



T.C

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**REPETATİF MANYETİK STİMULASYON (rTMS) FREKANS  
VE UYGULAMA BÖLGE FARKLILIKLARININ SAĞLIKLI  
FARELERİN KİLO DEĞİŞİMİ VE MİKROBİYOTASI ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

NUR DAMLA KORKMAZ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. SÜLEYMAN YILDIRIM

İSTANBUL-2019

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Nur Damla KORKMAZ  
Tez Başlığı : Repetatif Manyetik Stimülasyon(r TMS) Frekans ve  
Uygulama Bölge Farklılıklarının Sağlıklı Farelerin Kilo  
Değişimi ve Mikrobiyotası Üzerine Etkileri  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 04.01.2019

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

### Danışman

### Kurumu

### İmza

Prof.Dr. Süleyman YILDIRIM

İstanbul Medipol Üniversitesi



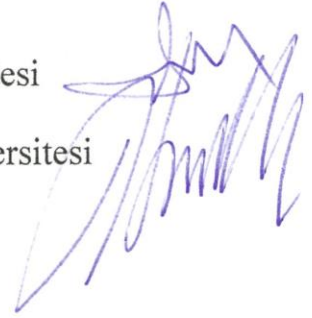
### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Lütfü HANOĞLU

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Barış Ethem Süzek

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .11/01/2019 tarih ve .2019.../...02... - .03... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Müdürü



## 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.

NUR DAMLA KORKMAZ



## TEŞEKKÜR

Mevlânâ Celâleddîn-i Rûmî Hazretlerinin Mesnevî-i Şerîf’inde buyurduğu; “Ey oğul! Bütün dünyayı ağzına kadar ilim ve güzellikle dolu bir testi bil” sözünün hikmetine vasıl olabilme niyetiyle beni derya-ı ilim sonsuzluğunda bir katre olarak yaratan Alim-i Mutlak Allah (c.c)’a hamd eder, başlangıcında olduğum meşakkatli yolun daim rızasına uygun, hayrını ve nurunu dilerim.

Evvela, yüksek eğitim yolunun başlangıcını yanında tamamladığım, bu süreçte, akademik bilgisi ve yardımlarına tabi olduğum danışman hocam Prof. Dr. Süleyman YILDIRIM’a teşekkürümü sunarım.

Tez çalışmamın istatistik veri yorumlaması bölümünde yardımcı olan kıymetli Hocam Hanefî ÖZBEK’e gösterdikleri yardım ve ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Bilimin ve eğitimin sadece ferdi gelişim süreci olmadığını, dayanışma ruhunu en derin samimiyetle hissettiğim, öncelikle değerli grup arkadaşlarım sevgili Fatma KOÇ’a ve Kevser Hanne ALTIN’a tüm yardımları ve manevi desteklerinden dolayı gönülden teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar ortamını beraber paylaştığımız, güzel anılar biriktirdiğimiz, sevgili arkadaşlarım; Oğuzhan KÖSE, Zeynep BALÇIKANLI, Erhan DEMİREL, Elif Nur YILMAZ ve Ezgi KARACA’ya en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Tez grafik tasarımında yardımını aldığım, değerli kuzenim Mithat AYDOĞAN’a gönülden teşekkür ederim.

Varlıklarına sonsuz şükrettiğim, ömürlerine bereket dilediğim, maddi desteklerinin yanında her daim yolumu, fikrimi, ruhumu aydınlatan kıymetli aileme; annem Günay YILMAZ KORKMAZ ve babam Sabahattin KORKMAZ’a ve gönül yoldaşlıklarını hissettiren biricik kardeşlerim Can Bora KORKMAZ’a ve Zeynep VINNET’e minnet ve muhabbet dolu şükranlarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Repetatif Transkraniyal Manyetik Stimulasyon (rTMS).....	5
4.1.1. rTMS parametreleri.....	5
4.1.2. rTMS'nin Moleküler Mekanizması Üzerine Hipotezler.....	9
4.1.2.1. rTMS ve Sinaptik Plastisite.....	9
4.1.2.2. rTMS ve BDNF.....	11
4.2. Obezite ve Yeme Bozuklukları .....	13
4.2.1. Obezite ve Yeme Bozuklukları Tedavisinde rTMS Uygulaması .....	14
4.2.1.1. Obezite ve Yeme Bozuklukları Tedavisinde rTMS Uygulamasının Olası Moleküler Mekanizması: HPA Aksı .....	15
4.3. Bağırsak Mikrobiyotası .....	19
4.3.1. Beyin-Bağırsak Aksı ve Enterik Sinir Sistemi.....	20
4.3.1.1. Beyin-Bağırsak Aksı, ESS ve Serotonerjik Sistem.....	22
4.3.2. Bağırsak Mikrobiyotası ve HPA Aksı .....	24
4.3.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Obezite, Yeme Bozuklukları.....	25
4.3.4. Bağırsak Mikrobiyotası ve rTMS Tedavisi'nin Obeziteyle İlişkisi.....	27

<b>5. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>32</b>
5.1. Etik Beyan ve Deney Düzeni .....	23
5.2. Deney Dizaynı .....	23
5.3. rTMS uygulaması .....	33
5.4. Gaita Örneklerinin Toplanması .....	33
5.5. Genomik DNA İzolasyonu .....	34
5.6. DNA'nın Analizi ve Konsantrasyon Ölçümü .....	35
5.7. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması .....	35
5.8. Sekanslama İşlemi, Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma.....	37
5.8.1. Kütüphane Miktarının Belirlenmesi ve Örnek Havuzunun Hazırlanması	37
5.8.2. Kütüphanenin Denatürasyonu ve MiSeq Cihazına Yüklenmesi.....	37
5.8.3. Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma .....	38
5.8.4. Topluluk Yapılarının ve Çeşitliliğin Çok Değişkenli Analizi .....	38
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
6.1. Kilo değişimi verileri.....	43
6.2. Biyoinformatik analiz verileri .....	41
6.2.1. Alfa çeşitlilik analizi.....	43
6.2.2. Beta çeşitlilik analizi.....	45
6.2.3. Taksonomik çeşitlilik .....	48
<b>7. TARTIŞMA .....</b>	<b>53</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>61</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>
<b>10. ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>87</b>
<b>11. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>89</b>

## **KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ**

rTMS	: Repetatif Transkraniyal Manyetik Stimulasyon
YF	:Yüksek Frekans
DF	:Düşük Frekans
HPA	:Hipotalamus Hipofiz Adrenal
BDNF	:Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
USPA	:Uzun Süreli Potansiyel Artışı
USD	:Uzun Süreli Depresyon
NMDA	:N-metil-D-aspartat
AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propanoik asit
EMG	:Elektromiyogram
GABA	: $\gamma$ -aminobütrik asit
GAD65	: Glutamik asit dekarboksilaz
TrkB	: Reseptör tirozin kinaz
CamKII	: Kalsiyum-Kalmodulin bağımlı protein kinaz
CREB	: CRE-bağlayıcı protein
CRE	: cAMP-cevap elementi
DLPFC	: Dorsolateral prefrontal korteks

AN	: Anoreksiya Nervoza
BN	: Bulimia Nervoza
PVN	: Paraventriküler nukleus
CRH	: Kortikotropin Serbestleştirici Hormon
ACTH	: Adrenokortikotropin hormon
CORT	: Kortikosteron
POMC	: Pro-opimelanokortin
ACC	: Anterior singulat korteks
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
ZO-1	:Zonula okludens
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
OSS	:Otonom Sinir Sistemi
ESS	:Enterik Sinir Sistemi
KBB	:Kan Beyin Bariyeri
TPH	:triptofan hidrosilaz
5-HTP	:5-hidroksi-triptofan
5-HT	:5-hidroksi triptamin,serotonin
AAAD	:aromatik aminoasit dekarboksilaz



Olf	:Olfaktör reseptörleri
TRPH	:Transiet receptor potential cation channel subfamily A
Adra2A	:Adreno Reseptör Proteinleri
IBS	:Irritabl Bağırsak Sendromu
GLP-1	:glukagon-benzeri-peptit-1
fMRI	:Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
FFA	:Serbest Yağ Asidi Reseptörleri
LPS	: Lipopolisakkarit
CCK	:Kolesistokinin
IL	:Interlökin
ChAT	: kolin asetiltransferaz

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1.1. Nöron sütunu (25),(26) .....	6
Şekil 4.1.1.2. TMS bobininin etki alanları (25),(29) .....	7
Şekil 4.1.1.3. TMS bobininden etkilenen kortikal alanlar(25),(31).....	8
Şekil 4.1.2.2.1. BDNF transkripsiyonuna ait olası moleküler mekanizma (55)....	13
Şekil 4.2.1. Kortiko-talamik yolak (90),(91).....	17
Şekil 4.2.2. DLPFC'e rTMS uygulamasının fronto-striatal ve HPA aksı üzerindeki muhtemel nöroendokrin etki mekanizması(91).....	18
Şekil 4.3.1.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Enterik Sinir Sistemi arasındaki bağlantılar(121).....	22
Şekil 4.3.4.1. Bağırsak mikrobiyotası ve beyin aksındaki çift yönlü iletişim(181).....	31
Şekil 5.2.1. Deney dizaynı şematize edilmektedir .....	33
Şekil 6.2.1.1 Gruplara ait alfa çeşitlilik analizi.....	44
Şekil 6.2.1.2 Chao1 indeksiyle hesaplanan çeşitlilik analizi.....	44
Şekil 6.2.1.3 Shannon indeksiyle elde edilen alfa çeşitlilik analizi.....	45
Şekil 6.2.2.1 Bray-curtis indisiyle hesaplanan gruplar arası karşılaştırmalı beta çeşitlilik analiz grafiği.....	46
Şekil 6.2.2.2 Jaccard indisi temel alınarak hesaplanan gruplar arası mikrobiyal komünite farklılıklarının gösterildiği beta çeşitlilik grafiği.....	47
Şekil 6.2.3.1 Gruplara ait taksonomik filum grafiği.....	48
Şekil 6.2.3.2 LDA skor grafiği.....	49
Şekil 6.2.3.3 Deney gruplarının kontrol grubuyla log2 değişim taksonomik karşılaştırması.....	50
Şekil 6.2.3.3. Isı haritası (heat-map).....	51

## **TABLULAR LİSTESİ**

<b>Tablo 5.7.1. PCR protokolü.....</b>	<b>36</b>
<b>Tablo 6.1.1 Grupların Tanımlayıcı İstatistiği.....</b>	<b>39</b>
<b>Tablo 6.1.2 Kilo değişimi Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova) Testi.....</b>	<b>39</b>
<b>Tablo 6.1.3 Varyansın homojenlik testi, Levene Testi.....</b>	<b>40</b>
<b>Tablo. 6.1.4 LSD (Least significant difference) Testi.....</b>	<b>40</b>
<b>Tablo 6.2.1. Miseq 16S rRNA dizin sayısı tablosu.....</b>	<b>42</b>

## 1. ÖZET

### REPETATİF MANYETİK STİMULASYON (rTMS) FREKANS VE UYGULAMA BÖLGE FARKLILIKLARININ SAĞLIKLI FARELERİN KİLO DEĞİŞİMİ VE MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİLERİ

Repetatif Manyetik Stimulasyon (rTMS) girişimsel olmayan beyin uyarım yöntemi olup, kafa derisi üzerinde tutulan indüktif bobinden geçen akım etkisiyle meydana gelen manyetik alanın ilgili beyin bölgesindeki nöron topluluğu üzerinde elektrik akım yoğunluğunu uyarmasına dayanmaktadır. rTMS tedavisi, herhangi bir cerrahi işlem içermemesi, uygulama kolaylığı ve güvenilirliği sayesinde bir çok nörolojik hastalıkların, obezite ve yeme bozuklukları tedavilerinde kullanılmaktadır. Genel olarak, düşük frekansta (1 Hz ve aşağısı) inhibe edici etki gösterirken, yüksek frekansta (5 Hz ve yukarısı) uyarıcı etki göstermektedir. Mortalite ve morbidite oranları oldukça yüksek olan obezite ve yeme bozukluklarında, rTMS tedavisi klinik uygulamalarda olumlu sonuçlar vermektedir. Klinikte uygulamalara rağmen, yöntemin moleküler ve hücresel etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu sebeple klinik-öncesi çalışmalar ve hayvan deneylerinden elde edilen bilgiler mekanizmanın aydınlatılmasında büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada rTMS'in görülen olumlu etki mekanizmalarına insan mikrobiyomundaki rTMS tedavisindeki değişimlerin katkıda bulunabileceği hipotezini test ettik. rTMS tedavisinin hastalık modeli içermeyen sağlıklı farelerin kilo artışları ve mikrobiyotası üzerindeki etkisi araştırıldı. Manyetik stimulasyon, 1 Hz düşük-frekans ve 20 Hz yüksek-frekanda beyin ve abdominal bölgeye uygulanarak 4 deney grubu oluşturuldu. Kontrol grubu farelere manyetik stimulasyon uygulamadı. TMS-beyin 1 Hz ve TMS-karın 20 Hz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı kilo azalması saptandı. Bağırsak mikrobiyotası biyoinformatik analizlerine göre TMS-karın 20 Hz grubunda kolon ve ince bağırsak mikrobiyal kompozisyonda anlamlı değişimler bulundu. Frekans ve uygulama bölge farkının daha iyi anlaşılabilmesi için uygulama öncesi ve sonrasında kan testi parametreleriyle metabolik çıktılarla desteklenen ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** rTMS, kilo değişimi, mikrobiyota, 16S rRNA dizin analizi

## **2. ABSTRACT**

### **EFFECTS OF DIFFERENT FREQUENCIES AND APPLICATION REGIONS OF REPETITIVE TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION (rTMS) ON WEIGHT GAIN AND MICROBIOTA IN HEALTHY MICE**

Repetitive magnetic stimulation (rTMS) is a non-invasive brain stimulation method that stimulates neurons via generation of a pulse high intensity magnetic field by passing an electric current through an inductive coil. However, despite the wide application of rTMS in clinical practice, the molecular and cellular mechanisms underlying the method remain uncertain. For this reason, the information obtained from pre-clinical studies and *in vitro* animal experiments have great importance on the understanding of the mechanism. In general terms, low frequency (LF) rTMS (1 Hz) decreases cortical excitability, whereas high-frequency (HF) rTMS (>5 Hz) increases cortical excitability. rTMS method gives positive results in the treatment of obesity and eating disorders which are associated with high mortality and morbidity rates. Additionally, the microbiota of normal individuals shows significant differences compared to those with obese and eating disorders. In this study, we investigated the effects of different frequencies and application regions of rTMS on weight gain and microbiota in healthy mice. We performed 4 experimental groups, and the magnetic stimulation was applied to the brain and abdominal region at 1 Hz low-frequency and 20 Hz high-frequency. The mice of the control didn't receive stimulation. 20 Hz rTMS-abdominal and 1 Hz rTMS-brain groups showed statistically significant weight reduction. According to bioinformatic analysis of the intestinal microbiota, severe microbial imbalance was detected in the gut colon and intestine fecal samples of the TMS-abdominal group at 20 Hz frequency. In order to better understanding of frequency and application region difference, we need to further investigations which are supported by metabolic outputs and blood test parameters.

**Key Words:** rTMS, weight change, microbiota, 16S rRNA sequence analysis

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Transkranyal Manyetik Stimulasyon (TMS) non-invaziv beyin uyarım yöntemi olup, kafa derisinin dışında tutulan indüktif telden geçen akım etkisiyle meydana gelen manyetik alanın ilgili beyin bölgesindeki hücre topluluğu üzerinde elektrik akımını uyarmasına dayanır. Ardışık olarak gerçekleştirilmesi, repetatif manyetik stimulasyon olarak adlandırılmaktadır. Girişimsel işlemlerin olmadığı yöntem uygulama kolaylığı ve güvenilirliği sebebiyle birçok farklı nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [1]. Yöntemin moleküler etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmadığı için hayvan modellerinden elde edilen bilgiler mekanizmanın aydınlatılmasında oldukça önem arz etmektedir. TMS, uygulama protokolleri ve uyarım frekansları çok çeşitli olup kortikal uyarılabilirliğe etkileri nispetince spesifik nörofizyolojik ve davranışsal bulgular oluşturmaktadır [2]. Genel olarak yüksek frekansta (YF) uyarım 5 Hz ve yukarı değerler olup kortikal uyarılabilirliği artırırken, 1 Hz ve daha düşük olan frekans aralığı düşük-frekans (DF) olup inhibe edici etki göstermektedir [3].

Obezite, dünya genelinde prevalansı ciddi şekilde artan, anormal yağ birikimiyle oluşan metabolik bozukluktur. 2013 verilerine göre dünyada yaklaşık 2 milyon kişi aşırı kilolu olarak kaydedilip sadece Birleşik Devletler de obez hastaların yıllık sağlık harcamaları obez olmayanlara göre %42 daha yüksek olarak kaydedilmektedir [4]. rTMS'nin obezite ve yeme bozuklukları örneğin Anoreksiya nervosa ve Bulimia Nervosa tedavisinde terapötik etkisi olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır [5], [6]. TMS'nin terapötik etkisinin mental bozukluklarda, depresyonda ve yeme bozukluklarında aşırı aktive olan stres yolağı HPA (Hypothalamus-pituitary-adrenal) aksını normalize ederek gerçekleştiği savunulmaktadır [5], [7]. Ayrıca TMS nin nöronal plastisitede büyük etkisi olan BDNF (Brain-derived-neurotrophic-factor) seviyesinin artışı tetiklediği gösterilmiştir [8]. Obezite ve yeme bozukluklarında görülen klinik bulgulara göre hastaların mikrobiyota karakteristiği sağlıklı bireylere oranla oldukça farklılık göstermektedir [9]. Mikrobiyota belirli bir çevrede yaşayan mikrobiyal topluluğun tümünü içeren terimdir [10]. Çalışmalar ayrıca mikrobiyota içermeyen farelerde HPA aksının daha agresif çalıştığını ve stres hormonu seviyelerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir [11]. Mikrobiyota içermeyen steril şartlarda yetiştirilen farelere sağlıklı farelerin fekal transplantasyonu sonrası

anksiyete benzeri davranışlarının düzeldiği kaydedilmektedir [12].

Tüm bu çalışmalar ışığında, bu tez çalışmasının amacı mekanizması henüz aydınlatılmamış olan rTMS'nin sağlıklı farelere yüksek frekansta (20 Hz) ve düşük frekansta (1 Hz) hem beyin hem de abdominal bölgeye uygulanması sonrası kilo değişimi ve mikrobiyota üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Çalışma, kilo, TMS uygulaması ve mikrobiyotanın birlikte ele alınıp stres yolağı üzerinde değerlendirilmesini içermesi sebebiyle bundan sonra yapılacak çalışmalara öncü olma özelliği taşımaktadır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Repetatif Transkraniyal Manyetik Stimulasyon (rTMS)

Repetatif transkraniyal manyetik stimulasyon (rTMS) indüktif bobin içinden geçen akım etkisiyle meydana gelen manyetik alan vasıtasıyla kafatası üzerinden beynin uyarıldığı girişimsel olmayan beyin uyarım yöntemidir. İndüklenen akım, doğrudan nöronların akson başlangıç segmentini depolarize ederek veya dolaylı olarak internöron depolarizasyonu ile uyarım etkisini göstermektedir [13]. Kortikal uyarılabilirlik üzerindeki etkisinden dolayı nörolojik ve nöropsikiyatrik hastalıkların tedavisinde terapötik amaçlı kullanılmaktadır [1]. Klinikteki uygulamalarda, depresyon tedavisinde [14], otizm tedavisinde [15], ağrı tedavisinde [16], travma sonrası stres bozukluğunda [17] ve Parkinson hastalığı tedavisinde [18] kullanılmaktadır. Ayrıca rTMS tedavisi, yeme bozukluklarında, Bulimia Nervosa [19] ve Anoreksiya Nervosa tedavisinde [7] klinik uygulamalarda yer almaktadır. Nörotransmitterlerin ve büyüme faktörlerinin (beyin kökenli nörotrofik faktör, BDNF) salınımıyla ilişkisi rTMS'nin olası mekanizmasında önemli rol oynamaktadır [20]. Ancak TMS'nin etki ettiği moleküler mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca uygulanan benzer TMS protokolleri sonrası elde edilen verileri bireyler arası uyarılabilirlik koşulu üzerinde farklılıklar göstermesi, TMS'nin birden çok farklı parametreye sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir [21]

#### 4.1.1. rTMS parametreleri

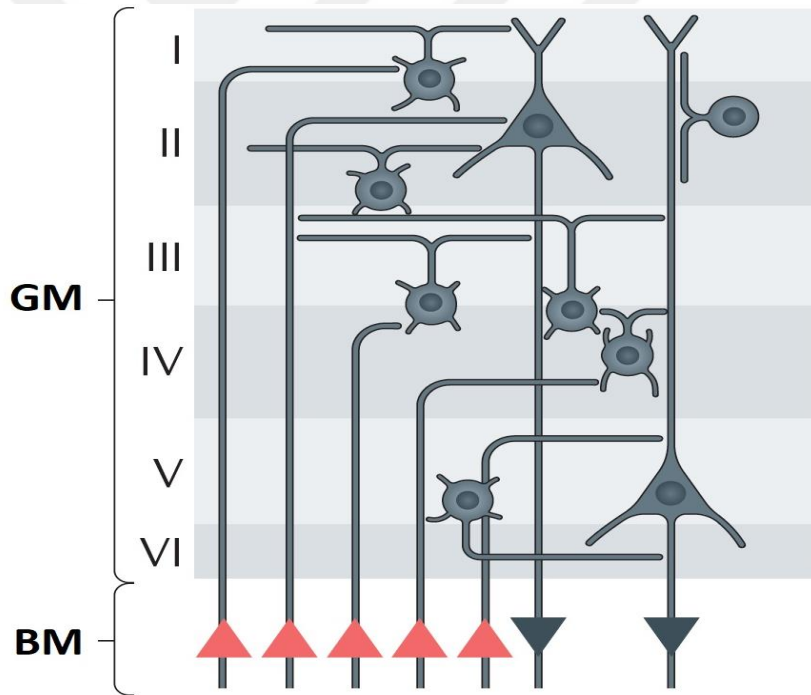
Uyarım frekansı protokollerin farklılığında en büyük etken olmakla birlikte stimulasyon bobininin geometrisi ve uygulama bölgesi, uyarım süresi ve aralıkları protokoller arası çeşitliliğe sebep olan başlıca etmenler arasında yer almaktadır [13]. rTMS çalışmalarında halkasal ve sekiz-şekilli olmak üzere 2 çeşit indüktif bobinden yararlanılır, odaklama kapasitesi daha yüksek olması sebebiyle çoğunlukla tercih edilen ve dahi bu çalışmada kullanılan sekiz-şekilli bobindir. Birbirine iştirilmiş 2 uyarıcı halkanın kavuşum noktasında uygulanan manyetik alanın odaklanması ve bölgeye yönlendirilmiş uyarımı daha etkili olmaktadır [22].

Kortikal uyarılabilirliğin modülasyonunda frekans başlıca etmendir. Genel olarak 1



Hz ve yukarı frekans değerleri yüksek frekans rTMS (YF-rTMS) olarak adlandırılıp uyarıcı etki göstererek kortikal uyarılabilirliği arttırmaktayken, 1 Hz ve daha düşük frekans değerleri düşük frekans rTMS (DF-rTMS) olarak belirtilip inhibitör etki göstererek kortikal uyarılabilirliği azaltmaktadır [3], [23].

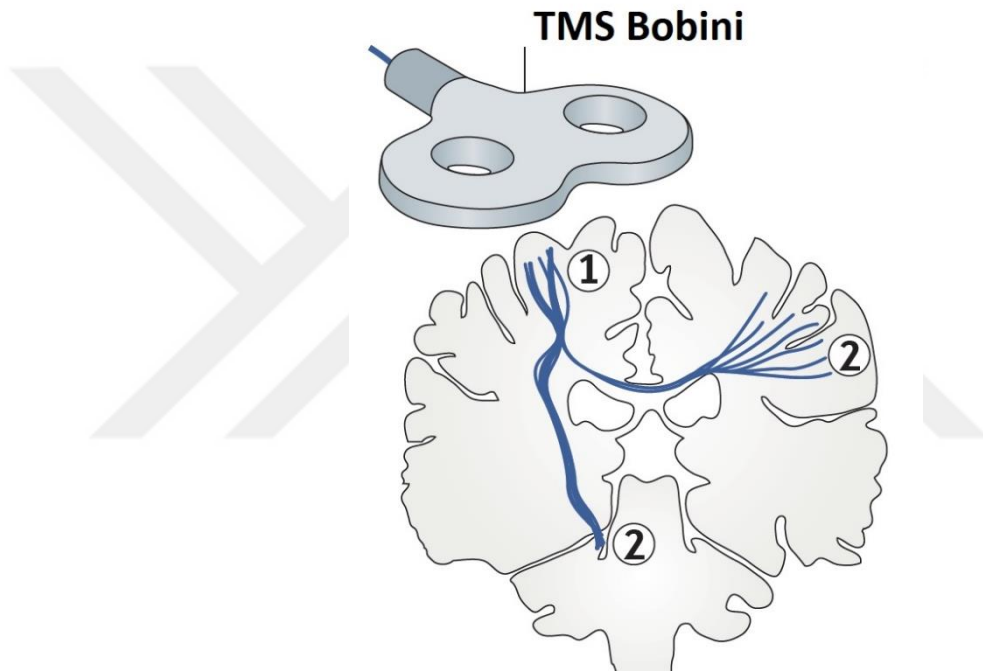
Manyetik frekansa bağlı olarak indüklenen elektrik akımı ile nöronların eşik değerinin üzerinde uyarılmasıyla depolarizasyon, aksiyon potansiyeli oluşmaktadır. Ancak aynı frekans değerleri bobinin oryantasyonuna göre farklılık göstermektedir. Bunun en önemli sebebi ise aktivasyon eşik değerinin nöron grupları arasında farklılık göstermesidir. Örneğin; görece daha küçük olan internöronların aktivasyon eşik değeri, daha büyük nöron çeşidi olan piramidal nöronlara göre daha düşüktür (Şekil 4.1.1). Bu durumda DF-rTMS uygulaması sırasında piramidal nöronlarda aksiyon potansiyeli oluşmaksızın intrakortikal internöronlar aktive olabilmektedir [24]



**Şekil 4.1.1.1** Bir nöron sütunu, piramidal hücreler (üçgen hücre gövdeleri), birçok inhibitör internöronlar ve birkaç uyarıcı internöron (yuvarlak hücre gövdeleri) içeren hücrelerin I-VI kortikal tabakalarına dağılmış haldeki topluluğudur. Farklı eşik değerlerine sahip nöron grupları ve uyarımdan etkilenen akson segment

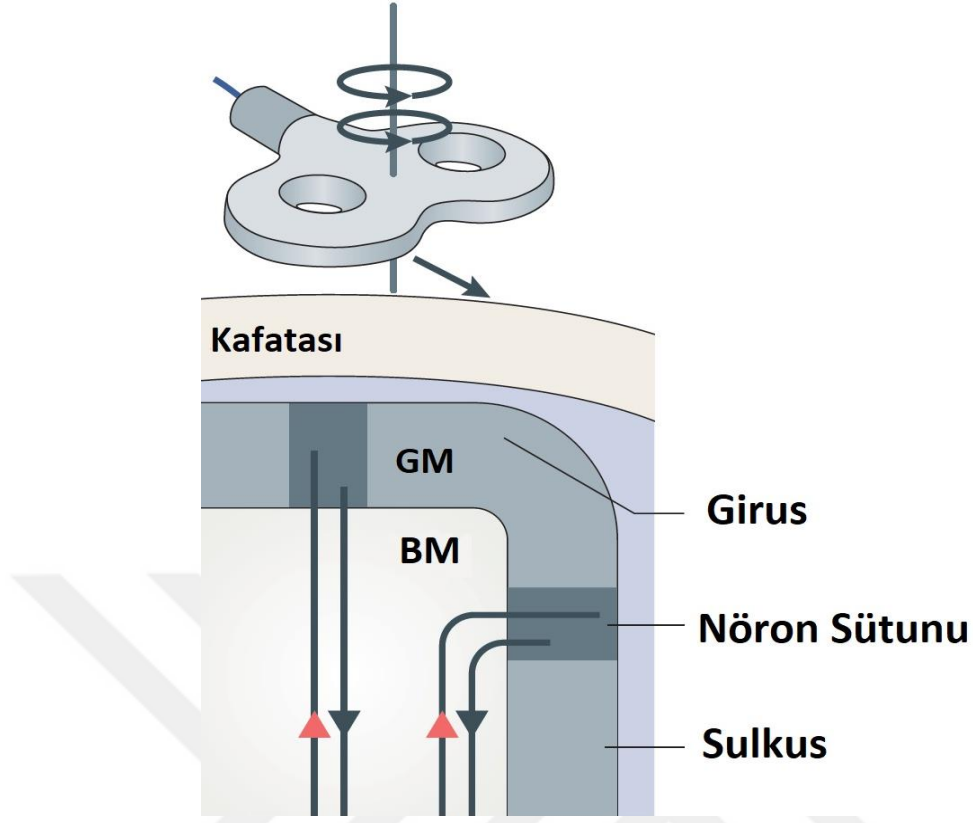
farklılığı TMS çalışmalarındaki çeşitliliğe sebep olan etmenlerdendir. GM: Gri Madde. BM: Beyaz Madde. [25], [26]

TMS uygulama bobininin oryantasyonunun bir diğer etkisine bağlı olarak indüklenen Elektrik alan, bobinin tutulduğu beyin bölgesinin hemen altında birinci derecede direkt etkili olurken, bobinden uzaklaştıkça ikincil uzak beyin bölgelerinde doğrudan etkisi sönmeye başlar, anatomik olarak birbirine bağlı alanlar aracılığıyla dolaylı etkisi görülür (şekil 4.1.2) [27], [28].



**Şekil 4.1.1.2** TMS bobininin hemen altında bulunan hedef bölge birincil derecede doğrudan indüklenen elektrik alandan etkilenirken, subkortikal ve uzak kortikal alanlar ikincil bölgeler olup, trans-sinaptik olarak indüklenen akımdan dolaylı olarak etkilenirler [25], [29].

Beyin katlanma bölgelerine bağlı olarak özellikle sulkus bölgelerinde aksonların uzaysal olarak bükülü şekillerinden dolayı indüklenen elektrik alandan etkilenen akson bölgeleri farklı olduğundan meydana gelen elektriksel uyarımlarda farklılık göstermektedir [18], [30].



**Şekil 4.1.1.3** TMS ile indüklenen intrakraniyal akım baskın olarak kafatasına teğet olarak hareket eder. Kortikal sütunlardaki girus ve sulkus yapıları ise birbirlerine dik açı yapacak şekilde konumlandıklarından dolayı elektrik alandan etkilenme kuvvetleri farklılık göstermektedir [25], [31]

rTMS protokolleri arasında değişkenliğe sebep olan bir diğer etmen ise TMS uygulaması sırasında beyin üzerinde etkin olan “durum etkisidir”. Bu sebeple genellikle YF-rTMS uyarıcı etki göstermesi beklenen 20 Hz uyarım sonrasında bazı hastalarda inhibisyon etkisinin kaydedildiği çalışmalarda yer almaktadır [21], [32]. Sinaptik seviyede nöronlar arası varolan bağlantılar, uyarım sırasında kortikal uyarılabilirlik cevabını etkilemektedir. Klinikte yapılan çalışmada uzun süreli nikotin tüketen hastalarda rTMS tedavisi sonrası, beklenen kortikal uyarılabilirliğin tüketmeyen gruba göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir [33]. Sinapslar arası bağlantılarda durum etkisi üzerinde etkili diğer parametreler; stres ve strese bağlı salgılanan hormonların kortikal düzenekteki etkileri [34], kognitif durum, dikkat, uyku-uyanıklık unsurları da arka plandaki durum etkisi üzerinden rTMS sonrası cevabı etkilemektedir [35]. Ayrıca beynin hücresel durum üzerine etki eden intrinsik faktörler

arasında; yaş, cinsiyet, sirkadyan ritim, genetik altyapı da etkili olmaktadır [36], [37] Tüm rTMS parametreleri, uygulanan aynı TMS protokollerine rağmen klinikte ve araştırmada denekler arasında çok çeşitli sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır.

#### **4.1.2. rTMS'nin Moleküler Mekanizması Üzerine Hipotezler**

##### **4.1.2.1. rTMS ve Sinaptik Plastisite**

TMS uygulaması sırasında kullanılan uyarım frekansına bağlı olarak beyinde plastisitenin indüklendiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Sinaptik plastisite, nöronlar arasındaki iletim yoğunluğuna bağlı olarak sinaptik kuvvetin modülasyonunun sağlandığı mekanizmadır [38]. Plastisite sonrasında pre-sinaptik ve post-sinaptik nöronlar arasındaki sinapsın kuvvetliliği artabilir veya azalabilir. Meydana gelebilecek olası bu iki durumdan sinapsın kuvvetinin arttığı moleküler süreç, uzun süreli potansiyel artışı (USPA) olarak adlandırılırken; sinaps kuvvetinin azaldığı, inhibisyon süreci, USPA'nın ters mekanizması olup, uzun süreli depresyon (USD) olarak tanımlanmaktadır [39]. Genellikle yüksek-frekans TMS sonrasında sinapslarda meydana gelen plastisite USPA şeklinde, sinapsta uyarıcı etki oluştururken, düşük-frekans TMS inhibe edici etki göstererek USD oluşumunu tetiklemektedir [40]. rTMS ile meydana bu sinaptik değişimlerin etkisi platisitedeki gen ifade profilindeki değişikliklere bağlı olarak uzun sürebilmektedir [39]. Sinaptik plastisitenin, USPA ve USD oluşumunda başlıca rol alanlar; NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörü ve  $Ca^{++}$  iyonudur. NMDA, uyarıcı glutamat nörotransmitterinin iyonotropik reseptör proteinidir, glutamat ve gilisinin varlığında aktive olarak pozitif yüklü katyonlara geçirgenlik sağlar böylece sinir hücresi membranının potansiyel değişimi ve depolarizasyonu gerçekleşir [41]. Hücre içine  $Ca^{++}$  akışına bağlı olarak ise intrasellülerde kademeli biyokimyasal reaksiyonlar tetiklenir, protein fosforilasyonu, protein sentezi ve gen transkripsiyonu başta olmak üzere. Her iki etmen de sinaptik plastisitenin oluşumunda oldukça kilit rol üstlenmektedir [42]

Birçok *in vitro* çalışmada, manyetik stimülasyon ile uyarım sonrasında hücrelerde plastisitenin indüklendiği kanıtlanmıştır. Nöron kültürüne yüksek frekansta manyetik stimülasyon sonrasında USPA tetiklendiği farklı çalışma grupları tarafından

ispatlanmıştır [43]–[45]. Yüksek frekansta manyetik uyarıma bağlı olarak pre-sinaptik nöronda tetiklenen aksiyon potansiyeliyle glutamat salınımının artmasının post-sinaptik membranda depolarizasyonu tetiklediği ve bu mekanizma ile USPA oluşumu meydana geldiği düşünülmektedir. Bunu kanıtlar nitelikte bulgular yapılan *in vitro* kültür çalışmalarında elde edilmiştir; yüksek frekans manyetik uyarım sonrası NMDA ve AMPA reseptör proteinlerinde sayıca artış moleküler teknikler yardımıyla kanıtlanmıştır [43]. YF-rTMS ile uyarılan USPA'nın oluşum mekanizmasına ait bir başka hipotezde ise dışarıdan uygulanan manyetik alanın etkisiyle indüklenen akımın direkt olarak nöronların membranında bulunan daha yüksek potansiyel fark ile ve yavaş aktive olan NMDA reseptörlerini uyaramayacağı, bunun yerine görece olarak daha düşük potansiyel farkla daha hızlı aktive olabilen AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propanoik asit) reseptörlerini başlangıçta uyararak nöronun depolarizasyonunu sağladığı sonrasında depolarize olan nöronda  $Mg^{++}$  bloğunun kalkması ile NMDA reseptörlerinin aktivasyonunun ve  $Ca^{++}$  akışının başlatıldığı savunulmaktadır. Sekonder sinyal ileten molekül olan  $Ca^{++}$  hücre içi akışıyla hücrede bir çok sinyal yollarını aktive olarak USPA ve plastisite indüklenir [46].

Motor kortekse uygulanan 1 Hz değerine yakın DF-rTMS sonrasında motor uyarılabilirliğin azaldığı yapılan EMG (elektromiyogram) testlerinde gösterilmiştir [47]. Her ne kadar düşük frekans TMS çalışmalarında USD benzeri hücrel cevapların oluştuğu bulgulara da TMS'nin USD oluşumu üzerindeki moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak olası mekanizmaya dair hipotezler literatürde yer almaktadır; bu görüşlerin en kuvvetlisi ise 1 Hz ve yakın değerlerdeki düşük frekans manyetik uyarıma bağlı olarak indüklenen akımın yüksek frekansla indüklenen akıma kıyasla sinir hücrelerine daha yavaş ve az miktarda  $Ca^{++}$  girişine sebep olmasının USD'yi tetiklediğidir [48]. Hipotezi destekleyen diğer çalışma gruplarına göre; DF-rTMS uygulamasının ardından tetiklenen inhibisyon USD sürecinde de USPA'da olduğu, NMDA reseptörlerinin vasıtasıyla meydana geldiği savunulmaktadır. USD oluşumunda, USPA'nın aksine NMDA reseptörlerinin daha yavaş uyarıldığı ve hücre içi  $Ca^{++}$  akışının yüksek konsantrasyonda olmayıp uyarıcı hücre içi  $Ca^{++}$ -bağımlı sinyal yollarını aktive etmeyecek düzeyde gerçekleştiği ve bu sebeple AMPA reseptörlerinin de-fosforilasyon ile inaktif duruma getirilmesiyle nöronda inhibisyonun, USD'nin meydana geldiği vurgulanmaktadır

[49], [50].

Ayrıca düşük frekansta rTMS uygulamasında intrakortikal bölgede yoğun olarak bulunan ve diğer nöron gruplarına göre eşik değeri daha düşük olan inhibitör GABAergic internöronların mikron boyutunda çok sayıdaki kolateral projeksiyonlarıyla etkiye daha açık oldukları ve DF-rTMS'nin inhibisyona bu sistem üzerinden etki ettiği bazı çalışmalarda yer almaktadır [51], [52]. Sıçan korteksine, 1 Hz DF-rTMS uygulamasının ardından beyin kesitlerinde yapılan immunohistokimya çalışmasında GABA sentezinden sorumlu enzim olan GAD65 (Glutamik asit dekarboksilaz)'ın miktarının azaldığı gösterilmiştir [53].

Ancak klinikte ve araştırmada uygulanan rTMS protokolleri, tüm beyin, belirli bir kortikal veya subkortikal alana hedeflidir ve bu alanlarda, nöronlar endotelial hücreler, glial hücreler, uyarıcı ve inhibe edici internöronlar gibi çok çeşitli hücre gruplarıyla bir arada ilişki içinde yer almaktadır. Bu sebeple *in vivo* çalışmalar sonucunda elde edilen çıktılar *in vitro*'daki gibi tek belirli tipteki az sayıda nörona ait olmayıp, içinde çok farklı hücre tiplerini barındıran nöron setlerinin indüklenen akıma verdiği total plastisite cevabından oluşmaktadır [54]

#### 4.1.2.2. rTMS ve BDNF

Yüksek-frekans rTMS moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik *in vitro*'da spesifik sinir hücre hatları çalışmalarından elde edilen bulgular, YF rTMS'nin doğrudan veya dolaylı olarak aktive ettiği NMDA reseptörlerinin  $Ca^{++}$  ve  $Ca^{++}$  bağımlı hücre içi molekül gruplarının etkisiyle nörotrofik faktörlerin salınım yollarının indüklendiğini göstermiştir [55].

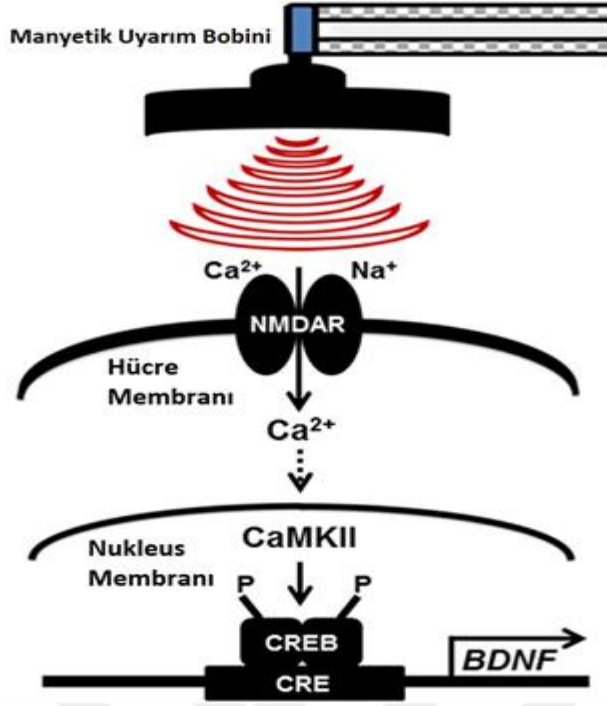
Nörotrofik faktörler, nöronların korunmasını ve farklılaşmasını, aksonal büyümeyi, nörogenezi ve sinaptik plastisiteyi düzenleyen peptid veya küçük protein yapıdaki molekül ailesi üyeleridir. Merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunan nörotrofik faktörler, membranda yer alan "reseptör-tirozin-kinaz (Trk)" molekülleri aracılığıyla ilgili hücre içi sinyal kaskadlarını başlatırlar [56]. BDNF (beyin kaynaklı nörotrofik faktör), beyinde en çok bulunan nörotrofin olup öğrenme ve hafıza ile ilgili süreçlerde aktif olup, nöron gelişimi ve plastisitede USD oluşumunda etkin rol oynar. Her bir nörotrofin yüksek affinite ile kendine özel Trk reseptörüne bağlanır, BDNF TrkB

reseptörüne bağlanır [57]. rTMS uygulamaları sonucunda BDNF seviyelerinde değişiklik kaydedilmiştir ancak çalışmalardan elde edilen sonuçlar değişkenlik göstermektedir. Ancak genel olarak YF-rTMS uygulaması sonrasında BDNF transkripsiyon seviyesinin arttığı kaydedilmektedir, çalışmalar spesifik sinir hücre hattı üzerinde manyetik stimülasyon uygulanmasının ardından aktive olan “Ca<sup>++</sup>-CaMKII-CREB” sinyal yolağının etkisiyle olabileceğini öngörmektedir [55]. Ca<sup>++</sup>-CaMKII-CREB yolağı BDNF transkripsiyonunda oldukça önemlidir [58].

Kalmodulin, hücre içinde Ca<sup>++</sup> bağlayıcı proteindir, kalsiyumu bağlayıp aktif hale geçmesiyle birçok proteinin fosforilasyonunu sağlar. CaMKII ise Kalsiyum/Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II olup glutamerjik sinapsların düzenlenmesinde görev alan beyinde en yoğun bulunan kalsiyuma bağlı aktive olan enzimdir. Sinaptik iletim sırasında kalsiyum-kalmodulin birliğini belirler ve bir dizi hücre içi biyokimyasal sinyal kaskadını başlatır [59]. CaMKII, USPA oluşumu sırasında aktive olan NMDA reseptörüne direkt olarak bağlanabilmektedir [60].

İnsanlarda ve kemirgenlerde BDNF geninin kodlama yapan bölgesi, 7 tane kodlama-yapmayan bölgenin kontrolü altında transkribe edilmektedir. Bu şekilde çok sayıdaki farklı promotör bölgenin farklılığı sayesinde, BDNF’in anlatımına, lokalizasyonuna, sinaptik bölgedeki dağılımına dair düzenlenmelere alternatif modülasyonlar sunmaktadır. Bu promotör bölgeler, fosforlanmış CREB (CRE-bağlayıcı protein) molekülünün bağlanabileceği çok sayıda CRE (cAMP-cevap elementi) dizilerini içerir [61].

rTMS ile membran potansiyelinin değişimine bağlı olarak aktive olan AMPA reseptörlerinden Ca<sup>++</sup> hücre içine akışı artar, Ca<sup>++</sup>-Kalmodulin birlikteliği oluşur ve CaMKII aktivasyonunu tetiklenir. Aktive olan CaMKII, NMDA reseptörlerine bağlanır ve sinaptik kuvvetin artmasını sağlar ayrıca CREB (cAMP-cevap elementi-bağlayıcı protein) molekülünü aktifleştirir. Fosforlanarak aktif hale gelen CREB, transkripsiyon faktörü, nükleusta ilgili CRE dizilerine bağlanarak BDNF transkripsiyonunu başlatır (Şekil 4.1.2.2.1) [55], [62], [63].



**Şekil 4.1.2.2.1.** Yüksek frekansta manyetik uyarıma bağlı olarak indüklenen BDNF transkripsiyonuna ait olası moleküler mekanizma gösterilmektedir. CaMKII: Kalsiyum/Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II, CREB: CRE, cAMP-cevap elementi-bağlayıcı protein, CRE: cAMP-cevap elementi [55].

## 4.2. Obezite ve Yeme Bozuklukları

Son yıllarda yapılan anket çalışmalarına göre dünya genelinde aşırı kilolu yetişkin sayısı yaklaşık iki milyar olup, sadece gelişmiş ülkelerdeki yetişkin nüfusun ise üçte birini obez bireyler oluşturmaktadır [64]. Birleşik Devletler'in verilerine göre obez bireylerin sağlık masrafları, sağlıklı kilolulara kıyasla %42 daha fazladır [65]. Multifaktöryel bir etiyolojiye sahip olması sebebiyle, tek tip bir tedavi yöntemi olmayıp, uygulanan tedavilerin neticeleri bireyden bireye değişkenlik göstermektedir. Yaşam şekli değişimi, ilaç tedavisi ve bariatrik cerrahi seçenekleri tek başına yeterli olmamakla birlikte, tedavi süreci sonrası bireylerin karşılaştığı sorunlardan biri olan yeniden ve daha agresif kilo alımını engelleyememektedir. Ayrıca, invaziv bir müdahale olan bariatrik operasyonların yüksek derecede obez hastalara uygulanması ciddi komplikasyonlar içermektedir [66].



Hızla artan obezite epidemi değerine kıyasla daha nadir gözlemlenen ve bu sebeple gereğinden fazla azımsanma hatasına düşülen yeme bozukluğu nevrozları şaşırtıcı şekilde, ölüm riski oranı en yüksek olan mental hastalıklar listesinde birinci sırada yer almaktadır [67]. Yeme bozukluğu hastalık grubunda olan anoreksiya nervoza, ciddi kilo kaybı ve açlık ile neticelenen bireyin yaşamını tehdit eden nöropsikiyatrik bir bozukluktur [68]. Bulimia nervozada ise anoreksiyadan farklı olarak engellenemeyen, aşırı yeme epizodları ve buna bağlı olarak kişinin kendisini kusmaya zorlaması veya laksatif, diüretik ilaç grubunun yanlış şekilde kullanılma davranışlarını içinde barındıran bir yeme bozukluğudur. Kronikleşme insidansı oldukça yüksek olan ve emosyonel olarak bireyin kendine tahrip algısını içinde barındıran bu bozukluklar, farmakolojik veya psikoterapik destek gibi tedavi yöntemlerine direnç sergiledikleri için yetersiz rehabilitasyon gösterirler [69].

Obezitenin oluşumunda temel etmen olan “aşırı yeme arzusu” semptomuna dair obez katılımcılar ile yapılan nörogörüntüleme çalışmalarına göre, beyindeki fronto-striatal donanım mekanizmasını fonksiyonel olarak çalışmamaktadır. Özellikle inhibisyon ve yeme davranışının kontrolünde birincil rol oynayan DLPFC (dorsolateral prefrontal korteks) obezite çalışmalarında ve tedavisinde hedef bölge niteliği taşımaktadır [70], [71].

Yeme bozukluğu olan hastalarda yapılan beyin görüntüleme çalışmaları, obezite etiyojisi çıktılarına benzer şekilde, anoreksik ve bulimiya nervozalı bireylerde gözlemlenen yeme davranışındaki kontrol bozukluğu bulgusuyla örtüşerek, DLPFC (dorsolateral prefrontal korteks)’in hastalığın patofizyolojisinde kilit rol oynadığını göstermektedir [70], [72].

#### **4.2.1. Obezite ve Yeme Bozuklukları Tedavisinde rTMS Uygulaması**

Obezite, anoreksiya ve bulimiya nervoza gibi birçok alt grubu olan yeme bozuklukları tedavisinde güncel klinik yaklaşımlar yetersiz kalmakta ve henüz tam olarak hedeflenen iyileşme kriteri yakalanamamaktadır. Etiyojileri yeteri kadar bilinmeyen bu patolojilerin tedavisinde, rTMS uygulaması yenilikçi ve güçlü bir terapötik metot olarak değerlendirilmektedir. Yemek yeme davranışında denetleme ve kontrol mekanizmasında bozukluğun bulgulanması bahsedilen hastalıkların ortak patofizyolojik temelini oluşturduğu için, bu alandaki araştırmalar, büyük ölçüde

DLPFC hedefli rTMS uygulamalarından oluşmaktadır [73]. Dorsolateral prefrontal korteks (DLPFC), besin alımının bilişsel kontrolünü destekleyen yönetici işlevlerle ilişkili karmaşık bir beyin bölgesidir. Hedef bölge seçilmesinde genel olarak, altta yatan hipotez, DLPFC aktivitesinin düzenlenmesiyle, bilişsel kontrolün kolaylaştırılması ve ilgili mekanizmaların biliş dengesinin kurulmasıdır [74]

#### **4.2.1.1. Obezite ve Yeme Bozuklukları Tedavisinde rTMS Uygulamasının Olası Moleküler Mekanizması: HPA Aksı**

Obezite ve yemek bozuklarında görülen yemek davranışını kontrol eden sinir ağlarındaki aktivite dengesizliğini tedavi için non-invaziv bir nöromodulasyon tekniği olan TMS potansiyel terapötik bir yaklaşım olarak klinikteki çalışmalarda yer almaktadır [70]. Çalışmalarda, güvenilir bir yöntem olan rTMS ile beynin kortikal aktivitesini değiştirerek, obezitede görülen aşırı yeme arzusu nöbetlerini dengelemeyi amaçlamaktadır [75].

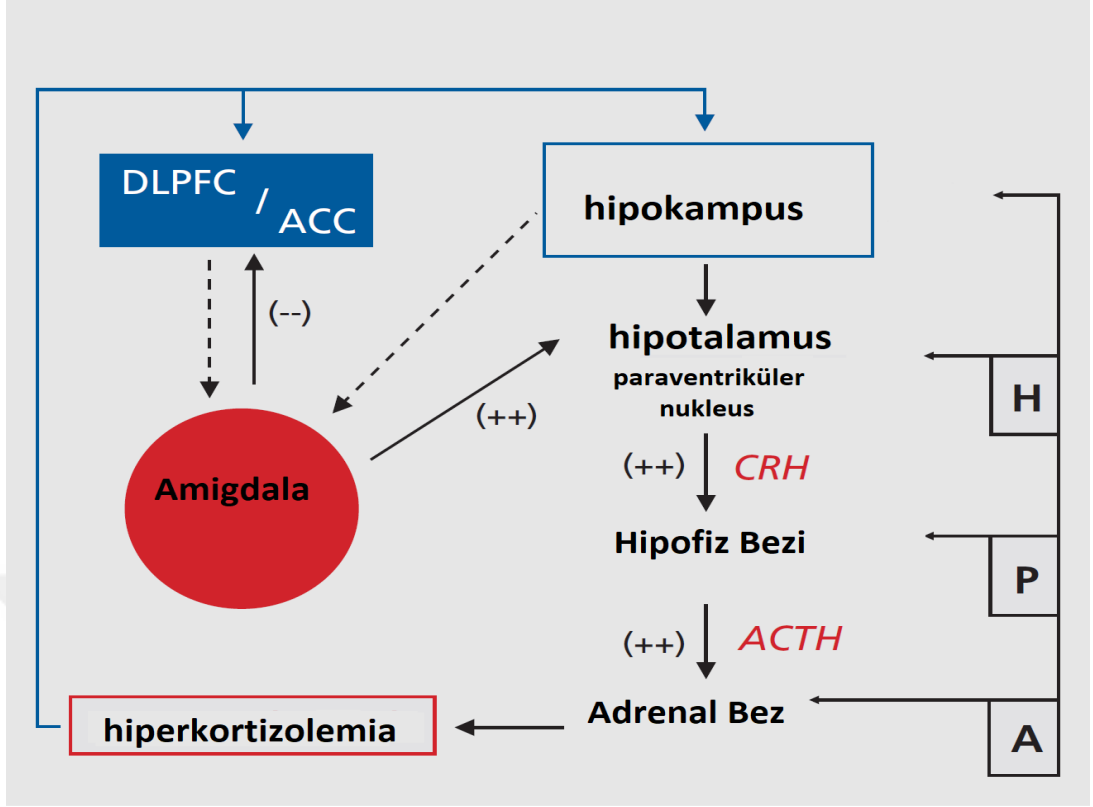
Bulimia nervozalı bireylere, YF-rTMS'nin DLPFC'e uygulanmasının ardından bireylerde kilo ve viseral yağ oranının azaldığı birçok çalışmada tespit edilmiştir. Uygulanan yüksek frekans rTMS sonrası kortikolimbik bağlantının kuvvetlenmesine bağlı olarak bireylerde aşırı yeme arzusunun hafifletildiği çalışmalarda kaydedilmiştir [19]. Başka bir çalışmada, 10 Hz YF-rTMS'nin Bulimia hastalarına 4 hafta DLPFC'e uygulanmasının ardından olumlu sonuçların alındığı kaydedilmiştir [76]. Anoreksiya nervozalı bireylere YF-rTMS tedavisi sonrası bireylerde abnormal çalışan fronto-striatal fonksiyonların düzeldiği nörogörüntüleme ve fMRI çalışmalarıyla desteklenerek gösterilmiştir ayrıca hastaların tedavi sonrası izlencelerinde, yemek algısı ve ödül üzerine sahip oldukları anksiyetik epizodlarının azaldığı sunulan çıktılar arasındadır [7]. Aşırı yeme ataklarına sahip 28 bayan katılımcı ile yapılan çalışmada, 10 Hz YF-rTMS, DLPFC'e uygulanan deney grubunun kontrol grubuna göre oto-regülasyonlarında artış kaydedilmiştir [77].

TMS'nin obezite ve yeme nervozaları üzerindeki terapötik etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen literatürdeki çalışmalar genellikle uyarıcı yüksek frekans rTMS'nin DLPFC'e uygulanmasıyla iştah ve aşırı yeme isteğinin azaldığını göstermektedir [74], [78], [79].

DLPFC'e rTMS tedavisinin moleküler etki mekanizması belirlenememiş olmasına

rağmen olası mekanizmanın HPA (Hipotalamus-hipofiz-adrenal) aksı üzerinden gerçekleştiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Olası mekanizma hipotezinin ana dayanak noktası, obezite ve yeme bozukluklarının patofizyolojik temelinde stres faktörüne bağlı olarak bozulmuş bir HPA aksının yer almasıdır [80], [81]. Bulimik ve anoreksik hastalarda yüksek serum kortizol değerleri saptanmaktadır [82]. HPA aksının hiperaktivitesi ve buna bağlı olarak yüksek kortizol değerlerinin obezite patofizyolojisine neden olduğu düşünülmektedir [83]. HPA hiperaktivitesinin yemek alımını arttırdığı ve normal değerlerin üzerindeki kortizolün yüksek kalorili besin tüketimine sebep olduğu laboratuvar çalışmalarında gösterilmiştir [84], [85].

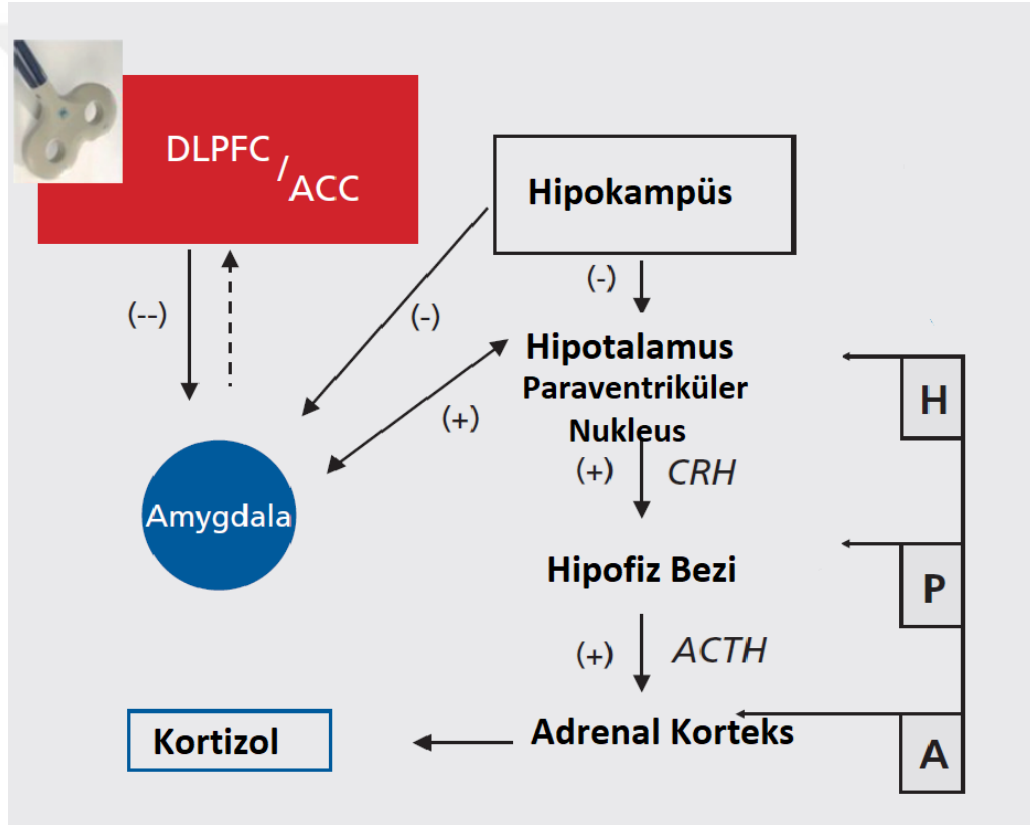
Stresin endokrin bileşeni olan HPA-aksı, hipotalamusun paraventrikular nükleus (PVN) hücrelerinden kortikotropin-serbesleştirici-hormon (CRH) salınımıyla uyarılır ve nöroendokrin kaskadı başlatır. Salınan CRH, hipofiz bezindeki CRH tip-1 reseptörlerine bağlanarak adrenokortikotropin hormon (ACTH) öncülü olan pro-opiomelanokortin (POMC) polipeptidini sentezler [86]. ACTH, adrenal bezlerin korteksinden kortizol hormonu sentezini uyararak sirkadyan ritimden karbohidrat, yağ, protein metabolizmasına, bağışıklık sisteminin baskılanmasına ve duygu durumun değişimine kadar birçok farklı sistemin düzenine etki göstererek vücudun strese karşı nöroendokrinolojik tepkisi oluşur [87]. HPA aksının nörobiyolojik modülasyonu başlıca DLPFC tarafından düzenlenmektedir [88], [89]. Bu veriler ışığında DLPFC hedefli rTMS çalışmaları ile kilo kontrolünün dengelenmesi hedeflenmektedir (Şekil 4.2.1).



**Şekil 4.2.1.** Kortiko-talamik yolak. Limbik ve kortikal nöronal donatılar iştah kontrolünde görev almaktadır. Kortikal seviyede, DLPFC ve ACC, yönetici işlevlerden sorumlu olup yemek alımının bilinçle ilişkili kontrolünün sağlandığı bölgelerdir. Limbik seviyede, amigdala ve hipokampus, emosyonel olarak iştahın oluşmasında, yeme davranışından zevk almada ve alışkanlık haline getirmede sorumlu bölgelerdir [90]. Stres altında, limbik alanlardaki hiper-aktiviteye bağlı olarak, CRH ve kortizol seviyeleri artmaktadır. Hipokampus disregülasyonu veya kortikal bölgelerin inhibe edici etki ağlarının çalışmamasına bağlı olarak ‘hiperkortizolemia’ görülmektedir. Bu durum strese bağlı anksiyete, obezite ve yeme bozuklarında tespit edilebilmektedir. DLPFC: Dorsolateral prefrontal korteks, ACC: Anterior singulat korteks, CRH: Kortikotropin serbestleştirici hormon, ACTH: Adrenokortikotropin hormon [91].

Yönetici fonksiyonların hipoaktivitesi semptomlarından yola çıkarak genellikle çalışmalarda yüksek-frekans rTMS, beynin yönetsel bölgesi olan DLPFC’ye uygulanmıştır. YF-rTMS’nin DLPFC’ye uygulanması yüksek kortizol seviyesini normal değerlere düşürmüştür [92]. Hatta tükürük kortizol değerleri yüksek olan

depresyonlu hastalarda YF-rTMS'nin DLPFC'ye tedavisi sonrasında da hastalarda kortizol seviyesi normal değerlere düşmüştür [93]. Bulimia hastalarına YF-rTMS DLPFC tedavisi sonrası aşırı yemek yeme atakları ve tükürük kortizol seviyeleri azalmıştır [94]. Yüksek frekans rTMS- DLPFC tedavisi sonucu uygulamadaki hedef kortikal bölgenin uyarıldığı ve bu bölgenin diğer beyin bölgeleriyle sahip olduğu sinaptik bağlantıların özelliklerinden dolayı uzak beyin bölgelerinde ise inhibisyon karakteristiğinin ortaya çıktığı düşünülmektedir [95] TMS'nin muhtemel terapötik mekanizmasının frontol korteks ve HPA aksı arasındaki nöroendokrin regülasyonun dengesini sağlayarak gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 4.2.2) [96].



**Şekil 4.2.2.** DLPFC'ye rTMS uygulamasının fronto-striatal ve HPA aksı üzerindeki muhtemel nöroendokrin etki mekanizması şematize edilmektedir. YF-rTMS DLPFC'ye uygulandığı takdirde HPA aksı üzerindeki inhibisyon özelliğini artırarak uygulama öncesi aşırı yüksek seyreden kortizol değerini, hiperkortizolemia bulgusunu hafifletirerek yeme bozuklukları, anksiyete ve depresyon gibi stres yolağının aşırı uyarıldığı patolojilere tedavi niteliği taşımaktadır. DLPFC: Dorsolateral prefrontal korteks, ACC: Anterior singulat korteks, CRH: Kortikotropin serbestleştirici hormon,

ACTH: Adrenokortikotropin hormon [91].

Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre her ne kadar, obezite, bulumia ve anoreksiya nervozanın da içinde bulunduğu yeme bozukluklarının tedavisinde DLPFC'e uygulanan rTMS'nin HPA-aksının aşırı aktivitesini azaltarak yüksek seyreden kortizol değerini dşrdğine dair çalışmalar yer alsada bunun tersini veya stimulasyonun stres aksına etki etmediğini gösteren bulgularda literatürde yer almaktadır. Sağlıklı erkek sıçanlara 15 Hz YF-rTMS 10 gün uygulandıktan sonra kortizol ve ACTH değerleri kontrol grubuna göre yükselme göstermiş [97]. Sağlıklı bireylere rTMS uygulaması sonrasında serum kortizol ve ACTH seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir [98]. Sağlıklı bayan katılımcılara sol DLPFC'e 10 Hz YF-rTMS uygulamasının öncesinde, hemen uyarımın ardından ve 30 dk sonrasında tükürük kortizol değerleri ölçülmüş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır [99]. Aynı grubun bayan katılımcılara, anksiyete testi skoru uygulayarak sağ ve sol DLPFC'e MRI ile hedefleyerek rTMS uygulamasının sonucunda sağlıklı bayanların anksiyete skorlarına ters orantılı olarak kortizol seviyelerinde artış gözlenmiştir, daha sağlıklı duygu durumunun daha hassas HPA cevabı oluşturduğunu çalışmalarında göstermişlerdir [100]. Birbiriyle elişen TMS- HPA aktivitesi sonuçları, rTMS'nin sadece HPA üzerinden direkt etki mekanizmasına sahip olmadığını göstermekle birlikte, kortizol ölümünün hassas ve emosyonel durumdan kuvvetli bir şekilde etkilendiğini değerlendirmek gerekmektedir. Çalışma sonuçları arasında ve aynı klinik teşhise sahip bireyler arasında elde edilen farklı rTMS tedavi neticelerinin en büyük sebeplerinden biri, cinsiyet ve hormonal farklılıktır [101] ayrıca yaş etkisi [102] ve uygulanan rTMS tedavi süresi de farklı sonuçların elde edilmesine sebep olan faktörler arasındadır [103].

### **4.3. Bağırsak Mikrobiyotası**

Mikrobiyota, memeli sindirim kanalında bulunan büyük çoğunluğunu bakterilerin oluşturduğu, virüs, protozoa, arke ve mantardan oluşan mikroorganizma topluluğudur [104]. Oldukça kompleks bir ekosistem olan bu topluluk, yetişkin insan sindirim sisteminde 1,000'den fazla bakteri türü içermekte ve yaklaşık 7,000'e yakın tür içi çeşitliliği içeren bakteri grubundan oluşmaktadır [105]. Mikrobiyom, sindirim

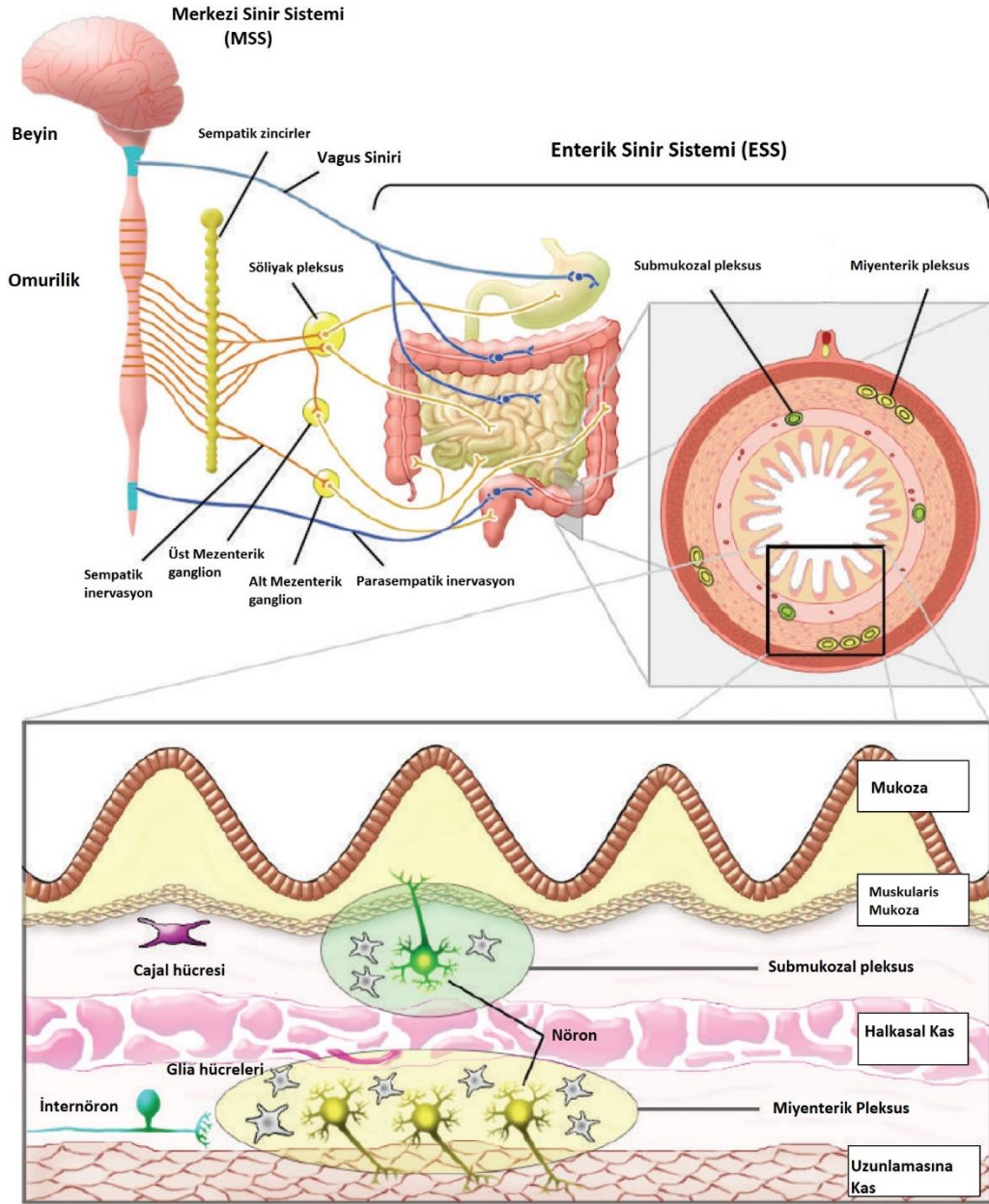
kanalında varlığını sürdüren mikrobiyal topluluğun sahip olduğu genomun tamamı olup, sadece bağırsak mikrobiyomu 3,3 milyon gen ile insan genom boyutunun yaklaşık 150 kat daha fazlasına sahiptir. Yetişkin bir bireyin bağırsaklarında bulunan mikrobiyal hücrelerin ağırlığı yaklaşık 1-2 kg olup, toplam dağılımda insan hücresinin 10 katı fazla sayıdaki mikrobiyal hücre varlığı vücutta tespit edilmiştir [106], [107]. Morfolojik ve biyokimyasal perspektiften incelendiği zaman, bağırsak mikrobiyotası vücutta yer alan herhangi bir endokrin organdan daha büyük ve kompleks bir biyokimyasal heterojeniteye sahiptir ve konak fizyolojisinde gerçek bir organ gibi görev almaktadır [108], [109]. Mikrobiyota, besin ve ksenobiyotik metabolizması (vitaminlerin sentezi, oligo ve polisakkaritlerin, ilaçların sindirimi gibi), immun sistemin regülasyonu ve nöroendokrin fonksiyonlar gibi konakta birçok fizyolojik süreçte yer alırlar. Mikrobiyota, bu etkilerinin bir kısmını, bakteriyel metabolizma ürünleri olan format, asetat, propiyonat ve butirat gibi kısa zincirli yağ asitleri (KZYA)'nin aracılığıyla gerçekleştirir [110]. KZYA, başlıca enerji kayanğı ve sinyal molekülü olarak görev alırlar. KZYA'ni algılayan sensör moleküller olan G-proteini eşlenikli reseptörler aracılığıyla çok çeşitli metabolik yollarda etkin olabilmektedirler [111]. Bakteriler ve konak hücreler arasında sinyal molekülü olarak görev alan KZYA, zonula okludens (ZO-1) ve klaudin gibi sıkı-bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek ince bağırsak hücre tabakasının ve bağırsak bariyerinin bütünlüğünü sağlarlar [110], [112].

#### **4.3.1. Beyin-Bağırsak Aksı ve Enterik Sinir Sistemi**

Beyin-bağırsak aksı, beyin ve bağırsak arasında nöronal, immünolojik ve hormonal sinyaller aracılığıyla gerçekleşen çift-yönlü kompleks iletişim sistemidir [113]. Bu iletişim yolu aracılığıyla bağırsak mikrobiyotası nöronal gelişim süreçlerine ve beyin fonksiyonlarına etki etmektedir. Bağırsak-beyin eksenini iletişiminin düzensizliği birçok metabolik, psikiyatrik, nörolojik hastalık ve komorbid bozukluklara neden olmaktadır [114]–[116]. Merkezi sinir sistemi (MSS) ve bağırsak arasında var olan bu kompleks iletişim ağı; otonom sinir sisteminin (OSS) sempatik ve parasempatik uzantılarından, enterik sinir sisteminden (ESS), humoral ve immun sinyal yollarından oluşmaktadır [106]. Bağırsak, nöral krest hücrelerinden kökenlenen, bağırsak duvarları içinde yer alan enterik sinir ağı ile innerve edilmektedir. Enterik

sinir sistemi (ESS), duyu, motor ve internöronlardan oluşan kompleks bir periferel sinir ağıdır. ESS sayesinde bağırsak hareketliliği, kan akımı, mukus sekresyonu gibi birçok temel gastrointestinal fonksiyon MSS'den bağımsız olarak gerçekleştirilmektedir. ESS işlevinden dolayı bağırsak için “ikinci beyin” adlandırılması kullanılmaktadır [117], [118]. Bağırsak motor kontrolü her ne kadar ESS tarafından gerçekleştirilse de işlevlerin modülasyonunda MSS'nin inen ve çıkan sinir ağları da oldukça etkindir. Vagal ve omurilik duyu nöronları bağırsaktan aldıkları visseral sinyalleri, omurilik ve beyin sapına, talamusa ileterek, beyinde poli-sinaptik ağlar sayesinde iletinin daha ileri beyin bölgelerine, hipotalamus, limbik bölgeler ve ön beyine ulaştırılıp değerlendirilmesini sağlarlar. Otonomik sinir sisteminin (OSS) inen yollar aracılığıyla da vagal ve spinal uzantılar, gastrointestinal motor fonksiyonları organizmanın stres ve homeostazına uygun olarak düzenlenmektedir. Beyin-bağırsak çift-yönlü iletişim aksında vagal nöron sinir iletim yolağının en önemli bileşenidir [119]. ESS, intrinsik birincil affarent nöronlar, enterik glia hücreleri, internöronlar ve motor nöronların bir araya gelerek oluşturduğu pleksuslardan, sinir ağlarından; submukozal (Meissner pleksus) ve Myenterik pleksus (Auerbach pleksus) oluşmaktadır. Şekil 4.3.1.1 [120].





Şekil 4.3.1.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Enterik Sinir Sistemi arasındaki bağlantıların şematik gösterimi [121].

#### 4.3.1.1. Beyin-Bağırsak Aksı, ESS ve Serotonerjik Sistem

Beyin-Bağırsak aksındaki çift yönlü iletişim ağında MSS ve ESS arasında ana sinyal molekülü serotoninidir. Serotonin sentezi, besin tüketimi yoluyla elde ettiğimiz esansiyel bir aminoasit olan triptofan öncülünde gerçekleşmektedir. Triptofan,

bağırsaklardan absorblandıktan sonra dolaşımında serbest veya albümin-bağlı formda bulunabilmektedir. Kan-beyin-bariyeri (KBB)'ni aminoasit taşıyıcı proteinler yardımıyla geçerek MSS'de serotonin sentezine katılır [122]. Serotonin sentez kaskadı beyin-bağırsak ekseninin her bölgesinde aynı şekilde gerçekleşmektedir. Hücreye alınan triptofan, triptofan hidroksilaz (TPH) ile 5-hidroksi-triptofan (5-HTP)'a dönüştürülür. Ara molekül 5-HTP aromatik aminoasit dekarboksilaz (AAAD) enzimi ile 5-hidroksitriptamin (5-HT)'ne, serotonine dekarboksile edilir [123].

Vücuttaki serotoninin büyük çoğunluğunu (yaklaşık olarak %90) bağırsak epitelinde bulunan bir grup enteroendokrin hücresi olan enterokromoffin hücreleri üretmektedir [124]. Bu hücreler, lümeneye bakan apikal kısımları ile besin ürünlerini, tahriş edici maddeleri, mikrobiyotanın oluşturduğu ürünleri, inflamatuvar ajanları algılayabilen spesifik kemoreseptörleri sayesinde algıladıkları bilgileri bağlantılı oldukları ESS hücreleri olan intrinsik birincil affarent nöronlara transforme ederek bağırsak epitelinin içinde bulunduğu şartlara uygun olarak motor hareket ve metabolizma sürecini regüle ederler [125]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, enterokromoffin hücrelerinin voltaj-kapılı  $Na^+$  ve  $Ca^{++}$  kanallarını eksprese ederek, elektriksel olarak uyarılabilir olduklarını göstermektedir. Tahriş edici molekülleri algılayan spesifik TRPA1 reseptörleri ve mikrobiyal metabolitlere sensör gibi davranan olfaktör reseptörleri (Olf 558) sayesinde ESS'ni uygun bağırsak homeostazı için yönlendirirler. Ayrıca, stres ile bağlantılı olarak salınan katekolaminleri algılayabilen adreno reseptör proteinlerini ( $Ad\alpha 2A$ ) bazolateral kısımlarda anlatıma tabi tutarak bağlantılı oldukları sinir hücrelerini uyarırlar [126]. Bağırsaktaki katekolamin seviyesi, özellikle norepinefrin miktarı inflamasyona, enfeksiyona ve sempatik sinirlerin oluşturduğu tonusa bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sempatik sinyallere ve strese bağlı olarak seviyesi artan norepinefrin ve adrenaline en hassas olan enteroendokrin hücre grubu sahip oldukları adreno reseptörlerden dolayı enterokromoffinlerdir ve  $Ad\alpha 2A$  reseptörlerinin uyasılmasına bağlı olarak spesifik hücre içi yolları aktif hale getirerek bağlantılı oldukları sinir hücrelerine uygun sinyaller sunarlar [127]. Serotonin üreten enterokromoffin hücrelerin bazolateralinde lokalize olan intrinsik birincil affarent nöronlar (submukozal ve myenterik pleksustan uzanan ESS nöronlarının fiberleri)  $5-HT_3$  reseptörlerine sahip olduklarından enterokromoffin hücreleriyle serotonin aracılığıyla bağlantı kurarlar [126]. Salınan

serotonin, gastrointestinal kanalda sekresyon, peristalsis, vasodilasyon, ağrı algısı ve bulnatı hissinin oluşmasında etkindir [128]. Ayrıca enterik serotonin, lenfosit, monosit, makrofaj ve dendritik hücre gibi immun hücrelerin de 5-HT reseptörlerini taşımalarından dolayı immun modülatör etkiye de sahiptir [129]. 5-HT sinyalindeki disregülasyon, psikiyatrik ve gastrointestinal hastalıklarda ve komorbid bozukluklarda görülen en belirgin semptomlardan biridir [130]. Bu sebeple serotonerjik nöronal iletim üzerine etkili trisklik antidepressan ilaçlar aynı zamanda irritabl bağırsak sendromu (IBS) vb. gastrolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [131].

Laboratuvar çalışmaları, steril koşullarda yetiştirilen mikrobiyotasız farelerin erken dönem serotonerjik sistemlerinin gelişmediğini kaydetmektedir [132]. Bir başka çalışmada ise bağırsak mikrobiyotasının 5-HT sentezini regüle ettiği gösterilmiştir. Fare ve insan mikrobiyotasında spesifik olarak spor-oluşturan bakteri grubunun enterokromoffin hücrelerinden serotonin sentezini üretimini indükledikleri belirtilmiştir [133]. Aynı şekilde erken dönemde mikrobiyotasız olarak yetiştirilen farelerde triptofan seviyelerinin normalden yüksek olduğu, anne sütüyle özellikle *B. infantis* probiyotik takviyesi sonrası triptofan ve 5-HT değerlerinin normale döndüğü kaydedilmiştir [134]. Bu veriler, bağırsak mikrobiyotasının triptofan ve serotonin metabolizması üzerine güçlü etkisini işaret ederek mikrobiyal kolonizasyonunun sinir sistemi gelişimi ve işleyişi için önemini göstermektedir [115].

#### 4.3.2. Bağırsak Mikrobiyotası ve HPA Aksı

Beyin-bağırsak eksenini, merkezi sinir sistemi (MSS), otonomik sinir sisteminin ekstrinsik fiberlerinden ve enterik sinir sisteminin (ENS) intrinsik nöronlarının inervasyonlarına ek olarak HPA aksı ve mikrobiyotayı da içermektedir [135]. Ana stres aksı olan HPA aksı, beyin ve bağırsak arasındaki ağda hormonal iletişimi sağlamaktadır. Limbik sistemin bileşeni olan HPA aksı, bireyin fiziksel ve mental stres etmenlerine karşı adaptasyonunu sağlamaktadır [136]. HPA aksı vücutta bağırsak fonksiyonlarının regülasyonunu da içeren çok çeşitli metabolik etkilere sahiptir. CRH salınımıyla aktive olan stres aksı, bağırsak hareketini [137], bağırsak bariyerinin geçirgenliği ve inflamatuvar cevap kapasitesi [138], duygu durum işleyişini [139] etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyotasının, immun hücreleri (sitokinler,

kemokinler) modüle ederek, vagal sinir aracılığıyla veya nöroaktif maddeler sentezleyerek HPA aksının fonksiyonuna etkileri çalışmalarda gösterilmiştir [140]. Mikrobiyotanın stres cevabına etkisini ilk olarak mikropsuz steril koşullarda yetiştirilen farelerde yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Mikrobiyotasız farelerin, normal koşullarda yetiştirilenlere göre daha kuvvetli ve abartılı HPA cevabı oluşturdukları gösterilmiştir. Ayrıca gelişim süreçlerinin ilk dönemlerinde, bu grup fareye mikrobiyotası olan farelerden fekal trasplantasyon ile kolonizasyonun sağlanmasıyla aşırı kuvvetli stres cevabının azaldığı, normal seviyelere düştüğü gözlemlenmiştir [141]. Probiyotik takviyesi ile mikrobiyotanın modifikasyonuna bağlı olarak HPA stres cevabı şiddeti değişmektedir. Oral *L. Farciminis* uygulamasının sonrasında HPA stres cevabının kuvvet derecesinin düştüğü, stres ile indüklenen bağırsak-bariyer geçirgenliğinin azaldığı ve endotokseminin baskılandığı gösterilmektedir [142]. Rhesus maymunlarında yapılan çalışmada post-natal anne ayrımı ile indüklenen erken dönem stresine bağlı olarak hayvanların fekal mikrobiyom çeşitliliğinde özellikle *Lactobacilli* topluluğunda önemli derecede azalma olduğu, anksiyetik davranış deney sonuçlarıyla birlikte gösterilmektedir [143]. Tüm veriler göstermektedir ki, mental veya fiziksel stres koşullarının uyarımına bağlı olarak, homeostazın sağlanmasında, mikrobiyota ve HPA stres aksı arasında çift-yönlü etkileşim söz konusudur.

#### **4.3.3. Bağırsak Mikrobiyotası ve Obezite, Yeme Bozuklukları**

Diğer bölümlerde bahsedildiği gibi obezite ve yeme bozuklukları etiyolojisinde stres en önemli faktör olmakla birlikte mikrobiyota ile kuvvetli etkileşime sahiptir. Birçok çalışma HPA aksının metabolik bozuklukların ve obezitenin başlangıcında önemli rol oynadığını doğrulamaktadır [144]. Stres, kilo alımı, visceral yağlanma, bazal glukoz seviyesi ve insülin direnci arasında pozitif korelasyon vardır. Çalışmalar, kronik strese bağlı olarak artan adrenal glukokortikoid seviyesinin, insülin artışını tetiklediği ve insülin direnci patolojisini meydana getirerek bireyin yüksek-kalorili besin tüketimine neden olduğunu göstermektedir. Böylece disregüle stres aksıyla indüklenen abdominal yağ fazlalığı ve yeme bozukluğu patolojisi oluşmaktadır [145]. Yüksek kalorili besin tüketimi ile indüklenen obez hayvan modellerinde, akut stres uyarımına karşı, kontrol grubuna göre kortikosteroid seviyesi daha yüksek olmaktadır. Bu obez

hayvanlara *B. Pseudocatenulatum* probiyotik takviyesi sonrası steroid hormon seviyesi normal değerlere düşmektedir. Mikrobiyatanın anksiyetik obez fizyoloji üzerindeki etkisini açıkça desteklemektedir [146]. Mikrobiyota kompozisyonundaki modifikasyonlar ile metabolik değişiklikler indüklenebilmektedir. Obez fare veya aşırı kilolu insanlardan alınan mikrobiyotanın, steril koşullarda yetiştirilen mikrobiyotasız farelere aktarımı, kolonizasyonu ile farelerin aşırı yemesi ve yağ depolaması uyarılabilmektedir [147]. Yüksek kalorili dietle beslenen farelerin beyin kesitlerinde hipotalamus ve nukleus akumbens gibi ödül ve tatmin duygusuyla ilgili merkezlerde insülin reseptör sayısı artış göstermektedir. Bu durum yüksek kalorili beslenmenin hem periferal dokularda hem de beyin de insülin direncini tetiklediğini kanıtlamaktadır. Bu farelere antibiyotik uyguladığında mikrobiyota değişimine bağlı olarak insülin direncinin azaldığı ve indüklenen bu değişikliğin fekal transplantasyon ile mikrobiyotasız farede de tekrarlanabilir olduğu çalışmada gösterilmektedir [148]. İntestinal disbiyozis (bağırsak florasındaki dengesizlik) depresyon ve anksiyete ile ilişkilidir. Bu iki semptom, anoreksiya nervosa (AN)'nın komorbid bozukluklarıdır. Bu nedenle mikrobiyota AN patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır [149]. AN'nın akut dönemlerinde alınan insan fekal örneklerin metagenomik analizine göre, deney grubunda kontrol grubuna göre *Bacteroidetes* şubesinde azalma saptanmaktadır [150]. Ayrıca AN'lı bireylerin mikrobiyotasında karbohidrat fermente eden *Firmucutes* şubesine ait belli sınıfların sayısında kontrol grubuna kıyasla azalma kaydedilmektedir. Bu veri AN fekal butirat değerlerinin genellikle düşük saptanmasını da desteklemektedir. Ayrıca gram-negatif bakteri olan *Proteobacteria* komünitesinde ve bağırsak inflamasyonlarıyla ilişki *Enterobacteriaceae* sayısında yüksek miktarda artış kontrol grubu fekal örneklerine kıyasla saptanmıştır [151], [152]. Mikrobiyotanın, beyindeki açlık ve beslenme davranışı merkezleri olan hipotalamusun arcuate nukleus nöronları ve beyin kökündeki nukleus traktus solitarius nöronları üzerinde etkisi vardır. Beyin kökü nukleus traktus solitarius'dan sentezlenen glukagon-benzeri-peptid 1 (GLP-1) obezite baskılayıcı nöropeptid olup, mikrobiyotası olan normal şartlarda yetiştirilen farelerde steril koşullarında büyütülen mikrobiyotasız farelere göre daha yüksek transkript miktarına sahiptir. Bu veri mikrobiyotasız farelerin obeziteye daha dirençli olduğu bulgusuyla korelasyon halindedir [153]. Ayrıca strese bağlı olarak artan nörepinefrin ve dopamin gibi

nörohormonlar, mikrobiyal kompozisyondaki gram-negatif bakterileri arttırmaktadır [154]. Obez mikrobiyota ise bağırsak-bariyer geçirgenliğini arttırmakta ve hem sistemik hem de hipotalamusta hücrel inflamasyona sebep olarak tokluk hormonu olan leptine karşı direnci tetiklemektedir [155]. Obez mikrobiyotanın tetiklediği bağırsak-bariyerindeki geçirgenliğe bağlı olarak mikrobiyal yapıların lümenine geçmesi kolaylaşmakta ve inflamatuvar yanıt kaskadını başlatmaktadır. Üretilen pro-inflamatuvar sitokinler ve prostaglandinler HPA aksını başlatıcı güçlü araçlardır. İnflamasyon, disbiyozis, yüksek kortizol değerleri obezite ve yeme bozuklarının belirgin komorbid bozukları olup, veriler, mikrobiyotanın immun ve nöroendokrin etkileşimler aracılığıyla bu hastalıkların patofizyolojisinde etkin rol oynadığını göstermektedir [156], [157].

#### **4.3.4. Bağırsak Mikrobiyotası ve rTMS Tedavisi'nin Obeziteyle İlişkisi**

Yapılan fMRI (fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme) çalışmalarına göre, obez bireylerde, yüksek-kalorili besinlerin fotoğraflarına karşı DLPFC'de oluşan aktivasyon normal kilodaki bireylere kıyasla daha düşüktür [158]. Gastrik bypass operasyonu sonrası kilo verme sürekliliği yüksek olan grup incelendiğinde, DLPFC aktivasyonunun daha yüksek olduğu saptanmaktadır [159]. Obezite ve birçok psikiyatrik bozuklukta prefrontal korteks abnormallikleri ve HPA aksı disfonksiyonu beraber bulgulanmaktadır [88], [160]. Prefrontal beyin bölgelerinin ve hipokampusün, HPA stres aksının regülasyonunda etkin olmasının en önemli basamağı bu beyin bölgelerinde kortikosteroid reseptörlerin bolca üretilmesine bağlı olarak kortizol etkisine hücrel seviyede maruz kalmalarıdır [161]. Bununla beraber, mikrobiyota çalışmaları göstermektedir ki, steril koşullarda mikrobiyotasız olarak yetiştirilen farelerde, prefrontal alanlarda ve hipokampal bölgede üretilen glukokortikoid reseptör sayısı normal farelere kıyasla daha düşüktür. Bu veri, mikrobiyotanın stres aksında önemli derecede rol oynayan glukokortikoid reseptörlerinin ekspresyonu üzerine baskın etkisini göstermektedir [162]. Aynı şekilde sterik koşullarda yetiştirilen hayvanların strese karşı oluşturdukları yüksek kortizol üretimi ve abartılı HPA aksı yanıtı, normal farelerin mikrobiyotasıyla kolonize edildiklerinde normale dönmektedir [163]. Bu bilgiler, mikrobiyotanın stres ile indüklenen HPA aksının regülasyonundaki baskın rolünü kanıtlamaktadır.

Ayrıca; obezite ve yeme bozukluklarında görülen baskılayıcı prefrontal nöronal mekanizmalardaki bozukluklara; HPA aksı disregülasyonuna bağlı olarak değişen inflamatuvar sitokin seviyeleri ve büyük ölçüde mikrobiyota ile ilişkili bağırsak hormonlarındaki düzensizlikler de büyük etmendir [164]. Birçok vaka raporları, yeme bozuklukları (AN, BN) ve obezite tedavisinde DLPFC'ye rTMS uygulamasının görülen semptomları hafiflettiğini göstermektedir [7], [76]. Bu hastalık grubunda ortak olarak bulgularanan aşırı aktif HPA aksı komorbid bozukluğunun tedavisine yönelik DLPFC hedefli rTMS uygulaması klinikte büyük çoğunlukla kortizolü düşürerek olumlu sonuçlar göstermektedir [81], [94], [165]. Yeme bozukluğu olan hastalarda, YF-rTMS uygulaması sonrası hastaların aşırı yeme nöbetleri hafiflemektedir. Her ne kadar rTMS mekanizması tam olarak bilinmese de olası etki, HPA aksı üzerinden kortizolün düşmesine bağlı olabileceği gibi BDNF artışına bağlı olarak da gerçekleşebilmektedir [166]. TMS'nin BDNF'i arttırdığı ve BDNF'in de iştah kontrolünden sorumlu hipotalamus üzerinde anoreksijenik etkisi bilinmektedir [167], [168].

Bağırsak kommensal bakterilerinin ürettiği kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) asetik asit, propiyonik asit ve butirik asit, mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenindeki iletişimde önemli araçlardır. KZYA, histon deasetilaz inhibitörleri olarak etki etmektedirler ayrıca G-protein eşlenikli serbest yağ asidi reseptörleri aracılığıyla birçok metabolik yolda yer alırlar. Propiyonik asit, portal ven nöronlarının üzerinde bulunan FFAR3 reseptörleri aracılığıyla, glukoz metabolizması ve kilo dengesi üzerinde etkili olmaktadır [169]. Ayrıca *in vivo* çalışmalar propiyonik asitin, GABA ( $\gamma$ -aminobutirik asit), indolamin serotonin (5-hidroksi triptamin, 5-HT) ve dopamin seviyelerini düşürdüğünü göstermektedir. KZYA'leri, dopaminden noradrenalin sentezleyen enzim, dopamine- $\beta$ -hidroksilaz'ın aktivitesini azaltmaktadır. Mikrobiyota metabolitleri olan KZYA'leri beyin fizyolojisi, duyu durum ve metabolizma üzerinde oldukça etkilidir. Şekil (4.3.4.1) [170], [171].

Obezite patofizyolojisinde inflamasyonun sebebi olarak gösterilen metabolik endotoksemi sorunu, gram-negatif bakterileri LPS (Lipopolisakkarit)'leri ile indüklenmekte, genetik olarak obez ve diyetle obez farelerde bulgulanmaktadır [172]. İntestinal inflamasyon ve bağırsak bariyerinin geçirgenliğine bağlı olarak bakteriyel metabolitler kolaylıkla bağırsak duvarında yer alan sinir uçlarına etki edebilmektedirler. Kronik LPS'ye maruz bırakılan sızıntılı bağırsak bariyerine sahip

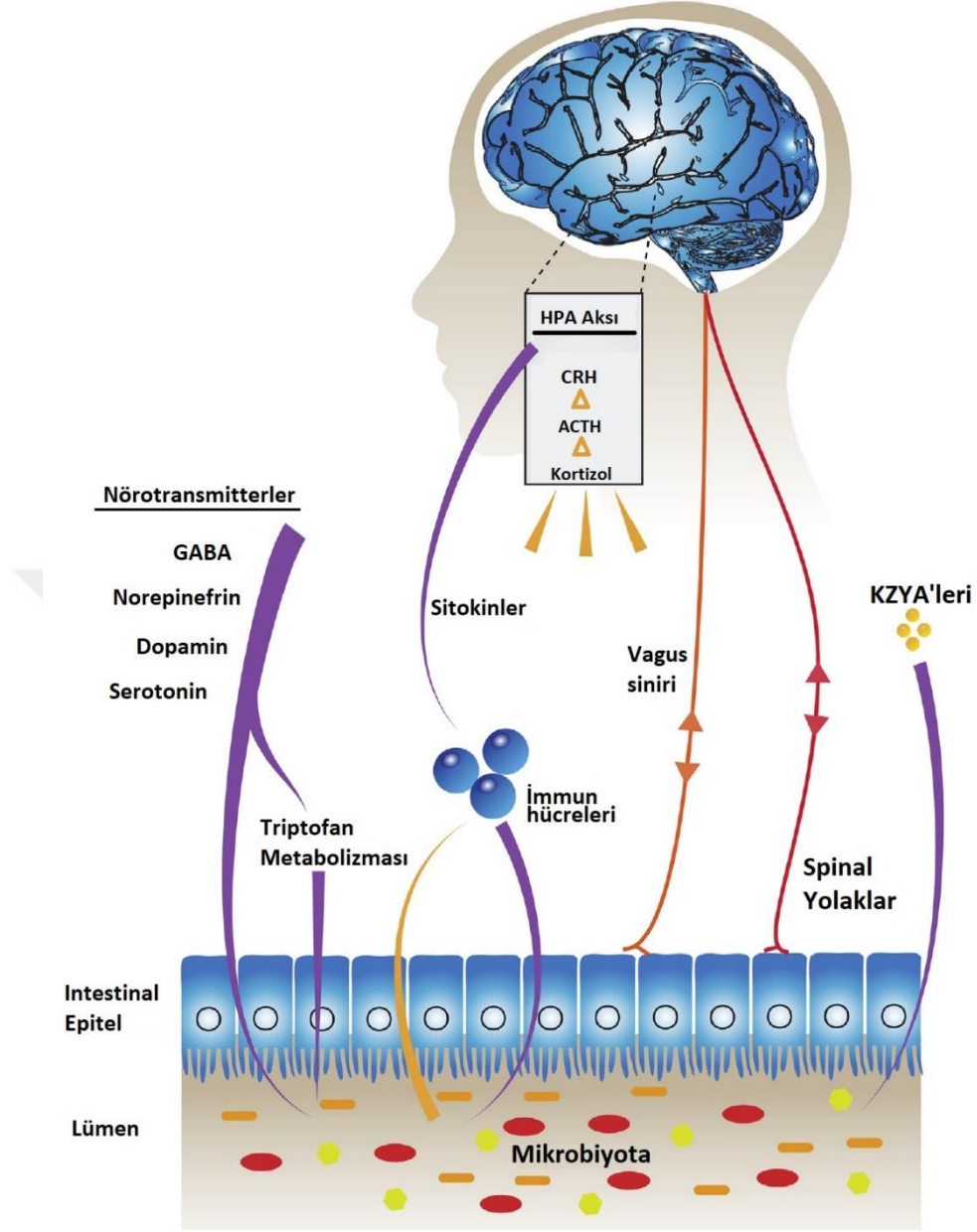
sıçanlarda yeme dürtüsü artmaktadır. Bu sonuçlar, mikrobiyal ürünlerin bağırsak-beyin eksenindeki ve obezite patolojisindeki etkisini göstermektedir. Şekil (4.3.4.1) [173].

Bağırsak mikrobiyotası ve beyin arasında gerçekleşen ve metabolik hastalık, stres veya herhangi bir bozuklukta değişiklik gösteren çift-yönlü aksta, vagus siniri önemli bir iletişim aracıdır. 10.kranial sinir olan vagus, abdominal kaviteden affarent nöronlar ile aldığı bilgiyi beyne ulaştırarak, mikrobiyotanın beyin fizyolojisi ve davranışlar üzerindeki etkinliğine aracılık etmektedir. Örneğin; *Lactobacillus reuteri* probiyotik takviyesine bağlı olarak farelerde beyinden salınan oksitosin miktarı artmakta ve farelere vagotomi yapıldığı takdirde salınım hızla düşüş göstermektedir [174]. Enerji homeostazının nöronal kontrolünde vagal refleksler oldukça kritiktir. Gastrik distansiyon, mukoza lüminal sıvısındaki kimyasallar, ph ve ozmolalite gibi değişkenler vagal affarent nöronlar aracılığıyla algılamakta ve mukozal vili ve kripleri innerve edebilmektedir [175]. 30'a yakın gastrointestinal nörohormon tanımlanmış olup; absorpsiyon, sindirim ve tokluk işlevleri için vagal affrentlere parakrin veya kan dolaşımına katılarak endokrin sinyaller gönderirler [176]. Kolesistokinin (CCK), GLP-1 ve 5-HT dolaşıma katılarak beyin kökündeki vagal duyu ve motor nöronları etkilemektedir. Obez deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalar, CCK peptidine karşı vagal cevap etkinliğinin obez olmayanlara göre daha az olduğunu göstermektedir [177]. Mikrobiyal ürünlerin bağırsak lümenindeki etkinliği vagal mekanizmaları içermektedir. *Citrobacter rodentum* takviyesi farelerde vagal temelli mekanizmalar aracılığıyla anksiyetik davranışları azaltmaktadır. Bu veriler, obezite patofizyolojisinde yer alan stres ve inflamasyon oluşumlarında vagus innervasyonunun, mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenindeki iletişim ağında oldukça etkin olduğunu göstermektedir Şekil (4.3.4.1) [178].

Obezite ve yeme bozukluklarında görülen, beyinde kontrol ve inhibisyondan sorumlu kortikal alanlardaki aktivite düşüklüğü, anksiyetik stres yolağının aşırı etkinliği, inflamasyon ve vagal mekanizma düzensizlikleri gibi bulguları iyileştirme amaçlı rTMS tedavisi klinikte kullanılmaktadır. TMS'nin mekanizması tam olarak çözümlenememiş olsa da obez ve bulimik hastaların çoğunlukla aşırı yeme ataklarının hafiflediği vaka raporlarında belirtilmektedir [179]. Şu ana kadar obez bireylerde rTMS uygulanmasının, ACTH, kortizol ve bağırsak mikrobiyotası değişimine olan



etkisini çalışan sadece bir grup bulunmakla beraber henüz sonuçları yayınlanmamıştır. Literatür verileri, obezite ve yeme bozukları gibi psikiyatrik ve metabolik semptomları içeren bozuklukların, bağırsak mikrobiyotasındaki değişim ve mikrobiyal komünite modifikasyonlarıyla karşılıklı güçlü etkileşimlere sahip olduğunu göstermektedir [146], [180]. Henüz mekanizması aydınlatılmamış olan TMS tedavisinin, kilo değişimi ve mikrobiyota üzerindeki olası etki mekanizmalarının, belirtilen aracı sistemler ile sağlandığı düşünülmektedir. rTMS tedavisine bağlı olarak kilo değişiminde mikrobiyota-beyin-bağırsak aksının olası etki yolları; enterik sinir sistemi aracılığıyla, HPA aksı uyarımına bağlı olarak humoral etkileşimler aracılığıyla, mikrobiyal KZYA'nin etkilerine bağlı olarak, mikrobiyotanın immun hücrelerle olan etkileşimine bağlı olarak veya vagal mekanizmalar vasıtasıyla olabileceği düşünülmektedir. Etki mekanizması ve fizyolojik süreçte diğer sistemler ile etkileşimi henüz aydınlatılmamış olan rTMS uygulamasının farklı frekans şiddetlerinin ve farklı anatomik bölgelere uygulamasının bağırsak mikrobiyomu üzerine etkisini saptamak amacıyla sağlıklı BALB/c fareler kullanılarak tez çalışması gerçekleştirildi.



**Şekil 4.3.4.1.** Bağırsak mikrobiyotası ve beyin aksındaki çift yönlü iletişim mekanizmaları gösterilmektedir. HPA (Hipotalamus-hipofiz-adrenal) aksı, immün hücrelerce indüklenmiş sitokinler, triptofan metabolizması, mikrobiyal metabolitler KZYA (kısa zincirli yağ asitleri) [181].

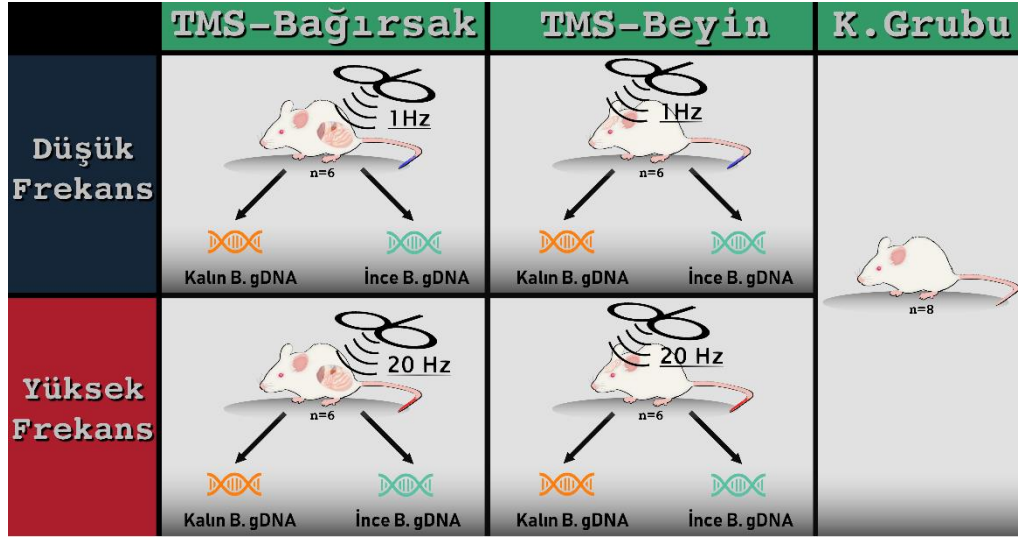
## **5. MATERYAL VE METOT**

### **5.1. Etik Beyan ve Deney Düzeni**

Bu çalışma Eylül-Ekim 2018 tarihleri arasında İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif Ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)'de gerçekleştirildi. Yapılan deneysel çalışma için İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan onay alındı. Araştırmada kullanılan hayvanların biyolojik ritim periyotları 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde düzenlendi. Çalışmada 8-12 haftalık BALB/c fareler rastgele 4 alt deney grubuna ayrıldı. TMS uygulama bölgesine göre beyin ve bağırsak olmak üzere 2 ana grup oluşturularak uygulanan TMS frekansına göre 20 Hz yüksek frekans ve 1 Hz düşük frekans alt grupları belirlenip her bir alt grupta n=6 olacak şekilde gruplandırma yapıldı.

### **5.2. Deney Dizaynı**

Etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış rTMS'nin frekans ve uygulama bölge farklılıklarına bağlı olarak bağırsak mikrobiyotasındaki değişimi saptamak ve normal fizyolojideki etkisini gösterebilmek için herhangi bir hastalık modeli içermeyen sağlıklı BALB/c fareler 4 alt deney grubu ve 1 ortak kontrol grubu olmak üzere rastgele dağıtıldı. Fareler %1'lik izofloran ile anestezi altındayken 10 dk boyunca 1 Hz, 20 Hz rTMS 1 Hz, 20 Hz rTMS uyarımları beyin ve bağırsak bölgelerine uygulandı. Abdominal bölge uyarımında, TMS cihazından çıkan manyetik dalgaları odaklamak amacıyla uygulama bölgesine denk gelecek şekilde üzerinde dairesel açıklık bulunan karton kullanıldı. Sekiz gün devam eden çalışma sonrasında numune toplama işlemi gerçekleştirildi. Deney dizayn görseli Şekil 5.2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 5.2.1. Deney dizaynı şematize edilmektedir.

### 5.3. rTMS uygulaması

Yapılan tez çalışmada sağlıklı BALB/c fareler kullanıldı. Sağlıklı bireylerin tercih edilmesiyle uyarım bileşenlerinin, normal fizyolojik süreçteki etkilerini daha belirgin bir şekilde gözlemleyebilmek hedeflendi. Transkraniyal stimülasyon ve karın bölgesine uygulanan bölgesel uyarım öncesinde sağlıklı BALB/c fareler, %1'lik izofloran (N0015A09, Adeka, Türkiye) (%30 O<sub>2</sub>, kalanı N<sub>2</sub>O) gaz anestezisine tabi tutuldular. Uygulama bobini anestezisi altındaki farelerin uyarılacak bölgeleri hedeflenerek tutuldu. Manyetik uyarım cihazı (Neurosoft, Avm Sağlık) ile yüksek frekans 20 Hz ve düşük frekans 1 Hz şiddetleri toplam 10 dakika süresince 5 sn uyarım ardından 55 sn dinlenme olacak şekilde uygulandı. Kontrol grubu farelere sadece anestezisi verildi ve deney gruplarının uyarı aldığı 10 dakikalık zaman dilimi boyunca benzer şartlar altında uyarım olmaksızın düzenekte bekletildiler. Tüm bu işlemler süresince cihazın sıcaklığı kontrol edilerek optimal derecelerde (28-40<sup>0</sup> C) tutuldu.

### 5.4. Gaita Örneklerinin Toplanması

Ardışık 8 gün boyunca beyin ve karın bölgelerine TMS işlemi alan deney grupları ve kontrol grubu hayvanlar, numune toplama gününde, yüksek doz anestezisi (izofloran) altında dekapite edildi. Steril neşter ve forseps yardımıyla hayvanların

ince bağırsakları ve kalın bağırsakları çıkartıldı ve steril petri kabına koyuldu. Steril forceps yardımıyla bağırsak bölmeleri içinde bulunan dışkılar dikkatlice çıkarıldı ve eppendorf tüpleri içerisinde buza yerleştirildi. Örnek toplama işlemi sırasında kullanılan neşter ve forsepsler her aşamada alkol ve distile su ile steril edildi. Gaita örneklerini içeren eppendorf tüpleri, etiketlenip parafilmle kapatılarak DNA izolasyonu yapılana kadar –80 derecede soğutucuda muhafaza edildiler.

### 5.5. Genomik DNA İzolasyonu

Hayvanların bağırsak bölmelerinin içerisinde steril koşullar altında çıkarılan dışkı örnekleri, 16 S rRNA mikrobiyota analizi yapılmak üzere öncelikle gDNA izolasyonuna tabi tutuldular. İnce bağırsak ve kalın bağırsak gaita örneklerinin DNA İzolasyonu, ticari kit kullanmadan laboratuvarında geliştirdiğimiz Fenol/Kloroform/İzoamil alkol 25:24:1 (V: V: V) protokolüyle yapıldı. Yaklaşık 100 mg dan düşük miktardaki fekal örnekler, 250 µL otoklavlanmış 0.1 mm çapında zirkonyum boncuk içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Gaita örneklerini içeren zirkonyumlu tüplere 210 µL %20 SDS ve 500 µL Lizis Tamponu (0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 0.1 M NaCl) eklendi ve 0.5-2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Bead-Bug homojenizatörde 3'er defa 300 Hz'de 30 saniye mekanik parçalama ile homojenize edilen örnekler işlem aralarında 30 saniye buzda tutuldu. Örnekler, 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Supernatant 200 µL hacim ile temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı, üzerine 500 µL Lizis Tamponu ve 20 µL RNase (5 mg/ml) eklenerek 37°C'de 1 saat bekletildi. Süre sonunda, 10 µL Proteinaz K çözeltisi eklenir ve 55°C'de en az 2 saat bekletildi. Üzerine eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil eklendi ve karıştırıldı. 13.000 rpm'de, 10 dakika santrifüjlendi. Üst fazdan 200 µL hacimli sıvı temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil karışımı eklenerek karıştırıldı. 13.000 rpm'de, 15 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı fazdan dikkatli bir biçimde 180 µL alındı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne eklendi. Alınan üst sıvı hacmine eşit miktarda (1:1) 180 µL izopropanol ve (1:10) 18 µL 3M sodyum asetat eklendi. DNA çökmesi için örnekler buzlukta (-20 derecede) en az bir saat bekletildi. Soğuk inkübasyonun ardından DNA 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra çökelti üzerine 500 µL soğuk %96

etanol eklenerek DNA yıkanır. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Sıvı uzaklaştırıldı, 500 µL soğuk %70 etanol eklendi. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Sıvı döküldü, kalan alkolün uzaklaştırılması için öncelikle, tüpler ağzı açık durumda 13.000 rpm'de 2-3 dakika santrifüjlendi ve küçük hacimli pipet yardımıyla sıvı çekildi. Alkolün tamamen uzaklaştırılması için havalandırma işlemi, kabinde ışık altında, tüpler ağızları açık biçimde 10 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Çökelti üzerine 50 µL TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) eklendi ve ısıtıcıda 65°C'de 6 dakika bekletilerek DNA çözündürüldü. Örnekler çalışma süresince -20 derecede saklandı.

### **5.6. DNA'nın Analizi ve Konsantrasyon Ölçümü**

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların miktar tayini için Qubit dsDNA HS (high sensitivity) kiti kullanıldı. Florometrik temele dayanan bu yöntemde, çift zincirli DNA moleküllerine seçici olarak bağlanabilen konsantre halde reaktif boyar madde, 1:200 oranıyla kitin içinde yer alan HS Tamponu ile seyreltildi ve ölçüm solüsyonu hazırlandı. Kitin içinde yer alan önceden seyreltilmiş standartlar 0.0 ng/ µL ve 10 ng/ µL konsantrasyonlara sahip olup hazırlanan ölçüm solüsyonuna 10 µL hacminde eklendi. Örnek ve standart ölçüm tüplerinin toplam hacmi 200 µL olarak belirlendi ve örneklerden 3 µL eklenerek miktar tayini gerçekleştirildi. Solüsyon içindeki reaktif boyanın DNA'ya tam olarak bağlanmasını sağlamak için tüpler, ölçüm cihazına yerleştirilmeden oda sıcaklığında 3-4 dakika bekletildi. Ölçüm tüpleri, Qubit 2.0 cihazında okutuldu ve sıvı içindeki DNA konsantrasyonu ng/ µL cinsinden tayin edildi.

### **5.7. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması**

İzolasyon işleminin ardından konsantrasyon ölçümü yapılan DNA örnekleri, 16S rRNA dizinleme çalışması için çoğaltılmak üzere polimeraz zincir reaksiyon (PCR) işlemine tabi tutuldular. PCR, spesifik DNA bölgesinin uygun primerler

tarafından yönlendirilerek *in vitro* 'da enzimatik olarak çoğaltılması olup, bu çalışmada 30 PCR döngüsüyle hedef dizi artışı gerçekleştirildi. PCR bileşenleri, 12.5 µL 2x KAPA-HiFi HotStart ReadyMix, 0,5 µL 341f primer1, 0,5 µL 805r primer2 ve 20 ng/ul başlangıç kalıp DNA miktarı olacak şekilde her bir örnekten konsantrasyonlarına uygun miktarda eklendi, toplamda 25 µL hacim olacak şekilde kalan miktar distile su ile tamamlandı. Kullanılan primerler 341f primer1 (CCTACGGGNGGCWGCAG) ve 805r primer2 (GACTACHVGGGTATCTAATCC) olup seçilme sebepleri fekal örnek mikrobiyomunun 16S rRNA yüksek-değişken V3-V4 gen bölgelerinin çoğaltılmasına uygunluk göstermeleridir. PCR işlemi tablo 5.7.1'de açıklanan protokol seçilerek uygulandı. 30 döngü sonunda PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. PCR döngüleri sırasında oluşan primer dimerlerinin temizlenmesi amacıyla, Agencourt AMPure XP kiti kullanılarak DNA purifikasyonu yapıldı.

**Tablo 5.7.1.** PCR protokolü

95°C	3 dk	
95°C 55°C 72°C	30 sn 30 sn 30 sn	30 döngü
72°C	5 dk	

## 5.8. Sekanslama İşlemi, Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma

### 5.8.1. Kütüphane Miktarının Belirlenmesi ve Örnek Havuzunun Hazırlanması

AMPure XP ile purifiye edilen örnekler, Qubit 2.0 fluometrik cihaz ile DNA konsantrasyon ölçüm işlemine tabi tutuldu. Her bir örnek, dizinleme protokolünde optimal konsantrasyon değeri olan 4 nM DNA molekülü içerecek şekilde, 1.66 ng/μL konsantrasyon değeri hedeflenerek dilüe edildi. Her bir dilüsyondan 5 μL alındı, boş bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirilerek örnek havuzu hazırlandı oldu. Hazırlanan havuzun, DNA dizinleme kütüphanesinin, DNA konsantrasyonu Qubit 2.0 ile 1,75 ng/μL değerinde ölçüldü. Formül yardımıyla havuzun kaç nM DNA'ya karşılık geldiği hesaplandı.

$$\frac{\text{konsantrasyon ng/}\mu\text{L}}{660 \text{ g/mol} \times \text{kütüphane baz uzunluğu}} \times 10^6 = \text{nM düzeyinde konsantrasyon}$$
$$\frac{1,75 \text{ ng/}\mu\text{L}}{660 \text{ g/mol} \times 630} \times 10^6 = 4,2 \text{ nM}$$

### 5.8.2. Kütüphanenin Denatürasyonu ve MiSeq Cihazına Yüklenmesi

4 nM'a dilüsyon ile hazırlanan DNA kütüphanesinden Qubit konsantrasyon ölçümü sonrasında 5 μL ve 0,2 M NaOH'den 5 μL alınarak mikrosantrifüj tüpünde birleştirildi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek DNA'nın denatürasyonu sağlandı. Denatüre edilmiş DNA çözeltisinden 10 μL, HT1 Hibridizasyon çözeltisinden 990 μL eklenerek hazırlanan yeni mikrosantrifüj tüpü vortekslendi. Belirtilen oranlarda ekleme yapılarak 20 pM konsantrasyonunda DNA kütüphanesi elde edildi. Bu değer 12 pM'a eşitleyebilmek için 360 μL DNA kütüphanesinden, 240 μL HT1 Hibridizasyon çözeltisinden eklendi. 12 pM derişime sahip DNA havuzuna 12,5 pM PhiX kütüphanesinden 120 μL eklendi ve hazırlanan kütüphane MiSeq dizinleme cihazına yüklendi.



### 5.8.3. Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma

Ham okumaların analiz işleminden önce cutadapt programı ile dizinlerdeki primer bölgeleri kesildi [182]. Ardından MG-RAST boru hattına aktarılıp karşılıklı okumalar (pair-end) birleştirildi ve verilerden ortalama kalite skorunun altında kalanlar ve uzunlukları 450 bp üzerinde olan okumalar dışlandı. Çift-sonlu okumaların birleşmesi ile operasyonel taksonomik üniteler (OTU) oluşturuldu [183].

Boru hattından OTU tablosu elde edildikten sonra, mothur (v.1.39.5) programına entegre UCHIME (v.4.2) programıyla tekrar kimerik okumalar tarandı [184]. Cins seviyesinde sınıflandırılmayan okumalar bir üst sınıflandırma hiyerarşisine dahil edildi.

Alfa çeşitlilik analizi için Shannon, Chao1 ve Gözlemsel OTU (Observed OTU) indisleri kullanıldı. Bu 3 analizde, gruplara ait OTU sayılarının değişimleri karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz Kruskal Wallis testi kullanılarak yapıldı.

### 5.8.4. Topluluk Yapılarının ve Çeşitliliğinin Çok Değişkenli Analizi

Beta çeşitlilik, örnek gruplarının içeriklerinin birbirlerine olan uzaklıklarının karşılaştırılmasıdır. Beta çeşitlilik analizi için Bray-Curtis benzerlik indisi ve JACCARD, indisleri örneklerdeki mikrobiyota benzerliklerinin birbirine olan uzaklıklarını göstermek için kullanıldı.

DESeq2 analizi ile gruplardaki göreceli bakteri taksonomileri arasındaki farklılıklar araştırıldı [185]. Microbiome Analyst programı kullanılarak DESeq2 analizi sonuçları ısı haritaları, filum korelasyon, LEfSe, Random Forest sınıflandırmaları elde edildi [186].

## 6. BULGULAR

### 6.1. Kilo Değişimi Verileri

Çalışmada rTMS uygulamasına tabi tutulan deney grubu ve kontrol grubu hayvanların kiloları 6 gün boyunca ölçüldü. Elde edilen ham kilo değişim verileri öncelikle Excel üzerinde standardize hale getirildi ve bu değerler üzerinden istatistik testler uygulandı. Grupların tanımlayıcı istatistiği olan, ortalama ve standart sapma verileri Tablo 6.1.1’de gösterilmektedir. Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi (One-way Anova) kullanıldı. Birinci ve altıncı gün tartımı arasındaki kilo değişim farkından anlamlı sonuç elde edilmiştir (Tablo 6.1.2).

Tablo 6.1.1 Grupların Tanımlayıcı İstatistiği

Grupların Tanımlayıcı İstatistiği			
	N	Ortalama	Standart Sapma
Fark 1_6 TMS Karın- (1 Hz)	6	-,2600	2,65224
TMS Karın- (20 Hz)	6	-1,3167	1,42273
TMS Beyin- (1 Hz)	6	-3,8567	3,22010
TMS Beyin- (20 Hz)	6	,5800	,69253
Kontrol	7	1,6229	3,33219
Total	31	-,5729	3,03582

Tablo 6.1.2 Kilo değişimi Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova) Testi

#### ANOVA

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F	P
Fark 1_6 Gruplar Arası	110,330	4	27,582	4,316	,008*
Grup içi	166,157	26	6,391		
Total	276,487	30			

P<0,05 anlamlı kabul edildi.

İkili karşılaştırmalar için Çoklu Karşılaştırma Testi (Post-hoc) kullanıldı. Varyansların homojenliği için Levene Testi kullanıldı. Buna göre birinci ve altıncı gün kilo değişim farkının homojen olduğu saptandı (Tablo 6.1.3). İkili testler varyansın homojenitesine göre seçildi. Buna göre; LSD (Least Significant Difference) testi kullanıldı.  $P < 0,05$  anlamlı kabul edildi (Tablo 6.1.4).

Tablo 6.1.3 Varyansın homojenlik testi, Levene İstatistik Testi.

Varyansların Homojenliği Testi				
	Levene İstatistik	df1	df2	P
Fark 1_6	1,281	4	26	,303

$P < 0,05$  anlamlı kabul edildi. Test sonucuna göre varyansın homojen olduğu saptandı.

Tablo 6.1.4 LSD (Least significant difference) Testi

Bağlı Değişken	(I) grup	(J) grup	Ortalama	
			Farkı (I-J)	P
	Kontrol	TMS Karın- (1 Hz)	1,88286	,192
		TMS Karın- (20 Hz)	2,93952*	,047
		TMS Beyin- (1 Hz)	5,47952*	,001
		TMS Beyin- (20 Hz)	1,04286	,465

\* $P < 0,05$  gruplar arasındaki farkın anlamlılığını göstermektedir.

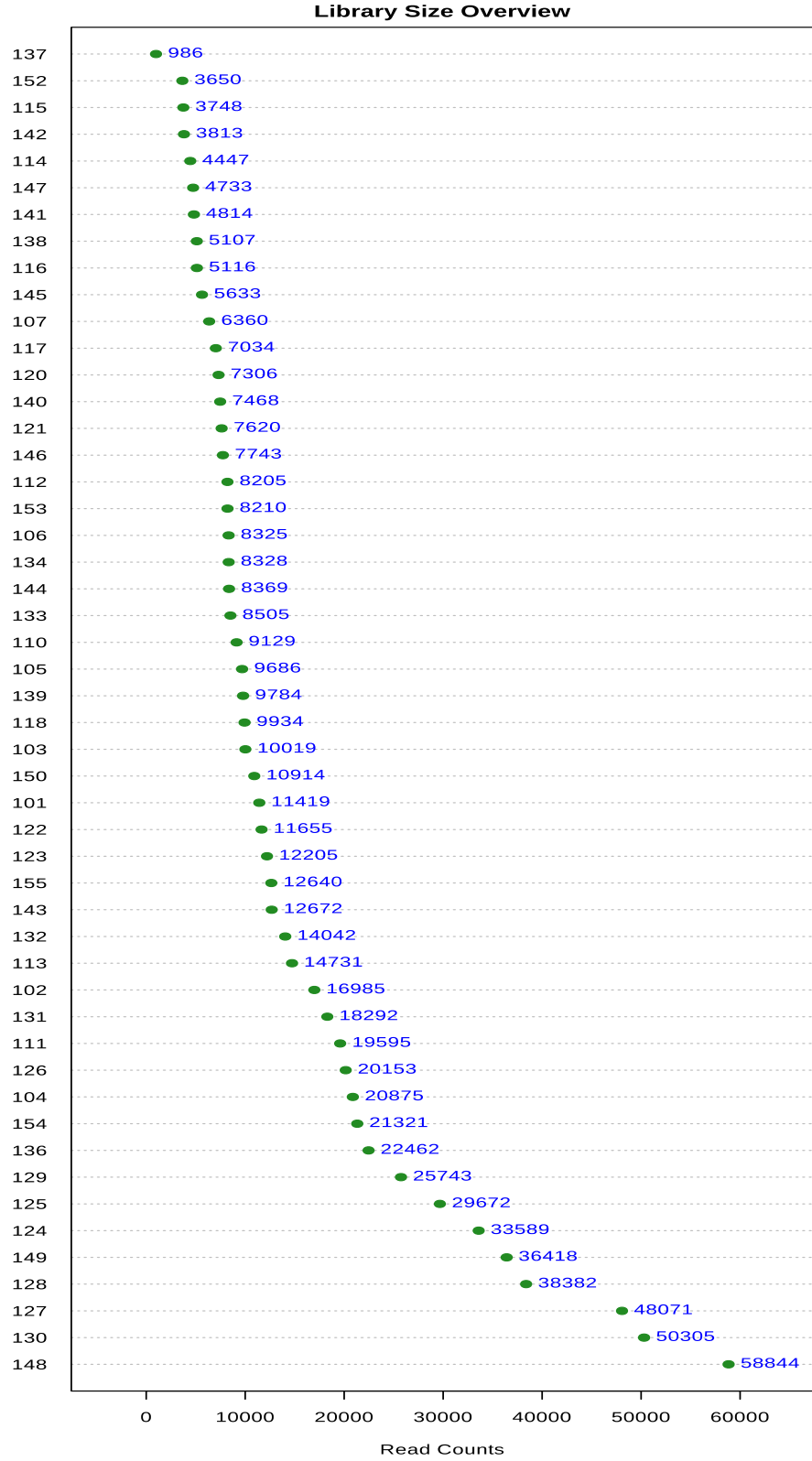
Elde edilen sonuçlar, rTMS'nin beyin ve bağırsak bölgelerine uygulanması sırasında 6 günlük zaman diliminde deney gruplarındaki hayvanların kilo değişimlerini  $p < 0,05$  seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı göstermektedir. Grupların birbirleriyle karşılaştırıldığı LSD testi sonuçlarına göre TMS Beyin-Mavi (1 Hz) grubundaki kilo değişimi; TMS Bağırsak (1 Hz), TMS Beyin (20 Hz) ve kontrol gruplarına göre  $P < 0,05$  kuvvetinde istatistiksel olarak anlamlıdır. TMS Beyin-Mavi (1 Hz) grubunda belirtilen

zaman dilimi süresince TMS uygulamasına bağı olarak kilo ortalamasında  $3,8567 \pm 3,22$  gram azalma saptanmaktadır. Bununla beraber, TMS'nin beyin bölgesine 20 Hz uygulandığı deney grubunda, TMS Beyin-Mavi (1 Hz) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak elde edilen kilo değişim sonucu  $P < 0,05$ , kilo ortalamasının  $0,58 \pm 0,69$  gram artmasıyla bulgulanmaktadır. TMS Bağırsak-Kırmızı (20 Hz) grubundaki kilo değişimi grup içi ağırlık ortalamasının  $1,3167 \pm 1,42$  gram azalması yönünde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç göstermektedir  $P < 0,05$ . Ancak elde edilen bu sonuç, daha yüksek miktarda grup içi ortalama kilo kaybının ( $3,8567 \pm 3,22$  gram) gözlemlendiği TMS Beyin-Mavi (1 Hz) grubuna göre daha az miktarda olup, beyne 20 Hz TMS uygulamasının kilo değişkeni üzerinde beyne 1 Hz uygulanmasına göre daha düşük seviyede etki ettiğini göstermektedir.

## **6.2 Biyoinformatik Analiz Verileri**

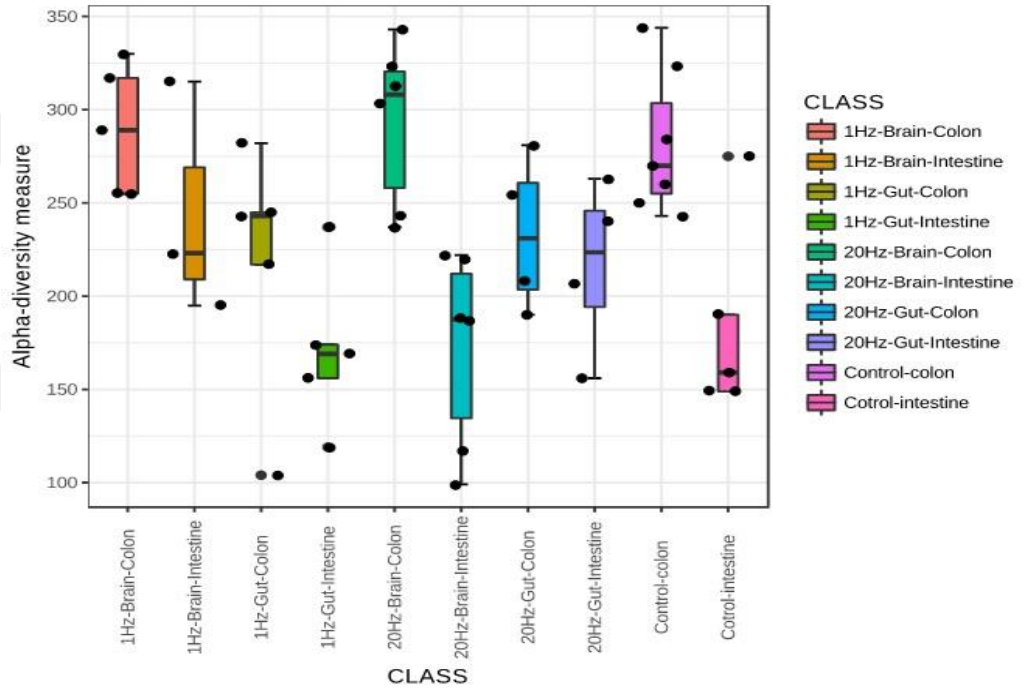
Bağırsak mikrobiyotasının ele alındığı bu tez çalışmasında V3-V4 hedefli uygun primer setleriyle çalışıldı ve ileri nesil dizinleme platformunda, Illumina MiSeq cihazında 986 ile 58,844 arasında okuma sayısı elde edildi (Tablo 6.2.1).

Tablo 6.2.1. Miseq cihazına yüklenen örneklerden elde edilen 16S rRNA dizin sayısı tablosu.

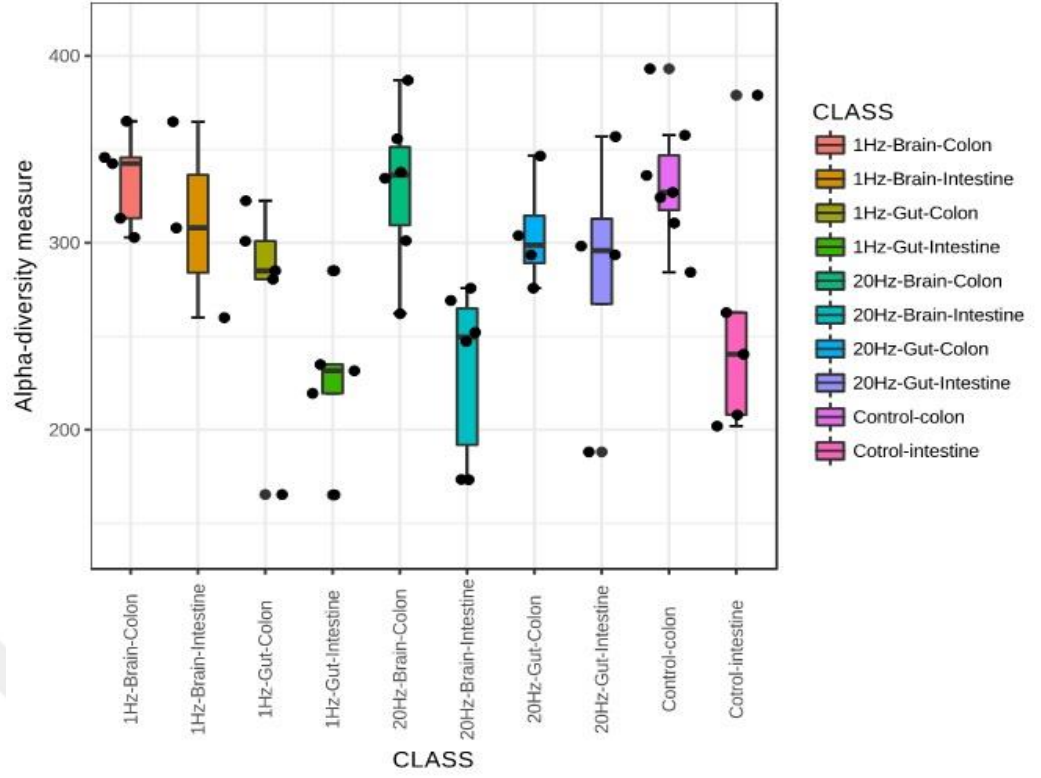


## 6.2.1 Alfa Çeşitlilik Analizi

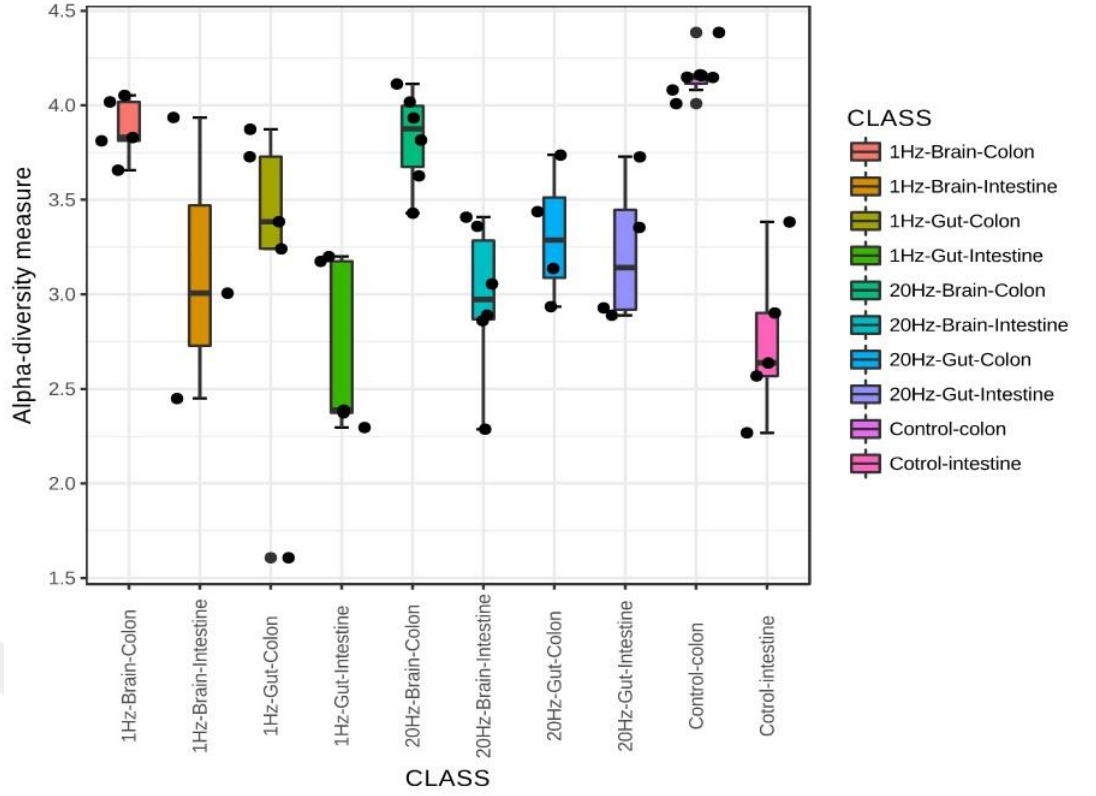
Çalışma örneklerinin sekansından elde edilen görünür çeşitlilik karşılaştırmalı kutu grafiği şekil 6.2.1.1’de gösterilmektedir. Farklı indeksler kullanılarak elde edilen grupların karşılaştırmalı alfa çeşitlilik grafikleri; Chao1 indeksiyle Şekil 6.2.1.2’de ve Shannon indeksiyle gösterimi Şekil 6.2.1.3’de yer almaktadır.



Şekil 6.2.1.1 Gruplara ait alfa çeşitlilik analizi (Observed OTU indeksi).



Şekil 6.2.1.2 Chao1 indeksiyle hesaplanan çeşitlilik analiz (Chao1)

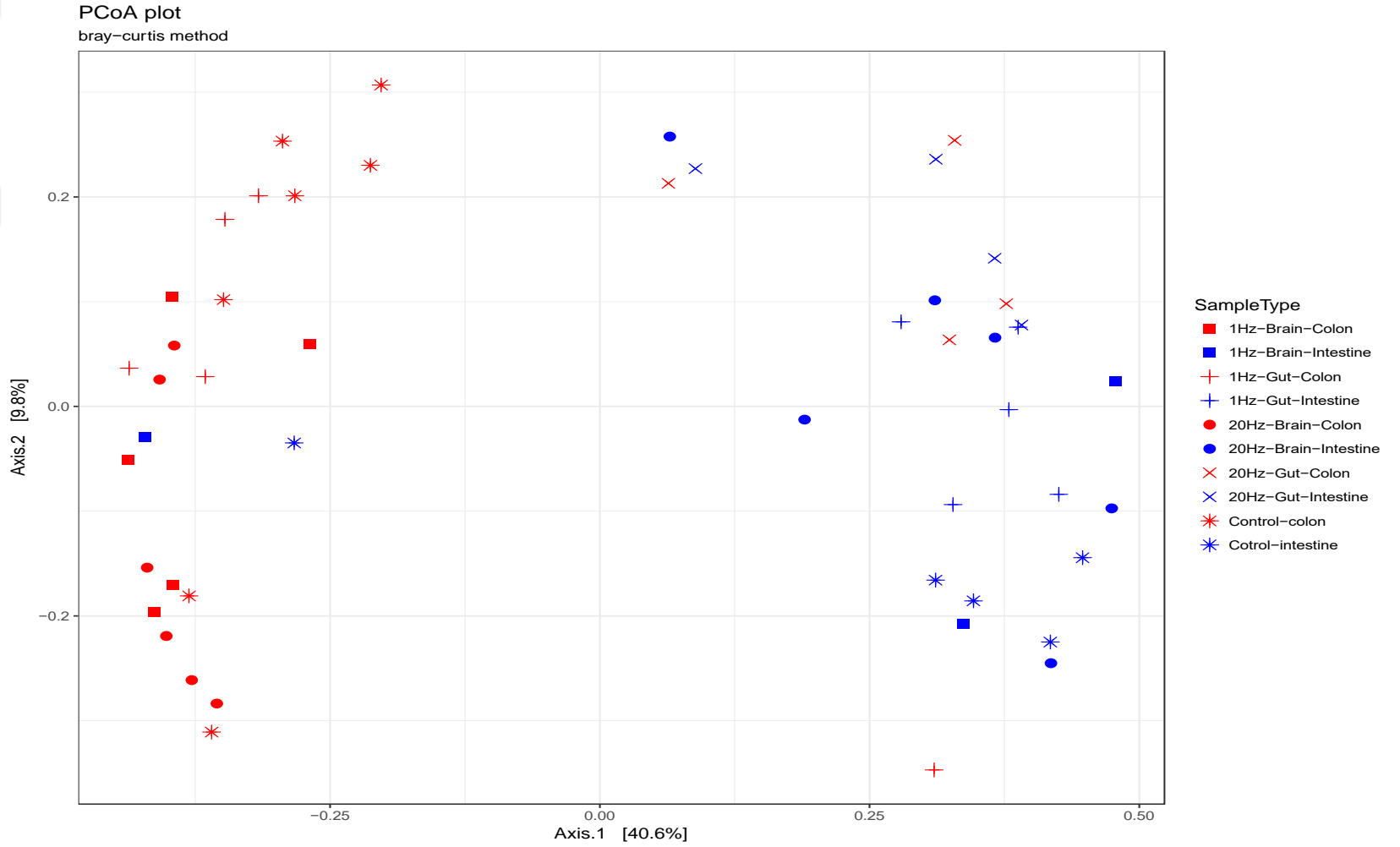


Şekil 6.2.1.3 Shannon indeksiyle elde edilen alfa çeşitlilik analizi

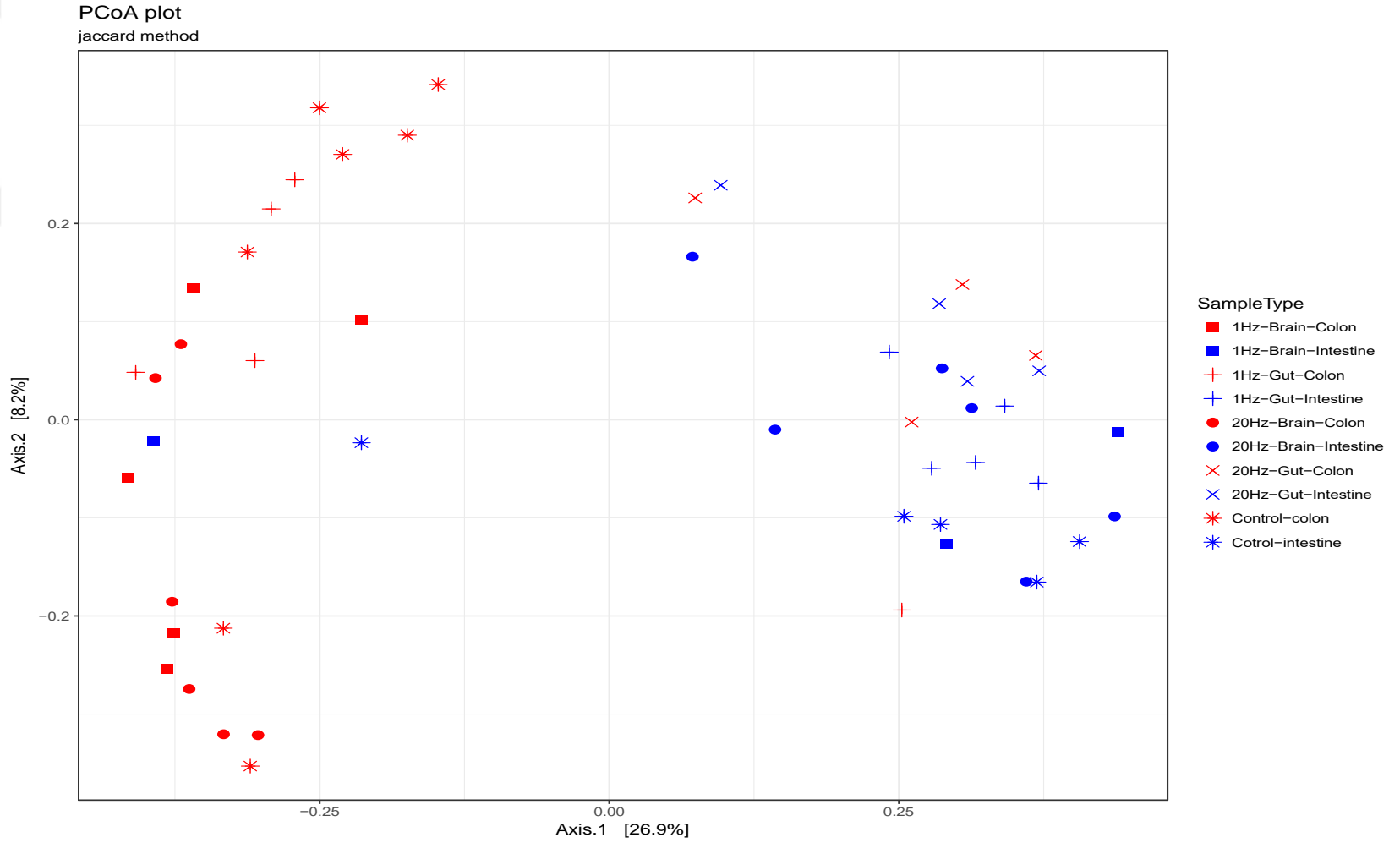
### 6.2.2. Beta Çeşitlilik Analizi

Gruplardan toplanan örneklerin birbirleriyle karşılaştırılmasında beta çeşitlilik ölçümü kullanılır. Bray-curtis ve Jaccard metodlarıyla analiz edilen grafikler sırasıyla şekil 6.2.2.1 ve şekil 6.2.2.2’de gösterilmektedir. Beta çeşitlilik analizleri sonucunda; kalın ve incebağırsak fekal örnekleri mikrobiyal çeşitliliğin, TMS-karın 20 Hz grubu üyeleri dışında, diğer deney gruplarında korunduğu bulguları ve literatüre uygunluk göstererek bağırsak kompartmanlarına özgün mikrobiyota yapılanması görüldü.





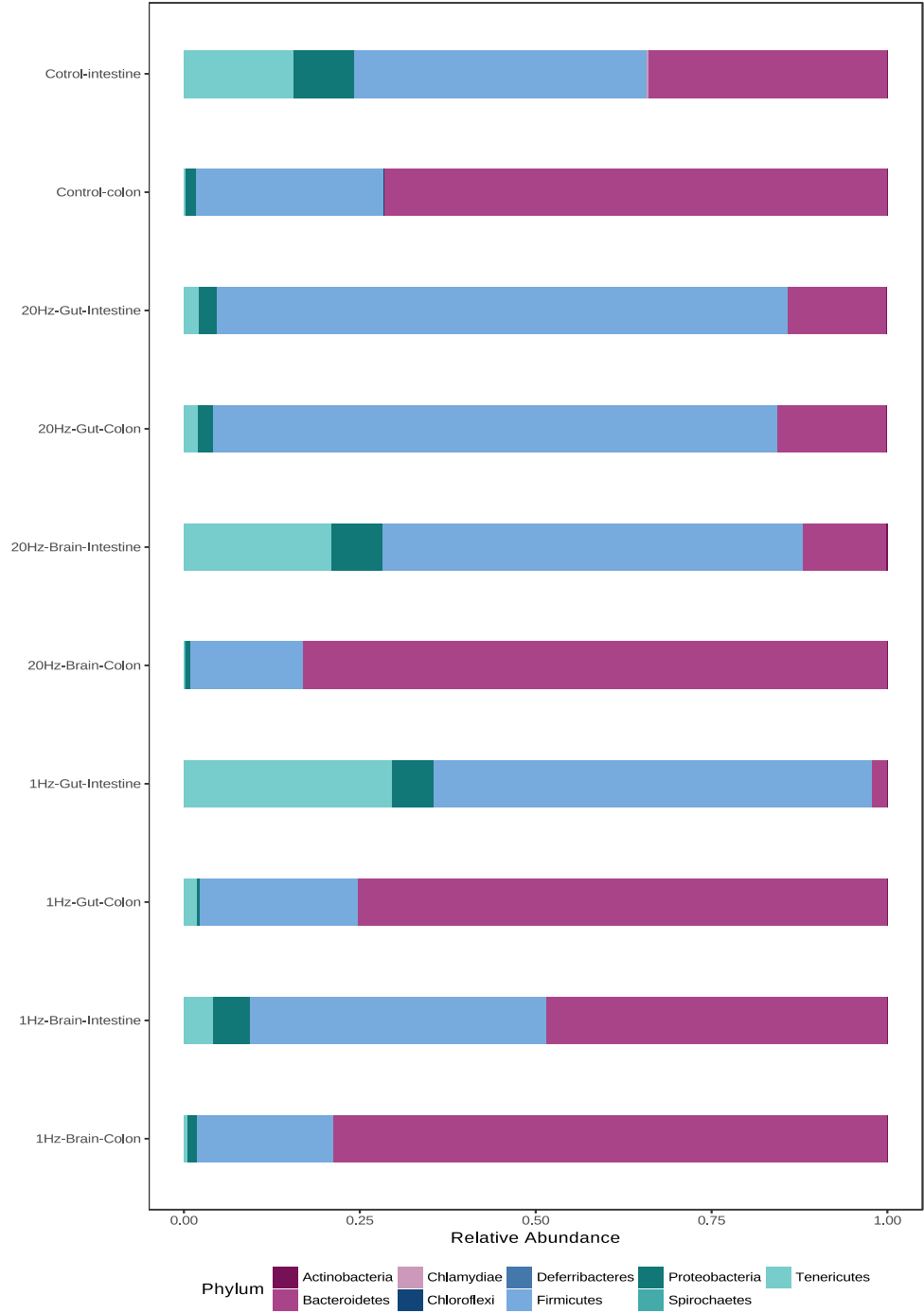
Şekil 6.2.2.1 Bray-curtis indisiyle hesaplanan gruplar arası karşılaştırmalı beta çeşitlilik analiz grafiği.



Şekil 6.2.2.2 Jaccard indisi temel alınarak hesaplanan gruplar arası mikrobiyal kommuniteler arasındaki farklılıkların gösterildiği beta çeşitlilik grafiği

### 6.2.3. Taksonomik Çeşitlilik

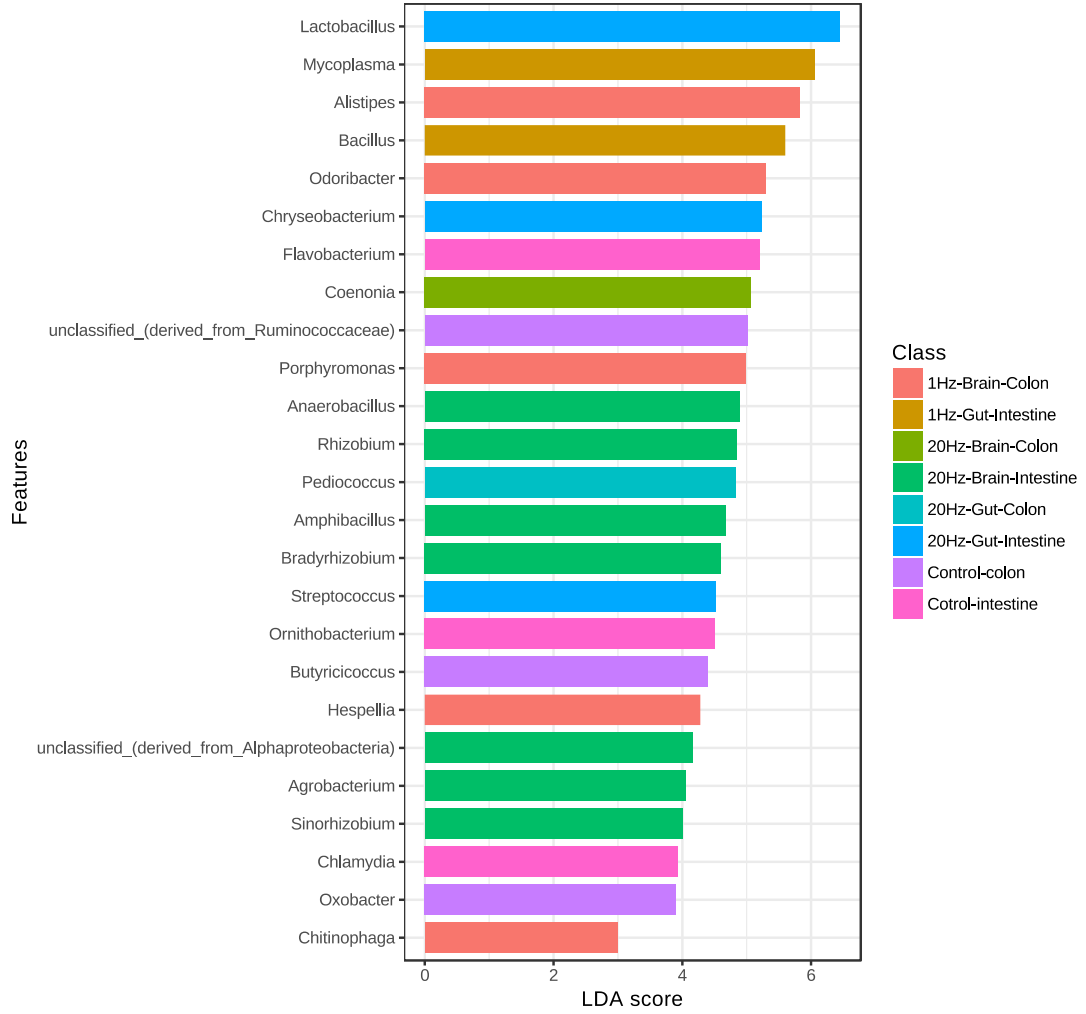
Gruplardan alınan örneklerdeki göreceli taksonomik çeşitlilik grafiği şekil 6.2.3.1’dedir. Grafikte mikrobiyal gruplar filum seviyesinde gösterilmektedir.



Şekil 6.2.3.1 Gruplara ait taksonomik filum grafiği.

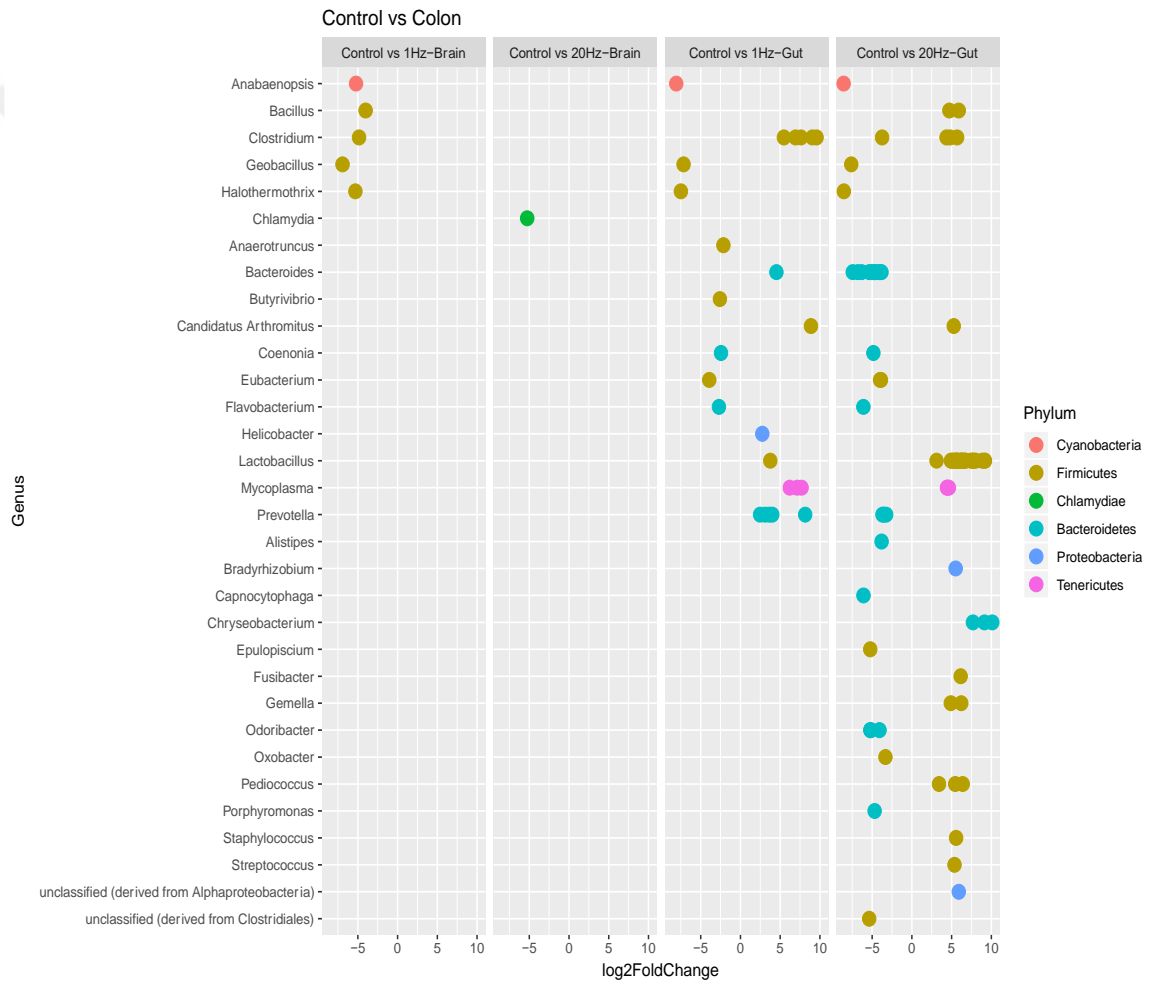
20 Hz TMS-karın uygulamasına bağlı olarak kolon ve ince bağırsak mikrobiyal kompozisyonunda benzeşme görüldü, kontrol gruplarına göre mikrobiyal kompozisyonda dengesizlik saptandı. TMS-karın 20 Hz kolon grubunda, kontrol kolon grubuna göre *Firmucutes* filumunda artış; *Bacteroidetes* filum üyelerinin miktarında ise azalma bulguları. TMS-beyin 1 ve 20 Hz kalın ve incebağırsak örnek grupları ve TMS-karın 1 Hz kalın ve incebağırsak grubunda kontrol gruplarıyla benzer mikrobiyal kompozisyon görüldü.

Gruplara ait LDA (Linear discriminant analysis) skor haritası Şekil 6.2.3.2’de gösterilmektedir. LDA analizi, deney gruplarındaki mikrobiyotalar arasında yoğunluğu farklılık gösteren bakteri gruplarının cins seviyesinde gösterimdir.



Şekil 6.2.3.2. LDA skor grafiği.

LDA skor analizi sonucunda, TMS-karın 20 Hz grubu incebağırsak örneklerinde *Lactobacillus* cinsi kontrol incebağırsak örneklerine göre çok daha yüksek miktarda saptandı. Ayrıca *Bacteroidetes* filumuna ait *Alistipes* cinsi TMS-beyin 1 Hz’de diğer gruplara göre daha yüksek miktarda görüldü. TMS-karın 20 Hz grubunda, diğer gruplar ve kontrol grubuna göre *Streptococcus* cinsi incebağırsata daha yüksek miktarda bulgularlandı. Deney gruplarının, kontrol grubuna göre belirgin olarak öne çıkan filumlarının gösterildiği DESeq2 (log2 fold change) explanation grafiği şekil 6.2.3.3’de gösterilmektedir.

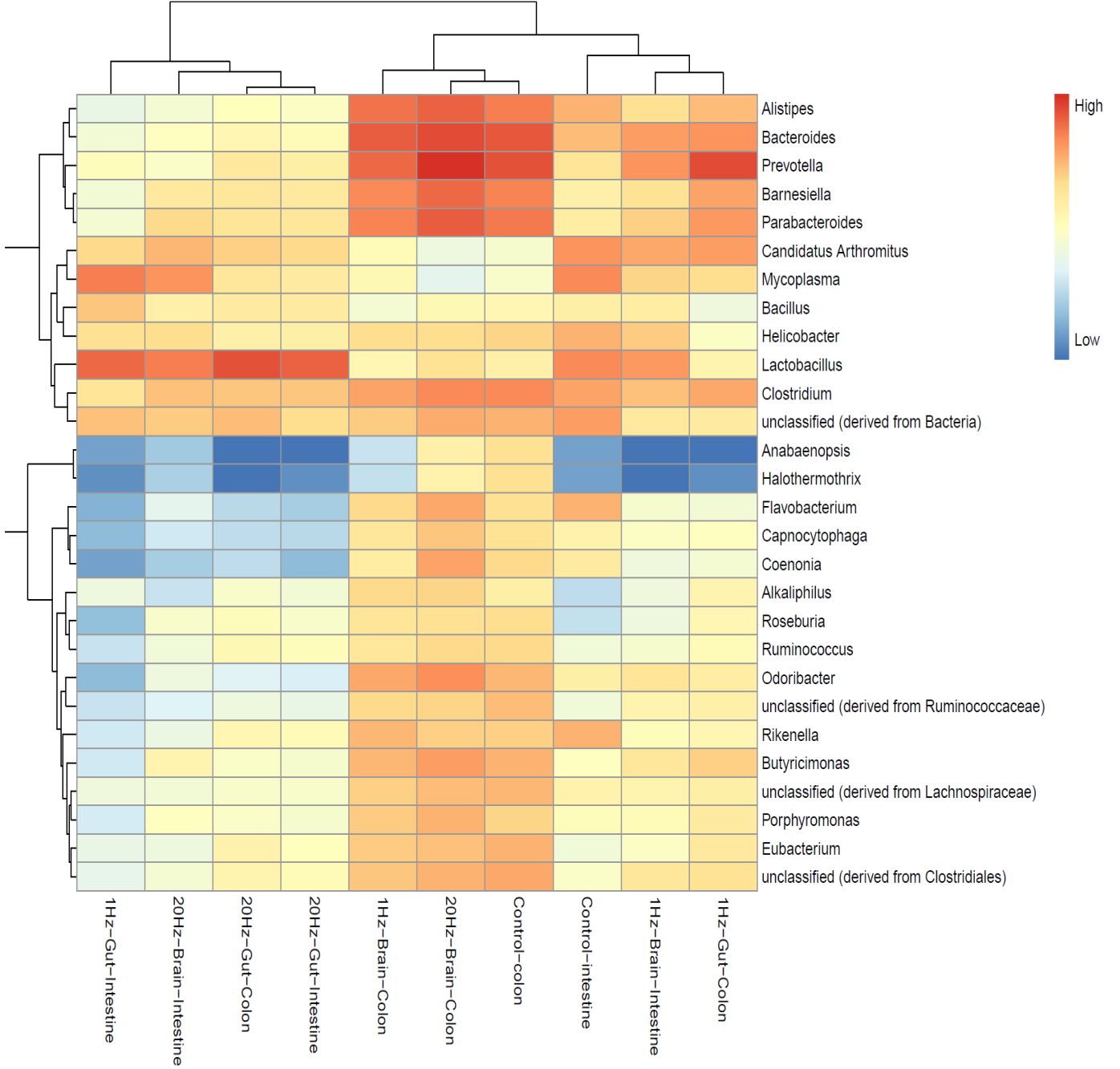


Şekil 6.2.3.3 Deney gruplarının kontrol grubuyla log2 değişim taksonomik karşılaştırması

TMS-karın 20 Hz grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak öne çıkan şube *Proteobacteria* dır, literatürde disbiyozis ile ilişkilendirilmektedir. TMS-beyin 1 Hz

grubunda, kontrol grubuna göre *Cyanobacteria* ve *Firmucutes* filumları daha az miktarda saptandı.

Şekil 6.2.3.3. Isı haritası (heat-map)



Şekil 6.2.3.3'de ısı haritası (heat-map) gösterilmektedir.

Haritada renk ölçeğinde gösteriliği gibi daha koyu olan bölgelerde mikrobiyom yoğunluğunun daha çok olduğunu göstermektedir. Haritanın sağ tarafında mikrobiyom cins seviyesinde belirtilmektedir. Deney gruplarına ait örnekler haritanın alt kısmında gösterilmektedir. Isı haritasından elde edilen sonuçlara göre; *Lactobacillus* cinsi, TMS-karın 20 Hz grubunun kolon fekal örneklerinde, kontrol-kolon grubuna göre daha fazla miktarda bulgulara ulaşıldı. Kontrol-kolonda, kontrol-incebağırsak grubuna göre daha az miktarda yer alırken, 20 Hz TMS-karın grubunda kolon fekal örneklerinde, 20 Hz TMS-karın incebağırsak grubuna göre artış ve yoğunluk fazlalığı saptandı. *Bacteroides*, *Alistipes*, *Prevotella*, *Barnesiella* ve *Parabacteroides* cinsleri TMS-beyin 1 ve 20 Hz, TMS-karın 1 Hz kolon örneklerinde kontrol-kolon grubuyla benzer sonuç gösterirken; TMS-karın 20 Hz grubunda kontrole göre oldukça düşük miktarda saptandı. Ayrıca, *Butyricimonas* genusu, kontrol kolona göre, TMS-beyin 1 Hz ve TMS-beyin 20 Hz kolon gruplarında benzerlik gösterirken; TMS-karın 20 Hz'de azalma gösterdi. *Butyricimonas* genusu incelemesinde kolon örneklerinde gözlemlenen farklılık, incebağırsak örneklerinde aynı kuvvette gözlenmedi, kontrol-incebağırsak grubuyla benzer kıyaslar gösterdi.

## 7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında girişimsel olmayan bir beyin uyarım yöntemi olan TMS'nin frekans ve uygulama bölge kriterleri değişken tutularak memeli nörofizyolojisi ve bağırsak mikrobiyal çeşitliliği üzerindeki etkisini araştırmak ve bulgulamak amaçlandı. Moleküler etki mekanizması henüz aydınlatılmamış olan manyetik stimülasyon yönteminin meydana getirdiği değişikliği daha net gözlemleyebilmek ve mekanizmasını aydınlatılabilmek amacıyla, sağlıklı farelerin beyin ve abdominal bölgelerine 1 Hz ve 20 Hz frekans değerlerinde uygulama gerçekleştirildi.

Çalışmadan elde edilen kilo değişimi verilerine göre; sağlıklı hayvanlara 1 Hz düşük frekans ve 20 Hz yüksek frekans rTMS beyin ve abdominal bölge uygulamalarına bağlı olarak TMS beyin-1 Hz düşük frekans deney grubunda daha yüksek seviyede olmakla birlikte, TMS bağırsak-20 Hz yüksek frekans gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı gözlemlendi. Literatürden farklı olarak sonuçlanan bir diğer veri ise; yüksek frekansla uyarılan TMS beyin-20 Hz deney alt grubu kilo ortalamalarında artışın gözlenmesidir. Literatürde genellikle obezite ve yeme bozukluklarında hipoaktivasyon ile ön plana çıkan DLPFC hedefli, davranış kontrolünden sorumlu bu beyin bölgesinin metabolik aktivitesini arttırmaya yönelik klinik çalışmalar yapılmıştır ve bu sebeple uyarıcı etkisi olduğu düşünülen yüksek frekans rTMS'nin obez ve bulimialı hastalara uygulanmasının ardından iyileştirici sonuçlar alındığı çalışmalarda belirtilmektedir [6], [19]. Ancak bazı klinik çalışmalarda ise yüksek frekans rTMS'nin DLPFC'ye uygulanmasının ardından hastaların aşırı yeme nöbetlerinde herhangi bir olumlu değişme olmadığı da kaydedilmektedir [77]. Benzer hipotezi destekler nitelikte bir diğer çalışmada sağlıklı bireylere 1 Hz düşük frekans rTMS'nin DLPFC hedefli uygulaması sonrasında bireylerdeki yemek algısının şiddetinde azalma kaydedilmektedir [73]. Tez çalışmasından elde ettiğimiz düşük frekans 1 Hz rTMS'nin etkinliğini destekleyen yayınlar da literatürde yer almaktadır. Düşük frekans 1 Hz TMS'nin seçici olarak GABAerjik inhibitör nöronlar üzerinde etkin olduğu belirtilmektedir [204]. Ayrıca, obezite ve yeme bozukluklarında, depresyonda hiperaktivite gösteren HPA stres aksının bu disregülasyonundan sorumlu olarak hipotalamus üzerinde inhibitör etkinliği azalmış GABAerjik nöronlar öne sürülmektedir [205]. Düşük frekans



rTMS'nin uzun zaman dilimi içinde incelendiğinde yüksek frekans rTMS'ye göre çok daha yüksek seviyede, kortikal GABAerjik nöronlardaki aktiviteyi arttırdığı gösterilmektedir [53]. Bu veriyi destekler nitelikteki çalışmada düşük frekans 1 Hz rTMS uygulamasının ardından, GABAerjik nöronların uyarımlarının etkisiyle, aşırı aktif HPA aksının aktivitesinin azaldığı ve kortizol seviyesinin düştüğü belirtilmektedir [206]. Bu veriler ışığında, mekanizması henüz tam olarak çözümlenememiş olan TMS'nin birbirinden farklı etimolojiye sahip nörolojik bozuklukların tedavisinde genellikle olumlu sonuç vermesini açıklayabilecek temel fizyolojik bağlamın hipotalamus ve HPA aksıyla ilişkili olduğu ve dahi bu nörohormonal işleyişte GABAerjik inhibitör nöronların uyarımı üzerinden TMS'nin etkinliğini gösterdiği literatür incelemesi sonucunda ön plana çıkmaktadır. Tez çalışmasının kilo değişimi bulgusu da bu savı destekler nitelikte olup TMS beyin 1 Hz düşük frekans grubunda istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybının gözlemlenmesinin muhtemelen selektif GABAerjik nöronların yoğun olarak innerve ettiği hipotalamus ve stres aksı mekanizmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Ancak net bir çıkarımda bulunulabilmesi için ek laboratuvar çalışmaları ve analizler gerekmektedir. TMS'nin HPA aksı üzerindeki etkinliğinde ön plana çıkan inhibitör GABA nöronlarının 20'den fazla sayıda morfolojik farklılık içeren, iyon kanalı protein farklılığı ve sinaptik bağlantı farklılığı taşıyan alt türleri bulunmaktadır [207]. Bu sebeple yöntemin moleküler etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik farklı motiflerdeki rTMS protokolleriyle selektif hücre çeşitlerine yönelik yapılacak çalışmalar gerekmektedir.

Tez çalışmasının bir diğer çıktısı olan, rTMS frekans ve uygulama bölge farklılıklarının bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisidir. İnsan sindirim kanalı yaklaşık  $10^{14}$  miktarında mikroorganizmayı barındırmaktadır. Oldukça kompleks ve dinamik olan bu mikrobiyal topluluğun sayısı ve içeriği konağın homeostazı ve fizyolojik koşullarıyla oldukça yakın ilişki sergilemektedir [208]. Metagenomik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; bağırsaklarda 1000'den fazla tür çeşidinin kommensal olarak yaşamakta ve mikrobiyomda %70-75 oranıyla en baskın 2 filum *Firmicutes* and *Bacteroides* olarak belirtilmektedir [209]. Obez bireylerdeki bağırsak mikrobiyota kompozisyonunda, *Bacteroides* şubesi bakterileri, normal kilodaki bireylere göre çok daha düşük oranda bulunmaktadır ve bu oranın kilo verilmesi durumunda değiştiği kaydedilmektedir [210]. Mikrobiyotanın stres koşulları altında

değişen HPA stres aksıyla karşılıklı etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Mikropsuz ortamda yetiştirilen germ-free farelerin konvensiyonel olarak yetiştirilen gruba göre daha yüksek CORT (kortikosteron) ve ACTH stres hormonları seviyesine sahip oldukları bulgulanmaktadır [141]. Bir başka çalışmada ise *Lactobacillus farciminis* probiyotik takviyesiyle desteklenen stres altındaki sıçanlarda, HPA hiperaktivitesinde azalma ve aynı zamanda strese bağlı olarak geçirgenliği artan ince bağırsak geçirgenliğinde azalma ve iyileşme kaydedilmiştir [211]. Mikrobiyotanın MSS'ne etkisi direkt nöronal yollar ile de gerçekleşebilmektedir. Enterik sinir sistemindeki duyu nöronları, bağırsak lümenindeki mikrobiyal hücrelerin ilk iletişim kitlesidir. Bu duyu nöronları aynı zamanda enterik motor nöronlarla da sinaps yaparak lümen hareketliliği üzerinde etkili olurlar ayrıca bu sinaps oluşumunda vagal sinir uçlarının da anatomik olarak yakın bulunduğu bilinmektedir [212]. Stres, GABA ve HPA aksı arasındaki ilişki göz önünde bulundurularak, mikrobiyotanın etkisinin bu sistem üzerine olası etkisi incelendiğinde inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* bakterileri tarafından sentezlenebildiği kaydedilmektedir [213].

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmasının fekal mikrobiyota analizinden elde edilen bulgular incelendiğinde öncelikle, TMS-bağırsak 20 Hz grubu dışında, kolon gaita örneklerinin incebağırsak gaita mikrobiyal komünitesinden oldukça farklı kompozisyona sahip olduğu görüldü. İnce bağırsak, mide öz suyundan yakın olarak etkilendiği için kolona göre daha az çeşitlilikte ve sayıda mikroorganizma içermektedir. Genellikle gram-pozitif cocci ve çubuk-şekilli bakteri grubunu baskın olarak içeren ince bağırsağın mideden uzak distal bölümlerinde alkali şartların etkisiyle gram-negatif *Enterobacteriaceae* miktarında belirgin artış vardır. Kalın bağırsak ise vücuttaki en geniş floraya sahip büyük çoğunlukla zorunlu anaerob *Bacteroides* and *Bifidobacterium* içerir [214]. Beta-çeşitlilik Jaccard ve Bray-curtis sonuçlarına göre; TMS-beyin 20 Hz grubunda, kalın bağırsak ve ince bağırsaktan alınan fekal örneklerin mikrobiyotası kontrol-kolon ve kontrol-incebağırsak örnekleriyle benzer oranda bulgalandı ve beyine 20 Hz rTMS uygulamasının bağırsak doku bütünlüğünü bozmadığı sonucuna varıldı. Ancak; TMS-karın 20 Hz grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı kilo kaybı saptandı (P=0,047) ve mikrobiyom analizi sonucunda kalın ve incebağırsak arasında olması gereken mikrobiyota çeşitliliğinin

kaybolduğu, 20 Hz TMS-abdominal bölge uygulamasının bağırsak doku bütünlüğünü olumsuz etkilediği gözlemlendi. Abdominal bölgede yer alan ve mikrobiyotaya ile sinir sistemi arasındaki beyin-bağırsak aksının önemli aracı olan vagal sinirin uygulama sırasında aşırı uyarımına bağlı olarak stres ve inflamasyonun tetiklendiği düşünölmektedir. Vagus siniri, myenterik ve submukozal pleksusda sinaps yapar. Enterik sinir sistemin kolinerjik neuronları (ChAT+) bu bölgede yerleşmiş olan makrofajlar ile direkt yakın temas halindedir. İntestinal duvardaki vagal nöromodulasyon enterik sinir sistemi (ESS) aracılığıyla olmaktadır. Yerleşik makrofajların uyarımı, ESS'nin kolinerjik uyarımı, vagal sinire bilgi girişini etkiler ve lamina propria toleransının belirlenmesinde önemli ölçüde rol oynarlar [234], [235]. Örneğin; ulseratif kolit, Chron's hastalığı gibi infalamatuar hastalıklarda intestinal duvar bütünlüğü ve lamina propria toleransı mikrobiyotaya karşı düşmektedir [236].

Ayrıca elde edilen kilo değişimleri verilerine göre; TMS-bağırsak 20 Hz grubunda kilo ortalamasında azalma görülürken; TMS-beyin 20 Hz grubunda ortalama kilo artışı kaydedildi. Bu bulgu, beyin uygulamasında kafatasının, 20 Hz uyarımına karşı bariyer etkisi göstererek uyarım şiddetini hafiflettiğini düşündürmektedir. Ayrıca TMS-karın 20 Hz grubunda, kontrol grubuna göre *Proteobacteria* filumundaki artışın saptanması literatürle örtüşerek disbiyozis oluşumunu işaret etmektedir [215]. TMS-beyin 1 Hz grubunda kontrol grubuna göre kilo ortalaması azalması anlamlı bulundu. Metagenom analiz sonucunda grupta kontrol grubuna göre gram-negatif *Firmucutes* sayısında azalma göröldü. TMS-beyin 1 Hz uygulaması sonrasında kolon ve ince bağırsak mikrobiyal kompozisyon farkı sabit kalarak, disbiyozis gözlemlenmediği ve ayrıca literatürde obezitede oranı artan gram-negatif *Firmucutes* filumunda düşüş saptanması, sağlıklı fiziyojolojiye düşük frekans 1 Hz rTMS uyarımının kilo azalmasını homeostatik süreci bozmadan tetiklediğini göstermektedir. Elde edilen veriler, stres durumunda intestinal bariyer geçirgeniliği bulgusu gözlemlenmeyen rTMS-beyin 1 Hz grubunda, muhtemel etkinin, GABAerjik nöron aktivite artışının tetiklenmesine bağlı olarak, HPA stres aksında inhibisyonun ve buna bağlı olarak stres hormonlarının seviyesindeki azalmanın kilo ortalaması düşüşünde etkili olabileceğini, değişen bu fiziyojistik sürecin mikrobiyotaya kompozisyonuyla benzer bağlamda gerçekteşebileceğini düşündürmektedir. Hipotezin doğrulanması için ek çalışmalar gerekmektedir.

Fare ve insan bağırsak mikrobiyotasında baskın olan iki filum *Firmucutes* ve *Bacteroidetes*, sırasıyla gram-pozitif ve gram-negatif bakteri grupları benzer olmasına karşın cins ve tür seviyesinde taksonomik farklılıklar bulunmaktadır [216]. Mikrobiyom analizi ısı haritası sonuçlarından elde edilen cins düzeyinde verilere göre; *Bacteroides*, *Alistipes*, *Prevotella*, *Barnesiella* ve *Parabacteroides* cinsleri TMS-beyin 1 ve 20 Hz, TMS-karın 1 Hz kolon örneklerinde kontrol-kolon grubuyla benzer sonuç gösterirken; TMS-karın 20 Hz grubunda kontrole göre oldukça düşük çıktı. Belirtilen cinsler, *Bacteroidetes* filumunda olup gram-negatif bakteri grubudur [217]. *Bacteroidetes* filumunda yer alan bakteriler, kontrol-incebağırsak grubunda, kontrol-kolon grubuna göre daha düşük bulunmaktalar. TMS-beyin 1 ve 20 Hz incebağırsak örnekleri, kontrol-incebağırsak grubuyla benzer yoğunluk gösterirken, kolondaki sonuca paralel şekilde TMS-karın 20 Hz incebağırsak fekal örneklerinde kontrol-incebağırsak örneklerine kıyasla düşüş kaydedildi. Isı haritasından elde edilen bir diğer veri ise *Lactobacillus* cinsi bakteride, TMS-karın 20 Hz grubunda kolon ve incebağırsak örneklerinde, kontrol grubuna kıyasla artış saptandı. *Lactobacillus*, cins olup Firmucutes filumunda yer alan gram-pozitif bakteri grubudur. Sağlıklı bir bireyde deudonumda %6 *Lactobacillus* varken kolondaki toplam bakterilerin %0,3'ünü *Lactobacillus* oluşturmaktadır. Bu durum *Lactobacillus* grubunun asidik pH'ya karşı dayanıklılığı ilişkilendirilmektedir [218]. Çalışmalar, obezite ve tip2 diyabetli bireylerde *Bacteroidetes* oranında düşüş, *Firmucutes* grubunda ise artış göstermektedir [219]. Obez bireylerde yüksek seviyede saptanan *Firmucutes* filumundaki artışın yer alan bazı *Lactobacillus* türlerinin orantısıyla ortaya çıktığını destekleyen çalışmalarda yer almaktadır. *Lactobacillus* türlerine göre kilo artışını veya düşüşünü desteklediği düşünülmektedir [220]. Ancak daha az sayıda da olsa *Bacteroidetes* ve *Firmucutes* miktarındaki değişimin direkt olarak vücut kitle endeksiyle ilişkili olmadığı ve diğer çalışmaların aksine obez mikrobiyotada tam tersi etki gösterdiği de bazı gruplarca desteklenmektedir [221], [222]. Tez çalışmasında, TMS-karın 20 Hz grubunda kolon ve incebağırsak gaita örneklerinde, kontrol grubuna kıyasla daha düşük oranda gram-negatif *Bacteroidetes* filum gruplarının gözlemlenmesi ve taksonomik sınıflandırma analizi sonucunda *Firmucutes* filumunda artış bulgulanması, literatürde obezite, tip2 diabet ve major depresyon mikrobiyota kompozisyonuyla benzeşmektedir [216], [223]. Ancak çalışmadan elde edilen kilo

değişimi verilerine göre; TMS-karın 20 Hz grubunda kilo ortalamasında düşüş gözlemlenmiştir. Benzer şekilde *Firmucutes* filumunda artış ve *Bacteroidetes* filumunda azalmanın gözlemlendiği irritabl bağırsak sendromunda, diabet ve obezitede ortak olan fizyolojik stres bulgusudur [224], [225]. TMS'nin karın bölgesine 20 Hz yüksek frekansta uygulanmasına bağlı olarak kilo azalması ve mikrobiyal kompozisyondaki dengesizlik akut stresin tetiklenmesiyle olabileceği gibi abdominal bölge uyarımında vagal affarent nöronların yüksek frekansta uyarımı nukleus solitarius ve hipotalamusu uyararak direkt ve kuvvetli etkiyle [226] stres aksının hiperaktivasyonunu oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca, *Lactobacillus* cinsi bakteriler, TMS-karın 20 Hz kolon ve incebağırsak fekal örneklerinde kontrol-kolon ve kontrol-incebağırsak standartlarına kıyasla daha yüksek miktarda bulundu. *Lactobacillus rhamnosus* güçlü bir probiyotik olup kolon epitel hücrelerindeki inflamasyonu azaltmaktadır [178]. Ayrıca *Lactobacillus*, bağırsak florasının uygun pH'sının devamlılığında ve diğer bakterilerin habitasyonunda etkin rol oynadığı için kilo kontrolünün sağlanmasında sindirim ve mikrobiyal dengenin korunması için probiyotik takviyesi olarak verilen türlere sahiptir [227]. TMS-karın 20 Hz grubunda belirgin artışı, grupta gözlemlenen mikrobiyota dengesizliği ile uyuşmamakta ve literatürdeki etkinin tersi bir durum oluşturmaktadır. Ancak Çin'de yapılan bir araştırmada inflamatuvar bağırsak sendromu hastalarında kontrol grubuna göre çok daha yüksek miktarda *Lactobacillus* cinsi saptanmıştır [228]. Bu veri, kolondaki oksidatif stres ve inflamasyona bağlı olarak *Lactobacillus* artışının tetiklenebileceğini, benzer durumun abdominal bölgeye 20 Hz TMS uygulandığı deney grubunda da artışa sebep olabileceğini düşündürmekle beraber daha kesin bir çıkarım için tür ve ırk seviyesinde ek bulgulara gerek olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, LDA grafiği sonuçlarında, TMS-karın 20 Hz grubunda yüksek miktarda *Lactobacillus* saptandı. Ayrıca, diğer gruplardan farklı olarak *Streptococcus* cinsi yüksek yoğunlukta görüldü. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsleri *Firmucutes* filumuna ait gruplar olup, deney grubuna ait diğer analiz sonuçlarını destekler şekilde *Firmucutes* artışını işaret etmektedir.

Isı haritası sonuçlarına göre; *Butyricimonas* cinsi bakteriler, TMS-beyin 1 ve 20 Hz gruplarında ve TMS-karın 1 Hz grubunda kontrol gruplarına benzer miktarda kalınbağırsakta saptandı ancak TMS-karın 20 Hz grubunda kontrol grubuna göre daha

az miktarda belirlenmiştir. *Butyricimonas* cinsi, gram-negatif Bacteroidetes filumunda yer alan bakterilerdir. Kalınbağırsak inflamasyonu ile negatif ilişkili olan *Butyricimonas* cinsi bakteriler, nörodejeneratif kas hastalığı olan MS (multiple sclerosis)'de düşük konsantrasyonda saptanmaktadır [229]. Kronik şekilde düşük-dereceli inflamasyonun görüldüğü obezitede MS oluşma riskinin yüksek olduğu, iki hastalığın ortak patolojiden kökenlendiği de ayrıca çalışmalarda yer almaktadır [230]. Kısa-zincirli yağ asidi butirat üretiminden sorumlu cins olan *Butyricimonas*, bağırsak florasında butirat üretimi sayesinde kolon hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamakla beraber pro-inflamatuar IL-12 üretimini inhibe ederek, anti-inflamatuar etki göstermektedir [231]. Bu verilere dayanarak, butirat üreten *Butyricimonas* cinsi bakterilerin TMS-karın 20 Hz grubu kolon fekal örneklerinde düşük konsantrasyonda saptanması, *Firmucutes* ve *Bacteroidetes* filumlarının kontrol grubuna kıyasla belirgin farklılık içermesi, deney grubunda yüksek frekans TMS'ye bağlı olarak kolon inflamasyonunun tetiklendiğini ve bağırsak bariyer bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir. Kilo ortalamasının uygulama süresince düştüğü TMS-karın 20 Hz grubu (P=0,047), mikrobiyota çeşitlilik ve taksonomik analizleriyle korelasyon göstererek yüksek frekans TMS'nin abdominal bölgeye uygulanmasının sağlıklı hayvanlarda stres fizyolojisi ve inflamasyon oluşumunu tetikleyebildiğini göstermektedir. Frekans etkisinin belirgin bir şekilde gözlemlendiği TMS-karın 1 ve 20 Hz deney grupları karşılaştırmasında, TMS'nin abdominal bölgeye 1 Hz uygulanmasıyla kolon ve incebağırsak mikrobiyal kompozisyonunda kontrol grubuna göre önemli derecede dengesizlik görülmedi ve grubun kilo ortalamasında istatistiksel olarak anlamlı değişim kaydedilmedi. Aynı bölgeye 20 Hz uyarı alan grupta bağırsak flora kompozisyonunda çarpıcı değişimin saptanması stimülasyon frekans parametresinin etkisini vurgulamaktadır. Ayrıca; TMS-beyin gruplarında 1 Hz uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı saptandı (P=0,001), bu veri obezite ve bulimia nervozalı bireylere kilo kontrolü amaçlı yüksek frekans rTMS uygulaması çalışmalarının büyük çoğunluğu ile çelişki göstermesine karşın; belli grup rTMS çalışmalarında düşük frekans (<5Hz) uygulamasının inhibitör GABAerjik nöronlar üzerindeki seçici etkinliğini vurgulayarak, bilhassa GABAerjik nöronlarca innerve edilen hipotalamus ve stres aksı üzerinde baskılayıcı etkinliğin çok daha etkin görülebileceği savunulmaktadır [53],

[232]. TMS-beyin 1 Hz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı kilo düşüşü saptanmasıyla beraber mikrobiyota analizi sonuçlarında kontrol grubu verilerden büyük ölçüde farklı sonuçlar elde edilmedi. 16S rRNA analizi sonucunda, TMS-beyin 1 Hz grubunda, kontrol grubuna göre *Firmicutes* filumuna ait belli bakteri türlerinde azalma görüldü. Önemli derecede belirgin olmayan bu veri, literatürde obez bireylerin ve zayıf/anoreksik mikrobiyota karşılaştırma çalışmalarının büyük çoğunluğu ile uyumludur. Çalışmaların büyük çoğunluğundan elde edilen sonuca göre; obez bireylerde, zayıf veya anoreksik gruplara kıyasla, *Firmicutes* filum üyelerinde artma, *Bacteroidetes* filumunda ise azalma kaydedilmekte ve kilo kaybına paralel olarak F/B oranında düşme görülmektedir [233]. Bu bulgulara karşıt daha az sayıdaki sonuçlarda kaynaklarda yer almaktadır. *Bacteroidetes* ve F/B oranının, vücut kitle endeksiyle ilişkili olmadığı, obez ve non-obez bireyler arasında fark gözlemlenmediği kaydedilmektedir [221]. TMS-beyin 1 Hz grubunda elde edilen istatistiksel anlamlı kilo düşüşü ve kontrol gruplarına benzer, değişim göstermeyen mikrobiyota kompozisyonu bulgusu daha az sayıdaki belli çalışmalarla uyum göstermesine karşın, literatürdeki çoğunluğu oluşturan sonuçlar ile örtüşmemektedir. TMS-beyin 1 Hz grubunda kilo ortalamasındaki azalma her ne kadar, GABAerjik nöronların seçici etkinliğinin hipotalamus, HPA aksını inhibe ederek, kortizolün daha az salgılanmasını ve yağ depolanmasını azalttığı mekanizması üzerinden değerlendirilse de kilo değişimine bağlı olarak mikrobiyal kompozisyonunun, enerji metabolizmasına bağlı olarak belli ölçüde değişimi beklenmektedir, öngörülenin aksine sonuç alınmıştır. rTMS uygulama bölge farklılığının (beyin ve abdominal bölge olmak üzere), kilo değişimi ve fekal mikrobiyota üzerinde en belirgin olarak gözlemlendiği grup, TMS-karın 20 Hz grubudur. TMS-beyin 20 Hz yüksek frekans grubunda kilo ortalaması, artış gösterdi ve metagenom analizi sonuçları ise kontrol grubuyla korelasyon içerisinde bulgulandı.

Bu verilere dayanarak, TMS-karın 20 Hz grubunda kilo düşüşü ve kolon-incebağırsak mikrobiyota kompozisyon dengesizliği bulguları göz önünde bulundurularak, bozulan bağırsak duvarı bütünlüğünün, karın bölgesine yüksek frekans TMS uygulamasına bağlı olarak, ESS'nin aşırı uyarımı, immün yanıtın tetiklenmesi ve vagal inflamasyon modülasyonunun aktif hale gelmesiyle oluştuğu düşünülmektedir. Ancak kesin yargıya varmak için serum sitokin değerlerini içeren ek bulgulara ihtiyaç vardır.

## 8. SONUÇ

Tez çalışmasından elde edilen veriler incelendiğinde; rTMS uygulama bölge ve frekans parametrelerinin mikrobiyota çeşitliliği ve bağırsak bölümlerindeki kompozisyonuna etkisi olduğu görülmektedir.

Kilo ortalamasının anlamlı ölçüde azalma gösterdiği TMS-karın 20 Hz ve TMS-beyin 1 Hz deney gruplarında, metagenom analiz verileri karşılaştırıldığında uygulama bölge farkı görülmektedir. TMS-beyin 1 Hz grubunda, kontrol grubuyla korelasyon gösteren mikrobiyota tespit edilmesine karşın; stimülasyonun Abdominal bölgeye 20 Hz uygulandığı grupta *Bacteroidetes* ve *Firmucutes* filumu, kontrol grubuna göre negatif korelasyona sahiptir. Aynı şekilde; *Lactobacillus* cinsi bakteriler, TMS-karın 20 Hz grubunun kolon ve incebağırsak örneklerinde kontrol grubu standartlarına göre önemli ölçüde artış göstermektedir. Normal şartlarda, duodenumdan distal bağırsaklara sayısında azalma gösteren *Lactobacillus* grupları, TMS-karın 20 Hz grubunda, kolon örneklerinde, incebağırsak fekal örneklerine göre daha yüksek miktarda saptandı. Ayrıca, anti-inflamatuar modülasyonla ilişkili *Butyricimonas* cinsi bakteriler, TMS-beyin 1 ve 20 Hz gruplarıyla, TMS-karın 1 Hz grubunda kontrol grubuyla benzer yoğunluk göstermesine karşın TMS-karın 20 Hz grubunda çok daha az miktarda saptandı. Elde edilen kilo değişimi ve mikrobiyota analizleri, yüksek frekans TMS-karın uygulamasının, sağlıklı farelerde olumsuz etki oluşturduğunu ve mikrobiyota kompozisyon düzensizliğini tetikleyerek bağırsak doku bütünlüğünü negatif yönde etkilediği görülmektedir. TMS-beyin 20 Hz grubunda kilo ortalamasında azalma beklenmesine karşın literatürün genelinden farklı olarak anlamlı bir kilo değişimi görülmemektedir. Buna karşın literatürde az sayıdaki çalışmanın desteklediği şekilde; TMS-beyin 1 Hz düşük frekans grubunda kilo ortalamasında azalma görüldü. Ancak; beklenenin aksine enerji metabolizmasındaki değişime rağmen, mikrobiyota da kontrol grubuna göre önemli bir değişim saptanmadı.

Çalışmada, TMS'nin sağlıklı fizyolojideki mikrobiyota üzerinde, abdominal bölge ve yüksek frekans uygulamasında olumsuz etkisinin olduğu görüldü. Elde edilen veriler ışığında, hipotezin desteklenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 9. KAYNAKÇA

- [1] F. Fregni and A. Pascual-Leone, “Technology Insight: noninvasive brain stimulation in neurology—perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS,” *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 2007.
- [2] T. Bäumer and R. Lange, “Repeated premotor rTMS leads to cumulative plastic changes of motor cortex excitability in humans,” *Neuroimage*, 2003.
- [3] F. Maeda, J. P. Keenan, J. M. Tormos, H. Topka, and A. Pascual-Leone, “Interindividual variability of the modulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cortical excitability,” *Exp. Brain Res.*, 2000.
- [4] J. G. Trogdon, E. A. Finkelstein, C. W. Feagan, and J. W. Cohen, “State- and payer-specific estimates of annual medical expenditures attributable to obesity,” *Obesity*, 2012.
- [5] M. F. Maranhão and N.M. Estella, “The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in obese females with binge eating disorder: A protocol for a double-blinded, randomized, sham-controlled trial,” *BMC Psychiatry*, 2015.
- [6] S. H. Kim and C. H. Chung, “The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on eating behaviors and body weight in obesity: A randomized controlled study,” *Brain Stimul.*, 2018.
- [7] F. Van Den Eynde, S. Guillaume, H. Broadbent, I. C. Campbell, and U. Schmidt, “Repetitive transcranial magnetic stimulation in anorexia nervosa: A pilot study,” *Eur. Psychiatry*, 2013.
- [8] M.-M. E., R. N., A.-B. L., B.-A. M., and R.-R. D., “Brain stimulation techniques: Non-invasive treatments for depression,” *Eur. Psychiatry*, 2012.
- [9] P. D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A. M. Neyrinck, and N. M. Delzenne, “Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice,” *Diabetes*, 2008.

- [10] V. Tremaroli and F. Bäckhed, “Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism,” *Nature*, 2012.
- [11] M. Vodička and P. Ergang, “Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress,” *Brain, Behavior, and Immunity*, 2018.
- [12] J. K. Goodrich and J. L. Waters, “Human genetics shape the gut microbiome,” *Cell*, 2014.
- [13] G. S. Pell, Y. Roth, and A. Zangen, “Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms,” *Prog Neurobiol*, 2011.
- [14] J. Brunelin and I. Jalenques, “The efficacy and safety of low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant depression: The results from a large multicenter french RCT,” *Brain Stimul.*, 2014.
- [15] M. F. Casanova and M. K. Hensley, “Effects of weekly low-frequency rTMS on autonomic measures in children with autism spectrum disorder,” *Front. Hum. Neurosci.*, 2014.
- [16] S. M. Sampson, S. Kung, D. E. McAlpine, and P. Sandroni, “The Use of Slow-Frequency Prefrontal Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Refractory Neuropathic Pain,” *J. ECT*, 2011.
- [17] M. T. Berlim and F. Van Den Eynde, “Repetitive transcranial magnetic stimulation over the dorsolateral prefrontal cortex for treating posttraumatic stress disorder: an exploratory meta-analysis of randomized, double-blind and sham-controlled trials.,” *Can. J. Psychiatry*., 2014.
- [18] R. Nardone, P. De Blasi and Y. Höller, “Repetitive transcranial magnetic stimulation transiently reduces punning in Parkinson’s disease: A preliminary study,” *J. Neural Transm.*, 2014.
- [19] F. Van den Eynde and A. M. Claudino, “Repetitive Transcranial Magnetic

- Stimulation Reduces Cue-Induced Food Craving in Bulimic Disorders,” *Biol. Psychiatry*, 2010.
- [20] E. M. Wassermann and S. H. Lisanby, “Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: A review,” *Clinical Neurophysiology*. 2001.
- [21] M. Gangitano, A. Valero-Cabré, J. M. Tormos, F. M. Mottaghy, J. R. Romero, and A. Pascual-Leone, “Modulation of input-output curves by low and high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex,” *Clin. Neurophysiol.*, 2002.
- [22] M. K. Fleming, I. O. Sorinola, D. J. Newham, S. F. Roberts-Lewis, and J. H. M. Bergmann, “The effect of coil type and navigation on the reliability of transcranial magnetic stimulation,” *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.*, 2012.
- [23] R. Chen, C. Gerloff, J. Classen, E. M. Wassermann, M. Hallett, and L. G. Cohen, “Safety of different inter-train intervals for repetitive transcranial magnetic stimulation and recommendations for safe ranges of stimulation parameters,” *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. - Electromyogr. Mot. Control*, 1997.
- [24] T. Pashut and D. Magidov, “Patch-clamp recordings of rat neurons from acute brain slices of the somatosensory cortex during magnetic stimulation,” *Front. Cell. Neurosci.*, 2014.
- [25] M. Diana, T. Raij, M. Melis, A. Nummenmaa, L. Leggio, and A. Bonci, “Rehabilitating the addicted brain with transcranial magnetic stimulation,” *Nature Reviews Neuroscience*. 2017.
- [26] V. Di Lazzaro and U. Ziemann, “The contribution of transcranial magnetic stimulation in the functional evaluation of microcircuits in human motor cortex,” *Front. Neural Circuits*, 2013.
- [27] R. J. Ilmoniemi and J. Virtanen, “Neuronal responses to magnetic stimulation reveal cortical reactivity and connectivity,” *Neuroreport*, 1997.

- [28] T. Paus, R. Jech, C. J. Thompson, R. Comeau, T. Peters, and A. C. Evans, "Transcranial magnetic stimulation during positron emission tomography: a new method for studying connectivity of the human cerebral cortex," *J. Neurosci.*, 1997.
- [29] P. C. Miranda, M. Hallett, and P. J. Basser, "The electric field induced in the brain by magnetic stimulation: A 3-D finite-element analysis of the effect of tissue heterogeneity and anisotropy," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2003.
- [30] V. E. Amassian, L. Eberle, P. J. Maccabee, and R. Q. Cracco, "Modelling magnetic coil excitation of human cerebral cortex with a peripheral nerve immersed in a brain-shaped volume conductor: the significance of fiber bending in excitation," *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Evoked Potentials*, 1992.
- [31] J. P. Brasil-Neto, L. G. Cohen, M. Panizza, J. Nilsson, B. J. Roth, and M. Hallett, "Optimal focal transcranial magnetic activation of the human motor cortex: Effects of coil orientation, shape of the induced current pulse, and stimulus intensity," *J. Clin. Neurophysiol.*, 1992.
- [32] N. Lang and H. R. Siebner, "Preconditioning with transcranial direct current stimulation sensitizes the motor cortex to rapid-rate transcranial magnetic stimulation and controls the direction of after-effects," *Biol. Psychiatry*, 2004.
- [33] N. Lang, A. Hasan, E. Sueske, W. Paulus, and M. A. Nitsche, "Cortical hypoexcitability in chronic smokers? A transcranial magnetic stimulation study," *Neuropsychopharmacology*, 2008.
- [34] P. Milani, P. Piu and T. Popa, "Cortisol-induced effects on human cortical excitability," *Brain Stimul.*, 2010.
- [35] M. Isserles and O. Rosenberg, "Cognitive-emotional reactivation during deep transcranial magnetic stimulation over the prefrontal cortex of depressive patients affects antidepressant outcome," *J. Affect. Disord.*, 2011.
- [36] B. Cheeran and P. Talelli, "A common polymorphism in the brain-derived

neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS.,” *J. Physiol.*, 2008.

- [37] K. M. Pearson-Fuhrhop, B. Minton, D. Acevedo, B. Shahbaba, and S. C. Cramer, “Genetic Variation in the Human Brain Dopamine System Influences Motor Learning and Its Modulation by L-Dopa,” *PLoS One*, 2013.
- [38] T. V. P. Bliss and T. Lømo, “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path,” *J. Physiol.*, 1973.
- [39] T. V. Bliss and R. Gardner-Medwin, “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path,” *J. Physiol.*, 1973.
- [40] G. S. Pell, Y. Roth, and A. Zangen, “Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: Influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms,” *Progress in Neurobiology*. 2011.
- [41] D. J. Linden, “The return of the spike: Postsynaptic action potentials and the induction of LTP and LTD,” *Neuron*. 1999.
- [42] G. J. Stuart and B. Sakmann, “Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites,” *Nature*, 1994.
- [43] M. Lenz, D. Becker, L. M. Willems, “Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons,” *Brain Struct. Funct.*, vol. 220, no. 6, pp. 3323–3337, 2015.
- [44] T. Tokay, N. Holl, T. Kirschstein, V. Zschorlich, and R. Köhling, “High-frequency magnetic stimulation induces long-term potentiation in rat hippocampal slices,” *Neurosci. Lett.*, 2009.
- [45] A. Vlachos, F. Muller-Dahlhaus, J. Roszkopp, M. Lenz, U. Ziemann, and T.

- Deller, "Repetitive Magnetic Stimulation Induces Functional and Structural Plasticity of Excitatory Postsynapses in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures," *J. Neurosci.*, 2012.
- [46] V. Di Lazzaro and A. Oliviero, "Ketamine Increases Human Motor Cortex Excitability to Transcranial Magnetic Stimulation," *J. Physiol.*, 2003.
- [47] G. Hess, C. D. Aizenman, and J. P. Donoghue, "Conditions for the induction of long-term potentiation in layer II/III horizontal connections of the rat motor cortex.," *J. Neurophysiol.*, 1996.
- [48] S. Yang, Y. Tang, and R. Zucker, "Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic i elevation," *J. Neurophysiol.*, 1999.
- [49] P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, and J. O' Keefe, *The Hippocampus Book*. 2009.
- [50] J. Lisman, "A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989.
- [51] L. Gustafsson, "Comment on 'disruption in the inhibitory architecture of the cell minicolumn: Implications for autism,'" *Neuroscientist*, 2004.
- [52] E. Sokhadze, "Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) affects event-related potential measures of novelty processing in autism.," *Appl. Psychophysiol. Biofeedback*, 2010.
- [53] J. Trippe, A. Mix, S. Aydin-Abidin, K. Funke, and A. Benali, "Theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex," *Exp. Brain Res.*, 2009.
- [54] R. G. Carson and N. C. Kennedy, "Modulation of human corticospinal excitability by paired associative stimulation," *Front. Hum. Neurosci.*, 2013.
- [55] A. Baek, "High-Frequency Repetitive Magnetic Stimulation Enhances the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Through Activation of

Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-cAMP-Response Element-Binding Protein Pathway,” *Front. Neurol.*, 2018.

- [56] S. D. Skaper, “Neuronal growth-promoting and inhibitory cues in neuroprotection and neuroregeneration,” *Methods Mol. Biol.*, 2012.
- [57] S. Bathina and U. N. Das, “Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications,” *Arch. Med. Sci.*, 2015.
- [58] Xiaodong Yan and Z. Ye, “CaMKII-Mediated CREB Phosphorylation Is Involved in Ca<sup>2+</sup>-Induced BDNF mRNA Transcription and Neurite Outgrowth Promoted by Electrical Stimulation,” *PLoS One*, 2016.
- [59] J. Lisman, H. Schulman, and H. Cline, “The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory,” *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002.
- [60] A. Thalhammer, Y. Rudhard, C. M. Tigaret, K. E. Volynski, D. A. Rusakov, and R. Schoepfer, “CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling,” *EMBO J.*, 2006.
- [61] J. A. Blendy, “The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment,” *Biological Psychiatry*, 2006.
- [62] H.-Y. Wang, “Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte,” *J. Neurosci.*, 2011.
- [63] T. Yukimasa and R. Yoshimura, “High-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Improves Refractory Depression by Influencing Catecholamine and Brain-Derived Neurotrophic Factors,” *Pharmacopsychiatry*, 2006.
- [64] M. Ng and M. Robinson, “Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013,” *Lancet*, 2014.
- [65] E. A. Finkelstein, J. G. Trogon, J. W. Cohen, and W. Dietz, “Annual medical

spending attributable to obesity: Payer- and service-specific estimates,” *Health Aff.*, 2009.

- [66] S. S. Hussain and S. R. Bloom, “The pharmacological treatment and management of obesity,” *Postgrad. Med.*, 2011.
- [67] F. R. E. Smink, D. Van Hoeken, and H. W. Hoek, “Epidemiology of eating disorders: Incidence, prevalence and mortality rates,” *Curr. Psychiatry Rep.*, 2012.
- [68] H. W. Hoek, “Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders,” *Current Opinion in Psychiatry*. 2006.
- [69] G. Noordenbos, A. Oldenhove, and J. Muschter, “Characteristics and Treatment of Patients with Chronic Eating Disorders Characteristics and Treatment of Patients,” *Eat. Disord.*, no. September 2011, pp. 37–41, 2010.
- [70] D. Val-Laillet and E. Aarts, “Neuroimaging and neuromodulation approaches to study eating behavior and prevent and treat eating disorders and obesity,” *NeuroImage Clin.*, 2015.
- [71] D. S. N. T. Le, K. Chen and M. Gluck, “Reanalysis of the obesity-related attenuation in the left dorsolateral prefrontal cortex response to a satiating meal using gyral regions-of-interest,” *J. Am. Coll. Nutr.*, 2009.
- [72] K. van Kuyck and N. Gerrard, “Towards a neurocircuitry in anorexia nervosa: Evidence from functional neuroimaging studies,” *Journal of Psychiatric Research*. 2009.
- [73] M. Camus and N. Halelamien, “Repetitive transcranial magnetic stimulation over the right dorsolateral prefrontal cortex decreases valuations during food choices,” *Eur. J. Neurosci.*, 2009.
- [74] F. Fregni and A. Pascual- Leone, “Transcranial direct current stimulation of the prefrontal cortex modulates the desire for specific foods,” *Appetite*, 2008.



- [75] B. R. Mishra, S. Sarkar, S. K. Praharaj, V. S. Mehta, S. Diwedi, and S. H. Nizamie, "Repetitive transcranial magnetic stimulation in psychiatry," *Ann Indian Acad Neurol*, 2011.
- [76] J. Downar, A. win Sankar, P. Giacobbe, B. Woodside, and P. Colton, "Unanticipated rapid remission of refractory bulimia nervosa, during high-dose repetitive transcranial magnetic stimulation of the dorsomedial prefrontal cortex: A case report," *Front. Psychiatry*, 2012.
- [77] R. Uher, D. Yoganathan and A. Mogg, "Effect of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation on food craving," *Biol. Psychiatry*, 2005.
- [78] K. S. Barth, "Food cravings and the effects of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation using an improved sham condition," *Front. Psychiatry*, 2011.
- [79] M. Kekic, I. Campbell, J. McClelland and S. Nestler, "The effects of prefrontal cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) on food craving and temporal discounting in women with frequent food cravings," *Appetite*, 2014.
- [80] M. M. Fichter, K. M. Pirke, J. Pöllinger, G. Wolfram, and E. Brunner, "Disturbances in the hypothalamo-pituitary-adrenal and other neuroendocrine axes in bulimia," *Biol. Psychiatry*, 1990.
- [81] C. Lo Sauro, C. Ravaldi, P. L. Cabras, C. Faravelli, and V. Ricca, "Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders," *Neuropsychobiology*. 2008.
- [82] P. Neudeck, G. E. Jacoby, and I. Florin, "Dexamethasone suppression test using saliva cortisol measurement in bulimia nervosa," *Physiol. Behav.*, 2001.
- [83] S. Gesta, Y. H. Tseng, and C. R. Kahn, "Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source," *Cell*. 2007.
- [84] E. Epel, R. Lapidus, B. McEwen, and K. Brownell, "Stress may add bite to appetite in women: A laboratory study of stress-induced cortisol and eating

- behavior,” *Psychoneuroendocrinology*, 2001.
- [85] E. Newman, D. B. O’Connor, and M. Conner, “Daily hassles and eating behaviour: The role of cortisol reactivity status,” *Psychoneuroendocrinology*, 2007.
- [86] B. S. McEwen, “Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain.,” *Physiol. Rev.*, 2007.
- [87] R. Buck, “The biological affects: A typology,” *Psychol. Rev.*, 1999.
- [88] R. M. Sullivan and A. Gratton, “Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: Side matters,” *Psychoneuroendocrinology*. 2002.
- [89] J. J. Cerqueira, O. F. X. Almeida, and N. Sousa, “The stressed prefrontal cortex. Left? Right!,” *Brain, Behavior, and Immunity*. 2008.
- [90] M. F. Dallman, “Stress-induced obesity and the emotional nervous system,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010.
- [91] C. Baeken and R. De Raedt, “Neurobiological mechanisms of repetitive transcranial magnetic stimulation on the underlying neurocircuitry in unipolar depression,” *Dialogues Clin. Neurosci.*, 2011.
- [92] M. E. Keck, “The neurobiological basis of therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in psychiatric disorders,” *Nervenheilkunde*, 2003.
- [93] S. Pridmore, “Rapid transcranial magnetic stimulation and normalization of the dexamethasone suppression test,” *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 1999.
- [94] A. M. Claudino and F. Van den Eynde, “Repetitive transcranial magnetic stimulation reduces cortisol concentrations in bulimic disorders,” *Psychol. Med.*, 2011.
- [95] Z. Nahas and F. A. Kozel, “Brain Effects of TMS Delivered Over Prefrontal

- Cortex in Depressed Adults,” *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 2001.
- [96] M. E. Keck, M. Engelmann, M. B. Müller, “Repetitive transcranial magnetic stimulation induces active coping strategies and attenuates the neuroendocrine stress response in rats,” *J. Psychiatr. Res.*, 2000.
- [97] D. W. Hedges, “Duration of transcranial magnetic stimulation effects on the neuroendocrine stress response and coping behavior of adult male rats,” *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 2003.
- [98] A. Pascual-Leone and E. M. Wassermann, “Safety of rapid-rate transcranial magnetic stimulation in normal volunteers,” *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. Evoked Potentials*, 1993.
- [99] C. Baeken, “The impact of one HF-rTMS session on mood and salivary cortisol in treatment resistant unipolar melancholic depressed patients,” *J. Affect. Disord.*, 2009.
- [100] C. Baeken, M. A. Vanderhasselt, and R. De Raedt, “Baseline ‘state anxiety’ influences HPA-axis sensitivity to one sham-controlled HF-rTMS session applied to the right dorsolateral prefrontal cortex,” *Psychoneuroendocrinology*, 2011.
- [101] H. Kunugi, “Assessment of the dexamethasone/CRH test as a state-dependent marker for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis abnormalities in major depressive episode: A multicenter study,” *Neuropsychopharmacology*, 2006.
- [102] S. Revskoy and E. Redei, “Decreased in vitro sensitivity to dexamethasone in corticotropes from middle-age rats,” *Exp. Gerontol.*, 2000.
- [103] P. Zwanzger, “Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on panic attacks induced by cholecystokinin-tetrapeptide (CCK-4),” *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2007.
- [104] J. Xu and M. A. Mahowald, “Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine,” *PLoS Biol.*, 2007.

- [105] J. Qin, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C *et al.*, “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing,” *Nature*, 2010.
- [106] S. Grenham, G. Clarke, J. F. Cryan, and T. G. Dinan, “Brain-gut-microbe communication in health and disease,” *Front. Physiol.*, 2011.
- [107] G. M. Weinstock, “Genomic approaches to studying the human microbiota,” *Nature*, 2012.
- [108] W. R. Russell, S. H. Duncan, and H. J. Flint, “The gut microbial metabolome: Modulation of cancer risk in obese individuals,” in *Proceedings of the Nutrition Society*, 2013.
- [109] Y. Wang and L. H. Kasper, “The role of microbiome in central nervous system disorders,” *Brain, Behavior, and Immunity*, 2014.
- [110] D. J. Morrison and T. Preston, “Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism,” *Gut Microbes*, 2016.
- [111] M. Priyadarshini, K. U. Kotlo, P. K. Dudeja, and B. T. Layden, “Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology,” *Compr. Physiol.*, 2018.
- [112] X.-L. . b e Zhou, X.-F. . c e Kong, G.-Q. . e Lian, F. . Blachier, M.-M. . e Geng, and Y.-L. . e Yin, “Dietary supplementation with soybean oligosaccharides increases short-chain fatty acids but decreases protein-derived catabolites in the intestinal luminal content of weaned Huanjiang mini-piglets,” *Nutr. Res.*, 2014.
- [113] S. H. Rhee, C. Pothoulakis, and E. A. Mayer, “Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2009.
- [114] M. Maes, I. Mihaylova, and J. C. Leunis, “Increased serum IgA and IgM against LPS of enterobacteria in chronic fatigue syndrome (CFS): Indication for the involvement of gram-negative enterobacteria in the etiology of CFS and for the

- presence of an increased gut-intestinal permeability,” *J. Affect. Disord.*, 2007.
- [115] S. M. O’Mahony, N. P. Hyland, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction,” *Psychopharmacology*, 2011.
- [116] T. R. Sampson, “Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson’s Disease,” *Cell*, 2016.
- [117] H. R. Mertz, “Overview of functional gastrointestinal disorders: Dysfunction of the brain-gut axis,” *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 2003.
- [118] M. D. Gershon, “The Enteric Nervous System: A Second Brain,” *Hosp. Pract.*, 1999.
- [119] P. Forsythe, J. Bienenstock, and W. A. Kunze, “Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014.
- [120] K. A. Sharkey, “Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders,” *Journal of Clinical Investigation*, 2015.
- [121] C. Bernardazzi, B. Pêgo, and H. S. P. De Souza, “Neuroimmunomodulation in the Gut: Focus on Inflammatory Bowel Disease,” *Mediators of Inflammation*, 2016.
- [122] J. P. Ruddick, A. K. Evans, D. J. Nutt, S. L. Lightman, G. A. W. Rook, and C. A. Lowry, “Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications,” *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2006.
- [123] M. Berger, J. A. Gray, and B. L. Roth, “The Expanded Biology of Serotonin,” *Annu. Rev. Med.*, 2009.
- [124] M. D. Gershon, “5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract,” *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 2013.
- [125] S. M. Brierley and D. R. Linden, “Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation,” *Nature reviews. Gastroenterology &*

*hepatology*, 2014.

- [126] N. W. Bellono and J. Zhang, "Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways," *Cell*, 2017.
- [127] I. Gabanyi, P. A. Muller, L. Feighery, T. Y. Oliveira, F. A. Costa-Pinto, and D. Mucida, "Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages," *Cell*, 2016.
- [128] T. A. Branchek and M. D. Gershon, "Time course of expression of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and NADPH diaphorase activity in neurons of the developing murine bowel and the appearance of 5-hydroxytryptamine in mucosal enterochromaffin cells," *J. Comp. Neurol.*, 1989.
- [129] J. Stefulj, L. Cicin-Sain, K. Schauenstein, and B. Jernej, "Serotonin and immune response: Effect of the amine on in vitro proliferation of rat lymphocytes," *Neuroimmunomodulation*, 2001.
- [130] D. G. Folks, "The interface of psychiatry and irritable bowel syndrome," *Current Psychiatry Reports*, 2004.
- [131] F. Creed, "How do SSRIs help patients with irritable bowel syndrome?," *Gut*, 2005.
- [132] K. M. Neufeld, N. Kang, J. Bienenstock, and J. A. Foster, "Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice," *Neurogastroenterol. Motil.*, 2011.
- [133] J. M. Yano, K. Yu, P. Ann and L. Ma, "Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis," *Cell*, 2015.
- [134] L. Desbonnet, L. Garrett, G. Clarke, J. Bienenstock, and T. G. Dinan, "The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat," *J. Psychiatr. Res.*, 2008.
- [135] K. N. Browning and R. A. Travagli, "Central nervous system control of

gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions,” *Compr. Physiol.*, 2014.

- [136] C. Nasca, E. Davis, B. Bigio, C. Sandi, and B. S. McEwen, “Effects of Stress Throughout the Lifespan on the Brain and Behavior,” *Horm. Brain Behav.*, 2016.
- [137] N. Kihara, M. Fujimura, I. Yamamoto, E. Itoh, a Inui, and M. Fujimiya, “Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats.,” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001.
- [138] T. G. Dinan, S. O’Mahony and S. M. Ahmed, “Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: Plasma cytokines as a potential biomarker?,” *Gastroenterology*, 2006.
- [139] C. Tsigos and G. P. Chrousos, “Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress,” in *Journal of Psychosomatic Research*, 2002.
- [140] R. D. Moloney, L. Desbonnet, G. Clarke, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “The microbiome: Stress, health and disease,” *Mamm. Genome*, vol. 25, no. 1–2, pp. 49–74, 2014.
- [141] N. Sudo and Y. Chida, “Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice,” *J. Physiol.*, 2004.
- [142] C. Boitard, “Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice,” *Hippocampus*, 2012.
- [143] M. T. Bailey and C. L. Coe, “Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys,” *Dev. Psychobiol.*, 1999.
- [144] S. B. Abraham, D. Rubino, N. Sinaii, S. Ramsey, and L. K. Nieman, “Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: A cross-sectional study of obese subjects

and review of the literature,” *Obesity*. 2013.

- [145] M. F. Dallman, N. C. Pecoraro, and S. E. La Fleur, “Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity,” *Brain, Behavior, and Immunity*. 2005.
- [146] A. Agusti, A. Moya-Pérez and I. Campillo, “Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 Ameliorates Neuroendocrine Alterations Associated with an Exaggerated Stress Response and Anhedonia in Obese Mice,” *Mol. Neurobiol.*, 2018.
- [147] V. K. Ridaura, J.J. Faith, F. E. Rey, J. Cheng, A. E. Duncan, Kau AL *et al.*, “Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice,” *Science*, 2013.
- [148] M. Soto and C. Herzog, “Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism,” *Molecular Psychiatry*, 2018.
- [149] G. B. Rogers, D. J. Keating, R. L. Young, M. L. Wong, J. Licinio, and S. Wesselingh, “From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: Mechanisms and pathways,” *Molecular Psychiatry*. 2016.
- [150] S. C. Kleiman, H. J. Watson, E. C. Bulik-Sullivan, E. Y. Huh, L. M. Tarantino, C. M. Bulik *et al.*, “The Intestinal Microbiota in Acute Anorexia Nervosa and during Renourishment: Relationship to Depression, Anxiety, and Eating Disorder Psychopathology,” *Psychosom. Med.*, 2015.
- [151] S. E. Winter and A. J. Bäumlér, “Dysbiosis in the inflamed intestine: Chance favors the prepared microbe,” *Gut Microbes*, 2014.
- [152] F. Borgo, A. Riva, A. Benetti, M. C. Casiraghi, S. Bertelli, S. Garbossa *et al.*, “Microbiota in anorexia nervosa: The triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests,” *PLoS One*, 2017.
- [153] E. Schéle, L. Grahemo, F. Anesten, A. Halleñ, F. Bäckhed, and J. O. Jansson,



“The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system,” *Endocrinology*, 2013.

- [154] M. Lyte and S. Ernst, “Catecholamine induced growth of gram negative bacteria,” *Life Sci.*, 1992.
- [155] F. A. Duca, “Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese-prone rats,” *Diabetes*, 2014.
- [156] K. A. Kim, W. Gu, I. A. Lee, E. H. Joh, and D. H. Kim, “High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway,” *PLoS One*, 2012.
- [157] C. B. de La Serre, C. L. Ellis, J. Lee, A. L. Hartman, J. C. Rutledge, and H. E. Raybould, “Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation,” *AJP Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010.
- [158] L. Batterink, S. Yokum, and E. Stice, “Body mass correlates inversely with inhibitory control in response to food among adolescent girls: An fMRI study,” *Neuroimage*, 2010.
- [159] R. L. Goldman, “Executive control circuitry differentiates degree of success in weight loss following gastric-bypass surgery,” in *Obesity*, 2013.
- [160] T. C. Sandeep, R. Andrew, N. Z. M. Homer, R. C. Andrews, K. Smith, and B. R. Walker, “Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone,” *Diabetes*, 2005.
- [161] M. J. Meaney, D. H. Aitken, S. R. Bodnoff, L. J. Iny, J. E. Tatarewicz, and R. M. Sapolsky, “Reprinted article: Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions,” *Behav. Neurosci.*, 2013.
- [162] M. Crumeyrolle-Arias and M. Jaglin, “Absence of the gut microbiota enhances

- anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats,” *Psychoneuroendocrinology*, 2014.
- [163] J. Barouei, M. Moussavi, and D. M. Hodgson, “Effect of Maternal Probiotic Intervention on HPA Axis, Immunity and Gut Microbiota in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome,” *PLoS One*, 2012.
- [164] A. L. Miller, H. J. Lee, and J. C. Lumeng, “Obesity-associated biomarkers and executive function in children,” *Pediatric Research*. 2015.
- [165] G. Tirabassi, G. Muscogiuri, A. Colao, and G. Balercia, “Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis increases central body fat accumulation in males affected by diabetes mellitus and late-onset hypogonadism,” *Endocr. Pract.*, 2016.
- [166] M. F. Maranhão, N. M. Estella, M. E. Cury, V. L. Amigo, C. M. Picasso, A. Berberian *et al.*, “The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in obese females with binge eating disorder: a protocol for a double-blinded, randomized, sham-controlled trial,” *BMC Psychiatry*, 2015.
- [167] M. Rios, “Conditional Deletion Of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Postnatal Brain Leads to Obesity and Hyperactivity,” *Mol. Endocrinol.*, 2001.
- [168] R. Zanardini and A. Gazzoli, “Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on serum brain derived neurotrophic factor in drug resistant depressed patients,” *J. Affect. Disord.*, 2006.
- [169] F. De Vadder, D. Goncalves, J. Vinera, C. Zitoun, A. Duchamp, F. Bäckhed *et al.*, “Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits,” *Cell*, 2014.
- [170] B. B. Nankova, R. Agarwal, D. F. MacFabe, and E. F. La Gamma, “Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells - Possible relevance to autism spectrum disorders,” *PLoS One*, 2014.

- [171] A. K. El-Ansary, A. B. Bacha, and M. Kotb, "Etiology of autistic features: the persisting neurotoxic effects of propionic acid," *J. Neuroinflammation*, 2012.
- [172] P. D. Cani, "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance," *Diabetes*, 2007.
- [173] C. B. de La Serre, G. de Lartigue, and H. E. Raybould, "Chronic exposure to Low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons," *Physiol. Behav.*, 2015.
- [174] T. Poutahidis, "Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin," *PLoS One*, 2013.
- [175] T. L. Powley, R. A. Spaulding, and S. A. Haglof, "Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: Chemoreceptor and mechanoreceptor architecture," *J. Comp. Neurol.*, 2011.
- [176] R. E. Steinert and C. Beglinger, "Nutrient sensing in the gut: Interactions between chemosensory cells, visceral afferents and the secretion of satiation peptides," *Physiol. Behav.*, 2011.
- [177] M. Covasa, J. Grahn, and R. C. Ritter, "High fat maintenance diet attenuates hindbrain neuronal response to CCK," *Regul. Pept.*, 2000.
- [178] J. A. Bravo and C. F. Cryan, "Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011.
- [179] M. Walpoth, "Repetitive transcranial magnetic stimulation in bulimia nervosa: Preliminary results of a single-centre, randomised, double-blind, sham-controlled trial in female outpatients," *Psychother. Psychosom.*, 2007.
- [180] C. De Filippo, "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010.

- [181] T. G. Dinan, R. M. Stilling, C. Stanton, and J. F. Cryan, "Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior," *J. Psychiatr. Res.*, 2015.
- [182] M. Martin, "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads," *EMBnet.journal*, 2011.
- [183] E. M. Glass and F. Meyer, "The Metagenomics RAST Server: A Public Resource for the Automatic Phylogenetic and Functional Analysis of Metagenomes," *Handb. Mol. Microb. Ecol. I Metagenomics Complement. Approaches*, 2011.
- [184] P. D. Schloss and J. Handelsman, "Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005.
- [185] H. C. The, T. A. Tran, "Assessing gut microbiota perturbations during the early phase of infectious diarrhea in Vietnamese children," *Gut Microbes*, 2018.
- [186] A. Dhariwal, J. Chong, S. Habib, I. L. King, L. B. Agellon, and J. Xia, "MicrobiomeAnalyst: A web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data," *Nucleic Acids Res.*, 2017.
- [187] S. H. Lisanby and R. H. Belmaker, "Animal models of the mechanisms of action of repetitive transcranial magnetic stimulation (RTMS): Comparisons with electroconvulsive shock (ECS)," in *Depression and Anxiety*, 2000.
- [188] M. Hallett, "Transcranial Magnetic Stimulation: A Primer," *Neuron*. 2007.
- [189] K. S. Barth and P. M. O'Neil, "Food cravings and the effects of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation using an improved sham condition," *Front. Psychiatry*, 2011.
- [190] J. I. Hudson, E. Hiripi, H. G. Pope, and R. C. Kessler, "The Prevalence and Correlates of Eating Disorders in the National Comorbidity Survey Replication," *Biol. Psychiatry*, 2007.

- [191] J. Arcelus, A. J. Mitchell, J. Wales, and S. Nielsen, "Mortality rates in patients with anorexia nervosa and other eating disorders: A meta-analysis of 36 studies," *Arch. Gen. Psychiatry*, 2011.
- [192] B. Figner and D. Knoch, "Lateral prefrontal cortex and self-control in intertemporal choice," *Nat. Neurosci.*, 2010.
- [193] R. A. Montenegro, A. H. Okano, F. A. Cunha, J. L. Gurgel, E. B. Fontes, and P. T. V. Farinatti, "Prefrontal cortex transcranial direct current stimulation associated with aerobic exercise change aspects of appetite sensation in overweight adults," *Appetite*, 2012.
- [194] C. J. Lowe, C. Vincent, and P. A. Hall, "Effects of Noninvasive Brain Stimulation on Food Cravings and Consumption: A Meta-Analytic Review," *Psychosomatic Medicine*. 2017.
- [195] K. Dunlop, "Increases in frontostriatal connectivity are associated with response to dorsomedial repetitive transcranial magnetic stimulation in refractory binge/purge behaviors," *NeuroImage Clin.*, vol. 8, pp. 611–618, 2015.
- [196] M. Walpoth and A. Hausmann, "Repetitive transcranial magnetic stimulation in bulimia nervosa: Preliminary results of a single-centre, randomised, double-blind, sham-controlled trial in female outpatients," *Psychother. Psychosom.*, 2008.
- [197] A. Gay and T. Sigaud, "A Lack of Clinical Effect of High-frequency rTMS to Dorsolateral Prefrontal Cortex on Bulimic Symptoms: A Randomised, Double-blind Trial," *Eur Eat Disord Rev*, 2016.
- [198] M. B. Müller, N. Toschi, A. E. Kresse, A. Post, and M. E. Keck, "Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain," *Neuropsychopharmacology*, 2000.

- [199] B. Estour and F. Lang, "Hormonal profile heterogeneity and short-term physical risk in restrictive anorexia nervosa," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2010.
- [200] M. E. Gluck, A. Geliebter, J. Hung, and E. Yahav, "Cortisol, hunger, and desire to binge eat following a cold stress test in obese women with binge eating disorder," *Psychosom. Med.*, 2004.
- [201] K. A. Dienes, N. A. Hazel, and C. L. Hammen, "Cortisol secretion in depressed, and at-risk adults," *Psychoneuroendocrinology*, 2013.
- [202] T. Zyss, B. Witkowska, and J. Jarosz, "Repetitive transcranial magnetic stimulation: EEG, serum prolactin and cortisol studies in humans," *Psychiatr. Pol.*, 1995.
- [203] D. W. Hedges and D. Ferguson, "Transcranial magnetic stimulation (TMS) effects on testosterone, prolactin, and corticosterone in adult male rats," *Biol. Psychiatry*, 2002.
- [204] M. S. George, "Transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression," *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010.
- [205] R. Giordano and A. Picu, "Neuroregulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in humans: Effects of GABA-, mineralocorticoid-, and GH-secretagogue-receptor modulation," *TheScientificWorldJournal*. 2006.
- [206] D. J. L. G. Schutter and J. van Honk, "An endocrine perspective on the role of steroid hormones in the antidepressant treatment efficacy of transcranial magnetic stimulation," *Psychoneuroendocrinology*. 2010.
- [207] H. Markram, M. Toledo-Rodriguez, Y. Wang, A. Gupta, G. Silberberg, and C. Wu, "Interneurons of the neocortical inhibitory system," *Nature Reviews Neuroscience*. 2004.
- [208] F. Bäckhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, and J. I. Gordon, "Host-bacterial mutualism in the human intestine," *Science*. 2005.

- [209] P. B. Eckburg, "Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora," *Science* (80-. ), 2005.
- [210] R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, and J. I. Gordon, "Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity," *Nature*, 2006.
- [211] A. Ait-Belgnaoui and H. Durand, "Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats," *Psychoneuroendocrinology*, 2012.
- [212] T. L. Powley, X. Y. Wang, E. A. Fox, R. J. Phillips, L. W. C. Liu, and J. D. Huizinga, "Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus," *Neurogastroenterol. Motil.*, 2008.
- [213] E. Barrett, R. P. Ross, P. W. O'Toole, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton, " $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine," *J. Appl. Microbiol.*, 2012.
- [214] F. Guarner and J. R. Malagelada, "Gut flora in health and disease," *Lancet*. 2003.
- [215] N. R. Shin, T. W. Whon, and J. W. Bae, "Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota," *Trends in Biotechnology*. 2015.
- [216] R. E. Ley, F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon, "Obesity alters gut microbial ecology," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005.
- [217] W. Wang, Y. Zhu, and X. Chen, "Selective Imaging of Gram-Negative and Gram-Positive Microbiotas in the Mouse Gut," *Biochemistry*, 2017.
- [218] D. E. Almonacid, L. Kraal, F. J. Ossandon, Y. V. Budovskaya, J. P. Cardenas, E. M. Bik *et al.*, "16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome," *PLoS One*, 2017.

- [219] F. H. Karlsson, "Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control," *Nature*, 2013.
- [220] F. Drissi, D. Raoult, and V. Merhej, "Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals," *Microbial Pathogenesis*. 2017.
- [221] S. H. Duncan, G. E. Lopley, G. Holtrop and J. Ince, "Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss," *Int. J. Obes.*, 2008.
- [222] A. Schwartz, T. Daras and S. Beijer, "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects," *Obesity*, 2010.
- [223] A. Naseribafrouei and K. Hestad, "Correlation between the human fecal microbiota and depression," *Neurogastroenterol. Motil.*, 2014.
- [224] I. B. Jeffery, P. W. O'Toole, L. Öhman and M. J. Claesson, "An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota," *Gut*, 2012.
- [225] S. Furukawa, T. Fujita and Y. Yamada, "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome," *J. Clin. Invest.*, 2004.
- [226] D. K. Naritoku, W. J. Terry, and R. H. Helfert, "Regional induction of fos immunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve," *Epilepsy Res.*, 1995.
- [227] K. Molly, I. De Smet, L. Nollet, M. Vande Woestyne, and W. Verstraete, "Effect of lactobacilli on the ecology of the gastro-intestinal microbiota cultured in the SHIME reactor," *Microb. Ecol. Health Dis.*, 1996.
- [228] W. Wang, L. Chen and R. Zhou, "Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease," *J. Clin. Microbiol.*, 2014.
- [229] S. Jhangi, R. Gandhi, B. Glanz, S. Cook, P. Nejad, W. Doyle *et al.*, "Increased Archaea Species and Changes with Therapy in Gut Microbiome of Multiple



Sclerosis Subjects,” *American Academy of Neurology*. 2014.

- [230] J. D. J. Guerrero-García, L. Carrera-Quintanar, R. I. López-Roa, A. L. Márquez-Aguirre, A. E. Rojas-Mayorquín, and D. Ortuño-Sahagún, “Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines,” *Mediators of Inflammation*. 2016.
- [231] M. D. Saemann, G. A. Böhmig, C. H. Osterreicher, H. Burtscher, O. Parolini, C. Diakos *et al.*, “Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production,” *FASEB J.*, 2000.
- [232] I. Kakucska, M. L. Tappaz, G. Gaal, M. E. Stoeckel, and G. B. Makara, “Gabaergic innervation of somatostatin-containing neurosecretory cells of the anterior periventricular hypothalamic area: A light and electron microscopy double immunolabelling study,” *Neuroscience*, 1988.
- [233] P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon, “An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest,” *Nature*, 2006.
- [234] C. Cailotto, P. J. Gomez-Pinilla, L. M. Costes, J. Van der Vliet, M. Giovangiulio, A. Némethova *et al.*, “Neuro-anatomical evidence indicating indirect modulation of macrophages by vagal efferents in the intestine but not in the spleen,” *PLoS One*, 2014.
- [235] K. N. Browning, S. Verheijden, and G. E. Boeckxstaens, “The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation,” *Gastroenterology*. 2017.
- [236] S. C. Bischoff, “Food allergy and eosinophilic gastroenteritis and colitis,” *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2010.

## 10. ETİK KURUL ONAYI



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.35292  
Konu : Etik Kurulu Kararı

31/08/2018

Sayın Doç. Dr. Süleyman YILDIRIM

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Repetitif Manyetik Stimulasyon (rTMS) Frekans ve Uygulama Bölge Farklılıklarının Sağlıklı Farelerin Kilo Değişimi ve Mikrobiyotası Üzerine Etkileri” 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 31.08.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 42AC9014X1 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

## 10. ETİK KURUL ONAYI (devamı)



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
31/08/2018	48		Doç. Dr. Süleyman YILDIRIM

“Repetitif Manyetik Stimulasyon (rTMS) Frekans ve Uygulama Bölge Farklılıklarının Sağlıklı Farelerin Kilo Değişimi ve Mikrobiyotası Üzerine Etkileri” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi:** 14 Eylül 2018-3 ay

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. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

## 11. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	Nur Damla	Soyadı	KORKMAZ
-----	-----------	--------	---------

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı	2019
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
Lise	Silivri Hasan-Sabriye Gümüş Anadolu Lisesi	2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*					
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok İyi					
Yabancı Dil Sınav Notu <input type="checkbox"/>								
KPDS	YÖKDİL/ YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	72,5	6,5 /9						

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,8	72,6	74,3
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
SPSS	orta
Microsoft Office	orta