti (Şekil 4. 77c). NK hücrelerinin tüm lenfositlere oran yüzdesi en fazla dalakta (%0.04) saptandı. Dalağı sırasıyla akciğer (%0.0096), mLN (%0.0092), colon (%0.0084), timus (%0.0031), ince bağırsak (%0.0018) ve son olarak karaciğer (%0.0002) takip etti (Şekil 4. 77d).



Şekil 4.77. E20.5 embriyolarından elde edilen organlarda ILC alt tiplerinin total lenfositlere yüzdesel oranları. **a.** Organlarda tespit edilen ILC2'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **b.** Organlarda tespit edilen ILC3'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **c.** Organlarda tespit edilen ILC1'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **d.** Organlarda tespit edilen NK hücrelerinin total lenfositlere yüzdesel oranı. Her sembol bir numuneyi ifade etmektedir (n=6). Yüzdelere total lenfosit popülasyonunun ne kadarının ILC'ler tarafından oluşturduğunu göstermektedir. Grafik tasarımı GraphPad Prism 9.0 ile yapıldı.

PN7'ye ait yavrulardan elde edilen akciğer, colon, dalak, karaciğer, mLN ve timus'ta saptanan ILC'lerin tüm lenfositlerin % kaçını oluşturduğuna dair grafik Şekil 4.78'de verildi. ILC2'lerin total lenfositlere oranı en fazla mLN'de (%8.7) saptandı. mLN'yi sırasıyla colon (%5.2), akciğer (%1.6), timus (%0.28), karaciğer (%0.08) ve son olarak dalak (%0.07) takip etti (Şekil 4.78a). ILC3'lerin total lenfositlere oran yüzdesi incelenen dokular arasında en fazla akciğerde (%4.5) saptandı. Akciğeri sırasıyla mLN

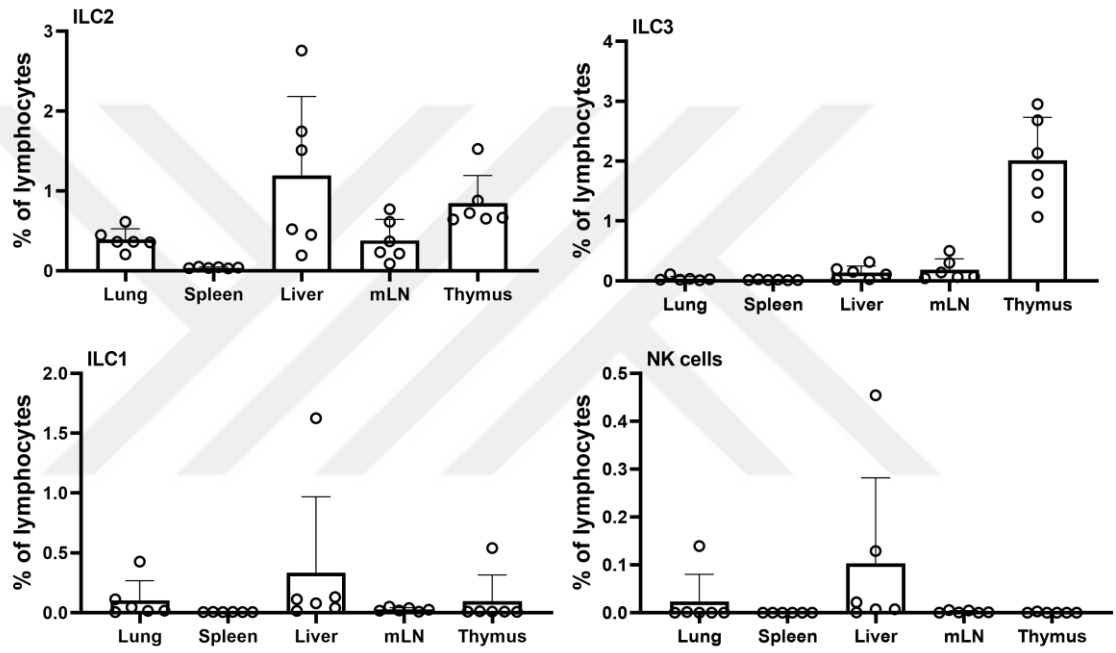
(%3.2), colon (%2.9), timus (%2.1), karaciğer (%0.76) ve son olarak dalak (%0.19) takip etti (Şekil 4. 78b). ILC1'lerin total lenfositlere oran yüzdesi incelenen dokular arasında en fazla colon'da (%2) saptandı. Colon'u sırasıyla karaciğer (%0.31), akciğer (%0.14), mLN (%0.07), dalak (%0.04) ve son olarak timus (%0.01) takip etti (Şekil 4.78c). NK hücrelerinin total lenfositlere oran yüzdesi incelenen dokular arasında en fazla colon'da (%0.11) saptandı. Colon'u sırasıyla akciğer (%0.022), karaciğer (%0.01), mLN (%0.004), dalak (%0.003) ve son olarak timus (%0.002) takip etti (Şekil 4.78d).



Şekil 4.78. PN7 yavrulardan elde edilen organlarda ILC alt tiplerinin total lenfositlere yüzdesel oranları. **a.** Organlarda tespit edilen ILC2'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **b.** Organlarda tespit edilen ILC3'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **c.** Organlarda tespit edilen ILC1'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **d.** Organlarda tespit edilen NK hücrelerinin total lenfositlere yüzdesel oranı. Her sembol bir numuneyi ifade etmektedir (n=5). Yüzdelere total lenfosit popülasyonunun ne kadarının ILC'ler tarafından oluşturduğunu göstermektedir. Grafik tasarımı GraphPad Prism 9.0 ile yapıldı.

PN30'a ait yavrulardan elde edilen akciğer, colon, dalak, karaciğer, mLN, timus ve ince bağırsakta (NK hücreleri ile ILC1'ler elde edilemedi) saptanan ILC'lerin tüm lenfositlerin % kaçını oluşturduğuna dair grafik Şekil 4.79'da verildi. ILC2'lerin total lenfositlere oranı en fazla ince bağırsakta (%4) saptandı. İnce bağırsak sırasıyla colon (%2), karaciğer (%1.1), timus (%0.84), akciğer (%0.39), karaciğer (%0.38) ve son

olarak dalak (%0.03) takip etti (Şekil 4.79a). ILC3'lerin total lenfositlere oranı en fazla timusta (%2) saptandı. Timusu sırasıyla ince bağırsaklar (%1), colon (%0.92), mLN (%0.18), karaciğer (%0.13), akciğer (%0.03) ve son olarak dalak (%0.01) takip etti (Şekil 4.79b). ILC1'lerin total lenfositlere oranı en fazla karaciğerde (%0.33) saptandı. Karaciğeri sırasıyla akciğer (%0.1), timus (%0.09), mLN (0.02) ve son olarak dalak (%0.006) takip etti (Şekil 4.79c). NK hücrelerinin total lenfositlere oranı en fazla karaciğerde (%0.1) saptandı. Karaciğeri sırasıyla dalak (%0.09), akciğer (%0.02), mLN (%0.002) ve son olarak timus (%0.0005) takip etti (Şekil 4.79d).



Şekil 4.79. PN30 yavrulardan elde edilen organlarda ILC alt tiplerinin total lenfositlere yüzdesel oranları. **a.** Organlarda tespit edilen ILC2'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **b.** Organlarda tespit edilen ILC3'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **c.** Organlarda tespit edilen ILC1'lerin total lenfositlere yüzdesel oranı. **d.** Organlarda tespit edilen NK hücrelerinin total lenfositlere yüzdesel oranı. Her sembol bir numuneyi ifade etmektedir (n=6). Yüzdelar total lenfosit popülasyonunun ne kadarının ILC'ler tarafından oluşturduğunu göstermektedir. Grafik tasarımı GraphPad Prism 9.0 ile yapıldı.

5. TARTIŞMA

Yaşamın ilk dönemlerinde adaptif bağışıklık sisteminin tepkileri sınırlıdır. Bu yüzden ILC'ler yetişkinlik dönemine göre yaşamın ilk dönemlerinde daha kritik role sahiptir (Chen ve ark., 2022). Bu çalışmada sıçanlarda prenatal ve postnatal organlarda ILC alt tipleri araştırıldı. Farklı gelişim sürelerinde ILC'ler detaylı flow sitometri kapılamalarıyla tespit edildi. Her kapılamada tespit edilen ILC alt tipleri diğer gelişimsel günlerdeki kapılamalarla karşılaştırarak ILC'lerin farklı zaman dilimlerindeki organlarda dağılımları ortaya çıkarıldı. Total ILC sayıları ile ILC alt tiplerinin sayıları her organ için ayrı ayrı tespit edilerek ILC'lerin organlardaki baskınlıkları saptandı. ILC'lerin total lenfositler içerisindeki yüzdesel oranları her organ için ayrı ayrı ortaya konuldu. PMA/ionomycine uyarımı ile sıçan ILC'lerinin sitokin üretim kapasiteleri gösterildi. Daha önce sıçanlarda rapor edilmeyen hücreler saptandı. Bu hücrelerin farklı zaman dilimlerinde frekans ve sayılarında meydana gelen değişiklikler sunuldu.

Karaciğer hematopoez sürecinde önemli rol oynar. YS'de kan adacıkları içerisinde primitif dalgalanmalar ile kan hücrelerinin oluşumu başlar. Pluripotent (başka hücrelere farklılaşma) ve yenilenme özelliğine sahip olmayan bu hücrelerin öncelikli görevi doku oksijenlenmesini sağlamaktır. Hematopoez dalgası YS'den karaciğere ve son olarak kemik iliğine göç eden hücrelerle kemik iliğinde kalıcı hale gelir (Jagannathan-Bogdan ve Zon, 2013). Dolayısıyla karaciğer hematopoez'in fetal dönemde vazgeçilmez bir organı olarak yerini korumaktadır. İnsanlarda karaciğer günde ~2000 litreden daha fazla kan almaktadır. Bu kanın ~%80'i portal ven aracılığıyla gastrointestinal sistemden gelir. Dolayısıyla her gün milyonlarca antijen bağırsaklardan karaciğere giderek karaciğerin antijenlere sürekli maruz kalmasına sebep olur (Mikulak ve ark., 2019). Buna rağmen karaciğer inflamasyon engelleyici mekanizmaları ile benzersiz bir immünolojik ortama sahiptir (Shi ve ark., 2011). Aynı zamanda karaciğer, metabolize edilen zararsız antijenlere karşı bağışıklık tepkilerini önlemek için tolerojenik bir ortam oluşturur. Karaciğer diğer periferik organlarla kıyaslandığında; geleneksel ve geleneksel ol

antijen sunan hücrelere ait benzersiz popülasyonların aracılık ettiği primer immün indüksiyon bölgesidir (Ochel ve ark., 2019).

İnsan fetal karaciğerinde ILC'leri tespit etmeye koyulan araştırmacılar, gebeliğin 6.-10. haftalarına ait insan fetal karaciğerinde ILC1, ILC2 ve ILC3'ün alt tipi olan NKp44⁺ILC'nin tespit edilmediğini bildirilmiştir. Bahsedilen çalışmada gebeliğin 15. haftasından itibaren ILC3 alt tipi olan NKp-44 ILC3'ler fetal karaciğerde tespit edilmiştir. Yetişkin karaciğerindeyse tüm ILC'lerin tespit edildiği yine aynı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Forkel ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, insanlarda gebeliğin 8.-12. haftalarında elde edilen fetal karaciğerde ILC1, ILC2 ve ILC3'ün bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada gebeliğin 8.-12. haftaları arasında fetal karaciğerde ILC3'lerin baskın olduğunu saptanmış, ILC2'lerin ILC1'lerden daha az yüzdelerde karaciğerde yer edindiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2021). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada araştırmacılar E14.5'e ait fare karaciğerinde ILC1'leri çok düşük sayılarda tespit ettiklerini bildirmiştir. Bu çalışmada fetal karaciğere ait ILC1'lerin sayısı E16.5'te 10⁴, E18.5'te 2x10⁴, PN1'de ~7x10⁴, PN3'te ise ~2x10⁵ olarak tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada araştırmacılar geleneksel NK hücrelerini E18.5'te hem flow sitometri hem de scRNA-seq analizlerinde saptayamadıklarını belirtmiştir (Sparano ve ark., 2022). 6-8 haftalık farklı tür farelerde yapılan analizlerde karaciğer ILC1'lerinin diğer ILC'lere göre daha zengin frekanslarda olduğu bildirilmiştir (Robinette ve ark., 2015). Farelerde karaciğer ILC1'lerinin karbon tetra klorür (CCL₄) enjeksiyonuna yanıt olarak aktive olduğu, IFN-γ ürettiği ve hepatositleri koruduğu bildirilmiştir (Nabekura ve ark., 2020). Bu da ILC1'lerin akut karaciğer hasarı esnasında dokuda koruyucu roller üstlendiğini göstermektedir. Alkol yüklemesine maruz kalan farelerle yapılan bir çalışmada, NK hücre popülasyonunda apoptoz görülmüş, böylece ILC1'lerin daha baskın olduğu bir karaciğer ortaya çıkmıştır. Bu ortamda bulunan ILC1'lerden üretilen IL-17A sitokini baskılanarak steatozis, inflamasyon ve karaciğer hasarının önemli ölçüde azaltıldığı bildirilmiştir (Cheng ve ark., 2023). Dolayısıyla karaciğerde ILC1 ve NK hücreleri arasında bir dengenin karaciğer homeostazisi için önemli olduğu söylenebilir. Yaş aralığı belirtilmeyen C57BL/6 farelerde, karaciğer ILC1 frekansı CD45⁺ lökositlerin %2'sini oluşturmaktadır (Sadeghalvad ve ark., 2023). 8 ila 20 haftalık yetişkin sıçanlarda yapılan bir çalışmada, karaciğer ILC1'lerinin total lenfositlerin ~%10-20'sini oluşturduğu

gösterilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Yüzde oranları araştırmacılar tarafından net olarak verilmediği için tahmini aralıklar olarak sunulmuştur. Çalışmamızda, karaciğer ILC1'lerinin total lenfositlerin E20.5'te %0.22, PN7'de %0.31 ve son olarak PN30'da %0.33'ünü temsil ettiği saptandı. Çalışmamızda E20.5 ve PN30'da ILC1'lerin lenfositlere yüzdesinin en fazla olduğu organ karaciğerdi (PN7'de colon'da daha yüksek oranda ILC1 bulunmaktaydı). Çalışmamız diğer sıçan çalışması ile ILC1'in karaciğerde lenfosit yüzdesi olarak en fazla görüldüğü organ olarak benzese de yüzdesel veriler arasında 30 katlık bir fark olduğu görülmektedir.

NK hücreleri karaciğerde hepatik sinüzoidler içerisinde endotel hücrelerine yapışık şekilde bulunur. Dokular arasında seyahat edebilmesi (dokuya yerleşik olmaması; bazı tipleri dokuya yerleşik olabilir), inflamasyon görülen dokulara hızlıca ulaşabilmeleri ve tümör hedeflerine sitotoksik etki göstermesi NK hücrelerini diğer ILC'lerden ayırmaktadır. Bu hücrelerin aynı zamanda antijen-spesifik immünolojik hafızaya sahip olduğu bildirilmektedir. Dalaktan alınan NK hücrelerinin karaciğere adaptif transferiyle karaciğer NK hücrelerine fenotipsel ve fonksiyonel olarak benzeyebilmektedir (Shi ve ark., 2011). Bu hücreler insanlarda dolaşım sisteminde bulunan tüm lenfositlerin %5-15'ini oluşturmaktadır. Yine insanlarda karaciğer lenfositlerinin ~%50'sine yakını NK hücreleri oluşturur (Mikulak ve ark., 2019). Bu oran farelerde %5-10 arasında değişmektedir. Başka bir çalışma karaciğerde bulunan NK hücrelerinin tüm lenfositlere oranını insanlarda %25-40, farelerde %10-20 olarak belirtmektedir (Trittel ve ark., 2019). Daha eski bir çalışmada NK hücrelerinin tüm lenfositlerin; insanlarda %20-30, farelerde %25-35 ve sıçanlarda %25-35'ini oluşturduğu belirtilmiştir (Gao ve ark., 2009). Bu çalışmaya atıfta bulunan başka bir çalışmada; insan ve sıçanlarda, farelere göre NK hücrelerinin tüm lenfositlere oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Gao ve Radaeva, 2013). Yaş aralığı belirtilmeyen C57BL/6 fare karaciğerine ait NK hücreleri CD45⁺ lökositlerin %4'ünü oluşturmaktadır (Sadeghalvad ve ark., 2023). 8-20 haftalık sıçanlarda NK hücrelerinin tüm lenfositlere oranı %2-4 olarak gösterilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Bizim çalışmamızda NK hücre frekansının tüm lenfositlere oranı; E20.5 fetal karaciğerde %0.0002, PN7 yavru karaciğerinde %0.01, PN30 yavru karaciğerinde ise %0.1 olarak saptandı. Çalışmamızda NK hücrelerinin tüm lenfositlere oranı E20.5'ten PN30'a kadar ~500 kat artmıştı. Literatürde daha önce yapılan

alışmalar ve çalışmamızın sunduğu veriler ışığında, NK hucrerinin tüm lenfositlere oranının sıçanlarda büyümeyle beraber arttığını söylenebilir.

Fare karaciğerine ait ILC2'ler, IL-13 sinyali ve glukoneogenezin baskılanması yoluyla kan glukoz seviyelerini düzenleyerek glikoz homeostazına katkıda bulunur (Fujimoto ve ark., 2022). Hepatik iskemik reperfüzyon hasarı (IRI) oluşturulan farelerle yapılan yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, karaciğer ILC2'lerinin IL-33 aracılığıyla karaciğer hasarını azalttığı saptanmıştır. Bu alışmada ILC2'lere sahip olmayan ICOS-T veya NSG farelerde IL-33 olsa da IRI'nın engellenmediği gösterilmiştir. İnsanlardan elde edilen ILC2'lerin farelere transferinin IRI'yı engellediği yine bu çalışmada gösterilmiştir. Araştırmacılar hepatik iske mi ve perfüzyon hasarı olan insanlarda ILC2'lerin terapötik amaçlarla kullanılabileceğini önermiştir (Cao ve ark., 2023). 18-60 yaş aralığındaki sağlıklı insanlarda, ILC2'lerin CD45⁺ lenfoid hücrelerin %0.03–0.89'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Gonzalez-Polo ve ark., 2019). Yaş aralığı belirtilmeyen C57BL/6 fare karaciğerine ait ILC2'ler CD45⁺ lökositlerin %0.025'ini oluşturmaktadır (Sadeghalvad ve ark., 2023). 8-20 haftalık sıçanlarda ILC2'lerin karaciğer lenfositlerinin %0-0.5'ini oluşturduğu saptanmıştır (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda karaciğer ILC2'lerinin tüm lenfositlerin E20.5'te %0.07'sini, PN7'de %0.08'ini ve PN30'da %0.38'ini oluşturduğu saptandı. Çalışmamızın PN30 grubunda tespit edilen ILC2'lerin lenfositlere yüzdesi diğer sıçan çalışması ile uyumluydu. ILC2'lerin lenfositlere yüzdesi, çalışmamızda insan yüzdelerine ulaşamasa da yaklaşmaktaydı.

ILC3'lerin karaciğer hastalıklarında önemli rolleri olduğu bildirilmektedir. Hepatit-B virüsü ile ilişkili kronik karaciğer hastalığının ileri evrelerindeki insanlarda periferik ILC3'lerin frekansında artış olduğu bildirilmiştir. Aynı alışmada ILC3'lerin fibrojenik etkilerini saptamak için insan karaciğer stellat hücre hattı (LX-2) ile ortak kültür deneyleri yapılmıştır. Bu deneyde ILC3'ler IL-17A ve IL-22 reterek LX-2 fibrogenezini arttırmıştır. Yine bu çalışmada fibrozise karşı koruyucu olduğu bilinen IFN- retimi ILC'lerin IL-22 üretimiyle baskılanmıştır (Wang ve ark., 2018). Daha eski bir çalışmada ise RORt^{-/-} farelerde CCL₄ enjeksiyonuyla indüklenen hepatitin Rag2^{-/-} farelere göre daha şiddetli olduğunu ve bu yüzden ILC3'lerin hepatite karşı koruyucu olduğunu bildirilmiştir (Matsumoto ve ark., 2013). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyet ile fare karaciğerinde ILC3 miktarında artış olduğu,

ROR γ ^{-/-} farelerdeyse ILC3 eksikliğine bağlı olarak karaciğerde yağlanma, fibrosiz ve yüksek palmitik asit seviyelerinin ortaya çıktığı saptanmıştır. Aynı çalışmada ILC3'lerin ürettiği IL-22'nin palmitat kaynaklı apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Hamaguchi ve ark., 2021). Daha yeni bir çalışma, fare karaciğerinde ILC3'lerin IL-22 aracılığıyla cerrahi operasyon sonrası gelişen enfeksiyonu sınırladığı, hepatositlerde antimikrobiyal peptit üretimini indüklediğini bildirmiştir. ILC3'lerin sınırladığı bağırsak bakterilerinin yayılmasının ise karaciğer rejenerasyonunu önlediği de yine bu çalışmada gösterilmiştir (Jakob ve ark., 2023). İlk bahsedilen çalışma ile sonraki çalışmalarda zıt sonuçların elde edilmesinin sebebi ILC3'lerin karaciğerde frekans değişiklikleri olabilir. Zira insan çalışmasında ILC3'ler karaciğer ortamında bulunurken, diğer çalışmalardaki ROR γ ^{-/-} farelerde ILC3 hiç bulunmamaktadır. Dolayısıyla karaciğerde belirli frekanslarda ILC3'lerin bulunması karaciğer için önemlidir. Yaşları belirtilmeyen C57BL/6 farelerde ILC'leri analiz eden bir çalışmada, ILC3'lerin CD45⁺ lökositlerin %0.007'sini oluşturduğu belirtilmiştir. Tespit edilen hücre sayısı ise 500 civarı olarak çalışmaya ait bir grafikte belirtilmiştir (Sadeghalvad ve ark., 2023). 8-20 haftalık yaş aralığındaki sıçanlarla yapılan çalışmada, ILC3'lerin total lenfositlere yüzdesi %0-0.3 aralığında saptanmıştır (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda karaciğerde ILC3'lerin total lenfositlere yüzdesi E20.5'te %1.8, PN7'de %0.76, PN30'da ise %0.13 olarak saptandı. Embriyonal dönemden yetişkinliğe giden süreçte çalışmamızdaki ILC3'lerin lenfositler içerisindeki yüzdesi gittikçe azalıyordu. Belirtilen sıçan çalışmasına bakarak, ILC3'lerin karaciğerde embriyonal dönemde yüksek frekanslarda olduğu ancak yetişkinliğe giden süreçte ILC3 frekansında azalmalar olduğu söylenebilir.

Hava yolları sürekli olarak çeşitli patojenlere ve yabancı antijenlere maruz kalır. Bu yüzden hava yollarındaki çeşitli hücre türleri (yapısal hücreler ve bağışıklık hücreleri dahil) hem doğal bağışıklığı hem de edinilmiş bağışıklığı içeren, patojenlere ve antijenlere karşı hassas bir savunma sistemi oluşturmak için etkileşime girer (Orimo ve ark., 2020). Bu doğrultuda, akciğer epiteli sadece gaz alışverişi yapmakla kalmaz aynı zamanda dışardan gelen saldırıları algılayarak bunlara karşı koyar. Dolayısıyla dinamik bir immün ortama sahiptir. ILC'ler akciğerde önemli role sahip immün sistem ailesidir. Astım, KOAH ve enfeksiyon gibi solunum yolu hastalıkları, akciğerdeki ILC alt kümelerinin bileşiminde ve işlevlerinde dramatik ve dinamik değişikliklerle ilişkili olabilmektedir (Ryu ve ark., 2023). ILC alt tiplerinin akciğerde baskınlığı türler

arasında değişiklik göstermektedir. İnsanlarda ILC3'ler akciğerde baskın ILC alt tipiyken, farelerde ILC2 baskın akciğer ILC alt tipidir (Mjosberg ve Spits, 2016). ILC alt tipleri, ortalama yaşı 60 ± 11 olan, solid akciğer tümör operasyonu sırasında tümörden etkilenmeyen akciğer dokusunun izolasyonu ile insanlarda saptanmıştır. Çalışmada ILC'lerin $CD45^+$ hücrelerine yüzdeleri; ILC1 için %9.8, ILC2 için %33, NCR^+ILC3 için %15.5 ve NCR^-ILC3 için %41.7 olarak saptanmıştır (De Grove ve ark., 2016). Bu çalışmanın sağlıklı kontrol grubunu sadece 5 katılımcının oluşturduğunu, NK hücrelerini ILC1'leri tespit için dışladıklarını, ILC'lerin mutlak hücre sayılarından bahsedilmediğini belirtmek gerekir.

ILC1'lerin KOAH hastalarının periferik kanında arttığı ve bu artışın hastalığın şiddetiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu yüzden hastalığın ilerleme aşamalarında biyobelirteç olarak kullanılabileceği ileri sürölmektedir (Hsu ve ark., 2021). KOAH'ta ILC alt tiplerinin kantifikasyonu ve rolünü araştıran bir çalışmada; ILC1'lerin tüm ILC'lerin kontrol grubunda %20'sini, sigara içenlerde %40'ını, KOAH'lılarda %60'tan fazlasını oluşturduğu gösterilmiştir (Blomme ve ark., 2021). Yaş aralığı belirtilmemiş C57BL/6 farelerde ILC1'ler $CD45^+$ lökositlerin %0.15'ini oluşturmaktadır (Sadeghalvad ve ark., 2023). 10-14 haftalık üç farklı sıçan türüne ait akciğer ILC1'leri total ILC'lerin %5-10'unu oluşturmaktadır (Abidi ve ark., 2020). Çalışmamızda akciğer ILC1'leri total ILC'lerin E20.5'te %0.15'ini, PN7'de ~%7'sini, PN30'da ~%5'ini oluşturmaktaydı. Çalışmamızın postnatal günleri önceki sıçan çalışması ile uyumluydu. Embriyonal dönemde akciğer ILC1'lerinin postnatal dönem ILC1'lerinden bir hayli düşük ILC popölasyonu olması daha önceden rapor edilmemiştir. Çalışmamızda ILC'lerin tespit edildiği kapılamalarda ILC1 frekansı prenatal dönemden postnatal döneme geçişte artış göstermekteydi. Buna karşın her iki kapılamada ILC1 hücre sayısı PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Bu da alveolarizasyon fazında akciğerde ILC1 sayısının doğumdan sonraki ilk haftada pik yaptığı sonucunu ortaya koymaktadır. 8-20 haftalık sıçanlarda ILC1'ler lenfositlerin yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda akciğer ILC1'lerinin lenfositlere yüzdesi E20.5'te %0.03, PN7'de ~5 katlık artışla %0.14 olarak tespit edildi. PN30'da ise tekrar %0.1 oranına gerilemekteydi. PN7'ye doğru ILC1'lerde artış, PN7'den PN30'a doğru tekrar azalarak stabil hale gelen ILC1 yüzdesi (daha önceden belirtilen ILC1 hücre sayılarındaki anlamlı farklılıkla paralel olarak) akciğerin

alveolarizasyon fazında ILC1'lerin fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir. Sonuçlarımızdaki akciğer ILC1'lerinin lenfositlere yüzdelерinin yetişkin sıçan çalışmasına göre daha az olması, akciğerlerin dış etmenlere maruz kalma süresindeki farklılıktan kaynaklanabilir. Muhtemelen sıçanlarda yaşlanmayla beraber alveolus'ların dış ortam antijenlerine maruz kalması ILC1'lerin ortamdaki varlığı güçlendirmekteydi. Özellikle sigara, astım, KOAH gibi akciğer parankiminde hasara yol açan durumlarda ILC1'lerin miktarındaki artış varsayımımızı destekler niteliktedir.

Akciğer NK hücreleri işlev ve fenotip açısından kemik iliği, dalak, kan ve diğer dokularda yer alan NK hücrelerinden farklıdır. NK hücreleri akciğer içerisinde virüs, bakteri, mantar gibi patojenler ile astım, KOAH ve akciğer kanseri gibi patolojik durumlarda önemli rol oynamaktadır. Virüs, bakteri ve mantarlara genellikle IFN- γ üreterek dokuda koruyucu işlev gösterir. Ancak yüksek oranlarda üretilen IFN- γ ile pulmoner ve sistemik inflamasyonu alevlendirebilir, erken akut akciğer yaralanmalarını şiddetlendirebilir. Akciğer kanseri metastazını engellerken otolog akciğer epitel hücrelerini öldürebilir (Cong ve Wei, 2019). Dolayısıyla salgıladıkları sitokinlere ve sitotoksik etkilerinin şiddetine göre patojen ve rahatsızlıkları engelleyebilir veya dokuya zarar vererek hasar oluşturabilir. Bu yüzden NK hücrelerinin akciğerdeki sayı ve frekansları önem arz etmektedir. 6-10 haftalık, 20-25 g ağırlığında C57BL/6 ve BALB/c farelerle yapılan bir çalışmada; akciğer NK hücrelerinin tüm lenfositlerin ~%10'unu oluşturduğu saptanmıştır (Wang ve ark., 2012). Yaş aralığı belirtilmemiş C57BL/6 fare kullanılan başka bir çalışmada akciğer NK hücrelerinin CD45⁺ hücrelerinin %8'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Sadeghalvad ve ark., 2023). 2007 yılında 6 haftalık dişi C57BL/6 farelerle yapılan bir çalışmada, akciğer NK hücrelerinin tüm lenfositlerin %8'ini oluşturduğu, hücre sayısının 10⁶'ya yaklaştığı rapor edilmiştir (Gregoire ve ark., 2007). 8-20 haftalık sıçanlarla yapılan bir çalışmada, akciğer NK hücrelerinin lenfositlerin %3-4'ünü oluşturduğu gösterilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda akciğere ait NK hücrelerinin tüm lenfositlerin E20.5'te %0.0096'sı, PN7'de %0.022'si ve PN30'da %0.023'ünü oluşturduğu saptandı. Akciğer NK hücre sayısı incelenen kapılamalarda 500-600'ı geçmeyerek PN7'de pik yapmaktaydı. Benzer şekilde NK hücre frekansı incelenen kapılamalarda günlere göre anlamlı farklılıklar göstermiyordu. Dolayısıyla sıçan akciğerinde NK hücre frekanslarında embriyonal ve postnatal dönemin 30. gününe kadar önemli farklılıklar gözlenmediği ancak yetişkinliğe

giden yolda patojen maruziyetiyle NK hücre frekans ve sayısında anlamlı değişikliklerin görülebileceğini düşünüyoruz.

Araştırmacılar astım, KOAH gibi solunum hastalıklarında genellikle ILC2'leri daha fazla çalışmaktadır. Fare akciğerinde ILC2'ler nematod virüsleri ile mantarlara amfiregulin salgılayarak, virüslerin neden olduğu doku hasarına karşı koruyucu etki gösterir (Mjosberg ve Spits, 2016). Hayvan modellerinde akciğer ILC2'lerinin $CD4^+$ T hücreleri yokluğunda, alerjenler tarafından indüklenen alerjik solunum yolu inflamasyonunda, doku onarımı ile enfeksiyon sonrası iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (Drake ve Kita, 2014). S1P'ye bağlanarak göç eden ILC2'lerin organlar arası trafiğinin konak hücre savunmasını C57BL/6 farelerde desteklediğini ortaya çıkaran bir çalışmada, PN7 fare akciğerinde ILC2'lerin sayısı 10^4 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada hücre sayısı PN30'da 15×10^4 'e ulaşmıştır (Huang ve ark., 2018). Prenatal ve postnatal döneme ait C57BL/6 vahşi tip (WT) fare akciğer dokusunda, IL-33 yolak aktivasyonunun akciğer gelişiminde tip 2 bağışıklığı sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, akciğer ILC2'lerinin sayısını E18'den PN7'ye kadar binden az saptamıştır. Alveolarizasyon fazından hemen sonra ILC2 sayısı 7-8 bine ulaşırken PN21'de bu sayı 3 bine düşmüş, yetişkin farelerde de bu sayı korunmuştur ancak günler arasındaki farkın anlamlılığı saptanmamıştır (de Kleer ve ark., 2016). Çalışmamızda, incelenen kapılamalarda akciğer ILC2'lerinin sayıları PN7'de PN30'dan anlamlı şekilde daha fazlaydı. Bu da sıçanlarla C57BL/6 WT farelerin akciğer alveolarizasyon fazında ILC2 sayısında kısmen benzer bir yükselme grafiği sergilediğini düşündürmektedir. Çalışmamız ile C57BL/6 WT fare çalışması arasında ILC2 sayılarında katlarca farklılık görülmektedir. Bu fark türler arasındaki boyut farkından kaynaklanabilir. Ayrıca farelerde akciğer alveolarizasyonu esnasında ILC2'ler çalışılmasına rağmen diğer ILC alt tiplerinin henüz çalışılmadığını belirtmek gerekir. 8-12 haftalık insan fetüslerinde akciğer ILC2'lerin total ILC'lere oranı oldukça düşük saptanmıştır (araştırmacılar % belirtmemiş) (Liu ve ark., 2021). Yaş aralığı belirtilmemiş C57BL/6 farelerde akciğer ILC2'lerinin $CD45^+$ hücrelerin %0.125'ini oluşturduğu, ILC2 sayısının ise 300 civarı olduğu gösterilmiştir (Sadeghalvad ve ark., 2023). 10-14 haftalık üç farklı sıçan türüyle yapılan bir çalışmada, akciğer ILC2'lerinin total ILC'lerin %40-55'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Abidi ve ark., 2020). 8-20 haftalık sıçanların kullanıldığı başka bir sıçan çalışmasında, akciğer ILC2'lerinin total

lenfositlerin %0-0.3'ünü oluşturduğu belirtilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda akciğer ILC2'leri lenfositlerin E20.5'te %5.4'ünü, PN7'de %1.6'sını, PN30'da %0.39'unu oluşturmaktaydı. Sıçan akciğer ILC2'leri prenatal dönemden postnatal döneme doğru lenfositlerin daha az bir yüzdesini ifade ediyordu. Çalışmamızdaki akciğer ILC2 frekansı bir önceki sıçan çalışması ile uyumluydu (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda akciğer ILC2'leri E20.5, PN7 ve PN30'da total ILC'lerin sırasıyla %42, %27 ve %30'unu oluşturmaktaydı. 10-14 haftalık sıçanlarla yapılan çalışma bulgularına göre PN30'da saptadığımız yüzde hemen hemen yarısı kadarı (Abidi ve ark., 2020). Bu da sıçan ILC2'lerinin embriyonal dönemde akciğerde baskın olduğunu, yetişkinliğe giden süreçte önce azalma sonra artma olabileceğine, yaşla beraber tüm lenfositler arasında ILC2 yüzdesinin azaldığına işaret edebilir. Akciğere ait ILC2 sayıları incelenen kapılamalarda doğumdan sonraki ilk haftada - istatistiksel olarak anlamlı olmasa da- artış göstermekteydi. Bu bulgular alveolarizasyon fazına uygun şekilde daha önce belirtilen literatürle uyumluydu (de Kleer ve ark., 2016). Akciğer ILC2'lerinin frekansı incelenen Lin⁻CD127^{dim} ve Lin⁻CD127^{hi} kapılamalarında, postnatal 30. günde en düşük seviyedeydi. Dolayısıyla ILC2 frekansı embriyonal dönemden postnatal döneme doğru azalmış olsa da ILC2'lerin PN30'da baskın ILC alt popülasyonu olmaya devam ediyordu.

Araştırmacılar başlangıçta akciğer ILC2'lerine daha fazla odaklanırken yakın zamanda akciğer ILC3'lerine ilgi göstermeye başlamıştır (Yang ve ark., 2021). Akciğer ILC3'leri yenidoğan döneminde bakteriyel pnömoniye karşı kritik görevler üstlenmektedir. Aslında yetişkin fare ve insanlarda zatürre ve pnömoniye T_h hücreleri aracılığıyla karşı konulmaktadır (Chen ve Kolls, 2013). Ancak yenidoğan döneminde adaptif bağışıklık hücrelerinin popülasyonu akciğerde nadiren görüldüğünden ILC'lerin bu dönemde daha fazla rol aldığı ifade edilebilir (dos Santos ve ark., 2013). Bir grup araştırmacı, yenidoğanlarda ILC3 gelişimini neyin yönlendirdiğini sorgulayarak, pulmoner fibroblastların insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) ile ILC3'lerin ILCP'lerden farklılaşmasını sağladığını saptamıştır. Bu araştırmacılar; yenidoğan farelere ait akciğer ILCP'lerinden IGF1 reseptörünü silerek ve alveolar fibroblastlardan IGF1'in ablasyonu ile ILC3 biyogenezinin kesintiye uğradığını ve böylece yenidoğan farelerde pnömoni duyarlılığının artarak solunum yolu enfeksiyonlarının daha sık görüldüğünü ispatlamıştır (Oherle ve ark., 2020). ILC3'lerin akciğerde rolünü araştıran başka bir

çalışmada, akciğer ILC3'lerinin T hücrelerinin alerjen ve mikroplara karşı tepkilerini kısıtlayarak solunum yolu inflamasyonlarını kontrol ettiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada mediastinum'daki lenf nodlarında yüksek seviyelerde MHC-II eksprese eden ILC3'lerin bol miktarda olduğu saptanmıştır. Çalışmanın Lin⁻CD127⁺ kapılamasında (Lin: CD3e, CD5, CD8a, NK1.1, CD11c, CD11b, B220 ve F4/80) akciğer ILC2 frekansı %60-75 (~hücre sayısı; #: 12×10^4) arasındayken, ILC3'ler %0-5 (~hücre sayısı; #: 4×10^4) arasında saptanmıştır. Mediastinal lenf nodlarında ILC2 frekansı ortalama %20 (~hücre sayısı; #: 6×10^2), ILC3'lerde ise ortalama %60-70 (~hücre sayısı; #: 18×10^2) arasında saptanmıştır (Teng ve ark., 2021). Daha önce bahsedilen C57BL/6 fare çalışmasında, yaşamın ilk haftasında akciğerde sadece birkaç yüz adet ILC3 olduğu tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2018). Yaş aralığı belirtilmemiş C57BL/6 farelerde akciğer ILC3'leri CD45⁺ hücrelerin %0.002'sini temsil ederken ILC3 sayısı 60 civarındaydı (Sadeghalvad ve ark., 2023). 8-12 haftalık insan fetüslerinde akciğer ILC3'lerinin total ILC'lerin %90'ından fazlasını temsil ettiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2021). 4-20 haftalık sıçanlarla yapılan bir çalışmada, akciğer ILC3'lerinin tüm lenfositler içerisindeki yüzdesi %1 civarı olarak belirtilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). 10-14 haftalık üç farklı sıçan türüyle yapılan başka bir çalışmada, akciğer ILC3'lerinin total ILC'lerin %30-35'ini oluşturduğu bildirilmiştir (Abidi ve ark., 2020). Çalışmamızda akciğer ILC3'lerinin frekansı incelenen kapılamalarda embriyonal dönemden postnatal döneme geçerken azalmaktaydı. Tüm kapılamalarda akciğer ILC3 frekansı %15-35 arasındaydı. Yine bu kapılamalarda akciğer ILC3 sayısı yaşamın ilk haftasında birinci aydaki sayıdan daha fazlaydı. Daha önce belirtilen fare çalışmasında akciğerdeki ILC3 sayısı PN7'den PN30'a doğru artarken çalışmamızda hücre sayısında artış gözlenmemektedir (Teng ve ark., 2021). C57BL/6 fare çalışmasında saptanan ILC3 sayısı, çalışmamızdaki ILC3 sayısı ile uyumlu değildi (Huang ve ark., 2018). Çalışmamızda akciğer ILC3'leri lenfositlerin E20.5'te %18.7'sini, PN7'de %4.5'ini, PN30'da %0.03'ünü temsil etmekteydi. Embriyonal dönemden yetişkinliğe giden süreçte sıçan akciğer ILC3'leri giderek lenfositler içerisinde daha az temsil ediliyordu. Sonuçlarımız 4-20 haftalık sıçan çalışmasındaki sonuçlarla uyumlu değildi (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda akciğerdeki ILC3'lerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdesi E20.5'te %83, PN7'de %76 ve son olarak PN30'da %3 civarındaydı. ILC2'ler akciğerde baskınlaştıkça ILC3'lerin total ILC'lere oranında azalma söz konusuydu.

Farklı tür sıçanlarda akciğerdeki ILC3'lerin tüm ILC'lerin ortalama %30-35'ini oluşturmaları, çalışmamızın bulgularıyla yaklaşık 10 katlık fark oluşturmaktaydı. Ayrıca bahsedilen çalışmada, akciğer ILC3'lerinin lenfositler içerisindeki temsil edilen yüzdesinin verilmediğini belirtmek gerekir (Abidi ve ark., 2020). Bronkopulmoner displazinin akciğer ILC3'lerine etkilerini araştıran bir fare çalışmasında; kontrol grubuna ait akciğer ILC3'leri lenfositlerin PN1'de %0.2'sini, PN3'te %0.3'ünü, PN7'de PN14'te ~%0.37'sini temsil ediyordu (Cai ve ark., 2022). Aynı cins farelerle yapılan yaş aralığı belirtilmeyen çalışmada ise bu oran %0.002 idi. Ancak bu çalışmadaki fareler yenidoğan değildi (Sadeghalvad ve ark., 2023). Dolayısıyla aynı cins farelerde frekans, oran farklılıklarının görülmesi akciğer ILC3'lerinin aynı türler içerisinde farklı yaş aralıklarında; frekans ve yüzdelerde heterojen görünüm sergileyebileceğini göstermektedir.

Dalak, kan yoluyla taşınan patojenlere karşı konak savunmasında uzmanlaşmış, yüksek oranda kanlanan sekonder lenfoid organlardan birisidir (Magri ve ark., 2014). Anatomik olarak kırmızı ve beyaz pulpa adlı iki farklı bölmeden oluşur. Hasar alan ya da deforme olmuş eritrositlerin yıkılması kırmızı pulpada gerçekleşirken, beyaz pulpa tamamen immünolojik işlevlere sahip dalak yapısıdır (Alexandre ve Mueller, 2023). Dalakta yer alan ILC'ler enfeksiyon veya doku hasarına karşı hızlıca sitokin üretebilmektedir. Dalak ILC2'leri IL-5, IL-9 ve IL-13 gibi T_H2 benzeri sitokinleri üretebilmektedir. Dalak ILC3'leri TNF- α , GM-CSF ve lenfotoksin üreterek marjinal zone B hücreleri ile nötrofilleri aktive etmektedir. Ayrıca IL-2, IL-6 ve CCL3 (makrofaj inflamatuvar proteini) üreterek splenik $CD4^+$ T hücrelerini ko-stimüle edebilir (ko-stimüle; immün hücrelerin antijen sunan hücre varlığında bağışıklık yanıtı vermesi için gereken ikinci sinyal uyarımı. Genellikle T hücreleri bağışıklık yanıtını etkinleştirmek için ikinci uyarana ihtiyaç duyar) (Lewis ve ark., 2019).

Dalak NK hücreleri enfekte hücreler ile tümör hedeflerine karşı uyarıma ihtiyaç duymadan hızlı sitolitik etki göstermeleri ile bilinmektedir. NK hücreleri, MHC-I eksikliği olan hedefleri, sitoplazmasında taşıdığı sitolitik bir protein olan perforin ile kolayca öldürür. İnsanlarda $CD56^+$ hücreler içerisinde ortalama %17'lik temsiliyeti olduğu eski bir çalışmada rapor edilmiştir (Ferlazzo ve ark., 2004).

Dalak ILC1'leri -diğer ILC1'lerde olduğu gibi- T-bet ifade ederken Eomes ifade etmemesi ile NK hücrelerinden farklılık gösterir. Yaş aralığı belirtilmemiş C57BL/6 fare dalağına ait ILC1'ler CD45⁺ hücrelerin %0.015'ini temsil etmektedir. Aynı çalışmada ILC1 sayısı ~on bin adet olarak tespit edilmiştir (Sadeghalvad ve ark., 2023). 10-14 haftalık Sprague Dawley (SPD) sıçanların kullanıldığı bir çalışmada, dalakta ILC1'lerin tüm ILC'lerin ~%30'unu oluşturduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Brown Norway (BN) ve Lewis (LEW) sıçanlarına ait dalak ILC1'leri tüm ILC'lerin sırasıyla %15 ve %45'ini oluşturmaktaydı (Abidi ve ark., 2020). 8-20 haftalık sıçanlarla yapılan çalışmada dalak ILC1'leri tüm lenfositlerin ~%0-2'sini temsil etmekteydi (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda dalak ILC1'leri lenfositlerin E20.5'te %0.08'ini, PN7'de %0.04'ünü, PN30'da %0.006'sını temsil ediyordu. Fetal dönemden yetişkinliğe uzanan süreçte dalak ILC1'lerinin lenfositler içerisinde temsil ettiği yüzdelerde azalma mevcuttu. Çalışmamızda dalak ILC1'leri tüm ILC'lerin E20.5'te %1.43'ünü, PN7'de %13'ünü'ini, PN30'da %10'unu temsil ediyordu. Sıçanlarda prenatal dönemden postnatal döneme geçişte dalak ILC1'lerinin tüm ILC'ler arasında temsiliyetinde artış söz konusuydu. Farklı tür sıçanlarda dalak ILC1'leri tüm ILC'lerin %15-45'ini temsil etmekteydi (Abidi ve ark., 2020). Literatürdeki sıçan çalışmaları ile çalışmamızda tespit ettiğimiz dalak ILC1'lerine bakılarak; dalak ILC1'lerinin farklı gelişimsel dönemlerde immün sisteminin ihtiyacına göre ILC'ler içindeki yüzdesinde artış veya azalış olabileceği görülmektedir.

Dalağına ait ILC2'lerle yapılan çalışmalarda genellikle ateroskleroz ve ILC2 ilişkisi irdelenerek splenik ILC2'lerin ateroskleroz'da fonksiyonu olduğu öne sürülmüştür (Newland ve ark., 2017). Bir çalışmada apolipoprotein-E eksikliği olan farelere IL-25 verilmesiyle ILC2 sayılarında yükselme gözlenmiştir. ILC2 sayısındaki artışla beraber ILC2'lerin salgıladığı IL-5'te (T_h2 değil) artış saptanmıştır. IL-5 artışı anti-fosforilkolin doğal IgM'nin yükselmesine neden olarak ateroskleroza karşı koruyuculuk göstermiştir (Mantani ve ark., 2015). 10-14 haftalık SPD sıçanlarda dalak ILC2'lerinin tüm ILC'ler içerisindeki oranı %20 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada LEW ve BN sıçanlara ait dalak ILC2'lerinin total ILC'lerin sırasıyla %15 ve %45'ini temsil ettiği bildirilmiştir (Abidi ve ark., 2020). 8-20 haftalık sıçanlarla yapılan bir çalışmada, splenik ILC2'lerin total lenfositlerin çok az bir kısmını temsil ettiği rapor edilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda dalak ILC2'leri tüm ILC'lerin E20.5'te %12, PN7'de %13,

PN30'da %28'ini oluşturmaktaydı. Embriyonal dönemden postnatal döneme gidildikçe dalakta ILC2 baskınlığı artmaktaydı. Diğer çalışmada 10-14 haftalık sıçan dalağında ILC3 baskın ILC alt tipi olarak saptanırken çalışmamızda embriyonal dönemde dalak ILC3'leri baskın ILC alt tipiydi (Abidi ve ark., 2020). Ancak PN30' ait dalakta ILC2'ler ILC3'lerden daha baskın hale gelmekteydi. Çalışmamız prenatal ve postnatal döneme ait dalakta baskın ILC alt tipinin değişkenlik gösterdiğini ortaya çıkardı. Çalışmamızda dalak ILC2'lerinin lenfositler içerisindeki temsiliyeti E20.5'te %2.7, PN7'de %0.07 ve PN30'da %0.03 kadardı. Diğer sıçan çalışmasında lenfositler içerisinde çok düşük şekilde temsil edilen dalak ILC2'lerinin tam değerleri verilmediğinden çalışmamız ile karşılaştırma yapılamadı. Ancak PN7 ve PN30'a ait grafiklerimizin (ILC2 % of lymphocytes, bkz. Şekil 4.78-79) diğer sıçan çalışmasındaki grafiklerle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz (Sudworth ve ark., 2022).

Dalakta $LT\alpha_1\beta_2$ eksprese eden ILC3'lerin dentritik hücre farklılaşmasını yönlendirdiği ve dokudaki homeostaziye doğrudan katıldığı daha önceden rapor edilmiştir (Vanderkerken ve ark., 2021). İnsanlarda dalak ILC3'lerinin inflamasyona uğramamış dalakta baskın ILC alt tipi olduğu ve neredeyse total ILC'lerin %90'ını oluşturduğu bilinmektedir (Audia ve ark., 2018). 8-12 haftalık insan fetüslerinde ILC3'lerin total ILC'lerin %90'dan fazlasını oluşturduğu daha önceden rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2021). Yaş aralığı belirtilmeyen C57BL/6 farelerde dalak ILC3'leri $CD45^+$ hücrelerin %0.0035'ini oluştururken hücre sayıları ~2000 olarak tespit edilmiştir (Sadeghalvad ve ark., 2023). Dalak ILC3'leri SPD sıçanlarda %40'luk oranla baskın ILC alt tipi olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada LEW ve BN sıçanlarda dalak ILC3'lerinin total ILC'lerin %30-35'ini oluşturduğu belirtilmiştir (Abidi ve ark., 2020). 8-20 haftalık sıçanların kullanıldığı başka bir çalışmada, dalak ILC3'lerinin total lenfositlerin yaklaşık %0.2'sini oluşturduğu gösterilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda dalak ILC3'leri total lenfositlerin E20.5'te %19.1'ini, PN7'de %0.19'unu, PN30'da %0.01'ini oluşturmaktaydı. Embriyonal dönemden postnatal döneme doğru dalak ILC3'lerinin lenfositler içerisindeki temsili alışılmışın dışında bir düşüş göstermekteydi. Embriyonal dönemde ILC3'lerin dalakta elzem olması postnatal döneme doğru azalması LTi hücrelerine işaret edebilir. Bu durum SLO olan dalağın gelişimi için embriyonal dönemde ILC3'lere (özellikle LTi hücrelerine) diğer ILC'lere oranla daha fazla ihtiyaç duyulduğunu, doğumdan sonraki dönemde ise ILC3'lere daha az ihtiyaç

duyulduğu fikrini akla getirmektedir. Bu varsayımı dalak içerisindeki baskın ILC alt popülasyonları destekler niteliktedir. E20.5'te ILC3'ler total ILC'lerin ~%65'ini oluştururken bu oran PN30'da %19'a kadar gerilemekteydi. Varsayımımızı ILC3 alt tiplerini (LTi hücrelerini) tespit ederek doğrulayabilme/çürütebilme imkânımız bulunmaktaydı. Ancak kullandığımız antikordaki renk çakışması bu durumu engelledi.

Diğer hematopoietik soyların aksine T hücreleri olgunlaşmadan evvel timusta gelişim gösterir. Gelişmekte olan timositler henüz periferik dokuları kolonize etmeden evvel timik mikro çevrede sıkı bir olgunlaşma sürecinden geçer. Timusta T hücre üretimi için gereken sinyalizasyon ve transkripsiyon faktörlerinin koordine şekilde düzenlenmesi timusun ana çıktısını T hücreleri olarak sunmaktadır. Yakın döneme kadar yetişkinlerde ILC'lerin kemik iliğinde üretilerek perifere dağıldığı sanılmaktaydı. Ancak son çalışmalarda ILC'ler ile yenidoğan T hücreleri arasında moleküler, transkripsiyonel ve gelişimsel paralelliklerin dikkate değer ölçüde korunduğu gösterilmektedir. Ayrıca ILC'lerin antijene özgü reseptörlerini uygun şekilde yeniden düzenlemede başarısız olan T hücrelerinden gelişebileceği gösterilmektedir. T hücreleri ve ILC'lerin ontogenisi üzerine yapılan çalışmalar, uzun ömürlü, dokuda yerleşik ILC'lerin timus kaynaklı olmasının muhtemel olduğuna ve sabit durum veya hafif bağışıklık gerektiren durumlar sırasında genişleyerek inflamasyona uygun şekilde yanıt verdiklerini göstermektedir (Shin ve McNagny, 2021). Timus, Notch ligandları ile IL-7 sağlayarak ILC'lerin farklılaşmasına elverişli mikro çevre sağlamaktadır. Timusta bulunan erken T hücre öncülleri ILC farklılaşması için gerekli transkripsiyon faktörlerini ifade etmektedir. Bu yüzden timus ILC üretimi için önemli bir merkez olarak düşünülebilir. Bu koordinasyonu sağlayan anahtar düzenleyicilerden helix-loop-helix E proteini baskılandığında timusta T hücre gelişimi engellenir. Buna mukabil devasa miktarlarda ILC2 üretimi gerçekleşir. *In vitro* ortamda ILC2'lerin T hücre progenitörlerinden köken alarak gelişebileceği de gösterilmektedir (Sun ve Bajana, 2022). Fare ve insanlarda timik ILC'ler üzerine çalışmalar bulunsada sıçanlarda timik ILC'leri araştıran henüz çalışma bulunmamaktadır.

Timik ILC1'ler diğer dokulardaki ILC1'lerden farklı olarak erken timik progenitör hücrelerden gelişebilmektedir. Ayrıca karaciğer, akciğer ve dalak gibi organlarda doğumdan PN3'e kadar ILC1'lerin sayısı artış gösterirken timusta doğumdan sonra

ILC1 sayısı azalmaktadır (Tougaard ve ark., 2024). Yakın zamanlı bir çalışmada fare timusuna ait ILC1'ler E14.5'te tespit edilmemiştir. Timik ILC1'lerin sayısı E16.5'te $\sim 2 \times 10^3$, E18.5'te 5×10^3 , PN1'de $\sim 12 \times 10^3$ ve PN3'te $\sim 6 \times 10^3$ olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada doğumun ilk gününe kadar timik ILC1'lerin sayısı anlamlı artış göstermiş doğumdan sonraki ilk üç günde yine anlamlı azalma göstermiştir (Sparano ve ark., 2022). Ancak bu azalma dokuda hücre ölümü ile mi, diğer dokulara ILC1'lerin göçü ile mi yoksa ILC1 plastisitesi ile mi gerçekleşir sorusunun cevabı çalışmada belirtilmemiştir. Ortalama üç buçuk günlük yenidoğan bebeklerle yapılan bir çalışmada, timik ILC1'lerin total ILC1'lerin ortalama %3-4'ünü oluşturduğu saptanmıştır (de Sousa ve ark., 2021). Farelerle yapılan bir çalışmada, ILC1'lerin total ILC'lerin PN7'de %5'e yakınıni temsil ettiği, PN14'te bu temsiliyetin %1-2'lere düştüğü gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada ILC1'ler; $CD8\alpha^-CD3i^-IL-7R\alpha^+Lin^-$ (B220, CD3, CD5, CD11b, CD11c, CD19, CD49b, CD123, F4/80, FcεR1, Gr-1, and Ter119) $Tbet^+$ olarak tanımlanmıştır (Jones ve ark., 2018). Bu soy belirtecinde NK hücrelerinin ILC1'lere dahil edilip edilmediği çalışmada belirtilmemiştir. Çalışmamızda timik ILC1 frekansı “dim ve hi” kapılamalarında prenatal dönemde düşük frekansa sahipti. İncelenen kapılamalarda postnatal döneme geçişte timik ILC1 frekansında anlamlı artış söz konusuydu. Bu anlamlı frekans artışına rağmen hücre sayısında anlamlı artış görülmemiştir. Fare çalışmalarında embriyonal dönemden postnatal döneme doğru geçişte anlamlı timik ILC1 artışı çalışmamızda sıçanlarda da görülmekteydi. Çalışmamızda timik ILC1'lerin total ILC'ler içerisindeki yüzdesi E20.5'ten PN7'ye geçişte fazla değişim göstermemekteydi. PN7'den PN30'a doğru 2 katlık bir artış söz konusuydu. Timik ILC1 sayısı fare çalışmasının aksine çalışmamızda daha düşük sayılardaydı (Sparano ve ark., 2022). Hücre sayısına zıt biçimde timik ILC1'lerin lenfositler içerisindeki temsili zamanla artıyordu. Timik ILC1'lerin lenfositler içerisindeki oranı E20.5 ve PN7'de %0.017 iken PN30'da %0.09'du. Embriyonal ve postnatal dönemin ilk haftasında timik ILC1'lerin lenfositler içerisindeki oranı aynıyken birinci ayın sonunda 5 katlık artış söz konusuydu. Dolayısıyla sıçanlarda timik ILC1'lerin ILC'ler içerisindeki temsiliyetinde artış gözlemlendi.

Timik (tNK) NK hücreleri yüksek CD127 ekspresyonu ile karakterize edilir (Di Vito ve ark., 2019). tNK hücreleri, çoğalan timositleri hedefleyerek timusta T hücrelerinin seçilmesi ve korunması görevini üstlenmektedir. Bazı çalışmalar bu hücrelerin timustan

çıkarak LN, kemik iliği ve karaciğere göç ettiklerini göstermektedir (Forbes ve ark., 2024). 6 haftalık C57BL/6 dişi farelerle yapılan bir çalışmada, timik NK hücrelerinin lenfositlerin %0.1'ini bile temsil etmediği ve hücre sayısının yok denecek kadar az olduğu rapor edilmiştir (Gregoire ve ark., 2007). Çalışmamızda tNK hücreleri lenfositlerin E20.5'te %0.0031'ini, PN7'de %0.002'sini ve PN30'da %0.0005'ini temsil ediyordu. tNK hücreleri, incelediğimiz tüm organ ve zaman dilimlerinde lenfositler içerisinde popülasyonları en az olan hücrelerdi. Bu bulgumuzu fare çalışması destekler nitelikteydi. Zira fare çalışmasında diğer tüm organlar NK hücrelerinin bol rezervuarları olarak sunulmakta, timus bu rezervuarın dışında tutulmaktaydı (Gregoire ve ark., 2007). Çalışmamızda tNK hücrelerinin total ILC popülasyonundaki temsiliyeti E20.5'te %0.28, PN7'de %0.17 ve PN30'da %0.03 olarak saptanmıştı. Doğumdan hemen sonra timositlerden T hücrelerinin seçilmesi (timopoez) sürecine denk gelen zaman diliminde, tNK'larında diğer günlere göre total ILC'ler içerisindeki oranında azalma görüldü. Doğumdan bir ay sonra tNK hücrelerinin total ILC'ler içerisindeki yüzdesinin %0.03'e gerilemesi, sıçanlarda doğumdan hemen sonra hızlı timopoeze giriş, sonrasında rutine binen % (tNK/total ILC) sergilemesine işaret edebilir. Bu varsayımı doğrulamak/çürütmek için timusun prenatal ve postnatal dönemde T hücre üretim frekanslarını saptamak gerekir. Ancak literatürde böyle bir çalışma saptanmadı. Çalışmamızda incelenen kapılamalarda tespit edilen tNK hücre frekanslarında prenatal ve postnatal dönem açısından anlamlı farklılık saptanmadı. tNK hücrelerinin CD127'yi fazla eksprese etmemesi, PN30'daki Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında hücre ve frekans tespit edilememesiyle örtüşmekteydi.

ILC2'ler birçok dokuda antihelminth bağışıklığı ile alerjik reaksiyonlara katılarak tip 2 bağışıklığı sağlamaktadır. Mukozal dokularda doku rejenerasyonu ve onarımını sağladığı bilinmektedir. Son çalışmalarda timik ILC2'lerin *ex-vivo* ortamda IL-5 ve IL-13 sekrete ettiği rapor edilmiştir. Hematopoetik öncüllerdeki IL-4/IL-13 reseptör kompleksinin sinyalizasyonu, öncül timik hücrelerin myeloide mi yoksa T hücre soy hattına mı farklılaşacağını belirlemede görev alır (Barik ve ark., 2017). Ek olarak IL-13, timik epitel hücrelerin fonksiyonlarını düzenler. Timik medüller epitel IL-13/IL-4 tarafından aktive edilerek, olgun T hücrelerinin zamanında çıkışını sağlar (White ve ark., 2017). Dolayısıyla timik ILC2'lerin IL-13 sekresyonuyla hematopetik hücrelerin farklılaşması üzerine doğrudan etkileri olduğu görülmektedir. Bu da bu hücrelerin

sadece immün sistem değil aynı zamanda dokuda çok yönlü fonksiyon gösterdiğine işaret etmektedir (Cupedo, 2018). Ancak bu durumun in vivo olarak ispat edilmediğinin belirtilmesi gerekir. Bu varsayımın doğru olup olmadığını test etmek için, diğer araştırmacının da bahsettiği gibi, IL-13 üreten yapıların T hücrelerine etki etmeden ablasyonu, timik ILC2'lerin T hücrelerine zarar vermeden deletesyonu gibi işlemlerin kullanılması gerekebilir (Cupedo, 2018). 8-12 haftalık insan fetüslerinde timik ILC2'lerin, ILC3 ve ILC1'den daha az popülasyona sahip olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2021). Ortalama    buçuk günlük yenidoğanlarda timik ILC2'lerin total ILC'lerin %20'sini temsil ettiği rapor edilmiştir (de Sousa ve ark., 2021). Farelerle yapılan bir çalışmada, timik ILC2'lerin timik ILC'lerin PN1'de %50, PN7'de %40'ın biraz altında, PN14'te %40'ın biraz üstünde, yeti kinlikteyse ~%30'unu oluşturduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada timik ILC2'lerin sayısı PN1'de 500 civarı, PN7'de 200-300 arası, PN14'te 2000'e yakın, yetişkinlerde ise 1000'in biraz üstünde tespit edilmiştir (Jones ve ark., 2018). Çalışmamızda timik ILC2'ler timik ILC popülasyonunun E20.5'te %25, PN7'de %22 ve PN30'da %30'unu oluşturmaktaydı. Prenatal dönemden postnatal döneme doğru timik ILC2'ler timik ILC popülasyonu içerinde daha fazla temsil ediliyordu ancak fare çalışmasının aksine incelenen prenatal ve postnatal dönem timuslarında ILC2'ler asla baskın ILC alt tipi olmamaktaydı. Fare çalışmasında timik ILC2'ler ILC3'lerin aksine daima dokuda yer almaya devam ediyordu. Çalışmamızdaki timik ILC2'lerin total ILC'lerin prenatal dönemde %25'ini, PN30'da ise %30'unu temsil ettiği görüldü. Doğumdan bir gün öncesinden doğumdan bir ay sonrasına kadar timik ILC2'lerin ILC popülasyonları içerisindeki sayısı ~2.5 kat artıyordu. Çalışmamızda timik ILC2'lerin sayısı kapılamalar arasında heterojen görünüm sergilemekteydi. İncelenen iki kapılamada timik ILC2 sayıları E20.5'ten PN7'ye doğru artış göstermiş PN7'den PN30'a doğru azalma eğilimi göstermiş olsa da bu artış ve azalış anlamlı değildi. E20.5'ten PN7'ye doğru timik ILC2'lerin artma eğilimi anlamlı olup fare çalışmasıyla uyum göstermektedir (Jones ve ark., 2018). Timik ILC2'ler lenfositlerin E20.5'te %1.3, PN7'de %0.28, PN30'da %0.84' n  temsil ediyordu. Doğumdan sonra azalan bir temsiliyet söz konusu idi. Bu durumun sebebi doğumdan hemen sonra timopoezin başlamasıyla T hücrelerdeki artış olabilir. PN7'den PN30'a geçişte timik ILC2'lerin lenfositler içerisindeki yüzdesel artı ı dokuda ILC2'lere ihtiyacın arttığına işaret edebilir. Bu durumun T hücre çıkışını destekleyen timik

medüller epitel aktivasyonu için gerekli IL-13 sitokinine talebin artmasından mı kaynaklandığı yoksa başka bir sebepten mi kaynaklandığı araştırılmayı beklemektedir.

Fetal dönemde LN'lerin gelişimi, endotel ve stromal hücreleri sinyalizasyon yoluyla aktive eden ILC3'lere sıkı şekilde bağlıdır. ILC3 ve sağladıkları sinyalizasyonların olmaması fare ve insanlarda LN gelişimini engeller. Timik ILC3'ler timus medullasında yer alan timik epitel hücrelerin gelişimi için elzem hücreler olarak göze çarpmaktadır. ILC3 kaynaklı nükleer faktör kappa- β ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) timus medullasındaki epitel hücrelerin nihai olgunlaşmasını sağlar. Aynı zamanda T hücrelerin oto-tolerans kazanması için gerekli olan AIRE geninin (otojen antijenlerin transkripsiyonunu yönlendirir) normal ekspresyonunu sağlar. Bu yüzden timik ILC3 veya timik ILC3'lerden kaynaklanan RANKL yokluğu timopoezde negatif seçilimin etkinliğini azaltarak oto-immüniteye yatkınlığı arttırmaktadır (Cupedo, 2018). Timik ILC3'ler 8-12 haftalık insan fetüslerinde timusun baskın ILC alt tipi olarak saptanmıştır (Liu ve ark., 2021). Ortalama üç buçuk günlük yenidoğan insan yavrularında timik ILC3'ler tüm ILC'lerin ~%12-13 kadarını temsil etmektedir (de Sousa ve ark., 2021). Daha önce zikredilen fare çalışmasında, timik ILC3'lerin total ILC'ler arasındaki temsili PN1'de ~%30, PN7'de %40'a yakın, PN14'te %5'ten az, yetişkinlikte neredeyse %1-2 kadar tespit edilmiştir. Hücre sayıları PN1'de 350 civarı, PN7'de 400 civarı, PN14'te 200-250 arası, yetişkinlikte ise 50'den daha az olarak belirtilmiştir (Jones ve ark., 2018). Çalışmamızda timik ILC3'ler tüm ILC popülasyonunun E20.5'te %59'unu, PN7'de %64'ünü, PN30'da %62'sini temsil ediyordu. Fare çalışmasının aksine timik ILC3'ler incelenen tüm günlerde timusun baskın ILC alt tipiydi. Embriyonal döneme ait timik ILC3'lerin baskın ILC alt tipi olması bulgumuz 8-12 haftalık insan fetüsleri ile uyumluydu. Ancak 8-12 haftalık insan fetüslerinde sığın bulgularımızdan farklı olarak ILC2 ve ILC1'lerin oranları daha fazlaydı (Liu ve ark., 2021). PN3.5 insan yavrularında ILC2 baskınlığının saptanması, insanlarda prenatal ve postnatal dönemde baskın timus ILC alt tiplerinin farklılaştığına işaret ederek, araştırılmayı beklemektedir (de Sousa ve ark., 2021; Liu ve ark., 2021). Çalışmamızda timik ILC3'lerin sayısı Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında PN7'den PN30'a doğru anlamlı azalma göstermişti. Diğer kapılamalarda anlamlı azalmalar saptanmasa da azalma trendi gösterdiğini belirtmek gerekir. Çalışmamızda timik ILC3'ler total lenfositlerin E20.5'te %24'ünü, PN7'de %2.1'ini, PN30'da %2'sini temsil etmekteydi. Bulgularımız E20.5'te timik ILC3'lerin timusun

yoğun ihtiyacına ithafen diğer dokulara göre yüksek oranlarda bulunduğunu göstermektedir. Gerçekten de incelenen tüm dokular arasında timus E20.5'te en fazla ILC3/lenfosit oranına (%24) sahip organdı. Bu da sıçan fetüsleri doğuma hazırlanırken ILC3'lerin timusta kritik rolleri olduğunu düşündürmektedir. Bu yüksek timik ILC3 oranının LT α hücreleri (CD4⁺CCR6⁺) mi yoksa diğer ILC3 alt tipleri (Ncr (NKp46)⁺CCR6⁻, Ncr(NKp46)⁻CCR6⁺) mi olduğu sıçanlarda araştırılmayı beklemektedir. Fare çalışmasında ILC'ler alt tiplerine ayrılmadan total timositler içerisindeki oranları saptanmıştır. Çalışmamızda her ILC alt tipinin ayrı ayrı lenfositler içerisindeki temsiliyeti verilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızla fare çalışmasını lenfosit/timosit düzleminde kıyaslamamız mümkün olmadı (Jones ve ark., 2018).

Bağırsak mukozası DC'ler tarafından numune alınan gıda antijenleri ve çok sayıda kommensal mikrop ve bunların ürünleri tarafından sürekli olarak hedef alınmaktadır. Yaklaşık 20 yıldır, mLN'lerin gıda proteinlerine karşı tolerans oluşturulmasında kilit bölge olduğu ve aynı zamanda kommensal bağırsak bakterilerinin sistemik bağışıklık sistemine nüfuz etmesini önlemek için bir güvenlik duvarı görevi gördüğü bilinmektedir. Bu yüzden nispeten eski bir çalışmada mLN'ler "bağışıklık anatomisinin merkezindeki organ" olarak nitelenmiştir (Macpherson ve Smith, 2006). LN'ler antijene özgü lenfositlerin ilgili antijenle rasgele karşılaşmasını mümkün kılan organize bir mikro çevre sağlar. Bu yapıları birbirine bağlayan lenfatik damar sistemi, bağışıklık hücrelerinin ve antijenin enfeksiyon bölgelerinden tahliye edilmesini sağlayarak immünolojik mücadeleye yönelik etkili bir adaptif bağışıklık yanıtı oluşturur (Mackley ve ark., 2015). ILC'ler (esasen ILC2 ve ILC3) lenflerin düğüme girdiği LN'nin interfolliküler alanlarında yer almaktadır. Anatomik olarak bağırsaklarla yakın münasebetinden ötürü mLN'ler bağırsaktaki ILC'ler ve DC'lerin göç ettiği uğrak bir nokta olarak hizmet eder. LN'lerde bulunan ILC'ler immünoglobülin A (IgA) üretimi ile mukozal bariyerlerde bulunan kommensal-spesifik T hücrelerini regüle ederek immün sistemin önemli elemanları olarak karşımıza çıkmaktadır (Kästele ve ark., 2021).

NK hücreleri insanlarda lenf düğümlerinin sinüs ve korteksinde bulunurken farelerde medulla, parakortikal ve kortikal bölgelerinde yer alır. LN'lerde yer alan NK hücrelerinin anti-tümöral rollerini sunan bir derlemede farelere ait NK hücre yüzdesi dinlenmede %0.2-0.5, DC'lerin LN'ye drene olması esnasında %5-12, viral enfeksiyon esnasında %1.5-4.6 olarak belirtilmiştir. İnsanlarda bu yüzdelere dinlenme esnasında %1-

7 arasında sıçanlarda ise %2 civarında gösterilmiştir (Graham ve ark., 2024). Bu derlemede saptanan sıçan çalışmasında mLN ve periferik lenf nodu NK hücre yüzdeleri (CD161⁺ hücreler içerisinde) hemen hemen aynı saptanmıştır (Del Río-Araiza ve ark., 2020). Fare organlarında ILC'leri karakterize eden bir çalışmada ILC'ler CD45⁺IL-7R α ⁺Lin⁻ (CD3, CD5, B220, CD11b, CD11c)⁻CD3⁻ olarak tanımlanmıştır. Ancak çalışmanın kapılama stratejisi göz önüne alındığında araştırmacıların T-bet⁺ hücreleri doğrudan ILC1 olarak kabul ettiği görülmektedir. Bu kapılamada Eomes ifade eden (NK hücreleri) hücreler olabilir. Ancak araştırmacıların bu konudan bahsetmemesi nedeniyle bu çalışmayı çalışmamız ile kıyaslayamadık (Dutton ve ark., 2017). 6-8 haftalık dişi C57BL/6 farelerde *Schistosoma japonicum* parazitin mLN'de yer alan NK ve doğal öldürücü T hücrelerine etkilerini araştıran bir çalışmada, kontrol grubu farelerde NK hücrelerinin lenfositlerin %2,8 $\pm$ 0,77'ini oluşturduğu saptanmıştır. Ancak NK hücre sayısının çalışmada belirtilmemiştir (Luo ve ark., 2014).

Çalışmamızda mLN'ye ait NK hücreleri tüm ILC'lerin E20.5'te %0.70'ini, PN7'de %0.04'ünü, PN30'da %0.33'ünü oluşturmaktaydı. Embriyonal dönemden bir ay sonra mLN'de NK hücrelerinin ILC'ler arasındaki oranı yaklaşık %50 azalmaktaydı. NK hücreleri total lenfositlerin E20.5'te %0.0092'sini, PN7'de %0.004'ünü, PN30'da %0.002'sini temsil etmekteydi. Dolayısıyla NK hücrelerinin ILC'ler arasındaki temsiliyetinde prenatal dönemden postnatal döneme doğru önce azalış sonra artış söz konusuyken, total lenfositler içerisindeki temsiliyetinde sürekli azalma söz konusuydu. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasında NK hücre sayısı E20.5'te PN7'ye göre, Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında ise PN7'de PN30'dan anlamlı olarak daha fazlaydı. Lin⁻CD127^{dim} kapılamasındaki bulgu, NK hücrelerinin doğumdan hemen önce sayılarında yükseklik olmasına rağmen hızlıca bu sayıda azalmaya işaret etmekteydi. Ancak NK hücrelerinin mLN'den diğer dokulara göç ederek mi yoksa başka bir mekanizma ile mi sayılarının azaldığı araştırılmayı beklemektedir. Zira son çalışmalarda 24 saatte sayıları ~200-2000 arasında değişen (CD45⁺ hücrelerin %0.01-0.03'ünü temsil eden) ILC'lerin bağırsaklardan mLN'lere doğru göç ettiği bildirilmektedir (Kästele ve ark., 2021). Bu durum mLN'lerdeki ILC popülasyonlarının dinamik değişiklikler gösterdiğini ve bağırsaklarla doğrudan ilişkili olduğuna işaret edebilir. İntestinal lenf nodları içeriğini insanlarda yukarı doğru cisterna chyli'ye götürebileceği gibi, aşağı doğru inguinal lenf nodlarına da gönderebilir. Bu lenf trafiğinde ILC'lerin karakterize edilmesi, göç sıklığı

ve yönlerinin belirlenmesi lenfle ilişkili rahatsızlıkları anlamada ve tedavi yollarının geliştirilmesinde faydalı olabilir.

Normalde ILC1'lerin dokuya yerleşik ILC alt tipi olduğu kabul edilir. Ancak Kaede farelerinde yapılan bir çalışmada deriden lenf nodlarına ILC1'lerin ILC2 ve ILC3'e göre daha fazla göç ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ILC'lerin S1P'ye bağlanarak LN'lere göç ettiği saptanmıştır. Ancak mLN'lerde böyle bir durum olup olmadığı çalışmada belirtilmemiştir (Dutton ve ark., 2019). 6-10 haftalık C57BL dişi farelerde mLN'ye ait ILC1'lerin diğer ILC popülasyonlarından daha az oranda olduğu gösterilmiştir. mLN'de tespit edilen ILC1 sayısının 1000'e ulaşmadığı aynı çalışmada gösterilmiştir. 6-12 haftalık C57BL/6 farelerde ILC1'lerin total ILC'lerin %20.5'ini oluşturduğu rapor edilmiştir (Dutton ve ark., 2017). 10-14 haftalık SPD sıçanlarda ILC1'lerin tüm ILC'lerin ~%2.3'ünü oluşturduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada mLN ILC1'lerinin total ILC'lerin, LEW sıçanlarda %20'sini, BN sıçanlarda ~%10'unu oluşturduğu belirtilmiştir (Abidi ve ark., 2020). Çalışmamızda mLN'de tespit edilen ILC1'ler total ILC'lerin E20.5'te %2.74'ünü, PN7'de %2.89'unu, PN30'da %5.22'sini oluşturmaktaydı. Embriyonal dönemden postnatal döneme doğru ILC1'lerin total ILC'ler arasındaki oranı doğumdan sonraki ilk haftada çok artmasa da birinci haftadan birinci aya kadar yaklaşık 2 katlık bir artış sergiledi. mLN ILC1'lerinin total ILC'ler içerisindeki porsiyonu diğer sıçan çalışmasındaki porsiyona benzerdi (Abidi ve ark., 2020). Bu da farklı tür sıçanlarda mLN ILC1'lerinin tüm ILC'ler içerisindeki yüzdelерinde farklılıklar olabileceğine işaret etmektedir. mLN ILC1'lerinin total lenfositler içerisindeki yüzdesi E20.5'te %0.028, PN7'de %0.07, PN30'da %0.02 olarak saptandı. Çalışmamızda mLN ILC1'lerinin total ILC'ler arasındaki oranında artış görülürken lenfositler içerisindeki temsil yüzdesinde prenatal ve postnatal dönemde bariz farklılıklar saptanmamıştı.

mLN'lerde ILC2'lerin ilk kez tespiti 2010 yılında üç farklı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Moro ve ark., 2010; Neill ve ark., 2010; Price ve ark., 2010). mLN ILC2'leri lenf düğümlerinde olgunlaşmamış T hücrelerinin olgunlaşmasında görev almakta, olgunlaşmış T hücreleri tarafından da regüle edilebilmektedir. Yine mLN'de yer alan ILC2'ler kanser progresyonu esnasında alt popülasyonlara doğru transdiferansiyasyona uğrayabilmektedir (Sugimura ve Wang, 2022). 6-12 haftalık C57BL/6 farelerle yapılan bir çalışmada, mLN'ye ait ILC2'lerin total ILC'lerin

%17.9'unu temsil ettiği bildirilmiştir (Dutton ve ark., 2017). 6-10 haftalık dişi WT fare mLN'sinde ILC2'ler ILC3'lerden daha az sayıda, ILC1'lerden daha fazla sayıda tespit edilmiştir. Çalışmada mLN ILC2'lerinin sayısı 1000'in altında saptanmıştır (Mackley ve ark., 2015). 10-14 haftalık SPD sıçanlarda mLN ILC2'lerinin total ILC'lerin ~%6.7'sini oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu oran LEW ve BN sıçanlarda ~%5 olarak bildirilmiştir (Abidi ve ark., 2020). Çalışmamızda mLN ILC2'leri total ILC'lerin E20.5'te %48'ini, PN7'de %52'sini, PN30'da %53'ünü temsil etmekteydi. ILC2'ler hem prenatal dönemde de postnatal dönemde mLN'nin baskın ILC alt poplasyonuydu. Bağırsaklarda homeostazi durumunda tüm ILC alt gruplarının göç ettiği bildirilse de mLN'lere ILC2 göçünün mLN baskın ILC popülasyonunu değişmesinde etkisi olup olmadığı araştırılmayı beklemektedir (Helfrich ve ark., 2021).

mLN ILC3'leri lenf düğümlerine g edebilen, dokuda yerleşik kalabilen hücrelerdir. LTi hücreleri de bu gruba dahil edildiğinde, lenfoid dokuyu inşa eden hücreler olarak telakki edilebilir (LTi hücrelerine dair detaylı bilgi genel bilgilerde yer almaktadır). Dokuda yerleşik antijen sunan ILC3'ler, T hücre bağımlı kolonik IgA üretimini kontrol etmektedir. Dokuda yerleşik antijen sunan ILC3'lerin yokluğunda, colon'da bulunan bakterilerin artan miktarda kontrolsüzce IgA ürettikleri gösterilmiştir. Bu yüzden mLN ILC3'lerinin doku homeostazi ile bağırsak mukozasında yaşayan kommensal bakterilerle mutualizmi korumakla görevli olduğu düşünülmektedir (Melo-Gonzalez ve ark., 2019). 6-12 haftalık C57BL/6 farelerde mLN'ye ait ILC3'lerin total ILC'lerin %48.7'sini oluşturduğu rapor edilmiştir (Dutton ve ark., 2017). 6-10 haftalık dişi WT fare mLN'lerinde ILC3'lerin total ILC'lerin %50'sinden fazlasını oluşturduğu gösterilmiştir (Mackley ve ark., 2015). 10-14 haftalık SPD, LEW ve BN sıçanlarda mLN ILC3'lerinin total ILC'lerin sırasıyla ~%82.9, %58-60 ve %45-50'sini oluşturduğu gösterilmiştir (Abidi ve ark., 2020). Çalışmamızda mLN'ye ait ILC3'ler, total ILC'lerin E20.5'te %27'sini, PN7'de %14'n, PN30'da %25'ini oluşturmaktaydı. ILC3'ler fare ve sıçan çalışmalarında mLN'nin baskın ILC alt popülasyonu olarak tanımlanmıştır (Abidi ve ark., 2020; Dutton ve ark., 2017; Mackley ve ark., 2015). Çalışmamızın bulguları, mLN'de hem prenatal hem de postnatal dönemde ILC3'lerin baskın olmadığını göstererek diğer sıçan çalışmasından farklı sonuçlar sunmaktadır. Çalışmamızın PN30 grubunda 4 haftalık sıçanların yer alması, diğer sıçan çalışmasında ise 10-14 haftalık sıçanların yer almasından ötürü, PN30'da saptanan ILC2

baskınlığının yaştın ilerlemesine bağılı olarak değişebileceği söylenebilir. Ancak bu durumun aydınlatılabilmesi için daha geniş yaş aralıklı sıçanların dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Gastrointestinal sistem emici bariyerini patojenlerden koruyan, doku fizyolojisine katkıda bulunan ve mukozal iyileşmeyi destekleyen karmaşık hücre ağları ve yoğun lenfoid yapılar içeren immünolojik açıdan zengin bir yapıdır. Gastrointestinal sistem diyetle alınan zararsız antijenler ile bağırsağa kolonize trilyonlarca yararlı mikroorganizmaya karşı tolerans göstermesi gereken bir oluşumdur. Bahsedilen etmenlere tolerans geliştirilmemesi; inflamatuvar bağırsak hastalığı, gıda alerjisi, kronik enterik enfeksiyonlar ve kanser gibi lokal ve sistemik hastalıklarla sonuçlanabilir (Horn ve Sonnenberg, 2024). Gastroenterik sistemin en önemli organları olan bağırsaklar, yaşam için olmazsa olmaz niteliğe sahip olup sürekli olarak yabancı antijenlere ve diğer çevresel etkenlere maruz kalır. Bu nedenle, önemli miktarda organize lenfoid doku ve büyük miktarda dağınık doğal ve adaptif efektör hücre popülasyonları ile bağışıklık sisteminin en büyük bölümünü oluşturur. Colon'da sindirim görülmese de sağlık için gerekli olan çok sayıda komensal mikroorganizmanın rezervuarı olarak işlev görür. Kolonik bağışıklık sistemi bu mikroorganizmaları potansiyel tehlikeler olarak tanır ve onları dışarı atmadan 'kol mesafesinde' tutar. Bu durum kalın bir mukus tabakası ile IgA antikorlarının üretilmesini ve çok sayıda düzenleyici T hücresinin varlığını gerektirmektedir (Mowat ve Agace, 2014). ILC'lerin keşfinden sonra bu hücrelerin bağırsak homeostazisi, doku onarımı, parazit ve patojen mikroorganizmalara karşı çok yönlü fonksiyonları olduğu anlaşılmıştır. Ancak bu fonksiyonlarına zıt şekilde bazı hastalıkların ILC aracılığıyla ilerlediği de bilinmektedir (Ryu ve ark., 2023).

Bağırsakta bulunan NK hücreleri diğer dokulardaki NK hücrelerinden daha karmaşık özelliklere sahiptir. Bağırsaklarda yer alan NK hücreleri epitel tabakası ile dokunun stromasında dağınık vaziyette yer alarak lenfoid kümelenme göstermezler. Böylece mikrobiyota bileşenleri, komensal ve patojen mikroorganizmalardan üretilen çok sayıda antijenle sürekli etkileşim gösterirler. Ayrıca bağırsak homeostazının sağlanması için dokuda yer alan epitel hücreler, fibroblastlar, makrofajlar, dentritik hücreler ve diğer lenfositlerle etkileşim gösterirler (Poggi ve ark., 2019). 8-20 hafta yaş aralığındaki sıçanlarda yapılan bir çalışmada, NK hücrelerinin total lenfositler içerisindeki temsili; ince bağırsak lamina propriası (LP) ile intraepitel lamina'da (IEL) %0.5'in altında

saptanmıştır (LP'de IEL'den daha fazla) (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda ince bağırsaktaki NK hücreleri total lenfositlerin E20.5'te %0.0018'ini oluşturuyordu (gereç ve yöntem kısmında belirtilen sebeplerden ötürü diğer günlerde tespit edilemedi). Colon'daki NK hücreleri total lenfositlerin E20.5'te %0.0084'ünü, PN7'de %0.11'ini oluşturuyordu. Colon'da yer alan NK hücrelerinin total lenfositler içerisindeki temsili doğumdan sonra ilk haftada ~13 kat artış göstermişti. Ayrıca bu temsil E20.5'te colon'da ince bağırsaktan ~4.6 kat daha fazlaydı. E20.5'te NK hücrelerinin total ILC'ler içerisindeki temsiliyeti ince bağırsakta %0.15 oranındayken colon'da %0.46 kadardı. PN7'de incelenen tüm organlar arasında NK hücrelerinin total lenfositlere oranla en fazla olduğu organ colon'du. Colon'daki NK hücre frekansı Lin⁻CD127^{hi} kapılamasında diğer kapılamadan daha fazlaydı. Ayrıca incelenen iki kapılamada da E20.5'ten PN7'ye doğru anlamlı NK hücre frekansı artışı saptanmıştı. Bu durumu E20.5'ten PN7'ye geçişte NK hücre/lenfosit oranı destekler nitelikteydi. Colon'a ait NK hücrelerinin total ILC'ler içerisindeki temsili E20.5'te %0.46'dan PN7'de %2.17'ye yükselmişti. NK hücrelerinin tüm ILC'ler arasındaki oranında doğumdan sonraki ilk haftada 5 katlık artış olması dokunun NK hücrelerine ihtiyacının artmasına işaret edebilir. PN30'da gereç ve yöntem kısmında belirtilen nedenlerden dolayı NK ve ILC1'leri tespit edilemedi. PN30'da NK hücrelerinin tespit edilmesi bu durumu açıklamayı kolaylaştırabilirdi.

ILC1'ler IL-12 ve IL-15 uyarımına yanıt olarak bol miktarda IFN- γ üreterek intestinal enfeksiyonlara karşı savunmanın ilk hattını oluşturur. Araştırmacılar T-bet (ILC1 üretiminde elzem TF) eksikliği olan fare modelinde, farelerin *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun erken safhalarında parazit çoğalımını kontrol edemediğini ortaya koymuştur (Zheng ve Zhu, 2022). Bağırsak ILC1'leri savunma ve bağışıklıkta görev almanın yanı sıra doku homeostazına da katkıda bulunur. Yakın zamanlı bir çalışmada, fare ve insanlardan elde edilen ILC1'lerin CD44v6⁺ epitel kriptalarının genişlemesini tetikleyen dönüştürücü büyüme faktörü β 1 (TGF- β 1) salgıladıkları gösterilmiştir. Yine bu çalışmada araştırmacılar ILC1'lerin, hücre dışı matrisin bozulmasında rol oynayan matris metaloproteinaz-9 (MMP-9) eksprese ettiğini göstererek ILC1'lerin bağırsaklarda zenginleşmesiyle fibrozis ve tümör büyümesini şiddetlendirebileceğini öne sürmüştür (Jowett ve ark., 2021). 8-12 haftalık insan fetüslerine ait ince bağırsak ILC1'lerinin total ILC'lerin çok az bir kısmını oluşturduğu ancak bu oranın ILC2'lerden daha fazla olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2021). 14-17 haftalık insan fetüslerinin

kullanıldığı başka bir çalışmada ince bağırsak LP'sine ait ILC1'lerin total ILC'lerin %5'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Bernink ve ark., 2015). 10-14 haftalık LEW, BN ve SPD sıçanlarda ILC1'lerin tüm ILC'lerin ileum LP'sinde sırasıyla ~%5, ~%3, %1.8 kadarını temsil ettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada LEW, BN ve SPD sıçanlarda ILC1'lerin tüm ILC'lerin colon LP'sinde sırasıyla ~%3.5, ~%2.6, %2.6 kadarını temsil ettiği gösterilmiştir (Abidi ve ark., 2020). 8-20 haftalık sıçanlarla yapılan bir çalışmada ince bağırsak IEL'inde tespit edilen ILC1'lerin total lenfositlerin %0.5'inden daha azını temsil ettiği, ince bağırsak LP'sinde bu temsilin çok az olduğu saptanmıştır (Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda ince bağırsakta tespit edilen ILC1'ler total ILC'lerin E20.5'te %4.44'ünü oluşturmaktaydı. PN30'da ise bu temsiliyet gereç ve yöntem kısmında belirtilen sebeplerden ötürü incelenemedi. Colon'da tespit edilen ILC1'ler total ILC'lerin E20.5'te %4.92'sini, PN7'de %26.59'unu oluşturmaktaydı (PN 30 colon'a ait ILC1'ler gereç yöntem kısmında belirtilen nedenlerden ötürü incelenemedi). Çalışmamızda E20.5'te tespit edilen ince bağırsak ILC1'leri total lenfositlerin %2.3'ünü oluşturmaktaydı. ILC1'lerin total lenfositler içerisindeki yüzdesine dair bulgularımız Sudworth ve ark. bulgularıyla uyumluydu (Sudworth ve ark., 2022). Literatürdeki diğer iki yetişkin sıçan çalışması ile çalışmamızdaki E20.5'te tespit edilen ILC1'lerin çok düşük frekanslarda olduğu görüldü (Abidi ve ark., 2020; Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızdaki ILC1 oranı PN7 colon'da, ILC2'lerden sonra en yüksek ILC alt popülasyonu olmayı başarmıştı. Colon'da ILC1'lerin tüm ILC'ler arasındaki temsil yüzdesi PN7'de E20.5'in ~5 katı kadardı. Doğumdan sonra colon'da ani ILC1 baskınlığının ortaya çıkmasının sebepleri araştırılmayı beklemektedir.

ILC2'ler bağırsak lümenindeki antijenlere karşı bağışıklıkta, bağırsak epitelinin bariyer fonksiyonunda ve mukoza onarımında tip 2 sitokinler üreterek katkıda bulunur. ILC2'ler bahsedilen katkıların yanı sıra ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında olumsuz etkilerde bulunabilir (Sunaga ve ark., 2022). ILC3'ler, bağırsak epitel bariyerinin ve bağışıklık homeostazının korunması için gereklidir. Bu önemli rol, öncelikle ILC3 tarafından IL-22 ve IL-17 gibi sitokinlerin salgılanması yoluyla gerçekleştirilir. Aynı zamanda, ILC3 ile bağırsak florası ve adaptif bağışıklık arasındaki etkileşim ağı da bağırsak homeostazı için kritik öneme sahiptir (Li ve ark., 2023). 14-17 haftalık insan fetüslerinde intestinal ILC2'lerin total ILC'lerin %5'ini oluşturduğu, ILC3'lerin total ILC'lerin %94'ünü oluşturduğu gösterilmiştir (Bernink ve

ark., 2015). 8-12 haftalık insan fetüsleriyle yapılan bir çalışmada, bağırsak ILC2'lerinin ILC1'lerden daha az olduğu, ILC3'lerin ise total ILC'lerin %90'a yakını oluşturduğu rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2021). Yaş aralığı belirtilmeyen C57BL/6 farelerle yapılan bir çalışmada, ince bağırsak dokusunda tespit edilen ILC2'lerin CD45⁺ hücrelerin %1.5'ini oluşturduğu, ILC2 sayısının 2×10^4 'ün biraz üstünde olduğu gösterilmiştir. Yine bu çalışmada ILC3'lerin CD45⁺ hücrelerin %6'sını oluşturduğu, ILC3 sayısının 300 civarı olduğu belirtilmiştir (Sadeghalvad ve ark., 2023). 10-14 haftalık LEW, BN ve SPD sıçanlarda ILC2'lerin tüm ILC'lerin ileum LP'sinde sırasıyla ~%75'ten biraz fazla, ~%75, %82.5 kadarını temsil ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada LEW, BN ve SPD sıçanlarda ILC2'lerin tüm ILC'lerin colon LP'sinde sırasıyla ~%75'in biraz üstü, ~%78, %80 kadarını temsil ettiği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada ileum LP'sinde tespit edilen ILC3'lerin total ILC'lerin LEW, BN ve SPD sıçanlarda sırasıyla ~%18, ~%22, %13.7'sini oluşturduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada LEW, BN ve SPD sıçanlarda ILC3'lerin tüm ILC'lerin colon LP'sinde sırasıyla ~%10, ~%15.5, %14.7 kadarını temsil ettiği gösterilmiştir (Abidi ve ark., 2020). Bir başka çalışmada 8-20 haftalık farklı cins sıçanlarda ince bağırsak IEL'inde tespit edilen ILC2'lerin total ILC'lerin %0.1'inden daha azını temsil ettiği, ince bağırsak LP'sinde bu temsilin zar zor görüldüğü (yok denecek kadar az olduğu) saptanmıştır. Bu çalışmada ILC3'lerin IEL ve LP için yaklaşık değerleri %0.4 ve %1.8 olarak gösterilmiştir (Sudworth ve ark., 2022). Abidi ve ark. ile Sudworth ve ark. çalışması intestinal sistemde baskın ILC popülasyonları için farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. İntestinal sistemde ILC baskın alt popülasyonu olarak Abidi ve ark. ILC2'leri tanımlarken Sudworth ve ark. ILC3'lerin ince bağırsak intestinal sisteminde baskın olduğunu öne sürmüştür (Abidi ve ark., 2020; Sudworth ve ark., 2022). Çalışmamızda ince bağırsak ve colon'da baskın ILC alt popülasyonlarının embriyonal ve postnatal dönemde benzer olduğu saptandı. İnce bağırsakta baskın ILC alt popülasyonu E20.5'te ILC2 olarak saptandı. Colon'da baskın ILC alt popülasyonu hem E20.5'te hem de PN7'de ILC2 olarak saptandı. Dolayısıyla çalışmamızda hem colon hem de ince bağırsakta ILC2 popülasyonu ILC3 popülasyonundan daha baskındı. Bu yüzden çalışmamızın bulgularındaki colon ve incebağırsak ILC baskın popülasyonu açısından, Abidi ve ark. çalışmasını destekler nitelikteydi (Abidi ve ark., 2020). Sudworth ve ark., Abidi ve ark.'nın çalışmasından farklı sonuçlar elde etmesinin mikrobiyomdan kaynaklanmadığını ancak hayvan

tesislerindeki mikrobiyota farklılıklarının buna sebep olabileceğini öne sürmüştü. Bizim açıklamamız sıçanlarda tür, mikrobiyota, hayvan tesisi ve en önemlisi yaş aralığının baskın ILC alt tiplerini değiştirebileceği yönündedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal lenfoid hücrelerin keşfi ile immünolojide yeni bir paradigma oluşmuş ve bu hücrelerin birçok hastalıkta roller aldığı gösterilmiştir. Embriyolojik çalışmalar konjenital, genetik ve diğer erken başlangıçlı hastalıkların arkasındaki mekanizmaların aydınlatılmasında önemli yer tutmaktadır. Çeşitli hayvan modellerinde embriyolojik dönemde ILC'lerin moleküler mekanizmalarının çözülmesi, konjenital ve yaşamın erken dönemlerinde meydana gelen hastalıkların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Farelerin sıçanlara kıyasla immünolojik çalışmalarda daha yaygın olarak kullanıldığı bilinmekle beraber sıçan fizyolojisinin fare fizyolojisinden daha iyi anlaşıldığı ve insan fizyolojisine daha çok benzediği bilinmektedir (Ellenbroek ve Youn, 2016; Iannaccone ve Jacob, 2009; "Rats!," 2010). Son zamanlarda genetiği değiştirilmiş sıçan türlerinin üretilmesi de sıçanları ILC'lerin çalışılabileceği konuma yaklaştırmaktadır. Tüm bunların yanı sıra sıçan embriyolarının fare embriyosundan daha büyük olması, embriyolojik çalışmalarda araştırmacılara avantaj sağlayacaktır. Farmakolojik ajanların bahsedilen hastalıkların tedavilerindeki rollerinin embriyolarda araştırılması bu alanda yeni gelişmelere kapı aralayabilir. Çalışmamızın diğer çalışmalara öncü olacağı düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKÇA

- Abidi A, Laurent T, Beriou G. Characterization of Rat ILCs Reveals ILC2 as the Dominant Intestinal Subset. Original Research. Front Immunol. 2020-February-19 2020;11:255. doi:10.3389/fimmu.2020.00255
- Addison W. Experimental and Practical Researches on the Blood: Second Series. Prov Med J Retrospect Med Sci. Aug 26 1843;6(152):444-445. doi:10.1136/bmj.s1-6.152.444
- Alexandre YO, Mueller SN. Splenic stromal niches in homeostasis and immunity. Nat Rev Immunol. Nov 2023;23(11):705-719. doi:10.1038/s41577-023-00857-x
- Andral G. Essai d'hématologie pathologique. Fortin, Masson et Cie; 1843.
- Audia S, Moulinet T, Ciudad-Bonte M. Altered distribution and function of splenic innate lymphoid cells in adult chronic immune thrombocytopenia. J Autoimmun. Sep 2018;93:139-144. doi:10.1016/j.jaut.2018.07.015
- Bal SM, Bernink JH, Nagasawa M. IL-1 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. Nat Immunol. Jun 2016;17(6):636-645. doi:10.1038/ni.3444
- Barik S, Miller MM, Cattin-Roy AN, Ukah TK, Chen W, Zaghouani H. IL-4/IL-13 Signaling Inhibits the Potential of Early Thymic Progenitors To Commit to the T Cell Lineage. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). Oct 15 2017;199(8):2767-2776. doi:10.4049/jimmunol.1700498
- Bernink JH, Krabbendam L, Germar K. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina

- Propria. Immunity. Jul 21 2015;43(1):146-160.
doi:10.1016/j.immuni.2015.06.019
- Blomme EE, Provoost S, De Smet EG. Quantification and role of innate lymphoid cell subsets in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinical & translational immunology*. 2021;10(6):e1287. doi:10.1002/cti2.1287
- Boulenouar S, Michelet X, Duquette D. Adipose type one innate lymphoid cells regulate macrophage homeostasis through targeted cytotoxicity. 2017;46(2):273-286.
- Brendolan A, Caamaño JH. Mesenchymal cell differentiation during lymph node organogenesis. *Front Immunol*. 2012;3:381. doi:10.3389/fimmu.2012.00381
- Cai J, Lu H, Su Z, Mi L, Xu S, Xue Z. Dynamic Changes of NCR– Type 3 Innate Lymphoid Cells and Their Role in Mice with Bronchopulmonary Dysplasia. *Inflammation*. 2022/04/01 2022;45(2):497-508. doi:10.1007/s10753-021-01543-7
- Cao Q, Wang R, Niu Z. Type 2 innate lymphoid cells are protective against hepatic ischaemia/reperfusion injury. *JHEP Reports*. 2023/10/01/ 2023;5(10):100837. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100837
- Chen K, Kolls JK. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annual review of immunology*. 2013;31:605-633. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100019
- Chen Y, Wang X, Hao X. Ly49E separates liver ILC1s into embryo-derived and postnatal subsets with different functions. *The Journal of experimental medicine*. May 2 2022;219(5):e20211805. doi:10.1084/jem.20211805
- Cheng C, Zhang Q, Li Y. Interplay Between Liver Type 1 Innate Lymphoid Cells and NK Cells Drives the Development of Alcoholic Steatohepatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2023;15(1):261-274. doi:10.1016/j.jcmgh.2022.09.010
- Cho CG, Gong SH, Kim H-B. Role of group 3 innate lymphoid cells during experimental otitis media in a rat model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2016/09/01/ 2016;88:146-152. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.07.001

- Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity*. Jul 17 2009;31(1):15-23. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.008
- Colonna MJ. Innate lymphoid cells: diversity, plasticity, and unique functions in immunity. 2018;48(6):1104-1117.
- Cong J, Wei H. Natural Killer Cells in the Lungs. Review. 2019-June-25 2019;10 doi:10.3389/fimmu.2019.01416
- Constantinides MG, McDonald BD, Verhoef PA, Bendelac AJN. A committed precursor to innate lymphoid cells. 2014;508(7496):397-401.
- Cooper MD, Peterson RD, Good RAJN. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. 1965;205(4967):143-146.
- Cupedo T, Crellin NK, Papazian N. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC⁺ CD127⁺ natural killer-like cells. 2009;10(1):66-74.
- Cupedo T. ILC2: at home in the thymus. 2018;48(9):1441-1444. doi:https://doi.org/10.1002/eji.201847779
- Daussy C, Faure F, Mayol K. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *The Journal of experimental medicine*. Mar 10 2014;211(3):563-577. doi:10.1084/jem.20131560
- De Grove KC, Provoost S, Verhamme FM. Characterization and Quantification of Innate Lymphoid Cell Subsets in Human Lung. *PloS one*. 2016;11(1):e0145961. doi:10.1371/journal.pone.0145961
- de Kleer IM, Kool M, de Bruijn MJW. Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung. *Immunity*. 2016/12/20/ 2016;45(6):1285-1298. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.031
- de Sousa TR, Sgnotto FDR, Fagundes BO, Duarte A, Victor JR. Non-atopic Neonatal Thymic Innate Lymphoid Cell Subsets (ILC1, ILC2, and ILC3) Identification and the Modulatory Effect of IgG From *Dermatophagoides Pteronyssinus* (Derp)-

- Atopic Individuals. Brief Research Report. *Front Allergy*. 2021-April-28 2021;2:650235. doi:10.3389/falgy.2021.650235
- Del Río-Araiza VH, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE. Perinatal exposure to bisphenol A increases in the adulthood of the offspring the susceptibility to the human parasite *Toxocara canis*. *Environmental Research*. 2020/05/01/ 2020;184:109381. doi:https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109381
- Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. Review. 2019-August-02 2019;10doi:10.3389/fimmu.2019.01812
- Diefenbach A, Colonna M, Koyasu SJI. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. 2014;41(3):354-365.
- DiGeorge AMJNFB, OAS. Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: concurrence with congenital hypoparathyroidism. 1968;4:116-123.
- dos Santos AB, Binoki D, Silva LF. Immune cell profile in infants' lung tissue. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. Dec 2013;195(6):596-604. doi:10.1016/j.aanat.2013.05.003
- Drake LY, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells in the lung. *Advances in immunology*. 2014;124:1-16. doi:10.1016/b978-0-12-800147-9.00001-7
- Dutton EE, Camelo A, Sleeman M. Characterisation of innate lymphoid cell populations at different sites in mice with defective T cell immunity. *Wellcome open research*. 2017;2:117. doi:10.12688/wellcomeopenres.13199.3
- Dutton EE, Gajdasik DW, Willis C. Peripheral lymph nodes contain migratory and resident innate lymphoid cell populations. *Science immunology*. May 31 2019;4(35)doi:10.1126/sciimmunol.aau8082
- Ebbo M, Crinier A, Vély F, Vivier E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2017/11/01 2017;17(11):665-678. doi:10.1038/nri.2017.86
- Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science*. May 22 2015;348(6237):aaa6566. doi:10.1126/science.aaa6566

- Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol.* Jan 2004;5(1):64-73. doi:10.1038/ni1022
- Ebihara T. Dichotomous Regulation of Acquired Immunity by Innate Lymphoid Cells. *Cells.* 05/11 2020;9:1193. doi:10.3390/cells9051193
- Ehrlich PJAAP. *Über die spezifischen Granulationen des Blutes.* 1879;571
- Ellenbroek B, Youn J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease models & mechanisms.* Oct 1 2016;9(10):1079-1087. doi:10.1242/dmm.026120
- Elsaid R, Meunier S, Burlen-Defranoux O. A wave of bipotent T/ILC-restricted progenitors shapes the embryonic thymus microenvironment in a time-dependent manner. *Blood.* Feb 25 2021;137(8):1024-1036. doi:10.1182/blood.2020006779
- Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *Journal of Experimental Medicine.* 2006;203(4):1105-1116. doi:10.1084/jem.20051615 %J Journal of Experimental Medicine
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L. The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic¹. *The Journal of Immunology.* 2004;172(3):1455-1462. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1455
- Finch DK, Stolberg VR, Ferguson J. Lung Dendritic Cells Drive Natural Killer Cytotoxicity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease via IL-15R α . *American journal of respiratory and critical care medicine.* Nov 1 2018;198(9):1140-1150. doi:10.1164/rccm.201712-2513OC
- Forbes C, Nierkens S, Cornel AM. Thymic NK-Cells and Their Potential in Cancer Immunotherapy. *ImmunoTargets and therapy.* 2024;13:183-194. doi:10.2147/itt.S441639
- Forkel M, Berglin L, Kekalainen E. Composition and functionality of the intrahepatic innate lymphoid cell-compartment in human nonfibrotic and fibrotic livers.

- European journal of immunology. Aug 2017;47(8):1280-1294.
doi:10.1002/eji.201646890
- Fort MM, Cheung J, Yen D. IL-25 Induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-Associated Pathologies In Vivo. Immunity. 2001/12/01/ 2001;15(6):985-995.
doi:https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00243-6
- Freeman CM, Stolberg VR, Crudginton S. Human CD56+ cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. PloS one. 2014;9(7):e103840. doi:10.1371/journal.pone.0103840
- Fujimoto M, Yokoyama M, Kiuchi M. Liver group 2 innate lymphoid cells regulate blood glucose levels through IL-13 signaling and suppression of gluconeogenesis. Nature Communications. 2022/09/15 2022;13(1):5408. doi:10.1038/s41467-022-33171-6
- Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. Journal of Leukocyte Biology. 2009;86(3):513-528. doi:10.1189/JLB.0309135 %J Journal of Leukocyte Biology
- Gao B, Radaeva S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2013/07/01/ 2013;1832(7):1061-1069. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.09.008
- Gasteiger G, Fan X, Dikiy S, Lee SY, Rudensky AYJS. Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. 2015;350(6263):981-985.
- Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. Review. 2017-October-13 2017;8doi:10.3389/fimmu.2017.01296
- Ghaedi M, Steer Catherine A, Martinez-Gonzalez I, Halim Timotheus YF, Abraham N, Takei F. Common-Lymphoid-Progenitor-Independent Pathways of Innate and T Lymphocyte Development. Cell Reports. 2016/04/19/ 2016;15(3):471-480.
doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.039
- Ginzel M, Martynov I, Haak R, Lacher M, Kluth D. Midgut development in rat embryos using microcomputed tomography. Commun Biol. Feb 12 2021;4(1):190.
doi:10.1038/s42003-021-01702-4

- Golub R, Cumano A. Embryonic hematopoiesis. Blood cells, molecules & diseases. Dec 2013;51(4):226-231. doi:10.1016/j.bcmd.2013.08.004
- Gonzalez-Polo V, Pucci-Molineris M, Cervera V. Group 2 innate lymphoid cells exhibit progressively higher levels of activation during worsening of liver fibrosis. 10.1016/j.aohep.2018.12.001. Ann Hepatol. Mar-Apr 2019;18(2):366-372. doi:10.1016/j.aohep.2018.12.001
- Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. Immunity. Jan 27 2012;36(1):55-67. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.016
- Graham LV, Khakoo SI, Blunt MD. NK Cells in the Lymph Nodes and Their Role in Anti-Tumour Immunity. 2024;12(8):1667.
- Gregoire C, Chasson L, Luci C. The trafficking of natural killer cells. Immunological reviews. Dec 2007;220(1):169-182. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x
- Haberthür D. High resolution tomographic imaging of the alveolar region of the mammalian lung. 2010.
- Hamaguchi M, Okamura T, Fukuda T. Group 3 Innate Lymphoid Cells Protect Steatohepatitis From High-Fat Diet Induced Toxicity. Original Research. 2021-March-15 2021;12doi:10.3389/fimmu.2021.648754
- Helfrich S, Hamann AA, Less C, Duerr CU. To the lymph node and beyond: migratory ILC3s regulate innate and adaptive immune responses. 2021;99(5):442-445. doi:https://doi.org/10.1111/imcb.12457
- Hernández-Torres DC, Stehle C. Embryonic ILC-poiesis across tissues. Mini Review. 2022-December-20 2022;13doi:10.3389/fimmu.2022.1040624
- Hill M. Embryology rat development. 2019.
- Hoorweg K, Peters CP, Cornelissen F. Functional differences between human NKp44- and NKp44+ RORC+ innate lymphoid cells. 2012;3:72.
- Horn V, Sonnenberg GF. Group 3 innate lymphoid cells in intestinal health and disease. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2024/06/01 2024;21(6):428-443. doi:10.1038/s41575-024-00906-3

- Hsu AT, Gottschalk TA, Tsantikos E, Hibbs ML. The Role of Innate Lymphoid Cells in Chronic Respiratory Diseases. Mini Review. 2021-September-22 2021;12doi:10.3389/fimmu.2021.733324
- Huang J, Deng K, Liu Y, Xia M, Lei M, Wu M. Global research trends on innate lymphoid cells in the brain, gut and lung field: a bibliometric and visualized analysis. Original Research. Front Immunol. 2024-February-07 2024;15:1336666. doi:10.3389/fimmu.2024.1336666
- Huang Y, Guo L, Qiu J. IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. Nat Immunol. Feb 2015;16(2):161-169. doi:10.1038/ni.3078
- Huang Y, Mao K, Chen X. S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. 2018;359(6371):114-119.
- Iannaccone PM, Jacob HJ. Rats! Disease models & mechanisms. May-Jun 2009;2(5-6):206-210. doi:10.1242/dmm.002733
- Ishizuka IE, Chea S, Gudjonson H. Single-cell analysis defines the divergence between the innate lymphoid cell lineage and lymphoid tissue-inducer cell lineage. Nat Immunol. Mar 2016;17(3):269-276. doi:10.1038/ni.3344
- Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. Development (Cambridge, England). Jun 2013;140(12):2463-2467. doi:10.1242/dev.083147
- Jakob MO, Spari D, Sánchez Taltavull D. ILC3s restrict the dissemination of intestinal bacteria to safeguard liver regeneration after surgery. Cell Reports. 2023/03/28/ 2023;42(3):112269. doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112269
- Jarade A, Garcia Z, Marie S. Inflammation triggers ILC3 patrolling of the intestinal barrier. Nature Immunology. 2022/09/01 2022;23(9):1317-1323. doi:10.1038/s41590-022-01284-1
- Jiao Y, Huntington ND, Belz GT, Seillet C. Type 1 Innate Lymphoid Cell Biology: Lessons Learnt from Natural Killer Cells. Review. Frontiers in Immunology. 2016;7

- Jones R, Cosway EJ, Willis C. Dynamic changes in intrathymic ILC populations during murine neonatal development. *European journal of immunology*. Sep 2018;48(9):1481-1491. doi:10.1002/eji.201847511
- Jowett GM, Norman MDA, Yu TTL. ILC1 drive intestinal epithelial and matrix remodelling. *Nature Materials*. 2021/02/01 2021;20(2):250-259. doi:10.1038/s41563-020-0783-8
- Karre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol*. Mar 2002;55(3):221-228. doi:10.1046/j.1365-3083.2002.01053.x
- Kästele V, Mayer J, Lee ES. Intestinal-derived ILCs migrating in lymph increase IFN γ production in response to *Salmonella Typhimurium* infection. *Mucosal immunology*. May 2021;14(3):717-727. doi:10.1038/s41385-020-00366-3
- Kim BS, Artis D. Group 2 innate lymphoid cells in health and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Jan 8 2015;7(5)doi:10.1101/cshperspect.a016337
- Kim CH, Hashimoto-Hill S, Kim MJTii. Migration and tissue tropism of innate lymphoid cells. 2016;37(1):68-79.
- Kim S, Iizuka K, Kang H-SP. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. 2002;3(6):523-528.
- Klose CS, Flach M, Möhle L. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. 2014;157(2):340-356.
- Klose CS, Kiss EA, Schwierzeck V. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6 $^{+}$ ROR γ $^{+}$ innate lymphoid cells. 2013;494(7436):261-265.
- Kluth D, Jaeschke-Melli S, Fiegel H. The embryology of gut rotation. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2003/11/01/ 2003;12(4):275-279. doi:https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2003.08.009
- Kokkinou E. Innate Lymphoid Cell Differentiation and Functions in Intestinal Homeostasis and Disease. Karolinska Institutet (Sweden); 2022.
- Koprivica I, Stanisavljević S, Mićanović D, Jevtić B, Stojanović I, Miljković Đ. ILC3: a case of conflicted identity. Review. *Frontiers in Immunology*. 2023;14

- Kuper CF, Beems RB, Hollanders VMH. Development and Aging, Thymus, Rat. In: Jones TC, Ward JM, Mohr U, Hunt RD, eds. Hemopoietic System. Springer Berlin Heidelberg; 1990:257-263.
- Lanier LLJARI. NK cell recognition. 2005;23(1):225-274.
- Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. Science immunology. Mar 1 2019;4(33)doi:10.1126/sciimmunol.aau6085
- Li M, Wang Z, Jiang W, Lu Y, Zhang J. The role of group 3 innate lymphoid cell in intestinal disease. Front Immunol. 2023;14:1171826. doi:10.3389/fimmu.2023.1171826
- Liang Z, Anderson HD, Locher V. Eomes expression identifies the early bone marrow precursor to classical NK cells. Nat Immunol. Jul 2024;25(7):1172-1182. doi:10.1038/s41590-024-01861-6
- Liu C, Gong Y, Zhang H. Delineating spatiotemporal and hierarchical development of human fetal innate lymphoid cells. Cell Res. Oct 2021;31(10):1106-1122. doi:10.1038/s41422-021-00529-2
- Luo X, Xie H, Chen D. Changes in NK and NKT cells in mesenteric lymph nodes after a Schistosoma japonicum infection. Parasitol Res. Mar 2014;113(3):1001-1009. doi:10.1007/s00436-013-3732-5
- Mackley EC, Houston S, Marriott CL. CCR7-dependent trafficking of RORgamma(+) ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. Nat Commun. Jan 9 2015;6:5862. doi:10.1038/ncomms6862
- Macpherson AJ, Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. The Journal of experimental medicine. Mar 20 2006;203(3):497-500. doi:10.1084/jem.20060227
- Magri G, Miyajima M, Bascones S. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. Nat Immunol. Apr 2014;15(4):354-364. doi:10.1038/ni.2830

- Mantani PT, Dunér P, Bengtsson E. IL-25 inhibits atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient mice. *PloS one*. 2015;10(1):e0117255. doi:10.1371/journal.pone.0117255
- Matsumoto A, Kanai T, Mikami Y. IL-22-Producing ROR γ t-Dependent Innate Lymphoid Cells Play a Novel Protective Role in Murine Acute Hepatitis. *PloS one*. 2013;8(4):e62853. doi:10.1371/journal.pone.0062853
- Mebius RE, Miyamoto T, Christensen J. The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45+CD4+CD3- cells, as well as macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. Jun 1 2001;166(11):6593-6601. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6593
- Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. Developing lymph nodes collect CD4+ CD3- LT β + cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. 1997;7(4):493-504.
- Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. Apr 2003;3(4):292-303. doi:10.1038/nri1054
- Melo-Gonzalez F, Kammoun H, Evren E. Antigen-presenting ILC3 regulate T cell-dependent IgA responses to colonic mucosal bacteria. *The Journal of experimental medicine*. Apr 1 2019;216(4):728-742. doi:10.1084/jem.20180871
- Mikulak J, Bruni E, Oriolo F, Di Vito C, Mavilio D. Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. Review. 2019-April-30 2019;10doi:10.3389/fimmu.2019.00946
- Mjosberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Nov 2016;138(5):1265-1276. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.009
- Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK. Human IL-25-and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. 2011;12(11):1055-1062.
- Moawad RS, Hegab AS, Barey M, Sabry R. Prenatal development of the liver in albino rat. 2014;1:1-20.

- Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*. Nov 2011;12(11):1045-1054. doi:10.1031/ni.2131
- Moro K, Yamada T, Tanabe M. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. Jan 28 2010;463(7280):540-544. doi:10.1038/nature08636
- Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Nature*. 2014;343(6178):1249288.
- Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2014/10/01 2014;14(10):667-685. doi:10.1038/nri3738
- Nabekura T, Riggan L, Hildreth AD, O'Sullivan TE, Shibuya AJI. Type 1 innate lymphoid cells protect mice from acute liver injury via interferon- γ secretion for upregulating Bcl-xL expression in hepatocytes. *Cell*. 2020;52(1):96-108. e9.
- Nabekura T, Shibuya A. Type 1 innate lymphoid cells: Soldiers at the front line of immunity. *Biomedical journal*. Apr 2021;44(2):115-122. doi:10.1016/j.bj.2020.10.001
- Nagasawa M, Spits H, Ros XR. Innate Lymphoid Cells (ILCs): Cytokine Hubs Regulating Immunity and Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Dec 3 2018;10(12)doi:10.1101/cshperspect.a030304
- Naito M, Kumanogoh A. Group 2 innate lymphoid cells and their surrounding environment. *Inflammation and Regeneration*. 2023/03/20 2023;43(1):21. doi:10.1186/s41232-023-00272-8
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. Apr 29 2010;464(7293):1367-1369. doi:10.1038/nature08900
- Newland SA, Mohanta S, Clément M. Type-2 innate lymphoid cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nature Communications*. 2017/06/07 2017;8(1):15781. doi:10.1038/ncomms15781

- Nossal G, Cunningham A, Mitchell G, Miller JJTJoem. Cell to cell interaction in the immune response: III. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice. 1968;128(4):839-853.
- Ochel A, Tiegs G, Neumann K. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Liver and Gut: From Current Knowledge to Future Perspectives. 2019;20(8):1896.
- Oherle K, Acker E, Bonfield M. Insulin-like Growth Factor 1 Supports a Pulmonary Niche that Promotes Type 3 Innate Lymphoid Cell Development in Newborn Lungs. Immunity. Feb 18 2020;52(2):275-294.e9. doi:10.1016/j.immuni.2020.01.005
- Okada S, Markle JG, Deenick EK. IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations. Science. Aug 7 2015;349(6248):606-613. doi:10.1126/science.aaa4282
- Orimo K, Saito H, Matsumoto K, Morita H. Innate Lymphoid Cells in the Airways: Their Functions and Regulators. Allergy, asthma & immunology research. May 2020;12(3):381-398. doi:10.4168/aaair.2020.12.3.381
- Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. Experimental hematology. Aug 2001;29(8):927-936. doi:10.1016/s0301-472x(01)00669-5
- Panda SK, Colonna M. Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. Review. Front Immunol. 2019-May-07 2019;10:861. doi:10.3389/fimmu.2019.00861
- Poggi A, Benelli R, Venè R. Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. Front Immunol. 2019;10:961. doi:10.3389/fimmu.2019.00961
- Price AE, Liang H-E, Sullivan BM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. 2010;107(25):11489-11494.
- Qiu J, Heller JJ, Guo X. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. Immunity. Jan 27 2012;36(1):92-104. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.011
- Rankin L, Groom JR, Chopin M. T-bet is essential for NKp46+ innate lymphocyte development through the Notch pathway. 2013;14(4):389.

Rats! Nat Methods. Jun 2010;7(6):413. doi:10.1038/nmeth0610-413

Robinette ML, Fuchs A, Cortez VS. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. Nat Immunol. Mar 2015;16(3):306-317. doi:10.1038/ni.3094

Ryu S, Lim M, Kim J, Kim HY. Versatile roles of innate lymphoid cells at the mucosal barrier: from homeostasis to pathological inflammation. Experimental & Molecular Medicine. 2023/09/01 2023;55(9):1845-1857. doi:10.1038/s12276-023-01022-z

Sadeghalvad M, Khijakadze D, Orangi M, Takei F. Flow cytometric analysis of innate lymphoid cells: challenges and solutions. Original Research. Front Immunol. 2023-September-22 2023;14:1198310. doi:10.3389/fimmu.2023.1198310

Saez A, Gomez-Bris R, Herrero-Fernandez B, Mingorance C, Rius C, Gonzalez-Granado JM. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Homeostasis and Inflammatory Bowel Disease. International journal of molecular sciences. Jul 16 2021;22(14)doi:10.3390/ijms22147618

Sanos SL, Bui VL, Mortha A. ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. 2009;10(1):83-91.

Schittny JC. Development of the lung. Cell and tissue research. Mar 2017;367(3):427-444. doi:10.1007/s00441-016-2545-0

Seillet C, Huntington ND, Gangatirkar P. Differential requirement for Nfil3 during NK cell development. 2014;192(6):2667-2676.

Serafini N, Jarade A, Surace L. Trained ILC3 responses promote intestinal defense. 2022;375(6583):859-863. doi:doi:10.1126/science.aaz8777

Shi F-D, Ljunggren H-G, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. Nature Reviews Immunology. 2011/10/01 2011;11(10):658-671. doi:10.1038/nri3065

- Shin SB, McNagny KM. ILC-You in the Thymus: A Fresh Look at Innate Lymphoid Cell Development. Review. 2021-May-06 2021;12doi:10.3389/fimmu.2021.681110
- Sparano C, Solís-Sayago D, Vijaykumar A. Embryonic and neonatal waves generate distinct populations of hepatic ILC1s. 2022;7(75):eabo6641. doi:doi:10.1126/sciimmunol.abo6641
- Spits H, Artis D, Colonna M. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. Feb 2013;13(2):145-149. doi:10.1038/nri3365
- Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annual review of immunology*. 2012;30(Volume 30, 2012):647-675. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075053
- Sudworth A, Segers FM, Yilmaz B. Innate lymphoid cell characterization in the rat and their correlation to gut commensal microbes. *European journal of immunology*. May 2022;52(5):717-729. doi:10.1002/eji.202149639
- Sugimura R, Wang CY. The Role of Innate Lymphoid Cells in Cancer Development and Immunotherapy. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2022;10:803563. doi:10.3389/fcell.2022.803563
- Sun X-H, Bajana S. ILC Differentiation in the Thymus. In: Sun X-H, ed. *Innate Lymphoid Cells*. Springer Nature Singapore; 2022:25-39.
- Sunaga S, Tsunoda J, Teratani T, Mikami Y, Kanai T. Heterogeneity of ILC2s in the Intestine; Homeostasis and Pathology. *Front Immunol*. 2022;13:867351. doi:10.3389/fimmu.2022.867351
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. 2001;7(1):94-100.
- Tan JKH, Watanabe T. Determinants of postnatal spleen tissue regeneration and organogenesis. *NPJ Regenerative medicine*. 2018;3:1. doi:10.1038/s41536-018-0039-2

- Teng F, Tachó-Piñot R, Sung B. ILC3s control airway inflammation by limiting T cell responses to allergens and microbes. *Cell Rep.* Nov 23 2021;37(8):110051. doi:10.1016/j.celrep.2021.110051
- Thompson IM. What is the Significance of the Spleen?: An Anatomical and Physiological Review. *Canadian Medical Association journal.* Jul 1926;16(7):813-818.
- Tougaard P, Ruiz Pérez M, Steels W. Type 1 immunity enables neonatal thymic ILC1 production. 2024;10(3):eadh5520. doi:doi:10.1126/sciadv.adh5520
- Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity.* Apr 2004;20(4):477-494. doi:10.1016/s1074-7613(04)00076-7
- Trittel S, Chambers BJ, Heise U, Guzmán CA, Riese P. Key features and homing properties of NK cells in the liver are shaped by activated iNKT cells. *Scientific Reports.* 2019/11/08 2019;9(1):16362. doi:10.1038/s41598-019-52666-9
- Valle-Noguera A, Ochoa-Ramos A, Gomez-Sánchez MJ, Cruz-Adalia A. Type 3 Innate Lymphoid Cells as Regulators of the Host-Pathogen Interaction. *Review.* 2021-September-29 2021;12doi:10.3389/fimmu.2021.748851
- Van de Pavert SA, Mebius REJNRI. New insights into the development of lymphoid tissues. 2010;10(9):664-674.
- van de Pavert SA. Layered origins of lymphoid tissue inducer cells. *Immunological reviews.* May 2023;315(1):71-78. doi:10.1111/imr.13189
- van de Pavert SA. Lymphoid Tissue inducer (LTi) cell ontogeny and functioning in embryo and adult. *Biomedical journal.* Apr 2021;44(2):123-132. doi:10.1016/j.bj.2020.12.003
- Vanderkerken M, Baptista AP, De Giovanni M. ILC3s control splenic cDC homeostasis via lymphotoxin signaling. *Journal of Experimental Medicine.* 2021;218(5):e20190835. doi:10.1084/jem.20190835
- Vdovíaková K, Vdovíaková K, Petrovová E. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Medical science monitor : international medical*

- journal of experimental and clinical research. Dec 2 2016;22:4716-4728.
doi:10.12659/msm.899129
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. 2011;331(6013):44-49.
- Vivier E, Spits H, Cupedo T. Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair? Nat Rev Immunol. Apr 2009;9(4):229-234. doi:10.1038/nri2522
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini SJNi. Functions of natural killer cells. 2008;9(5):503-510.
- Vivier E. The discovery of innate lymphoid cells. Nature Reviews Immunology. 2021/10/01 2021;21(10):616-616. doi:10.1038/s41577-021-00595-y
- Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them? Nat Rev Immunol. Feb 2013;13(2):75-87. doi:10.1038/nri3349
- Walzer T, Bléry M, Chaix J. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. 2007;104(9):3384-3389.
- Wang J, Li F, Zheng M, Sun R, Wei H, Tian Z. Lung natural killer cells in mice: phenotype and response to respiratory infection. Immunology. Sep 2012;137(1):37-47. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03607.x
- Wang S, Li J, Wu S. Type 3 innate lymphoid cell: a new player in liver fibrosis progression. Clinical Science. 2018;132(24):2565-2582. doi:10.1042/CS20180482
%J Clinical Science
- Warner N, Szenberg A, Burnet FMJAJoEB, Science M. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken: I. Dissociation of immunological responsiveness. 1962;40(5):373-388.
- Weinzirl J, Scheffers T, Garnitschnig L, Andrae L, Heusser P. Does the Spleen Have a Function in Digestion? Medical History, Phylogenetic and Embryological Development of the Splenogastric System. Complementary medicine research. 2020;27(5):357-363. Die Milz ein Verdauungsorgan? Zur Entwicklung des

splenogastrischen Systems in Medizingeschichte, Phylogenese und Embryologie.
doi:10.1159/000506390

Weizman O-E, Adams NM, Schuster IS. ILC1 confer early host protection at initial sites of viral infection. 2017;171(4):795-808. e12.

White AJ, Baik S, Parnell SM. A type 2 cytokine axis for thymus emigration. The Journal of experimental medicine. Aug 7 2017;214(8):2205-2216.
doi:10.1084/jem.20170271

Xiong L, Nutt SL, Seillet C. Innate lymphoid cells: More than just immune cells. Review. 2022-October-26 2022;13doi:10.3389/fimmu.2022.1033904

Yang D, Guo X, Huang T, Liu C. The Role of Group 3 Innate Lymphoid Cells in Lung Infection and Immunity. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2021;11:586471. doi:10.3389/fcimb.2021.586471

Yuan X, Rasul F, Nashan B, Sun C. Innate lymphoid cells and cancer: Role in tumor progression and inhibition. European journal of immunology. Sep 2021;51(9):2188-2205. doi:10.1002/eji.202049033

Zheng M, Zhu J. Innate Lymphoid Cells and Intestinal Inflammatory Disorders. 2022;23(3):1856.

Zook EC, Kee BL. Development of innate lymphoid cells. Nat Immunol. Jun 2016;17(7):775-782. doi:10.1038/ni.3481

EKLER



Tarih: 05.01.2022

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:22/001

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.01.2022 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMIŞ	Veteriner Hekim	Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Bölümü'nden Prof.Dr.Erdoğan UN "Sıçanlarda Prenatal ve Postnatal Dönemde Doğal Lenfoid Hücrelerinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 05.01.2022

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza :

SIÇANLARDA PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMDE DOĞAL LENFOİD HÜCRELERİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

2

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

www.bdbiosciences.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

tur.acousticbiotech.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

mafiadoc.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

www.biolegend.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.ncbi.nlm.nih.gov

İnternet Kaynağı

<%**1**

9

aacrjournals.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Hüseyin YİĞİT

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM

DERECE	KURUM	MEZUNİYET
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Anatomisi	2019
Lisans	Erciyes Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik	2016
Lise	Turgut Özal Anadolu Lisesi	2011

İŞ DENEYİMLERİ

YIL	KURUM	GÖREV
2018-devam ediyor	Kapadokya Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

YDS 72,5 (2017), Yökdil 80 (2020)

SCI-E İndeksli Yayınlar

1. Effect of cervical and lumbosacral spina bifida cystica on volumes of intracranial structures in children, H Yiğit, H Güler, H Yılmaz, ÜÖ Gümü, ZF Karaman, T Güneş, Child's Nervous System 40 (2), 527-535
2. Ophthalmic artery originating from anterior inferior cerebellar artery: a rare variation, A Gökoğlu, H Yiğit, E Inan, B Öztürk, H Dönmez, A Selçuklu, Surgical and Radiologic Anatomy, 1-4.
3. Effects of pseudoephedrine on rat fetal bone development: evaluation by three different methods, H Yiğit, E Balcıoğlu, İ Uçar, M Değermenci, GÖ Önder, T Ceylan, E Unur, Anatomical Science International 99 (1), 48-58.