



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KALBE ÖZGÜ VAGAL DUYU NÖRONLARININ MOLEKÜLER
VE FONKSİYONEL İNCELENMESİ**

YUSUF ENES KAZCI

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVI

İkinci Tez Danışmanı
Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL - 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Yusuf Enes KAZCI
Tez Başlığı : Kalbe Özgü Vagal Duyu Nöronlarının Moleküler ve
Fonksiyonel İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 28.07.2022

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

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. Esra ÇAĞAVİ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof.Dr. Celal AKDENİZ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof. Dr. Bülent AHISHALI	Koç Üniversitesi	
Doç.Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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.

Yusuf Enes KAZCI

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesini aktaran tez danışmanım Doç. Dr. Esra Çağavi'ye,

Doktora çalışmam süresince bana destek olan ve sinir bilim alanındaki değerli bilgilerini benimle paylaşan ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Tezimin izleme komitesinde bulunan ve çalışmalarına eleştirel katkı sağlayan Doç. Dr. Bilal Kerman'a,

Kıymetli vakitlerini ayırıp tez savunma jürimde bulunan ve yorum ve değerlendirmeleriyle bu tez çalışmasının iyileştirilmesine katkı sağlayan Doç. Dr. M. Yalçın Günal, Prof. Dr. Bülent Ahışalı, Prof. Dr. Celal Akdeniz ve Dr. Öğr. Üyesi. Serçin Karahüseyinoğlu'na,

Altı yıllık doktora çalışmalarım boyunca bana destek olan Esra Çağavi Lab'daki başta Sevilay Şahoğlu Göktaş, Aylın Nebol, Behnaz Karadoğan, Tuba Akgül Çağlar ve Mehmet Uğurcan Turhan olmak üzere tüm değerli meslektaşlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. Sinir Sistemi	7
4.2. Duyu Sinir Sistemi	9
4.2.1. Kalp sinir sisteminin duyu bileşenleri.....	10
4.2.1. Arka Kök Gangliyon (AKG).....	10
4.2.2. Noduz Gangliyon (NG).....	12
4.2.2.1. Phox2b transkripsiyon faktörünün NG nöronlarının embriyonik gelişimindeki rolü.....	12
4.2.2.1.1. Cre-LoxP sistemi ve Phox2b-Cre transgenik hayvanlar	17
4.2.2.2. Kalbe özgü NG nöronları	18
4.3. Kardiyovasküler Sistem	20
4.3.1. Kalbin elektrofizyolojik özellikleri ve aksiyon potansiyelin oluşması	22
4.3.2. Elektrokardiyografi (EKG)	23
4.4. Kalp ve Sinir Sistemi İlişkisi.....	25
4.4.1. Kalp işlevini kontrol eden motor sinirler	26
4.4.2. Kardiyak sinir sisteminin hiyerarşik yapısı.....	27

4.4.3. Kardiyak sinir sistemi ve vagal uyarım terapileri	29
4.4.4. Kalbi saran sinir ağının işlevini araştıran çalışmalar	30
4.4.5. Kalbi saran duyu sinir ağı ve MI.....	32
4.4.5.1. MI'nın oluşumu.....	32
4.4.5.2. İskemik hasar sonrası kalbi saran duyu sinirlerinin yapı ve işlevine etkileri	33
4.5. Kalp İşlevini Sinirsel Düzenlemesini Araştırmada Optogenetik Yöntemler ..	35
4.5.1. Optogenetik yönteminin genel özellikleri.....	35
4.5.2. Sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde optogenetik uygulamalar	36
4.6. Tüm Kalpte Sinir Ağının Görüntülemesi.....	39
4.6.1. Doku şeffaflaştırma yöntemleri.....	39
5. MATERYAL VE METOT	41
5.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar.....	42
5.2 Cihazlar	47
5.3. Deney Hayvanları.....	48
5.4. Transgenik Hatların Çoğaltılması, Çaprazlanması ve Genotipleme	48
5.5. Virüs Üretimi	50
5.6. İmmün Boyama.....	51
5.7. Beyin Sapı ve Spinal Kord'dan Kesit Alma	52
5.8. NG İzolasyonu	52
5.9. SG İzolasyonu	53
5.10. AKG İzolasyonu.....	53
5.11. Doku Şeffaflaştırma	54
5.11.1. Cubic şeffaflaştırma protokolü.....	54
5.11.2. iDISCO Şeffaflaştırma Protokolü	54
5.12. Mikroskop ile Görüntüleme	55

5.13. Sinir Çapı Analizi.....	56
5.14. Kalbin MI Modellemesinin Oluşturulması	56
5.15. Vagal Duyu Sinirlerinin Optogenetik Uyarımı	58
5.16. İstatistiksel Analiz.....	58
6. BULGULAR.....	60
6.1. Tez Çalışmasında Kullanılacak Bütün Cre-LoxP İkili Transgenik Hatların Üretilmesi.....	60
6.2. AAV Tabanlı Viral Yöntemler İle NG Nöronlarının Raporcu Proteinler ile İşaretlenmesi	62
6.3. Phox2b-Cre::TdTomato Anlatımının Genel Karakterizasyonu	65
6.3.1. Periferik gangliyonlarda Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin incelenmesi 66	
6.3.2. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin beyin sapında karakterizasyonu	70
6.4. Transgenik Fare Kalplerinde İmmün Boyama ve Görüntüleme.....	71
6.4.1. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin kalbe dallanan vagal sinir ağının görüntülenmesindeki yeterliliğinin incelenmesi	71
6.4.2. Standart Alexa Fluor sekonder antikorların bütün kalp görüntülenmesindeki yeterliliğinin değerlendirilmesi	72
6.4.3. Alexa Fluor Plus sekonder antikorlar kullanılarak bütün kalp sinir ağının görüntülenmesi.....	75
6.4.4. Uygulanan Alexa Fluor PLUS antikorları ve mikroskop yaklaşımı sonucu tespit edilebilen kalp vagal afferent sinir derinliğinin incelenmesi	82
6.4.5. iDISCO ve Cubic kalp doku şeffaflaştırma yöntemleri kullanılarak görüntülenebilen vagal afferent sinir derinliğinin incelenmesi.....	84
6.5. Phox2b-Cre::TdTomato İfade Eden Sinir Ağının Kalp Boyunca Görüntülenmesi.....	90
6.5.1. Kalbi saran vagal duyu sinir ağının bütün kalp ölçeğinde tespit edilmesi	91

6.5.1.1 Kalbi saran vagal duyu sinir ağı deseninin farklı kalplerde incelemesi	92
6.5.1.2. Kalp vagal duyu sinirlerinin çap analizi.....	94
6.5.1.2.1. Kalbi saran sinirlerde çap analiz metodunun optimizasyonu.....	94
6.5.1.2.2. Kalp vagal duyu sinir liflerinin dorsal ve ventral yüzeyde karşılaştırmalı çap analizi.....	103
6.5.2 Atriyum ve ventriküllerdeki vagal afferent sonlanma morfolojilerinin detaylı incelemesi.....	105
6.5.3. Vagal duyu sinir liflerinin kalp damarları üzerindeki dallanma deseninin incelenmesi.....	110
6.6. Phox2b-Cre::Tdtomato İfade Eden Vagal Duyu Sinirlerinin Diğer Kardiyak Sinirler ile Birlikte Kalpte İncelenmesi.....	112
6.6.1. Bütün kalp sinir ağının TUJ1 genel nöron belirteci ile incelenmesi.....	112
6.6.2. Vagal afferentlerin noradrenerjik sinir lifleri ile birlikte kalp boyunca incelenmesi.....	115
6.7. Miyokardiyal İnfarktüs Sonrası Vagal Duyu Sinir Ağının Bütün Kalpte İncelenmesi	124
6.7.1. Kalpteki vagal duyu sinirlerinin MI sonrası yeniden şekillenmesinin detaylı incelemesi.....	124
6.8. Phox2b-Cre İfade Eden Periferik Sinir Demetinin Vagal Duyu Kimliğinin Optogenetik uyarım Yöntemi ile İşlevsel Doğrulaması.....	119
6.8.1. Phox2b-Cre ifade eden vagal sinir demetinin depolarizasyonunun kalp fonksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi.....	120
7. TARTIşMA	127
8. SONUÇ.....	143
9. KAYNAKLAR.....	144
10. ETİK KURUL ONAYI.....	153
11. ZGEMİş.....	155

KISALTMALAR LİSTESİ

2D:	2 boyutlu
AAV:	Adeno-assosiye virüs
AKG:	Arka kök gangliyon
AP:	Areapostremma
AS:	Airyscan
ATP:	Adenozin trifosfat
AV:	Atriyoventriküler
BPM:	Dakikada atım sayısı
Ca²⁺:	Kalsiyum
CAG:	Tavuk beta-Aktin
CGRP:	Kalsitonin gen ilişkili peptid
CHAT:	Kolin asetil transferaz
Chr2:	Kanal rodopsin
Cl:	Klorür
CUBIC:	Açık, engelsiz beyin/vücut görüntüleme kokteylleri ve hesaplamalı analiz
ÇSS:	Çevresel sinir sistemi
DMX:	Vagusundorsal motor nükleusu
EKG:	Elektrokardiyografi
GPCR:	G proteini kenetli reseptör
HEK:	Insan embriyonik böbrek hücresi
JG:	Juguler gangliyon
K⁺:	Potasyum
KI:	Kırılma indeksi
LAD:	Sol ön inen arter
LSM:	Işık tarama mikroskobu
MI:	Miyokard infarktüs
MP:	Maksimum projeksiyon
MSS:	Merkezi sinir sistemi
mV:	Milivolt
Na⁺:	Sodyum

NA:	Nükleus ambiguus
NF200:	Nörofilament 200
NG:	Nodoz gangliyon
NMDA:	N-methyl-D-aspartate
Npy2r:	Neuropeptide Y receptor Y2
NTS:	Nucleustractussolitaris
OSS:	Otonom sinir sistemi
P2RX2/3:	Pürinerjik reseptör P2X2/3
P2ry1:	Pürinerjik reseptör P2Y1
PGP9.5:	Protein gen ürünü 9.5
Phox2b:	Paired-likehomeobox 2b
RFP:	Kırmızı floresan proteini
RNA:	Ribonükleik asit
RyR:	Ryanodine reseptör
SA:	Sinoatrial
SP:	Substance P
TdTomato:	Tandem dimerTomato.
TH:	Tirozin hidroksilaz
TRPV1:	Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi V üyesi 1
Vglut2:	Veziküler glutamat taşıyıcısı 2
YFP:	Sarı floresan proteini

TABLolar LİSTESİ

Tablo 5.1.1	Transgenik farelerin genotiplenmesinde kullanılan sarflar.....	42
Tablo 5.1.2.	<i>In vivo</i> operasyonlarda kullanılan alet, sarf ve kimyasallar	43
Tablo 5.1.3.	İmmun boyamalarda ve görüntülemelerde kullanılan malzemeler	44
Tablo 5.1.4.	Görüntülemelerde kullanılan antikolar	45
Tablo 5.1.5.	Bakteri çoğaltma ve virüs yapımında kullanılan malzemeler	46
Tablo 5.2.1.	Analiz ve görüntülemelerde kullanılan cihaz ve yazılımlar	47
Tablo 5.4.1.	Transgenik hatların genotiplenmesinde kullanılan primerler	49
Tablo 5.4.2.	Genotipleme PCR protokolü	49
Tablo 15.11.1.	Virüs üretiminde kullanılan vektörler	50
Tablo 5.6.1.	İmmünokimyasal boyamalarda kullanılan solüsyonların içerikleri	51
Tablo 5.7.1.	CUBIC işleminde kullanılan solüsyonlar.....	54
Tablo 5.14.1.	Solunum cihazında kullanılan değer tablosu.	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sistemi arasındaki ilişki.....	8
Şekil 4.1.2. Nöronların yapısal olarak sınıflandırılması.	9
Şekil 4.2.1.1. Kalbin ve perikardın duyuşal innervasyonu.	11
Şekil 4.2.2.1.1. Noduz ve Jugular gangliyonların görünümü.	13
Şekil 4.2.2.1.2. Kupari J. ve ark. tarafından yapılan vagal gangliyonların tek hücre RNA dizilemesi sonucu.....	15
Şekil 4.2.2.1.3. Yetişkin fare AKG nöronlarında Phox2b gen ifadesinin eksikliği ..	16
Şekil 4.8.1.Cre-LoxP sistemi	17
Şekil 4.3.1.1. Kalp kası hücrelerinde görülen aksiyon potansiyeli evreleri.....	23
Şekil 4.3.2.1. Bölgesel kardiyak elektriksel aktivite ile yüzey elektrokardiyogramı arasındaki ilişki.	24
Şekil 4.3.2.2. MI sonrası EKG bulgularında ST segmentte görülen değişimler	25
Şekil 4.5.1. Kardiyak sinir sistemlerinin anatomisi ve dağılımı	26
Şekil 4.6.1.1. Işığa duyarlı Kanalrodopsin ve halorodopsin proteinlerinin çalışma prensipleri.....	36
Şekil 4.6.1.1. Doku şeffaflaştırma yöntemleri.	40
Şekil 5.1. Kalbi saran Phox2b-Cre::tdTomato ifade eden vagal duyu sinirlerinin anti-RFP boyaması ile gösterimi.	42
Şekil 5.9.1. Fareden Stellate ganglion izolasyonu.	53
Şekil 5.14.1. Farelerde Miyokard İnfarktüs modeli oluşturulması.	58
Şekil 6.1.1. Phox2b::tdTomato ikili transgenik farelerin genotipleme sonuçları.	61
Şekil 6.1.2. Phox2b-Cre::chr2-eYFP heterozigot farenin genotip sonucu.....	62
Şekil 6.2.1. AAV-flex-eYFP virüsü ile <i>in vitro</i> enfekte edilmiş AKG nöronlarının temsili görünümü..	63
Şekil 6.2.2. AAV-flex-eYFP virüsü enfekte edilmiş NG nöronlarının enjeksiyon sonrası 50. günde ki görüntüsü.....	64
Şekil 6.2.3. AAV_flex_eYFP virüsü enjekte edilen Vglut2-Cre transgenik farenin NG nöronlarının enjeksiyon sonrası görüntüleri.....	64
Şekil 6.2.4. AAV_tdtomato virüsü ile enfekte edilmiş HEK hücrelerinin 6. gün sonundaki görünümü.	65

Şekil 6.3.1.1. Kalp sinirlerini barındıran periferik gangliyonlarda Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin görünümü.....	67
Şekil 6.3.1.2. Chat-Cre::tdTomato kalpte anti-RFP ile immün boyanmış Chat-Cre+ parasempatik sinirlerin dorsal yüzeydeki görüntüsü.....	69
Şekil 6.3.1.3. Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyinde kardiyak ganglion görünümü	70
Şekil 6.3.2.1. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin beyin sapı ve spinal kord yatay (transverse) kesitlerinde görünümü.....	71
Şekil 6.4.1.1. Phox2b-Cre-tdTomato kalpte endojen tdTomato sinyali	72
Şekil 6.4.2.1. Tuj-1 ve Alexa Fluor 488 ile boyalı vahşi tip fare kalbinin ventralateral ve dorsolateral görüntüsü	73
Şekil 6.4.2.2. Tuj-1 ve Alexa Fluor 488 ile boyalı vahşi tip fare kalbinin dorsal ventrikül yüzeyinin 20X objektif ile çekilmiş görüntüsü.....	74
Şekil 6.4.3.1. Tuj-1 boyalı vahşi tip kalbin dorsal ve ventral yüzeyinin 5X objektif ile çekilmiş görüntüsü..	76
Şekil 6.4.3.2. NF200 ile boyalı vahşi tip fare kalbinin Alexa Fluor Plus 488 uygulaması sonrası 5X objektif ile alınmış görüntüsü.	77
Şekil 6.4.3.3. Alexa Fluor ve Alexa Fluor PLUS sekonder antikorların PGP9.5 boyalı kalp ventrikülünde karşılaştırılmalı görünümü.....	78
Şekil 6.4.3.4. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal ve ventral yüzeyindeki vagal duyu sinir ağının 5 görüntüsü.....	79
Şekil 6.4.3.5. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalp ventrikülünde vagal duyu sinirlerinden gelen endojen tdTomato sinyalinin anti-RFP ve Alexa Fluor PLUS 647 ile immün boyama sonrası elde edilen sinyal ile karşılaştırılmalı görünümü.	80
Şekil 6.4.4.1. Phox2b-Cre::tdTomato kalbinde epikardiyum ve kısmi miyokard boyunca nodoz vagal innervasyonları.....	83
Şekil 6.4.5.1. Tuj-1 boyalı vahşi tip kalbin iDisco protokolü ile şeffaflaştırma protokolü uygulaması görüntüleri.	84
Şekil 6.4.5.2. Vahşi tip fare kalbinin tüm sinir ağının Tuj-1 antikor boyaması.....	86
Şekil 6.4.5.3. Tuj-1 boyalı vahşi tip kalbin Cubic şeffaflaştırma protokolü sonrası sinyalin 3 boyuttaki derinliği.	87

Şekil 6.4.5.4. Phox2b-Cre:tdTomato transgenik fare kalbinin anti-RFP boyalı vagal duyu sinirlerinin Cubic doku şeffaflaştırma işlemi sonrası görünümü.	88
Şekil 6.4.5.5. Cubic yöntemi ile şeffaflaştırmanın 12. gününde Phox2b-Cre::tdTomato kalpte çiçek sonlanmasının derinliğe bağlı renklendirilmiş görünümü.	89
Şekil 6.5.1.1. Phox2b-Cre::tdTomato kalpte vagal duyu sinir ağının ventral ve dorsal görüntüsü.....	91
Şekil 6.5.1.1.1. Phox2b-Cre::tdTomato ifade eden vagal duyu sinirlerinin farklı kalplerin dorsal yüzeyindeki görüntüleri.	93
Şekil 6.5.1.2.1.1. PGP9.5 pan-nöron belirteci ile boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş görüntüsünün neutube 1.0 programı ile analizi.....	94
Şekil 6.5.1.2.1.2. PGP9.5 pan-nöron belirteci ile boyalı vahşi tip fare kalbinin görüntüsünde neutube 1.0 programı ile tanımlanan sinir dalları.....	95
Şekil 6.5.1.2.1.3. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin görüntüsünde neutube 1.0 programı ile tanımlanan sinir liflerinin kalınlıklarına göre Matlab kodu ile renklendirilmiş görünümü.....	96
Şekil 6.5.1.2.1.4. Otofloresan sinyalin neutube 1.0 programı ile yanlış şekilde sinir eğrisi olarak tanımlanması.	96
Şekil 6.5.1.2.1.5. Otofloresan sinyalinin neutube 1.0 programındaki binarizasyon işlemi ve tanımlanan sinir ağına ola etkisinin görünümü.....	98
Şekil 6.5.1.2.1.6. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinde sinir dallarının kalınlıklarına göre renklendirilmiş görünümü.....	99
Şekil 6.5.1.2.1.7. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinde neutube 1.0 programı ile analiz sonucu tanımlanan sinir dalları.	100
Şekil 6.5.1.2.1.8. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinde neutube 1.0 programı ile tanımlanan sinir dalları ve bunların Matlab’da birleştirilmiş bütüncül versiyonu...	101
Şekil 6.5.1.2.1.9. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalp sinir ağı görüntüsünün 8 kare halinde veya bütün haldeki versiyonu kullanılarak yapılan sinir çapı analizi sonuçlarının karşılaştırmalı gösterimi.	101
Şekil 6.5.1.2.2.1. Kalbi saran anti-RFP boyalı vagal duyu sinirlerin dorsal ve ventral görüntüsü.....	103
Şekil 6.5.1.2.2.2. Farklı Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde vagal duyu sinirlerinin kalınlık analizi sonuçları.	104

Şekil 6.5.2.1. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinde atriyumlardaki vagal duyu sinir dallanmasının ve sonlanma biçimlerinin detaylı gösterimi.....	105
Şekil 6.5.2.2. Atriyumlarda vagal afferent sonlanmalarının ilave gösterimi.....	107
Şekil 6.5.2.3. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinde ventriküllerdeki vagal duyu sinir dallanmasının ve sonlanma biçimlerinin detaylı gösterimi.....	108
Şekil 6.5.2.4. Ventrikül dorsal ve ventral yüzeylerindeki vagal afferent sonlanmalarının ilave gösterimi.	109
Şekil 6.5.3.1. Vagal afferentlerin koroner sinüs inervasyonu ve sonlanmaları.	110
Şekil 6.6.1.1. Bütün sinirleri görüntülemek için üç farklı pan-nöron berliртеçi ile boyanmış vahşi tip kalplerin görüntülerinin karşılaştırmalı incelemesi.	112
Şekil 6.6.1.2. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal yüzeyinin anti-RFP boyalı vagal afferent ve TUJ-1 boyalı genel sinir liflerinin görüntüsü.....	113
Şekil 6.6.1.3. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal yüzeyinin anti-RFP boyalı vagal afferent ve TUJ-1 boyalı genel sinir liflerinin 20X görüntüleri	114
Şekil 6.6.2.1. Vahşi tip fare kalbindeki noradrenerjik sinir ağının anti-TH boyaması ile dorsal yüzeydeki görüntüsü.....	116
Şekil 6.6.2.2. Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyindeki vagal duyu sinirlerinin anti-TH boyalı noradrenerjik sinir lifleri ile birlikte görüntülenmesi...	117
Şekil 6.6.2.3. Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyinde TH+ ve vagal duyu sinirlerinin yüksek magnifikasyon	118
Şekil 6.7.1.1. Phox2b-Cre::chr2-eYFP farenin NG nöronlarında kanarodopsin-eYFP birleşik iyon kanalından gelen endojen eYFP sinyalinin hücre ve akson zarlarında 20X objektif ile alınan görüntüsü.....	120
Şekil 6.7.1.2. Trake yanından vagal demetin optogenetik uyarımını gösteren şema	121
Şekil 6.7.1.3. Optogenetik uyarım ve eşzamanlı EKG kayıt düzeneği.....	121
Şekil 6.7.1.4. Optogenetik uyarım parametrelerinin şematik gösterimi.	122
Şekil 6.7.1.5. Phox2b-Cre::chr2-eYFP farenin vagal demetinin optogenetik uyarımının eşzamanlı kaydedilen EKG üzerindeki etkisi.....	123
Şekil 6.8.1.2. Miyokardiyal İnfarktüs sonrası vagal duyu sinir ağındaki yeniden şekillenmenin detaylı karakterizasyonu.	125

Şekil 6.8.1.3. Başka bir kalpte MI sonrası vagal duyu sinir ağındaki yeniden şekillenmenin detaylı karakterizasyonu. 126

Şekil 7.1. Kalp sinir sisteminin tüm birimlerinin kalpten beyin korteksine doğru uzanan hiyerarşik yapısı. 137



1. ÖZET

KALBE ÖZGÜ VAGAL DUYU NÖRONLARININ MOLEKÜLER VE FONKSİYONEL İNCELENMESİ

Kalp, geniş sinir ağı ile örülmüş bir organdır ve işlevi, otonom sinir devreleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Miyokard İnfarktüsü (MI) benzeri patolojiler dolayısıyla, kardiyak sinirler, kalp rahatsızlıklarında risk oluşturan yapısal ve işlevsel bir yenilenme geçirir. Kardiyak sinirlerin motor bileşeni iyi tanımlanmasına rağmen, kalbin duyu sinir ağı ayrıntılı olarak tanımlanmamıştır. Önemi düşünüldüğünde, kalp üzerinde vagal duyu dallanmasının kapsamlı bir tasvirinin yapılması, iskemi sonrası ve yapısal hasar olan durumlarda oluşan sempatik aşırı uyarılma ve vagal geri çekilme gibi otonomik dengesizliklerin ayrıntılı tanımlanmasını sağlayacaktır. Bu tez kapsamında, fare kalbinin tamamını saran vagal duyu sinir liflerini görüntülemek için Phox2b transkripsiyon faktörünün sadece nodoz gangliyon nöronlarına özgü ifadesi kullanıldı. Üretilen Phox2b-Cre::tdTomato transgenik fare hatları kullanılarak vagal afferent sinir ağı 200 µm derinliğinde ve daha önce elde edilmemiş bir çözünürlük ile bütün kalp düzeyinde haritalandı. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal ve ventral yüzeylerinde, vagal duyu sinir ağının ayrıntılı dağılımı ve farklı vagal duyu sonlanma tipleri tanımlandı. Atriyum, ventrikül yüzeylerinde ve kalp damarları boyunca farklı duyu sinir liflerinin dallanma desenleri ve sonlanma tiplerinin kalp odacıklarına özgü mevcudiyetleri karşılaştırmalı incelendi. Sinir lifi izleme analizi ile kalbin dorsal ve ventral yüzeyleri boyunca 2.5-30 µm aralığında çaplara sahip vagal afferent liflerin dağılımı ve yaygınlığı ölçüldü. Vagal afferentlerin atriyumlar ve ventriküller üzerinde çiçek ve uç-ağlar benzeri sonlanmalar oluşturduğu gösterildi. İlâveten sadece ventriküllerde kas içi dizi benzeri sonlanmalar gözlemlendi. Ayrıca, MI sonrası kalplerde iskemik alan çevresinde vagal duyu sinirlerinin akson filizleri oluşturarak yapısal yeniden modelleme geçirdiğini gösterdik. Bu bulgular, vagal duyu yeniden şekillenmesinin otonomik dengesizlikler ve kardiyak aritmilerin oluşumu üzerindeki etkisine ilişkin anlayışımızı geliştirerek ileriye dönük daha etkili sinir uyarım tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Anahtar kelimeler: Kalp, Kardiyak afferent, Miyokard infarktüs, Sinir sonlanması, Vagus.

*Bu araştırma TÜBİTAK 1001Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 219S332 no.lu Proje kapsamında desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

MOLECULAR AND FUNCTIONAL INVESTIGATION OF HEART SPECIFIC VAGAL SENSORY NEURONS

The heart is an organ with an extensive neural network, and its function is tightly coordinated by autonomic neural circuits. After pathological events such as Myocardial Infarction (MI), cardiac nerves undergo a structural and functional remodeling that contributes to cardiac ailments. Although the motor component of the cardiac nerves is well defined, the sensory neural network of the heart has not been described in detail. Given its importance, a comprehensive depiction of vagal sensory branching over the entire heart would allow better identification of autonomic imbalances manifesting as sympathetic overstimulation and vagal withdrawal in post-ischemic situations. To this end, we mapped the vagal sensory nerve fibers innervating the entire mouse heart with unprecedented resolution. Using the Phox2b-Cre::tdTomato transgenic line, we described the detailed distribution of the vagal sensory neural network and different types of vagal sensory terminations on the heart's dorsal and ventral surfaces. With nerve fiber tracing analysis, we measured the distribution and prevalence of vagal afferent fibers with varying diameters along the dorsal and ventral surfaces of the heart. We showed that vagal afferents form terminals on the atria and ventricles such as flower-spray and end-nets. Vagal afferents formed intramuscular array-like terminations exclusively in the ventricles. We also showed that vagal afferents undergo structural remodeling by forming nerve sprouts around the infarct area in post-MI hearts. These findings may contribute to the development of more effective nerve stimulation therapies prospectively by improving our understanding of the potential impact of vagal sensory remodeling on the occurrence of autonomic imbalances and cardiac arrhythmias.

Keywords: Cardiac afferents, Heart innervation, Myocardial infarction, Nerve endings, Vagal afferents.

*This study was supported by TÜBİTAK under 1001 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by Project no: 219S332.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kalbin otonom nöral kontrolü, kardiyak intrinsik sinir sistemi ile merkezi sinir sistemi arasındaki sürekli iletişim ile gerçekleştirilir(1). Nöro-kardiyak ekseninde gerçekleşen bu iletişim, kardiyak homeostazi için kritik öneme sahiptir. Miyokard İnfarktüsü (MI) ve diğer kardiyovasküler hastalıklar tarafından tetiklenen sinir liflerinin yapısal ve fonksiyonel yeniden şekillenmesi yoluyla kardiyak inervasyon desenlerindeki değişiklikler, sempatik uyarılabilirliği artırarak ve vagal tonusu azaltarak otonomik dengesizliğe neden olur ve sonuçta kardiyak aritmilere veya fonksiyonel bozukluğa yol açar (2). Kalbin mekanik ve elektriksel fonksiyonlarının nöromodülasyonu, bazıları kalp kasını inerve eden nodoz gangliyon (NG) nöronları tarafından başlatılan ve otonom sinir sistemini aktive eden refleks devreler vasıtasıyla gerçekleştirilir (3). Bu nedenle, vagal duysal inervasyon desenlerindeki değişiklikler, kardiyak indeksleri kontrol eden beyin sapı aracılı refleksleri etkileyebilir ve sonuç olarak kardiyak aritmilere yatkınlığı artırabilir (4). Bununla birlikte, vagal afferentlerin kardiyak dallanmasının şu ana kadar elde edilmiş kapsamlı ve ayrıntılı bir haritasının olmaması, oluşabilecek kardiyak hasarlar sonrası vagal afferent yeniden şekillenmesinin (neuralremodeling) kesin tanımlamasını ve bunun beyin sapı aracılı reflekslerin düzensizliği ve parasempatik geri çekilme olguları üzerindeki muhtemel etkisinin anlaşılmasını engellemiştir. Bu engelin aşılması sayesinde kalbin çalışma mekanizması ve sinir sistemi ile ilişkisi hakkında toplanan bilgiler, hastalık mekanizmalarını daha iyi açıklamaya ve gelecekte hastalık biyobelirteçleri olarak kullanılacak moleküllerin bulunmasına yardımcı olacaktır.

Literatürde, transgenik ve optogenetik yaklaşımlarını kullanarak kardiyak sempatik ve parasempatik sinir liflerinin köken aldığı intrakardiyak ganglion nöronlarının kardiyak fonksiyonunu düzenleyici işlevlerini inceleyen güncel bir yayında(5) kalpteki motor liflerin dallanmalarını sadece görsel ve işlevsel olarak incelenmiş kalbin SA düğümüne uzanan motor lifler, optogenetik yöntemlerle ayrı ayrı uyarılmış ve eş zamanlı olarak kalp fonksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ancak kalbi çevreleyen duyu nöronlarının parasempatik intrakardiyak ganglion nöronları ve kardiyak sempatik sinirler ile fiziksel ve fonksiyonel ilişkisi incelenmemiştir. Bu nedenle, kalbe dallanan NG kökenli vagal duyu nöronlarının transgenik yöntemler kullanılarak spesifik etiketlemesinin ve optogenetik yöntemler ile fonksiyonel uyarımlarının kardiyak fonksiyon üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Yeni tekniklerin ışığında kalbi çevreleyen vagal duyu nöronlarının kalp elektrofizyolojisi üzerindeki rolünün tanımlanması amaçlanmıştır(5).

Kalbi saran vagal duyu sinirlerinin sağlıklı kalpteki dallanma desenlerinin belirlenmesi, bu dallanmanın kalp hastalıkları sırasında geçirdiği potansiyel değişimin karşılaştırmalı çözümlenmesine olanak sağlayacaktır. MI sonrası kalpteki hasarlı bölgenin çevresine uzanan vagal duyu sinir uçlarının uyarılma etkinliklerinin değişebildiği daha önce gösterilmiştir.

Ancak, bunun MI bölgesi çevresindeki vagal duyu sinirlerinin dallanma yapısındaki değişimler ile olan ilişkisi henüz gösterilmemiştir. Bunun sebebi sağlıklı kalplerdeki vagal duyu sinir ağının henüz detaylı bir şekilde haritalanamaması ile birlikte, iskemik şartlar sonrası bu vagal ağın yapısındaki olası değişikliklerin de henüz bilinmemesinden kaynaklanmaktadır.

Kalbi saran sinir ağı hakkında fikir edinmek ve kalp üzerinde aday nöral ablasyon merkezleri belirlemek için, kardiyak inervasyonu, kalbin 3 boyutlu(3D) yapısını koruyarak kısmen veya bütüncül olarak haritalayan az sayıda çalışma bulunmaktadır (5–8). Bunlar çoğunlukla kardiyak dokudaki tirozin hidroksilaz (TH), kolin asetiltransferaz (CHAT) veya veziküler kolin taşıyıcısı (VCHAT) gibi motor nöron belirteçlerine karşı immüno reaktiviteyi kullanarak kardiyak sinir sisteminin motor/efferen bileşenlerini ele alan çalışmalardır (5–7,9). Kardiyak sinir sisteminin duysal bileşeni, duyu sinir lifleri için kesin belirteçlerin bulunmaması nedeniyle kalpte ayrıntılı olarak ortaya çıkarılamamıştır, ancak bazı çalışmalar bu konuyu kalbin 3D organ yapısından ödün vererek ve CGRP veya substance P gibi nöropeptit belirteçleri kullanarak kısmen incelemişlerdir (10).

Anatomik olarak, kalbin vagal duysal innervasyonu, jugulerforamen içinde yer alan kranial ganglionlardan biri olan NG tarafından sağlanır. Embriyonik gelişimde, kranial ganglionlar hem nöral krestten hem de nöral plakoddan kaynaklanabilir. Genikulat, nodoz (vagus siniri) ve petrozal gangliyonlar yalnızca epibransiyal plakoddan türetilir, ancak hem juguler gangliyonlar hem de AKGler yalnızca nöral krest hücrelerinden köken alır(11). Epibransiyal plakoddan NG nöronlarının üretilmesinde, bir transkripsiyon faktörü olan Paired-homeobox 2b (Phox2b) gen ürünü kritik bir rol oynar (12). Viseral duyu nöronlarında, Phox2b yalnızca NG'den çıkan vagal afferentlerde ifade edilir. Bu nedenle, Phox2b gen lokusu, transgeni kardiyak vagal afferent sinirlere özel olarak hedeflemek için kullanılabilir ve kalbi innerve eden spinal afferent liflerden ayırma yapılmasına izin verir. Ek olarak, visseral fonksiyonları kontrol eden beyin sapı aracılı refleksler, spinal afferentler tarafından tetiklenen omurilik reflekslerinin herhangi bir müdahalesi olmaksızın kesin bir şekilde kapsamlı bir şekilde incelenebilir (3).

Bu tez çalışmasında, kardiyak duyu inervasyonunun vagal bileşenini sağlıklı durumda ve MI sonrası üç boyutlu kalp düzleminde ayrıntılı ve bütüncül olarak haritalamak için Phox2b-Cre transgenik fare hattı ve ileri görüntüleme teknikleri, konfokal mikroskobu ile yüksek çözünürlüklü görüntülemeyi oluşturan birleşik bir strateji işletildi. Phox2b geni kontrolünde üretilen Cre rekombinaz enzimine bağımlı şekilde tdTomato raporcu floresan protein geni ifade eden ikili transgenik hatlar üretildi (Phox2b-Cre::tdTomato). Bu transgenik farelerin periferik gangliyonları izole edildi ve Phox2b gen lokusu kontrolünde tdTomato ifadesinin sadece kalbin vagal duyu inervasyonunu sağlayan NG nöronlarında gerçekleştiği

gösterildi. Kalbin sempatik ve parasempatik motor inervasyonunu sağlayan noradrenerjik Stellate Gangliyon (SG) ve kolinerjik kardiyak gangliyon nöronlarında tdTomato ifadesi tespit edilmedi. Yine kalbin spinal duyu inervasyonunu sağlayan AKG nöronlarında tdTomato ifadesi gözlemlenmedi. Bu bulgular Phox2b gen lokusunun sadece NG nöronlarında transkripsiyonel açıdan etkin olduğunu ve Phox2b geni kontrolünde tdTomato ifadesinin kalbi inerve eden NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinin tespit edilmesinde etkin bir araç olarak kullanılabileceğini kanıtladı. Daha sonra Phox2b-Cre::TdTomato fare kalplerindeki tdTomato proteinleri anti-RFP ile immün boyaması optimize edildi. Uygulanan bütüncül kalp görüntüleme protokolü sonucu 5X objektif ile kardiyak vagal duyu sinir ağı daha önce literatürde erişilmemiş bir kapsam ve çözünürlükte görüntülendi. Farklı kalplerde vagal duyu sinir dallanması incelendiğinde bütün kalplerde benzer bir sinirlenme deseni gözlemlendi. Vagal duyu sinirlerinin damarlar ile birlikte kardiyak hilum bölgesinden kalbe giriş yaptığı ve kalbin epikardiyal yüzeyi boyunca ilerlediği tespit edildi. Kardiyak hilumdan giriş yapan vagal duyu sinirlerinin bir kısmı kalp yüzeyinde ventriküller ile atriyumlar arasında yatay şekilde yerleşik olan koroner sinir damarını çevreleyerek hemen bu damarın altında bir düğüm oluşturdu. Bu düğümden sonra vagal duyu sinirlerinin bir kısmı daha dikey bir yönelim göstererek sağ ve sol ventriküle doğru dallanırken bir kısmı ise daha yatay bir yönelim göstererek kardiyak hilumdan gelen ve doğrudan atriyuma dallanan vagal sinir lifleri ile birleşti.

Kalbi saran vagal duyu sinirlerinin bütün kalpteki dallanma profili detaylı şekilde tespit edildikten sonra dorsal ve ventral yüzeylerin inervasyon profili incelendi. Kalbin dorsal ve ventral epikardiyal yüzeylerinin 5X objektif ile çekilmiş görüntüleri incelendiğinde vagal duyu sinir liflerinin dorsal ve ventral yüzeylerde farklı yoğunlukta buldukları gözlemlendi. Bu gözlemi doğrulamak için farklı kalplerde dorsal ve ventral yüzeylerdeki vagal duyu sinir yoğunluğu ölçüldü ve karşılaştırmalı analiz sonucu kalbin dorsal yüzeyindeki vagal duyu sinir dallanmasının istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde daha yüksek yoğunlukta olduğu tespit edildi. Ayrıca sinir çap analiz metodolojisi kullanılarak kalbin dorsal ve ventral yüzeyindeki görece kalın çaptaki ($> 5\mu\text{m}$) ve ince çaptaki ($> 5\mu\text{m}$) vagal duyu sinirlerinin yüzdesi hesaplandı. Yapılan ölçümlerin karşılaştırmalı istatistiksel analizi sonucu kalbin dorsal yüzeyinde kalın çaptaki vagal duyu sinirlerinin ventral yüzeydekine göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. Bununla birlikte ince çaptaki vagal duyu sinirlerinin yüzdesi ise kalbin ventral yüzeyinde dorsale göre anlamlı şekilde yüksek bulundu. Ayrıca, kalbin atriyum, ventrikül ve damarları boyunca farklı vagal duyu sinir sonlanma tipleri yüksek çözünürlükte tespit edildi. Çiçek ve ağ benzeri sonlanmalar atriyum ve ventrikülün epikard yüzeyi boyunca tespit edildi. İlginç bir bulgu olarak kas içi dizi benzeri sonlanmalar sadece ventrikülün miyokard tabakası boyunca tespit edildi. Bu bulgu vücudun tüm organlarına kan

pompalamakla görevli olan ve kasılma gücü atriya göre daha yüksek olan ventriküllerin kasılma işlevinin duysal kontrolünün atriya göre daha farklı sinir devreleri yoluyla gerçekleşebileceğini önermektedir.

Sağlıklı kalplerde bu tez çalışması kapsamında geliştirilen metodoloji kullanılarak vagal duyu sinir dallanmasının bütüncül profili elde edildikten sonra MI olgusunu takiben oluşan hasarlı dokunun çevresinde vagal duyu sinirlenme ağının değişimi araştırıldı. Bu amaçla Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde LAD ligasyon yöntemi kullanılarak kronik MI modeli oluşturulan kalplerin bütüncül vagal duyu sinir ağının görüntülemesi sonucu MI hasar bölgesinde denervasyon ve hasar bölgesinin çevresinde ise vagal duyu nöral yeniden şekillenmesi (neural remodeling) tespit edildi. Bu bulgu iskemik hasar sonrası kalp dokusunda vagal duyu sinirlerinin yeniden şekillenmeye uğradıklarını morfolojik olarak kanıtladı. Bu yeniden şekillenme incelen bütün kalplerde MI sonrası hasar bölgesinin periferinde yeni vagal duyu akson filizlerinin istatistiksel olarak anlamlı oluşumu ile doğrulandı.

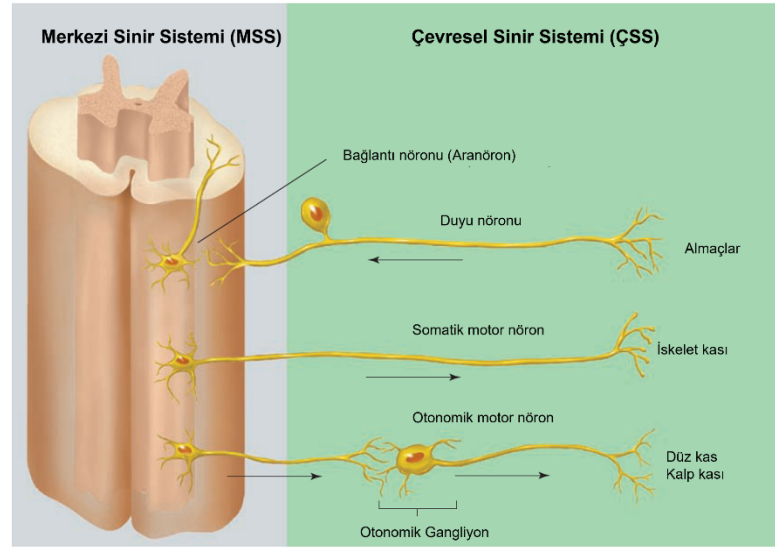
Sonuç olarak bu tez çalışmasında transgenik fareler kullanılarak geliştirilen metodoloji ile ilk defa bütün kalbin vagal duyu innervasyon haritası elde edildi. Kalbin dorsal ve ventral yüzeyleri ve atriyum-ventrikül boyunca vagal duyu sinir ağı ve farklı sonlanma tipleri tespit edildi. Ayrıca kalpteki vagal duyu sinirlerini çaplarına göre sınıflandırmayı mümkün kılan bir hesaplamalı görüntü analiz metodolojisi geliştirildi. Bu tez çalışmasında geliştirilen bu metodolojik yaklaşımlar kullanılarak MI sonrası kardiyak vagal duyu sinirlerinin yeniden şekillenme geçirdikleri net bir şekilde tespit edildi. Bu çalışmada geliştirilen yöntemlerin diğer kardiyovasküler hastalık durumlarında vagal duyu sinir yeniden şekillenmesi olgusunu görüntüleme ve tespit etmede işlevsel olacağı düşünülmektedir. Böylece vagal duyu sinir yeniden şekillenmesi ile kardiyovasküler hastalıklar sonucu görülen anormal medüller reflekslere bağlı kardiyak aritmilerin ilişkisi daha iyi tanımlanabilecektir. Bu sayede bu tez çalışmasında gerçekleştirilen kalbin vagal sinir ağının bütün kalpte kapsamlı görsel haritalanmasının kardiyak aritmilerinin klinik tedavisinde daha etkili vagal nöromodülasyon uygulamalarını geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Sinir Sistemi

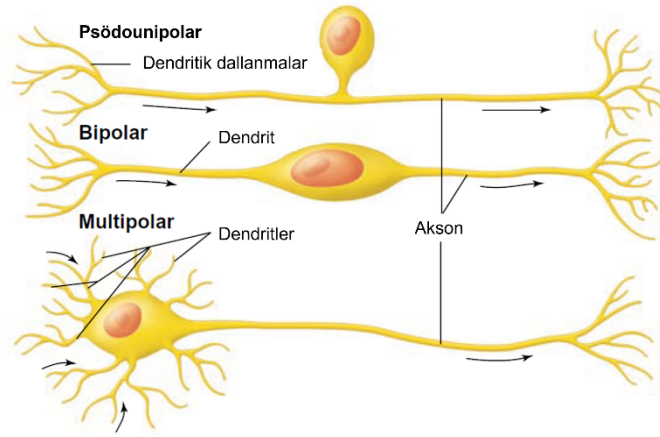
Sinir sistemi, çevreden bilgi almak ve gelen duyuşal bilgilere karşı tepkiler üretip motor komutlar oluşturmak ile sorumludur. Sinir sistemi, merkezi ve çevresel sinir sistemleri olarak iki ana gruba ayrılabilir. Merkezi sinir sistemi (MSS), beyindeki nöronlar ve omurilikten meydana gelirken çevresel sinir sistemi (ÇSS), omurilik ve beyinden köken alarak vücuda dağılan sinir ağlarından oluşmaktadır(13,14).

Çevresel sinir sistemi, kendi içinde duyuşal ve motor olmak üzere iki bölüme ayrılır (**Şekil 4.1.1**). ÇSS'nin duyuşal bölümü, duyuşal veriyi MSS'e taşımakla görevli olan sinirlerden oluştuğu için "getirici" (afferent) olarak adlandırılır. Bu sinir hücreleri hem kan basıncına meydana gelecek değişimler gibi vücut içinden hem de dokunma, tat alma koklama gibi dış çevreden gelen uyarıları iletmek ile görevlidirler. ÇSS'nin motor bölümü ise duyuşal veri sonucu beyinde oluşan motor yanıtları MSS'den uzaklaştırıp hedeflerine ulaştırmak ile görevlidir ve bu sebeple götürücü (eferent) nöronlar olarak adlandırılırlar. ÇSS'nin motor bölümü iki alt dala ayrılır: somatik sinir sistemi (SSS) ve otonom sinir sistemi (OSS). SSS, istemli motor tepkilerden sorumluken OSS, kontrolümüz dışında gerçekleşen istemsiz tepkilerden sorumludur. OSS, genellikle homeostaziyi kontrol etmek amacıyla vücuttaki organ sistemlerinin düzenlenmesinde rol oynar. Otonom sinir sistemi de kendi içerisinde sempatik ve parasempatik sinir sistemleri olarak iki bölüme ayrılır. Bu iki sistem arasındaki denge homeostazi oluşturur. Kalp hem sempatik hem de parasempatik sistem ile bağlantılıdır. Sempatik sistem kalp atış hızının artmasına neden olurken parasempatik sistem atış hızının düşmesini sağlar(13,14).



Şekil 4.1.1. Merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sistemi arasındaki ilişki (13).

Sinir sisteminde yer alan nöronlar, fonksiyonlarına ek olarak yapısal olarak da sınıflandırılırlar (**Şekil 4.1.2**). Nöronların yapısal olarak sınıflandırılması, nöronun hücre gövdesinden çıkan uzantıların sayısına göre yapılmaktadır. Psödounipolar nöronlar, hücre gövdesinden “T” şeklinde tek bir uzantı çıkaran nöronlardır. PSS’deki duyu nöronları, psödounipolar yapıdadırlar. Dallenmiş uzantılardan bir tanesi periferden duysal uyarıları toplarken diğer uzantı, bu uyarıları MSS’deki sinapslara iletir. İki ayrı uca uzanan iki uzantısı olan nöronlar, bipolar nöronlar olarak adlandırılır. Bu tip nöronlar gözün retinasında bulunurlar. Multipolar (çok kutuplu) nöronlar, en yaygın görülen nöron tipidir. Hücre gövdesinden uzanan birden fazla dendrit ve aksona sahiplerdir. Motor nöronlar, multipolar hücre yapısına sahiplerdir (13).



Şekil 4.1.2. Nöronların yapısal olarak sınıflandırılması (13).

Sinir sistemi, nöronlar dışında destekleyici hücreleri de içerir. Destek hücreleri, nöronların çalışmasına yardımcı olurlar. Schwann ve uydu hücreleri PSS’inde bulunan destek hücreleri iken MSS’de oligodendrositler, microglia, astrositler ve epindimal hücreler yer alır. Schwann hücreleri, periferik aksonların etrafında yer alan myelin kılıfın oluşmasında rol alırlar; uydu hücreleri ise ganglionikgliositler olarak da adlandırılırlar ve duyu ve otonomik gangliyonlardaki nöronların fonksiyonlarını desteklerler. Oligodendrositler, MSS aksonları etrafındaki myelin kılıfın oluşmasında; mikroglialar, MSS’deki patojen ve hücre kalıntılarının fagositozunda; astrositler, kan-beyin bariyerinin oluşmasında rol alırlar (13).

4.2. Duyu Sinir Sistemi

Duyusal sinir sistemi somatik-duyu ve visseral-duyu sistem olmak üzere ikiye ayrılır. Somatik-Duyusal Sinir sistemi dokunma, ağrı, basınç gibi duyu AKG’ler yoluyla spinal korda ve oradan merkezi sinir sisteminin diğer birimlerine taşınmasından sorumludur. Visseral-Duyusal Sinir Sistemi ise organların işleyişine dair hissi bilginin başta NG yoluyla arka beyne ve oradan da daha yukarıda konumlanmış kortikal bölgelere iletiminde sorumludur. Bu tez çalışmasında kalbin mekanik ve kimyasal ortamından bilgi taşıyan NG kaynaklı duyu sinirlerinin kalpteki sinir ağı oluşumlarının yapısına yoğunlaşılacaktır.

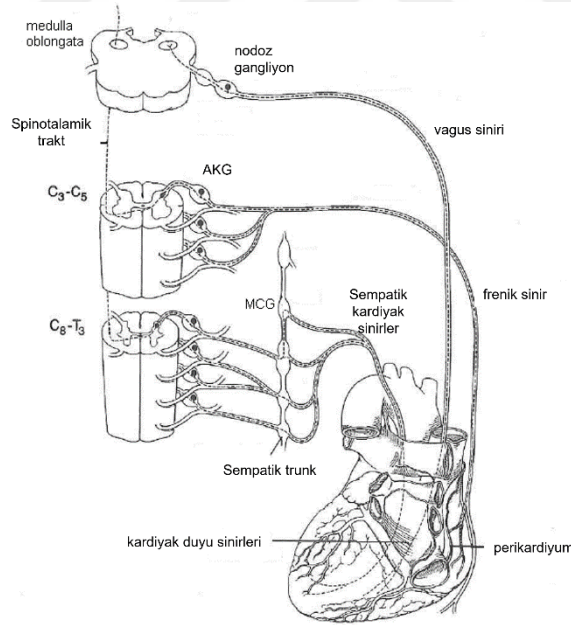
4.2.1. Kalp sinir sisteminin duyu bileşenleri

Kalbi saran sinir sisteminin duyu bileşenleri vagal ve spinal olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Kalpten gelen duyu bilgisini taşıyan vagal duyu sinirlerinin hücre gövdeleri jugular foramen içerisinde gömülü bulunan NGda konumlanmıştır. Kalpte değişik sonlanma motifleri gösterebilen bu sinirlerin diğer uçları arka beyin bölgesinde sonlanırlar. Burada konumlu çeşitli nöron çekirdekleri ile sinaptik bağlantılar kuran NG nöronları, kalpten taşıdıkları bilgiyi bir girdi şeklinde merkezi sinir sistemine (MSS) iletirler (15). Vagal duyu bilgisi beyin sapında bulunan ara nöron vasıtasıyla MSS'deki motor çekirdekler ile bağlantı kurarlar. Beyin sapı yoluyla, vagal duyu bilgisi kalp işlevini kontrol eden merkezi yapıya entegre edilir (15,16). Beyin sapında bulunan ara nöronların bir kısmı doğrudan buradaki motor birimler ile bağlantılı iken bir kısmı ise vagal duyu bilgisini daha üstte konuşlanmış merkezlere iletirler. Bu kontrol birimlerinin en üst seviyelerinden birisi İnsular Korteks'tir. İnsular Korteks ve diğer üst kortikal yapılardan gelen komutlar yine beyin sapında bulunan sinir çekirdeklerine katılarak, oluşan kompütasyon sonucu kalbi kontrol eden motor yanıtlar gerçekleştirilir. Ayrıca kalp fonksiyonunu kontrol eden hızlı motor yanıtlar beyin sapında sonlanan vagal duyu sinir uçları yine buradaki motor çekirdeklerden oluşan refleks devreleriyle icra edilir (16). Özellikle kardiyovasküler rahatsızlıklar sonucu bu refleks devrelerinin uyarılma kinetiklerinde meydana gelen bozukluklar kalp aritmilerinin oluşumu ve gelişimine katkı sağlamaktadır. Bu sebep kalbe özgü vagal duyu nöronlarının yapısal ve fonksiyonel çözümlemesinden doğacak bilgilerin kalp işlevini yöneten beyin sapı reflekslerinin anlaşılmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4.2.1. Arka Kök Gangliyon (AKG)

Spinal duyu sinirleri vagal duyu sinirleri ile birlikte kalpten duyu bilgisini merkezi sinir sistemine taşımada görev almaktadır. Bu spinal duyu sinirlerinin hücre gövdeleri arka kök gangliyonlarda (AKG) bulunmaktadır (**Şekil 4.2.1.1**). Servikalden sakrala kadar omuriliğin sağ ve sol tarafında dizili bulunan ve prevertebral gangliyonlar şeklinde de ifade edilen AKG'ler birçok organı inerve etmektedir. Kranial ve kaudal eksenin hangi seviyesindeki AKG'lerin kalbe sinir gönderdiği

literatürde araştırılmış ve son yapılan çalışmalar C2-T4 arası seviyede bulunan AKG nöronlarının aksonlarının kalbe uzandığı gösterilmiştir (17). AKG nöronlarının bir ucu kalpte sonlanırken diğer ucu dorsal boynuzdan spinal korda giriş yapar. Bu nöronların spinal kordda bulunan sempatik preganglionik aksonlar ile sinaptik bağlantı kurduğu düşünülmektedir. Ayrıca yine spinal kord güzergâhından beyin sapındaki Nucleus Tractus Solitarius (NTS) çekirdeği ile bağlantı kurduğu ve vagal duyu yolu ile benzer şekilde, kalbin işlevini yöneten merkezi sinir devresine katıldığı tahmin edilmektedir. Bu şekilde bir yapılanmanın olduğunu, özellikle kalp üzerinden yapılan elektriksel ve kimyasal yollu uyarıların sempatik refleksleri tetiklediğini gösteren bulgular tarafından desteklenmektedir (16). Ancak kalbi saran AKG kökenli duyu sinirlerinin yapı ve fonksiyonunu araştıran çalışmalar vagal sinirlere göre daha sınırlıdır. Bu sebepten dolayı kalpten alınan ağrı duyusunun AKG'ler yolu ile nasıl beyne iletildiğine dair bilgilerimiz henüz başlangıç aşamasındadır.



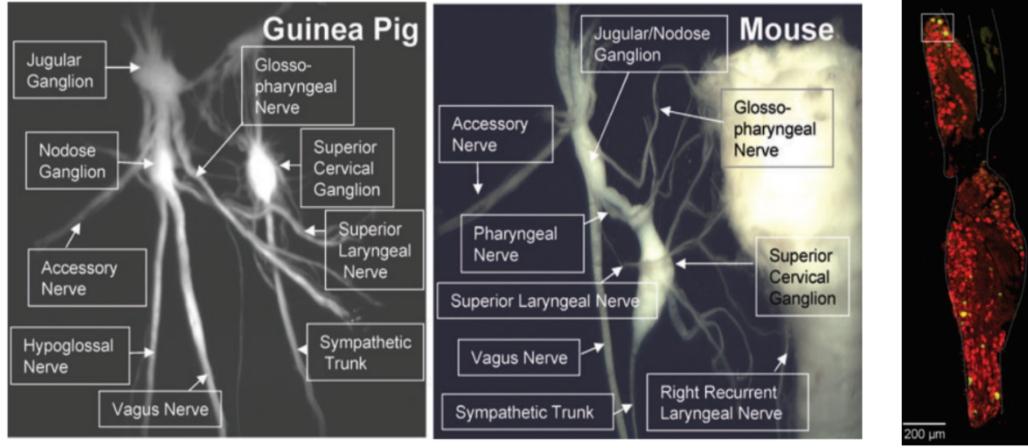
Şekil 4.2.1.1. Kalbin ve perikardın duyuusal innervasyonu(18).

4.2.2. Noduz Gangliyon (NG)

NG, jugularforamen içerisine gömülü olarak konumlanmış kranial bir gangliyondur. Onuncu kranial sinir olan Vagus sinirinin duyu liflerinin sinir hücre gövdeleri NG'de bulunmaktadır. Kalbin ve diğer iç organların vagal duysal sinirlenmesi NG tarafından gerçekleştirilmektedir. Memelilerin embriyonik gelişim sürecinde kranial gangliyonlar iki farklı embriyonik yapıdan köken alırlar. Bu yapılardan birincisi epibransiyal plakottur (epibranchial placode). Epibransiyal plakot embriyonik süreçte farklılaşarak noduz, petrozal ve genikulat gangliyonu oluşturur (11). Embriyonik gelişim sonrası noduz ganglion morfolojisi incelendiğinde çevresinde bulunan diğer kranial gangliyonlar ile farklı memeli canlılarda farklı yapılar oluşturduğu tespit edilmiştir (19).

4.2.2.1. *Phox2b* transkripsiyon faktörünün NG nöronlarının embriyonik gelişimindeki rolü

Farelerde ve daha yüksek memelilerde vagal duyu sinirleri iki periferik gangliyondan neşet ederler. Boynun her iki tarafında jugularforamen denilen boşluğa gömülü şekilde bulunurlar. Kafatasına daha yakın konumlanmış olan gangliyon superiorvagal ganglion ya da Jugular Gangliyon (JG) olarak isimlendirilir. Bu ganglion hemen aşağısında bulunan gangliyon ise inferiorvagal gangliyon veya NG diye isimlendirilmiştir. Bu iki gangliyon embriyonik gelişim sırasında farklı öncül hücrelerden farklılaşırlar. Jugular gangliyon nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. NG hücreleri ise embriyonik süreçte nöral plakod hücrelerinden farklılaşarak oluşmaktadır. Genellikle memelilerde iki farklı anatomik yapı olarak bulunan noduz ve jugular gangliyonlar (**Şekil 4.5.2.1.1, sol**) farelerde ise birleşik bir vagal gangliyon kompleksi oluşturmaktadır (**Şekil 4.5.2.1.1, orta**). Bu gangliyonların müstakil yapıları bazen immün boyama yöntemleri ile ayrıştırılabilmektedir (**4.5.2.1.1, sağ**).



Şekil 4.2.2.1.1. Nodoz ve Jugular gangliyonların kobay (solda) ve farede (ortada) görünümü. En sağda ise fareye ait RET+ nodoz ve jugular gangliyon nöronları gösterilmektedir (19).

Jugular gangliyona benzer şekilde ve AKG nöronları da sadece nöral krest hücrelerinden farklılaşarak meydana gelirler ve embriyonik köken olarak NG nöronlarından ayrışırlar(11). Aynı embriyonik kökenlerden gelen kranial gangliyonların anatomik ve işlevsel olarak birbirlerinden ayrı ve özelleşmiş yapılar halinde gelişebilmesinin en önemli sebeplerinden birisi, embriyonik gelişim sırasında hücrelerde oluşan farklı transkripsiyon faktör anlatım desenleridir. Bu minvalde NG nöronlarının epibransiyal plakod hücrelerinin bir kısmından farklılaşmasında bir homeobox transkripsiyon faktörünü kodlayan Phox2b (Paired Homeobox 2b) geninin oldukça kritik bir rolü vardır (12).

Phox2b geni homeodomain protein yapısı içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Phox2b transkripsiyon faktörü otonom sinir sisteminin gelişiminde rol oynayan bir proteindir. Daha önce yapılan bir çalışmada Phox2b geni silinmiş farelerin merkezi ve periferik sinir sisteminde bazı gelişimsel bozukluklar bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle sempatik gangliyonların gelişiminde önemli eksiklikler olduğu teşhis edilmiştir(20). Yine yapılan başka bir çalışmada bu sefer Phox2b geninin aşırı anlatımının sinir sisteminin gelişimi üzerindeki etkisine bakılmıştır. Tavuklarda gerçekleştirilen bu çalışmada omuriliğin gelişimi incelenmiş ve bu süreçte Phox2b geninin aşırı ifadesinin nöral krest hücrelerinin hücre döngüsünden çıkışını ve farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir (21). Birlikte ele alındığında, PHOX2B'nin

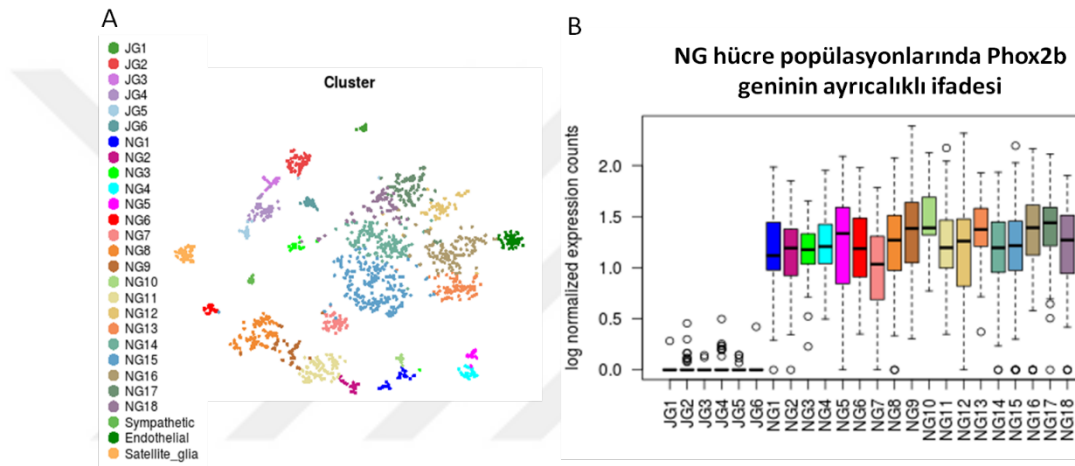
nöral krest hücre soyu belirleme ve/veya olgunlaşmasında görev alan baş düzenleyici transkripsiyon faktörlerinden biri olduğu literatürde tanımlanmıştır (22).

Nöral krest kaynaklı sinirlerin gelişmesi ve/veya olgunlaşmasında görevli olan Phox2b transkripsiyon faktörünün, ilginç bir bulgu olarak, epibransiyal plakot nöronlarının farklılaşması ve fonksiyonel kimliklerini edinmesinde de işlevi bulunmaktadır(11,12). Özellikle epibransiyal plakottan gelişen sinir hücre öncüllerinde Phox2b transkripsiyon faktörünün ayrıştırıcı anlatımının farklılaşma yolunu etkilediği ve somatik işlevden viseral işleve doğru geçişi sağlayan bir transkriptom profilinin oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (12). Bu bulgular sonucu viserayı yani organları inerve eden NG nöronlarının Phox2b geninin ayırıcı anlatımı kullanılarak moleküler olarak işaretlenebileceği düşünülmüştür.

Yakın zamanda yapılan kapsamlı bir tek hücre RNA dizileme çalışmasında fare NG ve JG nöronlarının transkripsiyon profilleri karşılaştırılmalı olarak analiz edildi (23). Bu çalışmada NG gangliyon hücreleri transkriptomik olarak 18 alt popülasyona ayrıldı. JG gangliyon hücreleri ise 6 farklı alt popülasyona ayrıldı. Bu popülasyonlarda Phox2b gen ifadesi incelediğimizde Phox2b geninin sadece NG hücre popülasyonlarında ifade edildiğini tespit ettik (**Şekil 4.2.2.1.2.**). Yine aynı çalışmada JG ve NG popülasyonlarının AKG nöron popülasyonlarına ait tek hücre RNA dizileme verisi ile karşılaştırmalı analizi sonucu JG nöronlarının iyon kanalı ve reseptör profillerinin AKG nöronları ile benzer olduğu tespit edildi. NG nöronları ise reseptör ve iyon kanalı profilleri yönünden AKG ve JG'den ayrı bir grup oluşturdu. Bu bulgular JG nöronlarının AKG nöronları gibi somatik duyu bilgisini taşımaya elverişli bir transkriptom profili gösterirken NG nöronlarının viseral duyuyu iletmeye yönelik bir profil gösterdiğini saptadı. Daha önce belirtildiği gibi hem JG nöronları hem de AKG nöronları embriyonik olarak nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. NG nöronları ise embriyonik süreçte epibransiyal plakottan gelişmektedir. Dolayısıyla mRNA profillerinin kapsamlı analizi Phox2b ifadesinin ayrıcalıklı ifadesinin epibransiyal plakot hücrelerinin visseral duyu iletimini icra eden NG nöronlarının oluşumunda görev aldığı bulgusunu desteklemektedir(23).

Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada yetişkin fare sinir sisteminin neredeyse bütün hücre tiplerinden örnek içeren yaklaşık yarım milyon hücrede kapsamlı bir tek hücre yeni nesil dizileme analizi gerçekleştirildi(24). Bu analiz sonucu yetişkin fare

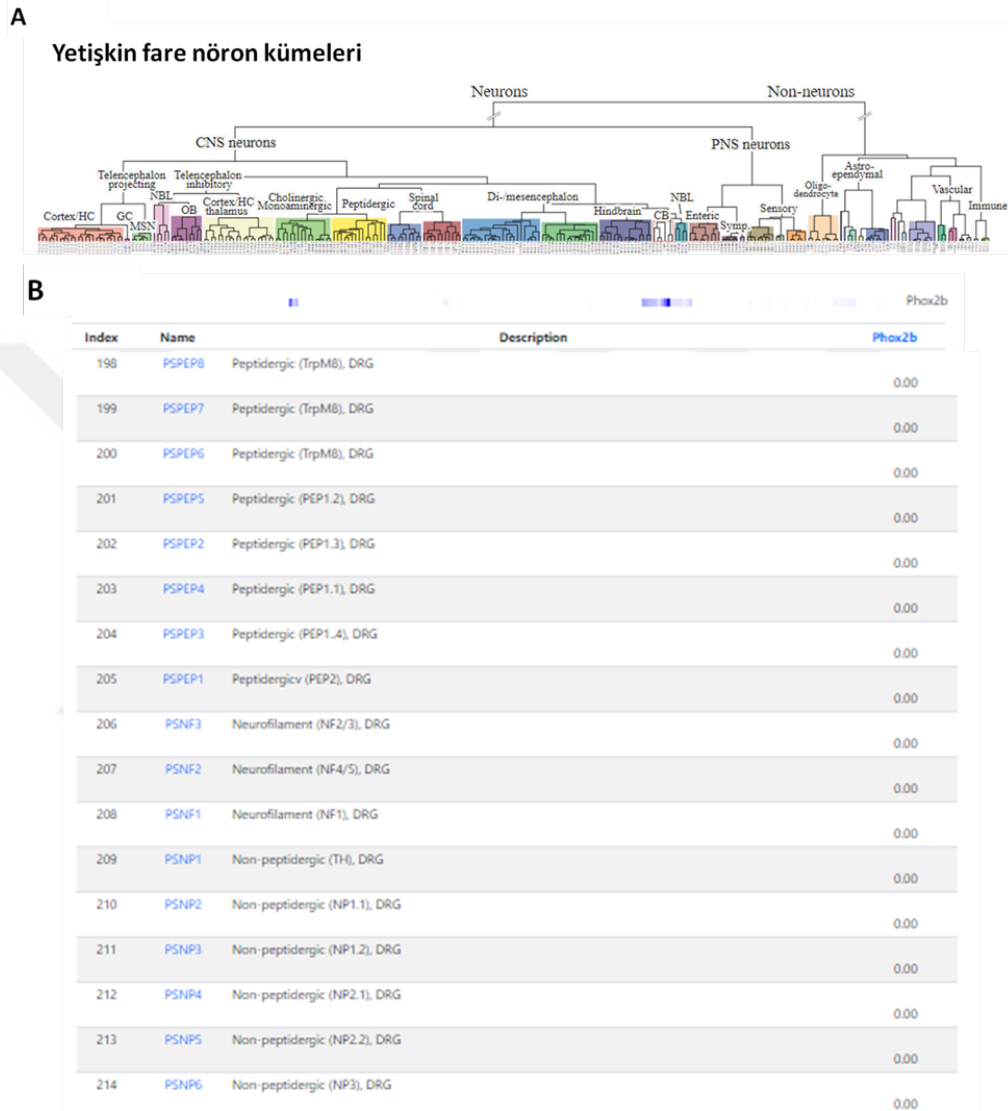
nöronları gen anlatım profillerine göre farklı kümelere ayırdı (Şekil 4.2.2.1.3A). Fareye ait bütün AKG nöronları toplam 17 farklı alt popülasyon oluşturdu. Bu AKG popülasyonları ifade ettikleri nöropeptit genleri ve nörofilament genlerine göre peptiderjik, non-peptiderjik ve nörofilament şeklinde üç farklı kümede sınıflandırıldı. İlginç şekilde bu AKG transkriptom verisini Phox2b gen ifadesi açısından incelendiğimizde 17 AKG nöron popülasyonunun hiçbirinde Phox2b gene ifadesi tespit edilmedi (Şekil 4.2.2.1.3B). Bu sonuç Phox2b geninin yetişkin fare AKG nöronlarında ifade edilmediğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.2.2.1.2. Kupari J. ve ark. tarafından yapılan vagal gangliyonların tek hücre RNA dizilemesi sonucu NG ve JG gangliyonları transkriptomik olarak farklı popülasyonlar oluşturdu. A. 18 farklı NG ve 6 farklı JG popülasyonu belirlendi. B. Phox2b geni sadece NG popülasyonlarına özgü ifade edildi(23).

Farede Phox2b gen lokusunun sadece NG kaynaklı vagal duyu sinirlerindeki yüksek etkinliği(23), ve AKG nöronlarında tamamen suskun olması bu gen lokusunun organları saran vagal duyu sinirlerinin aynı organları saran spinal duyu sinirlerinden ayrıştırılmasında kullanılabileceğini önermektedir (24). Bu amaçla daha önce yapılan çalışmalarda aşağıdaki bölümde çalışma prensibi detaylandırılan Cre-LoxP stratejisi kullanılarak Phox2b gen anlatımına bağlı olarak raporcu floresan protein ifade eden transgenik fare hatları geliştirilmiş ve bu sayede Phox2b geni ifade eden nöronların çeşitli fizyolojik sistemlerdeki fonksiyonları araştırılmıştır. Benzer bir yaklaşım ile organ işlevini düzenleyen NG kaynaklı vagal reflekslerin çalışma prensipleri, somatik

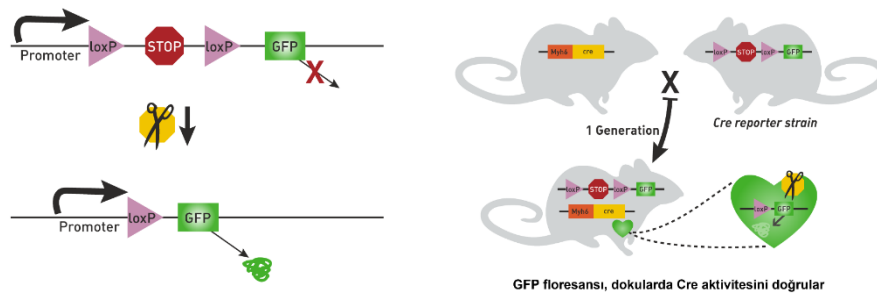
görevleri olan AKG vb. kaynaklı spinal reflekslerden ayırt edici şekilde çalışılabilir (4,25).



Şekil 4.2.2.1.3. Yetişkin fare AKG nöronlarında Phox2b gen ifadesinin eksikliği. **A.** Fare sinir sistemi hücrelerinin gen anlatım profillerine göre sınıflandırılması. **B.** Tespit edilen 17 AKG nöron popülasyonunda Phox2b gen ifadesinin bulunmadığını gösterimi(24).

4.2.2.1.1. Cre-LoxP sistemi ve Phox2b-Cre transgenik hayvanlar

Cre rekombinaz enzimi genomda yaklaşık 40 nükleotit uzunluğunda LoxP diye adlandırılan sekans dizisi ile 5' ve 3' uçlarından çevrili bulunan dizilerin kesilip çıkarılmasında işlevseldir. Cre proteini ilk olarak p1 bakteriyofajlarında keşfedilmiştir (26). Cre rekombinazın genomda nasıl bir değişiklik yapacağı, tanıyacağı iki LoxP nükleotit dizisinin aynı ya da zıt okuma çerçevesi yönünde bulunmasına göre değişiklik arz etmektedir. Eğer iki LoxP dizisi aynı okuma çerçevesi yönünde ise cre rekombinaz bu iki LoxP dizisinin arasındaki nükleotit dizisinin kesilip genomdan çıkarılması işlemi icra eder. Fakat eğer bu iki LoxP dizisi birbirlerine göre zıt okuma çerçevesi yönünde konumlanmış ise o zaman cre rekombinaz iki tarafından LoxP dizileri ile çevrili nükleotit sekansının ters çevrilmesi işlemi gerçekleştirir. Cre rekombinazın LoxP dizilerinin birbirlerine göre konumuna bağlı olarak farklı şekilde çalışma özelliği bu Cre-LoxP sisteminin istenilen hücre tiplerinde genetik mühendisliği gerçekleştirmek amacıyla yaygın başvurulan bir strateji olarak öne çıkmasını sağlamıştır (27,28). Cre rekombinaz proteinini kodlayan gen dizisinin hedeflenen hücreye özgü promotör dizisi tarafından ifade ettirilmesi sayesinde, LoxP sekansları ile çevrili olan istenen genin anlatımı sağlanmaktadır.



Şekil 4.8.1.Cre-LoxP sistemi (JaxLab, 2011)

Cre-LoxP sisteminin sadece istenilen hücre tipinde istenilen genin anlatımını değiştirebilmesi için Cre rekombinaz proteininin örneğin floresan protein ile işaretlenmek istenen hücrelerde ayrıştırıcı şekilde ifade edilebilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında bizim hedefimiz olan NG'lere özgü anlatımı tetikleyebilmek için

Phox2b gen lokusunda Cre rekombinaz proteinini kodlayan gen dizisini içeren bir transgenik hat kullandık (#16223). Daha önce bu transgenik hat ile ve başka Phox2b-Cre fare hattı ile yapılan çalışmalarda Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaz ifadesi ve etkinliği Cre'ye bağımlı raporcu protein ifadesi üzerinden değerlendirilmiş ve periferik gangliyonlarda raporcu protein ifadesi incelenmiştir. Phox2b geni genel olarak çeşitli nöron alt tiplerinin embriyonik gelişiminde etkili olmasına karşın, bu çalışmalarda, Phox2b-Cre'ye bağlı raporcu protein ifadesi periferik gangliyonlardan sadece NG'de tespit edilmiş fakat postgangliyonik sempatik, parasempatik nöronlarda ve AKG nöronlarında, ayrıca enterik sinir sisteminin bileşenlerinde tespit edilememiştir(29–31).

NG dışında raporcu protein ifadesinin tespit edilmediği belirtilmiştir. Bu bulgular Phox2b-Cre transgenik hattının NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinin organ inervasyonunun araştırılmasında işlevsel olabileceğini önermektedir.

4.2.2.2. Kalbe özgü NG nöronları

NG nöronlarının kalp ve diğer organları ayrıştırıcı şekilde inerve nöron popülasyonuna sahip olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak yakın zamanda yapılan tek-hücre yeni nesil dizileme çalışmaları ile nodoz nöronlarının ifade ettikleri reseptör, iyon kanalı ve benzeri genlerine göre farklı popülasyonlara atanabileceği gösterildi(23). Yeni yapılan bir çalışmada ise kalbi inerve eden NG nöronlarının akciğer ve mideyi inerve edenlerden farklı bir popülasyonu oluşturduğu retrograd viral vektör yöntemiyle gösterildi(32).

Kupari ve ark. tarafından icra edilen mezkur çalışmada murinnoduz ganglion hücreleri, transkriptom profillerine dayalı olarak 18 alt popülasyona ayrılmıştır (23). Bu çalışmada tespit edilen NG popülasyonlarının reseptör ve iyon kanalı profillerini ortaya çıkarılarak bunların akciğer hacminin ve organ duvarı geriliminin duyumsamasında işlevsel olduğundan bahsedilmiştir. Ayrıca NG kümelerinde farklı ifade edilen genlerin baroreseptörler, kemosensörler ve polimodal mekanosensörler ile ilişkili oldukları tespit edildi. Bu veriler, NG'nin, çeşitli iç duyu işlevlerde yer alan çeşitli nöron tipleri içerdiğini öne sürmektedir. Ayrıca, yukarıda bahsedilen diğer çalışmada ise(32), farklı iç organları inerve eden vagal duyu nöronları retrograd AAV vektörleri ile etiketlenmiştir. Bu tez çalışması için de önemli bir bulgu olarak, bu

çalışma, kalbe dallanan vagal duyuşal nöronal somatanın, akciğer ve mideyi innerve eden diğer NG nöronlarından ayrıştırılabilen ve üç boyutlu NG boyunca heterojen dağılımış farklı bir hücre popölasyonunu oluşturduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada bildirildiği gibi, fare embriyonik gelişimi sonucu sadece kalbi inerve eden NG nöronlarının anatomik oluşumu bu nöronların fonksiyonel kimliklerini tanımlayan transkriptom profillerinin de kalp ortamındaki kimyasal ve mekanik değişimleri tespit etmek için özelleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu tarz bir yapılanma ile uyumlu olarak, laboratuvarımızda gerçekleştirilen ve yayın aşamasında olan bir çalışmada, daha önce kalp dokusundan salgılanan moleküller ile (örneğin ATP, Adenozin, Prostaglandin D2) fonksiyonel olarak etkileşime girdiği literatürde gösterilen proteinleri kodlayan genlerin, kalbi inerve eden vagal ve spinal duyu nöronlarında farklı şekilde ifade edildiği tespit edildi.

Kalpteki serbest duyu sinir uçlarının kapsaisine duyarlı non-spesifik TRPV1 iyon kanallarını ifade ettiği daha önce gösterilmiştir (33). Bu TRPV1+ kardiyak afferentlerin Miyokardiyal İskemi sonrası kardiyojenik sempatik reflekslerin oluşumunda işlevsel olduğu düşünölmektedir(33). Kardiyak vagal afferent sinir liflerinin sağlayan NG nöronlarının TRPV1 iyon kanallarını ifade ettiği bilinmektedir (34). Ancak TRPV1 ifade eden vagal duyu sinirlerinin kalp rahatsızlıklarının oluşumu veya gelişimindeki rolleri henüz bilinmemektedir. Ancak akciğeri inerve eden TRPV1+ vagal duyu sinirlerini araştıran bir çalışmanın bulguları bu sinirlerin iç organların işleyişinde meydana gelen değişimlerin anlık duyuşal iletimi ve otonomik reflekslerin etkinleştirilmesi dışında görevlerinin de olabileceğini göstermiştir(35). Yakın zamanda yapılan bu çalışmada TRPV1 geninin kodladığı ağrı reseptörünü ifade eden vagal duyu sinirlerinin akciğerde bakteriyel enfeksiyon sonucu (zatürre) etkinleşen nötrofil ve gama-delta T hücresi aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (35). Aynı çalışmada normalde TRPV1 ifade eden vagal duyu sinirlerinde TRPV1 proteinin silinmesinin bağışıklık sisteminin baskılanmasını engellediği ve zatürreden iyileşme sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir. TRPV1 pozitif vagal duyu sinirlerinin bu baskılamayı CGRP nöropeptit proteinini salgılayarak gerçekleştirdikleri ayrıca tespit edilmiştir. Kalbi saran vagal duyu sinirleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı olduğu için, benzer bir fonksiyonun miyokardiyal iskemi ve enfarktüs sonrası kalpte de gerçekleşme durumu henüz bilinmemektedir. Akciğer enfeksiyonunu iyileştirmeye

yönelik koruyucu bağışıklık sistemin baskılanmasına benzer bir rolü, TRPV1 pozitif vagal afferentlerin endokardit, miyokardit ve perikardit gibi kalp enfeksiyonlarında gerçekleştirme durumları da henüz araştırılmayı beklemektedir.

Laboratuvarımızdaki yakın zamanda yapılan çalışmalardan birinde, kalbi innerve eden NG nöronlarında farklı şekilde ifade edildiği bulunan ve bir transkripsiyon faktörünü kodlayan genler tespit edildi (17). Yine önceki çalışmalarda, transkripsiyon faktörlerinin özel ifadesi yoluyla raporcu proteinlerin anlatımı merkezi ve periferik sinir sistemlerinde yer alan spesifik nöral popülasyonlarda indüklendi ve bu sayede onların embriyonik gelişimi detaylı şekilde araştırıldı. Bu popülasyonların spesifik işlevlerini ortaya çıkarmak için de benzer spesifik anlatım stratejileriyle bezenmiş optogenetik ve kemogenetik yaklaşımlar kullanıldı (36). Benzer bir bakış açısıyla, ortaya çıkan transkripsiyon faktörleri arasında, sadece kalbe özgü NG nöronlarında ifade edilenler, transkripsiyon faktörü veritabanlarında karşılaştırmalı analiz ile belirlenebilir. Sonunda, bu transkripsiyon faktörlerinin kalbe zarar veren NG'ye özgü ekspresyonu, vagal kardiyak duyu nöronlarının ilgili gelişimsel yörüngelerini araştırmak ve kardiyak (pato)fizyolojideki işlevlerini incelemek için transgenik ve viral vektör teknikleriyle kullanılabilir. Bu, daha iyi bir açıklama ve daha da önemlisi, vagal duyu nöronlarının kardiyak nöro-modülasyonla ilgili fonksiyonel rollerinin ayrımını sağlayabilir.

4.3. Kardiyovasküler Sistem

Kardiyovasküler sistem, oksijenin, besinlerin, atık ürünlerin ve ısının vücutta hızlı bir şekilde taşınması için kalp ve kan damarlarından oluşan kapalı bir sistemdir. Bu sistem, en önemli işlevi olan oksijen, glikoz, vitaminler ve suyun dokulara hızlı bir şekilde taşınması ve karbondioksit, üre ve kreatinin gibi metabolik atık ürünlerin hızlı bir şekilde hücrelerden uzaklaştırılmasının yanında hormonların dokulara ulaşmasını da sağlar ve bazı hormonları kendisi salgıladığı için bir kontrol sisteminin de parçasıdır. Bu sistemde bir kanın vücuda gönderilmesi görevi gören kalp, sağ ve sol karıncık olmak üzere birbirine bitişik iki pompadan oluşur. Her iki karıncık, sırasıyla sağ ve sol kulakçıklardan doldurulur. Sağ karıncık kanı akciğer yoluyla sol tarafa pompalar (pulmoner dolaşım) ve sol karıncık, besin ve oksijence zengin olan kanı aynı anda vücudun geri kalanına aort aracılığıyla iletir (sistemik dolaşım) (37,38).

Pulmoner dolaşımında, CO₂ ve besin atıklarını taşıyan venöz kan üst ve alt vena kava olmak üzere iki ana toplardamar aracılığıyla sağ kulakçığa girer ve ardından triküspid kapakçığı vasıtasıyla sağ karıncığa dolar. Karıncıklar, diastol adı verilen gevşeme durumundayken kan ile dolar ve sistol adı verilen kasılma durumuna geçerek içerdiği kirli kanı pulmoner arter aracılığı ile akciğere gönderir. Akciğerde, alveollerde gerçekleşen difüzyon yoluyla kandaki oksijen seviyesi yükselir ve oksijenli kan pulmoner damarlardan sol karıncık ve kulakçığa geri döner. Sistemik dolaşımın gerçekleşmesi için sol karıncık, sağ ile hemen hemen aynı anda kasılır ve aynı hacimde kanı vücuda gönderir. Sol karıncıktan çıkan kan, aorttan ve dallanan arter sisteminden tüm vücuda yayılır. Sistemik ve pulmoner dolaşıma sebep olan kulakçık ve karıncıkların kasılması, kalbin elektriksel aktivitesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (37).

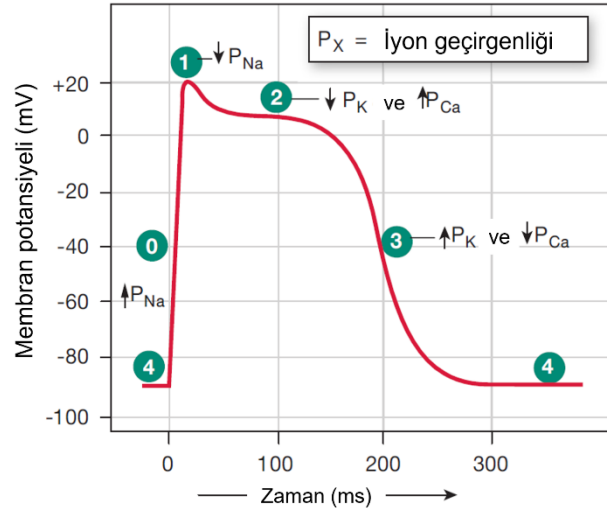
Kalp kaslarının kasılıp gevşemesi kalp kası hücreleri, kardiyomiyositler ve kalpteki iletim sistemine ek olarak kalbe uzanan sinir sistemi tarafından kontrol edilir. Kalbin elektriksel iletim sistemi sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler düğüm, His ve Purkinje lif demetlerinden oluşur. Kalbin kasılması, sinoatriyal nod bölgesindeki kasılma yeteneklerini kaybedip spontan depolarize olabilme özelliği kazanan özelleşmiş hücreler tarafından oluşturulan aksiyon potansiyeli sayesinde başlar. Sinoatriyal düğüm hücreleri tarafından başlatılan aksiyon potansiyeli, sağ atriyumdan atriyoventriküler düğüme ulaşır. Depolarizasyon dalgasının yayılımı atriyoventriküler nod bölgesinden başlayan diğer iletim sistemi elemanlarındaki özel kardiyomiyositler aracılığı ile tüm kalbe yayılır (39).

Kalpte bulunan içkin iletim sistemi kalbi saran otonom sinir uçları ile sürekli bir etkileşim halindedir ve onlar tarafından etkinliği kontrol edilmektedir. Dolayısıyla otonom sinir sistemi kardiyak mekanik ve elektriksel indislerini kontrol etmektedir. Bunlar kalbin atım sayısı ve sinoatriyal ve atriyoventriküler düğümden elektriksel sinyalin iletim hızı ve ayrıca kalp kasının kasılma ve gevşeme kinetikleridir. Otonom sinir sisteminin iki antagonistik çalışan alt bileşeni olan parasempatik sinirler ve sempatik sinir lifleri, sırasıyla kalp atım hızının yavaşlatılması ve hızlandırılmasından mesuldürler. Kalbin sinirsel kontrolün diğer önemli bileşenini oluşturan duyuşal sinir sistemi ise kalbin kimyasal ve mekanik ortamındaki ağrı, basınç, inflamasyon ve doku

deformasyonu gibi uyarıların algılanıp spinal kord ve beyin sapı üzerinden arka beyin ve insular kortekse aktarımından sorumludur (40).

4.3.1. Kalbin elektrofizyolojik özellikleri ve aksiyon potansiyelin oluşması

Kardiyomiyositler aksiyon potansiyeli oluşturma özelliğine sahip hücrelerdir. Aksiyon potansiyeli oluşturmaları için ileti sistemi tarafında uyarılmaları sonucu membran potansiyelinin eşik değerini aşması gerekmektedir. Aksiyon potansiyeli Faz 0, 1, 2, 3 ve 4 olmak üzere 5 fazdan meydana gelir (**Şekil 4.3.1.1**). Elektriksel uyarımın kalp kası hücrelerine ulaşması sonucu oluşan aksiyon potansiyelinin ilk aşamasında hücre membranında bulunan voltaj-duyarlı Na kanalları açılarak depolarizasyon gerçekleşir, membran potansiyeli -60 mV'tan -40 mV'a yükselir (Faz 0). Birinci fazda, Na kanalları kapanır ve geçici K kanalları açılır. K iyonlarının hücre dışına çıkması ile membran potansiyeli -15 mV'a ulaşır. Depolarizasyon dalgası kardiyomiyositlerde L-tipi Ca kanallarının açılmasını sağlar ve bu kanalların açılması ile hücre içine Ca giriş olur. K iyonları hücre dışına çıkarken içeriye Ca iyonlarının girmesi Faz 2'de görülen plato evresini oluşturmaktadır. Hücre içine alınan Ca iyonları, sarkoplazmik retikulumdaki ryanodine reseptör Ca kanalı (RyR) açılmasına ve sarkoplazmik retikulundan sitoplazmaya Ca iyonlarının salınmasına sebep olur. Sitoplazmadaki Ca iyonları, troponinlere bağlanarak kasılmayı başlatır. Faz 3'te Ca kanalları kapanır ve yavaş aktiflenen K kanalları açılır. Hücre içine K iyonlarının girmesi ile hücre membranının repolarizasyonu başlar. Membran potansiyeli -55 mV'a ulaştığında K kanalları kapanarak repolarizasyon sonlanmış olur. Aksiyon potansiyelinin sonlanması sonucu Faz 4'te dinlenme fazı oluşur (39).

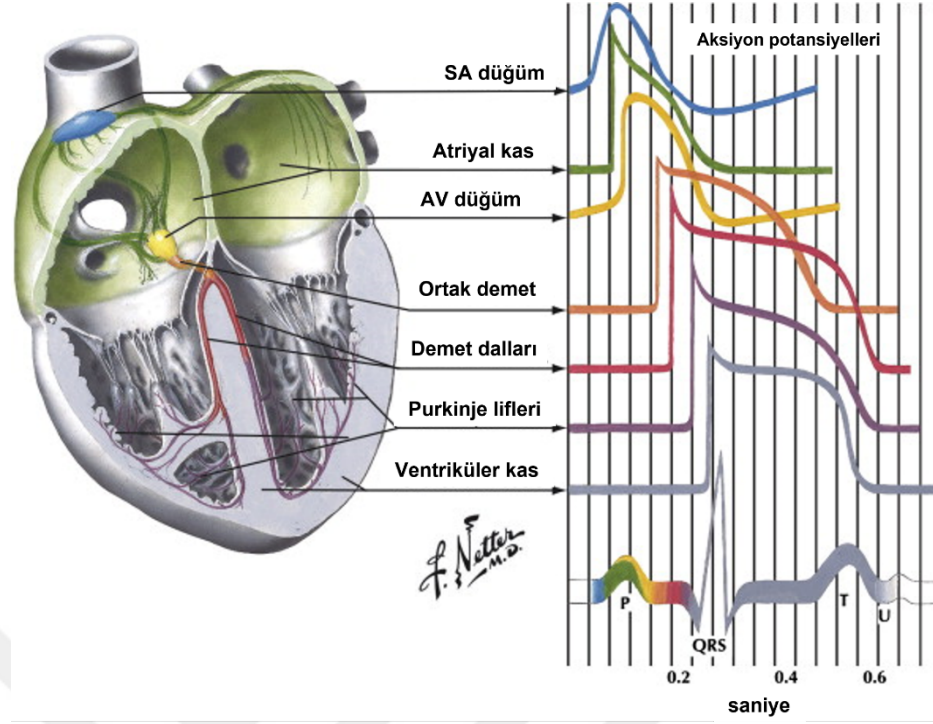


Faz	Membran Kanalları
0	Na ⁺ kanalları açılır
1	Na ⁺ kanalları kapanır
2	Ca ²⁺ kanalları açılır, hızlı K ⁺ kanalları
3	Ca ²⁺ kanalları kapanır, yavaş K ⁺ kanalları
4	Dinlenme potansiyeli

Şekil 4.3.1.1. Kalp kası hücrelerinde görülen aksiyon potansiyeli evreleri(39)

4.3.2. Elektrokardiyografi (EKG)

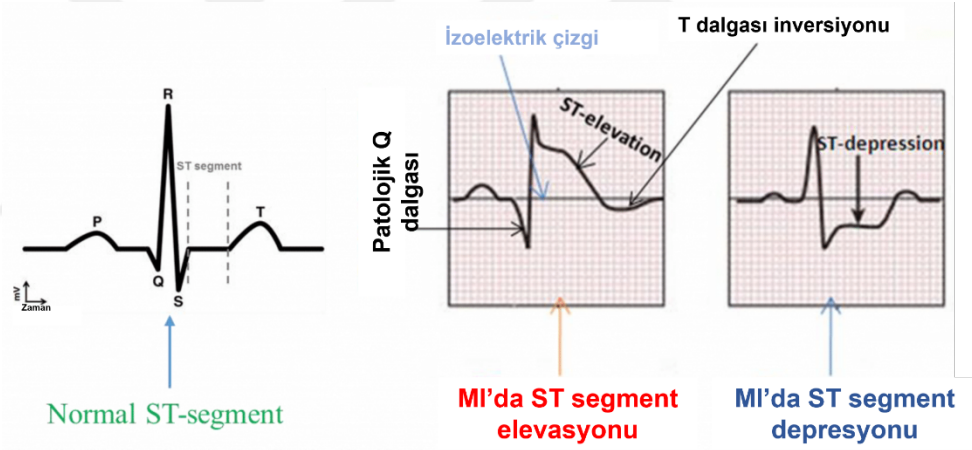
Elektrokardiyogram (EKG), vücuda yerleştirilen elektrotlar aracılığıyla kaydedilen kalbin elektriksel aktivitesinin bir ölçümüdür. Ölçülen her bir dalga kompleksi tek bir kalp atışını temsil eder ve her kompleks P dalgası, QRS kompleksi ve T dalgası olmak üzere üç bileşenden meydana gelmektedir (Şekil 4.3.2.1). EKG'nin her bir bileşeni (dalgası), kalbin belirli bölgelerindeki elektriksel aktiviteyi yani aksiyon potansiyellerini temsil eder (39).



Şekil 4.3.2.1. Bölgesel kardiyak elektriksel aktivite ile yüzey elektrokardiyogramı arasındaki ilişki (39).

Sol ve sağ atriyum boyunca depolarizasyon dalgasının yayılıp hücrelerin depolarize olması, EKG ölçümlerindeki P dalgasını oluşturur. Elektriksel uyarı sinoatriyal düğümden çıkarak sırasıyla sağ ve sol atriyuma ulaşır. Elektrik akımının AV nodda iletilmesi sırasında elektriksel aktivitede izoelektrik adı verilen bir duraklama gerçekleşir. Bu duraklama, EKG’de P-R segmenti olarak açığa çıkar ve ventriküler kasılma gerçekleşmeden önce atriyumdaki kanın ventriküllere dolması için gerekli süreyi sağlar. Q dalgasının başlangıcı ventriküler depolarizasyonun başlangıcını işaret eder. AV nod tarafından sağ atriyumdan ventriküllere iletilen elektrik akımı, His demetleri ve purkinje liflerinden oluşan iletim sistemi aracılığıyla sol ve sağ ventriküller ve interventriküler septum boyunca hızla yayılır. Ventriküler depolarizasyonun gerçekleşmesi, EKG ölçümlerinde QRS kompleksi olarak ortaya çıkar. Atriyal depolarizasyon ile ventriküler depolarizasyon arasında geçen süre P-R aralığı olarak adlandırılır ve P-R aralığındaki bir değişiklik, parasempatik sinir sisteminin (vagus siniri) kalp üzerindeki aktivitesinin hassas bir göstergesidir. QRS kompleksinin sonunda, tüm ventriküle miyokardın depolarizasyonu gerçekleşmiş olur. Ventriküler

depolarizasyon sonucunda ventriküller kasılır ve kan aort ve pulmoner artere doğru atılır (41,42). Bu aşamada, elektriksel aktivitede, S-T segmentini oluşturan, bir duraklama meydana gelir. S-T Segmenti ventriküler depolarizasyon ve repolarizasyon arasındaki aralığı temsil eder. S-T segmentinde en yaygın görülen anormallikler, segment elevasyonu ve depresyonu olarak tanımlanır. ST elevasyonu, segmentin izoelektrik çizgiden yukarı doğru hareketidir ve akut miyokard infarktüs (MI) veya perikardit nedeniyle oluşabilir. S-T depresyonu ise segmentin izoelektrik çizgiden aşağı doğru hareketidir (Şekil 4.3.2.2). Akut subendokardiyal miyokard iskemisine bağlı olarak veya ST elevasyonunda karşılıklı bir değişiklik olarak ortaya çıkabilir(43,44). Ventriküler miyokardiyal hücrelerin repolarize olmaya başlaması ile T dalgası oluşur. Ventriküler repolarizasyonun tamamlanması ile T dalgası sona erer ve kalbin bir kasılma ve gevşeme döngüsü tamamlanmış olur(42).

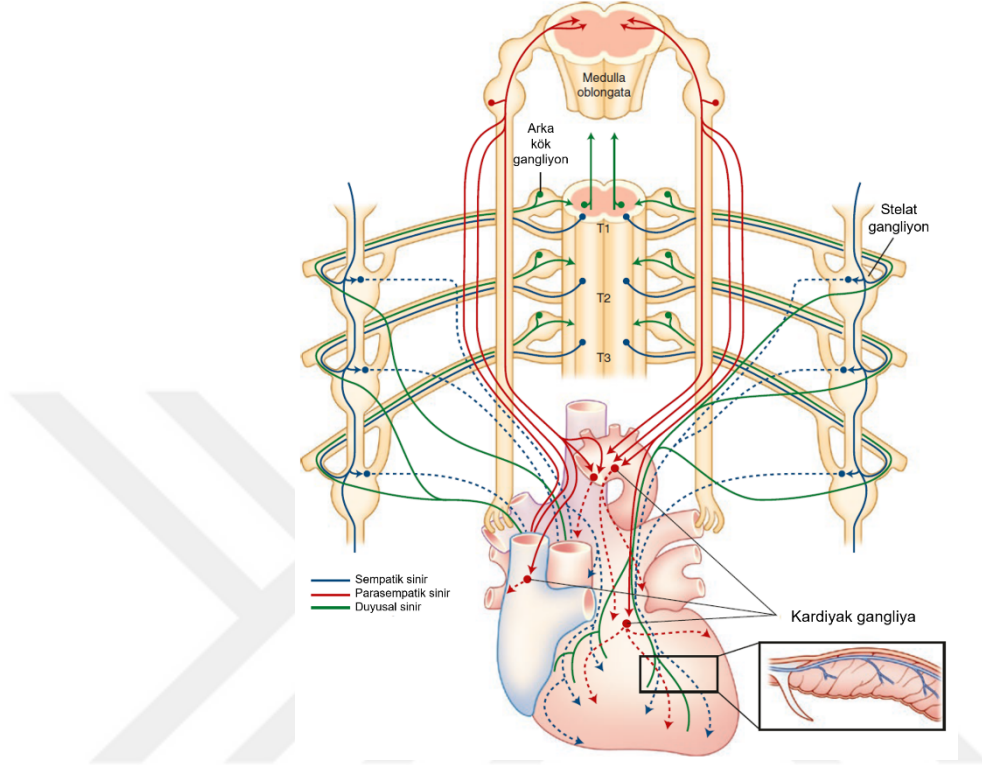


Şekil 4.3.2.2. MI sonrası EKG bulgularında ST segmentte görülen değişimler (45)

4.4. Kalp ve Sinir Sistemi İlişkisi

Kalp yoğun oranda sinir ile sarılmış bir organdır. Kalbi saran bu sinirler hem kalbin iç işleyişini hem de kalp ile merkezi sinir sistemi ve nihayetinde tüm vücudun ilişkisini düzenlerler. Vücudun anlık kan ihtiyacına göre kalp ve damar sisteminin bileşenlerinin tüm işlevleri sinir sisteminin bileşenleri tarafından koordine edilmektedir. Sinir-kalp eksenini de isimlendirilen ve en uçtaki işlevsel üyeleri beyin ve kalp olan bu iletim sistemi çift taraflı olarak çalışmaktadır. Bu taraflardan

birini kalp homeostazının anlık bilgisini beyne ileten duyu sistemi, diğ er tarafını ise beyin ve spinal korddan merkezi komutları kalbe ileten motor sistemi oluş turmaktadır (ř ekil 4.5.1.).



ř ekil 4.5.1. Kardiyak sinir sistemlerinin anatomisi ve dağı lımı(40).

4.4.1. Kalp işlevini kontrol eden motor sinirler

Kalp oksijence zengin kanı tüm vücuda ve karbondioksitce zengin kanı ise akciğ ere pompalamak ile görevli bir organdır. Kalbin beyinden ayak uçlarına kadar vücudun tüm bölgelerine yeterli kanı gönderebilmesi atriyum ve özellikle ventriküllerdeki kasılma ve gevşeme kinetiklerinin koordineli yönetimi sayesinde mümkün olmaktadır. Kalbin atriyum ve ventriküllerinin doğru zaman aralığında kasılıp gevşemesi sayesinde kalbe gelen ve kalpten giden kanın kalpteki dolaşımı sorunsuz bir şekilde sürdürülebilir. Bunu sağ layan temel yapılardan birisi kalpte içkin bulunan kalbin kendi elektriksel iletim sistemidir. Ayrıca bu sistemin bileş enleri kalbi saran sinirler yolu ile sinir sistemi tarafından her an etkin bir şekilde kontrole tabiidir. Örneğ in kalpte kasılmayı başlatan ilk elektriksel sinyali üreten ve özelleş miş

kardiyomiyosit hücrelerinden oluşan sinoatrial düğüm hem sempatik (noradrenerjik) hem de parasempatik (kolinerjik) motor sinirler tarafından yoğun bir şekilde inerve edilmektedir (5,7). Sempatik ve parasempatik sinirler kalp atım sayısı ve kasılıp-gevşeme indislerini anatgonistik bir şekilde düzenlemektedirler. “Kaç ya da savaş” ilkesi uyarınca sempatik sinirler tehlike anında kalbi atım sayısını ve kan basıncını yükselmesinden sorumludur. Parasempatik sinirler ise bu durumun tam tersi etkilere sebep olmaktadır. Dolayısıyla bu iki zıt çalışan otonom sinir sistemi bileşeni de merkezi sinir sisteminde üretilen motor komutların kalbe iletilmesinde sorumludurlar (46–49).

Kalbin saran sempatik ve parasempatik sinirlerin nöron gövdelerinin oluşturduğu gangliyonlar toraks ve kalpteki konumlarına göre isimlendirilirler. Kalbe özgü sempatik sinirlerin hücre gövdeleri omurganın sağında ve solunda omurgaya koşut olarak konuşlanmış paravertebral zincirde bulunurlar. Bu sempatik gangliyonlar toraksın içerisinde fakat kalbin dışında buldukları için intratorasik ekstrakardiyak gangliyon şeklinde adlandırılırlar. Farelerde son yapılan çalışmalarda kalbi innerve eden sempatik sinirlerin nöron gövdelerinin SG olarak da isimlendirilen servikotorasik (cervicothoracic) gangliyonun belirli bir bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir (5). Bu gangliyon inferior servikal gangliyon ile T1-T2 torasik gangliyonların bir füzyonundan oluşmaktadır.

Kalbi saran parasempatik postganglionik sinirlerin hücre gövdeleri ise epikardın üzerindeki yağ bezelerinin üzerinde dağılmış halde, yani kalbin üzerinde bulunmaktadır. Bu yüzden bu gangliyonlar intratorasik intrakardiyak ya da kısaca intrakardiyak gangliyonlar diye isimlendirilmektedir. Bu gangliyonların büyük bir kesimi (~% 85) kolinerjik özelliktedir (5,6,50).

4.4.2. Kardiyak sinir sisteminin hiyerarşik yapısı

Son bir asırdır kalbin işleyişini kontrol eden sinir sistemi, sempatik ve parasempatik sinirlerin antagonistik çalışması ve bu sinirlere komut veren merkezi sinir sistemindeki ilgili merkezlerin, kalbi saran spinal ve vagal kökenli duyu sinirlerinden aldığı girdiler ile beslenerek kardiyak motor komutları oluşturması üzerinden tasvir edildi. Bu sistemde kalbin üzerindeki yağ yataklarında gömülü şekilde bulunan intrakardiyak gangliyonların preganglionik parasempatik

sinirler ile taşınan motor komutları kalbin iç iletim sistemine aktarmada bir arayüz görevi gördüğü kabul edildi. Ancak son yirmi yılda yapılan çalışmalar (derlemeler için bkz.(8,16,51),(52) kalpte bulunan gangliyonların sadece kolinerjik yapıda olmadığını göstermiştir(6,7). Buna ek olarak, intrakardiyak gangliyonları oluşturan nöronların sadece kalp dokusu ile değil, kendi içlerinde ve diğer intrakardiyak gangliyonlar ile de bağlantı kuran ve bu bağlantılarda kullanılan ara nöron türevi yapıları içeren gangliyonlupleksuslardan oluştuğu gösterilmiştir (6,7)(52).Özellikle kalp yüzeyinden yapılan mekanik uyarılar ve bazı kalp damarlarında yapılan geçici tıkamalar sırasında kalpteki intrakardiyalgangliyon nöronlarından alından elektriksel kayıtlarda duyu ve motor yanıtlarına benzer sinirsel uyarımlar kaydedilmiştir(51,53). Sonuçta yapılan tüm bu tanımlayıcı ve işlevsel çalışmalar intrakardiyak gangliyonlar ağının MSS'den gelen komutları aktaran bir arayüz değil, fakat bu komutları da kendine katan ve kendi başına özerk bir sinir sistemini oluşturabilecek birimlere sahip olan daha karmaşık bir yapı olduğunu öne sürmektedir. Bu nedenle kalp yüzeyinde bulunan bu intrakardiyak gangliyonlar ağı kalbe içkin sinir sistemi olarak isimlendirilmeye başlanmıştır (52). Yine bu sistemi kalbin kendi beyni şeklinde tasvir eden yayınlar da literatürde bulunmaktadır (3,54). Dolayısıyla kalbi kontrol eden sinir sisteminin hiyerarşik yapısı incelendiğinde, bu yapının yukarıda beyin korteksi ile başlayıp (İnsula vb.), beyin sapı, NG, AKG, ekstrakardiyak gangliyonları (SGvb) içerecek şekilde aşağı doğru devam eden ve intrakardiyak gangliyonlar ile sonlanan oldukça geniş, birbiriyle iç içe ve karmaşık bir sistem olduğu görülmektedir. Dolayısıyla kalbin mekanik ve kimyasal ortamına dair duyu verileri hem kalbe içkin sinir merkezlerine hem de spinal kord ve beyin sapına ve daha üst kortikal merkezlere iletilmektedir. Bu sürekli iletişim sonucu hiyerarşik yapıda yukarıda konumlanan sinir yönetim merkezlerinden gelen komutlar kalpte içkin bulunan sinir merkezlerine iletilmekte ve bu sinir merkezi doğrudan kalpten aldığı duyu verileri ile bu dışsal komutları entegre ederek anlık yanıtlar oluşturmaktadır. Kardiyak sinir sisteminin bu entegrasyonu nasıl gerçekleştirdiği henüz bütünüyle aydınlatılamamıştır. Kalbin işlevini kontrol eden hiyerarşik sinir sisteminin kalp ile en üst kortikal birimlere kadar her bir seviyesinde refleksif yanıtlar oluşabilmektedir.

Kardiyak sinir sisteminin birbiri ile iç içe geçmiş karmaşık yapı ve işleyişinin kardiyovasküler rahatsızlıklar ile bozulduğu, ya da bozulmasının kalp aritmisi ve

benzeri rahatsızlıkları tetiklediği düşünülmektedir. Özellikle Miyokardiyal İnfarktüsü (MI) sonrası kardiyak sinir sistemini oluşturan bazı birimlerin sinirsel yeniden yapılanmaya uğradıkları bilinmektedir (55). Yapılan son çalışmalarda MI sonrası kalbi saran sempatik sinirlerin morfoloji ve uyarılma kinetiklerinde değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir (9). Yine MI sonrası NG nöronlarının transkriptom profilleri ve uyarılma kinetiklerinde değişimlerin meydana geldiği gösterilmiştir (56). Bunlara ek olarak MI sonrası kalbin içkin sinir sistemini oluşturan gangliyon birimlerinin de yine yapısal ve işlevsel yeniden yapılanmaya uğradığı gösterilmiştir (1). Kalbi innerve eden duyu ve motor sinirlerde MI sonrası oluşan bu yapısal ve fonksiyonel değişimlerin, yine MI sonrasında kalp işleyişinde görülen sempatik aşırı uyarılabilirlik ve vagal tonda düşüş şeklindeki otonomik dengesizlikleri altında yatan ana etkenlerden olduğu düşünülmektedir.

4.4.3. Kardiyak sinir sistemi ve vagal uyarım terapileri

MI gibi iskemik rahatsızlıklar sonrası oluşan kalp aritmilerinin otonom sinir sisteminin çalışmasındaki dengesizlik ve bozulmalardan kaynaklandığı bilinmektedir (55). Özellikle MI sonrası görülen taşiaritmik fenotipin vagal tondaki düşüklükten kaynaklandığı düşüncesiyle, MI hastalarında vagal uyarım terapileri klinik bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde başka bir terapi yöntemi olan spinal kord uyarımı da yine bazı aritmi rahatsızlıklarını düzeltmede uygulama alanı bulmaktadır. Bu yöntemler dışında nöral ablasyon müdahaleleri de kalbin otonomik kontrolündeki dengesizlik ve bozulmaları sağıltmak için klinikte uygulanmaktadır. Örneğin, MI sonrasında kalpte görülen sempatik aşırı uyarılmasını kontrol altına alabilmek için Stellaktomi tedavisi uygulanarak, Stellate ganglion MSS ile bağlantı sağlayan kısmı tahrip edilmektedir. Bu işlem sonrası ilgili gangliyondaki sempatik nöronların aşırı uyarılma fenotipinin azaldığı gösterilmiştir (4,25,51). Yapılan vagal uyarım terapileri sonucunda ise kalp hastalarında ortaya çıkan kalbin parasempatik uyarımındaki genel azalmanın iyileştiği gösterilmiştir.

Ancak kalbi saran sinir ağının kapsamlı bir haritasının henüz çıkarılmamış olması nöroblasyon ve sinirsel uyarı terapilerinin hem sonuç alabilecek şekilde tasarlanmasını hem de ilgili uygulama sonuçlarının sağlıklı değerlendirilmesini engellemektedir. Örneğin onuncu kraniyal sinir olan Nervus Vagus %70 oranında

duyu ve %30 oranında parasempatik motor sinir içermektedir. Bu sinire yapılan elektriksel uyarılarda vagal duyu ve motor sinirlerin ne ölçüde uyarıldığı ve bunların kalpte görülen yanıtta ne ölçüde katkı sağladığı henüz tam aydınlatılmamıştır(5). Vagal duyu ve motor sinirlerin kalpte nasıl bir nüfuz deseni sergilediği ve sonlanmalarının kalbin hangi anatomik bölgelerinde yoğunlaştığının bütüncül bir haritasının çıkarılması sinirsel uyarım tedavilerinin daha doğru bir şekilde icra edilebilmesi için elzemdir. Ayrıca nöroablasyon terapilerine yeni hedefler oluşturmak için de kalbin bütüncül sinir ağının tüm bileşenleriyle (duyu ve motor olmak) ifşa edilmesi gerekmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar sonucu bu sinir ağının morfolojisinde meydana gelen değişikliklerin tespit edilmesi, bu değişimlerin yol açabileceği sorunlara göre tasarlanmış özgün tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

4.4.4. Kalbi saran sinir ağının işlevini araştıran çalışmalar

Son yıllarda hücrelere erişebilmek ve onların işleyişini manipüle edebilmeye imkân sağlayan yeni teknolojilerin ortaya çıkmasıyla beraber iç organların işleyişini düzenleyen sinir devrelerini aydınlatmaya yönelik araştırmaların da sayısında artış yaşanmıştır. Özellikle karotit arter ve aortta(57–59), gırtlak(60), akciğer (61), mide ve ince bağırsak (62) gibi organlarda vagal duyu sinirlenmesini morfolojik ve işlevsel olarak inceleyen önemli yayınlar bulunmaktadır (63). Bu yayınlarda organların vagal duyu sinirlenme desenleri incelenmiş ve akson uçlarında bulunan farklı sonlanma şekilleri gösterilmiştir (63). Bunun ile birlikte atıfta bulunulan çalışmalara benzer kapsamda kalbi sinirleyen vagal duyu sinirlerine dair çalışmalar literatürde bulunmamaktadır. Daha çok kalbin sempatik ve parasempatik sinirlenmesini görüntüleme maksadıyla icra edilen ve buna müteveccih çalışmalar çeşitli model organizmalar özelinde gerçekleştirilmiştir (6,7,10,64–69).

Kalbi saran motor sinirlerin görüntülenmesine yönelik araştırmaların fazla olmasının en önemli sebeplerinden birisi sempatik ve parasempatik sinirleri organ ortamında işaretlemek için gerekli belirteç proteinlerin bulunmasıdır (6,7,67,68,70,71). Kalpteki sempatik sinirlerin dağılımını incelemek için Tirozin Hidroksilaz (TH) proteinine bağlanabilen antikorlar kullanılmaktadır. TH proteini çevresel sinir sisteminde işlevsel olan sempatik nöronlarda noradrenalin üretiminde

görev alan hız-kısıtlayıcı bir enzimdir. Akson boyunca ifade edildiğinden sempatik sinirlerin organlardaki sinirlenme desenlerini ve sonlanma biçimlerini ifşa etmede istimal edilmektedir. Parasempatik sinirleri işaretlemeye ise kolin-asetil transferaz (Chat) proteinine bağlanabilen antikolar kullanılmaktadır. Chat proteini parasempatik sinirlerde asetilkolin üretiminden mesûl bir enzimdir.

Kalpteki duyu sinirlerini işaretlemek için peptiderjik sinir belirteçlerinden kalsitonin geniyle ilgili peptit (CGRP) ve P maddesi (SP) proteinlerine özgü antikolar kullanılmaktadır(10,65–68,70,71). Duyu sinirlerinin bir kısmınının peptiderjik yapıda olmasından dolayı CGRP ve SP'ye özgü antikolar kullanılmaktadır. Ancak Chat ve TH antikoları ile kıyaslandığında bunlar tüm duyu sinirlerini aynı kapsam ve kuvvette işaretleme kapasitesinden yoksundurlar. Bu nedenle genel olarak iç organları ve özel olarak kalbi saran duyu sinirlerini haritalayan çalışmalar hem sayıca hem de içerik olarak oldukça eksiktir.

Rajendran P. ve ark. tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada anti-TH antikoru ile fare kalbinin bütüncül sempatik sinirlenme deseni açığa çıkarılmıştır(5). Ayrıca transgenik farelerde cre-LoxP yaklaşımı kullanılarak parasempatik sinirler eYFP floresan proteini ile işaretlenmiş ve yine bütün kalpteki parasempatik sinir ağı görüntülenmiştir. Bu çalışmada anti-Chat antikolarının çevresel sinir sisteminde üretilen Chat proteinini etiketlemede yetersiz olduğu öne sürülüp Chat geni kontrolünde cre rekombinaz proteini üreten transgenik hat kullanılmıştır. Bu çalışma çevresel sinirlerin kalpte görüntülenmesinde cre-LoxP sisteminin etkin şekilde kullanılabileceğini göstermesi bakımından ehemmiyetlidir. Aynı cre-LoxP yaklaşımı AAV virüs vektörleri kullanılarak da gerçekleştirilip pulmoner venin altındaki kolinerjik gangliyonlu pleksusların sinoatriyalnod bölgesini innerve ettikleri gösterilmiştir. Bu bulgu sinoatriyal nodun post-gangliyonik parasempatik sinirler ile doğrudan kontrolünü göstermesi açısından önemlidir. Rajendran P. ve ark. tarafından yapılan bu çalışmadakine benzer bir yaklaşım bu tez çalışmasında kalbi saran vagal duyu sinirlerinin görselleştirilmesinde kullanılacaktır. Aynı çalışmada ilerleyen başlıklarda detaylandırılacağı üzere, cre-LoxP yöntemi kullanılarak kalbi saran sempatik ve parasempatik sinirlerin depolarizasyonu gerçekleştirilip kalp ritmindeki etkileri EKG ile kaydedilmiştir.

4.4.5. Kalbi saran duyu sinir ağı ve MI

MI sonrası kalbin nekroza uğramış ve hasarlanmış olan dokusunun fibrosize uğrayıp yeniden yapılanma geçirdiği bilinmektedir. Son yapılan çalışmalar kalbi sinirleyen sempatik sinirlerin de MI bölgesinde denervasyona uğradığını ve MI yara çevresinde yeni sinir uçları oluşumu (neural sprouting) sergilediğini göstermiştir (9). Bu yeniden yapılanmanın sadece sinir morfolojisiyle sınırlı olmadığı ve sinirleri sağlayan gangliyon nöronlarının transkripsiyon profillerinde ve uyarılma kinetiklerinde de değişmeler meydana geldiğine müteveccih çalışmalar mevcuttur (9,16,51,55,56).

4.4.5.1. MI'nın oluşumu.

Kalbi oluşturan hücrelerin beslenmesi kalbe nüfuz eden koroner damarlar yoluyla gerçekleşir. Bu damarlar epikard seviyesinden başlayarak kalbe nüfuz eder ve kılcallaşarkendokard boyunca ilerleyip lumene kadar uzanırlar. Eğer koroner damarlarda kolesterol yüksekliği vb. durumlarda gelişebilen damar tıkanıklığı (Ateroskleroz) oluşursa, tıkalı damarın beslediği kalp dokusu, başta en derin endokart tabakasını besleyen kılcallara oksijence zengin kanın hiç ulaşmaması ya da az ulaşmasından dolayı hipoksiye girebilir. Bu durumun ileri aşaması sonucu beslenemeyen ventrikül miyokard tabakası ölür. Bu patolojik durum Miyokard İnfarktüsü (MI) diye adlandırılır. Bu durum sadece ölen dokuyu değil, dokunun çevresindeki başta kardiyomiyositler olmak üzere tüm hücrelerin işlevinde bozulmalar yol açar. MI yarası çevresinde, ölmemiş fakat oksijence zengin kan tarafından yeterli düzeyde beslenemeyen iskemik bir bölge oluşabilir.

MI kaynaklı patolojileri araştırmak için fare ve başka diğer model organizmalarda çeşitli yöntemler kullanılarak MI modelleri geliştirilmektedir. MI tetiklemek için kullanılan başlıca yöntemlerden birisi kalbin sol ön inen arterinin (left anterior descending veya kısaca LAD) geçici (akut MI) ya da kalıcı (kronik MI) olarak ilgili model organizmanın epikard yüzeyinden bağlanmasıdır. Bu yöntem sonucu oluşturulan MI modeli ile MI'nın kalp dokusu ve kalbin elektriksel ve mekanik çalışması üzerindeki etkisi zaman bağlı olarak takip edilip araştırılabilmektedir.

4.4.5.2. İskemik hasar sonrası kalbi saran duyu sinirlerinin yapı ve işlevine etkileri

MI sonucu kalp dokusunun fibrozise uğrayıp yeniden yapılanma işlemine maruz kaldığı bilinmektedir. MI sonucu oluşan kas kaybının olduğu bölge fibröz doku tarafından örtülmektedir. Bu durum kalbin kasılma ve dolayısıyla kan pompalama gücünü ciddi şekilde azaltmaktadır. Bu sebeple kök hücre tabanlı alternatif yöntemler geliştirilerek kaybedilen kas yapısının tekrar temin edilmesine yönelik onarımsal çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Literatürde MI sonrası sadece kalbin parenkimal dokusunun değil aynı zamanda kalbi saran sinir ağının da yeniden yapılanmaya uğradığı daha önce gösterilmiştir. Ayruca MI sonrası oluşan otonomik dengesizliklerde MI sırasında kalpten salgılanan bradykinin vb. moleküller ile uyarılan kalpteki duyu sinir uçlarının rolü olduğu daha önce gösterilmiştir(3,4,33). 2003'te Zahner ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kalbe akson gönderen duyu nöronlarının MI kaynaklı iskemi sırasında aktifleştikleri yayınlanmıştır (33). Bu çalışmada TRPV1 nosiseptif duyu nöron belirteci geni ifade eden duyu liflerinin, MI sonrası kalpte oluşan iskemik alandaki sonlanmalarının uyarılmasının, kalpte MI sonrası görülen sempatik uyarım aşırılığı fenomenini tetiklediği öne sürülmüştür.

1985 yılında yapılan başka bir çalışmada ise kalp dokusunun görece alt duvarında bulunan vagal duyu uçlarının iskemi sonrası uyarılmasının bradikardiye sebep olduğu gösterilmiştir(72). Kalpte bulunan AKG kaynaklı sinir uçlarının ise iskemi sonrası sempatik refleks aktivitesindeki artışa bağlı olarak oluşan taşikardi ile ilişkisi kurulmuştur (72). Bununla birlikte günümüze değin kalbi saran vagal ve spinal kaynaklı duyu sinirlerin kalp boyunca uzaysal dağılımı kapsamlı bir şekilde gösterilmediğinden atıfta bulunulan çalışmanın bulguları desteklenememiştir. Ancak yine de kalpteki iskemik hasarın yol açabileceği aritmi desenlerinin oluşumunda duyu sinirlerinin rolü olabileceğini önermesi bakımında oldukça önemli bir çalışmadır.

Anatomik olarak incelendiğinde kalbe akson gönderen vagal duyu sinirlerinin diğer ucunun beyin sapında sonlandığı bilinmektedir. Bu vagal afferentlerin beyin sapında sonlandıkları ve sinaptik etkileşim kurdukları başlıca çekirdek Nucleus Tractus Solitarius (NTS)'tir. NG'den girdi alan bu NTS nöronları yine beyin sapında bulunan parasempatik motor çekirdeklerden Dorsal Medial Nucleus (DMV) ve Nucleus Ambiguus (NA) ile sinaptik bağlantı kurmaktadır. Dolayısıyla kalp üzerinden

uyarılan NG nöronlarının beyin sapı üzerinden bir refleks devresini uyararak kalbin işlevini parasempatik olarak düzenlemektedir (3). Kalbi saran spinal duyu sinirlerini gönderen AKG nöronları ise spinal kord üzerinden daha çok sempatik refleksleri tetiklemektedir. NG ve AKG kaynaklı bu reflekslerin nasıl çalıştıkları hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun başlıca sebebi kalbin duyu sinir ağına yönelik çalışmaların, motor sinir ağına kıyasla oldukça yetersiz olmasıdır. Bu eksiklikler çeşitli kardiyovasküler rahatsızlıkların oluşumu veya prognozunda kalbin duyu sinir ağının işlevinde meydana gelen değişimlerin ne ölçüde etkisi olduğunun aydınlatılmasını da engellemiştir.

Literatürde NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinin kalbi saran dallarının MI sonrası yapısal değişime uğrama durumu henüz araştırılmamıştır. Ancak morfolojik değişim henüz gösterilememek ile birlikte MI sonrası NG nöronlarının transkriptom profillerinde ve elektriksel uyarılma kinetiklerinde meydana gelen değişimleri yayınlayan çalışmalar bulunmaktadır(9,16,51,55,56). Wan F. ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada MI öncesi ve sonrası NG nöronlarının mRNA anlatımları incelenmiştir. Yapılan karşılaştırmalı ölçüm sonucunda, ATP bağlandığında etkinleşen purinerjik almaç proteinleri kodlayan P2RX2 ve P2RX3 genlerinin ifade miktarlarında MI sonrası anlamlı artışlar olduğu gösterilmiştir(73). Bu değişimin MI sonrası kalbi inerve eden vagal duyu sinirlerinin ATP yoluyla depolarizasyonunu kolaylaştırdığı öne sürülebilir. AKG üzerinden TRPV1 reseptörleri yoluyla iletilen somatik ağrı duyusunun devamı durumunda, TRPV1 ifadesinin AKG'lerde arttığı ve bunun ağrı duyusunun hassaslaştırılmasına neden olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde iskemik durumun ATP'ye bağlı olarak kalpten beyin sapına vagal duyu sinirleri üzerinden iletiildiği kabul edildiğinde, P2RX2-3 reseptörleri üzerinden de benzer bir hassaslaştırma işleminin gerçekleştiği öne sürülebilir. Ancak kalbi saran vagal afferentlerin beyin ile iletişimle purinerjik sinyal yollarını kullanma durumu ve eğer kullanılıyorsa bunun ne oranda ve hangi bağlamlarda gerçekleştiği henüz bilinmemektedir(74).

4.5. Kalp İşlevini Sinirsel Düzenlemesini Araştırmada Optogenetik Yöntemler

Son yapılan kalbin motor sinir kontrolünü araştırmaya yönelik daha önce atıfta bulunulan Rajendran P. ve ark. tarafından yapılan çalışmada kalbi sinirleyen sempatik

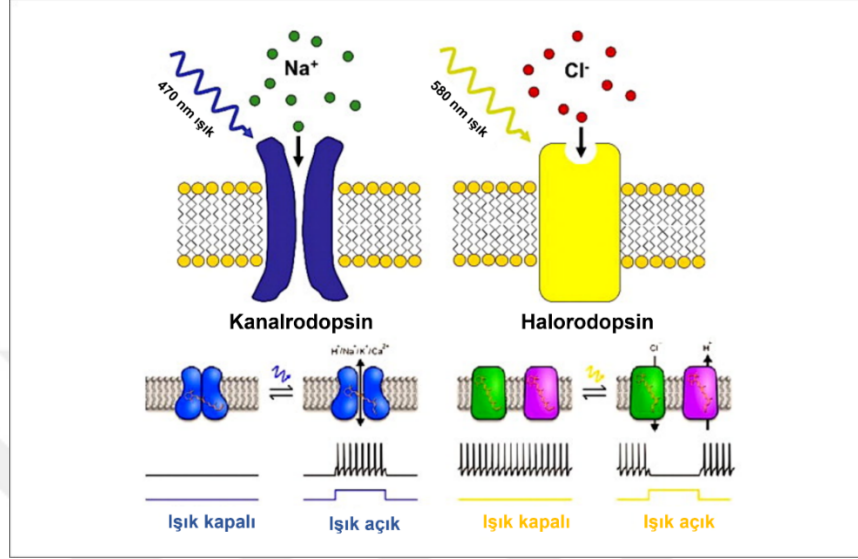
ve parasempatik nöronlarda mavi ışık ile etkinleşen almaç protein (kanalrodopsin 2) ifadesi gerçekleştirilerek kalbin motor sinir kontrolünün dinamikleri çalışılmıştır (5). Kısaca optogenetik olarak adlandırılan bu yöntem kalbe özgü sinirlerin fonksiyonlarının araştırılması namına önemli bir imkân sunmaktadır.

4.5.1. Optogenetik yönteminin genel özellikleri

Optogenetik muayyen dalga boyunda ışıklar kullanılarak hedeflenen hücre tipine münhasır bir depolarizasyon oluşturma yöntemidir. Aslında sinirbilim alanında ışığın beyinde belirli bir hücre tipinin işlevini kontrol etmeye yönelik kullanımına dair ilk fikirler 1979 yılına kadar takip edilebilmektedir. Nobel ödüllü bilim insanı Francis Crick sinirbilim çalışmalarındaki zorluklardan birinin beyindeki tek bir nöron tipini münhasır şekilde istenilen zaman aralığı ve süresince uyarabilecek bir yöntemin eksikliği olduğunu yıllar önce belirtmişti. İlaçların bu amaç için kullanımı hem zaman (ör: kana karışma süresi) hem de konum açısından yeterli hücrel çözünürlüğü sağlamamaktadır. Elektrotların kullanımı ise tek bir hücre tipini uyarabilecek çözünürlük sunmamaktadır. F. Crick tarafından da öne sürüldüğü şekilde ışığın gerçekten de bu amaca uygun olduğunu hem K. Deisseroth'nun(75) hem de Z. Pan'ın grubunun yaptığı öncü çalışmalar ile gösterilmiştir(76).

Optogenetik çalışmalarda kullanılan mikrobiyal opsinlerin ışık ile etkinleşebilme özelliği ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce keşfedilmiştir. Stoeckenius ve Oesterhelt tarafından yapılan çalışmada baketriyodopsinlerin göz ile görülebilir dalga boyunda ışık ile uyarıldığında açılabilen iyon kanalları olduğu gösterilmiştir (77). Daha sonra 1977 yılında halorodopsin ve 2002 yılında ise kanalrodopsin proteini keşfedildi (78). Kanalrodopsin molekülü tek hücreli yosunlarda (Algae) ışığa göre hareket etme (fototaksi) işlevini gerçekleştirmektedir. Halorodopsin ise halobakterilerde keşfedilmiştir. Kanalrodopsinler ışık-kapılı Ca^{++} geçirgen iyon kanalı etkinliği gösterirken, halorodopsinler ise Cl^{-} geçirgen iyon kanalı olarak çalışmaktadır(79). Hücre zarında Kanalrodopsin ifade eden nöronlar mavi ışık ile uyarım sonucu aksiyon potansiyeli üretirken, halorodopsin ifade eden nöronlar ise sarı ışık ile uyarıldığında baskılanırlar (Şekil 4.6.1.1). Bu sayede nöron tiplerine özel promotörler yoluyla ya da doğrudan viral vektörler aracılığıyla sadece arzulanan

nöronlarda kanalrodopsin ve türevi iyon pompaları ifade edilerek ilgili nöronların uyarılma ya da baskılanma durumunda ortaya çıkan yanıtlar araştırılabilir (79).



Şekil 4.6.1.1. Işığa duyarlı Kanalrodopsin (sol) ve halorodopsin (sağ) proteinlerinin çalışma prensipleri (80).

4.5.2. Sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde optogenetik uygulamalar

Optogenetik yönteminin kalbe nüfuz eden sinir hücrelerinin işlevini araştırmada kullanıldığı son çalışmalardan birisi Rajendran ve ark. tarafından transgenik farelerde yapılan çalışmadır (5). Bu çalışmada kalbi saran sempatik ve parasempatik sinirlerin kalpteki sinirlenme deseni gösterildikten sonra, sırasıyla, bu farklı fonksiyona sahip sinirlerin optogenetik yöntemler ile uyarılmasının eş zamanlı alınan EKG kayıtları ile kalp elektrofizyolojisindeki etkisine bakılmıştır. Özetle SG'deki (servikotorasik gangliyon) kalbi sinirleyen baş nöron kümelerinin konumu kalbin farklı bölgelerine retrograd boya verilerek işaretlenmiştir. Daha sonra TH kontrolünde cre rekombinaz ifade eden fare ile Cre'ye bağımlı kanalrodopsin ifade eden fare çaprazlanmıştır. Bu Cre-LoxP yaklaşımı ile noradrenerjik nöronlarında kanalrodopsin2 ifade eden ikili transgenik fare üretilmiştir. Gerçekten bu farenin SGundaki daha önce yeri belirlenen bölgeye 495 nm dalga boyunda mavi ışık tutulduğunda kalbin atım sayısında anlamlı bir artış gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu artışın postgangliyonik sempatik sinirlerden salgılanan noradrenalin molekülünün kalp kası hücrelerindeki bir G protein eşli

reseptör (GPCR) olan beta-1 adrenerjik reseptörlerine bağlanması üzerinden gerçekleştiği tezini desteklemek için aynı deney öncesinde propranolol uygulanan farede de icra edilmiştir. Seçici olmayan bir adrenerjik reseptör antagonisti olan, yani alfa-1, alfa-2 ve beta-1 adrenerjik reseptörlerinin hepsini bağlanarak bloklayabilen bu kimyasal sonrası kalbi sinirleyen TH-Cre+ nöronların sağ SG üzerinden optogenetik uyarımı kalp atım sayısında değişiklik meydana getirmemiştir (5). Aynı çalışmada kalbi sinirleyen parasempatik nöronların optogenetik uyarımı Chat-Cre kontrolün kanalrodopsin2 ifade eden farede gerçekleştirilmiştir. Sinoatriyal düğümü sinirlediği bilinen pulmoner venin altında gangliyonlu sinirlerin mavi ışık ile uyarımı sonucu kalp atım sayısının anlamlı şekilde düştüğü bulunmuştur. Bu sonuçlar optogenetik tekniğinin kalp işlevinin sinirsel yönetimini araştırmada oldukça kullanışlı ve yetkin bir yöntem sunduğunu göstermektedir.

Aynı çalışmada sinir liflerinin optogenetik uyarımının elektriksel uyarıya göre hedeflenen özgül sinir dallarının işlevini çalışmada daha odaklı ve etkin bir yaklaşım olduğu karşılaştırmalı analiz ile gösterilmiştir (5). Trakenin her iki yanında karotit arter ile birleşik şekilde hizalanan vagal demetin elektriksel ve optogenetik uyarımının atım sayısı üzerinde zamana bağlı farklı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Bunu en önemli sebebi elektriksel uyarımın vagal demetin hem NG kökenli duyu hem de kolinerjik motor bileşenini depolarize etmesidir. Mavi ışık uyarımı ise sadece kolinerjik motor sinirleri uyardığı için oluşan etkinin niceliği ve niteliği değişmektedir. Ayrıca sağ ve sol vagal demetlerin al dalının trakenin hemen yanından kesilmesi ve böylece kalbi sinirleyen pregangliyonik parasempatik motor sinirlerin arka beyin ile bağlantısı kesildikten sonra, kesilen vagal demetin beyin sapına bağlı yukarıda kalan kısmının yüksek frekansta (20 Hz) elektriksel uyarımı sonucu kalbin atım sayısında anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir. Aynı bölgeye aynı frekansta mavi ışık tutulması ise herhangi bir değişime yol açmamıştır. Elektriksel uyarım sonucu NG duyu sinirlerinin arka beyindeki parasempatik çekirdekleri NTS üzerinden uyardıkları bilinmektedir. Ancak kalbi sinirleyen bu parasempatik çekirdeklerden (kalbi kontrol eden başlıca NukleusAmbigus ve daha az olmak üzere Dorsal Motor Çekirdek) kalbe giden pregangliyonik sinirler kesilmiş durumda oldukları için, atım sayısında görülen düşüş NG duyu sinirlerinin NTS ya da başka ara nöronlar ve sinaptik bağlantılar ile merkezi sinir sistemindeki pregangliyonik sinirleri kontrol eden çekirdekler ile bağlantısı

olduğunu öne sürmektedir. Hülasa vagal duyu sinirlerinin uyarımının oluşturduğu parasempatik etkinin içerisinde sempatik sinirlerin baskılanmasının da dolaylı etkisi bulunmaktadır. Optogenetik ve elektriksel uyarım yöntemlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen bu bulgular optogenetik temelli yaklaşımların ileride vagal ve diğer sinir uyarım terapilerinin iyileştirilmesine ve daha özgül hale getirilmesine katkı sunabileceğini göstermektedir.

Literatürde doğrudan kalp ile değil fakat optogenetik yöntemler ile vagal duyu sinirlerinin akciğer fonksiyonu ve kan basıncını kontrolünü araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Cheng R. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada akciğeri sinirleyen P2ry1 ve Npy2r ifade eden vagal duyu fasiküllerinin iki ayrı alt popülasyon oluşturdukları ve akciğerde farklı sonlama desenleri oluşturdukları gösterilmiştir (61). Bu popülasyonlarda yapılan optogenetik uyarımların, solunum fiziyojisi üzerinde birbirinden farklı etkilere yol açtığı bu makalede gösterilmiştir. Bu çalışmada Vglut2-Cre (vesicular glutamate transporter 2) kontrolünde kanalrodopsin2 ifade eden vagal duyu nöronlarının optogenetik uyarımında da kalp atışında %90'a varan düşüş gösterilmiştir. Bu sonuç, bu hattın kalbi sinirleyen duyu nöronlarının işlevinin çalışılmasında kullanılabileceğini öne sürmektedir(61). Aynı grubun daha sonraki çalışmasında bu sefer Piezo2-Cre (Piezo2: mekanosensör iyon kanalı 2) kontrolünde kanalrodopsin 2 ifade eden transgenik hatta yine optogenetik yöntemler kullanılarak karotid arter ve aortik yayda sonlanan vagal duyu sinirlerinin kan basıncını düzenleyen reflekslerin oluşumundaki rolü gösterilmiştir.

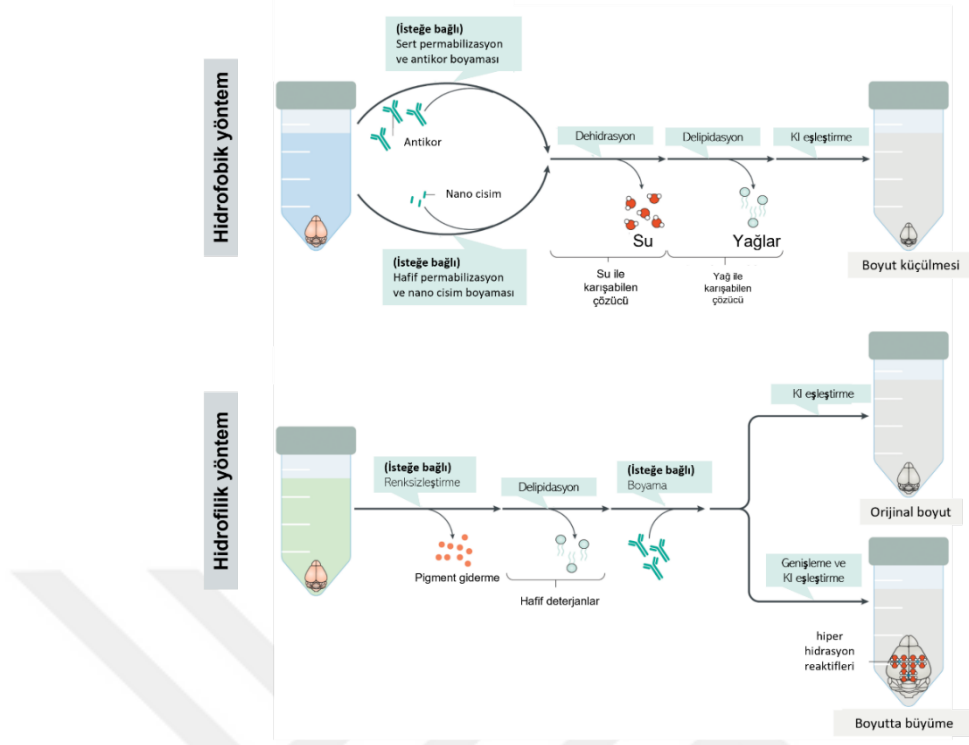
4.6. Tüm Kalpte Sinir Ağının Görüntülemesi

Kalp sinir ağını görüntülemek nöron belirteçleri olan PGP9.5, NF200 ve Tuj-1 antikoları ile organ düzeyinde immün boyama işlemleri yıllardır yapılmaktadır. Kalp ve dalak gibi yoğun miktarda kan damarları içeren organlarda immün boyama yapılmadan perfüzyon yapılması gerekmektedir. Bu amaç ile, örneğin, farede yapılan yapılan çalışmalarda kalp disekte edilmeden önce aort ya da kaval venlerden heparin vb. pıhtılaşmayı engelleyici madde verilerek kanın sistemden dışarı akışı sağlanmaktadır. Daha sonra yine damar yoluyla fiksatif verilerek ilk doku fiksasyonu işlemi kalp disekte edilmeden yapılmaktadır. Daha sonra disekte edilen kalbin geçirgenliği artırılıp BSA ya da hayvan serumları ile bloklanması ve arzulanan

antikorlar ile immün boyama işlemi gerçekleştirilmektedir. Eğer Cre-LoxP stratejisiyle kalp sinirleri floresan proteinler ile işaretlendiyse antikor uygulanmadan endojen floresan protein sinyali kalp boyunca görüntülenebilmektedir(81). Ancak bu tarz yaklaşımlar kalbin miyokard tabakasını inerve eden sinirlerin görsel olarak yeterince detaylı incelemesini sağlayamamaktadır. Yakın zamanda hem transgenik fare kalplerinde Cre-LoxP yöntemi ile üretilen floresan proteinlerin hem de vahşi tip fare kalplerinde antikor sinyallerinin miyokard tabakası boyunca derinliği görüntülemesi için organ boyunca doku şeffaflaştırması yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem ile kalp dokusu immün boyama öncesi şeffaf hale getirilip mikroskop ile görüntüleme sırasında lazer kaynağından gelen ışığın daha derine nüfuz edebilmesi yoluyla daha derinlikli inervasyon ağları görüntülenebilmiştir (5). Aşağıda detaylandırılan bu doku şeffaflaştırma yöntemleri sayesinde kalp dokusundaki ışığı emen ve yansıtan yağlar çıkarılıp daha yüksek derinlikte görüntüler elde edilebilmiştir.

4.6.1. Doku şeffaflaştırma yöntemleri

Doku şeffaflaştırma bir dokuda bulunan ve ışığı dağıtıcı ya da emici özellik gösteren moleküllerin uzaklaştırılması işlemidir. Mikroskop ile görüntüleme işlemi öncesi dokunun içerisindeki özellikle lipit moleküllerinin deterjan yardımıyla çözülerek uzaklaştırılması sonucu doku daha şeffaf bir hale gelir. Bu sayede çeşitli antikorlar ile boyanmış organların yüksek derinlikli görüntülemesi mümkün olmaktadır.

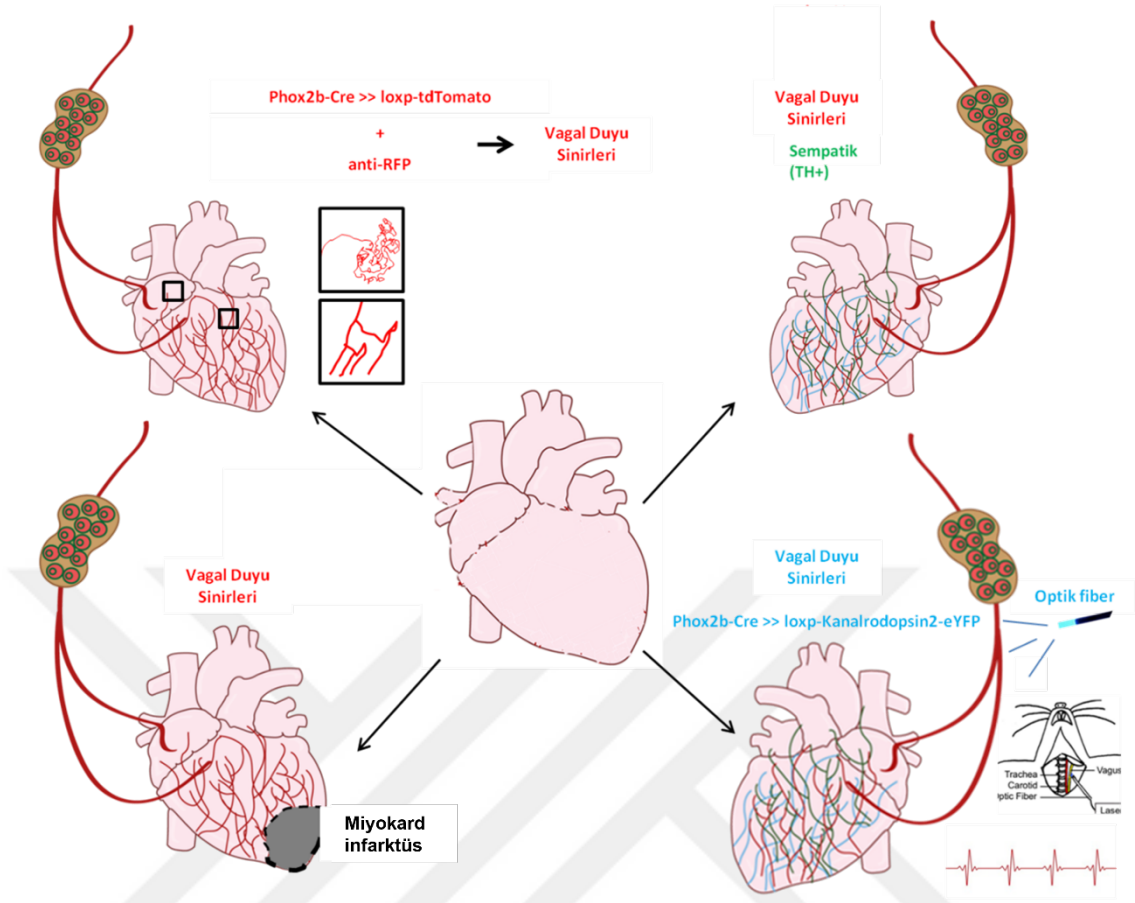


Şekil 4.6.1.1. Hidrofobik (üst) ve hidrofilik (alt) doku şeffaflaştırma yöntemleri. KI= Kırılma indisi(82).

Doku şeffaflaştırma yöntemi özellikle yoğun oranda lipit içeren sinir sistemi yapılarının yüksek derinlikli ve çözünürlüklü görüntülediği sinir bilim çalışmalarında uygulama alanı bulmuştur(82). Bu çalışmalarda genellikle iki farklı doku şeffaflaştırma yaklaşımı ön plana çıkmaktadır. Birincisi hidrofobik doku şeffaflaştırma yöntemidir. Bu yöntemde hidrofobik yani su ile karışmayan çözücüler kullanılarak şeffaflaştırma gerçekleştirilir. Örneğin iDisco vb. yöntemlerde bu çözücü Di-benzil-eter veya benzil-benzoat gibi çözücülerdir. Bu hidrofobik çözücüler hidrofobik yapıdaki lipit moleküllerinin organdan çözülerek uzaklaştırılmasını sağlar. Diğer yaygın şeffaflaştırma yöntemi ise hidrofilik yöntemdir. Suda çözünebilir kimyasallar kullanılarak icra edilen bir yöntemdir. Örneğin CUBIC yönteminde protein tabiatını taşıyıcı eden üre molekülü kullanılarak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmektedir (82).

5. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında Phox2b-Cre::tdTomato transgenik fare kalpleri perfüze edilip fikslendi. Daha sonra Phox2b-Cre kontrolünde NG-kaynaklı vagal afferent sinirlerde ifade edilen tdTomato raporcu proteinleri anti-RFP antikoru ile tetkik edilip bütün kalpteki sinir ağı görüntülendi (**Şekil 5.1., sol üst**). Vagal duyu sinirleri transgenik ve immün boyama yaklaşımı ile tespit edildikten sonra vagal duyu sinirlerinin TH immünoreaktif sempatik sinirler ile birlikte görüntülemesi gerçekleştirildi (**Şekil 5.1., sağ üst**). Daha sonra vagal duyu sinir ağının Miyokardiyal İnfarktüs geçiren kalplerdeki morfolji yapısı kalp boyunca görüntülendi (**Şekil 5.1., sol alt**). Son olarak Phox2b-Cre::kanalrodopsin2-eYFP transgenik hattı kullanılarak vagal duyu sinirlerinde mavi ışık ile etkinleşen kanalrodopsin2 iyon kanalı ürettirildi. Trakenin yanından aşağı inen vagal sinir liflerine optik fiber yoluyla 465 nm dalga boyunda ışık tutularak Phox2b-Cre ifade eden vagal duyu sinirlerinin depolarizasyonu icra edildi (**Şekil 5.1., sağ alt**). Bu optogenetik uyarım sırasında alınan eşzamanlı EKG kayıtları ile vagal duyu sinir uyarımının kalp ritmi üzerindeki etkisi tespit edildi. Tüm bu çalışmalarda kullanılan gereçler ve uygulanan yöntemler aşağıda detaylı şekilde verilmiştir.



Şekil 5.1. Kalbi saran Phox2b-Cre::tdTomato ifade eden vagal duyu sinirlerinin anti-RFP boyaması ile gösterimi.

5.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

Tablo 5.1.1 Transgenik farelerin genotiplenmesinde kullanılan sarflar

Sarf malzemeler	Firma	Kodu
OneTaq® Hot Start Quick-Load® 2X Master Mix	NEB	M0488L
Yükleme boyası	Thermo Fisher	R0631
Quick-Load 2-Log DNA Ladder	NEB	N0469
Agaroz jel	Multicell	800-015-EG

Tablo 5.1.2 *Invivo* operasyonlarda kullanılan alet, sarf ve kimyasallar

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası
Ketasol	Richterpharma	3516
Rompun	Bayer	430720U
Mikro Cımbız	Aesculap	BD333R
Mikro Cımbız	Aesculap	BD331R
Mikro Cımbız	Aesculap	BD329R
Micro Needleholder	Aesculap	FD048R
Makas	Aesculap	FM010R
Emilebilen dikiş ipi 6.0	Pegelakrapid	Q1160
Emilebilen dikiş ipi 5.0	Doğsan	S2160
Terramycin	Pfizer	
Ventilasyon Tüpü	Harvard Apparatus	73-0027
Trakeal Kanül	Harvard Apparatus	73-2830

Tablo 5.1.3. İmmun boyamalarda ve görüntülemelerde kullanılan malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Kodu
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	A9418
DAPI	Sigma	D9542
Hidrojen Peroksidaz	Sigma	H1009
Keçi serumu	Gibco	16210-064
Paraformaldehit	Sigma	158127
Sodyum Azit	Sigma	S8032
Triton X-100	Sigma	X100
Tween-20	Sigma	P1379
Fosfat Tamponu (PBS)	BioShop	PBS404.100
Glycine	Sigma	G8898
Bloklama tamponu	Thermo	37520
Antibody Diluent Reagent Solution	Life Technologies	3118
Heparin	Mustafa Nevzat İlaç	Nevparin 25.000 IU/ 5 ml
Ultra Saflıkta Agaroza	Invitrogen	16500-100
DMSO	Sigma	D2650
Triethanolamine	Sigma	108379.1000
Quadrol	Sigma	122262
Urea	Sigma	108487.1000
Eppendorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R
15 ml Falcon	Falcon	352096
50 ml Falcon	Falcon	352070
35 mm Cam Petri	WPI	FD35-100

Tablo 5.1.4. Görüntülemeye kullanılan antikorlar

Antikor	Konak	Firma	Dilüsyon
anti-RFP	Tavşan	Rockland, 600-401-379	1:500
anti-RFP	Keçi	Rockland, 200-101379	1:500
anti-RFP	Tavşan	Rockland, 600-401-379	1:500
anti-TH	Tavşan	Abcam, ab112	1:500
anti-TUJI	Tavşan	Abcam, ab18207	1:500
anti-PGP9.5	Fare	Abcam, ab8189	1:500
Anti_Rabbit_ALEXA FLUOR PLUS 488	Eşek	Thermo, A32790	1:500
Anti_Rabbit_ALEXA FLUOR PLUS 647	Eşek	Thermo, A32795	1:500
Anti_Goat_ALEXA FLUOR PLUS 488	Eşek	Thermo, A32814	1:500

Tablo 5.1.5. Bakteri çoğaltma ve virüs yapımında kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	Marka	Katalog Numarası
Amicon Ultra 15ml 100K	MILLIPORE	UFC910024
150 mm petri	Corning	430599
OptimemMedium	Thermo Fisher	31985070
LB Agar	Biomatik	A8523-500G
LB Broth	Biomatik	A8523-500G
293AAV hücre hattı	Cell BioLabs	AAV-100
OptiPrep™ DensityGradientMedium	Sigma-Aldrich	D1556
Benzonase	Sigma-Aldrich	E8263-25 KU
%0.05 Trypsin/EDTA	Gibco	25300054
%0.25 Trypsin/EDTA	Gibco	25200056
Jelatin	Sigma Aldrich	G9391-100g
DPBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco	14190-094
DPBS (+CaCl ₂ , + MgCl ₂)	Gibco	14040-091
100 mm bakteri petri	Sigma Aldrich, Corning	CLS430167
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen	S33102
D-Sorbitol High Purity	Sigma-Aldrich	BMA2450
Gel LoadingDyePurple (6X)	BioLabs	B7024S
Glutamax	Gibco	35050-61
MEM NEAA	Gibco	11140-050
Na-pyruvate	Gibco	11360-070
P/S	Sigma Aldrich	M3148
Ampisilin (100mg/ml)	Multicell	450-110-EL
Plazmid Isolation Kit	AMBRD Laboratories	10-13-01-010
Plastik Öze	ISOLAB	S.082.01.003.010
100 mm Bakteri Petrisi	Corning	CLS430167
15 ml Falcon	Falcon	352096
50 ml Falcon	Falcon	352070
Cryotubevial	Nunc	363401
T75 flask	Sigma Aldrich, Corning	430725U
DMEM High Glucose	Thermo Fisher	21969035
Plasmidmaxi kit	QIAGEN	12162
OptiSeal, PolypropyleneCentrifuge tubes (56/cs)	Beckman	361621

5.2 Cihazlar

Tablo 5.2.1. Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihaz ve yazılımlar

Cihaz/Yazılım Programı	Marka	Model
Konfokal mikroskop	Zeiss	LSM880
Konfokal mikroskop	Zeiss	LSM800
AxioZoom	Zeiss	V.16 mikroskop
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery V8
Operasyon mikroskobu	Zeiss	ZeissStemi 305
Vibratom	Leica	VT1000S
Cryostat	Leica	CM1950
Mouse VentilatorMiniVentType 845	Harvard Apparatus	73-0043
EKG cihazı	BIOPAC Systems	Inc. MP36
Ultra santrifüj	Beckman	Ti70 rotor
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
Santrifüj	Eppendorf	5810R
Elektroforez cihazı	BIO-RAD	PowerPac
Gerçek zamanlı PCR	Biorad	CFX Connect
T100TM ThermalCycler	Biorad	1861096
Spektrometre cihaz	BioRAD	
pH metre	Isolab	pH7110
Isıtıcı Plaka	WPI	Hot coldplate
Tartı	Ohaus Explorer	EX124-US
Ultrasonikator	BandelinSonarex	
Vorteks	BenchmarkScientific	BV1000
Distile Su Cihazı	Millipore	ZRQSV8W
Multipipet	GILSON, pipetman	FA10009
Çalkalayıcı su banyosu	N-Biotek	
Nanodrop	Thermo Scientific	
Mikrodalga Fırın	Samsung	
Fiji	ImageJ	2.0.0-rc 69/1.52i
Matlab	MathWorks	R2018a
GraphPadPrism	GraphPad Software, LLC	Versiyon 7.0

5.3. Deney Hayvanları

Deney hayvanları üzerinde yapılan tüm deneysel işlemler, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan 38828770-604.01.01-E.10841 ve E-38828770-772.02-2459 numaralı izin çerçevesinde Medipol Araştırma Merkezi (MEDİTAM) bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler için kullanılması planlanan ebeveyn transgenik fare suşları, Jackson Laboratuvarı'ndan (JAX) satın alındı. Vagal afferentlerde tdTomato ekspresyonunu seçici olarak hedeflemek için Phox2b-Cre (JAX #16223; (29)) fareleri, Cre'ye bağlı bir tdTomato transgeni (JAX #07909; (83)) taşıyan Ai9 fareleri ile çaprazlandı. Benzer şekilde, parasempatik kardiyak ganglionlarda tdTomato transgeninin ekspresyonunu yönlendirmek için Chat-Cre (JAX #06410; (29)) fareleri Ai9 fareleri ile çaprazlanmıştır. Tüm in vivo deneyler, MEDİTAM'ın İstanbul Medipol Üniversitesi'ndeki hayvan araştırma tesisinin yasalarına göre yapılmıştır. Hem sağlıklı hem de MI kalpleri için sinir yoğunluğu ve çapı analizlerinde toplamda beş çift transgenik Phox2b-Cre:tdTomato faresi kullanıldı. Kolonilerin çoğaltılmasında ve kontrol deneylerinde C57BL/6J vahşi tip fare suşları kullanıldı.

5.4. Transgenik Hatların Çoğaltılması, Çaprazlanması ve Genotiplemesi

Bu tez çalışması kapsamında, vagal duyu nöronlarının görüntülenmesi amacıyla kullanılan Phox2b-Cre ve parasempatik sinirlerin incelenmesinde kullanılan Chat-Cre transgenik soyları ile bu soyların tdTomato transgenini ifade eden fareler ile çaprazlanması sonucu oluşturulan ikili-transgenik soyların üretim kafeslerine alınıp çoğaltılması ile elde edilen yavruların genotip analizleri Tablo 5.4.1'de verilen primerler kullanılarak Jackson Laboratuvarı'nın (JAX Lab) önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Genotipleme işlemi için doğumunun üzerinden yaklaşık 1 ay geçen yavruların kulaklarından forseps ve steril makas yardımıyla alınan küçük bir doku parçası DNA izolasyonunda kullanılmıştır. DNA izolasyonu için JAX lab'da önerilen protokol takip edilmiştir. DNA izolasyonu için yavru farelerden elde edilen kulak örnekleri 75 µl 25 mM NaOH/0.2mM EDTA içeren lizis çözeltisi içerisinde Thermal Cycler (Bio-Rad T100) cihazı kullanılarak 98 °C'de bir saat inkübe edildi. Sonrasında her bir kulak örneği için tüplere 75 µl 40 mM Tris HCl (pH: 5.5) içeren nötralizasyon çözeltisi eklenerek genomik DNA süspansiyonda elde edildi. Hot Start Master Mix (New England Biolabs) ve ilgili primerler kullanılarak hazırlanan PCR

karışımına son olarak hazırlanan DNA örneklerinden 1 µl eklendi. Genotipleme protokolü olarak JAX Lab'ın önerdiği Touch-down PCR protokolü kullanıldı (Tablo 5.4.2). Tablo 5.4.1'de verilen primerler ve Tablo 5.4.2'de belirtilen protokol kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünleri %1.5 yoğunluğunda hazırlanan agaroz jelde 30 dakika boyunca 80 volt güç uygulanarak yürütüldüler. BioRad Chemi-doc cihazı ile görüntülenen PCR ürünlerinin bant boyları, JAX lab internet sitesinde belirtilen referans bant boyları ile karşılaştırılarak transgenik farelerin genotip analizi tamamlandı.

Tablo 5.4.1 Transgenik hatların genotiplenmesinde kullanılan primerler

Gen	Primer Sekansı
ChR2_EGFP-C-frwd	CACGAACTCCAGCAGGACCATG
ChR2-rev-2	CATATATCGAGGGTTATCATACTGTGCC
TdTomato_9020	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA
TdTomato_9021	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC
TdTomato_9103	GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC
TdTomato_9105	CTG TTC CTG TAC GGC ATG G
Phox2b_14314	CGG TTA TTC AAC TTG CAC CA
Phox2b_31704	AGT GGC CTC TTC CAG AAA TG
Phox2b_31705	TGC GAC TGT GTC TGA TTT CC
Phox2b_51219	CAC CGT CTC CAC ATC CAT C

Tablo 5.4.2 Genotipleme PCR protokolü

Basamak	Sıcaklık °C	Süre	Not
1	94	2 dk	
2	94	20sn	
3	65	15sn	Her siklus için -0.5 C düşürme
4	68	10sn	
5			2-4 basamakları arası 10 siklus (Touchdown)
6	94	15sn	
7	60	15sn	
8	72	10sn	
9			6-8 basamakları arası 28 siklus
10	72	2 dk	
11	10		

5.5. Virüs Üretimi

AAV virüslerini üretmek için HEK hücrelerinde üçlü transfeksiyon stratejisi uygulandı. AAV kapsit proteini, trangen ve yardımcı proteinleri kodlayan üç plazmit HEK hücrelerine verildi. Transfeksiyondan 5 gün sonra hücreler parçalanıp AAV virüsleri izole edildi (5).

Tablo 15.11.1. Virüs üretiminde kullanılan vektörler

Katolog numarası	Vektör	Özellik
81070	Retro helper-CAP	Yardımcı vektör
112865	AAV2/9	Yardımcı vektör
103006	PHP.S	Yardımcı vektör
28306	Flex-tdTomato	pAAV
49056	AAV_GFP-Cre	pAAV
20298	pAAV-EF1a-doublefloxed-hChr2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA	pAAV
112867	DeltaF6	Helper
AF369965-NovoPro	pHelper	Helper

5.6. İmmün Boyama

Farelere 1X PBS içinde Heparin (Nevparin; 500U) ve ardından %4 PFA ile intrakardiyal olarak perfüze edildi. Daha sonra kalpler diseke edildi ve 24 saat oda sıcaklığında (RT) %4 PFA'da tutuldu. PBS ile gece boyunca yıkandıktan sonra, daha önce yayınlanmış immün boyama protokolünün modifiye edilmiş bir versiyonu kullanıldı [17]. Kısaca kalpler, 1X PBS, %0.2 Triton X-100, %20 DMSO ve 0.3 M glisin içeren geçirgenleştirme çözeltisine alındı ve iki gün boyunca oda sıcaklığında tutuldu. Ardından kalpler iki gün boyunca %3 BSA'da bloke edildi. Birincil antikolar anti-TH (1:500, Abcam, #ab112), anti-RFP (1:500; Rockland, #600-401-379) ve anti-RFP (1:500; Rockland, #200-101-379) iki gün boyunca Antikor Seyreltici Solüsyonu (Thermo Fisher, #3118) içinde uygulandı. Kalpler, 1X PBS, %0.2 Tween-20 ve 10 mg/ml heparin içeren PtWH solüsyonu ile gece boyunca yıkandı. Son olarak, 1:500 dilüsyonlarda Alexa Fluor Plus 488 (Invitrogen, A32814) ve Alexa Fluor Plus 647 (Invitrogen, #A32795) iki gün boyunca uygulandı, ardından PtWH içinde bir gün yıkama yapıldı. Daha sonra immün boyanmış numuneler 1X PBS'de tutuldu. Kalp dışındaki dokular için her adım bir gecede gerçekleştirildi.

Tablo 5.6.1 İmmünokimyasal boyamalarda kullanılan solüsyonların içerikleri

Sarf Malzeme	Miktar
PTx.2 (100ml)	
PBS 1X	100mL
TritonX-100	200uL
PTwH (100ml)	
PBS 1X	100mL
Tween-20	200µL
10mg/mL Heparin	100µL
Permabilizasyon Solüsyonu (10mL)	
PTx.2	8mL
Glycine	0,23 g
DMSO	2mL
Bloklama Solüsyonu (50mL)	
PTx.2	8.4 mL
Keçi Serumu	0.6 mL
DMSO	1 ml

5.7. Beyin Sapı ve Spinal Kord'dan Kesit Alma

Beyin sapı ve spinal korddan kesi alma işlemi daha önce literatürde gösterilen şekilde gerçekleştirildi (84). Sakrifiye edilmiş fare yüzüstü şekilde sabitlendi. Sonra kafa kısmı boynun bir kısmını içerecek şekilde ve beyin sapını ve spinal kordun bir

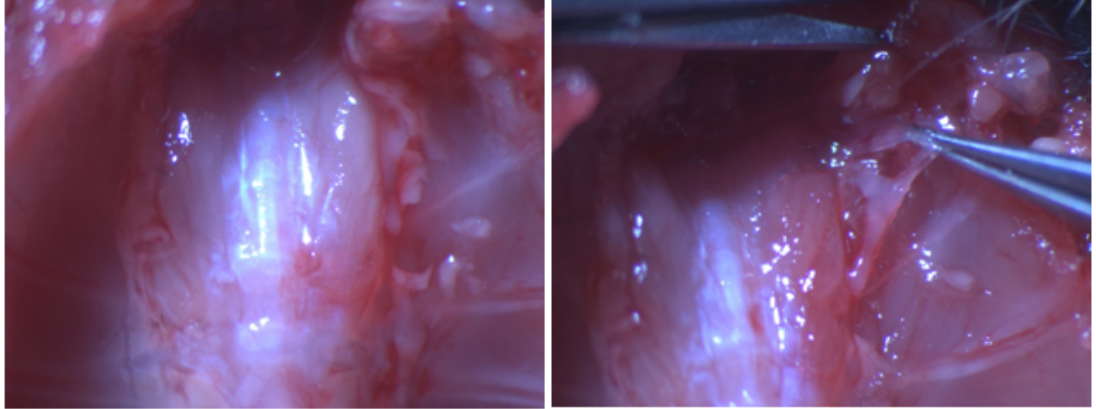
kısmını kapsayacak şekilde yatay eksen boyunca kesilerek alt gövdeden ayrıldı. Cerrahi makas yardımıyla kafa derisi yüzölçümü kafatası açık hale getirildi. Daha sonra orbita (göz çukuru) kısmından kalın ve küt uçlu forseps ile kafatası bir el ile sabitlendi ve diğer el kullanılarak ince uçlu mikrocerrahi makas yardımıyla beyin sapından kortekse doğru kafatası kemiği ortadan sagittal doğrultuda kesildi. Sonra her iki lateral doğrultuda korteksten ayrıldı. Boyun kemikleri forseps ile kırılarak beyin sapı ve spinal kord açığa çıkarıldı ve çevre dokulardan temizlendi. Daha sonra beyin ön kısmı olfaktor bulbul bölgesinden ve optik sinirlerden kesilerek ayrıldı. Beyin, beyin sapı ve spinal kordun kranial kısmı birlikte soğuk 1X PBS içeren tüpe alındı. Daha sonra Leica VT1200 vibratome yardımıyla beyin sapı ve spinal kord bölgelerinden 1mm'lik yatay kesitler alınıp görüntülendi.

5.8. NG İzolasyonu

Ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezi altına alınan fareler sırt üstü sabitlendi. Torakotomi yapıldı ve trake üzerindeki tükürük bezleri forseps yardımıyla kenarlara alınıp trake görünür hale getirildi. Sağ ve sol NG dokuları için sırasıyla trakenin sağ ve sol tarafından uzanan karotit arterlere koşut hizalanmış vagal alt demetlerin konumu belirlendi. Daha sonra bu alt demetler yukarı doğru karotit arterin çatal yapıp jugularforamene doğru yöneldiği düğüme kadar takip edildi. Yukarıdan ve aşağıdan gelen vagal sinir demetlerinin birleştiği bu bölgeden jugularforamene doğru forseps ucu yardımıyla ilerlenerek vagal sinir bariz hale getirildi. Sinirin kalınlaşarak gangliyon ile birleştiği noktadan itibaren forseps ucu ile gangliyon çevre dokulardan yavaşça ayrıştırıldı ve gangliyon vagus üst dalı ile birleştiği nokta açık hale getirildi. Daha sonra bir el ile vagus sinirin alt dalı hemen gangliyon altından forseps ile kavrandı. Forseps ile aşağı yönde çekim uygulanırken öbür el ile kıvrık ince makas yardımıyla gangliyondan çıkan vagus üst dalı kesildi. Sadece alt dala bağlı şekilde serbest kalan NG alt dalın küçük bir kısmı kalacak şekilde aşağıdan da kesilerek ependorf tüpe alındı.

5.9. SG İzolasyonu

Stellate (servikotorasik) gangliyon (SG) eldesi daha önceki literatüre göre yapıldı (85). Ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi altına alınan fareler sırt üstü sabitlendi. Toraks boşluğu açıldı ve akciğerler kesilerek uzaklaştırıldı. Çevre dokular forseps yardımıyla temizlendi ve sağ ve sol kaburgaların ortasındaki longuscolli kasları görünür hale getirildi. Daha sonra bu kasların üzerindeki bağ doku forseps yardımıyla yırtılarak torasik omurga ve ona bağlı sağ ve sol kaburgalar belirlendi. Birinci sol kaburga kemiğinin omurga ile birleştiği bölgede yerleşik olan sol SG (servikotorasik gangliyon) dokusu forseps yardımıyla çevre dokulardan ayrıldı (Şekil 5.4.1.). Daha sonra bu gangliyondan çıkan üst ve alt sinir dalları kesilerek serbest hale gelen sol SG% 4 PFA içerisinde fiksleildi. Benzer şekilde sağ SG da aynı şekilde çıkarılarak fiksleildi.



Şekil 5.9.1. Farede soldaki SG'nin birinci kaburganın omurga ile birleştiği bölgeden forseps ile çıkarımı

5.10. AKG İzolasyonu

Yetişkin 10-12 haftalık transgenik fareler ketamine (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi altına alındı. AKG izolasyonu amacıyla fareler yüzüstü sabitlendi. İlk önce deri daha sonra ise servikal bölgesi kesildi ve böylece omurilik görünür hale getirildi. Daha sonra servikal ve torasik seviyelerdeki AKG gangliyonları elde etmek için bu seviyelerdeki kostalar forseps yardımıyla ayrıldı. Açığa çıkan AKG gangliyonlar üst ve alt sinirlerden kesilip serbest hale getirildi. %4 PFA içeren tüplere alındı.

5.11. Doku Şeffaflaştırma

5.11.1. Cubic şeffaflaştırma protokolü

Phox2b-Cre::tdTomato transgenik farenin NGlarıCubic protokolünün bir versiyonu şeffaflaştırıldı (86). Fikse edilmiş NG dokusu %10 Triton X-100 (Sigma), %5 NNNN-tetrakis (2-HP) etilendiamin (Sigma) ve %10 üre (Sigma) içeren Cubic R1 çözeltisi içerisine alındı ve gece boyunca oda sıcaklığında çalkalandı. Daha sonra şeffaflaştırılmış NG dokusu ZEISS LSM 880 konfokal mikroskopunda görüntülendi.

Fare kalplerinin Cubic ile şeffaflaştırılması işleminde daha farklı bir uygulama yapıldı. Fikslenmiş fare kalpleri %10 Triton, %5 NNNN-tetrakis (2-HP) ethylenediamine, %10 üre ve 25 mM NaCl içeren R1 solüsyonunun distile su kullanılarak %50 oranında seyreltilmiş versiyonu içerisinde 6 saat boyunca 37 °C'de çalkalanarak tutuldular. Daha sonra aynı kalpler seyreltilmemiş R1 solüsyonu içerisine alınıp 37 °C'de 8 gün boyunca çalkalandı. Kalplerin içinde bulunduğu R1 solüsyonu uygulamanın 2., 4. ve 6. günlerinde değiştirildi. Protokolün 8. gününde kalpler konfokal mikroskopu ile görüntülendi.

Tablo 5.7.1. CUBIC işleminde kullanılan solüsyonlar

Sarf Malzeme	Miktar
CUBIC-1 (Solüsyon-1)	
Üre	%25
Quadrol	%25
Triton X-100	%15
CUBIC-2 (Solüsyon-2)	
Üre	%25
Sükroz	%50
Triethanolamine	%10
Triton X-100	%0.1

5.11.2. iDISCO Şeffaflaştırma Protokolü

Fikslenen fare kalpleri sırasıyla %20, 40, 60 ve 80 yoğunlukta metanol serisinden geçirildi (5). Her bir aşamada oda sıcaklığında 1 saat süreyle tutularak kalpler metanol ile dehidre edildiler. Sonra oda sıcaklığında 1 saatlik %100 metanol ile iki defa yıkama yapıldı ve kalpler 4°C'de soğutuldu. Kalpler daha sonra oda

sıcaklığında %66 diklorometan/%33 metanol karışımı içinde gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi, Sonra oda sıcaklığında iki kez %100 metanol içinde 1'er saat boyunca yıkanan kalpler 4°C'de soğutuldu. Daha sonra kalpler metanol içinde %5 H₂O₂ ile gece boyunca 4°C'de tutuldu ve ağartıldı. Sonra kalpler tekrar bir metanol serisinden geçirilerek yenidenhidre edildi ve ardından 0.01 uM PBS ile yıkandı. Daha sonra her biri oda sıcaklığında 1 saat süreyle 0.01 uM PBS ve %0.2 Triton X-100 ile iki defa yıkama yapıldı. İmmün boyama için, kalpler %0.2 Triton X-100, %20 DMSO ve 0.3°M glisin içeren 0.01 uM PBS ile iki gün oda sıcaklığında çalkalanarak geçirgen hale getirildi. Daha sonra %0.2 Triton X-100, %10 DMSO ve %5 normal eşek serumu içeren 0.01 uM PBS solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında bloke edildi. Daha sonra 400 µl ticari antikor solüsyonu (Antibody Diluent Reagent Solution, Life Technologies) içerisinde primer antikor ile kalpler oda sıcaklığında 48 saat boyunca çalkalandı. Daha sonra 24 saat boyunca PTwH solüsyonu ile yıkanan kalpler 400 µl ticari antikor solüsyonu içerisinde seyreltilmiş sekonder antikor ile 48 saat boyunca inkübe edildi. Son olarak 24 saatlik PTwH solüsyonu ile yıkama yapıldı. Sonra boyalı kalpler tekrar metanol serisi dehidre edildi. Sonra oda sıcaklığında 3 saat boyunca %66 diklorometan/%33 metanol karışımı içinde çalkalanarak inkübe edildi. Kalpler daha sonra iki kez %100 diklorometan ile oda sıcaklığında yıkandı. Son olarak benzil eter içinde inkübe edilen ve saklanan kalpler görüntülemeye alındı.

5.12. Mikroskop ile Görüntüleme

Tez çalışmasında elde edilen bütün görüntülemeler için LSM 880 konfokal mikroskobu (ZEISS) kullanıldı. Bütün kalp çekimleri Plan-Apochromat Fluar 5X/0.16 M27 objektifi ile gerçekleştirildi. Kalbin tamamını görüntülemek için kalplerin boyutuna göre değişen sayıda yatay ve dikey eksende kareler (tile) belirlenerek çekim yapıldı. Tile ayarları yapılırken her bir tile arasındaki kesişme yüzdesi %10 olarak belirlendi. Z-stack çekimlerinde her bir slice aralığı için Zen Black programının belirlediği optimal değer seçildi (~10-15 um). 488 nm dalga boyunda yapılan görüntülemelerde Multiline Argon lazer (458/488/514nm, 25 mW) kullanıldı. 633 nm dalga boyunda yapılan görüntülemeler için Solid state lazer (633nm, 5mW) kullanıldı. Bu tez çalışmasında LSM 880 konfokal mikroskobu ile gerçekleştirilen bütün görüntülemelerde Airyscan detektörü kullanıldı.

Gerçekleştirdiğimiz çekimlerde hegzagonal yapıda 32 GaAsP kanaldan oluşan bu dedektörün örnekten gelen ışığı klasik pinhole aparatına göre daha yüksek oranda yakaladığı tespit edildi. Z-stack görüntüleri elde edildikten sonra Zen Black programı (ZEISS) kullanılarak 2 boyutlu maksimum projeksiyon görüntüleri elde edildi.

Yine aynı program kullanılarak oluşturulan maksimum projeksiyon görüntüdeki kareler (tile) stitching işlemi ile birleştirildi. Görüntülerin parlaklık ve keskinlik ayarları Zen Black programı (ZEISS) kullanılarak manuel şekilde gerçekleştirildi. Bütün kalp görüntülemelerinde yaklaşık 200 um derinlik elde edildi. Yüksek çözünürlüklü görüntülemeler Plan-Apochromat 20X/0.8 objektif kullanılarak gerçekleştirildi. Benzer şekilde elde edilen Z-stack görüntüler Zen Black programında maksimum projeksiyon yöntemiyle iki boyutlu hale getirildi ve parlaklık ve keskinlik düzenlemeleri yapıldı. Hem 5X hem de 20X objektif ile çekilen bütün z-stack görüntülerin üç boyutlu projeksiyon versiyonları ve videoları ZEN Black programında yapıldı ve “avi” uzantısıyla kaydedildi.

5.13. Sinir Çapı Analizi

Zen Black programı ile bütün kalp z-stack görüntülerinden (LSM 880) maksimum projeksiyon yöntemi ile iki boyutlu kalp görüntüleri elde edildi. 2D görüntüler ImageJ'de binary hale getirildi. Binary görüntülerin sinirsel izlemesi Neutube1.0 yazılımı kullanılarak yapıldı(87). Nöral izleme dosyalarında (swc) saklı olan sinir eğrileri Charles Fowlkes(5) tarafından yazılan “visdata_03” komut dosyası kullanılarak Matlab'da (MathWorks) akson çapı analizi için sınıflandırıldı. Görüntülerdeki fiber prevalansı analizleri için, Matlab'da “imread” fonksiyonu kullanılarak her bir renk için rölatif piksel oranı hesaplandı. Sinir yoğunluğu analizi için, tüm kalp görüntüleri binary hale getirildi ve her iki pikselin nispi oranları Matlab'da ölçüldü.

5.14. Kalbin MI Modellemesinin Oluşturulması

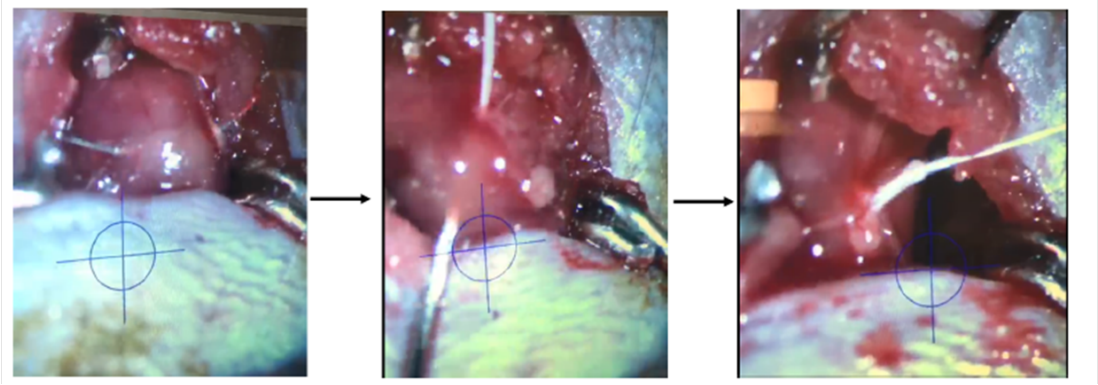
Farelere, Ketamin (50 mg/kg, Pfizer) ve ksilazin (5 mg/kg, Bayer) intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Daha sonra fareler MiniVent (Harvard Aparatı) kullanılarak torakotomize edildi. Kalp açığa çıkarıldı ve sol ön inen (LAD) daha önce tarif edildiği gibi ipek sütür ile bağlandı(88). Kısaca, kostalarekartör

yardımı ile açıldıktan sonra görünür hale getirilen kalbinyüzeyindeki LAD ortalanarak şekilde dikiş iğnesinin geçirilmesi (Şekil 5.14.1, sol) sonrası kalpte kanama yaratmamak için iplik dikkatlice çekilir (Şekil 5.14.1, orta) ve hasar oluşturmak için düğüm atılır (Şekil 5.14.1, sağ).

Daha sonra kostadaki açıklık suture edilerek kapatıldı. Son olarak, trakea açıklığı ve cilt dikildi. LAD oklüzyonu sırasında, EKG kayıtlarının ST sapmalarının eşzamanlı tespiti ile MI doğrulandı. Fareler, MI prosedüründen 20-30 gün sonra disekte edildi (88).

Tablo 5.14.1. Solunum cihazında kullanılan değer tablosu. Hayvanın kilosuna göre ayarlanan solunum hacmi (μl) ve solunum hızı (bpm) değerleri

Ağırlık (g)	Solunum Hacmi (μl)	Solunum Hızı (bpm)
1	6	322
2	12	269
3	18	242
4	25	225
5	31	212
10	64	177
15	98	159
20	132	148
25	166	140
30	201	133
40	270	124
50	341	117



Şekil 5.14.1. Farelerde Miyokard İnfarktüs modeli oluşturulması.

5.15. Vagal Duyu Sinirlerinin Optogenetik Uyarımı

Optogenetik stimülasyon gerçekleştirmek için laboratuvarımızda tasarlanan bir lazer sistemi kullanıldı. Bu sistemde, 465 nm dalga boyunda mavi ışık yayan lazer ışık kaynağına (~150 mW) bir fiber optik kablo (200 µm Core, Thorlabs) bağlanır. Ayrıca lazer kaynağına giden voltajın kontrol edilmesi için programlanabilir Arduino Uno mikrodenetleyici kartı kullanılarak ışığın istenilen zaman ve frekansta verilebilmesi sağlanmıştır. Daha sonra optogenetik uyarımlar 5 ms'lik ışık uyarılarında (~150 mW) ve 50 Hz frekansında toplam 10 saniye süreyle gerçekleştirilmiştir. Optogenetik uyarım sırasında kalbin elektriksel aktivitesinde meydana gelen değişiklikler eş zamanlı EKG kayıtları alınarak takip edilmiştir. Eş zamanlı EKG kayıtları için Biopac MP36 System cihazı kullanıldı. Einthoven üçgenine uygun olarak, fareye cihaz elektrotları yerleştirildi ve optogenetik stimülasyon öncesinde, sırasında ve sonrasında Lead I'den kayıtlar alındı.

5.16. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında elde edilen bütün verilerin istatistiksel analizi R programındaki temel (core) istatistik paketleri kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir kalbe ait sinir yoğunluğu ölçümleri yine R programındaki temel fonksiyonlar kullanılarak dotplot haline getirildi. DotPlot grafiklerinde veriler nokta şeklinde ve ayrıca gruplara ait verilerin standart sapması ve ortalamaları gösterildi. Gruplara ait kalplerde ölçülen sinir yoğunluğu değerlerinin dağılım biçimlerini tespit etmek için Shapiro–Wilk testi kullanıldı. Yapılan analiz sonucu karşılaştırılan kalp gruplarındaki

ölçümlerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Normal dağılım dikkate alınarak bütün verilerin istatistiksel analizinde Öğrencinin Eşlenmiş t testi kullanıldı. Yapılan karşılaştırmalı analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

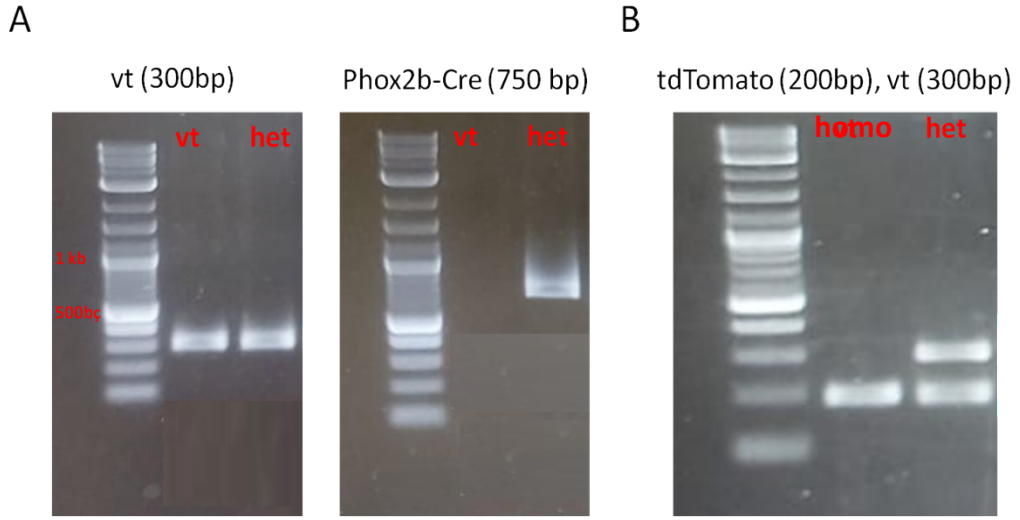


6. BULGULAR

Kalbi saran vagal duyu sinirlerini daha önce gösterilmemiş bir kapsam ve detayda görüntüleyebilmek amacıyla Phox2b-Cre::tdTomato ikili transgenik hattın yapısal ve işlevsel karakterizasyonunu yaptık. Daha sonra bu transgenik hattı kullanarak bütün kalpteki vagal duyu sinir ağını yüksek çözünürlükte görüntülemek için immün boyama ve mikroskopik görüntüleme yöntemi ile var olan analiz yöntemleri geliştirilerek kullanıldı. Bu geliştirdiğimiz yöntem ile elde ettiğimiz görüntüler üzerinden sinir çapı çözümlenmeleri gerçekleştirdik. Yapısal karakterizasyonun son aşaması olarak MI sonrası kalbin vagal sinir ağında meydana gelen değişimleri inceledik. İşlevsel karakterizasyon amacıyla Phox2b-Cre ifade eden vagal sinir ağının sinirsel uyarımının kalbin elektriksel aktivitesi üzerindeki etkisini araştırdık.

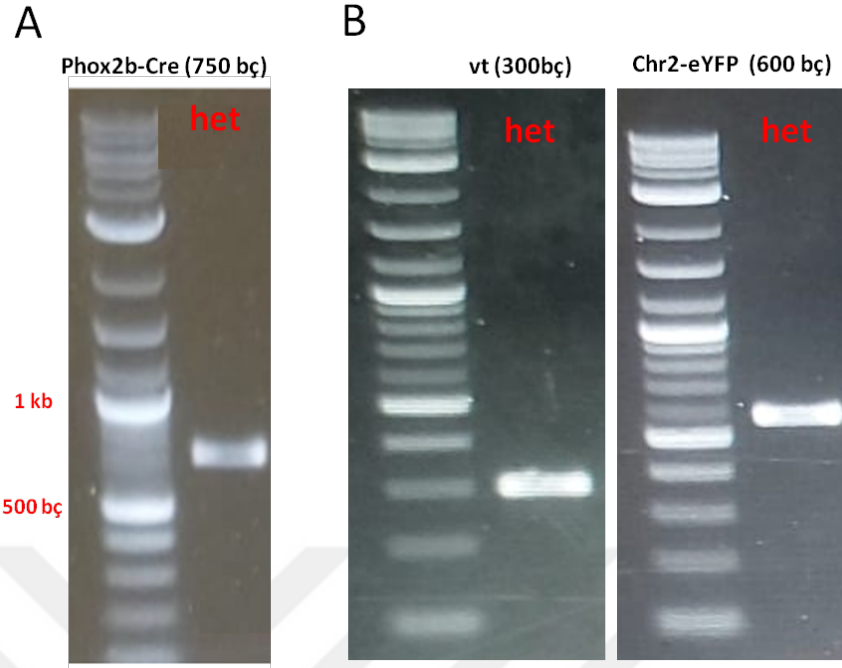
6.1. Tez Çalışmasında Kullanılacak Bütün Cre-LoxP İkili Transgenik Hatların Üretilmesi

NG kökenli vagal duyu nöronlarını floresan proteinler ile işaretleyebilmek için Cre-LoxP sistemini kullandık. Bu çalışmada sadece NG nöronlarında tdTomato raporcu proteini ifadesini sağlamak amacıyla Phox2b gen promotör bölgesi kontrolünde cre rekombinaz ifade eden transgenik fare kullandık (#16223). Bu fareyi genomunda birbiri ile zıt yönde iki LoxP dizisi ile çevrili ve promotör dizisi ile zıt okuma yönünde konumlandırılmış tdTomato geni taşıyan ikinci bir transgenik fare ile çaprazladık (#7909). Doğan yavru farelerin kulaklarından alınan doku örnekleri ile yapılan genotipleme sonucu her iki transgeni de taşıyan fareleri belirledik (**Şekil 6.1.1**). Her iki transgen için de heterozigot olan fareler minimum iki aylık olduktan sonra farelerin NG'lerinde Phox2b geni kontrolünde kırmızı dalga boyunda uyarıldığında ışıma veren tdTomato flöresan raporcu proteinlerin üretilme durumuna bakıldı. Hem sağ hem de sol NG nöron gövdelerinin hepsinde tdTomato ifadesi gözlemlendi. İleriki bölümlerde farklı anatomik ve fizyolojik yapı gösteren bütün periferik gangliyon örneklerinde tdTomato ifadesi incelenmiş ve ifadenin NG'ye özgü olduğu gösterilmiştir.



Şekil 6.1.1. Çaprazlama sonucu elde edilen Phox2b::tdTomato ikili transgenik farelerin genotipleme sonuçları. vt: vahşi tip; het:heterozigot; bç: baz çifti; kb:kilobaz

NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinin optogenetik uyarım ile depolarizasyonunun kalp atım sayısı üzerindeki etkisini araştırmak için ikinci bir transgenik hat üretildi. NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinde Cre rekombinaz enzimi ifade eden Phox2b-Cre (#16223) transgenik fare Cre rekombinaz bağımlı kanalrodopsin2-eYFP (chr2-eYFP) birleşik transjeni taşıyan fareler (#12569) ile çaprazlandı (Şekil 6.1.2.). Bu işlem sonucu üretilen Phox2b-Cre::chr2-eYFP ikili transgenik fareler Phox2b geni ifade eden NG nöronlarında kanalrodopsin2-eYFP füzyon iyon kanalı proteinini üretmektedir (bkz. 6.8.1. no.'lu bölüm). 465-495 nm dalga boyunda ışık ile uyarıldığında açılan kanalrodopsin 2 iyon kanalı üzerinden vagal duyu sinirleri depolarize edilmesi amaçlanmıştır. Özetle bu tez çalışmasında kardiyak vagal duyu sinirlerini görüntülemek için Phox2b-Cre::tdTomato, ve bu sinirlerin optogenetik yöntemi ile fonksiyonunu araştırmak amacı ile de Phox2b-Cre::chr2-eYFP ikili transgenik fare hatları üretilmiştir. Bu transgenik hatlar ve vahşi tip fareler kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

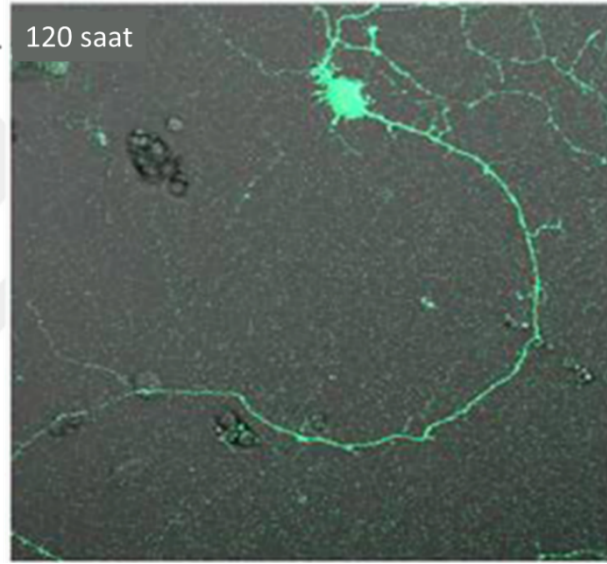


Şekil 6.1.2. Phox2b-Cre::chr2-eYFP heterozigot/heterozigot farenin genotip sonucu. **A.**Phox2b-Cre. **B.** chr2-eYFP

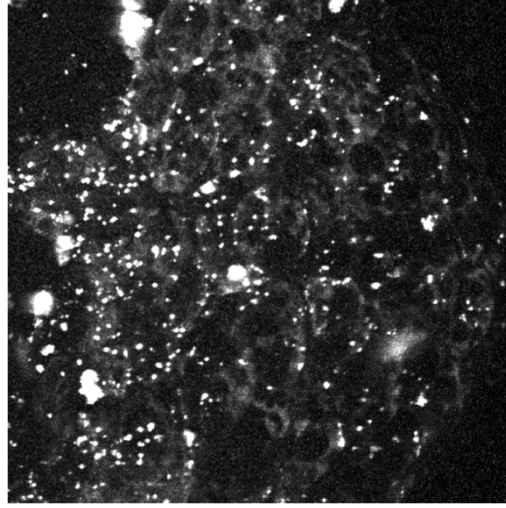
6.2. AAV Tabanlı Viral Yöntemler ile NG Nöronlarının Raporcu Proteinler ile İşaretlenmesi

Hem ikili transgenik yöntemler hem de viral vektörler kullanarak NG nöronlara moleküler erişim sağladık. Üçlü transfeksiyon yöntemiyle HEK-AAV hücrelerinde ürettirilen AAV2 kapsit içeren ve cre rekombinaza bağımlı eYFP floresan protein transjeni taşıyan virüsler üretildi. Bu virüslerin transfeksiyon verimi öncelikle hücre kültüründe sınıandı. AAV2-eYFP virüsleriyle sırasıyla HEK hücreleri, AKG ve NG fare primer nöronları transfekte edildi. Bütün *in vitro* uygulamalarda eYFP ifade eden hücreler görüntülendi (Şekil 6.2.1). Daha sonra Phox2b-Cre transgenik farenin NG'sine AAV-eYFP virüs enjeksiyonu yapıldı fakat nöron somalarında eYFP sinyali tespit edilemedi (Şekil 6.2.2). Transgenik hat ile alakalı bir sorun olup olmadığını test etmek için Vglut2 kontrolünde Cre rekombinaz ifade eden transgenik farenin NG'sine de doğrudan AAV-eYFP virüs enjeksiyonu yapıldı. Viral transdüksiyondan 50 ve 60 gün sonra farelerin NG'leri çıkarıldı ve konfokal mikroskopu ile görüntülendi. Sonuçta tek tük hücre gövdeleri dışında eYFP ifadesi gözlemlenmedi (Şekil 6.2.3). Üretilen bu virüslerin *in vivo* uygulamada verimsiz olması nedeniyle virüs üretimi

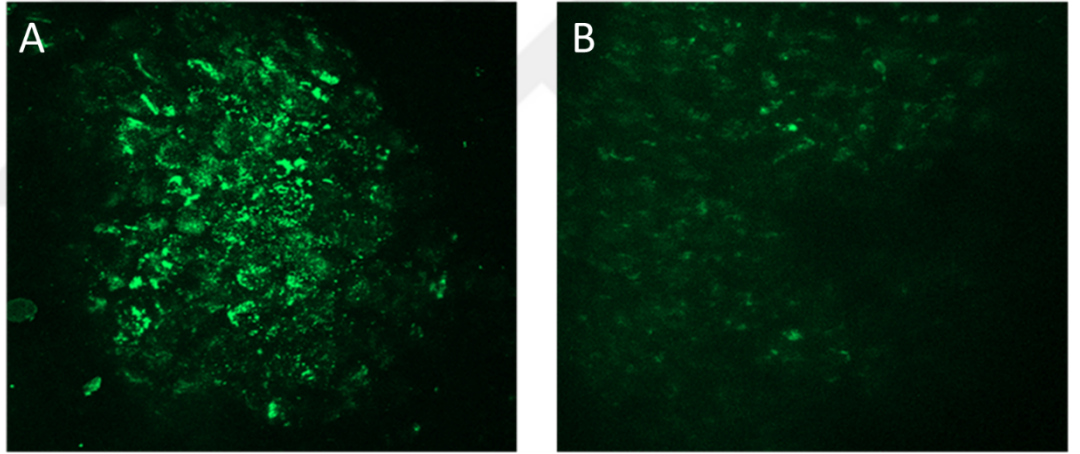
sonlandırıldı. Alternatif olarak yurt dışından ticari olarak AAV viral vektör temini gerçekleştirildi. Fakat temin edilen ve tdTomato floresan protein transgenini taşıyan AAV-tdTomato viral vektörünün HEK hücrelerinde icra edilen ön denemesi sonucu çok az sayıda enfekte olan hücre tespit edildi (Şekil 6.2.4). Bu sonuçlar ışığında viral vektör stratejisinin yeterli verimlilikte uygulanamayacağı değerlendirilerek kalbi saran vagal duyu sinirlerinin görüntülemesinde ikili transgenik farelerde immün boyama stratejisinin tatbikine karar verildi. Bu gaye ile immün boyama ve mikroskopik görüntüleme yöntemlerinin optimizasyonu gerçekleştirildi.



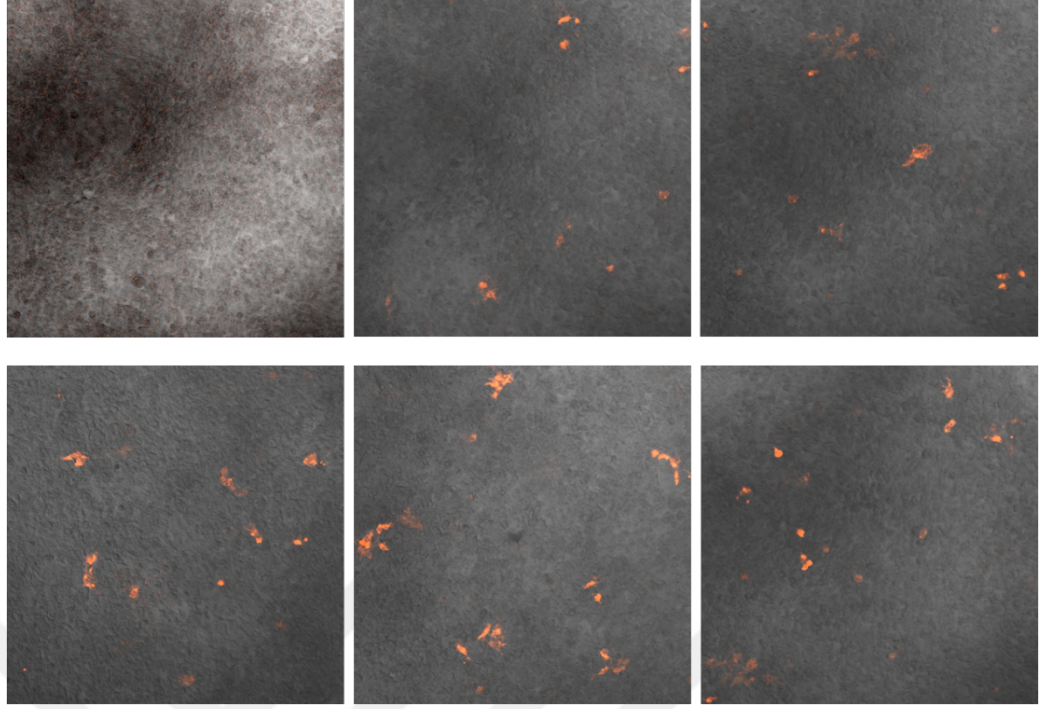
Şekil 6.2.1. AAV-flex-eYFP virüsü ile *in vitro* enfekte edilmiş AKG nöronlarının temsili görünümü. 20X objektif.



Şekil 6.2.2. Phox2b-Cre transgenik farede doğrudan AAV-flex-eYFP virüsü enfekte edilmiş NG nöronlarının enjeksiyon sonrası 50. gündeki görüntüsü. Spesifik olmayan artifakt sinyaller tespit edildi. 20X objektif. Ölçek: 50 mikron.



Şekil 6.2.3. Intratekal (A) yol veya doğrudan kalbine (B) AAV_flex_eYFP virüsü enjekte edilen Vglut2-Cre transgenik farenin NG nöronlarının enjeksiyon sonrası 47. (A) ve 50. (B) günlerindeki görüntüleri görünümü. 20X objektif. Ölçek: 50 mikron.



Şekil 6.2.4. AAV_tdtomato virüsü ile enfekte edilmiş HEK hücrelerinin 6. gün sonundaki görünümü.

6.3. Phox2b-Cre::TdTomato Anlatımının Genel Karakterizasyonu

AAV viral vektörler yoluyla vagal duyu sinirlerini işaretleme yönteminde gerekli verimin elde edilememesinden dolayı Cre-LoxP sistemini temel alan ikili transgenik yaklaşım yöntemi ile çalışmaya devam edildi. Yukarıda detaylandırılan bu sistemi kalbi saran vagal duyu sinirlerini diğer sinirlerden ayırıştırarak işaretlemeye kullanabilmek için ilgili ikili transgenik fare hattında üretilen raporcu proteininin anlatımının karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bu amaç ile Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato geni ifadesini kalbe sinir gönderen periferik gangliyonlarda ve bu gangliyonların ilişkili olduğu beyin sapı ve spinal kord bölgelerinde inceledik. Kalbi sinirleyen sempatik sinirler başlıca SG'lerden (serviko-torasik) neşet ederler. Kalbi sinirleyen parasempatik sinirler ise kalbin epikart dokusu üzerinde konuşlu yağ tabakasının içerisinde gömülü halde bulunmaktadır. Kalp dışından kalbe giden duyu sinirleri ise NG kaynaklı vagal ve AKG kaynaklı spinal duyu sinirleridir. Bütün bu kalp ile ilişkili olan gangliyonlarda Phox2b-Cre::tdTomato ifadesini inceledik ve sadece kalbi saran vagal sinirleri görüntüleyebilmek için ne ölçüde işlevsel olduğunu

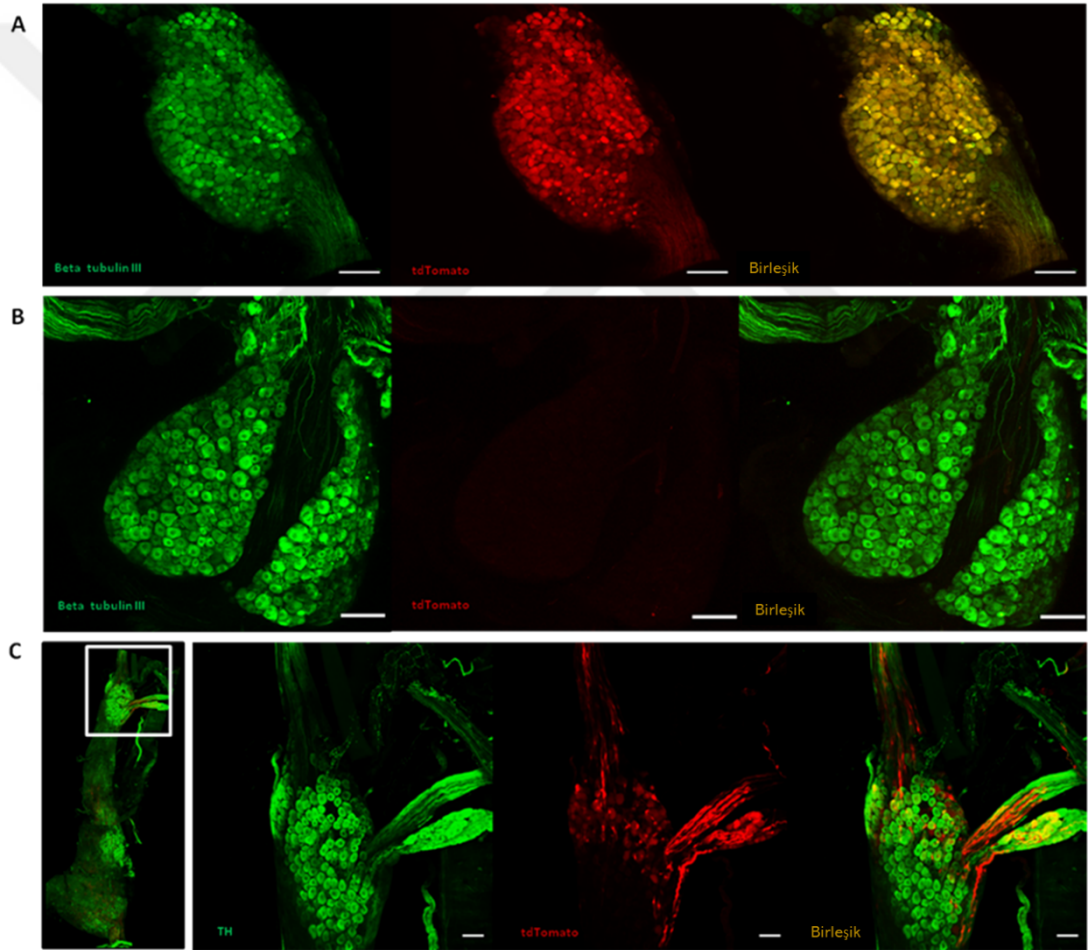
sorguladık. Ayrıca Phox2b transkripsiyon faktörünün sempatik ve parasempatik pregangliyonik nöronların embriyonik dönemdeki gelişiminde etkin olduğu bilinmektedir. Yine duyu sinir hücre öncüllerinin somatik yoldan viseral yola geçişinde Phox2b ifadesinin kritik olduğu bilinmektedir. NG kaynaklı duyu sinirleri viseral işlevlerden sorumludur ve bunların beyin sapında Area Postrema (AP) ve Nukleus Traktus Solitarius (NTS) çekirdeklerinde sonlandığı bilinmektedir. Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaz ifadesinin Phox2b geninin uzaysal anlatım deseni ile ne ölçüde uyduğunu raporcu tdTomato ifadesi üzerinden detaylı şekilde inceledik.

6.3.1. Periferik gangliyonlarda Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin incelenmesi

NG kaynaklı kardiyak afferent inervasyonunu görüntüleyebilmek için, daha önce Cre rekombinaz enziminin ifadesini sadece inferior petrosal ve NG nöronlarında indüklediği literatürde bildirilen Phox2b-Cre transgenik fare hattı kullanıldı(30) u hat kullanılarak Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato ifade eden Phox2b-Cre::tdTomato ikili transgenik fare hatları üretildi. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin kalbi saran vagal duyu sinirlerini ayırt edici şekilde görüntülemeye kullanılabilmesi için tdTomato ifadesinin vagal duyu sinirleri dışında kalbi saran diğer periferik sinirlerde bulunmaması gerekmektedir. Bu koşulun geçerli olup olmadığını incelemek için kalbi inerve eden periferik gangliyonlarda Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin inceledik. İlk olarak Phox2b-Cre::tdTomato farelerden NG izole edilip pan-nöronal belirteç TUJ1 ile immün boyama gerçekleştirildi. TUJ1 ile işaretlenmiş tüm NG nöron somalarında ve akson liflerinde tdTomato ifadesi tespit edildi (**Şekil 6.3.1.1A**). Bu sonuç bütün NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinde Phox2b-Cre kontrollü tdTomato ifadesinin mevcut olduğunu göstermektedir.

İkinci olarak kalbi saran spinal duyu sinirlerinde Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin durumu incelendi. Kalbi saran spinal duyu sinirlerinin hücre gövdeleri AKG'lerde bulunmaktadır. Özellikle kalbi inerve ettiği daha önce tespit edilmiş torasik seviyedeki bütün AKG nöronları (T1-T8) izole edildi ve Phox2b-Cre::tdTomato ifadesi mikroskop altında incelendi (**Şekil 6.3.1.1B**). Görüntüleme sonucu TUJ1 ile boyalı AKG nöronlarında Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato floresan protein ifadesi gözlemlenmedi.

Kalbi saran duyu sinirleri Phox2b-Cre::tdTomato ifadesi açısından incelendikten sonra kalbi saran motor sinirlere geçildi. İlk olarak yakın zamanda yapılan bir retrograd çalışma ile murin kalbinin sempatik inervasyonunun çoğunluğunu sağladığı gösterilen SG (servikotorasik) Phox2b-Cre::tdTomato farenden izole edildi (5). İzole edilen SGun sempatik kimliğini doğrulamak için anti-TH boyaması gerçekleştirildi. Daha sonra tdTomato floresan sinyali ve TH immün reaktivitesi konfokal mikroskop altında görüntüledi. Görüntüleme sonucu hepsi TH pozitif olan SG nöronlarının hücre gövdelerinde Phox2b-Cre::tdTomato ifadesi saptanmadı, ancak hücre gövdeleri çevresindeki uydu glial hücrelerde (89) ve bazı presinaptik liflerde tdTomato ifadesi gözlemlendi (Şekil 6.3.1.1C).

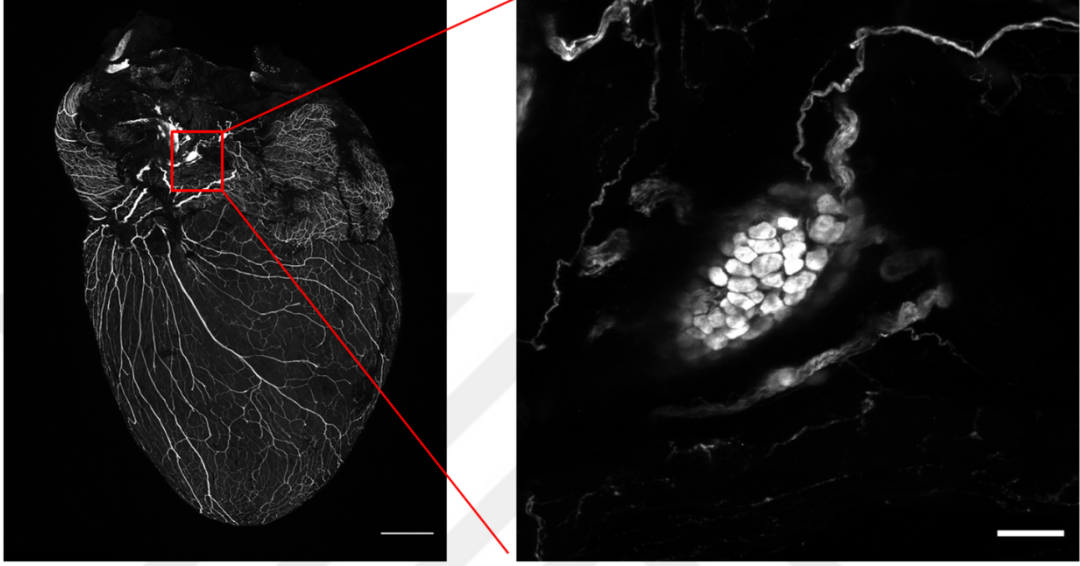


Şekil 6.3.1.1. Kalp sinirlerini barındıran periferik ganglionlarda Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin görünümü. Phox2b-Cre::tdTomato farelerinin NG (A) ve AKG (B), anti-TUJ1 (yeşil) antikor ve tdTomato (kırmızı) ile immün boyanma sonrası görüntüleri. Ölçek: 100 µM. C. Anti-TH antikor ile boyanmış stellargangliyonda TH (yeşil) ve tdTomato (kırmızı) sinyalleri. Ölçek: 50 µM. (Kazci Y.E. ve ark. , 2022).

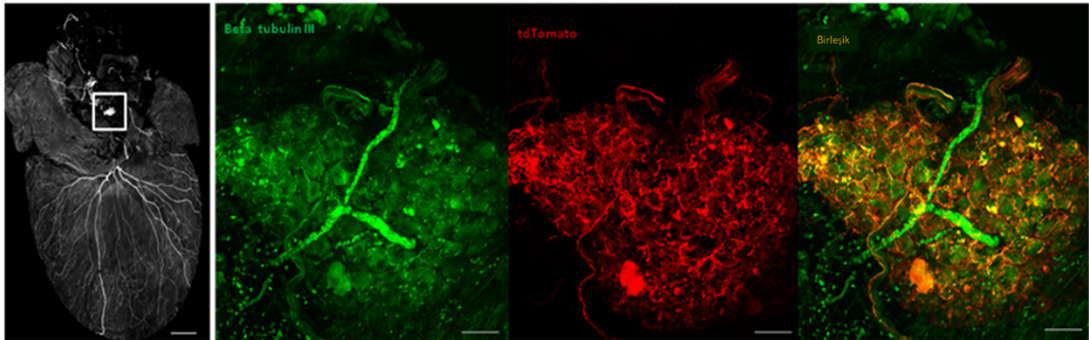
Kalbe sinir gönderen sempatik gangliyonlardan sonra kalbi saran parasempatik sinirlerde Phox2b-Cre::tdTomato ifadesi incelendi. Kalbi saran parasempatik sinirlerin nöron gövdeleri kalp epikartı üzerindeki yağ dokuda gömülü parasempatik kardiyak gangliyonlarda bulunmaktadır (7). Kolinerjik yapıdaki parasempatik gangliyonların kalp yüzeyindeki konumunu belirlemek için Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbi ilk olarak anti-kolin asetiltransferaz (Chat) antikoru ile immün boyandı. Ancak kalp boyunca spesifik bir sinyal elde edilemedi. Literatürde tespit edilen farklı Chat antikoları ile de denemeler yapılmasına rağmen başarılı bir sonuç elde edilemedi. Bu nedenle, kalp üzerindeki parasempatik gangliyonların anatomik konumunu belirlemek için Chat geni kontrolünde Cre rekombinaza bağımlı şekilde tdTomato proteini üreten Chat-Cre::tdTomato ikili transgenik hattı kullanıldı. Bu fare kalbi anti-RFP ile boyanarak Chat-Cre+ parasempatik sinirler ve bunları sağlayan gangliyonların anatomik konumu tespit edildi (Şekil 6.3.1.2). Daha sonra aynı parasempatik gangliyonlar Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinde TUJ-1 ile boyanarak tespit edildi. Ayrıca anti-RFP ile tdTomato proteini işaretlendi ve TUJ-1 pozitif parasempatik nöron somalarında Phox2b-Cre::tdTomato anlatımı incelendi (Şekil 6.3.1.3). Görüntüleme sonucu parasempatik kardiyak gangliyonların nöron gövdelerinde tdTomato ifadesi tespit edilmedi. İlginç şekilde parasempatik nöron gövdelerini saran vagal duyu sinirleri saptandı (Şekil 6.3.1.3).

Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin duyu ve motor işleve sahip periferik gangliyonlarda incelenmesi sonucu sadece NG nöronlarının gövde ve aksonlarında Phox2b kontrolünde üretilen Cre rekombinaz enziminin tdTomato raporcu proteinini sentezlettiği tespit edildi. Kalbi saran spinal duyu sinirlerinin nöron gövdelerinin bulunduğu servikal ve torasik seviyedeki AKG nöronlarında tdTomato proteini tespit edilmedi. Yine kalbi saran sempatik sinirlerin nöron gövdelerinin içeren SG nöronlarında ve kalbi saran parasempatik sinirlerin nöron gövdelerinin bulunduğu kardiyak gangliyonlarda tdTomato anlatımı saptanmadı. Bu sonuçlar Phox2b gen lokusunun periferik gangliyon nöronları içerisinde sadece kalbe dallanan vagal duyu sinirlerinin nöron gövdelerini içeren NG nöronlarında transkripsiyonel olarak etkin olduğunu ve dolayısıyla Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaz ifadesine bağlı tdTomato raporcu protein anlatımının sadece kalbi saran vagal duyu sinirlerini görüntülemeye yeterli ve güvenilir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu

sonuçlar doğrultusunda bu tez çalışması boyunca kalbi saran vagal duyu sinir ağını detaylı şekilde görüntülemek için Phox2b-Cre:tdTomato transgenik fare kalpleri kullanılmıştır.



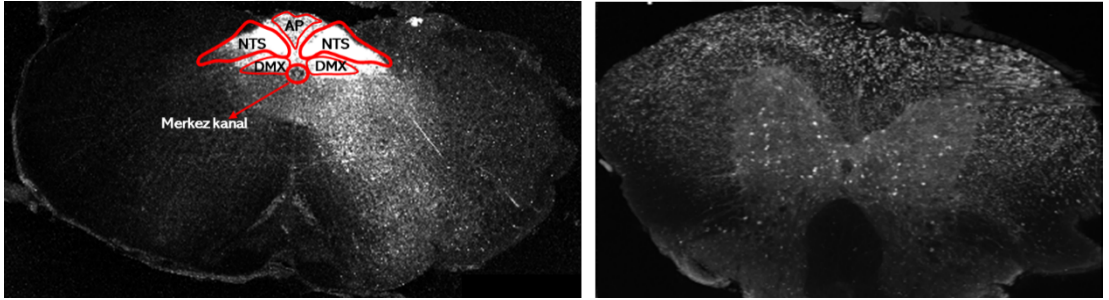
Şekil 6.3.1.2. Chat-Cre::tdTomato kalpte anti-RFP ile immün boyanmış Chat-Cre+ parasempatik sinirlerin dorsal yüzeydeki maksimum projeksiyon görüntüsü (sol). Sağda parasempatik kardiyak gangliyonun büyütülmüş görüntüsü. Ölçek: 1 mm (sol), 50 μ M (sağ).(Kazci Y.E. ve ark. , 2022).



Şekil 6.3.1.3. Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyinde kardiyak ganglion görünümü (sol). Kare içindeki kardiyak ganglion büyütülmüş görüntüsü sağda verilmiştir. TUJ1 ile immün boyanmış ganglion nöronları (yeşil) ve anti-RFP ile boyalı vagal afferent sonlanmaları (kırmızı) detaylı şekilde görülmektedir. Ölçek: 50 μ M.(Kazci Y.E. ve ark. , 2022).

6.3.2. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin beyin sapı çekirdeklerinde karakterizasyonu

Phox2b geni nöral krest hücrelerinden sinir hücresi farklılaşmasında ifadesi önemli olan faktörlerdendir. Cre ifadesinin özellikle Phox2b gen bölgesinden üretildiğini göstermek için nöral krest kökenli beyin sapı çekirdeklerinde raporcu tdTomato floresan protein anlatımını inceledik. Ayrıca NG nöronlarının beyin sapında sonlandığı NTS çekirdeklerinde ve AreaPostrema (AP) çekirdeğinde tdTomato sinyalinin durumunu analiz ettik (Şekil 6.3.2.1, sol). Literatüre uyumlu şekilde beyin sapından alınan yatay kesitlerde NTS ve AP çekirdeklerinin olduğu bölgede yüksek düzeyde tdTomato sinyali gözlemledik. Ayrıca pregangliyonik parasempatik sinirlerin çıktığı DMX çekirdeklerinde de tdTomato sinyali gözlemledik (Şekil 6.3.2.1, sol). AKG sinirlerinde tdTomato sinyali olmadığını gösteren bulgumuz ile tutarlı şekilde AKG sinirlerinin spinal korda giriş yaptığı dorsal boynuz bölgesinde Phox2b-Cre kaynaklı tdTomato anlatımı gözlemlemedik (Şekil 6.3.2.1, sağ).



Şekil 6.3.2.1. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin beyin sapı (sol) ve spinal kord (sağ) yatay (transverse) kesitlerinde görünümü. AP: Area Postrema; NTS: Nükleus Traktus Solitarius; DMX: vagus sinirinin dorsal motor nükleusu.

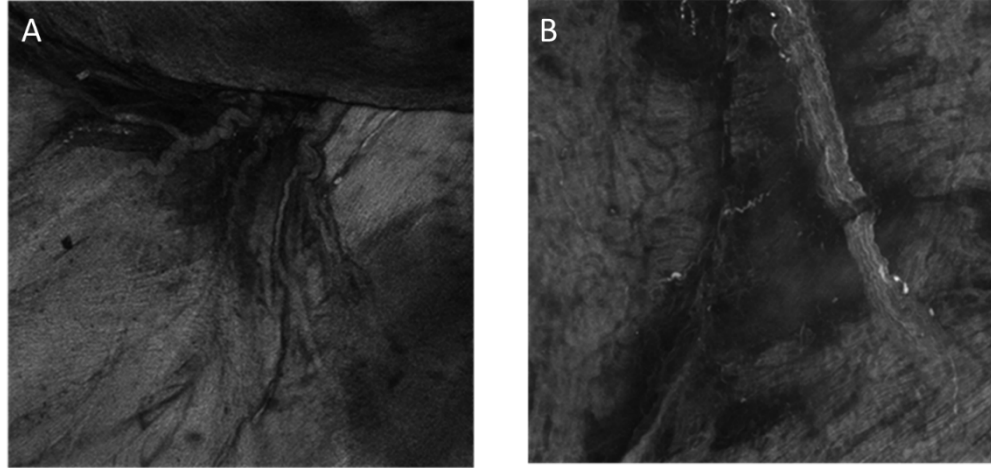
6.4. Transgenik Fare Kalplerinde İmmün Boyama ve Görüntüleme

Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato ifadesinin NG'lere özgü gerçekleştiği tespit edildikten sonra kalp yüzeyindeki NG-kökenli vagal afferent sinirlerinin görüntülenmesine geçildi. Kullanılan transgenik sistemde vagal afferentlerin kalpte sonlanan uçlarına kadar tdTomato floresan proteini ifade edebilmesi ve bu ifadenin kalp dokusundan gelecek arka plan flöresan sinyalinden konfokal mikroskop

vasıtasıyla ayırt edilebilecek güçte olması gerekmektedir. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin bu koşulları ne ölçüde sağladığı aşağıdaki çalışmalarda incelendi.

6.4.1. Phox2b-Cre::tdTomato ifadesinin kalbe dallanan vagal sinir ağının görüntülenmesindeki veriminin incelenmesi

Kalbi saran vagal afferentleri görüntüleyebilmek 8-12 haftalık Phox2b-Cre::tdTomato ikili transgenik fare kalplerinden 5X ve 20X objektifleri ile LSM 880 konfokal mikroskobunda (ZEISS) görüntüler alındı. 543 nm dalga boyunda lazer ile kalp uyarılıp, kalpten yansıyan 581-620 nm arası dalga boyundaki ışık filtreden geçirilerek icra edilen çekimler sonucu 5X objektif ile kalbi saran sinir dalları arka plan dokudan ayrıştırılabilecek netlikte görüntülenemedi (**Şekil 6.4.1.1A**). 20X objektif ile gerçekleştirilen çekimler de ise 5X objektife kıyas ile daha net sinir sinyalleri elde edildi (**Şekil 6.4.1.1B**). Ancak 20X objektif ile çekilen görüntülerde de otofloresan sinyalin boyutu vagal duyu sinir sonlanma tiplerini tanımlamaya engel teşkil etmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasının başlıca amacı kalbi saran vagal duyu sinir ağının daha önce literatürde gerçekleştirilememiş bir kapsayıcılık ve detayda ve bütün kalp boyunca görselleştirilmesi olduğu için, 5X objektif ile alınabilen sinyalin artırılması gerekmektedir. Bunun en önemli sebebi en büyük ekseni 8-10 mm boyutlarına ulaşabilen fare kalbinin bütüncül çekiminin verimli bir şekilde ancak 5X objektif aracılığıyla alınmış kareler yoluyla gerçekleştirilebilmesidir. Cre rekombinaz proteinine bağımlı şekilde etkinleştirilen CAG promotörü kontrolündeki tdTomato ifadesinin bu amaç için yetersiz olmasından dolayı antikor ile bütüncül kalp boyaması yöntemi ile kalpteki tdTomato sinyalinin miktarının arttırılması gerekmektedir.

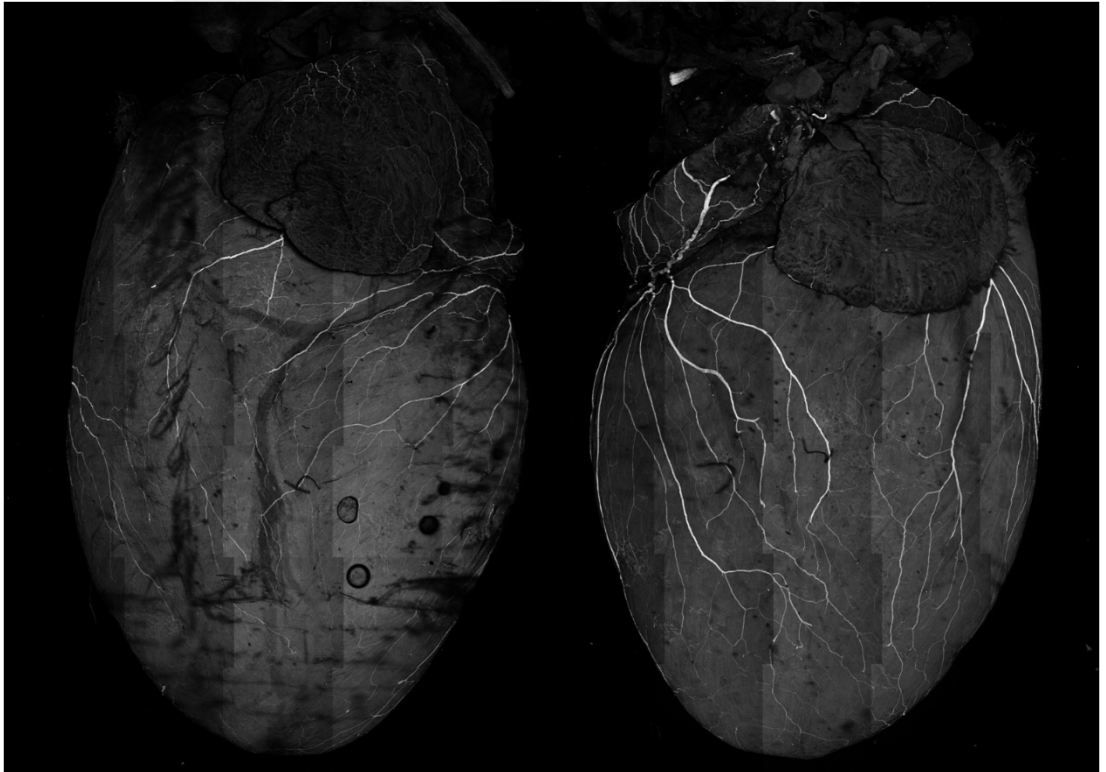


Şekil 6.4.1.1. Phox2b-Cre-tdTomato kalp ventrikülünde endojen tdTomato sinyalinin 5X (A) ve 20X (B) objektifler ile çekilmiş görüntüleri.

6.4.2. Standart Alexa Fluor sekonder antikorların bütün kalp görüntülemesindeki yeterliliğinin değerlendirilmesi

Phox2b-Cre kontrolünde gerçekleşen tdTomato ifadesinin kalp boyunca vagal duyu sinirlerini görüntülemek için endojen olarak yeterli olmadığı saptandığı için tüm kalpte immün boyama yapılması hedeflendi. Kalbi saran sinirlerin bütün kalpte detaylı şekilde görüntülenebilmesi için 5X objektif ile tetkik edilebilecek yeterlilikte florofor molekülü konjuge olan bir sekonder antikor sinyali gerekmektedir. Bu nedenle Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde tdTomato proteinlerinin anti-RFP antikoruna ile immün boyaması gerçekleştirilmeden önce standart Alexa Fluor sekonder antikorların bütün kalp boyamasındaki yeterliliği vahşi tip kalpte TUJ-1 pan-nöron belirteci kullanılarak test edildi. Bütün kalpte 5X objektif ile yapılan görüntüleme sonucu endojen tdTomato sinyali ile yapılan görüntülemeye kıyasla (Şekil 6.4.1.1) daha yüksek parlaklık ve çözünürlükte sinir ağı tespit edildi (Şekil 6.4.2.1). Ancak 5X objektif ile görüntülenebilen sinir ağının sınırlı olduğu ve muhtemelen sekonder antikordan gelen sinyalin yer yer yetersiz olmasından dolayı kalbin bazı bölgelerinde kesintili bir inervasyon deseni tespit edildi. Bunun ile birlikte 20X objektif ile yapılan görüntülemelerde 5X objektife göre kardiyak sinir fasikülleri daha detaylı şekilde tespit edilebildi (Şekil 6.4.2.2). Ancak 20X objektif ile yapılan görüntüleme de bile Alexa Fluor 488 sekonder antikorunun yer yer sinir fasiküllerine yeterince bağlanamaması

ya da arka plan sinyalinden yer yer daha düşük ışımından dolayı tespit edilebilen sinir lifi miktarının düşük olduğu görüldü (**Şekil 6.4.2.2**). Bu tez çalışması kapsamında vagal duyu sinirlerinin bütün kalp boyunca detaylı haritalaması hedeflendiği için 5X objektif ile görüntülenebilen sinir ağının çözünürlüğün artırılması gerekmektedir. Ayrıca 20X objektif ile yapılacak daha yüksek magnifikasyon sağlayan görüntülemelerin de kalp dokusundaki vagal duyu sinir sonlanmalarının saptanabileceği bir yeterlilikte olması gerekmektedir. Kalbin kas dokusundan kaynaklı otoflorasan sinyalin mevcudiyeti ile birlikte değerlendirildiğinde birincil antikora bağlanma kapasitesi ve dolayısıyla sinyal gürültü oranı çok daha yüksek olan bir sekonder antikor arayışına geçildi ve yeni nesil son teknoloji Alexa Fluor PLUS sekonder antikorlar temin edilip bütün kalp sinir ağının görüntülemesindeki verimliliği test edildi.



Şekil 6.4.2.1. Tuj-1 ve Alexa Fluor 488 ile boyalı vahşi tip fare kalbinin ventrolateral (sol) ve dorsolateral (sağ) çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsü. 5X objektif.

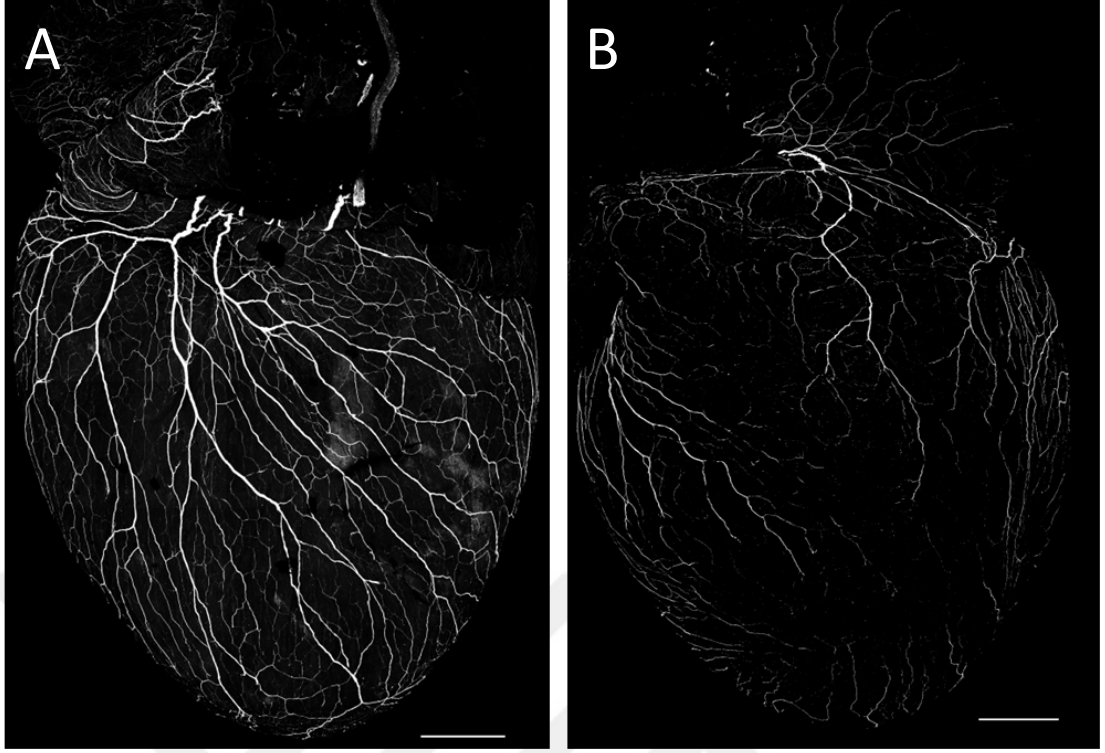


Şekil 6.4.2.2. Tuj-1 ve Alexa Fluor 488 ile boyalı vahşi tip fare kalbinin dorsal ventrikül yüzeyinin 20X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsü.

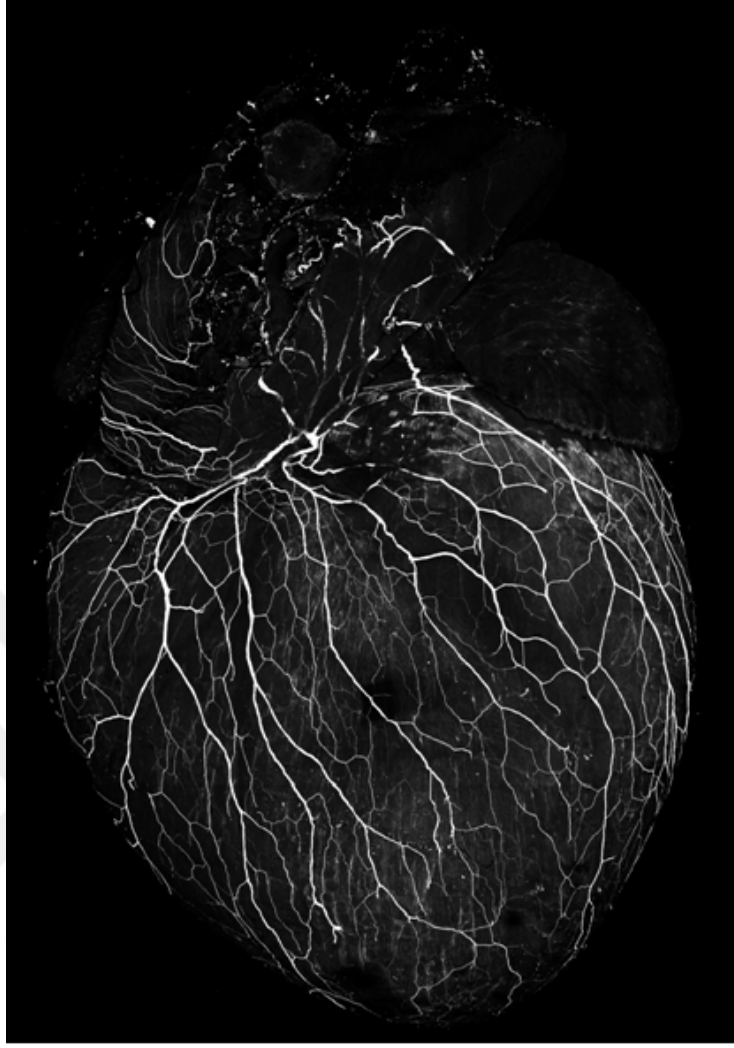
6.4.3. Alexa Fluor Plus sekonder antikolar kullanılarak bütün kalp sinir ağının görüntülenmesi

Bu tez çalışmasında belirlenen kalbi saran vagal duyu sinir ağının bütüncül şekilde ve kalbin tüm atriyum ventrikül ve damarlarını kapsayacak ölçekte görüntülenmesi hedefini gerçekleştirebilmek için 5X objektif ile yakalanabilecek sinir ağı miktarını arttırmak gerekmektedir. Ayrıca yine kalbin kas yapısından kaynaklı olarak sinir ağından gelen sekonder antikora konjuge florofor sinyalinin, görüntü odağının dışından gelen sinyalleri yüksek oranda engelleyecek şekilde ayrıştırabilecek bir mikroskop donanımı gerekmektedir. Fare kalbinin boyutu 5X objektifin görüntü alanının çok üzerinde olduğu için tek bir görüntü karesinde bütün kalbin saran ağı görüntülenebilmesi imkân dâhilinde değildir. Bu nedenden dolayı dikey ve yatay düzlemde kalbin yüzeyden derine katmanlarını içerecek çok sayıda görüntü karelerinin alınması ve daha sonra bu karelerin birbirleri ile doğru bir şekilde birleştirilmesi

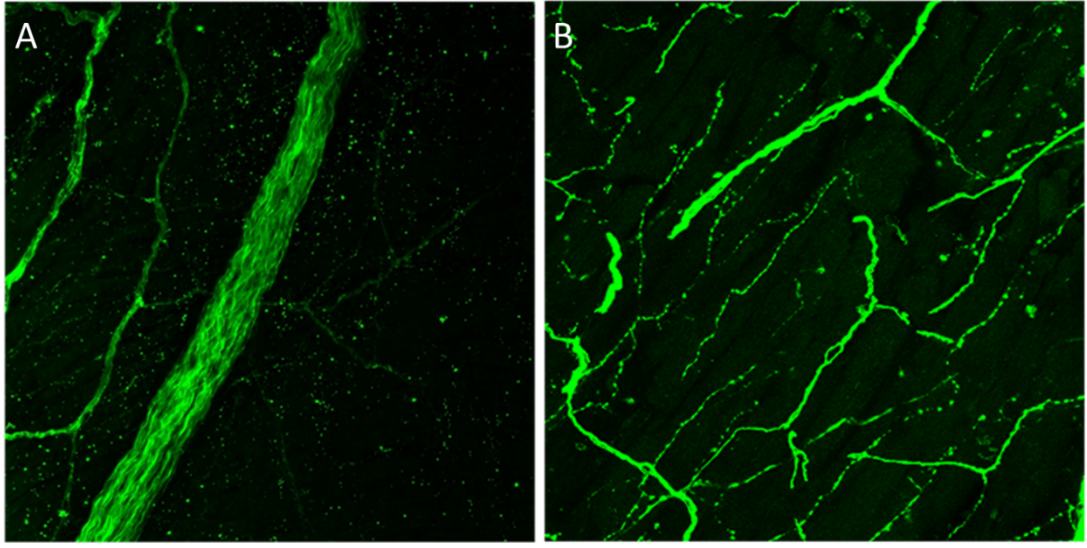
gerekmektedir. Tüm bu faktörleri tek tek dikkate alınarak kalbi saran bütün vagal duyu sinir ağını görüntülemek için bir iş akışı oluşturuldu. İlk olarak sekonder antikora bağlı florofor bölgesinden gelen sinyali artırmak için literatür kapsamlı şekilde araştırılıp klasik Alexa Fluor antikora kıyas ile çok daha yüksek sinyal-gürültü oranına sahip olduğu tespit edilen Alexa Fluor PLUS sekonder antikora temin edildi. Daha sonra bu Alexa Fluor PLUS sekonder antikora kalp dokusu üzerindeki çalışma konsantrasyonları TUJ-1 primer antikora kullanılarak vahşi tip kalplerde optimize edildi. Alexa Fluor Plus 488 ile işaretlenmiş TUJ-1 boyalı vahşi tip kalplerin konfokal mikroskopu ile görüntülenmesi sonucu tez çalışması kapsamında şu an kadarki en yüksek detay ve çözünürlükteki kardiyak sinir ağı tespit edildi (**Şekil 6.4.3.1**). Özellikle tamamen aynı immün boyama işlemlerinden geçmiş ve standart Alexa Fluor 488 ile işaretlenmiş TUJ-1 boyalı vahşi tip kalp bütüncül görüntüsü ile kıyaslandığında (**Şekil 6.4.2.1**) görüntülenebilen sinir lifi yoğunluğu ve inceliginde dramatik bir artış tespit edildi (**Şekil 6.4.3.1 ve 6.4.3.2**). Görülen farklılığın kullanılan TUJ-1 primer antikora farklı sekonder antikora olan afinitesinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülerek başka primer antikora kullanılarak (NF200 ve PGP89.5) Alexa Fluor Plus 488 sekonder antikora etkinliği incelendi. Başka bir nöron belirteci olan NF200 antikora ile Alexa Fluor Plus 488 antikora birlikte uygulanması sonucu 5X objektif ile vahşi tip kalbi saran sinir ağı görüntüledi (**Şekil 6.4.3.3**). Bütün kalp görüntüsü incelendiğinde Alexa Fluor Plus sinyalinin arkaplan sinyalinden yeterli çözünürlükte ayrıştırılabildiği tespit edildi. Yine PGP9.5 pan-nöron belirteci ile boyalı vahşi tip kalplerin görüntülenmesi sonucu Alexa Fluor Plus 488 sekonder antikora standart Alexa Fluor antikora kıyasla daha fazla sinir lifinin tetkik edilmesini sağladığı tespit edildi (**Şekil 6.4.3.4**). 20X objektif kullanılarak konfokal mikroskopu ile icra edilen bu görüntüleme sonucu Alexa Fluor Plus 488 antikora kardiyak kas lifleri ile hizalanmış varikoz sinir liflerini dahi işaretleyebildiği saptandı (**Şekil 6.4.3.4B**). Bu sonuçlar özellikle vagal afferent liflerinin ince sonlanım uçlarını görüntüleyebilmek için Alexa Fluor Plus sekonder antikora yeterli olabileceğini öne sürmektedir.



Şekil 6.4.3.1. Tuj-1 boyalı vahşi tip kalbin dorsal (A) ve ventral (B) yüzeyinin 5X objektif ile çekilmiş MP görüntüsü. Ölçek: 1 mm.

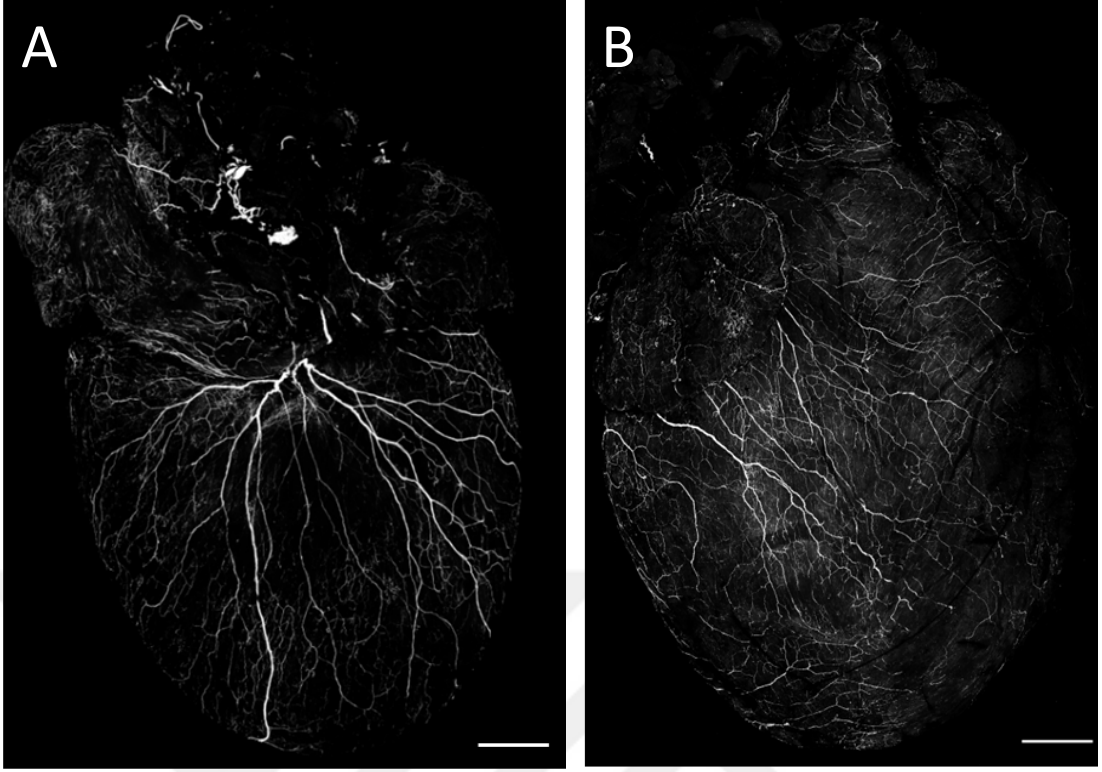


Şekil 6.4.3.2. NF200 ile boyalı vahşi tip fare kalbinin Alexa Fluor Plus 488 uygulaması sonrası 5X objektif ile alınmış MP görüntüsü. Ölçek: 1 mm.

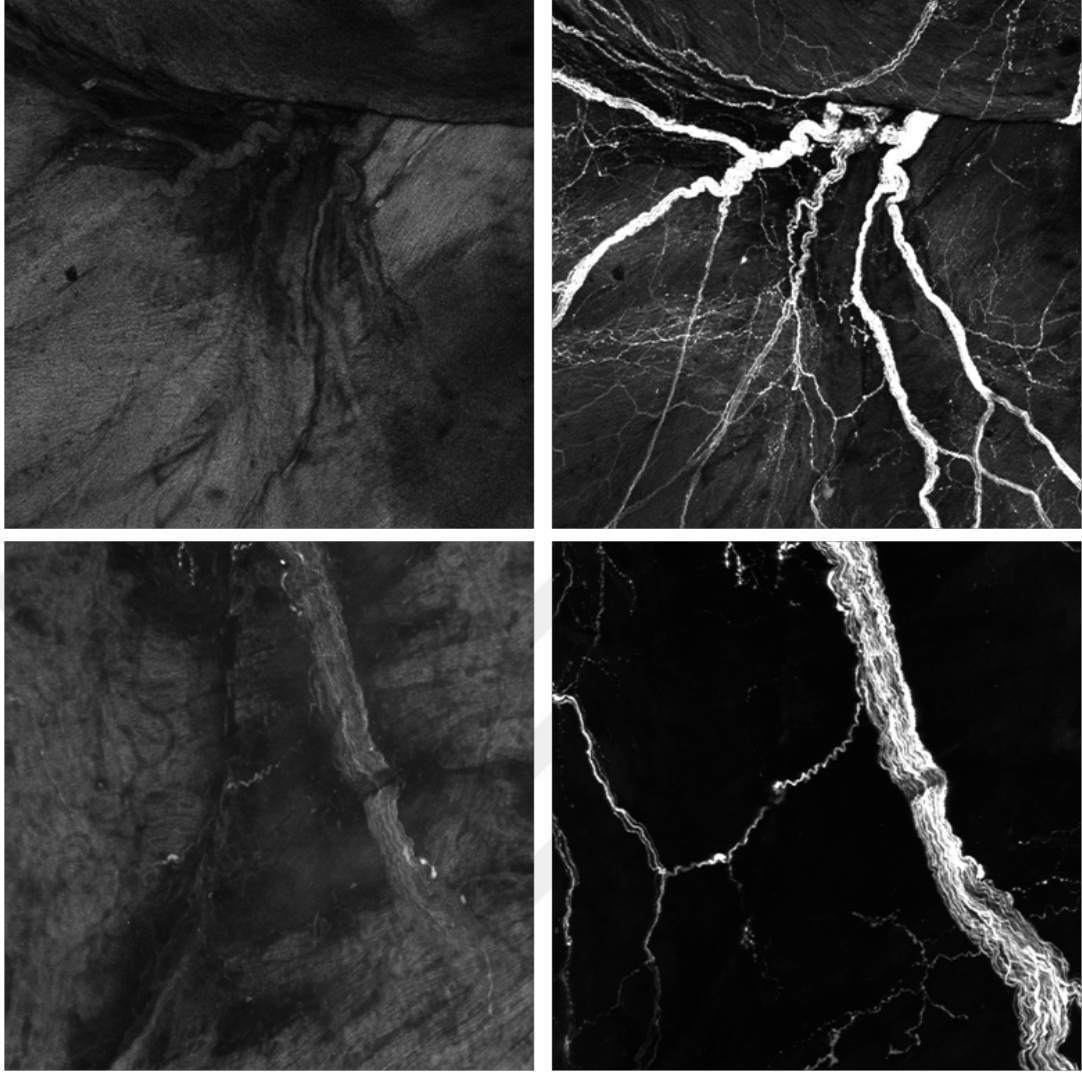


Şekil 6.4.3.3. Alexa Fluor (A) ve Alexa Fluor PLUS (B) sekonder antikorların PGP9.5 boyalı kalp ventrikülünde karşılaştırmalı görünümü. Maksimum projeksiyon. 20X objektif.

Alexa Fluor Plus sekonder antikorların çalışma koşulları bütün kalpte optimize edilip kalp sinir ağını 5X objektif ile görüntüleme yeterliliği doğrulandıktan sonra vagal afferent sinir ağının bütün kalpteki görüntülenmesine geçildi. Phox2b-Cre::tdTomato kalplerdeki tdTomato proteinleri anti-RFP ile boyandı ve Alexa Fluor PLUS 647 sekonder antikorunu uygulanarak görüntüledi. Hem dorsal hem de ventral kalp yüzeylerinden yapılan görüntüleme kalbi saran vagal duyu sinir ağı daha önce literatürde elde edilememiş bir kapsam ve çözünürlükte görüntüledi (**Şekil 6.4.3.5** ve **Şekil 6.4.3.6**). Anti-RFP ve Alexa Fluor Plus immün boyamalarının endojen tdTomato floresan sinyaline kıyas ile ne ölçüde sinyal artışı sağladığını tespit etmek için Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin aynı bölgelerinden boyama öncesi ve sonrası görüntülemeler gerçekleştirildi. Hem 5X hem de 20X objektif ile alınan görüntülerin karşılaştırmalı incelemesi sonucu optimize edilen immün boyama protokolünün tespit edilebilen vagal sinir ağının miktarında dramatik bir artış sağladığı gözlemlendi (**Şekil 6.4.3.7**).



Şekil 6.4.3.4. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal (A) ve ventral (B) yüzeyindeki vagal duyu sinir ağının 5X objektif ile alınmış maksimum projeksiyon görüntüsü. Ölçek: 1 mm.



Şekil 6.4.3.5. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalp ventrikülünde vagal duyu sinirlerinden gelen endojen tdTomato sinyalinin (**sol**) anti-RFP ve Alexa Fluor PLUS 647 ile immün boyama sonrası (**sağ**) elde edilen sinyal ile karşılaştırılmalı görünümü. Üst: 5X. Alt: 20X objektif. Maksimum Projeksiyon Görüntüler.

Kalbi saran sinir ağının yüksek çözünürlüklü görüntüsünü elde edebilmek için konfokalmikroskopunda lazer ile uyarım sonrası kalpten yansıyan odak dışı ışığın yüksek seviyede engellenebilmesi gerekmektedir. Bunu gerçekleştirebilmek için LSM880 Konfokal Mikroskopu (ZEISS) yeni geliştirilen Airyscan (AS) modunda kullanıldı. AS modu sahip olduğu özel pinhole düzeneği sayesinde görüntülenen örnekten yansıyan odak dışı ışıkları daha yüksek düzeyde engellemekte ve bu sayede daha yüksek çözünürlüklü bir görüntü sağlamaktadır. Alexa Fluor PLUS sekonder

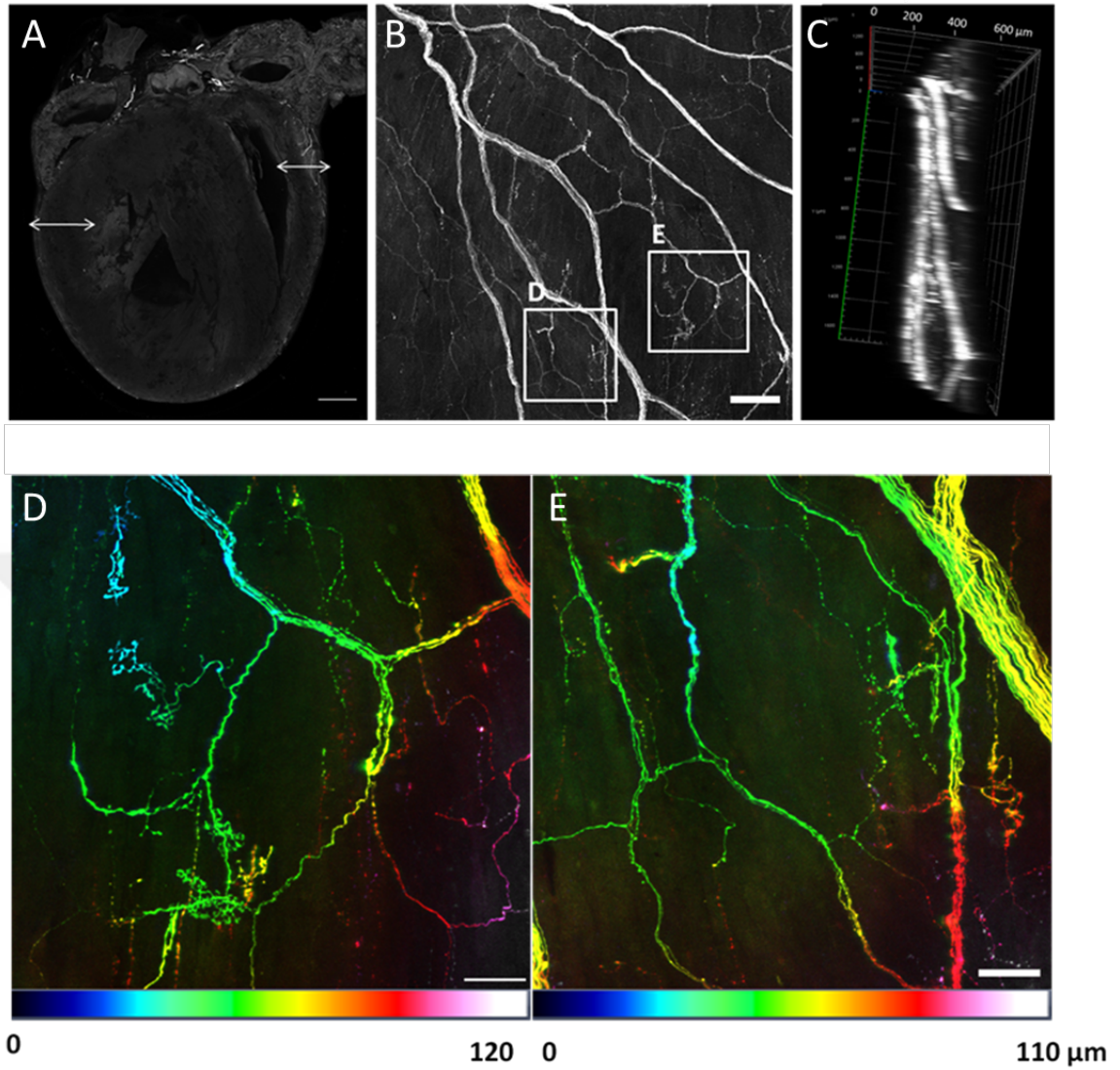
antikorlar ve LSM880 konfokal mikroskobunun AS modunda kullanılmasını içeren birleşik görüntüleme stratejisi sonucu hem kalbi saran bütün sinirler (**Şekil 6.4.3.1** ve **Şekil 6.4.3.3**) hem de spesifik olarak vagal duyu sinirleri (**Şekil 6.4.3.5**) bütün kalp boyunca daha önce literatürde elde edilmemiş bir kapsam ve çözünürlükte tespit edilebildi.

6.4.4. Uygulanan Alexa Fluor PLUS antikorları ve mikroskop yaklaşımı sonucu tespit edilebilen kalp vagal afferent sinir derinliğinin incelenmesi

Bu tez çalışması kapsamında optimize edilen ileri mikroskopik görüntüleme yönteminin kalp dokusuna nüfuz eden sinir ağını ne ölçüde tespit edebildiği sorusu, elde edilen inervasyon verisinin yorumlanması açısından önem arz etmektedir. Histolojik olarak kalp dokusu üç farklı katmandan oluşmaktadır. Epikardiyum en dış katmanı oluştururken endokardiyum ise kalp lümenini çevreleyen en iç katmanı oluşturur. Bu iki katmanın arasında en kalın tabaka olan miyokardiyum bulunmaktadır. Diğer katmanlara göre en yüksek oranda kas dokusunu miyokardiyum içermektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan 8-10 haftalık yetişkin fare kalbinin anatomisi insan kalbi ile karşılaştırmalı incelendiğinde epikardiyum ve endokardiyum katmanlarının alınan kesitlerde doku boyutunda ayrıştırılmasının zor olduğu ve her iki tabakanın da çoğu zaman tek hücre kalınlığında olduğu literatürden bilinmektedir (90).

Bu tez çalışmasında kardiyak vagal afferentlerin kalp yüzeyinden derinlere doğru dallanmasını en optimal düzeyde görüntüleyebilmek için önceki bölümlerde detaylı bir şekilde bahsedilen transgenik ve ileri mikroskopik görüntüleme yaklaşımlarını haiz bir metodoloji uygulandı. Bütün kalp ölçeğinde gerçekleştirilen vagal afferent görüntülemesinin miyokardiyal dokuya ne ölçüde nüfuz edebildiğini inceleyebilmek amacı ile anti-RFP ve Alexa Fluor PLUS 647 ile boyalı Phox2b-Cre::Tdtomato ifade eden bütün fare kalbinin uzun ekseni boyunca ve tam ortasından koroner bir kesit alındı. Bu kesitin konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi sonucu miyokard tabakasının ventriküllerde 1-1.5 mm kalınlığına ulaştığı tespit edildi (**Şekil 6.4.4.1A**). Kalbin dorsal epikardiyal yüzeyinden ne kadar derine ulaşan vagal duyu sinirlerini görebildiğimizi belirlemek için aynı kalbin dorsal yüzeyinin 5X objektif ile görüntülemesini gerçekleştirdik (**Şekil 6.4.4.1B**). Bu z-stack görüntüsünün 3 boyutlu görünümünü lateral yönden incelendiğinde mevcut metodolojimiz yoluyla 5X objektif

ile sekonder antikordan gelen sinyalin yaklaşık 200 µm derinliğine kadar yakalanabildiği saptandı (**Şekil 6.4.4.1C**). Daha sonra, 5X objektif ile çekilen görüntünün (**Şekil 6.4.4.1B**) vagal duyu sonlanmaları içeren iki bölgesinin 20X objektif ile büyütülmüş görüntülemesi gerçekleştirildi (**Şekil 6.4.4.1D-E**). 20X objektif ile çekilen z-stack katmanlarının epikardiyal yüzeyden miyokardiyuma doğru z-boyutunda değişen konumuna göre renklendirilmiş 2 boyutlu projeksiyonları oluşturuldu (**Şekil 6.4.4.1D-E**). Epikardiyal yüzeyde bulunan sinirler mavi ile işaretlenirken miyokardiyum içerisine uzanan sinir uçları ise kırmızı-beyaz renk ölçeğinde temsil edildiler. Bu görüntüler 20X objektif ile yaklaşık 120µm derinliğe kadar uzanan vagal duyu sinir liflerinin tetkik edilebildiğini göstermektedir (**Şekil 6.4.4.1D-E**). Her iki karede de çiçek benzeri sonlanmaların epikardiyal yüzeyden yaklaşık 60 µm derinlik seviyesine konumlandığı görülmektedir (**Şekil 6.4.4.1D-E**). Kas içi dizi benzeri sonlanmaların ise yaklaşık 100 µm derinlikte miyokard dokusunu oluşturan miyofibriller ile hizalı ve onları sarar şekilde konumlandığı tespit edildi (**Şekil 6.4.4.1E**). Bu veriler toplu şekilde değerlendirildiğinde uyguladığımız kardiyak vagal afferent görüntüleme metodolojisinin epikardiyumun tamamını ve miyokardiyumun ise bir kısmını tetkik edebildiği saptanmıştır. Ulaşılabilen görüntüleme derinliğinin kardiyak vagal afferentlerin hem yüzeyel hem de miyokard içerisindeki miyofibrilleri ile hizalanmış kas içi dizi sonlanmalarını inceleyebilmek için yeterli olduğu ayrıca tespit edilmiştir. Yine de yakın zamanda geliştirilen organ şeffaflaştırma yöntemlerinin tespit edilebilen vagal afferent sinir derinliğine muhtemel katkısının değerlendirmek amacıyla bütün kalp boyunca doku şeffaflaştırma yöntemleri uygulandı.

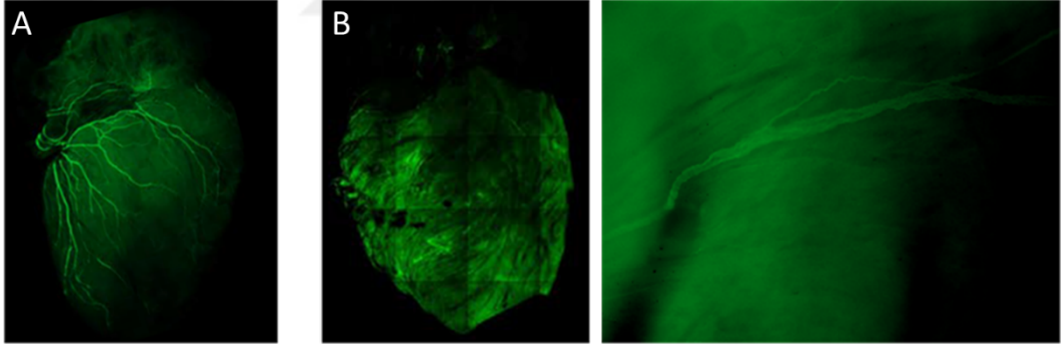


Şekil 6.4.4.1. Phox2b-Cre::tdTomato kalbinde epikardiyum ve kısmi miyokard boyunca nodoz vagal innervasyonları. **A.** Phox2b-Cre::tdTomato kalbinden uzunlamasına kesit. Ölçek: 1 mm **B.** 5X objektifinde aynı kalbin sol ventrikülünden maksimum yoğunluk projeksiyon görüntüsü. **C.** B şeklindeki kalbin z katmanlarının 3 boyutlu lateral görünümü. Soldan sağa, sinir demetleri epikardiyumdan miyokardiyuma uzanır. **D-E.** Renk kodlu projeksiyonlarla B'deki kutuların yüksek büyütme görünümü. 20X objektif. Ölçek çubukları: 1 mm (A), 200 μm (B), 50 μm (C-D).

6.4.5. iDISCO ve Cubic kalp doku şeffaflaştırma yöntemleri kullanılarak görüntülenebilen vagal afferent sinir derinliğinin incelenmesi

Kalp dokusunu şeffaflaştırmanın konfokal mikroskobu ile görüntülenebilen sinir derinliğine muhtemel katkısını araştırmak için literatürdeki farklı doku

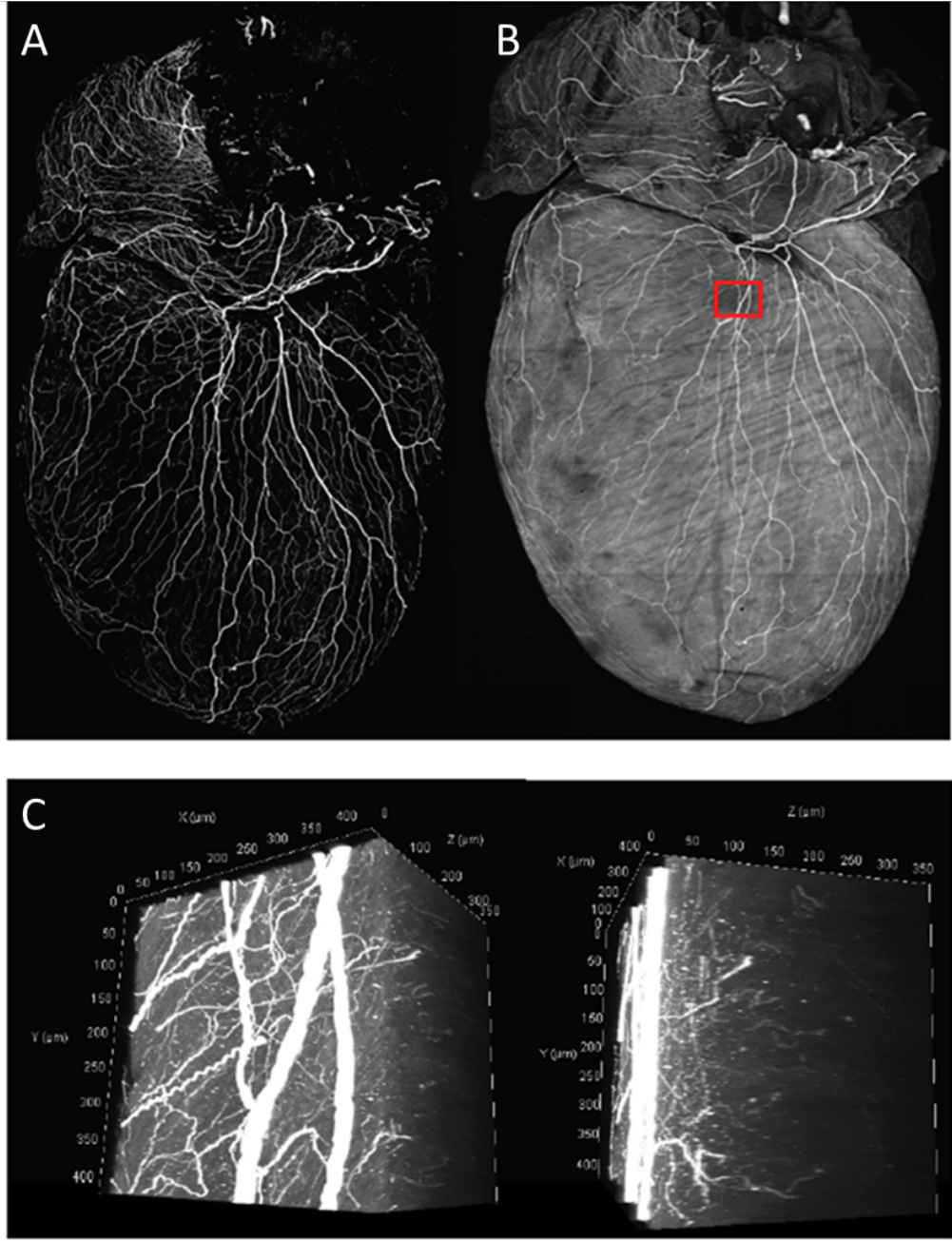
şeffaflaştırma protokolleri incelendi. Kalp dokusunu delipidasyona uğratarak daha şeffaf hale getirebilmek için iki farklı doku şeffaflaştırma protokolü uygulandı. Bu protokoller TUJ-1 boyalı kalplerde denenmiş ve şeffaflaştırmanın konfokal mikroskopu ile görüntülenebilen sinirlenme derinliğine olan katkısı incelenmiştir. İlk olarak hidrofobik solüsyon yöntemlerinden iDISCO kullanıldı. Fikse edilen kalpler ilk önce hidrojen peroksit ile muamele edilip (bleaching) artan oranlarda metanol çözeltilerinden geçirildi. Daha sonra Dexametazon ve Metanol karışımında bir süre tutulduktan sonra kalp Dibenzil-eter içerisinde şeffaflaştırıldı. Bu işlem sonucu şeffaflaştırmanın 7.günü 5X objektif ile icra edilen görüntülemeye kalp kasından gelen otoflorasan sinyalde büyük bir artış olduğu görüldü (**Şekil 6.4.5.1**). Şeffaflaştırılmamış doku ile kıyaslandığında otoflorasan sinyalde meydana gelen bu artışın epikardiyal yüzey boyunca sinir ağının takibini büyük oranda engellediğini gözlemledik. Yine iDisco uygulaması sonucu organ boyut ve yapısında küçülme ve farklılaşmalar olduğu tespit edildi (**Şekil 6.4.5.1B**).



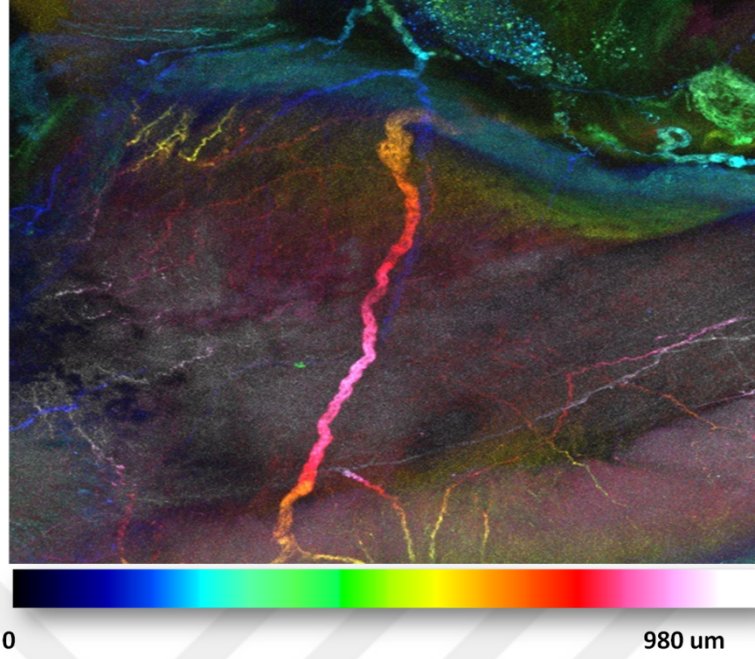
Şekil 6.4.5.1. Tuj-1 boyalı vahşi tip kalbin iDisco protokolü ile şeffaflaştırma protokolü uygulaması öncesi (**A**) ve sonrası 7.günde (**B**) 5X (sol) ve 20X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüleri.

Hidrofobik yöntemlerden iDisco uygulamasından verim alınamayınca yine sinirbilim alanında yaygın şekilde kullanılan hidrofilik yani su fazında gerçekleşen Cubic doku şeffaflaştırma yöntemine geçildi. TUJ-1 boyalı kalplerde Cubic-1 yöntemi uygulanarak yapılan şeffaflaştırma sonrası 5X objektif ile alınan görüntülerde otoflorasan sinyalin arttığı görüldü (**Şekil 6.4.5.2A-B**). Artan otoflorasan sinyal yüzünden epikardiyal yüzeydeki sınırlar detaylı şekilde görüntülenemedi (**Şekil 6.4.5.2C**). Görece kalın olan sınırların tespit edilebildiği derinlikte ise artış elde edildi (**Şekil 6.4.5.3**). 20X objektif ile alınan görüntülerde ise ilgili objektifin çalışma derinliğine bağlı kısıtlamadan dolayı şeffaflaştırmanın tespit edilebilen sinir derinliği miktarına katkı sağlamadığı tespit edildi (**Şekil 6.4.5.2C**).



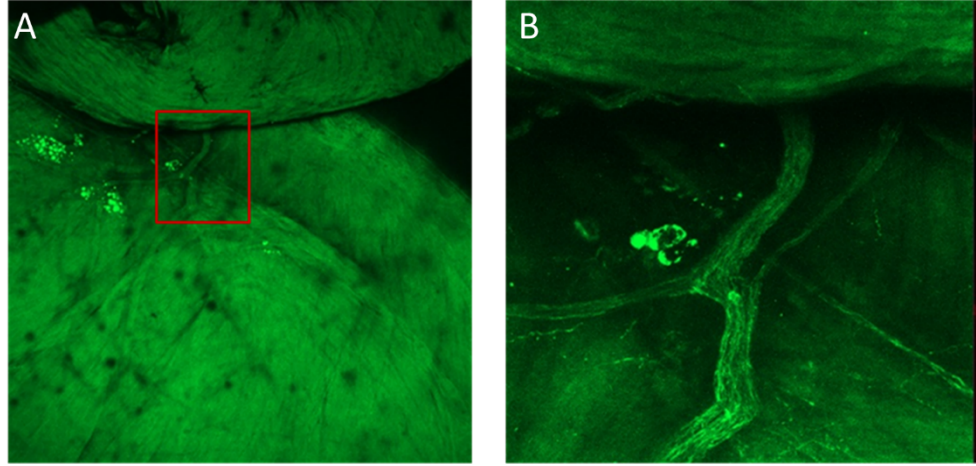


Şekil 6.4.5.2. Vahşi tip fare kalbinin tüm sinir ağının Tuj-1 antikor boyaması. **A.** 5X objektif ile alınan konfokal görüntüsünün maksimum projeksiyonu. **B.** 3 günlük şeffaştırma sonrası otofloresan artışı ve arka fon (background) nedeniyle 3B bütün kalpte sinyal ile detayın azalması. **C.** Şekil B bulunan karenin 20X objektif ile alınan z-stack görüntüsünün dorsal (sol) ve lateral 3B görünümü.



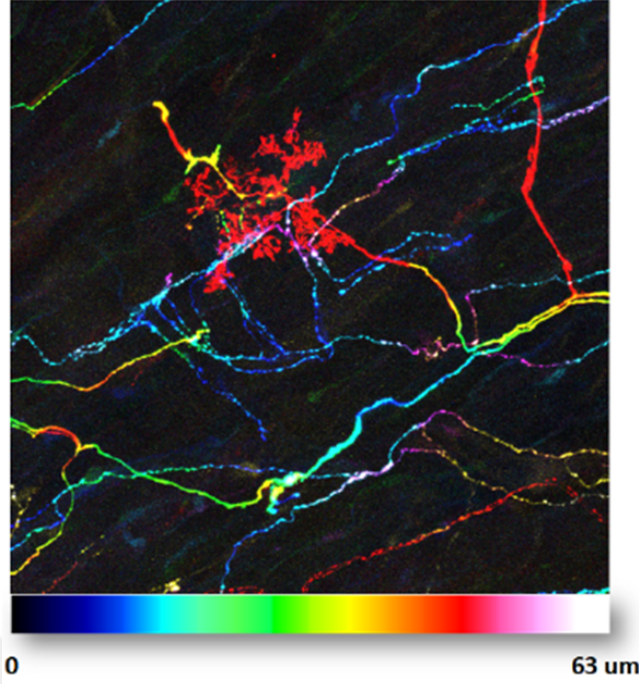
Şekil 6.4.5.3. TUJ-1 boyalı vahşi tip kalbin Cubic şeffaflaştırma protokolü sonrası sinyalin 3 boyuttaki derinliği.

Daha sonra aynı Cubic şeffaflaştırma protokolü anti-RFP ile boyanmış Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde uygulandığında TUJ-1 boyalı vahşi tip kalp görüntülemelerine benzer sonuçlar elde edildi. Şeffaflaştırma solüsyonlarında bulunma miktarı arttıkça kalp sınırlarından gelen antikör sinyalinin koşut olarak azaldığı tespit edildi (**Şekil 6.4.5.4**). Şeffaflaştırma sonucu artan otofloresan sinyalin henüz sekonder antikordan gelen sinyali bütünüyle engellemediği ve 20X objektif ile hala sinyalin görüntülenebildiği koşullarda bile sinyal derinliğinde artış tespit edilmedi. Phox2b-Cre::Tdtomato kalpte şeffaflaştırma sonrası 20X objektif ile alınan görüntü (**Şekil 6.4.5.5**) şeffaflaştırma yapılmadan alınan görüntüler (**Şekil 6.4.4.1D-E**) ile karşılaştırmalı olarak incelendiğinde vagal duyu sinir liflerinin her iki durumda da benzer derinlikte ve detayda görüntülenebildiği tespit edildi.



Şekil 6.4.5.4. Phox2b-Cre::tdTomato transgenik fare kalbinin anti-RFP boyalı vagal duyu sinirlerinin 21 günlük Cubic doku şeffaştırma işlemi sonrası görünümü. **A.** Ventrikülün 5X objektif ile alınmış konfokal görüntüsü. **B.** Şekil A’da kare ile işaretlenmiş bölgenin 20X objektif ile çekilmiş detaylı görünümü.

İki farklı şeffaştırma yönteminin (iDsico ve Cubic) kalpteki farklı zamanlar boyunca icra edilen uygulamalarının sonuçları birlikte değerlendirildiğinde kalp kas dokusundan gelen otofloresan sinyalin şeffaştırma uygulamaları sonucu arttığı gözlemlendi. Bu artış sekonder antikora bağlı florofor molekülünden gelen ışımaya sinyalinin konfokal mikroskobu ile tespit edilmesini engelledi. Bu gözlemler sonucu kalbi saran vagal duyu sinir ağının en kapsamlı görüntülemesinin şeffaştırma işlemleri yapılmadan ve sadece immün boyama ile elde edilebileceği tespit edildi. Bu amaç ile bu tez çalışması kapsamında epikardiyumun tamamına ve miyokardiyumun bir kısmına nüfuz eden vagal duyu sinirleri bütün kalp boyunca görüntüledi.



Şekil 6.4.5.5. Cubic yöntemi ile şeffaflaştırmanın 12. gününde Phox2b-Cre::tdTomato kalpte çiçek sonlanmasının derinliğe bağlı renklendirilmiş görünümü. Maksimum Projeksiyon. 20X objektif.

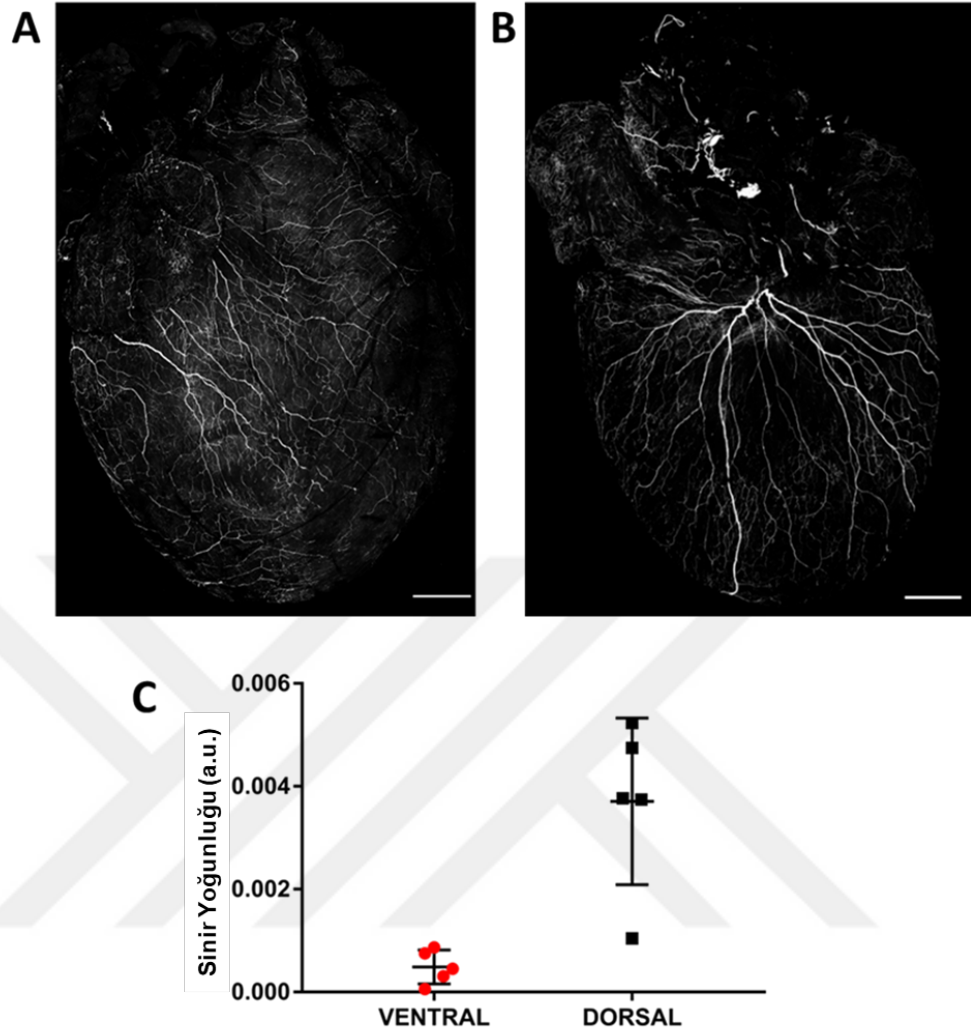
6.5. Phox2b-Cre::TdTomato İfade Eden Sinir Ağının Kalp Boyunca Görüntülenmesi

Bu tez çalışması kapsamında yapılan immün boyama ve mikroskopik görüntüleme optimizasyon çalışmaları sonucunda kalbi saran vagal duyu sinirlerini bütün kalbi kapsayacak şekilde görüntüleyebilmek için en verimli metodoloji belirlendi. Kısaca Cre rekombinaza bağımlı şekilde CAG promotör bölgesinden ifade edilen tdTomato floresan protein sinyalinin tek başına kalpteki sinirleri görüntülemeye yeterli olmadığı tespit edildi ve anti-RFP boyaması aşağıda verilen tüm görüntülerin eldesinde kullanıldı. İkinci olarak bütün kalp görüntülemelerinde yüksek çözünürlük elde edebilmek için anti-RFP antijenine bağlanabilen ve standart Alexa Fluor vb. antikora göre dört kat fazla sinyal-gürültü oranı sunabilen Alexa Fluor PLUS sekonder antikora kullanıldı. Son olarak 5X objektif ile bütüncül kalpte ve kalbin çeşitli bölgelerine odaklanan yüksek magnifikasyonlu görüntülemelerde LSM880 konfokal mikroskobu kalpten yansıyan odak dışı ışıkları daha yüksek oranda

engelleyebilen AS seçeneği ile kullanıldı. Aşağıda paylaşılan bütün görüntülemelerde bu üç adımı içeren bir metodoloji uygulandı.

6.5.1. Kalbi saran vagal duyu sinir ağının bütün kalp ölçeğinde tespit edilmesi

Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin hem dorsal hem de ventral yüzeydeki vagal duyu sinirlenmesinin bütüncül ve detaylı görüntüsü 5X objektif ile elde edildi ve karşılaştırmalı olarak incelendi. İlk olarak dorsal kalp yüzeyinde kalın çaplı sinir fasiküllerinin ventral yüzeye kıyasla daha yoğun olduğu gözlemlendi. Ayrıca incelenen 5 farklı Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinde gerçekleştirilen immün boyamaların karşılaştırmalı analizi sonucu dorsal ve ventral yüzeylerde genel sinir yoğunluklarının birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu tespit edildi (**Şekil 6.5.1.1.**). İstatistiksel analiz sonucu vagal duyu sinirlerinin kalbin dorsal yüzeyindeki yoğunluğunun ventral yüzeyine göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (**Şekil 6.5.1.1.C**, $p = 0.0015$).



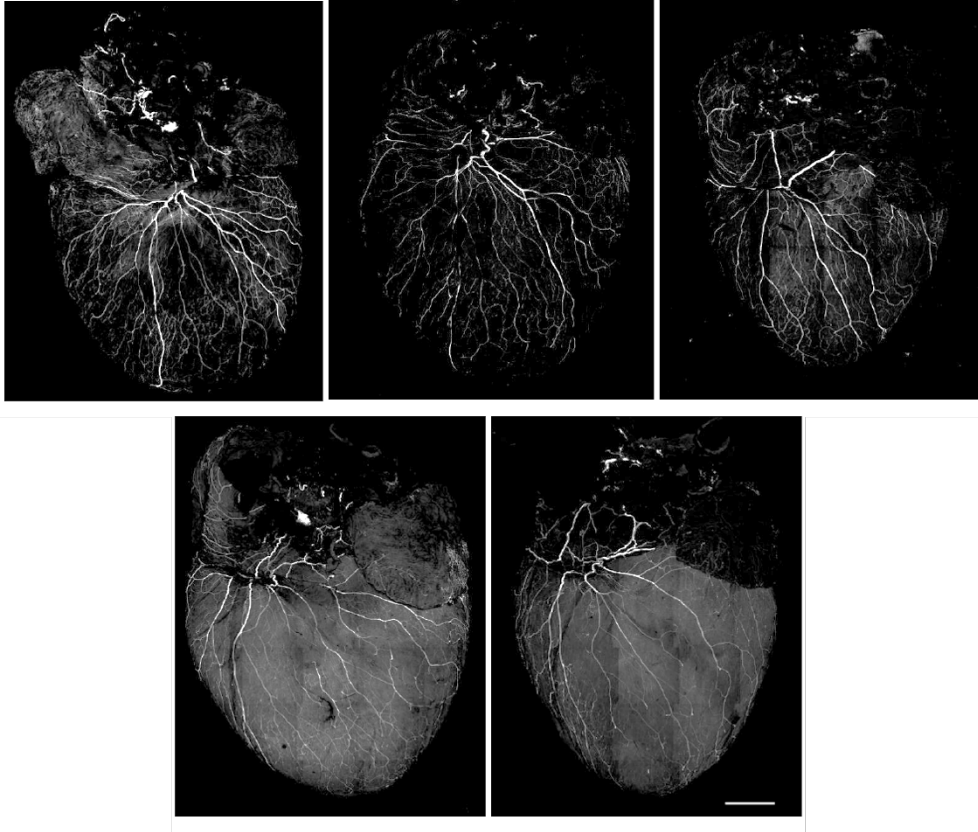
Şekil 6.5.1.1. Phox2b-Cre::tdTomato kalpte vagal duyu sinir ağının ventral (A) ve dorsal (B) görüntüsü. Maksimum Projeksiyon. 5X Objektif. Ölçek: 1 mm. C. Kalplerin dorsal ve ventral tarafları arasındaki sinir yoğunluklarının ölçümü (Kazci Y.E. ve ark. , 2022).

6.5.1.1 Kalbi saran vagal duyu sinir ağı deseninin farklı kalplerde incelemesi

Vagal duyu sinir dallanmasının incelendiği bütün Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde dorsal yüzeyde ventral yüzeye göre daha yoğun sinir lifleri tespit edildi (Şekil 6.5.1.1C, n = 5). Farklı kalplerin ventral yüzeylerinde yapılan ölçümler kendi içlerinde benzer sinirlenme yoğunlukları gösterdi. Ancak ventral yüzeylerde yapılan ölçümler ile kıyaslandığında farklı Phox2b-Cre::tdTomato kalplerin dorsal yüzeylerinde tetkik edilen sinir lifi yoğunluğu kendi içerisinde daha yüksek varyasyon

gösterdi (**Şekil 6.5.1.1C, n = 5**). Bununla birlikte analizde kullanılan kalplerin dorsal yüzeyleri detaylı incelendiğinde görüntülenebilen vagal duyu sinir dallanmasının benzer bir desen gösterdiği tespit edildi (**Şekil 6.5.1.1.1**). İlerideki sinir lifi çap ölçümlerinde detaylı bir şekilde gösterileceği gibi $5 \mu\text{m}$ > sinir dalları kardiyak hilumdan Aort ve venler yoluyla kalbe girdikten sonra koroner sinüsün hemen altından düğüm oluşturup ventriküllere doğru ilerlemektedir. Dorsal yüzeyde koroner sinüs üzerinden yatay yönde ilerleyen vagal duyu sinirleri yol boyunca daha ince dallara ayrılarak atriyumları sinirlemektedir (**Şekil 6.5.3.1**). Bu benzer sinirlenme profili incelenen tüm kalplerde gözlemlenmiştir.

Total vagal duyu sinir liflerinin dorsal ve ventral yüzeydeki miktarları incelendikten sonra farklı çaptaki vagal sinir liflerinin kalbin ventral ve dorsal yüzeyindeki dağılımının araştırılması hedeflendi. Bu amaç ile ilk önce 5X objektif ile alınmış bütün kalp görüntülerini girdi olarak alıp sinir ağını ön yargısız bir şekilde tespit edebilecek bir hesaplamalı metodoloji geliştirildi ve optimize edildi.



Şekil 6.5.1.1.1. Phox2b-Cre::tdTomato ifade eden vagal duyu sinirlerinin farklı kalplerin dorsal yüzeyindeki görüntüleri. n = 5. Ölçek: 1 mm. (Kazci Y.E. ve ark., 2022).

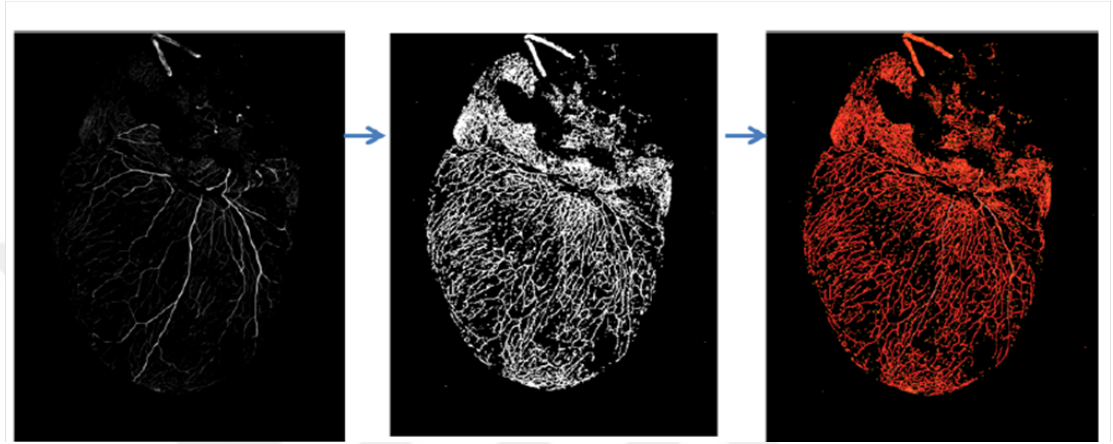
6.5.1.2. Kalp vagal duyu sinirlerinin çap analizi

Kalbi saran vagal duyu sinir liflerini kalınlıklarına göre belirlemek ve farklı kalınlıktaki sinirlerin bütün kalbin farklı bölgelerinde ne kadar yoğunlukta dallanma gösterdiğini belirlemek için kapsamlı bir görüntü analiz metodolojisi uyguladık. İlk önce PGP9.5 genel nöron belirteci ile boyalı vahşi tip bütün kalp görüntüsü kullanılarak sinir lif çap analiz metodolojisinin optimizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra geliştirilen analiz yöntembilimi kalbi saran vagal duyu sinir liflerinin çaplarına göre karakterizasyonunda kullanıldı.

6.5.1.2.1. Kalbi saran sinir liflerinin çap analiz metodunun optimizasyonu

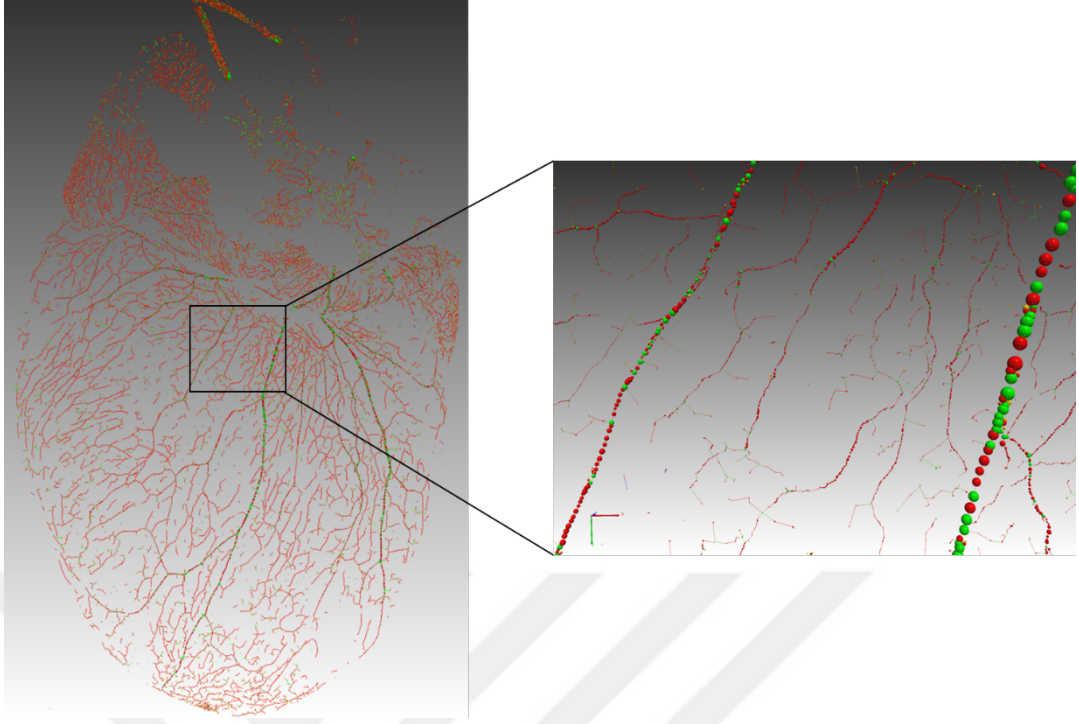
Kalbe dallanan sinir liflerinin çap analizi için kullanılacak metodoloji ilk olarak vahşi tip kalp görüntüsünde uygulandı. Başlangıç adımı olarak PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin 2D maksimum projeksiyon görüntüsü oluşturuldu ve bu resim

üzerinde sinir lifi çap analizi metodolojisi optimize edildi. PGP9.5 antikoruna ile işaretli sinir dallarını objektif bir yöntem ile bütün kalp boyunca belirlemek için Neutube 1.0 yazılımı kullanıldı ve resimdeki sinir eğrilerini otomatik olarak tanımlandı (**Şekil 6.5.1.2.1.1**).



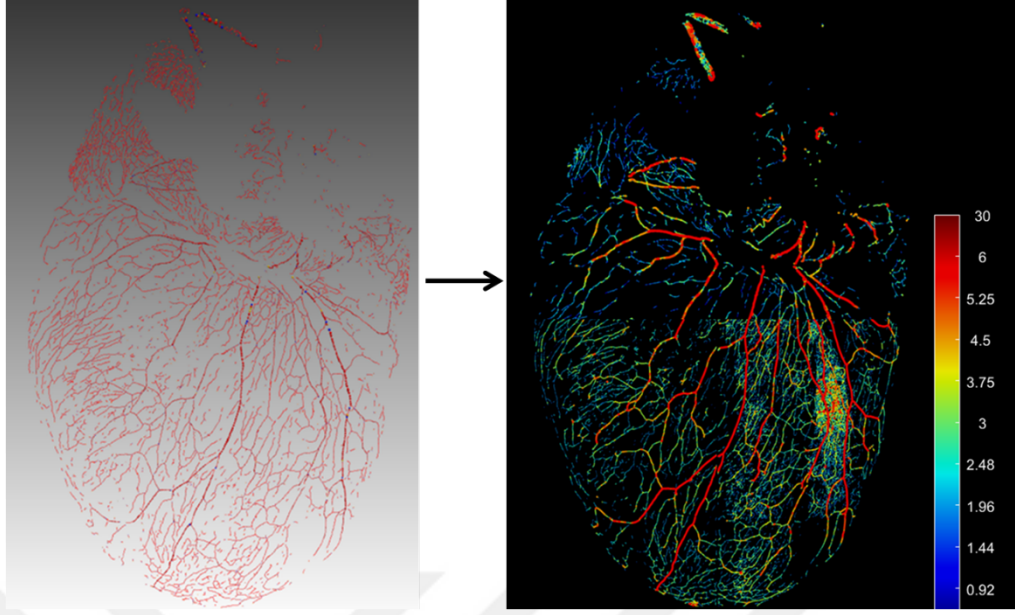
Şekil 6.5.1.2.1.1. PGP9.5 pan-nöron belirteci ile boyanmış vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsünün (solda) Neutube 1.0 programı ile binarize edilmiş (ortada) ve sinir eğri iskeleti oluşturulmuş türevleri (sağda).

Bu yazılım, girdi adına verilen 2D resmi ilk aşamada binarize hale dönüştürüp daha sonra beyaz pikselleri birleştirerek sinir eğrilerinin iskeletini oluşturmaktadır (**Şekil 6.5.1.2.1.1**). Son adımda ise dijital olarak oluşturulmuş sinir morfolojilerini depolamak için kullanılan SWC dosyası çıktı olarak verilmektedir (**Şekil 6.5.1.2.1.2**). SWC dosyasında sinir liflerinin değişen kalınlıkları farklı çapta küreler şeklinde görüntülenebilmektedir (**Şekil 6.5.1.2.1.2, sağ**).

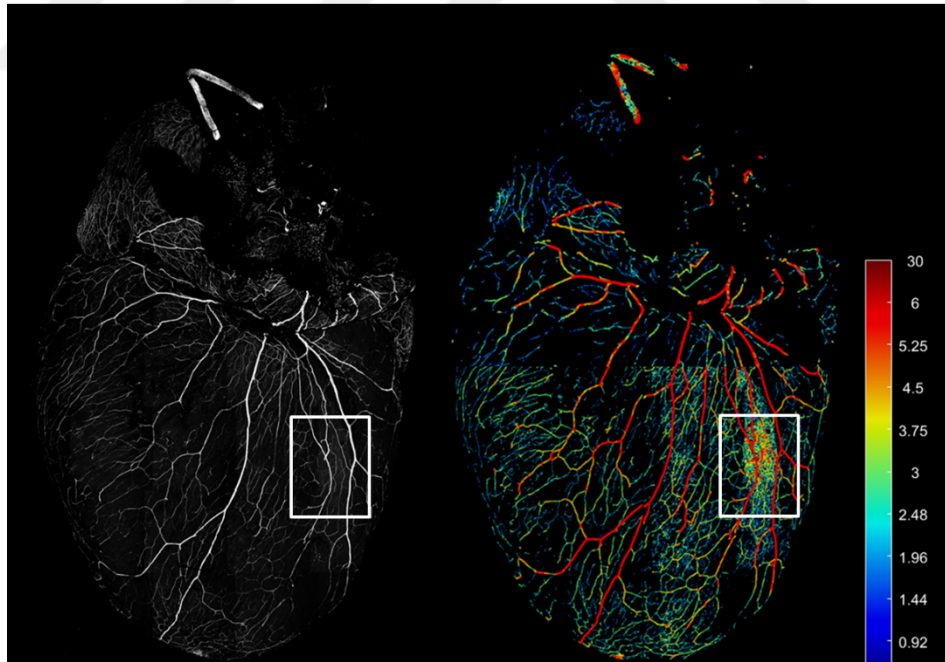


Şekil 6.5.1.2.1.2. PGP9.5 pan-nöron belirteci ile boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsünde neutube 1.0 programı ile tanımlanan sinir dalları.

Neutube 1.0 yazılımı tarafından ilgili kalp resminde tanımlanan sinir liflerinin kalınlık bilgisini içeren SWC dosyasını kullanarak ilgili sinir liflerini kalınlıklarına göre renklendirmek için daha önce Matlab ortamında yazılmış bir komut dizisi kullanıldı (**Rajendran P. ve ark., 2019**). Bu komut dizisi kullanılarak 0-30 μm arası kalınlıktaki sinir demetleri kalınlıklarına göre renklendirildi (**Şekil 6.5.1.2.1.3**). Sinir liflerinin kalınlıklarına göre spesifik tonda renklendirilmesi işlemiyle farklı renkteki piksellerin kalbin değişik bölgelerindeki yoğunluğunun hesaplanması amaçlandı. Bu yöntem ile farklı çaptaki sinir liflerinin kalpteki bölgesel dağılımının ölçülmesi hedeflendi. Ancak renklendirilmiş resim incelendiğinde antikor boyaması sonucu arka plan sinyalinin fazla olduğu bölgelerin neutube programı tarafından hatalı şekilde sinir lifi olarak tanımlandığı tespit edilmiştir (**Şekil 6.5.1.2.1.4**).



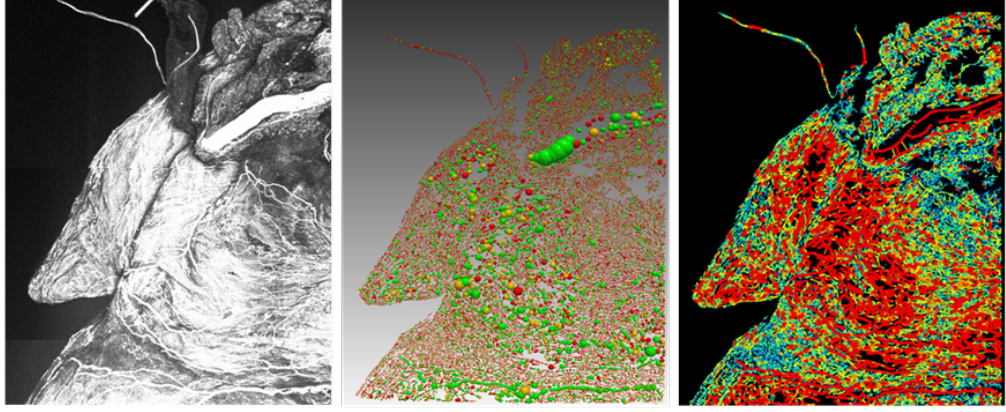
Şekil 6.5.1.2.1.3. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsünde neutube 1.0 programı ile tanımlanan sinir liflerinin kalınlıklarına göre Matlab kodu ile renklendirilmiş görünümü.



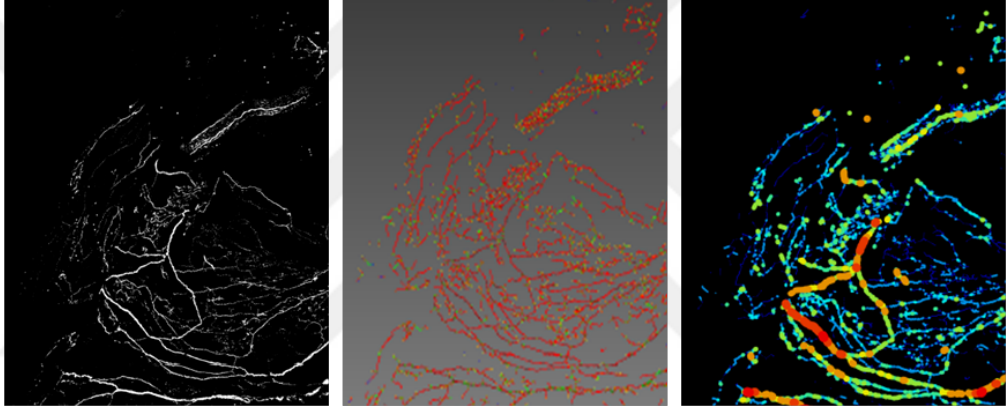
Şekil 6.5.1.2.1.4. Otofloresan sinyalin neutube 1.0 programı ile yanlış şekilde sinir eğrisi olarak tanımlanması. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsünde otofloresan içeren kare içine alınmış bölgede sinir liflerinin kalınlıklarına göre Matlab kodu ile renklendirilmiş görünümü.

Sinir liflerinin kalbin bazı bölgelerinde yanlış tanımlanmasının sebebini tespit etmek amacıyla başka bir kalbin sol atriyum bölgesini içeren resmin parlaklık ve karşıtlık değerleri ayarlanmamış ham versiyonu (raw data) girdi olarak neutube programına verildi (**Şekil 6.5.1.2.1.5A**). Oluşturulan çıktı dosyası üzerinde Matlab kodu kullanılarak sinir liflerinin kalınlıklarına göre renklendirilmesi işlemi gerçekleştirildi (**Şekil 6.5.1.2.1.5A, sağda**). Oluşan renklendirilmiş veri incelendiğinde, ilginç bir bulgu olarak, neutube yazılımının girdi olarak verilen resimdeki sinyali herhangi bir keşifsel yaklaşım yoluyla tarayıp filtrelemeden olduğu gibi binarize ettiği ve bu işlem dolayısıyla yanlış sinir lifi tanımlaması olduğu tespit edildi. Bu tespiti güçlendirmek için aynı kalp resminin parlaklık ve karşıtlık değerleri manuel olarak ayarlanıp arka plan sinyali azaltılmış versiyonu oluşturulup aynı analiz gerçekleştirildi. Öngörüldüğü gibi, bu işlem sonucunda, girdi resimde görüntülenen sinir dalları ile daha tutarlı bir sonuç elde edildi (**Şekil 6.5.1.2.1.5B**).

A



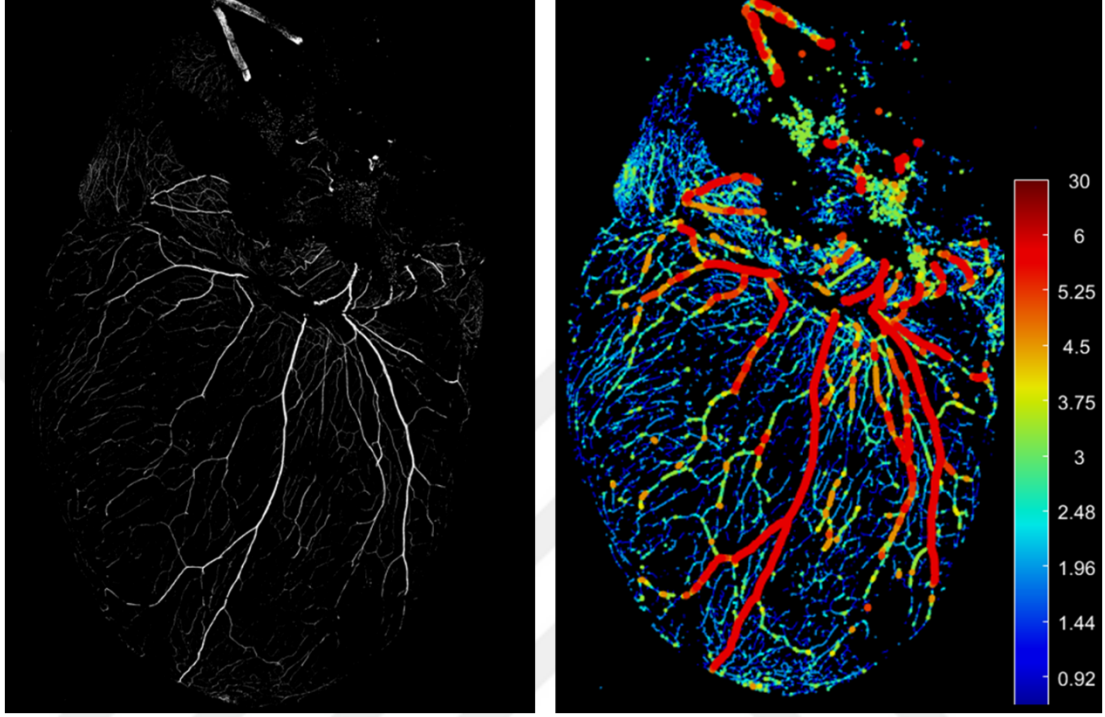
B



Şekil 6.5.1.2.1.5. Otofloresan sinyalinin neutube 1.0 programındaki binarizasyon işlemi ve tanımlanan sinir ağına ola etkisinin görünümü. **A.** Kalbin bir bölgesindeki sinir dallanmasının içeren görüntünün maksimize edilmiş halinin sinir çapı analiz sonucu. **B.** Aynı görüntünün parlaklık ve keskinlik değerlerinin düzenlenmiş versiyonunun sinir çapı analiz sonucu.

Bu bulgular arka plan (otofloresan) sinyalinin manuel olarak düzenlenmesinin sonuçlar üzerindeki etkisini göstermektedir. Arka plan sinyali yapılan boyamaya göre kalbin farklı bölgelerinde farklı yoğunlukta olabilir düşüncesi ile parlaklık ve kontrast ayarlarının sonuçları etkilemeyecek en optimal şekilde nasıl yapılabileceği üzerine yoğunlaşıldı. Bu amaçla PGP9.5 boyalı bütüncül kalp resmi kullanılarak iki farklı yaklaşım test edildi. Birinci yaklaşımda **Şekil 6.5.1.2.1.4**'te kare içerisine alınmış kalbin otofloresan sinyali en yoğun olan bölgesinde sinir dallarını göz ile arka plandan

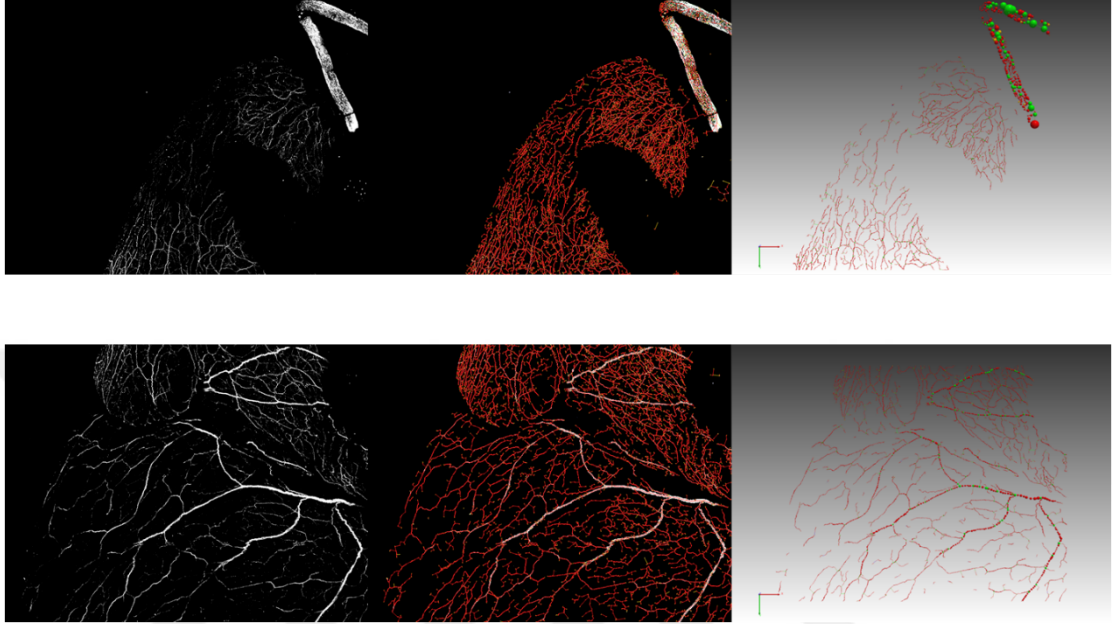
ayrıştırılabilmesini sağlayacak minimum miktarda sinyalin parlaklığı kısıldı ve sinir liflerinin çap analizi gerçekleştirildi (Şekil 6.5.1.2.1.6).



Şekil 6.5.1.2.1.6. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsündeki (solda) sinir dallarının kalınlıklarına göre renklendirilmiş görünümü (sağda).

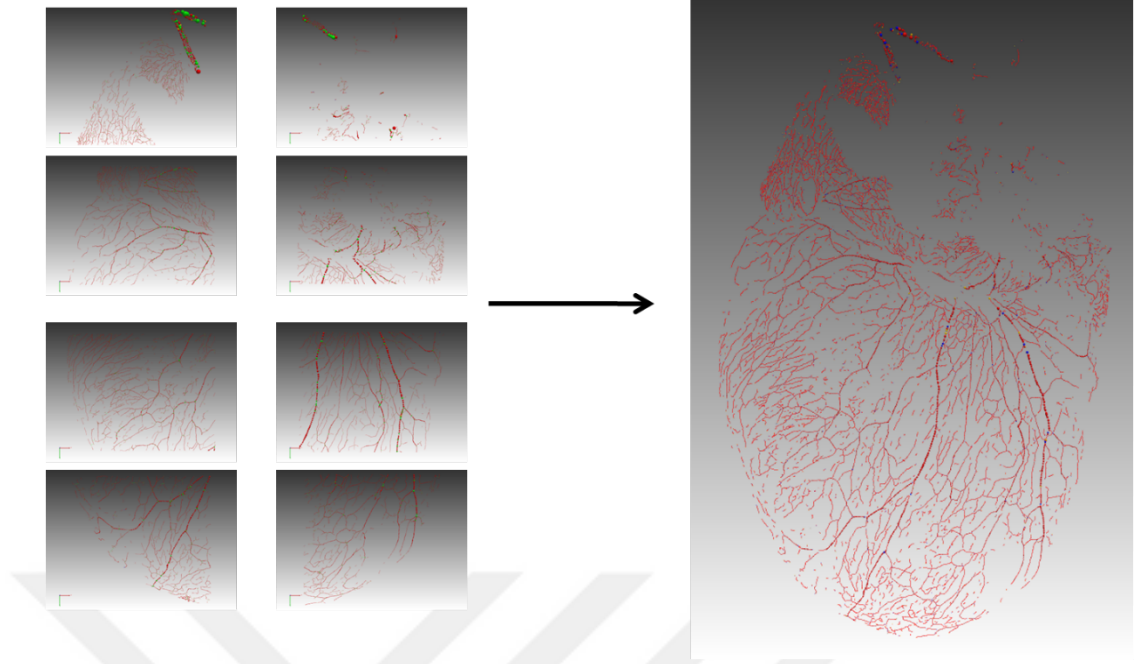
İkinci yaklaşımda ise bütün kalp resmi 2 x 4 şeklinde 8 kareye bölündü ve her bir karenin arka plan sinyali düşürme işlemi kendi içerisinde ve sinyal kaybını olabildiğince düşük tutma için yine minimum ölçekte gerçekleştirildi. Şekil 6.5.1.2.1.7'te iki kare için neutube programının tanımlayabildiği sinir dalları örnek olarak verilmiştir. 8 karenin her birisi için tanımlanmış sinir dallarını içeren SWC verilerinin sinir dalı kalınlığına göre renklendirme işlemi kullanılmadan önce birleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Rajendran ve. ark. tarafından oluşturulan birleştirme (stitching) kodu Matlab'da kullanıldı. Bu birleştirme kodu girdi olarak verilen SWC verilerinin X ve Y düzleminde nereye konumlandırılacağı bilgisini SWC dosyalarının isimlerinden almaktadır. Bu amaç ile her bir kareyi bütün resimdeki X ve Y pozisyonuna göre isimlendiren bir Matlab kodu yazıldı. Her bir karenin 2 boyutlu

düzlemdeki pozisyon bilgisine göre simlendirilen SWC dosyaları girdi olarak kullanılarak birleştirme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 6.5.1.2.1.8).

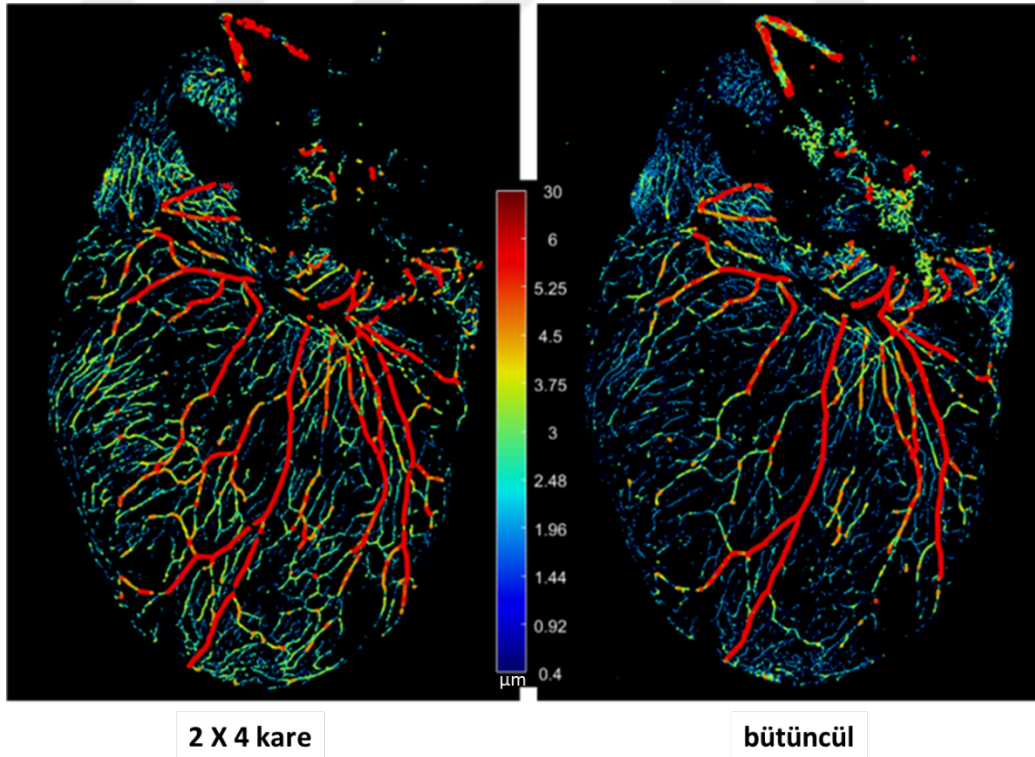


Şekil 6.5.1.2.1.7. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsünden iki farklı karenin ayrı girdiler olarak neutube 1.0 programı ile analizi sonucu tanımlanan sinir dalları.

Birleştirme işlemi sonucu oluşturulan bütün kalbe ait SWC dosyası kullanılarak sinir dallarının çaplarına göre renklendirilmesi işlemi gerçekleştirildi. İki farklı yaklaşım ile oluşturulan sinir lif kalınlık analizi sonuçları karşılaştırıldığında kareler halinde ve bütüncül işlem sonucu sinir dalları boyunca benzer renk dağılımının olduğu gözlemlendi (Şekil 6.5.1.2.1.9). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde özellikle kalın ($>5\mu\text{m}$) ve ince ($<5\mu\text{m}$) sinir liflerinin kalpteki yoğunluğunun kalbin dorsal ve ventral yüzeylerinde karşılaştırmalı analizi için bütüncül kalp analizi yaklaşımının yeterli olduğu görüldü. Kalbe saran vagal duyu sinir liflerinin kalınlık analizinde de arka plan sinyalini azaltacak şekilde minimum boyutta bir ayarlama gerçekleştirilip neutube programına ile işleme devam edildi.



Şekil 6.5.1.2.1.8. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalbinin 5X objektif ile çekilmiş maksimum projeksiyon görüntüsünün 8 ayrı karesinde neutube 1.0 programı ile tanımlanan sinir dalları (sol) ve bunların Matlab’da birleştirilmiş bütüncül versiyonu (sağ).



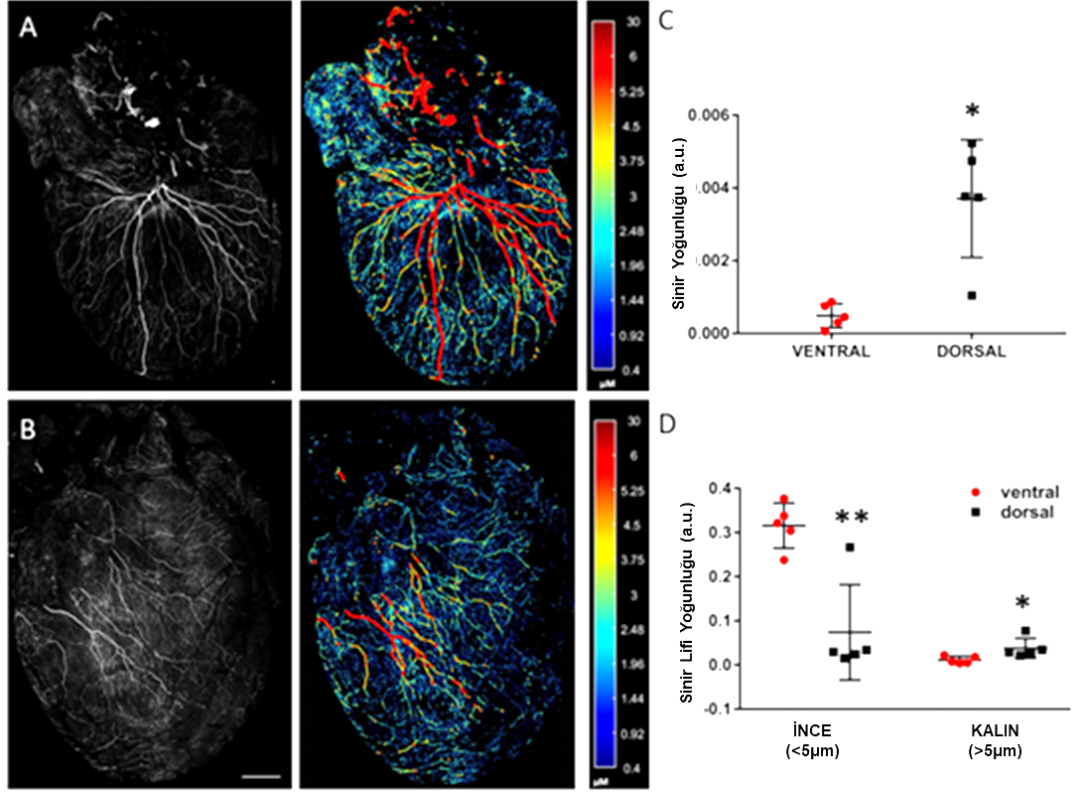
Şekil 6.5.1.2.1.9. PGP9.5 boyalı vahşi tip fare kalp sinir ağı görüntüsünün 8 kare halinde (solda) veya bütün haldeki versiyonu kullanılarak (sağda) yapılan sinir çapı analizi sonuçlarının karşılaştırmalı gösterimi.

6.5.1.2.2. Kalp vagal duyu sinir liflerinin dorsal ve ventral yüzeyde karşılaştırmalı çap analizi

Bu tez çalışmasında hedeflenen vagal duyu sinir dallanmasının kalp boyunca dağılımı, bölgelere göre yoğunluğu ve kalın ($>5\mu\text{m}$) ve ince ($<5\mu\text{m}$) sinir liflerinin detaylı karşılaştırmalı analizinde kullanılacak metodoloji optimize edildi. Bu aşamadan sonra Phox2b-Cre::tdTomato fare kalplerinde anti-RFP antikoru ile immün boyama yaparak konfokal mikroskobu ile görüntülenip tespit edilen kardiyak vagal afferent sinir liflerinin kalp boyunca morfolojik karakterizasyonu icra edildi. Kalbin dorsal yüzeyinde özellikle ventrikül epikartında yoğunlaşmış kalın sinir lifleri ($>5\mu\text{m}$) tespit edildi (**Şekil 6.5.1.2.2.1A**). Kardiyak hilum bölgesinden kalbe giren vagal duyu sinirlerinin atriyumlara yaklaştıkça daha ince ($<5\mu\text{m}$) dallara ayrılarak ve zikzak şeklinde dalgalı bir yapıya dönüşerek atriyal pektinat kaslarını ağ şeklinde sardığı gözlemlendi (**Şekil 6.5.1.2.2.1A**). Daha sonraki bölümlerde detaylı bir şekilde inceleneceği üzere vagal afferent demetlerin bir kısmı epikart üzerinde atriyumlar ile ventriküller arasında yatay bir şekilde yerleşik olan ve sağ atriyumuna doğru genişleyen koroner sinüs damarının hemen altında düğüm şeklinde bir yapı oluşturmaktadır (**Şekil 6.5.3.1**). İlginç bir bulgu olarak vagal afferentlerini görüntülediğimiz bütün Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde bu yapıyı gözlemledik (**Şekil 6.5.1.1.1**). Koroner sinüsün üzerinde yatay yönde ilerleyen vagal duyu sinir demetlerinden çıkan dalların bir kısmı atriyumlar yönünde bir kısmı ise daha aşağıya doğru ventriküller yönünde ilerlemektedir (**Şekil 6.5.1.2.2.1**).

Kalbin ventral yüzeyini saran vagal duyu sinir lifleri incelendiğinde epikardiyum boyunca ince ($<5\mu\text{m}$) sinir demetlerinin kalınlara ($>5\mu\text{m}$) göre daha yoğun olduğunu gözlemledik (**Şekil 6.5.1.2.2.1B**). İnce ve kalın vagal duyu liflerinin ventral yüzeydeki yoğunluğunun dorsaldakiler ile kıyaslanması ventral yüzeyde ince liflerin daha yüksek oranda bulunduğunu gösterdi (**Şekil 6.5.1.2.2.1C, p = 0.002**). İnce dalların aksine, kalın dalların karşılaştırmalı analizi ise dorsal yüzeyde kalın dalların ventraldekilere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yoğun yer aldığını gösterdi (**Şekil 6.5.1.2.2.1C, p = 0.038**). Bu ince ve kalın sinir liflerinin yoğunluğundaki farklılıklar dışında ventral yüzeydeki vagal afferent sinirlenmesini dorsal yüzeydekenden ayıran diğer bir gözlem kalın dalların konumudur. Kalın vagal duyu liflerinin ($>5\mu\text{m}$) sol atriyumun hemen altından sol ventriküle doğru ilerleyip

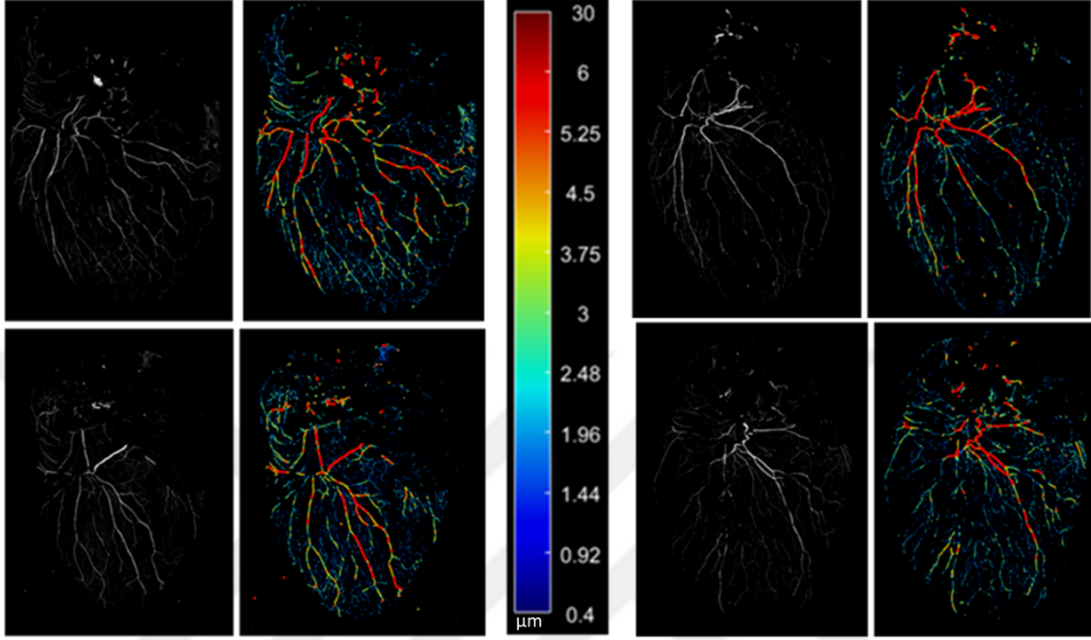
buradan daha ince ($<5\mu\text{m}$) dallara ayrılarak apeks ve sağ ventrikülü ağ şeklinde sardıkları tespit edildi (Şekil 6.5.1.2.2.1B).



Şekil 6.5.1.2.2.1. Kalbi saran anti-RFP boyalı vagal duyu sinirlerin dorsal (A) ve ventral (B) görüntüsü ve bu görüntülerdeki sinir yoğunluklarının (C) ve kalın-ince sinir miktarlarının (D) ölçümlerinin karşılaştırılması. 5X Objektif. Ölçek çubuğu: 1 mm. (Kazci Y.E. ve ark., 2022).

Kalbi saran vagal duyu sinir liflerinin kalpteki desenlerinin fareler arasında ana hatlar açısından benzerlik gösterdiği daha önce gösterilmişti (Şekil 6.5.1.1.1). Bu görsel bulgu farklı Phox2b-Cre::tdTomato fare kalplerinden alınan dorsal görüntülerin sinir-çap analizi yapılarak desteklendi (Şekil 6.5.1.2.2.2). Kalın ve ince vagal afferent liflerinin kalp boyunca benzer bir uzaysal dağılım gösterdiği ve özellikle koroner sinüs çevresindeki düğüm yapısının incelenen bütün kalplerde bulunduğu tespit edildi. Tüm bu bulgular toplu şekilde değerlendirildiğinde fare kalbini saran vagal duyu sinirlerinin

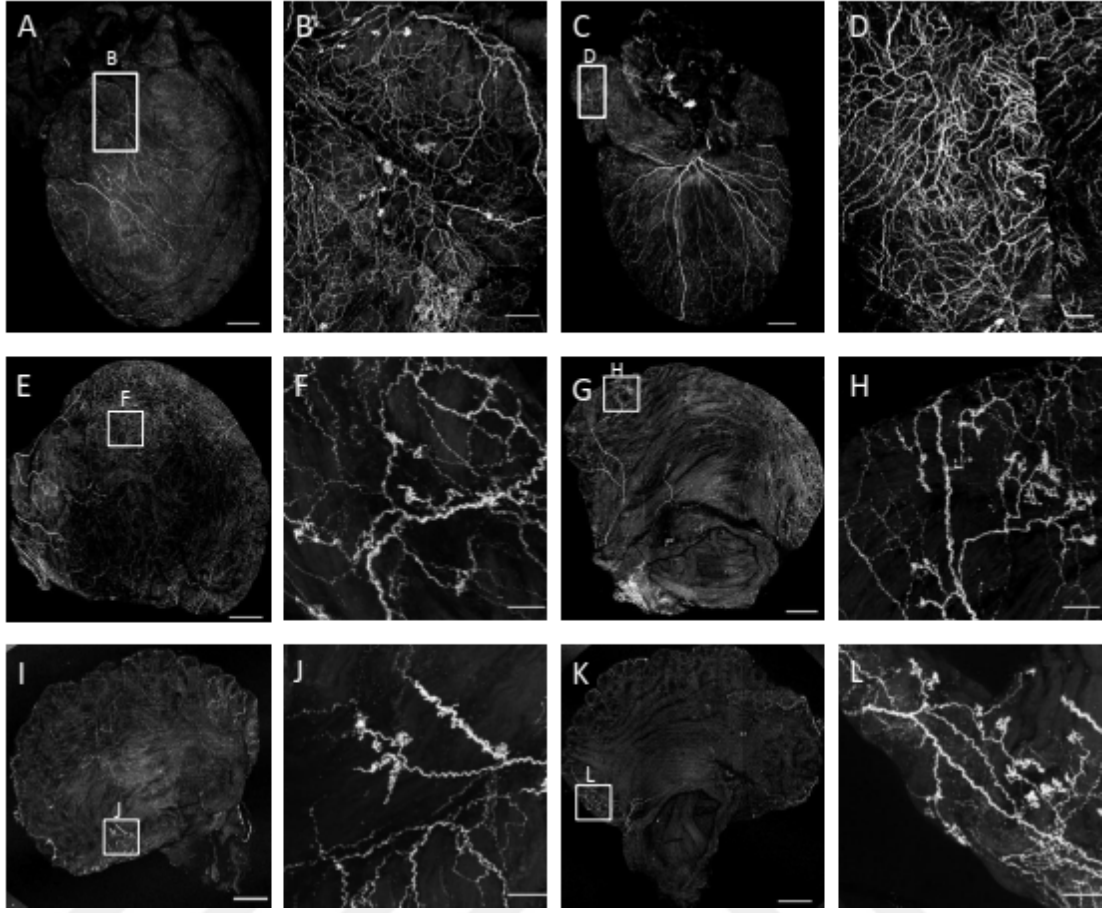
embriyonik gelişim sürecinde kalbe nüfuz eden damarlar gibi belirli bir desen gösterdikleri görülmektedir.



Şekil 6.5.1.2.2.2. Farklı Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde vagal duyu sinirlerinin kalınlık analizi sonuçları. Dorsal görüntüler. Maksimum Projeksiyon. 5X Objektif. Ölçek çubuğu: 1 mm.

6.5.2 Atriyum ve ventriküllerdeki vagal afferent sonlanma morfolojilerinin detaylı incelemesi

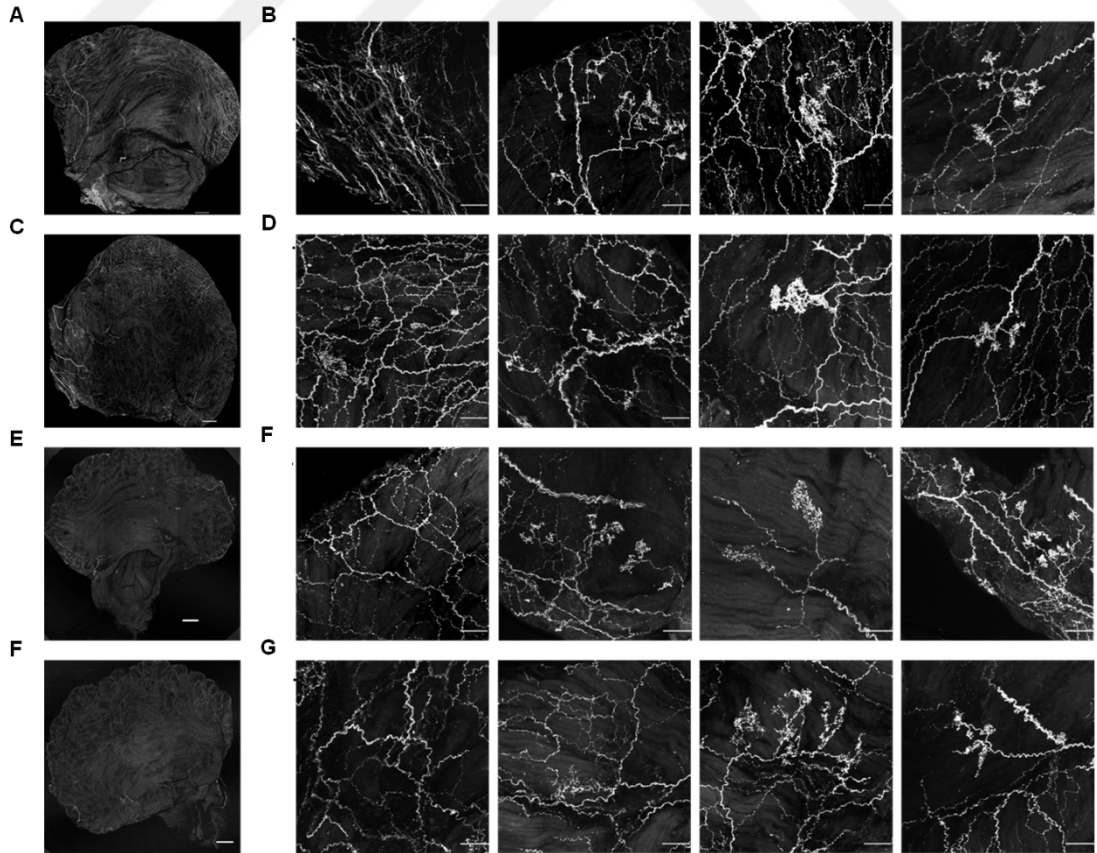
Kardiyak vagal afferentlerin bütün kalbin dorsal ve ventral yüzeylerindeki dallanmasının kapsamlı ve detaylı şekilde incelenmesi sonrası atriyum ve ventriküllerde epikart seviyesinde konumlanan ve miyokard içerisine doğru nüfuz eden sinir sonlanma tiplerinin detaylı araştırması gerçekleştirildi. Vagal afferent sinirlerin atriyal kasların yüzeyinde zikzak şeklinde dalgalı bir yapı oluşturduğu tespit edildi (**Şekil 6.5.2.1**). Yine dalgalı yapıdaki bu vagal duyu lifleri atriyum yüzeyinde çiçek benzeri sonlanmalar oluşturdu (**Şekil 6.5.2.1F-H-J-L**). Çiçek benzeri sonlanmalara ek olarak ağ benzeri vagal afferent sonlanmaları da yine atriyumlarda tespit edildi (**Şekil 6.5.2.2D-F-G**).



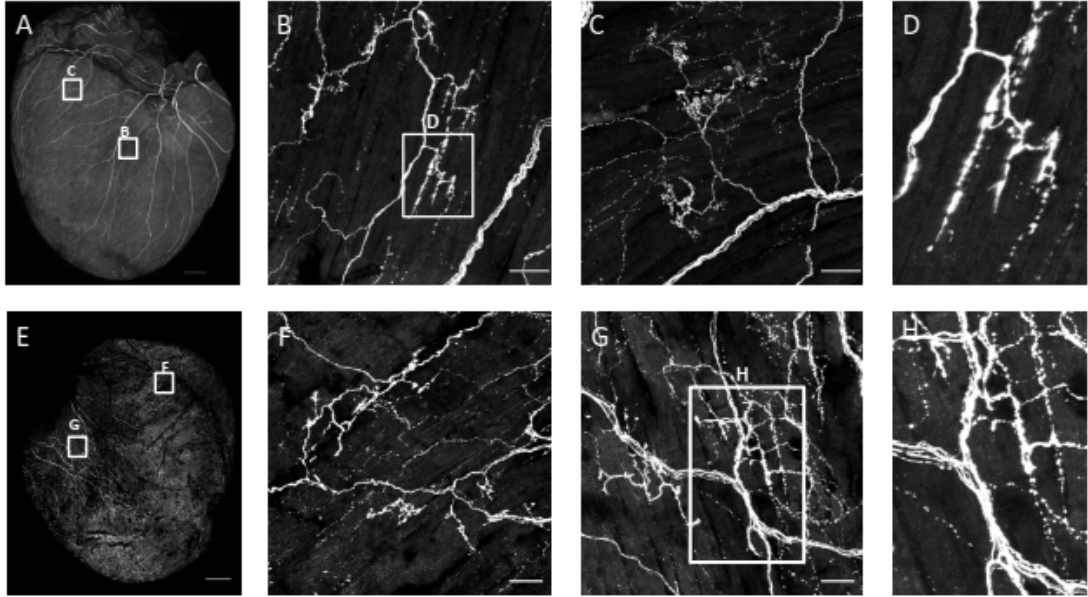
Şekil 6.5.2.1. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinde atriumlardaki vagal duyu sinir dallanmasının ve sonlanma biçimlerinin detaylı gösterimi. **A.** Bütün kalbin ventral yüzeyininin 5X objektif ile MP görüntüsü. **B.** A'daki sol atriyumdaki kareli alanın 20X objektif ile alınmış görüntüsü. **C.** Bütün kalbin dorsal yüzeyininin 5X objektif ile MP görüntüsü. **D.** C'deki sağ atriyumdaki kareli alanın 20X objektif görüntüsü. Sağ atriyumun üst yüzeyinin (**E**) ve sağ ventrikül ile temas eden alt yüzeyinin (**G**) 5X objektif görüntüleri. Sol atriyumun üst (**I**) ve alt yüzeylerinin görüntüsü (**K**). Atriumlardaki kareli alanlardaki vagal afferent sonlanmalarının 20X objektif görüntüleri (**F, H, J, L**). Ölçek: 1 mm (**A,C**), 200 μ M (**B**), 100 μ M (**D**), 500 μ M (**E,G,I,K**), 50 μ M (**F, H, J**). (Kazci Y.E. ve ark., 2022).

Atriyumların hem üst hem de ventrikül ile temas eden alt kısımlarında çiçek ve ağ benzeri sonlanmalar tespit edildi (**Şekil 6.5.2.1E-L**). Bu sonlanma tipleri bir ağacın dallarının uzantıları (aksonal arborizasyon) şeklinde gözlemlendi. İlginç şekilde atriyum saran sinir liflerinin yer yer varikoz yapıları oluşturduğu tespit edildi (**Şekil 6.5.2.2C ve E**).

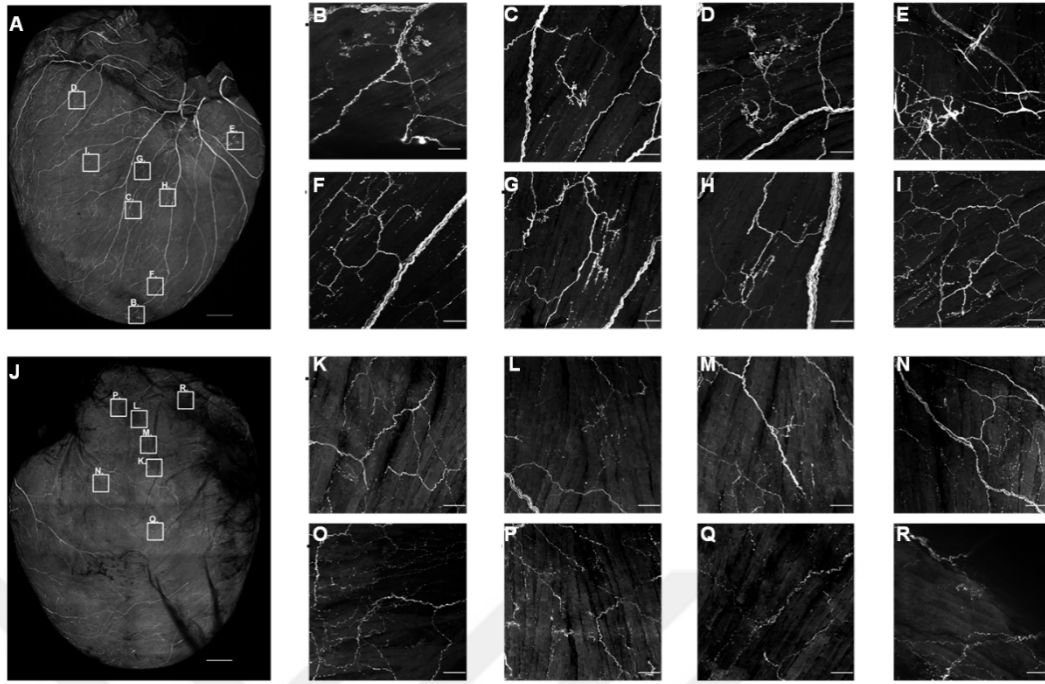
Ventrikülleri saran vagal duyu sinirleri incelendiğinde atriyumdaki gibi çiçek ve ağ benzeri sonlanmalar tespit edildi (**Şekil 6.5.2.3**). Ayrıca vagal duyu liflerinin çok sayıda varikoz yapıları oluşturduğu görüntüledi (**Şekil 6.5.2.3D-H**). Atriyumlardan farklı olarak ventrikül yüzeyinde vagal duyu sinirlerinin miyokardiyum içerisine doğru ilerleyip miyofibriller ile koşut kas içi dizi sonlanmaları oluşturduğu tespit edildi (**Şekil 6.5.2.3B-D-G-H**). Epikart boyunca birlikte ilerleyen vagal duyu sinir liflerinin hedef dokulara yaklaştıkça farklı sonlanma tiplerine ayrıştığı tespit edildi. Görüntülenebilen en ince kalınlıktaki tekli sinir demetlerinin çiçek ve kas içi benzeri sonlanmalar oluşturdukları gözlemlendi (**Şekil 6.5.2.3B ve F**). Ancak görüntülenen sinir demetinin içerisindeki tek bir aksonun iki farklı sonlanma tipi oluşturup oluşturmadığı mevcut boyama metodolojimizin kısıtlılığından dolayı belirlenemedi.



Şekil 6.5.2.2. Şekil 6.5.2.1’de gösterilen atriyumlarda vagal afferent sonlanmalarının ilave gösterimi. Ölçek: 500 μ M (A, C, E, F). 50 μ M (B, D, G, F). (Kazci Y.E. ve ark., 2022)



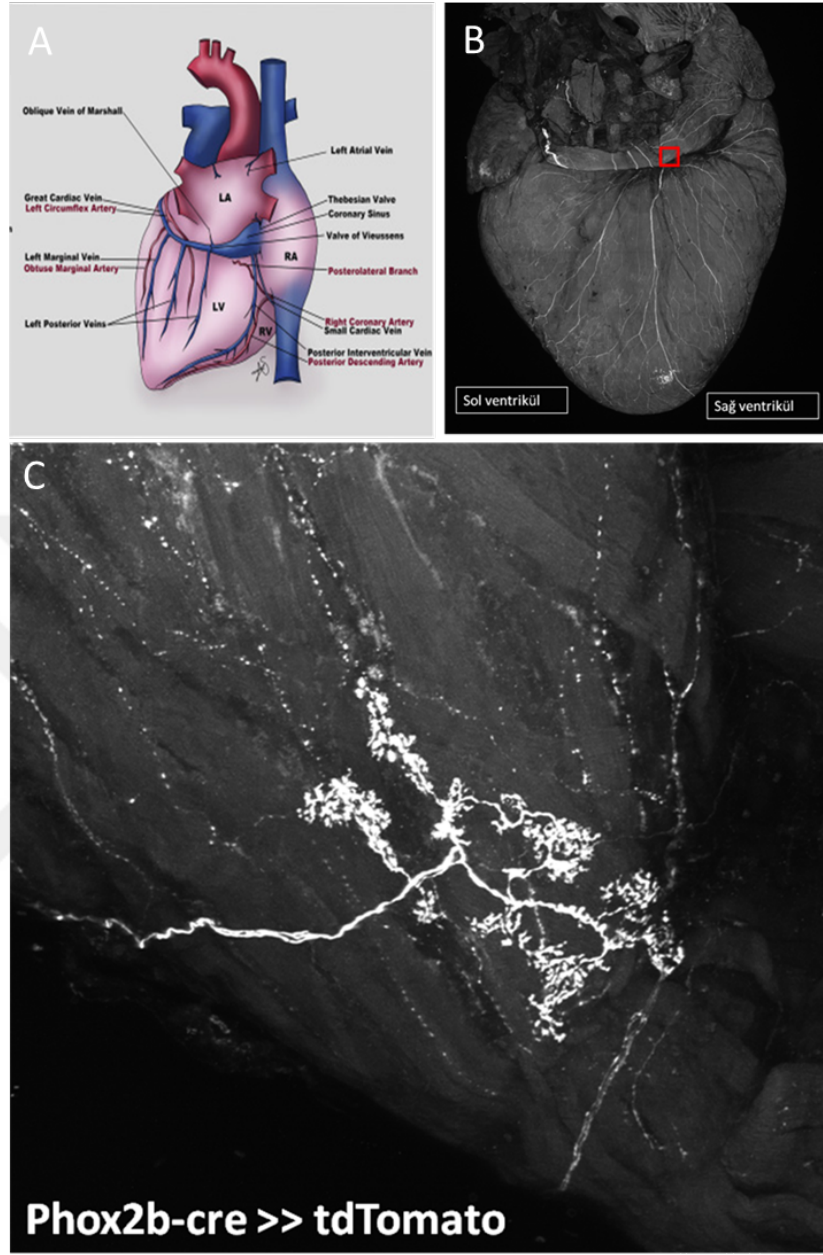
Şekil 6.5.2.3. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinde ventriküllerdeki vagal duyu sinir dallanmasının ve sonlanma biçimlerinin detaylı gösterimi. **A.** Ventriküllerin 5X objektif ile dorsal görünümü. **B-C.** A’deki kareli alanların 20X objektif ile yüksek magnifikasyon görüntüleri. **D.** B’deki kareli bölgedeki kas içi dizi sonlanmasının büyütülmüş görüntüsü. **E.** Ventriküllerin 5X objektif ile ventral görünümü. **F-G.** E’deki kareli alanların 20X objektif ile yüksek magnifikasyon görüntüleri. **H.** G’deki kareli bölgedeki kas içi dizi sonlanmasının ve varikoz sinir liflerinin büyütülmüş görüntüsü. Ölçek: 1 mm (A,E). 500 μ M (B, C, F, G). (Kazci Y.E. ve ark., 2022).



Şekil 6.5.2.4. Şekil 6.5.2.3’de gösterilen ventrikül dorsal ve ventral yüzeylerindeki vagal afferent sonlanmalarının ilave gösterimi. Ölçek: 500 μ M (A, J). 50 μ M (B-R). (Kazci Y.E. ve ark., 2022)

6.5.3. Vagal duyu sinir liflerinin kalp damarları üzerindeki dallanma deseninin incelenmesi

Yapılan bütüncül kalp boyamalarında vagal duyu sinirlerinin kalpteki damarlarda sonlandığı tespit edildi. Büyük kardiyak ven damarının sağ atriyuma doğru genişleyen ve koroner sinüs diye isimlendirilen kısmında vagal duyu sinirleri tespit ettik (Şekil 6.5.3.1A-B). Sağ atriyum yüzeyinden koroner sinus üzerinde ve damara paralel ilerleyen bu sinirlerin sol atriyum ile sol ventrikül arasında yatay ilerleyen kardiyak veni takip ettikleri tespit edildi (Şekil 6.5.3.1B). Bazı sinir lifleri ise kardiyak veni çevresinden sarıp damarın altından ventriküle doğru yayılım gösterdi (Şekil 6.5.3.1B). İlginç şekilde kardiyak venin üzerinde vagal duyu liflerinin varikoz yapılar oluşturduğunu gördük (Şekil 6.5.3.1C). Yine atriyum ve ventrikül yüzeylerinde olduğu gibi bu damarın üzerinde de çiçek benzeri sonlanmalar gözlemledik (Şekil 6.5.3.1C). İlerleyen bölümlerde sempatik sinirler ile vagal duyu sinirlerinin birlikte incelendiği görüntülerde bu çiçek benzeri sonlanmaların damar yüzeyindeki bağ doku lifleri üzerinde sonlandıkları tespit edildi (Şekil 6.6.2.3A).



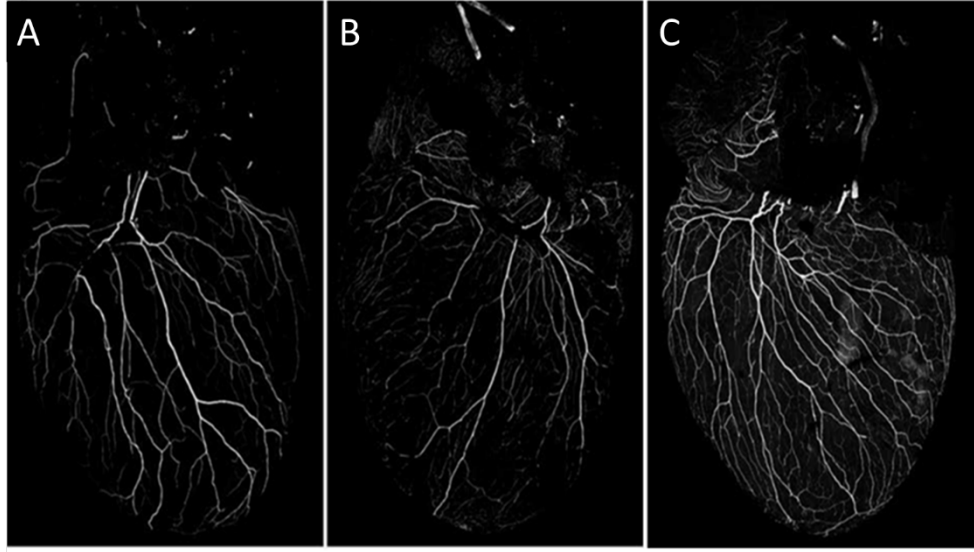
Şekil 6.5.3.1. Vagal afferentlerin koroner sinüs inervasyonu ve sonlanmaları. **A.** Kardiyak venlerin kalpteki pozisyonunu gösteren şema(91). **B.** Phox2b-Cre::tdTomato kalpte vagal duyu sinir ağının dorsay yüzeydeki 5X objektif ile MP görüntüsü. **C.** B'deki koroner sinüs üzerindeki kareli bölgenin yüksek magnifikasyonlu görüntüsü. Vagal duyu varikoz sinir lifleri ve çiçek benzeri sonlanmaların kardiyak ven üzerindeki görünümü. Ölçek: 1 mm (B). 50 μ M (C).

6.6. Phox2b-Cre::Tdtomato İfade Eden Vagal Duyu Sinirlerinin Diğer Kardiyak Sinirler ile Birlikte Kalpte İncelenmesi

Kalbi saran vagal afferentlerin kalbi sinirleyen bütün sinir dalları arasındaki yoğunluğunu tespit edebilmek için Phox2b-Cre::tdTomato kalpte TUJ-1 antikoru ile immün boyama gerçekleştirdik. Bu sayede kalbi saran vagal afferent sinir ağını Phox2b-Cre::tdTomato üzerinden anti-RFP vasıtasıyla ne ölçüde işaretleyebildiğimizi ve bu yöntemin kalbi saran bütün sinir ağında özgün bir sinir demeti popülasyonunu işaretlemeye ne ölçüde etkin olduğunu araştırdık (**Bölüm 6.6.1**). Vagal duyu sinirlerinin kalbi saran genel sinir ağı ile birlikte görünümünü inceledikten sonra kalpteki motor sinirler ile olan dallanma desenini inceledik (**Bölüm 6.6.2**). Bu amaçla kalpteki motor sinir ağının sempatik bileşenini görüntülemek için Tirozin Hidroksilaz (TH) antikoru kullandık. Anti-TH antikoru ve anti-RFP antikoları ile immün boyama icra edilen Phox2b-Cre::tdTomato fare kalplerinde noradrenerjik sinirlerin vagal duyu sinirleri ile birlikte kalp boyunca dağılımını detaylı bir şekilde gözlemlendi.

6.6.1. Bütün kalp sinir ağının TUJ1 genel nöron belirteci ile incelenmesi

Kalbi saran bütün sinirleri görüntülemek için pan-nöronal belirteç olarak kullanılan üç farklı proteine ait antikor ile deneme yapıldı. Anti-NF200, PGP9.5 ve Tuj-1 antikoları ile immün boyama yapılan vahşi tip kalpler konfokal mikroskopunda aynı lazer ve filtreleme ayarlarıyla 5X objektif ile görüntülendi ve tespit edilebilen sinir yoğunlukları karşılaştırıldı (**Şekil 6.6.1.1**). Bu karşılaştırma sonucu en kapsamlı ve detaylı sinir ağı görüntüsü Tuj-1 antikoru ile boyalı kalpte elde edildi. Bu bulgu dolayısıyla Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde vagal afferentler ile birlikte bütün sinir ağını görüntülemek için anti-RFP ile birlikte Tuj-1 ile immün boyama gerçekleştirildi.

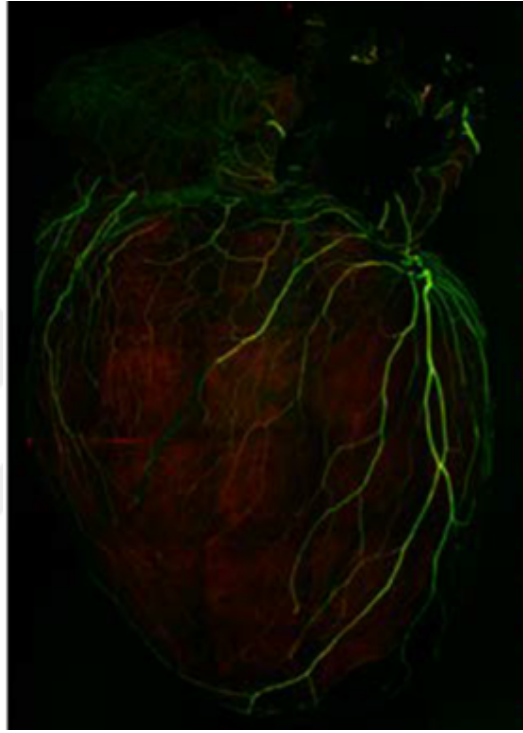


Şekil 6.6.1.1. Bütün sinirleri görüntülemek için literatürde kullanılan üç farklı pan-nöron belirteçi ile boyanmış vahşi tip kalplerin 5X objektif ile alınmış MP görüntülerinin karşılaştırmalı incelemesi. **A.** NF200 **B.** PGP9.5 **C.** TUJ-1. Ölçek: 1 mm.

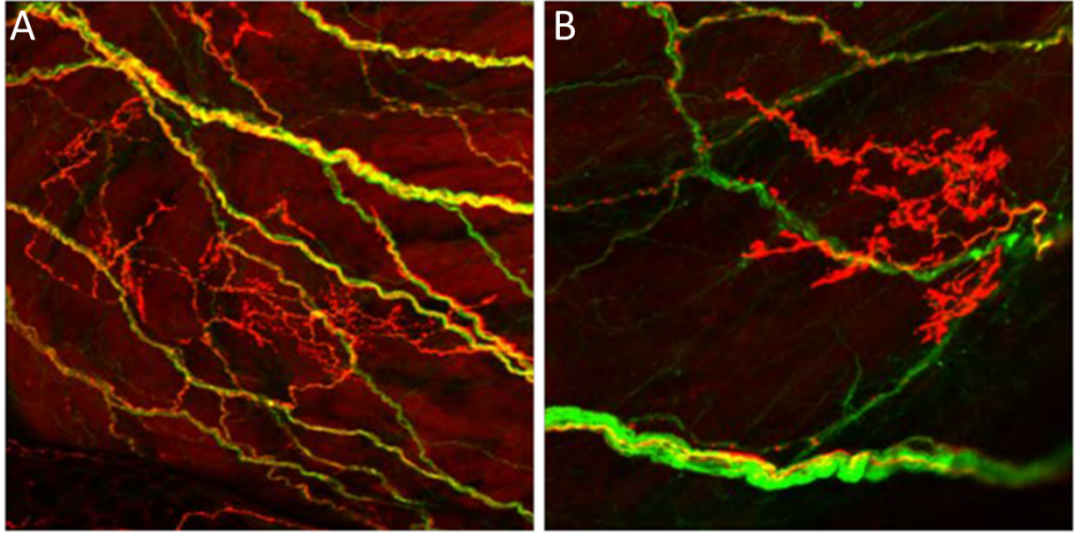
İkili boyama sonrası Phox2b-Cre::tdTomato kalbin 5X görüntülemesi gerçekleştirildi. TdTomato sinyalini arttırmak için kullanılan anti-RFP antikorunu görüntülemek 488 nm dalga boyunda uyarılabilen sekonder antikor kullanıldı. Tuj-1 antikorunu görüntülemek için ise 647 dalga boyunda sekonder antikor kullanıldı. İkili boyama sonrası 5X objektif ile kalp görüntülendi (**Şekil 6.6.1.2**). Bu görüntülemeye vagal afferentlerden gelen sinyal ile genel sinirlerden gelen sinyalin örtüştüğü görüldü. Sadece RFP ya da sadece Tuj-1 boyanmış sinir liflerini görüntüleyebilmek için daha yüksek bir magnifikasyon ile çekim yapmak gerekti. 20X objektif ile yapılan yüksek çözünürlüklü çekimlerde Tuj-1 boyalı sinirler ile vagal afferent sinirlerinin birlikte fasiküller oluşturduğu görüldü (**Şekil 6.6.1.3**). Yapılan bu yakın çekimlerde Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato ifade eden sinirlerin bütün sinir liflerinden ayrıştığı net şekilde görüntülendi (**Şekil 6.6.1.3**). Bu veriler Phox2b gen lokusundan ifade edilen Cre rekombinazın bütün nöronlarda değil fakat kalbe sinir gönderen bazı nöronlarda tdTomato ifadesini etkinleştirdiğini anti-RFP aracılığıyla göstermektedir.

İlginç şekilde Tuj-1 sinyali taşıyan vagal afferentlerin ağ benzeri (**Şekil 6.6.1.3A**) ve çiçek benzeri (**Şekil 6.6.1.3B**) sonlanmalarında bu sinyali göstermediği gözlemlendi. Ayrıca yine ilginç bir bulgu olarak vagal afferentlerin sonlanma

oluşturduğu bölgelerde sadece kardiyak doku ile değil fakat Tuj-1 ile boyanmış başka sinir fasikülleri ile de fiziksel yakınlık kurduğu gözlemlendi (**Şekil 6.6.1.3, solda**). Bu bulgular vagal afferent sinirlerin kalpte sadece hedef kardiyak dokular ile değil fakat kalbe dallanan başka sinir tipleri ile de fiziksel iletişim halinde olabileceğini göstermektedir. Vagal afferentlerin birlikte fasikül oluşturarak kalbe dallandığı bu sinirleri daha detaylı incelemek için ikinci bir immün boyama deneyi gerçekleştirildi.



Şekil 6.6.1.2. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal yüzeyinin anti-RFP boyalı vagal afferent (kırmızı) ve TUJ-1 boyalı genel sinir liflerinin (yeşil) 5X objektif ile alınmış MP görüntüsü. Ölçek: 1 mm.



Şekil 6.6.1.3. Phox2b-Cre::tdTomato fare kalbinin dorsal yüzeyinin anti-RFP boyalı vagal afferent (kırmızı) ve TUJ-1 boyalı (yeşil) genel sinir liflerinin 20X objektif ile alınmış MP görüntüleri. **A.** Bütün sinir liflerinden ayrılan vagal duyu sinir lifleri ve onların ağ benzeri sonlanmaları **B.** Vagal duyu varikoz sinir liflerinin detaylı görünümü ile birlikte çiçek benzeri vagal duyu sinir sonlanmaları. Ölçek: 50 μ M.

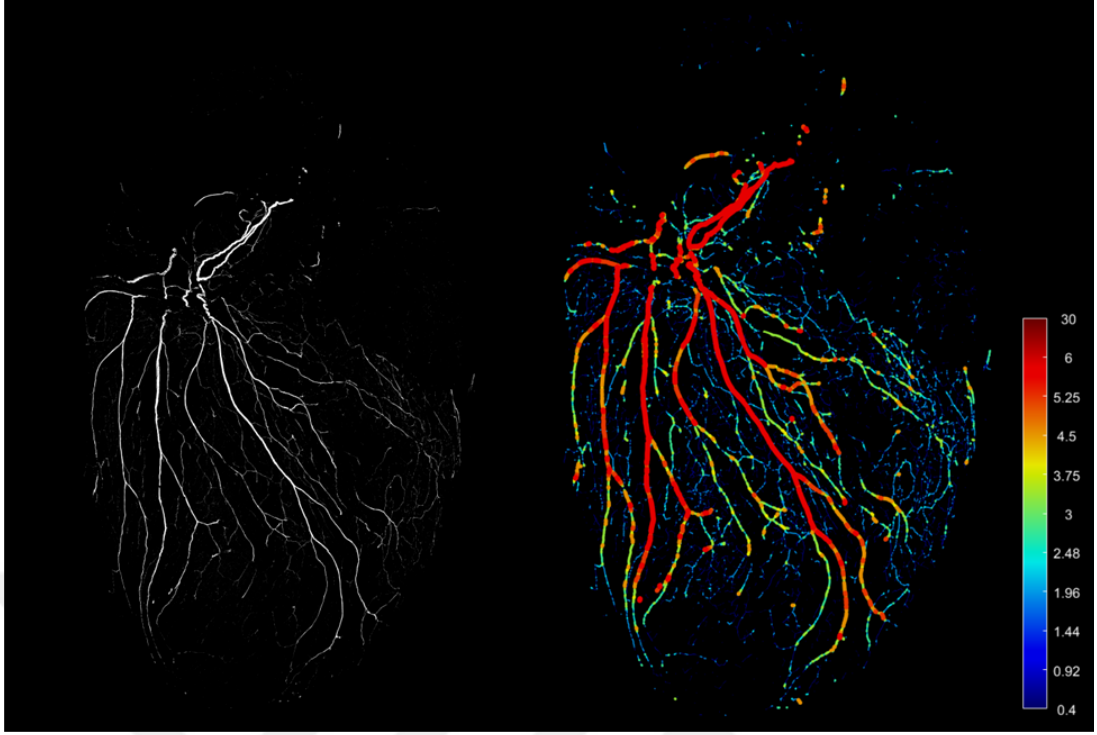
6.6.2. Vagal afferentlerin noradrenerjik sinir lifleri ile birlikte kalp boyunca incelenmesi

Kardiyak vagal afferentlerin Tuj-1 boyalı diğer sinir demetleri ile birlikte görüntülenmesi sonucu bu duyu sinirlerinin sadece kardiyak doku ile değil fakat kalbi saran başka sinir demetleri ile de fiziksel yakınlık kurduğu saptandı. Kalbi saran motor sinirlerin vagal afferentler ile fasikül oluşturan sinirler arasında olabileceği düşünüldü. İkili bir boyama yapılarak bu hipotez test edilmeden önce motor sinirlerin sempatik bileşeni olan noradrenerjik sinirlerin kalpte görüntülenmesi gerçekleştirildi (**Şekil 6.6.2.1**). Vahşi tip kalpte anti-TH antikoru kullanılarak yapılan immün boyama sonucu kalbi saran noradrenerjik sempatik sinirler görüntüldü. Ayrıca sinir lif kalınlık analiz yapıldı ve noradrenerjik sinirlerin kalbin dorsal yüzeyinde vagal afferentlere benzer bir yayılım gösterdiği tespit edildi.

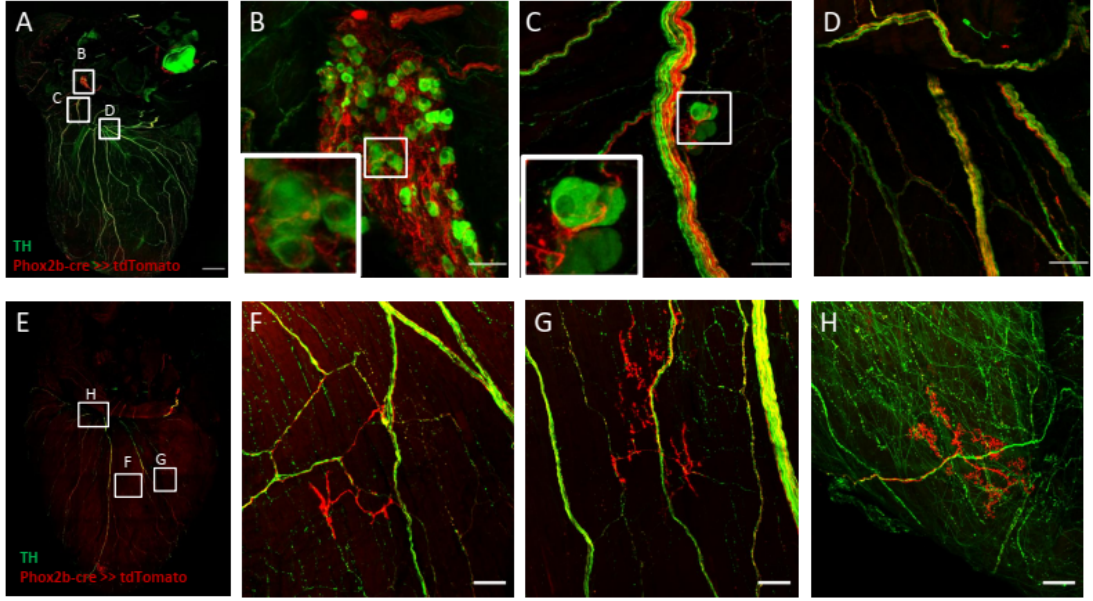
Anti-TH boyaması vahşi tip kalpte optimize edildikten sonra aynı işlem Phox2b-Cre::tdTomato kalpte gerçekleştirildi (**Şekil 6.6.2.2**). 5X objektif ile yapılan görüntülemelerde TH pozitif olan sinir liflerinin vagal afferent sinir lifleri ile birlikte demetler halinde kalbi sardığı gözlemlendi (**Şekil 6.6.2.2** ve **Şekil 6.6.2.3**). Ayrıca büyük kalp damarları çevresinde vagal duyu ve noradrenerjik liflerin birlikte hizalı

şekilde demetler halinde ilerlediği tespit edildi (**Şekil 6.6.2.3B**). Ek olarak bu kalp damarı çevresinde yüksek TH ifadesine sahip nöron hücre gövdeleri tespit edildi (**Şekil 6.6.2.2**). Bu hücre kümesi içerisinde sadece asıl nöron hücreleri (principal neurons) değil fakat ayrıca daha küçük çapta olan katekolaminerjik SIF hücreleri de tespit edildi. Bu nöron gövdeleri ve SIF hücrelerinin çevresinde yoğun bir vagal duyu sinir dallanması saptandı. Ayrıca vagal duyu sinirlerinin TH pozitif nöron gövdelerinin çevresini daire şeklinde sarıp muhtemel sinaptik bağlantılar (butonlar) oluşturduğu görüntüledi (**Şekil 6.6.2.2**). Bu TH pozitif kardiyak gangliyonların çevrelerindeki vagal dallanmalar dışında, ilginç bir bulgu olarak, koroner sinüs üzerinde noradrenerjik (TH+) motor sinirler ile birlikte ilerleyen vagal duyu liflerinin buradaki katekolaminerjik küçük hücre kümelerini sararak periselüler presinaptik bağlantılar oluşturduğu tespit edildi (**Şekil 6.6.2.2C**). Ventriküller incelendiğinde vagal duyu ve noradrenerjik sinir liflerinin iç içe geçmiş paralel fasiküller halinde kardiyak dokuda ilerlediği gözlemlendi (**Şekil 6.6.2.2D**). Ventrikül yüzeyi boyunca birlikte ilerleyen bu iki farklı sinir demetlerinden vagal duyu liflerinin daha sonra ayrılarak çiçek benzeri ve kas içi dizi benzeri sonlanmalar oluşturduğu tespit edildi (**Şekil 6.6.2.2F,G**).

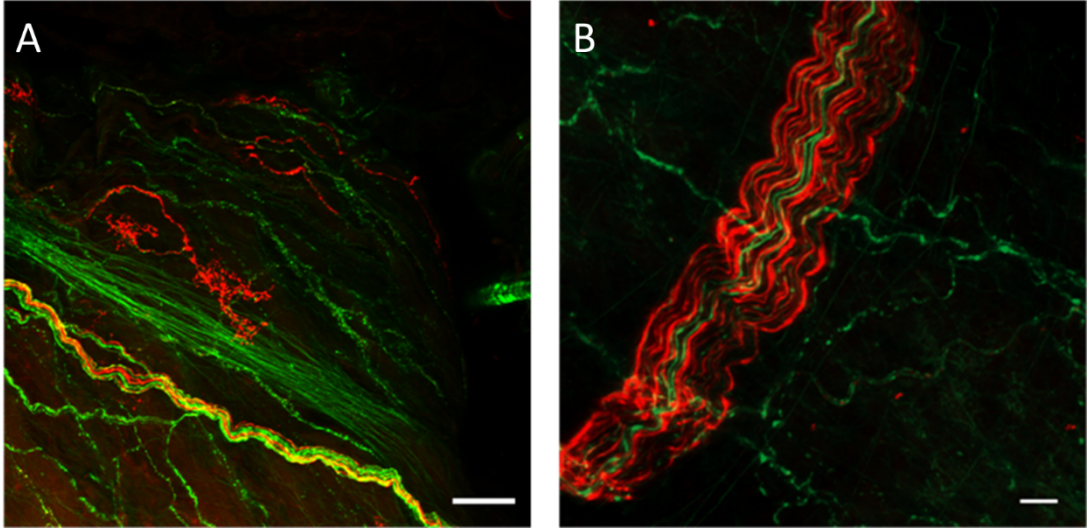
Koroner sinüs üzerinde yapılan detaylı görüntülemelerde her iki sinir tipinin hem birlikte fasiküller şeklinde ilerlediği ve vagal duyu lifleri çiçek benzeri sonlanmalar oluştururken TH pozitif sinirlerin ise damar üzerinde varikoz yapıları oluşturduğu görüntüledi (**Şekil 6.6.2.2E, H ve Şekil 6.6.2.3A**). İlginç şekilde benzer kalınlıklara sahip vagal duyu lifleri ve TH pozitif lifler her zaman birlikte demetler halinde görüntülenmedi. Ancak bölgesel olarak kendi başına ilerleyen tekli vagal duyu sinir demetleri ve yine tekli noradrenerjik demetler tespit edildi. Bu bulgular vagal afferentlerin kalpteki motor sinirler ile birlikte demetler oluşturduğunu göstermektedir. Vagal duyu sinir liflerinin ayrıca TH pozitif olan sinir lifleri ve nöron gövdeleri ile de kalpte muhtemel presinaptik bağlantı içerisinde olduğu bu veriler ile tespit edilmiştir.



Şekil 6.6.2.1. Vahşi tip fare kalbindeki noradrenerjik sinir ağının anti-TH boyaması ile dorsal yüzeydeki 5X objektif ile MP görüntüsü (**solda**). Noradrenerjik sinirlerin kalınlıklarına göre renklendirilmiş görünümü (**sağda**).



Şekil 6.6.2.2. Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyindeki anti-RFP boyalı vagal duyu sinirlerinin (kırmızı) anti-TH boyalı noradrenerjik sinir lifleri ile birlikte görüntülenmesi. **A.** 5X objektif ile alınan MP görüntüsü. **B.** A'daki kareli alandaki kan damarı çevresindeki TH⁺ nöronlar (yeşil) ve SIF hücreleri üzerindeki vagal duyu sinirlerinin peri-hüresel sonlanmalarının 20X objektif görüntüsü **C.** A'daki kareli alandaki koroner sinüste TH⁺ nöron somasını çevreleyen vagal afferentlerin 20X objektif görüntüsü. **D.** A'daki kareli alandaki vagal duyu sinirleri ve TH⁺ sinir liflerinin ventrikül üzerindeki paralel dallanmasının görünümü. **E.** Farklı bir kalpte vagal afferentler ve TH⁺ sinir liflerinin birlikte görünümü. **F.** E'deki ilgili kareli bölgedeki TH⁺ varikoz sinir lifleri ile birlikte vagal afferentlerin kas içi dizi benzeri sonlanmalarının yüksek magnifikasyonlu görüntüsü. **G.** TH⁺ varikoz sinirler ile birlikte aynı vagal afferent fasiküllerinden çıkan çiçek ve kas içi dizi benzeri sonlanmalar. **H.** Koroner sinüs üzerindeki vagal afferentlerin çiçek benzeri sonlanmasının TH⁺ varikoz sinir lifleri ile görünümü. Ölçek: 1 mm (A,E). 50 uM (B-D, F-H). (Kazci Y.E. ve ark., 2022).



Şekil 6.6.2.3. Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyinde TH+ (yeşil) ve vagal duyu sinirlerinin (kırmızı) 20X objektif ile yüksek magnifikasyon MP görüntüleri. **A.** Şekil 6.6.2.2E'deki kalbin koroner sinüs damarında T+ sinirlerin ve çiçek benzeri vagal duyu sinir sonlanması. **B.** Şekil 6.6.2.2A'daki B işaretli kareli alandaki TH+ nöronlardan gelen sinir liflerinin ve bu nöronlar ile bağlantı kuran vagal afferent sinir lifleri. Ölçek: 50 uM .(Kazci Y.E. ve ark., 2022).

6.7. Phox2b-Cre İfade Eden Periferik Sinir Demetinin Vagal Duyu Kimliğinin Optogenetik uyarım Yöntemi ile İşlevsel Doğrulaması

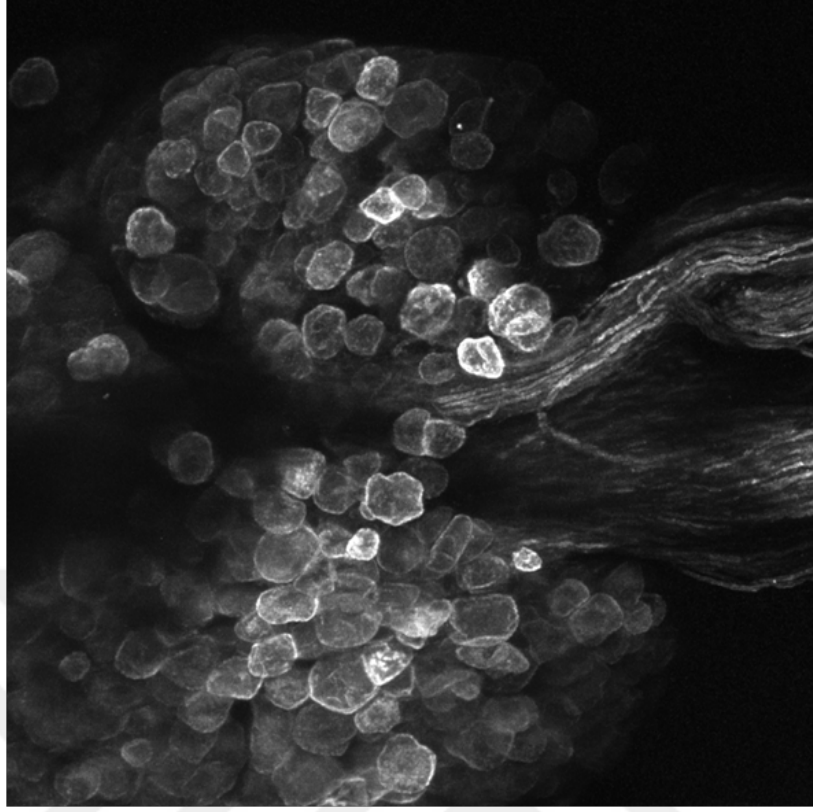
Bu tez çalışması kapsamında şu ana kadar paylaşılan bulgular Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato ifade eden transgenik hattın kalbi saran vagal afferentlerin ayrıcalıklı görüntülemesinde işlevsel olduğunu gösterdi. Phox2b gen lokusundan ifade edilen Cre rekombinazın perifer sinirlerden sadece onuncu kafatası siniri olan Nervus Vagus'un NG kaynaklı duyu sinirlerinde raporcu tdTomato protein ifadesinin etkinleştirdiği detaylı şekilde tespit edildi. Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde kapsamlı şekilde görüntülenen vagal duyu sinirlerinin nöron gövdeleri NG'de bulunmaktadır. Kalbi sinirleyen NG'deki bipolar duyu nöronlarının aksonlarının bir ucu kalpte bulunurken diğer ucunun beyin sapındaki Nucleus Traktus Solitaris (NTS) çekirdeğinde sonlandığı bilinmektedir. NTS'de sonlanan vagal duyu sinirlerinin beyin sapındaki parasempatik çekirdekler olan DMX ve Nukleus Ambiguus ile doğrudan ya da dolaylı sinaptik bağlantılar kurdukları bilinmektedir.

Şu ana kadar görüntülenen Phox2b-Cre yoluyla tdTomato ifade eden sinirlerin vagal afferentler olduğuna dair bulgular tdTomato anlatımının periferik gangliyonlar ve kalbi saran sinirlerdeki detaylı incelemesi yoluyla elde edildi. Tdtomato ifade eden

bu sınırlar eğer gerçekten vagal duyu sınırları ise, diğere bir ifade ile, eğer Phox2b kontrollü Cre rekombinaz ifadesi gerçekten vagal duyu sınırlarında gerçekleşmiş ise, NG'den çıkan bu sınırların depolarizasyonu sonucu parasempatik yanıtların kalpte oluşması gerekmektedir. Transgenik yaklaşım ile görüntülediğimiz sinir liflerinin vagal duyu kimliklerini işlevsel olarak da gösterebilmek için optogenetik uyarım tekniğini kullandık.

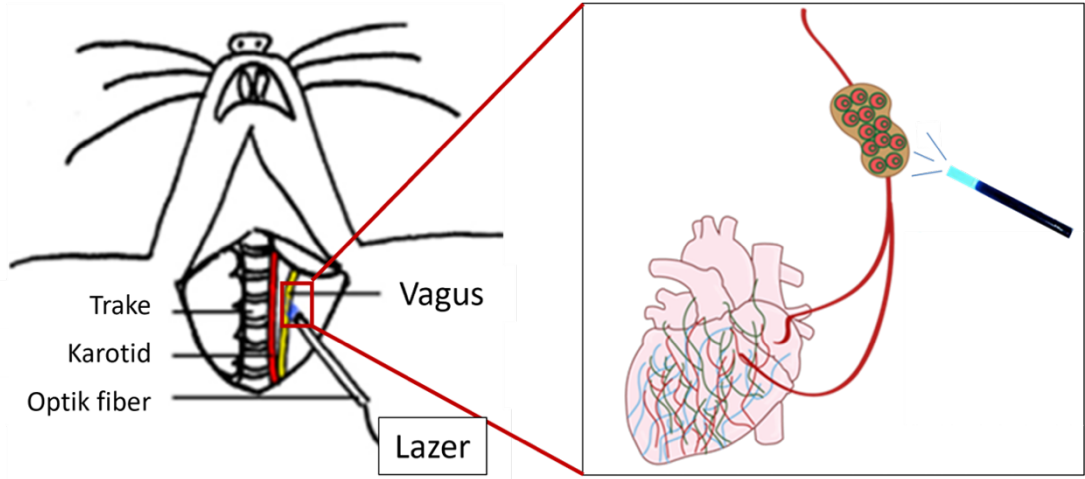
6.7.1. Phox2b-Cre ifade eden vagal sinir demetinin depolarizasyonunun kalp fonksiyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi

Phox2b-Cre ifade eden sinir demetlerinin depolarizasyonunun kalp fonksiyonu üzerindeki etkisini optogenetik uyarım tekniği ile incelemek için ikili transgenik fare yaklaşımını uyguladık. Phox2b-Cre fareleri Cre rekombinaz bağımlı kanalrodopsin 2 ve eYFP füzyon proteini (chr2-eYFP) kodlayan transgen taşıyan fareler ile çaprazladık. Elde edilen ikili transgenik farelerden (Phox2b-Cre::Chr2-eYFP) NG gangliyonlar çıkarıldı ve Chr2-eYFP füzyon iyon kanalının nöron membranındaki ifadesi konfokal mikroskobu ile görüntülendi (**Şekil 6.7.1.1**). NG nöron soması ve akson çevresindeki zar boyunca eYFP'den gelen endojen sinyal görüntülendi. Bu doğrulama sonrası Phox2b-Cre::Chr2-eYFP farelerde optogenetik uyarım işlemine geçildi.

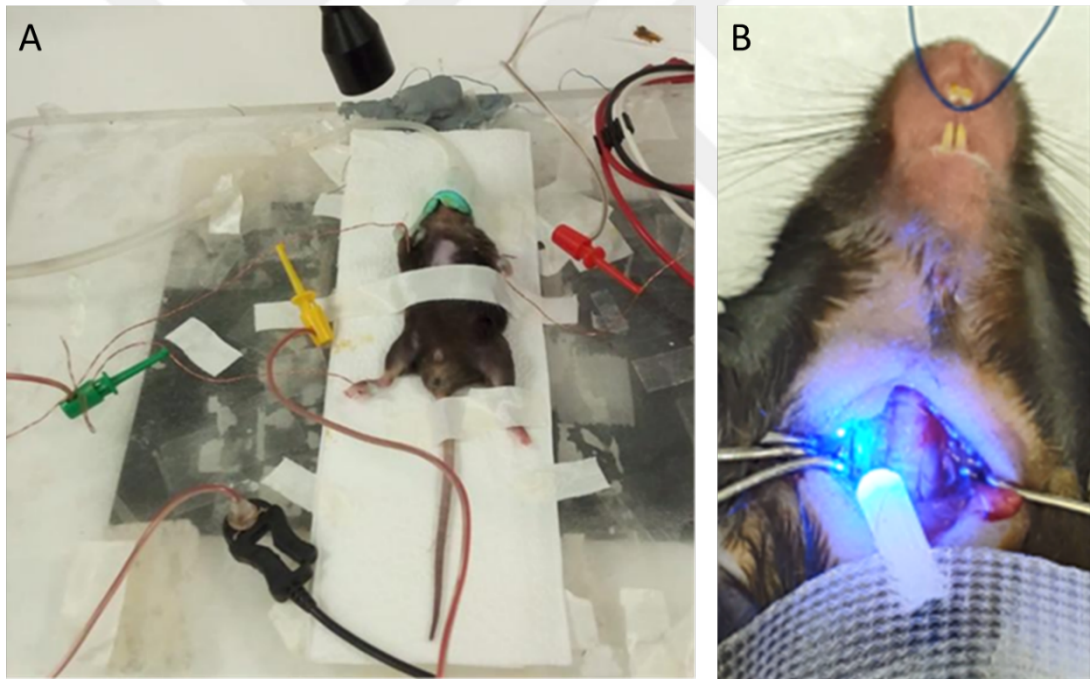


Şekil 6.7.1.1. Phox2b-Cre::chr2-eYFP farenin NG nöronlarında kanarodopsin2-eYFP birleşik iyon kanalından gelen endojen eYFP sinyalinin hücre ve akson zarlarında 20X objektif ile alınan MP görüntüsü. Ölçek: 50 µM.

Phox2b-Cre kontrolünde 465-495 nm dalga boyunda ışık ile etkinleşebilen kanalrodopsin 2 iyon kanalını ifade eden vagal duyu sinirlerinin ışık ile uyarımı için transgenik fare izofloran sistemi kullanılarak anestezi altına alındı. Daha sonra NG'den gelen ve trake yanında karotid arter ile birlikte aşağı doğru uzanan vagal demet açılarak (Şekil 6.7.1.2) 465 nm dalga boyunda lazer kaynağına bağlı optik fiber ile uyarılabilir hale getirildi (Şekil 6.7.1.3). Optogenetik uyarım ile vagal duyu vagal duyu sinir liflerinin depolarizasyonunun kalp fonksiyonu üzerine etkisini tespit edebilmek için EKG elektrotları farenin el ve ayaklarına yerleştirildi (Şekil 6.7.1.3).

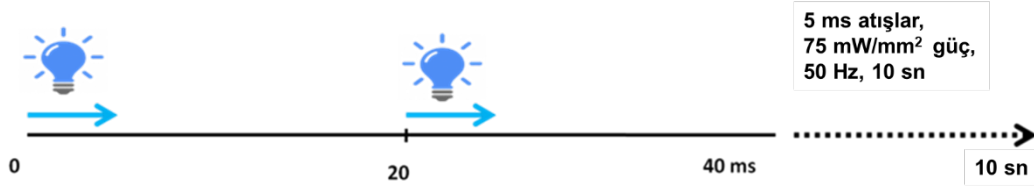


Şekil 6.7.1.2. Trake yanından vagal demetin optogenetik uyarımını gösteren şema (soldaki fare çizimi (61)'den uyarlandı).



Şekil 6.7.1.3. Optogenetik uyarım ve eşzamanlı EKG kayıt düzeneği. **A.** Sırt üstü sabitlenmiş izofloran anestezi altındaki Phox2b-Cre::Chr2-eYFP farenin iki kolu ve bir ayağına bağlı EKG elektrotlarının görünümü. **B.** Trakesi görünür kılınmış farenin sağ vagal demetinin optik fiber ile uyarımı.

Daha sonra trakenin yanında uzanan vagal demet optik fiber ile 10 saniye boyunca 75 mW/mm^2 gücünde mavi ışık ile 50 Hz frekansında ve 5 ms atışlar şeklinde uyarıldı (**Şekil 6.7.1.4**). Uyarımın kalp fonksiyonu üzerindeki etkisi alınan eş zamanlı EKG kayıtları ile ölçüldü ve özellikle atım sayısındaki değişim tespit edildi.



Şekil 6.7.1.4. Optogenetik uyarım parametrelerinin şematik gösterimi.

EKG sonuçları incelendiğinde optogenetik uyarım öncesi yaklaşık 450 BPM hızında atan fare kalbinin atım hızının 10 saniyelik uyarım başlar başlamaz yaklaşık 50 BPM'e düştüğü tespit edildi (**Şekil 6.7.1.5**). Uyarım başlar başlamaz kalp atım hızında tespit edilen bu %88'lik düşüş sonrasında uyarımın bitmesiyle kalbin tekrar uyarım öncesindeki atım hızına geldiği gözlemlendi (**Şekil 6.7.1.5**). Hem sadece Phox2b-Cre transgeni taşıyan hem de sadece Chr2-eYFP transgeni taşıyan farelerde kontrol amaçlı yapılan vagal demet optogenetik uyarım deneylerinde ise kalp atım sayılarında herhangi bir değişim tespit edilmedi. Elde edilen bu bulgular Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaz proteininin vagal duyu sinirlerinde mavi dalga boyunda ışığa duyarlı şekilde açılan kanalrodopsin 2 iyon kanalı geninin anlatımını etkinleştirdiğini göstermektedir. Vagal duyu sinirlerinin 10 saniye boyunca depolarize olması sonucu beyin sapındaki sinir devreleri uyarılıp kalp üzerinde parasempatik bir yanıt oluşturulmuştur. Bu sonuç ile Phox2b-Cre transgeninin periferik sinirlerde ve kalpte tdTomato raporcu proteinleri aracılığıyla tespit edilen vagal duyu sinirine özgü anlatımı kanalrodopsin 2 iyon kanalı aracılığıyla işlevsel olarak da tespit edilmiştir.



Şekil 6.7.1.5. Phox2b-Cre::chr2-eYFP farenin vagal demetinin optogenetik uyarımının eşzamanlı kaydedilen EKG üzerindeki etkisi. Uyarım parametreleri: 50 mWatt, 5 ms atış, 50 Hz.

6.8. Miyokardiyal İnfarktüs Sonrası Vagal Duyu Sinir Ağının Bütün Kalpte İncelenmesi

Şu ana kadar sunulan bulgular ile Phox2b-Cre::tdTomato ve anti-RFP immün boyama birleşik yaklaşımının kalpteki vagal duyu sinir ağının doğru ve detaylı bir şekilde saptanmasında başarılı olduğu gösterildi. Kalpteki vagal duyu sinirlerinin güvenilir bir şekilde görüntülemesini sağlayan böyle bir yaklaşımın elde edilmesi sadece sağlıklı kalplerdeki vagal duyu ağını değil aynı zamanda kardiyovasküler rahatsızlıklar sonucu kalpteki vagal afferent sinirleşmesinde meydana gelen muhtemel değişimleri görüntülemeye de işlevsel olacağı düşünüldü. Kalbi saran sempatik sinirlerin, MI sonrası yapısal olarak yeniden şekillenmeye uğradığı bilinmektedir (92). MI sonrası benzer bir yeniden şekillenmenin kardiyak vagal duyu sinirlerinde gerçekleşme durumu henüz bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında geliştirilen ve optimize edilen görüntüleme yaklaşımı kullanılarak MI sonrası kalbin vagal duyu sinir ağının detaylı incelemesi gerçekleştirildi.

6.8.1. Kalpteki vagal duyu sinirlerinin MI sonrası yeniden şekillenmesinin detaylı incelemesi

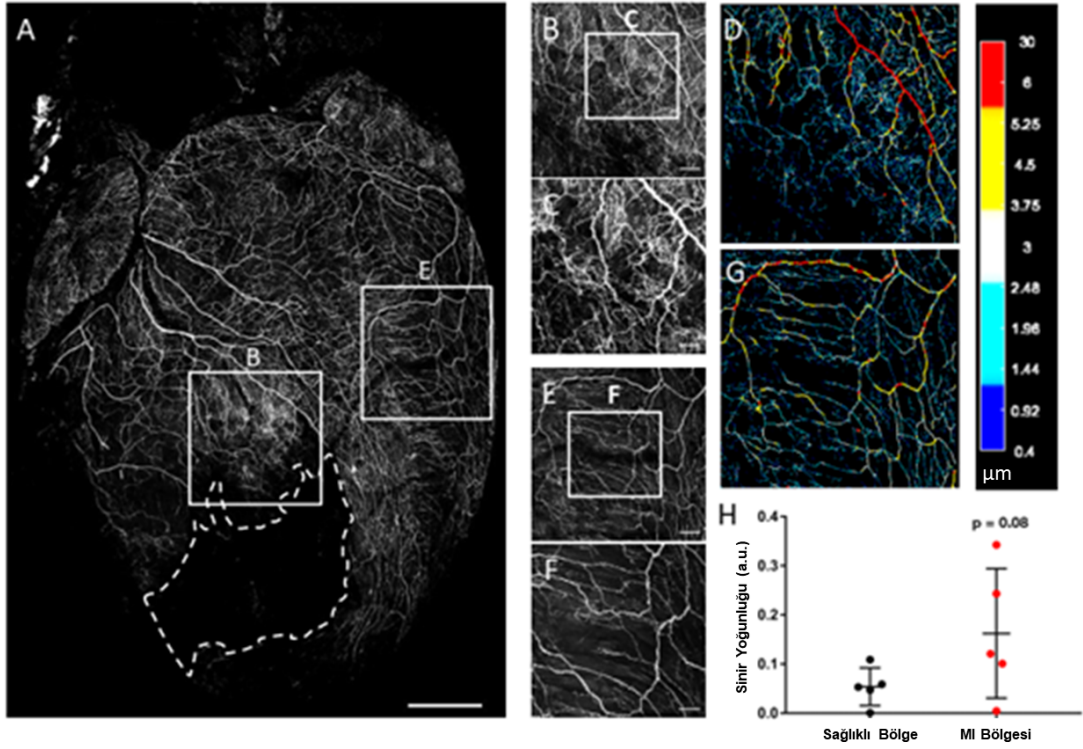
MI sonrası vagal afferentlerin kalpteki durumunu incelemek için Phox2b-Cre::tdTomato farelerde MI modeli oluşturuldu. Bu amaçla sol ventrikülü besleyen

anterior arter kalıcı olarak bağlandı (LAD ligasyonu). Bağlanma sonrası sol ventrikülden apekse doğru kalbin kas dokusunda kan akışının bloklendiğini gösteren bir beyazlama görüldü. Ayrıca hemen işlem sonrası alınan EKG kaydında MI belirteçlerinden olan ST segmentinde deviasyon tespit edildi (**Şekil 6.8.1.1**).

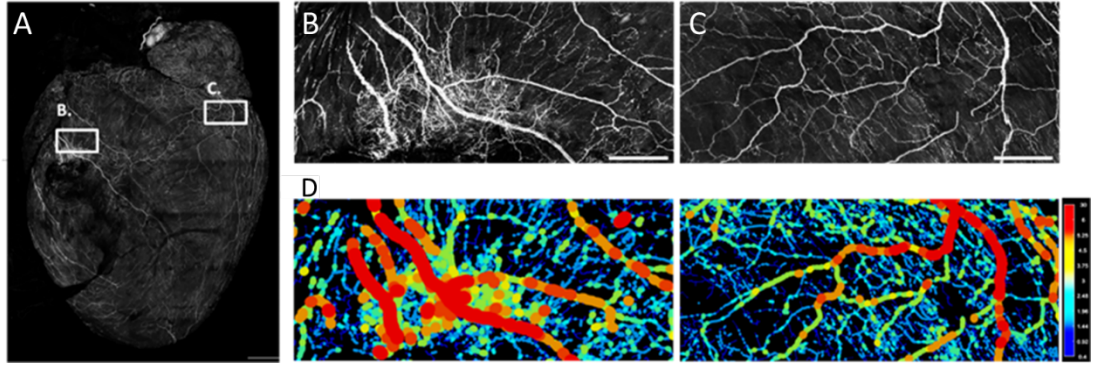
Kalıcı damar tıkanıklığı ile MI indüklendikten 21 gün sonra Phox2b-Cre::tdTomato fare kalplerinin anti-RFP ile immün boyaması gerçekleştirildi. MI geçirmiş kalplerin 5X objektif ile yapılan görüntülemesinde sol ventrikülden apekse doğru uzanan bölgede kas dokusunda hasar saptandı (**Şekil 6.8.1.2A ve Şekil 6.8.1.3A**). MI hasar bölgesinde vagal duyu sinir kaybı tespit edildi. Denervasyon diye ifade edilen bu kaybın hasar bölgesini kalbin diğer bölgelerden ayıracak yoğunlukta olduğu gözlemlendi. MI hasar bölgesinin çevresinde ise sinirlenme yoğunluğunda bir artış gözlemlendi (**Şekil 6.8.1.2A ve Şekil 6.8.1.3A**). Sinir yoğunluğunda artış tespit edilen bölgelerin ve MI hasar bölgesine uzak ve sağ ventriküle yakın olan bölgelerin 5X objektif ile yüksek çözünürlüklü çekimi yapıldı (**Şekil 6.8.1.2B,E**). Bu görsellerin karşılaştırmalı gözlemi sonucu hasar bölgesinde artan sinir yoğunluğunun hasarın hemen çevresindeki sinir uçlarında meydana gelen arborizasyon (filizlenme) şeklinde küçük yeni dallanmalar olduğu tespit edildi. MI hasar ve sağlıklı bölgelerin 20X objektif ile büyütülmüş görüntülemesi ile yeni oluşan görece diğer sinirlerden daha parlak vagal duyu sinir dalları net bir şekilde gözlemlendi (**Şekil 6.8.1.2C,F ve Şekil 6.8.1.3B-C**). Daha önce optimize ettiğimiz sinir çapı analizi sonucu sağlıklı bölgelere kıyasla hasarlı bölgelerin çevresindeki sinir artışının özellikle 2.5 µm'den küçük olan sinir liflerinden kaynaklandığını tespit ettik (**Şekil 6.8.1.2D,G ve Şekil 6.8.1.2D**).

MI hasar bölgesinde gözlemediğimiz vagal duyu sinir liflerindeki artışın ne ölçüde anlamlı olduğunu test etmek için MI geçirmiş 5 farklı Phox2b-Cre::tdTomato kalbini inceledik. Her bir kalpte MI hasar bölgesi çevresinden bir alan ve sağ ventriküle yakın sağlıklı bölgeden bir alan belirledik. Daha sonra tüm kalplerde her iki bölgedeki bütün sinirlerin yoğunluğunu piksel miktarı üzerinden hesapladık. Hesaplama sonucu 5 farklı kalpte de MI çevresindeki sinir yoğunluğunun sağlıklı bölgeye kıyasla daha yüksek olduğu tespit edildi (**Şekil 6.8.1.2H, p = 0.08**). Her ne kadar tespit edilen farklılık yaygın kullanılan p = 0.05 değerinden büyük çıkmış olsa da incelenen bütün MI kalplerde hasar çevresinde görülen vagal duyu sinir artış eğilimi daha geniş örnek tabanlı bir deney ile bu bulgunun desteklenebileceğini

göstermektedir. Bütün bu sonuçlar sadece kalbi saran sempatik sinirlerin değil fakat kardiyak vagal duyu sinirlerinin de MI sonrası yeniden şekillenmeye uğradığını göstermektedir.



Şekil 6.8.1.2. Miyokardiyal İnfarktüs (MI) sonrası vagal duyu sinir ağındaki yeniden şekillenmenin detaylı karakterizasyonu. **A.** MI sonrası vagal duyu sinir ağının Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyinde detaylı görünümü. Kesikli çizgi MI hasar bölgesini göstermektedir. **B.** A'daki kare içindeki peri-infarct alanın yüksek magnifikasyon görünümü. **C.** B'dek peri-infarct bölgede yeni oluşmuş akson filizlerinin yüksek magnifikasyon görünümü. **D.** B'de gösterilen peri-infarct alandaki vagal sinir liflerinin kalınlıklarına göre renklendirilmiş görünümü. **E.** A'daki sağ ventriküle yakın kare içine alınmış sağlıklı alandaki vagal afferent ağının büyütülmüş gösterimi. **F.** E'deki karenin yüksek magnifikasyon görüntüsü **G.** E'deki sağlıklı bölgedeki vagal afferent sinir ağının kalınlıklara göre renklendirilmiş görünümü. **H.** İnfarkt alanı (D) ve sağlıklı bölgedeki (G) total vagal duyu sinir yoğunluğunun karşılaştırmalı analizi. $n = 5$, $p = 0.08$. Ölçek: 1 mm (A). 200 μM (B,E). 50 μM (C,F). (Kazci Y.E. ve ark., 2022).



Şekil 6.8.1.3. Başka bir kalpte Miyokardiyal İnfarktüs (MI) sonrası vagal duyu sinir ağındaki yeniden şekillenmenin detaylı karakterizasyonu. **A.** MI sonrası vagal duyu sinir ağının Phox2b-Cre::tdTomato kalbin dorsal yüzeyinde detaylı görünümü. **B.** A'daki kare içindeki peri-İnfarkt alanın yüksek magnifikasyon görünümü. **C.** A'daki sağ ventriküle yakın kare içine alınmış sağlıklı alandaki vagal afferent ağının büyütülmüş gösterimi. **D.** Peri-İnfarkt alanı (B) ve sağlıklı bölgedeki (C) vagal duyu sinirlerinin kalınlıklarına göre renklendirilmiş karşılaştırmalı gösterimi. Ölçek: 1 mm (A). 200 μ M (B,C). (Kazci Y.E. ve ark., 2022).

Bütün bulgular değerlendirildiğinde kalbi saran vagal afferent sinir ağının kapsamlı ve detaylı görüntüsü kullanılan Phox2b-Cre::tdTomato transgenik yaklaşımı ve ileri mikroskopik görüntüleme teknikleri kullanılarak yüksek çözünürlüklü şekilde elde edildi. Kardiyak vagal afferent aksonlarının kalbin atriyum, ventrikül ve damarlarındaki farklı sonlanma biçimleri tespit edildi. Ayrıca optogenetik yöntemler kullanılarak Phox2b-Cre transgeninin vagus sinirinin NG kaynaklı duyu sinir liflerinde özgün şekilde ifade edildiği ve bu sinirlerin uyarımının kalpte parasempatik yanıtların oluşmasını sağladığı gösterildi. Son olarak Phox2b-Cre::tdTomato transgenik fare kalplerinde gerçekleştirilen kronik MI sonrası sol ventrikül-apeks bölgesinde oluşan hasar dokusunun çevresinde vagal afferent aksonlarının yeniden şekillenmeye uğradıkları ve hasar dokusuna doğru akson filizleri (sprout) uzattıkları tespit edildi. Bu bulgular kalbin vagal duyu sinir dallanmasının yapısının ve işlevinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

7. TARTIŞMA

Kardiyak fonksiyon otonom sinir sisteminin sıkı kontrolü altındadır (2). Bu otonomik kontrol duyusal girdinin afferent sinirler yoluyla merkezi sinir sistemine sürekli iletimi ile sağlanmaktadır. İskemi veya müteakip fibrozis nedeniyle kalp kası hasarı durumunda hem kardiyak afferent hem de efferent innervasyon dramatik şekilde değişebilmektedir(4,93). Kardiyak hasarı takiben sinirlerin yapısında meydana gelen değişim ve yeniden şekillenme, kardiyak fonksiyonel bozulmalara ve kardiyak aritmilere yol açan otonomik dengesizliklerin oluşumuna katkıda bulunur(2). Otonomik dengesizlik, sempatik aşırı aktiviteler ve/veya kardiyovasküler sinir düzenlenmesinde vagal tonus azalması şeklinde ortaya çıkabilir (1,4). Tedavi seçeneği olarak klinikte vagal stimülasyon tedavileri veya ablasyonlar yapılabilmektedir (1,4,94). Bununla birlikte, bu tedavilerin tasarımı ve uygulama sonucu oluşturdukları etkilerin klinik değerlendirilmesi, kalp nöroanatomi ile ilgili olan bilginin eksikliğinden dolayı optimal seviyede yapılamamaktadır. Özellikle kalbi saran sinir ağının yani kalp inervasyonunun bütüncül ve kapsamlı bir görsel haritası henüz literatürde bulunmamaktadır. Kalp sinirlenmesinin motor bileşenleri ve bunların bütün kalpte oluşturdukları sinirlenme desenleri belli oranda aydınlatılmış olmak ile birlikte kalbi saran duyu sinirleri henüz kapsamlı bir şekilde görüntülenememiştir.

Kardiyovasküler hastalıkların kalpteki sinir ağının yapısı ve işlevi üzerindeki bilginin ise çok daha sınırlıdır. Vagal ve spinal duyu sinirlerinin kalpteki dallanma desenleri ve yine bu duyu sinirlerinin kardiyak hastalıklar sonrasında geçirdiği muhtemel değişim ve yeniden şekillenmeler tam olarak araştırılmamıştır. Özellikle, sinirsel yeniden yapılanma geçiren motor ve duyu sinirlerinin tanımı ve kardiyak iskemiye takiben kalp atım bozukluklarının oluşumuna olan katkıları bilinmemektedir. Kardiyak motor sinirlerin miyokardiyal iskemi vb. koşullar sonucu geçirdikleri morfolojik değişimleri araştıran çalışmalar henüz yeni ve oldukça sınırlıdır (9).

Kalbin motor sinir ağını görüntüleyen fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda görüntüleyen çalışmaların duyu sinirlerine göre fazla olmasının sebebi hem sempatik hem de parasempatik sinirleri görüntülemek için elverişli belirteç proteinlerin tanımı olmasıdır. Sempatik sinirlerin nöron gövdelerini ve aksonlarını görüntülemek için TH immünreaktivitesi ve parasempatik sinirleri görüntülemek için de Chat immünreaktivitesi kullanılabilir. Bu sayede kalbi saran noradrenerjik ve

kolinerjik efferen sinirlerin bütün kalpte detaylı görüntülenmesi daha önce yapılan çalışmalarda gerçekleştirilebilmiştir (5–7,9,10,68,95). Motor sinir belirteçleri ile kıyasladığımız zaman bütün duyu sinirlerini akson boyunca işaretleyebilecek ve bütün organ boyunca duyu sinir dallanmasını görüntülemeye imkan verecek vasıfta bir duyu akson belirteci bulunmamaktadır. Bu yüzden kalbin duyu sinir ağının araştırılan az sayıda çalışmada yapılan görüntülemelerde bütün duyu sinirlerini değil bazı alt popülasyonları işaretleyen CGRP ve SP gibi bazı peptiderjik belirteçler kullanılmıştır (7,10). Ayrıca ilgili çalışmalarda bütün kalp boyunca duyu sinir ağının yayılımı görüntülenmemiş fakat kalbin bazı bölgelerindeki duyu sinir ağına odaklanılmıştır.

Kalpdeki duyu sinir ağının sağlıklı fizyolojik koşullarda bütüncül bir haritasının henüz elde edilmemiş olması hem kalp fonksiyonunu kontrol eden otonom sinir sisteminin işleyişine dair bilgilerin kısıtlı kalmasına yol açmış hem de kardiyovasküler hastalıkların oluşumu ve gelişiminde duyu sinir liflerinin katkısının araştırılmasını engellemiştir. Kalbi saran ekstrakardiyak yani nöron gövdesi kalp yüzeyinde bulunmayan duyu sinirleri anatomik kökenlerine göre vagal ve spinal diye iki ayrı kola ayrılmaktadır. NG kökenli vagal ve AKG kökenli spinal duyu sinirlerinin kalpteki uçlarının uyarım frekansında meydana gelen değişimlerin miyokardiyal iskemi sonrası görülen kalp aritmileri ile ilişkili olabileceği elektrofizyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir (72). Ayrıca kalp yüzeyindeki vagal afferentlerin kimyasal uyarımının otonomik refleks devrelerini etkinleştirdiği yine elektrofizyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (96,97). Ancak görece uzun zaman önce yapılan bu çalışmalardan günümüze kalp sinir sistemine ilişkin literatür incelendiğinde, özellikle parasempatik refleks oluşumunda işlevselliği bilinen vagal afferentlerin sinir deseninin sağlıklı ve hastalıklı kalplerde bütüncül ve detaylı şekilde araştırılmaması kalp rahatsızlıklarının dünyadaki yaygınlığı düşünüldüğünde çok önemli bir eksikliklerdir.

Vagal afferentlerin kalp dışındaki diğer fizyolojik sistemlerde görev alan organlardaki inervasyonu incelendiğinde kemosenitif ve mekanosenitif işlevler icra eden farklı sonlanma tipleri keşfedilmiştir(63,98). Bu sonlanmalar morfolojilerine göre çiçek benzeri, intragangliyonik laminar, ağ benzeri ve kas içi dizi benzeri sonlanmalar şeklinde sınıflandırılmıştır (63). Bu sonlanma tiplerinin bir kısmı organ hacminde meydana gelen değişimleri sonlandıkları organın kas yapısındaki anlık deformasyonu algılayarak merkezi sinir sistemine iletmektedir. Bu

mekanosensitif reseptör görevi gören sonlanma yapıları dışında diğer sonlanma tipleri de kemosenitif işlevler gerçekleştirmektedir. Sonlandıkları organın kimyasal ortamındaki inflamasyona özgü molekülleri, ATP vb. moleküller üzerinden nekroz'a bağlı olarak ağrı duyusunu iletmektedir. Ayrıca yine bazı vagal afferent sonlanmalar ise Piezo 1/2 vb iyon kanalları üzerinden kan basıncındaki değişimleri algılamaktadır. Kalbe geldiğinde ise vagal afferentlerin kalp dokusunun farklı katmanlarındaki sonlanma tipleri bütün kalp boyunca henüz tespit edilmemiştir. Bunun başlıca sebebi yine bütün vagal afferent sinirlerini organ boyunca sonlanmaları da kapsayacak şekilde görüntülemeyi sağlayacak belirteç proteinlerin eksikliğidir.

Bu önemli kısıtlamanın üstesinden gelmek için bu tez çalışmasında transgenik fare ve immün boyama temelli ileri görüntüleme yöntemlerini kullanarak bileşik bir strateji geliştirdik. Phox2b-Cre::tdTomato transgenik fareler kullanarak sadece NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinin bütün kalpte kapsamlı ve yüksek çözünürlüklü görüntülenmesini gerçekleştirdik ve vagal duyu sinirlerini kalbin farklı yüzeylerinde ve bölgelerinde kalınlıklarına göre sınıflandırıp bölgesel dağılımlarını analiz ettik.

Phox2b-Cre::tdTomato ikili transgenik yaklaşımının kalpteki vagal afferentleri tdTomato floresan raporcu proteinleri ile ayırt edici ve spesifik şekilde işaretlediği gösterildikten sonra aynı metodoloji kullanılarak MI sonrası vagal duyu sinir ağının yapısal yeniden şekillenmesi bütün kalpte incelendi ve değişimlerin niceliksel analizi gerçekleştirildi. Son olarak kalpte görüntülenen Phox2b-Cre::tdTomato ifade eden sinirlerin vagal afferent kimliğe sahip oldukları optogenetik yöntem kullanılarak fonksiyonel açıdan da doğrulandı.

Phox2b gen ifadesinin NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinin görüntülenmesinde araçsallaştırılabileceğine dair yakın zamanda yapılan tek hücre RNA dizileme çalışmaları önemli kanıtlar sunmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi yetişkin fare JG ve NG nöronlarının transkriptom profillerini araştıran bir çalışmada gen anlatım profillerine göre sınıflandırılan 18 NG nöron alt popülasyonunun hepsinde Phox2b geninin ifade edildiği ancak JG nöron alt popülasyonlarının hiç birinde ifade edilmediği tespit edildi (23) (Şekil 4.2.2.1.2). Yine yetişkin fare sinir sisteminin bütün nöronlarının transkriptom profillerinin tek hücre RNA dizilemesi yöntemiyle araştırıldığı yakın zamanlı başka bir çalışmada AKG nöronları toplamda 17 farklı alt popülasyona ayrıştırıldı (99). Bu AKG popülasyonları incelendiğinde, hiç

birinin Phox2b genini ifade etmediği tespit edildi (Şekil 4.2.2.1.3). Bu sonuçlar bütüncül olarak değerlendirildiğinde Phox2b gen ifadesinin kalbi inerve eden NG kaynaklı vagal duyu sinirlerini yine kalbi inerve eden AKG kaynaklı spinal duyu sinirleri ve JG kaynaklı vagal duyu sinirlerinden ayırıştırarak kalp boyunca görüntüleme de kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaç ile bu tez çalışması boyunca Phox2b gen ifadesine bağlı bir Cre-LoxP transgenik yaklaşımı işletilerek tdTomato floresan proteininin kalbe dallanan bütün periferik gangliyonlardaki ifadesi incelenmiştir.

Phox2b geninin nöral krest kökenli motor nöron öncülerinde geçici bir süre için transkripsiyonel olarak aktif olduğu belirtilmiş olmasına rağmen (11), önceki yayınlar ile tutarlı olarak (30,31,100), NG dışında incelenen periferik gangliyonların hiçbirinde Phox2b-Cre kontrolünde tdTomato anlatımı saptanmadı. Bu bulgu, farklı Phox2b-Cre transgenik hatları kullanan önceki çalışmalar ile birlikte değerlendirildiğinde, periferik sinirler arasında gözlenen Phox2b-Cre::tdTomato'yu ifade eden sinir liflerinin vagal afferentleri temsil ettiğini doğrulamaktadır.

Literatürde daha önceki yayınlanmış bir çalışmaya dayanarak (20), kalbin motor inervasyonunu sağlayan periferik gangliyonlarda, Phox2b-Cre tarafından yönetilen tdTomato anlatımının gerçekleşmesi beklenebilir, çünkü Phox2b geni sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin gelişiminde kritik role sahip bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Ancak, bu çalışmada kalbi inerve eden başta sempatik gangliyonlar olan SG nöron somalarında herhangi bir Phox2b-Cre::tdTomato ifadesi gözlemlenmedi (5). Benzer şekilde, kolinerjik kardiyak inervasyonu besleyen intrakardiyak gangliyonların nöron somalarında Phox2b-Cre tarafından etkinleştirilen tdTomato ifadesi kardiyak vagal afferentlerin kalpteki tespitini etkileyecek seviyede gözlemlenmedi. Bununla birlikte, sinir lifleri boyunca periferik Chat proteinlerini işaretlemek için etkili antikörlerin olmaması nedeniyle ilk olarak (5), Chat geni kontrolünde Cre rekombinaz ifadesine bağlı şekilde tdTomato ifade eden Chat-Cre::tdTomato fare hattı üretilerek Chat+ sinirler tdTomato raporcu proteinleri ile işaretlendi. Sonra bu kalpler anti-RFP ile immün boyanıp kolinerjik kardiyak gangliyonların anatomik konumları belirlendi. Chat+ pozitif olduğu ve dolayısıyla parasempatik olduğu düşünülen kardiyak gangliyonların kalbin dorsal yüzeyindeki konumu belirlendikten sonra aynı gangliyonlar Phox2b-Cre::tdTomato kalplerde anti-

RFP boyaması vasıtası ile tdTomato anlatımı açısından incelendi. Bu inceleme sonucu Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaza bağlı tdTomato anlatımının Chat+ parasempatik kardiyak gangliyonlarda bulunmadığı tespit edildi. İlginç şekilde kalbin post gangliyonik parasempatik sinir ağını sağlayan bu gangliyonların nöron gövdelerinin üzerinde sinaptik butonlara benzeyen tdTomato+ vagal duyu sinir sonlanmaları tespit edildi. Bazı vagal duyu sinir fasiküllerinin Chat+ olduğu bilinen bu nöron gövdelerinin çevresini sardığı tespit edildi. Vagal afferent sinirler ile parasempatik kardiyak gangliyon nöronları arasındaki tespit edilen bu fiziksel irtibat kalbe dallanan vagal duyu sinirlerinin kalbe içkin sinir devresini oluşturan birimler ile merkezi sinir sistemi arasındaki anlık sinirsel haberleşmeden sorumlu olabileceğini öne sürmektedir.

Bu tez çalışmasında Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaz ifadesinin kalpteki vagal afferentleri raporcu proteinler ile işaretlemeye etkili bir yaklaşım olabileceği doğrulandı. Gerçekten de immün boyama ile birlikte bu çalışmada kullanılan transgenik yaklaşım, son zamanlarda retrograd etiketleme ile kalbi inerve ettiği gösterilen spinal afferentlerden ayırabileceği bir kesinlikte sadece vagal afferentlerin kardiyak inervasyon desenini spesifik olarak ortaya çıkarmak için etkin bir şekilde kullanılabilir (101). AKG'ler ile bağlantılı spinal afferentlerde hiçbir şekilde Phox2b-Cre tarafından etkinleştirilen tdTomato ifadesi tespit edilmemesi bu hattın organ düzeyinde vagal duyu çalışmalarındaki etkinliğini kesin bir şekilde gösterdi.

Bu çalışmada Cre-LoxP rekombinasyon stratejisinin kalp özelinde vagal afferentleri işaretlemek için başarılı bir şekilde kullanılabilmesi hem kalp hem de diğer organların sinir ağının farklı anatomik köken ve farklı fizyolojiye sahip bileşenlerinin araştırılmasında bu stratejinin etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Şu ana kadar organ inervasyonunu araştırmaya yönelik çalışmalarda karşılaşılan en önemli sıkıntı spesifik nöron popülasyonlarını ilgili nöronların aksonlarını da içerecek şekilde işaretleyebilecek belirteç proteinlerin eksikliğidir. Farklı anatomik yapılardan köken alan sinir popülasyonlarını birbirlerinden ayırt edebilecek en önemli proteinler transkripsiyon faktörleridir. Çünkü nöronlarda ifade edilen transkripsiyon faktörlerinin farklılığı farklı fonksiyonel kimliklere sahip nöronların embriyonik dönemde ve nöral kök hücreler yoluyla yetişkinlik döneminde oluşumunu

indüklemektedir. Ancak bu transkripsiyon faktörleri nöron çekirdeklerinde bulduklarında immün boyama yöntemiyle ilgili nöronların aksonlarını organ düzeyinde görüntülemeye kullanılamamaktadır. Ancak Cre-LoxP stratejisi ile ilgili transkripsiyon faktörünü kodlayan genin kontrolünde Cre rekombinaz geni arzulanan nöronda üretilerek ilgili nöronu işaretlemek mümkün olabilmektedir. Özellikle ilgili nöronların uzattığı aksonların dallandığı organları görüntüleyebilmek için Cre rekombinaza bağlı raporcu protein ifadesi CAG promotörü gibi güçlü bir *cis* regülatör dizisi ile indüklenerek raporcu proteinlerin aksoplazmadaki ifadesi gerçekleştirilebilmektedir. Bu tez çalışmasında böyle bir mantık işletilerek Phox2b transkripsiyon faktörü kontrolünde Cre rekombinaz tarafından etkinleştirilen ve CAG promotörü ile indüklenen tdTomato anlatımı kullanıldı ve kalbi saran NG aksonları yüksek çözünürlükte görüntülenebildi. Phox2b ifadesinin AKG gangliyonlarında bulunmaması sayesinde kalbi saran spinal duyu sinirleri görsel açıdan elenebildi. Yine kalbe dallanan periferik sempatik ve parasempatik gangliyonlarda Phox2b geninin ifade edilmemesi sayesinde kalpteki motor sinirler görsel açıdan elenebildi. Bu yöntem ile sadece kalpteki vagal duyu sinirleri görüntülenebildi. Eğer literatürde daha önce duyu sinirlerini işaretlediği bilinen CGRP ve SP nöropeptitleri kullanılsaydı kalbi saran duyu sinirlerinin sadece peptiderjik alt popülasyonu görüntülenebilecekti. Ayrıca bu peptiderjik sinirler hem AKG hem de NG'den gelebileceği için vagal ve spinal duyu ayrımının kalp boyunca gerçekleştirilebilmesi de mümkün olamayacaktı. Bu olgular dikkate alındığında bu çalışmada etkinliği gösterilen ve kalp özelinde optimize edilen Cre-LoxP tabanlı görüntüleme metodolojisinin iç organların sinir ağının yüksek çözünürlüklü şekilde araştırılmasında ve organ işlevini kontrol eden sinir devrelerinin tanımlanmasında önemli bir yaklaşım sunduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında incelenen bütün Phox2b-cre::tdTomato transgenik fare kalplerinde bütünsel ölçekte benzer bir inervasyon profili tespit edildi. Bununla birlikte gözlemlenebilen inervasyon ağı detaylı şekilde incelendiğinde kalpten kalbe bazı farklılıklar da müşahade edildi. Bu farklılıklar hem biyolojik hem de teknik nedenlere irca edilebilir. Örneğin kalp dokusunda farenin yaşı ile doğru orantılı şekilde biriken ve otofloresana sebep olan lipid yapısındaki bazı pigmentlerin (lipofuscin, vb.) kalpte tespit edilebilen vagal sinir ağı miktarındaki varyasyonlar ile ilişkisi olduğunu gözlemledik. Bu tür bir varyasyonu en aza indirebilmek için, aynı genetik arka plana

sahip ve benzer yaşlarda 8-12 hafta arasında yetişkin fareler kullanılmasına dikkat edildi. Özellikle bu tez çalışmasının ana sonuçlarını oluşturan MI sonrası vagal sinir ağının yeniden şekillenme geçirdiği vb. bulgularının istatistiksel gücünü yüksek tutma için fare sayısı etik kurulun izin verdiği ölçülerde arttırılmıştır.

Vagal duyu sinirlerinin kalp boyunca yüksek çözünürlüklü incelenmesi sonucu hem sağ hem de sol atriyum yüzeyinde vagal afferentlerin daha önce atriyuma dallanan diğer sinir dallarında gösterildiği şekilde zikzak şeklinde dalgalı bir inervasyon yapısı oluşturduğu tespit edildi (10). Ayrıca her iki atriyumun hem üst yüzeyinde hem de ventriküle bakan alt yüzeyi boyunca ağ ve çiçek benzeri vagal afferent sonlanmalar müşahade edildi. Tüm bunlara ilaveten vagal afferent duyu liflerinin atriyum üzerinde yer yer varikoz yapıları oluşturduğu tespit edildi. Bu vagal afferentvarikoz sinir lifleri ayrıca ventriküllerde de gözlemlendi. Bu bulgu kalp ve duyu sinirleri ilişkisinin kalpteki duyu bilgisinin nörokardiyak eksenindeki yönetici sinir çekirdeklerine iletilmesinden farklı ve daha lokal boyutları olduğunu önermektedir. Vagal duyu sinirlerinin kalpteki uçlarının uyarılması sonucu doğrudan bu duyu sinirlerinden salgılanan bir takım nörotransmitter ya da nöropeptit benzeri moleküllerin hem normal kalp homeostasi hem de myokardiyal iskemi vb. patolojiler sonucu oluşan kalp dokusunun ve sinir ağının yeniden şekillenmesinde daha önce tanımlanmamış bir rolü olabilir. Yine ilginç bir bulgu sadedinde sadece ventriküllerde kas içi dizi benzeri sonlanmalar müşahade edildi. Ventriküller ile kısıtlı mevcudiyetin sebebi ventriküllerin kas yapısının atriyumlarınkine göre daha kompakt ve daha kalın şekilde olması ile ilişkili olabilir. Atriyumlardan ventrikülller doğru kan taşınması yer çekimi yönünde gerçekleşirken ventriküller hem vücutta daha uzak bölgelere hem de yerçekiminin aksi yönde kanın pompalanmasından sorumludur. Bu durum ventriküllerin daha kompakt miyokard yapısı ile birlikte değerlendirildiğinde ventrikül kasılmasının anlık durumunun kas içi dizi sonlanmaları üzerinden nörokardiyak eksenin farklı merkezi birimlerine iletiildiği muhtemel bir sinir devresinin varlığı tartışılabilir.

Farklı fare kalpleri incelendiğinde vagal duyu sinir liflerinin kalbe kardiyak hilustan damarlar ile birlikte girip atriyum ve ventriküllere doğru dallandığı ve kalp dokuları üzerinde farklı sonlanmalar oluşturduğu tespit edildi. Phox2b geni kontrolünde Cre rekombinaz anlatımı kullanılarak tdTomato floresan proteini

üzerinden mikroskop ile görüntülenebilen bu NG kaynaklı farklı tipteki vagal duyu sinir sonlanmalarının tek bir aksondan mı geldiği yoksa birbirine koşut aksonların farklı sonlanma uçlarına mı ayrıştığı meselesi nörokardiyak eksenin nasıl teşekkül ettiğini anlayabilmek açısından aydınlatılmaya muhtaçtır. Söz gelimi eğer farklı tipteki vagal afferent sonlanmaları aynı NG nöron somasından kaynaklanıyorsa, bu durumda farklı sinir uçlarının tekil olarak depolarizasyonu uyarının niteliğinden bağımsız olarak ilgili NG somasının arka beyindeki sinaptik bağlantısı üzerinden aynı sinir devrelerinin aktivasyonunu indükleyebilir. Farklı tipte sonlanan aynı aksonun farklı dallara ayrılması ilgili sonlanma bölgelerinden uzakta örneğin henüz kardiyak hilustan hemen sonra gerçekleşebiliyorsa bu durum kalpten taşınan duyu bilgisinin bölgesel bir bileşeni olmadığı anlamına da gelebilir. Örneğin vagal duyu aksonu iki farklı dala ayrılabilir ve bunlardan bir tanesi atriyumun epikart tabakasındaki bağ dokuda çiçek benzeri bir sonlanma oluşturabilir. Diğer taraftan aynı aksonun diğer bir dalı ventrikü miyokardına nüfuz edip kas içi dizi benzeri bir sonlanma oluşturabilir. Böyle bir senaryoda atriyum ya da ventriküldeki bu vagal duyu uçlarının tekli depolarizasyonlarının ilgili NG nöronunun beyin sapındaki Nucleus Tractus Solitarius çekirdeğinde aynı ikincil nöronları aktive etmesi beklenir. Kalp fonksiyonunu düzenleyen sinir devresinin bu şekilde yapılanması sonucu kalpteki duysal sinyalin gerçekleştiği ilk konumdan bağımsız şekilde duyu bilgisinin taşındığı ve bunu taşıyan ilgili NG nöronlarının arka beyin ve daha yüksek korteks bölgelerinde sinaptik bağlantı kurduğu birimlerin kardiyak motor komutları ürettiği öne sürülebilir. Tüm bu hipotezlerin test edilebilmeleri için tek akson çözünürlüğünde işaretleme ve görüntülemeyi mümkün kılan yakın zamanda geliştirilen AAV viral vektör benzeri etiketleme yöntemlerinin kalbi saran duyu sinir ağını ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalarda kullanılması gerekmektedir (5).

NG nöronlarının kalp ile birlikte başka iç organları da inerve ettikleri bilinmektedir (63). Kalbin atriyum ve ventrikül gibi farklı bölgelerinde sonlanan ve aynı NG nöronu ile bağlantılı vagal afferent aksonların olma ihtimali ve bunun kalbin sinirsel yönetimine yönelik potansiyel sonuçları yukarıda tartışılmıştı. Benzer bir yaklaşımla aynı NG nöron gövdelerinden birden çok organda sonlanan akson dallarının uzaması ihtimali de düşünülebilir. Ancak yeni yapılan bir çalışmada retrograd AAV viral vektörler kullanılarak fare kalbini inerve eden NG nöronlarının

akciğer ve mideyi inerve eden NG nöronlarından ayrı bir popülasyon oluşturduğu gösterilmiştir (32). Kalbi inerve eden vagal duyu nöronları NG boyunca heterojen bir dağılım göstermiştir. Bu veriler ile birlikte değerlendirildiğinde bu tez çalışmasında tespit edilen kalbi saran vagal duyu sinir ağının NG'deki kalbe özgü popülasyondan geldiği sonucuna varılmaktadır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında kalp boyunca görüntülenen çiçek, ağ ve kas içi dizi benzeri vagal afferent sonlanmalarının her bir atımda kalp dokusunda gerçekleşen değişimlerin anlık bilgisini sadece ve spesifik olarak kalbi inerve eden NG nöronlarına ve oradan da arka beyindeki kalp işlevini kontrol eden sinir merkezlerine ilettiği kalbe özgü bir duyuşal sinir yolağının varlığı öne çıkmaktadır.

Kalbin fonksiyonunu düzenleyen sinir devreleri klasik paradigmada özetlendiği şekilde sadece sempatik ve parasempatik bileşenlerden kurulu bir yapıdan çok daha karmaşık bir sistem oluşturmaktadır. Özellikle kalp yüzeyinde bulunan gangliyon kümelerinin sağlıklı ve hasta durumlardaki immünokimyasal ve elektrofizyolojik karakterizasyonu paradigmayı değiştiren çok önemli bulgular sunmuştur. Bu çalışmalar kalbin beyin ve spinal kord ile etkileşen fakat bunlardan bağımsız ve müstakil bir sinir sistemi merkezi oluşturabilecek tüm sinir tipi bileşenlerine sahip olduğunu göstermiştir (1,3,4,16,55). Kalbin bu sinirsel donanımı kalpten duyuşal girdiler alıp bunlara kendi başında kalp seviyesinde refleksif yanıtlar oluşturabilir. Yine spinal kord üzerinde değişik segmentlerde yerleşik bulunan sinir devreleri gibi beyne duyuşal bilgi iletimi de gidiyor olabilir. Burada kalp yüzeyindeki özellikle afferent işleve sahip gangliyonlar ile vagal afferentlerin kurduğu muhtemel sinaptik bağlantılar kalpten merkeze doğru taşınan bilginin bir boyutunu oluşturabilir. Bizim kardiyak gangliyon somalarının çevresinde görüntülediğimiz vagal afferent sonlanmalar bu hipotezi desteklemektedir (**Şekil 6.3.1.3** ve **Şekil 6.6.2.2B-C**). Ancak kalp sinir sisteminde duyuşal iletim birden çok sinir yolu ile gerçekleşen oldukça kompleks bir yapıdır. NG kaynak vagal afferent sinirler sadece kardiyak gangliyonlara değil epikart ve miyokard dokusuna da nüfuz etmekte ve sonlanmalar oluşturmaktadır. Dolayısıyla kalp dokusunda diyastol ve sistol sırasında meydana gelen değişimler vb. bilgiler de anlık şekilde NG üzerinden beyin sapı ve üst kortikal yapılara iletilmektedir. Kalpten taşınan duyuşal bilginin üçüncü boyutu AKG ve onun üzerinden torasik ve servikal seviyelerdeki spinal kort segmentleridir. AKG nöronlarının kalbi inerve ettiği

son yapılan retrograd sinir işaretleme çalışması ile net bir şekilde gösterildi(101). Bu bulgular kalpten merkezi sinir sistemine duyuşal bilgi iletim yolunun çok katmanlı ve hiyerarşik yapısını göstermektedir.

Kalbin sinir sisteminin bu hiyerarşik yapısı incelendiğinde bu yapının kalpten kortekse doğru değişik seviyelerde konumlanmış tüm birimlerinin hem kendi içinde refleks devreleri içerdiği hem de bu birimlerden daha üstteki birimlere duyuşal bilginin aktarıldığı görülmektedir. Dolayısıyla tüm birimler aşığıdaki ve yukarıdaki birimler ile sinirsel iletişim halindedir ve bu hiyerarşik yapılanma en kaudal tarafta hipotalamus ve insular korteks gibi birimleri de içermektedir. Kalp fonksiyonunu düzenleyen sinir devrelerini araştırırken ve bu hiyerarşik yapının tikel bileşenlerine dair bulgular bu yapının bütünü içinde ele alınıp değerlendirilmelidir. Aksi takdirde yapılacak tüm yorumlar ve varılacak sonuçlar özellikle kardiyovasküler hastalıklar sonucu ortaya çıkan otonomik dengesizlikleri açıklamada yetersiz ve eksik kalacaktır. Özellikle kalp homeostazini kontrol eden otonomik reflekslerde meydana gelen değişimler incelenirken kalp sinir sisteminin kompleks yapısı tüm bileşenleri ile dikkate alınmalıdır. **Şekil 7.1**'de görüldüğü gibi kalp sinir sistemini oluşturan hiyerarşik yapının kalpten kortekse kadar bütün seviyelerinde sinir geri bildirim devreleri yerleşik şekilde bulunmaktadır.

zamanda intrinsik kardiyak gangliyonlardaki vagal duyu innervasyonu vasıtası ile de gerçekleştirildiğine dair kanıt sunmaktadır (1,3,4,16,55). Kalbin epikardiyal yağ dokusunda bulunan kardiyak gangliyonların büyük bölümünün kolinerjik tabiatı dikkate alındığında (7), kalpteki parasempatik tonun anlık bilgisinin vagal afferentlerin gangliyon sonlanmaları üzerinden sinaptik bağlantılar yoluyla doğrudan nöro-kardiyak eksenin daha üst birimlerine iletilme ihtimali öne sürülebilir. Bu bulgular ayrıca kardiyak gangliyonlu pleksus içine lokal akım enjekte edilerek oluşturduğu gözlemlenen bradikardik yanıtların sadece doğrudan kardiyak kolinerjik afferent somata ve aksonların elektrik ile aktifleştirilmesinden değil fakat bunun dışında ya da bununla birlikte akım uygulanan kardiyak gangliyon üzerinde sonlanan vagal afferent aksonlarının aktifleşmesinden kaynaklanabileceğini önermektedir (3).

Bu tez çalışmasında, önceki yayınlara paralel şekilde fare kalplerinde noradrenerjik gangliyon nöronlarının mevcudiyeti tespit edildi. Yine bu gangliyonlarda, ana nöronlara ek olarak ve bunlara kıyasla daha parlak olan SIF hücreleri gözlemlendi (7,95). İlginç bir şekilde, Phox2b-Cre::tdTomato transgenik kalplerde TH immünoreaktif ana nöronlar ve SIF hücreleri etrafında periselüler vagal afferent sonlanmalar müşahade edildi. Bu sonlanmalar kolinerjik gangliyonlara benzer şekilde vagal afferentler ile noradrenerjik gangliyon nöronları arasında muhtemel bir sinaptik etkileşimin olabileceğini önermektedir. Vagal afferentler ve kalbe içkin sinir sisteminin çeşitli noradrenerjik ve kolinerjik gangliyon bileşenleri arasındaki bu muhtemel sinaptik etkileşimlerin kardiyovasküler dinamiklerin düzenlenmesindeki fonksiyonel rolünün aydınlatılması için yeni araştırmalar gerekmektedir.

Kalp yetmezliğinde nöral yeniden şekillenmesinin rolünü araştırmak için, kardiyak sinir ağının önemli bir bileşeni olan vagal afferentlerin detaylı görüntülenmesine hizmet edecek ileri teknik yaklaşımların geliştirilmesi oldukça önemlidir (1,2). Kardiyak patolojilerde otonomik dengeyi yeniden kurmak ve vagal tonusu artırmak için daha önce bahsedildiği üzere klinikte otonomik nöromodülasyon tedavileri uygulanmaya başlanmıştır (1,2,16). Bu tedavileri iyileştirmek ve yenilerini tasarlamak için kardiyak vagal innervasyonun yüksek çözünürlüklü bir görsel haritasının çıkarılması ve iskemik hasar sürecini takiben nöral yeniden şekillenme işlemini yöneten moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Gerçekten de, uygun görüntüleme yaklaşımlarının eksikliği iskemi sonrasında gözlemlenen

kardiyak yeniden şekillenme olgusunda vagal afferentlerin işlevinin ve kardiyak aritmilerin oluşumuna yönelik katkısının kapsamlı bir şekilde araştırılmasını engelledi. Bu tez çalışmasında bu kritik eksiklik ele alındı ve ileri mikroskobik görüntüleme teknikleri ile birleşik bir transgenik yaklaşım kullanılarak bütün fare kalbinin vagal afferent ağı yüksek çözünürlükte görselleştirildi ve vagal afferentlerin Miyokardiyal İnfarktüs sonrası kalpte yeniden şekillenmeye maruz kaldıkları gösterildi. Vagal ve intrinsik kardiyak afferent sinirlerin MI sonrası depolarizasyon kinetiğinde meydana gelen değişimler daha önce yalnızca elektrofizyolojik ölçümler ile gösterilmişti (4,16). Bu çalışmadaki bulgular MI sonrası kalplerde enfarkt alanı çevresinde vagal afferentlerin yeniden şekillenmeye uğradığını ilgili nöral filizlerin detaylı görüntülemesi ile kanıtladı. Önemli olarak bu bulgular MI sonrası kalpte görülen otonomik dengesizliklerin duyuşsal bir bileşene sahip olabileceğini önermektedir. Bu nedenle MI sonrası gerçekleşen nöral yeniden şekillenme işlemi motor ve duyu sinirler birlikte değerlendirildiğinde çok boyutlu ve karmaşık bir yapı sunmaktadır. MI sonrası kardiyak yeniden şekillenmesini tanımlamaya yönelik yapılacak çalışmaların daha önce ihmal edilen vagal duyu sinir boyutunu da dikkate alması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan metodolojik yaklaşımın, yeniden şekillenen vagal afferentlerin ayrıntılı moleküler karakterizasyonunu sağlamak için geliştirilebileceği düşünülmektedir. Kalbi saran vagal duyu sinir ağının kapsamlı ve detaylı karakterizasyonu sonucunda elde edilen bilgilerin aritmi ve diğer kardiyak patolojileri kontrol ve tedavi etmeye yönelik mevcut kardiyak sinir uyarım uygulamalarının iyileştirilmesine ve kardiyak sinir sisteminde yeni uyarım merkezlerinin keşfedilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan Phox2b-Cre transgenik hattının vagal duyu sinirlerinde Cre rekombinaz anlatımını tetiklediğini işlevsel olarak kanıtlamak için Cre-LoxP stratejisini temel alan bir optogenetik yaklaşım uygulandı. Cre rekombinazın gerçekten NG kaynaklı vagal duyu sinirlerinde ifade edildiği mavi dalga boyunda aktifleşen kanalrodopsin 2 iyon kanalının Cre rekombinaza bağlı ifadesi ile gösterildi. Phox2b-Cre'ye bağlı kanalrodopsin 2 üreten transgenik farenin vagal demetinin trakenin yanından optogenetik uyarımı boyunca alınan eşzamanlı EKG kaydı incelendiğinde vagal duyu sinirlerinin depolarizasyonunu kanıtlayan parasempatik etki tespit edildi. Bu sonuç Phox2b gen promotörünün NG kaynaklı vagal duyu

sinirlerinde Cre rekombinaz ifadesini indükleyebildiğini göstermektedir. Bu fare çalışmasında gerçekleştirilen kalp atımını kontrol eden duyu sinir devrelerinin etkinliklerinin optogenetik yöntemler ile araştırılması deneyleri sırasında kullanılan fare anestezisinin elde edilen sonuçlar üzerindeki rolüne dair önemli bilgiler elde edildi.

Literatürdeki yaygınlığı dikkate alınarak laboratuvarımızda gerçekleştirilen kalp diseksiyonu vb. işlemler öncesi fareleri anestezi altına almak amacıyla Ketamin ve Rompun kimyasallarının intraperitoneal enjeksiyonları gerçekleştirilmektedir. Çalışma mekanizması tam olarak bilinmeyen Ketamin molekülünün, duyu nöronlarından gelen bilginin beyne iletilmesinde işlevsel olduğu bilinen beyindeki N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) reseptörlerini blokladığı gösterilmiştir (102). Arka beyindeki periferik duyu nöron sonlanım uçlarından salgılanan glutamat molekülleri NMDA reseptörlerine bağlanarak taşınan duyu sinyalinin merkezi sinir sistemine iletilmesini sağlar. Bir NMDA anatagonisti olan Ketamin molekülü ise, bu reseptörleri bloke ederek duyu nöronlarından gelen bilginin beyne iletimini engeller ve bu yolla farenin uyuşarak anestezisyne girmesini sağlar.

Çoğu zaman Ketamin ile birlikte fare anestezisinde kullanılan Rompun (xylazine) kimyasalı ise merkezi alfa-adrenerjik reseptörlere bağlanarak merkezi sinir sisteminde dopamin ve noradrenalin salınımını azaltır ve bu yol ile uyuşma, kas gevşemesi ve nosiseptif uyarıların algılanmasında azalmaya neden olur(103). Ketamin ve Rompun anestezikleri birlikte kullanıldıklarında iskelet kaslarının sedasyonu ve gevşemesi sağlanmış olur (103). Bu tez çalışması kapsamında yapılan ilk optogenetik uyarım deneylerinde fareleri anestezisyne alabilmek amacıyla bu iki anestezik ilaç bir arada kullanıldı. Ancak, vagal demetlerin trake yanından optogenetik uyarımı sırasında alınan EKG kayıtlarında herhangi bir etki veya değişiklik gözlenmedi. Normal şartlarda optogenetik uyarım ile depolarize edilen vagal duyu sinir uçlarından salgılanan glutamat molekülleri tarafından uyarılması beklenen beyin sapındaki nöronlardaki NMDA reseptörlerinin etkinleşerek bir depolarizasyon dalgası başlatması ve bunun sonucunda kardiyak parasempatik reflekslerin aktifleşmesi beklenmektedir. Literatürde aksi yönde herhangi bir veri bulunmadığı için optogenetikvagal duyu uyarımı deneyleri öncesinde anestezi amacıyla ketamin uygulanmıştı. Ketamin uygulamasının vagal duyu sinir uçlarından salgılanan glutamat

moleküllerinin sinaptik yarığın diğer tarafındaki NMDA reseptörlerini bloke ettiği hipotezinden hareketle başka bir farede izofluran sistemi ile anestezi gerçekleştirilip aynı optogenetikvagal uyarım işlemi gerçekleştirildi. Gerçekten de bu işlem sırasında alınan eş zamanlı EKG kayıtlarında kalp atım sayısında beklendiği şekilde parasempatik aktivasyonu gösteren dramatik bir düşüş tespit edildi. Bu bulgu özellikle kalbi saran duyu sinir devrelerinin işlevlerini araştırmaya yönelik *in vivo* çalışmalarda kullanılan anestezik ilaçların elde edilen sonuçları doğrudan etkileyebileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen bu sonuç kalp duyu sistemi çalışmalarında kullanılacak anestezik ilaçların seçiminin ne derece önemli olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında tüm kalp üzerindeki global kardiyak vagal afferent ağı ve bu vagal afferentlerin kalp boyunca gerçekleştirdikleri farklı sonlanma morfolojileri tespit edildi. Bununla birlikte, bu farklı sonlanan sinir fasiküllerinin mikro düzeyde paralel uzanan ve farklı tipte sonlanan tek ve ayrı aksonlardan mı oluştuğu yoksa farklı sonlanma tipleri gösteren tekli vagal duyu aksonları mevcut mu meselesi bu çalışmada elde edilen görsel çözünürlüğün ısıtılmasından dolayı aydınlatılamamıştır.

Yakın zamanda geliştirilen AAV viral vektörleri ile tek akson seviyesinde işaretlemeyi mümkün kılan yaklaşımlar kalbe dallanan tek bir vagal duyu aksonunun birden fazla tipte sonlanma formuna ayrışma yeteneğinin konfokal mikroskobunda derinlikli incelemesine yardımcı olabilir (5).

Son yapılan bir çalışmada tek bir sinir somasında raporcu protein kodlayan bir genin anlatımının ışık ile etkinleşmesini sağlayan bir yöntem geliştirilmiş ve merkezi sinir sistemi çalışmalarında uygulanmıştır (104). Bu sayede ışık yoluyla bir genin ifadesinin zamansal ve konumsal kontrolü gerçekleştirilebilmiştir. Bu yöntem NG gangliyonlarda tekli nöron gövdelerinde floresan protein anlatımını indüklemek ve ilgili NG nöronundan çıkan aksonun kalpteki dallanma desenini görüntülemek için kullanılabilir. Bu sayede tek bir vagal sinir aksonunun bir ya da birden çok sonlanma tipi oluşturma istidadını haiz olma meselesi tenvir edilebilir. Bu tarz yüksek çözünürlüklü görüntüleme stratejilerinin uygulanması ayrıca özellikle kardiyak iskemiler sonucu kalbin mekanik ve kimyasal ortamında meydana gelen değişikliklere yanıt olarak vagal duyu sinirlerinde gerçekleşen yeniden şekillenmenin detaylı tanım ve karakterizasyonuna yardımcı olacaktır. Bu sayede vagal duyu sinir yeniden

şekillenmesinin kardiyovasküler rahatsızlıkları takiben ortaya çıkan otonomik bozukluklar ve bunlara bağlı kardiyak aritmilere olan muhtemel katkısı daha detaylı şekilde tanımlanabilir.



8. SONUÇ

Bu tez çalışmasında fare kalbi bütüncül ölçekte incelenip dorsal ve ventral kardiyak vagal duyu sinir dallanması ayrıntılı şekilde görsel olarak haritalandı. Kalbin ventral yüzeyinde dorsal yüzeye kıyasla gözlemlenen daha yüksek kas otofloresan sinyali nedeniyle vagal afferent sinir lifleri dorsal yüzeydekiler kadar kapsamlı ve yüksek çözünürlüklü tespit edilemedi. Kalp gibi nispeten yüksek kas dokusuna sahip organlarda sinir ağının kapsamlı ve detaylı şekilde görüntüleyebilmek için organa özgü tasarlanmış yeni immün boyama yöntemlerinin geliştirilmesi yüksek çözünürlüklü görüntülemeyi engelleyen kardiyak doku otofloresan sinyalini ortadan kaldırarak konfokal mikroskopu ile ayrıştırılabilen antikör sinyalinin miktarının artışına olanak sağlayacaktır. Bu alandaki gelişmeler sadece kalp işlevini yöneten sinir ağının kapsamlı haritasının üretilebilmesi için gerekli olmamakla birlikte aynı zamanda kalbi saran sinirlerin kardiyak patofizyolojisindeki rolünü tespit edebilmek için de kritik bir önem taşımaktadır. Kardiyovasküler ve miyokardiyal iskemik patolojiler sonucu kalbi saran sinir ağında meydana gelen yapısal ve fonksiyonel değişimler ve yeniden şekillenmeler ve bunların müteakip kardiyak aritmi ve bozukluklardaki işlevi henüz yeterince aydınlatılmamıştır. Kalbe spesifik olarak geliştirilecek immün boyama, doku şeffaflaştırma ve mikroskopik görüntüleme yöntemlerinin sağlayacağı yüksek çözünürlüklü görseller kalbin hasarlı bölgelerinde ve bunların periferinde yeni oluşan bu tez çalışmasında gösterilen vagal duyu ve diğer sinir filizlerinin kapsamlı tespiti ve araştırılmasında faydalı olacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Rajendran PS, Nakamura K, Ajijola OA, Vaseghi M, Armour JA, Ardell JL, et al. Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. *J Physiol.* 594(2):321–41, 2016.
2. Herring N, Kalla M, Paterson DJ. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies. *Nat Rev Cardiol.* 16(December), 2019.
3. Armour JA. Potential clinical relevance of the “little brain” on the mammalian heart. *Exp Physiol.* 93(2):165–76, 2008.
4. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac Innervation and Sudden Cardiac Death. *Circ Res.* 116(12):2005–19, 2015.
5. Rajendran PS, Challis RC, Fowlkes CC, Hanna P, Tompkins JD, Jordan MC, et al. Identification of peripheral neural circuits that regulate heart rate using optogenetic and viral vector strategies. *Nat Commun.* 10(1):1–13, 2019.
6. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Noujaim SF, Jalife J, Pauza DH. Morphologic pattern of the intrinsic ganglionated nerve plexus in mouse heart. *Hear Rhythm.* 8(3):448–54, 2011.
7. Rysevaite K, Saburkina I, Pauziene N, Vaitkevicius R, Noujaim SF, Jalife J, et al. Immunohistochemical characterization of the intrinsic cardiac neural plexus in whole-mount mouse heart preparations. *Hear Rhythm.* 8(5):731–8, 2011.
8. Hanna P, Dacey MJ, Brennan J, Moss A, Robbins S, Achanta S, et al. Innervation and Neuronal Control of the Mammalian Sinoatrial Node a Comprehensive Atlas. *Circ Res.* :1279–96, 2021.
9. Zhu C, Rajendran PS, Hanna P, Efimov IR, Salama G, Fowlkes CC, et al. High-resolution structure-function mapping of intact hearts reveals altered sympathetic control of infarct border zones. *JCI Insight.* 7(3):1–13, 2022.
10. Shenton FC, Campbell T, Jones JFX, Pyner S. Distribution and morphology of sensory and autonomic fibres in the subendocardial plexus of the rat heart. *J Anat.* 238(1):36–52, 2021.
11. Vermeiren S, Bellefroid EJ, Desiderio S. Vertebrate Sensory Ganglia: Common and Divergent Features of the Transcriptional Programs Generating Their Functional Specialization. *Front Cell Dev Biol.* 8(October), 2020.

12. D'Autréaux F, Coppola E, Hirsch MR, Birchmeier C, Brunet JF. Homeoprotein Phox2b commands a somatic-to-visceral switch in cranial sensory pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(50):20018–23, 2011.
13. Fox SI. No Title.
14. Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell.* 157(1):163–86, 2014.
15. Armour JA. The little brain on the heart. *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* 2007., 2007.
16. Ardell JL, Armour JA. Neurocardiology: Structure-Based function. *Compr Physiol.* 6(4):1635–53, 2016.
17. Akgul Caglar T, Durdu ZB, Turhan MU, Gunal MY, Aydın MS, Ozturk G, et al. Evaluation of the bilateral cardiac afferent distribution at the spinal and vagal ganglia by retrograde labeling. *Brain Res.* 1751(October 2020):147201, 2021.
18. Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW. Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res.* 84(8):921–8, 1999.
19. Nassenstein C, Taylor-Clark TE, Myers AC, Ru F, Nandigama R, Bettner W, et al. Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. *J Physiol.* 588(23):4769–83, 2010.
20. Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature.* 399(6734):366–70, 1999.
21. Dubreuil V, Hirsch MR, Pattyn A, Brunet JF, Goridis C. The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Development.* 127(23):5191–201, 2000.
22. Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, Laquaglia M, et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene.* 27(4):469–76, 2008.
23. Kupari J, Häring M, Agirre E, Castelo-Branco G, Ernfors P. An Atlas of Vagal Sensory Neurons and Their Molecular Specialization. *Cell Rep.* 27(8):2508-2523.e4, 2019.
24. Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, van der Zwan J,

- et al. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*. 174(4):999-1014.e22, 2018.
25. Vaseghi M, Armour JA, Ardell JL. Atlas of Cardiac Innervation. :13–35, 2017.
 26. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*. 150(4):467–86, 1981.
 27. Daigle TL, Madisen L, Hage TA, Valley MT, Knoblich U, Larsen RS, et al. A Suite of Transgenic Driver and Reporter Mouse Lines with Enhanced Brain-Cell-Type Targeting and Functionality. *Cell*. 174(2):465-480.e22, 2018.
 28. Tsien JZ. Cre-lox neurogenetics: 20 years of versatile applications in brain research and counting... *Front Genet*. 7(FEB):1–7, 2016.
 29. Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, Berglund E, Lee CE, et al. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab*. 13(2):195–204, 2011.
 30. Scott MM, Williams KW, Rossi J, Lee CE, Elmquist JK. Leptin receptor expression in hindbrain Glp-1 neurons regulates food intake and energy balance in mice. *J Clin Invest*. 121(6):2413–21, 2011.
 31. Gautron L, Zechner JF, Aguirre V. Vagal innervation patterns following Roux-en-Y gastric bypass in the mouse. *Int J Obes*. 37(12):1603–7, 2013.
 32. Zhao Q, Yu CD, Wang R, Xu QJ, Dai Pra R, Zhang L, et al. A multidimensional coding architecture of the vagal interoceptive system. *Nature*. 603(7903):878–84, 2022.
 33. Zahner MR, Li DP, Chen SR, Pan HL. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. *J Physiol*. 551(2):515–23, 2003.
 34. Kim SH, Hadley SH, Maddison M, Patil M, Cha B, Kollarik M, et al. Mapping of sensory nerve subsets within the vagal ganglia and the brainstem using reporter mice for Pirt, TRPV1, 5-HT3, and Tac1 expression. *eNeuro*. 7(2):1–24, 2020.
 35. Baral P, Umans BD, Li L, Wallrapp A, Bist M, Kirschbaum T, et al. Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and $\gamma\delta$ T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. *Nat Med*. 24(4):417–26, 2018.
 36. Lee C, Lavoie A, Liu J, Chen SX, Liu BH. Light Up the Brain: The Application

- of Optogenetics in Cell-Type Specific Dissection of Mouse Brain Circuits. *Front Neural Circuits*. 14(April):1–14, 2020.
37. Robinson BF, Epstein SE, Beiser GD, Braunwald E. Control of Heart Rate by the Autonomic Nervous System. *Circ Res.*, 2012.
 38. Christoffels VM, Moorman AFM. Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2009., 2009.
 39. Silverthorn DU, Ph D, Ober WC, Cummings B. An integrated Approach..
 40. Dilsizian V, Narula J. Atlas of Cardiac Innervation. *Atlas of Cardiac Innervation*. 2017., 2017.
 41. Bohnen MS, Peng G, Robey SH, Terrenoire C, Iyer V, Sampson KJ, et al. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev*. 97(1):89–134, 2017.
 42. Klabunde RE. Cardiac electrophysiology: Normal and ischemic ionic currents and the ECG. *Adv Physiol Educ*. 41(1):29–37, 2017.
 43. Hwang C, Levis JT. ECG diagnosis: ST-elevation myocardial infarction. *Perm J*. 18(2):e133, 2014.
 44. Coppola G, Carità P, Corrado E, Borrelli A, Rotolo A, Guglielmo M, et al. ST segment elevations: Always a marker of acute myocardial infarction? *Indian Heart J*. 65(4):412–23, 2013.
 45. Based I, Ecg M lead L interval. An Automated High-Accuracy Detection Scheme for Myocardial a Multi-Class SVM Classifier. *Sensors.*, 2021.
 46. Mitchell GAG. the Innervation of the Heart. *Heart*. 15(2):159–71, 2007.
 47. Kawano H, Okada R, Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels.*, 2003.
 48. Hasan W. Autonomic cardiac innervation: Development and adult plasticity. *Organogenesis*. 2013., 2013.
 49. Robinson BF, Epstein SE, Beiser GD, Braunwald E. Control of heart rate by the autonomic nervous system. Studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise. *Circ Res*. 19(2):400–11, 1966.
 50. Hanna P, Rajendran PS, Ajjola OA, Vaseghi M, Andrew Armour J, Ardell JL, et al. Cardiac neuroanatomy - Imaging nerves to define functional control.

- Auton Neurosci Basic Clin. 207(July):48–58, 2017.
51. Rajendran PS, Armour JA, Ardell JL, Shivkumar K, Vaseghi M, Chui RW, et al. Neural Control of Cardiac Function in Health and Disease. In: Atlas of Cardiac Innervation. 2016., 2016.
 52. Wake E, Brack K. Characterization of the intrinsic cardiac nervous system. Auton Neurosci Basic Clin. 199:3–16, 2016.
 53. Beaumont E, Southerland EM, Hardwick JC, Wright GL, Ryan S, Li Y, et al. Vagus nerve stimulation mitigates intrinsic cardiac neuronal and adverse myocyte remodeling postmyocardial infarction. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 309(7):H1198–206, 2015.
 54. Durães Campos I, Pinto V, Sousa N, Pereira VH. A brain within the heart: A review on the intracardiac nervous system. J Mol Cell Cardiol. 119(March):1–9, 2018.
 55. Hadaya J, Ardell JL. Autonomic Modulation for Cardiovascular Disease. Front Physiol. 11(December), 2020.
 56. Salavatian S, Hoang JD, Yamaguchi N, Lokhandwala ZA, Swid MA, Armour JA, et al. Myocardial infarction reduces cardiac nociceptive neurotransmission through the vagal ganglia. JCI Insight. 7(4), 2022.
 57. Umans BD, Liberles SD. Neural Sensing of Organ Volume. Trends Neurosci. 41(12):911–24, 2018.
 58. Abboud FM, Liberles SD, Patapoutian A. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. (C):4–8, 2018.
 59. Min S, Chang RB, Prescott SL, Beeler B, Joshi NR, Strohlic DE, et al. Arterial Baroreceptors Sense Blood Pressure through Decorated Aortic Claws. Cell Rep. 29(8):2192-2201.e3, 2019.
 60. Prescott SL, Umans BD, Williams EK, Brust RD, Liberles SD. An Airway Protection Program Revealed by Sweeping Genetic Control of Vagal Afferents. Cell. 181(3):574-589.e14, 2020.
 61. Chang RB, Strohlic DE, Umans BD, Liberles SD, Chang RB, Strohlic DE, et al. Vagal Sensory Neuron Subtypes that Differentially Article Vagal Sensory Neuron Subtypes that Differentially Control Breathing. Cell. 161(3):622–33, 2015.


62. Williams EKK, Chang RBB, Strohlic DEE, Umans BDD, Lowell BBB, Liberles SDD. Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. *Cell*. 166(1):209–21, 2016.
63. Prescott SL, Liberles SD. Internal senses of the vagus nerve. *Neuron*. 110(4):579–99, 2022.
64. Ragauskas T, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauziene N, Inokaitis H, Pauza DH. Chemical phenotypes of intrinsic cardiac neurons in the newborn pig (*Sus scrofa domestica* Erxleben, 1777). *J Morphol*. 283(1):51–65, 2022.
65. Pauziene N, Rysevaite-Kyguoliene K, Alaburda P, Pauza AG, Skukauskaite M, Masaityte A, et al. Neuroanatomy of the Pig Cardiac Ventricles. A Stereomicroscopic, Confocal and Electron Microscope Study. *Anat Rec*. 300(10):1756–80, 2017.
66. Inokaitis H, Pauziene N, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza DH. Innervation of sinoatrial nodal cells in the rabbit. *Ann Anat*. 205:113–21, 2016.
67. Pauza DH, Rysevaite-Kyguoliene K, Vismantaite J, Brack KE, Inokaitis H, Pauza AG, et al. A combined acetylcholinesterase and immunohistochemical method for precise anatomical analysis of intrinsic cardiac neural structures. *Ann Anat*. 196(6):430–40, 2014.
68. Pauza DH, Saburkina I, Rysevaite K, Inokaitis H, Jokubauskas M, Jalife J, et al. Neuroanatomy of the murine cardiac conduction system. A combined stereomicroscopic and fluorescence immunohistochemical study. *Auton Neurosci Basic Clin*. 176(1–2):32–47, 2013.
69. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ. A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: Chemoreceptors as well as baroreceptors. *J Auton Nerv Syst*. 67(1–2):1–14, 1997.
70. Pauziene N, Alaburda P, Rysevaite-Kyguoliene K, Pauza AG, Inokaitis H, Masaityte A, et al. Innervation of the rabbit cardiac ventricles. *J Anat*. 228(1):26–46, 2016.
71. Li L, Hatcher JT, Hoover DB, Gu H, Wurster RD, Cheng ZJ. Distribution and morphology of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive axons in the whole-mount atria of mice. *Auton Neurosci Basic Clin*. 181(1):37–48, 2014.


72. Shepherd JT. The heart as a sensory organ. *J Am Coll Cardiol.*, 1985.
73. Wan F, Li G, Liu S, Zhu G, Xu C, Lin J, et al. P2X_{2/3} receptor activity of rat nodose ganglion neurons contributing to myocardial ischemic nociceptive signaling. *Auton Neurosci Basic Clin.* 158(1–2):58–64, 2010.
74. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 120(1):207–28, 2017.
74. Kazci YE, Sahoglu Goktas S, Aydin MS, Karadogan B, Nebol A, Turhan MU, Ozturk G, Cagavi E. Anatomical characterization of vagal nodose afferent innervation and ending morphologies at the murine heart using a transgenic approach. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2022.103019>.
75. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.*, 2005.
76. Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, et al. Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration. *Neuron.* 50(1):23–33, 2006.
77. Oesterhelt D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol.* 233(39):149–52, 1971.
78. Deisseroth K. Optogenetics. *Nat Methods.* 8(1):26–9, 2011.
79. Deisseroth K. Historical Commentary Optogenetics : 10 years of microbial opsins in neuroscience. 18(9):1213–25, 2015.
80. G N, Tan A, Farhatnia Y, Rajadas J, Hamblin MR, Khaw PT, et al. Channelrhodopsins: Visual regeneration and neural activation by a light switch. *N Biotechnol.* 30(5):461–74, 2013.
81. White IA, Gordon J, Balkan W, Hare JM. Sympathetic reinnervation is required for mammalian cardiac regeneration. *Circ Res.* 117(12):990–4, 2015.
82. Ueda HR, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, et al. Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 21(2):61–79, 2020.
83. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the

- whole mouse brain. *Nat Neurosci.* 13(1):133–40, 2010.
84. Spijker S. Dissection of rodent brain regions. *Neuromethods.* 57:13–26, 2011.
 85. Scherschel K, Bräuninger H, Glufke K, Jungen C, Klöcker N, Meyer C. Location, dissection, and analysis of the murine stellate ganglion. *J Vis Exp.* 2020(166):1–18, 2020.
 86. Susaki EA. The CUBIC clearing protocol with Reagent-1A (for whole mouse brain). *Nat Protoc.* 157:1709–27, 2014.
 87. Ascoli GA, Donohue DE, Halavi M. NeuroMorpho.Org: A central resource for neuronal morphologies. *J Neurosci.* 27(35):9247–51, 2007.
 88. Lugrin J, Parapanov R, Krueger T, Liaudet L. Murine myocardial infarction model using permanent ligation of left anterior descending coronary artery. *J Vis Exp.* 2019(150):1–7, 2019.
 89. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. *Brain Res Rev.* 48(3):457–76, 2005.
 90. Buetow BS, Laflamme MA. *Cardiovascular.* 2018.
 91. Sirajuddin A, Chen MY, White CS, Arai AE. Coronary venous anatomy and anomalies. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 14(1):80–6, 2020.
 92. Zhu C, Rajendran PS, Hanna P, Efimov IR, Salama G, Fowlkes CC, et al. High-resolution structure-function mapping of intact hearts reveals altered sympathetic control of infarct border zones. *JCI Insight.* 7(3), 2022.
 93. Ajijola OA, Yagishita D, Patel KJ, Vaseghi M, Zhou W, Yamakawa K, et al. Focal myocardial infarction induces global remodeling of cardiac sympathetic innervation: Neural remodeling in a spatial context. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 305(7):1031–40, 2013.
 94. Buckley U, Shivkumar K, Ardell JL. Autonomic regulation therapy in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 12(4):284–93, 2015.
 95. Cheng Z, Powley TL, Schwaber JS, Doyle FJ. Vagal afferent innervation of the atria of the rat heart reconstructed with confocal microscopy. *J Comp Neurol.* 381(1):1–17, 1997.
 96. Ustinova EE, Schultz HD. Activation of cardiac vagal afferents in ischemia and reperfusion: Prostaglandins versus oxygen-derived free radicals. *Circ Res.* 74(5):904–11, 1994.

97. Pelleg A, Xu J, Hurt CM, Sterious W, Wang L. Electrophysiological-anatomic correlates of ATP-triggered vagal reflex in dogs. II. Vagal afferent traffic. *Am J Physiol Circ Physiol.* 267(3):H1093–7, 2017.
98. Umans BD, Liberles SD. Neural Sensing of Organ Volume. *Trends Neurosci.* 41(12):911–24, 2018.
99. Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson JET, Lönnerberg P, et al. Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci.* 21(6):869–80, 2018.
100. Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, Berglund E, Lee CE, et al. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab.* 13(2):195–204, 2011.
101. Koc A, Sahoglu Goktas S, Akgul Caglar T, Cagavi E. Defining optimal enzyme and matrix combination for replating of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes at different levels of maturity. *Exp Cell Res.* 403(2):112599, 2021.
102. Zorumski CF, Izumi Y, Mennerick S. Ketamine: NMDA receptors and beyond. *J Neurosci.* 36(44):11158–64, 2016.
103. Struck MB, Andrutis KA, Ramirez HE, Battles AH. Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 50(3):344–8, 2011.
104. Yao S, Yuan P, Ouellette B, Zhou T, Mortrud M, Balaram P, et al. RecV recombinase system for in vivo targeted optogenomic modifications of single cells or cell populations. *Nat Methods.* 17(4):422–9, 2020.

10. ETİK KURUL ONAYI

 **MEDİPOL**
UNV İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.10841
Konu : Etik Kurulu Kararı

13/03/2019

Sayın Yusuf Enes Kazer

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Kalbe özgü vagal duyu nöronlarının moleküler ve fonksiyonel incelenmesi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 13.03.2019 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden B1081FD5X9 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üni...



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/03/2019	07		Yusuf Enes Kazıcı

“Kalbe özgü vagal duyu nöronlarının moleküler ve fonksiyonel incelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 36 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	