



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FAREDE KALBE ÖZGÜ DUYU NÖRONLARININ KÜLTÜR VE
DOKUDA MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

ZEYNEP BEGÜM DURDU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İSTANBUL, 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Sahibi : Zeynep Begüm DURDU
Tez Başlığı : Farede Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Kültür ve Dokuda
Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 19.08.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç.Dr. Esra ÇAĞAVI

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Arzu KARABAY
KORKMAZ

İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 20.08/2019 tarih ve 2019.../26...-09... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Zeynep Begüm DURDU



TEŞEKKÜR

Tez çalışması ve yüksek lisans hayatım boyunca, tecrübe ve bilgisi ile çalışmama yol gösteren, her konuda yardım ve fedakârlık eden, bu çalışma ile kendimi geliştirmemi, bilgi ve beceri kazanmamı sağlayan, her zaman sevgi, saygı ve güler yüzü ile hatırlayacağım değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Esra Çağavi' ye

Laboratuvara başladığım ilk günden beri yanımda olan ve bana desteğini hiç esirgemeyen benim canım arkadaşım Gizem Örs'e,

Çalışmalarım boyunca bana hep yardımcı ve destek olan, tecrübelerinden çokça yararlandığım, ekip arkadaşım, manevi ablam Tuba Akgül Çağlar'a,

Laboratuvarımızın araştırmacı doktoru, *in vivo* ve çizimler konusunda bana her zaman yardımcı olan çok sevgili arkadaşım Mehmet Uğurcan Turhan'a,

Laboratuvarı ailem gibi görmemi sağlayan, ekip arkadaşlarım Tuğçe Torun, Sevilay Şahoğlu Göktaş, Arzuhan Koç, Yusuf Enes Kazcı ve Gökçe İlayda Söztekin'e,

Laboratuvarımızın daimî stajyerleri çok yardımsever arkadaşlarım Musab Güzel ve Aylin Nebol'a,

Yüksek lisansa beraber başladığımız ve tez yazımına beni hep teşvik eden canım arkadaşlarım Harbiye Hacıbektaşoğlu ve Oğuzhan Köse'ye,

Üniversite hayatım boyunca bana laboratuvarı sevdiren, beni hep koruyup kollayan yardımlarını hiç esirgemeyen canım arkadaşlarım Büşra Alper, Sinem Kadioğlu, Tuğçe Nur Eralp ve Sinem Güneri'ye,

Hücre kültürü çalışmalarında desteklerini hiç esirgemeyen, her zaman yardımcı olan çok sevgili Neşe Aysit ve Sadık Bay'a

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan tüm REMER ve MEDİTAM idari ve akademik personeline,

Eğitim hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan, duydukları sonsuz sevgi ve güveni hissettiren, her daim yanımda olan, sahip olduğum en büyük hazinem olan sevgili aileme,

Lise ve üniversite hayatım boyunca yanımda ve bana her zaman destek olan sevgili dostlarım Selen Gençsoy, Gizem Keçeloğlu ve Enes Derya'ya en içten sevgilerimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xiii
1 ÖZET.....	1
2 ABSTRACT.....	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4 GENEL BİLGİLER	7
4.1 Kalp Gelişimi ve Fizyolojisi.....	7
4.2 Kalp Anatomisi ve Fonksiyonu.....	8
4.3 Kalpte Elektriksel Aktivite ve Aksiyon Potansiyeli.....	9
4.4 Sinir Sistemi ve Gelişimi.....	10
4.5 Sinir Hücresi ve Çeşitleri.....	11
4.6 Merkezi ve Periferik Sinir Sistemi	14
4.7 Somatik ve Otonom Sinir Sistemi	16
4.8 Kalp ve Sinir Sistemi İlişkisi.....	16
4.9 Duyu Nöronları ve Organ İlişkisi.....	18
4.10 Kalbe Özgü Duyu Nöronları.....	19
4.11 Arka Kök Gangliyon.....	20
4.12 Noduz Gangliyon.....	22
4.13 Ağrı.....	23

4.13.1	Ağrı Reseptörleri.....	23
4.13.2	Kalp ve Ağrı.....	24
4.13.3	Ağrı ile İlişkilendirilen Genler.....	25
4.14	Retrograde Boyalar ve Uygulamaları.....	28
4.14.1	Fluoro-Gold.....	29
4.14.2	Fast Blue.....	29
4.14.3	Wheat Germ Agglutinin.....	29
4.14.4	Kolera Toksin B.....	30
4.14.5	DiI.....	30
4.14.6	Di-8-ANEPPQ.....	31
5	METOT VE MATERYAL.....	32
5.1	Deney Dizaynı.....	32
5.2	Fare Soyları.....	33
5.3	Kullanılan Sarf Malzemeler ve Vasatlar.....	33
5.4	Cihazlar.....	36
5.5	qRTPCR'da Kullanılan Primerler.....	37
5.6	<i>In vivo</i> Opere Edilecek Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	38
5.7	Trakeostami.....	39
5.8	Farede <i>in vivo</i> Retrograde İşaretleme.....	39
5.9	Fareden Doku İzolasyonu.....	40
5.9.1	Nodoz Gangliyon (NG) İzolasyonu.....	40
5.9.2	Arka Kök Gangliyon (AKG) İzolasyonu.....	41
5.10	Fare Primer Hücre Kültürü.....	42
5.10.1	Hücre Plak Yüzey Matrisleri.....	42
5.10.2	Sinir Hücre Kültürü.....	42
5.11	Floresanca Aktifleştirilmiş Hücre Ayırışması (FACS).....	43

5.12	İmmünohistokimyasal (IHC) İnceleme.....	44
5.13	İmmünohistokimyasal (IHC) İnceleme	45
5.14	Di-8-ANEPPQ ile İşaretli Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Yer ve Yüzdesinin Doku Kesitlerinde Haritalaması.....	46
5.15	RNA İzolasyonu	46
5.15.1	RNA Kantifikasyonu.....	47
5.15.2	cDNA Sentezi.....	48
5.15.3	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	49
6	BULGULAR.....	50
6.1	Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının <i>In Vivo</i> İşaretlenmesi ve İşaretli Dokuların Görüntülenmesi.....	50
6.2	Di-8-ANEPPQ İşaretli Doku Kesitlerinde IHC Optimizasyon Çalışması ..	52
6.3	Kalbe Özgü Duyu Nöronlarını WGA ve Di-8-ANEPPQ ile İşaretlenmesi ve Karşılaştırılması	53
6.4	Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının FACS ile Saflaştırılması	55
6.5	Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Morfolojik İncelenmesi	56
6.6	AKG ve NG Dokusunda Kalbe Dallanan Duyu Nöron Somalarının Histolojik İncelenmesi	60
6.7	Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının qRT-PCR ile Değerlendirilmesi	62
6.8	Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Ağrı Reseptörü Proteinleri Ekspresyonun Değerlendirilmesi.....	65
6.9	AKG ve NG Doku Kesitlerinde Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Haritalama Çalışması.....	67
7	TARTIŞMA VE SONUÇ	69
8	KAYNAKLAR	76
9	ETİK KURUL ONAYI.....	85
10	ÖZGEÇMİŞ	87



KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	: Adenozin difosfat
AKG	: Arka kök gangliyon
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
Ca⁺²	: Kalsiyum
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CGRP	: Kalsitonin genine bağlı peptid
CHRNA6	: Kolinerjik Reseptör Nikotinik Alfa 6 Alt Ünitesi
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
Di-8-ANNEPPQ	: 6-(Diocylamino)-2-(2-(4-pyridyl)ethenyl)naphthalene
DiI	: DiIC18(3); 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri
DRG	: Dorsal root ganglion
EKG	: Elektrokardiyografi
EtOH	: Etanol
FACS	: Floresanla Aktive Olmuş Hücre Ayrıcı
FBS	: Fetal sığır serumu
FB	: Fast Blue
FG	: Fluoro-Gold
HLH	: Helix-loop-helix geni
HRP	: Horseradish peroksidaz
HSSN	: Heart Specific Sensory Neuron

ICC	: İmmünohistokimya
IHC	: İmmünohistokimya
K⁺	: Potasyum
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na⁺	: Sodyum
NBA	: Nörobazal besiyeri
NG	: Noduz gangliyon
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NPY2R	: Nöropeptit Reseptör Y Tip 2
P2RX2	: Pürinerjik reseptör X tip 2
P2RY1	: Purinerjik Reseptör Y Tip 2
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFA	: Paraformaldehit
RPM	: Revolutions Per Minute
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute besiyeri
RNA	: Ribonükleik asit
SCN10A	: Voltaja duyarlı sodyum kanalı alfa 10. alt ünitesi
TRPA1	: Geçici Reseptör Potansiyel Ankrin 1
TRPV1	: Geçici Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (Transient Receptor Potential Cation Channel subfamily V member 1)
TRPV2	: Geçici Reseptör Potansiyel Vanilloid 2
TRKA	: Tropomyosin reseptör kinaz A
WGA	: Weat Germ Agglutinin

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.3.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler	33
Tablo 5.3.2. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler ve malzemeler	33
Tablo 5.3.3. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar	34
Tablo 5.3.4. Hücre kültüründe kullanılan besi yeri içerikleri	34
Tablo 5.3.5. İmmun boyamalarda kullanılan malzemeler.....	35
Tablo 5.3.6. Antikorlar ve Florasan işaretleyiciler	35
Tablo 5.4.1. Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihazlar	36
Tablo 5.4.2. <i>In vivo</i> operasyonlarda kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	36
Tablo 5.5.1. AKG ve NG hücrelerinin karakterizasyonu için kullanılan kantitatif gerçek zamanlı PCR primerleri.....	37
Tablo 5.15.1. Qubit RNA ölçüm kiti için kullanım miktarları.....	48
Tablo 5.15.2. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.....	48
Tablo 5.15.3. qRT-PCR reaksiyon içeriği.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Embriyoda kalp gelişim evrelerinin şematik gösterimi.	8
Şekil 4.2.1. Kalbin yapısı ve ileti sistemi.....	9
Şekil 4.3.1. Aksiyon potansiyeli grafiği.....	10
Şekil 4.5.1. Nöronların uzantılarına göre sınıflandırılması.....	12
Şekil 4.5.2. Fonksiyonlarına göre nöronların sınıflandırılması.....	13
Şekil 4.6.1. İnsanın omurilik anatomisi	15
Şekil 4.8.1. Kalp sinir sisteminin anatomisi ve dağılımı.....	17
Şekil 4.11.1 Fareye ait omuriliğin şematik gösterimi.	21
Şekil 4.12.1. Noduz anatomisi	23
Şekil 4.13.1. Kalp ve ağrı ilişkisinin şema ile gösterilmesi	25
Şekil 4.13.2. Ağrı reseptörlerinde bulunan iyon kanallarının sinir hücresi üzerinde gösterilmesi	27
Şekil 4.14.1. Retrograd ve Anterograd boyaların mekanizması	29
Şekil 5.1.1. Çalışmanın deneysel basamak ve yöntemlerini içeren şema.	32
Şekil 5.10.1. AKG ve NG izolasyonun şematik olarak gösterilmesi.	43
Şekil 6.1.1. Di-8-ANEPPQ ile işaretlenen sağ ve sol kostadan alınan AKG ve NG dokularının konfokal mikroskobunda görüntülenmesi.	51
Şekil 6.1.2. Di-8-ANEPPQ ile işaretlenen sağ ve sol kostadan alınan AKG dokularının konfokal mikroskobunda görüntülenmesi.....	51
Şekil 6.2.1. Di-8-ANEPPQ işaretli AKG kesitlerde fiksatif sıcaklığı değişkenine bağlı IHC optimizasyonu.	52
Şekil 6.2.2. Di-8-ANEPPQ işaretli kesitlerde fiksatif ve epitop açığa çıkarma tekniğine bağlı IHC optimizasyonu.	53
Şekil 6.3.1. Retrograde boyanan AKG ve NG doku kesitlerinin immunohistokimyasal incelenmesi.....	54
Şekil 6.3.2. Kalbine Di-8-ANEPPQ+WGA enjekte edilen farenin operasyondan 5 gün sonra NG dokularının konfokal mikroskobunda görüntülenmesi.....	55
Şekil 6.4.1. Fare kalbine in vivo Di-8-ANEPPQ verilmesi sonrası AKG ve NG hücrelerinin FACS analizi ve floresan görüntüsü.	56
Şekil 6.5.1. Kalbe özgü duyu nöronları ve kontrol nöronların ışık mikroskobu ve immunohistokimyasal boyama sonrası görüntülenmesi.	57

Şekil 6.5.2. Kalbe özgü duyu AKG ve NG nöronları ile heterojen AKG ve NG nöronlarının gövde alanı, akson kalınlığı ve akson dallanmalarının karşılaştırmalı değerlendirmesi.....	58
Şekil 6.5.3. Kalbe özgü duyu AKG ve kontrol AKG gangliyonların gövde alanı analizlerinin grafik olarak gösterimi.....	59
Şekil 6.5.4. Kalbe özgü duyu NG ve kontrol NG gangliyonların gövde alanı analizlerinin grafik olarak gösterimi.....	60
Şekil 6.6.1. Kalbe boya verilen fareden alınan farklı bölümlerden alınan AKG kesitlerinin görüntülenmesi.....	61
Şekil 6.6.2. Kalbe özgü duyu AKG kesitlerinin immunohistokimyasal boyama sonrası görüntülenmesi.....	62
Şekil 6.7.1 Kalbe özgü duyu NG hücrelerinde ağrı reseptörleri gen ifade analizi.....	64
Şekil 6.7.2 Kalbe özgü duyu AKG hücrelerinde ağrı reseptörleri gen ifade analizi..	65
Şekil 6.8.1. <i>In vivo</i> olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretli NG kesitinde ağrı ile ilişkilendirilen proteinlerle boyama sonrası görüntülenmesi.....	66
Şekil 6.8.2. <i>In vivo</i> olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretli T1 seviyedeki AKG kesitinin ağrı ile ilişkilendirilen proteinlerle boyama sonrası görüntülenmesi.....	66
Şekil 6.9.1. Kesitleri birleştirme basamakları	67
Şekil 6.9.2. Kalbe özgü duyu nöronlarını doku boyutunda haritalama çalışması.....	68
Şekil 6.9.3. Di-8-ANEPPQ işaretli dokuların haritalama sonrası yüzdelik dağılımı. 68	

RESİMLER LİSTESİ

Resim 5.7.1. BalbC farelerin trakeostomi yöntemi ile entübasyonu.....	39
Resim 5.8.1. Fare kalbine Di-8-Anepq boyasının verilme basamakları	40
Resim 5.9.1. Nodoz diseksiyonun basamakları.	41
Resim 5.9.2. AKG diseksiyonunun basamakları	42



1 ÖZET

FAREDE KALBE ÖZGÜ DUYU NÖRONLARININ KÜLTÜR VE DOKUDA MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Duyusal veriler kalpten beyne arka kök gangliyon (AKG) ve nodoz gangliyon (NG) vasıtası ile iletilir. Son yıllarda, akciğer, bağırsak, mide gibi organlara özgü duyu nöronları tanımlanmış olmasına rağmen kalbe özgü duyu nöronları henüz moleküler ve elektrofizyolojik düzeyde detaylı incelenmemiştir. Literatürde kalp ile ilişkili duyu sinir gövdelerinin NG ve AKG’de bulunduğunu gösteren araştırmalar, histolojik incelemeler ile sınırlı kalmıştır. Bu tez çalışması kapsamında farelerin kalbine retrograd bir boya olan Di-8-ANEPPQ verilerek kalbe özgü duyu nöronları işaretlendi. AKG ve NG’ler işaretlenmeden bir hafta sonra doku ve hücresele düzeyde incelendi. İlk olarak kalbe özgü nöronları AKG ve NG’den ayrıştırılarak FACS ile saflaştırıldı. AKG’de kalbe özgü duyu nöronlarının, heterojen nöron popülasyonuna göre gövde alanı ve akson kalınlığının anlamlı olarak küçük olduğunu belirledik. Bu veri kalbe özgü nöronların farklı bir subpopülasyona ait olabileceğini ve küçük çaplı ağrı nöronlarını içerdiğini göstermektedir. NG ve AKG’de ağrı reseptör gen ifade analizi yapıldı ve önceki çalışmada yaptığımız transkriptom analizi ile uyumlu veriler elde edildi. Kalbe özgü duyu nöronlarındaki ağrı reseptör genleri IHC ile incelendiğinde, TRPV1’in doku boyutunda anlatımı olduğu ve işaretli hücrelerle örtüştüğü görülürken, P2RX2 ve SCN10A anlatımının daha az olduğu ve örtüşmediğini tespit ettik. NG ve omuriliğin C8 ve T1-T5 seviyesinde konumlanan AKG’lerde doku boyutunda 3-boyutlu haritalama sonucu Di-8-ANEPPQ ile işaretli hücrelerin dokuda heterojen bir dağılım gösterdiği ve toplam nöron popülasyonunun NG’de yaklaşık %5’ini, AKG’lerde %1-3’ünü oluşturduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu tez çalışması ile literatürde ilk kez kalbe özgü NG ve AKG duyu nöronlarının dokuda lokalizasyonu ve oranı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, kalbe özgü duyu nöronlarının tanımlanması ve kalp-sinir sistemi etkileşiminin sistemler seviyesinde anlaşılmasına katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: Kalbe Özgü Duyu Nöronu, Arka Kök Gangliyon, Nodoz Gangliyon, Di-8-ANEPPQ, 3 boyutlu haritalama

*Bu araştırma TÜBİTAK 1001 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı tarafından 115S381 nolu ve BAP 2018/19 proje kapsamında desteklenmiştir.

2 ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MOUSE HEART-SENSORY NEURONS IN CULTURE AND TISSUE.

Sensory information from the heart is transferred to the brain via the dorsal root ganglion (DRG) and nodose ganglion (NG). Although, internal organs, such as lung, intestine, and stomach, have specific sensory neuron populations, heart-specific sensory neurons (HSSN) have not been described in a molecular level, yet. In the literature, sensory neuron axons innervating have been examined on the sensory nerve nodes. However, these studies have been limited to histological analysis. In this thesis study, a retrograde Di-8-ANEPPQ dye, was injected into the hearts of mice. One week after the labelling, the DRG and NG were dissociated and the HSSN were isolated using FACS to be examined in the cell culture. As a result of our morphological analysis of DRG and NG cells, we have shown that both the neuron cell body area and the axon diameter of the HSSN were significantly smaller than those of heterogeneous neurons that are not purified in FACS. This novel data indicates that the HSSN may belong to a different subpopulation and to functionally define, expression of nociceptor genes were investigated, generating consistent results with previous transcriptome data. The genes of pain receptors in the HSSN were identified by IHC. We found that TPRV1 overlapped with labeled cells whereas the expression of P2RX2 and SCN10A was less and did not overlap. It was found that the cells labelled with Di-8-ANEPPQ demonstrated a heterogeneous distribution in the tissue after the 3-dimensional tissue mapping of DRGs located at C8, T1, T3 and T5 levels of the spinal cord and NG. It was also found that heart-specific sensory neurons constitute 5% of the total NG neurons and %1-3 of total DRG neurons. As a result, the localization and ratio of the heart-specific DRG and NG cells in the tissue were investigated for the first time in this thesis. The outcomes of this thesis study provide the identification of the heart-specific sensory neurons in tissue and the understanding of the interaction between heart and sensory nervous system.

Keywords: Heart-Specific Sensory Neuron, Dorsal Root Ganglion, Nodose Ganglion, Di-8-ANEPPQ, 3D mapping.

*This study was supported by TÜBİTAK under 1001 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 115S381 and BAP 2018/19

3 GİRİŞ VE AMAÇ

Kalp hastalıkları, günümüzde klinikte yaygın olarak görülen bir hastalık grubudur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda Türkiye nüfusunun %34'ünde kalp hastalıklarına rastlama riski tespit edilmiştir (1). Klinikte en sık rastlanan olgulardan biri olan kalp krizi ise, kalbi besleyen damarların tıkanması sonucu kalbe yeterli besin ve oksijen iletilmemesi ve buna bağlı olarak dokuda nekroz oluşması durumudur (2,3). Kalp krizi hastalarda göğüste baskı, kolda ve göğüs bölgesinde ağrı veya mide bulantısı gibi birçok farklı semptom olarak kendini gösterebilmektedir (4). Göğüs bölgesinde gelişen bu ağrı hissini ya da diğer duyu verilerin kalpten beyne aktarılmasında kullanılan duyu nöron ağrı, lokalizasyonu ve moleküler yolları büyük ölçüde bilinmemektedir.

Genel olarak duyu verileri kalpten beyne, vagus sinirinin inferior gangliyonu olan NG ve omurilikte bulunan AKG'ler aracılığıyla iletilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda duyu nöronları ve organlar arasındaki ilişki incelenmiş ve bağırsak, akciğer, mide gibi organlara özgü duyu nöronları tanımlanmıştır (5,6). Kalbe özgü duyu nöronlarını tanımlamaya yönelik yapılan az sayıda histolojik çalışmada ise, kalbe özgü nöronların omuriliğin servikal ve torakal segmentlerinde ve NG'de yoğun olduğu tespit edilmiş fakat detaylı moleküler düzeyde çalışmalar yapılmamıştır (7). AKG ve NG'de bulunan duyu nöronlarının kalpte oluşan ağrı, basınç ve gerilme bilgilerini taşıyabildiği düşünülmektedir (7). Bu hücrelerin kalp ile olan moleküler ve hücresel düzeyde etkileşimi hakkında literatürde bilgiye rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında temel amaçlarımız, ilk olarak AKG ve NG'de bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının *in vivo* işaretlemesi sonrasında ayrıştırılarak kültürü ve moleküler karakterizasyonu, daha sonra nöron spesifik proteinlerle immün işaretlemesi yapılarak morfolojik ve kantitatif incelemesi ile gen ifade analizi; ikinci amacımız ise kalbe özgü duyu nöronlarını doku kesitlerinde konum (mapping) ve toplam hücre grubuna oranını literatürde ilk olarak belirlenmesidir. Bu amaçla çalışmada kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek için retrograd bir boya olan Di-8-ANEPPQ *in vivo* enjeksiyon ile fare kalbine verildi. Enjeksiyondan bir hafta sonra farelerden alınan AKG ve NG dokularından elde edilen hücrelerden yeşil floresan

işaretle kalbe özgü duyu nöronları FACS ile saflaştırıldı. FACS sonrası analizlerde genel NG ve AKG hücre popülasyonunun %2-4'nün Di-8-ANEPPQ işaretle duyu nöronları olduğu tespit edildi. Saflaştırılan hücrelerden alınan floresan görüntülerde, Di-8-ANEPPQ boyalı NG ve AKG sinir hücrelerinin yeşil floresan ile yüksek canlılıkta olduğu gözlemlendi.

Kalbe özgü duyu nöronlarının gövde çaplarının 100-300 µm aralığında olduğu, saflaştırılmamış heterojen kontrol nöronların 100-1000 µm aralığında olan gövde çaplarına göre daha küçük olduğu gözlemlendi. Kalbe özgü duyu nöronlarının nöronal karakterini, gövde alanı, akson dallanması ve akson kalınlığı analizi yapmak amacıyla hücreler nöron belirteci olan TUJ1 ile immün boyandı. Kalbe özgü duyu AKG nöron kültürlerinde kontrole göre istatistiksel anlamlı olarak gövde alanları ve akson kalınlığının daha küçük olduğu tespit edildi. Kalbe özgü duyu NG'ler ve kontrol NG hücreleri arasında ise akson kalınlığı ve dallanmalarında anlamlı bir fark görülmedi. Morfolojik analizler sonucu kalbe özgü duyu nöronlarının yoğun olarak küçük nöronları içermesi nedeniyle farklı bir alt popülasyona sahip olabileceği kanısına varıldı. Bu alt popülasyonun yoğun olarak literatürde tanımlanan küçük çaplı ağrı reseptörlerini içerdiği düşünüldü.

Duyu nöronlarının morfolojik olarak sınıflandırılması sonucu, küçük çaplı olan nöronların ağrı reseptörleri olduğu tanımlanmıştır (8). Yaptığımız analizler sonucunda kalbe özgü duyu nöronlarında küçük çaplı daha fazla hücre olduğunu belirledik. Tamamlanmış olan 115S381 nolu TÜBİTAK projemiz kapsamında yapılan transkriptom analizlerinde ağrı reseptörlerinde bulunan P2RX2 ve SCN10A genlerinin ekspresyon ifade seviyelerine göre kalbe özgü duyu AKG ve NG hücrelerinde anlamlı olarak yüksek ifade edildiği belirlenmişti. Tuba AKGÜL ÇAĞLAR'ın doktora tez çalışmasının transkriptom sonuçlarını doğrulamak ve kalbe özgü duyu nöronlarını tanımlamak amacıyla, ağrı reseptörlerinde bulunan P2RX2, SCN10A, TRPV1, TRPV2, CHRNA6, TRKA1, TRPA1 genlerinin ifadesi qRT-PCR ile incelendi. Sonuç olarak kalbe özgü duyu NG nöronlarındaki SCN10A, TRPA1 ve TRPV2 gen anlatımında transkriptom ile uyumlu veriler elde edildi. Kalbe özgü duyu AKG nöronları ve heterojen nöron örnekleri kullanılarak yapılan qRT-PCR sonuçlarında ise

kalbe özgü duyu AKG nöronlarında P2RX2 transkriptoma uyumlu şekilde ifade edildiği belirlenmiştir.

Kalbe özgü duyu nöronlarını doku boyutunda incelemek amacıyla, gen ifade analizlerinden yola çıkarak belirlenen ve ağrı reseptörlerinde bulunan TRPV1, SCN10A, P2RX2 proteinlerini tespit etmeye yönelik yapılan immün boyamalar sonucu NG ve AKG dokusunda Di-8-ANEPPQ işaretli nöronların tamamı TRPV1 proteinini ifade ettiğini göstermiştir. P2RX2 ve SCN10A'nın Di-8-ANEPPQ işaretli az sayıda hücrede anlatımı olduğu belirlenmiştir.

Literatürde omurilikte bulunan dorsal boynuzun (horn) laminar bir organizasyona sahip olduğu çeşitli çalışmalarda detaylı gösterilmiştir (9). Termal uyaranlar kullanılarak, dorsal boynuzda hangi lamina düzeyinin uyarıldığını gösteren yayınlar mevcuttur (10). Bu tez çalışmasında ise ağrıya cevap veren somaları içeren AKG ve NG dokularında omuriliğe benzer laminar organizasyonun olup olmadığını değerlendirmek amacıyla Di-8-ANEPPQ işaretli NG ve C8, T1, T3, T5 seviyelerindeki AKG dokularının analizleri sonucu kalbe özgü duyu nöronlarının NG ve AKG'lerde heterojen bir dağılım gösterdiğini belirledik. NG'lerde bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının AKG'ye oranla istatistiksel anlamlı şekilde daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Kalbe özgü duyu nöronlarının NG'deki hücre popülasyonunun yaklaşık %5'ini oluşturduğu belirledik. AKG'ler arasında C8 ve T1-T5 arasındaki hücre popülasyonunda kalbe özgü duyu nöronlarının yaklaşık %2-3'lük bir orana sahip olduğu tespit ettik.

Bu tez çalışması kapsamında kalbe özgü duyu nöronlarını tanımlamada kullanılabilecek aday genleri belirlemeye yönelik veriler elde edilmiştir. Genel ağrı reseptörü olan TRPV1'in kalbe özgü duyu nöronlarının tamamında ifade edildiği gösterilmiştir. Gen ifade analizlerinde kalbe özgü duyu nöronlarında heterojen kültürlerle göre istatistiksel anlamlılık gösteren ve biyobelirteç potansiyeli taşıyan, SCN10A ve P2RX2 gibi genlerin AKG ve NG'de IHC analizleri yapıldı. Literatürde ilk kez kalbe özgü duyu nöronlarının AKG ve NG dokularındaki konum ve yüzdesi tespit edilmiştir. Elde edilen veriler bilimsel toplantılarda poster ve sözlü olarak

sunulmuştur. İleride yapılacak çalışmalarda, aday ağrı reseptör genleri bulunarak transgenik fare hatları oluşturulması, üretilecek bu hayvanlarda, kalp ile duyu sinir ilişkisi moleküler ve fonksiyonel olarak incelenmesi mümkündür.



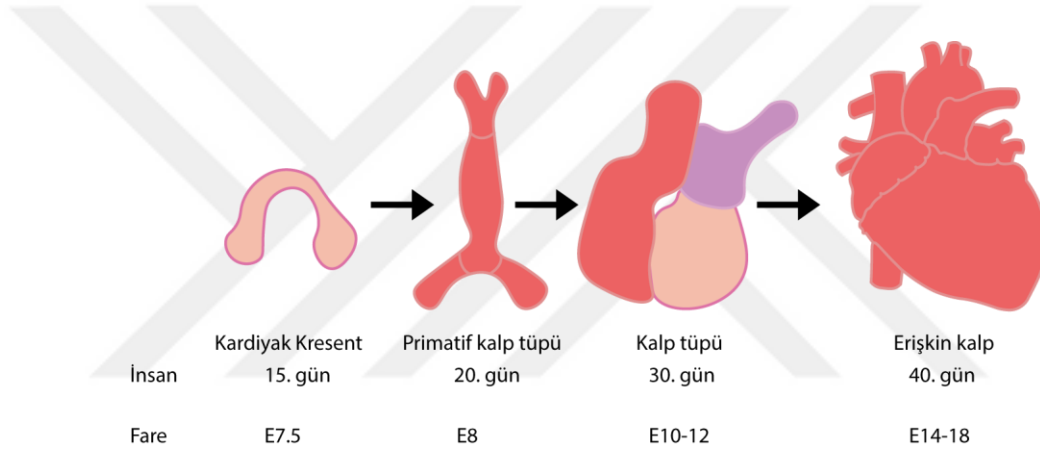
4 GENEL BİLGİLER

4.1 Kalp Gelişimi ve Fizyolojisi

Embriyo, gelişiminin ilk döneminde besin ihtiyacını difüzyon yoluyla karşılayabilmektedir. Ancak kısa zamanda hızlı bir şekilde büyümesi nedeniyle oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılayacak, ayrıca metabolik olarak atık ürünleri yapısından uzaklaştırabilecek yeni bir sisteme ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenlerden dolayı embriyoda gelişimini tamamlayan ilk sistem kardiyovasküler sistemdir. Kalbin gelişimi, embriyonun 20. gününde başlamaktadır (11,12). Embriyoda, kalp ilk olarak kardiyojenik bölgeden gelişmeye başlar. Kalbin geliştiği bu bölge, embriyonun mezodermal kraniyal lateral bölgesine kardiyak progenitörlerin yerleşmesi ile oluşur ve bu bölgeye primer kalp alanı (first heart field) adı verilmiştir. Kardiyak progenitör hücreleriyle birlikte bunlardan köken aldığı bilinen kardiyomiyosit hücreleri, NKX2-5 ve GATA4 transkripsiyon faktörlerini kalp gelişiminin erken dönemlerinde ifade edebilmektedir. Kardiyojenik kordon yapılarını kardiyojenik bölge ile endodermden salgılanan kimyasal faktörler oluşturmaktadır. Endokardiyal kalp tüpleri olarak adlandırılan lümenler, kardiyojenik kordon içerisinde gelişmeye başlarlar (13). Bu tüpler birbirlerine yaklaşarak ilkel kalp tüpünü meydana getirirler. İlkel kalp uzadıkça perikardiyuma katlanmayı gerçekleştirmektedir. Bu katlanmayla beraber ana damarları ve odaları hizaya getirir ve S şeklindeki yapının oluşması sağlanır. Bu S şeklindeki bu yapı insan embriyosunun 23-28. günlerinde meydana gelir (14). Miyokardiyum, kardiyomiyositlerin oluşturduğu kardiyak jel ve epikardiyum, bu epimiyokard tabakası tarafından oluşturulur. Epikardiyum sinir hücreleri ve kan damarlarınca zengin bağ dokudan meydana gelmiş iken, miyokardiyum kardiyomiyositlerce zengin kas dokusudur. Embriyonun 28. gününden itibaren kalpte spontan kasılmalar oluşmaktadır. Aktin filamentlerin miyozin filamentlerinin üzerinden kaymasıyla kardiyak kasılmalar gözlenmektedir. Kasılmada görev alan proteinleri kodlayan MHC (Myosin Heavy Chain) ve MLC (Myosin Light Chain) genleri ile troponin-tropomiyozin kompleksinin kalp gelişiminin bu aşamasında karakteristik rol oynadığı bilinmektedir.

Fare kalp gelişimi insan gelişimine benzer fakat daha kısa sürede gerçekleşir. Fare kalbi, erken gastrulasyon sırasında primitive çizginin mezodermal hücrelerinden

oluşmaktadır. Farede kalp gelişiminde, anterior mezoderimde bulunan kalp progenitör hücreleri embriyonun 7,5. gününde primer kalp alanı oluşturur (15). Birincil kalp alanı 8. günde orta hatta göç eder ve kalp tüpünü oluşturur. Birincil ve ikincil kalp alanlarının genişlemesi ile atriya ve ventriküller oluşur. Kalp tüpünün orta kısmı, daha sonra sol ve sağ ventriküller oluşturan kardiyak döngüyü oluşturmak için bükülür 9. günde endokardiyal bölge ve kalbin ileride oluşacak kapakçıkları oluşur. Ventriküler yüzey 10. günde epikardiyal hücreler tarafından kapatılır. 15. günde, atriyal ve ventriküllerde septum ve kapakçık oluşur (15). Sol ventrikül ve sol ve sağ atriyal primer kalp alanı; sağ ventrikül, çıkış yolu ve sol ve sağ atriyal sekonder kalp alanı tarafından oluşturulur. Embriyonun 14,5. gününde farede kalp gelişimi tamamlanır (Şekil 4.1.1).

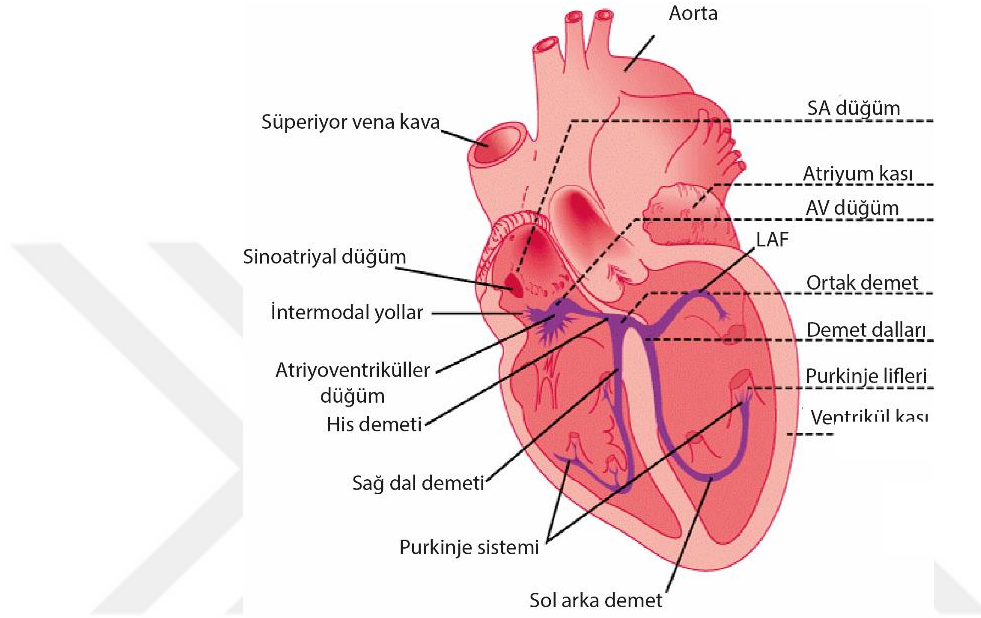


Şekil 4.1.1. Embriyoda kalp gelişim evrelerinin şematik gösterimi.

4.2 Kalp Anatomisi ve Fonksiyonu

Dolaşım sistemi; kalp, kalbe bağlı damarlar ve kandan oluşur. Sürekli ve kapalı bir sistem olduğu için de madde alış-verişi kılcıl damarlarda gerçekleşir (16). Kalp içten dışa doğru endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyum tabakalarından meydana gelir. Kalp kası miyokardiyum tabakasını oluşturur. Miyokardiyum işlev ve yapı bakımından çizgili kasa benzemekte ve fonksiyonel olarak otonom kontrole bağlıdır. (11). Kalbin otonom kontrolünü atriyoventriküler düğüm ve sinoatriyal düğüm olarak adlandırılan iki bölüm sağlamaktadır (17). Kalbin kasılması normal şartlarda düzenli bir sırayla gerçekleşmektedir. Atriyum kasılmasını (sistol) ventrikül kasılması izler ve gevşeme sırasında dört boşluğun tamamı gevşemektedir. Kalbin atımını sağlayan sistem özelleşmiş kalp ileti sistemidir ve bu sistem aracılığı ile

miyokardın tüm bölümlerine yayılmaktadır. İleti sistemini oluşturan yapılar sinoatriyal düğüm (SA), internodal atriyal yollar, atriyoventriküler düğüm (AV), His demeti ve dalları ile Purkinje sisteminden meydana gelmiştir (Şekil 4.2.1). SA düğümde olan uyarılar atriyum yollarını geçerek AV düğüme, bu düğümden his demetine, his demeti dallarından da Purkinje sisteminden geçerek ventrikül kaslarına yayılmaktadır (18).



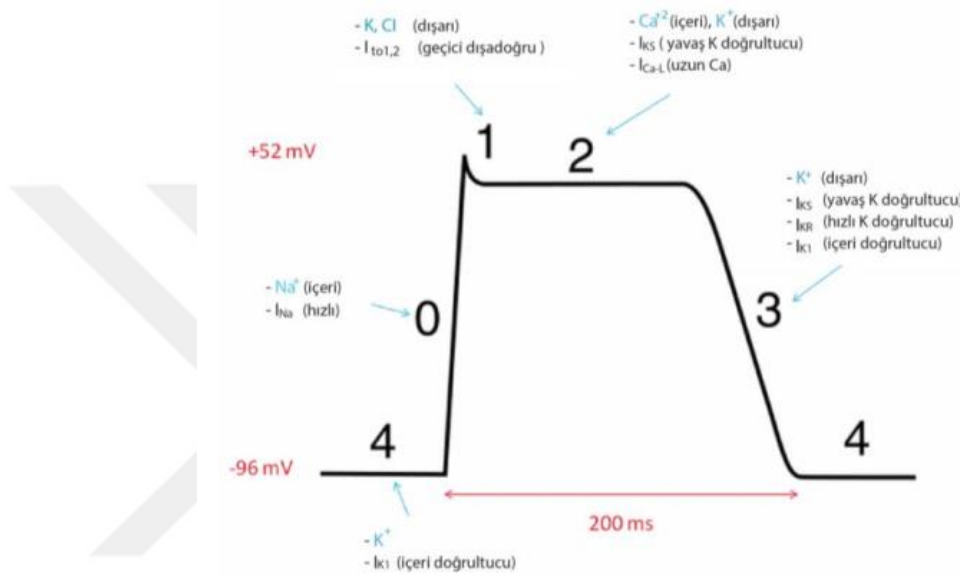
Şekil 4.2.1. Kalbin yapısı ve ileti sistemi (11).

4.3 Kalpte Elektriksel Aktivite ve Aksiyon Potansiyeli

Kardiyomiyositlerde oluşan aksiyon potansiyeli ile kalbin kasılması başlamaktadır (11). Kardiyak aksiyon potansiyeli beş fazdan oluşur. Faz 0, 1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırılır (Şekil 4.3.1). 0. fazda, duyarlı Na^+ kanalları hızlıca açılır, sodyum hücre içine girer ve membran depolarizasyonu gerçekleşir. Depolarizasyon sonu hücre içi ve dışı arasında potansiyel fark meydana gelir ve membran potansiyeli -60 mV'dan, -40 mV'a çıkar. 1. fazda Na^+ kanalları kapanır, Cl^- hücre içerisine girmeye başlar ve kısmi repolarizasyon gerçekleşir. Daha sonra eşik değerinin aşılması ile geçici potasyum kanalları açılarak K iyonlarının hücre dışına çıkmasına neden olur. K^+ çıkışı ile hücre zarı potansiyeli -15 mV olur.

K^+ hücre dışına yavaş olarak çıkarken; Na^+ ve Cl^- hücre içine yavaşça girer. Plato fazı aksiyon potansiyelin en uzun süren bölümüdür. 2. fazda hücre içerisine alınan kalsiyum sarkoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum kanallarının açılmasına, bunun

sonucunda sarkoplazmik retikulumdaki kalsiyum iyonlarının hücre sitoplazmasına geçisini sağlamaktadır. Na^+ ve Ca^{+2} yavaş giriş kanalları kapanır ve K^+ için hızlı kanal aktivasyonu devam eder. Böylece repolarizasyonun son fazı oluşur. Potansiyelin 3. fazında I_{Ks} ve I_{Kr} kanalları depolarizasyon ile açılır ve yaklaşık -55mV zar potansiyeliyle kanal kapanır. Faz 4'te aksiyon potansiyeli biterek dinlenme fazı başlar. Na^+/K^+ pompası aracılığı ile iyonlar durağan fazdaki hücre içi konsantrasyonlarına ulaşır (19).



Şekil 4.3.1. Aksiyon potansiyeli grafiği.

4.4 Sinir Sistemi ve Gelişimi

Sinir sistemi embriyonun 21-28. günleri arasında ektodermin kalınlaşmış bölümü olan nöral plaktan gelişmektedir. Nöral plaktan; krista nöralis ve nöral tüp oluşur. Nöral tüpün ön kısmına nöroporus anterior, arka kısmına nöroporus posterior olarak adlandırılmıştır (20,21). İlk olarak nöroporus anterior 25-26.günde kapanmakta ve daha sonra nöral tüpün kraniyal kısmından beyin ventrikülleri ve merkezi kanallar oluşmaktadır. 4.çift somitin kaudalinde kalan nöral tüp omurilik olarak gelişmektedir ve nöral tüpün duvarlarındaki nöroepitelyal hücrelerden, nöronlar ve makroglialar oluşmaktadır. Nöral kristadan oluşan yapılar; kraniyal ve spinal gangliyonların nöronları, satellit ve schwann hücreleri, sempatik ve parasempatik gangliyonların postgangliyonik nöronları olarak sınıflandırılmaktadır (20,21).

Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü (RUNX) ailesinin üyeleri olan RUNX1 ve RUNX3'ün, duyu nöronlarının gelişimsel sürecinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. RUNX transkripsiyon faktörleri, gelişimsel süreçte farklı zamanlarda hem transkripsiyonu inhibe hem de aktive ederek görev yapmakta ayrıca duyu nöronlarının farklı alt tiplerini (Nosiseptör, mekanoreseptör ve propriyoseptör) moleküler ve fonksiyonel olarak karakterize eden genlerin ifadelenmesini sağlamaktadır. Ayrıca bu transkripsiyon faktörlerinin, aksonal büyüme ve hücre ölüm yolları ile ilişkilendirilen çeşitli çalışmalarda bulunmaktadır (22).

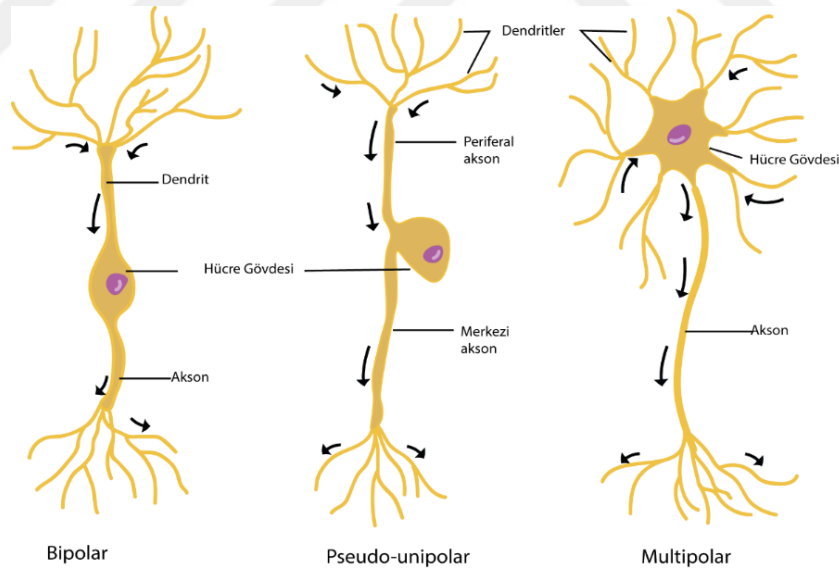
Periferik sinir sisteminin gelişmesinde; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin ailesi (NT3 ve NT4), nörotrofin reseptörü p75 (p75NTR), yüksek afiniteli Trk reseptör kinazları (Trk A, B ve C) gibi çeşitli genler ve büyüme faktörleri rol oynamaktadır (23). NGF, TrkA reseptörünün substratı olarak, reseptörü aktive eder ve sempatik sinirlerin büyümesini, hayatta kalmasını ve korunmasını destekler. NGF gibi NT3'de doğumdan önce duysal ve sempatik sinir sistemi elemanlarının gelişimi ve korunmasında ve doğumdan sonra sempatik innervasyonda rol oynamaktadır (24). Helix-loop-helix (HLH) genleri, nöral hücre kaderinin ve sinirsel hücre oluşumunun erken belirlenmesinde önemlidir. Mash1, tüm sempatik ve parasempatik nöronların gelişimi için gereklidir ve nöral krest hücrelerinde ifade edilir. Memelilerde sinir sisteminin merkezi ve periferik bölümlerinin oluşumu için, HLH, Mash1 ve Neurogenin-1 (Ngr-1) genleri ifade edilir ve otonom ve duysal nöronların gelişimini destekler (25,26).

4.5 Sinir Hücresi ve Çeşitleri

Sinir sistemini nöron adı verilen sinir hücreleri ile glia adı verilen destek hücreleri oluşturmaktadır. Nöronlar, duyu algılanması, motor ve duysal cevapların oluşturulması, öğrenme ve hafıza gibi fonksiyonların yerine getirilmesini sağlayan hücrelerdir. Morfolojik olarak hücre gövdesi (soma), akson, dendrit ve sinaptik terminallerden oluşmaktadır (27).

Sinir hücresinin soması, çekirdek ve sitoplazmadan oluşmakta ve bu somanın dendrit ve akson olarak adlandırılan uzantıları bulunmaktadır. Hücre gövdesinden

dallanan dendritlerin görevi diğer sinir hücreleriyle bağlantı kurup bu hücrelerden gelen uyarıların hücre gövdesine iletilmesini sağlamaktır. Diğer bir uzantı olan aksonların görevi ise hücre gövdesinden gelen uyarıların organlara ve diğer sinir hücrelerine iletmektir (27). Nöronlar uzantılarının sayısına göre unipolar, bipolar ve multipolar olarak sınıflandırılır (Şekil 4.5.1). Aksonlar genellikle dendritlerden uzun olup, kendi uzunlukları boyunca, akson terminalleri adı verilen birçok damar benzeri dal yapısı oluşturur. Bu dalların her birinin ucunda sinaptik terminal adı verilen, diğer nöronların gövdeleri veya dendritleri ile bağlantı kurabilen yapılar bulunur. Bağlantı kurdukları noktalara ise sinaps adı verilir. Sinir hücrelerinin membranı kimyasal, mekanik ve elektriksel uyarıcılara karşı duyarlıdır. Bu tür uyarıcılar sonucunda nöronun transmembran potansiyelinde değişiklikler aksiyon potansiyeli olarak akson boyunca ilerlemektedir. Sinir sisteminde nöronların dışında ayrıca glia adı verilen yardımcı hücreler bulunur. Glia hücreleri temel olarak nöronları desteklemekte, beslemesini sağlamakta ve koruyucu kılıf oluşturabilmekte, ortamdaki iyon konsantrasyonunu ayarlayarak nöronların çalışmasını düzenleyebilmektedir.

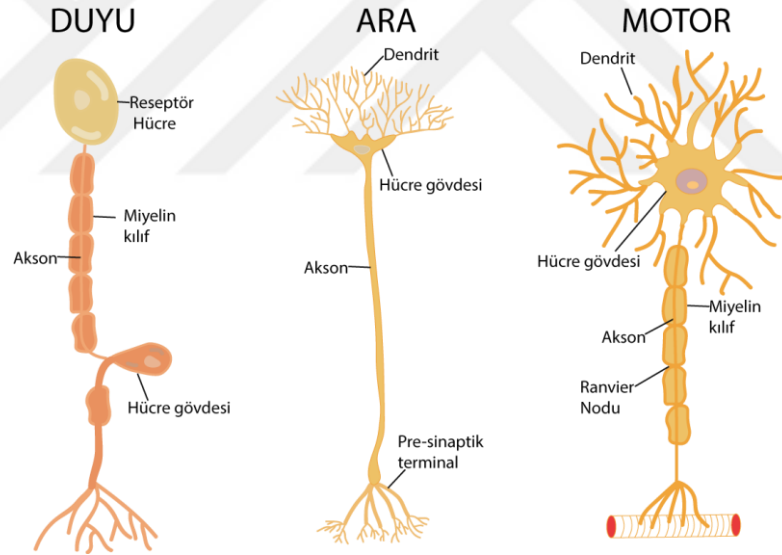


Şekil 4.5.1. Nöronların uzantılarına göre sınıflandırılması

Unipolar nöronlar, bir uzantıya sahip olup, otonom sinir sistemindeki gangliyonlarda bulunmaktadır ve bu nöronların bu nöronların hücre gövdesinden çıkan dendritleri yoktur. **Bipolar nöronların** periferik ve merkezi olmak üzere iki uzantısı vardır. Bu uzantılardan periferik olanı nöronun dendritidir, periferden hücre gövdesine impuls taşır; merkezi olanı ise nöronun aksonudur ve gelen impulsu MSS (merkezi

sinir sistemi)’ne taşır. Bipolar nöronların çoğu duyu nöronlarında bulunmaktadır. **Pseudo-unipolar nöronlar**, bipolar nöronların özel bir tipi olarak tanımlanan ve duyu nöronlarında yoğun olarak bulunan nöronlardır. Pseudo-unipolar nöronların periferik uzantıları çeşitli reseptörlerden dokunma, basınç, ağrı ve ısı gibi duyuları hücre gövdesine taşırken, merkezi uzantıları ise gelen impulsları omuriliğe iletir (27). **Multipolar nöronların** bir aksonu ve hücre gövdesinden çıkan çok sayıda dendriti vardır. MSS’deki nöronların büyük çoğunluğu multipolar nöronlardır.

Nöronlar fonksiyonel olarak motor, duyu ve internöronlar olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 4.6.1). Duyu nöronları, çeşitli reseptörlerden aldıkları cevapları merkezi sinir sistemine, motor nöronlar ise merkezi sinir sisteminden gelen cevapları kaslara ve salgı bezlerine iletirler. Duyu ve motor nöronların dışında kalan tüm nöronlar internöronlar olarak sınıflandırılır. İnternöronlar, MSS’deki nöronların çoğunluğunu oluşturur (20,27).



Şekil 4.5.2. Fonksiyonlarına göre nöronların sınıflandırılması.

Motor Nöronlar, MSS’den gelen uyarılar sonucu, organların ve sistemlerin çalışmasını aktive veya inhibe ederek düzenler. Motor nöronlar, somatik nöronlar ve visseral motor nöronlar olmak üzere ikiye ayrılır (7). Somatik motor nöronları, iskelet kaslarını inerve eder. Visseral motor nöronlar ise organlar ve damarlar gibi istek dışında çalışan yapıların aktivitelerini düzenleyen nöronlardır. Bu nöronlar sempatik veya parasempatik olmalarına göre çeşitli visseral fonksiyonları aktive veya inhibe eder.

İnternöronlar, MSS'deki nöronların çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bu nöronların görevi genel olarak aldıkları impulsları merkezi sinir sistemi içerisinde bir nörondan diğerine taşımaktır. Bu nedenle internöronların uzantıları merkezi sinir sisteminin dışına çıkmamaktadır. İnternöronlar, motor ve duyu nöronları arasında yer alır. Duyu nöronlarından gelen sinyaller bağlı olarak motor cevabın yönetiminde uyarıcı veya inhibe edici roller oynayabilir (28).

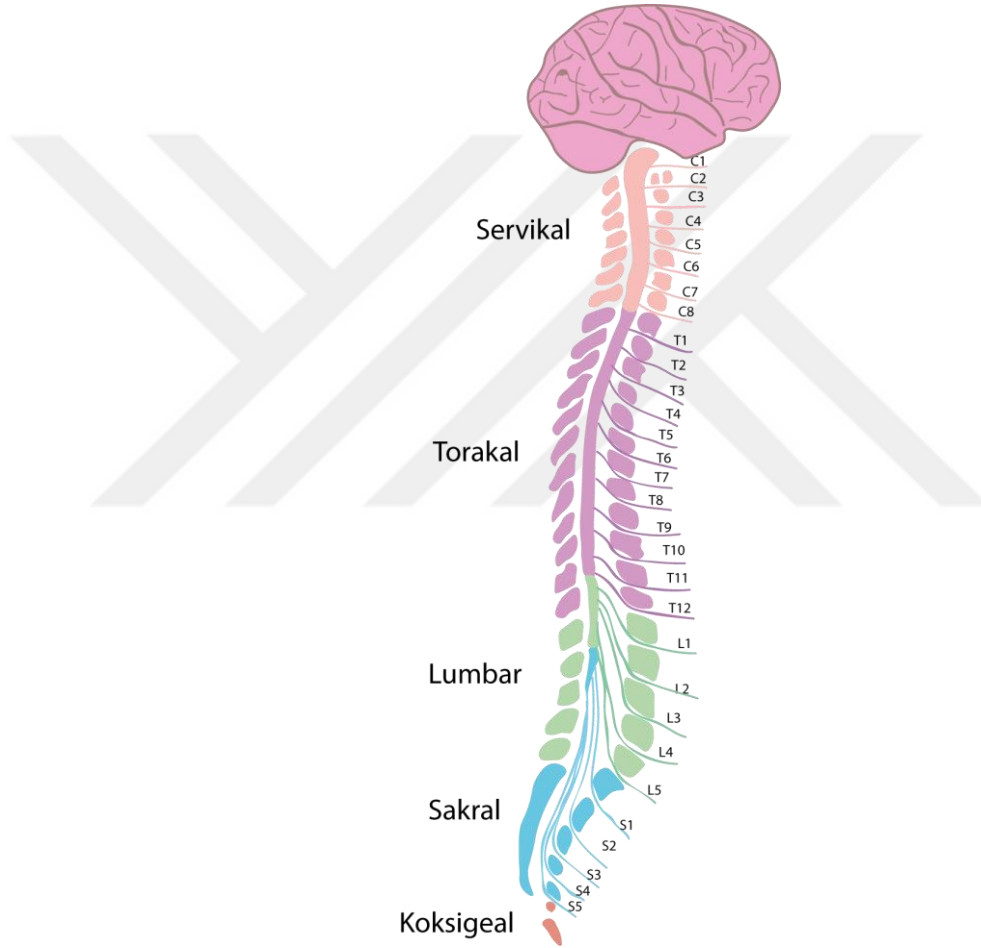
Duyu Nöronları, vücuttaki duyuşal sinyali alarak merkezi sinir sistemine iletmektedirler. Duyu nöronları, tatma, koklama, duyma, görme gibi içgüdüsel becerilerimizi katkı sağlayan önemli yapılardır (29). Bu nöronlar günlük hayatımızda ve tehlike anında vücudumuzun uyarılmasını sağlayarak, vücudumuzdaki diğer mekanizmaların devreye girmesini sağlarlar. Duyu nöronları fonksiyonel olarak somatik duyu nöronları, özel duyu nöronları ve viseral duyu nöronları olmak üzere üç grupta incelenebilir (27). **Somatik duyu nöronları**; ağrı, ısı, dokunma ve basınç gibi duyuları algılayan nöronlardır. **Özel duyu nöronları**; görme, koku alma, işitme ve tat alma gibi özel duyuları algılar. Bu tür duyuların algılanmasını sağlayan reseptörler özelleşmiş organlarda bulunur. **Viseral duyu nöronları**; organlardan, salgı bezlerinden ve damarlardan gelen duyuları algılayan nöronlardır. Viseral duyular, interoseptörler adı verilen reseptör tarafından alınır. Bu tür reseptörler organların damarların duvarında bulunur.

4.6 Merkezi ve Periferik Sinir Sistemi

Sinir sistemi, fonksiyonları nedeniyle vücudumuzda bulunan en karmaşık sistemlerinden biridir. Merkezi ve periferik olmak üzere iki temel bölümden oluşmaktadır. MSS, beyin ve omurilikten oluşmaktadır. Beyin, merkezi sinir sisteminin en büyük kısmıdır, sağ ve sol hemisfer olmak üzere iki yarımküreden oluşmaktadır. Sağ hemisfer vücudun sol tarafından gelen duyuları algılar ve vücudumuzun sol tarafındaki hareketleri kontrol ederken, sol hemisfer de tam tersi olarak vücudumuzun sağ tarafından gelen duyuları algılar ve vücudumuzun sağ tarafındaki hareketlerini kontrol etmektedir (30).

Merkezi sinir sisteminin bir diğer elemanı olan omurilik ise, omurilik soğanı ile ikinci bel omuru arasında bulunan, omurların üst üste gelerek oluşturduğu kanal

biçiminde bir yapıdır. Omurilikten 31 çift spinal sinir çıkar ve bir spinal sinirin çıkış yerine uyan omurilik kısmına segment adı verilmektedir. Servikal, torakal, lomber, sakral ve koksigeal olmak üzere beş bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 4.6.1). Servikalde 8, torakalde 12, lumbarda 5, sakralda 5 ve koksigeal bölgede 1 segment bulunmaktadır (7,21). Omuriliğin gövde ve ekstremiteler kaslarını kontrol eden merkez olması ve bu merkezler ile serebral korteks arasında bağlantıyı sağlayan yol olması gibi çeşitli fonksiyonları bulunur. Omurilikte arka kök duysal, ön kök motor fonksiyonlarla ilgili bilgileri alma ve iletmeye ilişkilendirilir (30,31).



Şekil 4.6.1. İnsanın omurilik anatomisi

Periferik sinir sisteminin görevi ise, vücuda gelen her türlü bilgiyi duysal nöronlar yardımıyla algılamak ve bunları periferik ve merkezi sinir sistemine taşımaktır. Periferik sinir sistemi 12 çift kranyal sinir, 31 çift spinal sinir ve bunların gangliyonlarından oluşmaktadır. Bu sistemdeki bir sinir duysal (afferent) veya motor (efferent) nöronların aksonu olan lifler içermektedir. Duyusal nöronlar reseptörlerden MSS'ye, motor nöronlar ise MSS'den kaslara veya bezlere uyarı taşımaktadır (32).

4.7 Somatik ve Otonom Sinir Sistemi

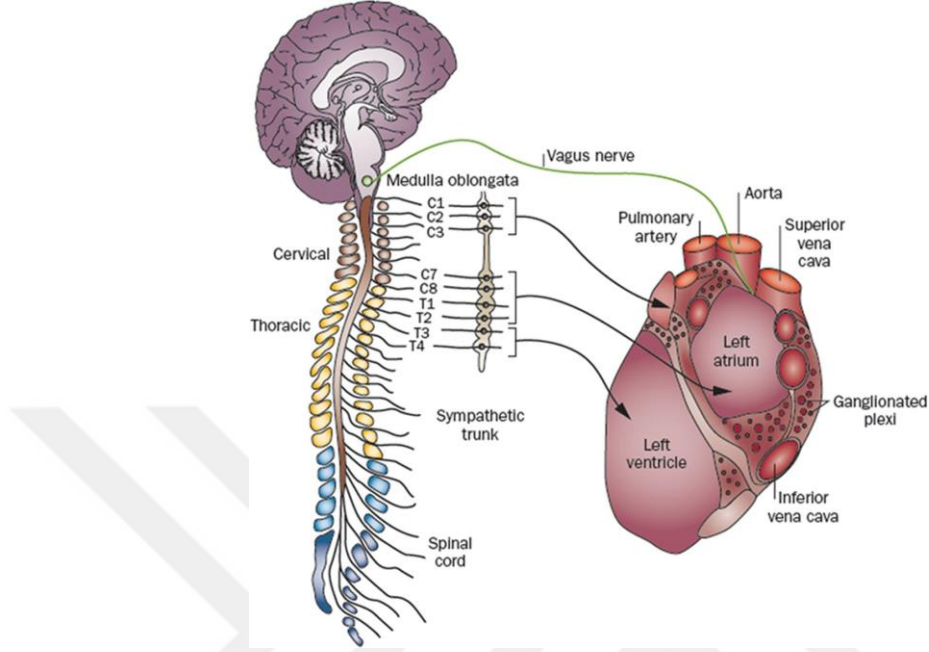
Somatik sinir sistemi, MSS'ye duyuşsal bilgi gönderen periferik sinirler ile iskelet kaslarını uyaran motor sinirlerden oluşmaktadır. Duyusal sinirler, kas, eklem, tendon ve duyu organlarından gelen uyarıları algılamakta, motor sinirler de bu uyarıları değerlendirmektedir (33).

Otonom sinir sistemi ise sempatik ve parasempatik olmak üzere fonksiyonel açıdan birbiriyle ters çalışan iki bölümden oluşmaktadır. Sempatik ve parasempatik sistemde presinaptik nöronların anatomik yerleşimleri birbirlerinden farklıdır (21,34). Sempatik ve parasempatik sistemin organlar üzerindeki etkileri terstir. Örneğın sempatik sistem kalp hızını artırır, solunum sayısını artırır, sindirim sisteminin çalışmasını yavaşlatır, periferik damarlarda daralma yapabilmektedir (35). Parasempatik sistem ise kalp hızını ve solunum sayısını azaltır, sindirim sisteminin çalışmasını hızlandırır, periferik damarlarda genişleme yapabilmektedir (36). Etkileri birbirinin tersi olan bu iki sistem birbirini tamamlayacak şekilde ve bir denge içinde çalışarak vücudun iç ve dış ortamdaki değışikliklere uyumunu sağlamaktadır.

4.8 Kalp ve Sinir Sistemi İlişkişisi

Kalp, sempatik ve parasempatik sistemlerden ve duyu nöronlarından veri (input) olarak kalp ritmini ve kasılmayı düzenler (37). Kalbe sempatik inervasyonu, sağ ve sol stellit gangliyonundan köken almaktadır (Şekil 4.8.1). Kalp parasempatik aktivitesine medulladan çıkan vagus siniri aracılık eder. Gelişmiş sempatik stimölasyon, sinoatriyal düğümün gevşemesini arttırır ve atriyoventriküler düğüm iletimini uyurarak, kalp atım hızı ve kasılma oranında artışa neden olmaktadır. Parasempatik sistemlerin etkileri esas olarak muskarinik ve preganglionik nikotinik reseptörlerin asetilkolin aktivasyonu ile aracılık eder ve kalp atım hızı ve kasılma azalır (38). Sempatik ve parasempatik inervasyonun kalp içindeki dağılımı değışkenlik göstermektedir. Sempatik inervasyon, atriumlardan ventriküllere doğru azalarak ilerleyen bir gradyan dağılımı göstermektedir. Parasempatik nöronlara inervasyonu SA ve AV nodlarda daha yoğunken, kalpteki dağılımı sempatik nöronlara göre daha heterojendir (39). Kardiyak gangliyon ve internöronlar sempatik, parasempatik sistemler ve miyokard duyuşsal nöronlarından gelen bilgileri işler ve diğer kalp gangliyonlarına sinyalleri iletmektedir. Norepinefrin ve izoproterenol, sempatik sinir

sistemini, asetilkolin parasempatik sinir sistemine etki ederek aksiyon potansiyel frekansını aktive veya inhibe edebilmektedir (40,41).



Şekil 4.8.1. Kalp sinir sisteminin anatomisi ve dağılımı. Kardiyak sempatik ganglionlar servikal ve torakal gangliyonlardan oluşur. Parasempatik innervasyon vagus siniri ile ilişkilidir (38).

AKG ve NG'de kardiyak sinir sisteminin oluşmasını sağlayan kardiyak afferent nöronlarını içermektedir (42,43). Bu nöronlar dorsal atriya ve ventriküllerin çıkış yollarına dağılmakta ve bu nöronların distal duysal nöritleri (uzantı), kalbin kimyasal ve mekanik ortamını sürekli olarak iletmektedir. Bu bilgi medulla ve omurilikteki ikinci nöronlara, bu afferent nöronların merkezi nöritlerinden salınan kimyasal araçlar vasıtasıyla aktarılır. Bu nöronlardan duysal girdilerin kalbe olan efferent nöronal çıkışın kontrolünde önemli bir rolü vardır. Literatürde, sempatik ve parasempatik sistemlerin kalbin işleyişi üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (7,43).

4.9 Duyu Nöronları ve Organ İlişkisi

Duyu nöronları ile organlar arasındaki bağlantı son yıllarda araştırmacıların dikkatini çeken bir konu olmuştur. Yapılan araştırmalarda bağırsak, akciğer, mide gibi çeşitli organlara özgü duyu nöronlarının karakterizasyonu yapılmıştır.

Akciğer ile beyin arasındaki önemli bir uyarı sistemi olan vagus siniri ile ilgili son zamanlarda birçok çalışma bulunmaktadır. Literatürde yapılan bir çalışmada solunum üzerinde güçlü ve zıt etkilere yol açabilen iki fare vagus sinir aferenti; P2RY1 (Purinerjik Reseptör Y Tip 2) ve NPY2R (Nöropeptit Reseptör Y Tip 2) tanımlanmış ve bu genleri içeren nöronların akciğerleri yoğun olarak inerve ettiğini gösterilmiştir. P2RY1 purinerjik reseptörü bulunan NG hücrelerinin akciğere özgü olduğu tespit edilmiştir. Farelerde P2RY1-Chr2 üretimi olan NG hücrelerinin *in vivo* olarak uyarılması sonucu solunumun durduğu kalp, mide veya bağırsakta herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir (44). Yapılan çalışmalar, hava yolundaki duysal sinirlerin, astımın patogeneğinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Daha önce tanımlanmış bir kaşıntı reseptörü olan MrgprC11, deriyi innerve eden ve nonhistaminerjik kaşıntıya aracılık eden duyu nöronlarında üretilmektedir. G-protein kapılı bir reseptör olan Mrgprs11 reseptörüne sahip nodoz hücrelerinin bronş hacmini değiştirdiğini optogenetik yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir (45). Akciğere özgü duyu nöronlarını incelemek amacıyla Piezo2 knock-out transgenik hayvanlarda solunumu durduğu, Piezo2'nin optogenetik kontrolü ile farelerde solunumun geçici olarak durdurduğu gösterilmiştir. Bu çalışma bir mekanoreseptör olan Piezo2'nin akciğer genişlemesi ile ilgili duysal veriyi taşımakla sorumlu olduğu bulunmuştur (46).

Vagus siniri, sindirim, kardiyovasküler ve solunum sistemleri ile ilişkilendirilen en önemli vücut-beyin bağlantısıdır. Vagal duyu nöronları ile gastrointestinal sistemde, bağırsak hormonlarının kontrolü ve organ genişlemesi tespit edilmiştir. Bu nöronların moleküler çeşitliliğini ve gastrointestinal sistemdeki uyarıları nasıl algıladığını araştıran çalışmalarda kas ve sinir hücreleri kullanılarak kokültürü yapılmış ve Chr2 üreten transgenik fare hatları kullanarak duyu sinir hücre alt tiplerinin bağırsağa özgü olduğu ve bu hücrelerin uyarılması sonucu organda fonksiyonel değişimler olduğu tespit edilmiştir (5). GPR35 veya GLP1R adlı

reseptöre sahip NG hücrelerinde Chr2 üreten farelerde, GPR35 reseptörüne sahip nöronların ışık ile uyarılması sonucunda bağırsakta kimyasal bir uyarının olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber GLP1R'nin uyarılması ile bağırsakta mekanik değişimler gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarla bağırsaktan ve gastrointestinal fizyolojinin nöral kontrolünü anlamaya yönelik moleküler bir çerçeve sağlamıştır (5).

Yemek sırasında mide, yutulan yiyecek ve içeceklere uyum sağlamak için genişlemektedir. Duyu nöronları mide hacminin artışında görev almakta ve sindirimi destekleyen sinyalleri uyarabilmektedir. Mide hacmindeki küçük artışlar, tokluk hissini oluştururken, mide hacmindeki büyük artışlar, bulantı ve ağrının farklı hislerini oluşturmaktadır. Mide, vagal ve AKG nöronlarından yoğun innervasyon alır. AKG nöronları mide gerilmesini tespit edilebilmekte ancak algı ve davranıştaki rolleri kısıtlı kalmıştır. Yapılan çalışmalarda, GLP1R içeren vagal aferent alt tiplerinin mide gerilmesine cevap verdiğini tespit etmişlerdir (47).

4.10 Kalbe Özgü Duyu Nöronları

Kalbe özgü nöronlarının yoğun olarak AKG ve NG'de konumlandığı bilinmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada, servikal bölgede C5-C8 arası, torokal bölgede T1-T4 arasındaki AKG'ların yoğun olarak kalbe innervasyonu belirlenmiş ve bu seviyede bulunan nöronların kalbe ait duyu bilgisi MSS'ne ilettikleri tespit edilmiştir (48). Ayrıca literatürdeki çalışmalarda, kalbe özgü duyu nöronları *in vivo* olarak işaretlenmiş ancak morfolojik düzeyde tam olarak karakterizasyonu yapılmamıştır ve bununla beraber kalbe özgü duyu nöronlarını diğer nöron tiplerinden ayıran özellikler tam olarak ortaya konulmamıştır (49). Kalbe özgü duyu nöronları, CGRP (kalsitonin genine bağlı peptid), nöropeptid Y gibi nöropeptitler ve vaskülarizasyonu düzenleyen ve kalbe kronotropik (hızı değiştiren) ve inotropik (kasılma gücünü artıran) etkileri olan P maddesini serbest bırakmaktadır. Acı biberin yapısında bulunan kapsaisin adlı madde, duyu sinirler tarafından üretilen temel ağrı algılama reseptörlerinden biri olan TRPV1'i aktive etmektedir. Kapsaisin yüksek dozlarda uygulandığında duyu sinirlerin bir alt kümesinin dejenerasyonuna neden olduğu ve böylece kalıcı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (50). Liu ve ark. 2008'de AKG ve kardiyomiyosit hücrelerini kökültüre ederek aralarındaki morfolojik ilişkiyi

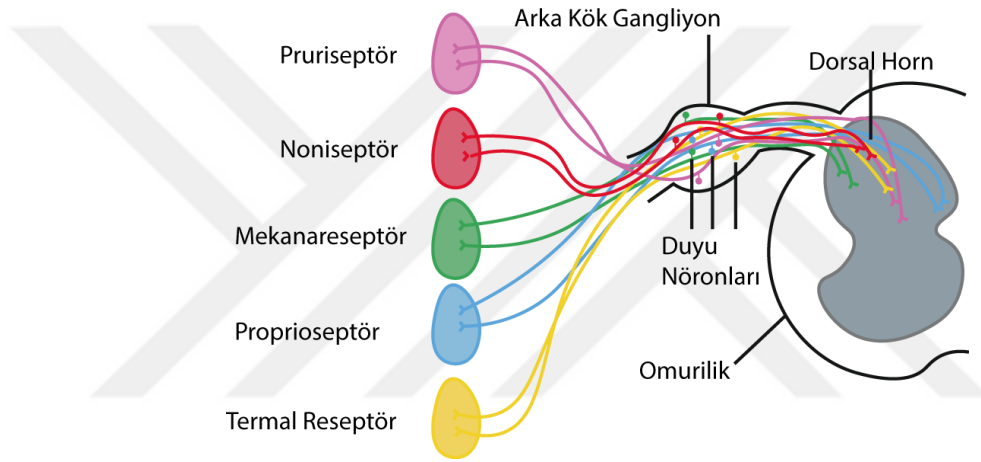
göstermek için yaptıkları çalışmada primer duyuusal sinir uçları ve kardiyomiyositler arasındaki morfolojik ilişki kurduğu ve nöromüsküler kokültürlerde kardiyomiyositlerin neden olduğu duyuusal nöropeptid sentezini sağladığını tespit etmişlerdir. Kardiyomiyositlerin neden olduğu SP ve CGRP'nin üretimi ve salınımı, kısmen kardiyomiyositlerin fonksiyonel peptiderjik kontrolü ile ilişkili olabileceğini ve duyuusal nöropeptid sentezinin ve hedef kardiyomiyositlerin neden olduğu salınımın önemi hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (51).

Chen ve ark. 1999 yılında Pekin ördeklerine kalbin çeşitli bölgelerine hidrojen peroksit enjeksiyonu yaparak kalbe ile ilişkili olan nöronları işaretlemiş ve daha sonra bu nöronları sınıflandırmayı amaçlamışlardır. Kalbi inerve eden sempatik nöronlar özellikle T1-T3 ve C15 segmentinde lokalize olduğunu tespit etmişler. Kardiyak duyu nöronlarının C15 ile T2 arasında, vagus sinirinden kökenlenen nodoz ve jugular gangliyonlarında bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Boyanan nöronların Pekin ördeklerinde kalp ve kontrol dolaşımının iletişiminden sorumlu olduğunu düşünmüşlerdir (7). 1984 yılında Lee ve ark. yaptıkları çalışmada kedilerde kalbe dallanan sinirlerin aksonları ile viseral aferent nöronların segmental dağılımını incelemişlerdir. HRP ile işaretlenen hücrelerin hayvanlar arasında geniş bir varyasyon gösterdiği C7 den T7 segmentine kadar işaretli duyu nöronlarının bulunduğunu belirlemişlerdir (52). Hoover ve ark. yaptıkları çalışma ile ventriküler afferent nöronların somaları HRP ile retrograd boyama yapılarak tanımlanmış ve bu nöronlarının boyutunu belirlenmiştir. Ayrıca nodoz gangliyon ve AKG'lerin, ventriküler afferent nöronları arasındaki temel fiziksel ve nörokimyasal farklılıklar olduğunu belirleyerek, bu nöronların polimodal özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir (53).

4.11 Arka Kök Gangliyon

Omuriliğin segmentleri arasında bulunan, Arka Kök Gangliyonlar (AKG), dorsal nöral tüpten göç eden nöral krest hücrelerinden köken almıştır (21) . Duyu nöronları olan AKG'ler, servikal, torakal, lumbal ve sakral spinal sinirlerin dorsal kökleri boyunca spinal kordun girişine yakın konumlanmıştır (54). AKG'ler psödounipolar nöronlar olup tek bir nöron hücre gövdesi ve iki dalı bulunur. Bir aksonal dal; dokuya duyuusal inervasyon sağlamak için çevreye uzanırken, diğer daha

kısa dal merkezi sinir sistemi nöronu ile sinapsa gitmektedir. Ayrıca, memeliler için bir uyarı sistemi olarak görev yapan çeşitli kimyasal, mekanik ve termal uyanları tespit edebilen ve bunlara cevap verebilen oldukça gelişmiş nöronlardır (55). Bu duyu nöronları iç organlardan, deriden ve kemiklerden gelen çeşitli duysal verileri beyine iletmekle görevlidir. AKG nöronları iletimlerinden sorumlu oldukları duysal verilere göre sınıflandırılmaktadır (56): Düşük eşikli mekanoreseptörler; dokunma ve basıncı, noniseptörler; ağrıyı, Pruriseptörler; kaşıntıyı, propioseptörler; uzaysal konumuzu ve sıcaklık reseptörleri; sıcak veya soğuğa neden olan uyanları iletmek ile sorumludur (Şekil 4.11.1).



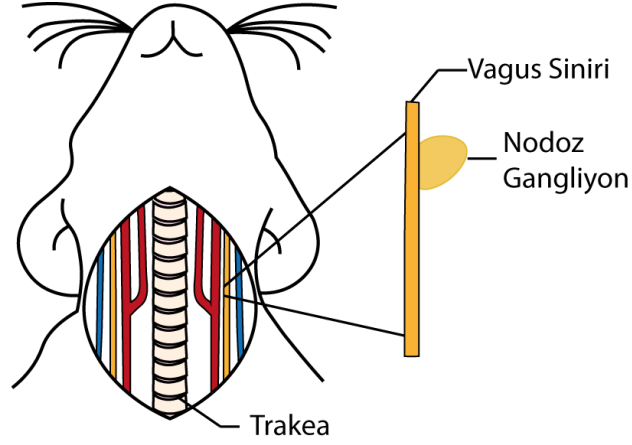
Şekil 4.11.1 Fareye ait omuriliğin şematik gösterimi.

AKG'ler, anatomik olarak birbirinden ayrılmaktadır. Omuriliğin dorsal hornunda bulunan laminar organizasyona göre her AKG duyu nöron tipi kendi duysal yollarını oluşturmaktadır (Şekil 4.11.1). İletmek ile sorumlu oldukları duyu verisini alan AKG nöronları, görevlerine göre omurilikteki bulunan beş laminadan birine giderek sinyali beyine ulaştırır. Farede toplamda 30-31 çift olarak 8 servikotorakal, 13 torakolumbar, 5 lumbar, 4 sakral ve 1 koksigeal AKG den oluşmaktadır (Şekil 4.9.1). AKG nöronlarının büyüme ve gelişmesini sağlayan nörotrofik faktörler; sinir büyüme faktörü (NGF), beyinden kökenlenen nörotrofik faktör (BDNF), Nörotrofin 3 (NT3) ve NT4'dır (23).

4.12 Nodoz Gangliyon

Vagus siniri 10. kranial sinir olarak da adlandırılan, motor ve duyuşal lifler içeren, beyin sapından kolonun belirli bir bölgesine kadar uzanan, vücutta en geniş dağılıma sahip olan en önemli parasempatik sinirdir. Latince de vagus dolaşmak anlamına gelmektedir. Vagus siniri en uzun kranial sinir olduğu için bu isimle özdeşleşmiştir. Tüm parasempatik liflerin yaklaşık %75'i vagus siniri içinde seyrederek göğüs ve karın boşluğuna dağılır. Vagus sinirinin duyuşal işlevleri açısından iki bölüme ayrılır; somatik aferentler, cilt ve kaslarda hissedilen duyuşlardır; viseral aferentler, vcdumuzda organlardan hissedilen duyuşlardır. Ayrıca vagus sinirinin; kalpte uyarısı frekansı ve ileti hızını yavaşlatabilme, koroner damarlarda vazokonstriksiyon yapabilme, mide bezlerinde salgıyı arttırma, mide ve bağırsaktaki peristaltik hareketleri arttırma gibi çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır (5,57).

NG, vagus sinirin inferior gangliyonu olarak tanımlanmıştır (58). NG, vagus sinirinin hücre gövdesi olmakla beraber orta beyinde ektoderm yapıdaki epibrankial plasedolardan köken almıştır (45). Epibrankial plasedolar, Sox3 ifade etmeye başladığında epibrankial plasedolar, çevreden gelen sinyaller ile plasedo-özgü genleri ifade ederek nodoz gangliyon hücrelerini oluştururlar (58). NG, beyinden çıktıktan sonra dil, yutak, gırtlak, yemek borusu, kalp, akciğer gibi torasik (göğüs ile ilgili) organlar ve mide, karaciğer, bağırsak gibi abdominal organlara dallanmaktadır (45,59). Beyinden kökenlenen lifler parasempatik etki göstermektedir ve genel olarak sindirim sistemini hızlandırırken diğer sistemleri yavaşlatmaktadır. Ayrıca i organlardan gelen duyuşal veriyi beyine iletmekle sorumlu olan vagus siniri, parasempatik nöron fiberlerini, vücuttaki bazı kemoreseptör ve baroreseptrlerin algıladıkları bilgileri beyinin belirli bölgelerine taşımaktadır. Bu nöronlar, çeşitli endojen ve eksojen uyarıların geçişi için kritik öneme sahiptir (58,60).



Şekil 4.12.1. Notoz anatomisi

4.13 Ağrı

Ağrı, vücudumuzda tehlikelere karşı oluşan bir uyarı mekanizmasıdır. Vücudumuzda gelişen herhangi bir doku hasarında ortaya çıkabilmektedir ve kişi bu uyarımı ortadan kaldırmak için bir tepki oluşturmaktadır. Oluşan bu tepki sayesinde vücut kendi savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir ve bu nedenle ağrı koruyucu bir mekanizmaya sahiptir (11,61).

4.13.1 Ağrı Reseptörleri

Deride ve diğer dokularda bulunan ağrı reseptörleri serbest sinir uçlarından oluşmaktadır. Bu reseptörler, derinin yüzeysel tabakalarında ve bazı iç dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Ağrının ortaya çıkmasında çeşitli uyaranlar bulunmaktadır. Bu uyaranlar mekanik, termal ve kimyasal olarak sınıflandırılabilir. Kimyasal ağrı oluşturan bradikinin, serotonin, asitler, asetilkolin gibi kimyasallar doku zedelenmelerinden sonra ortaya çıkan yavaş, şiddetli ağrının uyarılmasında önemlidir (11).

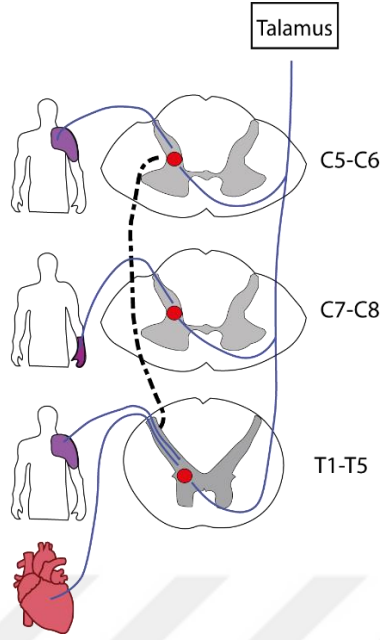
Ağrı reseptörleri, vücutta bulunan diğer duyu reseptörlerine göre, daha az adapte olurlar. Oluşan birtakım yavaş ağrılarda ağrı liflerinin uyarılması, uyaran devam ettiği sürece giderek artabilmektedir. Ağrı reseptörlerindeki bu duyarlılık artışına hiperaljezi denir (62). Ağrı reseptörlerinin adaptasyonun zayıf olması, ağrıya neden olan hasar verici uyarı devam ettiği sürece kişinin bunun farkında olmasını sağlamak açısından önemlidir (62,63).

4.13.2 Kalp ve Ağrı

Günlük yaşamımızda, kalp ve göğüs bölgesinde yaşanan ağrıları ilk olarak kalp krizi ile ilişkilendirilmekte fakat bu ağrılar farklı nedenlerle ortaya çıkabilmektedir. Literatürde yapılan araştırmalara göre, göğüs ağrısı yaşayanların yaklaşık %25'inde ağrıların kalpten bağımsız olarak oluştuğu belirlenmiştir (64). Kaburga incinmeleri, göğüs bölgesinde bulunan sinir sıkışmaları, akciğer hastalıkları ve kas problemleri kalp bölgesinde oluşan ağrının kalbe bağlı olmayan diğer nedenleri arasındadır. Bu sağlık koşullarından bazıları hayati önemde olabilir, bazıları ise basit tedavi yöntemleriyle kısa sürede iyileşebilir.

Miyokard infarktüsü (MI), kalp kası olan miyokardın iskemik nekrozuyla oluşmaktadır. Temel olarak kalbi besleyen damarların kan akımındaki değişiklikler nedeniyle ani azalmasına veya kesilmesine bağlı olarak gelişen ve o damarın beslediği kalp kasında hücre ölümü ile sonuçlanan bir kalp olgusudur (65). MI sırasında en sık rastlanan semptom göğüste oluşan ağrıdır. Oluşan bu ağrıyı hastalar genellikle göğüste baskı, basınç, ağırlık hissi, sıkışma veya yanma şeklinde tanımlamaktadır. Ağrının viseral özelliğinden dolayı, ağrı net olarak lokalize edilememekte ve tanımlanamamaktadır.

Viseral duyu, vücudumuzda iç organlara özgü duyuları tanımlamaktadır. Viseral ağrı ise vücut yüzeyine yansıdığı zaman kişi bunu viseral organın bulunduğu bölgede değil, genellikle o organın embriyoda köken aldığı omurilikteki dermatomunda (tek bir dorsal kök gangliyonundan köken alan periferik sinir lifleri tarafından sağlanan bir deri bölgesi) hisseder. Kalp boyun ve üst torakstan köken almıştır. Buna göre kalbe ait viseral ağrı lifleri sempatik duyu sinirleri içinde yukarı çıkar ve C3 ve T5 segmentleri arasında omuriliğe girer (4,7). Bu nedenle kalpten gelen ağrı Şekil 4.11.2'de görüldüğü gibi boynun yan tarafına, omuzlara pektoral kaslara, kolun alt kısmına ve göğüste sternum altındaki bölgeye yansır. Bu bölgeler kendi duysal liflerini C3 ile T5 arasındaki omurilik segmentlerine gönderen vücut yüzeyi bölgeleridir (4). Genellikle ağrı sağdan çok sol tarafta hissedilir. Çünkü kalbin sol tarafı sağdan daha fazla koroner hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.13.1. Kalp ve ağrı ilişkisinin şema ile gösterilmesi (4)

4.13.3 Ağrı ile İlişkilendirilen Genler

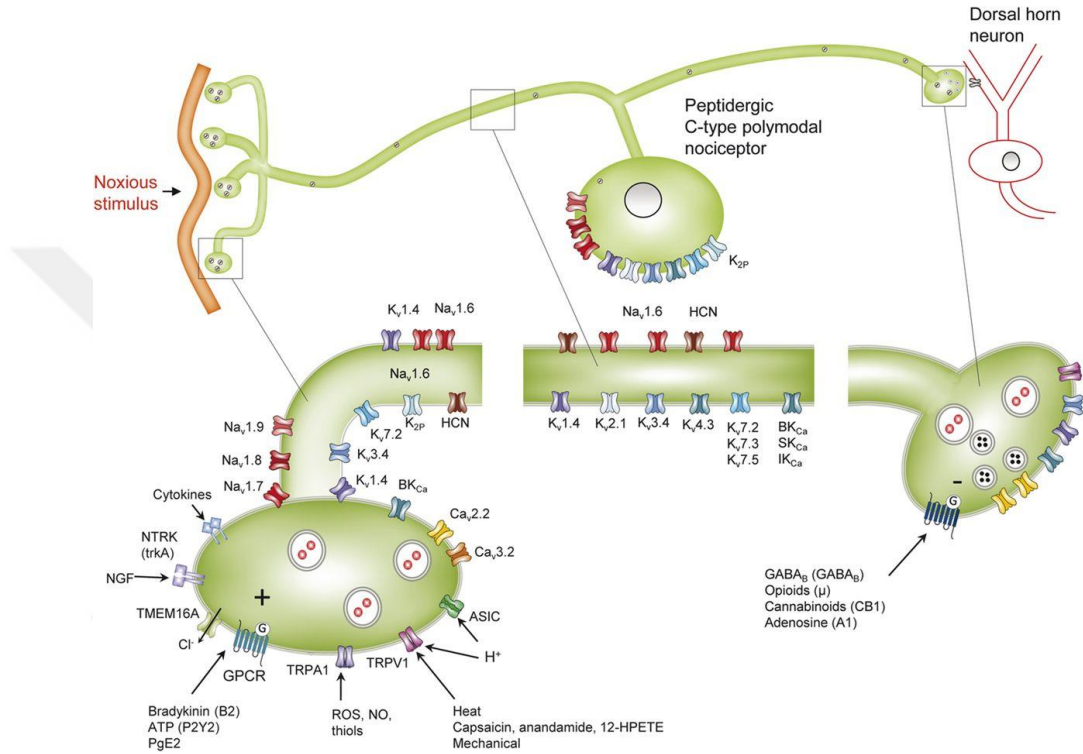
Transient Reseptor Potential (TRP) iyon kanalları; ilk olarak *Drosophila melanogaster*'da keşfedilen, nosiseptif duyuusal sinir sonlanmalarında konumlanan ve hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde tat, ağrı ve sıcaklık gibi duyuların algılanması ile aktifleştiği bilenen, seçici olmayan özel bir katyon kanalı ailesidir. TRP kanallarının kalsiyuma karşı duyarlılığının yüksek olduğu bilinmektedir (66). TRP protein ailesi; TRP conancial (TRPC), TRP vanilloid (TRPV), TRP melastatin (TRPM), TRP polisistein (TRPP), TRP mukolipin (TRPML) ve TRP ankrin (TRPA) olmak üzere altı sınıfa ayrılmıştır (67,68). TRPV1 ve TRPA, ağrı ile ilişkilendirilen ve literatürde birçok çalışmada kullanılan kanal proteinleridir. TRPA1 iyon kanalı ise yoğun olarak duyu nöronlarında anlatımı olduğu tespit edilmiştir. AKG ve TG (trigeminal gangliyon) duyu nöronlarında, TRPA1 kanalları genellikle küçük çaplı nöronlarda ifade edildiği bilinmektedir. Sinir sistemi gelişiminde önemli bir role sahip olan NGF'in, TRPA1 in gen anlatımını kontrol ederek kronik enflamatuar hiperaljeziyi düzenlediğini ve ayrıca bu düzenlemede nosiseptörlerin de görev aldığı düşünülmektedir (68).

ATP (Adenozin 5'-trifosfat) hücre içi enerji kaynağı ve hücre dışına çıktığında pürinerjik haberleşmede rol oynayan önemli bir nörotansmitterdir. Ekstrasellüler

ATP, vücudumuzun birçok bölümünde sinyal molekülü olarak görev alır, merkezi ve periferik sinir sisteminde etkisini pürinerjik reseptörler ile göstermektedir. **Pürinerjik reseptörler** P1, P2X ve P2Y olmak üzere üç alt sınıfa ayrılır (69). P1 reseptörleri adenozinle aktive olan, adenozin reseptörleridir. P2 reseptörleri ise P2X ve P2Y olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. P2X reseptörleri, ATP bağlandığında ligand bağımlı iyon kanallarını açarak iyonotropik bir etki göstermekte ve yedi alt tipi bulunmaktadır. P2Y reseptörleri, ATP bağlandığında postsinaptik hücrede iyon kanallarının açılmasını ve ikincil habercilerin (cAMP) oluşumuna neden olarak metabotropik bir etki göstermektedir (70). Yapılan araştırmalarda, ATP'nin bir nörotransmitter olarak merkezi ve periferik sinir sisteminde işlevinin olduğu, ağrı, migren ve inflamasyon gibi patofizyolojik durumlarda rol oynadığı bulunmuştur (71). ATP, P2X3 ve P2X2/3 reseptörleri aracılığı ile periferik ağrı sinyallerini başlatabilmektedir ve bu reseptörleri uyardığında membran depolarize olarak ağrı sinyalleri oluşturmaktadır. Ağrı sinyallerinin periferden merkeze aktarılmasına ise P2X2, P2X3 ve P2X6 reseptörleri aracılık etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ATP'nin pürinoseptörler aracılığı ile migren ağrısının oluşumunda önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (59,71). P2X reseptörleri arka kök, trigeminal ve nodoz gangliyon dahil olmak üzere çoğu duyuusal nöronda bulunmaktadır. AĞ ve TG nosiseptif, mekanik ve proprioseptif ve birincil somatosensoriyel nöronlar içerebilmektedir. NG hücrelerinde P2X3 reseptörü üretimi hem mRNA hem protein olarak daha fazladır. P2X2/3 heteromultimerleri özellikle NG'de belirleyici bir şekilde fazla olmakla beraber, tüm P2X alt tipleri duyu nöronlarında bulunmaktadır (69,72).

Voltaj kapılı sodyum kanalları (NaV), aksiyon potansiyelinin oluşumunda kritik bir rol oynamakta ve çoğu hücrelerin uyarı oluşumu ve iletimi için gereklidir. Bu iyon kanalları bir adet büyük, por oluşturuvcu a-alt birimi ve bir veya birden fazla yardımcı birimden oluşmaktadır. Sinir sistemi, iskelet kası ve kardiyomiyosit gibi farklı farklı fizyolojik özelliklere sahip hücrelerde a-alt ünite sodyum kanallarının izoformları tanımlanmıştır. Kardiyomiyositlerde Nav1.5, kalp iletimini belirleyen en önemli sodyum kanalıdır, fakat kalpte başka sodyum kanalları da bulunmaktadır (73). Nav1.7, Nav1.8 ve Nav1.9, yoğun olarak periferik nöronlarda bulunmaktadır. Nav1.7 genetik olarak insanlarda ağrıyı algılamada rol oynadığı bilinmektedir. Nav1.8 ve

Nav1.9'un ağrı iletimindeki rolü hayvan çalışmaları ile desteklenmiş ve Nav1.8 için ağrı sinyalleşmesinde önemli bir rol oynadığı çeşitli deneylerle ispatlanmıştır. Yapılan çalışmalarda Nav1.8'in nakavt edilmesi veya Nav1.8-pozitif nöronların ablasyonu, iltihaplanma ve soğuk kaynaklı ağrı sonrasında termal hiperaljeziyi azalttığı belirlenmiştir (74).



Şekil 4.13.2. Ağrı reseptörlerinde bulunan iyon kanallarının sinir hücresi üzerinde gösterilmesi (75).

Sinir hücrelerinde, sodyum kanalı izoformu NaV1.8 (SCN10A), AKG ve kranial duyu gangliyonların küçük ve orta çaplı nosiseptif duyu nöronlarında yüksek oranda bulunmaktadır (73). NaV1.8 sodyum kanalının fonksiyonu, ağrıyı algılama ile ilişkilendirilmiştir. Ancak yapılan son çalışmalarda bu kanalın EKG'de PR aralığı ve QRS süresin oluşması ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, SCN10A lokusunun, atriyal fibrilasyon ile de ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalar, kalp elektrofizyolojisinde NaV1.8' in rol oynadığını göstermekte ancak kalpteki asıl işlevi hala tam olarak anlaşılmamıştır (73).

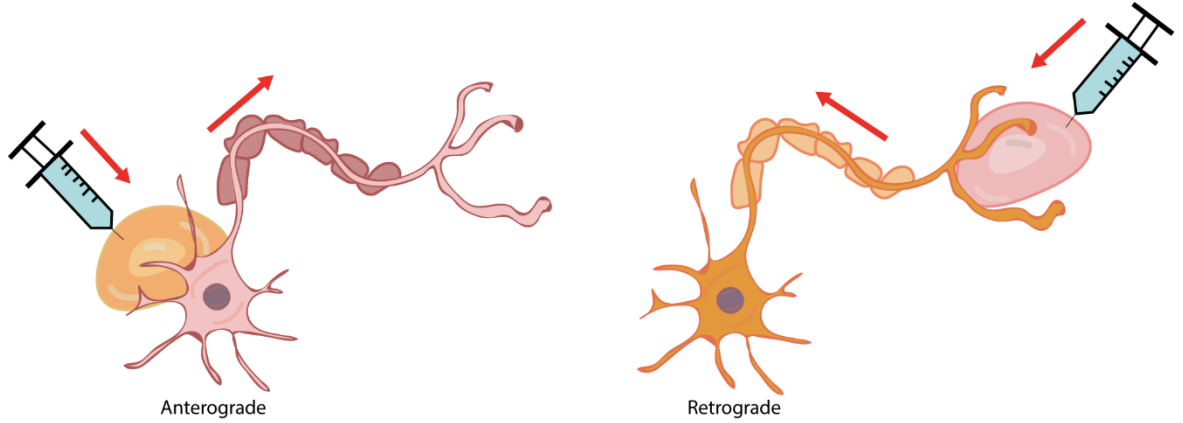
Doğum öncesi, duyuusal ve sempatik sinirlerin gelişmesi için temel bir protein olan NGF'in doğum sonrası ağrıyı tetiklemede ve bağışıklıkta rol oynadığı

bilinmektedir. Bu büyüme faktörünün reseptörü **TrkA**'dır. Trk (tropomiyosin reseptör kinaz) ailesinin A, B ve C olmak üzere üç farklı reseptörü bulunmaktadır. TrkA bir reseptör kinazdır. Bu reseptörlerin ligandları, NGF, BDNF, NT-3 VE NT-4 gibi çeşitli nörotrofik faktörlerden oluşmaktadır. TrkA, periferik sinir sistemi, merkezi sinir sistemi, bağışıklık ve sindirim sistemi, prostat, uterus, böbrek ve cilt gibi çeşitli organ ve dokularda anlatımı bulunmaktadır. NGF, periferik ve merkezi sensitizasyonu tetiklemekte, böylece hiperaljezi ve allodiniye neden olmaktadır. Bu gibi patolojik durumlarda, tedavi amaçlı NGF/TrkA sinyalini bloke eden bir analjezik kullanılarak tedavi edilmektedir (76).

4.14 Retrograde Boyalar ve Uygulamaları

Sinir hücreleri salgı yapabilmekte ve diğer salgı hücrelerinden farklı olarak, salgı yapan bölge genellikle hücre gövdesinden uzakta, aksonun sonunda bulunmaktadır (18,77). Vücudumuzda veziküller içinde paketlenen maddelerin transportu temel olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. Veziküller içinde paketlenen maddeler aksonun mikrotubulleri boyunca akson ucuna doğru kinezin denilen motor proteinler tarafından ATP bağımlı bir hareket ile somadan akson ucuna doğru taşınırlar (78,79). Bu yönde madde taşınımına "anterograde transport" denilir. Akson ucundan somaya doğru dynein motor proteini ile gerçekleşen transporta ise "retrograde transport" adı verilmekte ve bu mekanizmanın akson ucundaki metabolik ihtiyaçların somaya iletilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (77).

Retrograd boyama, kalp, akciğer, mide gibi viseral organlara dallanan akson uçlarını boyayarak organların çevresinde bulunan sinir gövdelerini, sinir bağlantılarını incelemede kullanılan bir yöntemdir. Retrograd boyama teknikleri, hedef bir nöron popülasyonu ve sinir sistemi içindeki girdileri arasındaki nöronal bağlantıların detaylı değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu teknikler, belirli bir yapıdaki nöronlar (örneğin göz) ile beyindeki hedef nöronlar arasındaki bağlantıların haritalanmasına olanak sağlar (80). Bu tekniğin tam tersi olan anterograd boyama, sinir bağlantılarını kaynağından sonlandırma noktalarına (yani hücre gövdesinden sinapsa kadar) izlemek için kullanılmaktadır (Şekil 4.14.1). Hem anterograd hem de retrograd izleme teknikleri, aksonal taşınmanın görselleştirilmesini sağlamaktadır.



Şekil 4.14.1. Retrograd ve Anterograd boyaların mekanizması

4.14.1 Fluoro-Gold

İlk olarak Schmued ve Fallon tarafından retrograd izleyici olarak tanımlanan Fluoro-Gold (FG) difüzyon yoluyla aksonlardan somalara taşınan bir floresan boyadır (81). Yapılan çalışmalarda FG'nin dokularda uzun süre etkinliğini koruduğu gösterilmiştir. Bir başka çalışmada hücre içi enjeksiyon sonrası, FG ile işaretlenen hücrelerin lizozom benzeri yapıların elektron mikroskopunda görüntülenmesi yapılmıştır. Ayrıca FG, immunositokimya ve immunohistokimyasal çalışmalarda sabitlenebildiği için tercih edilmektedir (82). Araştırmacılar, FG enjeksiyonu sonrası uzun süreli takip edilen deneylerde, bu boyanın farklı deneysel koşullar altında nörotoksik etkiler gösterebileceği sonucuna varmışlardır (83).

4.14.2 Fast Blue

Fast Blue (FB), retrograd özellikle nöronal izleyici olarak kullanılan floresan boyalardan biridir. Bu boya, çeşitli hayvan modellerinde örneğin retrograd olarak uzun mesafelerde etkili bir şekilde taşındığından, uzun süreli *in vivo* deneylerde (sıçan, kedi ve maymun vb.) motonöronal hücreleri işaretleme için tercih edilmektedir. Retrograd izleme teknikleri, tek bir nöron popülasyonundan sinir sistemi boyunca çeşitli hedeflere nöronal bağlantıların detaylı değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (84). Bu teknikler, göz ile beyindeki hedef nöronlar arasındaki bağlantıların haritalanmasında kullanılmaktadır. Fast Blue ve Diamidino Sarı, tek veya çift retrograd floresan işaretleme için en yaygın kullanılan boyalardandır (85).

4.14.3 Wheat Germ Agglutinin

WGA (Wheat Germ Agglutinin), nöronlarda bulunan buğday lektini olarak da bilinen anterograd ve retrograd boyamalarda kullanılan floresan boyalardan biridir.

Çalışma mekanizması temel olarak hücredeki N-asetil glukozamin ve N-asetilneraminik asite bağlanarak gerçekleşir (86). Deneysel çalışmalarda sabitlenebildiği için immunohistokimya ve immunositokimya çalışmalarında da kullanılmaktadır. WGA'nın HRP enzimiyle konjugatı, sinir bağlantılarının izlenmesi için önemli olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu konjugatın anterograd izleme için uygun olduğu bilinmektedir. (86,87). WGA-HRP konjugatı kullanılarak yapılan bir araştırmada, beyin sapınındaki aksonal ve terminal bağlantıların haritalaması yapılmıştır. Çalışmada sıçanların nodoz gangliyonlarına enjekte edilen WGA-HRP, kullanılan boyaların arasında, hücreleri en çok işaretleyen boya olduğu belirlenmiştir (88).

4.14.4 Kolera Toksin B

Kolera toksini, *V. cholerae* tarafından sentezlenen bu enterotoksinin A ve B olarak tanımlanan yapılarından oluşmaktadır. A toksini tek bir alt üniteye sahipken, B toksini 5 alt üniteden oluşmaktadır. B toksini barsak epitel hücrelerinin yüzeyindeki gangliosid GM1 ile bağlandıktan sonra, A alt bölümü sitoplazmaya girer ve burada ayrışarak A1 formuna dönüşerek çalışmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda rekombinant olarak üretilen B formu, retrograd ve anterograd floresan boya olarak kullanılmaktadır (89). CTB (Cholera toxin b)'nin, HRP enzimi ile konjugatı sıçanların MSS'deki hücrelerini belirlemek ve analiz etmek için kullanılmıştır. Analizler sonucu, CTB nin retrograd olarak taşındığı ve sinir hücrelerinin gövdelerine bağlandığı gösterilmiştir (90). Yetişkin ve yenidoğan gelinciklerin beyinlerindeki aksonal morfolojiyi tanımlamak adına yapılan çalışmada, CTB'nin anterograd taşınım özelliği kullanılarak, WGA ya göre hücreleri daha iyi boyadığı ve görüntülemeye daha uygun olduğu bulunmuştur (91).

4.14.5 DiI

DiI bir hücrenin tamamını boyamak için kullanılan lipofilik membran boyasıdır. Membrana geçene kadar zayıf floresan özelliğine sahiptir ve genellikle nöronal ve diğer hücreler için uzun süreli bir izleyici olarak kullanılmaktadır (84,92). DiI' in çözelti, macun ve kristal gibi farklı formları da bulunmaktadır. DiI ve DiA canlı ve sabitlenmiş dokularda ve hücrelerde anterograd/retrograd nöronal izleyiciler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Difüzyon yoluyla taşınan DiI in aldehitle sabitlenmiş dokularda uzun yıllar boyunca işaretli hücrelerin görüntülenebildiği de gösterilmiştir.

Ayrıca bu boyanın, hücre canlılığı, gelişimi veya temel fizyolojik özelliklerini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir. DiI işaretli motor nöronların, kültürde dört hafta kadar ve *in vivo* olarak bir yıla kadar yaşadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

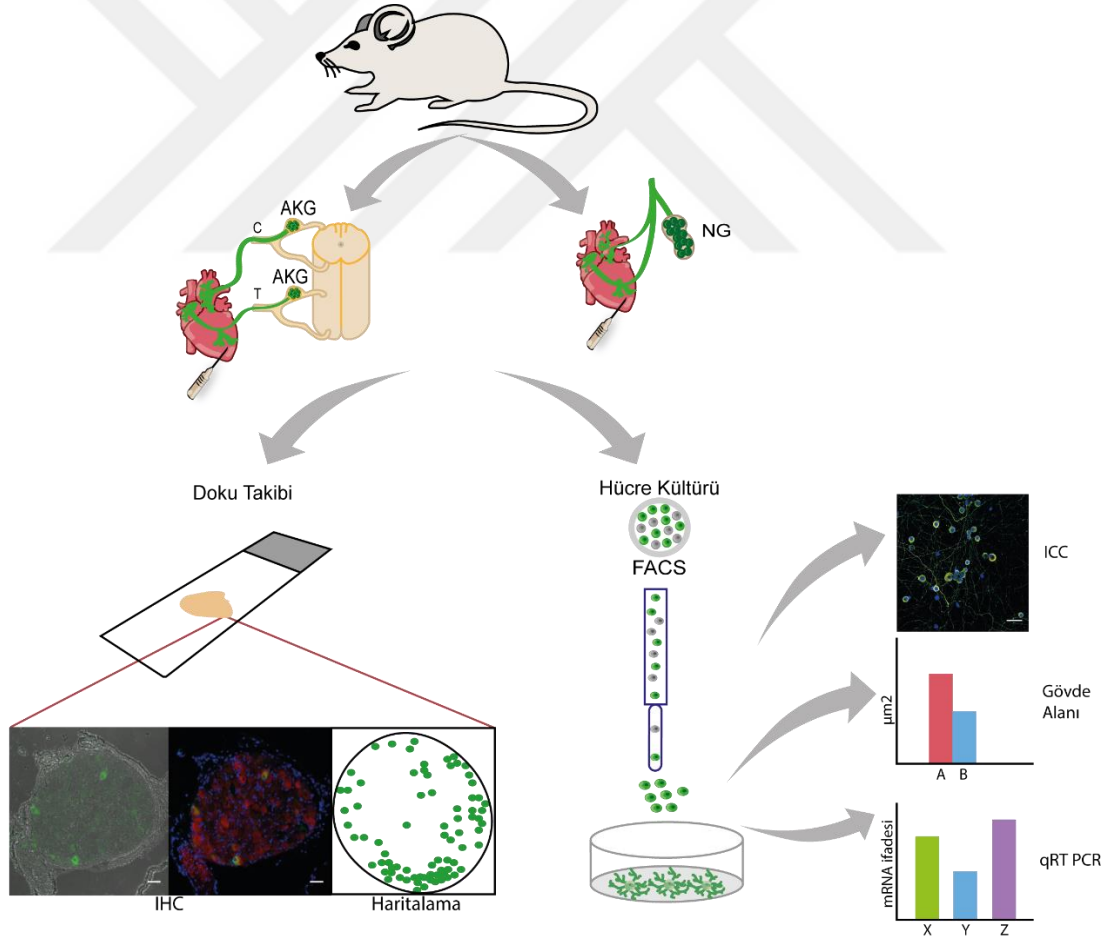
4.14.6 Di-8-ANEPPQ

Di-8-ANEPPQ (6-(Diocetyl amino)-2-(2-(4-pyridyl) ethenyl naphthalene), voltaja duyarlı, retrograd taşınma özelliğine sahip olan ve hızlı cevap veren bir membran boyasıdır. Bu boya, enjeksiyon sonrası difüzyon yoluyla aksonlardan hücre gövdesine taşınmaktadır. Di-2-ANEPEQ'den daha hidrofobiktir ve nöronların retrograd boyanması için kullanılmaktadır. ANEP ailesi, çevrelerindeki elektriksel potansiyele hızlı tepki veren problemlerdir. Sinir, kalp ve beyin hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerdeki potansiyel değişiklikleri tespit etmek için de kullanılmaktadır (93). Literatürde Di-8-ANEPPQ'nun voltaja duyarlılık özelliği kullanılarak hücrelere kimyasal ve elektrik gibi uyaranlar verilip membran değişiklikleri incelenmiştir (94). 1996 yılında Werner ve ark., embriyonik tavukları kullanarak yaptıkları çalışmada Di-8-ANEPPQ'yu omurilikten enjekte ederek, 1-2 saat bekleme sonrası, motor nöronlarında işaretli hücreleri gözlemlemiştir. Yapılan çalışma ile boyanın retrograd taşıma yoluyla nöronal hücre gövdelerini, dentrit ve aksonları işaretlediği belirlenmiş, motor nöronların uyarımlar sonrası floresan değişiklikleri kaydedilmiştir. Bu çalışma ile Di-8-ANEPPQ'nun belirli bir nöron popülasyonu içindeki sinir ağlarında uyarımlara karşı cevabın ölçülmesinde ve bağlantıların haritalanmasında yararlı olabileceğini göstermişlerdir (95). Bu tez çalışması kapsamında Di-8-ANEPPQ'nun nöronları retrograd olarak boyama özelliğinden kaynaklı tercih edilmiştir.

5 METOT VE MATERYAL

5.1 Deney Dizaynı

Bu tez çalışması kapsamında kalbe özgü duyu nöronlarını doku ve kültür düzeyinde incelenerek, AKG ve NG kökenli kalbe özgü duyu nöronlarının gövde çapı, akson kalınlığı gibi morfolojik ve 3-boyutlu haritalama gibi moleküler karakterizasyonunun yapılması planlanmıştır. Proje içerisinde uygulamayı önerdiğimiz *in vivo* işaretleme, FACS, kalbe özgü duyu nöronu morfolojisini incelemek amacıyla qRT-PCR, immunositokimya, immunohisyo kimyasal yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Deney basamaklarının tamamı İstanbul Medipol Üniversitesi bünyesinde bulunan Regeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) gerçekleştirilmiştir. Planlanan çalışmanın basamakları Şekil 5.1.1' de detaylandırılmıştır.



Şekil 5.1.1. Çalışmanın deneysel basamak ve yöntemlerini içeren şema.

5.2 Fare Soyları

Hayvanlarla yapılan tüm deneysel işlemler İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 38828770-604.01.01-E.44147 nolu izini ile gerçekleştirildi. Bu tez çalışmasında yetişkin 10-12 haftalık dişi BALB/c Albino türü fareler kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan deney hayvanları İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM)'nden temin edildi.

5.3 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Vasatlar

Tablo 5.3.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
96-Kuyulu PCR Petrisi	BIO-RAD	HSP9601
Eppendorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R
iQ SYBR Green Supermix	BIO-RAD	170-8882
iScript cDNA Sentez Kiti	BIO-RAD	170-8891
LightCycler 8'li Strip	Roche	6612601001
RNA Zap	Sigma	MBP-7000
Rnase/Dnase İçermeyen Su	Sigma Aldrich	W4502
RNeasy Plus Micro RNA İzolasyon Kiti	Qiagen	74034
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	BIO-RAD	172-5272
Qubit RNA Ölçüm Kiti	Thermo Fisher	Q32855

Tablo 5.3.2. Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler ve malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
0.22 um Filtre	Millipore	SLGP033RS
100 um Cell Strainer	Falcon	352360
15 ml Falkon	Falcon	352096
35 mm Cam Petri	WPI	Fd35-100
50 ml Falkon	Falcon	352070
6 well Plate	Corning	3516

Eppendorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R
Hücre Kazıyıcısı	Costar	3010

Tablo 5.3.3. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
0.05% Tripsin/EDTA	Gibco	25300054
B-27 Supplement (50X),	Thermo Fisher	17504044
Collagenase XI	Sigma	C7657
DMEM	Thermo Fisher	41966029
DNase	Sigma	D4513
DPBS (+CaCl ₂ ,+ MgCl ₂)	Gibco	14040-091
DPBS(-CaCl ₂ ,-MgCl ₂)	Gibco	14190-094
FBS	Gibco	10270-106
HBSS (+CaCl ₂ ,+ MgCl ₂)	Gibco	H9269
Laminin	Sigma	L2020
MEM NEAA	Gibco	11140-050
Na-pyruvate	Gibco	11360-070
NBA	Gibco	10888-022
NGF	Sigma	N6009
Pen Strep	Gibco	15140-122
Poly-L-Lysine	Sigma	P6282
RPMI 1640	Thermo Fisher	21870076
Tripsin İnhibitörü	Sigma	T6622

Tablo 5.3.4. Hücre kültüründe kullanılan besi yeri içerikleri

Sarf Malzeme	Miktar	Marka	Katalog Numarası
AKG-NG Diseksiyon Vasatı			
RPMI	%98	Gibco	41966-029
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Sigma Aldrich	M3148
Hücre Ekim Vasatı			
NBA	%94	Gibco	10888-022

B27	%2	İnvitrogen	17504-044
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Sigma Aldrich	M3148

Tablo 5.3.5. İmmun boyamalarda kullanılan malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
BSA	Capricorn	BSA1S
Sitrat Tamponu	Bio-Optica	15M103
Fluoromount Aqueous Mounting Medium	Sigma Aldrich	F4680
Goat Serum	Gibco	16210-064
Hydrogen Peroxide Solution	Sigma Aldrich	H1009
Lamel (24x60mm)	Deckglaser	
PAP Pen	Sigma Aldrich	Z672648-1EA
Paraformaldehit	Sigma	158127
Pozitif Yüklü Mikroskop Slaytları (26x76mm)	Laborant	201504
Sodyum Azide	Sigma	S8032
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems	14020108926
Triton-X 100	Sigma	X-100
Tween 20	Sigma	P1379

Tablo 5.3.6. Antikorlar ve Florasan işaretleyiciler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası	ICC Dilüsyon	IHC Dilüsyon
Alexa Flour 488	Cell Signaling	4408S	1:1000	
Alexa Flour 633	Moleculer Probes	A21050	1:500	
Alexa Flour 647	Cell Signaling	4414S	1:1000	
DAPI	Sigma	D9542	1:1000	

Di-8-ANEPPQ	Biotium	61014		
DiI	Invitrogen	N22880		
Fluorogold	Santa Cruz	sc358883		
NF200	Abcam	ab4680	1:100.000	1:1000
P2RX2	Alomone Lab	APR-003	1:200	1:200
SCN10A	Alomone Lab	ASC-016	1:200	1:200
TRPV1	Abcam	ab203103	1:500	1:200
TUJ1	Abcam	ab18207	1:1000	1:500
WGA Alexa Fluor 647	Life Tech	W32466	1:1000	1:500

5.4 Cihazlar

Tablo 5.4.1. Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka	Model
Akım Sitometrisi Analizi	FlowJo	Versiyon 10.5
FACS	BD	Influx
Fiji	ImageJ	
Işık Mikroskobu	Zeiss	
İnkübatör	Thermo Scientific	
Konfokal Mikroskobu	Zeiss	LSM780
Kryostat	Leica	CM1950
Masaüstü Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific	ST16R
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
Termal Döngü Cihazı	BIO-RAD	T100 Thermal Cycler
qRT-PCR cihazı	BIO-RAD	CFX Connect
Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Scientific	Q33216
Sınıf 2 Biyolojik Kabin	Thermo Scientific	51026638

Tablo 5.4.2. *In vivo* operasyonlarda kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihaz/Malzeme	Firma Adı	Katalog Numarası
Di-8-ANNEPPQ	Biotium	61014

Eğitim Mikroskopu	Zeiss	Discovery V8
Enjektör İğnesi	BD Microlance 3	304000
Forseps	Dumont #5 standard	11252-30
Hamilton Enjektörü	Hamilton	5221002
Heparin	Mustafa Nevzat İlaç	Nevparin
İpek Dikiş İpi 5/0	Doğsan	S2165
Isıtıcı Plaka	WPI	Hot cold plate
Ketasol	Richterpharma	3516
Makas	Vannas Spring scissors	1500--00
Mikro Cımbız	Aesculap	BD333R
Minivent	Harvard Apparatus	D-79232
Perfüzyon Pompası	Ismatec	NP40
Rompun	Bayer	430720U
Trakeal Kanül	Harvard Apparatus	73-2830
Ventilasyon Tüpü	Harvard Apparatus	73-0027
Ventilatör	Harvard Apparatus	73-0043

5.5 qRTPCR'da Kullanılan Primerler

Kalbe özgü duyu nöronlarını moleküler düzeyde karakterize etmek amacıyla tasarlanan primerler **Tablo 5.5.1'** de gösterilmiştir.

Tablo 5.5.1. AKG ve NG hücrelerinin karakterizasyonu için kullanılan kantitatif gerçek zamanlı PCR primerleri

	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Primerleri	Primer dizisi 5'-3'
Nosiseptor Primerleri	TRPV1-F	CATCTTCACCACGGCTGCTTAC
	TRPV1-R	CAGACAGGATCTCTCCAGTGAC
	TRPV2-F	GGGTCAATGCCTGTATCCTG
	TRPV2-R	TGCCAGAGAAAGAGGTAGCT
	SCN10A-F	CGCTGAATCTCTTTGTCGGG

	SCN10A-R	CGTCTTCTCCTCGCTCTGAT
	TRPA1-F	AACACGGCTTTGATGTCCAC
	TRPA1-R	TCATGTCCAAGTCTCCGCTT
	TRKA-F	ACCCACAGTGAAGATCCAGA
	TRKA-R	CCAAATTTCTTCACGGTGGC
	CHRNA6-F	GAGACACTTCGAGTTCAGCAG
	CHRNA6-R	GGTCCAGGTTATCACACCGTCA
	P2RX2-F	TACCTGCCATTCAGACGACG
	P2RX2-R	GCTTGCAATGTTGCCCTTTG
Nöron Primerleri	TUJ1-F	ACGCATCTCGGAGCAGTT
	TUJ1-R	CGGACACCAGGTCATTCA
	NF200-F	AAAGTGAACACGGATGCTATGC
	NF200-R	GTGCTTTTCAGTGCCTCCAAC
	VGLUT-F	TGCTACCTCACAGGAGAATGGA
	VGLUT-R	GCGCACCTTCTTGCACAAAT
Normalizasyon için Kontrol Genleri	GAPDH-F	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA
	GAPDH-R	CGGAGATGATGACCCTTTTC

5.6 *In vivo* Opere Edilecek Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu tez çalışması kapsamında 2-3 aylık yetişkin Balb-C türü fare kalbe özge duyu nöronlarını işaretlemek için kullanıldı. Deney hayvanları tartılarak ağırlıkları belirlendi. Daha sonra fareleri anesteziye almak amacıyla Ketamin (100 mg/kg) ve Ksilen (10 mg/kg) karışımı hazırlanıp intraperitoneal yol ile enjekte edildi. Farenin refleksleri; parmak kısırtma yanıtlarına belirli aralıklarla bakılarak, anesteziye girip girmediği kontrol edildi. Aseptik koşulların sağlanması amacıyla farenin göğüs bölgesi ve çene bölgesi tıraş edildi.

5.7 Trakeostami

Fareler oral veya trakeostami adı verilen iki farklı yöntemle entübe edilebilir. Cerrahi müdahale sırasında torakotomi aşamasında vücuttaki negatif basınç bozulduğu için hayvanın akciğerleri söner. Entübasyonun temel amacı bu negatif basıncı sağlamak ve operasyonda oluşabilecek komplikasyonları en aza indirmektir. Hayvanların anatomik yapısı ve ağırlığı bakımından küçük olduğu için bu çalışma kapsamında trakeostami yöntemi tercih edildi. Trakeostami işlemi için ilk olarak boğazın orta bölgesine 1-1.5 cm'lik dikey bir kesi atıldı. Kesi yapılan bölgenin altında bulunan bağ doku disekte edildi ve submandibular tükürük bezleri yan taraflara alındı. Yapılan işlemler sırasında vagus siniri ve karotid artere zarar verilmemesine özen gösterildi. Trake görünür hale geldikten sonra, iki segment arasında makas ile küçük bir kesi atıldı. Aspirasyon ve ventilasyon değerleri farenin ağırlığına göre düzenlendi. Daha sonra endotreal tüp, trakede açılan boşluğa yerleştirildi (Resim 5.7.1). Operasyonda oluşabilecek hipotermi ve benzeri komplikasyonları önlemek için fare sıcak ped üzerine yatırıldı.

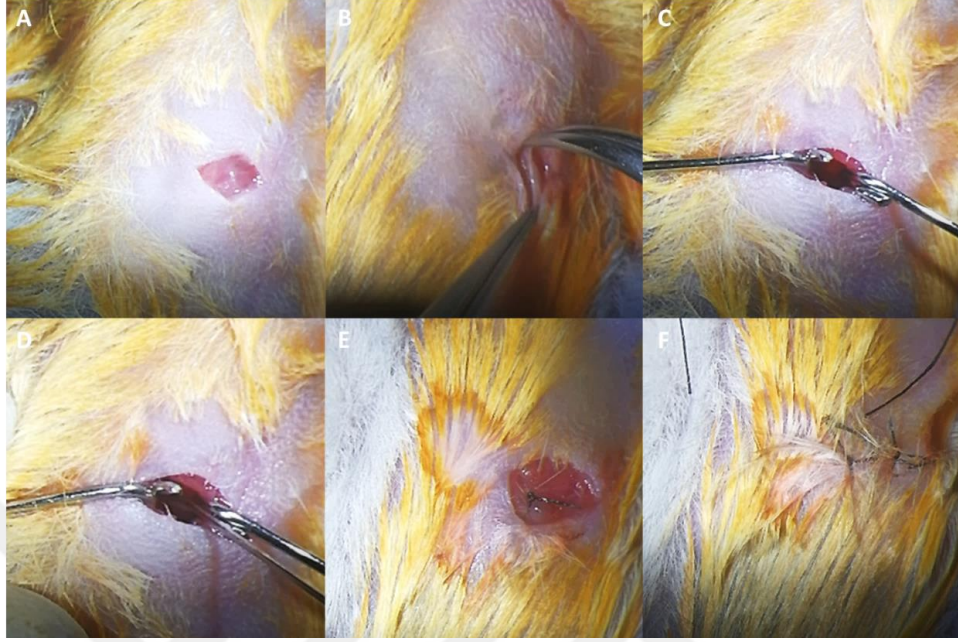


Resim 5.7.1. BalbC farelerin trakeostomi yöntemi ile entübasyonu. (A) Trakeye ulaşmak için bağ doku diseksiyonu (B) Ventilasyon için trakeye kesi oluşturma (C) Trakeostomi tüpünün yerleştirilmesi (D) Operasyonun ardından kesinin dikilmesi

5.8 Farede *in vivo* Retrograde İşaretleme

Kalbe özgü duyu nöronlarını işaretleme amacıyla çalışmamızda çeşitli retrograd boyalar tercih edildi. Voltaj duyarlı Di-8-AnepPQ, Fluorogold, DiI, WGA-Alexa Fluor 647 olmak üzere dört farklı boya kullanıldı. Fareler anesteziye alınıp, trakeostemi işlemi gerçekleştirildikten sonra, farenin kaburga kaslarının 4-5. seviyelerinin bulunduğu bölge belirlendi. Belirlenen bölgeye kesi atıldı, sırasıyla deri ve kaslar, kaburgayı görene kadar dikkatlice disekte edildi. Kaburga küt uçlu cerrahi aletle ayrıldı. Kaburgaların arasını rektör yardımıyla açılarak kalp görünür hale getirildi. Retrograd boya, Hamilton enjektörü ile kalbe verildi. Boya verildikten sonra,

sırasıyla kaburga, kaslar ve deri 5.0 ip kullanılarak dikildi. Enfeksiyonu önlemek amacıyla operasyon bölgesi batikon ile temizlendi (Şekil 5.8.1).

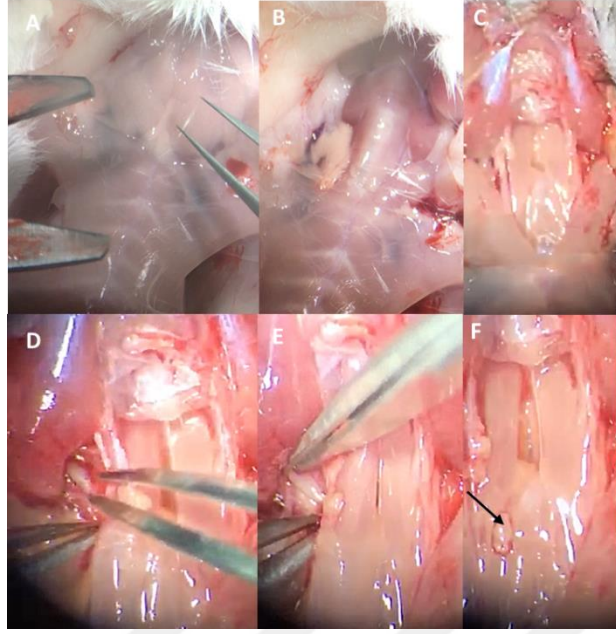


Resim 5.8.1. Fare kalbine Di-8-AnepPQ boyasının verilme basamakları (A) Göğüs bölgesinin traşlanma sonrası derisine kesi atılması (B) Kalbe ulaşmak için bağ doku diseksiyonu (C) Ekartörler yardımıyla disekte edilen bölgenin sabitlenmesi (D) Di-8-AnepPQ yüklü hamilton enjektörü ile kalbin apeks bölgesine boyanın enjeksiyonu (E) toraks ve kas bölgesinin 5-0 ipek iplikle dikilmesi (F) Derinin dikilmesi. Operasyon tamamlandıktan sonra fareler post-operatif odasına alınır.

5.9 Fareden Doku İzolasyonu

5.9.1 Nodoz Gangliyon (NG) İzolasyonu

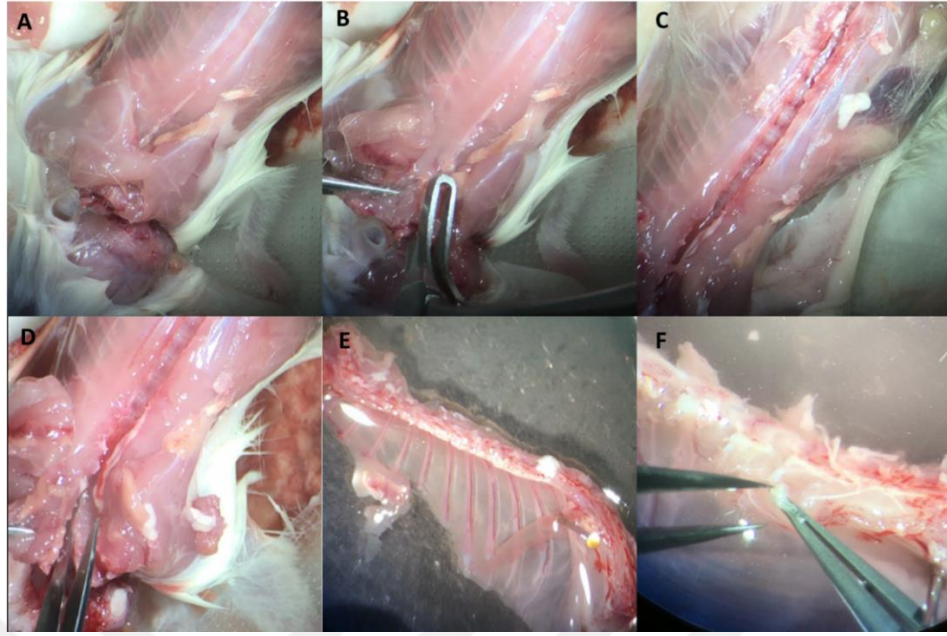
In vivo uygulaması sonrası 7. günde farelerde diseksiyon sırasında kanama riskini azaltmak ve diseksiyonu kolaylaştırmak amacıyla kalbin aortadan kesilmesi gerekmektedir. Fare ketamine (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anesteziye alındıktan sonra, diseksiyon için sırt üstü yatırıldı ve sabitlendi. 70% alkol ile göğüs kafesi sterilize edilmiş fare stratum hizasından deri ve daha sonra diyaframa ulaşılarak diyafram kesildi. Kalbe ulaşıldıktan sonra aortadan kesilerek, vücudundan tüm kanın boşalması beklendi. Nodoz diseksiyonu için boyun bölgesindeki deri kesildikten sonra tükürük bezleri alındı, trake çıkarılarak vagus sinire ulaşıldı. Vagus sinir lifi takip edilerek jugular foramende bulunan nodoza ulaşıldı (Şekil 5.9.1). Sağ ve solda 1 adet olan nodozlar çıkarılarak stereo mikroskop altında steril koşullarda RPMI 1640 vasatına alındı.



Resim 5.9.1. Nodoz diseksiyonun basamakları. (A) Tükürük bezlerinin alınması (B) Trakenin kesilmesi (C) Kesilmiş olan trake (D) Sinir takip edilerek nodozun bulunması (E) Sinirleri takip edilerek bulunan nodozun diseksiyonu (F) disekte edilen nodozon görüntüsü.

5.9.2 Arka Kök Gangliyon (AKG) İzolasyonu

AKG diseksiyonu için servikal seviyedeki omurilik kafatası ile birleşme noktasından kesilerek omurilik açığa çıkarıldı. Omurilik temizlenerek, sağ ve sol kosta soğuk tampon çözeltisi içerisine alındı (Şekil 5.9.2). Servikal ve toraks seviyesindeki AKG'lar stereo mikroskobu yardımıyla kostadan çıkarılarak, soğuk RPMI 1640 içerisine alındı.



Resim 5.9.2. AKG diseksiyonunun basamakları. (A) Omurilik kesimi (B) Omuriliğin oluk makası ile ayrıştırılması (C) Temizlenmiş olan kostalar (D) Kostaların makas yardımı ile kesimi (E) Kostanın silikon tabanda sabitlenmesi (F) Kemiklerin arasında bulunan AKG'nin çıkarılması.

5.10 Fare Primer Hücre Kültürü

Kalbe özgü duyu nöronlarını, hücre boyutunda incelemek adına, diseksiyon sonrası AKG ve NG dokuları enzimatik ve mekanik olarak ayrıştırıldı. Sonraki aşamada hücreleri moleküler analizler yapmak amacıyla petri kaplarına ekildi.

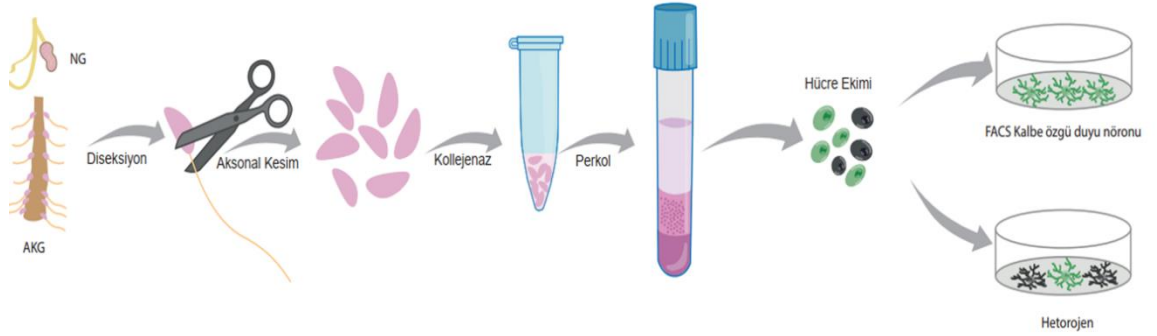
5.10.1 Hücre Plak Yüzey Matrisleri

Kültüre edilen AKG ve NG hücrelerinin petri kaplarına daha iyi tutunması ve yapışmasını sağlamak için Poly-L ve laminin kullanılmaktadır. İlk olarak steril dH₂O %10 Poly-L petri kaplanarak iki saat oda sıcaklığında bekletildi. Petri kapları iki saat sonunda iki kere steril dH₂O ile yıkandıktan sonra kalsiyum ve magnezyum içermeyen 1x PBS ile 10 mg/ml olarak hazırlanan Laminin kaplandı. Kaplamanın tamamlanması için petri kapları 37°C inkübatörde bir gece bekletildi.

5.10.2 Sinir Hücre Kültürü

Kalbe özgü duyu nöronlarının detaylı morfolojik ve moleküler incelemelerini yapmak amacıyla, diseksiyon sonrası NG ve AKG dokuları 100 U/mL Tip XI Kolajenaz içerisinde 40 dakika 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası dokular enzimi ortamdaki uzaklaştırmak için Hank's Buffer Salt solüsyonu ile yıkandı. Dokular 1 mg/ml tripsin içerisinde alınarak 37°C de 15 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası dokular sırayla kesik mavi uç, mavi uç ve sarı uçlardan geçirilerek mekanik olarak ayrıştırıldı. Tritürasyonun son aşamasında insülin enjektöründen geçirilen hücreler 100 mg/mL DNase içerisinde 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1000 Rotation Per Minute (RPM)’da santrifüj edilen hücrelerin supernatantı atılarak, pelleti %10 fetal bovine serum ve 700 lg/mL tripsin inhibitörü içeren NBA ile dilüe edildi. Hücreleri glia ve kan hücreleri gibi sinir hücresinden farklı hücrelerden ayırmak amacıyla %10, %35 ve %60 perkol gradienti hazırlandı. Hazırlanan gradyana hücre süspansiyonu yavaşça eklendi. Hücre süspansiyonunu gradientde ayırmak için 1700 RPM’de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda beyaz bulutumsu bir tabaka oluştu, oluşan bu yapının altında bulunan sinir hücreleri pipet yardımıyla alındı. Perkolü ortamdan uzaklaştırmak için hücreler NBA eklenerek santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti FACS da ayrıştırılmak için PBS içerisine alındı. Heterojen örnekler için de aynı basamaklar uygulandı, hücre pelleti NBA içerisinde çözülerek hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Sayım sonrasında deney planına uygun şekilde petri kaplarına ekildi (Şekil 5.10.1).



Şekil 5.10.1. AKG ve NG izolasyonunun şematik olarak gösterilmesi.

5.11 Floresanca Aktifleştirilmiş Hücre Ayrışması (FACS)

Enzimatik ve mekanik yollarla Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü AKG ve NG dokuları, hücre boyutuna ayrıştırıldı. Di-8-ANEPPQ işaretli heterojen hücreleri homejen hale getirmek için Floresanla Aktive Edilmiş Hücre Ayrıştırma (FACS-sorter; BD Biosciences) cihazı kullanıldı. Bu çalışma için, *in vivo* olarak kalbe Di-8-aneppQ verilen ve herhangi bir müdahalede bulunulmayan kontrol farelerden AKG ve nodöz gangliyonlar operasyonun 7. gününde çıkarıldı. AKG izolasyonunda belirtilen adımlar takip edilerek enzim yoluyla ayrıştırılan hücreler, %1 DNase ve %1 FBS içeren kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS içerisine alınarak 100 µm’lik hücre

süzgeçinden (cell strainer) geçirildi. FACS ayırıştırması sırasında kapılamanın canlı ve sağlıklı hücrelere odaklanması, ölü hücre ve debrilerden kurtulmak amacıyla sırasıyla kontrol NG ve AKG hücreleri FACS'ta 488 nm uyarım ve GFP ve 700 nm ışımaya filtreleri kullanılarak analiz edildi. Otofloresan ve canlı hücre profilinin oluşturulması sonucunda sırasıyla Di-8-ANEPPQ işaretli NG ve AKG heterojen hücre popülasyonu floresanla aktive edilerek işaretli nöronlar 25 ng/ml NBA içeren 35 mm'lik petri kaplarına ayırıştırıldı. Ayırıştırılan Di-8-ANEPPQ işaretli hücreler LSM780 konfokal mikroskopunda incelendi. Boyanın saflaştırılan hücrelerdeki varlığı belirlendikten sonra petriyelerden hücreler toplanarak 1000 RPMI 3 dakika santrifüj edildi. NG ve AKG hücrelerinin bir kısmı kültüre edilerek geri kalanı RNA izolasyonu için ayrıldı. Kültür ortamına alınan hücrelerin canlılığını korumak ve FACS sonrası stresi azaltmak için ayırıştırma işlemi tamamlandıktan sonra hücre vasatına 25 ng/ml NGF konuldu. Bir sonraki gün kültür besiyeri değiştirilerek hücrelerin durumu ışık mikroskobu altında incelendi.

5.12 İmmünohistokimyasal (ICC) İnceleme

Heterojen olarak elde edilen kalbe özgü duyu nöronları FACS ile saflaştırıldıktan sonra petri kaplarına ekildi. Hücrelerin petri kabına tutunması ve akson uzatması için 2-3 gün beklendi. Kültürün 3-4. günlerinde hücreler %4 PFA (Paraformaldehit) ile sabitlendi. Hücrelerin protein düzeyini ve hücre içi lokalizasyonunun belirlemek amacıyla immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Boyama protokolü uygulanacak hücrelerin ilk olarak besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve PBS ile yıkanarak besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreleri sabitlemek amacıyla %4 PFA hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sabitlenen hücreler 1x PBS ile yıkandıktan sonra 1x PBS'te çözülen %3 BSA, %0.01 Sodyum Azit, %5 Serum, 0.1% Triton X ile hazırlanan bloklama solüsyonunda 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Proteinleri işaretlemek amacıyla Tablo 5.3.6'de belirtilen konsantrasyonlarda birincil antikorlar hücre kaplarına eklendi ve çalkalayıcıyı kullanarak örnekler +4°C de 12-16 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, eklenen antikorlar pipet yardımıyla toplandı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra mikroskopta floresan görüntü alabilmek için kullanılan birincil antikorları tanıyıp bağlanabilen floresan özellikli ikincil antikorlar kullanıldı. Konsantrasyonları Tablo 5.3.6'da belirtilen ikincil antikorlar

petriye ekledi ve inkübasyon karanlıkta oda sıcaklığında gerçekleştirildi. İkincil antikorlar bir saat sonunda ortamdan uzaklaştırıldı. Floresan boyama sonrası hücreler %0.02 Tween-20 PBS ile yıkanarak bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi hücrelere çekirdek boyası 1 µg/ml DAPI (Sigma, D9542) eklenerek 3 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra kurumaması için tekrar PBS eklenerek LSM780 Konfokal mikroskobu ile görüntülendi.

5.13 İmmünohistokimyasal (IHC) İnceleme

Operasyonun 7. gününde hayvan perfüze edilir. Perfüze edilen hayvanın AKG ve NG sinirleri ile birlikte boyanın verildiği yeri belirlemek için kalp disekte edilerek doku dondurma mediumu içerisine alınarak donduruldu. Boyanın kalp dışındaki organlara taşınıp taşınmadığını gözlemlemek amacıyla ayrıca akciğer, karaciğer gibi organları da donduruldu. Doku dondurma mediumu içerisindeki dokular -80°C ye kaldırıldı. İmmünboyamada kullanmak amacıyla kroyostatda 10 µm kesitler alındı. Doku kesitleri %4 PFA'da 20 dakika oda sıcaklığında sabitlendi. Sabitlenen örnekleri PFA'dan uzaklaştırmak amacıyla dokular 1x PBS ile yıkandı. Sonraki aşamada dokulardaki peroksidaz enzimini inaktive etmek amacıyla %0,3 Hidrojen Peroksit ile dokular yıkandı. Birincil antikorun çalışmasına göre epitop açığa çıkarma işlemi yapıldı. Epitop açığa çıkarmak için sitrat tamponun içine alınan slaytlar mikrodalga fırında 5 dakika 700W, 12 dakika 300 W da ısıtılarak inkübe edildi. Isıtılan dokular sitrat tampon içerisinde oda sıcaklığına alınarak soğuması beklendi ve daha sonra pap kalemi ile dokuların etrafında hidrofobik bir bariyer oluşturuldu. Doku kesitlerinin üzerine bloklama solüsyonu eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bloklama gerçekleştirildi. Bloklama sonrası, solüsyon ortamdan uzaklaştırıldı. Dilüsyon tampon çözeltisi ile istenilen oranda sulandırılan birincil antikorların doku kesitlerinin üstüne eklendi. Kesitler gece boyunca +4°C de inkübe edildi. Bir sonraki gün birincil antikorlar çekilerek, kalan kimyasalı uzaklaştırmak amacıyla kesitler PBS ile yıkandı. Birincil antikorunu tanıyacak ikincil antikor istenilen dilüsyonda hazırlanarak dokuların üstlerine konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. PBS yıkamaları yapıldıktan sonra, çekirdekleri boyamak amacıyla DAPI (1µg/ml) ile oda sıcaklığında 5 dakika muamele edildi. Boyaması sonrası PBS ile yıkanan dokular kapatma mediumunu kullanarak lamel ile kapatıldı. Kapatıcının polimerleşmesi için kesitler

+4°C 1 gece boyunca bekletildi. LSM780 Konfokal mikroskobu kullanılarak mikroskop altında incelenerek doku kesitlerinin boyaması tespit edildi.

5.14 Di-8-ANEPPQ ile İşaretli Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Yer ve Yüzdesinin Doku Kesitlerinde Haritalaması

AKG ve NG'nin Di-8-ANEPPQ ile *in vivo* işaretleme sonrası dokuların bütün olarak ya da alınan seri kesitlerde kalbe özgü duyu nöronlarının 3B (3-boyutlu) yapısında konumunu tespit etmeyi ve kalbe özgün duyu nöronlarının işaretlenmiş heterojen dokudaki yüzdelik gösterimini tayin etmeyi amaçladık. Bu amaçla, *in vivo* işaretlenmiş NG ve AKG dokuları diseksiyon sonrası OCT ile donduruldu. Dondurulan dokuların kryostatla 10 µm kalınlığında seri kesitleri alındı ve LSM780 konfokal mikroskobunda Di-8-ANEPPQ işaretli kesitler görüntülendi. Daha sonra işaretli kesitlerdeki hücre sayısını, toplam nöronlara oranlamak amacıyla, doku kesitleri 1mg/ml DAPI ile boyandı. Boyama sonrası kesitler 1 kez PBS ile yıkandı ve görüntüleme öncesi doku kapatma solüsyonu ile kesitler kapatıldı. Haritama için alınan kesitler ImajeJ, Zen Lite ve Adobe Illustrator programı kullanılarak analiz edildi ve birleştirildi. Birleştirme yaparken önce tüm fotoğraflar czi formatından JPEG formatına dönüştürüldü. Adobe Illustrator programında üçlü fotoğraflar olacak şekilde üst üste getirildi. Seri kesit alındığı için, işaretli hücrelerin her kesitte farklı olup olmadığını belirlemek amacıyla, üçlü fotoğraflar biraya getirildi ve daha sonra hücre sayımı, haritalaması yapıldı. AKG ve NG'ler için Illustrator programında haritalama için alınan kesit resimleri kullanılarak çizgisel bir taslak oluşturuldu. Üst üste gelen fotoğraflar, oluşturulan AKG ve NG taslağına yerleştirilerek işaretli nöronların buldukları alanlara temsili olarak noktalar eklendi. Aynı işlem üçlü fotoğraflar halinde tüm kesit fotoğraflarına uygulandı. Haritalama yaparken, yaklaşık her dokudan 30-60 arası kesit elde edildi. Yapılan çalışmada doku bütünlüğü, kesitlerdeki Di-8-ANEPPQ sinyali, kesit sayısı (20-40) dikkat edilerek analizler gerçekleştirildi. Doku bütünlüğünü kaybetmiş, kesit sayısı 15'den az örnekler kullanılmadı.

5.15 RNA İzolasyonu

FACS ile saflaştırılan kalbe özgü duyu nöronlarını moleküler düzeyde

incelemek amacıyla RNA izolasyonu yapıldı. Kalbe özgü duyu nöronları saflaştırıldıktan hemen sonra ya da kültüre edildikten 3 gün sonra RNeasy Plus Micro RNA İzolasyon Kiti kullanılarak izolasyon yapıldı. FACS sonrası 1000-1500 NG hücresi, 15.000-20.000 AKG hücresi elde edildi. Az miktarda elde edilen hücrelerden verimli bir şekilde RNA elde etmek için 500 hücreye kadar RNA izolasyonuna olanak sağlayan RNeasy Plus Micro Kit kullanıldı. Kitin içerisinde bulunan protokolün adımlarında birkaç değişiklik izlenerek RNA izolasyonu yapıldı. Hücre süspansiyonundan yapılacak olan RNA izolasyonu için besiyer uzaklaştırılarak lizis tamponu eklendi. Eğer izolasyon hücre kültüründeki tutunan hücrelerden yapılacaksa besiyeri uzaklaştırılarak petri kapları 1x PBS ile bir kez yıkandı. 350 μ l %1 β -mercaptoethanol içeren lizis tamponu, hücre süspansiyonu içeren eppendorfa veya petri kaplarına eklendi. Petri kabındaki lizis tamponu içeren hücreler, hücre kazıyıcısı (cell scraper) ile toplandı. Bu basamaktan sonra hücre süspansiyonu ve tutunan hücreler için aynı adımlar izlendi. Lizis tamponu eklenen örnekler pipetaj yapılarak homejenize edildi. Örnekler gDNA eliminator spin kolonlarına aktarıldı ve 30s 8000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar atıldı, kolonların altındaki tüpe geçen sıvıya 350 μ l %70'lik etanol eklendi ve lizat homojen olana kadar pipet ile karıştırıldı. RNeasy MinElute spin kolonlara aktarılan lizat 15 s 8000 x g de santrifüj edildi. RNeasy spin kolona 700 μ l yıkama tamponundan eklendi ve 15 s 8000 x g de santrifüj edildi. RNeasy Spin Kolona 500 μ l yıkama tamponundan eklendi ve 15 s 8000xg de santrifüj edildi. 500 μ l %80'lik alkol eklendi ve 2 dk 8000xg de santrifüj edildi. Yeni bir toplama tüpüne alınan RNeasy kolonu maksimum hızda 3 dk santrifüj edilerek etanol tamamen uzaklaştırılmış oldu. Bu aşamada RNA'nın toplanacağı RNase içermeyen toplama tüpüne aktarılan kolonun tam ortasına 14 μ l RNase içermeyen distile su eklendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. Daha sonra yüksek hızda 1dk santrifüj edildi ve izole edilen RNA -80°C'de muhafaza edildi.

5.15.1 RNA Kantifikasyonu

RNA izolasyonu sonrası, örneklerin RNA miktarlarını ölçmek için Qubit cihazı ve Qubit cihazına uyumlu olan RNA kiti kullanıldı. RNA kitinde kullanım kılavuzunda ve Tablo 5.15.1'de belirtilen miktarlarda çalışma solüsyonu hazırlandı. Qubit cihazının kalibrasyonu için kit ile birlikte gelen Standart 1 ve Standart 2 Tablo 5.15.1'de belirtildiği şekilde hazırlanarak, vorteksenerek 2 dk oda sıcaklığında inkübe

edildi ve cihazda okutuldu. Kalibrasyondan sonra çalışma solüsyonu içerisine alınan örnekler vortekslenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve cihazda okutuldu.

Tablo 5.15.1. Qubit RNA ölçüm kiti için kullanım miktarları

Hacim	Standart	Örnekler
Qubit Solüsyonu	190 µl	198 µl
Standart	10 µl	-
Örnek	-	2 µl
Toplam	200 µl	200 µl

5.15.2 cDNA Sentezi

AKG ve NG lerden izole edilen RNA'ların konsantrasyon ölçümleri yapıldıktan sonra, cDNA sentezi için iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR kiti kullanıldı. Kit içerisinde bulunan protokol Tablo 5.15.2'de gösterildi. Protokolde verilen oranlara göre hazırlanan master mix tüplere dağıtıldı, RNA ve su eklendi. Tüplerde bulunan örnekler termal ısıtıcıda 30 dk 42°C ve 5 dk 85°C'ye ayarlanan programda ısıtılarak hazırlandı.

Tablo 5.15.2. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

İçerik	Reaksiyon için gerekli hacim (µl)
5x iScript advanced reaction mix	4
iScript advanced reverse transcriptase	1
RNA (50-200ng)	0.5-2
Nükleaz içermeyen su	13-14.5
Toplam Hacim	20

5.15.3 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler Tablo 5.15.3’de gösterilmiştir. Örneklerden elde edilen cDNA 1:3 veya 1:5 oranında dilüe edilerek reaksiyon Tablo 5.13.1’deki gibi gerçekleştirildi. Reaksiyondan elde edilen sonuçlar GAPDH’ye göre normalize edildi.

Tablo 5.15.3. qRT-PCR reaksiyon içeriği

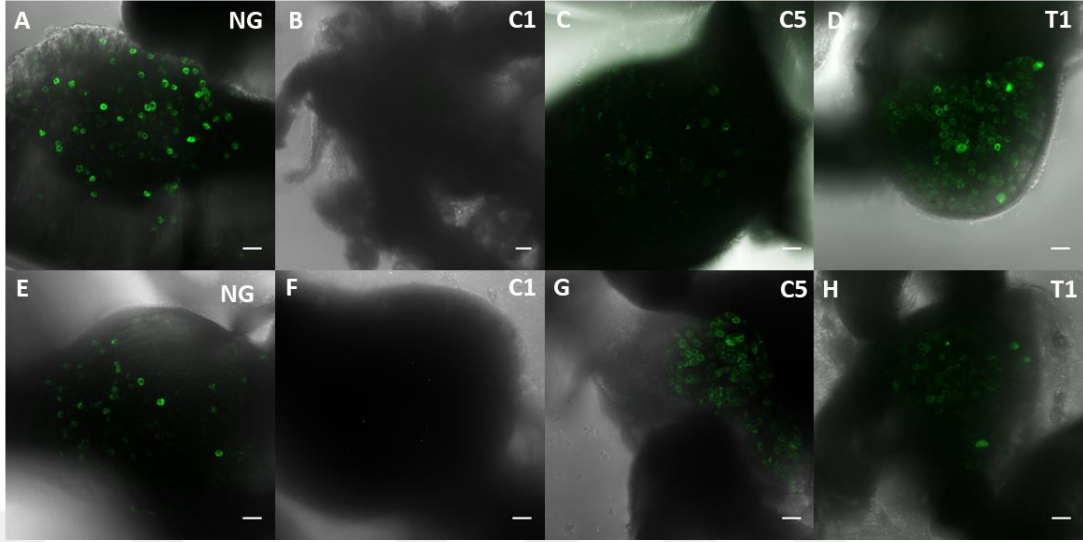
İçerik	Reaksiyon için gerekli hacim (µl)
Nükleaz içermeyen su	3
Forward Primer (10 µm)	0.5
Reverse Primer (10 µm)	0.5
cDNA (1:3)	1
Syber Green supermix (2x konsantrasyon)	5
Toplam Hacim	10

6 BULGULAR

6.1 Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının *In Vivo* İşaretlenmesi ve İşaretli Dokuların Görüntülenmesi

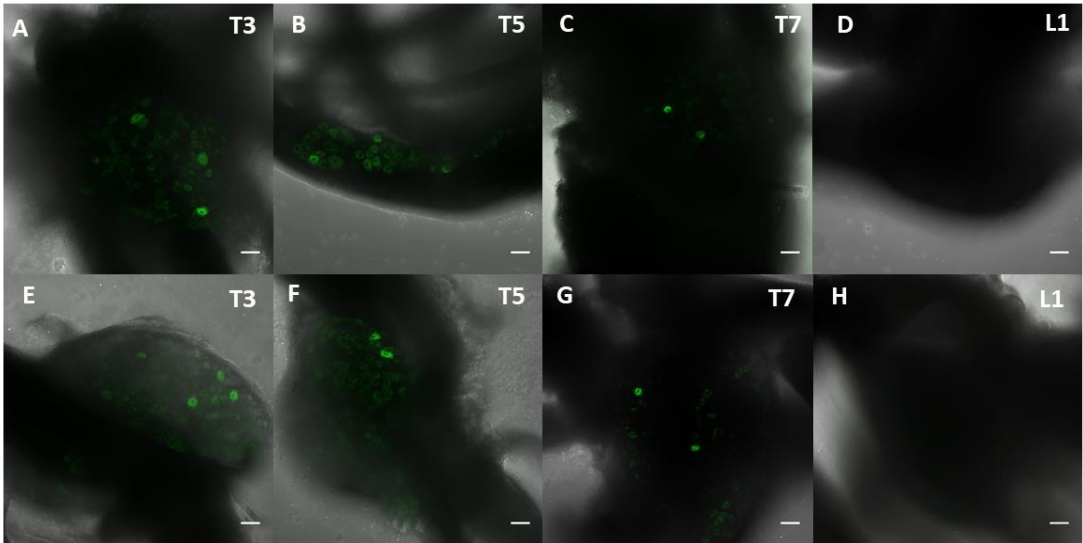
Bu tez çalışmasına öncü olan araştırmalarda, kalbe özgü duyu nöronlarını retrograd boyalar ile işaretlenmesine yönelik *in vivo* doz optimizasyonu, gün ve boya seçeneklerinin değerlendirildiği deneysel çalışmalar MSc. Tuba AKGÜL ÇAĞLAR'ın 'Sinir Hücreleri ile Kalp Kası Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Moleküler ve Elektrofizyolojik Düzeyde Araştırılması' adlı doktora tez çalışmasında yapılmıştır. Ön çalışmalarda, Di-8-ANEPPQ'nun karşılaştırılan DiI ve Fluorogold gibi diğer boyalara göre sayıca daha fazla somayı, yüksek floresan şiddetinde işaretleyebilmesi yönü ile Di-8-ANEPPQ tercih edilmiştir. Di-8-ANEPPQ fare kalbinin apex bölgesine verilerek operasyondan 7 gün sonra AKG ve NG dokularında en verimli *in vivo* işaretlemeyi sağladığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, Di-8-ANEPPQ işaretli sağ ve sol AKG ve NG dokuları ayrı olarak incelendi. Kalbin gövdenin solunda konumlanması nedeniyle kalbe özgü duyu nöronlarının sol AKG'lerde daha yoğun olabileceği düşündük. *In vivo* Di-8-ANEPPQ işaretli AKG ve NG dokuları içerdiği floresan boya ile işaretlenme verimi karşılaştırıldığında, NG dokularında sayıca daha fazla floresan ile işaretli hücre gözlemlendi (Şekil 6.3.1A-E). Sağ ve Sol NG'lerin kendi aralarında karşılaştırılması sonucu hücre sayısı açısından aralarında anlamlı fark gözlenmedi. Sağ ve sol olarak ayrılan AKG'lerin aynı segmentlerinden dallanan dokular incelendiğinde sol C5 seviyesindeki AKG'lerdeki Di-8-ANEPPQ işaretli somaların, sağ C5 seviyesindeki AKG'lere göre sayıca fazla olduğu belirlendi. Ayrıca sağ T1 seviyesinden alınan AKG dokusunda sol T1 dokusuna göre sayıca daha fazla Di-8-ANEPPQ işaretli soma gözlemlendi (Şekil 6.1.1).



Şekil 6.1.1. Di-8-ANEPPQ ile işaretlenen sağ ve sol kostadan alınan AKG ve NG dokularının konfokal mikroskobunda görüntülenmesi. (A) Sağ NG, (B) Sağ C1, (C) Sağ C5, (D) Sağ T1, (E) Sol NG, (F) Sol C1, (G) Sol C5, (H) Sol T1. Ölçek çubuğu: 50 μ m

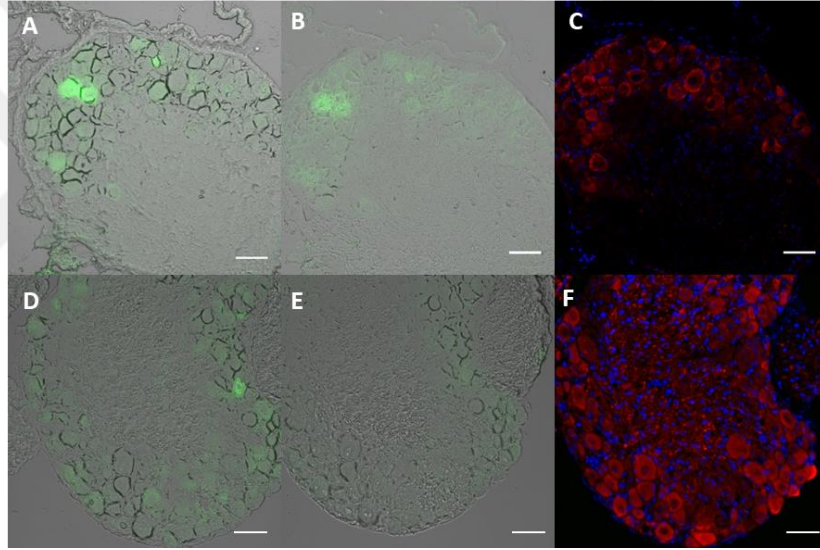
Sağ ve sol T3, T5, T7 seviyelerinden alınan AKG'ler işaretli soma sayısı açısından değerlendirilmesi sonucu aralarında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 6.1.2). Kalbe özgü duyu nöronu innervasyonu ve retrograd taşınım beklemediğimiz C1 ve L1 seviyelerindeki dokular incelenmiştir ve bu iki dokuda da Di-8-ANEPPQ işaretli hücre görülmemiştir. Bu bulgu anatomik olarak C1 ve L1 seviyesinde kalbe dallanan duyu siniri olmadığını doğrulamaktadır.



Şekil 6.1.2. Di-8-ANEPPQ ile işaretlenen sağ ve sol kostadan alınan AKG dokularının konfokal mikroskobunda görüntülenmesi. (A) Sağ T3, (B) Sağ T5, (C) Sağ T7, (D) Sağ L1, (E) Sol T3, (F) Sol T5, (G) Sol T7, (H) Sol L1. Ölçek çubuğu: 50 μ m

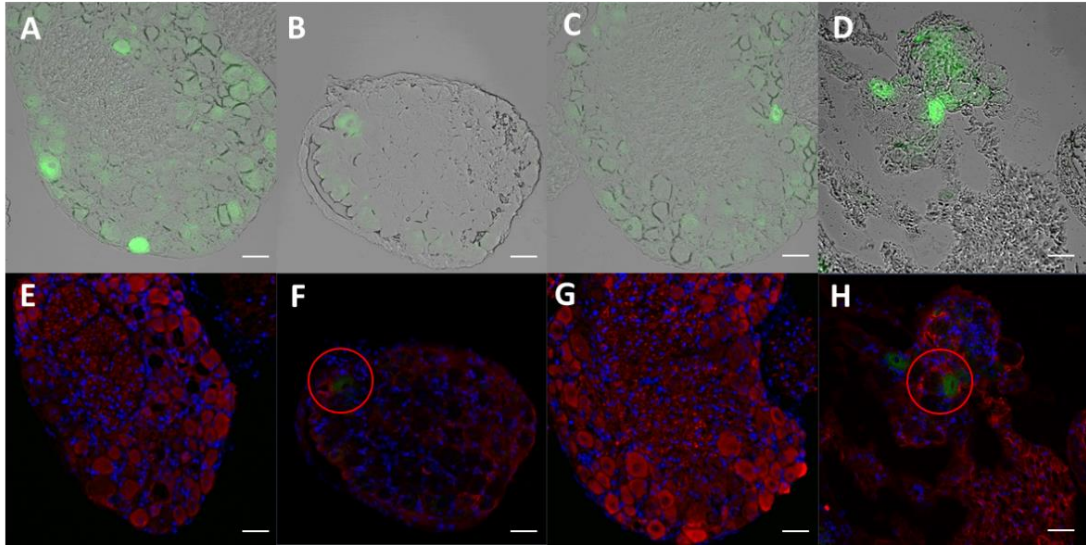
6.2 Di-8-ANEPPQ İşaretli Doku Kesitlerinde IHC Optimizasyon Çalışması

Di-8-ANEPPQ işaretli dokuları daha detaylı incelemek amacıyla kesitlerde yapılan immunohistokimyasal boyamalar sırasında Di-8-ANEPPQ'nun floresan sinyalini kaybettiği tespit edildi (Şekil 6.2.1). Floresan şiddetini korumak ve sinyal kaybını önlemek amacıyla çeşitli optimizasyon çalışmaları yapıldı. İlk olarak kullanılan fiksatifin sıcaklığında değişiklik yapıldı. Oda sıcaklığı ve +4°C olarak iki farklı sıcaklıkta fikselenerek yapılan çalışmada fiksasyon sonrası, +4°C'de fikslenen dokuların, oda sıcaklığında fikslenen dokulara göre Di-8-ANEPPQ sinyalinin daha fazla olduğu ve sinyalini koruduğu belirlenmiştir. Fikslenen dokulara yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda dokularda Di-8-ANEPPQ sinyalinin tamamen kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 6.2.1).



Şekil 6.2.1. Di-8-ANEPPQ işaretli AKGkesitlerde fiksatif sıcaklığı değişkenine bağlı IHC optimizasyonu. (A-D) Fiksasyon öncesi Di-8-ANEPPQ işaretli kesitin görüntüsü, (B) +4°C %4 PFA ile fikse edilen doku kesitinin görüntüsü, (C-F) Di-8-ANEPPQ işaretli AKG kesitinde TuJ1 ve DAPI boyama sonrası konfokalde görüntüsü. TUJ1: Kırmızı, DAPI: Mavi. Ölçek çubuğu: 50 µm

Boyanın sinyalini iyileştirmek ve kaybını önlemek için yapılan bir diğer çalışma ise fiksatif yoğunluğunu değiştirmek ve epitop açığa çıkarma basamağını değerlendirmektir. Fiksatif oranları %1 ve %4 PFA ile fikselenen dokuları incelediğimizde dokuda Di-8-ANEPPQ sinyalinin korunduğu belirlendi fakat epitop açığa çıkarma basamaklı IHC (İmmünohistokimya) sonrası floresan sinyali tamamen kayboldu (Şekil 6.2.2). Epitop açığa çıkarma adımı yapılmadan boyanan kesitlerde ise Di-8-ANEPPQ floresan şiddetinin yüksek oranda azaldığı belirlendi.



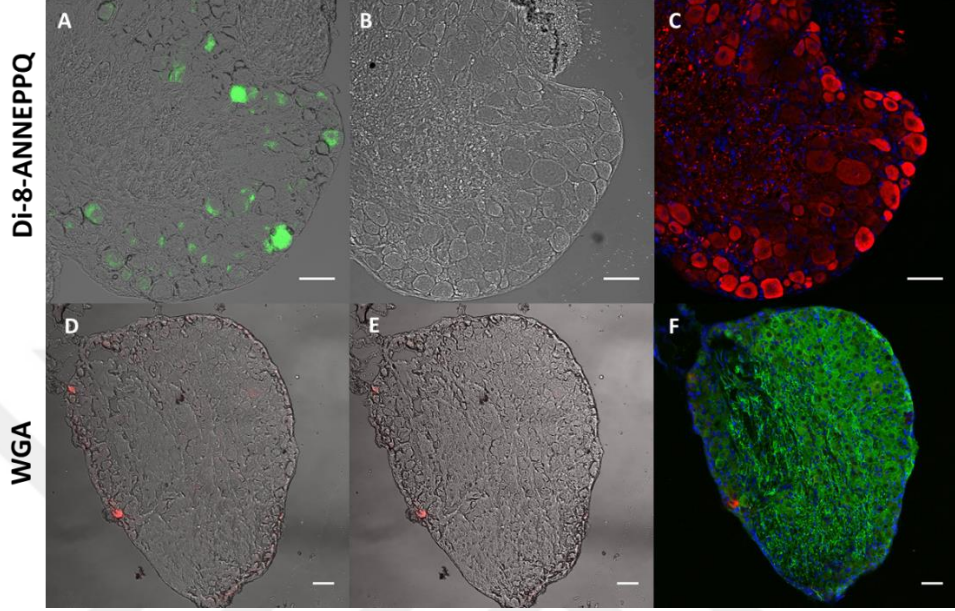
Şekil 6.2.2. Di-8-ANEPPQ işaretli kesitlerde fiksatif ve epitop açığa çıkarma tekniğine bağlı IHC optimizasyonu. (A-B) %1 PFA ile fikslenen AKG kesitlerinin görüntüsü, (C-D) %4 PFA ile fikslenen AKG kesitlerinin görüntüsü, (E) %1 PFA ile fikslenen epitop açığa çıkarma işlemiyle TuJ1 ve DAPI boyaması yapılan kesitin konfokaldeki görüntüsü, (F) %1 PFA ile fikslenen epitop açığa çıkarma işlemi yapılmadan TuJ1 ve DAPI boyaması yapılan kesitin konfokaldeki görüntüsü. (G) %1 PFA ile fikslenen epitop açığa çıkarma işlemiyle TuJ1 ve DAPI boyaması yapılan kesitin konfokaldeki görüntüsü, (H) %1 PFA ile fikslenen epitop açığa çıkarma işlemi yapılmadan TuJ1 ve DAPI boyaması yapılan kesitin konfokaldeki görüntüsü. TuJ1 ve DAPI boyama sonrası konfokalde görüntülenmesi. TUJ1: Kırmızı, DAPI: Mavi. Ölçek çubuğu: 50 µm

Çalışmalarımızın deneysel basamaklarında yaşadığımız sorunları boyayı satın aldığımız ticari firma yetkililerine danışmamız sonucu Di-8-ANEPPQ'nun fikslenmeye uygun olmadığını öğrendik. Bunun üzerine laboratuvarımızda bulunan retrograd olarak taşınabilen boyaları araştırdık.

6.3 Kalbe Özgü Duyu Nöronlarını WGA ve Di-8-ANEPPQ ile İşaretlenmesi ve Karşılaştırılması

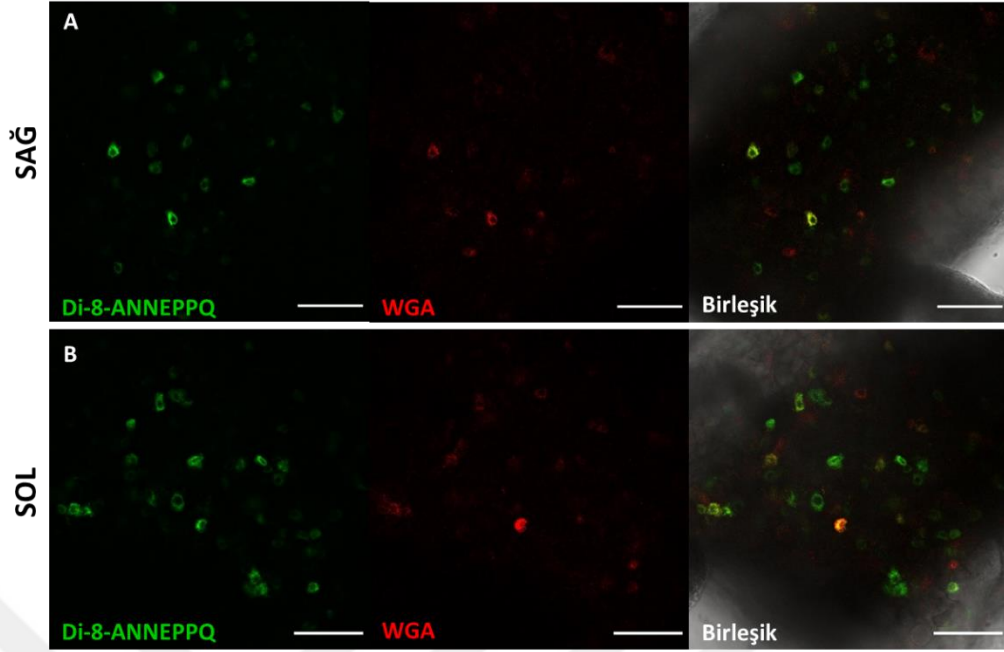
Di-8-ANEPPQ'nun IHC ile uyumlu olmamasını deneyimlememiz sonucu IHC ile doku takibi amacıyla laboratuvarımızda bulunan retrograd olarak taşınabilen ve fikslenilebilen bir boya olan WGA'yı değerlendirmeye karar verdik. Di-8-ANEPPQ ve WGA'yı karşılaştırmak amacıyla yapılan histolojik çalışmalarda, WGA işaretli kesitlerde kesit başına işaretli bir hücre gözlemlenirken, Di-8-ANEPPQ işaretli kesitte, işaretli birden çok hücre tespit edilmiştir. Fikslenme ve immün boyama sonrası Di-8-ANEPPQ'nun floresan sinyali tamamen kaybolurken, WGA'nın floresan sinyalinin korunduğu ama azaldığı belirlendi (Şekil 6.3.1). Bu çalışma ile, Di-8-ANEPPQ'nun

kesitlerde WGA'ya göre daha fazla hücre gövdesini işaretlemesi nedeniyle Di-8-ANEPPQ boyası ile çalışmalara devam edildi ve işaretli kesitler boyama sonrası görüntüleriyle birleştirilerek IHC analizlerine devam edildi.



Şekil 6.3.1. Retrograde boyanan AKG ve NG doku kesitlerinin immunohistokimyasal incelenmesi. (A) Di-8-ANEPPQ ile işaretlenen AKG kesiti, (B) Fiksasyon sonrası Di-8-ANEPPQ işaretli AKG kesiti (C) Di-8-ANEPPQ işaretli AKG kesitinde TuJ1 ve DAPI boyama sonrası konfokalde görüntülenmesi, (D) WGA ile işaretlenen NG kesiti, (E) Fiksasyon sonrası WGA işaretli NG kesiti, (F) WGA işaretli NG kesitinde TUJ1 ve DAPI boyama sonrası konfokalde görüntülenmesi. TUJ1: Kırmızı, DAPI: Mavi. Ölçek çubuğu: 50 µm

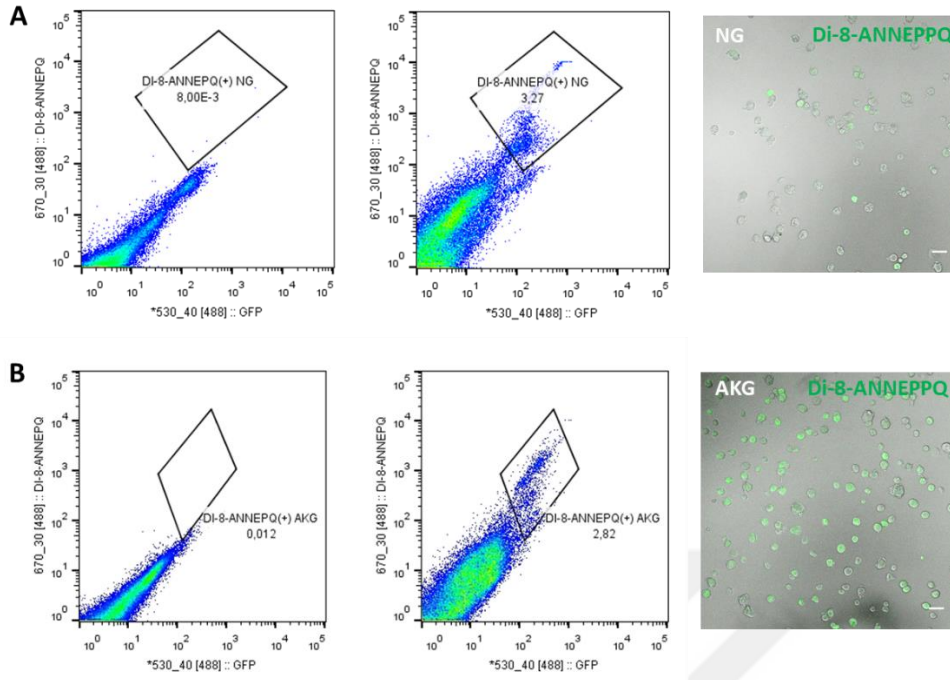
Kalbe enjekte edilen WGA ve Di-8-ANEPPQ boyaalarının aynı hücre popülasyonlarını işaretlediğini göstermek amacıyla kalbin apeks bölgesine iki boyada eşit miktarda ve aynı bölgeye verildi. Operasyondan beş gün sonra, WGA ve Di-8-ANEPPQ işaretli olan nodoz dokusunda, WGA işaretli her hücrenin Di-8-ANEPPQ işaretli olduğu belirlendi. Sonuç olarak WGA'nın, Di-8-ANEPPQ'e göre daha az hücreyi boyadığı tespit edildi (Şekil 6.3.2).



Şekil 6.3.2. Kalbine Di-8-ANEPPQ+WGA enjekte edilen farenin operasyondan 5 gün sonra NG dokularının konfokal mikroskobunda görüntülenmesi (A) sağ NG, (B) sol NG. Ölçek çubuğu: 50 μ m

6.4 Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının FACS ile Saflaştırılması

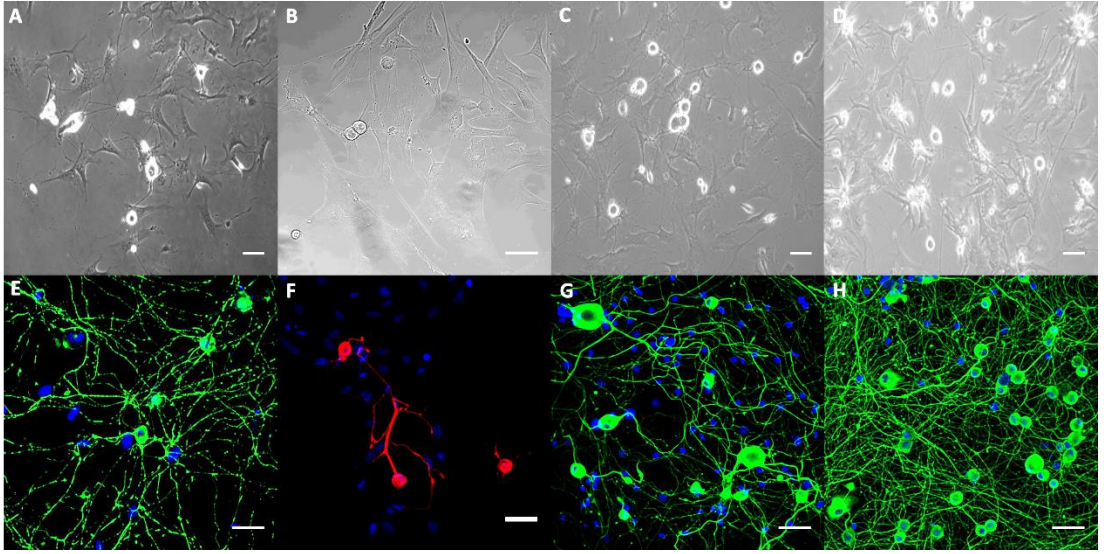
Di-8-ANEPPQ boyasının kalpten NG ve AKG dokularında işaretlediği kalbe özgü duyu nöronları FACS cihazı ile saflaştırıldı (Şekil 6.4.1). FACS ile yapılan kapılama ve saflaştırma sonucunda, genel NG ve AKG hücre popülasyonunun sırasıyla %3.27 ve %2.82'sinin Di-8-ANEPPQ işaretli duyu nöronları olduğu tespit edildi (Şekil 6.4.1). FACS ile saflaştırılan Di-8-ANEPPQ işaretli duyu nöronları cam petrilere ekilerek konfokal mikroskobu altında floresan görüntüleri alındı. Saflaştırmanın ardından alınan floresan görüntülerde, Di-8-ANEPPQ boyalı NG ve AKG sinir hücrelerinin yeşil floresana sahip olduğu ve canlılıklarının yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 6.4.1). Elde edilen bulgular, FACS cihazı ile Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerinin boyanmamış hücre popülasyonundan ayrıldığını, başarı ile saflaştırıldığını ve işlem sonrası canlılıklarını koruduklarını göstermiştir.



Şekil 6.4.1. Fare kalbine in vivo Di-8-ANNEPPQ verilmesi sonrası AKG ve NG hücrelerinin FACS analizi ve floresan görüntüsü. (A) Di-8-ANNEPPQ ile işaretlenmiş NG hücrelerinin floresan yayılımı ve saflaştırma sonrası hücre kültürü görüntüsü. (B) Di-8-ANNEPPQ ile işaretlenmiş canlı AKG hücrelerinin floresan yayılımı ve saflaştırma sonrası hücre kültüründeki durumu. Ölçek çubuğu: 50 um, Di-8-ANNEPPQ: yeşil.

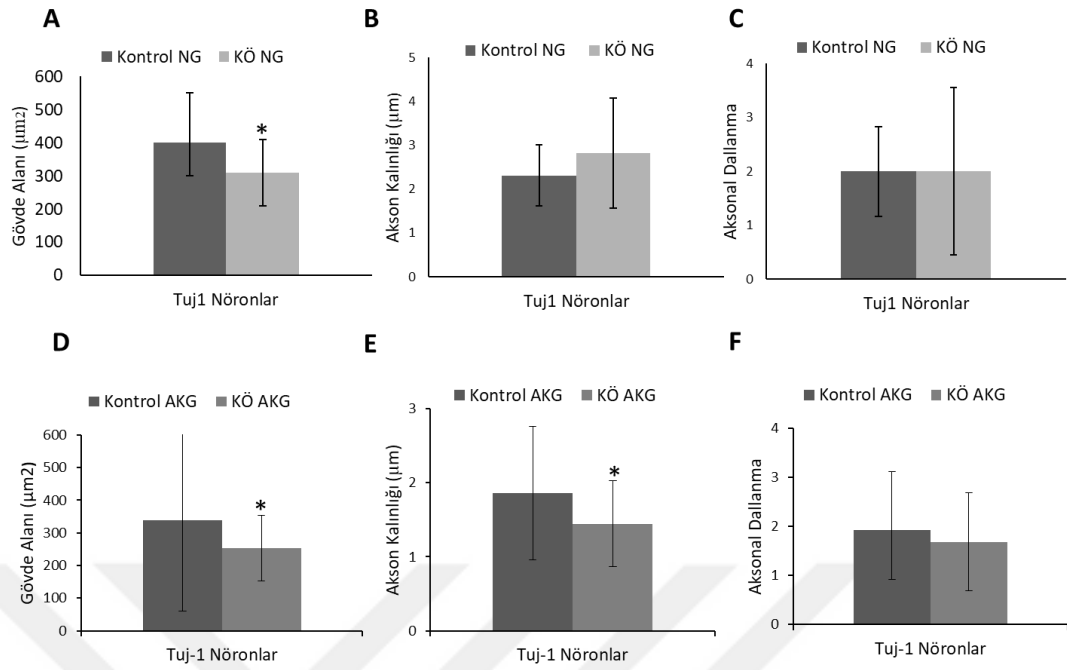
6.5 Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Morfolojik İncelenmesi

Kalbe özgü duyu nöronlarını morfolojik olarak sınıflandırmak amacıyla gövde çaplarına, akson kalınlığı ve dallanması gibi özellikleri incelendi. Kalbe özgü duyu nöronları olarak tanımlanan hücreler FACS'ta saflaştırılan, yeşil floresan ile işaretli hücrelerden oluşmakta, heterojen kontrol hücreleri ise FACS'ta saflaştırılmamış, dokudan elde edilen tüm hücreleri içermektedir. FACS sonrası elde edilen kalbe özgü duyu nöronlarını ışık mikroskobu görüntülerinde, heterojen kontrol nöronlara göre hücrelerin daha küçük çap ve alanına sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 6.5.1A-D). Daha detaylı sayım ve analiz yapmak amacıyla hücreler nöron belirteci olan TUJ1 ve çekirdek boyası olan DAPI ile immün boyama yapıldı (Şekil 6.5.1 E-H). Di-8-ANNEPPQ işaretli hücreler TUJ1 nöron belirteci ile %100 örtüştü. Heterojen kültürdeki glialarda floresan gözlemlenmedi.



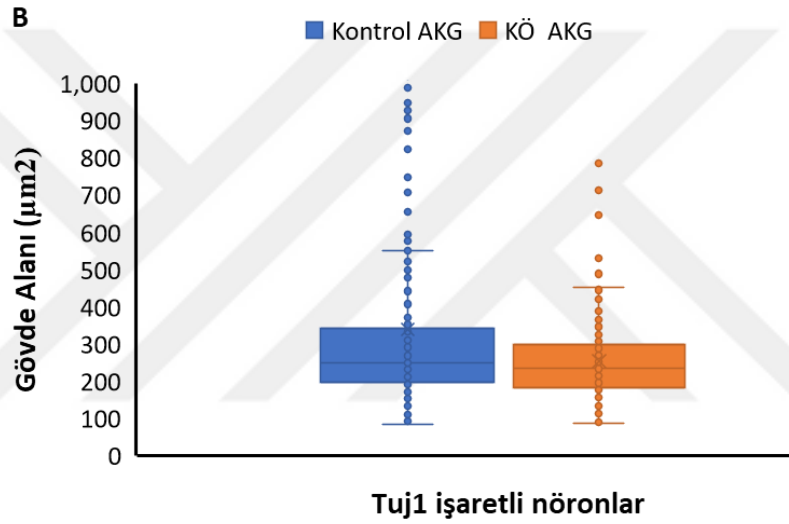
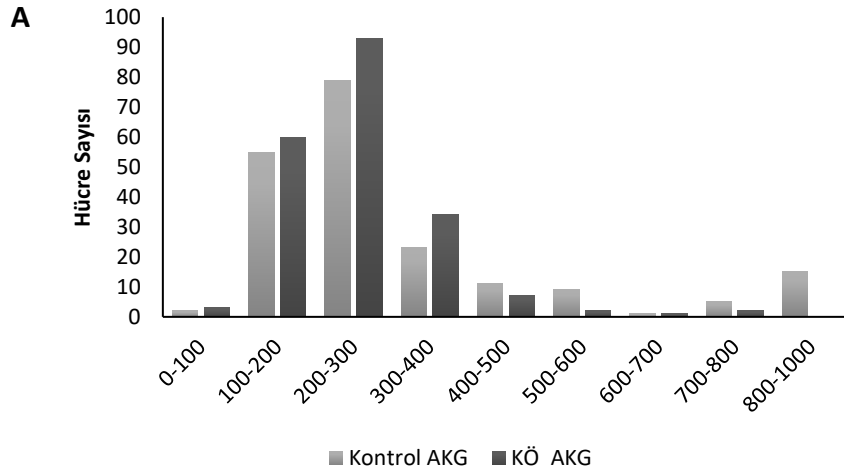
Şekil 6.5.1. Kalbe özgü duyu nöronları ve kontrol nöronların ışık mikroskobu ve immunohistokimyasal boyama sonrası görüntülenmesi. (A-E) Kontrol NG, (B-F) Kalbe özgü duyu NG, (C-G) Kontrol AKG, (D-H) Kalbe özgü AKG. TUJ1: Kırmızı, Yeşil, DAPI: Mavi. Ölçek barı: 50 μm

İmmün boyama sonrası, hücrelerin gövde çapı, akson kalınlığı ve dallanmasını ImageJ programında yapılan analiz sonucunda kalbe özgü NG'lerin ortalama 300 μm çap alanına, heterojen nöronların ise ortalama 400 μm çap alanına sahip olduğu ve kalbe özgü duyu NG'lerin heterojen kontrol NG'lerine göre gövde çapının istatistiksel olarak daha küçük olduğu belirlendi. Akson çapı ve dallanma analiz sonuçları incelendiğinde iki hücre grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. (Şekil 6.5.2A-C). Kalbe özgü duyu NG'lerin gövde alanları ve akson kalınlıklarında görülen anlamlı fark sonrası, aynı çalışma kalbe özgü duyu AKG'leri içinde yapıldı. İmmün boyama analizlerinde kalbe özgü AKG'lerin heterojen kontrol AKG'lere göre gövde alanları ve akson kalınlıklarında istatistiksel anlamlı olarak daha küçük olduğu tespit edildi. NG'de olduğu gibi AKG kökenli nöronlarda da akson dallanma analizleri sonucu anlamlı fark olmadığı belirlendi (Şekil 6.5.2).



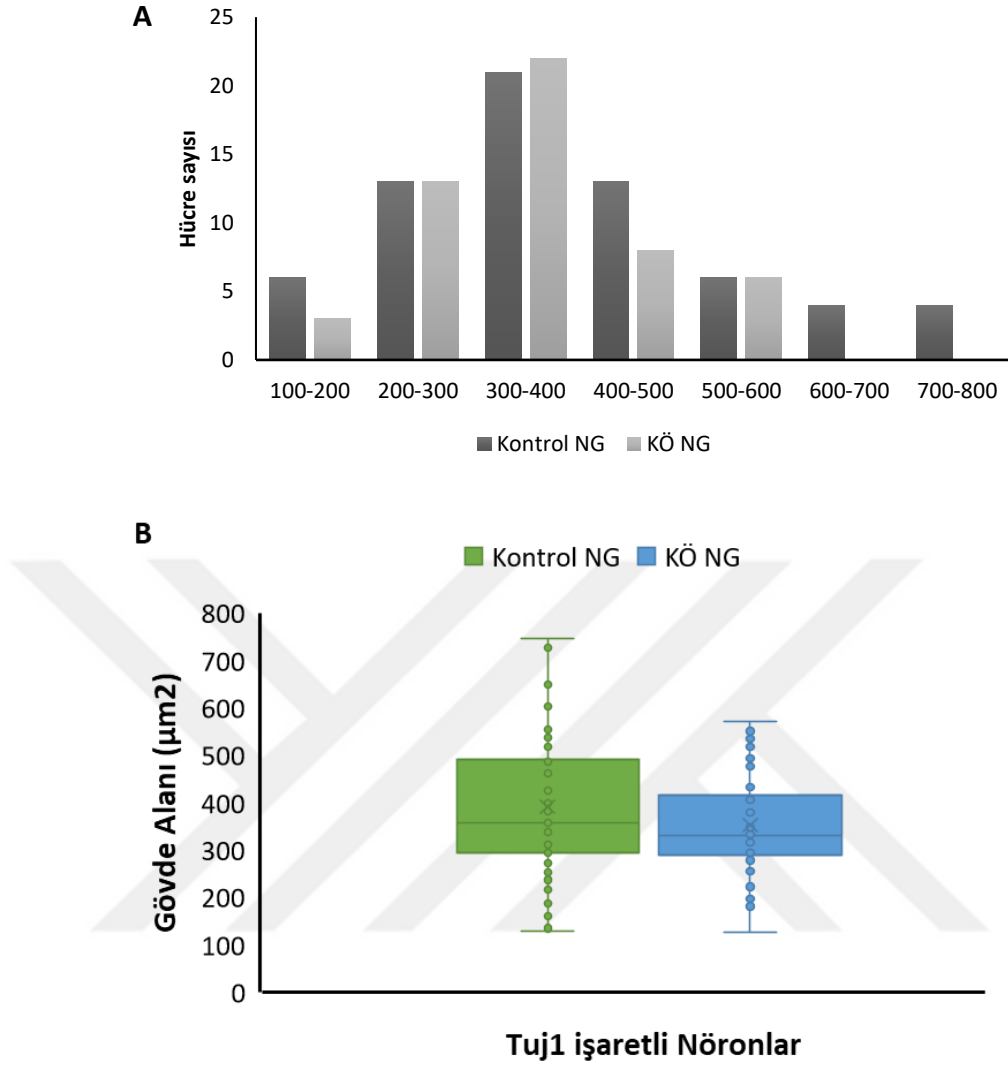
Şekil 6.5.2. Kalbe özgü duyu AKG ve NG nöronları ile heterojen AKG ve NG nöronlarının gövde alanı, akson kalınlığı ve akson dallanmalarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi. (A) AKG gövde alanı, (B) AKG akson kalınlığı (C) AKG akson dallanması (D) NG gövde çapı, (E) NG akson kalınlığı (F) NG akson dallanması.

AKG kökenli kalbe özgü duyu nöronlarının gövde alanlarındaki farklarını karşılaştırmak amacıyla oluşturulan grafikte, kalbe özgü duyu AKG'lerin gövde çaplarının yoğun olarak 200-300 µm² boyutunda olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunun heterojen bir popülasyon gösterdiği 100-1000 µm² olarak geniş bir aralıkta hücre alanlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.5.3A). Gövde alanı analizi sonuçlarını ayrıca dot plot grafiği ile gösterilmiştir. Analiz sonucunda kontrol AKG gövde alanlarının ortalamasının üstünde bir popülasyona sahip olduğu, kalbe özgü AKG'lerin daha küçük ve homojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 6.5.3B).



Şekil 6.5.3. Kalbe özgü duyu AKG ve kontrol AKG gangliyonların gövde alanı analizlerinin grafik olarak gösterimi. (A) Sütun grafiği ve (B) Dot plot grafiği ile gösterilmesi.

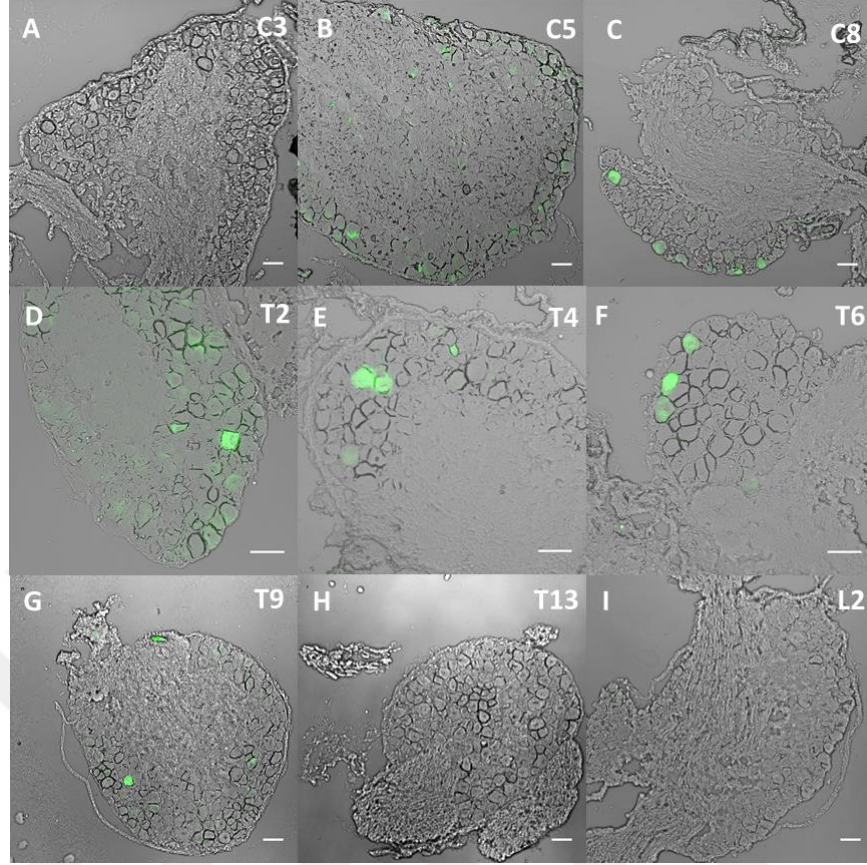
Kalbe özgü duyu NG'lerinin gövde alanlarının 200-400 μm^2 de yoğun bir dağılım gösterdiği, kontrol NG'lerde ise bu dağılımın 200-800 μm^2 arası olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.5.4). Gövde alanlarının arasındaki farkı ayrıca dot plot grafiği ile incelediğimizde, kalbe özgü duyu NG gövde alanlarının 100-500 μm^2 arasında dağılım gösterdiği, kontrol NG'lerin ise 100-700 μm^2 arasında heterojen bir dağılım göstermektedir (Şekil 6.5.4).



Şekil 6.5.4. Kalbe özgü duyu NG ve kontrol NG gangliyonların gövde alanı analizlerinin grafik olarak gösterimi. (A) Sütun grafiği ve (B) Dot plot grafiği ile gösterilmesi.

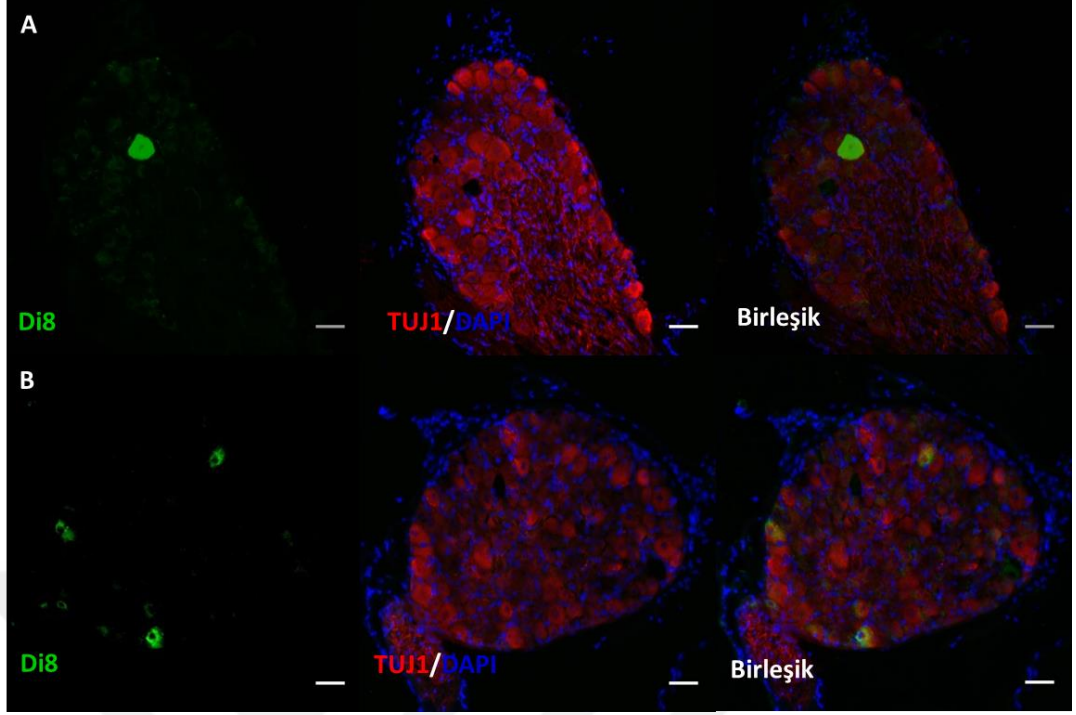
6.6 AKG ve NG Dokusunda Kalbe Dallanan Duyu Nöron Somalarının Histolojik İncelenmesi

Doku boyutunda detaylı inceleme yapmak amacıyla omuriliğin farklı segmentlerinden alınan kesitler Şekil 6.6.1 de gösterilmiştir. Di-8-ANEPPQ işaretli somalar, C5-C8 ve T1-T5 seviyelerinden alınan AKG doku kesitlerinde yoğun olarak gözlemlendi. Kalbe özgü duyu nöronu innervasyonu ve retrograd taşınım beklemediğimiz C3, T13 ve L1 seviyelerindeki doku kesitleri incelenmiş ve bu doku kesitlerinde Di-8-ANEPPQ işaretli hücre görülmemiştir.



Şekil 6.6.1. Kalbe boya verilen fareden alınan farklı bölümlerden alınan AKG kesitlerinin görüntülenmesi. (A) C3, (B) C5, (C) C8, (D) T2, (E) T4, (F) T6, (G) T9 (H) T13 (I) L2
Ölçek barı: 50 µm

Di-8-ANEPPQ işaretli AKG kesitlerinde yeşil floresana sahip hücrelerin, nöron olduğunu doğrulamak amacıyla kesitler nöron belirteci olan TUJ1 ile immün boyaması yapıldı. Omuriliğin T2 ve T5 segmentlerinden alınan doku kesitlerini kullanarak yapılan immunohistokimyasal çalışmalar sonucunda, Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerde TUJ1 anlatımı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla, Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin nöron olduğunu doku boyutunda doğrulamaktadır (Şekil 6.6.2).



Şekil 6.6.2. Kalbe özgü duyu AKG kesitlerinin immunohistokimyasal boyama sonrası görüntülenmesi (A) Di-8-ANEPPQ işaretli T2 kesiti, (B) Di-8-ANEPPQ işaretli T5 kesiti. Di-8-ANEPPQ: Yeşil, TUJ: Kırmızı, DAPI: Mavi. Ölçek çubuğu: 50 µm

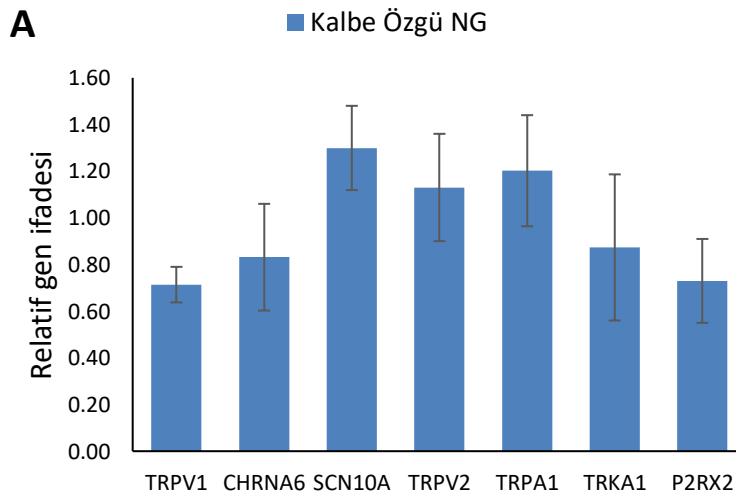
6.7 Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının qRT-PCR ile Değerlendirilmesi

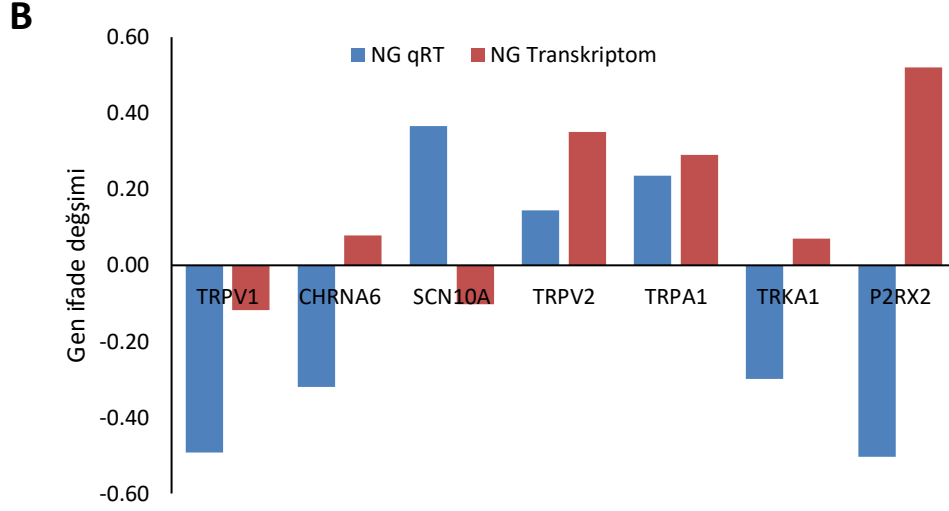
Kalbe özgü duyu nöronlarını *in vivo* işaretleme ve tanımlamayı amaçladığımız ve TÜBİTAK tarafından 115S381 proje numarası ile tamamlanan, ‘Sinir Hücreleri ile Kalp Kası Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Moleküler ve Elektrofizyolojik Düzeyde Araştırılması’ başlıklı projemizde bu tez çalışmasına temel olan veriler elde edilmişti. Proje kapsamında retrograd ilerleyen boyalar ile işaretlenen kalbe özgü duyu nöronların tanımlanmasına yönelik biyoinformatik analizler gerçekleştirildi. Analizlerde kalbe özgü duyu nöronlarını heterojen nöronlara göre gen ifade oranlaması yapılmış ve aralarındaki farkı göstermek için Log₂ tabanındaki kat değişimi incelenmiştir.

Transkriptom sonuçlarından elde edilen verilere göre kalbe özgü duyu AKG nöronlarının heterojen nöronlarla karşılaştırılması sonucu Log₂ tabanlı kat değişimi 1.5’den fazla olan 19 genin ifadesinin daha yüksek olduğu, Log₂ tabanlı kat değişimi 1.5’den az olan 377 genin ifadelerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Kalbe özgü duyu

NG nöronlarında, heterojen nöronlarla karşılaştırıldığında Log2 tabanlı kat değişimi 1.5'dan fazla olan 5 genin ifadesinin yüksek olduğu, Log2 tabanlı kat değişimi 1.5'dan düşük olan 380 genin ifadelerinin düşük olduğu tespit edilmişti. Bu tez kapsamında kalbe özgü duyu nöronlarını morfolojik analizler sonucu küçük çaplı ağrı reseptörleriyle ilişkilendirdik.

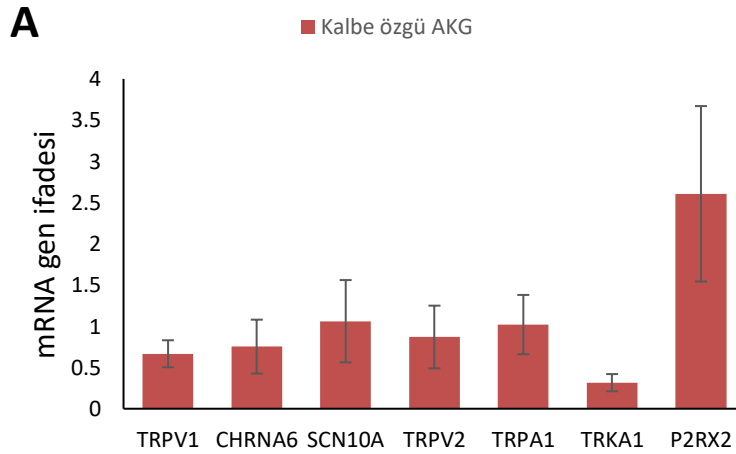
Log2 tabanlı kat değişim sonuçlarına göre kalbe özgü duyu AKG nöronlarında P2RX2 ve SCN10A, kalbe özgü duyu NG nöronlarında P2RX2 anlamlı olarak yüksek ifade edildiği tespit edildi. Son yıllarda yapılan çalışmalarda P2RX2 ve SCN10A genlerini ağrı reseptörlerinin ifade ettiği gösterilmiştir (96). Transkriptom datalarını doğrulamak ve kalbe özgü duyu nöronlarını tanımlamak amacıyla, ağrıyı algılayan sinirlerde bulunan bulunan P2RX2, SCN10A, TRPV1, TPRV2, CHRNA6, TRKA1, TRPA1 genlerinin ifadesi gen ekspresyon analizi yapılarak incelendi (Şekil 6.7.1). Kalbe özgü NG'leri kontrol NG'lere oranlayarak yapılan gen ekspresyon analizinde SCN10A ve TRPA1'in kontrole oranla gen anlatımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.7.1A). Gen ekspresyon analizi ile elde edilen sonuçları transkriptomdaki Log2 tabanlı kat değişim oranlarıyla karşılaştırdığımızda kalbe özgü duyu NG nöronlarında TPRV2 ve TRPA1'in gen anlatımının transkriptom ile uyumlu sonuç verdiği belirlenmiştir. SCN10A ifadesinin kalbe özgü duyu nöronlarında fazla olduğu fakat transkriptom datalarına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.7.1B).

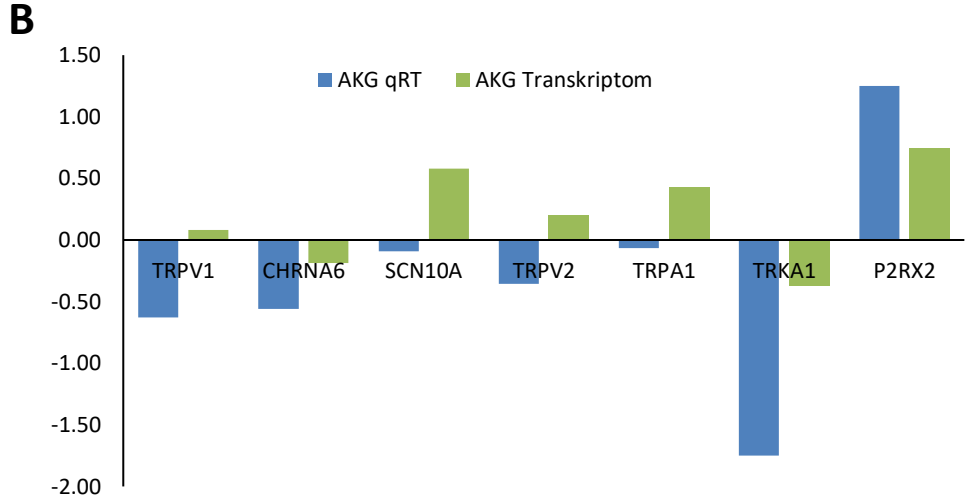




şekil 6.7.1 Kalbe özđü duyu NG hücrelerinde ağrı reseptörleri gen ifade analizi. (A) Kalbe özđü NG'lerin heterojen kontrole oranla değişim grafiği (B) Kalbe özđü NG'lerin Log2 kat değişimi.

Kalbe özđü duyu AKG nöronları ve heterojen nöron örnekleri kullanılarak yapılan gen ekspresyon analizi sonuçlarını heterojen AKG'ler ile karşılaştırdığımızda, SCN10A, TRPA1 ve P2RX2'in gen anlatımının kalbe özđü AKG'lerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (şekil 6.7.2A). Sonuçları Log2 tabanlı kat değişim oranlarıyla karşılaştırdığımızda kalbe özđü duyu AKG nöronlarında P2RX2'in transkriptoma uyumlu şekilde artarak ifade ettiği belirlenmiştir (şekil 6.7.2B).

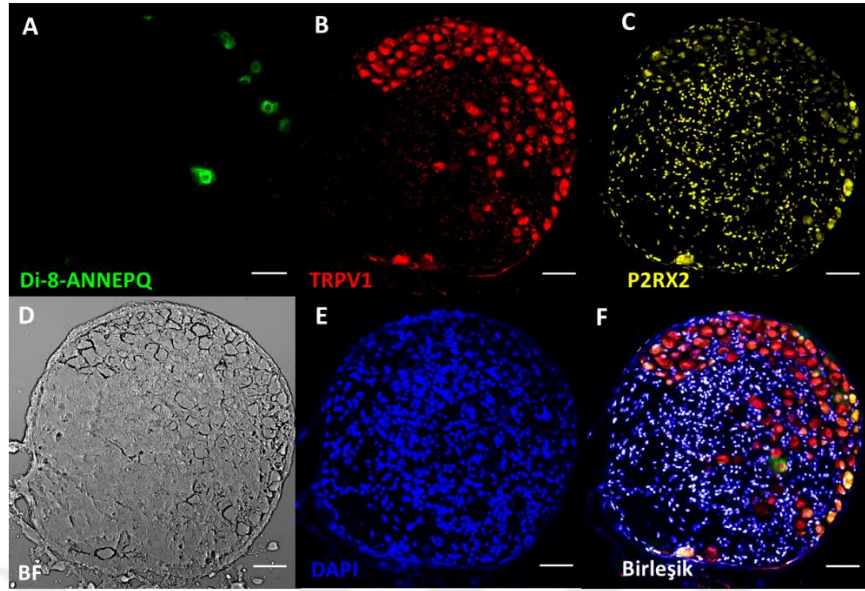




Şekil 6.7.2 Kalbe özgü duyu AKG hücrelerinde ağrı reseptörleri gen ifade analizi. (A) Kalbe özgü AKG'lerin kontrole oranla katlık değişim grafiği (B) Kalbe özgü AKG'lerin Log2 kat değişimi.

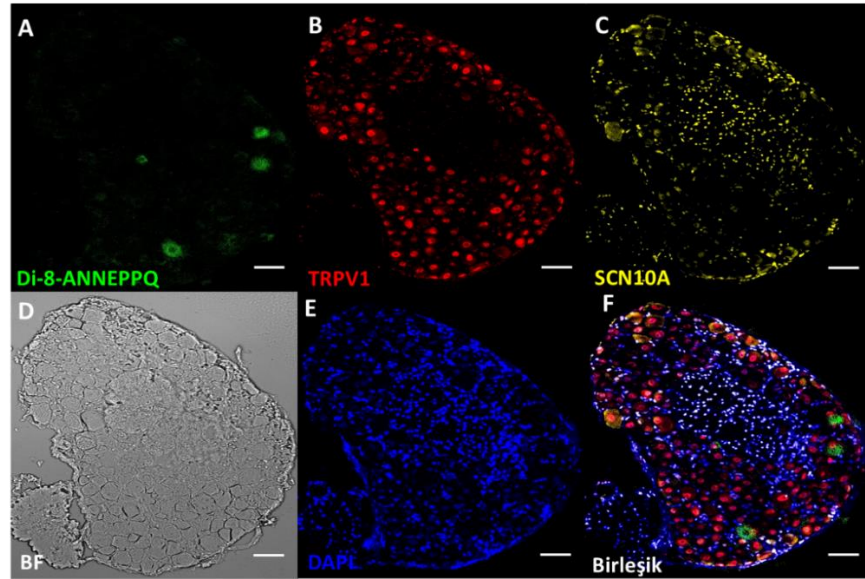
6.8 Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Ağrı Reseptörü Proteinleri Ekspresyonun Değerlendirilmesi

Çap analizinde elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak kalbe özgü duyu nöronlarının küçük çaplı nosiseptörlerce yoğun olabileceği öngörüldü. Gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre kalbe özgü duyu AKG ve NG'de SCN10A ve P2RX2 genlerinin yüksek miktarda ifade ettiği gösterilmiştir. Genel ağrı reseptörü olan TRPV1'de kullanılarak, küçük çaplı ağrı reseptörlerinin membranlarında bulunan bu genleri protein düzeyinde incelemek amacıyla Di-8-ANEPPQ işaretli NG ve omuriliğin farklı segmentlerinden alınan AKG doku kesitleri kullanılarak immunohistokimyasal boyamalar yapıldı. Di-8-ANEPPQ işaretli NG'den alınan kesitlerde TRPV1 ve P2RX2 immun boyama sonrası alınan görüntülerde NG kesitindeki hücrelerin yoğun olarak TRPV1 ifade ettiği gözlemlendi. P2RX2 ekspresyonunun hücrelerde daha az olduğu tespit edilmiştir. Di-8-ANNEPQ işaretli hücrelerin hepsi TRPV1 eksprese ettiği, TRPV1'e göre daha az hücrenin P2RX2'de ifade ettiği belirlenmiştir (Şekil 6.9.1).



Şekil 6.8.1. *In vivo* olarak Di-8-ANNEPPQ ile işaretli NG kesitinde ağrı ile ilişkilendirilen proteinlerle boyama sonrası görüntülenmesi (A) Di-8-ANNEPPQ, (B) TRPV1, (C) P2RX2 (D) BF: Aydınlik alan (E) DAPI, (F) Birleşik. Görüntüler 20x objektif ile çekilmiştir. Ölçek çubuğu: 50µm.

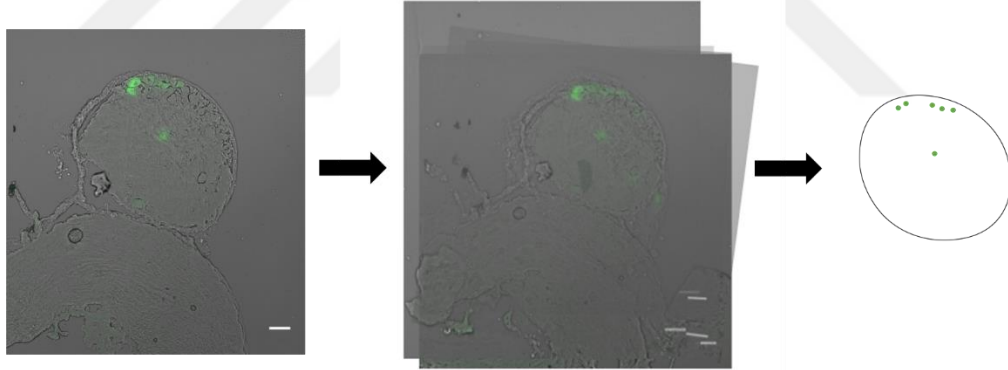
Di-8-ANNEPPQ işaretli T1 seviyesinde konumlanan AKG dokusundan alınan kesitlerde, immün boyama sonrası TRPV1'in işaretli hücrelerde yoğun olarak ifade edildiği belirlenmiştir. SCN10A'nın TRPV1'e göre daha az sayıda hücrede anlatıldığını tespit edilmiştir (Şekil 6.9.2).



Şekil 6.8.2. *In vivo* olarak Di-8-ANNEPPQ ile işaretli T1 seviyesindeki AKG kesitinin ağrı ile ilişkilendirilen proteinlerle boyama sonrası görüntülenmesi (A) Di-8-ANNEPPQ, (B) TRPV1, (C) SCN10A (D) BF: Aydınlik alan, (E) DAPI, (F) Birleşik. Görüntüler 20x objektif ile çekilmiştir. Ölçek çubuğu: 50µm.

6.9 AKG ve NG Doku Kesitlerinde Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Haritalama Çalışması

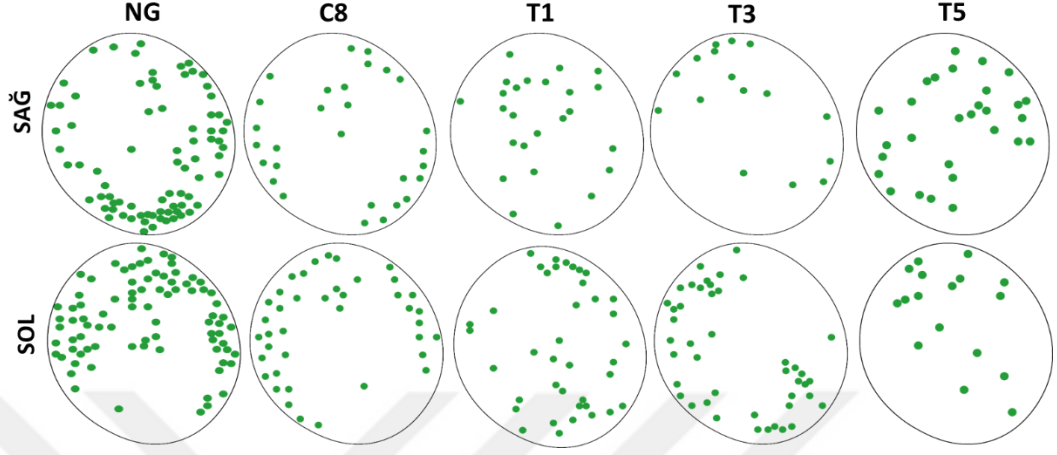
AKG ve NG dokularını yüksek çözünürlükte dokudaki organizasyon ve sayısal olarak değerlendirmek amacıyla haritalama çalışması da yapılmıştır. Rexed'in laminar sistemine göre omuriliğin gri cevheri arkadan öne doğru 10 farklı laminaya ayrılmıştır (9). Laminar organizasyon ile duyu nöronlarının hangi bölgelerde konumlandığı belirlenmiştir (9,97). Bu tez çalışmasında, ağrıya cevap veren somaların omuriliğe benzer bir laminar organizasyonunun olup olmadığını değerlendirmek amacıyla NG ve omuriliğin servikal ve torakal segmentlerindeki AKG dokuları kullanılarak 3 boyutlu haritalama çalışması yapıldı. Haritalanma çalışmasını yapmak amacıyla kesitler üst üste getirilerek oluşturulan doku şablonuna yerleştirildi ve işaretli hücreleri temsilen yeşil noktalar eklendi. İncelenen tüm AKG ve NG'ler için aynı basamaklar uygulandı (Şekil 6.9.1). Yapılan çalışma kesitlerin birleştirilmesi ile elde edilen stereolojik bir haritalama çalışmasıdır.



Şekil 6.9.1. Kesitleri birleştirme basamakları

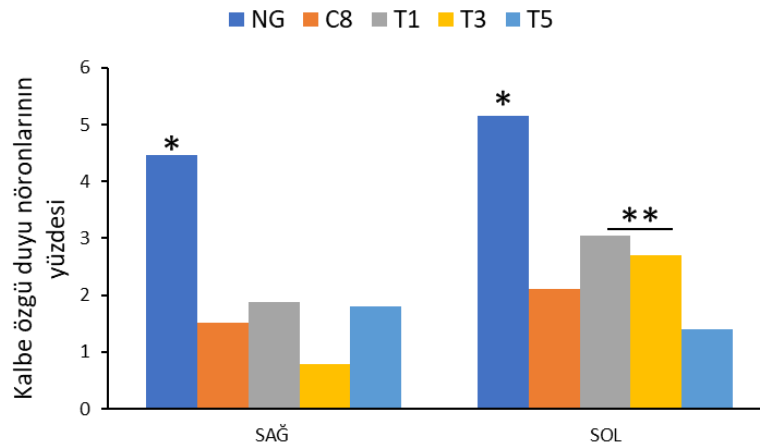
Kalbe inerve olan nöronların NG dokusunda, AKG'lere oranla sayıca daha fazla olduğu belirlenmiş ve dokuda heterojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 6.9.2). Kalbe özgü duyu nöronlarının NG'deki hücre popülasyonununun %5 (105/2037)'ini oluşturduğu belirlenmiştir. Sağ ve sol olarak ayrılan NG dokuları

arasında kalbe özgü duyu nöronları içermesi açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 6.9.2. Kalbe özgü duyu nöronlarını doku boyutunda haritalama çalışması.

Omuriliğin C8, T1, T3 ve T5 segmentlerinden alınarak, sağ ve sol olarak ayrılan AKG dokularında yapılan incelemeler sonucunda, kalbe özgü duyu nöronu olarak belirlediğimiz Di-8-ANEPPQ pozitif hücrelerin, dokuda heterojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Haritalama ve hücre sayımı sonucu, C8 segmentindeki AKG'lerin %1.5, T1 segmentindeki AKG'lerin % 2.5, T3 segmentindeki AKG'lerin %1-3 arası ve T5 segmentindeki AKG'lerin %2'lik bir orana sahip olduğu tespit edilmiştir. Çeşitli segmentlerde yapılan incelemelerde, kalbe özgü duyu nöronlarının sadece sol T1 ve T3'ün sağ bölüme göre hücre sayılarında anlamlı bir fark tespit edilmiştir (Şekil 6.9.3).



Şekil 6.9.3. Di-8-ANEPPQ işaretli dokuların haritalama sonrası yüzdelik dağılımı. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

7 TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde kalp hastalıkları bulaşıcı olmayan hastalıklar sınıfında, ölüm oranı en fazla olan gruptur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kalp hastalıklarına bağlı Türkiye’de ölüm oranlarının %34’e ulaştığı belirlenmiştir. (1). Klinikte en sık rastlanan olgulardan biri olan kalp krizi, kalbi besleyen damarlarda oluşan tıkanıklık gibi problemler sonucu, kalbe oksijen ve besleyici maddeler temin edilemediği için kalpte hasarlar meydana gelerek oluşmaktadır. Kalp krizi sırasında göğüste oluşan ağrı, nefes darlığı, mide bulantısı en sık rastlanan semptomlardır. Bu semptomların oluşmasının nedeni kalpten gelen duyu sinirlerinin viseral özelliğinden kaynaklanmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda bu ağrının üst ekstremitede olmasının nedeni kalpten gelen duysal uyarıların omurilikteki C3-8, T1-T8 arası olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (4). Hastaların teşhisi, gösterdiği klinik semptomlar, biyokimyasal kan testleri ve EKG ile konulmaktadır. Ayrıca tanımlanan semptomlar yaş ve cinsiyete bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Fakat kalp krizi sonrası kalpten gelen ağrının moleküler düzeyde tanımlanması halen tam olarak yapılamamıştır.

Duyu nöronları günümüzde görme, koklama, tat alma gibi duyularımıza ek olarak, vücudumuzdaki iç organlardan beynimize fizyolojik durumumuz hakkında hayati bilgiler aktarabilmektedir (44). Literatürde gastorintestinal sistem, bağırsak ve akciğere özgü duyu nöronları son yıllarda tanımlanmıştır (5,47,98). Kalbe özgü nöronları inceleyen çalışmalarda ise otonom sinir sistemin parasempatik ve sempatik sinirleri ile kalp ilişkisi incelenmiş, duyu nöronlarının sinir bağlantıları ise buldukları omurilik segmentleri açısından temel tanımlamalar yapılmış fakat ayrıntılı morfolojik ve moleküler çalışmalar eksik kalmıştır.

Kalpten gelen duysal bilgi AKG ve NG beyne vasıtasıyla iletilmektedir. AKG ve NG kardiyak sinir sisteminin oluşmasını sağlayan kardiyak afferent nöronları içermektedir (42,43). Bu tez çalışması kapsamındaki amaçlarımız, AKG ve NG’de bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının *in vivo* işaretleme sonrası ayrıştırılması,

kültürde ve morfolojik ve moleküler karakterizasyonu ile kalbe özgü duyu nöronlarını doku kesitlerinde konum (mapping) ve toplam hücre grubuna oranın belirlenmesidir.

Bu tez çalışmasının temel aldığı kalbe-özgü duyu sinirlerinin retrograd boyalar ile işaretlenmesine yönelik *in vivo* doz, gün ve boya seçeneklerinin değerlendirildiği deneysel yaklaşımların geliştirilmesi MSc. Tuba AKGÜL ÇAĞLAR'ın '**Sinir Hücreleri ile Kalp Kası Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Moleküler ve Elektrofizyolojik Düzeyde Araştırılması**' adlı tezinde yapılmıştır. Ön çalışmalarda, Di-8-ANNEPPQ'nun karşılaştırılan DiI ve Fluorogold gibi diğer boyalara göre sayıca daha fazla somayı, yüksek floresan şiddetinde işaretleyebilmesi yönü ile Di-8-ANEPPQ tercih edilmiştir. Önemli olarak, Tuba AKGÜL ÇAĞLAR'ın tez çalışması kapsamında kalbe enjekte edilen sadece C ve T segmentlerinde bulunan AKG ve NG dışında omurilik, karaciğer, akciğer ve kalp gibi çeşitli organları bulunmadığı, yayılımın hedefli olduğu ve sistemik dağılım göstermediği incelenmiştir. Sonuçlarımız literatüre ile uyumlu şekilde boyanın retrograd olarak sadece doğru anatomik segmentte yer alan AKG'ler ile NG işaretlediği göstermiştir (48,49,95).

Kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek için, operasyon sırasında farelerin kalplerinin apex bölgesinden enjeksiyon yapıldı. Literatürde, sıçanlarla yapılan çalışmalarda kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemeye retrograd boyayı kalbin 4 farklı bölgesine veren çalışmalar bulunmaktadır. Akciğer, bağırsak gibi organların duyu nöronlarını araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda retrograd boyalar, organ hacminin genişliğinden dolayı akciğer ve bağırsağın birçok bölgesine enjekte edilmiştir (5,46). Biz de yaptığımız çalışmada bu bilgilerin öncülüğünde Di-8-ANEPPQ'yı kalbin apeks bölgesinden bir kez enjekte etmeye karar verdik. Enjeksiyon sonrası, farelerde mortalite oranının yüksek olduğu belirlendi. İlerleyen çalışmalarda mortaliteyi önlemek amacıyla boyanın paste formu kullanılabilir. Kullanılacak paste boya kalbe zarar vermeden yüzeyine yerleştirilerek boyanın nüfuz etmesi sağlanabilir.

Kalbe özgü duyu nöronlarının AKG'lerde C5-8 ve T1-T8 seviyelerinde daha yoğun bulunduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (4,49). Fakat sağ/sol ayrımı ve somaların konumu, yüzdesi hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. *In vivo* olarak kalbe Di-8-ANEPPQ verilen farelerden diseksiyon sonrası NG ve AKG'lerden alınan

dokular sağ ve sol olarak ayrılarak yapılan incelemelerde, literatüre benzer olarak NG'lerde, C5-C8 ve T1-8 seviyesinden alınan AKG'lerde Di-8-ANEPPQ işaretli somalar gözlemlendi. NG ve AKG'leri kendi içinde karşılaştırdığımızda, NG dokusunda sayıca işaretli hücrelerin daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir. NG'lerde işaretli hücreleri daha fazla görülmesinin nedeni anatomik yapısından kaynaklı olabileceği düşünüldü. Sağ ve sol olarak ayrılan Di-8-ANEPPQ işaretli AKG'ler incelendiğinde doku boyutunda C5-C8 ve T1-T5 seviyeleri arasında işaretli nöronlar arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir.

AKG ve NG dokularında Di-8-ANEPPQ ile işaretli hücreleri detaylı incelemek ve nöron olduğunu doğrulamak amacıyla yapılan IHC sonrası dokudaki Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin floresan sinyalini kaybettiğini, işaretli kesitlerin çoğunda sinyalin tamamen kaybolduğu belirlendi. Sorunu çözmek amacıyla deney düzeneğinde IHC basamaklarının; fiksatif çeşidi, sıcaklık değişimi, fiksasyon süresi optimize edildi. Yapılan tüm çalışmalar sonucu sinyali iyileştirecek yöntemler yetersiz kaldı. Üretici firma ile irtibat kurularak teknik destek alındı. Aldığımız bilgiler ile Di-8-ANEPPQ'nun fikslenebilen bir boya olmadığı sonucuna ulaştık. Bu nedenle IHC çalışmalarında fiksasyon öncesi alınan görüntüler boyama sonrası görüntüler ile birleştirildi.

İmmünohistokimya çalışmaları için laboratuvarımızda bulunan retrograd olarak taşınabilen ve fikslenebilen bir boya olan WGA'yı deneylerimizde Di-8-ANEPPQ ile karşılaştırmaya karar verdik. WGA hem retrograd hem de arterograd özellik gösteren, sabitlenebildiği için ICC ve IHC'de kullanımı uygun olan hücredeki N-asetil glukozamin ve N-asetilneraminik asite bağlanarak çalışan bir boyadır (87,88). Di-8-ANEPPQ lipofilik özelliğe sahip, hücre zarına entegre olarak çalışan bir retrograd boyadır (99). Doku boyutunda yapılan incelemelerde WGA'nın kalbe enjeksiyondan 5 gün sonra AKG ve NG'lere taşındığı belirlenmiştir. WGA işaretli somaların Di-8-ANEPPQ'ya göre sayıca daha az olduğu tespit edildi. Kesit boyutunda yapılan incelemelerde de WGA işaretli NG kesitlerinde, bütün dokudaki hücrelere göre sayıca daha az işaretli soma gözlemlenmiştir. Bunun nedeni boyanın dokudaki stabilitesinden kaynaklı olduğu düşünüldü. Ayrıca literatürde yapılan çalışmalarda WGA işaretli

hücrelerin farklı bir popülasyona ait olabileceği gösterilmiştir (100). Sıçanlarda yapılan çalışmada WGA'nın AKG dışında schwann hücreleri ve ranvier düğümlerini de işaretlediği tespit edilmiştir. Farklı AKG kesitlerinde ise Di-8-ANEPPQ işaretli dokulara uyumlu olarak çok sayıda işaretli soma belirlenmiştir. Sonraki aşamada fikslenme ve immün boyama sonrası Di-8-ANEPPQ'nun floresan sinyali tamamen kaybolurken, WGA'nın floresan sinyalinin korunduğu belirlendi. Bu çalışma ile, Di-8-ANNEPQ'nun kesitlerde WGA'ya göre daha fazla hücre gövdesini işaretlediği sonucuna varıldı. Di-8-ANNEPQ boyası ile çalışmalara devam edildi ve işaretli kesitler boyama sonrası görüntüleriyle birleştirildi.

İki farklı retrograd boya olan WGA ve Di-8-ANEPPQ'nun kalbin aynı bölgesine vererek boyaların spesifik olarak aynı hücreleri boyanacağını düşündük. Yapılan ön çalışmalarda, NG'de AKG'ye göre daha fazla işaretli hücre olduğu tespit edilmişti bu nedenle aynı kalpte ikili boyamada NG dokusu incelendi. Çalışma sonucunda WGA işaretli her hücrenin Di-8-ANEPPQ işaretli olduğu belirlendi. NG dokusu incelendiğinde ise Di-8-ANEPPQ işaretli sayıca daha çok hücre olduğu gözlemlendi. Bu sonucun, WGA'nın kalpten somalara taşınma hız farkı ve membran difüzyon oranının daha düşük olması, farklı hücre tiplerini de boyaması ile stabilite farklılıklarından kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca literatürde WGA kullanılarak yapılan in vivo araştırmalarda, WGA işaretli hücrelerin gövde alanlarının, işaretli olmayan hücrelere göre daha büyük olduğu tespit edilmiştir (101). Yapılan araştırmalarda WGA işaretli hücrelerin farklı bir popülasyonu işaretlediği belirlenmiştir. Bir başka çalışmada ise WGA işaretli hücrelerin AKG dışında, farklı nöron tiplerini de boyadığı tespit edilmiştir (100). Bu çalışmalar kalpten enjekte edilen WGA'nın kalbe özgü duyu nöronlarının tamamını neden boyamadığını açıklamaktadır. Yaptığımız morfolojik analizler sonucu Di-8-ANEPPQ işaretli nöronların küçük çaplı nöronları daha fazla içerdiği tespit edilmiştir.

Kalbe özgü duyu nöronlarını heterojen nöronlardan ayırmak ve detaylı morfolojik analizler yapmak amacıyla Di-8-ANEPPQ işaretli heterojen hücreler FACS cihazında saflaştırıldı. Heterojen popülasyonda %3,27 Di-8-ANEPPQ pozitif NG hücresi ve %2,82 Di-8-ANEPPQ pozitif AKG hücresi elde edildi. Işık mikroskopundan alınan

görüntülerde, kalbe özgü duyu nöronu olarak düşündüğümüz FACS ile saflaştırılan pozitif hücrelerin kontrol hücrelere göre gövde çaplarının daha küçük olduğu gözlemlendi. Morfolojik analizler sonucu FACS ile saflaştırılmış kalbe özgü duyu AKG nöronları ve heterojen AKG nöron kültürleri karşılaştırıldığında, kalbe özgü duyu AKG nöron gövde alanlarının ($200-300 \mu\text{m}^2$) ve akson çaplarının istatistiksel anlamlı olarak daha küçük olduğu belirlendi. Kalbe özgü ve heterojen AKG nöronlarının aksonal dallanmasına bakıldığında iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Aynı çalışmayı kalbe özgü duyu NG nöronları ve heterojen NG nöronları kullanarak yaptığımızda analiz ettiğimiz sonuçlarda kalbe özgü duyu NG nöronlarının istatistiksel anlamlı olarak heterojen NG kültürüne göre küçük olduğu tespit ettik. Kalbe özgü NG'lerin akson kalınlığında heterojen NG'lere göre anlamlı fark bulunmamıştır. Fakat gövde alanına göre akson kalınlığı daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ölçümleri yaparken sinir gövdelerinin uçlarından ölçüm yapılmıştır. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda akson kalınlık ölçümleri gövdeden 1-2 cm daha uzak mesafede yapılabilir. Ayrıca morfolojik analizlerin tamamı ekimden 3 gün sonra yapılmıştır. Gelecek çalışmalarda hücre ekiminden 1 gün sonra analiz yapılarak aralarında karşılaştırma yapılabilir. AKG ve NG'de yapılan analizler sonucu kalbe özgü duyu nöronlarının küçük çaplı nöronları yoğun içermesinden dolayı farklı bir alt popülasyona sahip olabileceği kanısını varılmıştır.

Çap analizi sonuçları, literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında kalbe özgü duyu nöronlarının kontrole göre gövde alanları küçük olduğu için yoğun olarak nosiseptör sınıfındaki nöronları içerdiği düşünüldü (102). SCN10A, TPRV1 ve P2RX2 ağrı ile ilişkilendirilen nosiseptörlerin hücre membranlarında bulunan kanal proteinleridir (103). 115S381 nolu TÜBİTAK projemizde yapılan transkriptom verilerinde SCN10A ve P2RX2 genlerinin AKG ve NG'lerde anlamlı olarak gen ifadesinin heterojen nöronlara göre yüksek olduğu bulunmuştur. Transkriptom datalarını doğrulamak ve kalbe özgü duyu nöronlarını tanımlamak amacıyla, ağrı reseptörlerinde bulunan genlerinin ifadesini qRT-PCR ile inceledik. Sonuç olarak kalbe özgü duyu NG nöronlarındaki TPRV2 ve TRPA1 gen anlatımında transkriptom ile uyumlu olarak ifade edildiği belirlendi. Kalbe özgü duyu AKG nöronları ve heterojen nöron örnekleri kullanılarak yapılan qRT-PCR sonuçlarında ise kalbe özgü

duyu AKG nöronlarında P2RX2 transkriptoma uyumlu şekilde ifade edildiği belirlenmiştir.

Gen ifade bulgularımıza dayanarak kalbe özgü duyu AKG’de SCN10A ve TRPV1, kalbe özgü duyu NG hücrelerinde P2RX2 ve TRPV1 genlerinin yüksek miktarda ifade ettiği gösterilmiştir. Bu genleri protein düzeyinde incelemek amacıyla Di-8-ANEPPQ işaretli NG ve omuriliğin farklı segmentlerinden alınan AKG’ler kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda Di-8-ANEPPQ işaretli NG ve AKG’deki hücrelerin yoğun olarak TRPV1’i ifade ettiği gözlemlendi. Fakat Di-8-ANEPPQ az sayıda hücrenin P2RX2 ve SCN10A ifade ettiği belirlendi. Gen ifade analizlerinde anlatımı yüksek olan P2RX2 ve SCN10A’nın protein düzeyinde düşük ekspresyon olduğu belirlendi. Bu genlerin mRNA seviyesinin protein translasyonunu yansıtmamış olabilir ya da farklı segmentteki kesitler ve çeşitli antikolar ile çalışma tekrarlanabilir. Çalışmayı doğrulamak amacıyla kültür boyutunda immunositokimyasal analizler yapılabilir.

Rexed’in laminar sistemine göre omuriliğin gri cevheri arkadan öne doğru 10 farklı laminaya ayrılmıştır (9). Bu laminalarda genel olarak deriden gelen afferent lifler sinaps yapar. Literatürde termal uyarılarla, omurilik dorsal hornunda laminar organizasyonda hangi lamina düzeyinin uyarıldığını gösteren çalışmalarda dorsal hornunda haritalama yapılmıştır (10). Dokuyu daha net görüntülemek için literatürde berraklaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Fakat kullandığımız Di-8-ANEPPQ fikslenemediği için, berraklaştırma yöntemleri sonrası dokudaki floresan özelliğini kaybetmektedir. Tez çalışması kapsamında dorsal horndaki laminal organizasyonun, gangliyon düzeyinde AKG ve NG dokularında olup olmadığı sorusuna cevap vermek ve kalbe özgü duyu nöronlarının toplam nöronlara göre oranını belirlemek amacıyla haritalama çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışma kesitlerin birleştirilmesi ile elde edilen stereolojik bir haritalama çalışmasıdır. Çalışmada NG ve omuriliğin C8, T1, T3 ve T5 seviyesindeki dokular kullanıldı. Haritalama sonucunda sağ ve sol olarak ayrılan NG ve AKG’lerde bulunan kalbe innerve olan nöronların dokuda heterojen bir dağılım gösterdiği belirlendi. Kalbe innerve olan duyu nöronlarının dokudaki yüzdesini belirlemek amacıyla yapılan sayımlarda NG’lerde bulunan kalbe özgü duyu

nöronlarının AKG'lere göre istatistiksel anlamlı olarak sayıca daha fazla olduğu tespit edildi. NG'lerde işaretli hücre oranı yaklaşık %5 iken, AKG'lerde bu oran en fazla %3 olduğu belirlendi. Sağ ve sol ayrımı yapılarak yapılan analizlerde sol T1 ve T3 segmentlerinde bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının sağ bölgedeki işaretli hücrelere göre anlamlı olarak fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedenin kalbe dallanan nöronların yoğun olarak solda olduğu literatürde ileri sürülmüştür. Sonuçlarımız literatüre uyumlu olarak sol bölgede kalbe özgü duyu nöronlarının daha yoğun olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile literatürde ilk olarak kalbe özgü duyu AKG ve NG'de bulunan nöronların konumu ve yüzdesini belirlenmiştir.

Literatürde bağırsak ve mideye özgü nöronları tanımlarken çeşitli proteinler biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (5,6). Bu tez çalışması ile doku ve hücre boyutlarında gen ekspresyon analizleri sonuçlarına göre kalbe özgü duyu nöronlarını karakterize etmede SCN10A, P2RX2 gibi proteinler tanımlamada kullanılabilir. Bu genleri kullanarak oluşturulacak transgenik hatlarda, kalp ile sinir ilişkisini moleküler ve fonksiyonel özelliklerinden yararlanılarak araştırılmasına olanak sağlama potansiyeli vardır. Kalbe özgü duyu nöronlarını morfolojik ve moleküler olarak detaylı olarak inceleyerek literatüre özgün bir katkı sağlamıştır. Tez çalışmasında elde ettiğimiz veriler, bilimsel toplantılarda poster ve sözlü sunum olarak hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasıyla elde ettiğimiz sonuçları, etki değeri yüksek dergilerde yayımlanma ve uluslararası toplantılarda sunmayı hedeflemekteyiz.

Gelecek çalışmalarda, haritalama sonuçlarının istatistiksel anlamlılığını arttırmak amacıyla örnek alınan hayvan sayısı artırılabilir ve omuriliğin analiz edilmeyen segmentleri kullanılabilir. Elde edilen veriler farklı ve büyük hayvan türlerinde kalbe özgü duyu nöronlarını 3B görüntüleme ve haritalama yönelik çalışmalara olanak sağlayabilir. Bu tez çalışmasında kalbe özgü biyobelirteç tanımlamak ve sınıflandırmada yöntemler geliştirilerek, literatüre katkı sağlanmıştır. Elde ettiğimiz verilerin ışığında kalbe özgü duyu nöronlarının tanımlanması ve kalp-sinir sistemi etkileşiminin sistemler seviyesinde anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

8 KAYNAKLAR

1. Of R, Death P, To DUE. World Health Organization - Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles,. WHO. 2018.
2. Moore A, Goerne H, Rajiah P, Tanabe Y, Saboo S, Abbara S. Acute Myocardial Infarct. Radiologic Clinics of North America. 2019.
3. Rischpler C. A cute myocardial infarction. Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2016.
4. Foreman RD, Garrett KM, Blair RW. Mechanisms of cardiac pain. Compr Physiol. 2015;5(2):929–60.
5. Williams EK, Chang RB, Strohlic DE, Umans BD, Lowell BB, Liberles SD. Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. Cell. 2016 Jun;166(1):209–21.
6. Hockley JRF, Taylor TS, Callejo G, Wilbrey AL, Gutteridge A, Bach K, et al. Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. Gut. 2018;1–12.
7. Chen Y, Lin D, Ohmori Y, Naito J. Localization of sympathetic, parasympathetic and sensory neurons innervating the heart of the Beijing duck by means of the retrograde transport of horseradish peroxidase. JVetMedSci. 1999;61(0916-7250 (Print) LA-eng PT-Journal Article PT-Research Support, Non-U.S. Gov't RN-EC 1.11.1.-(Horseradish Peroxidase) SB-IM):1–5.
8. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. Nat Neurosci. 2015;
9. Foxworthy WA, Clemo HR, Meredith MA. Laminar and connectional organization of a multisensory cortex. J Comp Neurol. 2013;
10. Haring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, et al. Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. Nat Neurosci. 2018 Jun;21(6):869–80.
11. Hall J. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Saunders Elsevier. 2011;(12.Basım).
12. McCulley DJ, Black BL. Transcription Factor Pathways and Congenital Heart Disease. In: Current Topics in Developmental Biology. 2012.

13. Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) Formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 2003.
14. Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. DEVELOPMENT OF THE HEART : (1) FORMATION OF THE CARDIAC CHAMBERS AND ARTERIAL TRUNKS. 2003;(1).
15. Nandi SS, Mishra PK. Harnessing fetal and adult genetic reprogramming for therapy of heart disease. 2015;(April).
16. Osztheimer I, Fülöp G. Cardiovascular system. In: *Handbook of Physics in Medicine and Biology*. 2010.
17. Kennedy A, Finlay DD, Guldenring D, Bond R, Moran K, McLaughlin J. The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 2016.
18. Barrett K, Brooks H, Boitano S, Barman S. *Ganong's Review of Medical Physiology Twenty-Third Edition*. Ganong's review of medical physiology. 2010.
19. Zipes DP, Jalife J. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Sixth Edition*. Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Sixth Edition. 2013.
20. Albisetti GW, Ghanem A, Foster E, Conzelmann K-K, Zeilhofer HU, Wildner H, et al. İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M., Okar İ. DH, editor. *Brain* [Internet]. Nobel Tıp. 2014 Apr;2(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.03.006>
21. Ashwell KWS, Waite PME. Development of the Peripheral Nervous System. *Hum Nerv Syst*. 2012;14–30.
22. Marmigère F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007.
23. Hildreth V, Anderson RH, Henderson DJ. Autonomic Innervation of the Developing Heart : Origins and Function. 2009;46(March 2008):36–46.
24. Ieda M, Kanazawa H, Ieda Y, Kimura K, Matsumura K, Tomita Y, et al. Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts. *Circulation*. 2006;
25. Lo L, Tiveron MC, Anderson DJ. MASH1 activates expression of the paired

- homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development*. 1998;
26. Ma Q, Chen Z, Barrantes IDB, De La Pompa JL, Anderson DJ. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron*. 1998;
 27. Spencer H, Spencer H. The structure of the nervous system. *Princ Psychol Vol 1* (2nd ed). 2010;15–45.
 28. Kullmann DM. Interneuron networks in the hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*. 2011.
 29. Moller AR. *Sensory Systems: Anatomy, Physiology and Pathophysiology*. Sensory Systems: Anatomy, Physiology and Pathophysiology. 2003.
 30. Studer L. The Nervous System. In: *Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition*. 2013.
 31. Farina P, Scotté F, Villa C, Baussart B, Di Stefano AL. Central nervous system. In: *Side Effects of Medical Cancer Therapy: Prevention and Treatment: Second Edition*. 2018.
 32. Köylü H. *Sağlık Bilimleri İçin Temel Fizyoloji*. İstanbul T. 2017.
 33. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. The human central nervous system. *The Human Central Nervous System*. 2008.
 34. Zhang DY, Anderson AS. The Sympathetic Nervous System and Heart Failure. *Cardiology Clinics*. 2014.
 35. ROBINSON BF, EPSTEIN SE, BEISER GD, BRAUNWALD E. Control of Heart Rate by the Autonomic Nervous System. *Circ Res*. 2012;
 36. Mitchell GAG. THE INNERVATION OF THE HEART. *Heart*. 2007;
 37. Kingma JG, Simard D, Rouleau JR. Influence of cardiac nerve status on cardiovascular regulation and cardioprotection. *World J Cardiol*. 2017;
 38. Franciosi S, Perry FKG, Roston TM, Armstrong KR, Claydon VE, Sanatani S. The role of the autonomic nervous system in arrhythmias and sudden cardiac death. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2017.
 39. Kimura K, Ieda M, Fukuda K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. *Circulation Research*. 2012.

40. Bleich HL, Boro ES, Lown B, Verrier RL. Neural Activity and Ventricular Fibrillation. *N Engl J Med*. 1976;
41. Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull SS, Foreman RD, Schwartz PJ. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res*. 1991;
42. Kember GC, Armour JA, Fenton GA, Malhotra A. Control of cardiac function and noise from a decaying power spectrum. *Phys Rev E - Stat Physics, Plasmas, Fluids, Relat Interdiscip Top*. 2004;
43. Brown AM. Excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibres during myocardial ischaemia. *J Physiol*. 1967;
44. Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal Sensory Neuron Subtypes that Differentially Control Breathing. *Cell*. 2015 Apr;161(3):622–33.
45. Han L, Limjunyawong N, Ru F, Li Z, Hall OJ, Steele H, et al. Mrgprs on vagal sensory neurons contribute to bronchoconstriction and airway hyper-responsiveness. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018; Available from: <http://www.nature.com/articles/s41593-018-0074-8>
46. Nonomura K, Woo S-H, Chang RB, Gillich A, Qiu Z, Francisco AG, et al. Piezo2 senses airway stretch and mediates lung inflation-induced apnoea. *Nature*. 2017 Jan;541(7636):176–81.
47. Umans BD, Liberles SD. Neural Sensing of Organ Volume. *Trends Neurosci*. 2018 Aug;
48. Guic MM, Kosta V, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Characterization of spinal afferent neurons projecting to different chambers of the rat heart. *Neurosci Lett*. 2010 Jan;469(3):314–8.
49. Kosta V, Guic MM, Aljinovic J, Sapunar D, Grkovic I. Immunohistochemical characteristics of neurons in nodose ganglia projecting to the different chambers of the rat heart. *Auton Neurosci*. 2010 Jun;155(1–2):33–8.
50. Sridharan V, Tripathi P, Sharma S, Moros EG, Zheng J, Hauer-Jensen M, et al. Roles of sensory nerves in the regulation of radiation-induced structural and functional changes in the heart. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 Jan;88(1):167–74.

51. Å XL, Å LMP, Vitetta ES. *Immuno.Rev.*2008, Liu, engineering mAb.pdf. 2008;222:9–27.
52. Lee, KH., Kim, J., Chung J. Segmental Distribution of Dorsal Root Ganglion Cells. 1984;52:185–90.
53. Hoover DB, Shepherd A V, Southerland EM, Armour JA, Ardell JL. Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from dog ventricular myocardium. 2008;141:38–45.
54. Papka RE. Sensory Ganglia. *Encycl Neurosci.* 2009;657–68.
55. Lopes DM, Denk F, McMahon SB. The Molecular Fingerprint of Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Neurons. *Front Mol Neurosci.* 2017;
56. Liu Y, Ma Q. Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2011;21(1):52–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.09.003>
57. Buschman HP, Storm CJ, Duncker DJ, Verdouw PD, van der Aa HE, van der Kemp P. Heart Rate Control Via Vagus Nerve Stimulation. *Neuromodulation Technol Neural Interface* [Internet]. 2006;9(3):214–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1525-1403.2006.00062.x>
58. Richard C, Griessenauer CJ. *Anatomy of the Vagus Nerve.* 2015;1.
59. Wang L, Feng D, Yan H, Wang Z, Pei L. Comparative analysis of P2X1, P2X2, P2X3, and P2X4 receptor subunits in rat nodose ganglion neurons. *PLoS One.* 2014;9(5):e96699.
60. Zhuo H, Ichikawa H, Helke CJ. Neurochemistry of the nodose ganglion. *Prog Neurobiol.* 1997 Jun;52(2):79–107.
61. Maccone A, Otis JAD. *Neuropathic Pain.* *Semin Neurol.* 2018;
62. Sandkühler J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. *Physiol Rev.* 2009;
63. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology.* 2014.
64. Loggia ML, Juneau M, Bushnell MC. Autonomic responses to heat pain: Heart rate, skin conductance, and their relation to verbal ratings and stimulus intensity. *Pain.* 2011;
65. Anderson JL, Morrow DA. *Acute Myocardial Infarction.* *N Engl J Med*

- [Internet]. 2017 May 24;376(21):2053–64. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1606915>
66. Zhou Y, Suzuki Y, Uchida K, Tominaga M. that regulates TRPA1 activity. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3399>
 67. Wu Z, Pan H. Role of TRPV1 and intracellular Ca²⁺ in excitation of cardiac sensory neurons by bradykinin. 2007;2:276–83.
 68. Yazğan B, Yazğan Y, Nazıroğlu M. Derleme Ağrı Moleküler Yolaklarında TRPV1 Katyon Kanalinin Önemi. 2016;21(1):1–10.
 69. Burnstock G. Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des.* 2009;15(15):1717–35.
 70. von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology and Therapeutics.* 2006.
 71. Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:333–59.
 72. Wieskopf JS, Mathur J, Limapichat W, Post MR, Al-Qazzaz M, Sorge RE, et al. The nicotinic $\alpha 6$ subunit gene determines variability in chronic pain sensitivity via cross-inhibition of P2X2/3 receptors. *Sci Transl Med.* 2015;
 73. Verkerk AO, Remme CA, Schumacher CA, Scicluna BP, Wolswinkel R, De Jonge B, et al. Functional NaV1.8 channels in intracardiac neurons: The link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res.* 2012;111(3):333–43.
 74. Faber CG, Lauria G, Merkies ISJ, Cheng X, Han C, Ahn H-S, et al. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(47):19444–9.
 75. Benarroch EE. Ion channels in nociceptors Recent developments. 2015;
 76. Hirose M, Kuroda Y, Murata E. REVIEW ARTICLE NGF / TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain. 2016;16(2):175–82.
 77. Saxton WM, Hollenbeck PJ. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci.* 2012;
 78. Van Meer G, Sprong H. Membrane lipids and vesicular traffic. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004.

79. Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, Braschi E, Rippstein P, Fon EA, et al. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol.* 2012;
80. Hedreen JC, Holm GC. Retrograde and anterograde axonal transport demonstrated by intracerebral injection of a labeled protein-acylating agent. *Brain Res Bull.* 1981;
81. Puigdellí A. Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue , Fluoro-Gold , and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection. 1998;86:7–16.
82. Naumann T, Ha W, Frotscher M. Retrograde tracing with Fluoro-Gold : different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies. 2000;103:11–21.
83. Schmued LC, Fallon JH. Short Communications Fluoro-Gold : a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. 1986;377:147–54.
84. Choi D, Li D, Raisman G. Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: A comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Fluoro-Gold and DiI. *J Neurosci Methods.* 2002;
85. Keizer K, Kuypers HGJM, Huisman AM, Dann O. Diamidino yellow dihydrochloride (DY·2HCl); a new fluorescent retrograde neuronal tracer, which migrates only very slowly out of the cell. *Exp Brain Res.* 1983;
86. Casagrande VA, Hutchins JB. Methods for Analyzing Neuronal Connections in Mammals. In: *Methods in Neurosciences.* 1990.
87. Nakashima M, Uemura M, Yasui K, Ozaki HS, Tabata S, Taen A. An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: Distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neurosci Res.* 2000;
88. Robertson B, Lindh B, Aldskogius H. WGA-HRP and cholera toxin B subunit-HRP as anterogradely transported tracers in vagal visceral afferents and binding of WGA and cholera toxin B subunit to nodose ganglion neurons in rodents. *Brain Res.* 1992;


89. Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. Cholera toxin B: One subunit with many pharmaceutical applications. *Toxins*. 2015.
90. Llewellyn-Smith IJ, Minson JB, Wright AP, Hodgson AJ. Cholera toxin B-gold, a retrograde tracer that can be used in light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol*. 1990;
91. Angelucci A, Clascá F, Sur M. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: A highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods*. 1996;
92. Cheng C, Trzcinski O, Doering LC. Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye DiI. *Front Neuroanat*. 2014;
93. Loew LM. Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes. *Pure Appl Chem*. 2007;
94. Pucihar G, Kotnik T, Miklavčič D. Measuring the Induced Membrane Voltage with Di-8-ANEPPS Part I : Preliminary steps Part II : Loading the cells with di-8-ANEPPS Part III : Experiment and image acquisition Part IV : Image processing and analysis. 2009;(November):3–5.
95. Wenner P, Tsau Y, Cohen LB, O'Donovan MJ, Dan Y. Voltage-sensitive dye recording using retrogradely transported dye in the chicken spinal cord: Staining and signal characteristics. *J Neurosci Methods*. 1996;
96. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 2010.
97. Kaas JH, Collins CE. The organization of sensory cortex. *Current Opinion in Neurobiology*. 2001.
98. Lai NY, Mills K, Chiu IM. Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence. *J Intern Med*. 2017;282(1):5–23.
99. Pucihar G, Kotnik T, Miklavčič D. Measuring the Induced Membrane Voltage with Di-8-ANEPPS. *J Vis Exp*. 2009;
100. Robertson B. Wheat germ agglutinin binding in rat primary sensory neurons: a histochemical study. *Histochemistry*. 1990;
101. Burgess A, Shah K, Hough O, Hynynen K. Characterization of Glutamatergic Neurons in the Rat Atrial Intrinsic Cardiac Ganglia that Project to the Cardiac


Ventricular Wall. 2016;15(5):477–91.

102. Pk S, Dajah S. MORPHOLOGICAL STUDY OF NOCICEPTIVE NEURONS IN THE TRIGEMINAL GANGLION. *Int J Heal Rehabil Sci.* 2016;
103. Dubin AE, Patapoutian A. Review series Nociceptors : the sensors of the pain pathway. 2010;120(11).



9 ETİK KURUL ONAYI

 **MEDİPOL UNV**



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.44147
Konu : Etik Kurulu Kararı

08/10/2018

Sayın Doç. Dr. Esra ÇAĞAVI

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Farede Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Kültür ve Dokuda Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 08.10.2018 tarihinde e-İmzalanmıştır.
Evrakınızı <https://ebya.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden A3B44B72X5 koda ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacak Mah. Ekinözü Cad. No.19 Kavacak Karşı - Beşiktaş
34810 İstanbul

Tel: 444 82 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
05/10/2018	71		Doç. Dr. Esra ÇAĞAVI

"Farede Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Kültür ve Dokuda Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu" başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "Oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zeynep Begüm	Soyadı	Durdu
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	20/10/1994
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	
E-mail	zeynep.durdu@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi	2016
Lise	Beylikdüzü Cahit Zarifoğlu Lisesi	2012

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Araştırmacı	İstanbul Medipol Üniversitesi, BAP 2018/19	8 ay
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK Proje No: 117Z245	5 ay
Yürütücü	İstanbul Kültür Üniversitesi, TÜBİTAK 2209/A	12 ay

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta
Almanca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç

Yabancı Dil Sınav Notu

Yökdil	50
--------	----

ALES	78
------	----

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Windows Office	İyi

Illustrator	İyi
Image J	İyi

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası Yayınlar

1. Coker-Gurkan A., Celik M., Ugur M., Arisan ED., Obakan-Yerlikaya P., **Durdu ZB.**, Palavan-Unsal N. (2018) Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF-κB signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells. Amino Acids. doi:10.1007/s00726-018-2581-z

Sözlü Sunum

1. **Zeynep Begüm Durdu** ‘‘ Farede Kalbe Özgü Duyu Nöronların Kültür ve Dokuda Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu’’ 2. *Yüksek Lisans-Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
2. Göktaş Şahoğlu S., Örs G., Torun T., **Durdu Z. B.**, Akgül Çağlar T., Kazcı Y. E., Söztekin G. İ., Yıldırım Koç A., Tuzcu V., Çağavi E. (Mayıs 2018). CRISPR/Cas9 ile Genetiği Düzeltilmiş Uzun QT Sendromu UPK Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin Elektrofizyolojik İncelemesi. 7. *Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.
3. Sevilay Şahoğlu Göktaş, Gizem Örs, Tuğçe Torun, **Zeynep Begüm Durdu**, Yusuf Enes Kazcı, Emre Deniz, Batu Erman, Volkan Tuzcu, Esra Çağavi. ‘‘İnsan uzun QT sendromu kökenli uyarılmış pluripotent kök hücrelerde ilgili mutasyonun CRISPR/Cas9 ile düzeltilerek hastalık fenotipinin incelenmesi’’, XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi-Uluslararası Katılımlı, Fethiye, 26-29 Ekim 2017.
4. Sevilay Şahoğlu Göktaş, Gizem Örs, Tuğçe Torun, **Zeynep Begüm Durdu**, Gökçe İlayda Görgülü, Yusuf Enes Kazcı, Emre Deniz, Batu Erman, Volkan Tuzcu, Esra Çağavi. ‘‘Correction of KCNQ1 Gene Mutation in Long QT Syndrome Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells by CRISPR/Cas9 System’’ 5th International Congress of the Molecular Biology Association of

Turkey, Abstract Book-43, Boğaziçi University/İstanbul, 8-10 Eylül 2017 (Short Talk 15/43).

Poster Sunumları

1. Çağavi, Esra, Sahoglu Goktas, Sevilay, Torun, Tugce, Kazci, Yusuf Enes, **Durdu, Zeynep B.**, Ors, Gizem, Akgul Caglar, Tuba. “Functional Evaluation Of Crispr/Cas9 Edited Kcnq1 Mutations In Cardiomyocytes Derived From Ips Cells Of Long Qt Syndrome Patients” Poster, International Society For Stem Cell Research (ISSCR) 2019 International Symposia, Abstract Book-57, Amsterdam-Netherlands, 20-22 February 2019.
2. **Zeynep B. Durdu**, Tuba Akgül Çağlar, Esra Çağavi. (2018) “Arka Kök Gangliyonu Kalbe-Özgü Duyu Sinirleri ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Morfolojik, İmmün Boyama ve Canlılık Analizi” *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
3. Akgül Çağlar T, Günel M.Y, **Durdu ZB**, Kazcı YE, Bayat K, Öztürk G, Çağavi E. (2018) “Kalbe Özgü Duyu Nöronlarının Moleküler ve Elektrofizyolojik Düzeyde Tanımlanması” *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
4. Şahoglu Göktaş S., ÖrsG., Torun T., **Durdu Z. B.**, Görgülü G. İ., Akgül Çağlar T., Kazcı Y. E., Tuzcu V., Çağavi E. (2018). İnsan Uzun QT Sendromu Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde İlgili Mutasyonun CRISPR/Cas9 ile Düzeltilerek Hastalık Fenotipinin İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
5. Örs G., Görgülü Söztekin G. İ., Turhan M. U., Akgül Çağlar T., **Durdu Z. B.**, Çağavi E. (2018). Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyomiyositlerin Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
6. Örs G., Söztekin Görgülü G. İ., Turhan M. U., Akgül Çağlar T., **Durdu Z. B.**, Çağavi E. (2018). Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyak Hücrelerin Aritmik

Transgenik Fare Modellerinde Tedaviye Yönelik İncelenmesi. 7. *Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.

7. **Z. B. Durdu**, A. Coker Gurkan, E. D. Arisan, P. Obakan Yerlikaya, N. Palavan Unsal. (2016) The role of canonical and non-canonical NF- κ B pathway in growth hormone-mediated resistance mechanism against curcumin induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. The 41st FEBS Congress, Kusadasi, Turkey

