



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SİNİR HÜCRELERİ İLE KALP KASI HÜCRELERİ ARASINDAKİ
ETKİLEŞİMİN MOLEKÜLER VE ELEKTROFİZYOLOJİK DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

TÜBA AKGÜL ÇAĞLAR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL- 2021

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Tüba AKGÜL ÇAĞLAR
Tez Başlığı : Sinir Hücreleri ile Kalp Kası Hücreleri Arasındaki Etkileşimin
Moleküler ve Elektrofizyolojik Düzeyde Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 07.01.2021

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

Danışman

Doç.Dr. Esra ÇAĞAVİ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Lütfü HANOĞLU

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Arzu K. KORKMAZ

İstanbul Teknik 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

BEYAN

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

Tüba AKGÜL ÇAĞLAR



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yol gösterici olan ve sabırla sorularımı yanıtlayan, akademik hayatımda desteğini eksik etmeyen sayın danışmanım Doç. Dr. Esra Çağavi'ye,

Tez çalışmalarımın teorik ve deneysel adımlarda bana yol gösterici olan sayın eş danışmanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e

İn vivo çalışmaların gerçekleşmesinde büyük rolü olan Doç. Dr. Mehmet Yalçın Günel'a,

Çalışmalarım boyunca zorlukları beraber omuzladığımız takım arkadaşım MSc. Zeynep Begüm Durdu'ya ve *in vivo* deneylerimde teorik bilgi ve deneyimlerini eksik etmeyen doktor adayımız Mehmet Uğurcan Turhan'a,

Bu çalışmanın RNA dizilime analizlerini göğüsleyen ve tamamlayan ekip arkadaşım MSc. Yusuf Enes Kazcı'ya ve moleküler biyoloji tekniklerini bana sevdiren ve öğreten Sevilay Şahoğlu Göktaş'a,

Manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen takım arkadaşım MSc. Gökçe İlayda Görgülü Söztekin'e ve yardımlarını eksik etmeyen takım arkadaşlarım MSc. Arzuhan Koç ve MSc. Gizem Örs'e,

Deneysel bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Emre Vatandaşlar ve Sadık Bay'a, Optogenetik ve kalsiyum görüntüleme konusunda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Deniz Atasoy ve Dr. Nilüfer Atasoy'a,

Laboratuvar çalışmalarımı destekleyen SABITA ve MEDİTAM idari ve akademik personeline,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini gösteren, yaşadığım zorluklar veya aldığım kararlar karşısında anlayışlı olan ve yol gösteren, sevgisini ve ilgisini bir an olsun eksik etmeyen canım annem Altın Akgül ve canım babam Ali Akgül'e,

Tez çalışmalarım boyunca hep yanımda olan ve her türlü zorluğu beraber aştığım can yoldaşım eşim Mustafa Çağlar'a ve Çağlar ailesine; tez yazımı boyunca tek vücut olduğum, tekmelerini eksik etmeden varlığını hissettiren, sonrasında asla peşimi bırakmayarak yanımda olduğunu gösteren tosuncuğum oğlum Burak Çağlar'a

Sonsuz teşekkürler.

KISALTMALAR LİSTESİ

AAV	: Adeno ilişkili virüs
AKG-K	: Kalbe özgü AKG duyu nöronları, saflaştırılan Di-8-AnepPQ işaretli AKG nöronları
AKG-T	: Kalbine DMSO enjekte edilen farelerden elde edilen total AKG nöronları
AKG	: Arka kök gangliyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BDNF	: Beyin kökenli nöron faktörü
BMP	: Kemik morfogenetik protein
C	: Servikal
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
CAG	: β -Actin başlatıcısı
Calca	: Kalsitonin
Cbx	: Carbenoxolone
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
ChR2	: Kanalrodopsin2
CNQX	: Cyanquixaline
Di-8-ANEPPQ	: 1-(3-Trimethylammoniopropyl)-4-[2-(di-n-octylamino)-6naphthyl] vinyl]pyridinium dibromide
DiI	: 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate; DiIC18(3)
Ef1a	: Genel hücre elongasyon faktörü 1
F	: Frekans
FACS	: Floresanca aktifleştirilmiş hücre ayırıcı
Fgf3	: Fibroblast büyüme faktörü 3
GCaMP6s	: Genetik olarak değiştirilmiş yavaş kalsiyum proteini 6
GFP	: Yeşil floresan proteini
GPCR	: G protein kapılı iyon kanalı
IB4	: İzolektin B4
K ⁺	: Potasyum iyonu

KM	: Kardiyomiyosit
L	: Lumbar
Lypd6	: Lynx protein LY6/PLAUR domain-containing 6
MI	: Miyokard infarktüsü
Mrgpr	: Mas-ilişkili G protein kapılı reseptör
Na ⁺	: Sodyum iyonu
Nav	: Voltaj kapılı Na ⁺ kanalı
NBA	: Nöral basal medium-A
NG-K	: Kalbe özgü NG duyu nöronlar, saflaştırılan Di-8-AnepqQ işaretli NG nöronları
NG-T	: Kalbine DMSO enjekte edilen farelerden elde edilen total NG nöronları
NG	: Nöroz gangliyonu
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NT4	: Nörotrofin 4
Phox2	: Eşleştirilmiş homeobox 2
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
qRT-PCR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SP	: Substance P
T	: Toraks
Trk	: Nörotrofik tirozine reseptör kinazlar
TRP	: Transient reseptör potansiyel
TRPM8	: Transient reseptör potansiyel melastatin 8
TRPA1	: Transient reseptör potansiyel ankrin 1
TRPV1	: Transient reseptör potansiyel vanilloid 1
UPK	: Uyarılmış Pluripotent Kök
WGA	: Wheat germ agglutinin
WNT	: Wingless ve int-1

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. Sinir Sistemi.....	7
4.2. Duyusal Sinir Sistem.....	8
4.2.1. Arka Kök Gangliyonu (AKG).....	8
4.2.2. Noduz Gangliyon (NG).....	11
4.2.3. Nöronda Aksiyon Potansiyeli	12
4.3. Kardiyovasküler Sistem.....	13
4.3.1. Kalbin Elektrofizyolojik Özellikleri	14
4.4. Kalp ve Sinir Sistemi İlişkisi	15
4.4.1. Kalp ve Otonom Sinir Sistemi	15
4.4.2. Kalp ve Duyu Sinir Sistemi	16
4.4.3. Kalp-Duyu Sinir Sistemi Etkileşiminin Klinik Önemi	18
4.5. Ca ⁺² Görüntüleme, Optogenetik ve Uygulama Alanları	20
4.5.1. Genetik Olarak Değiştirilmiş Yavaş Ca ⁺² Proteini 6 (Genetically Calcium modified protein 6 slow, gCaMP6s).....	20
4.5.2. Sinir ve Kardiyovasküler Sistemlerindeki GCaMP6s Uygulama Alanları	22
4.5.3. Kanalrhodopsin-2 (ChR2).....	22
4.5.4. Sinir Sistemi ve Kardiyovasküler Sisteminde Optogenetik Uygulamalar	23

4.6.	Global Gen Ekspresyonu Analizi ile Gen Keşfi.....	25
4.7.	Duyu Nöronlarında Ağrı ile İlişkili Üretilen Reseptör ve İyon Kanalları	28
4.8.	İmmün Sistem ve Sinir Sistemi İlişkisi.....	30
4.9.	Geriye Doğru Taşınan (Retrograd) Boyalar ve Uygulama Alanları... 31	
5.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
5.1.	Kullanılan Malzemeler ve Vasatlar	35
5.2.	Cihazlar.....	38
5.3.	Fareden Doku İzolasyonu.....	40
5.3.1.	Nodoz Gangliyon (NG) İzolasyonu	40
5.3.2.	Arka Kök Gangliyon (AKG) İzolasyonu	40
5.3.3.	Yenidoğan Kalp İzolasyonu.....	41
5.4.	Fare Primer Hücre Kültürü.....	41
5.4.1.	Hücre Plak Yüzey Matriksleri ve Besi Yeri Hazırlanışı	41
5.4.2.	Hücre Sayımı.....	42
5.4.3.	Sinir Hücre Kültürü.....	42
5.4.4.	Kardiyomiyosit Kültürü	43
5.4.5.	Duyu Nöronları ve Kardiyomiyosit Kokültürü	44
5.5.	Hücre Saflaştırması.....	44
5.5.1.	Percoll Gradyanı ile Kardiyomiyositlerin Ayrıştırılması.....	44
5.5.2.	Tetramethylrhodamine Methyl Ester Perchlorate (TMRM) Boyaması ile Kardiyomiyosit Saflaştırması.....	45
5.5.3.	Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC) ile Fibroblast Bölünmesinin Durdurulması	46
5.6.	Kalbe-Özgü Nöronların <i>In vivo</i> İşaretlenmesi.....	47
5.6.1.	Di-8-ANEPPQ <i>In Vitro</i> Boyama Protokolü.....	47
5.6.2.	Kalbe-Özgü Nöronların <i>In vivo</i> İşaretlenmesi	48
5.6.3.	Floresan Görüntüleme.....	52
5.7.	Floresanca Aktifleştirilmiş Hücre Ayrışması (FACS)	52

5.8.	İmmünohistokimyasal (IHC) İnceleme	53
5.9.	İmmünohistokimyasal (IHC) İnceleme	56
5.10.	Di-8-ANEPPQ İşaretli Kalbe Özgü Nöronların Boyutlu Görüntülenmesi ve Hücre Gövde Çap Ölçümü	57
5.11.	Elektron Mikroskobu ile İnceleme	58
5.12.	RNA İzolasyonu.....	58
5.12.1.	RNA Ölçümü	59
5.12.2.	cDNA Sentezi.....	60
5.12.3.	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ..	61
5.13.	Transkriptom (RNA dizi analizi) ve Biyoinformatik Analizler	64
5.14.	Elektrofizyolojik Analizler	66
5.14.1.	Ca ²⁺ Görüntüleme	66
5.14.2.	Optogenetik Uygulamalar	67
5.14.3.	Hareket Takip (Motion Tracking) Analizi	68
5.14.4.	Hücreler Arasında Ca ²⁺ İyonuna Bağlı Sinyal Korelasyon Analizi ...	68
5.14.5.	Yama-Kıskacı (Patch-Clamp)	68
5.14.6.	Gerçek Zamanlı Ekstraselüler Kayıt (Extracellular Recording, ECR) ..	69
5.15.	İstatiksel Analiz	70
6.	SONUÇLAR.....	71
6.1.	Di-8-ANEPPQ'nun Floresan Özelliklerinin <i>In Vitro</i> Karakterizasyonu	71
6.2.	Di-8-ANEPPQ'nun Siyatik Sinir ile <i>In vivo</i> İncelenmesi	74
6.3.	Di-8-ANEPPQ'nun Kalbe Enjeksiyonundan Sonra Bekleme Süresinin Belirlenmesi	75
6.4.	Di-8-ANEPPQ'nun AKG ve NG Dokularında İncelenmesi.....	78
6.5.	Di-8-ANEPPQ'nun Doku Kesitlerinde İncelenmesi	80

6.6. Di-8-ANEPPQ'nun İmmünohistokimyasal İncelenmesi	82
6.7. Kalbe Özgü Duyu Sinir Hücrelerinin 3-Boyutlu Görüntülenmesi.....	83
6.8. Kalbe Özgü Duyu Sinir Hücrelerinin Çap Analizi	84
6.9. Kalbe Özgü Duyu Sinir Hücrelerinin Safılaştırılması ve Histolojik İncelenmesi	85
6.10. Kalbe Özgü Duyu Sinirlerinin RNA-Dizileme Analizi ile Moleküler İncelenmesi	87
6.10.1. RNA-Dizileme Sonrası Aday Genlerin qRT-PCR ile Analizi.....	100
6.11. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültür Koşullarının Optimasyonu ve Proliferasyon ve Apoptoz Analizi	100
6.11.1. Kardiyomiyosit ve Heterojen Duyu Nöronlarının Kokültür Koşullarının Optimasyonu	101
6.11.2. Primer Kültürlerin Saflığını Korumaya Yönelik Çalışmalar	102
6.11.3. Primer Kardiyomiyosit, Kalbe Özgü Duyu Nöronları ve Kokültürlerde Gen Ekspresyon Analizi.....	107
6.12. Primer Kardiyomiyosit ve Kalbe Özgü Duyu Nöron Kokültürlerinde Morfoloji, İmmunofloresans ve Canlılık Analizi	108
6.13. Primer Kardiyomiyosit ve Duyu Nöron Kokültürlerin Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi	111
6.14. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Elektrofizyolojik ve Optogenetik İncelenmesi, Ca⁺² Görüntülenmesi.....	112
6.14.1. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Elektrofizyolojik İncelenmesi	113
6.14.2. Kalbe Özgü Duyu Nöronu ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Ca ⁺² Görüntüleme ve Optogenetik Uygulamanın Optimasyonu.....	115
6.14.3. Kalbe Özgü Duyu Nöron ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Spontan Ca ⁺² Görüntüleme	119
6.14.3.1. Kalbe Özgü NG Duyu Nöron ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Spontan Ca ⁺² Görüntüleme	120

6.14.3.2. Kalbe Özgü AKG Duyu Nöron ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Spontan Ca^{+2} Görüntüleme	124
6.14.4. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Kimyasal Uygulama ile İncelenmesi	135
6.14.5. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Optogenetik İncelenmesi.....	141
7. TARTIŞMA	147
8. KAYNAKLAR	166
9. ETİK KURUL ONAYI.....	181
10. ÖZGEÇMİŞ.....	183

TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1.1 Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri	35
Tablo 5.1.2 Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler.....	36
Tablo 5.1.3 Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler	37
Tablo 5.1.4 İmmün boyamalarda kullanılan malzemeler	38
Tablo 5.2.1 Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihazlar	38
Tablo 5.2.2 <i>In vivo</i> operasyonlarda kullanılan cihaz ve malzemeler	39
Tablo 5.6.1 Solunum cihazında kullanılan değer tablosu. Hayvanın kilosuna göre ayarlanan solunum hacmi (μ l) ve solunum hızı (bpm) değerleri	49
Tablo 5.6.2 Di-8-ANEPPQ boyası ile kalbe özgü nöronların işaretlenmesi ve optimizasyonu	52
Tablo 5.6.3 Retrograd floresan boyaların uyarılma ve ışımaya özellikleri ile verilen konsantrasyon bilgisi.....	52
Tablo 5.8.1 İmmünohistokimyasal (ICC) ve immunohistokimyasal (IHC) analizlerde kullanılan birincil antikorlar.....	54
Tablo 5.8.2 İmmünohistokimyasal (ICC) boyama ve immunohistokimyasal (IHC) analizde kullanılan ikincil antikorlar.....	55
Tablo 5.12.1 Qubit RNA ölçüm kiti için solüsyonlar ve kullanım miktarları	60
Tablo 5.12.2 cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.....	60
Tablo 5.12.3 RT-qPCR’da her bir kuyucuk için kullanılan reaksiyon karışımı	61
Tablo 5.12.4 RT-qPCR’da kullanılan primerler	61
Tablo 6.10.1 Kalbe özgü AKG duyu nöronları için yapılan Gen Ontoloji Analizi sonuçları	98
Tablo 6.10.2 Kalbe özgü NG-duyu nöronları için yapılan Gen Ontoloji Analizi sonuçları	99
Tablo 6.10.3 Kalbe özgü AKG-duyu nöronları için yapılan Gen Ontoloji sınıflandırma analizi sonuçları	99
Tablo 6.14.1 ECR cihazı ile alınan KM ve AKG-K hücrelerine ait atım genliği değerleri.....	114
Tablo 6.14.2 ECR cihazı ile alınan KM ve AKG-K hücrelerine ait atım hızı değerleri.....	114

Tablo 6.14.3 ECR cihazı ile alınan KM ve AKG-K hücrelerine ait atım süresi değerleri.....	114
Tablo 6.14.4 Tek başına ekilen veya kokültürlerde spontan GCaMP6s aktivite gösteren kalbe özgü duyu nöronlarının farklı günlerdeki yüzdesini gösteren tablo	130
Tablo 6.14.5 Kokültürlerde bulunan kalbe özgü AKG nöronları ve kardiyomiyositlere ait spontan Ca^{+2} değişim sinyallerinin günlere bağlı korelasyonu.....	131



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.2.1 Fare embriyosuna ait omuriliğin şematik gösterimi.	10
Şekil 4.2.2 Nöronda aksiyon potansiyeli	13
Şekil 4.3.1 Kardiyomiyositlerde gerçekleşen aksiyon potansiyeli.....	15
Şekil 4.4.1 Sinir sisteminin kalbe dallanmasının şematik gösterimi.....	16
Şekil 4.5.1 GCaMP Ca^{+2} işaretleyicilerinin yapısı.....	21
Şekil 4.5.2 ChR2 kanal proteinin yapısı.	23
Şekil 4.7.1 P2X kanalının hücre zarındaki yerleşimi.....	28
Şekil 4.8.1 İmmün ve periferik sinir sistemi arasındaki ilişkiyi gösteren şema.....	30
Şekil 5.5.1 Percoll gradyanına hücrelerin süzdürülmesi ve santrifüj sonucunda farklı hücre gruplarını veya ölü hücre içeren altı tabakanın gözlemlenmesi.....	45
Şekil 5.6.1 Siyatik sinire Di-8-ANEPPQ uygulaması ve retrograd boyama incelemesi.	48
Şekil 5.6.2 Operasyona hazırlık aşamalarının gösterimi.....	49
Şekil 5.6.3 Kalbe ulaşmak için takip edilen adımlar.....	50
Şekil 5.6.4 Retrograd ajanların kalbe enjeksiyonu için takip edilen adımlar.....	51
Şekil 6.1.1 Di-8-ANEPPQ'nun primer hücre kültüründe boyama testi.....	71
Şekil 6.1.2 Primer canlı hücre kültüründe Di-8-ANEPPQ'nun voltaj duyarlılık analizi.	72
Şekil 6.1.3 Di-8-ANEPPQ boyasının ışımaya spektrumu.	73
Şekil 6.2.1 Di-8-ANEPPQ'nun <i>in vivo</i> işaretleme kapasitesinin siyatik sinirde test edilmesi.	74
Şekil 6.3.1 <i>In vivo</i> olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş NG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi.....	76
Şekil 6.3.2 <i>In vivo</i> olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş AKG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi.....	76
Şekil 6.3.3 <i>In vivo</i> olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş NG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi.....	77
Şekil 6.3.4 <i>In vivo</i> olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş AKG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi.....	78
Şekil 6.4.1 NG ve AKG'da bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının Di-8-ANEPPQ, DiI ve Fluorogold ile retrograde işaretlenmesi.....	79

Şekil 6.4.2 rAAV2-retro virüsünü kalbe enjeksiyonun sonra NG ve AKG nöronlarının floresan görüntüsü.....	80
Şekil 6.5.1 Belirli seviyelerdeki Di-8-ANEPPQ işaretli AKG nöronlarının görüntülenmesi.....	81
Şekil 6.5.2 Di-8-ANEPPQ'nun kalp, akciğer, karaciğer ve böbrekteki tutulumunun incelenmesi.....	82
Şekil 6.6.1 <i>In vivo</i> işaretlenmiş Di-8-ANEPPQ pozitif AKG ve NG nöronlarının immünohistokimyasal analizi.....	83
Şekil 6.7.1 Kalbe özgü duyu nöronlarının 3 boyutlu gösterimi.....	84
Şekil 6.8.1 Di-8-ANEPPQ işaretli kardiyak nöronlarının doku boyutundaki hücre gövde alan ve çaplarının analizi.....	85
Şekil 6.9.1 Fare kalbine <i>in vivo</i> Di-8-ANEPPQ verilmesi sonrası AKG ve NG hücrelerinin FACS analizi ve floresan görüntüsü.....	86
Şekil 6.9.2 Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü AKG nöronlarının Tuj-1 ile immünboyaması.....	87
Şekil 6.10.1 Kalbe özgü nöronlardan izole edilen RNA örneklerine ait fragman analizi.....	88
Şekil 6.10.2 Kalbe özgü duyu nöronlarındaki genel gen dağılımı.....	91
Şekil 6.10.3 RNA dizi analizi sonucu FACS ile saflaştırılan kalbe özgü AKG ve Nodoz sinir hücreleri ile kontrol olarak kullanılan AKG ve Nodoz hücrelerinin Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis, PCA).....	91
Şekil 6.10.4 Örneklerin Öklit uzaklığı yöntemine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi sonucu (Hirerachical Clustering based Euclidean Distance).....	92
Şekil 6.10.5 Örneklerin tüm genom profili üzerinden gerçekleştirilen kümeleme analizi sonucu Hirerachical Clustering based Euclidean Distance gösterimi.....	93
Şekil 6.10.6 DRG-T ve NG-T örneklerine göre, AKG-K ve NG-K örneklerinde yüksek ve düşük ifade edilen gen sayısını gösteren grafik.....	94
Şekil 6.10.7 RNA dizi analizi analizi sonucunda elde edilen ilk 50 gen listesi.....	95
Şekil 6.10.8 Kalbe özgü duyu nöronlarının heterojen popülasyona göre yüksek ve düşük ifade edilen G-protein kapılı reseptör (GPCR), iyon kanalı ve transkripsiyon faktörlerini gösteren heat-map.....	98

Şekil 6.10.9 RNA-dizileme analizi sonucu belirlenen aday genlerin qRT-PCR ile doğrulanması.	100
Şekil 6.11.1 Çeşitli hücre dışı matrislere ekilen primer kardiyomyosit ve AKG nöron kokültürlerinin immünboyaması.	101
Şekil 6.11.2 Kardiyomyosit ve duyu nöron kokültürlerinin incelenmesi. (A) Kokültürün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.	102
Şekil 6.11.3 Percoll grandyanı sonucu elde edilen tabakaların ışık ve floresan mikroskobu ile incelenmesi.....	103
Şekil 6.11.4 TMRM boyaması ile FACS-ayırıştırması yapılarak kardiyomyosit saflaştırması.....	104
Şekil 6.11.5 İmmünboyama sonucunda farklı konsantrasyonlarda AraC uygulanan kardiyomyosit ve AKG nöron kültürlerinin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü ve hücre sayımı.	106
Şekil 6.11.6 Kokültür çalışmaları için kullanılan bölmeler ve bu bölmelere ekilen hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü.....	107
Şekil 6.11.7 Kardiyomyosit ve AKG nöronlarının tekli kültürleri, heterojen ve bölmelere ekilen kokültürleri ile AKG dokusundaki TRPC3, piccolo, chapsyn ve MHY6 genlerinin RT-qPCR ile gen ekspresyon incelenmesi.	108
Şekil 6.12.1 Kalbe özgü duyu sinir hücreleri ile kardiyomyosit kokültürlerinin ışık mikroskobu ile incelenmesi.....	109
Şekil 6.12.2 Kalbe özgü duyu sinir hücreleri ile kardiyomyosit kokültürlerinin immünohistokimyasal incelemesi ve hücre sayımı.....	110
Şekil 6.12.3 Tek başına ve kokültür ortamındaki AKG nöron ve kardiyomyosit hücrelerinde calcein, PI ve Hoechst boyaması.....	111
Şekil 6.13.1 Titanyum plak üzerine yerleştirilen NG sinir hücreleri ile kardiyomyosit ait kokültürlerin EM ile incelenmesi.....	112
Şekil 6.13.2 Titanyum plak üzerine yerleştirilen NG sinir hücreleri ile kardiyomyosit ait kokültürlerin EM ile incelenmesi.....	112
Şekil 6.14.1 Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomyosit kokültürlerinin ECR Analizi.	113
Şekil 6.14.2 Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomyosit kokültürlerinin ECR Analizi.	115

Şekil 6.14.3 Kokültürdeki total AKG nöronları ve kardiyomiyosit hücrelerine ait Ca^{+2} değişim analizi.	116
Şekil 6.14.4 AKG nöronlarında ve kardiyomiyosit hücrelerinde GCaMP6s üretiminin takibi.....	117
Şekil 6.14.5 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve AKG nöronlarının floresan görüntüsü.	118
Şekil 6.14.6 ChR2 üreten primer yenidoğan kardiyomiyosit hücrelerinin elektriksel kontrolü.	118
Şekil 6.14.7 Kokültürlerde nöron ve kardiyomiyositin Ca^{+2} değişimleri arasında senkronizasyon analizinin adımları.....	119
Şekil 6.14.8 Fluo-4 ile boyanan NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüleri ve Ca^{+2} analizi.	120
Şekil 6.14.9 Kalbe özgü NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültüründe Fluo-4 boyaması sonrası Ca^{+2} değişim analizi.	121
Şekil 6.14.10 GCaMP6s üreten total NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüleri ve Ca^{+2} analizi.	122
Şekil 6.14.11 Aralarında pozitif korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi.....	123
Şekil 6.14.12 Kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültüründe Fluo-4 ile boyanması sonrası Ca^{+2} değişim analizi.	125
Şekil 6.14.13 GCaMP6s üreten total AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüleri ve Ca^{+2} analizi.....	126
Şekil 6.14.14 Aralarında pozitif korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi.....	128
Şekil 6.14.15 Aralarında negatif korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi.....	128
Şekil 6.14.16 Aralarında birebir korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi.....	129

Şekil 6.14.17 Tek başına ekilen veya kokültürlerde spontan aktif GCaMP6s üreten kalbe özgü duyu nöronlarının farklı günlerdeki yüzdesini gösteren grafik.	131
Şekil 6.14.18 Tek başına ekilen veya kokültürdeki kalbe özgü AKG nöronu ve kardiyomiyositlere ait frekans değerleri.....	132
Şekil 6.14.19 Onuncu güne ait tek başına ekilen veya kokültürlerde bulunan kardiyomiyositlere ait dakikada atım sayısı değerlerini gösteren grafik.	133
Şekil 6.14.20 Aralarında pozitif korelasyon olduğu belirlenen Di-8-ANEPPQ (-) AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi.....	134
Şekil 6.14.21 FACS ile ayrıştırılan ve kültür kaplarına ekilen Di-8-ANEPPQ (+) ve Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının çap analizini gösteren grafik.....	135
Şekil 6.14.22 İlaç uygulaması öncesi ve sonrası kokültürlerdeki hücrelerin Ca^{+2} bağlı floresan değişimleri arasındaki senkronizasyon analizinde takip edilen adımlar.	135
Şekil 6.14.23 İsoproterenol uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği.	137
Şekil 6.14.24 İsoproterenol uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişimini gösteren grafik ve hücreler arası korelasyon analizi.	138
Şekil 6.14.25 CNQX uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği.	139
Şekil 6.14.26 Mecamylamine uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği.	140
Şekil 6.14.27 Carbenoxolone (cbx) uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği.	141
Şekil 6.14.28 Optogenetik araçlar ile hücrelerin elektriksel aktivitesinin kontrolü.	142
Şekil 6.14.29 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve GCaMP6s-ifade eden spinal nöron kokültürlerinde optogenetik uygulama ile hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kontrolü.	143
Şekil 6.14.30 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve GCaMP6s-ifade eden spinal nöron kokültürlerinde optogenetik uygulama ile hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kontrolü.	144

Şekil 6.14.31 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve GCaMP6s-ifade eden spinal nöron kokültürlerinde optogenetik uygulama ile hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kontrolü.	145
Şekil 6.14.32 Optogenetik yöntem kullanılarak kokültürdeki nöron ve kardiyomiyosit hücrelerinin frekans ve genlik değerlerini gösteren grafik.	146



1. ÖZET

SİNİR HÜCRELERİ İLE KALP KASI HÜCRELERİ ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİN MOLEKÜLER VE ELEKTROFİZYOLOJİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Kalbe dallanan otonom sinir sistemi ve duyu nöronları kalp kası hücreleri (kardiyomiyosit) ve kalbin çalışmasını düzenler. Kalpte oluşan ağrı, basınç ve gerilme gibi duyuusal bilgilerin bağlantılı olduğu arka kök gangliyon (AKG) ve nodoz gangliyonda (NG) bulunan nöronlar tarafından beyne iletildiği bilinmektedir. Ancak, kalbe ait bu duyuusal veriyi taşıyan duyu nöronlarının karakteri, moleküler ve elektrofizyolojik özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, literatürde ilk olarak kalbe özgü AKG ve NG duyu nöronları işaretlenerek saflaştırıldı, karakterize edildi ve kardiyomiyositler ile arasındaki elektriksel iletişim *in vitro* ortamda incelendi. Kardiyak aferentleri işaretlemek için değerlendirilen dört farklı retrograd boya içerisinde, Di-8-ANEPPQ'nun en yüksek işaretleme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Üç boyutlu görüntüleme ve hücre çap analizleri sonucunda, kalbe özgü duyu nöronlarının AKG ve NG'da bilateral olarak homojen dağıldığı ve hücre boyutlarının 20 µm'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Genel transkriptom profili değerlendirdiğinde, saflaştırılan kalbe özgü duyu nöronlarının total duyu nöron popülasyonuna göre Scn10a, Scn11a, Mrgpa3, Mrgpd gibi iyon kanallarını yüksek ifade ettikleri tespit edilmiştir (p<0.05). İmmünboyama, RNA dizi analizi ve hücre çap analizi kardiyak aferentlerin nosiseptif nöronlar olduğunu göstermektedir. Kalsiyum (Ca²⁺) işaretleyici GCaMP6s kullanılarak yapılan analizlerde, kokültürlerdeki kalbe-özgü duyu nöronlarının elektrofizyolojik aktivite gösterdiği ve hücreler arasında Ca²⁺'a bağlı sinyal korelasyonu (>0.5) olduğu bulunmuştur. Kokültürdeki kardiyomiyositlerin ışık ile optogenetik uyarımı sonucunda, duyu nöronlarının Ca²⁺ değişiminde artış gözlemlenmiş ve bu veriler bu iki hücre grubu arasındaki elektriksel bağlantıyı *in vitro* olarak literatürde ilk kez göstermiştir. Bu tez çalışması ile kalbe özgü duyu nöronlarının gen ifade profili, kardiyomiyositlerle olan elektriksel etkileşiminin ve moleküler mekanizması değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, kalp ve duyu sinir sistemi arasındaki iletişiminin daha detaylı incelenmesine ve gelecekte ilişkili hastalıkların patolojisinin anlaşılmasına yönelik çalışmalarda etkin veriler sunacağı öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Ca²⁺ Görüntüleme, Kalbe Özgü Duyu Nöronları, Optogenetik, Retrograd İşaretleme, RNA Dizilime Analizi

*Bu araştırma TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 115S381 nolu Proje kapsamında desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE NEURON AND CARDIAC MUSCLE CELL INTERACTION AT THE MOLECULAR AND ELECTROPHYSIOLOGICAL LEVEL

Heart muscle contraction is controlled by cardiac muscle cells (cardiomyocytes) and neurons. It is known that sensorial information such as pain, pressure, and stretch is transmitted into the brain via the neurons located in the dorsal root ganglion (DRG) and nodose ganglion (NG). However, the molecular and electrophysiological mechanism at how sensorial input from the heart is conveyed is unclear. In this thesis, cardiac afferents in DRG and NG were labeled, purified, and characterized at the molecular level and their electrical interaction between cardiomyocytes was analyzed. From four retrograde tracers evaluated, Di-8-ANEPPQ yielded the highest labeling efficiency of cardiac afferents. 3D imaging of the whole tissues and cell diameter measurement from tissue sections revealed the homogeneous and bilateral distribution of cardiac afferents having a cell diameter smaller than 20 μm . Based on the global transcriptome profile and immunohistochemical analysis, purified cardiac sensory cells expressed at high levels highly ion channels such as *Scn10a*, *Scn11a*; G-coupled proteins such as *Mrgpa3*, *Mrgpd* compared to total sensory neuron population ($p < 0.05$). RNA sequencing and cell diameter and immunolabeling with TRPV1 analyzes revealed that cardiac afferents showed the molecular character of nociceptive neurons. In the co-culture system, neurons became active when interacting with the cardiomyocytes and a correlation in electrical interaction between cells was found (>0.5 or <-0.5). After optogenetic stimulation of cardiomyocytes, an increase in calcium exchange in the neurons was observed confirming the electrical interaction between cells. Through this study, for the first time in the literature gene expression profile of cardiac sensory neurons was revealed, and sensory neuron cardiomyocyte interaction was examined. This information will shed light on the mechanism of how sensory input is relayed to the brain at the cellular and molecular level of normal and disease conditions.

Keywords: Calcium Imaging, Cardiac Sensory Neurons, Optogenetics, Retrograde Labeling, RNA Sequence Analysis

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

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar dünya genelinde ölümlerin %30'unu oluşturmaktadır. Yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine yönelik yapılan yoğun çalışmalara rağmen ölümlerin başlıca sebeplerinden biri kalp hastalıkları olmaya devam etmekte ve Türkiye’de de bu durum ciddiyetini korumaktadır. Bu nedenle, kalp gelişimi ve hastalıklarının moleküler temelini incelemeyi amaçlayan araştırmalar tıp dünyasında öncelikli hale gelmiştir.

Vücuda kanı pompalayan kalbin kasılması, kalbin sağ üst karıncığında bulunan özelleşmiş kardiyomiyositler olan ve doğal kalp pili olarak da bilinen sinoatriyal düğüm (SA) tarafından başlatılmaktadır (1). SA düğüm kalp ritmini, iletim hızını, miyokardiyal kasılma gevşeme gücünü, sistol ve diastolü kontrol eden parasempatik ve sempatik sinirler ile donatılmıştır (2,3). Sempatik ve parasempatik sinirler otonom sinir sisteminin bir parçasıdır ve merkezi sinir sisteminden kardiyak dokuya motor komutları taşımaktadır (2–4). Beyinden gelen sempatik ve parasempatik sinirler dışında, kardiyak otonom sinir sistemi duyu sinirleriyle iletişim halinde bulunan intrinsik kardiyak gangliyon ve ekstrakardiyak intratorasik gangliyon merkezlerine sahiptir (5). Diğer taraftan, kalpte oluşan basınç, ağrı, gerilme gibi duysal veriler kalbe dallanan ve hücre gövdeleri arka kök gangliyon (AKG) veya nodoz gangliyonda (NG) bulunan duyu sinirleri tarafından beyne iletilmektedir (2,6). Kol, bacak gibi ekstremiteler ile kalp, akciğer, bağırsak gibi iç organlar olmak üzere farklı organlara dallanan AKG duyu nöron gövdeleri omuriliğin farklı seviyesinde yer almaktadır (7). Bunun yanında, AKG nöronları gelişimsel süreçte vücudun uzaysal konumunu algılayan proprioseptör, mekanik değişimlere duyarlı düşük eşikli mekanoreseptörler, soğuk veya sıcak ile uyarılan sıcaklık reseptörleri, ağrıdan sorumlu nosiseptörler ve kaşıntıyı algılayan pruriseptör olmak üzere farklı alt tiplere ayrılmaktadır (8).

Omuriliğin farklı seviyelerinden çıkan, iç organ ve ekstremitelere innerve olan AKG duyu nöronları çeşitli duyuları algılamak üzere farklı alt tiplere özelleşmiştir. Benzer şekilde, farklı reseptörlere sahip NG’da bulunan duyu nöronlarının organlara özgü farklılaşarak duysal veriyi iletmekle sorumlu oldukları önerilmiştir. Yapılan optogenetik çalışmalar farklı reseptörleri ifade etmesi ile birbirinden fonksiyonel

olarak ayrılan NG duyu nöronlarının duysal veriyi beyne iletmenin yanında fonksiyonel olarak da ilişkili olduğu bölgeyi kontrol ettiğini önermiştir (9,10). AKG ve NG nöronları ile taşınan duysal veri, geri bildirim ile kalbin içsel veya beyinde sonlanan otonom sinirlerinin oluşturduğu motor komutun düzenlenmesinden önemli rol oynar (11).

Literatürde yapılan çalışmalarda, retrograd boyalar kullanılarak kalbe özgü AKG nöronlarının C5-C8 ile T1- T4 arasındaki boyun omurlarında konumlandıkları ve NG'daki varlıkları gösterilmiştir raporlanmıştır (12–15). Histolojik çalışmaların yanında, kalbe özgü NG ve AKG duyu nöronları retrograd boya ile işaretlenerek, saflaştırılmadan hücre kaplarına ekilmiş ve çeşitli ağrı uyaranlarına verdikleri cevaplar ölçülmüştür (16). Duyu sinirleri kimyasal ve/veya mekanik olarak uyarılabilir. Bu farklı uyarı mekanizmaları, farklı duyu hücre gruplarını aktive ederek AKG ve NG 'da fonksiyonel farklılaşma ile açıklanabilir. Örneğin, NG'da bulunan duyu nöronları kalbe dair sadece kimyasal bilgiyi beyne iletirken, AKG duyu nöronlarının kalbe ait mekanik ve kimyasal veriyi beyne taşıdığı önerilmiştir (17,18). AKG ve NG duyu nöronlarının önemli bir role sahip olmasına rağmen, kalpten gelen duysal bilgiyi moleküler ve hücresel düzeyde iletim mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir.

Literatürde, periferik sinir sistemi dahilinde AKG ve NG duyu nöronları tek hücre düzeyinde veya doku boyutunda RNA dizilime analizi ile incelenmiş ve yüksek veya düşük ifade ettikleri gen grupları göz önünde bulundurularak sınıflandırılabilmiştir (19–21). Kısıtlı sayıda çalışma, organa özgü nöronları RNA dizilime yöntemi ile incelemiş veya optogenetik yöntemi kullanılarak bağırsağa, akciğere özgü NG nöronları tanımlanabilmiştir (10,22,23). Hockley ve ark. fast blue adlı retrograd boya kullanarak bağırsağa özgü AKG duyu nöronları işaretlemiş, floresanca aktifleştirilmiş hücre ayırıcı (FACS) cihazı ile boyalı hücreleri tek hücre düzeyinde saflaştırmış ve RNA dizilime yöntemi ile gen ifade profillerini incelemişlerdir (24). Diğer bir çalışmada ise farede burun deliğine fast blue verilerek solunum yolları ile ilintili NG duyu nöronlarını işaretlenmiş, FACS ile saflaştırılmış

ve RNA kalite özellikleri gösterilmiştir (25). Ancak kalbe özgü duyu nöronlarının gen ifadelerine dahil bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında; kalbe özgü duyu nöronlarının taşıdığı duysal verinin tanımlanması ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki moleküler ve elektrofizyolojik ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, ilk aşamada kalbe özgü duyu sinir hücreleri Di-8-ANEPPQ retrograd boya ile *in vivo* işaretlenerek FACS cihazı ile saflaştırılmıştır. FACS ile saflaştırılmadan Di-8-ANEPPQ işaretli hücre kaplarına ekilen heterojen ve total nöron kültürü incelendiğinde, AKG veya NG duyu nöronlarının %34'nü kalbe özgü duyu nöronlarının oluşturduğu ilk defa bu tez çalışması ile ortaya koyulmuştur. Saflaştırılan kalbe özgü AKG ve NG duyu nöronlarının genel gen profili ile karşılaştırmak amacıyla Di-8-ANEPPQ'nun çözücüsü olan DMSO aynı miktarda kalbe enjekte edilerek 'SHAM' grubu oluşturulmuştur. 'SHAM' grubuna ait AKG ve NG da enzimatik aşamalardan geçirilerek hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Kalbe özgü veya 'SHAM' grubuna ait AKG ve NG nöron hücre süspansiyonu RNA dizi analizi metodu kullanılarak genel gen profilleri oluşturulmuş ve gruplar karşılaştırarak kalbe özgü duyu nöronlarının diğer sinir hücreleri ile benzerlikleri veya farklılıkları ortaya konulabilmektedir. Kalbe özgü AKG ve NG nöronları ile total AKG ve NG nöron popülasyonunun genel gen profilleri karşılaştırıldığında, kökenlerine göre AKG ve NG nöronlarının birbirlerinden ve kalbe özgü duyu nöronlarının ise genel duyu nöron popülasyonundan ayrıldığı gösterildi. Ayrıca, diferansiyel analiz yöntemi kullanılarak kalbe özgü AKG nöronlarının total AKG nöronlarına göre Scn10a (Nav1.8), Scn11a (Nav 1.9), P2xr2, chn4a, Kcnp2i, Kcnp4, Fxyd2 gibi iyon kanalları ile mrgrpa3, mrgrpx1, mrgrpb4, Cystlr2 gibi G protein kapılı iyon (GPCR) kanallarına ait genleri Log₂ tabanlı kat değişimi 1.5 kat ve üstü olacak şekilde ifade ettiği tespit edilmiştir. Kalbe özgü NG nöronlarında ise yüksek ifade edilen gen sayısının kalbe özgü AKG duyu nöronlarına kıyasla az olmakla beraber, P2xr2 iyon kanalın ile Fibroblast büyüme faktörü 3'ün (fgf3) ve bir nikotionik asetil kolin düzenleyici Lynx protein LY6/PLAUR domain-containing 6 (Lypd6) yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir.

Genel gen profilinin incelenmesinin yanında, kalbe özgü duyu sinir hücreleri tek başına veya kardiyomyosit hücreleri ile birlikte hücre kaplarına ekilerek, hücreler arası elektriksel iletişim Ca^{+2} işaretleyiciler ve optogenetik araçlar kullanılarak araştırılmıştır. Ekilen duyu nöronlarında, kokültürdeki nöronlara göre aktif olan hücre sayısının azlığı ve aktif olanlarda frekansın düşük olarak belirlendi. Ayrıca, kokültürlerdeki spontan olarak aktif olan kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomyosit hücreleri arasında eş zamanlı Ca^{+2} değişimi Matlab yazılımı kullanılarak gösterildi. Spontan aktivitenin yanında, hücreler uyarılarak aralarındaki elektriksel iletişim ayrıntılı olarak incelendi. Bunun için bir beta adrenerjik durdurucu olan isoproterenol kültürlerine eklendiğinde tek başına olan kalbe özgü AKG hücrelerinde bir değişiklik olmazken, kardiyomyositlerin atım hızının artması ile kokültürlerde bağlantılı olabilecek nöronlarda aksiyon potansiyel frekansının arttığı gözlemlendi. Kimyasal uyarımın yanında, hücreler arası elektriksel iletişim optogenetik araçlarla da incelendi. Bunun için, viral yolla kanalrodopsin-2 (ChR2) aktarılan kardiyomyositler mavi ışık ile uyarılarak bağlantılı olabileceği kalbe özgü duyu nöronlarındaki Ca^{+2} değişimi takip edildi. Yapılan optogenetik uyarım sonucunda, kokültürlerde spontan aktivite gösteren kalbe özgü duyu nöronu Ca^{+2} sinyal frekanslarının, etkileşim halinde ChR2 üreten kardiyomyositlerin uyarılması ile arttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile kalbe özgü duyu nöronları literatürde ilk olarak *in vivo* işaretlendi ve saflaştırıldı, bu özel popülasyonun transkriptom profili araştırıldı ve kardiyomyosit hücreleri ile olan sinyal alışverişi kimyasal ve optogenetik araçlar ile incelendi. Bu çalışma kapsamında RNA dizi analizi sonucu elde edilen gen listesi kullanılarak kalbe özgü nitelikte ifadesi saptanan aday kanal proteinleri belirlenmiş, gelecek çalışmalarda transgenik hayvan modellerinde ve benzeri *in vitro* modellerde, kalbe özgü nöronlar ile kalp arasındaki iletim detaylı incelenebilir. Bu tez çalışmasında, kalbe özgü duyu nöronlarını AKG ve NG'da bulunan diğer nöron gövdelerinden ayıran, hücresel ve moleküler özellikler literatürde ilk defa ortaya konmuştur.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, çevreden ve canlının iç sisteminden gelen uyarıyı algılamak, gelen duyuşsal veriyi değerlendirmek ve bütünlüştürerek motor komut oluşturmak üzere gelişmiş ve özelleşmiştir. Sinir sistemi merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır. Merkezi sinir sisteminin elemanları beyindeki nöronlar ve omurilik iken, periferik sinir sistemi kafatası ve omurilikten köken alan ve ayrılarak vücuda dağılan sinir lifleri ağından oluşmaktadır. Periferik sinir sisteminde, duyuşsal veriyi merkezi sinir sistemine ileten sinir lifleri getirici (aferent) olarak adlandırılırken, götürücü (eferent) nöronlar ise işlenen duyuşsal veri sonucunda beyinde oluşan motor komutları hedeflerine ulaştırmaktan sorumludur. Diğer taraftan, istemli kontrolden bağımsız iç organların fonksiyonlarını düzenleyen otonom sinir sistemi parasempatik ve sempatik sinirler olmak üzere ikiye ayrılır (26).

Sinir sistemini nöronlar ve destekleyici hücreler olmak üzere iki hücre tipi oluşturmaktadır. Nöronlar aldıkları veriyi hedefe ulaştırmakla sorumluyken, destekleyici hücreler sinir hücrelerinin işlevsel olarak çalışmasına destek olurlar. Schwann ve satellit hücreleri periferik sinir sisteminin; oligodendrosit, mikrogliya, astrosit ve endodermal hücreler ise merkezi sinir sisteminin destek hücreleridir (27).

Sinir sistemini oluşturan ve sinyal iletiminden sorumlu olan nöronlar fonksiyonlarına ve yapılarına göre sınıflandırılmaktadır. Üstlendikleri fonksiyonlar göz önüne alındığında, nöronlar getirici (duyuşsal, aferent) veya götürücü (motor, eferent) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Getirici nöronlar, duyuşsal veriyi merkezi sinir sistemine taşıırken, götürücü nöronlar beyinde oluşan motor komutları hedef noktalara taşırlar. İnternöronlar ise nöronlar arasında destekleyici ve bütünlüyci bir görev üstlenirler. Motor nöronlar somatik ve otonom olmak üzere ikiye ayrılırlar. Somatik nöronlar refleks ve istemli hareketten sorumluyken, otonom sinir sistemi parasempatik ve sempatik olmak üzere iki alt sınıfa ayrılan ve istem dışı hareketlerden sorumlu olan nöronlardan oluşmaktadır (26,27). Diğer taraftan, sinir hücre gövdesinden çıkan

uzantılarının sayısı göz önünde bulundurularak nöronlar yapılarına göre de alt gruplara ayrılmaktadır. Hücre gövdesinden tek bir uzantı çıkararak T şeklini alan nöronlar psödounipolar olarak adlandırılmaktadır ve AKG nöronları psödounipolarlara sınıfına bir örnektir. Bunun yanında, hücre gövdesinden gözdeki retina hücreleri gibi iki uzantı çıkan nöronlara bipolar; birden fazla aksona sahip ve dendrit uzantıları ile kuşatılmış motor nöron gibi nöronlar ise ve multipolar nöron tipine örnektir (27).

4.2. Duyusal Sinir Sistem

Duyusal sinir sistemi, her biri farklı uyarıyı algılayan reseptörlere sahip duyu nöronlarından oluşmaktadır. Duyusal reseptörler; tat, ses, koku gibi duyu veriyi nöronların iletebileceği enerji formuna çevirerek, gelen bilginin merkezi sinir sistemine taşınmasını sağlamaktadır. Ses, ışık, koku gibi birbirinden farklı duyu uyarı, izledikleri nöral yolak ve oluşturdukları sinaptik bağlantılarla beyin çeşitli bölgelerine iletirler. (27). Duyusal nöron sınıfına ait olan AKG nöronları ağrı, ısı, basınç gibi duyu veriyi algılamak üzere özelleşmiş olup, omuriliğin arka boynuzundan çıkarlar (28). Duyusal sinir sistemi, duyu veriyi vücut yüzeyinden veya iç organlardan alan sırasıyla alan somatik ve viseral olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

4.2.1. Arka Kök Gangliyonu (AKG)

Embriyonik dönemde AKG duyu nöronları, arka nöral tüpten göçen nöral krest hücrelerinden farklılaşmaktadırlar. Multipotent kapasiteye sahip olan nöral krest hücreleri, periferik sinir sistemi elemanı olan duyu, sempatik ve enterik sinir hücrelerine dönüşme kapasitesine sahiptir (29).

Kemik morfogenetik protein (Bone morphogenetic protein, BMP) ile WNT sinyalleri nöral tüpte bulunan epitel-mezenkimal hücrelerinin nöral krest hücrelerine dönüşmesini sağlamaktadır. Oluşan nöral krest hücreleri, nöral tüpü çevreleyen bazal laminanın açılmasıyla göç eder ve zincir benzeri yapılar halinde bir araya gelerek AKG'ları meydana gelir. Nöral krest hücrelerinin AKG nöronlarına dönüşmesinde neurogenin1 ve neurogenin2 adlı transkripsiyon faktörleri rol oynamaktadırlar.

Brn3aA ve Islet1 transkripsiyon faktörleri ise, oluşan AKG nöronlarında bir süre sonra Neurogenin1 ve Neurogenin2 genlerinin ifade edilmesini engelleyerek farklı duyu nöron alt tiplerinin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. AKG nöronlarının belirli duysal veriye duyarlı olması ve özelleşmesi, ifade ettikleri farklı nörotrofik faktörlere yüksek afiniteleri olan nörotrofik tirozin reseptör kinazlar (Trk) ile gerçekleşmektedir. Trk ailesinden TrkA sinir büyüme faktörü (NGF) ile, TrkB reseptörleri beyin kökenli nöron faktörü (BDNF) ve nörotrofin 4 (NT4) ile ve son olarak TrkC reseptörü NT3 nörotrofik faktör ile aktif hale geçer. Multipotent kapasitedeki nöral krest hücreler, ilk olarak TrkC'yi ifade eden miyelin miktarı yüksek olan (A β -fiber) proprioseptörler ile TrkB ifade eden mekanoreseptörlere farklılaşmaktadır. İkincil ve üçüncül farklılaşma evresi olarak isimlendirilen aşamada ise nöral krest hücreler, TrkA reseptörü üreten miyelinsiz C tipi ile az miyelinli A δ tipi AKG nöronlarını oluşturmaktadır. Farklılaşmanın son evresinde oluşan bu nöronlar, embriyonik dönemin ilerleyen safhalarında nosiseptör, thermoreseptör, pruriseptör ve düşük eşikli mekanoreseptör C fiberi veya C-mekanoreseptörler olarak özelleşmektedirler (8).

Sahip oldukları moleküler karakter ve iyon kanallarındaki çeşitlilik sayesinde AKG nöronları farklı modalitelere özelleşerek uyaranlara cevap oluştururlar. Örneğin, TrkA⁺ üreten peptiderjik ve TrkA⁻ peptiderjik olmayan nosiseptör nöronlar ağrı ile ilişkili uyaranları algılamaktadırlar. Peptiderjik nöronlarının, TrkA reseptörlerini taşımasının yanında kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ve substance P (SP) nöropeptidlerini de sentezlediği tespit edilmiştir. Peptiderjik nöronların aksine, peptiderjik olmayan nöronlar TrkA ifadeleri azalmakta ve bir kısmı bir yüzey belirteci olan izolektin B4 (IB4) ile işaretlenebilen Ret ifadeleri artmaktadır. Nosiseptörlerden farklı olarak, TrkB⁺/TrkC⁺ AKG nöronları geniş çaplı hücre gövdelerine sahip düşük eşikli mekanoreseptör iken, sadece TrkB⁺ üreten AKG nöronları proprioseptör tipte olup eksterimite hareketi ve konumunu algılamaktadırlar (29). Buna göre, sahip oldukları farklı reseptör tipi ve iletimlerinden sorumlu oldukları duysal verilere göre AKG nöronları aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır (8):

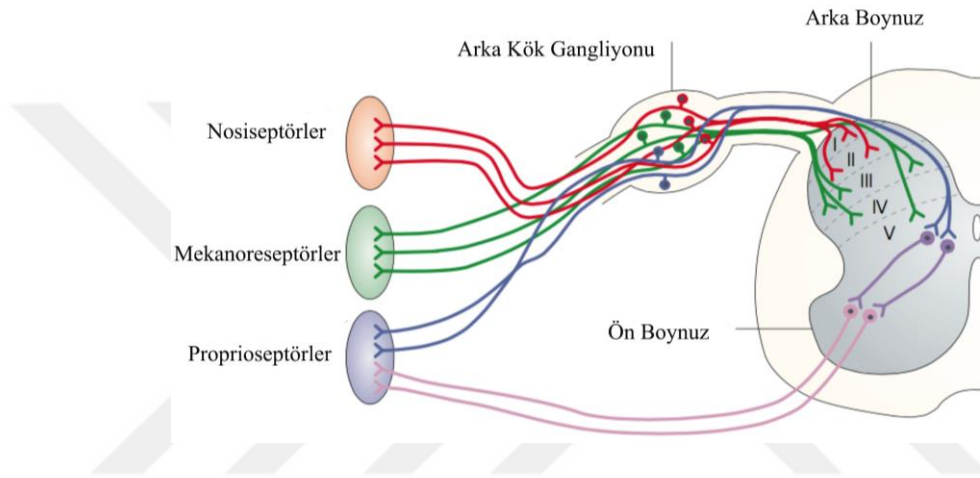
- i) Vücudun uzaysal konumunu algılayan **proprioseptör**,
- ii) Dokunma, basınç ve titreşimi algılayan **düşük eşikli mekanoreseptörler**,

iii) Soğuk veya sıcak iletken **sıcaklık reseptörleri**,

iv) Ağrı ile oluşan yüksek eşikli uyarıyı algılayan **nosiseptörler**,

v) Ve kaşıntı ile ilişkili uyarıyı **pruriseptörler**.

AKG nöronları taşıdıkları farklı moleküler kimliğin yanında, ayrıca anatomik olarak da birbirinden ayrılmaktadır. Omuriliğin farklı bölgelerinde sonlanan her bir AKG duyu nöron tipi kendi duyu yollarını oluşturmaktadır (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.2.1 Fare embriyosuna ait omuriliğin şematik gösterimi. AKG' dan çıkan fiberler, bir taraftan omurilik üzerinden özgü laminalara girerken diğer taraftan periferde bulunan hedef dokulara dallanmaktadır. Kırmızı ile gösterilen nosiseptörler lamina I ve II'ye; yeşil ile gösterilen mekanoreseptörler lamina III, IV ve V'e; Proprioseptörler arka boynuzun tüm laminalarından geçerken ayrıca ön boynuzla da bağlantı kurar (30).

Yapısal olarak psödounipolar olan AKG duyu nöronları hücre gövdelerinden çıkan tek akson uzantısıyla hedef dokuya ve omuriliğe uzanırlar. Arka intervertebral boşluklarda konumlanan AKG'larının 8'i servikal (C), 13'ü toraks (T), 5 veya 6'sı lomber (L) ve 4'ü sakral olmak üzere farede toplamda 30-31 çifttir. Hedef dokudan duyu veriyi alan proprioseptör, nosiseptör, pruriseptör, mekanoreseptör ve termoreseptör tipi AKG nöronları omurilikteki 5 laminadan birine giriş yaparak beyne ulaşmaktadırlar (30). Yapılan çalışmalar özelleşmiş her bir somatik algının (modalite) iletilmesinin ve algılanmasını "popülasyon kodlama hipotezi" ile açıklamaktadır. Seçicilik olarak adlandırılan bu hipoteze göre her bir duyu kendisine özelleşmiş duyu ağı veya işaretlenmiş yol ile periferden beyne iletilmektedir. Seçicilik

hipotezine göre, bir duyuşal verinin aktarılmasında bazı durumlarda birden fazla işaretlenmiş yol aktif hale gelir. Bu nedenle, duyuşal verinin algılanması temel olarak işaretlenmiş yollar arasındaki iletişim ağı ile gerçekleştirilir. Örneğın, herhangi bir ağı hissi yaratmayan soğuk hissi hem soğuk algılayan hem de ağı algılayan duyu fiberlerini uyarır. Ancak soğuk algılayan sinyalleri ağı yolağını maskeleyesiyle ağı hissedilmez sadece soğuk hissi oluşur. Her bir somatik aferent özel nöral devreler veya ağı ile bağlantılıdır. Bu bağlantının tümü duyuşal-işaretlenmiş yolak olarak adlandırılmaktadır. Normal koşullarda bir somatik duyu fiberinin uyarılması sadece ona özgü duyumsamayı sağlar. Patolojik koşullarda, işaretlenmiş bir yolağın bozulması, normalde baskılanması gereken bir duyunun ortaya çıkmasına sebep olabilir (31). Örneğın, normal fizyolojik koşullarda soğuk uyarının algılanması sırasında Aδ fiberlerinin oluşturduğu yolak, aynı zamanda aktif olan ve ağı ile ilintili C fiberlerini baskılamakta ve böylece soğuk algılandığında ağı hissini oluşmasını engellemektedir. Ancak, nöropatik ağırdan şikayetçi hastalarda bu durum değışmekte, Aδ fiberlerinin olası dejenerasyonu veya lezyonu sonrası baskılama ortadan kalkarak hasta soğuk uyarısına karşı da ağı duymaktadırlar (31).

4.2.2. Nodoz Gangliyon (NG)

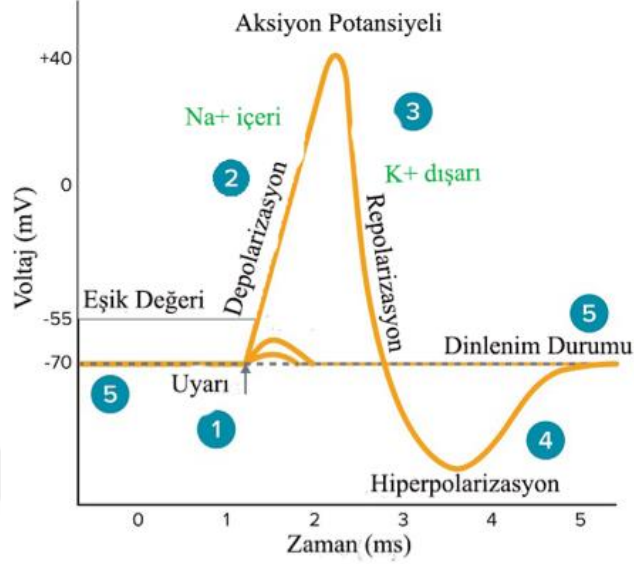
Vagus sinirin alt düğümü olan NG, içerdığı duyu sinir gövdeleri ile iç organlardan aldığı duyuşal veriyi beyne iletmek ile sorumludur. Vagus sinirin hücre gövdesi olan NG, orta beyinde bulunan epibransiyal plakalardan farklılaşmışlardır. Gelişimsel süreçte, epibransiyal plakaların oluşumu sırasında Neurogenin2 geni Neurogenin1'e göre daha yüksek seviyede ifade edilmektedir (32). Ektoderm tabakasından köken alan epibransiyal plakalar, farklılaşmadan önce Pax2 ve Fox1 gibi genleri ifade ederler. Sonrasında Sox3 ifade etmeye başlayan epibransiyal plakalar, komşu dokulardan yayılan sinyaller ile plaka-özgü genleri ifade eder ve sırasıyla genikulat (geniculate), petrozal and nodoz sinir hücrelerine farklılaşırlar. Bir transkripsiyon faktörü olan Phox2a ve ilişkili olduğu Phox2b ise NG nöron alt tiplerinin oluşumunda ve bu nöronların canlılığında görev almaktadır. Diğer taraftan, NG'da bulunan satelit glia hücreleri ise nöral krestten köken alır (32).

Anatomik olarak incelendiğinde NG, omurilik soğanından köken alan ve kafatasından juguler delikten ayrılan kranial 10. yüz siniri olan vagus sinirin bir uzantısıdır. Vagus sinirine ait duyuşsal veriyi taşıyan ve psödounipolar yapıdaki duyuş nöron gövdelerini içeren NG, juguler düğümün kuyruk kısmında yer alır. Kalp, akciğer, bağırsak gibi iç organlardan aldığı duyuşsal veriyi taşıyan NG, soliter çekirdeğe girerek beyne ulaşır. İç organlardan gelen duyuşsal veriyi NG aracılığı ile beyne iletmekle sorumlu olan vagus siniri, parasempatik, motor ve somatik fiberleri de taşımaktadır (33). Sindirim, solunum ve kardiyovasküler sistemler üzerindeki rolünün yanında inflamasyon, ruh hali ve ağrının düzenlenmesinde de rol alması, klinikte vagus sinirin elektriksel olarak uyarılarak tedavi amaçlı başvuruşulan bir yöntem halini almıştır (34). Vagus sinir uyarımı olarak adlandırılan bu tedavide, elektriksek uyarımı sağlayan bir implant vagus sinire yerleştirilerek depresyon, epilepsi ve aritmi gibi hastalıkların tedavisi amaçlanmıştır (35).

4.2.3. Nöronda Aksiyon Potansiyeli

Aksiyon potansiyeli, sinir hücrelerinin aldıkları veriyi kodlamasına ve elektriksel olarak taşımaya olanak sağlamaktadır. Nöronda, hücre dışı ve hücre içindeki iyonların farklı konsantrasyonda olması ve hücre zarının seçici geçirgen özelliğı aksiyon potansiyelinin temelini oluşturmaktadır. Pozitif yüklü iyonların (katyonlar) ve negatif yüklü iyonların (anyonlar) hücre içi ve hücre dışı sıvıda eşit dağılmamasından dolayı hücre zarında bir voltaj farkı oluşur ve bu fark zar potansiyeli olarak adlandırılmaktadır (36). Dinlenme durumundaki (resting potential) bir nöronun zar potansiyeli yaklaşık -70 mV' tur. Hücreye gelen uyarı zar potansiyeli için gerekli olan eşik değerini geçtiğinde, voltaja duyarlı Na⁺ kanalları açılarak hücre içine Na⁺ gerçekleşir. Dinlenme durumunda hücre dışına göre daha negatif olan hücre içi, Na⁺ girişi ile depolarize olarak pozitif yüklenir. Na⁺ kanallarının açılmaya devam etmesi ile depolarizasyon süreci uzar ve nöron ateşlenerek aksiyon potansiyeli meydana gelir (27,36). Zar potansiyeli +40 mV olduğunda, Na⁺ kanalları inaktif hale geçer ve bu sayede Na⁺ kanallarının voltaj değişimine karşı tekrardan açılması engellenir. Bu sırada voltaj kapılı K⁺ kanalları açılır, hücre içinde konsantrasyonu daha yüksek olan K⁺ iyonu hücre dışına gönderilir ve hücre dinlenme potansiyeline geri döner. Aksiyon potansiyelinin aşağı inişlerinde açılan voltaja bağılı K⁺ kanalları, art potansiyelinin

oluşumuna sebep olarak hücreyi dinlenme durumundan daha negatif bir hale çeker. Nöronda gerçekleşen aksiyon potansiyeli çok hızlı olup, yaklaşık 1 ms uzunluğundadır (27,36,37).



Şekil 4.2.2 Nöronda aksiyon potansiyeli (37).

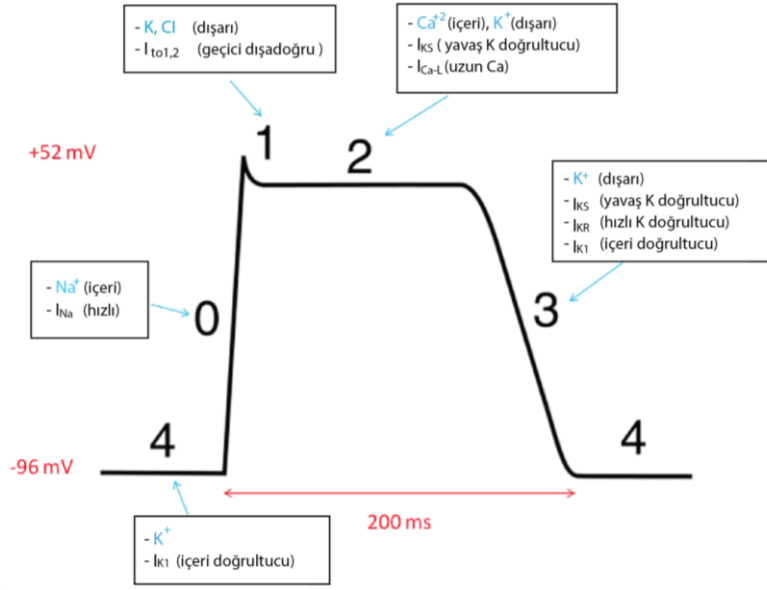
4.3. Kardiyovasküler Sistem

Kalp ve damar sistemi vücuda gerekli olan O_2 ve besini kan aracılığıyla tüm vücuda iletirken, metabolizma sonucu oluşan artık ürünleri de hücrelerden uzaklaştırmakla sorumludur. Pompa görevi gören kalp, atriyum ve ventrikül olmak üzere iki farklı kalp kasından oluşmaktadır. Kas ve damar ağından oluşan kalpten çıkan, aort ile besin ve oksijence zengin kan (sistemik dolaşım) vücuda iletilir. Pulmoner dolaşımında ise, CO_2 ve besin atıklarını taşıyan kan vena kava yolu ile kalbe geri döner ve pulmoner arter ile sağ ventrikülden çıkarak akciğere gönderilir. Akciğerde, CO_2 ve O_2 değişimi gerçekleştirilir ve oksijence zengin kan pulmoner venler ile sol atriyuma iletilir (26). Kalbin elektriksel aktivitesi sonucu, atriyum ve ventriküller kasılıp gevşeyerek sistemik ve pulmoner dolaşım gerçekleşmektedir. Kalp kaslarının kasılıp gevşemesi kalbe dallanan sinir sistemi, ileti sistemi (conduction system) ve kardiyomiyositler tarafından kontrol edilmektedir (1). Atım üretici (pacemaker) olarak adlandırılan sinoatriyal düğüm, atriaventriküler düğüm, His demeti ve purkinje fiberleri kalbin elektriksel ileti sistemini oluşturmaktadır. Kalp

kasılması sinoatriyal düğümde oluşan sinyal ile başlamakta ve diğer ileti sisteminde bulunan özelleşmiş kardiyomiyositler vasıtasıyla bütün kalbe dağılmaktadır. İleti ağı sayesinde sinoatriyal düğümde oluşan kasılma komutu, kalpteki bütün kardiyomiyositlere ulaşarak eş zamanlı kalp kasılma ve gevşemesini sağlamaktadır. İleti sistemine ek olarak, kalbe dallanan otonom sinir uçları da kalp atışı, ileti hızı, kalp kası kasılması ve rahatlamasında önemli bir rol oynamaktadır (1). Otonom sinir sistemi, kalp ileti sisteminin kasılmayı başlatmasını takiben, kasılıp gevşemenin hızını ve gücünü kontrol eder. Otonom sinir sistemi elemanı olan parasempatik ve sempatik sinirler sırasıyla kalp atışının yavaşlamasından veya hızlanmasından sorumludur (2,3). Diğer taraftan, duyuşal sinir sistemi kalpte oluşan ağrı, basınç ve mekanik değişimler gibi verileri algılamak ve beyne ileterek motor komutun oluşturulmasında rol almaktadır (2,6).

4.3.1. Kalbin Elektrofizyolojik Özellikleri

Kardiyomiyositler -85 mV dinlenme potansiyeline ve aksiyon potansiyel oluşturma özelliğine sahiptirler. Kardiyomiyosit zar potansiyelinin eşik değerini aşım aksiyon potansiyeli üretebilmesi için ileti sistemi tarafından uyarılmalıdır (38). Elektriksel uyarı kalp kasına ulaştığında, hücre zarında bulunan voltaja duyarlı sodyum (Na^+) kanalları (Nav) açılarak depolarizasyon gerçekleşir. Hücre içerisine Na^+ girişi hücre potansiyelinin hızlı bir şekilde aksiyon potansiyel oluşumuna neden olmaktadır (Faz 0, Şekil 4.3.1). Eşik değerinin aşılması ile geçici potasyum (K^+) kanalları açılır, K^+ iyonları hücre dışına çıkar ve hücre zarı potansiyeli -15 mV'a ulaşır (Faz 1). Hücre zarı depolarizasyonu L-tip Ca^{+2} kanallarının açılmasına ve hücre içi Ca^{+2} girişini sağlar. Bunu takiben, hızlı aktiflenen K^+ kanalları da açılarak K^+ iyonlarının hücre dışına taşınmasını sağlar. Ca^{+2} ve K^+ iyonlarının zıt yönde hareketleri Faz 2 olarak da adlandırılan platoyu oluşturmaktadır. Hücre içerisine alınan Ca^{+2} sarkoplazmik retikulumda bulunan Ca^{+2} kanallarının açılmasını ve Ca^{+2} iyonlarının hücre sitoplazmasına geçmesini sağlar. Faz 3'te yavaş aktiflenen K^+ kanalları açılır ve hücre içerisine K^+ iyonu geçerek hücre zarı repolarize olur. Na^+-K^+ pompası ve $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ değiştirici kanalı, hücre içi-dışı arasındaki değişen iyon gradyanını düzenler ve kardiyomiyosit dinlenme fazına geri döner (Faz 4). Dinlenme fazı ve aksiyon potansiyel bitimi arasındaki süreye aksiyon potansiyel süresi denilmektedir (38).



Şekil 4.3.1 Kardiyomiyositlerde gerçekleşen aksiyon potansiyeli.

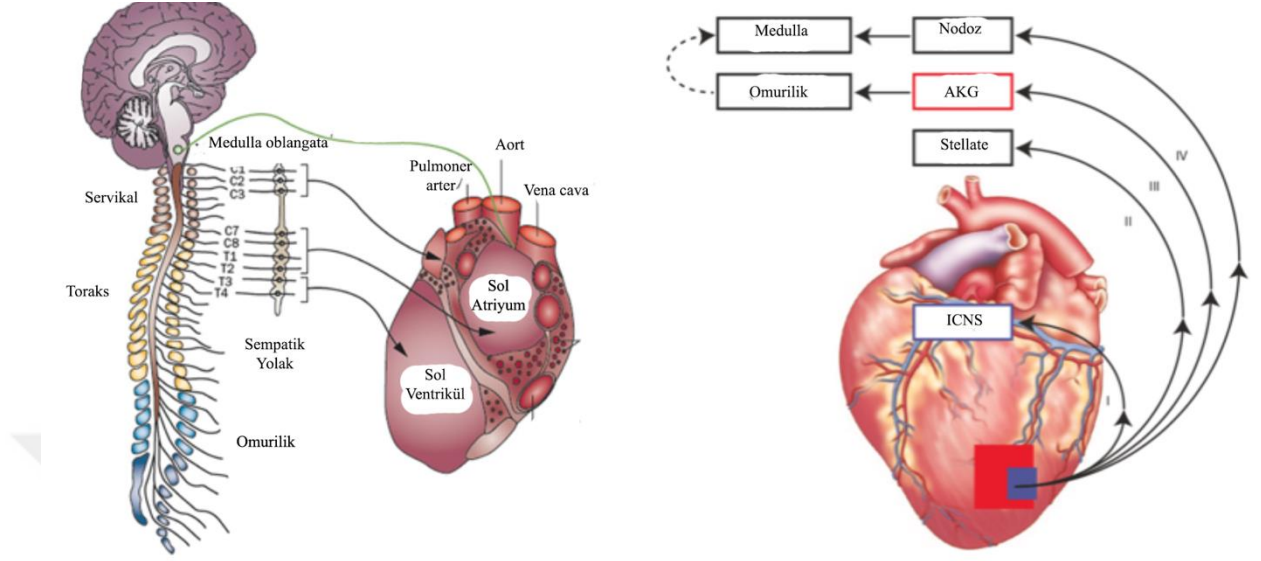
4.4. Kalp ve Sinir Sistemi İlişkisi

Kalp atışı sinir sistemi, ileti sistemi ve kardiyomiyositler tarafından kontrol edilmektedir. İleti sistemine ek olarak, yapılan çalışmalar göstermiştir ki kalbe dallanan sinir lifleri, kalbi bir ağ şeklinde sarmakta ve bu sistem, kalp atışı, ileti hızı, kalp kası kasılması ve rahatlamaında önemli bir rol oynamaktadır. Otonom ve duyuusal sinir sisteminin yanında, birbiriyle etkileşim halinde bulunan kardiyak intrinsik gangliyon ve kardiyak ekstrinsik gangliyonlar da kalbin fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

4.4.1. Kalp ve Otonom Sinir Sistemi

Sinir sistemi merkezi sinir sistemi ve çevresel (periferik) sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Kalp gibi iç organlar ve ekstremitelere dallanan periferik sinirler vücuttaki fizyolojik dengenin sağlanmasından sorumludur (27). Periferik sinir sisteminin elemanları olan sempatik ve parasempatik nöronlar beyinden aldıkları motor komutu kalbe iletmektedir (Şekil 4.4.1 A). Merkezi sinir sisteminden kalbe motor komutları taşıdıkları için getirici (eferent) sinirler olarak adlandırılan sempatik ve parasempatik nöronlar kalbin kasılıp gevşeme hızını atım ve gücünü üretici

(pacemaker) olarak adlandırılan sinoatriyal düğüme dallanarak düzenlemektedir (2,6,39).



Şekil 4.4.1 Sinir sisteminin kalbe dallanmasının şematik gösterimi. A) Kardiyak sempatik nöronlar toraks, superior servikal ve stellate olmak üzere üç farklı gangliyondan oluşmaktadır. Parasempatik nöronlar omurilik soğanından çıkarak vagus siniri ile kalbe ulaşmaktadır (40). (B) Duyu nöronları kalpten çıkarak intrinsik kardiyak gangliyon (ICNS), stellate gangliyon ile DRG, NG üzerinden beyne ulaşır (5).

Kardiyak otonom sistemi birbirleriyle etkileşim halinde bulunan intrinsik kardiyak gangliyon, ekstrakardiyak intratorasik gangliyon, omurilik, beyin sapı ve beyin merkezlerinden oluşmaktadır (5). Kalbin kasılıp gevşemesi üzerinde önemli bir rol oynayan otonom sinir iletiminde meydana gelebilecek bozukluklar kardiyovasküler hastalıklara ve hatta ani ölümlere sebep olabilmektedir. Bu nedenle, sinir sisteminin uyarılması ile kalp hastalıklarının tedavisine yönelik literatürde preklirik çalışmalar mevcuttur ve 4.4.3 başlığında detaylandırılmıştır (41,42).

4.4.2. Kalp ve Duyu Sinir Sistemi

Periferik sisteminin önemli bir elemanı olan duyu nöronlarının geri bildirim ile akciğer ve bağırsak gibi organlara giden motor komutun düzenlenmesinde rol oynadığı çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (10,22). Duyu nöronları, kalpteki basınç, ağrı veya gerilme gibi duyuusal veriyi AKG ve NG başta olmak üzere beyin ve doku içi entegrasyon merkezleri olan intrakardiyak ve stellate gangliyonlara iletmektedir

(12,14) (Şekil 4.4.1 B). NG'nun kalbe ait kimyasal veriyi, AKG'nun ise kalp kasına ve koroner damarlara ait kimyasal ve mekanik duyusal veriyi merkezi sinir sistemine taşıdığına yönelik literatürde çalışmalar mevcuttur (11,16). Kardiyomiyositler tarafından salgılanan NGF ve GDNF'nin sinir dallanmasını yönlendirdiği ve onarıcı etkisi olduğu incelenmiş, duyu nöronlarından salgılanan SP ve CGRP gibi faktörlerin kardiyomiyositlerin gelişim ve onarımında etkileri araştırılmıştır (43).

Kalpte ağrıyı algılayan duyu nöronlarının alt tiplerini incelemek amacıyla çalışmalarda, Benson ve ark. fare kalbine özgü duyu nöronlarını retrograd DiI boyası ile işaretledikten sonra izole etmiş ve bu nöronların MI sonrası salınan ATP, kapsaisin, serotonin, adenosine ile pH değişimine verdikleri cevap yama kısıncı metodu ile incelenmiştir (16). Yapılan diğer bir çalışmada ise farede oluşturulan MI sonrası AKG ve NG duyu nöronlarında ATP'ye duyarlı P2X3 veya P2X2/3 reseptörlerinin protein düzeyinde arttığı tespit edilmiştir (44,45). Zahner ve ark. ise deride sıcaklığa bağlı ağrıyı algılayan ve kapsaisine duyarlı transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) reseptörüne sahip duyu nöronlarının kardiyak sempatik nöronlar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu çalışma ile TRPV1-duyu nöronlarının iskemi sonrası ağrı verisini ilgili merkezlere taşıdığı ve sempatik nöronların fonksiyonunu düzenlediği raporlanmıştır (46).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, sempatik nöronlar uyarılmış pluripotent kök (UPK) hücrelerinden farklılaştırılmış ve yenidoğan fare kalp kası hücreleri ile birlikte kültüre edilmiştir (47). Bu iki hücre tipi arasındaki bağlantı, optogenetik yöntemlerle incelenmiştir. Mavi ışık ile açılan kanal rodopsin (ChR2) ile Na⁺ ve Ca⁺² iyonlarının hücre içine alınması sonucu, sempatik nöronlar uyarılmış, böylelikle kardiyomiyositlerin atımlarında hızlanma gözlenmiştir (47). Hücreler arası fonksiyonel bağlantıların incelendiği bu tip çalışmaların yanı sıra, elektron mikroskobu görüntüleri ile bu bağlantılarda rol oynadığı tahmin edilen ve nöronlardan salınan sinaptik veziküller tespit edilmiştir (48). UPK hücre temelli kardiyomiyositler ve periferik sinir hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise hücreler arasında fiziksel bir bağlantının kurulduğu ispatlanmıştır (49). Bu bağlantı, morfolojik sinaptik protein işaretleyici olan sinapsin-1 immün boyaması ile gösterilmiştir, ancak hücreler arası bağlantının fonksiyonel yönü gösterilememiştir (49).

Sinir sisteminin kalp üzerindeki rejeneratif etkilerini ve fonksiyonunu incelemek için Mahmoud ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, parasempatik fiberleri içeren vagus siniri anatomik bir şekilde kesilerek hasara uğramış fare kalbindeki etkisi incelenmiştir (50). Rejeneratif kapasiteye sahip kalp kası hücrelerinin bu özelliğini, vagus sinir kesisi sonrası kaybettiği ve NGF ile tekrardan kazandığı tespit edilmiştir (50). Yapılan çalışmalar genel olarak, duyu sinir gövdelerinin bulunduğu sinir düğümlerinin histolojik olarak incelemesi ile sınırlı kalmıştır. Kalpten gelen visseral duyu bilgisinin (ağrı, basınç, gerilme vb.) moleküler ve hücresele seviyede nasıl iletiildiği, ne tip duyu sinirlerinin bu iletimde kullanıldığı, diğere duyu sinirlerinden farkı ve bu iletimin kalp fonksiyonu ve hastalıkları üzerindeki etkisi halen bilinmemektedir. Ayrıca, insanda kalbe-özgü duyu sinirleri ile kalp kası hücreleri arasındaki iletişimin moleküler mekanizması da büyük oranda bilinmemektedir.

4.4.3. Kalp-Duyu Sinir Sistemi Etkileşiminin Klinik Önemi

Duyu nöronlarının kalbe ait çeşitli duyuusal verileri sadece beyne iletmekle görevli olmayıp, kalp fonksiyonunu otonom sinir sistemine geri bildirim vermek suretiyle düzenlediği düşünülmektedir. Bu durum normal fizyolojik düzenlemenin yanında, patolojik olgularda, doku hasarı ve onarım süreçlerinde etkili olduğuna dair literatürde kanıtlar mevcuttur (51). Bu nedenle, kalpten aldığı duyuusal veriyi taşıyan nöronların karakterizasyonu, alt tiplerinin belirlenmesi, normal ve hasar sonrası fonksiyonlarının ortaya konulması kalp hastalıklarına yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

İlginç bir çalışmada Wang ve arkadaşları kalpten duyuusal veriyi ilgili merkezlere ileten ve sempatik nöron aktivitesini düzenlediği tespit edilen TRPV1-duyu nöronlarının kalp hasarı sırasındaki etkisini incelemiştir. Sıçanlarda oluşturdukları MI sonrası kalbin dış yüzeyine uyguladıkları resiniferatoxin (RTX) ile TRPV1-duyu nöronların aktivitesini durdurarak, sempatik tonun azaldığını, hasarlı bölgede ve kalp fonksiyonunda iyileşme olduğunu göstermişlerdir (52). Aynı grup 2017’de yaptıkları çalışmada kalbe özgü duyu nöronların normal durumda sempatik nöronlarının akut aktivasyonundan hastalık durumunda ise kronik aktivasyonundan sorumlu olduğunu raporlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, MI sonrası artan sempatik aktivasyon ile kalp

atım hızının ve vazokonstrüksiyonun normale göre arttığını, kalbe uyguladıkları genel duyu nöronların iletimini durdurucu lidocaine ile sempatik aktivasyonun azaldığını, artan kardiyak bulgularının normale yaklaştığını raporlanmıştır (53).

Miyokard infarktüsü (MI), kalp kası olan miyokardın iskemik nekrozuyla oluşmaktadır (54). MI ile ilişkili oluşan ağrı göğüste baskı, basınç, ağırlık hissi, sıkışma veya yanma şekilde tanımlanmaktadır. Kalbe dallanan duyuusal sinir sisteminin iskemi ve reperfüzyon gibi kardiyak olayların algılanmasında rol oynadığı bilinirken son zamanlarda kardiyak doku homeostazı ve onarımında da görev aldığı düşünülmüştür (44,51,53). MI sonrası kalpten salınan adenosine, bradykinin, adenosin trifosfat (ATP), kapsaisin, serotonin ve reaktif oksijen radikaller kalbe özgü duyu nöronlarının aktivitesini değiştirmektedir. Fazla uyarılan aktif duyu nöronlarının merkezi sinir sistemine gönderdikleri bilgi sonucu kalbe dallanan sempatik ve parasempatik nöron uçlarında morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere sebep olmaktadır (55). Hasar sonrası veya yaşlı fare kalbi kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda, *in vivo* olarak kalp ve duyu sinir sisteminin birbiri üzerindeki rejeneratif etkisi (50) veya kalbe özgü duyu nöronları doku boyutunda incelenmiştir (14). MI sonrası aktivitesi değişen duyu nöronları ile kalpte parasempatik nöronların sustuğu sempatik nöronların ise aktivitesinin (sympathoexcitatory refleks) ve innervasyonlarının arttığı, bunun ventriküler aritmiye neden olabileceği tespit edilmiştir (55). Bu bulgular sonucunda, duyu nöronlarının sadece duyuusal veriyi iletmekle görevli olmadığı, normal ve patolojik durumda kalbin işleyişi ile ilgili otonom sinir sistemine geri bildirim vermek suretiyle kalp fonksiyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Ancak, normal veya hasar sonrası kalpten salınan kimyasal uyarıyı ileten duyu nöronlarının ve fiberlerin kardiyomiyositler ile hücresel ilişkisi ve moleküler özellikleri net olarak bilinmemektedir (11).

Kalp yetmezliği teşhisi konmuş hastalarda sinir sistemi uyarılarak tedavi amaçlı prelinik çalışmalar bulunmaktadır. Tse ve arkadaşları ileri derecede kalp yetmezliği teşhisi konmuş hastalarda, T1-T3 hizasındaki omuriliği elektriksel olarak 24 saatte bir uyararak hastalarda sol kulakçık fonksiyonun geliştiğini, ventriküler aritmi riskinin azaldığını ve hastaların ağrılarının azaldığını raporlamışlardır (42). Yapılan çalışmalar ile kalbe özgü duyu nöronlarının normal ve patolojik durumlarda otonom sinir

sistemini üzerinden kalp fonksiyonunu ve anatomisini düzenlediği ortaya konulmuştur.

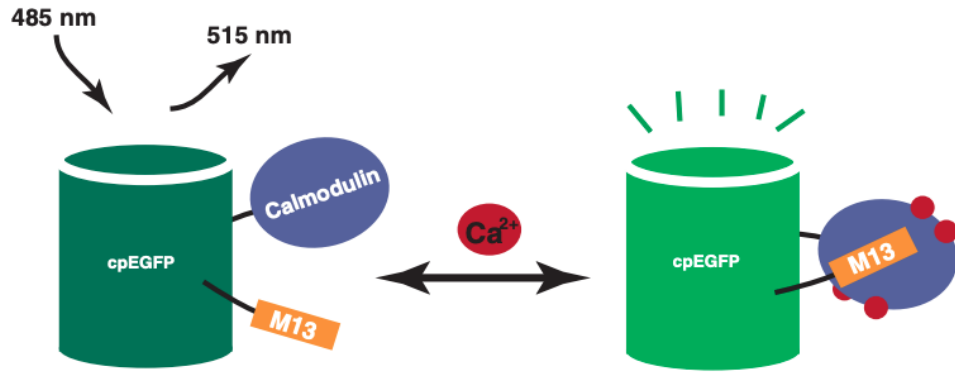
4.5. Ca⁺² Görüntüleme, Optogenetik ve Uygulama Alanları

Optogenetik, ışığa duyarlı iyon kanallarını kodlayan genlerin virüs yolu ile hedeflenen hücrelere transfer edilip ilgili proteinlerin aktivitesinin ışıkla düzenlenmesine dayanmaktadır (56). Optogenetik tekniğinde hedeflenen hücre genetik yöntemlerle işaretlenebildiği için, elektriksel veya kimsayal uyarımın aksine optogenetik uyarım istenilen hücre incelenebilmektedir. Ayrıca, ışığa duyarlı hücre zarı proteinleri ışık ile uyarılarak hedeflenen hücrenin elektrofizyolojik aktivitesi zamana bağlı kontrol altına alınabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı, 2010'da yılın metodu seçilen optogenetik, hücreleri uyararak veya baskılayarak çalışma mekanizmasını ve fonksiyonel özelliklerinin araştırılabilmesine olanak sağlamaktadır (57).

4.5.1. Genetik Olarak Değiştirilmiş Yavaş Ca⁺² Proteini 6 (Genetically Calcium modified protein 6 slow, gCaMP6s)

Miyokardiyum hücrelerinin kasılıp gevşemesi hücre içi ve hücre dışı iyon değişimi ile gerçekleşmektedir. Hücre dışında konsantrasyonu yüksek olan Na⁺ iyonun hücre içerisine alınması hücre potansiyelinin değişmesine, voltaja duyarlı Ca⁺² kanallarının açılmasına ve hücre içerisine Ca⁺² girişine neden olmaktadır. Hücre içi Ca⁺² artışı, sarkoplazmik retikulumdaki Ca⁺² rezervlerinin boşalmasına ve kasın kasılmasına sebep olmaktadır (58). Benzer şekilde elektriksel olarak aktif olan nöronlarda aksiyon potansiyelinin üretimi sırasında hücre içi Ca⁺² miktarı artmaktadır. Bu nedenle, Ca⁺² görüntüleme kardiyomyosit ve sinir hücrelerinin elektrofizyolojik incelenmesinde başvurulan önemli bir tekniktir. Rhod-2, Fura-2 veya Fluo-4 gibi Ca⁺² değişimine duyarlı floresan özellikte sentetik boyalar ticari olarak temin edilebilmektedir. Floresan özellikli bu ve benzeri Ca⁺² işaretleyiciler, hücre içi Ca⁺² iyonunun artması durumunda sahip oldukları floresan şiddetini arttırarak Ca⁺² değişimlerinin tespit edilmesini sağlamaktadır (59). Kullanılan sentetik boyalar hücre içi Ca⁺² değişimini göstermekle beraber, boyanın uzun süre hücre içerisinde kalmaması, sinyal gürültüsünün yüksek olması ve zamansal çözünürlüğünün düşük

olması gibi dezavantajlar bulunmaktadır. Sentetik Ca^{+2} boyalara alternatif olarak, 2001 yılında geliştirilen genetik olarak modifiye edilmiş Ca^{+2} proteini (Genetically modified Ca^{2+} protein, GCaMP) sahip olduğu başlatıcı (promoter) bölgesi ile hedeflenen hücrede üretilmesi, sentetik boyalara göre zamansal çözünürlüğünün yüksek olması ve uzun süre hücre içi Ca^{+2} değişikliğine olanak sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır (60). Nakai ve arkadaşları tarafından geliştirilen GCaMP kas hücrelerinde üretilerek bu hücrelerin spontan, kimyasal veya elektriksel uyarı sonucu oluşan Ca^{+2} değişimini gerçek zamanlı olarak GCaMP ile tespit edilebilmiştir (60). GCaMP taşıdığı yeşil floresan proteini (cpEGFP) ile floresan özelliği göstermekte ve böylece Ca^{+2} değişiminin takibine olanak sağlamaktadır. GCaMP işaretleyicide bulunan kalmodulin ve miyozin hafif zincir kinaza (M13), hücre içine giren Ca^{+2} veya sarkoplasmik retikulumdaki depoların boşalması ile serbest hale geçen Ca^{+2} iyonu bağlanır ve yeşil floresan ışınması gerçekleşir (Şekil 4.5.1). Yıllar içerisinde geliştirilen, hassasiyeti arttırılan GCaMP Ca^{+2} işaretleyicisinin GCaMP3, GCaMP6s (s:slow, yavaş) ve GCaMP6f (f: fast, hızlı) gibi türevleri de bulunmaktadır (61). GCaMP6s, önceki GCaMP türevlerine göre Ca^{+2} değişimlerine daha hassas olduğu ve GCaMP6f'ye kıyasla daha şiddetli floresan değişimi gösterdiği raporlanmıştır (62). Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki Ca^{+2} iyonuna bağlı ilişkiyi incelemek amacıyla GCaMP6s Ca^{+2} işaretleyicisi olarak kullanıldı.



Şekil 4.5.1 GCaMP Ca^{+2} işaretleyicilerinin yapısı. GCaMP taşıdığı yeşil floresan proteini (cpEGFP) ile floresan özelliği göstermektedir. Ortamda Ca^{+2} olmadığında floresan şiddeti düşük olan GCaMP2, artan hücre içi Ca^{+2} iyonunun kalmodulin ve M13'e bağlanır ve floresan şiddetini artırmaktadır (63).

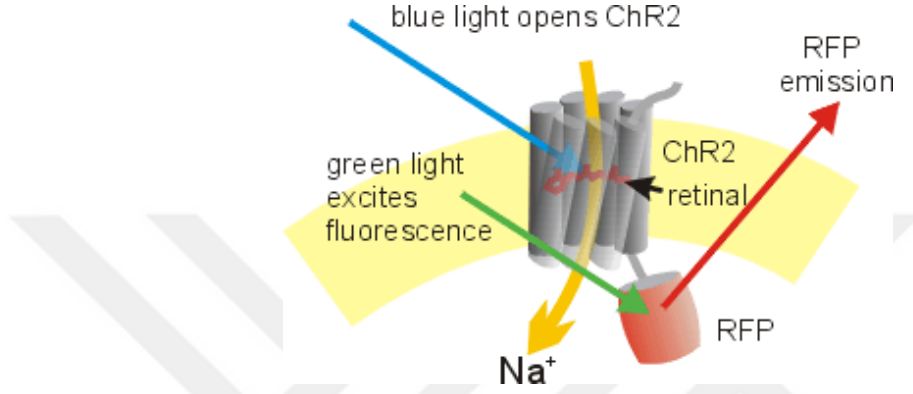
4.5.2. Sinir ve Kardiyovasküler Sistemlerindeki GCaMP6s Uygulama Alanları

Hücreler tarafından üretilen GCaMP ve türevleri sentetik Ca^{+2} işaretleyicilerine kıyasla *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda uzun süreli Ca^{+2} görüntülemeye olanak sağlamaktadır. Dana ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Thy1 başlatıcısına sahip GCaMP6 veya GCaMP6f ifade eden transgenik fareler üretilerek *in vivo* Ca^{+2} değişimi takip edilebilmiştir. Fare beyinde görmeden sorumlu bölgeden alınan floresan görüntülemeler ile Thy1-GCaMP6 üreten hücrelerde Ca^{+2} 'a bağlı floresan değişimini göstermişlerdir (64). Sinir hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise GCaMP üreten AKG hücreleri kullanılarak her bir duyu nöronun farklı uyarılara cevap oluşturduğu tespit edilmiştir (65). Mekanik veya ısı uyarılarına karşı GCaMP üreten AKG nöronlarının Ca^{+2} değişimi incelenmiş ve uyarılara karşı oluşturdukları cevaplara göre hücreler sınıflandırılabilmiştir (65). Tallini ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise GCaMP2 kullanılarak embriyonik ve erişkin fare kalbinin oluşumu incelenmiştir (66). GCaMP2 üreten kardiyomiyosit hücreleri karıncık ve kulakçık dokularının gelişimini canlı görüntülemeye olanak sağlamıştır

4.5.3. Kanalrhodopsin-2 (ChR2)

Hücrelerin elektriksel aktivitesinin kontrol edilmesine olanak sağlayan ChR2 kodlayan gen alglerden elde edilmiştir (56). ChR2 proteinin Işık uyarımı ile hücrelerin elektriksel aktivitesini kontrol edilebilmekte ve hedeflenen hücrenin fonksiyonel özellikleri incelenebilmektedir. Elektriksel uyarımın aksine, kanalrodopsin genetik olarak hedeflenen hücrelerin işaretlenebilmesi, zamansal olarak kontrol edilebilmesi ve fiber optik ile minimal invaziv müdahaleye olanak sağlamaktadır (67). *Chlamydomonas reinhardtii* adlı alglerden edilen kanalrodopsin, ChR1 ve ChR2 olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. ChR1 ışığa duyarlı proton kanalı iken, ChR2 ışık ile uyarıldığında açılarak hücre içine katyon geçişini sağlamaktadır. ChR2 sahip olduğu all-trans retinal sayesinde, mavi ışık ile uyarıldığında konformasyonel değişim geçirir ve kanal açılarak iyon geçişini sağlar (Şekil 4.5.2). Literatürde ilk olarak, Boyden ve arkadaşları tarafından klonlanan ChR2, hipokampus hücrelerinde *in vitro* üretilmiş ve mavi ışık ile uyarılan bu hücrelerin elektriksel kontrolü sağlanmıştır (56).

Işık ile uyarım sonrası açılan ChR2 ile hücre içerisine Na^+ iyonu girerek hücreyi depolarize ettiği ve hücrenin elektriksel kontrolüne olanak sağladığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, halorodopsin de aktif olan nöronların susturulmasında kullanılan diğer bir optogenetik araçtır. ChR2'nin aksine, halorodopsin sarı ışık uyarımı sonucu açılarak, hücre içine klorür (Cl^-) geçişine ve hücrenin repolarizasyonuna neden olmaktadır (68).



Şekil 4.5.2 ChR2 kanal proteinin yapısı. Kırmızı floresan proteini ile birlikte üretilen ChR2 mavi ışık uyarımı ile konformasyonel değişime uğrar ve açılarak hücre içerisine Na^+ geçişini sağlamaktadır (69).

4.5.4. Sinir Sistemi ve Kardiyovasküler Sisteminde Optogenetik Uygulamalar

Elektriksel uyarı ile büyük bir hücre grubu aynı anda uyarılırken, optogenetik yöntem belirli kardiyomiyosit ve nöronlarının hedeflenmesini ve tek hücre seviyesinde elektriksel değişimin gerçekleşmesini mümkün kılmıştır. Literatürde, *in vivo* ve *ex vivo* olarak kardiyomiyositlere virüs yolu ile ChR2 üretimi sağlandıktan sonra, belirli frekanslarda mavi ışık ile uyarılan hücrelerin cevap olarak aynı ritimde attığı raporlanmıştır (70). Optogenetik araçlar insan embriyonik kök hücre kökenli sempatik nöron ile yenidoğan fareye ait kardiyomiyosit hücreleri arasındaki elektriksel iletişimi *in vitro* düzeyde incelemeye olanak sağlamıştır (47,71). Bu çalışmalarda, ChR2 üreten sempatik nöronlar ışık ile uyarıldığında, nörotransmitter salgıladığı ve bağlantı kurduğu kardiyomiyositlerin kasılıp gevşeme hızını değiştirdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, embriyonik hücre kökenli sempatik nöronun kardiyomiyosit ile fiziksel ve fonksiyonel bağlantı kurduğu, bu bağlantının optogenetik ile kontrol edilebildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, sinir hücrelerinin kardiyomiyosit ile kurduğu

fiziksel ve fonksiyonel bağlantı sayesinde asetilkolin reseptörü, K⁺, Na⁺ gibi kanal proteinlerinin üretimini arttırdığı ve olgunlaştığı tespit edilmiştir (47). Steinbeck ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada, UPKH'dan üretilen motor sinir hücrelerinin elektriksel aktivitesinin *in vitro* ortamda optogenetik araçlar ile kontrol edilebildiği ve bağlantı kurduğu iskelet kas hücrelerinin uyarım sonucunda kasılıp gevşemesinde değişikliğe sebep olduğu tespit edilmiştir (71).

In vitro kas ve sinir hücre kültürlerinde üzerinde yapılan optogenetik çalışmaların yanında, ChR2 üreten transgenik fare soyları kullanılarak duyu sinir hücre alt tiplerinin belirli bir organa özgü olduğu ve bu hücrelerin uyarılması sonucu organda fonksiyonel değişimlerin olduğu tespit edilmiştir (9,10,22,23). Bu çalışmalardan birinde, Williams ve arkadaşları GPR35 veya Glp1r adlı reseptörü ifade eden NG hücrelerinde ChR2 üreten transgenik hat oluşturmuşlardır. GPR35-ChR2 üreten NG nöronlarının ışık ile uyarılması sonucunda bağırsakta kimyasal bir uyarın sonrası verilen cevap, Glp1r-ChR2 NG nöronlarının uyarılması sonucu ise bağırsakta mekanik değişimin olduğu gözlemlenmiştir (10). Benzer şekilde, bir purinerjik reseptör olan P2ry1 üreten NG hücrelerinin optogenetik yöntemler kullanılarak akciğere özgü olduğu raporlanmıştır (22). P2ry1-ChR2 üreten NG hücrelerinin *in vivo* uyarılması sonucu farede solunumun durduğu, diğer taraftan kalp, mide veya bağırsakta herhangi bir fonksiyonel değişimin olmadığı tespit edilmiştir (22). Yapılan diğer bir çalışmada, G-protein kapılı bir reseptör olan Mrgpr11 reseptörü ifade eden ve ChR2 üreten NG hücreleri mavi ışık ile uyarılarak, bronş hacminin değiştiği raporlanmıştır (23). Akciğere özgü NG nöronlarının belirlendiği diğer bir çalışmada ise, Piezo2 geninin silindiği (knockout) transgenik hayvanlarda solunumun durduğu, diğer taraftan ise Piezo2-ChR2 NG nöronlarının uyarılması ile farelerde apnenin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile bir mekanoreseptör olan Piezo2'nin akciğerler gerginliği ile ilgili duyuşal veriyi taşımakla sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (9). Yukarıda bahsedilen çalışmalar göstermiştir ki, optogenetik araçlar hedeflenen hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin ortaya çıkarılmasına olanak sağlamaktadır.

4.6. Global Gen Ekspresyonu Analizi ile Gen Keşfi

Yeni nesil dizileme teknolojisindeki gelişmeler, doku ya da hücre kökenli örneklere ait genom ve tüm ifade edilen genler ve izoformlarının yüksek çözünürlükte ve düşük maliyette transkriptom profillerinin ortaya çıkarılmasına imkan sağlamıştır (72). Bu sayede, örneklere ait bütün genom ve ortaya çıkarılabilmektedir. Günümüzde bu teknoloji hem temel biyolojik soruları cevaplamayı hedefleyen çalışmalarda hem de çeşitli hastalıklara ilişkin moleküler belirteçler tanımlamaya yönelik araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yeni nesil dizileme yönteminde, genel olarak hedef DNA ya da RNA moleküllerinin çok sayıda küçük parçaya ayrılması, PCR ile çoğaltılması ve bu küçük parçaların uçlarının belirli uzunlukta nükleotidler halinde dizilenmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir (Shotgun sequencing). Bütün genom dizilemesi çalışmalarında, küçük DNA parçalarına ait sekans dizileri uç uca bir araya getirilip birleştirilerek (assemble) daha büyük DNA parçaları oluşturulur. Daha sonra bu DNA parçaları bir araya getirilerek başlangıçtaki orijinal DNA dizisi inşa edilir. Böylece aynı anda ve aynı düzlemde milyonlarca dizileme reaksiyonu stratejisi kullanılarak bütün genom dizileme gerçekleştirilir. Benzer strateji bütünsel (whole)-global RNA-dizileme (RNA-Seq) işleminde de kullanılmaktadır. Fakat hedeflenen RNA molekülü daha kararsız bir yapıya sahip olduğu için başlangıç aşamasında cDNA'ya çevrilmekte ve takip eden işlem PCR ile çoğaltılan küçük cDNA parçaları üzerinden gerçekleştirilmektedir. Küçük cDNA parçalarının tek ya da her iki ucuna adaptör nükleotid dizileri eklenip, bu dizilere hizalanan primerler kullanılarak okuma işlemi yürütülür. Dizileme sonucu üretilen milyonlarca okumanın hangi genlere ait olduğunun saptanması için her bir okuma çeşitli hizalama programları kullanılarak ilgili organizmanın referans genomuna ya da transkriptomuna hizalanır. Bu işlem sonucu her bir gene tekabül eden okuma sayısı üzerinden ilgili genlerin anlatım değerleri belirlenir (73).

Gen anlatım değerleri elde edildikten sonra, farklı istatistiksel modeller ve programlar kullanılarak (örnek: DESeq2) diferansiyel anlatım analizi gerçekleştirilir (74). Daha sonra ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bulunan genlerin fonksiyonlarını araştırmak için mevcut bilimsel literatür bilgisi kullanılarak oluşturulmuş ve genlerin ilişkili oldukları biyolojik işlem ve yolların bilgisini içeren Gen Ontoloji (75),

KEGG, Reactome (76) vb. veri tabanlarındaki gen setleri üzerinden zenginleştirme analizleri (enrichment) gerçekleştirilir. Bu analizleri gerçekleştirmek için web tabanlı DAVID, GORILLA programları ve R Bioconductor ortamında çalışan GOSEQ (75) ve ClusterProfiler (77) paketleri kullanılabilir.

Transkriptom alanında son yıllarda ortaya çıkan gelişmeler, sinir sisteminin bütünsel (whole) veya tek hücre (single cell) boyutunda moleküler düzeyde incelenmesine olanak vermiştir. Söz konusu RNA analiz çalışmalarında, duyu nöronlarına özgü kanal protein, G protein-kapılı reseptör ve transkripsiyon faktörleri gibi genler incelenerek sınıflandırılmasına başlanmıştır. Bunun yanında, duyu nöronlarının gelişimsel sürecinde, hastalık durumu veya doku hasar sonrasında ilişkili genlerin araştırılmasında ilerleme kaydedilmiştir. Lopes ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, saflaştırılan AKG ve trigeminal nöronlarında, Homeobox ailesine ait 24 genin sadece AKG’de üretildiği, 44 genin AKG’de yüksek seviyelerde ifade olurken 19 genin trigeminal gangliyada ifade olduğu RNA dizi analizi yöntemi ile tespit edilmiştir (78). Bu çalışma ile literatürde daha önce tanımlanmış olan trigeminal ve AKG’ye özgü genlerin aslında astrosit veya oligodentrosit gibi nöron olmayan hücrelerden kaynaklandığı gösterilmiştir. AKG duyu nöronlarını sınıflandırmak için yapılan diğer bir çalışmada ise Scn10a, parvalbumin transgenik hayvan hattı ile izolektin B₄ (IB₄) antikorunu kullanılarak üç farklı AKG popülasyonu RNA düzeyinde incelenmiştir (79). Mikroarray analizi sonucu, duyu nöronları tüm AKG dokusu ile karşılaştırıldığında Mpz, Mag, Pamp2 ve Mbp gibi miyelin ile ilişkili genlerin üretimlerinin düştüğü, Scn10a ifade eden nöronlarda nosiseptif nöronlarla ilişkili Trpv1, Trpa1, Scn10a ve Scn11a gibi genlerin sentezlendiği, parvalbumin üreten nöronlarda ise Pvalb, Runx3, Etv1 ve Ntrk3 gibi proprioseptif benzeri genlerin ifadelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Scn10a ve parvalbumin üreten nöron grubuna ait gen ontolojisi ve KEGG analizleri karşılaştırıldığında, Ca⁺² ve K⁺ iyon kanallarının üretiminin farklı olduğu tespit edilmiştir (79).

Dizileme teknolojisindeki son gelişmeler, sinir hücrelerine ait gen profillerinin bütünsel (whole)-global yaklaşımın yanında tek hücre düzeyinde de RNA dizi analizi yöntemi ile incelenmesine olanak sağlamıştır. Hücre gövde boyutları ölçülen ve tek

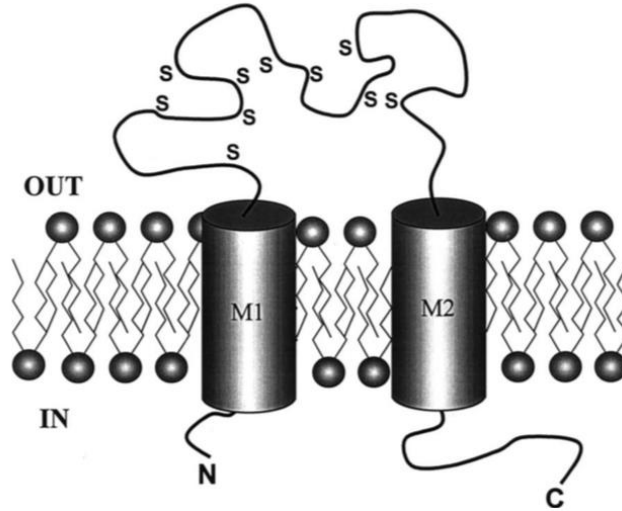
hücreden yapılan RNA dizi analizi yapılan AKG duyu nöronlarının; neurofilament üreten, peptiderjik, peptiderjik olmayan ve tirozine hidroksilaz üreten olmak üzere dört farklı popülasyona ayrılmıştır (19). Gruplar kendi aralarında karşılaştırılarak, nörofilament sınıfının beş, peptiderjik sınıfının iki, peptiderjik olmayan sınıfın ise üç farklı alt gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Oluşan grupların her birinin belirli proteinleri ürettiği immünboyamalar ile de gösterilmiştir. Duyu sinir hücrelerinin sınıflandırmasının yanında, RNA dizi analizi tekniği kullanılarak Nav1.8 işaretli AKG nöronları kullanılarak nosiseptif nöronlar gen düzeyinde incelenebilmiştir (80). Manyetik boncuklarla işaretlenen Nav1.8 AKG hücreleri manyetik ayırıştırma yöntemi ile saflaştırılarak gen profilleri tüm AKG popülasyonu ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analiz sonucunda, saflaştırma yöntemi ile nöron olmayan hücrelere ait gen ifadelerinin azaldığı ve elde edilen genlerin %23'nün nosiseptif nöronlara ait olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile nosiseptif nöronlarında bulunan Klf5, Med10, Myc ve Stat6 gibi transkripsiyon faktörlerinin ağrı ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.

RNA dizi analizi ile duyu nöronları temel düzeyde sınıflandırabilmiş veya belli bir duyu nöron alt tipi gen düzeyinde incelenebilmiştir (19,78–80). Ayrıca, RNA dizi analizi doku hasarı veya hastalık sonrası, sinir hücrelerinde meydana gelen gen düzeyinde değişiklikleri incelenmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, siyatik sinir hasarı sonrası AKG duyu nöronlardaki meydana gelen moleküler değişim RNA dizilime yöntemi ile analiz edilerek, literatürde ağrı ile ilişkili olduğu belirtilen tip-2 angiotensin II reseptör, SP reseptör ve C-C kemokin reseptör tip 5 gen ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. Calca adlı genin Kalsitonin (Calca2) ve CGRP (Calca1) olmak üzere iki farklı alternatif formu bulunmaktadır. Yapılan analizlerde, sağlıklı gruba göre siyatik hasarı oluşturulan grupta Calca1 gen ifadesinin düşük olduğu raporlanmıştır (81). Ayrıca, yaralanma sonrası Wnt yolağının önemli role sahip olduğu tespit edilmişti. Bu çalışmaların yanında, belli bir bölgeye özgü duyu nöronları da saflaştırılarak RNA dizi analizi ile incelenmiştir (82). Bunun için, akson boyunca geriye doğru taşınan (retrograd) ve floresan özellikteki Cholera Toxin-B peritoneal boşluğa verilerek bu bölgeye özgü AKG ve NG duyu nöronları işaretlenmiş, saflaştırılmış ve RNA dizi analizi sonucunda bu nöronlarda duyu sinyalinin

aktarımında rol oynayan bazı kanal ve nörotransmitter genlerinin yüksek oranda ifadesi gözlenmiştir.

4.7. Duyu Nöronlarında Ağrı ile İlişkili Üretilen Reseptör ve İyon Kanalları

Pürin olarak tanımlanan ATP ve adenozin hücre içi enerji kaynağı olmasının yanında, hücre dışına salındığında nöronlar tarafından nörotransmitter olarak algılanmasını sağlar. Hücre dışı ATP veya ATP'nin indirgenmesi ile ortaya çıkan adenozin merkezi ve periferik sistemde tek başına veya asetilkolin, SP ve Calca gibi nörotransmitterler ile birlikte salgılanmaktadır (27). Pürin reseptörleri ligand bağımlı metatropik P2Y ve iyonotropik P2X olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. ATP'ye duyarlı olan P2X reseptörü P2X1-7 olmak üzere yedi alt tipi bulunmakta, P2X1-6 reseptörleri duyu nöronlarında üretilmektedir (83). P2X reseptörleri iki adet hücre zarı bölgesi ve 10 adet sistin içeren hücre dışı bir ilmeğe sahiptir. P2Y reseptörlerinin sekiz alt tipi bulunmakla beraber, sahip olduğu ikincil haberci sistemi ile uyarılara P2X reseptörüne kıyasla daha yavaş cevap oluşturmaktadırlar (83).



Şekil 4.7.1 P2X kanalının hücre zarındaki yerleşimi (83).

P2X reseptörüne ait alt sınıflar homodimer veya diğer reseptörler ile bir araya gelerek heterodimer şeklinde hücre zarında konumlab (83). AKG duyu nöronları büyük çoğunlukla P2Xr3 reseptörünü üretirken, NG duyu nöronlarında P2X2 homodimeri ve P2Xr2/3 heterodimerini üretilmektedir. P2X reseptörlerinin hücre

zarında homodimer veya heterodimer halinde bulunması, hücrenin elektriksel aktivitesinde farklılıklara sebep olmaktadır. Örneğin, P2Xr2 uyarılara yavaş duyarsızlaşarak (desensitization) aralıksız (sustained) cevap oluştururken, P2Xr3 reseptörü uyarılara karşı hızlı şekilde duyarsızlaşarak geçici (transient) cevap oluşturmaktadır (83). Ayrıca, farklı kimyasallara duyarlı olan purinerjik reseptörlerden a-b-meATP P2X2/3 reseptörünün, ATP ise P2Xr3 reseptörünün uyarandır. P2X reseptörlerinin ATP ile uyarılması sonucunda kanal açılarak hücre içine Ca^{+2} geçişi olmakta ve hücrede aksiyon potansiyel oluşmaktadır. Bağırsak, böbrek ve akciğer gibi organlardan salınan ATP'nin duyu nöronları tarafından fizyolojik koşullarda duyuusal sinyali iletilmesinin yanında, ağrı, sıcaklığa ve mekanik değişime bağlı ağrıyı ilettiği gösterilmiştir (84). Örneğin, P2Xr2 reseptörünün hipoksik ortamda oksijen duyarlılığı hayvan modelleri üzerinde gösterilmiştir (85). Ayrıca, transgenik hayvanlar ile yapılan deneyler sonucunda P2Xr3 ve P2Xr2 reseptörlerinin bağırsaktaki mekanik değişime duyarlı olduğu raporlanmıştır (86). Mekanik ve pH değişimleri dışında ağrıya duyarlı olan purinerjik reseptörlerinin MI sonrasında AKG ve NG nöronlarında P2Xr2 ve P2Xr2 üretiminin protein düzeyinde arttığı raporlanmıştır (44,45).

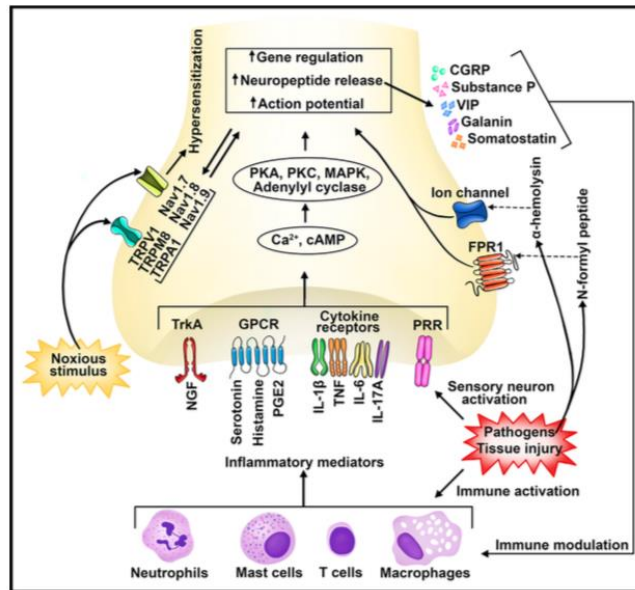
Nav1.8 kullanılarak magnetik ayırıştırma yolu ile saflaştırılan AKG hücrelerinde yapılan RNA dizi analizi sonucu P2Xr2 reseptörü, Nav1.9 (Scn11a), Kcnp2i, Kcnp4, Mrgrpa3, Mrgrpx1, Mrgrpb4, TRPV1 ve TRPA1 gibi iyon kanallarının arttığı tespit edilmiştir (80). Ağrıyı algılayan nöronlarda tespit edilen ve farklı alt tipleri bulunan Mas1 ilişkili G protein reseptörlerinin (Mrgrp), ayrıca deride kaşıntıyı da algılamak ve iletmekle sorumlu olduğu raporlanmıştır (87,88). MrgrpX1'nin fonksiyonel ortoloğu olan Mrgrp11'nin AKG ve jugular gangliyondaki ekspresyonlarının farklı görevler üstlendiği tespit edilmiştir (23). Jugular gangliyonda bulunan Mrgrp11 reseptörünün bronş lümeninin daralmasına ve solunum yollarının hassasiyetini arttırdığı ve astımda önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Mrgrp11 geni silinen hayvanlarda ise bu hassasiyetin azaldığı gösterilmiştir (23).

4.8. İmmün Sistem ve Sinir Sistemi İlişkisi

Sinir hücreleri ve immün hücreler canlıdaki hemostazın korunmasında görevlidir. Sinir hücreleri ve immün hücreler arasındaki etkileşimin ağrı gibi canlılığın yaşamı için önemli bir uyarının düzenlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (89,90). Sinir hücreleri ve immün hücreleri arasındaki etkileşim;

- Nöronlarda sitokinleri tanıyan reseptörlerin varlığı,
- Makrofajlarda asetilkolin ve adrenerjik reseptörlerin varlığı,
- İmmün hücrelerin nörotansmitter üretebilmesi ile sağlanmaktadır.

Ağrı duyu nöronları Nav1.7, Nav1.8 (Scn10a), Nav1.9 (Scn11a) ve transient reseptör potansiyel (TRP) iyon kanallarına sahiptir. TRP iyon kanallarından, TRPV1 sığağa bağlı ağrının algılanmasından, TRP melastatin 8 (TRPM8) soğuya bağlı ağrının algılanmasından sorumludur (90). Diğer taraftan, TRP ankrin 1 (TRPA1) kimyasal ve mekanik ağrı duyarlılığının düzenlenmesinde rol almaktadır (90). Nav kanalları ise Şekil 4.7.2'de gösterildiği gibi nöronun ağrı sonrası aksiyon potansiyelin oluşumu (depolirazasyon) ve düzenlenmesinde rol almaktadır (89). Patojen veya yaralanma sırasında immün hücreleri NGF, Il-6, TNF gibi inflammatör sitkonilerin, prostaglandins (PGE2), serotonin, and histamin gibi kimyasalların salgılanmasına neden olmaktadır (Şekil 4.7.2).



Şekil 4.8.1 İmmün ve periferik sinir sistemi arasındaki ilişkiyi gösteren şema (89).

İnflamatör düzenleyiciler, ağrıya duyarlı duyu nöronlarda bulunan reseptörlere etki eder ve bu reseptörlerde meydana gelen moleküler değişiklikler sonucu ağrıya duyarlılık artmaktadır (89,90). İnflamatör uyaran olan sitokinler TRPV1 veya TRPA1 reseptörlerinin fosforilasyonuna veya Nav'da modifikasyonlara sebep olmaktadır. Hücredeki reseptörlerde meydana gelen değişimler, hücrenin aksiyon potansiyel için gerekli olan eşik değerinin düşmesi gibi hücrenin elektriksel özelliklerinde değişimlere sebep olmaktadır. Bu değişimler sonucunda, ağrılı bir uyarana karşı ağrının artması (hiperaljezi) veya ağrısız mekanik veya sıcaklık uyarana karşı ağrı cevabının oluşması (allodini) gibi normal olmayan durumlar ortaya çıkabilmektedir. Patojen veya inflamatuvar uyaran sonucu aktif olan nöron VIP, SP, CGRP, somatotastin veya galanin salgılayarak immün cevabın düzenlenmesinde rol oynamaktadır (89,90).

İnflamasyon sonrası, duyu nöron ve immün hücreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, TRPV1 reseptörleri susturulması ile Staphylococcus aureus'un neden olduğu pnömani tedavisinin gerçekleştirilebileceğini ileri sürülmüştür (91). Yapılan çalışmada, akciğere dallanan vagal TRPV1+ duyu nöronlarının, patojenin akciğere ulaşmasından sonra aktif hale gelerek GCPR ürettiği tespit edilmiştir. Üretilen GCRP nöropeptitin nötrofil ve $\gamma\delta T$ hücrelerinin immün cevaplarını bastırdığı ve pnömani gelişimini desteklediği gösterilmiştir. TRPV1'in silinmesi (ablasyonu) sonrasında ise sitokin üretiminin arttığı ve bakteriyel enfeksiyonun akciğerden temizlendiği tespit edilmiştir (91).

4.9. Geriye Doğru Taşınan (Retrograd) Boyalar ve Uygulama Alanları

Geriye doğru taşınan (retrograd) boyalar verildiği anatomik bölgeden aksion boyunca geriye doğru ilerleyerek ilişkili olduğu nöron hücrelerini işaretlemektedir. Literatürde, floresan özellikteki retrograd boyalar sindirim sistemi, trake ve yüzeysel baldır (gastrocnemius) kası gibi hedef bölgelere dallanan sinir hücrelerinin takibinde kullanılmıştır (92–94). Benzer yaklaşımla, kalbe dallanan sinir hücreleri de fast blue, DiI and horseradish peroksidaz gibi retrograd boyalar ile işaretlenmiş ve kısmi olarak

incelenmiştir (12,14,95,96). Bu çalışmalardan biri, köpek kalbinin kardiyopulmoner toplar damarına, kulakçığa, karıncığına veya kalbin apeks bölgesine horseradish peroksidaz enjekte ederek, kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemişlerdir (96). Kalbin farklı bölgelerine yapılan enjeksiyon sonucunda, AKG duyu nöronlarının kalbin farklı bölgeleriyle heterojen bir dağılımla bağlantı kurduğu tespit edilmiştir (96). Başka bir çalışmada ise, kalbin farklı çemberlerine fast blue adlı retrograd boya enjeksiyonu ile kalbe özgü NG ve AKG duyu nöronlarının topografik dağılımını incelemeyi amaçlamıştır (12,14). Fast blue ile işaretlenmiş duyu nöronları floresan mikroskobu ile görüntülediğinde, C6-C8 seviyesi ile T2-T8 seviyesindeki AKG nöronları ile NG'da heterojen dağılımdaki işaretli duyu nöronlarının kalbe dallandığı ortaya konulmuştur (12,14). Topografik pozisyonun incelenmesine ek olarak, yaşlanmanın kalbe özgü duyu nöronları üstündeki etkisi de retrograd boyalar kullanılarak incelenebilmiştir (97). Literatürde kalbe özgü duyu nöronlarını incelemek için yapılan çalışmalarda, hücrelerin etkin bir şekilde işaretlenmemesi, kısıtlı histolojik incelenmesi veya floresan görüntülerinden yeterli bilgiye ulaşılamaması nedeniyle kardiyak aferentlerin moleküler ve elektriksel özellikleri ayrıntılı bir şekilde incelenmemiştir (12,14,97).

Lipofilik özelliğinden dolayı hücre zarına entegre olan DiI [1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate; DiIC18(3)] nöron takibinde retrograd boya olarak kullanılmaktadır (16,95,98,99). Literatürde, DiI kullanılarak işaretlenen NG ve AKG'de bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının ATP, kapsaisin, serotonin, pH değişimi gibi ağrı ile ilişkili kimyasallara verdikleri cevap incelenmiştir (16). Retrograd boyalar kullanılarak NG ve AKG'dan kalbe dallanan sinir hücrelerinin ayrıca merkezi sinir sisteminde yaptıkları bağlantılar da aynı teknik ile incelenebilmiştir. Corbett ve arkadaşları kalbin sinoatriyal düğümüne verdikleri DiI kristalleri ile medulla oblongatadaki kardiyak vagal nöronlarının bağlantısını görüntülemişlerdir (95). DiI gibi lipofilik özellikte olan Di-8-ANEPPQ (1-(3-Trimethylammoniopropyl)-4-[-[2-(di-n-octylamino)-6naphthyl]vinyl]pyridinium dibromide) da nöron işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır. DiI boyasına benzer olarak retrograd nöron işaretlemenin yanında, Di-8-ANEPPQ hücre zarındaki elektriksel potansiyel farkına hassas olup, voltaj değişimine bağlı floresan şiddeti değişmekte ve bu nedenle hücre zarı potansiyelinin takibinde kullanılabilir (98). Friedrich ve

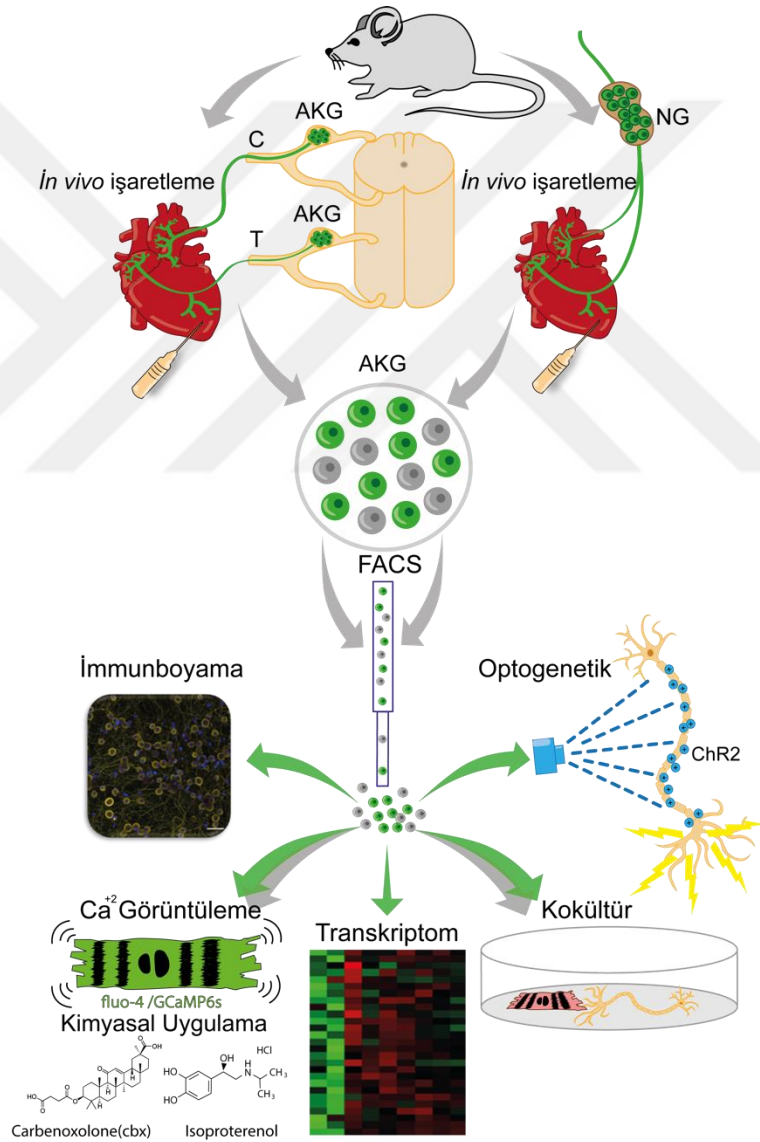
arkadaşları lipofilik retrograd boya olan DiI and Di-8-ANEPPQ'nun nöron işaretleme kapasitesini değerlendirmek üzere nazal epitelyuma enjekte etmişlerdir (99). Yapılan görüntülemeler sonucunda, DiI ve Di-8-ANEPPQ'nun benzer nöron gruplarını işaretlediği ancak DiI boyasına göre Di-8-ANEPPQ işaretli nöronların floresan şiddetinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (99).

Fluorogold literatürde kullanılan diğer bir retrograde boyadır (100). Deri ve yüz aferent nöronlarını fluorogold and DiI ile işaretleme sonucunda her iki boyanın da benzer verimlilikte olduğu tespit edilmiştir (101,102). Ayrıca, fluorogold kalbe dallanan nodoz ve jugular gangliyon nöronlarını işaretlemek için de kullanılmıştır. Fluorogold kalbe enjekte edildikten sonra jugular gangliyon incelenmiş ve işaretli hücrelerin neredeyse yarısının nörotransmitter olarak CGPR ürettiği gösterilmiştir (15). Di-8-ANEPPQ ve DiI boyalarına kıyasla, fluorogoldun immün işaretleme ve elektron mikroskobu incelemelerine daha uygun özelliklere sahip olduğu raporlanmıştır (100,103).

Sentetik boyaların yanında, son yıllarda geliştirilen bir virüs teknolojisi olan adeno-ilişkili virüs (AAV) de enjekte edildiği bölgeden geriye doğru hareket ederek ilgili nöronları işaretleme kapasitesine sahiptir (104). Tervo ve arkadaşları tarafından geliştirilen rAAV2-retro beynin çeşitli bölgelerine ve kasa enjekte edilerek virüsün işaretleme kapasitesi araştırılmıştır (104). Kasa yapılan rAAV2-retro enjeksiyonlarının beyne yapılan uygulamaya kıyasla verimliliğin az olduğu tespit edilmiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması ile kalbe özgü duyu nöronları literatürde ilk olarak *in vivo* işaretlendi ve saflaştırıldı, bu özel popülasyonun transkriptom profili araştırıldı. Ayrıca, kalbe özgü duyu nöronlarının kardiyomiyosit hücreleri ile olan sinyal alışverişi Fluo-4 ve GCaMP6s Ca²⁺ işaretleyiciler kullanılarak *in vitro* düzeyde incelendi. Hücreler arası Ca²⁺ iyonuna bağlı spontan aktivitenin yanında, nöron ve kardiyomiyositler kimyasal veya optogenetik ile uyarılarak floresan değişimleri takip edildi. Tez çalışması süresince izlenen deney basamakları Şekil 5.1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5. 1 Çalışmanın Ana Basamakları.

5.1. Kullanılan Malzemeler ve Vasatlar

Tablo 5.1.1 Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri

Sarf Malzeme	Yüzdellik	Marka	Katalog Numarası
Kardiyomiyosit İzolasyonu (Serum İçeren Besiyeri)			
DMEM	%62	Gibco	41966-029
M-199	%20	Gibco	31150-022
HEPES (1X)	%1	Sigma	H0887
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
Fetal Bovine Serum	%10	Gibco	10270-106
At Serumu	%5	Gibco	16050-130
Kardiyomiyosit İzolasyonu (Serum İçermeyen Besiyer)			
DMEM	%72	Gibco	41966-029
M-199	%25	Gibco	31150-022
HEPES (1X)	%1	Sigma	H0887
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
Kardiyomiyosit Besiyeri			
DMEM	%88	Gibco	41966-029
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050
Sodium Prüvat	%1	Sigma	11360-070
Fetal Bovine Serum	%3	Gibco	10270-106
At Serumu	%1.5	Gibco	16050-130
NewCalf Serum	%1.5	Gibco	16010167
B-27 Supplement	%2	Gibco	17504-044
Nöron İzolasyon Besiyeri			
Advanced RPMI	%98	Gibco	12633-012
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
Nöron Besiyeri			

Neural Basal Medium	%96	Gibco	10888-022
B-27 Supplement	%2	Gibco	17504-044
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
RPMI Besiyeri			
Advanced RPMI	%94	Gibco	12633-012
B-27 Supplement	%2	Gibco	17504-044
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050
Sodium Pürivat	%1	Sigma	11360-070

Tablo 5.1.2 Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Marka	Katalog Numarası
%0.05 Tripsin EDTA	Gibco	25300-054
Adenosine 5 triphosphate magnesium salt	Sigma	A5187-100MG
B-27 Supplement	İnvitrogen	17504-044
2,3-Butanedione monoxime (BDM)	Sigma	B0753
Calcein	Sigma	C0875
Carbenoxolone (Cbx)	Sigma	C4790
Cnqx	Sigma	C127
COLLAGENASE TYPE II	Gibco	17101-015
Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC)	Sigma	C1768
DAPI	Sigma	D9542
Di-8-ANEPPQ	Biotium	61014
DNase	Sigma	D4513
EGTA	Sigma	E4378
Fibronektin	Sigma	F1141
Fluo-4	Invitrogen	F14201
Fluorogold	Santa Cruz	sc-358883
D-(+)-Glikoz	Sigma	G7021
HBSS	Sigma	H9269
HBSS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco	14170-088

Hoechst bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma	14533
Isoproterenol hydrochloride	USP	35100
Jelatin	Sigma	G9391
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma	C1016
Kolajenaz Tip XI	Sigma	C7657
Laminin	Sigma	L2020
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	Sigma	93659
Mecamylamine	Sigma	M9020
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma	N6009
Neural Basal Medium	Gibco	10888-022
NeuroTrace DiI Tissue-Labeling Paste	Thermofisher	N22880
NewCalf Serum	Gibco	16010167
PBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco	14190-094
Penicilin/Streptomycin (P/S)	Gibco	15140-122
Percoll	Sigma	P4937
Pluronik asit	Sigma	P2443
Poly-L	Sigma	P6282
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma	4243
Propidium Iodide	Sigma	p4170
RPMI	Sigma	R0883
Sodyum Fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma	4276
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma	31434-1KG-R
Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM)	Molecular Probes	T668
Tripan mavisi	Sigma	T5146
Tripsin	Sigma	T4174
Tripsin inhibitörü	Sigma	T6522

Tablo 5.1.3 Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler

Sarf malzemeler	Firma	Kodu
B-mercaptoethanol	Sigma	M3148
iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR kiti	iScript	1708891
Qubit cihazına uygun RNA kiti	Invitrogen	32852
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen	74034
Truseq Total RNA Sample Preparation Kit v2.	Illumina	15058251

Universal Syber Green Supermix	iTaq	175124
Universal Syber Green Supermix	Sso Advanced	172-5271
Water	Sigma	W4502

Tablo 5.1.4 İmmun boyamalarda kullanılan malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Kodu
Aseton	Sigma	24201-2SL-R
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	A9418
DAPI	Sigma	D9542
Fluoromount Aqueous Mounting Medyum	Sigma	F4680
Hidrojen Peroksidad	Sigma	H1009
Hoechst	Sigma	14533
Keçi serumu	Gibco	16210-064
Optimum Cutting Temperature (OCT)	Leica Biosystems	14020108926
Pan Pen	Sigma	Z672648
Paraformaldehit	Sigma	158127
Sitrat Tamponun	Bio-Optica	15M103
Sodyum Azit	Sigma	S8032
Triton X	Sigma	X100
Tween-20	Sigma	P1379

Kullanılan plastik ve cam malzemeler

Sarf malzemeler	Firma	Kodu
0.22um Filter unit	Millipore	SLGP033RS
15 ml Falkon	Falcon	352096
50 ml Falkon	Falcon	352070
Hücre kazıyıcısı (cell scapter)	Costar	3010
ibidi insert	ibidi	80206
Pozitif Yüklü Mikroskop Lamları	Laborant	201504
Klonlama Silindiri	Sigma	C3983-50EA

5.2. Cihazlar

Tablo 5.2.1 Analiz ve görüntülemelerde kullanılan cihazlar

Cihaz/Yazılım Programı	Marka	Model
FACS	BD	Influx

Akım sitometrisi analizi	FlowJo	Versiyon 10.5
Konfokal mikroskobu	Zeiss	LSM780
Krostat cihazı	Leica	CM1950
PCR	Biorad	Thermal Cycler
Pipet yapıcı (puller)	Sutter Instruments	P-1000
Qubit cihazı	Invitrogen	
Santrifüj	Thermo Scientific	ST16R
Spinning Disk mikroskobu	Zeiss	Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse Microscope
XCELLigence RTCA Cardio ECR	ACEA Biosciences	
Fiji	ImageJ	2.0.0-rc-69/1.52i)
Matlab	MathWorks	R2018a
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
Ozmometre	Advance Instruments	3250
Illumina NextSeq 500 platformu	Illumina	NextSeq 500
Qubit	Invitrogen	
Axon Digidata Digitizer	Molecular Devices	Model 1550
Multiclamp Amplifier	Molecular Devices	Model 700B
Multipipet	GILSON, pipetman	FA10009
PatchStar Micromanipulator	Scientifica	

Tablo 5.2.2 *In vivo* operasyonlarda kullanılan cihaz ve malzemeler

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
Mouse Ventilator MiniVent Type 845	Harvard Apparatus	73-0043
Di-8-AnepqQ	Biotium	61014
Hamilton Enjektörü	Hamilton	5221002
Isıtıcı Plaka	WPI	Hot cold plate
Stereo Mikroskop	Zeiss	Discovery V8

5.3. Fareden Doku İzolasyonu

Hayvanlarla ilgili işlemler İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 38328770-30 nolu izin çerçevesinde gerçekleştirildi. Bu çalışmada yetişkin 10-12 haftalık dişi ve postnatal 0-3 günlük (P0-3) yenidoğan BALB/c Albino türü fareler kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından temin edildi ve operasyonlar MEDİTAM bünyesinde gerçekleştirildi.

5.3.1. Nodoz Gangliyon (NG) İzolasyonu

Yetişkin 10-12 haftalık BALB/c türü dişi fareler NG izolasyonu için kullanıldı. Anestezi öncesi, fareler tarttırılarak gerekli olan Ketamine (100mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) miktarı hesaplandı. İnsülin enjektörü ile miktarı belirlenen anestezi ajanları fareye i.p. yol ile verildi. Karanlık bir alana alınan farenin, pedal refleksi takip edilerek anesteziye dalma derecesi tayin edildi. Anesteziye alınan fare, diseksiyon için sırt üstü sabitlendi. Öncelikle alkol ile steril hale getirilen deri göğüs kafesi hizasından kesilerek diyaframa ulaşıldı. Dikseksiyon sırasında oluşabilecek kanamayı en aza indirmek amacıyla diyafram kesilerek ulaşılan kalp aortadan kesildi. NG'nun bağlı olduğu vagus siniri görebilmek amacıyla boyun bölgesindeki deri kesildikten sonra tükürük bezleri alındı, trake çıkarıldı. Stereo mikroskop yardımıyla vagus siniri lifi takip edilerek jugular foramende bulunan NG'nun yeri tespit edildi. Sağ ve solda birer adet olan NG çıkarılarak %1 Glutamax ve %1 P/S ile zenginleştirilmiş soğuk RPMI 1640 besiyerine alındı.

5.3.2. Arka Kök Gangliyon (AKG) İzolasyonu

Yetişkin fareden AKG doku izolasyonu ve nöron kültürü daha önce bahsedildiği şekilde hazırlandı (105). Yetişkin 10-12 haftalık BALB/c türü dişi fareler AKG izolasyonu için kullanıldı. Anestezi öncesi, fareler tarttırılarak gerekli olan Ketamine (100mg/kg) ve ksilazin (10mg/kg) miktarı hesaplandı. İnsülin enjektörü ile miktarı belirlenen anestezi ajanları fareye i.p. yol ile verildi. Karanlık bir alana alınan farenin, pedal refleksi takip edilerek anesteziye dalma derecesi tayin edildi. Anesteziye alınan fareler diseksiyon için yüz üstü yatırılarak sabitlendi. Önceden alkol ile steril hale getirilmiş deri ve sonrasında servikal seviyedeki omurilik kafatası ile birleşme

noktasından kesilerek omurilik açığa çıkarıldı. Omurilik temizlenerek, sağ ve sol kosta %1 Glutamax ve %1 P/S ile zenginleştirilmiş soğuk RPMI 1640 içerisine alındı. C ve T seviyesindeki AKG stereo mikroskobu yardımıyla kostadan çıkarılarak, soğuk RPMI 1640 içerisine alındı. AKG enzim ile muamele edilmeden önce diseksiyon sırasında gelen sinir fiberleri makas yardımıyla kesilerek ortamdaki uzaklaştırıldı.

5.3.3. Yenidoğan Kalp İzolasyonu

Yenidoğan fareden kalp izolasyonu ve kardiyomyosit kültürü daha önce bahsedildiği şekilde hazırlandı (106). Kalp izolasyonu 0-3 günlük yenidoğan BALB/c türü fare kullanılarak gerçekleştirildi. %70 alkol ile muamele edilen yeni doğan fareler steril koşullarda kabin içerisine alındı. Dekapistasyon ile sakrifiye edilen farelerin göğüs kafesi makas yardımıyla açılarak kalp izole edildi, buz üzerinde soğutulmuş Hank's tampon tuz çözeltisi içerisine alındı. Isı değişimini ve hücre kaybını en aza indirmek amacıyla doku soğuk tablo üzerinde alındı. Kalp sırasıyla kandan, ekstra dokudan temizlendi ve kulakçık kesilerek enzime hazır hale getirildi. Enzimin dokuya daha iyi nüfuz etmesi amacıyla kalp apeks bölgesinden kesildi. Her bir kalp için 1 ml %0.05 Tripsin EDTA kullanıldı ve enzim içerisine alınan dokular 12-16 saat +4 °C'de enzim ile muamele edildi.

5.4. Fare Primer Hücre Kültürü

Duyu nöronları ve kardiyomyosit hücreleri arasındaki olası morfolojik, hücresel, moleküler ve elektriksel iletişimi incelemek amacıyla AKG, NG ve kardiyomyosit kültürleri optimize edilerek oluşturuldu.

5.4.1. Hücre Plak Yüzey Matrisleri ve Besi Yeri Hazırlanışı

Hücre ekimi ışık ve floresan mikroskobu görüntülemesi için cam petrilere, elektron mikroskobu incelemesi için ise titanyum plaklar üzerine gerçekleştirildi. Hücrelerin hücre plaklarına yapışması için ekstraselüler matris olarak laminin ve/veya fibronektin kullanıldı. Matris olarak laminin ve/veya fibronektin kaplaması öncesinde plaklara steril dH₂O içerisinde hazırlanan %10 Poly-L eklendi. Oda

sıcaklığında iki saat inkübasyon sonunda plak yüzeyler iki kere steril dH₂O ile yıkanarak Poly-L ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama sonrası PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) içerisinde hazırlanan 10 mg/ml laminin ve/veya 10 mg/ml fibronektin ile yüzeyler kaplanarak 37°C’de inkübatörde bir gece bekletildi. Hücre ekimi fibronektin çekilerek yıkama yapılmadan, laminin ise çekilip plaklar PBS ile yıkanarak gerçekleştirildi. Kokültürlerinde en uygun yüzey matriksini belirlemek amacıyla fibronektin, laminin ve fibronektin+laminin olmak üzere üç farklı protein hücre plak yüzeylerine kaplandı. Kardiyomiyosit ve duyu nöronları üç farklı yüzeye ekildi, hücrelerin canlılıkları ve akson uzatmaları ışık mikroskobu ve immunboyama ile değerlendirildi.

5.4.2. Hücre Sayımı

Enzimatik aşamalardan geçirilen ve dokulardan izole edilen kardiyomiyosit veya duyu nöronlarını belirli sayıda hücre kaplarına ekmek amacıyla hücre sayımı gerçekleştirildi (107). Bunun için, hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile boyandı. Sadece ölü hücrelerin zarından geçebilen tripan mavi hemositometre kullanılarak canlı hücrelerinin sayılmasına olanak sağlamaktadır. Totalde 20 µl olacak şekilde hücre sayımı için hazırlanan ve tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak, hemositometre lamına yerleştirildi. Birkaç dakika hücrelerin hemositometre lamına yerleşmesi beklendikten sonra, ışık mikroskobu altında canlı hücrelerin sayıldı. Hemositometrede 16 kareden köşelerde bulunan 4 kare içerisinde canlı hücreler sayıldı, ortalaması alındı, 10⁴ ve dilüsyon katsayısı 2 ile çarpılarak toplam hacimdeki hücre sayısı elde edildi. İstenen sayıdaki hücre, kültür kaplarına ekilerek işlem tamamlandı (107).

5.4.3. Sinir Hücre Kültürü

Kalbe-özgü aferent sinirlerin detaylı morfolojik incelemelerini yapabilmek amacıyla, dokudan izole edilen ve işaretli sinir gövdelerini içeren NG ve AKG’lar 100 U/mL tip XI kolajenaz içerisinde 40 dakika 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Hank’s tampon tuz çözeltisi ile dokular üçer kez yıkanarak enzim ortamdan uzaklaştırıldı. Dokular, 15 dakika 37°C’de 1 mg/ml tripsin enzimi ile inkübe edilerek 2 mm’den başlayarak daralan çaplara sahip pipet uçlarından geçirildi. Mekanik

tritürasyonun son aşaması olarak insülin enjektöründen geçirilen hücreler 100 lg/mL DNase içerisinde alınarak inkübatöre kaldırıldı. DNase enzimi ile 30 dakika inkübasyonun sonunda hücre süspansiyonu 1000 dakikada rotasyonda (Rotation Per Minute, RPM) 3 dakika santrifüj edildi. Süpernetant atılarak pellet %10 fetal bovine serum ve 700 lg/mL tripsin inhibitörü içeren Tablo 5.1.1'de belirtilen NBA besiyeri ile sulandırıldı. Bu aşamadan sonra hücre süspansiyonu percoll gradyanına veya 5.7.bölümünde belirtilen adımlardan geçirilerek FACS cihazında analiz edildi. Sinir hücrelerini glialardan ve doku parçalarından ayırmak amacıyla %10, %35 ve %60 percoll gradyanı hazırlandı. Serum ve enzim inhibitörü eklenen hücre süspansiyonu hazırlanan percoll gradyanına konularak 1700 RPM'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda percoll gradyanında ortada bulunan beyaz tabaka ile birlikte üç farklı hücre tabakası elde edildi. Beyaz tabakanın altında bulunan saflaştırılmış sinir hücreleri pipet yardımıyla alındı ve üzerine NBA besiyeri eklenerek 1000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi (105). Hücre pelletine NBA veya kardiyomiyosit besiyeri eklendi ve pellet pipet yardımıyla homojen hale getirildi. Hücre süspansiyonundan 5 µl veya 10 µl alınarak ışık mikroskobu ile hücre sayımı yapıldı ve deney planına uygun şekilde hücre sayısı hücre kaplarına ekildi.

5.4.4. Kardiyomiyosit Kültürü

Bölüm 5.3.3'te belirtildiği gibi yenidoğan fareden elde edilen kalp dokusu tek hücre boyutuna getirilmek üzere 12-16 saatlik tripsin enzim ile muamele edildi. İnkübasyon sonunda, dokuların içinde bulunduğu tripsin enzimi Tablo 5.1.1'de belirtilen serum içermeyen kardiyomiyosit besiyeri ile yarı yarıya değiştirildi. Dokular 1-2 dakika 37 °C'de inkübe edildi, inkübasyon sonunda tripsin enzimi susturuldu ve %70'lik kolejenaz II enzimi ile dokular 37 °C'de 40 dakika muamele edildi. Enzim ile ayrıştırılan kardiyomiyosit hücre süspansiyonu Tablo 5.1.1'de belirtilen serum içeren kardiyomiyosit besiyerine alındı ve 800 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Fibroblast hücreleri kardiyomiyositlere göre daha hızlı yapışma kinetiğine sahiptirler. Olası fibroblast kontaminasyonunu engellemek amacıyla, kardiyomiyositçe zengin hücre pelleti Tablo 5.1.1'de belirtilen kardiyomiyosit kültür besiyeri ile süspanse edildi ve %0,1 jelatin ile kaplı hücre kaplarına aktarıldı. Yaklaşık 75 dakika inkübasyonun sonunda, yapışması daha yavaş olması sebebiyle süspansiyon

halinde kalan kardiyomiyositler toplanarak 1000 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Sayım sonrası kardiyomiyositler deney amacına göre belirli sayıda kültür kaplarına ekilmiştir.

5.4.5. Duyu Nöronları ve Kardiyomiyosit Kokültürü

Kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla her iki hücre tipinin de canlılıklarını koruyabilecekleri kokültür koşulları araştırıldı. İlk olarak hem nöron ve hem de kardiyomiyositlerin tutunabilecekleri ekstraselüler matriks karşılaştırıldı. Bunun için, laminin ve/veya fibronektin ekstraselüler matriks üzerine ekilen hücrelerin canlılıkları ve akson uzatma kapasiteleri ışık mikroskobu ve immunositokimyasal teknikler ile analiz edildi. Ekstraselüler matrikse ek olarak, uygun kokültür için Tablo 5.1.1'de belirtilen RPMI, NBA ve kardiyomiyosit besiyeri olmak üzere üç farklı kültür besiyeri kullanıldı. Farklı kültür besiyerlerine ekilen hücrelerin fonksiyonu ve canlılığı ışık mikroskobu ile incelenerek karşılaştırıldı.

Duyu nöronları ile kardiyomiyositlerin aynı kültür kabına heterojen ekilmesinin yanında, iki hücre tipini birbirinden ayırmak amacıyla ibidi insert ve cloning ring kullanılarak kompartıman oluşturuldu. Kompartıman ile birbirinden ayrılan hücreler ışık mikroskobu ile görüntüleri alınarak incelendi.

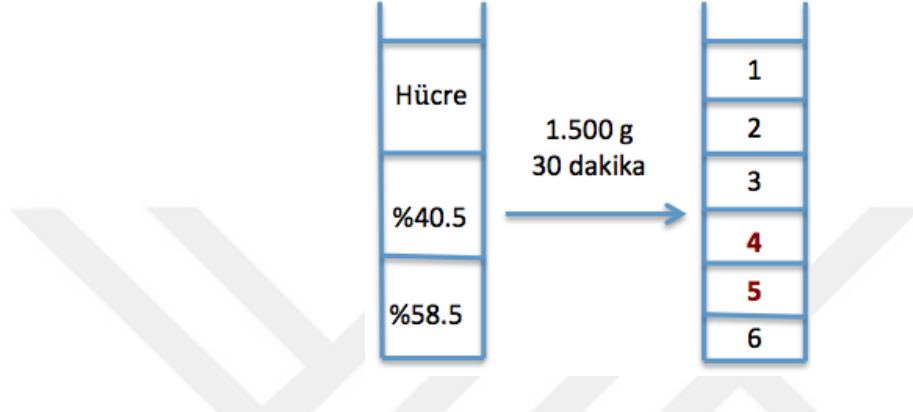
5.5. Hücre Saflaştırması

Kardiyomiyosit kültüründeki fibroblast kontaminasyonunu en aza indirmek amacıyla sırasıyla 5.5.1, 5.5.2 ve 5.5.3 bölümlerinde anlatılan percoll gradyanı, mitokondri boyası Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM) ve antimitotik ajan AraC kullanıldı.

5.5.1. Percoll Gradyanı ile Kardiyomiyositlerin Ayrıştırılması

Percoll içerisinde küçük partiküller bulunan bir kimyasaldır. Percoll gradyanı farklı percoll konsantrasyonlarında hazırlanan tabakalar oluşmakta ve hücrelerin özgül ağırlıklarına göre farklı hücre tiplerini birbirinden ayırmaktadır. Literatürde indüklenmiş pluripotent kök hücre temelli kardiyomiyositleri diğer hücre tiplerinden ayırmak için percoll gradyanı kullanıldığı raporlanmıştır (108). Kardiyomiyositleri

fibroblast hücrelerinden ayırmak amacıyla, %40,5 ve %58,5 olmak üzere iki farklı percoll tabakası oluşturuldu ve hücre süspansiyonu bu iki tabakanın üstüne yavaşça eklendi (108). Percoll gradyanı 1.500xg 30 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonunda hücrelerin özgül ağırlıklarına göre altı tabaka oluştuğu gözlemlendi (Şekil 5.5.1). Literatürde, percoll gradyanı sonucu oluşan altı tabakadan 4. ve 5. tabakaların kardiyomiyositçe zengin oldukları raporlanmıştır (108).



Şekil 5.5.1 Percoll gradyanına hücrelerin süzdürülmesi ve santrifüj sonucunda farklı hücre gruplarını veya ölü hücre içeren altı tabakanın gözlemlenmesi

Percoll gradyanı sonucu elde edilen altı hücre tabakasının her biri ayrı hücre plaklarına ekildi ve bir hafta süresince ışık mikroskobu kullanılarak incelendi. Elde edilen kültürlerde bulunan kardiyomiyosit ve fibroblast yüzdesini tayin etmek için kalp kası hücreleri hücreler kardiyomiyosite özgü protein olan troponin T (cTnT) ve çekirdek boyası DAPI ile immünboyama gerçekleştirildi. Alınan floresan görüntülerden, cTnT (+) ve DAPI (+) hücreler kardiyomiyosit hücreleri olarak, sadece DAPI (+) ile işaretlenen hücreler ise kardiyomiyosit olmayan hücre olarak değerlendirildi.

5.5.2. Tetramethylrhodamine Methyl Ester Perchlorate (TMRM) Boyaması ile Kardiyomiyosit Saflaştırması

Canlı hücre mitokondri floresan boyası olan TMRM, literatürde kardiyomiyosit saflaştırmasında kullanılmaktadır (109). Bu teknik, kardiyomiyosit hücrelerindeki mitokondri sayısının fibroblastlardan fazla olması ve buna bağlı olarak TMRM ile boyanan kardiyomiyositlerin fibroblastlara oranla daha şiddetli TMRM bağlı floresans yaymasına temeline dayanmaktadır. Bu nedenle, kardiyomiyosit saflaştırmasında

percoll gradyanı dışında TMRM boyası kullanılarak kardiyomiyosit hücreleri ayrıştırılmaya çalışıldı. Bunun için, yenidoğan fareden elde edilen kardiyomiyosit hücre süspansiyonu 10 nM TMRM ile 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. FACS cihazından geçirilmek üzere TMRM ile boyanan hücreler %1 DNase PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) içerisine alındı. FACS cihazında 488 nm lazer ve 580/30 ile 530/40 ışık filtreleri kullanılarak kapılama sonucu TMRM boyalı hücreler floresan şiddeti yüksek ve düşük olmak üzere hücreler ayrıştırıldı. Her iki gruba ait hücrelere ait kültürler ışık mikroskobu ile ve immünboyama ile analiz edilerek kardiyomiyosit içerikleri incelendi.

5.5.3. Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC) ile Fibroblast Bölünmesinin Durdurulması

Kardiyomiyosit kültürlerindeki fibroblast sayısını en aza indirmek için percoll gradyanı ve TMRM boyasının yanında ayrıca hücre bölünmesini yavaşlatan veya tamamen durduran AraC kullanıldı (110,111). 2, 4 veya 6 gün olmak üzere üç farklı zaman aralığında kardiyomiyosit kültürleri 10 μ M AraC ile inkübe edildi. AraC ajanın çözücüsü dH₂O eklenen kardiyomiyosit kültürü AraC uygulamasını karşılaştırmak üzere kontrol olarak kullanıldı. AraC inkübasyonu boyunca ve sonrasında hücreler ışık mikroskobu altında incelendi. Kültürler, fikslenerek kardiyomiyosite özgü protein olan kardiyak troponin C (cTnT) ve DAPI ile immünboyaması gerçekleştirildi. Alınan floresan görüntülerden, cTnT (+) ve DAPI (+) hücreler kardiyomiyosit hücresi olarak, sadece DAPI (+) ile işaretlenen hücreler ise kardiyomiyosit olmayan hücre olarak değerlendirildi.

Kardiyomiyosit kültürlerinde uygulanan antimitotik ajan olan AraC ayrıca nöron kültürlerine uygulanarak ortamda bulunan glia hücrelerinin bölünmesinin durdurulması amaçlandı. Literatür taraması sonucu 5 μ M ve 10 μ M olmak üzere iki farklı AraC konsantrasyonu nöron kültürlerine uygulandı (112,113). Glia hücrelerinin kültürdeki sayısını ve AraC'nin nöronlar üzerindeki toksisite etkisini araştırmak amacıyla AraC'nin çözüldüğü dH₂O eklendiği nöron kültürü kontrol olarak kullanıldı. Hücrelerin AraC ile iki gün inkübasyonun sonunda besiyeri değiştirildi. Kültürün 7. gününde hücreler fikslendi, nörona özgü protein olan Tuj-1 ve DAPI ile

immunboyaması yapıldı. Yapılan hücre sayımı sonunda, Tuj1 pozitif/DAPI pozitif hücre sayısı oranı kullanılarak en uygun AraC konsantrasyonu tayin edildi.

5.6. Kalbe-Özgü Nöronların *In vivo* İşaretlenmesi

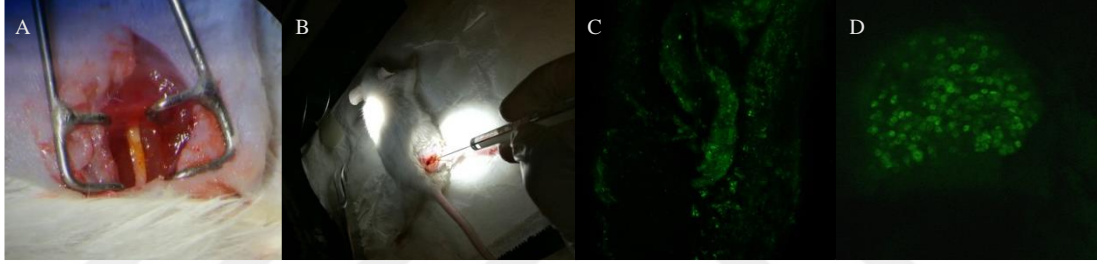
Kalbe özgü nöronları *in vivo* işaretlemek amacıyla Di-8-ANEPPQ, DiI, fluorogold ve rAAV2-retro retrograd ajanları kullanıldı. Di-8-ANEPPQ enjekte edilen bölgeye özgü nöronları işaretlemesinin yanında voltaj duyarlı olduğu literatürde raporlanmıştır (98). Di-8-ANEPPQ'nun hücre boyama kapasitesini, uyarılma/ışıma spektrumunu oluşturmak ve voltaj duyarlılığını test etmek amacıyla öncelikle hücre kültüründe uygulandı. Analiz sonrasında, kalbe-özgü nöronları *in vivo* işaretlemek üzere Di-8-ANEPPQ, DiI, fluorogold ve rAAV2-retro kullanılarak retrograd ajanlar karşılaştırıldı.

5.6.1. Di-8-ANEPPQ *In Vitro* Boyama Protokolü

In vivo deneyleri gerçekleştirmeden önce, Di-8-ANEPPQ'nun hücre boyamasını ve voltaj-duyarlılığını test etmek için yetişkin NG kültürü veya yenidoğan kardiyomiyositler Di-8-ANEPPQ ile boyandı. Hücreleri boyamadan önce, 10 mM Di-8-ANEPPQ stok solüsyonu 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi Nöron veya kardiyomiyosit kültürü ısınan boyadan hazırlanan 20 µM Di-8-ANEPPQ besiyeri ile 20-30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Boyama sonrası kültürler iki kere fosfat tampon çözelti ile yıkandı. Hücrelerin normal fizyolojik koşulları sağlaması için kültürler taze kültür besiyeri konularak hücreler 10-15 dakika at 37 °C'de inkübe edildi. Di-8-ANEPPQ ile boyalı nöron veya kardiyomiyositlerdeki voltaj değişikliğini ölçmek için 488 nm laser ile 494-654 nm emisyon filtresi kullanıldı. Nöronları uyarmak için tek hücre aksotomi kullandı. Belirlenen nörona ait akson femtosecond lazer kullanılarak kesildi. Spontan veya aksotomi sonrası Di-8-ANEPPQ boyalı hücrelerden (1 frame/sn) olacak şekilde görüntü alındı. Alınan görüntülerden ImageJ yazılımı kullanılarak floresan değişikliği ölçüldü. Boyama kapasitesi ve voltaj duyarlılığının test edilmesinin yanında, konfokal mikroskopunda bulunan güç spektrum modülü kullanılarak Di-8-ANEPPQ ile boyanan kardimiyosit hücrelerinin uyarılma ve ışıma spektrumu ölçüldü.

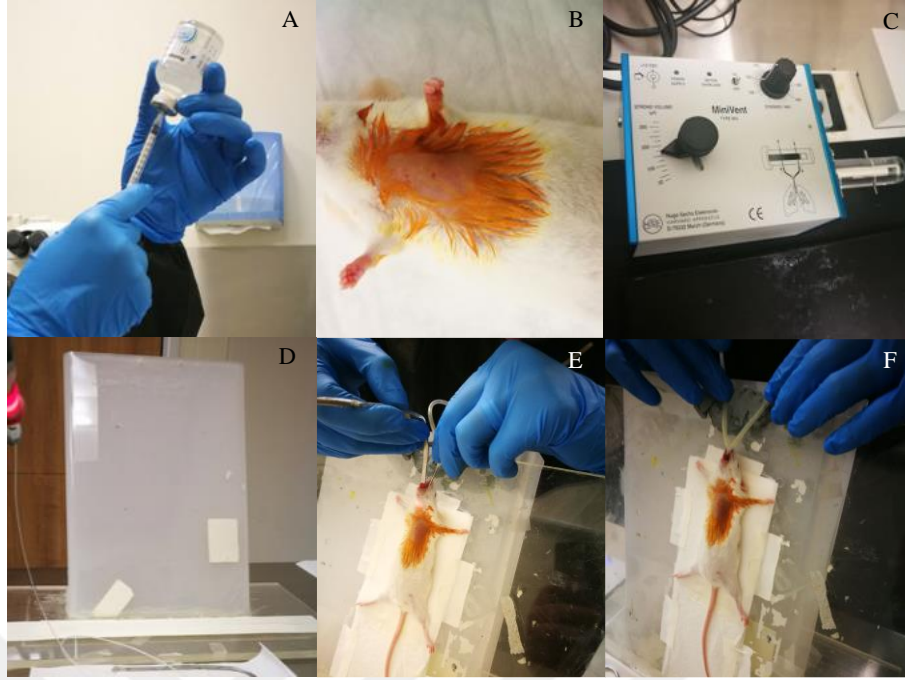
5.6.2. Kalbe-Özgü Nöronların *In vivo* İşaretlenmesi

AKG ve NG'da bulunan kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek amacıyla akson boyunca geriye doğru ilerleyen (retrograd) ve voltaj duyarlı Di-8-ANEPPQ boyası kullanıldı. Ayrıca, Di-8-ANEPPQ boyasına ek olarak literatürde sıklıkla kullanılan ve verildiği dokudan geriye doğru ilerleyerek nöronları işaretleyen DiI (102), Flurogold (100) veya yeni bir virüs teknolojisi olan rAVV2-retro (104) kullanıldı. Kalp operasyonlarındaki mortalitenin yüksek olması nedeniyle retrograd özelliğe sahip ajanlar öncelikle siyatik sinire uygulandı (Şekil 5.6.1 A-B). Operasyondan üç gün sonra siyatik sinir çıkarılarak boyanın sinire (Şekil 5.6.1 C) ve sinirin dallandığı Lumbar 3-5 seviyesindeki AKG nöronlarına geçişi (Şekil 5.6.1 D) floresan mikroskobu altında gözlemlendi.



Şekil 5.6.1 Siyatik sinire Di-8-ANEPPQ uygulaması ve retrograd boyama incelemesi. (A) Anestezi altında BalbC türü farelerde siyatik sinir açığa çıkartılarak, (B) 1.5 µl Di-8-ANEPPQ (10µM) enjeksiyonu gerçekleştirildi. (C) Operasyondan iki gün sonra siyatik sinirde ve (D) lumbar 3-5 aralığında AKG'da Di-8-ANEPPQ (yeşil) boyasının konfokal mikroskobunda tespiti (10X).

Siyatik sinire uygulanan retrograd ajanların değerlendirmesi sonucunda belirlenen ajanlar kalbe uygulanarak kalbe özgü duyu sinir hücrelerinin işaretlenme kapasiteleri karşılaştırıldı. Kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek amacıyla 10-12 haftalık yetişkin Balb-C türü fare kullanıldı. Ketamine (100 mg/kg) ve ksilen (10 mg/kg) karışımı intraperitoneal (i.p.) yol ile enjekte edildi, refleksler belli aralıklarla kontrol edilerek fare anestezi altına alındı. Farenin göğüs bölgesi tıraşlandı ve batikon ile aseptik koşullara uygun hale getirildi. Soluk borusunda bulunan kıkırdak yapıdaki epiglottis farelerin entübasyonunda yol gösterici rol oynamaktadır. Bu nedenle, epiglottisi net bir şekilde görebilmek için Şekil 5.6.2 D'deki platform tasarlandı (114). Anestezi altındaki hayvan tasarlanan platforma yerleştirildi, epiglottis gözlemlenerek soluk borusuna entübasyon aparatı yerleştirildi ve solunum cihazına bağlandı.



Şekil 5.6.2 Operasyona hazırlık aşamalarının gösterimi. (A) Farenin anesteziye alınması, (B) Cildin temizlenmesi, (C) Solunum cihazı ve hayvanın ağırlığına göre ayarlar, (D) Entübasyon için kullanılan düzenek, (E) Entübasyon boru sistemi (F) ve Farenin entübe edilmesi

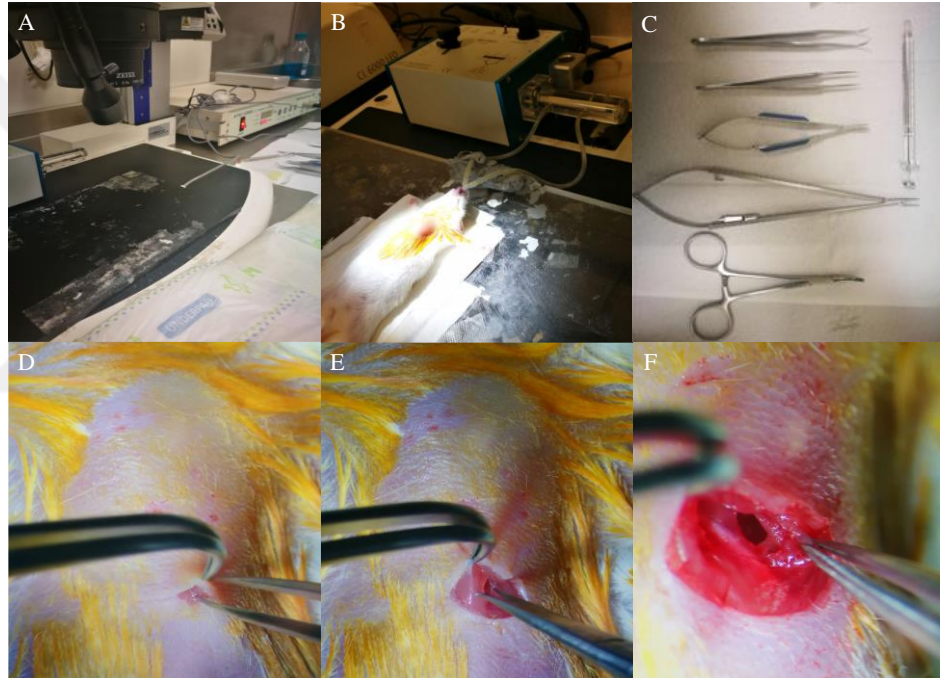
Solunum cihazında bulunan gaz değişim hacmi (T_v - μ l) ve dakikada verilme ritmi (Beat Per Minute) hayvanın gramına uygun resimde Tablo 5.6.1’de belirttiği gibi ayarlandı.

Tablo 5.6.1 Solunum cihazında kullanılan değer tablosu. Hayvanın kilosuna göre ayarlanan solunum hacmi (μ l) ve solunum hızı (bpm) değerleri

Ağırlık (g)	Solunum Hacmi (μ l)	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

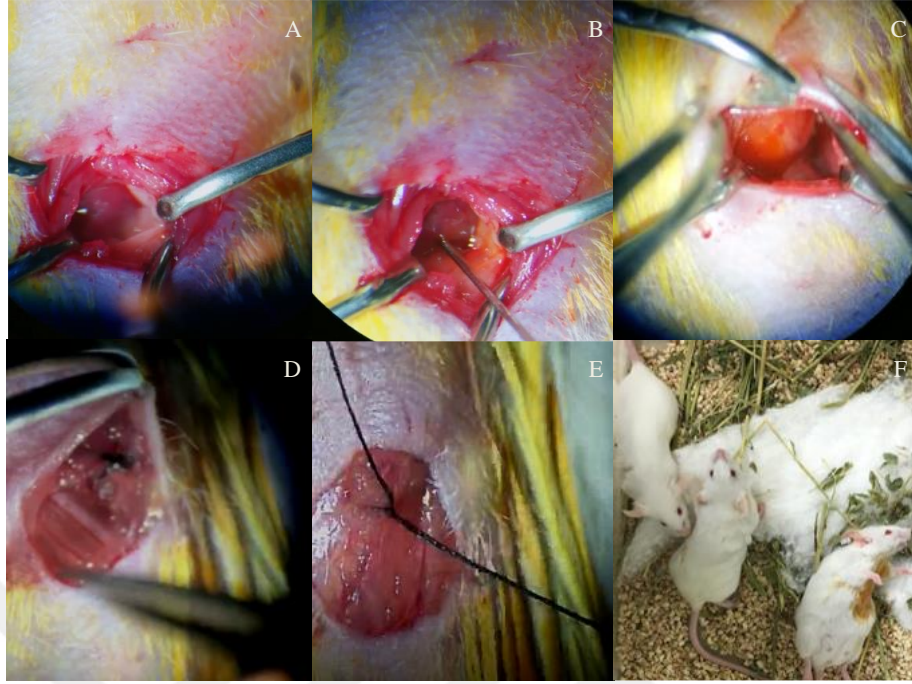
Operasyon sırasında oluşabilecek hipotermiyi en aza indirmek amacıyla fare sıcak ped üzerine yatırıldı (Şekil 5.6.3 A). Entübasyonun başarısı, hayvanın soluk alıp

vermesi ile solunum cihazının senkronize olması ve hayvanın solunumu sırasında sadece göğüs kafesi hacminin değişmesi gibi parametreler gözlemlenerek doğrulandı (Şekil 5.6.3 B). Operasyon sırasında Şekil 5.6.3 C'de gösterilen cerrahi aletler kullanıldı. Retrograde boyaların enjeksiyonu için kalbin apeks bölgesi seçildi. Kalbin apeks bölgesini kaplayan toraks 9-10 seviyesindeki kaburgalara ulaşmak amacıyla sol aksiller bölge ve xiphoid çıkıntı arasında hayali bir çizgi çekilerek çizginin orta noktası belirlendi. Deri ve ardından alt katmanlarda bulunan kaslar küt uçlu cerrahi bir alet ile disekte edildikten sonra kaburgalar görünür hale getirildi (Şekil 5.6.3 D, E). İki kaburga arasındaki kaslar kesildi (Şekil 5.6.3 F) ve retraktör yerleştirildi.



Şekil 5.6.3 Kalbe ulaşmak için takip edilen adımlar. (A) Hipotermiyi engellemek amacıyla fare sıcak pede yatırılması, (B) entübasyon sonrası solunum cihazına bağlanması. (C) Operasyon sırasında kullanılan aletler ve bu aletler ile (D) önce derinin (E) sonra kasların kesilmesi, (F) Xiphoid çıkıntıyı başlangıç noktası sayarak toraks 2-3 arasını açarak kalbin Apeks Bölgesine ulaşılması.

Kalbin gözlemlenmesi ile (Şekil 5.6.4 A) Di-8-Anepq (10uM), Flurogold (5mg/ml) ve rAVV2-retro (Virüs titrasyonu: 3.53×10^{12}) Hamilton enjektörü (701N, 30G) ile, DiI Tissue-Labeling Paste ise bir pipet yardımıyla alınarak kalbin apeks bölgesine verilmiştir (Şekil 5.6.4 B). Boyanın kalbe yayılımı gözlemlendikten sonra (Şekil 5.6.4 C) kas ve deri 6-0 ipek iplikle dikildi (Resim 5.6.3 D, E) ve operasyon bölgesi batikon kullanılarak temizlendi (Şekil 5.6.4 F).



Şekil 5.6.4 Retrograd ajanların kalbe enjeksiyonu için takip edilen adımlar. (A) Kalbin apex bölgesine ulaşma, (B) hamilton enjektörü kullanarak retrograd ajanların kalbin apeks bölgesine enjeksiyonu ve (C) kullanılan ajanların kalp yüzeyindeki yayılımını gözlemlendikten sonra (D) toraks ve kas bölgesinin 5-0 ipek iplikle dikilmesi (E) negatif basınç verilmesinin ardından derinin dikilmesi. (F) Operasyon tamamlandıktan sonra fareler post-operatif odaya alınır.

Kalbin apeks bölgesine verilen Di-8-anepq'nun duyu nöron gövdelerini içeren AKG ve NG nöronlarına optimum taşınma süresini incelemek amacıyla Tablo 5.6.1'de belirtildiği gibi 1, 3, 7, ve 14 günler seçilmiştir. Ayrıca, Di-8-Anepq boyası pipet ve Hamilton enjektörü olmak üzere iki farklı yöntem ile kalbin apeks bölgesine verilmiştir. Operasyondan 1, 3, 7 ve 14. gün sonrasında boya verilen hayvanlar sakrifiye edilerek AKG ve NG dokuları çıkarılmıştır. Soğuk RPMI içerisine alınan dokular konfokal mikroskobu altında floresan görüntüleri alındıktan sonra hücreler enzim yolu ile ayrıştırılarak hücre kültüründeki boya tutumu incelenmiştir.

Tablo 5.6.2 Di-8-ANEPPQ boyası ile kalbe özgü nöronların işaretlenmesi ve optimizasyonu

Di-8-ANEPPQ Konsant. (mM)	Verilen Miktar (μ l)	Method	Çözücü	Enjeksiyon Yeri	Bekleme Süresi	Hayvan Sayısı
20	1	Pipet	HBSS	Apex	1	1
20	1	Pipet	HBSS	Apex	3	2
20	1	Pipet	HBSS	Apex	5	2
20	1	Pipet	HBSS	Apex	7	3
20	1	Pipet	HBSS	Apex	14	1

5.6.3. Floresan Görüntüleme

In vivo retrograd boyalar verildikten sonra floresan görüntüleme için Tablo 6.1’de belirtilen uyarılma ve ışıma filtreleri kullanılmıştır. Di-8-ANEPPQ için 488 nm uyarılma ve 493-654 nm emisyon filtresi; DiI için 514 nm uyarılma ve 519-672 nm emisyon filtresi; fluorogold için 405 uyarılma ve 410-585 nm emisyon filtresi; rAAV2-retro için 561 nm uyarılma ve 560-677 nm emisyon filtresi kullanıldı (Tablo 5.6.3).

Tablo 5.6.3 Retrograd floresan boyaların uyarılma ve ışıma özellikleri ile verilen konsantrasyon bilgisi

Boya Adı	Uyarılma (nm)	İşıma (nm)	Konsantrasyon	Verilen Miktar
Di-8-ANEPPQ	488	493-654	10 mg/ml	1 μ l
DiI Paste	514	519-672	933.88 M.W	5 mg
Fluorogold	405	410-585	5 mg/ml	1 μ l
rAAV2-retro	561	560-690	8.33x10 ¹² MOI	1 μ l

5.7. Floresanca Aktifleştirilmiş Hücre Ayrışması (FACS)

Gen ekspresyon analizleri ve kokültürlerde kullanmak üzere *in vivo* Di-8-AnepPQ ile işaretlenmiş kalbe özgü duyu nöronları floresanla aktive edilmiş hücre ayrıştırma (FACS) cihazı ile saflaştırıldı. Kalbe özgü duyu nöronlarının FACS ile saflaştırılması için, *in vivo* olarak kalbe Di-8-anepPQ verilen ve herhangi bir müdahalede bulunulmayan kontrol farelerden AKG ve NG’lar çıkarıldı. Bölüm

3.3.2’de belirtilen adımlar takip edilerek enzim yoluyla ayrıştırılan hücreler, %1 DNase ve %1 FBS içeren PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) içerisine alındı. FACS’ta hücre kaynaklı olası bir tıkanmayı engellemek için hazırlanan hücre süspansiyonu 100 µm’lik hücre süzgecinden (cell strainer; 352360, Falcon) geçirildi. FACS ayrıştırması sırasında kapılamanın canlı ve sağlıklı hücelere odaklanması, ölü hücre ve debrilerden kurtulmak amacıyla sırasıyla kontrol NG ve AKG hücreleri 488 nm uyarım ile 630±30 ile 513±40 kullanıldı ışımaya filtreleri kullanılarak analiz edildi. Otofloresan ve canlı hücre profilinin oluşturulması sonucunda sırasıyla Di-8-AnepPQ işaretli NG ve AKG içeren heterojen hücre popülasyonu kontrol ile aynı uyarım ve ışımaya filtreleri kullanıldı. Floresan işaretli nöronlar 25 ng/ml Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor, NGF) ile zenginleştirilmiş NBA içeren 35 mm’lik petri kaplarına ayrıştırıldı. Ayrıştırılan Di-8-AnepPQ işaretli hücrelerin konfokal mikroskobunda floresan ışımaları gözlemlendi ve petrilere hücreler toplanarak 1000 RPMI 3 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan Di-8-AnepPQ işaretli NG hücrelerinin tümü RNA izolasyonuna alındı. Saflaştırılan Di-8-AnepPQ işaretli AKG hücrelerinin ise bir kısmı kültür kaplarına ekimi yapıldı ve geri kalanından ise RNA izole edildi. Hücrelerin canlılığını korumak ve FACS sonrası stresi azaltmak için NBA besiyerine 25 ng/ml NGF eklendi. Ekimden bir gün sonra kültür besiyeri değiştirildi ve hücreler ışık mikroskobu altında incelendi.

5.8. İmmünohistokimyasal (ICC) İnceleme

Heterojen veya homojen kalbe özgü duyu sinir hücreleri tek başına veya kardiyomyosit hücreleri ile yapılan kokültürü ICC inceleme için %4 Paraformaldehit ile sabitlenerek aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

- Hücrelerin besiyeri çekildi ve iki kez fosfat tampon (PBS) ile yıkanarak besiyeri tamamen ortamdan uzaklaştırıldı.
- %4’lük PFA hücre kaplarının yüzeyini örtecek şekilde eklendi ve hücreler PFA ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- PBS ile yıkamalarından ardından petri kaplarına bloklama solüsyonu (PBS’te çözülmüş %3 BSA, %0.01 Sodyum Azit, %5 Keçi Serum, 0.1% Triton X) eklenerek hücreler 30-45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Hedeflenen proteinleri işaretlemek amacıyla Tablo 5.8.1’de belirtilen konsantrasyonlarda birincil antikorlar veya konjuge antikorlar hücre kaplarına eklendi ve +4 °C’de 12-16 saat boyunca inkübe edildi.
- 12-16 saat sonunda hücre kapları PBS ile yıkandı. Floresan görüntü alabilmek için Tablo 5.8.1’de belirtilen birincil antikorları tanıyıp bağlanabilen floresan özellikli ikincil antikorlar kullanıldı. Tablo 5.8.2’da belirtilen konsantrasyonlarda ikincil antikorlar kaplara eklenerek, ışığa duyarlı oldukları için karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyonları gerçekleştirildi. 1 saat sonunda ikincil antikorlar petriden pipet yardımıyla çekildi.
- Floresan boyama sonrası hücreler üç kez %0.02 Tween-20 PBS ile yıkanarak bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi çekirdek boyası olan DAPI konsantrasyonu 1 µg/ml olacak resimde petri kaplarına eklendi ve 3 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. DAPI ile boyama işlemi tamamlandıktan sonra PBS eklenen örneklerin konfokal floresan mikroskobu veya spinning disk konfokal mikroskobu ile floresan görüntüleri alındı.

Tablo 5.8.1 İmmünotokimyasal (ICC) ve immunohistokimyasal (IHC) analizlerde kullanılan birincil antikorlar

Antikor ismi	Marka	Kodu	Dilüsyon (ICC; IHC)
Anti myosin heavy chanin	Upstate	05-716	1:500
cTnT	Thermo	MS-295-P	1:500; 1:200
cTnI	Abcam	Ab47003	1:500
Cx-43	abcam	ab11370	1:1000
Synaptophysin	abcam	ab32127	1:50
Synapsin I	abcam	ab64581	1:200

Beta III Tubulin	abcam	ab4680	1:1000; 1:500
NF-200	abcam	ab4680	1:100.000; 1:50.000

Tablo 5.8.2 İmmünotokimyasal (ICC) boyama ve immunhistokimyasal (IHC) analizde kullanılan ikincil antikorlar

Antikor ismi	Marka	Kodu	Dilüsyon (ICC, IHC)
Alexa Flour 488	Cell Signaling Technologies	4408S	1:500
Alexa Flour 488	Cell Signaling Technologies	4412S	1:1000
Alexa Flour 488	Abcam	ab150165	1:500
Alexa Flour 546	Molecular Probes	A11003	1:500
Alexa Flour 546	Molecular Probes	A11010	1:1000
Alexa Flour 546	Molecular Probes	A11040	1:1000; 1:400
Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21070	1:1000
Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21050	1:500
Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21103	1:1000
Alexa Flour 647	Cell Signaling Technologies	4410S	1:500; 1:500
Alexa Flour 647	Cell Signaling Technologies	4414S	1:1000

5.9. İmmunohistokimyasal (IHC) İnceleme

In vivo işaretleme sonrası çıkarılan dokular Optimum Cutting Temperature (OCT) içerisine gömülerek -80 °C'ye kaldırıldı. Dokulardan krostat cihazı ile 10 µm kalınlığında alınan kesitler pozitif yüklü lamlara yerleştirildi. Alınan kesitlerin immünboymasını gerçekleştirmek için sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı.

- -80 °C'den çıkarılan kesitler 5-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Dokular %4 PFA'da 20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek fiksasyonu gerçekleştirildi.
- PFA'yı uzaklaştırmak için dokular iki kere PBS'ten geçirilir, 5 dakika PBS'te bekletilir.
- Dokulardaki peroxidase enzimini durdurmak amacıyla kesitler %0,3 Hydrogen Peroxide ile yıkandı.
- Bir kere distile su ile yıkanan kesitler, daha sonra iki kere PBS'ten geçirildi.
- Birincil antikorun tanıdığı bölgeye göre epitope retrieval yapılır. Epitope retrieval için kesitler 1X sitrat tamponun içine alındı. Mikrodalga fırın kullanılarak kesitler önce 5 dakika 700 W ardından 12 dakika 300 W'ta ısıtıldı.
- Sitrat tampon içerisinde ısıtılan kesitler oda sıcaklığına alınarak soğuması beklendi.
- Her bir lamdaki kesitleri deney amacına göre ayırmak için kesitlerin etrafları hidrofobik özellikteki pan pen ile çizildi.
- Kesitlerin üzerine bloklama solüsyonu konularak 1 saat oda sıcaklığında bloklama gerçekleştirildi.
- Birincil antikorlar dilüsyon tampon çözeltisi ile istenilen konsantrasyona sulandırıldı ve kesitlerin üstlerine pipet yardımıyla konuldu. Nemli bir kaba yerleştirilen kesitler 1 gece boyunca +4 °C'de birincil antikorlar ile inkübe edildi.
- Bir sonraki gün birincil antikorlar çekildi, ortamdaki bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak amacıyla kesitler 3 kere 5'er dakikalık PBS ile yıkandı.
- Birincil antikoru tanıyacak floresan özelliğe sahip ikincil antikor istenilen dilüsyonda hazırlandı, dokuların üstlerine konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında

karanlıkta inkübe edildi. Bu işlem sırasında, negatif kontrol olarak adlandırılan birkaç kesite birincil antikor konulmadan sadece ikincil antikor ile inkübe edildi.

- Ortamdaki bağlanmamış ikincil antikorları uzaklaştırmak amacıyla kesitler 3 defa 5 dakikalık PBS yıkamalarından geçirildi.
- Son olarak çekirdekleri boyamak amacıyla 1 µg/ml konsantrasyonundaki DAPI ile kesitler oda sıcaklığında 5 dakika muamele edildi.
- Boyaması sonrası 5 dakika PBS ile yıkanan kesitler floresan mikroskobu altında incelenerek floresan ışıması incelendi.
- Boyandığı gözlenen dokuların üstü Fluomount Aqueous Mounting Medyum kullanılarak lamel ile kapatıldı. Kapatıcının polimerleşmesi için kesitler +4 °C’de bir gece boyunca bekletildi.
- Bir sonraki gün lamellerin etrafı bir oje yardımıyla kapatılarak tespit edildi.
- Görüntü almak üzere negatif kontrollerden otofloresanı en aza indirmek amacıyla floresan mikroskobunda ayarlamalar yapıldı. Ayarlamalardan sonra boyanan kesitlere geçilerek görüntü alındı.

5.10. Di-8-ANEPPQ İşaretli Kalbe Özgü Nöronların Boyutlu Görüntülenmesi ve Hücre Gövde Çap Ölçümü

AKG ve NG’ları kolajen yapısındaki kapsüller tarafından çevrelenmiş hücre kümeleridir. Kolajen yapısı gereği gangliyonlar ışığı ikincil harmoniğe çevirebilir bu özelliğinden faydalanılarak herhangi bir floresan boya ile işaretlenmeden multifoton ile görüntülenebilmektedirler (115). Bu nedenle, kolajen yapıdaki ganlyionların dış hatlarını belirlemek ve Di-8-ANEPPQ işaretli kardiyak aferentleri görüntülemek amacıyla ikili Ti:Sapphire multifoton lazere sahip (Coherent Chameleon Vision IIand Ultra, Coherent) Zeiss 7 MP mikroskobu (Carl Zeiss) kullanıldı. 820 nm dalga boyu kullanılarak ikincil harmonik üretimi sağlandı ve Di-8-ANEPPQ işaretli hücreler görüntüledi. Geri ve ileri ikincil harmonik üretimine ait sinyaller 20x/1.0 N Plan-Apochromat su immersiyonlu, 1.8 mm çalışma uzaklığına sahip objektif ile alındı ve Z düzleminde 1 µm’lik kesitler şeklinde 300-500 µm kalınlığında görüntüler elde edildi.

Kalbe özgü AKG ve NG duyu nöronlarının çaplarını belirlemek için, OCT içerisine gömülen Di-8-ANEPPQ işaretli her bir gangliyondan 30-60 kesit alındı. Aynı hücrenin alanını ölçmemek için, çekilen kesitlere ait floresan görüntüler ardışık sıra halinde incelendi ve çevresi en belirgin Di-8-ANEPPQ işaretli hücreler alan ölçümü için kullanıldı. Fiji software (2.0.0-rc-69/1.52i) yazılımı kullanılarak hücrelerin alanları ölçüldü ve elde edilen alan değerleri kullanılarak her bir hücrenin soma çapı hesabı yapıldı.

5.11. Elektron Mikroskobu ile İnceleme

Heterojen veya homojen kalbe özgü duyu sinir hücreleri ile kardiyomiyosit kokültürlerinde hücreler arası bağlantıyı incelemek amacıyla elektron mikroskobu kullanıldı. Aşağıda belirtilen adımlar takip edilerek örnekler elektron mikroskobunda incelemeye uygun olarak hazırlandı.

- Titanyum plak üzerine ekilen hücrelerin besiyeri çekildi ve iki kez PBS ile yıkanarak besiyeri tamamen ortamdan uzaklaştırıldı.
- Fiksatif olarak %2,5 Glutaraldehit kullanıldı. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar Glutaraldehit eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Hücreler 10'ar dakika üç kere distile su ile yıkandıktan sonra %30, %50, %70, %90, %96 ve %100'lük alkol serisinden geçirildi.
- Örnekler artan alkol serisinden sonra sırasıyla %30 ve %50 aseton içerisinde beşer dakika tutuldu.
- Son adım olarak %100 aseton içerisine alınan örnekler kurumak üzere bir gece boyunca critical point cihazında bekletildi.

5.12. RNA İzolasyonu

Saflaştırılan kalbe özgü duyu sinir hücreleri ve karşılaştırmak için kullanılan heterojen AKG ve NG hücrelerinden FACS sonrası hücre süspansiyonu halinde veya petri kaplarına ekim sonrası RNeasy Plus Micro Kit kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. RNeasy Plus Micro Kit 500 hücreye kadar RNA izolasyonuna olanak

sağlamaktadır. Kitin kullanım kılavuzunda belirtilen adımlarda birkaç modifikasyon yapılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu hücre süspansiyonundan yapılacaksa besiyeri uzaklaştırılarak lizis eklenir. Hücre kültüründe adherent hücrelerden RNA izolasyonu için ise besiyeri uzaklaştırılarak petri kapları bir kere PBS ile yıkandı. %1 β -mercaptoethanol içeren 350 μ l RLT tampon çözelti hücre pelletine veya petri kaplarına eklendi. Lizis içerisine alınan petri kaplarındaki hücreler hücre kazıyıcısı yardımıyla toplandı. Bu aşamadan sonra hücre süspansiyonu ve adherent hücreler için aynı adımlar takip edildi. Homojenizasyonu gerçekleştirilen örnekler gDNA eliminator spin kolonlarına aktarıldı ve 30 saniye 8000xg'de santrifüj edildi. Kolon atıldı ve kolonun altına geçen sıvıya kullanılan lizisin 1X hacmi kadar yani 350 μ l %70'lik etanol eklendi. Lizat homojen olana kadar pipet ile karıştırıldı ve RNeasy MinElute spin kolonlara aktarılarak 15 saniye 8000xg'de santrifüj edildi. RNeasy Spin Kolona 700 μ l RW1 tamponundan eklendi ve 15 saniye 8000xg'de santrifüj edildi. RNeasy Spin Kolona 500 μ l RPE tamponundan eklendi ve 15 saniye 8000xg'de santrifüj edildi. Son olarak RNeasy Spin Kolona 500 μ l %80'lik alkol eklendi ve 2 dakika 8000xg'de santrifüj edildi. Yeni bir toplama tüpüne alınan RNeasy kolonu etanolü tamamen uzaklaştırmak için maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. 5 dakika üstü açık resimde oda sıcaklığında belirtilen kolon RNA'nın toplanacağı RNase içermeyen toplama tüpe aktarıldı. Kolonun tam ortasına 14 μ l RNase içermeyen distile su eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 1 dakika 13.000xg'de ile santrifüj edilen kolondan tüpe geçen RNA -80 °C'de muhafaza edildi.

5.12.1. RNA Ölçümü

İzole edilen RNA'ların miktarlarını ölçmek amacıyla Qubit cihazı ve Qubit cihazına uygun RNA kiti kullanıldı. RNA kitine ait kullanım kılavuzunda belirtilen Tablo 5.12.1'deki çalışma solüsyonu hazırlandı. Qubit cihazının kalibrasyonu için kit ile birlikte gelen Standart1 ve Standart2 Tablo 5.12.1'de belirtildiği resimde hazırlandı. Standart solüsyonları vortekslenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve kalibrasyon için Qubit cihazında okutuldu. Kalibrasyondan sonra çalışma solüsyonu içerisine alınan örnekler vortekslenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve Qubit cihazında okutuldu.

Tablo 5.12.1 Qubit RNA ölçüm kiti için solüsyonlar ve kullanım miktarları

İçerik	Standart (µl)	Örnek (µl)
Çalışma Solüsyonu	190	198
Standart	10	-
Örnek	-	2
Toplam Hacim	200	200

5.12.2. cDNA Sentezi

Örneklere ait RNA konsantrasyonlarına uygun resimde iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR kiti kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Kullanılacak olan RNA miktarının konsantrasyonuna göre ve toplamda 20 µl olacak resimde master mix Tablo 5.12.2’de belirtilen reaksiyon bileşenleri ile hazırlandı ve pipet yardımıyla karıştırıldı. cDNA sentezi için hazırlanan karışım sırasıyla 30 dakika 42 °C ve 5 dakika 85 °C adımlarını içeren program kullanılarak termal ısıtıcıda muamele edildi.

Tablo 5.12.2 cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

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

5.12.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Örneklere ait cDNA 1:5 veya 1:10 oranında titre edilerek Tablo 5.12.3 belirtilen resimde RT-qPCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Tablo 5.12.4 de belirtilen primerler kullanılarak RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi. RT-qPCR reaksiyonu sonuçları GAPDH'a göre normalize edildi.

Tablo 5.12.3 RT-qPCR'da her bir kuyucuk için kullanılan reaksiyon karışımı

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

Tablo 5.12.4 RT-qPCR'da kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi
B III tubulin-F	CGCACGACATCTAGGACTGA
B III tubulin-R	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT
Basson-F	TGTTTTAGGAGTCCCAGGAGGCA
Basson-R	TGAAGCAGAAAGGGCCACAGGGG
BDNF-F	TGCAGGGGCATAGACAAAAGG
BDNF-R	CTTATGAATCGCCAGCCAATTCTC
CACNA1C-F	AGCAAGAACCACTGCGGAT
CACNA1C-R	GAAGAAATGCAGCAACAGCC
CACNA1D-F	CATCCCATTCCCTGAAGATG
CACNA1D-R	GGATGCAGCAACAGTCCATA
CGRP-F	TGGTTGTCAGCATCTTGCTC
CGRP-R	CCTTCACCACACCTCCTGAT
Chapsyn-F	AGGTGGATGGCAGAGACTATCAC
Chapsyn-R	CTAAATGCTCTTCTGTCGTTGTCAG
CX 43-F	TTGACTTCAGCCTCCAAGG

CX 43-R	AATGAACAGCACCGACAGC
CX37-F	TTCCTCTTCGTCAGCACACC
CX37-R	TCTTACACAGCACGCTGACC
CX40-F	ATGGGTGACTGGAGCTTCC
CX40-R	CACAAAGATGATCTGCAGTACCC
GAPDH-2-F	GAAGGGCATCTTGGGCTA
GAPDH-2-R	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT
GAPDH-3-F	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA
GAPDH-3-R	CGGAGATGATGACCCTTTTG
GATA-4-F	GACTTCTCAGAAGGCAGA-GAG
GATA-4-R	CCATGGAGCTTCATGTAGAGG
GDNF-F	GCCGCCGAAGACCACTCCCTC
GDNF-R	GTGCCGCCGCTTGTTTATCTGG
GFAP-F	GGCGCTCAATGCTGGCTTCA
GFAP-R	TCTGCCTCCAGCCTCAGGTT
Isl1-F	GACATGATGGTGGTTTACAGGC
Isl1-R	GCTGTTGGGTGTATCTGGGAG
Lars2-F	CGGAGCTGAAGGGTCTTCTC
Lars2-R	TCCCGGTGGCACTGTAGATA
MAP2-F	TTGGTGCCGAGTGAGAAGA
MAP2-R	GTCTGGCAGTGGTTGGTTAA
MHY1-F	GAGGGACAGTTCATCGATAGCAA
MHY1-R	GGGCCAACTTGTCATCTCTCAT
MHY2-F	AGGCGGCTGAGGAGCACGTA
MHY2-R	GCGGCACAAGCAGCGTTGG
MHY3-F	CTTCACCTCTAGCCGGATGGT
MHY3-R	AATTGTCAGGAGCCACGAAAAT
MHY4-F	CACCTGGACGATGCTCTCAGA
MHY4-R	GCTCTTGCTCGGCCACTCT
MHY6-F	CCAACACCAACCTGTCCAAGT
MHY6-R	AGAGGTTATTCCTCGTCGTGCAT
MHY7-F	CTCAAGCTGCTCAGCAATCTATTT
MHY7-R	GGAGCGCAAGTTTGTCATAAGT
MHY8-F	CAGGAGCAGGAATGATGCTCTGAG
MHY8-R	AGTTCCTCAAACCTTTCAGCAGCCAA
Ms4a3-F	TCCTCATCAGATGGCCTGGT
Ms4a3-R	AAGCTTGGGGCTGAGTGTTT
NCX1-F	GACTTTGAGGACACCTGTGG
NCX1-R	TCACTCATCTCCACCAGACG
Neun-F	CCAGGCACTGAGGCCAGCACACAGC

Neun-R	CTCCGTGGGGTCGGAAGGGTGG
NF-200-F	AGCTGCACTACTCGCTGA
NF-200-R	GGCCGTTGCTTAGGGTGTC
NGF-F	TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG
NGF-R	CTGTGTCAAGGGAATGCTGAA
NKCC1-F	CATGGTGTCCAGGATTTGCAC
NKCC1-R	CGTTCAATTCAGCAATCAGG
Nkx2.5-F	CAGTGGAGCTGGACAAAGCC
Nkx2.5-R	TAGCGACGGTTCTGGAACCA
P2X3-F	GTCCTCACACATCCACACATCTG
P2X3-R	ACTCTGCCTACTCAACTACATCCC
Piccolo-F	AGCAAAGACAGGACAGAA
Piccolo-R	ATATTCCGTCAGAGGAGTAC
PSD-95-F	AGGTGGCAGAGCAGGGGAAG
PSD-95-R	AGGGCTTGGGCAATTCAGTC
RYR2-F	CGAGGATGAGATCCAGTTCC
RYR2-R	CAAATCCTTCTGCTGCCAAG
SAP-97-F	CAGGAAACGAGTGATGCTGA
SAP-97-R	GCT CGTCCCATACAGATGGT
SERCA-2-F	GGGCAAAGTGTATCGACAGG
SERCA-2-R	TCAGCAGGAACTTTGTCACC
Substance P-F	CACACTATGGGCCAGTGAGATC
Substance P-R	GCACACCACGACAATCATCATT
Synapsin I-F	CCGCCAGCATGCCTTC
Synapsin I-R	TGCAGCCCAATGACCAAA
Synaptophysin-F	TGCCAACAAGACGGAG
Synaptophysin-R	GGCGGATGAGCTAACT
Synaptotagmin 1-F	CAAAAGTCCACCGGAAAACC
Synaptotagmin 1-R	TTGCCACCTAATTCCGAGTATG
TASK-1-F	TTCGCCGGCTCCTTCTACTTC
TASK-1-R	CGTAGAACATGCAGAACACCTTG
TASK-3-F	GCGAGGAGGAGAACTTAAAGCAG
TASK-3-R	TCTGGAACATAACCAGCGTCAGAG
Tbx20-F	GTGCACATCATAAAGAAGAAAGACC
Tbx20-R	AAACGGATTGCTGTCTATTTTCAGC
Tbx5-F	TGACTGGCCTTAATCCCAA
Tbx5-R	ACAAGTTGTCGCATCCAGTG
TRPC3-F	TGACTTCCGTTGTGCTCAAATATG
TRPC3-R	CCTTCTGAAGCCTTCTCCTTCTGC

TRPC4-F	TCTGCAGATATCTCTGGGAAGGATGC
TRPC4-R	AAGCTTTGTTCGAGCAAATTTCCATC
TRPC5-F	ATCTACTGCCTAGTACTACTGGCT
TRPC5-R	CAGCATGATCGGCAATGAGCTG
TRPCF	AAAGATATCTTCAAATTCATGGTC
TRPC6-R	CACGTCCGCATCATCCTCAATTTTC
VGlut1-F	CCCCCAAATCCTTGCACTTT
VGlut1-R	AACAAATGGCCACTGAGAAACC
VGlut2-F	TGCTACCTCACAGGAGAATGGA
VGlut2-R	GCGCACCTTCTTGACAAAAT
β -actin-F	AGTACTCCGTGTGGATCGGC
β -actin-R	GCTGATCCACATCTGCTGGA

5.13. Transkriptom (RNA dizi analizi) ve Biyoinformatik Analizler

Kalbe özgü duyu nöronlarının global gen ifade analizini gerçekleştirmek amacıyla aşağıda belirtilen dört gruba ait RNA örnekleri kullanılmıştır:

1. Kalbe özgü AKG (**AKG-K**): Saflaştırılan Di-8-AnepPQ işaretli AKG nöronları,
2. Kalbe özgü NG (**NG-K**): Saflaştırılan Di-8-AnepPQ işaretli NG nöronları,
3. Heterojen AKG (**AKG-T**): Kalbine DMSO enjekte edilen farelerden elde edilen total AKG nöronları,
4. Heterojen NG (**NG-T**): Kalbine DMSO enjekte edilen farelerden elde edilen total NG nöronları.

Yukarıda belirtilen gruplardan elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi Fragman Analizi ile belirlendi. Fragman analizi sonucunda 1'den 10'a kadar değer alan RNA kalite sayısı (RNA Quality Number, RQN) değerleri elde edilmektedir. RQN 1 değeri RNA'nın tamamen degrades olduğunu gösterirken, RQN 10 değeri ise RNA'nın bozulmadığı, tamamen korunduğunu göstermektedir. Fragman analizi sonucunda RQN değeri 7 ve üzeri olan 9 örnek RNA-dizileme için seçildi. Elde edilen RNA konsantrasyonuna göre AKG ve NG duyu nöronlarına ait RNA örnekleri sırasıyla 500 ng/ μ l ve 200 ng/ μ l olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnekten Truseq Total RNA Sample Preparation Kit v2. kullanılarak RNA kütüphaneleri oluşturuldu. RNA dizi analizi işlemi İstanbul Medipol Üniversitesi Genomik Merkezi'nde bulunan

Illumina NextSeq 500 platformu kullanılarak gerçekleştirildi. 75 baz uzunluğunda çift-sonlu okumalar (paired end reads, 2 x 75 bp) sonucunda örnek başına ortalama 40 milyon okuma (read) elde edildi.

İşlenmemiş RNA-dizi verilerinin transkript yaygınlık değerleri (abundance) belirlenmeden önce nitelik kontrolü FastQC (Quality Check) v0.11.6 programı kullanılarak gerçekleştirildi (116). FastQC analizi sonucunda gen ifade analizini etkileyecek yoğunlukta düşük nitelikli baz dizileri ve adaptör dizi kontaminasyonu gözlemlenmediği için trimming işlemi yapılmadı. Kütüphaneler ait okumaların kaliteleri FastQC ile kontrol edildikten sonra Salmon v.0.9.1 RNA ölçme programı (117) ile Ensembl veritabanından (91.sürüm) elde edilen tüm-fare (mus musculus)-transkriptom verisine hizalandı. Bu adımdan sonra, R Bioconductor (100) üzerinden ilgili paketler kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Tximport (119) paketi kullanılarak tüm fare genomuna hizalanan transkriptlere ait ekspresyon değerleri ait oldukları genler doğrultusunda birleştirildi. Diferansiyel ifade edilen genleri belirlemek amacıyla Tximport ile elde edilen her bir gene ait okuma sayılarını içeren matris DESeq2 paketi ile analiz edildi (74). DESeq2 analizi sonucu düzenlenmiş log-tabanlı değerler (regularized log-transformed counts) Hiyerarşik Kümeleme (hierarchical clustering) ve Temel Bileşenler Analizlerinde (PCA) kullanıldı. PCA için ekspresyon değerleri örnekler boyunca en çok değişkenlik gösteren ilk 500 gen belirlendi. Ortaya çıkan 500 gen Stats paketinde tanımlı prcomp fonksiyonunun DESeq2 paketine ait kodlama dile uygun resimde yazılması ile PCA gerçekleştirildi (74). PCA ve hiyerarşik kümeleme analizleri ile elde edilen sonuçlara ait grafikler pca3d (120) ve Gplots (121) paketleri kullanılarak oluşturuldu. GOseq (75) paketi kullanılarak DESeq2 ile belirlenen diferansiyel ifade edilen genler için Gen Ontoloji Zenginleştirme Analizi (GO term enrichment analysis) gerçekleştirildi. Bu analizde düzenlenmiş p değeri (adjusted p value) 0.05'den küçük olan ve mutlak \log_2 kat değişim değeri (\log_2 fold changes) 1.5'ten büyük olan genler hedef genler, 0.05'ten büyük p değerine sahip olan genler ise tüm genler (background) olarak seçildi. Benjamini ve Hochberg metodu kullanılarak p değerlerinin çoklu test doğrulaması gerçekleştirildi (122). Zenginleştirme analizine ek olarak, ClusterProfile paketi içerisindeki groupGO fonksiyonu kullanılarak diferansiyel ifadesi olan genler (mutlak \log_2 kat değişim değeri > 0.5) GO terimlerine göre sınıflandırıldı (77).

5.14. Elektrofizyolojik Analizler

Kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişimi incelemek amacıyla Ca^{+2} indikatörü GCaMP6s ve bir optogenetik aracı olan kanal-rodopsin virüs yolu ile hücrelere verildi. Ayrıca, hücrelerden elektriksel kayıt alabilmek için yama kısıkaçı ve gerçek zamanlı ekstraselüler kayıt cihazı kullanıldı. Kardiyomiyosit hücrelerinin atım frekanslarını ölçmek için ise ışık alan videoları çekildi ve bu videolardan hareket takip analizi kullanılarak her bir kardiyomiyosit hücresinin zamana bağlı atım grafiği oluşturuldu.

5.14.1. Ca^{+2} Görüntüleme

Tek başına veya kardiyomiyositler ile kokültüre edilen kalbe özgü duyu nöron hücrelerine ait Ca^{+2} değişimini incelemek amacıyla bir sentetik boya olan Fluo-4 kullanıldı. Hücrelerdeki elektriksel aktivite sonucu oluşan Ca^{+2} değişimini floresan bir boya olan Fluo-4 floresan şiddetini değiştirerek gerçek zamanlı takibini sağlamaktadır. 5 μ M Fluo-4 ve Fluo-4'nun hücre zarından geçmesini sağlayan %0.02'lik Pluronic asit Tyrode's çözeltisi (KCl 5mM, NaCl 140mM, Hepes 5mM, NaH_2PO_4 1mM, $MgCl_2$ 1mM, $CaCl_2$ 1.8mM, Glukoz 10mM, pH=7.4) içerisinde hazırlandı (123). Hücreler hazırlanan Fluo-4 içeren Tyrode's çözeltisi içerisine alınarak 30 dakika 20 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası herhangi bir tampon çözeltisi ile yapılan yıkama sonucu boya ortamdan uzaklaştırıldı ve görüntüleme için hücre kaplarına Tablo 5.4.1'de belirtilen kardiyomiyosit besiyeri eklendi. Hücreler normal fizyolojik koşullarına geri dönmesi amacıyla 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. %5 CO_2 ve 37 °C koşullarda inkübasyona sahip Spinning disk konfokal mikroskobu veya konfokal mikroskobu ile görüntüler alındı. Floresan görüntüleme sonucu zaman bağlı Ca^{+2} değişimleri verileri Image-J programı ile elde edildi.

Sentetik boyalar dışında, araştırma merkezimizde üretilen AAV-EF1a-GCaMP6s-WPRE-pGHpA ve AVV-Syn-GCaMP6s virüsleri kullanılarak uzun süreli Ca^{+2} görüntülenmesi amaçlandı. AAV-EF1a-GCaMP6s-WPRE-pGHpA

kardiyomiyosit ve duyu sinir hücrelerine, AVV-Syn-GCaMP6s ise taşıdığı sinapsin (Syn) prometeri nedeniyle sadece nöron hücrelerine verildi. Farklı konsantrasyondaki virüs partikülleri %2 FBS, %1 P/S, %1 Glutamax, %1 NEAA, %1 Sodyum pyruvate DMEM içerisinde hazırlanarak GCaMP6s üretmesi istenen hücelere verildi. Bir gece hücrelerin virüs ile inkübasyonun sonunda tampon çözeltisi kullanılarak yıkamalar yapıldı ve Tablo 5.4.1’de belirtilen kardiyomiyosit besiyeri petri kaplarına eklendi.

5.14.2. Optogenetik Uygulamalar

Kardiyomiyosit ve kalbe özgü duyu sinir hücreleri arasındaki elektriksel iletişimi incelemek amacıyla son dönemde yaygın olan optogenetik yöntem kullanılmıştır. Optogenetik araç olan ışığa duyarlı Channelrhodopsin2 (ChR2) Adeno İlişkili Virüs (AAV) kullanılarak kardiyomiyosit veya sinir hücrelerini enfekte edildi. Kullanılan bu virüs, içerdiği tavuk β -actin başlatıcısı (CAG, chicken B-actin promoter) ile çeşitli hücre tiplerinde kullanılması, hücre enfekte yüzdesinin yüksek olması, H134R mutasyonu ile mavi ışığa daha duyarlı olması ve kırmızı floresan olan tdtomato taşıması nedeniyle tercih edilmiştir. Kardiyomiyosit hücreleri için %2 FBS, %1 P/S, %1 Glutamax, %1 NEAA, %1 Sodyum pyruvate içeren DMEM ve nöron hücreleri için ise ek olarak %2 B27 kullanılarak hücrelerin ChR2 üretmesi hedeflendi. Mikrolitresinde 1.22×10^{13} viral partikül içeren virüsten 0.2 μ l, 0.4 μ l, 0.8 μ l ve 1 μ l AVV-ChR2 kullanılarak kardiyomiyositleri enfekte eden ve canlılığın en yüksek olduğu konsantrasyona bakıldı. Nöron hücrelerinin ChR2 üretmesi için NBA besiyeri içerisine 0.5 μ l veya 1 μ l AVV-ChR2 eklendi. Hücrelerin floresan özelliğine sahip ChR2 üretimini belirlemek amacıyla virüs ile enfekte edilmeyen hücreler kullanılarak görüntüleme sırasında oluşabilecek otofloresan en aza indirildi. Virüs ile enfekte olan ve ChR2 üreten hücreler taşıdıkları tdtomato floresan ile enfekte olmayanlardan ayırt edildi. Konfokal mikroskobunda soldurma (bleaching) modülündeki alan seçimi ile ChR2 üreten kardiyomiyosit hücreleri hedeflendi ve yine aynı modül ile %10 lazer gücü, 100 saniye boyunca saniyede 1-5 arasında değişen mavi ışık kullanılarak uyarıldı. Uyarılma esnasında kardiyomiyositlerin kasılıp gevşemesi ve bağlantılı oldukları GCaMP6s üreten nöronlarda Ca^{+2} değişimi takip edildi.

5.14.3. Hareket Takip (Motion Tracking) Analizi

Tek başına veya kokültürdeki kardiyomiyositlerin kasılıp gevşeme kinetiklerini analiz etmek amacıyla Huebsch ve ark. tarafından geliştirilen Motion Tracking analizi kullanıldı (124). Işık mikroskobu görüntüsü çekilen kardiyomiyositlere ait görüntüler avi formatına çevrilerek Matlab yazılımı ile kullanılan Motion Tracking analiz arayüzüne yüklendi. Videoya ait frekans, um cinsinden piksel büyüklüğü, makroblok büyüklüğü 16 piksel ve seçilebilen hareket minimum 7 piksel olarak seçildi. İstenilen alan (ROI) seçilerek kardiyomiyosite ait atım hızı/saniye ile kasılma süresi, hızı ve frekans değerleri elde edilmektedir.

5.14.4. Hücreler Arasında Ca^{+2} İyonuna Bağlı Sinyal Korelasyon Analizi

Kardiyomiyosit ve duyu nöronlarından alınan Ca^{+2} floresan sinyalleri ile ve kasılma kinetik değerlerine ait sinyallerin benzerliklerini ortaya koymak için Matlab (2020b) yazılımı kullanıldı. Matlab yazılımında bulunan çapraz korelasyon (Cross-correlation) fonksiyonu kullanılarak yazılan kod sayesinde kardiyomiyosit ve duyu nöronlarına ait Ca^{+2} sinyalleri ile kardiyomiyosit atım hızı değerlerinin benzerliği incelendi. 0.5 veya -0.5 değeri analiz edilen hücreler arasında s korelasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca, elde edilen çapraz korelasyon grafiği ile sinyaller arasındaki zaman kayması olup olmadığı ve ne kadar olduğu belirlendi. Sinyal benzerliğinin incelenmesinin yanında, iki hücre tipinin Ca^{+2} sinyallerine ait frekans değerleri Fourier dönüşüm fonksiyonu kullanılarak oluşturuldu ve ortak frekans aralıkları belirlendi.

5.14.5. Yama-Kıskacı (Patch-Clamp)

Hücrelerde oluşan zar potansiyel değişimi diğer bir adıyla aksiyon potansiyel yama kıskacında akım kenetleme yöntemiyle ölçülmeye çalışıldı. Yama kıskacı deneyleri için önceden laminin veya fibronektin kaplı 15 mm çapa sahip lamelere hücre ekimi gerçekleştirildi. Kayıt sırasında sırasıyla pipet Solüsyonu (KCl 140 mM, Mg-ATP 5mM, $MgCl_2$ 1mM, Hepes 10mM, EGTA 5mM) ve external solüsyon (NaCl 150 mM, Glukoz 10 mM, $CaCl_2$ 1.2 mM, Hepes 10 mM, KCl 4 mM, $MgCl_2$ 1 mM) kullanıldı (Honda vd., 2011). Solüsyonlar hazırlandıktan sonra osmolarite ve pH

değerleri ölçüldü. Pipet solüsyonu için pH=7.2 ve osmolaritenin 290-295 mOSM olmasına dikkat edildi. Dış (External) solüsyonunda ise pH=7.4 ve osmolarite 315-320 mOSM olarak ayarlandı. Solüsyonlar hazırlandıktan sonra filtrelendi ve kullanıma kadar pipet solüsyonu -20 °C’de dış solüsyon ise +4 °C’ de muhafaza edildi. Hücre zarına temas edebilmek için barosilikat cam pipetler pipet yapıcı (puller) kullanılarak sivrileştirildi. Yüksek direnç ve ısı ile sivriltilen pipet uçlarının açık olmasına dikkat edildi ve bunun için tozlu ortamdan uzak tutuldu. Kardiyomiyosit hücreleri için en uygun pipet direnci 3-5 mega Ohms’dur (125). Bu nedenle, pipet çekilirken pipetin direncinin bu aralıkta olmasına dikkat edildi. Kayıt günü hücreler dış solüsyon içerisine alındı. Hazırlanmış olan pipetler içerisine pipet solüsyonu eklendi. Kayıtlar gigaseal olarak adlandırılan pipet ile hücre temasında pipet direncinin gigaOhm olduğu koşullarda gerçekleştirildi.

5.14.6. Gerçek Zamanlı Ekstraselüler Kayıt (Extracellular Recording, ECR)

Saflaştırılan kalbe özgü duyu nöronları ile birlikte veya yalnız olarak kültüre edilen kardiyomiyositlerin kasılma ve alan potansiyelleri XCELLigence RTCA Cardio ECR sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. 48 kuyulu ECR plaklarının her bir kuyucuğuna 25 bin adet kardiyomiyosit ve 1000 adet kalbe özgü AKG nöronu ekildi. Aşağıda belirtilen üç farklı grup oluşturularak, istatistiksel analiz için her bir grup dört kuyucuğa ekildi.

1. Sadece kardiyomiyosit
2. Kalbe özgü AKG Duyu nöronu ve kardiyomiyosit kokültürü
3. Heterojen AKG duyu nöronu ve kardiyomiyosit kokültürü

Ekimden sonrası her bir kuyucuktan dört saatte bir kayıt alınarak hücrelerin elektriksel aktivitesi analiz edildi. Kardiyomiyositlerin mekanik değişimi yani kasılıp değişimini gösteren Empedans (EMP) ve alan potansiyeli (AP) verileri 20 saniyelik ölçümler şeklinde ve sırasıyla 12 milisaniye (msn) ve 0.1 msn çözünürlükte alındı. xCELLigence® RTCA CardioECR Data Analysis yazılımı kullanılarak elde edilen verilerden atım sayısı, alan AP süresi (FPD) ve AP çubuk genliği (FP spike amplitude) hesaplamaları gerçekleştirildi.

5.15. İstatiksel Analiz

Ca²⁺ görüntüleme, elektrofizyolojik kayıt ve hücre sayımına ait veriler ortalama \pm STD olarak gösterildi. İstatiksel analizi gerçekleştirmek için Student's two-tailed unpaired and paired t testleri kullanıldı. KM ve Nöronların optogenetik uyarım öncesi, uyarı sırasında ve uyarım sonrası frekans karşılaştırmalarında Wilcoxon testi kullanıldı. Ca²⁺ iyonuna bağlı floresan şiddetinin genlik karşılaştırmalarında, elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerini belirlemek için öncelikle Gorov-Smirnov testi uygulandı. Normal dağılım gösterenler t paired yöntemi ile test edildi normal dağılım göstermeyenler Wilcoxon yöntemi ile test edildi. P <0.05 seçilerek istatistiksel anlamlılık belirlendi.

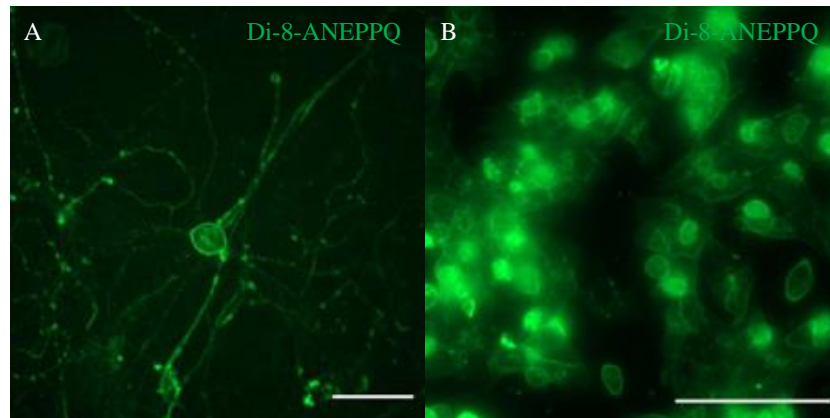
6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, kalbe özgü duyu sinir hücrelerinin retrograd boya kullanılarak işaretlenmesi, saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Kalbe özgü duyu sinirlerini tanımlamak amacıyla retrograd işaretleme kapasitesine sahip ajanlar kalbe enjekte edilerek, işaretleme kapasiteleri karşılaştırıldı. Bu amaçla, retrograd ilerleyen ve nöron işaretleyen Di-8-ANEPPQ, DiI, Fluorogold sentetik boya ile rAAV2-retro-tdtomato virüsü kullanıldı. Dakikada 300-500 kez kasılan kalbe enjeksiyonun zorluğu ve kalp cerrahisinde yaşam ihtimalinin düşük olmasından dolayı, retrograd ajanlar öncül deneyler için daha stabil ve kolay bir uygulama imkanı sağlayan siyatik sinire verildi.

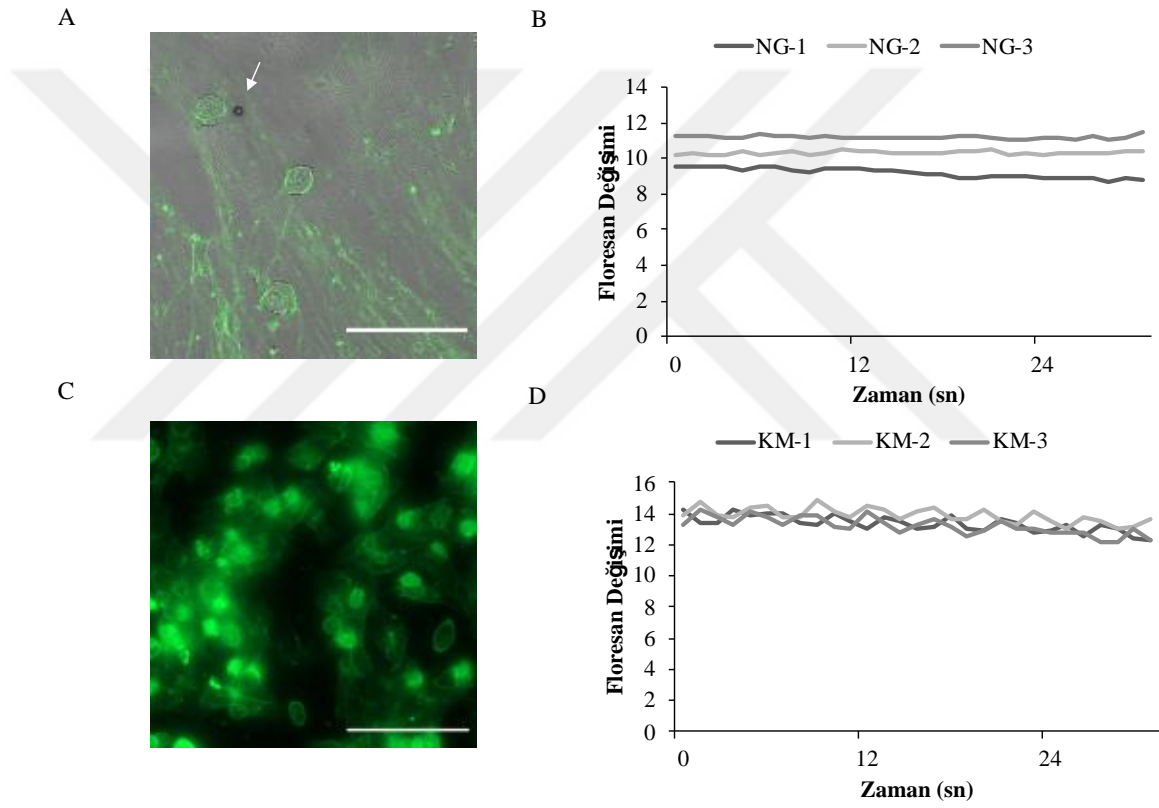
6.1. Di-8-ANEPPQ'nun Floresan Özelliklerinin *In Vitro* Karakterizasyonu

Literatürde, Di-8-ANEPPQ boyasının *in vivo* retrograd nöron boyama özelliğinin yanında voltaj duyarlı olduğu da raporlanmıştır (126). Di-8-ANEPPQ'nun primer hücre kültüründeki boyama kapasitesini test etmek amacıyla, NG kültürü (Şekil 6.1.1 A) ve yenidoğan kardiyomiyosit (Şekil 6.1.1 B) hücreleri 20 μ M Di-8-ANEPPQ ile boyandı. Boyama sonrası alınan gerçek zamanlı floresan görüntülerde, lipofilik özelliğinden dolayı Di-8-ANEPPQ boyasının hücre zarında lokalize olduğu gözlemlendi (Şekil 6.1.1) (127).



Şekil 6.1.1 Di-8-ANEPPQ'nun primer hücre kültüründe boyama testi. (A) Di-8-ANEPPQ boyalı NG hücreleri ve (B) yenidoğan kardiyomiyositler. Di-8-ANEPPQ: Yeşil, Ölçek Barı: 100 μ m.

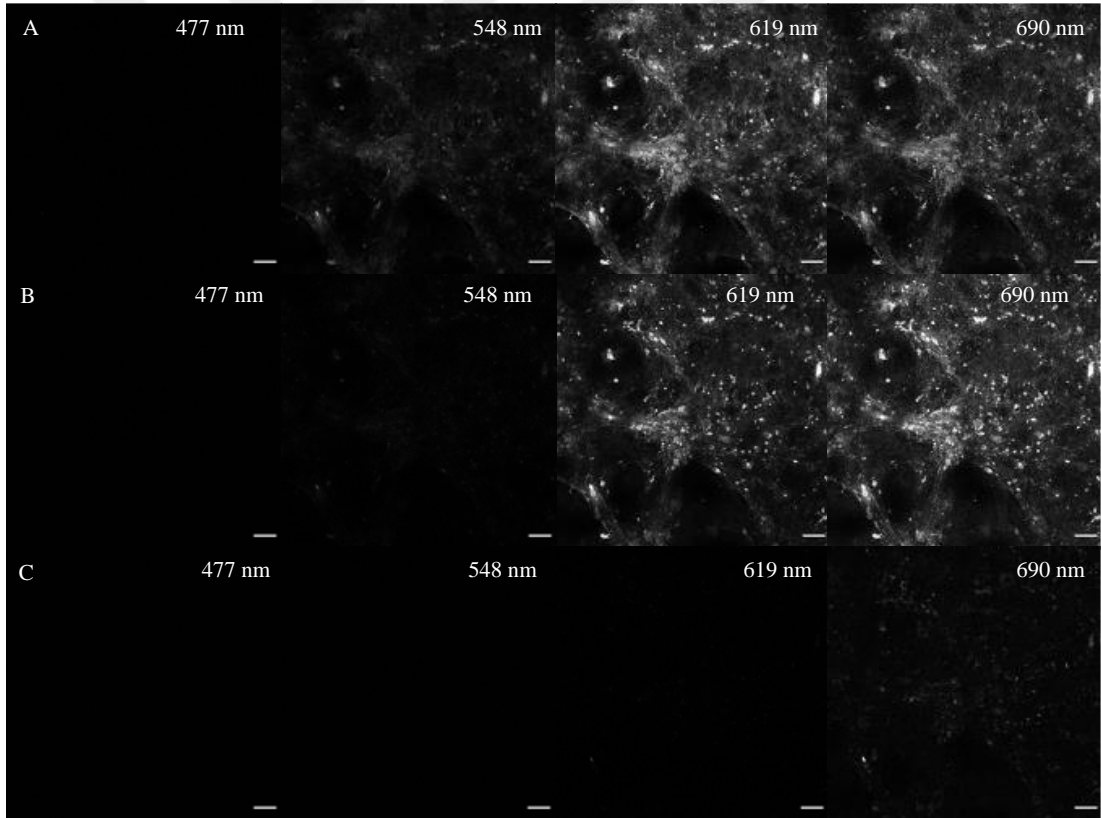
Hücre zarını boyayan Di-8-ANEPPQ boyasının voltaj duyarlılığını test etmek amacıyla, Di-8-ANEPPQ boyalı nöronlara aksotomi uygulandı ve hücrelerdeki floresan değişimi analiz edildi. Aksotomi öncesi ve sonrası yapılan floresan analizi sonucunda, Di-8-ANEPPQ ile boyalı spontan veya uyarılmış nöron kültürlerinde (Şekil 6.1.2 A, B) voltaj değişimi tespit edilemedi. Nöron kültürünün yanında, Di-8-ANEPPQ boyasının voltaj duyarlılığı spontan atım gösteren kardiyomiyosit kültüründe test edildi (Şekil 6.1.2 C). Benzer şekilde, floresan değişimi tespit edilmesi (Şekil 6.1.2 D). Bu nedenle, voltaj duyarlılığı doğrulanamayan Di-8-ANEPPQ'nun bu sadece floresan ve retrograd özellikleri ile deneylerde kullanıldı.



Şekil 6.1.2 Primer canlı hücre kültüründe Di-8-ANEPPQ'nun voltaj duyarlılık analizi. (A) Di-8-ANEPPQ ile boyalı NG nöronları ve (B) sinir hücrelerindeki aksotomi öncesi ve sonrası voltaj değişimi. (C) Di-8-ANEPPQ ile boyalı yenidoğan kardiyomiyosit hücreleri ve (D) spontan voltaj değişimi gösteren grafik. Di-8-ANEPPQ: Yeşil, NG: Noduz gangliyon, KM: Kardiyomiyosit, Ölçek çubuğu: 100 μ m.

Literatürde, Di-ANEPPQ'nun yaklaşık 500 nm ile uyarıldığı ve 700 nm ışıkla yapıldığı rapor edilmiştir (98). İmmünboyamalar ve hücre saflaştırması sırasında beklenmedik bir durumla karşılaşmamak için, Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin uyarılma ve ışık spektrumu incelenmiştir. Di-8-ANEPPQ floresan boyasının 488 nm

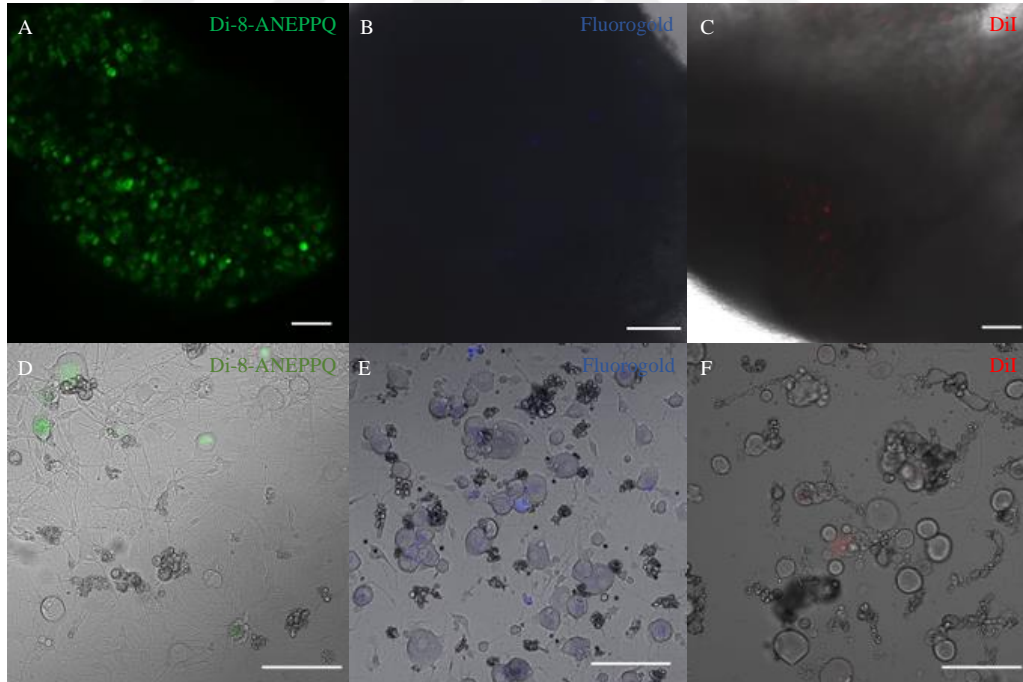
(Şekil 6.1.3 A) ve 561nm (Şekil 6.1.3 B) ile uyarıldığı ancak 633 nm ve üstü ile uyarılmadığı gözlemlendi (Şekil 6.1.3 C). Diğer taraftan, Di-8-ANEPPQ'nun uyarılması sonucunda 571 nm ile 690 nm arasında geniş bir spektrumda ışımaya yaptığı tespit edildi (Şekil 6.1.3). Di-8-ANEPPQ'nun uyarılma ve ışımaya spektrum analizi için konfokal mikroskopunda bulunan Lamda modu kullanılarak Di-8-ANEPPQ ile boyanmış kardiyomiyosit hücreleri incelendi. Yapılan spektrum analizi sonucunda Di-8-ANEPPQ'nun 488 nm (Şekil 6.1.3), 514 nm ve 561 nm olmak üzere üç farklı dalga boyu ile uyarıldığı ve 571-690 nm arasında geniş bir ışımaya özelliğine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 6.1.3). Bu nedenle, Di-8-ANEPPQ işaretli hücreleri görüntülemek amacıyla 488 nm lazer ve floresan görüntüleme için 570 nm ve 690 nm arasındaki filtreler kullanıldı. Ayrıca, Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin immün boyamaların 633 nm ve üzeri uyarılan ikincil antikolar tercih edildi.



Şekil 6.1.3 Di-8-ANEPPQ boyasının ışımaya spektrumu. Lamda modu kullanılarak (A) 488 nm, (B) 561 nm ve (C) 633 nm ile uyarılan Di-8-ANEPPQ boyalı primer kardiyomiyosit hücrelerinin konfokal mikroskopundaki ışımaya spektrumu. Ölçek çubuğu: 100 µm.

6.2. Di-8-ANEPPQ'nun Siyatik Sinir ile *In vivo* İncelenmesi

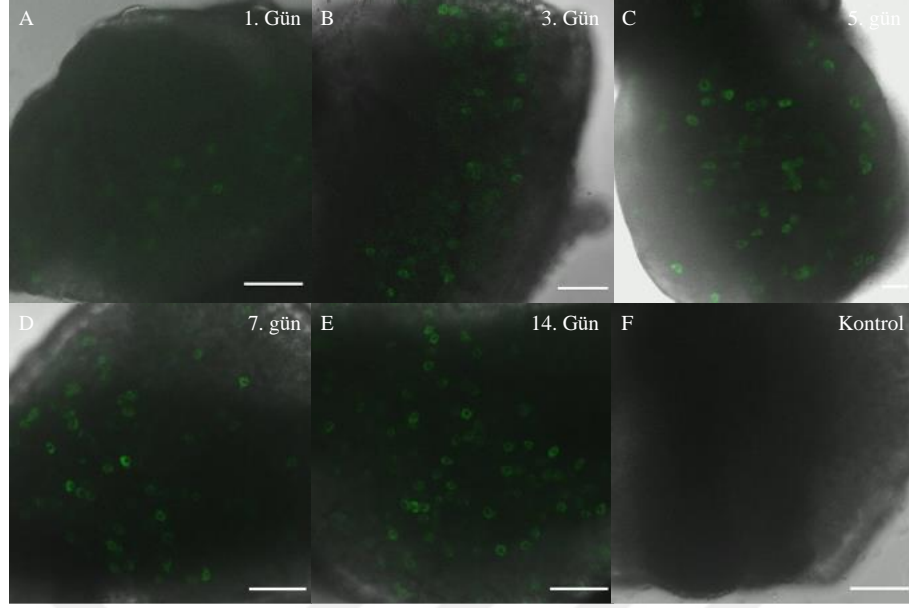
In vitro işaretleme özellikleri doğrulanan Di-8-ANEPPQ'ya ek olarak belirlenen ve REMER bünyesinde *in vitro* ve *in vivo* doğrulamaları farklı araştırmalar kapsamında yapılmış DiI, fluorogold ve rAAV2-retro-tdtomato denendi. Operasyondan 3 gün sonra, siyatik sinire dallanan lumbar 3-5 seviyesindeki AKG'lar çıkarıldı. Floresanca işaretlenen AKG nöronları önce doku boyutunda daha sonra enzimatik aşamalardan geçirilerek hücre kültüründe konfokal mikroskobu kullanılarak incelendi (Şekil 6.2.1). Alınan floresan görüntüler sonucunda, DiI (Şekil 6.2.1 C, F) ve fluorogold (Şekil 6.2.1 B, E) uygulamasına göre Di-8-ANEPPQ'nun doku boyutunda (Şekil 6.2.1 A) ve hücre kültüründe (Şekil 6.2.1 D) daha fazla AKG hücresi işaretlediği ve floresan şiddetinin yüksek olduğu gözlemlendi. Floresanca işaretlenen AKG hücrelerine ait görüntüler, retrograd boyalar arasında Di-8-ANEPPQ'nun daha fazla sinir hücrelerini *in vivo* işaretlediği belirlendi.



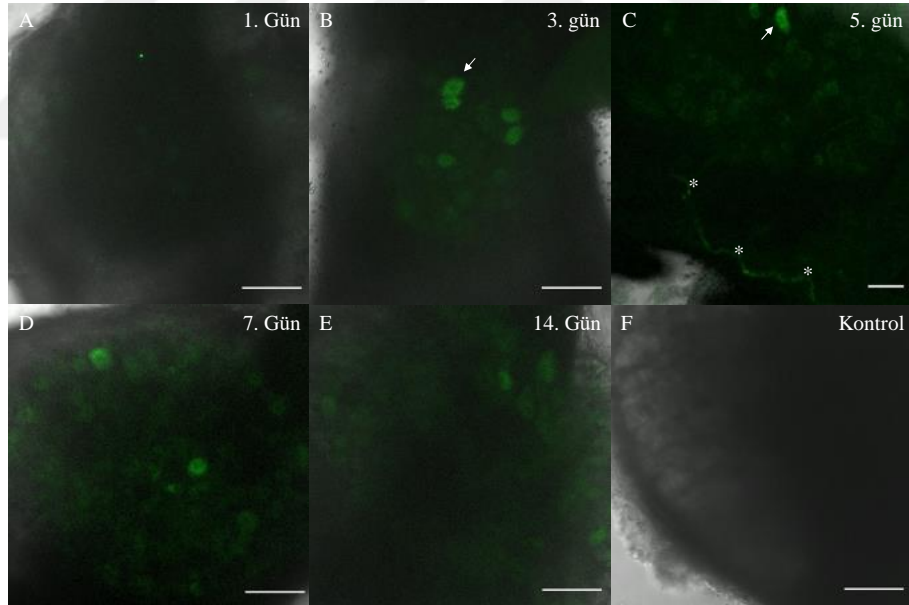
Şekil 6.2.1 Di-8-ANEPPQ'nun *in vivo* işaretleme kapasitesinin siyatik sinirde test edilmesi. (A, D) Di-8-ANEPPQ (yeşil), (B, E) Fluorogold (mavi) ve (C, F) DiI (kırmızı) uygulaması sonrası Lumbar 3-5 seviyesindeki AKG hücrelerinin doku ve hücre kültüründeki floresan görüntüsü, ölçek çubuğu: 100 µm.

6.3. Di-8-ANEPPQ'nun Kalbe Enjeksiyonundan Sonra Bekleme Süresinin Belirlenmesi

Di-8-ANEPPQ boyasının nörona özgü retrograd işaretleyici olduğuna tespit edildikten sonra, kalbe verilen Di-8-ANEPPQ'nun AKG ve NG'de bulunan duyu sinir hücrelerine optimum taşınma süresi incelendi. Bu amaçla, Di-8-ANEPPQ'nun verilmesinden 1, 3, 5, 7, veya 14 sonra AKG ve NG'lar çıkarılarak konfokal mikroskopu kullanılarak incelendi. Boya verilmemiş kontrol dokularına göre alınan floresan görüntüleri kullanılarak (Şekil 6.3.1 F, Şekil 6.3.2 F), 1.gün floresan şiddeti düşük olmakla beraber incelenen her güne ait NG ve AKG dokularında belirli bir hücre grubunun Di-8-ANEPPQ ile işaretlendiği ve gangliyon boyunca heterojen bir dağılıma sahip olduğu sonucuna varıldı (Şekil 6.3.1, Şekil 6.3.2). Ayrıca, bazı doku örneklerinde hücrelere ait fiberlerin de Di-8-ANEPPQ ile boyandığı tespit edildi (Şekil 6.3.2 C). Günler karşılaştırıldığında, operasyondan 7 gün sonra elde edilen Di-8-ANEPPQ ile boyalı kalbe özgü duyu nöron sayısının diğer günlere göre yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 6.3.1 D, Şekil 6.3.2 D). Operasyondan 14 gün sonrasında ise işaretli hücre sayısının AKG nöronlarında sabit kaldığı (Şekil 6.3.2 E) ancak NG nöronlarında düştüğü tespit edildi (Şekil 6.3.1 E). Sonuç olarak, devam eden deneylerde Di-8-ANEPPQ'nun kalbe enjeksiyonundan 7 gün sonra NG ve AKG dokularının çıkarılmasına ve görüntülenmesine karar verildi.



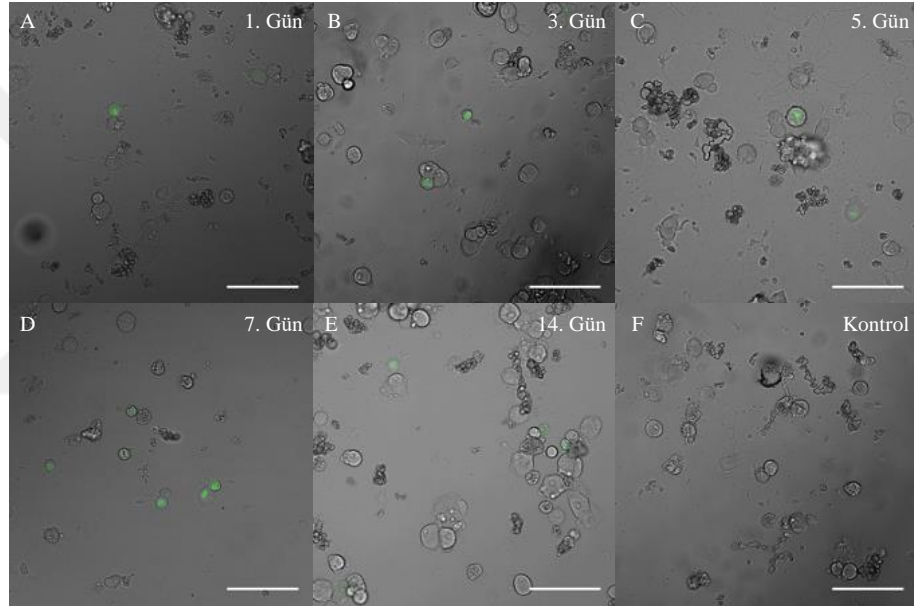
Şekil 6.3.1 *In vivo* olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş NG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi. Di-8-ANEPPQ boyasının kalbe verilmesinden (A) 1, (B) 3, (C) 5, (D) 7 ve (E) 14 gün sonra NG nöronlarının (F) kontrol NG dokusuna göre alınan floresan görüntüsü. Di-8-ANEPPQ: yeşil, ölçek çubuğu: 100 µm.



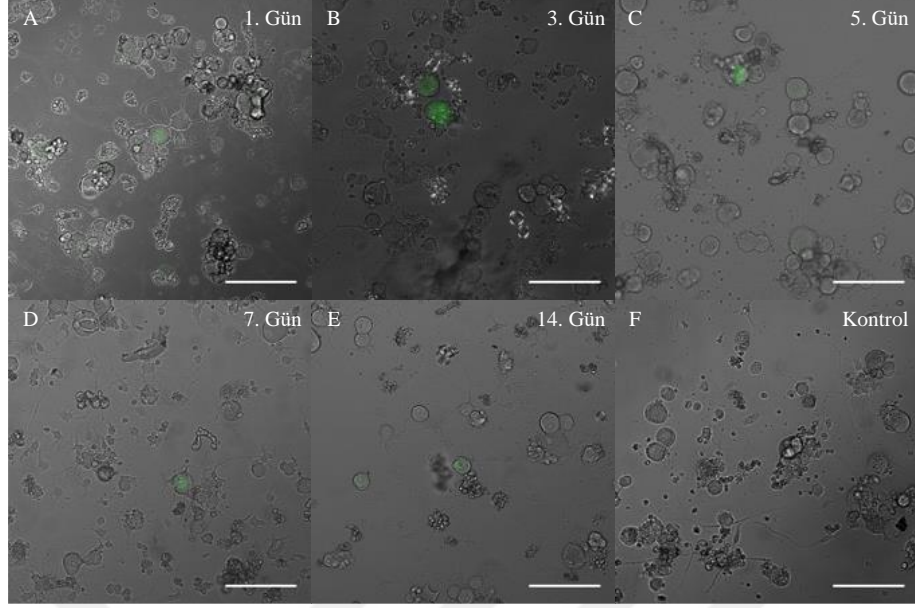
Şekil 6.3.2 *In vivo* olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş AKG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi. Di-8-ANEPPQ boyasının kalbe verilmesinden (A) 1, (B) 3, (C) 5, (D) 7 ve (E) 14 gün sonra AKG nöronlarının (F) kontrol AKG dokusuna göre alınan floresan görüntüsü. Di-8-ANEPPQ: yeşil, ölçek çubuğu: 100 µm.

In vivo olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş NG (Şekil 6.3.1) ve AKG (Şekil 6.3.2) nöronlarının tek hücre boyutunda floresan özelliğini koruyup korumadığını tespit etmek amacıyla dokular enzimatik aşamalardan geçirildi. Hücre kültüründen

alınan floresan görüntülerde, enjeksiyon gününden bağımsız olarak Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin boyayı halen içerdiği, boyanın nöron gövdesinde sitoplazmaya homojen dağıldığı, çekirdeğe girmediği ve bir haftaya kadar floresan özelliğini koruduğu gözlemlendi (Şekil 6.3.3, Şekil 6.3.4). Alınan görüntülerden yapılan hücre sayımı ile NG ve AKG hücre popülasyonunun %34'nün Di-8-ANEPPQ işaretli diğer bir deyişle kalbe özgü sinir hücrelerinden oluştuğu tespit edildi. Yapılan incelemeler sonucunda, operasyondan 7 gün sonra Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin floresan özelliğini enzimatik aşamalardan sonra da devam ettirdiği (Şekil 6.3.3 D, Şekil 6.3.4 D) ve bu nedenle floresanca aktifleştirilmiş hücre ayırma cihazına konularak saflaştırılabileceğine karar verildi.



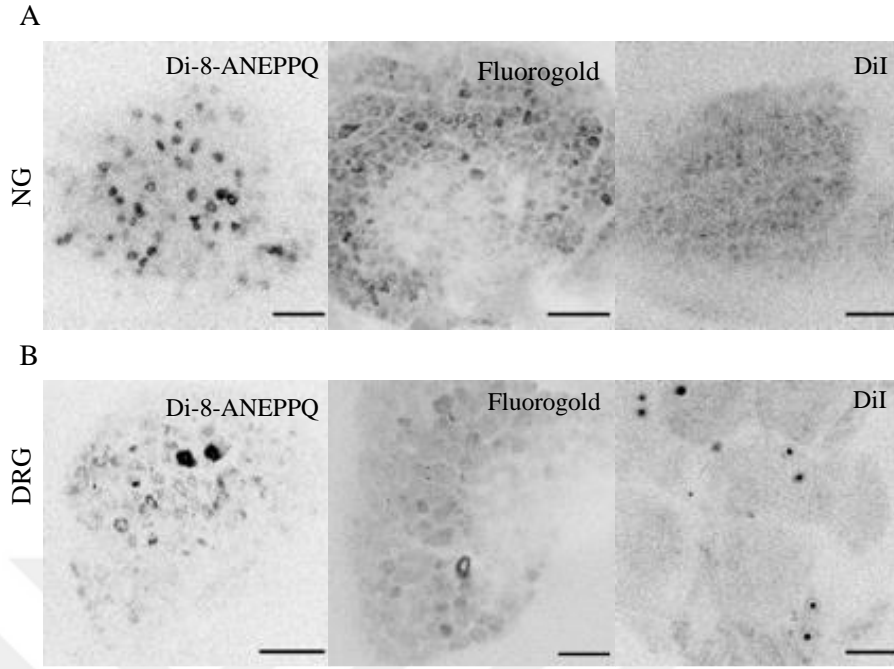
Şekil 6.3.3 *In vivo* olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş NG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi. Di-8-ANEPPQ boyasının kalbe verilmesinden (A) 1, (B) 3, (C) 5, (D) 7 ve (E) 14 gün sonra *in vitro* NG nöronlarının (F) kontrol NG nöronlarına göre alınan floresan görüntüsü. Di-8-ANEPPQ: yeşil, ölçek çubuğu: 100 µm.



Şekil 6.3.4 *In vivo* olarak Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş AKG nöronlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi. Di-8-ANEPPQ boyasının kalbe verilmesinden (A) 1, (B) 3, (C) 5, (D) 7 ve (E) 14 gün sonra *in vitro* AKG nöronlarının (F) kontrol AKG nöronlarına göre alınan floresan görüntüsü. Di-8-ANEPPQ: yeşil, ölçek çubuğu: 100 µm.

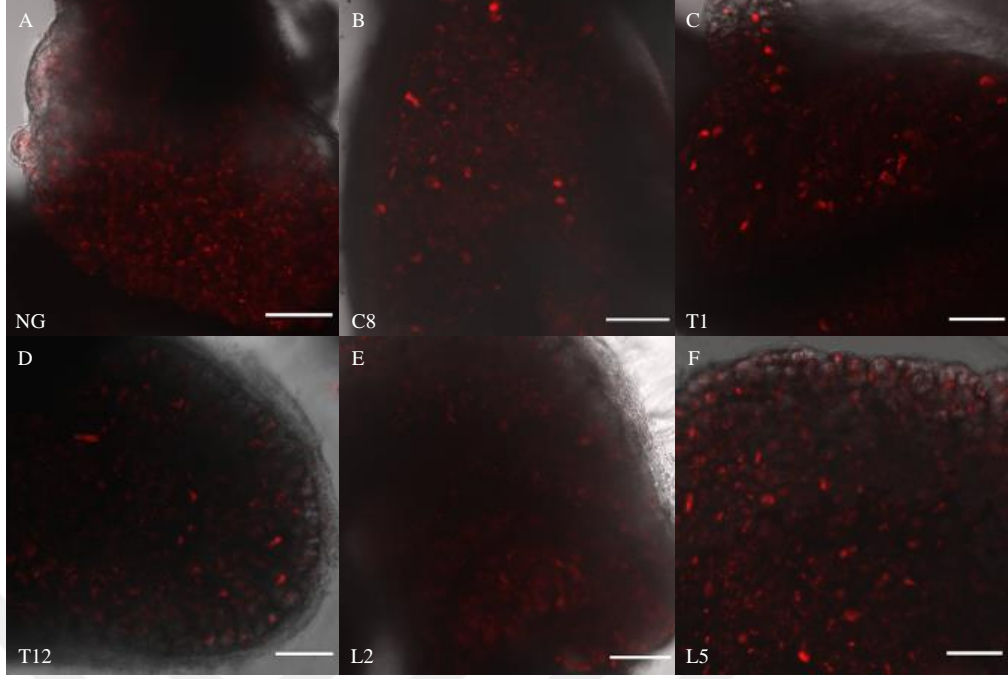
6.4. Di-8-ANEPPQ'nun AKG ve NG Dokularında İncelenmesi

Seçilen retrograd boyaların siyatik sinir ile bağlantılı AKG nöronlarını *in vivo* işaretleme kapasiteleri karşılaştırılıp, değerlendirildikten sonra Di-8-ANEPPQ, DiI ve Fluorogold ile rAAV2-retro-tdtomato fare kalbine verildi. Literatürde raporlandığı gibi operasyondan 7 gün sonra, C5-T8 arasındaki DRG ve NG dokuları alındı ve konfokal mikroskobu kullanılarak floresan görüntüleri alındı (Şekil 6.4.1) (14). Di-8-ANEPPQ işaretli nöronlar NG (Şekil 6.4.1 A) ve DRG (Şekil 6.4.1 D) dokusunda gözlemlendi. Diğer taraftan, Di-8-ANEPPQ boyasına kıyasla DiI veya Fluorogold ile floresanca işaretlenmiş az sayıda sinir hücreleri NG (Şekil 6.4.1 B, C) ve AKG örneklerinde (Şekil 6.4.1 E, F) tespit edildi ve Fluorogold ajanının özgü olmayan sitoplazma boyaması gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 6.4.1 NG ve AKG'da bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının Di-8-ANEPPQ, DiI ve Fluorogold ile retrograde işaretlenmesi. (A, D) Di-8-ANEPPQ (yeşil), (B, E) DiI (kırmızı), (C, F) Fluorogold (mavi). Oklar: Fluorogold ile işaretlenen hücreler, Ölçek çubuğu: 100 μ m.

Retrograd işaretleme kapasitesine sahip rAAV2-retro-tdtomato virüsüne ait dokular değerlendirildiğinde, sadece NG dokusu (Şekil 6.4.2 A) ile servikal ve toraks seviyesindeki AKG'daki hücreleri değil (Şekil 6.4.2 B-D) ayrıca lomber seviyesindeki AKG'daki hücrelerini de enfekte ettiği görüldü (Şekil 6.4.2 E, F). Yapılan incelemeler, rAAV2-retro-tdtomato viral ajanın özgül olmayan bir boyama kapasitesine sahip olduğu ve olası bir sistemik dağılım gösterdiğini düşündürmüştür. Bu nedenle, ilerleyen deneylerde rAAV2-retro-tdtomato kullanılmadı. Düşük sayıda nöron işaretleyen DiI or Fluorogold uygulaması ile spesifik olmayan bir boyama kapasitesine sahip rAAV2-retro-tdtomato virüsüne kıyasla, ilintili seviyelerdeki Di-8-ANEPPQ işaretli nöronların güçlü floresana sahip olduğu belirlendi. Bu nedenle, ilerleyen deneylerde kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek amacıyla retrograd boya olarak Di-8-ANEPPQ'nun kullanılmasına karar verildi.

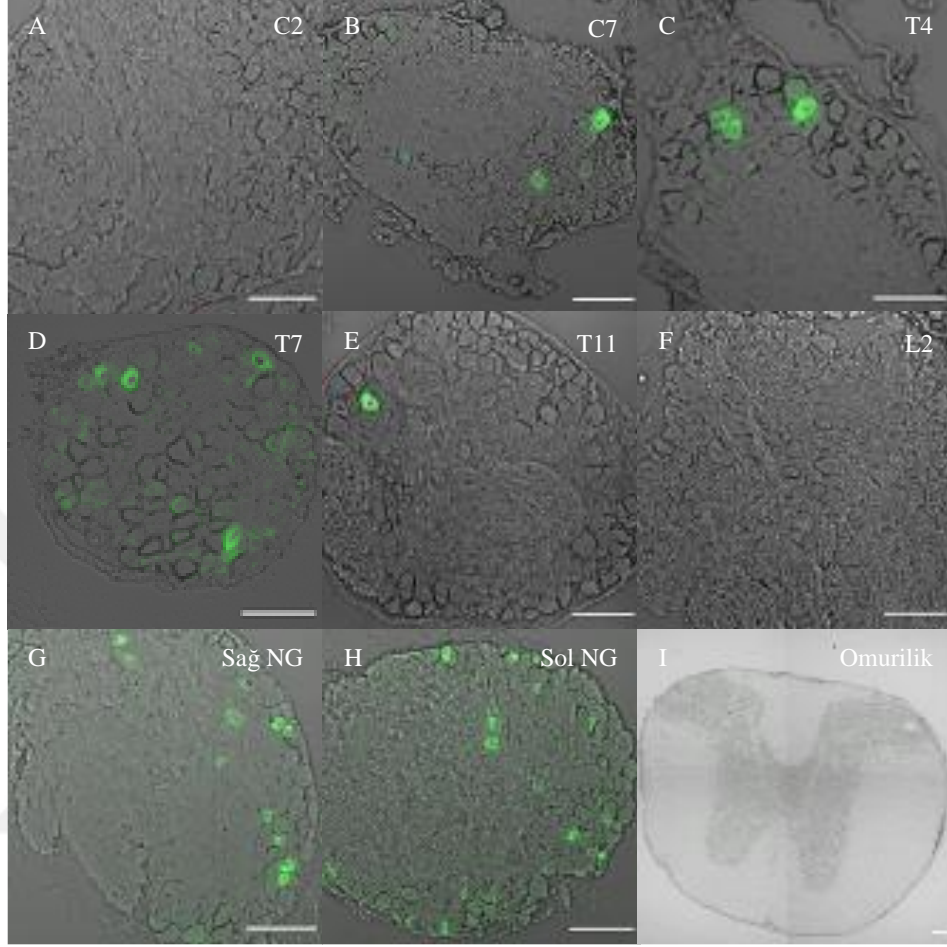


Şekil 6.4.2 rAAV2-retro virüsünü kalbe enjeksiyonun sonra NG ve AKG nöronlarının floresan görüntüsü. rAAV-retro ile enfekte (A) NG, (B) C8, (C) T1, (D) T12, (E) L2 ve (F) L5 seviyesindeki duyu sinir hücreleri. rAAV2-retro-tdtomato: kırmızı, Ölçek çubuğu: 100 µm.

6.5. Di-8-ANEPPQ'nun Doku Kesitlerinde İncelenmesi

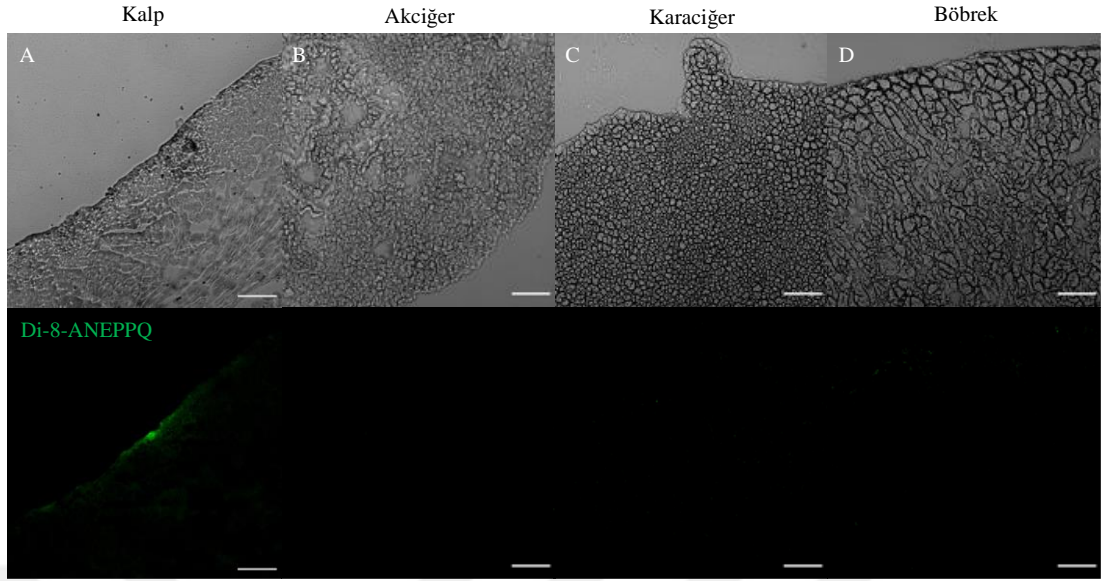
Di-8-ANEPPQ'nun sadece kalbe dallanan duyu nöronlarını işaretlediğini tespit etmek amacıyla operasyondan 7 gün sonra servikal, toraks ve lomber olmak üzere bütün AKG dokuları toplanarak kesit alındı (Şekil 6.5.1). C1-C4 (Şekil 6.5.1 A) ile L1-L5 (Şekil 6.5.1 F) seviyesindeki AKG doku kesitlerinde Di-8-ANEPPQ'ya rastlanmadı. Ayrıca, T10-T13 seviyesindeki AKG kesitlerinde ise floresanca işaretli tek hücre gözlemlendi (Şekil 6.5.1 E). Diğer taraftan, Di-8-ANEPPQ işaretli duyu nöronlarının literatüre benzer şekilde sağlı sollu C5-T8 arasındaki AKG (Şekil 6.5.1 B-D) ile NG'da (Şekil 6.5.1 G, H) yoğun bir dağılım gösterdiği tespit edildi (12,96). Ayrıca, C4-T8 seviyesindeki omurilikten alınan kesitlerden floresan görüntüleri alınarak, Di-8-ANEPPQ boyasının işaretlenmiş AKG nöronlarından omuriliğe geçişi incelenmiştir. Yapılan görüntüleme sonucunda, Di-8-ANEPPQ floresanına omurilikte rastlanmadı (Şekil 6.5.1 G, I). Elde edilen bu veri, kalbe enjekte edilen Di-8-

ANEPPQ'nun kardiyak aferentlerin başarıyla işaretlediğini ve AKG nöronlarında kalarak omuriliğe yayılmadığını göstermektedir.



Şekil 6.5.1 Belirli seviyelerdeki Di-8-ANEPPQ işaretli AKG nöronlarının görüntülenmesi. Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş AKG nöronlarının ilgili omurilik seviyelerindeki (A) C2, (B) C5, (C) T4, (D) T7, (E) T11, (F) L2, (G) Sağ NG, (H) Sol NG ve (I) Omurilik. Di-8-ANEPPQ: yeşil, ölçek çubuğu: 100 µm.

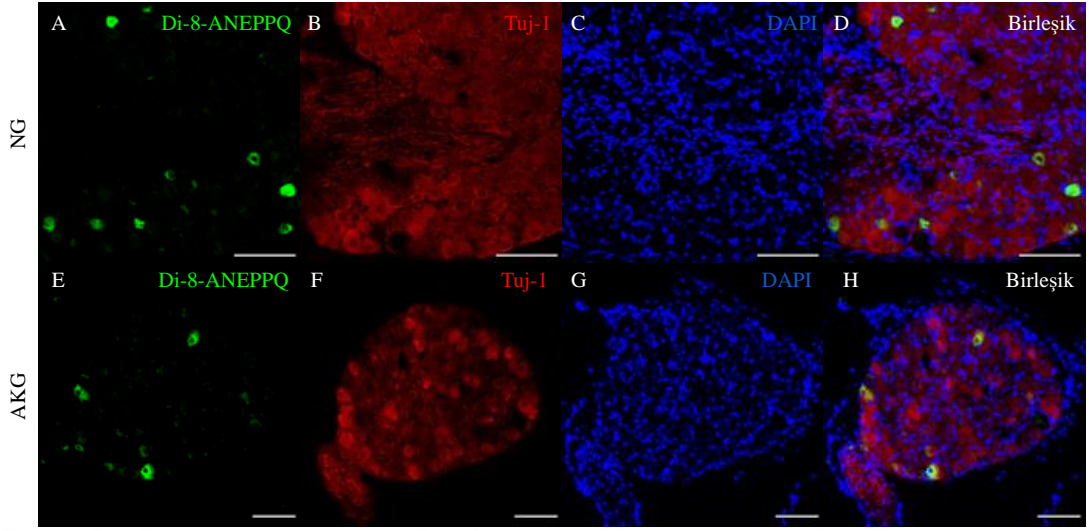
Di-8-ANEPPQ boyasının C-T seviyesindeki AKG ile NG nöronlarını işaretlemesinin yanında, kalbe enjeksiyon sonrasında akciğer, karaciğer ve böbrek organlarına geçişi incelendi. Kalpten alınan kesitlerde, operasyondan 7 gün sonra Di-8-ANEPPQ'nun floresan özelliğini koruduğu ve kalbe yayılmış olduğu gözlemlendi (Şekil 6.5.2 A). Akciğer (Şekil 6.5.2 B), karaciğer (Şekil 6.5.2 C) ve böbreğe ait kesitlerde (Şekil 6.5.2 D) floresan sinyale rastlanmadı. Sonuç olarak, kalbe enjeksiyon sonrasında Di-8-ANEPPQ boyasının başka organlara sızmadığı ve bu nedenle özgül boyamayı sağladığı sonucuna ulaşıldı.



Şekil 6.5.2 Di-8-ANEPPQ'nun kalp, akciğer, karaciğer ve böbrekteki tutulumunun incelenmesi. (A) Kalpten alınan kesitlerde Di-8-ANEPPQ'nun kalpte floresan sinyali. (B) Akciğer, (C) karaciğer ve (D) böbrek dokularına ait kesitlerin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. Di-8-ANEPPQ: yeşil, ölçek çubuğu: 100 µm.

6.6. Di-8-ANEPPQ'nun İmmünohistokimyasal İncelenmesi

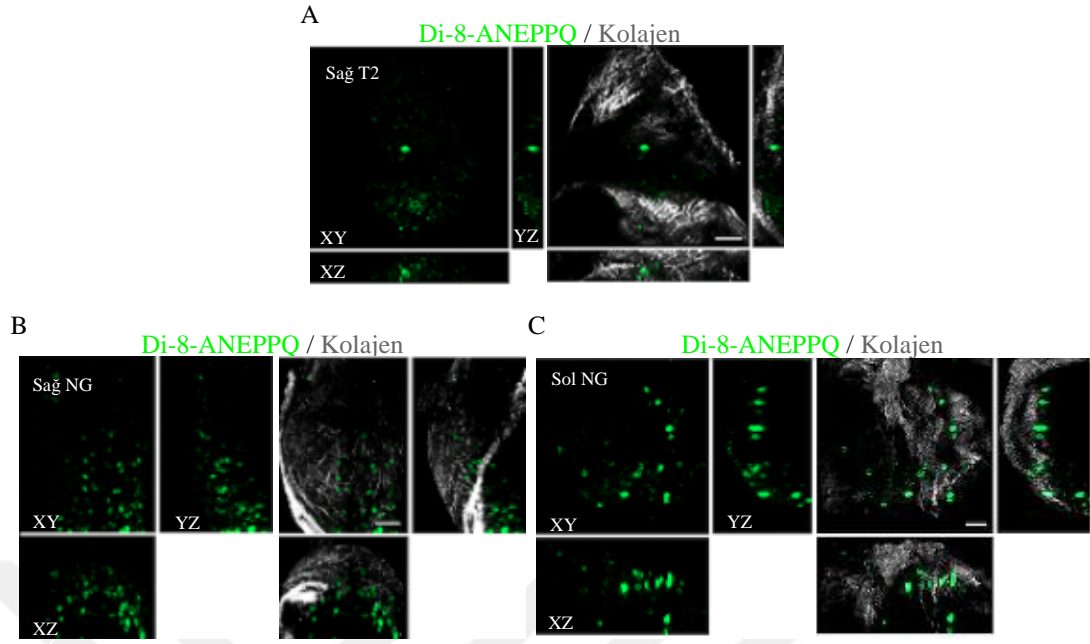
Doku boyutunda Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin nöron karakterizasyonu için immün boyama yapıldı ve nöron işaretleyici olarak Tuj-1 kullanıldı. İmmün boyama sürecinde, dokuların fiksasyonu sonrası Di-8-ANEPPQ'nun floresan şiddetinin azaldığı ve boyama sonunda boyanın floresansını tamamen kaybettiği gözlemlendi. Bu nedenle, Di-8-ANEPPQ'nun fiksasyon ve immünboyama ile uyumlu olmadığı sonucuna varıldı. Bu problemi çözmek için, fiksasyon öncesi Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin floresan görüntüleri (Şekil 6.6.1 A, D) ile Tuj-1 ile immünboyama sonrası aynı kesitten alınan (Şekil 6.6.1 B, E) floresan görüntüler üst üste getirilmiştir (Şekil 6.6.1 C, F). Yapılan işlem sonucunda, Di-8-ANEPPQ ve Tuj-1 işaretleyicilerine ait floresan sinyallerinin kolokalize olduğu ve retrograd boyanın nöron dışında başka bir hücreye geçmediği tespit edildi (Şekil 6.6.1 C, F). Nörona özgü protein olan Tuj-1 ile yapılan işaretleme sonucu, kalbe enjekte edilen Di-8-ANEPPQ'nun AKG ve NG'da Tuj-1 duyu nöronlarını işaretlediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 6.6.1 *In vivo* işaretlenmiş Di-8-ANEPPQ pozitif AKG ve NG nöronlarının immünohistokimyasal analizi. NG nöronu (A) Di-8-ANEPPQ, (B) Tuj-1 ve (C) Birleşik. AKG nöronları (D) Di-8-ANEPPQ, (E) Tuj-1 ve (F) Birleşik. Tuj-1 (kırmızı): beta tubulin III, DAPI (mavi): nuclear marker, Di-8-ANEPPQ (yeşil). Ölçek barı: 100 μ m.

6.7. Kalbe Özgü Duyu Sinir Hücrelerinin 3-Boyutlu Görüntülenmesi

Kalbe özgü duyu nöronlarının NG ve AKG dokularındaki dağılımını incelemek amacıyla Di-8-ANEPPQ işaretli dokular iki-foton mikroskobu ile incelendi. Alınan 3 boyutlu görüntülerde kalbe özgü duyu sinirlerinin hem AKG (Şekil 6.7.1 A) hem de NG dokularında (Şekil 6.7.1 B, C) bilateral olarak homojen dağıldığı tespit edildi.

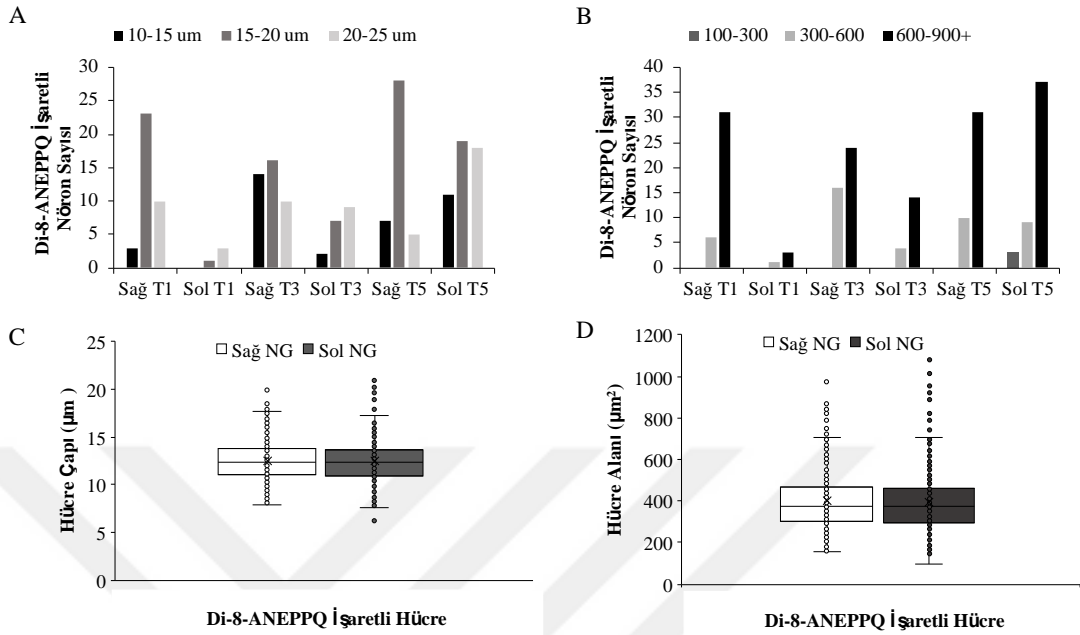


Şekil 6.7.1 Kalbe özgü duyu nöronlarının 3 boyutlu gösterimi. (A) sağ T2, (B) sağ NG ve C) sol NG. Di-8-ANEPPQ: yeşil, kolajen: gri. Ölçek çubuğu: 100 μm . Penetrasyon derinliği; Sağ T2 AKG: 92 μm , sağ NG: 420 μm , sol NG: 300 μm .

6.8. Kalbe Özgü Duyu Sinir Hücrelerinin Çap Analizi

Kalbe özgü duyu nöronlarının boyutlarını tespit etmek amacıyla, Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin çap analizi gerçekleştirildi. Bunun için, Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin alanları ölçülerek çapları hesaplandı. Yapılan hesaplamalar sonucunda, kalbe özgü AKG nöronlarının hücre gövde alanlarının sırasıyla; sağ T1: $823 \pm 252.4 \mu\text{m}^2$, sol T1: $740.4 \pm 242.3 \mu\text{m}^2$, sağ T3: $750.2 \pm 327.8 \mu\text{m}^2$, sol T3: $890.4 \pm 289.9 \mu\text{m}^2$, sağ T5: $823 \pm 252.4 \mu\text{m}^2$, sol T5: $842.3 \pm 350 \mu\text{m}^2$ (Şekil 6.8.1 A) olduğu tespit edildi. Kalbe özgü AKG duyu nöronlarının hücre çaplarının ise sağ T1: $18.3 \pm 2.75 \mu\text{m}$, sol T1: $17.1 \pm 3.09 \mu\text{m}$, sağ T3: $16.98 \pm 3.72 \mu\text{m}$, sol T3: $18.74 \pm 3.2 \mu\text{m}$, sağ T5: $17.5 \pm 2.3 \mu\text{m}$, sol T5: $18.2 \pm 3.9 \mu\text{m}$ ve genel olarak 10-25 μm arasında dağılım gösterdiği tespit edildi (Şekil 6.8.1 B). Diğer taraftan, dokularda yapılan hücre gövde analizlerine göre sağ NG'da bulunan kalbe özgü nöronlarının hücre gövde alanları ortalama $399.8 \pm 147.7 \mu\text{m}^2$, sol NG'da ise $397.1 \pm 153.3 \mu\text{m}^2$ olarak ölçüldü (Şekil 6.8.1 C). Alan analizinden yapılan hesaplamalar göre ise vagal kardiyak aferentlerin ortalama hücre çaplarının sağ gangliyonda $12.73 \pm 7.74 \mu\text{m}$, sol gangliyonda ise 12.69

$\pm 7.88 \mu\text{m}$ olduğunu göstermiştir (Şekil 6.8.1 D). Köken aldığı gangliyondan bağımsız kalbe özgü duyu nöronlarının boyutlarının $20 \mu\text{m}$ 'den küçük olduğu sonucuna varıldı.

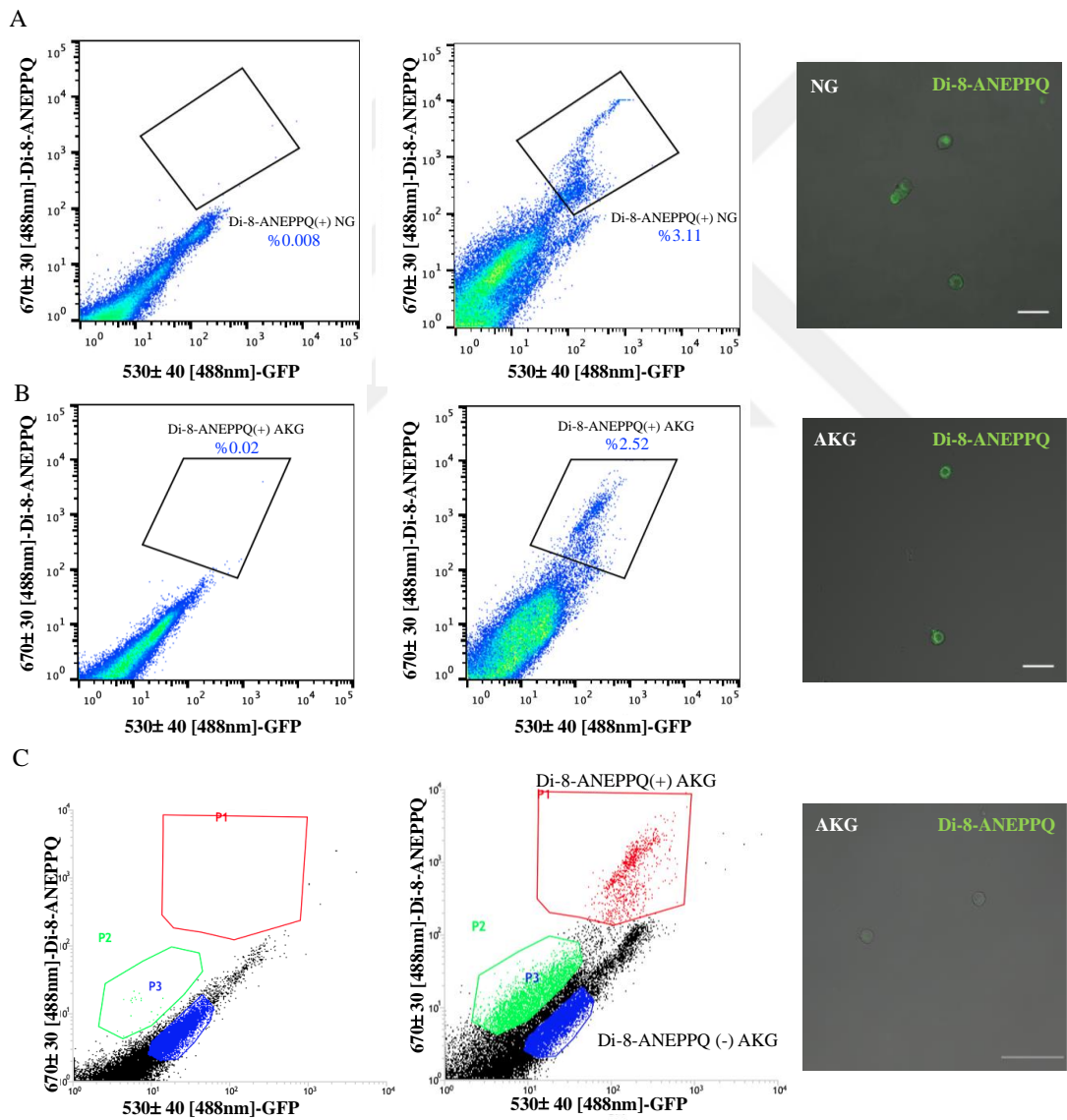


Şekil 6.8.1 Di-8-ANEPPQ işaretli kardiyak nöronlarının doku boyutundaki hücre gövde alan ve çaplarının analizi. İki taraflı T1, T3 ve T5 AKG kardiyak nöronlarının (A) hücre gövde alanlarını ve (B) çaplarını gösteren grafik. Sağ ve sol NG kardiyak nöronlarının (C) hücre gövde alanlarını ve (D) çaplarını gösteren grafik.

6.9. Kalbe Özgü Duyu Sinir Hücrelerinin Saflaştırılması ve Histolojik İncelenmesi

Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin FACS cihazında saflaştırılması ve analiz edilmesi için, bölüm 6.2 tespit edildiği üzere 488 nm lazer uyarımda, $630 \pm 30 \text{ nm}$ ile $513 \pm 40 \text{ nm}$ filtreler ise floresanı ışınmasını yakalamak için kullanıldı. FACS cihazında tercih edilen iki farklı ışınma filtresi sayesinde Di-8-ANEPPQ işaretli hücreler başarıyla ayrıştırıldı (Şekil 6.9.1). FACS cihazında yapılan kapılama sonucunda, NG (Şekil 6.9.1 A) ve AKG (Şekil 6.9.1 B) duyu sinir hücrelerinde benzer floresan profili elde edildi. FACS ile yapılan kapılama ve saflaştırma sonucunda, genel NG ve AKG hücre popülasyonunun sırasıyla %1.68-3.66 ve %1.62-3.31'sinin Di-8-ANEPPQ işaretli duyu nöronları olduğu tespit edildi (Şekil 6.9.1). FACS ile saflaştırılan Di-8-ANEPPQ işaretli duyu nöronları cam petrilere ekilerek konfokal mikroskobu altında floresan görüntüleri alındı. Saflaştırmanın ardından alınan floresan görüntülerde, Di-8-

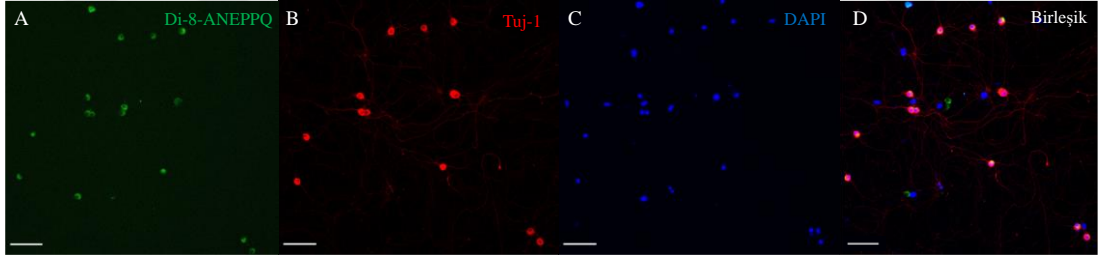
ANEPPQ boyalı NG (Şekil 6.9.1 A) ve AKG (Şekil 6.9.1 B) sinir hücrelerinin yeşil floresana sahip olduğu ve canlılıklarının yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 6.9.1 C). Diğer taraftan, Di-8-ANEPPQ (-) hücreleri belirlemek adına P2 ve P3 olarak adlandırılmış iki alan alınarak, kültüre edildi. Alınan floresan görüntülerde, P2 kapısına ait bölgeden akson kalıntılarının elde edildiği P3 alanından bölgeden ise canlılığını koruyan ve yeşil ışığa vermeyen AKG nöronların olduğu gözlemlendi (Şekil 6.9.1 C). Elde edilen bulgular, FACS cihazı ile Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerinin boyanmamış hücre popülasyonundan ayrıldığı, başarılı ile saflaştırıldığı ve işlem sonrası canlılıklarını koruduklarını göstermiştir.



Şekil 6.9.1 Fare kalbine *in vivo* Di-8-ANEPPQ verilmesi sonrası AKG ve NG hücrelerinin FACS analizi ve floresan görüntüsü. (A) Belirlenen filtreler

kullanılarak floresan işaretli olmayan NG popülasyonun belirlenmesi, *in vivo* Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş canlı NG hücrelerinin floresan yayılımı ve ayrıştırma sonrası hücre kültüründeki durumu. (B) Belirlenen filtreler kullanılarak floresan işaretli olmayan AKG popülasyonun belirlenmesi, *in vivo* Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmiş canlı AKG hücrelerinin floresan yayılımı ve ayrıştırma sonrası hücre kültüründeki durumu. (C) Di-8-ANEPPQ işaretli hücrelerin kapılanması ve Di-8-ANEPPQ (-) hücrelerin belirlenmesi ve ayrıştırılması sonrası floresan görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50 μm , Di-8-ANEPPQ: yeşil.

FACS yöntemi ile saflaştırılan ve konfokal mikroskobu altında Di-8-ANEPPQ pozitif olduğu tespit edilen AKG sinir hücrelerinin (Şekil 6.9.2 A) immünboymaları nörona özgü proteinler olan ile Beta Tubulin III (Tuj-1) ve çekirdek boyası olan DAPI ile immünboyması gerçekleştirildi. Yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda, saflaştırılan kalbe özgü AKG nöronlarının hücrelerin Tuj-1 ile işaretlendiği (Şekil 6.9.2 B, D) ve bu nedenle nöron özellikte olduğu tespit edildi. Alınan floresan görüntülerde, Tuj1 negatif DAPI pozitif hücrelerin varlığı da gözlemlendi (Şekil 6.9.2 C). Bu hücrelerin, FACS sırasında nöron hücre gövdelerine tutunmuş halde oldukları ve zamanla nöron gövdesinden ayrılarak bölünüp çoğaldıkları sonucunda varıldı (Şekil 6.9.2).



Şekil 6.9.2 Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü AKG nöronlarının Tuj-1 ile immünboyması. (A) FACS sonrası kalbe özgü AKG nöronlarında Di-8-ANEPPQ sinyali ve (B) kültürün 3.gününde kalbe özgü AKG nöronlarının Tuj-1 (kırmızı) ve (C) DAPI (mavi) ile immünboyması sonrası konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. (D) Birleşik. Ölçek çubuğu: 100 μm .

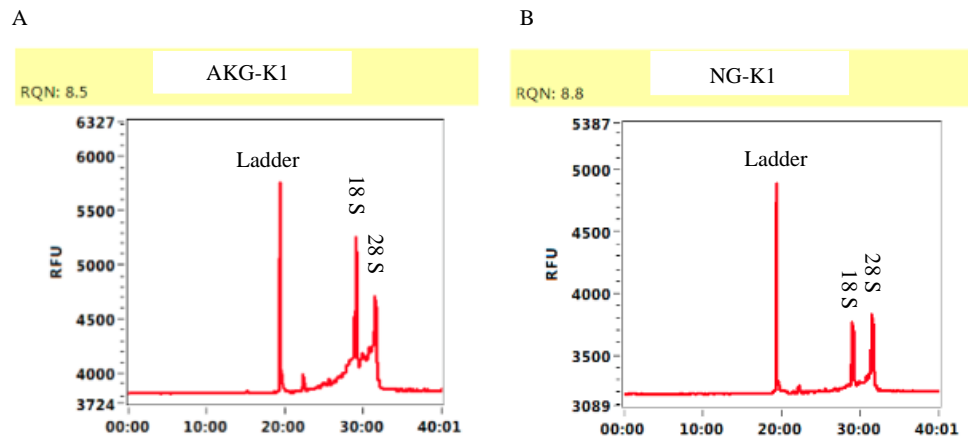
6.10. Kalbe Özgü Duyu Sinirlerinin RNA-Dizileme Analizi ile Moleküler İncelenmesi

Kalbe özgü duyu sinir hücrelerinin gen ifadelerinin tanımlanması ve diğer duyu nöronları ile gen ifade seviyesinde farklarının tespit edilmesi amacıyla RNA dizi analizi kullanılarak global gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirildi. FACS kullanılarak saflaştırılan Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü duyu nöronları ile aynı

işlemlerden geçirilen ancak kalbine Di-8-ANEPPQ yerine çözücüsü olan DMSO verilen hayvanlardan elde edilen duyu nöronlarından RNA izole edildi ve aşağıda belirtilen gruplar oluşturuldu.

- **AKG-K:** Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü AKG nöronları (n=3),
- **AKG-T:** Kalbine DMSO enjekte edilen hayvanlardan alınan ve percoll gradyanı kullanılarak saflaştırılan total AKG nöronları (n=2),
- **NG-K:** Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü NG nöronları (n=2),
- **NG-T:** Kalbine DMSO verilen hayvanlardan alınan total NG nöronları (n=2).

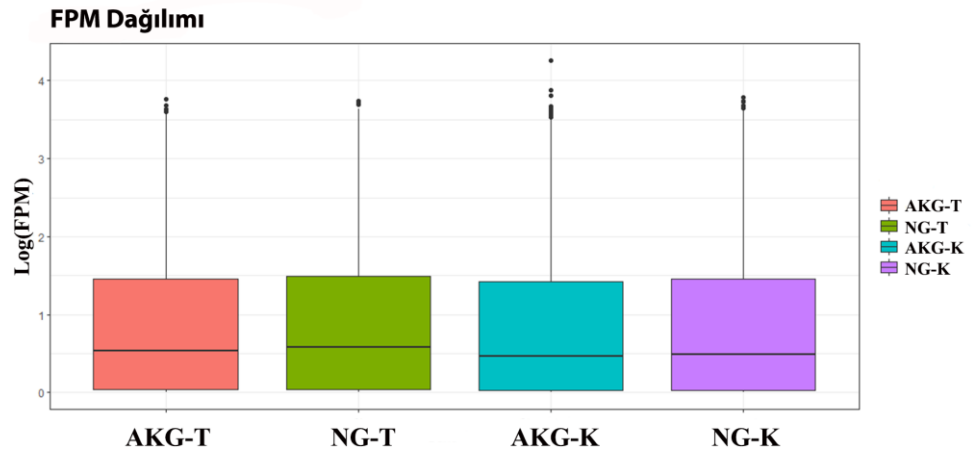
Kardiyak aferentlerin global gen ekspresyon profilini belirlemek üzere öncelikle örneklerin RNA konsantrasyonları ve RNA fragman analizi ile RNA kaliteleri ölçüldü. RNA fragman analizinde elde edilen referans ve 18S/28S oranları kullanılarak RNA kalite değerleri (RQN) belirlendi. RQN değeri 6.8 ve üzeri olan örnekler RNA dizi analizi için kullanıldı (Şekil 6.10.1). Şekil 6.4.1 A’da gösterilen kalbe özgü AKG duyu nöron örneğine ait RNA kalite grafiğinde 18S ve 28S’e ait tek bir tepenin varlığı ve tepelerin çevresinde dalgalanmalarının olmaması RNA’nın bozulmadığını göstermektedir. Kalbe özgü NG nöronlarından elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları AKG örneklerine göre daha düşük elde edildi ve bu durum NG örneğine ait fragman analizi grafiğinde (Şekil 6.10.1 B) 18S ve 28S tepe değerlerinin AKG örneğine göre daha kısa olması olarak gözlemlendi (Şekil 6.10.1 A).



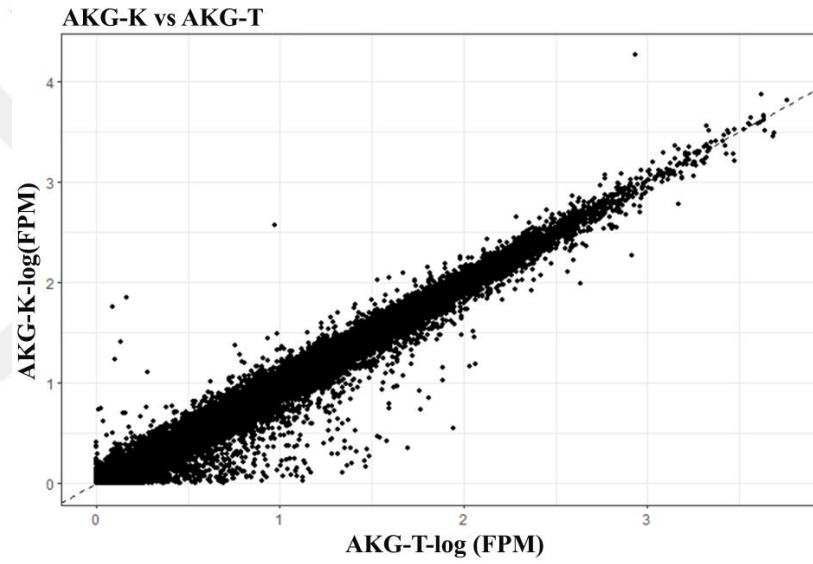
Şekil 6.10.1 Kalbe özgü nöronlardan izole edilen RNA örneklerine ait fragman analizi. (A) Kalbe özgü AKG örnek 1 (AKG-K1) ve (B) NG örnek 1 (NG-K1) nöronlarına ait RNA kalitesini gösteren RNA fragman analiz grafiği ve RQN değeri.

Toplanan RNA örnekleri RNA konsantrasyonları ve RQN değerlerine göre değerlendirildi ve belirlenen örnekler RNA dizi analizi analizine gönderildi. Kalbe özgü veya total AKG örnekleri toplamda 500 ng RNA, kalbe özgü veya total NG örnekleri ise toplamda 200 ng RNA olacak şekilde 10'ar µl'lik çözeltiler içerisinde hazırlandı. RNA dizi analizi sonucu her bir gruba ait FPM (FPM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) değerleri belirlenerek, gruplar arası karşılaştırmanın yapılabilirliği test edildi. AKG-K, AKG-T, NG-K ve NG-T örneklerinin RNA analizi sonucu benzer FPM değerleri olduğu tespit edildi (Şekil 6.5.2 A). Benzer şekilde AKG ve NG örneklerine ait FPM değerleri kendi aralarında dağılım grafiği (scatter plot) çizildiğinde bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil 6.10.2 B, C). Elde edilen FPM değerlerindeki benzerlik AKG ve NG gruplarının kendi içinde ve aralarında karşılaştırma yapılabileceğini göstermektedir.

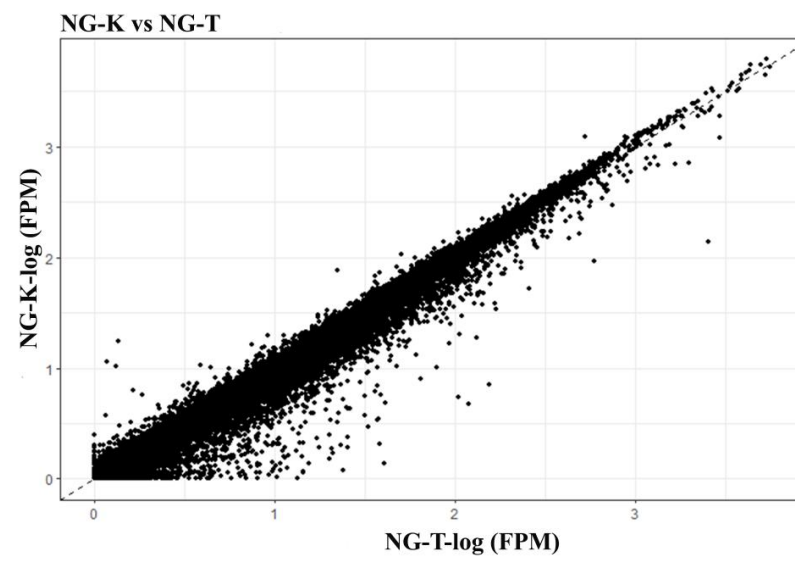
A



B

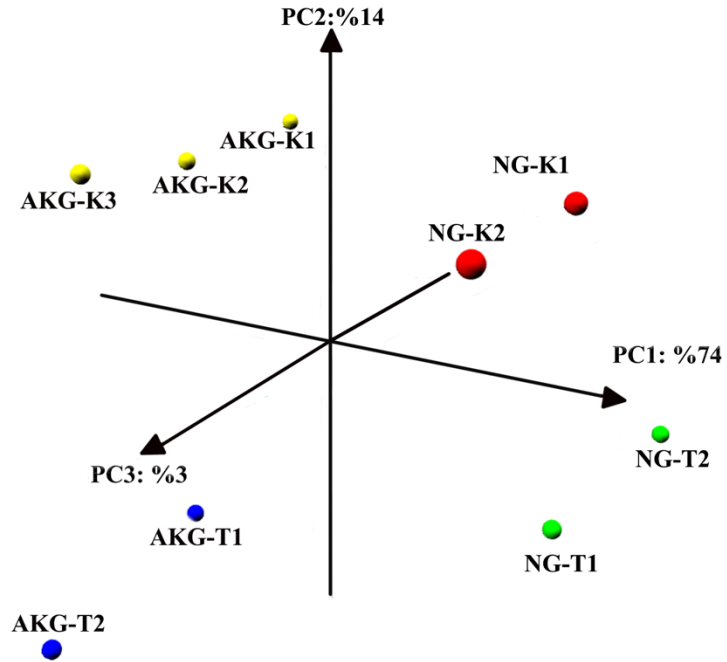


C



Şekil 6.10.2 Kalbe özgü duyu nöronlarındaki genel gen dağılımı. (A) Her bir grup için bütün genleri kapsayan FPM değerlerini gösteren grafik. (B) AKG-K ve AKG-T'nin FPM değerlerini karşılaştıran dağılım grafiği. (C) NG-K ve NG-T'nin FPM değerlerini karşılaştıran dağılım grafiği. FPM: Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads.

RNA dizi analizi sonuçlarına göre bütün örnekler boyunca ekspresyonu en çok değişkenlik gösteren 500 gene ait ekspresyon verileri kullanılarak Temel Bileşenler Analizi (PCA) yapıldı. PCA analizine ait grafikte AKG ve NG'ların kökenlerine ve de kendi içlerinde kalbe özgü veya genel duyu iletimi için özelleştikleri fonksiyonel yapıya göre net bir şekilde ayrıldıkları gözlemlendi (Şekil 6.10.3). AKG kökenli tüm örnekler, NG kökenli tüm örneklerden total varyansın %74'ünü açıklayan eksen boyunca ayrıldı (PC1: %74). Kalbe özgü duyu nöronlarını içeren AKG-K ve NG-K ile kontrol grubu olan AKG-T ve NG-T total varyansın %14'ünü açıklayan ikincil eksen boyunca ayrıldılar (PC2: %14). AKG-K ve NG-K örneklerinin kendi içlerinde ise %3'lük bir varyasyonla ayrıldığı gözlemlendi (PC3: %3). Örneklerin üç boyutlu düzlemde birbirlerinden ayrılması, kalbe özgü duyu nöronlarının genom profili açısından farklı bir popülasyonu temsil ettiğini göstermektedir.

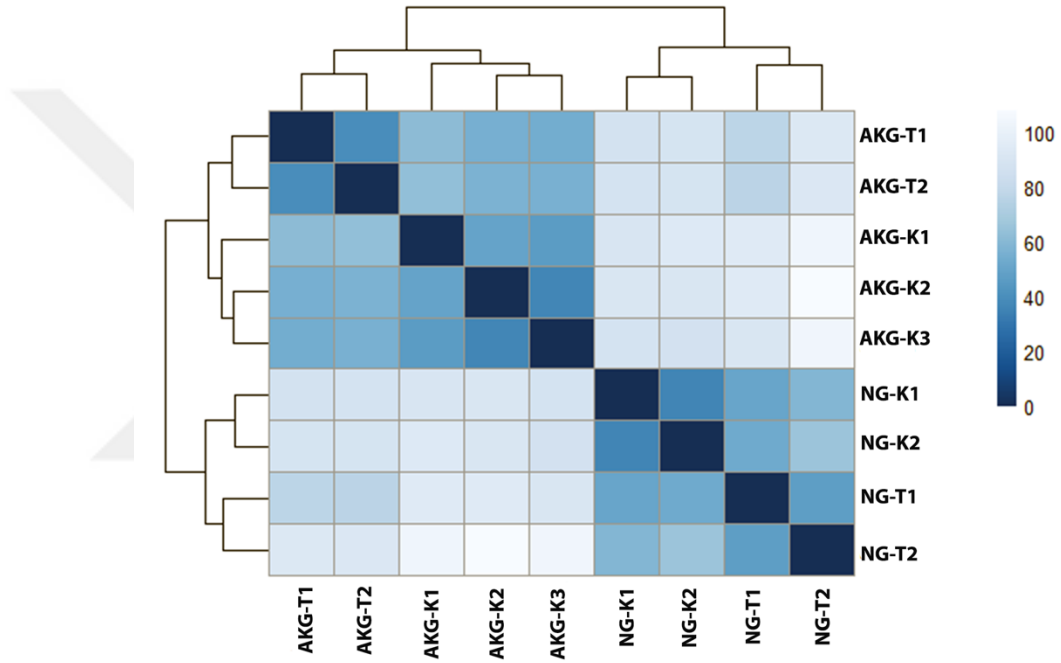


Şekil 6.10.3 RNA dizi analizi sonucu FACS ile saflaştırılan kalbe özgü AKG ve Noduz sinir hücreleri ile kontrol olarak kullanılan AKG ve Noduz hücrelerinin Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis, PCA).

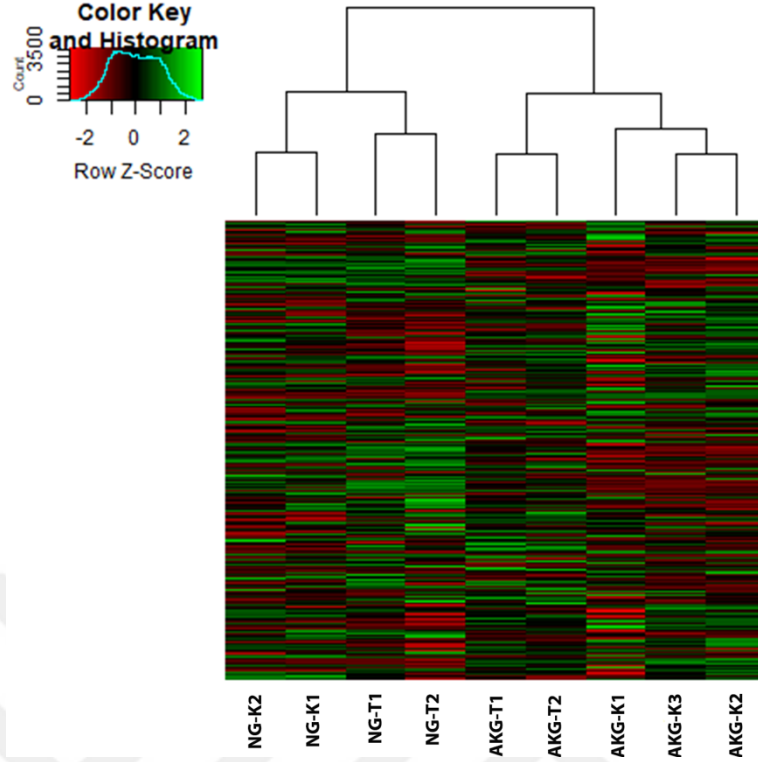
En yüksek varyans gösteren 500 gen seçilerek gerçekleştirilen Temel Bileşenler Analizinde her bir eksen (PC), ilgili eksen boyunca açıklanan yüzdelik varyansı

göstermektedir. AKG-K: Kalbe özgü AKG, NG-K: Kalbe Özgü NG, AKG-T: AKG total popülasyonu, NG-T: NG total popülasyonu.

Örnekler boyunca ifade edilen bütün genler kullanılarak gerçekleştirilen korelasyon (Şekil 6.10.4) ve hiyerarşik kümeleme analizi (Şekil 6.10.5) sonucunda gangliyon tipi (AKG ile NG) ve hücre tiplerine (kalbe özgü duyu nöronları ile total hücre) göre grupların kendi içlerinde kümelendiği tespit edildi. Korelasyon ve hiyerarşik kümeleme analizlerinin PCA analizi ile benzer sonuçlar verdiği bulundu. Total hücre popülasyonuna kıyasla genom profili açısından kardiak duyu nöronlarının farklı bir popülasyonu temsil ettiği sonucuna varıldı.

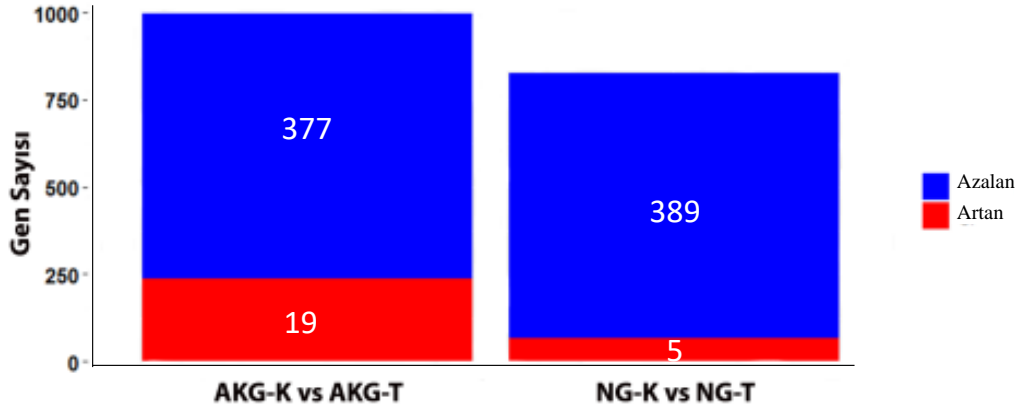


Şekil 6.10.4 Örneklerin Öklit uzaklığı yöntemine göre gerçekleştirilen kümeleme analizi sonucu (Hirerachical Clustering based Euclidean Distance).



Şekil 6.10.5 Örneklerin tüm genom profili üzerinden gerçekleştirilen kümeleme analizi sonucu Hierarchical Clustering based Euclidean Distance gösterimi. Anlatım değeri 1 FPKM ve üzerinde olan genler kullanılarak oluşturuldu.

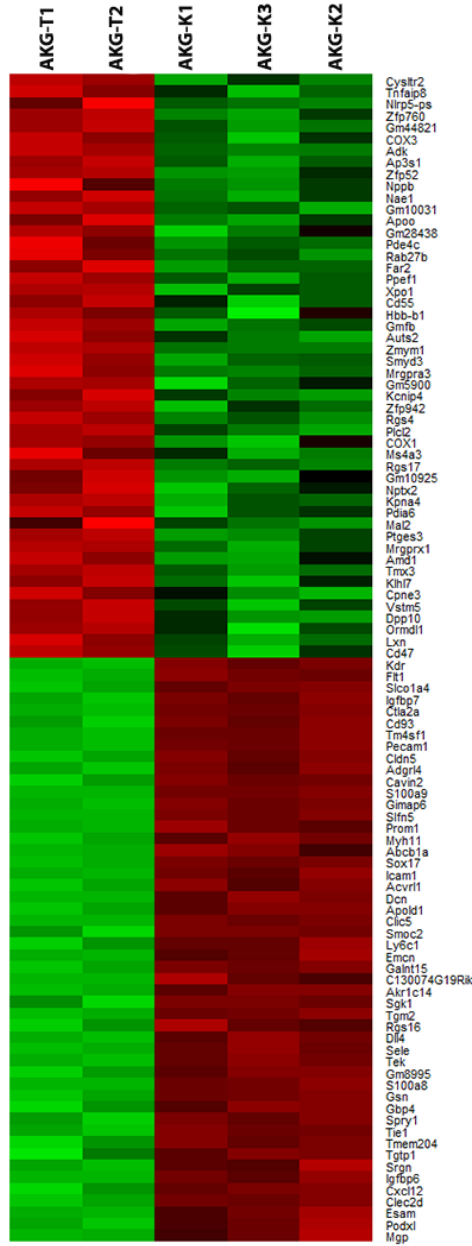
Hiyerarşik grafik ile genel nöron popülasyonundan farklılığı gösterilen kalbe özgü duyu nöronlarında bu farklılığa sebep olan genleri saptamak için diferansiyel anlatım analizi gerçekleştirildi. Diferansiyel analiz sonucunda, AKG-T popülasyonuna kıyasla AKG-K grubunda anlamlı olarak yüksek ifade edilen 19 gen (Log_2 tabanlı kat değişimi >1.5 , çoklu teste göre düzeltilmiş $p < 0.05$) ve düşük ifade edilen 377 gen tespit edildi (Log_2 tabanlı kat değişimi < -1.5 , çoklu teste göre düzeltilmiş $p < 0.05$) (Şekil 6.10.6). Diferansiyel analizi kullanılarak NG-K ile NG-T grubu karşılaştırıldığında ise kalbe özgü NG nöronlarında anlamlı olarak yüksek ifade edilen 5 gen (Log_2 tabanlı kat değişimi >1.5) ve düşük ifade edilen 389 gen tespit edildi (Log_2 tabanlı kat değişimi < -1.5 , çoklu teste göre düzeltilmiş $p < 0.05$) (Şekil 6.10.6).



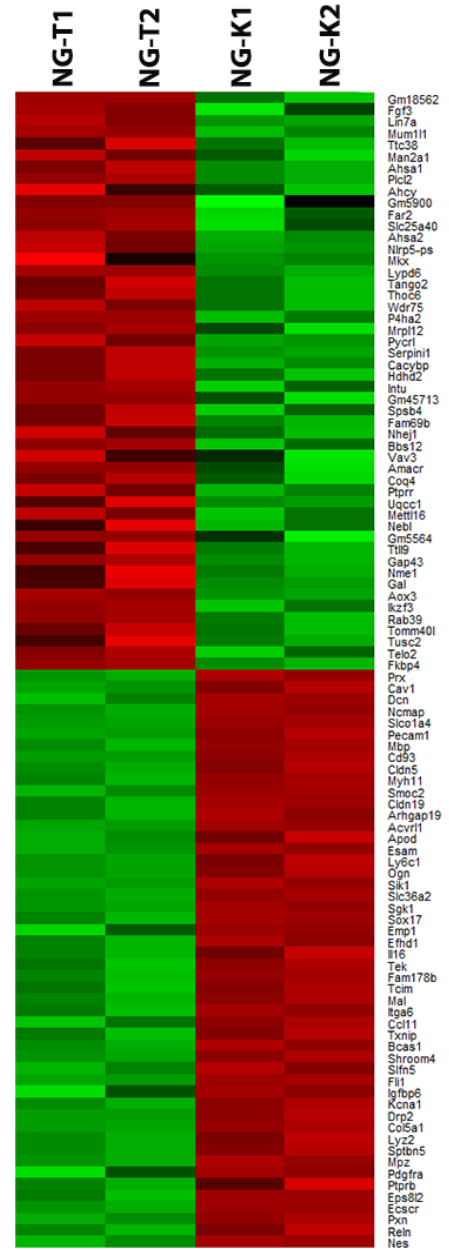
Şekil 6.10.6 DRG-T ve NG-T örneklerine göre, AKG-K ve NG-K örneklerinde yüksek ve düşük ifade edilen gen sayısını gösteren grafik.

Total duyu nöronlarına göre kalbe özgü duyu nöronlarında düşük ve yüksek ifade edilen gen listesi kullanılarak sıralamadaki ilk 50 gen tespit edildi (Şekil 6.10.7). AKG-K grubunda yüksek ifade edilen genlere bakıldığında ilk sırada leukotriene bağlandığında aktif olan G-protein kapılı reseptörü kodlayan Cysltr2 adlı genin olduğu tespit edildi (Şekil 6.10.7 A). Ayrıca sinir hücreleri ile immün hücreleri arasında bir sinyal proteini olan Tnfai8, Nppb nörotransmitter, mas-ilişkili G-protein kapılı reseptörlerden biri olan Mrgpa3 ve ağrı nöronlarında çoğunlukla üretilen K⁺ kanalı olan Kcnip4 kodlayan genlerin yüksek ifade edilen ilk 50 gen arasında olduğu görüldü (90) (Şekil 6.10.7 A). NG-K grubunda ise purinerjik sinyalde rol oynayan Ahcy (S-adenosylhomocysteine hydrolase) ile ATP'ye duyarlı Ca²⁺ geçiren purinerjik kanal olan P2Xr2 genlerin listenin ilk sırasında olduğu tespit edildi (83) (Şekil 6.10.7 B).

A



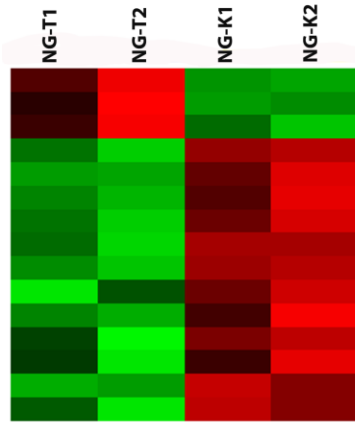
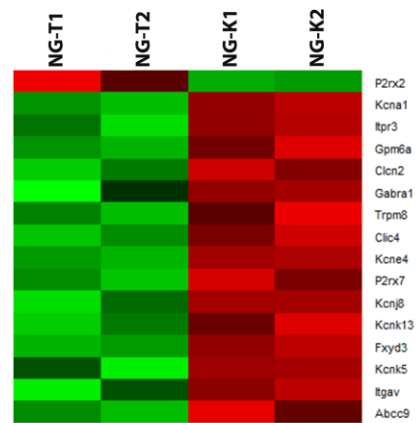
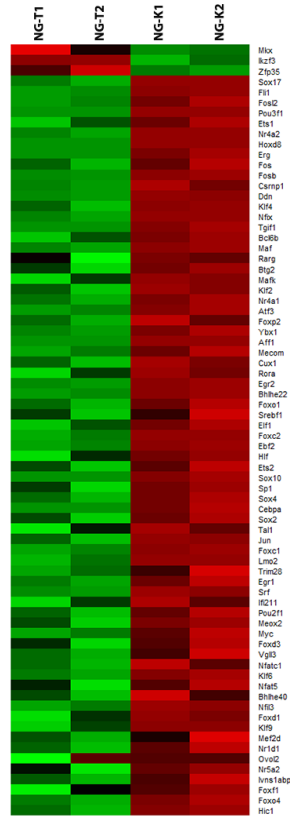
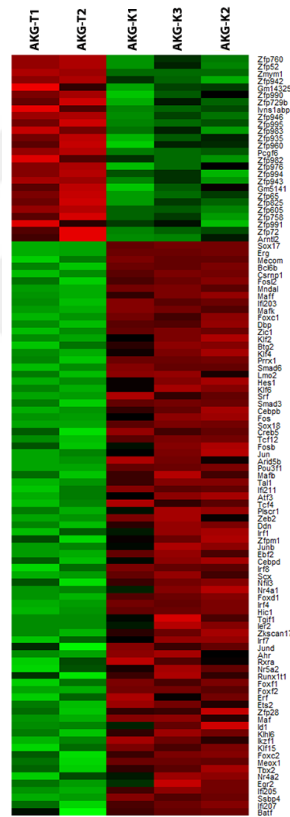
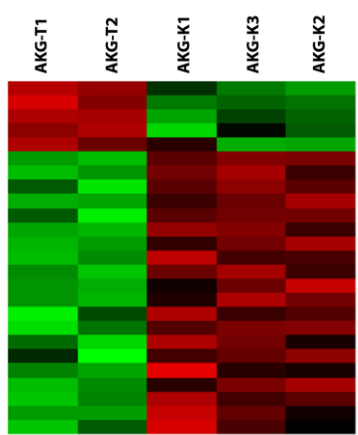
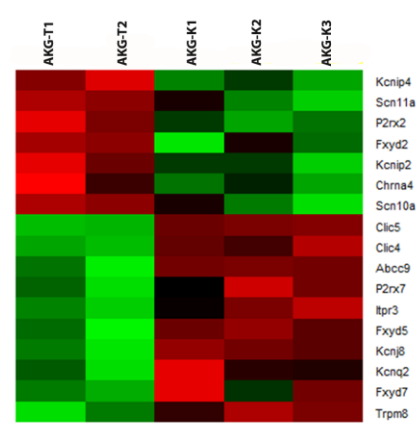
B



Şekil 6.10.7 RNA dizi analizi sonucunda elde edilen ilk 50 gen listesi. (A) AKG-K ve (B) NG-K örneklerinde yüksek ve düşük ifade edilen ilk 50 gen listesi.

Bir sonraki aşama olarak, yüksek ve düşük ifade edilen genlerin Gen Ontoloji (GO) kategorilerinden GPCR (GO: 0004930), iyon kanalı (GO: 0005216) ve transkripsiyon faktörleri (GO: 0003700) kullanılarak kalbe özgü duyu nöronlarında yüksek ifade edilen genlerin biyolojik fonksiyonlarını sınıflandırıldı. Kalbe özgü NG grubunda yüksek ifade edilen genlerden Galanin ve Progesteron GPCR sınıfına ait olduğu belirlenirken (Şekil 6.10.8 A), ATP'ye duyarlı purinerjik reseptör olan P2Xr2 de iyon

kanalı sınıfında çıkmıştır (Şekil 6.10.8 B). Kalbe özgü AKG nöronlarında ise GPCR kategorisinde ise mas ilişkili reseptörler olan Mrgpra3, Mrgprx1, Mrgprb4 ile Cystlr2 bulunduğu tespit edildi (Şekil 6.10.8 E). İyon kanalları kategorisinde ise literatürde ağrı nöronları ile ilişkilendirilmiş Na⁺ kanalları (Scn10a, Scn11a), K⁺ kanalları (Kcnip2, Kcnip4), purinerjik reseptör (P2Xr2) ve nikotonik kolinerjik reseptörün (Chrna4) ifade eden genler bulundu (Şekil 6.10.8 F). Gen ontoloji analizi ile belirlenen genlerin hangi sınıfa ait olduğu belirlenmiş olup, kardiyak aferentlere özgü fonksiyonların araştırılmasına imkan sağlamıştır. Ayrıca, diferansiyel ekspresyon analizine göre kalbe özgü duyu nöronlarının özelleşmesinde az sayıda genin yüksek ifadesinin yanında bazı özelliklerin baskılanması için belirtilen 300 üzeri genin baskılanması gerektiği sonucu çıkarılmıştır.

A**B****C****D****E****F**

Şekil 6.10.8 Kalbe özgü duyu nöronlarının heterojen popülasyona göre yüksek ve düşük ifade edilen G-protein kapılı reseptör (GPCR), iyon kanalı ve transkripsiyon faktörlerini gösteren heat-map. Kalbe özgü NG nöronlarında (A) Galanin (gal), ptgdr ve mas-ilintili GPCR reseptörleri, (B) P2Xr2 iyon gibi kanal ve (C) Ikzf3 gibi transkripsiyon faktörlerinin heat-map dağılımı. Kalbe özgü AKG nöronlarında (D) Arntl 2 gibi transkripsiyon faktörlerinin, (E) Cystrl2 ve Mrgpra3 gibi GPCR ve (F) P2Xr2 ve Scn10a gibi iyon kanallarının heat-map dağılımı.

Diferansiyel anlatım gösteren genler içerisinde benzer moleküler fonksiyonları gerçekleştiren ve istatistiksel olarak anlamlı olan gen gruplarını belirlemek amacıyla gen ontoloji terimlerinden faydalanan gen grubu zenginleştirme (Gene Set Enrichment) analizi kullanıldı. Yapılan gen grubu zenginleştirme analizi sonucu, kalbe özgü AKG ve NG nöronlarına ait örneklerde yüksek ifade edilen genler için anlamlı bir şekilde yüksek ifade edilen gen grubu bulunmadı. Total hücre grubuna göre AKG-K (Tablo 6.10.1) ve NG-K (Tablo 6.10.2) grubunda düşük ifade edilen genlerin çeşitli biyolojik işlemler ile ilişkili oldukları ve gruplaştığı belirlendi. AKG-K ve NG-K örneklerinde ortak olan biyolojik işlemler arasında “Blood Vessel Morphogenesis” (ör: Foxf1, Dll4, Pdgfb genleri), “Regulation of Cell Proliferation” (ör: Lrr32, Fn1, Ltn1 genleri) ve “Cell Adhesion” (ör: Cldn1, Eng, Vwf genleri) başlıkları bulunmaktadır. Kalbe özgü nöronlarda yüksek ifade edilen genlerin düşük ifade edilenlere göre sayıca az olmasından dolayı Gen Ontoloji Zenginleştirme Analizi’nden sonuç alınamadı.

Tablo 6.10.1 Kalbe özgü AKG duyu nöronları için yapılan Gen Ontoloji Analizi sonuçları

category	over_represented_pvalue	numDEInCa	numInCa	term	ontology	padj_value
GO:0048514	4.65E-30	68	525	blood vessel morphogenesis	BP	7.09E-26
GO:0035239	4.79E-29	80	757	tube morphogenesis	BP	3.65E-25
GO:0001944	5.09E-28	72	633	vasculature development	BP	2.59E-24
GO:0072358	1.34E-27	72	644	cardiovascular system development	BP	4.15E-24
GO:0001568	1.36E-27	70	606	blood vessel development	BP	4.15E-24
GO:0001525	2.27E-26	58	436	angiogenesis	BP	5.77E-23
GO:0035295	1.39E-25	83	920	tube development	BP	3.03E-22
GO:0072359	2.83E-24	82	942	circulatory system development	BP	5.39E-21
GO:0048646	1.09E-23	81	940	anatomical structure formation involved in morphogenesis	BP	1.84E-20
GO:0022610	1.32E-22	87	1077	biological adhesion	BP	2.01E-19
GO:0006952	1.12E-20	79	1053	defense response	BP	1.55E-17
GO:0007155	1.60E-20	83	1066	cell adhesion	BP	2.03E-17
GO:0002376	4.17E-20	106	1791	immune system process	BP	4.89E-17
GO:0048731	9.69E-20	174	3793	system development	BP	1.05E-16
GO:0009653	7.60E-19	124	2260	anatomical structure morphogenesis	BP	7.72E-16
GO:0008283	3.94E-18	98	1649	cell proliferation	BP	3.75E-15
GO:0016477	4.22E-18	82	1175	cell migration	BP	3.78E-15
GO:0042127	9.07E-18	87	1367	regulation of cell proliferation	BP	7.56E-15
GO:0042221	9.43E-18	146	3099	response to chemical	BP	7.56E-15
GO:2000147	3.24E-17	48	464	positive regulation of cell motility	BP	2.47E-14

Tablo 6.10.2 Kalbe özgü NG-duyu nöronları için yapılan Gen Ontoloji Analizi sonuçları

category	over_represented_pvalue	numDEInCat	numInCat	term	ontology	padj_value
GO:0022610	1.18E-21	87	1077	biological adhesion	BP	1.78E-17
GO:0007155	2.34E-21	86	1066	cell adhesion	BP	1.78E-17
GO:0048731	6.66E-20	179	3793	system development	BP	2.80E-16
GO:0051239	7.35E-20	136	2490	regulation of multicellular organismal process	BP	2.80E-16
GO:0009653	2.79E-19	128	2260	anatomical structure morphogenesis	BP	8.51E-16
GO:0035239	1.74E-18	66	757	tube morphogenesis	BP	4.42E-15
GO:0048646	7.48E-18	73	940	anatomical structure formation involved in morphogenesis	BP	1.63E-14
GO:0007275	9.77E-18	187	4255	multicellular organism development	BP	1.86E-14
GO:0032502	3.88E-17	204	4937	developmental process	BP	6.32E-14
GO:0048869	4.15E-17	162	3489	cellular developmental process	BP	6.32E-14
GO:0030154	5.13E-17	156	3304	cell differentiation	BP	7.11E-14
GO:0016477	1.08E-16	81	1175	cell migration	BP	1.38E-13
GO:0048856	1.44E-16	194	4614	anatomical structure development	BP	1.68E-13
GO:0001525	2.17E-16	46	436	angiogenesis	BP	2.37E-13
GO:0032501	3.45E-16	224	5677	multicellular organismal process	BP	3.50E-13
GO:0035295	4.92E-16	69	920	tube development	BP	4.69E-13
GO:0048514	7.69E-16	50	525	blood vessel morphogenesis	BP	6.89E-13
GO:0001944	1.79E-15	55	633	vasculature development	BP	1.52E-12
GO:0072358	3.47E-15	55	644	cardiovascular system development	BP	2.65E-12
GO:0048870	3.65E-15	82	1279	cell motility	BP	2.65E-12
GO:0051674	3.65E-15	82	1279	localization of cell	BP	2.65E-12
GO:0072359	4.96E-15	68	942	circulatory system development	BP	3.43E-12
GO:0001568	1.90E-14	52	606	blood vessel development	BP	1.26E-11
GO:0002376	2.85E-14	96	1791	immune system process	BP	1.81E-11
GO:0098609	3.26E-14	50	563	cell-cell adhesion	BP	1.98E-11
GO:2000026	3.94E-14	96	1717	regulation of multicellular organismal development	BP	2.31E-11
GO:0048513	5.99E-14	127	2648	animal organ development	BP	3.38E-11
GO:0051240	7.11E-14	86	1466	positive regulation of multicellular organismal process	BP	3.87E-11
GO:0008283	7.77E-14	91	1649	cell proliferation	BP	4.08E-11
GO:0040011	8.73E-14	86	1458	locomotion	BP	4.43E-11
GO:0050793	1.30E-13	111	2191	regulation of developmental process	BP	6.37E-11
GO:0030155	1.77E-13	47	547	regulation of cell adhesion	BP	8.43E-11
GO:0006928	2.60E-13	91	1624	movement of cell or subcellular component	BP	1.20E-10
GO:0042127	6.02E-13	79	1367	regulation of cell proliferation	BP	2.70E-10

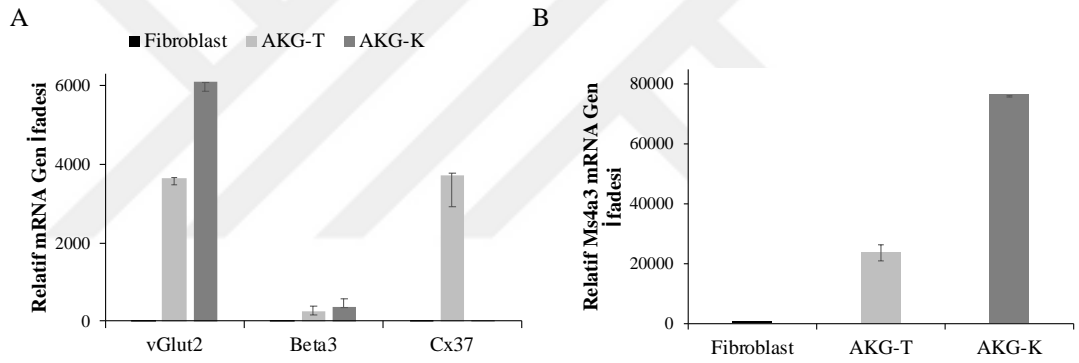
Alternatif bir yaklaşım olarak, kalbe özgü duyu nöronlarında yüksek ifade edilen genleri moleküler fonksiyonları ve dahil oldukları biyolojik işlemlere göre sınıflandırmak için R ortamında ClusterProfiler paketi kullanıldı. Gen Ontoloji terimleri üzerinden yapılan gruptandırmada yüksek ifade edilen genlerin genel olarak “Regulation of Metabolic Process” başlığı ile ifade edilen biyolojik fonksiyon ile ilişkili olduğu tespit edildi (Tablo 6.10.3; ör: Nlrp4c, Col7a1 genleri). Bu sonuçlar, metabolik reaksiyonları düzenlemede görev alan genlerin kalbe özgü duyu nöronlarının fonksiyonel olarak özelleşmesinde rolü olduğunu önermektedir.

Tablo 6.10.3 Kalbe özgü AKG-duyu nöronları için yapılan Gen Ontoloji sınıflandırma analizi sonuçları

GO:0055114	oxidation-reduction process	1
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	10
GO:0009056	catabolic process	1
GO:0009058	biosynthetic process	8
GO:0009892	negative regulation of metabolic process	2
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	1
GO:0019222	regulation of metabolic process	6

6.10.1. RNA-Dizileme Sonrası Aday Genlerin qRT-PCR ile Analizi

RNA-dizileme analizi sonucu kalbe özgü AKG nöronlarında heterojen popülasyona göre Ms4a3 gibi yüksek ifade edilen genler (Log_2 tabanlı kat değişimi >1.5) ile Cx37 gibi düşük ifade edilen genler (Log_2 tabanlı kat değişimi <-1.5) qRT-PCR ile teyit edildi (Şekil 6.10.9 A, B). Ayrıca, AKG-K örneklerinde AKG-T'a göre anlamlı bir farklılık olmayan vGlut2 ve Beta3 genleri de qRT-PCR ile incelendi (Şekil 6.10.9 A). Yapılan qRT-PCR reaksiyonu sonucu RNA-dizileme ile benzer şekilde Ms4a3 geninin AKG-K örneğinde AKG-T örneğine göre yüksek, Cx37 geninin ise düşük ifade edildiği, vGlut2 ve Beta3 genlerinin ise bir farklılık olmadığı tespit edildi (Şekil 6.10.9). Sonuç olarak, RNA dizi analizi analizinde incelenen örneklerin qRT-PCR cihazında da benzer sonuçlar vermesi RNA dizi analizi analizinde elde edilen gen profilinin güvenilirliğini göstermektedir.



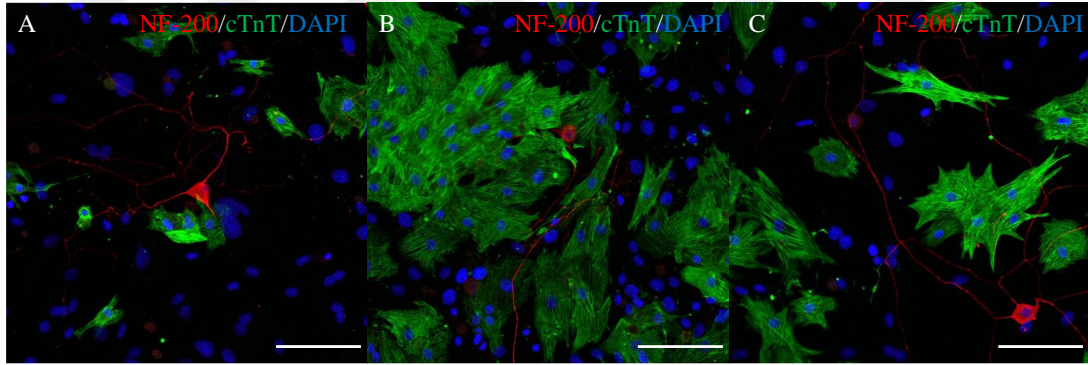
Şekil 6.10.9 RNA-dizileme analizi sonucu belirlenen aday genlerin qRT-PCR ile doğrulanması. (A) Ms4a3 (B) vGlut2, Beta3 ve Cx37 relatif mRNA gen ifade analizi.

6.11. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültür Koşullarının Optimizasyonu ve Proliferasyon ve Apoptoz Analizi

Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomiyosit kokültürlerinin oluşturulması amacıyla iki hücre tipini de uygun kültür koşulları optimize edilerek, sonraki aşamada hücrelerin birbirleri üzerindeki gen ifade değişimleri ile trofik etki ve apoptoz analizi gerçekleştirildi.

6.11.1. Kardiyomiyosit ve Heterojen Duyu Nöronlarının Kokültür Koşullarının Optimizasyonu

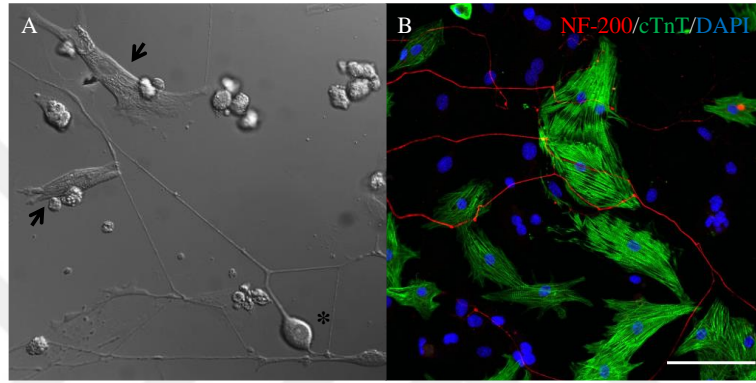
Kokültür ortamında kardiyomiyosit ve duyu nöronlarının canlılıklarını koruyabilmeleri ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için çeşitli hücre dışı matriks ve kültür besiyeri tipleri incelendi. Hücre dışı matriks için hücre kaplarının yüzeyleri fibronektin (Şekil 6.11.1 A), laminin (Şekil 6.11.1 B) veya laminin ve fibronektin karışımı (Şekil 6.11.1 C) ile kaplanarak, kardiyomiyosit ve AKG hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. Fibronektin üzerine ekilen kokültürlerde nöronların canlılıklarını korudukları ancak akson boylarının laminin ve laminin/fibronektin matrikslerindeki nöronlara göre kısa olduğu gözlemlendi (Şekil 6.11.1 A). Laminin (Şekil 6.11.1 B) veya laminin/fibronektin karışımı (Şekil 6.11.1 C) üzerine ekilen kokültürlerde kardiyomiyosit ve nöronların canlılıklarını korudukları, kardiyomiyositlerin kültür kaplarına yayıldığı ve nöronların aksonlarının fibronektin üzerine ekilen nöronlara göre daha fazla uzattığı gözlemlendi (Şekil 6.11.1). Bu nedenle, oluşturulacak olan nöron ve kardiyomiyosit kültürlerinde laminin ve fibronektin karışımı hücre dışı matriks olarak kullanmasına karar verildi.



Şekil 6.11.1 Çeşitli hücre dışı matrikslere ekilen primer kardiyomiyosit ve AKG nöron kokültürlerinin immünboyaması. (A) Fibronektin, (B) Laminin ve (C) Fibronektin ve Laminin karışımı ile kaplanan kültür kaplarındaki hücrelerin floresan görüntüsü. cTnT: yeşil, NF-200: kırmızı, DAPI: mavi, Ölçek barı: 100 μ m.

Çeşitli hücre dışı matrikslerin yanında, nöron ve kardiyomiyosit kokültürlerinde Tablo 5.4.1’de belirtilen RPMI, NBA ve Kardiyomiyosit besiyeri olarak adlandırılan besiyerleri kullanıldı. Kokültürde kullanılan NBA ve RPMI besiyerinde hücrelerin canlılıklarını korudukları ancak kardiyomiyosit atımlarının yavaş olduğu ve hücre kaplarına yayılmadıkları gözlemlendi. NBA ve RPMI besiyerine kıyasla kardiyomiyosit besiyerinde kardiyomiyositlerin atımlarının hızlı olduğu ve

yayıldıkları tespit edildi. Yapılan gözlemler ve analizler sonucunda, üç farklı kültür besiyerinden kardiyomyosit besiyerinin, hücre dışı matriks için ise laminin ve fibronektin karışımının kokültür çalışmalarımızda kullanılmasına karar verildi. Bu doğrultuda hazırlanan kokültürlerde, nöronların kardiyomyositlere doğru akson uzatarak bağlantı kurduğu ışık mikroskobu (Şekil 6.11.2 A) ve floresan mikroskobu altında (Şekil 6.11.2 B) gözlemlendi. Bu nedenle ilerleyen nöron ve kardiyomyosit kültür/kokültürlerinde besiyeri olarak Tablo 5.4.1'de içeriği belirtilen ve %2 B27 içeren kardiyomyosit besiyerinin kullanılmasına karar verildi.

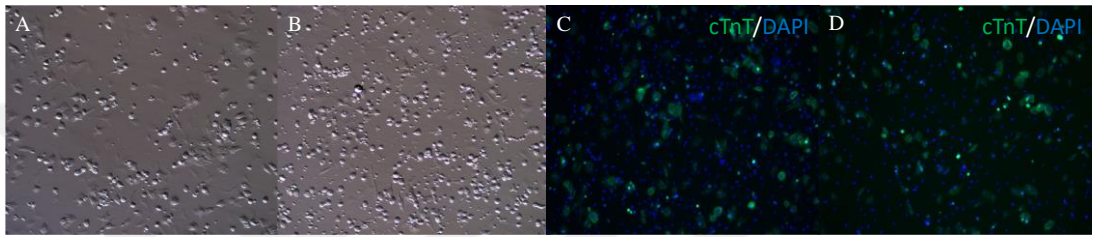


Şekil 6.11.2 Kardiyomyosit ve duyu nöron kokültürlerinin incelenmesi. (A) Kokültürün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. Oklar kardiyomyositi, * işareti AKG nöronlarını göstermektedir. (B) İmmünboyama sonrası kokültürlerin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. cTnT: yeşil, NF-200: kırmızı, ve DAPI: mavi, Ölçek çubuğu: 100 μ m.

6.11.2. Primer Kültürlerin Saflığını Korumaya Yönelik Çalışmalar

Duyu nöronları ile kardiyomyosit kokültürlerinin ileri günlerinde, glia ve fibroblast sayısının arttığı ve hücre kapladıklarına yayıldıkları için analizleri zorlaştırdığı tespit edildi. Bu nedenle, nöron ve kardiyomyosit saflaştırılmak için percoll gradyanı, TMRM ve AraC olmak üzere üç farklı kimyasal kokültürlere uygulanarak glia ve fibroblast sayısını en aza indiren ajan araştırıldı. Bunlardan ilki olan percoll gradyanında, %40.5 ve %58.5 olmak üzere iki farklı percoll tabakası hazırlanarak, kardiyomyosit hücre süspansiyonu üzerine eklendi. Santrifüj sonrası, altı farklı hücre tabakası elde edildi ve ayrı ayrı hücre kaplarına ekildi. Bir hafta boyunca ışık mikroskobu ile yapılan inceleme sonucunda, 1. ve 2. tabakalara ait kültürde fibroblast hücreleri, 3. tabakada az sayıda kardiyomyosit ve fibroblast, 4. ve 5. tabakalarda diğer tabakalara göre sayıca fazla kardiyomyosit (Şekil 6.11.3 A, B) ve

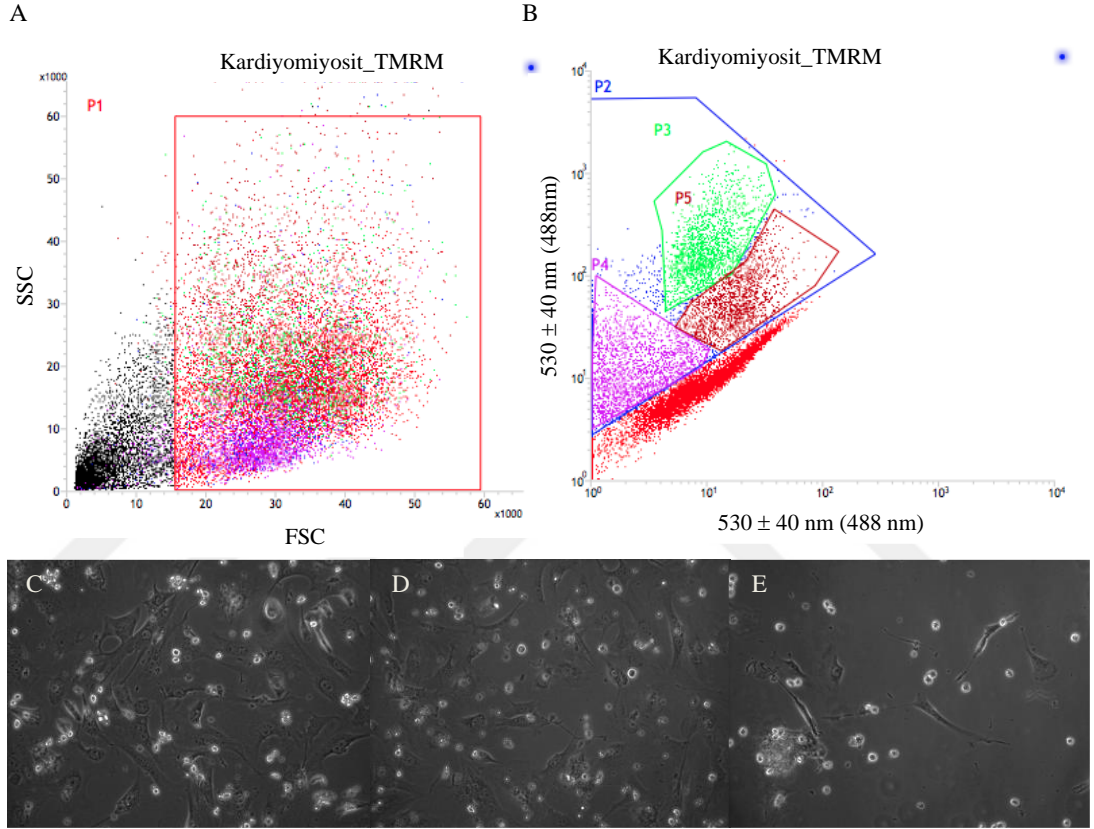
son tabaka olan 6.tabakada ölü hücre ve debri gözlemlendi. Kardiyomiyositçe zengin olarak tespit edilen 4. ve 5. tabakalara ait kültürle kardiyak troponin T ve çekirdek boyası (DAPI) ile immünboyama uygulanarak kardiyomiyosit saflığının belirlendi (Şekil 6.11.3 C, D). Yapılan hücre sayımı sonucunda, tabaka 4'e ait kültürün %46'sını kardiyomiyosit hücreleri oluştururken (Şekil 6.11.3 C), bu oran tabaka 5'te %47 olarak bulundu (Şekil 6.11.3 D). Literatüre kıyasla elde edilen kardiyomiyosit saflığının düşük olmasından dolayı, ilerleyen deneylerde percoll gradyan yöntemi kardiyomiyosit saflaştırma işleminde kullanılmadı (108).



Şekil 6.11.3 Percoll gradyanı sonucu elde edilen tabakaların ışık ve floresan mikroskobu ile incelenmesi. Percoll gradyanı sonucu elde edilen (A) tabaka 4'ün ışık ve (C) floresan görüntüsü. Percoll gradyanı sonucu elde edilen (B) tabaka 5'in ışık ve (D) floresan görüntüsü. cTnT: yeşil, DAPI: mavi, 10x.

Percoll gradyan yönteminin yanında, canlı hücre mitokondri boyası olan TMRM kardiyomiyosit hücrelerini fibroblast hücrelerinden ayırmak ve saflaştırmak amacıyla kullanıldı. Bu teknik, kardiyomiyosit hücrelerindeki mitokondri sayısının fibroblastlardan fazla olması ve buna bağlı olarak TMRM ile boyanan kardiyomiyositlerin fibroblastlara oranla daha şiddetli TMRM bağlı floresan yayması temeline dayanmaktadır (109). Bunun için, kardiyomiyosit izolasyonu sonrası elde edilen hücre süspansiyonu 10 nM TMRM ile boyandı ve fibroblastlardan ayrıştırılmak üzere FACS cihazına alındı (Şekil 6.11.4 A, B). FACS ile analiz edilen TMRM ile boyanmış hücrelerin yaydıkları floresan şiddetine göre üç farklı gruba ayrıştığı tespit edildi (Şekil 6.11.4 B). Buna göre TMRM boyaması yüksek olan kapı (P3) kardiyomiyosit, TMRM boyaması orta düzeyde olan kapı fibroblast ve diğer hücreler (P5), TMRM boyaması düşük olan kapı ise eritrosit ve ölü hücre olarak tanımlandı (P4) ve ekildi (Şekil 6.11.4 B) (109). FACS sonucu TMRM pozitif olarak ayrıştırılan hücreler, herhangi bir saflaştırma işleminden geçirilmeyen kardiyomiyosit hücre kültürü ile karşılaştırıldı (Şekil 6.11.4 C). Yapılan karşılaştırma sonucunda, TMRM ile boyanan ve floresan şiddeti düşük olan hücrelerin fibroblast benzeri oldukları tespit

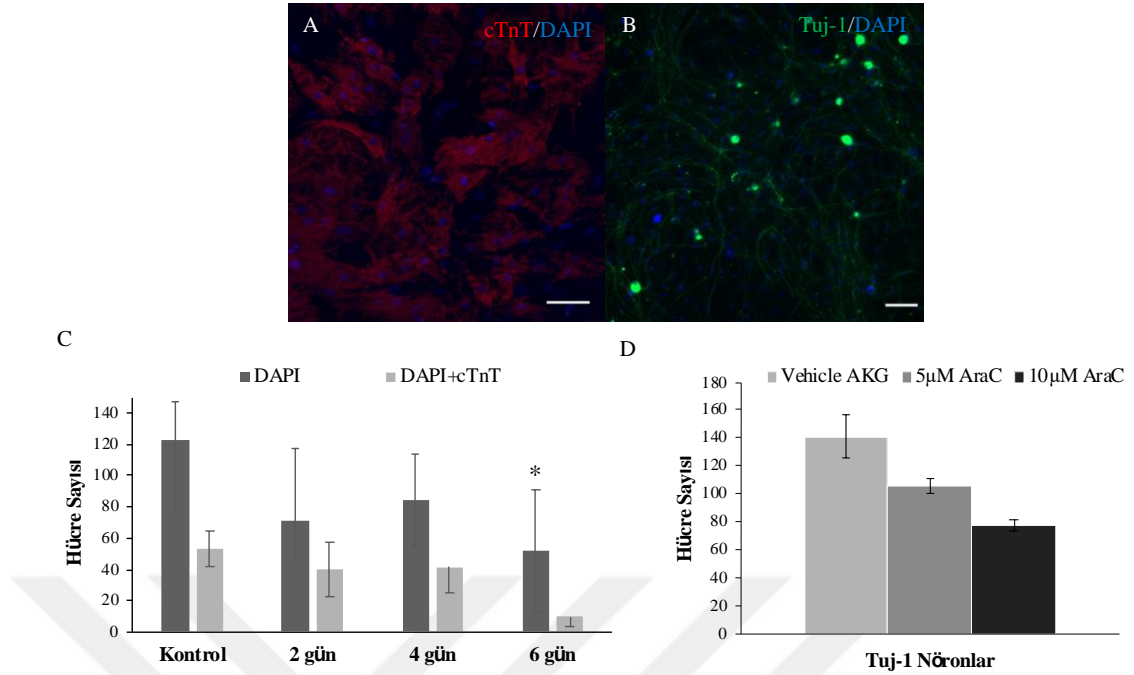
edildi (Şekil 6.11.4 D). TMRM floresan şiddeti diğer hücre gruplarından yüksek olan ve literatürde kardiyomiyositçe zengin olarak belirtilen grupta (Şekil 6.11.4 E) ise kontrole göre (Şekil 6.11.4 C) kardiyomiyosit hücre canlılığının düşük ve sayıca az olduğu gözlemlendi (109). TMRM boyama sonucu kardiyomiyositçe zengin hücre kültürü elde edilemediği için, çalışmanın ilerleyen deneylerinde TMRM boyası kardiyomiyosit saflaştırılma işleminde kullanılmadı.



Şekil 6.11.4 TMRM boyaması ile FACS-ayırıştırması yapılarak kardiyomiyosit saflaştırılması. FACS kapılama sırasında (A) TMRM boyaması sonucu yenidoğan kalp hücre popülasyonunun genel dağılımı, (B) TMRM boyamasının floresan şiddetine göre 3 farklı hücre grubunun ayrıştırılması. FACS sonrası hücrelerin ekimden 4 gün sonra (C) kontrol grubu, (D) TMRM-negatif hücreler ve (E) TMRM boyaması yüksek hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.

Kardiyomiyosit ve nöron kültürlerinde sırasıyla fibroblast ve glia sayısını en aza indirmek için percoll gradyanı ve TMRM boyasının yanında ayrıca hücre bölünmesini yavaşlatan veya tamamen durduran AraC adlı kimyasal kullanıldı (110,111). Antimitotik ajan olan AraC; percoll ve TMRM yöntemlerinden farklı olarak kardiyomiyosit kültürünün 2.günde kültür besiyerine eklenerek 2, 4 veya 6 gün

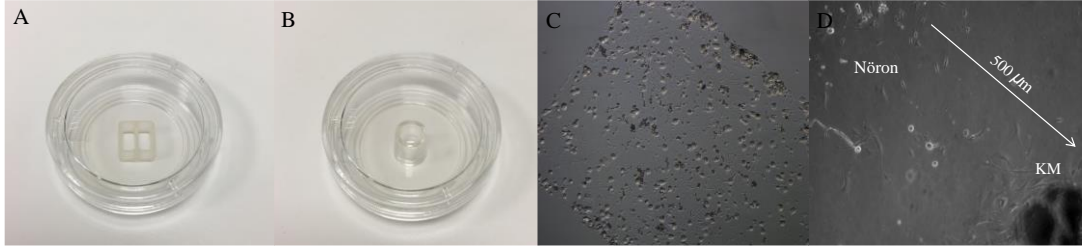
boyunca uygulandı. Alınan ışık mikroskobu görüntüleri ve yapılan immunositokimyasal analizler sonucunda, sadece AraC çözücüsü olan dH₂O eklenen kültürlerde kardiyomiyosit yüzdesi %43 iken, 2, 4 ve 6 günlük AraC uygulanan kardiyomiyosit kültüründe sırasıyla %56, %49 ve %19 kardiyomiyosit saflığına ulaşıldı (Şekil 6.11.5 A, C). 6 günlük AraC uygulamasından sonra kardiyomiyosit hücrelerinin canlılıklarını kaybettiği ve bu nedenle sayıca azaldığı, 2 veya 4 günlük AraC uygulamasında ise hücrelerin canlılıklarını korudukları gözlemlendi. Yapılan hücre sayımı sonuçlarına göre, kardiyomiyosit kültürlerinde fibroblast sayısını en aza indirmek için 2 günlük 10 µM AraC uygulaması uygun bulundu (Şekil 6.11.5 A, C). Kardiyomiyosit izolasyonu sırasında yaşanan fibroblast kontaminasyonuna benzer durum, duyu nöron izolasyonu ve kültüründe de fibroblast gibi bölünme özelliğine sahip glia hücre kontaminasyonu ile gözlemlendi. Zamanla kültür kaplarına yayılan ve analizleri zorlaştıran glia hücre sayısını en aza indirmek amacıyla, AKG nöron kültürlerine iki boyunca 5 µM ve 10 µM olmak üzere iki farklı AraC konsantrasyonu uygulandı (112,113). Benzer şekilde, AraC'nin çözücüsü olan steril dH₂O eklenen AKG kültürü kontrol olarak kullanıldı. AraC uygulama sonrası PFA ile fikslenen kültürler DAPI ve nörona özgü Tuj-1 ile floresan işaretleri kullanılarak boyandı (Şekil 6.11.5 B). Alınan floresan görüntüler sonucunda, kontrol grubuna kıyasla 5 µM AraC uygulanan kültür kaplarında (Şekil 6.11.5 B) aksonal dallanmanın yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol ve 5 µM AraC grubuna kıyasla 10 µM AraC uygulanan kültürlerde nöron canlılığının az olduğu ve istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte nöron sayısının az olduğu tespit edildi ($p>0.05$) (Şekil 6.11.5 D). Yapılan gözlemler ve kantitatif analizler sonucu, akson dallanması yüksek olan ve nöron sayısının kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmayan 5 µM AraC konsantrasyonunun ($p>0.05$) duyu sinir hücre kültürlerinde kullanılması uygun görüldü (Şekil 6.11.5 D). Kardiyomiyosit ve nöronlarda AraC uygulaması sonucunda elde edilen veriye dayanarak, iki hücre tipinin de bir arada ekildiği kokültürlerde ekimden 2 gün sonra 2 gün boyunca 5 µM AraC uygulanmasına karar verildi.



Şekil 6.11.5 İmmünboyama sonucunda farklı konsantrasyonlarda AraC uygulanan kardiyomiyosit ve AKG nöron kültürlerinin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü ve hücre sayısı. AraC uygulaması sonrası (A) Kardiyomiyosit, (B) AKG nöronlarının floresan görüntüsü. AraC uygulaması sonrası (C) Kardiyomiyosit kültürlerinde ve (D) AKG nöron kültürlerindeki hücre sayısının grafiksel gösterimi. cTnT: kırmızı, tuj1: yeşil, DAPI:mavi. Ölçek çubuğu: 100 µm. *p<0.05

Anatomik olarak duyu sinir hücreleri gangliyonlarda toplu halde birlikte bulunurken, aksonları aracılığıyla kalp ve diğer organlara erişim ve etkileşim halindedir. Bu nedenle, birbirinden ayrı bölgelere konumlanmış duyu sinir ve kalp hücrelerini laboratuvar ortamında daha iyi modelleyebilmek amacıyla iki bölmeli hücre kültürü aparatı olan ibidi insert (Şekil 6.11.6 A) ve klonlama halkaları kullanıldı (Şekil 6.11.6 B). İbidi 2 insert aparatında nöronların canlılıklarını korudukları, akson uzattıkları ve birbirleriyle bağlantı kurdukları gözlemlendi (Şekil 6.11.6 C). Klonlama halkasına ayrı ayrı ekilen nöron ve kardiyomiyositlerin yayılım gösterdiği ve nöronların kardiyomiyositlere akson uzatarak bağlantı kurduğu gözlemlendi (Şekil 6.11.6 D). Ancak, kullanılan bölmelerin çıkarılırken hücreleri de beraberinde kaldırdığı ve iki hücre grubu arasındaki alanda glia veya fibroblastların çoğalması ile aksonların uzamasını engellediği gözlemlendi (Şekil 6.11.6 D). Bu olumsuz sonuçlardan dolayı, ilerleyen deneylerde hücreler birbirinden ayrılmadan kardiyomiyosit ve duyu nöronları heterojen dağılımda ekilerek kokültürler oluşturuldu

ve analizler için kullanıldı.

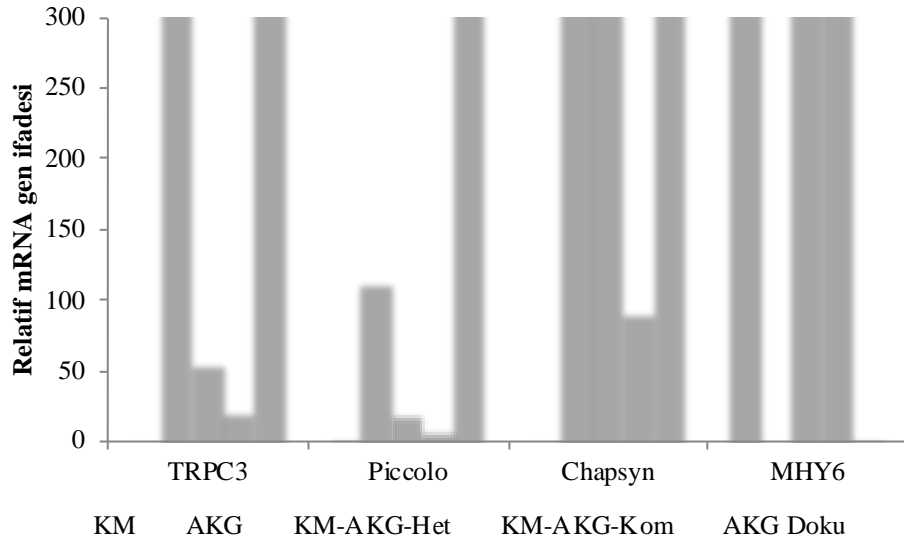


Şekil 6.11.6 Kokültür çalışmaları için kullanılan bölmeler ve bu bölmelere ekilen hücrelerin ışık mikroskobu görüntüsü.

(A) İbidi firmasına ait 2 bölmeli kültür aparatı ve (B) klonlamada halkası. (C) İbidi aparatına ekilen AKG duyu nöronları, (D) klonlama halkasına ekilen nöronlar ile kardiyomiyosit kokültürünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsünün incelenmesi. KM: Kardiyomiyosit, ok: nöron ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki mesafeyi göstermektedir (500 μm), 10X.

6.11.3. Primer Kardiyomiyosit, Kalbe Özgü Duyu Nöronları ve Kokültürlerde Gen Ekspresyon Analizi

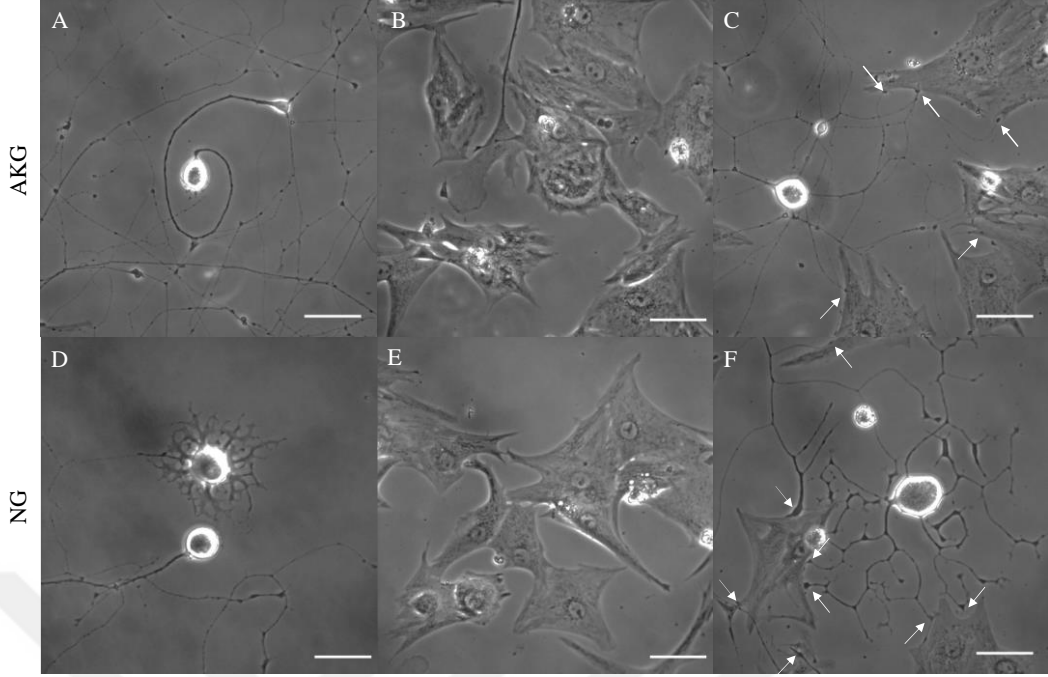
Aynı hücre kaplarına birbirinden izole (kompartmant) veya heterojen halde ekilen kardiyomiyosit ve AKG nöronlarına ait kokültürde gen ekspresyon farklılıklarını ortaya koymak ve uygun kokültür koşulunu belirlemek amacıyla qRT-PCR cihazı kullanıldı. Bu amaçla, kardiyomiyosit ve AKG nöron kültürlerinin ve heterojen veya bölmelere ekilerek oluşturulan kokültürüne ait RNA örnekleri ile Tablo 5.11.4'te belirtilen mekanik uyarıyı algılayan TRPC3 kanalı, pre-sinaptik bağlantı proteini Piccolo, sinaptik protein Chapsyn ve kardiyomiyositlere özgü iskelet proteini olan Mhy6 genlerini tanıyan primerler kullanılarak qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda heterojen kokültürlerde, bölmelere ekilerek oluşturulan kokültürlere göre TRPC3, Piccolo ve Chapsyn mRNA düzeylerinin artış olduğu tespit edildi (Şekil 6.11.7). Bu nedenle, kardiyomiyosit ve nöron kokültürleri hücreleri birbirinden ayırmadan heterojen olarak ekimine karar verildi.



Şekil 6.11.7 Kardiyomiyosit ve AKG nöronlarının tekli kültürleri, heterojen ve bölmelere ekilen kokültürleri ile AKG dokusundaki TRPC3, piccolo, chapsyn ve MHY6 genlerinin RT-qPCR ile gen ekspresyon incelenmesi. KM: kardiyomiyosit, Het: heterojen kokültür, kom: bölmeler kullanılarak oluşturulan kokültür.

6.12. Primer Kardiyomiyosit ve Kalbe Özgü Duyu Nöron Kokültürlerinde Morfoloji, İmmunofloresans ve Canlılık Analizi

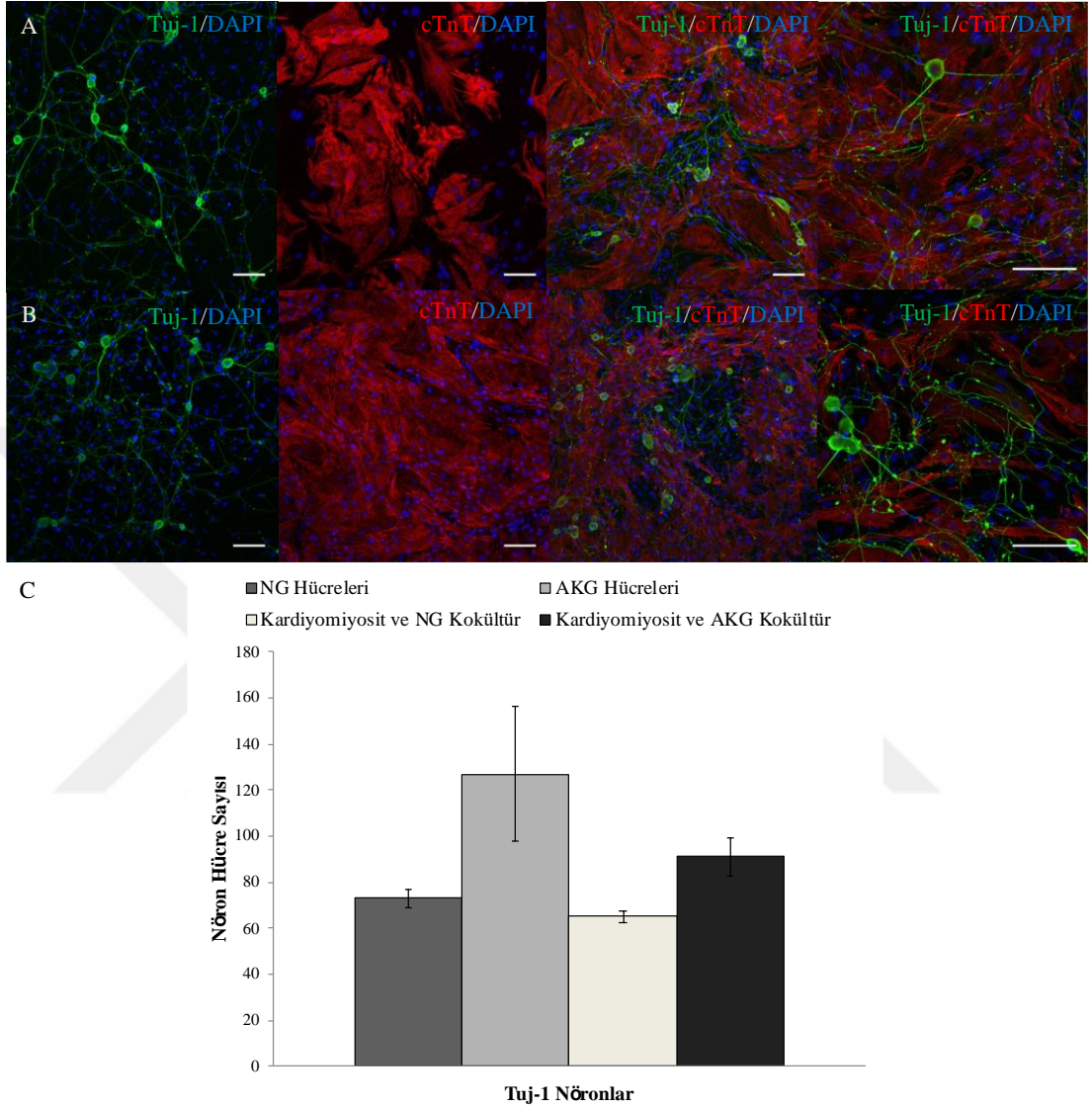
Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomiyosit hücrelerinin birbiri üzerindeki olası trofik veya apoptotik etkilerini incelemek amacıyla nöron, kardiyomiyosit kültürleri ile iki hücre birlikte ekilerek kokültürleri oluşturuldu. Tek hücre tipinin olduğu kültürlerin ve kokültürlerin takibi öncelikle ışık mikroskobu altında gerçekleştirildi. FACS ile ayrıştırılan kalbe özgü AKG ve NG duyu nöronlarının kültür ortamında canlılıklarını korudukları ve akson uzattıkları gözlemlendi (Şekil 6.12.1 A, D). Benzer şekilde, kalbe özgü AKG veya NG duyu nöronları ve kardiyomiyositler kokültürlerinde sinir hücrelerinin kardiyomiyositlere akson uzattıkları gözlemlendi (Şekil 6.12.1 C, F). Kardiyak aferentlerin saflaştırma işlemi sonrası canlılıklarını korudukları ve kokültür koşullarında akson uzatarak kardiyomiyosit hücreleri ile fiziksel bağlantı kurdukları tespit edildi.



Şekil 6.12.1 Kalbe özgü duyu sinir hücreleri ile kardiyomiyosit kokültürlerinin ışık mikroskobu ile incelenmesi. (A) Kalbe özgü AKG hücreleri, (B) yenidoğan kardiyomiyosit hücreleri ve (C) kokültürleri. (D) Kalbe özgü NG hücreleri, (E) yenidoğan kardiyomiyosit ve (F) kokültürleri. Oklar: nöronların kardiyomiyositlerle bağlantı kurduğu yeri gösteriyor, Ölçek çubuğu: 10 μm .

Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomiyosit kokültürleri hücrelerinin ışık alan görüntüleri ile incelenmesinden sonra, birbiri üzerindeki olası trofik veya apoptotik etkileri araştırıldı. Bu amaçla, tek başına ekilen kalbe özgü duyu nöron veya kardiyomiyosit kültürü ve ikisi hücre tipinin bir arada bulunduğu kokültürler kardiyomiyosite ve nörona özgü protein işaretleyicileri olan kardiyak troponin (cTnT) ve Tuj-1 antikorları kullanılarak immünboyaması gerçekleştirildi (Şekil 6.12.2). Konfokal mikroskobu ile alınan florsan görüntülerden Tuj-1 işaretli nöron hücreleri sayılarak, gruplar karşılaştırıldı. Hücre sayımı sonucunda, tek başına veya kardiyomiyosit ile olan kokültürlerdeki Tuj-1 işaretli nöron sayısının istatistiksel olarak birbirlerinden farklı olmadıkları tespit edildi (Şekil 6.12.2). Kokültürlerden alınan yüksek magnifikasyonlu görüntülerde ise NG (Şekil 6.12.2 A) veya AKG kökenli kalbe özgü duyu nöronlarının (Şekil 6.12.2 B) kardiyomiyositler ile fiziksel bağlantı kurdukları tespit edildi. Tek başına veya kardiyomiyosit hücreleri ile ekilen duyu nöronlarının sayıca benzerliği, kardiyomiyosit hücrelerinin kültür ortamında canlılık bakımından sinir hücrelerini etkisi olmadığını göstermektedir (Şekil 6.12.2 C). Literatürde, vagus sinirin kalp kası hücreleri üzerindeki rejeneratif etkisi gösterilmiş

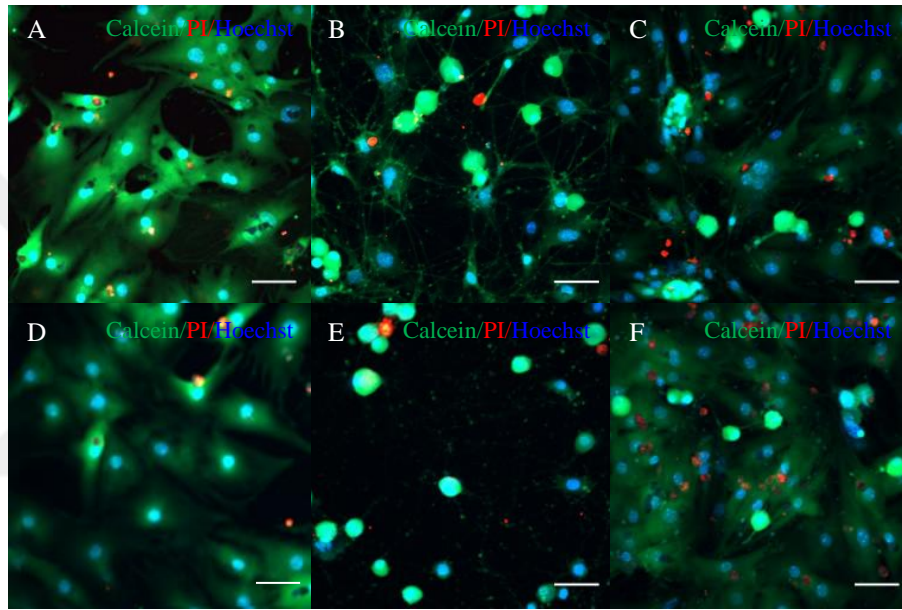
olup, cTnT pozitif hücreler sayılarak kültür ortamında nöronların kardiyomiyosit hücreleri üzerindeki olası trofik etkisi araştırılabilir (50).



Şekil 6.12.2 Kalbe özgü duyu sinir hücreleri ile kardiyomiyosit kokültürlerinin immünohistokimyasal incelemesi ve hücre sayımı. (A) Kalbe özgü NG hücreleri, yenidoğan kardiyomiyosit hücreleri ve kokültürleri. (B) Kalbe özgü AKG hücreleri, yenidoğan kardiyomiyosit hücreleri ve kokültürleri. (C) Tek veya kardiyomiyosit ile birlikte kültüre edilen nöronların Tuj-1 boyaması ile hücre sayımını gösteren grafik. Tuj1: yeşil, cTnT: kırmızı ve DAPI: mavi. Ölçek çubuğu: 100 μ m.

Kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositlerin kültür ortamında birbirleri üzerindeki olası trofik veya apoptotik etkilerini incelemek amacıyla immünboyanın yanında canlı hücre boyaları olan calcein, ölü hücreleri işaretleyen propidium iodide (PI) ve çekirdek boyası hoechst kullanıldı (Şekil 6.12.3). Ayrıca, saflaştırılmayan total

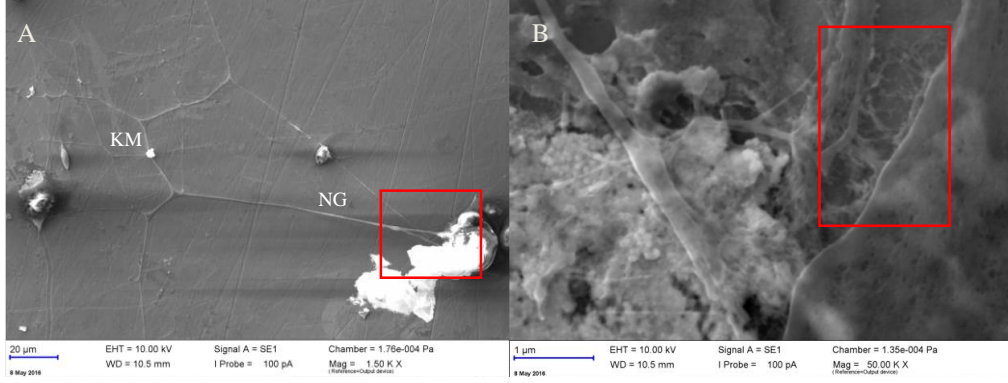
popülasyona sahip AKG nöronları (Şekil 6.12.3 B) ile kardiyomiyositlerin kokültürlerinde de (Şekil 6.12.3 C) calcein/PI/hoescht uygulanarak hücre sayımı yapıldı. Yapılan analizler sonucu kalbe özgü duyu nöronların tek başına (Şekil 6.12.3 E) ve kokültürlerdeki (Şekil 6.12.3 F) hücre sayısının istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadıkları tespit edildi ($p>0.05$). Benzer sonuç tek başına veya kokültürdeki total duyu sinir hücre sayımından da elde edildi ($p>0.05$). Duyu nöronlarının kalbe özgü veya total duyu nöronlarının bulunduğu kokültürden benzer sonuç elde edilmesi hücre popülasyon farklılığının herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



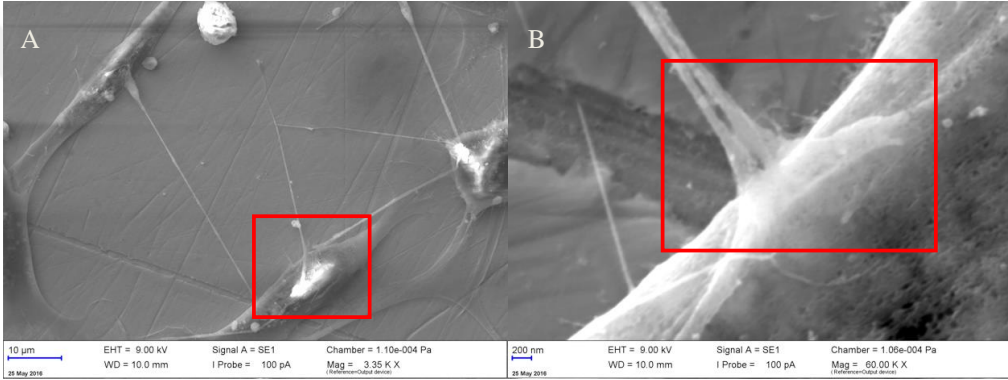
Şekil 6.12.3 Tek başına ve kokültür ortamındaki AKG nöron ve kardiyomiyosit hücrelerinde calcein, PI ve Hoechst boyaması. (A, D) Kardiyomiyosit (B) Total AKG nöronları, (C) Total AKG ve Kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü. (E) Kalbe özgü AKG nöronlar ile (F) kardiyomiyosit kokültürlerinin floresan görüntüsü. Calcein: yeşil, PI: kırmızı, Hoechst: mavi. Ölçek çubuğu: 50 μm .

6.13. Primer Kardiyomiyosit ve Duyu Nöron Kokültürlerinin Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

Duyu nöronları ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki bağlantıyı incelemek amacıyla heterojen AKG veya NG duyu nöronları ile kardiyomiyositler titanyum plaklara ekilmiştir. Yapılan elektron mikroskobu görüntülerinde kardiyomiyosit hücreleri ile AKG (Şekil 6.13.1) veya NG hücreleri arasında fiziksel bir bağlantının olduğu tespit edildi (Şekil 6.13.2).



Şekil 6.13.1 Titanyum plak üzerine yerleştirilen NG nöronları ile kardiyomiyosit ait kokültürlerin EM ile incelenmesi. (A) Bağlantı kurmuş kardiyomiyosit ve nöronların 1.50 KX ve (B) 50.00 KX görüntüsü. Kardiyomiyosit ve nöronlar arasındaki bağlantı kırmızı dikdörtgen ile gösterilmiştir. KM: kardiyomiyosit.



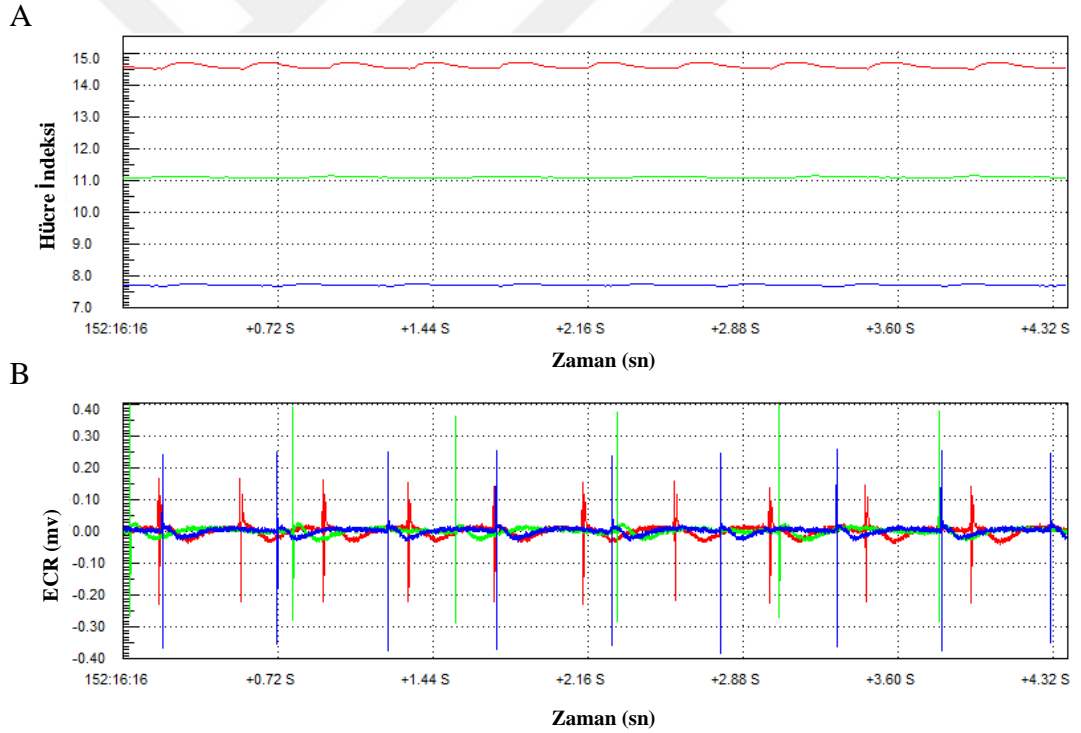
Şekil 6.13.2 Titanyum plak üzerine yerleştirilen AKG nöronları ile kardiyomiyosit ait kokültürlerin EM ile incelenmesi. (A) Bağlantı kurmuş kardiyomiyosit ve nöronların 3.35 KX ve (B) 60.00 KX görüntüsü. Kardiyomiyosit ve nöronlar arasındaki bağlantı kırmızı dikdörtgen ile gösterilmiştir. KM: kardiyomiyosit

6.14. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Elektrofizyolojik ve Optogenetik İncelenmesi, Ca^{+2} Görüntülenmesi

Kalbe özgü duyu nöronlarının kardiyomiyosit ile olan kokültürlerinde hücreler arası elektrofizyolojik iletişim Xcelligence RTCA Cardio-ECR cihazı, Ca^{+2} görüntüleme ve optogenetik araçlar kullanılarak incelendi.

6.14.1. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Elektrofizyolojik İncelenmesi

Xcelligence RTCA Cardio-ECR sahip olduğu alan potansiyel elektrotları ile hücrelerin elektriksel özellikleri hakkında bilgi verirken, empedans elektrotları kardiyomiyositlerin kasılıp gevşeme grafiğini oluşturmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı ve REMER bünyesinde bulunan Xcelligence RTCA Cardio-ECR cihazı, kardiyomiyosit ve duyu sinir hücreleri arasındaki elektriksel iletişimi incelemek amacıyla kullanıldı. Elektrofizyolojik kayıt için, cihazın 48 kuyucuklu hücre plaklarına total veya kalbe özgü AKG nöronları kardiyomiyositler ile birlikte ekilerek, hücrelerden alan potansiyel ve empedans verileri ölçüldü. Elektrotlar aracılığı ile hücrelerden farklı zamanlarda kaydedilen atım sayısı, alan potansiyel süresi ve alan potansiyel genlikleri değerlendirilerek, karşılaştırıldı (Şekil 6.14.1, Tablo 6.14.1).



Şekil 6.14.1 Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomiyosit kokültürlerinin ECR Analizi. (A) Atım sayısının karşılaştırılması, (B) Alan potansiyel karşılaştırması.

Yapılan analizler sonucunda, kardiyomiyositlerin tek başına veya heterojen/kalbe özgü AKG duyu nöronları ile olan kokültürleri arasında farklı zamanlarda kaydedilen atım genliği değerlerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Tablo 6.14.1). Diğer taraftan oluşturulan kültürler arasında zamana bağlı atım hızı ve süresinde anlamlı

farklılık tespit edilmesine rağmen ($p<0.05$), kuyucuklar arası varyasyonun geniş olmasından dolayı Xcelligence RTCA Cardio-ECR cihazı ilerleyen deneylerde kullanılmadı (Tablo 6.14.2, Tablo 6.14.3).

Tablo 6.14.1 ECR cihazı ile alınan KM ve AKG-K hücrelerine ait atım genliği değerleri.

Atım Genliği (mV)			
	KM	KM ve AKG-K	KM ve AKG-H
1.kayıt	0.48 ± 0.09	0.48 ± 0.07	0.38 ± 0.04
2. kayıt	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.05	0.17 ± 0.04
3.kayıt	0.56 ± 0.11	0.15 ± 0.09	0.46 ± 0.24

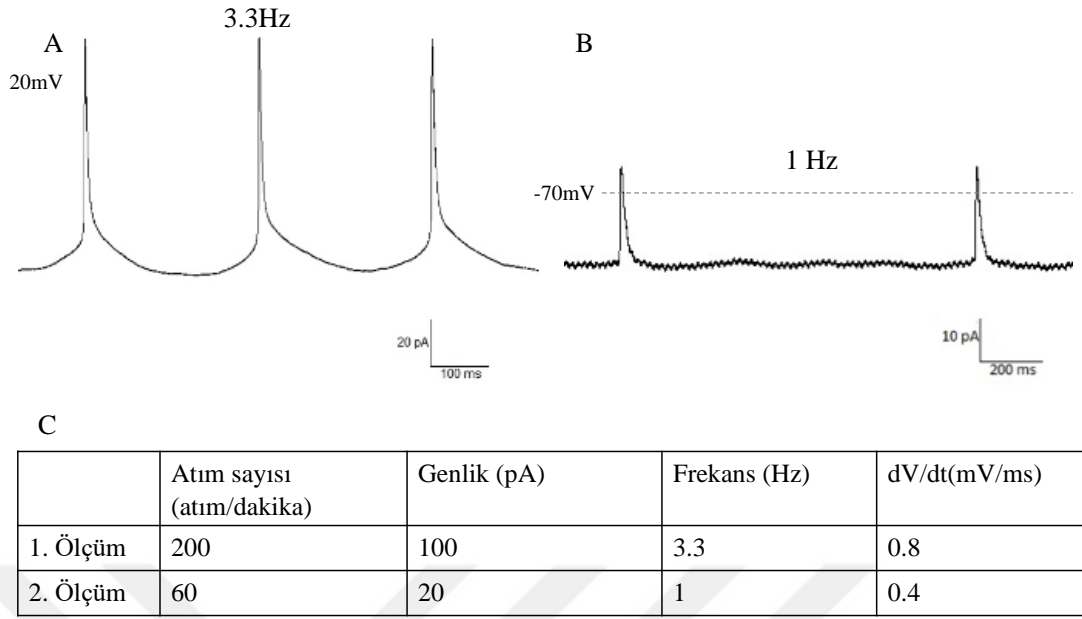
Tablo 6.14.2 ECR cihazı ile alınan KM ve AKG-K hücrelerine ait atım hızı değerleri. a: KM ye göre, b: KM ve AKG-K kokültürüne göre ve c: KM ve AKG-H kültürüne göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$).

Dakikada Atım Sayısı			
	KM	KM ve AKG-K	KM ve AKG-H
1.kayıt	67.6 ± 10.65	68.06 ± 6.99 ^c	79.13 ± 3.69 ^b
2. kayıt	182.06 ± 7.35 ^b	174.95 ± 2.42 ^a	163.05 ± 10.32
3.kayıt	85.18 ± 2.67	66.79 ± 18.97	102 ± 83.95

Tablo 6.14.3 ECR cihazı ile alınan KM ve AKG-K hücrelerine ait atım süresi değerleri. a: KM ye göre, b: KM ve AKG-K kokültürüne göre ve c: KM ve AKG-H kültürüne göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$).

Atım Süresi (ms)			
	KM	KM ve AKG-K	KM ve AKG-H
1.kayıt	730.56 ± 148.45	722.18 ± 34.47 ^c	56.32 ± 27.11 ^b
2. kayıt	194.87 ± 12.97 ^b	823.58 ± 37.35 ^a	227.54 ± 23.15
3.kayıt	521.97 ± 17.64	706.36 ± 82.67	641.21 ± 355.47

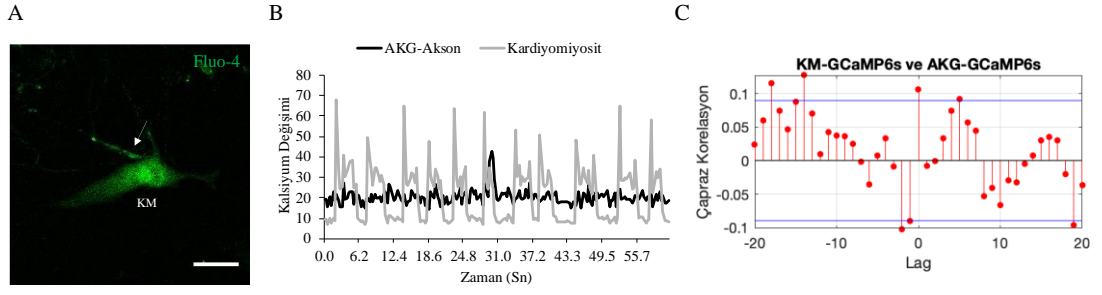
Xcelligence RTCA Cardio-ECR cihazına ek olarak hücreler arası elektriksel iletişimi incelemek amacıyla yama kıskacı metodu kullanıldı. Primer yenidoğan fare kardiyomiyosit hücrelerinden alınan akım kıskacı kayıtlarında voltaj değişim sinysali kaydedildi (Şekil 6.14.2 A-B). Ancak, yenidoğan kardiyomiyositin hücre zarının kırılğan yapısından ve yama kıskacındaki teknik zorluklardan dolayı ilerleyen çalışmalarda hücrelerden kayıt alınamadı. Bu nedenle, ilerleyen deneylerde kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişimi araştırmak için Xcelligence RTCA Cardio-ECR ve yama kıskacı metodu kullanılmadı.



Şekil 6.14.2 Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomiyosit kokültürlerinin ECR Analizi. (A-B) Aksiyon potansiyel ölçümü ve (C) Parametreleri.

6.14.2. Kalbe Özgü Duyu Nöronu ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Ca^{+2} Görüntüleme ve Optogenetik Uygulamanın Optimizasyonu

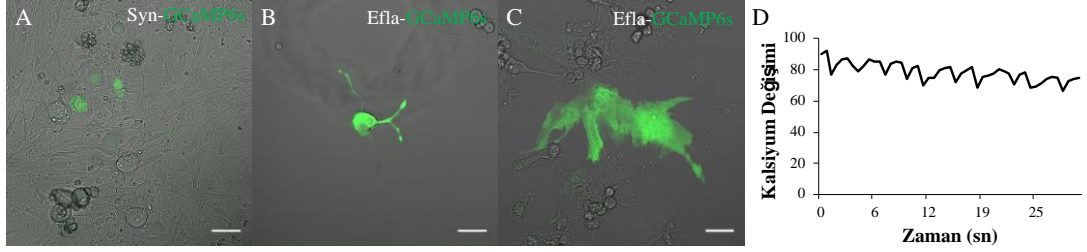
Bir voltaj boyası olan Di-8-ANEPPQ'nun *in vitro* voltaj duyarlılığının gerçek zamanlı olarak görüntülenememesi ve analizden sonra tespit edilememesinden dolayı, hücrelerdeki aktiviteyi incelemek amacıyla hücre içi Ca^{+2} değişimine bağlı anlık artan azalan floresan şiddeti gösteren Fluo-4 boyası kullanıldı. Öncül deneylerde, kardiyomiyosit ve total AKG duyu nöronlarının 5 μ M Fluo-4 ile boyandığı gözlemlendi (Şekil 6.14.3 A). Fluo-4 boyaması sonrası spinning disk konfokal mikroskobu ile alınan floresan görüntülerde ve analizinde, sitoplazmik Ca^{+2} değişimine bağlı Fluo-4'a ait floresan artışı veya azalışı gerçek zamanlı olarak tespit edildi (Şekil 6.14.3 A, B). Ancak, incelenen kardiyomiyosit ve duyu nöronlarından hücreler arası Ca^{+2} iyonuna bağlı değişim sinyalleri arasında korelasyon tespit edilmedi (korelasyon katsayısı <0.5 , Şekil 6.14.3 C). Fluo-4 ile boyalı hücrelerde floresan değişiminin gerçek zamanlı gözlenebilmesi, elektriksel aktif olan kardiyomiyosit ve nöron hücrelerinin deney sırasında belirlenebilmesini sağladı.



Şekil 6.14.3 Kokültürdeki total AKG nöronları ve kardiyomiyosit hücrelerine ait Ca^{+2} değişim analizi. (A) Fluo-4 işaretli total AKG nöronları ile kardiyomiyosit hücrelerinin floresan görüntüsü ve (B) oluşturdukları Ca^{+2} değişim ve (C) bu değişime bağlı korelasyonu gösteren grafik. Ok: nörona ait akson, KM: kardiyomiyosit, Fluo-4: yeşil, ölçek çubuğu: $50 \mu m$.

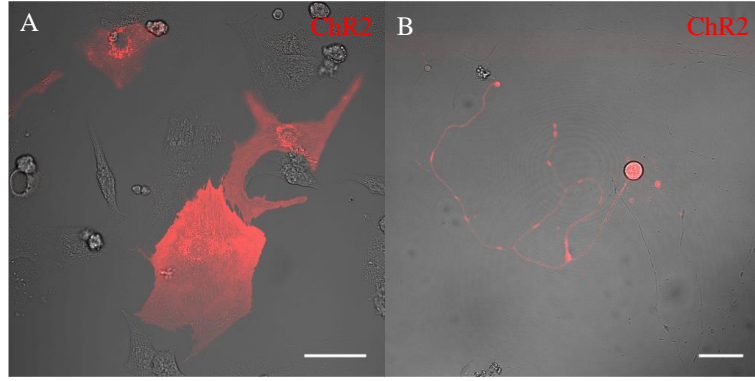
Hücre içi Ca^{+2} değişiminin Fluo-4 kullanılarak uzun süreli takibinde boyanın solması ve hücreden atılması nedeniyle, ilerleyen deneylerde hücreye entegre olan, hücreler tarafından üretilen ve uzun süreli floresan görüntülemeye olanak tanıyan bir GCaMP6s Ca^{+2} işaretleyici kullanıldı. Nöron ve kardiyomiyositlerde GCaMP6s üretimini sağlamak amacıyla nörona özgü sinapsin (synapsin) ve genel hücre elongasyon faktör1 (Efla) olmak üzere iki farklı başlatıcı (promoter) içeren AAV virüsü kullanıldı. İçerdiği farklı başlatıcı bölge ile hücre seçiciliğini sağlamasının yanında, yeşil floresan protein (GFP) bölgesi taşıyan vektör floresan mikroskobu altında GCaMP6s üreten hücrelerin takibine olanak sağladı (Şekil 6.14.4 A-C). AKG kültürlerinin sinapsin veya Efla başlatıcısına sahip iki virüs tipi ile muamelesinin sonucunda, yeşil floresana sahip nöronların varlığı gözlemlendi ve AKG nöronlarının her iki tip başlatıcı ile enfekte olarak GCaMP6s ürettiği tespit edildi (Şekil 6.14.4 A-B). Ancak, sinapsin başlatıcı bölgesine sahip virüs ile enfekte olan nöronlara kıyasla (Şekil 6.14.4 A), AAV-Efla-GCaMP6s vektörü ile enfekte olan nöronların (Şekil 6.14.4 B) daha kısa sürede GCaMP6s ürettiği ve daha şiddetli floresana sahip oldukları gözlemlendi. Kardiyomiyosit kültürlerinde ise AAV-Efla-GCaMP6s uygulaması sonrası yeşil floresana sahip hücreler gözlemlenirken, bu virüsün başarılı bir şekilde kardiyomiyositleri enfekte ettiği sonucuna varıldı (Şekil 6.14.4 C). Ayrıca, spontan atıma sahip ve GCaMP6s üreten kardiyomiyositlerin Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan değişimi gerçek zamanlı ve analizler sonucu tespit edildi (Şekil 6.14.4 D). Farklı iki tip başlatıcıya sahip virüs vektörleri ile nöron ve kardiyomiyositlerde GCaMP6s üretiminin sağlanması ve görüntüleme sırasında ve analiz sonrasında Ca^{+2} değişiminin

takip edilebilmesi nedeniyle, hücreler arası elektriksel aktivitenin incelenmesinde Fluo-4 yerine GCaMP6s Ca^{+2} işaretleyici kullanıldı.



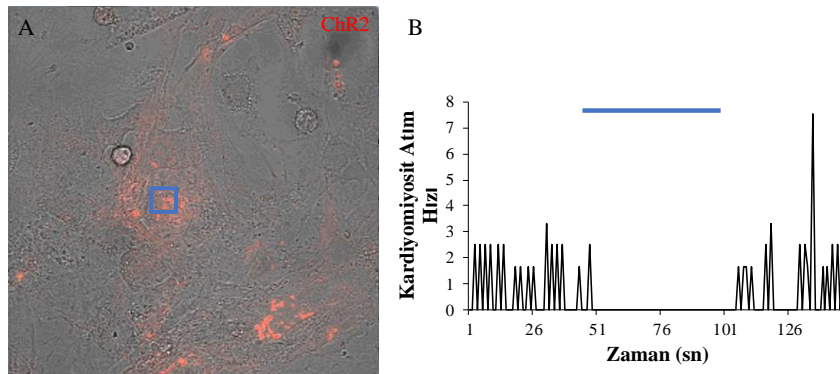
Şekil 6.14.4 AKG nöronlarında ve kardiyomiyositlerde GCaMP6s üretiminin takibi. (A) AKG nöronlarının sinapsin başlatıcısına sahip GCaMP6s ve (B) Efla başlatıcısını içeren vektör ile GCaMPs üretimini sonucunda floresan görüntüsü. (C) Efla başlatıcısını içeren virüs ile enfekte olan ve GcaM6s üreten kardiyomiyosit hücrelerinin floresan görüntüsü ve (D) spontan atım sonucu bu hücrelerde Ca^{+2} değişimini gösteren grafik. GCaMP6s: yeşil, ölçek çubuğu: 50 μm .

Ca^{+2} görüntüleme tekniğinin yanında, kokültürlerde hücreler arası elektriksel iletişimi incelenmek amacıyla bir optogenetik araç olan kanalrodopsin2 (ChR2) proteini kullanıldı. ChR2 kanal proteini mavi ışık ile uyarımı sonucunda kanal açılarak, hücre içine Na^{+} veya Ca^{+2} girişi gerçekleşir ve hücre depolarize olur. Bu teknik kullanılarak, ChR2 üreten hedef kardiyomiyositlerin ışık ile uyarılması, hücrelerde zamana bağlı elektriksel kontrolü sağlanması ve bağlantılı olabilecek kardiyomiyosit ve nöron arasındaki elektriksel iletişimin incelenmesi amaçlanmaktadır. Hem AKG nöronunda hem de kardiyomiyositlerde ChR2 proteinin üretimini sağlamak amacıyla CAG başlatıcısı içeren AAV kullanıldı. CAG-ChR2-tdtomato virüsünün kültüre uygulanması sonucunda, kırmızı floresana sahip kardiyomiyosit (Şekil 6.14.5 A) ve nöronlar gözlemlenerek (Şekil 6.14.5 B), hücrelerin ChR2 kanal proteinlerini ürettiği tespit edildi.



Şekil 6.14.5 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve AKG nöronlarının floresan görüntüsü. ChR2 üreten (A) kardiyomiyosit ve (B) AKG nöronlarının floresan mikroskobu altındaki görüntüsü. ChR2: kırmızı, ölçek çubuğu: 50 μm .

Belirli sayıda nöron veya kardiyomiyositlerin ChR2 üretebilmesi için uygun virüs partikül miktarı belirlendikten sonra, ChR2 proteini fonksiyonel olarak test edildi. Bu amaçla, ChR2 üreten spontan kasılıp gevşeyen kardiyomiyositler konfokal mikroskobunda bulunan soldurma (bleaching) modülü kullanılarak 488 nm lazer ile uyarıldı ve dakikadaki atım değerleri Motion Tracking arayüzü kullanılarak analiz edildi. Alınan görüntüler ve analizler sonucunda, ChR2 üreten kardiyomiyositlerin (Şekil 6.14.6 A) sürekli mavi ışık uyarımı boyunca spontan atımlarının durduğu ve uyarımın sonlanması ile hücrelerin kasılıp gevşemeye devam ettiği tespit edildi (Şekil 6.14.6 B). İncelemeler sonucunda, virüs ile hücrelerde ChR2 üretiminin sağlandığı ve hedeflenen hücrelerin ışık uyarımı sonucu elektriksel aktivitesinin değiştiği tespit edilmiş olup, optogenetik yönteminin nöron ve kardiyomiyosit arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla kullanılabileceğine karar verildi.

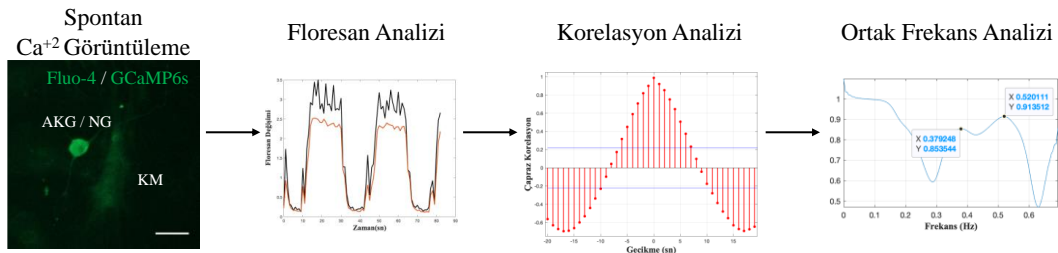


Şekil 6.14.6 ChR2 üreten primer yenidoğan kardiyomiyosit hücrelerinin elektriksel kontrolü. (A) Konfokal mikroskobuna ait soldurma (bleaching) uygulaması ile ChR2 üreten kardiyomiyositlerde alan seçimi ve seçilen bölgeye ışık gönderimi (mavi kare). (B) Seçilen ChR2 üreten kardiyomiyositin spontan aktivitesi ve

sürekli verilen 488 nm lazer uyarımı (mavi çizgi) sonucu atım hızı değişimini gösteren grafik. ChR2: kırmızı, 40X

6.14.3. Kalbe Özgü Duyu Nöron ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Spontan Ca^{+2} Görüntüleme

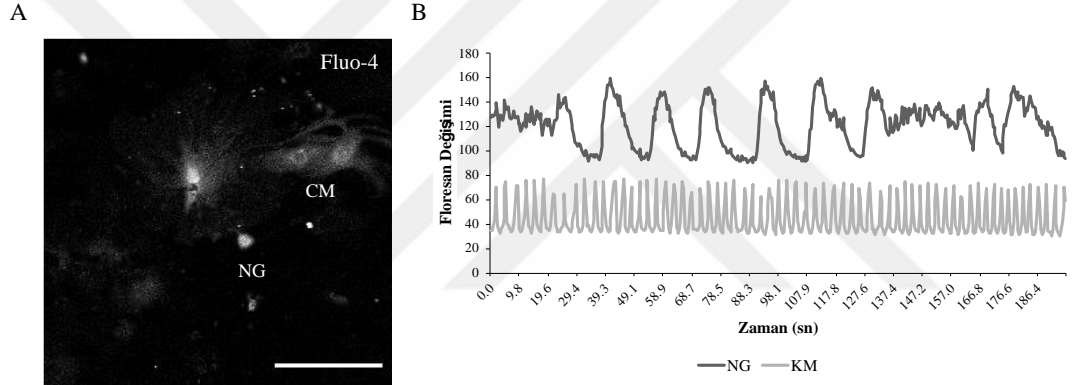
Kalbe özgü duyu nöronları ile kardiyomiyositler arasındaki Ca^{+2} iyonuna bağlı iletişimi incelemek amacıyla hücreler tek başına veya aynı hücre kabına ekilerek, Fluo-4 veya GCaMP6s Ca^{+2} işaretleyicileriyle incelendi (Şekil 6.14.7). AKG veya NG nöron ve kardiyomiyositlerin kokültürlerinde öncelikli olarak spontan Ca^{+2} değişimi floresan mikroskobu ile görüntülendi (Şekil 6.14.7). Alınan floresan görüntüler Fiji ile analiz edilerek zamana bağlı Ca^{+2} değişim grafikleri oluşturuldu. Hücreler arası Ca^{+2} iyonuna bağlı sinyal senkronizasyonunu tespit etmek amacıyla, nöron ve kardiyomiyositlerin zamana bağlı floresan değişimleri matlab arayüzü kullanılarak korelasyon analizi ile incelendi. Korelasyon değerinin 0.5 ve üzeri olması hücreler arası senkronizasyonun yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, korelasyon analiz grafiğinde zaman kaymasının (lag) 0 saniye olması eş zamanlı oluşan sinyalleri gösterirken, sıfırın sağ veya sol yanında korelasyonun yüksek çıkması hücrelerin Ca^{+2} değişiminde birbirlerini takip ettiklerini göstermektedir. Ayrıca, incelenen bazı alanlarda floresan görüntüleme sırasında spontan kasılıp gevşeme özelliğine sahip kardiyomiyosit hücrelerinden ışık alan görüntüsü de alındı ve bu hücrelere ait dakika atım değerleri (bpm) Matlab arayüzü ile çalışan Motion Tracking ile çıkarıldı. Elde edilen kardiyomiyosit dakikada atım değeri ve nöronun Ca^{+2} değişim sinyalleri arasında da korelasyon analizi yapılarak, sinyal benzerlikleri incelendi. Korelasyon analizine ek olarak, matlab arayüzünde Fourier dönüşüm kodu kullanılarak hücrelerin floresan değişim sinyalleri frekanslarına ayrıştırıldı ve hücreler arası ortak frekans değerleri belirlendi (Şekil 6.14.7).



Şekil 6.14.7 Kokültürlerde nöron ve kardiyomiyositin Ca^{+2} değişimleri arasında senkronizasyon analizinin adımları

6.14.3.1. Kalbe Özgü NG Duyu Nöron ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Spontan Ca^{+2} Görüntüleme

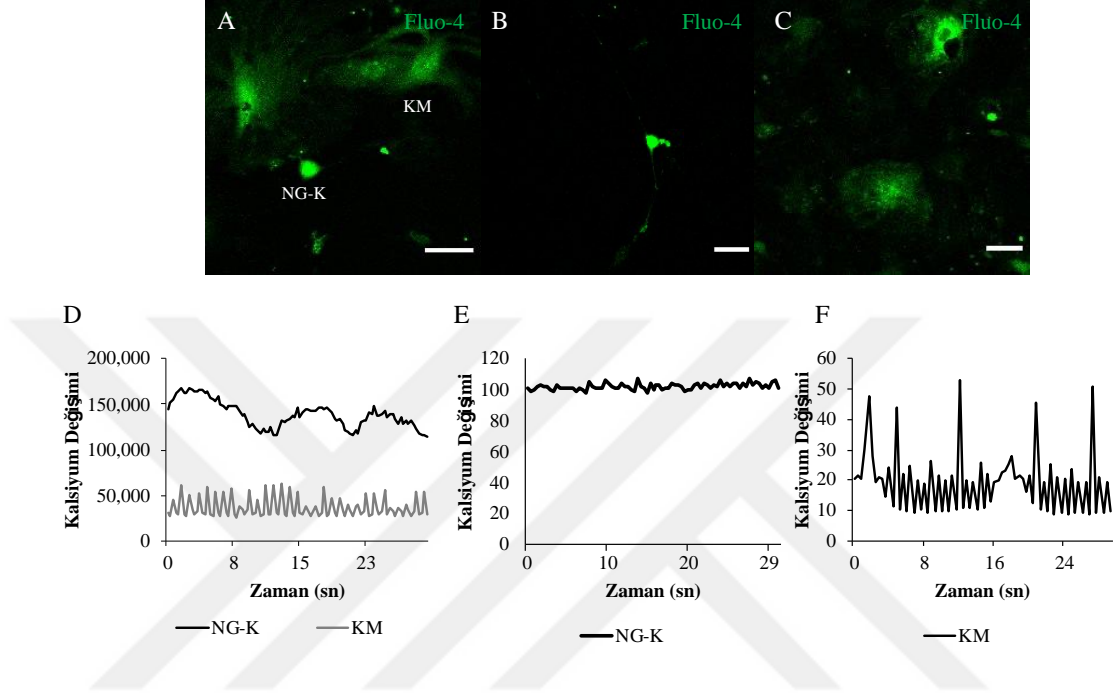
Duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişimi incelemek amacıyla, öncül deneylerde total AKG veya NG nöronları ile kardiyomiyosit hücrelerinin spontan aktiviteleri incelendi. Bunun için, hücreler Fluo-4 Ca^{+2} indikatör boyası ile muamele edildi. Birbiriyle bağlantılı olabileceği düşünülen ve spontan Ca^{+2} değişimine sahip nöron ve kardiyomiyosit hücreleri belirlendi (Şekil 6.14.8 A). Hedeflenen hücrelerde zamana bağlı Ca^{+2} değişimi takip edildi ve Fiji programı kullanılarak analiz edildi. Yapılan floresan değişim analizleri sonucunda, iletişim halinde olduğu düşünülen total NG duyu nöronları ile kardiyomiyositler arasında Ca^{+2} bağlı senkronize floresan değişim gözlemlendi (Şekil 6.14.8 B).



Şekil 6.14.8 Fluo-4 ile boyanan NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüleri ve Ca^{+2} analizi. (A) Fluo-4 ile işaretlenmiş kokültürdeki NG duyu nöron ve kardiyomiyosit konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. (B) Kokültürdeki total NG hücreleri ve kardiyomiyositler Ca^{+2} değişimini gösteren grafik. NG: NG nöronları, KM: kardiyomiyosit, Fluo-4: gri, ölçek çubuğu: 100 μm .

Kalbe özgü NG nöronları ve kardiyomiyosit hücreleri tek başlarına veya birlikte kültür kaplarına ekilerek, sergiledikleri Ca^{+2} değişimi Fluo-4 ile incelendi (Şekil 6.14.9). Spinning disk konfokal mikroskobu ile alınan floresan görüntülerinin analizi sonucunda, kardiyomiyosit ve kalbe özgü NG nöronları arasında senkronize Ca^{+2} değişimleri tespit edildi (Şekil 6.14.9 D). Tek başına ekilen kalbe özgü NG nöronlarında, Ca^{+2} iyonuna bağlı spontan floresan değişimi gözlemlenmezken (Şekil 6.14.9 E), sadece kardiyomiyosit kültüründe atıma bağlı Ca^{+2} değişimi tespit edildi (Şekil 6.14.9 F). Kültürlerin floresan görüntülemesi sırasında, Fluo-4 boyasının gerçek zamanlı Ca^{+2} değişiminin takibini sağlamakla beraber kısa sürede floresan özelliğini

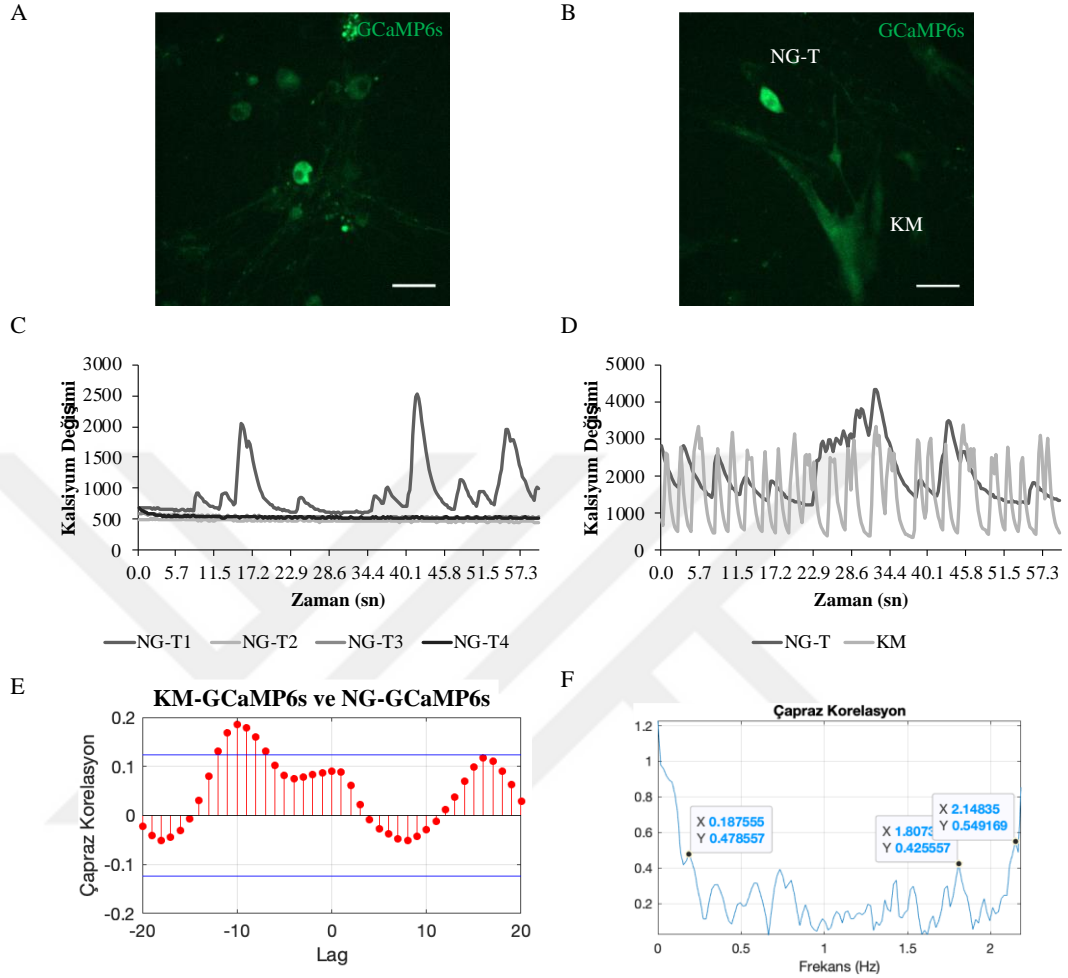
kaybettiği ve hücre içinden birkaç saat içinde atıldığı gözlemlendi. Fluo-4 ile yapılan Ca^{+2} değişim analizleri sonucunda, kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasında elektriksel etkileşiminin olduğu ancak Fluo-4 ile bu etkileşimi uzun süreli takip edilemeyeceği sonucuna varıldı.



Şekil 6.14.9 Kalbe özgü NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültüründe Fluo-4 boyaması sonrası Ca^{+2} değişim analizi. Fluo-4 ile işaretli (A) Kokültürdeki kalbe özgü NG duyu nöronu (NG-K) ve kardiyomiyosit (KM) ile (B) tek başına ekilen NG-K ve (C) kardiyomiyosit hücrelerinin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. (D) NG-K hücrelerinin ve kardiyomiyositlerin Ca^{+2} değişim analizi. (E) Yalnız ekildiğinde NG-K nöronlarının ve (F) kardiyomiyositlerin oluşturduğu Ca^{+2} değişimini gösteren grafik. Fluo-4: yeşil, ölçek çubuğu: 50 μm .

Total AKG duyu nöronlarında yapılan Ca^{+2} görüntüleme ve analizlerine benzer şekilde, GCaMP6s üreten total NG nöronları ve kardiyomiyosit hücre kültürleri oluşturularak aralarındaki Ca^{+2} iyonuna bağlı değişim analiz edildi (Şekil 6.14.10 A-D). Yapılan görüntülemeler (Şekil 6.14.10 A, B) ve floresan değişim analizi sonucunda (Şekil 6.14.10 C, D), kokültürdeki nöronlara kıyasla, tek başına ekilen NG nöronlarının büyük bir çoğunluğunun suskun olduğu tespit edildi (Şekil 6.14.10 C). Ayrıca, kokültürde kardiyomiyosit hücrelerine ait Ca^{+2} değişimine benzer veya belirli aralıklarla floresan değişimine sahip NG nöronları gözlemlendi (Şekil 6.14.10 D). Ancak, Matlab analizi sonucunda floresan değişimlerine ait sinyaller arası korelasyonun

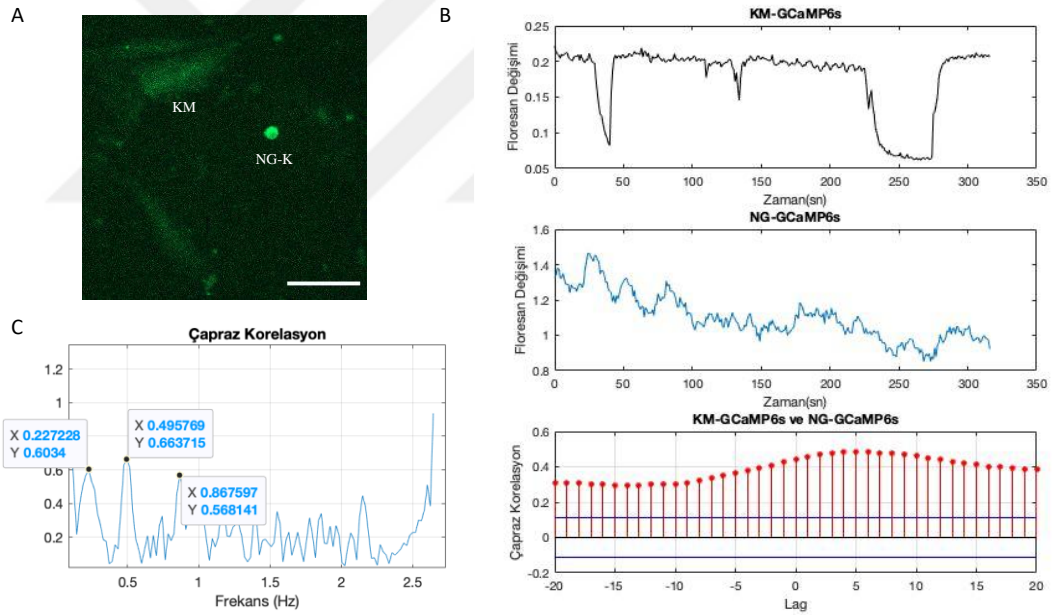
düşük (korelasyon katsayısı <0.5) ve ortak frekans anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 6.14.10 E, F).



Şekil 6.14.10 GCaMP6s üreten total NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüleri ve Ca²⁺ analizi. GCaMP6s üreten (A) tek ekilen NG nöronlarının ve (B) kokültürdeki duyu nöron ve kardiyomiyositlerin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. (C) Yalnız ekildiğinde NG nöronlarının ve (D) kokültürdeki total NG nöronları ve kardiyomiyositlerin oluşturduğu Ca²⁺ değişimini gösteren grafik. (E) Kokültürde hücreler arası Ca²⁺ iyonuna bağlı sinyal korelasyon analizi ve ortak frekans aralıkları. GCaMP6s: yeşil, NG-T: total NG nöronları, KM: kardiyomiyosit, ölçek çubuğu: 50 μ m.

Total duyu nöronları ve kardiyomiyosit hücreleri kullanılarak elde edilen ön bulgular kullanılarak, kardiyak NG aferentleri ile kardiyomiyosit hücreleri arasındaki elektriksel iletişim incelendi (Şekil 6.14.11). Kokültürlerde kalbe özgü duyu nöronu ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki elektriksel aktivite benzerliğini incelemek için Matlab arayüzünde bulunan ve korelasyon analizine olanak sağlayan xcorr fonksiyonu kullanıldı. Analiz için, kokültürlerde spontan aktiviteye sahip ve aksonal

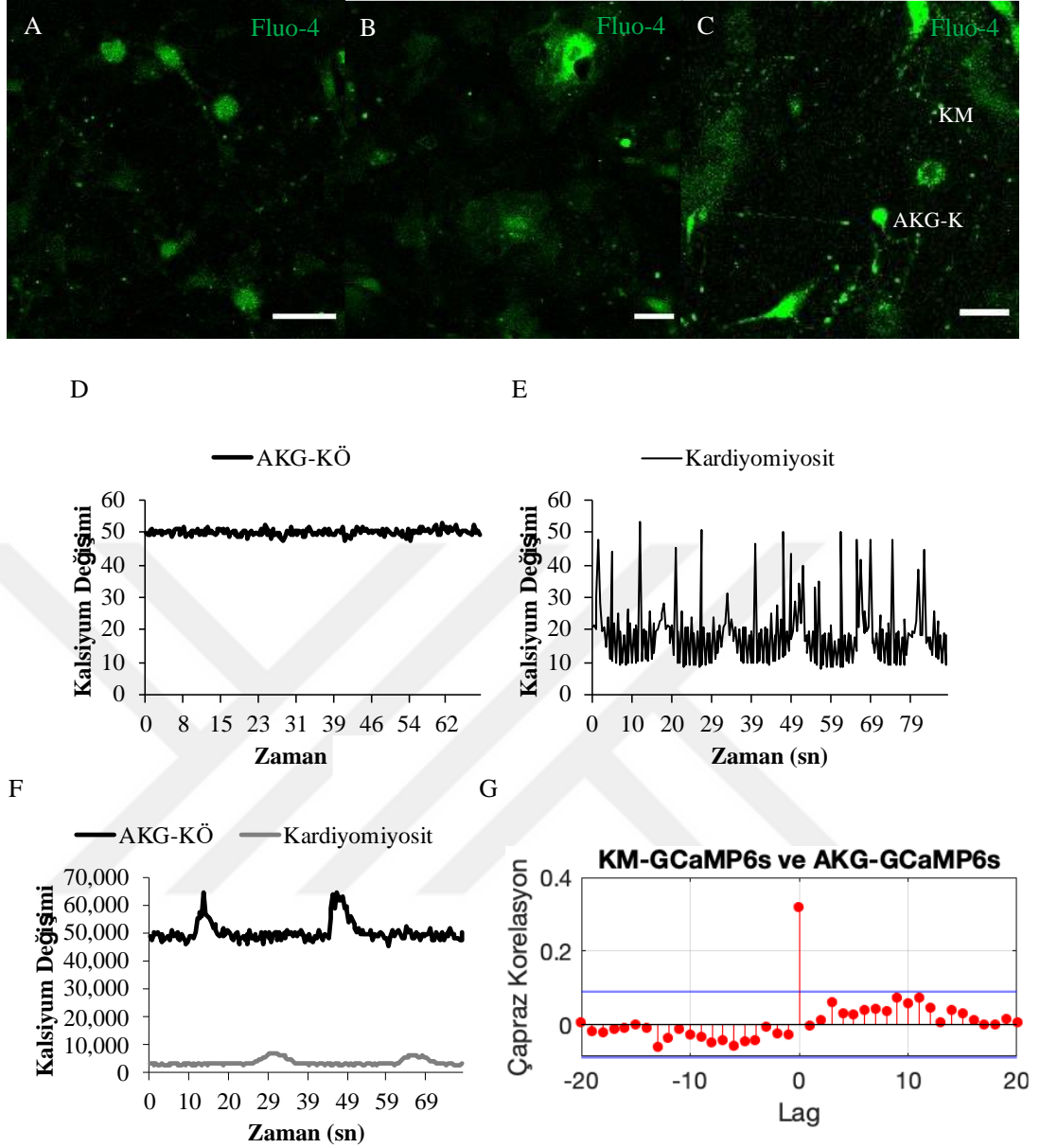
bağlantı takip edilerek birbiriyle bağlantılı olduğu düşünülen duyu nöron ve kardiyomiyosit hücreleri belirlendi (Şekil 6.14.11 A). Yapılan floresan analizi sonucunda, kalbe özgü NG nöronları ve kardiyomiyosit hücreleri arasında Ca^{+2} iyonuna bağlı yüksek korelasyon tespit edilirken (korelasyon katsayısı > 0.5 ; Şekil 6.14.11 B), ortak frekanslarının 0.2 Hz, 0.49 Hz ve 0.86 aralığında olduğu bulundu (Şekil 6.14.11 C). Total NG nöronlarına kıyasla (Şekil 6.14.9), kalbe özgü NG nöronlarının kardiyomiyositlerle olan Ca^{+2} bağlı sinyal korelasyon katsayısının 0.5'ten büyük ve ortak frekanslarının ise düşük olduğu tespit edildi. RNA dizi analizine öncelik verilmesi ve FACS sonrası düşük sayıda kalbe özgü NG nöronlarının saflaştırılması nedeniyle, NG nöronlarının kardiyomiyositlerle olan kokültürleri ayrıntılı incelenemedi. Bu nedenle, NG nöronlarına kıyasla sayıca fazla olan AKG duyu nöronları kullanılarak kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişim incelendi.



Şekil 6.14.11 Aralarında pozitif korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü NG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi. (A) Kokültürde GCaMP6s üreten kalbe özgü NG duyu nöronu (NG-K) ve kardiyomiyosite (KM) ait floresan görüntüsü ve (B) zamana bağlı floresan değişimi ile bu sinyaller arasındaki korelasyonu gösteren grafik. (C) Nöron ve kardiyomiyosite ait Ca^{+2} değişim sinyalinin ortak frekans aralıkları. GCaMP6s: yeşil; ölçek çubuğu: 100 μm .

6.14.3.2. Kalbe Özgü AKG Duyu Nöron ve Kardiyomiyosit Kokültürlerinde Spontan Ca^{+2} Görüntüleme

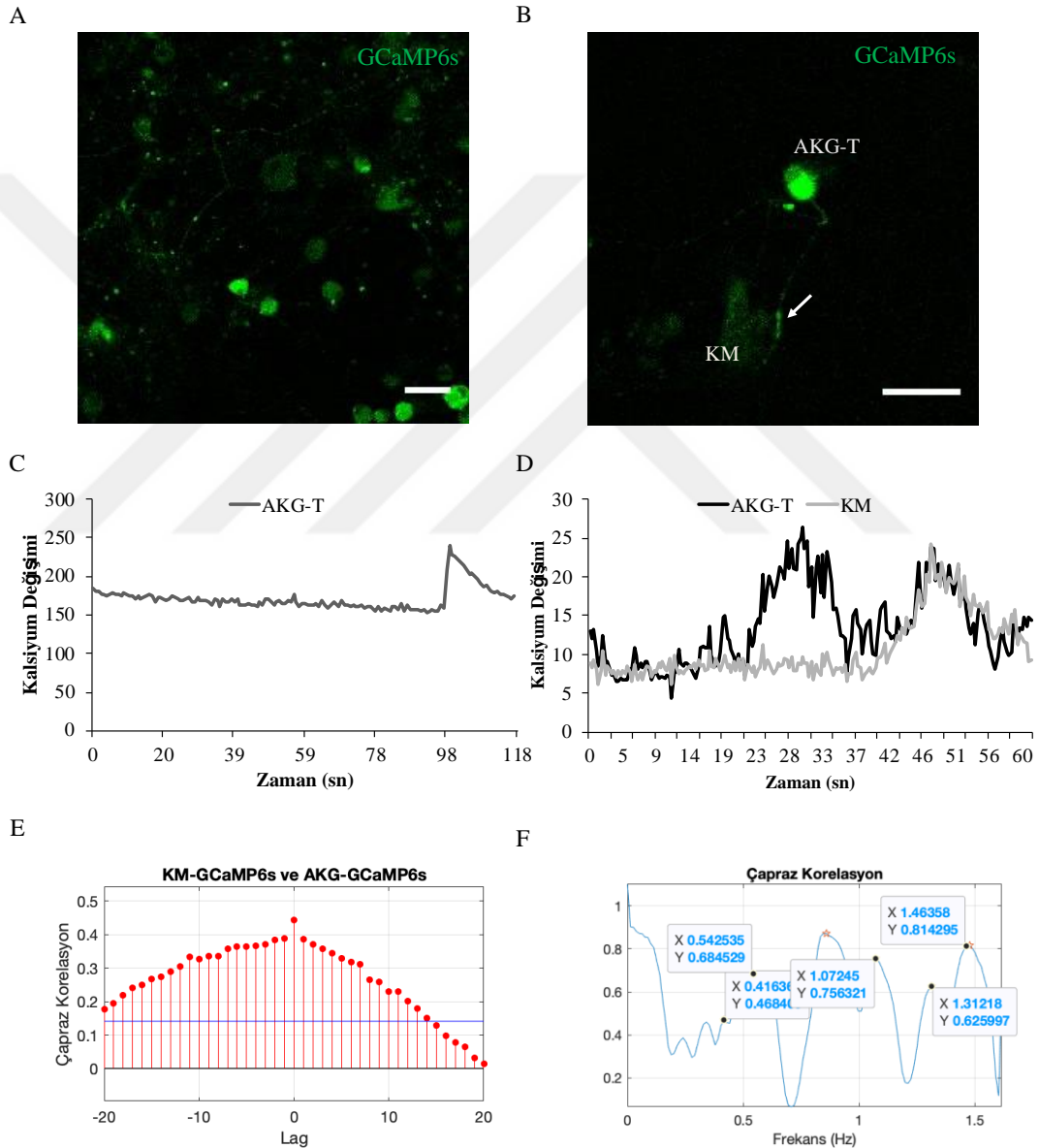
NG nöronları ile yapılan Ca^{+2} değişim görüntüleme ve analizlerine benzer şekilde, kalbe özgü AKG duyu nöronları ile kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişimi incelemek amacıyla hücreler tek başlarına veya aynı hücre kaplarına ekilerek, zamana bağlı kalsiyum değişimleri öncelikli olarak Fluo-4 ile takip edildi. Bunun için, Di-8-ANEPPQ ile *in vivo* işaretlenen kalbe özgü AKG nöronları FACS cihazı ile saflaştırılarak tek başına veya kardiyomiyosit ile beraber kültüre edildi. Fluo-4 ile boyanan kültürlerde görüntüleme sırasında veya Ca^{+2} değişim sinyal analizi sonucunda, tek başına ekilen kalbe özgü AKG nöronlarında çoğunlukla floresan değişim gözlemlenmezken (Şekil 6.14.12 A, D), kokültürdeki nöronlarda aktif Ca^{+2} değişimi tespit edildi (Şekil 6.14.12 C, F). Ancak yapılan Matlab analizi sonucunda, kokültürlerdeki kalbe özgü AKG duyu nöronları ile bağlantılı olabileceği kardiyomiyositler arasında Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan değişimleri arasında düşük korelasyon olmasına rağmen (yaklaşık korelasyon katsayısı: 0.4), sinyallerin eş zamanlı oldukları tespit edildi (zaman kayması:0, Şekil 6.14.12 G).



Şekil 6.14.12 Kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültüründe Fluo-4 ile boyanması sonrası Ca^{+2} değişim analizi. Fluo-4 ile işaretli (A) Kokültürdeki duyu nöron ve kardiyomiyosit ile (B) sadece AKG ve (C) kardiyomiyositlerin konfokal mikroskopu altındaki görüntüsü. (D) Kokültürdeki Kalbe özgü AKG hücrelerinin ve kardiyomiyositlerin Ca^{+2} değişim analizi. (E) Yalnız ekildiğinde AKG nöronlarının ve (F) oluşturduğu Ca^{+2} değişimi. Ölçek çubuğu: $50 \mu m$.

Fluo-4 ile elde edilen ön bulgulardan yararlanılarak, benzer deneyler uzun süreli ve farklı günlerde Ca^{+2} değişimini takip etmek amacıyla GCaMP6s Ca^{+2} indikatörü ile tekrarlandı. Bunun için, total AKG nöronları ile kardiyomiyositlerin spontan aktiviteleri incelendi. Tek başına ekilen ve GCaMP6s üreten AKG nöronlarında spontan Ca^{+2} değişiminin olmadığı veya frekansının düşük olduğu gözlemlenmedi

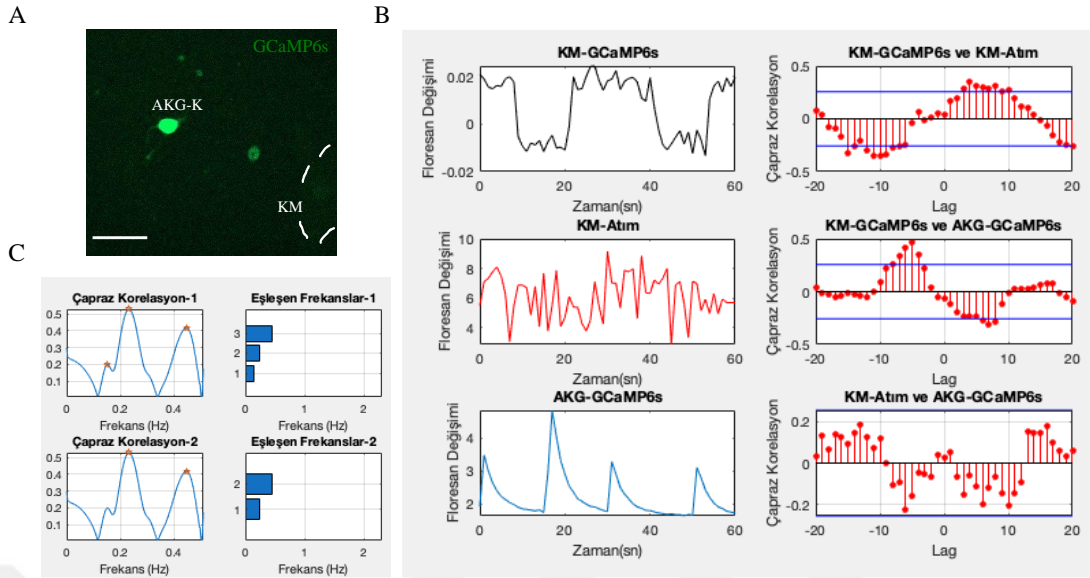
(Şekil 6.14.13 A, C). Diğer taraftan, tek başına ekilen nöronlara kokültürlerde GCaMP6s üreten total AKG duyu nöronlarının daha aktif olduğu belirlendi (Şekil 6.14.13 B, D). Yapılan Matlab analizi sonucunda, iletişim halinde olduğu düşünülen total AKG duyu nöronları ile kardiyomiyositlerin Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan değişimleri arasında düşük korelasyon olduğu (korelasyon katsayısı <0.5) (Şekil 6.14.13 E) ve ortak frekansların ise 0.5-1.3 Hz arasında bulunduğu tespit edildi (Şekil 6.14.13 F).



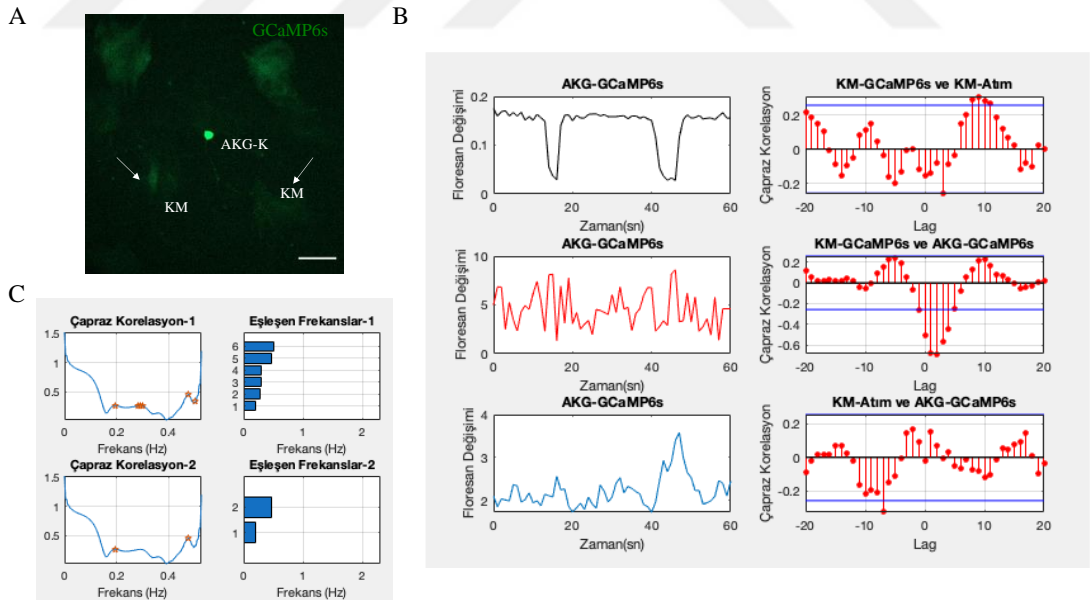
Şekil 6.14.13 GCaMP6s üreten total AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüleri ve Ca^{+2} analizi. GCaMP6s üreten (A) sadece AKG hücrelerinin ve (B) duyu nöron ve kardiyomiyosit kokültürlerinin konfokal mikroskobu altındaki görüntüsü. (C) Tek başına ekilen veya (D) kokültürdeki total AKG hücreleri ile kardiyomiyositlerin oluşturduğu Ca^{+2} değişimini gösteren grafik. E)

Kokültürde hücreler arası Ca^{+2} değişimine bağlı korelasyonu (korelasyon katsayısı <0.5) ve ortak frekansları gösteren grafik. AKG-T: total AKG nöronları, KM: kardiyomiyosit, ok: olası aksonal bağlantı. GCaMP6s: yeşil, ölçek çubuğu: $50 \mu m$.

Kalbe özgü AKG nöronları ve kardiyomiyosit kokültürlerinde floresan analizleri incelendiğinde ise, duyu nöronu ve kardiyomiyositlerin Ca^{+2} değişim sinyallerinde 5-10 saniyelik zaman kayması ile birlikte yüksek pozitif (Şekil 6.14.14 B) veya ters korelasyon (Şekil 6.14.15 B) tespit edildi. Ayrıca, taranan alanlar arasında birebir senkronize ($lag=0$) ve diğer alanlara kıyasla aralarında yüksek korelasyon bulunan Ca^{+2} değişimine sahip kardiyomiyosit ve kalbe özgü AKG nöronu tespit edildi (korelasyon katsayısı=1; Şekil 6.14.16 A-B). Senkronizasyon tespit edilen hücrelere ait zamana bağlı floresan değişim sinyalleri Fourier dönüşüm fonksiyonu ile frekanslarına ayrıştırılmış ve elde edilen veriler incelendiğinde iki hücre tipine ait sinyallere ait ortak frekans aralığının 0.2-0.4 Hz olduğu belirlenmiştir (korelasyon katsayısı $0.5 <$; (Şekil 6.14.14 C, Şekil 6.14.15 C, Şekil 6.14.16 C). Floresan görüntüleme sırasında, spontan kasılıp gevşeme özelliğine sahip kardiyomiyosit hücrelerinden ışık alan görüntüsü de alınmış ve bu hücrelere ait dakika atım değerleri (bpm) Matlab arayüzü ile çalışan Motion Tracking ile çıkarılmıştır (Şekil 6.14.14 B, Şekil 6.14.15 B, Şekil 6.14.16 B). Ancak, Şekil 6.14.16'te gösterilen örnek dışında, nöronlara ve kardiyomiyositlere ait Ca^{+2} değişimi ile dakikada atım değerleri arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir (Şekil 6.14.14 B, Şekil 6.4.15 B). Total AKG nöronlarına kıyasla (Şekil 6.14.13), kalbe özgü AKG nöronlar ve kardiyomiyositlerin Ca^{+2} bağlı floresan değişimleri arasında 0.5'ten büyük sinyal korelasyonu olduğu ve hücrelerin düşük frekanslarda ortak sinyal ürettikleri tespit edilmiştir.

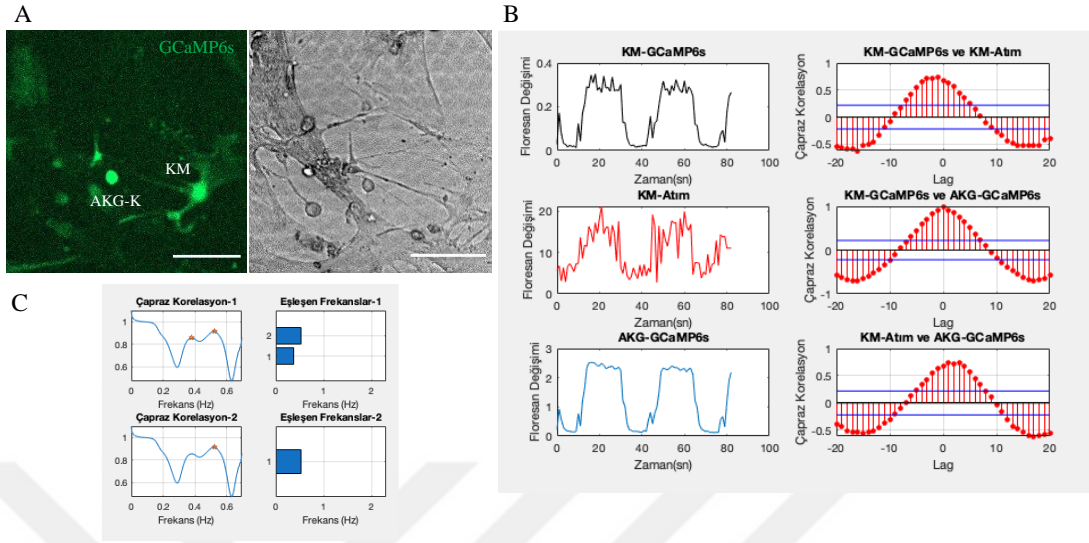


Şekil 6.14.14 Aralarında pozitif korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi. (A) Kokültürde GCaMP6s üreten kalbe özgü AKG duyu nöronu (AKG-K) ve kardiyomiyosite (KM) ait floresan görüntüsü ve (B) zamana bağlı floresan değişimi ile kardiyomiyosite ait dakikada atım değeri değeri ve bu sinyaller arasındaki korelasyonu gösteren grafik. (C) Nöron ve kardiyomiyosite ait Ca^{+2} değişim sinyalinin ortak frekans aralıkları. GCaMP6s: yeşil; --- kardiyomiyosit; Ölçek çubuğu: $100 \mu m$



Şekil 6.14.15 Aralarında negatif korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi. (A) Kokültürde GCaMP6s üreten kalbe özgü AKG duyu nöronu (AKG-K) ve kardiyomiyosite (KM) ait floresan görüntüsü ve (B) zamana bağlı floresan değişimi ile kardiyomiyosite ait dakikada atım değeri ve bu sinyaller arasındaki korelasyonu gösteren grafik. (C) Nöron ve kardiyomiyosite ait

Ca^{+2} değişim sinyalinin ortak frekans aralıkları. GCaMP6s: yeşil; oklar: kardiyomiyosit; Ölçek barı: 100 μm .



Şekil 6.14.16 Aralarında birebir korelasyon olduğu belirlenen kalbe özgü AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi. (A) Kokültürde GCaMP6s üreten kalbe özgü AKG duyu nöronu (AKG-K) ve kardiyomiyosite (KM) ait floresan görüntüsü ve (B) zamana bağlı floresan değişimi ile kardiyomiyosite ait dakika atım değeri ve bu sinyaller arasındaki korelasyonu gösteren grafik. (C) Nöron ve kardiyomiyosite ait Ca^{+2} değişim sinyalinin ortak frekans aralıkları. GCaMP6s: yeşil; oklar: kardiyomiyosit; Ölçek barı: 100 μm .

Hücreler arası etkileşimi ortaya koymak amacıyla, kokültür ve tek başına ekilen kültürlerin farklı günlerdeki floresan değişimine incelenerek suskun ve aktif kalbe özgü AKG nöronları sayıldı ve tablo 6.7.2 oluşturuldu. Kokültürdeki kalbe özgü AKG nöronların Ca^{+2} değişimleri incelendiğinde, 0-5.günlerde $\%14.6 \pm 17.4$ 'ünün, 5-10.günlerde $\%29 \pm 12.1$ 'inin, $\%10-15$.günlerde ise $\%35$ 'nin aktif olduğu bulundu (Tablo 6.14.4, Şekil 6.14.17). Diğer taraftan, tek başına ekilen kalbe özgü AKG nöronların Ca^{+2} değişimleri incelendiğinde 0-5.günlerde $\%4.75 \pm 5.5$ 'nin, 5-10.günlerde $\%11.66 \pm 7.63$ 'ünün ve 10-15.günlerde ise $\%4$ 'ünün aktif olduğu tespit edildi. Belirli günlerde ve üç farklı deney ile tekrarlanan sayım sonucunda, kokültürlerde spontan olarak aktif olan kardiyak AKG aferentlerin tek başına ekilenlere göre kültürün gününden bağımsız olarak yüzdesinin yüksek olduğu sonucuna varıldı (Tablo 6.14.4, Şekil 6.14.17).

Tablo 6.14.4 Tek başına ekilen veya kokültürlerde spontan GCaMP6s aktivite gösteren kalbe özgü duyu nöronlarının farklı günlerdeki yüzdesini gösteren tablo

1. Deney

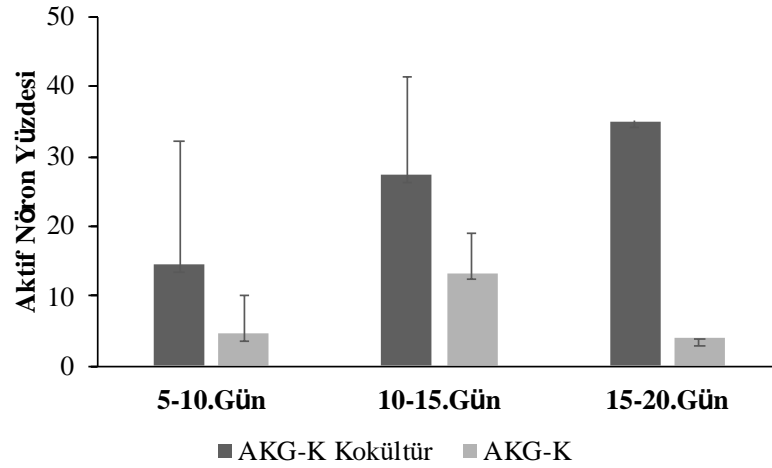
	Kültür Adı	Total AKG	Aktif olan AKG	%
6. Gün	AKG-K + KM	25	5	20
10. gün	AKG-K + KM	28	12	43
7. Gün	AKG-K	14	-	0
10. gün	AKG-K	20	2	10
20. Gün	AKG-K	28	1	4

2. Deney

	Kültür Adı	Total AKG	Aktif olan AKG	%
11. Gün	AKG-K + KM	32	1	3
15. Gün	AKG-K + KM	19	3	16
20. Gün	AKG-K + KM	17	6	35
6. Gün	AKG-K	16	-	0
12. Gün	AKG-K	20	4	20
20.Gün	AKG-K	25	1	4

3. Deney

	Kültür Adı	Total AKG	Aktif olan AKG	%
7. Gün	AKG-K + KM	50	1	2
8. Gün	AKG-K + KM	35	2	5
12.Gün	AKG-K + KM	13	3	23
7.Gün	AKG-K	11	1	9
12. Gün	AKG-K	20	2	10



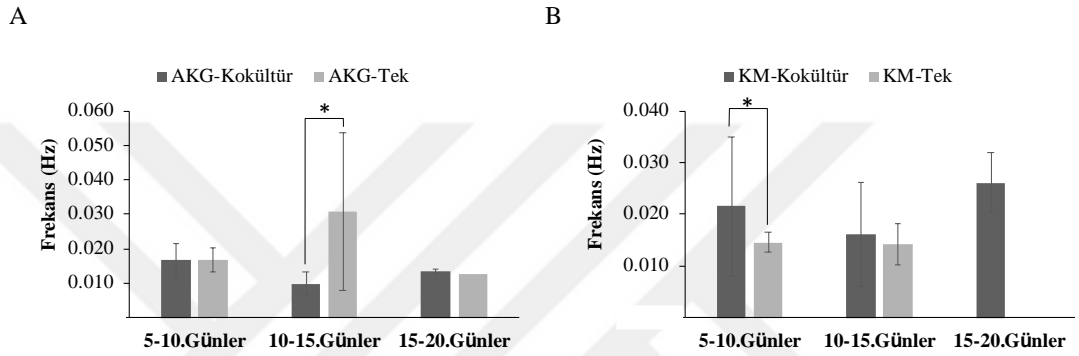
Şekil 6.14.17 Tek başına ekilen veya kokültürlerde spontan aktif GCaMP6s üreten kalbe özgü duyu nöronlarının farklı günlerdeki yüzdesini gösteren grafik.

Kalbe özgü AKG nöronları ve kardiyomiyosit kokültüründe aktif olarak belirlenen nöronlar ve bağlantılı olabileceği kardiyomiyositlerin farklı günlerdeki floresan değişim sinyalleri arasındaki senkronizasyon incelendi. Aktif nöronların olduğu 5-10. günler arasında 5 alan, 10-15. günler arasında 13 alan ve 15-20. günler arasında bir alan tespit edilerek, bu alanlara ait hücreler arası Ca^{+2} iyonuna bağlı değişim benzerlik ve frekans değerleri belirlendi. Yapılan korelasyon analizi sonucunda, kalbe özgü AKG nöronu ve kardiyomiyositlerin zamana bağlı Ca^{+2} değişim sinyalleri arasında 5-10. günlerde iki alanda pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı: $0.5 <$), bir alanda ters korelasyon (korelasyon katsayısı: $-0.5 >$); 10-15. günlerde ise üç alanda pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı: $0.5 <$) ve dört alanda sinyaller arası ters korelasyon (korelasyon katsayısı: $-0.5 >$) olduğu belirlendi (Tablo 6.14.5).

Tablo 6.14.5 Kokültürlerde bulunan kalbe özgü AKG nöronları ve kardiyomiyositlere ait spontan Ca^{+2} değişim sinyallerinin günlere bağlı korelasyonu

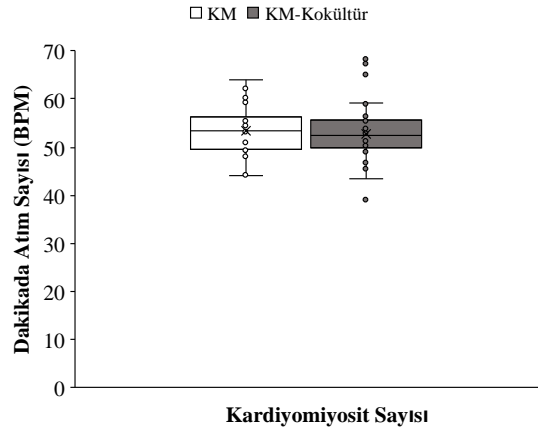
	İncelenen Alan Sayısı	Pozitif Korelasyon ($0.5 <$)	Ters Korelasyon ($-0.5 >$)
5-10. Gün	5	2	1
10-15. Gün	13	3	4
15-20. Gün	1	-	-

Kokültürdeki hücrelerin Ca^{+2} değişimleri arasındaki korelasyon analizinin yanında, tek başına ekilen veya kokültürlerdeki nöron ve kardiyomiyosit hücrelerinin belirlenen günlerdeki floresan değişim sinyallerinin frekans değerleri karşılaştırıldı (Şekil 6.14.18). Yapılan analiz sonucunda, tek başına ekilen kalbe özgü AKG nöronların kokültürdeki nöronlara göre 10-15.günlerdeki frekans değerlerinin yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 6.14.18 A; $p<0.05$). Diğer taraftan, tek başına ekilen ve kokültürdeki kardiyomiyositlerin kültürün 5-10.günlerinde frekans değerlerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu bulundu (Şekil 6.14.18 B; $p<0.05$).



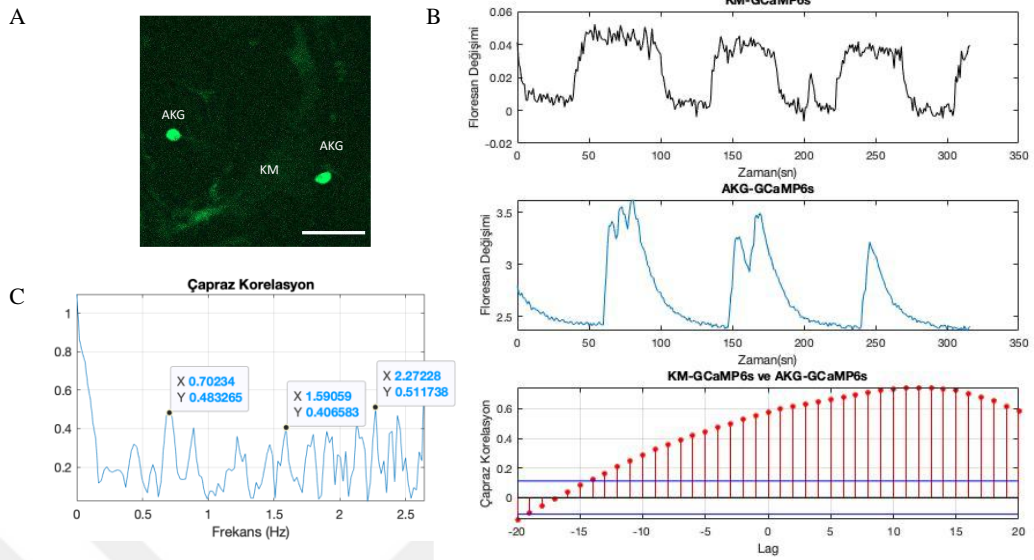
Şekil 6.14.18 Tek başına ekilen veya kokültürdeki kalbe özgü AKG nöronu ve kardiyomiyositlere ait frekans değerleri. Kültürün 5-10, 10-15 ve 15-20. Günlerinde, tek başına ekilen veya kokültürdeki (A) kalbe özgü AKG nöronları ve (B) kardiyomiyositlere ait frekans değerlerini gösteren grafik (* $p<0.05$). KM: kardiyomiyosit.

Farklı günlere ait kokültürlerde, hücreler arası Ca^{+2} değişim korelasyonun 10.günde en fazla olduğu belirlendi ve bu nedenle 10.günde incelenen kardiyomiyosit hücrelerinin dakikadaki atım değerleri incelendi. Motion tracking programı ile yapılan hesaplama sonucunda, tek başına ekilen ve kokültürdeki kardiyomiyositler hücrelerine ait dakikada atım sayısı değerlerinin sırasıyla 53.33 ± 3.94 ve 58.25 ± 23.7 olduğu ve aralarında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 6.14.19, $p>0.05$). Işık alan görüntülerinden elde edilen dakikada atım değerlerinin 45-60 olduğu, Xcelligence RTCA Cardio-ECR cihazından alınan kayıtlarda ise yenidoğan fare kardiyomiyositlerinin dakikada 120-180 kez attığı gözlemlendi. Farklı iki metod ile alınan kayıtlarda dakikada atım sayılarının farklı olması, ışık alan görüntülerinin çözünürlüğünün kardiyomiyositlerin kasılıp gevşemesini yakalamayacak kadar düşük olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle, ilerleyen deneylerde kardiyomiyositlerin dakikada atım sayısı analizlere dahil edilmedi.



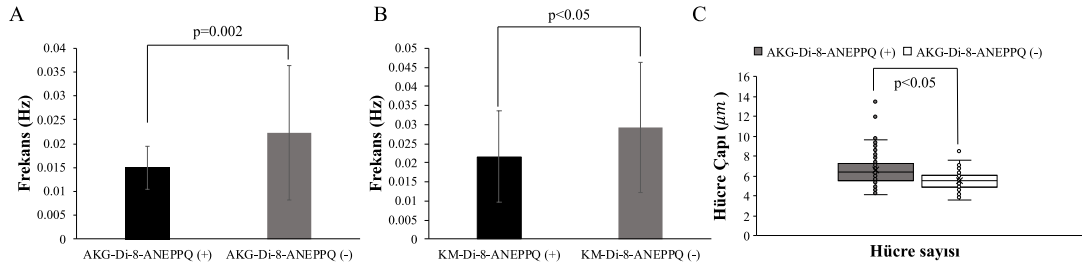
Şekil 6.14.19 Onuncu güne ait tek başına ekilen veya kokültürlerde bulunan kardiyomiyositlere ait dakikada atım sayısı değerlerini gösteren grafik.

Kalbe özgü duyu nöronlarının kardiyomiyosit ile olan Ca^{+2} iyonuna bağlı sinyal korelasyonunu karşılaştırmak amacıyla, FACS sırasında Di-8-ANEPPQ ile işaretli AKG nöronlarının yanında floresanca işaretlenmemiş nöronlar da ayrıştırıldı. Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronları, kardiyak duyu nöronlarıyla benzer şekilde tek başına veya kardiyomiyosit hücreleri ile birlikte ekilerek, hücrelerdeki zamana bağlı Ca^{+2} değişimi takip edildi (Şekil 6.14.20 A). Yapılan görüntülemeler ve Ca^{+2} değişim sinyallerinin Matlab analizi sonucunda, Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronları ve kardiyomiyosit hücrelerinin floresan değişim sinyalleri arasında 10-15 saniye zaman kayması ile birlikte pozitif korelasyon tespit edildi (Şekil 6.14.20 B). Kardiyomiyositlerle aralarında düşük ortak frekans aralıkları bulunan kalbe özgü duyu nöronlarının aksine, Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının kardiyomiyositler ile ortak frekans aralıklarının 0.5 Hz ve üzeri olarak bulundu (Şekil 6.14.20 C).



Şekil 6.14.20 Aralarında pozitif korelasyon olduğu belirlenen Di-8-ANEPPQ (-) AKG duyu nöronu ile kardiyomiyosit kokültürünün floresan görüntüsü ve Ca^{+2} bağlı floresan değişim sinyalinin analizi. (A) Kokültürde GCaMP6s üreten Di-8-ANEPPQ (-) AKG duyu nöronu (AKG) ve kardiyomiyosite (KM) ait floresan görüntüsü. (B) Hücreler arası Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan değişimini ve korelasyonu gösteren grafik. (C) Nöron ve kardiyomiyosite ait Ca^{+2} değişim sinyalinin ortak frekans aralıkları. GCaMP6s: yeşil; Ölçek çubuğu: $100 \mu m$.

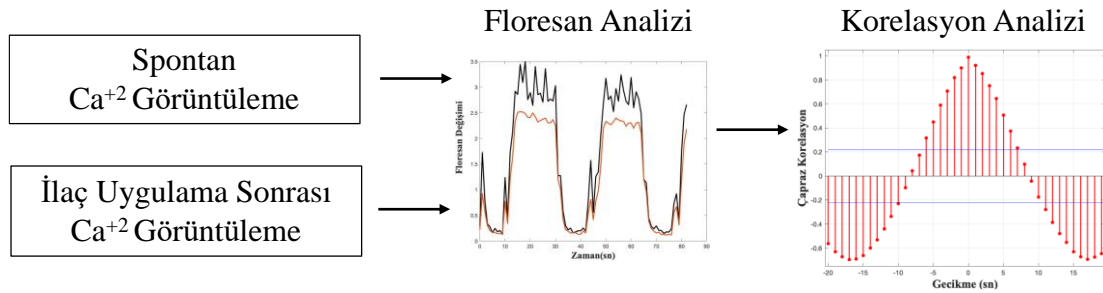
Ca^{+2} iyonuna bağlı sinyal senkronizasyon analizlerinin yanında, kokültür ortamındaki Di-8-ANEPPQ (+) AKG, Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronları ve kardiyomiyositlere ait frekans değerleri hesaplanarak, karşılaştırıldı (Şekil 6.14.21 A, B). Elde edilen verilere göre, kokültürdeki Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının, kalbe özgü nöronlara göre daha yüksek frekansta Ca^{+2} sinyali ürettiği tespit edildi ($p=0.002$; Şekil 6.14.21 A). Diğer taraftan, kalbe özgü duyu nöronları veya Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronları ile birlikte kokültürde olan kardiyomistlerin frekans değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$; Şekil 6.14.21 B). Nöronlar arasında tespit edilen frekans farkının hücre tipiyle ilişkisi incelemek amacıyla, Di-8-ANEPPQ (+) AKG ve Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının hücre gövde çapları hesaplandı. Yapılan hücre çapı analizine göre, Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının hücre gövde çaplarının Di-8-ANEPPQ (+) AKG nöronlara göre daha küçük olduğu tespit edildi ($p<0.05$; Şekil 6.14.21 C).



Şekil 6.14.21 FACS ile ayrıştırılan ve kültür kaplarına ekilen Di-8-ANEPPQ (+) ve Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının çap analizini gösteren grafik. Kokültürlerdeki (A) Di-8-ANEPPQ (+) ve Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronları ile (B) bu nöronlarla kokültürde olan kardiyomiyositlere ait frekans değerleri. Kokültürlerdeki (A) Di-8-ANEPPQ (+) ve Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının hücre gövde çap analizleri.

6.14.4. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Kimyasal Uygulama ile İncelenmesi

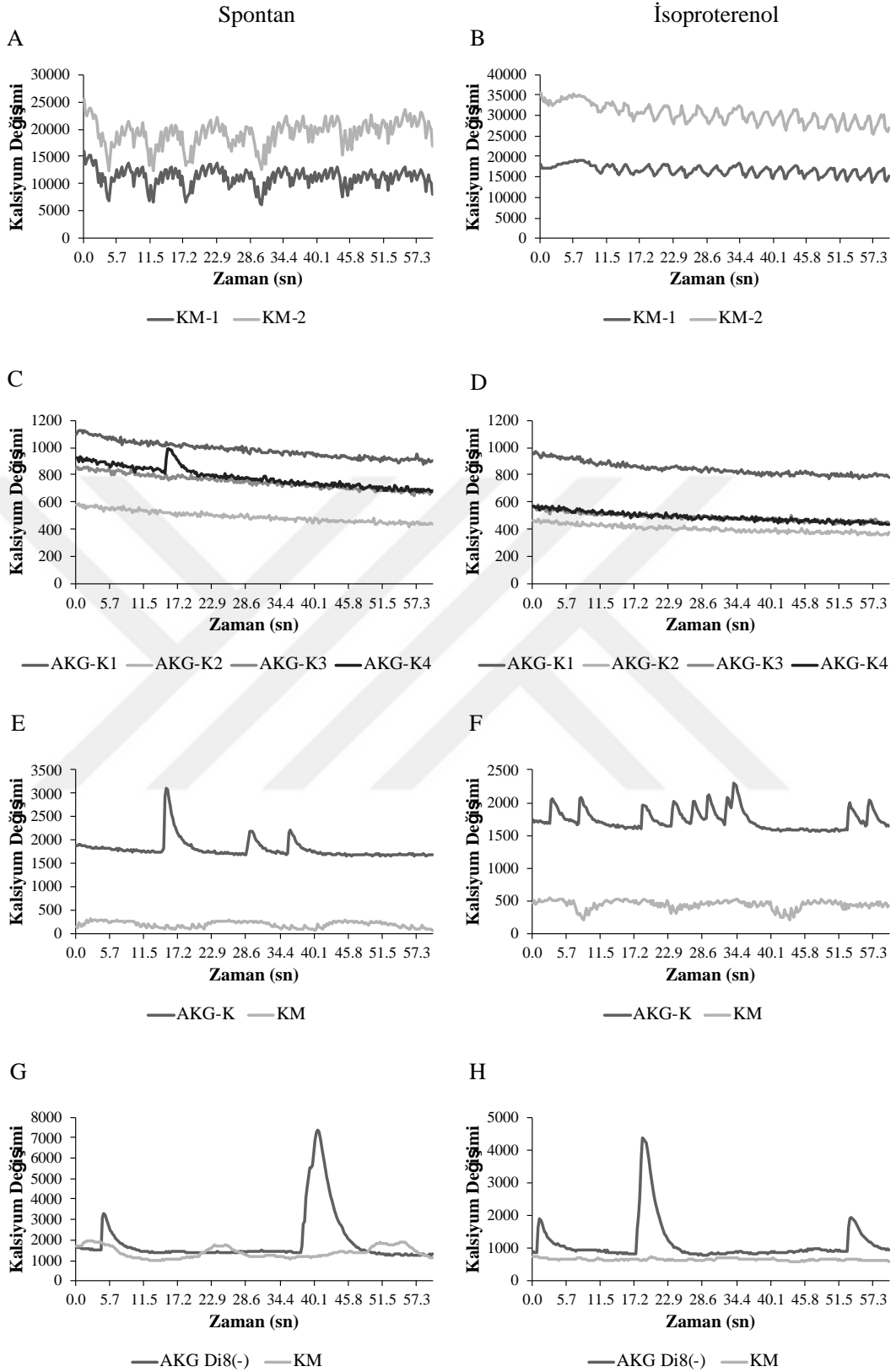
GCaMP6s üreten kalbe özgü duyu nöron ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki spontan Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan görüntüleme ve sinyal analizinin yanında, hücreler arasındaki bağlantıyı incelemek için isoproterenol, cyanquixaline CNQX, mecamylamine ve carbenoxolone (cbx) kimyasalları kültürlerine uygulandı. Kimyasalların etkisini incelemek amacıyla, ilaç öncesi (spontan) ve sonrası alınan Ca^{+2} görüntülerinden floresan değişim analizi yapıldı ve hücreler arası senkronizasyon korelasyon analizi ile incelendi (Şekil 6.14.22).



Şekil 6.14.22 İlaç uygulaması öncesi ve sonrası kokültürlerdeki hücrelerin Ca^{+2} bağlı floresan değişimleri arasındaki senkronizasyon analizinde takip edilen adımlar.

Bu kimyasallardan, beta adrenerjik agonist olan isoproterenol 100 nm olacak şekilde tek başına nöron ve kardiyomiyositler kültürleri ile bu hücrelerin kokültürlerine eklendi. İsoptererenol uygulaması öncesi spontan atımı olan kardiyomiyositlerde (Şekil 6.14.23 A), ilaç uygulaması sonrası atım hızının arttığı

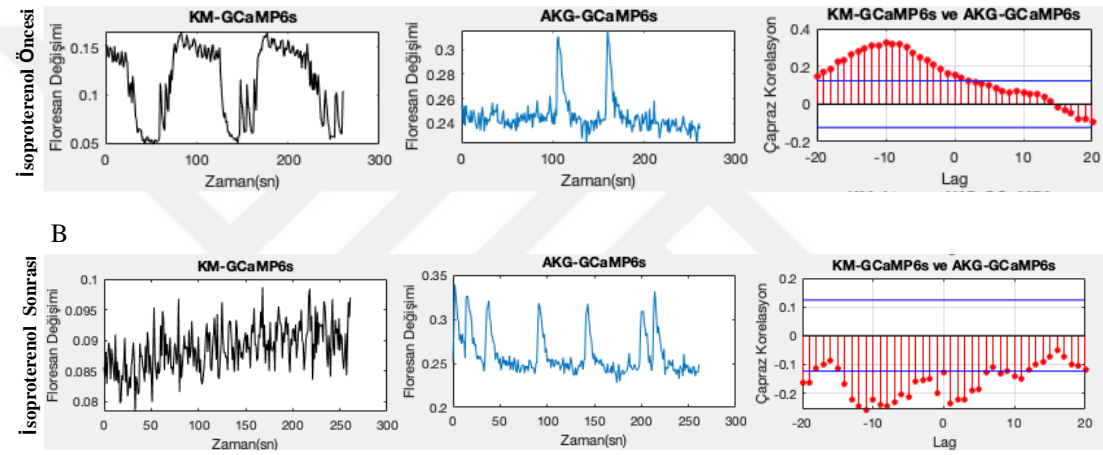
tespit edildi (Şekil 6.14.23 B). Tek başına ekilen kalbe özgü AKG duyu nöronlarında ise isoproterenol öncesi (Şekil 6.14.23 C) ve sonrası (Şekil 6.14.23 D) Ca^{+2} değişimlerinde bir farklılık görülmedi. Bu nedenle, kokültürlerde isoproterenol eklendiğinde sadece kardiyomiyosit hücrelerinin elektriksel aktivitesi değişecek, buna bağlı olarak bağlantılı olduğu düşünülen nörondaki Ca^{+2} değişimi incelemek, hücreler arası elektriksel bağlantının varlığı araştırıldı. Bu amaçla, ilaç uygulaması öncesi kardiyomiyosit ile bağlantılı ve spontan olarak aktif GCaMP6s üreten kalbe özgü AKG nöronları belirlendi (Şekil 6.14.23 E). Kokültüre isoproterenol eklenmesinden sonra, kardiyomiyosit ve bağlantı kurduğu gözlemlenen nöronlarda Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan sinyal frekansının arttığı gözlemlendi (Şekil 6.14.23 F). Kalbe özgü duyu nöronları ile karşılaştırmak üzere FACS ile Di-8-ANEPPQ (-) AKG duyu nöronları ayrıştırıldı ve kardiyomiyosit hücreleri ile birlikte kokültürleri oluşturuldu. Kalbe özgü duyu nöronlarına benzer şekilde, kokültürlerde spontan aktif Di-8-ANEPPQ (-) duyu nöronları ve bu nöronların kardiyomiyosit hücreleri ile senkronize Ca^{+2} değişimi gözlemlendi (Şekil 6.14.23 G). Oluşan Ca^{+2} değişim sinyalinin ise isoproterenol öncesi ve sonrası değişmediği tespit edildi (Şekil 6.14.23 H).



Şekil 6.14.23 İsoproterenol uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği. Spontan (A, C, E, G) ve 100 nM isoproterenol uygulaması sonrası (B, D, F, H) sırasıyla kardiyomiyosit (A, B), kalbe özgü AKG (Di-8-ANEPPQ (+))

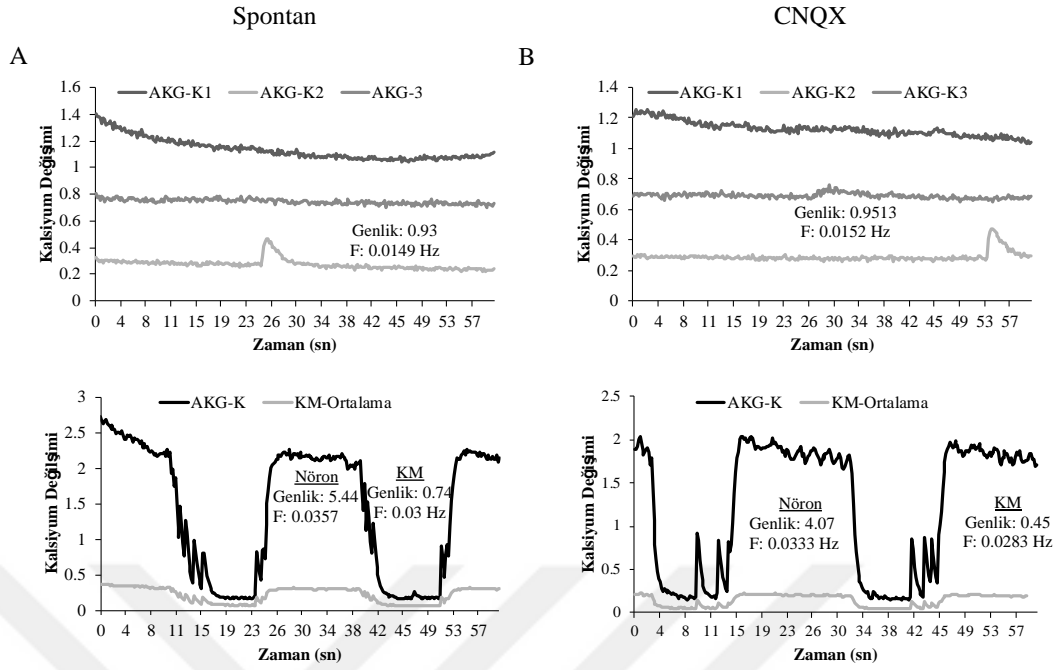
(C, D), kalbe özgü AKG ve kardiyomiyosit kokültürü (E, F), Di-8-ANEPPQ (-) AKG ve kardiyomiyosit kokültürlerinde (G, H) Ca^{+2} değişimini gösteren grafik.

İsoproterenol uygulamasının yapıldığı kokültürelere ait 17 alandan 4 alanda kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyositlerin Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan değişimlerinde bir artış görülürken, bir alanda ise azalış olduğu gözlemlenmiştir. İsoproterenol sonrası frekansı artan nöronların bulunduğu alanlar incelendiğinde, isoproterenol uygulama öncesi ve sonrasında kokültürde hücreler arasında Ca^{+2} iyonuna bağlı bir korelasyon tespit edilmemiştir (Şekil 6.14.24 A, Şekil 6.14.24 B). İncelenen alanda nöronların bağlantılı olduğu kardiyomiyositlerin bulunmaması hücreler arası sinyal korelasyonunun bulunmamasının nedeni olabilir.



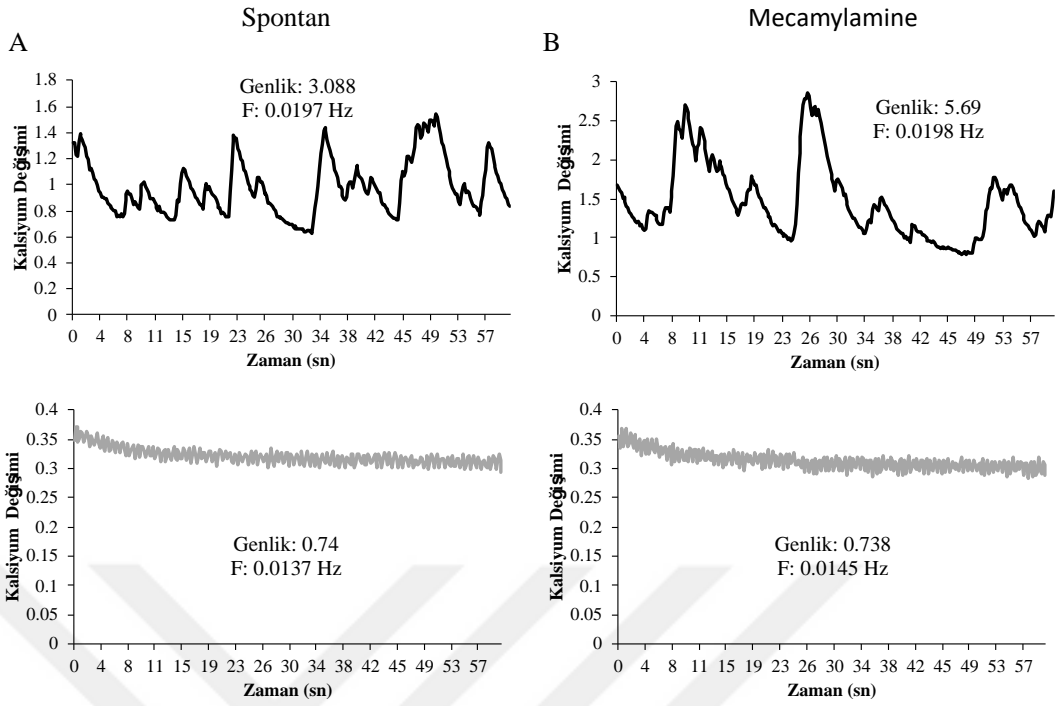
Şekil 6.14.24 İsoproterenol uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişimini gösteren grafik ve hücreler arası korelasyon analizi. (A) İsoproterenol verilmeden önce incelenen alanda kardiyomiyosit ve kalbe özgü AKG hücrelerine ait zamana bağlı Ca^{+2} değişimi ve birbirleri arasındaki korelasyonu gösteren grafik. (B) İsoproterenol uygulamasından sonra aynı alan ve aynı hücrelerdeki zamana bağlı Ca^{+2} değişimi ve birbirleri arasındaki korelasyonu gösteren grafik.

Kokültürdeki hücreler arası bağlantının tipini incelemek amacıyla, glutamaterjik sinaps antagonisti olan bir diğer kimyasal CNQX költürlere uygulandı. Tek başına ekilen veya költürlerdeki kalbe özgü AKG nöronları ile kardiyomiyositlerde CNQX uygulaması öncesi ve sonrasında Ca^{+2} değişimi bakımından bir farklılık tespit edilmedi (Şekil 6.14.25). Elde edilen bulgu, nöronlar ve kardiyomiyositler arasındaki olası sinaptik bağlantının glutamaterjik olmadığı olasılığını düşündürmektedir. Költürdeki nöronlarda frekans bakımında artış görülürken, kardiyomiyositler arasında bir sinyal benzerliği tespit edilmedi.



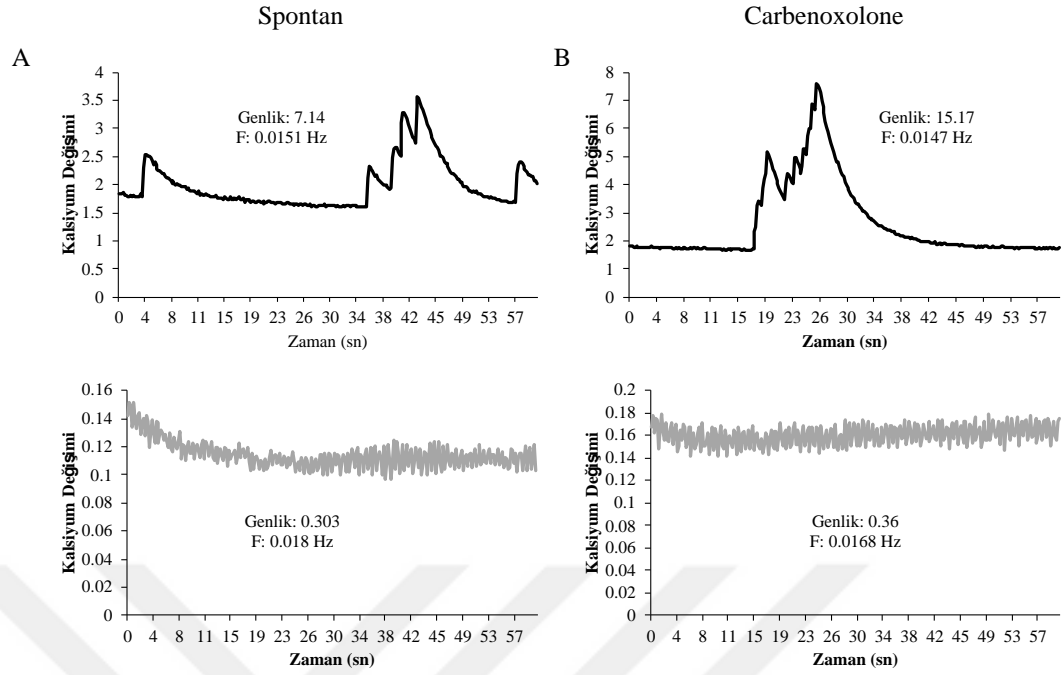
Şekil 6.14.25 CNQX uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği. Spontan (A, C) ve $10 \mu M$ CNQX uygulaması sonrası (B, D) sırasıyla kalbe özgü AKG (A, B), kalbe özgü AKG ve kardiyomiyosit kokültürü (C, D) Ca^{+2} değişimini gösteren grafik.

RNA dizi analizi sonucunda, AKG nöronlarında yüksek ifade edildiği tespit edilen asetilkolin reseptör ve düzenleyicilerinin varlığını doğrulamak amacıyla, kokültürlere genel asetilkolin reseptörlerini antagonisti mecamlamine uygulandı (Şekil 6.14.26). İncelenen alanlar arasında mecamlamine uygulaması sonrası kalbe özgü AKG nöronlarına ait Ca^{+2} değişimine bağlı floresan şiddetinde artış gözlemlenirken, kardiyomiyosit hücrelerinde herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 6.14.26 A, B).



Şekil 6.14.26 Mecamylamine uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği. Spontan (A) ve (B) 10 μ M Mecamylamine uygulaması sonrası sırasıyla kalbe özgü AKG ve kardiyomiyosit kokültürü Ca^{+2} değişimini gösteren grafik.

Kokültürlerdeki nöron ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki iletişimin oluk bağlantı üzerinden olup olmadığını incelemek amacıyla, költürlere oluk bağlantı bloklayıcısı cbx uygulandı (Şekil 6.14.27 A, B). İncelenen alanlar arasında kalbe özgü AKG nöronlarına ait Ca^{+2} değişimine bağlı floresan şiddetinde cbx uygulaması sonrasında artış gözlemlenirken, kardiyomiyositlerde herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 6.14.27 A, B).

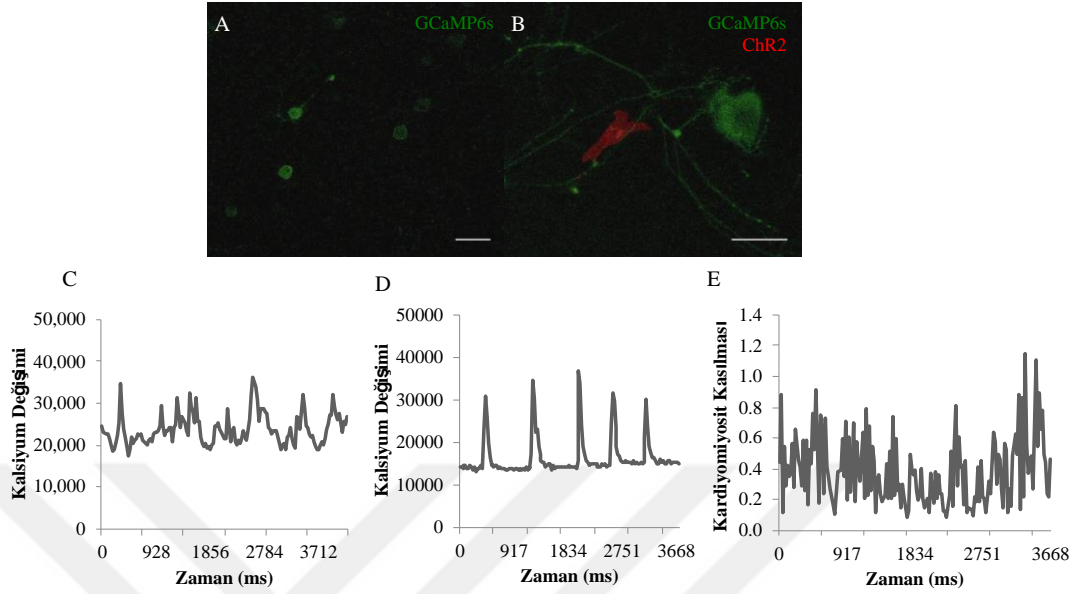


Şekil 6.14.27 Carbenoxolone (cbx) uygulaması öncesi ve sonrası hücrelerdeki Ca^{+2} değişim grafiği. Spontan (A) ve (B) 10 μ M cbx uygulaması sonrası sırasıyla kalbe özgü AKG ve kardiyomiyosit kokültürü Ca^{+2} değişimini gösteren grafik.

6.14.5. Kalbe Özgü Duyu Sinirleri ile Kardiyomiyosit Kokültürlerinin Optogenetik İncelenmesi

AKG ve NG nöronları ile kardiyomiyosit kokültürlerinde hücreler arası elektriksel bağlantının varlığını göstermek amacıyla optogenetik kullanılan diğer bir yöntemdir. Bunun amaçla, kokültürlerde ChR2 üreten kardiyomiyositler mavi ışıkla uyarıldı, kardiyomiyositin bağlantılı olduğu ve GCaMP6s üreten AKG duyu nöronlarında Ca^{+2} değişimi takip edildi. Öncül deneylerde, kardiyomiyositlerin ChR2 proteini üretiminden sonra bu kanal proteininin hücrelerin fonksiyonel aktivitesine etki edip etmediği incelendi. Bunun için, kokültürlerde GCaMP6s üreten AKG nöron ve aksonal bağlantı yaptığı görülen ChR2 üreten kardiyomiyositler belirlendi (Şekil 6.14.28 B). Tek başına ekilen AKG hücrelerine oranla (Şekil 6.14.28 A, C), kokültürdeki AKG nöronlarında Ca^{+2} iyonuna bağlı ritmik floresan değişimi gözlemlendi (Şekil 6.14.28 D). Diğer taraftan, AKG nöronun bağlantı kurduğu amacıyla motion tracking programı kullanılarak (124) ChR2 üreten kardiyomiyositin kasılıp gevşeme profili çıkarıldı (Şekil 6.14.28 E). Kardiyomiyositlerin ChR2

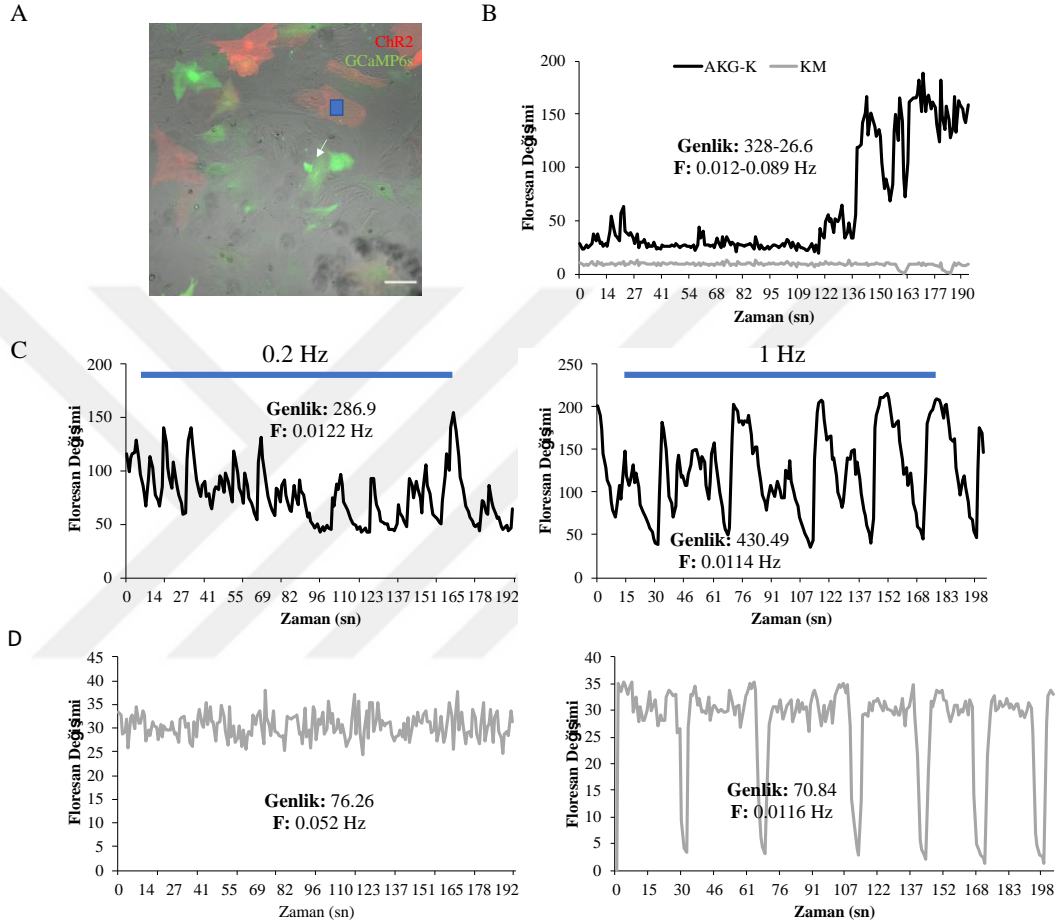
ürettikten sonra da atımlarının devam ettiği ve optogenetik aracın hücrelerin fonksiyonunu etkilemediği tespit edildi.



Şekil 6.14.28 Optogenetik araçlar ile hücrelerin elektriksel aktivitesinin kontrolü. Optogenetik araçlar olan ChR2 ve GCaMP6s üreten (A) AKG kültürü, (B) AKG ve kardiyomiyosit kokültürlerinin floresan görüntüleri. Sırasıyla bu tek başına ve kokültürlerdeki (C, D) AKG nöronlarındaki floresan değişimi gösteren grafik. (E) AKG ve kardiyomiyosit kokültürde kardiyomiyositin kasılma-gevşeme grafiği. ChR2: kırmızı, GCaMP6s: yeşil, Ölçek çubuğu: 50 μm .

Nöronların Ca^{2+} iyonuna bağlı floresan değişimine ve kardiyomiyositlerin atımlarının devam ettiği belirlendikten sonra, hücreler arası elektriksel aktiviteyi incelemek amacıyla ChR2 üreten kardiyomiyosidler mavi ışıkla uyarıldı. Bunun için, kokültürde ChR2 üreten kardiyomiyosit ile bağlantılı olduğu düşünülen, GCaMP6s üreten ve spontan aktiviteye sahip kalbe özgü AKG nöronları belirlendi (Şekil 6.14.29 A). ChR2-kardiyomiyosit 0.2 Hz ve 1 Hz olmak üzere iki farklı frekanstaki mavi ışık ile uyarılarak hangi frekansın kalbe özgü AKG nöronun spontan aktivitesini değiştireceği araştırıldı (Şekil 6.14.29 C). 0.2 Hz ışık ile uyarım sonrası AKG nöronundaki uç uca (peak to peak) genlik ve frekans değerlerinde bir farklılık bulunmazken, kardiyomiyosit hücrelerinin 1 Hz mavi ışık uyarımı sonrasında nöronun spontan aktivitesine kıyasla genlik ve frekans değerlerinde artış tespit edildi (Şekil 6.14.29 B, C). Çözünürlüğün düşük olmasından dolayı, uyarılan kardiyomiyositin dakikada atım değerlerinde bir değişiklik gözlemlenmedi. Optogenetik uyarımın kasılıp gevşeme kinetiğindeki etkisini ortaya koymak amacıyla uyarılan

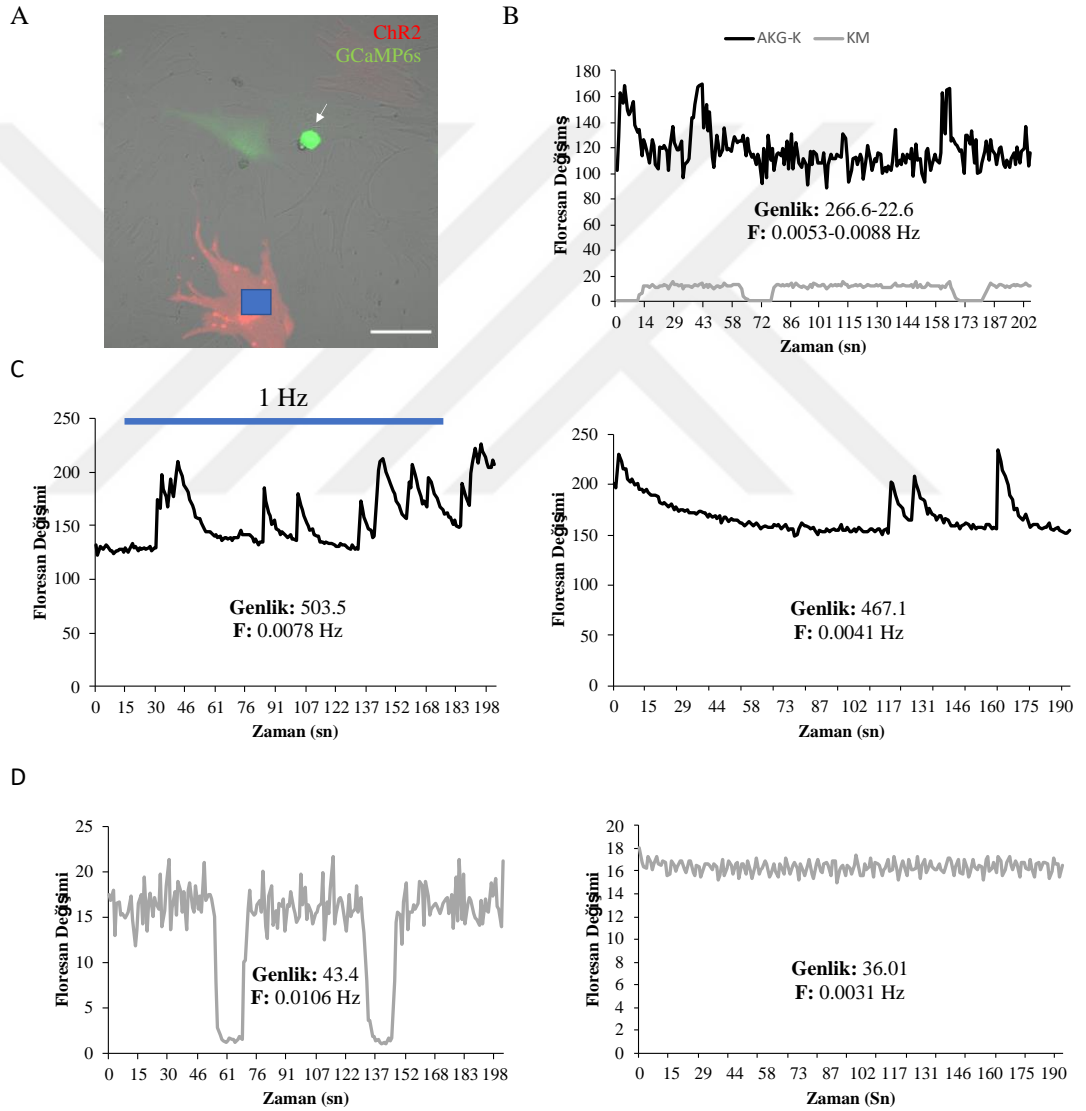
kardiyomiyositle bağlantılı ve senkronize olan GCaMP6s üreten kardiyomiyosit seçilerek, Ca^{+2} değişim sinyali analiz edildi. 1 Hz mavi ışıkla uyarılan kardiyomiyosit ile bağlantılı kardiyomiyositin Ca^{+2} değişimine ait sinyallerin sıklaştığı ve buna bağlı olarak frekansın arttığı bulundu (Şekil 6.14.29 D). Bu nedenle, bir sonraki deneylerde Chr2 üreten kardiyomiyosit hücreleri öncelikli olarak 1 Hz mavi ışık ile uyarıldı.



Şekil 6.14.29 Chr2 üreten kardiyomiyosit ve GCaMP6s-ifade eden spinal nöron kokültürlerinde optogenetik uygulama ile hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kontrolü. (A) Konfokal mikroskobuna ait soldurma (bleaching) uygulaması ile Chr2 üreten kardiyomiyosite ışık uyarımı (mavi çizgi) sonucunda GCaMP6s üreten AKG nöronlarında (beyaz ok) Ca^{+2} değişiminin takibi. 0.2 Hz ve 1 Hz 488 nm lazer uyarımı boyunca (mavi çizgi) sırasıyla (C) GCaMP6s-AKG nöronundaki ve (D) GCaMP6s üreten kardiyomiyositin floresan değişim grafiği. Chr2: kırmızı, GCaMP6s: yeşil, ölçek çubuğu: 100 μm .

Taranan alanlarda, Chr2 üreten kardiyomiyosit ve bağlantılı kurduğu GCaMP6s üreten kalbe özgü AKG duyu nöronları belirlenerek, etkisinin ortaya konulduğu 1 Hz mavi ışık uyarımı sonrasında hücrelerin floresan değişimini takip edildi (Şekil 6.14.30, Şekil 6.14.31). Şekil 6.14.30 A'da gösterilen Chr2-kardiyomiyositin mavi ışık

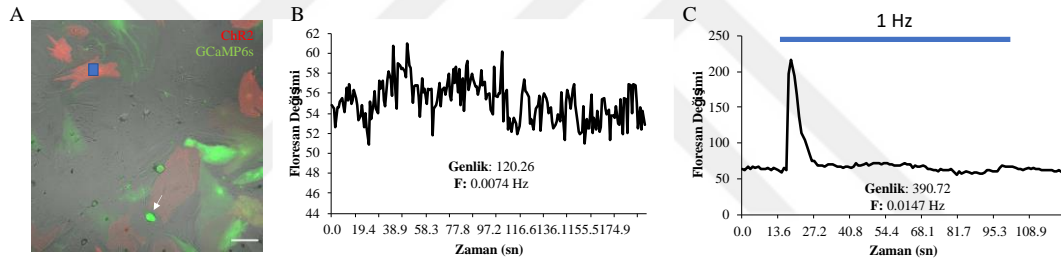
uyarımı boyunca bağlantılı olduğu GCaMP6s-AKG nöronun floresan değişimine ait genlik ve frekans değerlerinde artış tespit edildi (Şekil 6.14.30 B, C). Uyarım sonrasında ise GCaMP6s-AKG nöronunda floresan değişim sinyaline ait genlik ve frekans değerlerinde düşüş tespit edildi (Şekil 6.14.30 C). ChR2-kardiyomiyosit ile bağlantılı olduğu gözlemlenen ve GCaMP6s üreten kardiyomiyosit incelendiğinde ise, mavi ışık uyarımı sırasında Ca^{+2} iyonuna bağlı sinyalin frekans ve genlik değerlerinde artış, uyarım sonrasında ise hücrenin spontan aktivitesine geri döndüğü belirlendi (Şekil 6.14.30 B, D).



Şekil 6.14.30 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve GCaMP6s-ifade eden spinal nöron kokültürlerinde optogenetik uygulama ile hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kontrolü. (A) Konfokal mikroskobuna ait soldurma (bleaching) uygulaması ile ChR2 üreten kardiyomiyosit hücrelerine ışık gönderimi (mavi çizgi) ve uyarım sonucunda GCaMP6süreten AKG nöronlarında (beyaz ok) Ca^{+2} değişiminin takibi. (C)

GCaMP6s-AKG nöronun sırasıyla mavi ışık uyarımı boyunca ve sonrasında floresan değişim grafiği. ChR2-kardiyomiyositle bağlantılı GCaMP6s üreten kardiyomiyositin sırasıyla mavi ışık uyarımı boyunca ve sonrasında floresan değişim grafiği. ChR2: kırmızı, GCaMP6s: yeşil, ölçek çubuğu: 100 μm .

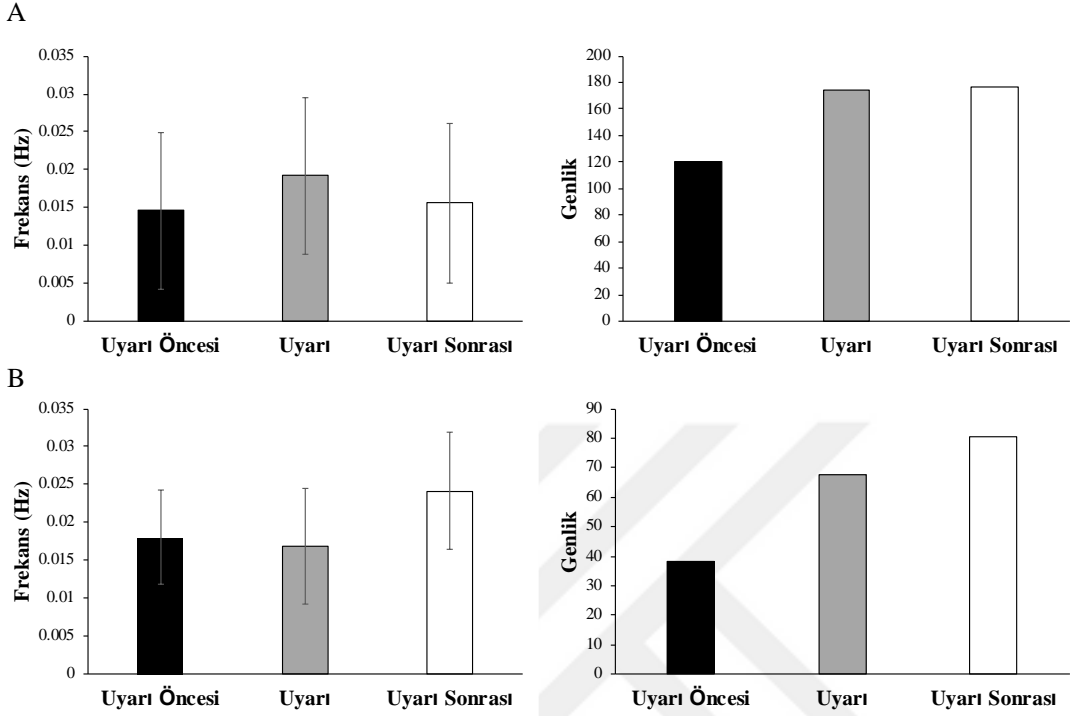
Spontan olarak aktif olan nöronların dışında, ChR2 üreten kardiyomiyositlerin mavi ışık uyarımının suskun (herhangi bir floresan değişimi bulunmayan) kalbe özgü AKG nöronlardaki Ca^{+2} iyonuna bağlı değişimi üzerindeki etkisi incelendi. Bunun için, floresan mikroskopu altında GCaMP6s üreten ve Ca^{+2} değişimi gözlemlenmeyen AKG nöronu ile aksonal bağlantı kurduğu ChR2 üreten kardiyomiyosit belirlendi (Şekil 6.14.31 A, B). Sonrasında, hedeflenen kardiyomiyosit 1 Hz mavi ışık ile uyarılarak nörondaki floresan değişimi takip ve analiz edildi (Şekil 6.14.31 C). Uyarım sonrasında, nörondaki Ca^{+2} iyonuna bağlı sinyal frekansının arttığı ve nöronun aktif hale geçtiği tespit edildi (Şekil 6.14.31 C). Yapılan analizlerle, kokültürlerde hücreler arası bağlantının, optogenetik yöntemiyle incelenebildiği sonucuna varıldı.



Şekil 6.14.31 ChR2 üreten kardiyomiyosit ve GCaMP6s-ifade eden spinal nöron kokültürlerinde optogenetik uygulama ile hücrelerin elektriksel aktivitelerinin kontrolü. (A) Konfokal mikroskobuna ait soldurma (bleaching) uygulaması ile ChR2 üreten kardiyomiyositin ışık ile uyarımı (mavi çizgi) ve sonrasında GCaMP6s üreten AKG nöronlarında (beyaz ok) Ca^{+2} değişiminin takibi. (B) Uyarım öncesi ve (C) sonrasında, GCaMP6s-AKG nöronundaki floresan değişimini gösteren grafik. ChR2: kırmızı, GCaMP6s: yeşil, ölçek çubuğu: 100 μm .

Optogenetik yöntemin, kardiyomiyosit ve bağlantılı olduğu kalbe özgü duyu nöronlarındaki etkisini ortaya koymak amacıyla, uyarı öncesi, uyarı sırasında ve uyarı sonrasında görüntüsü alınan hücrelerin Ca^{+2} iyonuna bağlı sinyal frekans ve genlik değerleri oluşturuldu (Şekil 6.14.32). Kardiyomiyositlerin mavi ışık uyarımı boyunca, kardiyak aferentlerin Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan sinyallerinde frekans ve genlik değerlerinde bir artış tespit edildi (Şekil 6.14.32). GCaMP6s üreten kardiyomiyositlerinde ise, uyarım sırasında Ca^{+2} değişim sinyallerinin genliğinde bir artış gözlemlenirken, uyarım sonrasında da etkinin sürdüğü tespit edildi. Ayrıca, uyarım sonrasında incelenen nöronun aktivitesi uyarım öncesine dönerken (Şekil

6.14.32 A), kardiyomiyosit hücrelerine ait Ca^{+2} sinyal frekansının istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte arttığı gözlemlendi (Şekil 6.14.32 B).



Şekil 6.14.32 Optogenetik yöntem kullanılarak kokültürdeki nöron ve kardiyomiyosit hücrelerinin frekans ve genlik değerlerini gösteren grafik. Kokültürde ChR2 üreten kardiyomiyositlerin mavi ışıkla uyarılması öncesi ve sonrası GCaMP6s üreten (A) kalbe özgü AKG nöronlarında ve (B) kardiyomiyositlerin frekans ve genlik değerleri.

Elde edilen veriler sonucunda, optogenetik yöntem kullanılarak *in vitro* ortamda kalbe özgü duyu AKG nöronları ve kardiyomiyositler arasındaki iletişimin varlığı gösterilmiş olup, nöronun Ca^{+2} iyonuna bağlı aktivitesi kardiyomiyosit üzerinden kontrol edilebilmiştir.

7. TARTIŞMA

Kasılma sinyali kalbin sağ üst atrium duvarında bulunan özelleşmiş kardiyomiyositler içeren ve doğal kalp pili olarak da bilinen sinoatriyal düğüm tarafından başlatılmaktadır (1). Sinoatriyal düğüm kalp ritmini, iletim hızını, miyokardiyal kasılmayı ve gevşemeyi kontrol eden parasempatik ve sempatik sinirler ile etkileşim halindedir (2,3). Sempatik ve parasempatik sinirler otonom sinir sisteminin bir parçasıdır ve merkezi sinir sisteminden kardiyak dokuya motor komutları taşımaktadır (2–4,128). Sempatik ve parasempatik sinirlere ek olarak, kardiyak otonom sinir sistemi birbirleriyle ve duyu sinirleri ile iletişim halinde bulunan intrinsik kardiyak gangliyon ve ekstrakardiyak intratorasik gangliyon kalp fonksiyonunu düzenler (55). Kalpte oluşan basınç, ağrı, gerilme gibi duysal veriler kalbe dallanan ve hücre gövdeleri AKG veya NG’da bulunan duyu sinirleri tarafından beyne iletilmektedir (2,6). Kol, bacak gibi ekstremiteler ile kalp, akciğer, bağırsak gibi iç organlar olmak üzere farklı hedeflere dallanan AKG duyu nöronları omuriliğin farklı seviyelerine ulaşarak beyne sinyal iletimi gerçekleştirir (7).

AKG nöronları gelişimsel süreçte vücudun uzaysal konumunu algılayan proprioseptör, mekanik değişimlere duyarlı düşük eşikli mekanoreseptörler, soğuk veya sıcak ile uyarılan sıcaklık reseptörleri, ağrıdan sorumlu nosiseptörler ve kaşıntıyı algılayan pruriseptör olmak üzere farklı alt tiplere farklılaşmaktadır (8). AKG nöronlarının birbirinden farklı topografik pozisyona sahip olması ve çeşitli duyuları algılamak üzere özelleşmesi, duysal verinin yeri ve tipinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. AKG nöronlarından farklı olarak, iç organlara ait duysal veriyi beyne iletmekle görevli olan NG sadece duyu nöron gövdelerini değil ayrıca parasempatik fiberleri de içermektedir. NG nöronlarının optogenetik araçlarla incelenmesinde, bu nöronların ilişkili olduğu organa özelleşerek sadece duysal veriyi beyne ilemediği ayrıca o bölgenin fonksiyonel işlevi üzerinde de etkisi olduğu raporlanmıştır (9,10). AKG ve NG nöronlarının taşınan duysal veri ile geri bildirim mekanizması beyinde sonlanan otonom sinirlerinin oluşturduğu motor komutu düzenlediği ön görülmüştür (11). Önemli bir role sahip olmasına rağmen AKG veya

NG nöronları ile kalpten gelen duyuşal bilginin iletim mekanizması moleküler ve hücreşel düzeyde halen tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, kalbe özgü duyu nöronlarının ilettiğı duyuşal verinin tanımlanması ve kardiyomiyosit hücreleri ile arasındaki moleküler ve elektrofizyolojik ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk aşama olarak, kardiyak duyu sinir hücreleri Di-8-ANEPPQ, DiI, Fluorogold ve Retro-AAV2-tdtomato retrograd ajanlar ile *in vivo* işaretlenmiş ve bu boyaların işaretleme kapasitesi karşılaştırılmıştır. Diğere retrograd boyalara oranla işaretleme kapasitesi en yüksek olan Di-8-ANEPPQ ile *in vivo* işaretlenen ve AKG ve NG'da bulunan kardiyak aferentler FACS ile saflaştırıldı ve diğere sinir hücreleri ile benzerlikleri veya farklılıkları incelemek amacıyla RNA dizi analizi yapıldı. Ayrıca, kalbe özgü duyu nöronlarının kültürü veya kardiyomiyosit hücreleri ile birlikte hücre kaplarına ekilerek, trofik etki ve elektriksel iletişim incelenmiştir.

Literatürde, kalbe dallanan duyu sinir hücre gövdelerinin NG ile boyun omurları (C5-C8) ve gövde omurları (T1-T4) arasında bulunan AKG'da yer aldığı gösterilmiştir. Literatürde, bu çalışmalar retrograd boyaların kalp kasına enjeksiyonu ve ardından ilintili duyu sinirlerinin takibi ile kısıtlı sayıda histolojik inceleme ile sınırlı kalmıştır (12,96). Retrograd floresan boya ile işaretlenmiş kalbe özgü NG ve AKG duyu nöronları histolojik incelemenin yanında çeşitli ağrı uyaranlarına verdikleri cevaplar *in vitro* ortamda ölçülmüştür (16). Bu tez çalışması ile kalbe özgü AKG ve NG duyu nöronları mRNA düzeyinde tanımlanabilmiş ve kardiyomiyosit ile olan elektriksel iletişimleri incelenebilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilecek bilgi, ileriki çalışmalarda kalp-sinir sistemi arasındaki etkileşim mekanizmasının ortaya konulmasına ve hastalıkların patolojisinin ışık tutma kapasitesine sahiptir.

Literatürde yapılan çalışmalardan ve SABITA kapsamında elimizde bulunan retrograd boyalardan yola çıkarak, kalbe özgü duyu nöronları işaretlemek Di-8-ANEPPQ, DiI ve Fluorogold gibi sentetik boyalar ile son yıllarda öne çıkan yeni jenerasyon rAAV2-retro viral vektörü retrograd ajan olarak belirlendi ve *in vivo* nöron işaretleme kapasiteleri karşılaştırıldı (13,15,16,99,104). Lipofilik özelliğinden dolayı

hücre zarında entegre olan DiI ve Di-8-ANEPPQ boyaarı bu özelliği ile verildikleri bölgeden geriye doğru taşınarak ilintili nöron veya nöron gruplarını floresanca işaretleyebilmektedirler (99,129). Ayrıca, Di-8-ANEPPQ hücre zarındaki elektriksel potansiyel farkına bağlı olarak floresan şiddetini değiştirmekte ve hücrede gerçekleşen voltaj değişimlerinin takibinde kullanıldığı çalışmaları bulunmaktadır (98). Diğer bir retrograd boya olan Fluorogold'un da literatürde sinir takibi uygulamalarına dair çalışmaları bulunmaktadır (100). Son zamanlarda geliştirilen bir virüs teknolojisi olan rAAV2-retro ajanı da sentetik boyalar ile benzer şekilde enjekte edildiği bölgeden geriye doğru hareket ederek ilgili nöronları işaretleyebilme kapasitesine sahip olduğu raporlanmıştır (104).

Kalp gibi sabit olmayan bir organa yapılacak enjeksiyonun zorluğu ve operasyon sonrası mortalitenin düşük olmasından dolayı, retrograd boyaaların işaretleme kapasiteleri daha basit bir model olan siyatik sinire incelenerek karşılaştırıldı (130). Yapılan analizler sonucunda, Di-8-ANEPPQ boyasının uygulanan diğer retrograd boyalara göre daha fazla sayıda siyatik sinir ile ilintili L3-L5 AKG sinir hücre gövdelerini işaretlediği tespit edildi. Bu gözlem, literatürde yapılan nazal epitelyuma ve ex vivo olarak tavuk omuriliğine Di-8-ANEPPQ enjeksiyonu sonrasında elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir (99,129).

Retrograd boyaaların siyatik sinir enjeksiyonundan sonraki işaretleme kapasiteleri karşılaştırıldıktan sonra, kalbe özgü duyu nöronlarını floresanca işaretleme amacıyla farede kalp operasyonları optimize edildi. Kalp operasyonun gerçekleştirilmesi için öncelikli olarak farenin traketomi veya oral yol ile entübe edilerek, solunum cihazına bağlanması gerekmektedir. Literatürde, entübasyonu kolaylaştırmak için tasarlanmış platformlar veya entübasyona gerek duyulmadan ultrason cihazı kullanılarak kalp operasyonlarının gerçekleştirilebildiği raporlanmıştır (114,131–133) Bu tez çalışmasında ise, Vandirvot ve ark. tarafından tasarlanan ve 60-80° eğime sahip platform düzenek kullanılarak epiglottis görünür hale getirildi ve fareler oral yoldan entübe edildi (114).

Kalbin çeşitli bölgelerine yapılan retrograd boya enjeksiyonundan sonra işaretli nöronların sayıca ve topografik organizasyon bakımından bir farklılık olmadığını gösteren çalışmalar göz önünde bulundurularak, kalbin sol kulakçığının apeksi boyanın uygulanacağı bölge olarak seçildi (14,96). Önceki çalışmalar, Kalbin çemberlerine ayrı ayrı yapılan fast blue enjeksiyonu ile sol kulakçık apeksi dahil olmak üzere kalbin farklı bölgelerine horseradish peroxidaz uygulaması sonucunda enjeksiyon bölgesinden bağımsız olarak işaretlenen benzer sayıda ve anatomik pozisyonda kalbe özgü nöronların işaretlendiği raporlanmıştır (12,96). Ayrıca, enjeksiyon sonrası iç organlar incelenerek floresan sinyalinin tespit edilememesi, işaretlenen nöronların kalp ile ilgili olduğunu göstermiş, sistemik dağılımı ve boyanın başka organlara sızma olasılığını ortadan kaldırmıştır.

Retrograd boyaların kalbe enjeksiyonundan sonra, işaretlenen kalbe özgü duyu nöronları literatüre benzer şekilde iki taraflı C4-C8 ile T1-T9 AKG sekmeleri ve NG'da tespit edilmiştir (12,14,96). Elde edilen veriler ile ilk defa kalbin apeksine dallanan duyu nöronlarının C1-4, T10-12 ile L AKG sekmenlerinde bulunmadığı gösterilmiştir. Uygulanan retrograd sentetik boyaların aksine, kalbe rAAV2-retro-tdtomato enjeksiyonu sonucunda sadece kalp ile ilintili duyu nöronlarının değil ayrıca olası sistemik dağılımdan dolayı bütün AKG sekmelerinde işaretli hücelere rastlanmıştır. Bu nedenle, ilerleyen deneylerde kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek amacıyla of rAAV2-retro-tdtomato virüsü tercih edilmemiştir. Ancak, rAAV2-retro-tdtomato virüs teknolojisinin optimizasyonu ile hedeflenen hücreler *in vivo* işaretlenmekle kalmayacak ayrıca GCaMP6f gibi Ca^{+2} indikatörlerinin de üretilebilmesi sağlanabilecektir (134). Bu nedenle, ileriki deneylerde kalbe özgü nöronları işaretlemede rAAV2-retro ajanının kullanılması avantaj sağlayacaktır. Uygulanan çeşitli retrograd boyaların içerisinde, Di-8-ANEPPQ işaretlediği nöronların yüksek floresana sahip ve sayıca fazla olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında değerlendirilen retrograd ajanları içerisinde, Di-8-ANEPPQ boyasının AKG ve NG'da sayıca ve floresan şiddeti yüksek olacak şekilde kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlediği gösterilmiştir. Literatürde, DiI ve Di-8-ANEPPQ boyasının nazal epitele veya ANEPP ailesinin *ex vivo* tavuk omuriliğine

enjeksiyonundan sonra, Di-8-ANEPPQ ile işaretli nöronların en yüksek floresana sahip olduğu raporlanmıştır (99,129). Sonuç olarak, elde edilen bulgular iki taraflı C3-C8 ile T1-T10 arasındaki AKG ve NG'da bulunan kalbe özgü duyu nöronlarını Di-8-ANEPPQ boyasının en verimli şekilde işaretlediğini göstermiştir.

Kalbe ve siyatik sinire yapılan retrograd boyaların karşılaştırılması sonucunda, Di-8-ANEPPQ sayıca ve floresan şiddeti bakımında yüksek hücreyi işaretleme kapasite sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, kalbe özgü duyu nöronları işaretlemek amacıyla Di-8-ANEPPQ kullanılmıştır. Di-8-ANEPPQ'nun kalbe enjeksiyonundan sonra kalbe özgü duyu nöronlarına ulaşması için gerekli günü belirlemek amacıyla operasyondan 1, 3, 5, 7 ve 14 gün sonra NG ve AKG'ları çıkarılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, diğer günlere göre hem AKG ve hem de NG nöronlarında enjeksiyondan 7 gün sonra yüksek floresana sahip ve sayıca fazla Di-8-ANEPPQ işaretli hücre gözlemlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek amacıyla 7 günlük bekleme süresinin literatürde benzer şekilde kalbe özgü duyu nöronlarını işaretlemek için tercih edildiği görülmüştür (12,14).

Di-8-ANEPPQ boyasının retrograd nöron işaretleyici olmasının yanında, hücre voltaj değişiminin takibi için de kullanıldığı gösterilmiştir (126). Ancak literatürün aksine Di-8-ANEPPQ ile boyanmış primer kültürlerde, spontan kardiyomiyosit ve uyarılmış veya spontan sinir hücrelerinde voltaj değişimi gözlemlenmemiştir. Ayrıca, WGA gibi bazı retrograd boyaların sinaptik boşluktan atlayarak post-sinaptik alana geçtikleri gösterilmiştir (Levy et al., 2017). C ve T sekmeleriyle ilintili omuriliği bakıldığında, Di-8-ANEPPQ işaretli hücre görülmemesi Di-8-ANEPPQ boyasının sinaptik boşluğu geçemediğini göstermektedir. Diğer taraftan, Di-8-ANEPPQ'nun yaklaşık 500 nm dalga boyu ile uyarılıp, 700 nm ve civarında ışığa verdiği raporlanmıştır (129). Ancak bulgularımız Di-8-ANEPPQ'nun 488 nm ile 561 nm dalga boyu ile uyarıldığı ve 540 nm ile 700 nm arasında geniş bir yelpazede ışığa verdiğini göstermiştir. Di-8-ANEPPQ'nun sahip olduğu geniş uyarılma ve ışığa yelpazesi, yaptığımız Tuj-1 boyamalarında 633 nm lazer ve üstü ile uyarılan ikincil antikoları seçmemize neden olmuştur. Dikkat edilecek diğer bir husus ise, Di-8-

ANEPPQ floresan sinyalinin fiksatif ile muamelesinden sonra solduğu ve saptanamadığı, bu nedenle fiksatif öncesi ve sonrası yapılan floresan çekimlerinin üst üste getirilerek Di-8-ANEPPQ işaretli nöronların incelenebileceğidir. Elde edilen bu veriler göz önüne alındığında, Di-8-ANEPPQ ile işaretlenen kardiyak aferentlerin nörona özgü Tuj-1 proteinini ürettiği ve bu nedenle nöral karakterde olduğunu göstermiştir.

Literatürde, bulunduğu gangliyondan bağımsız olarak periferik duyu nöronları hücre gövde büyüklüklerine göre sınıflandırılmış; 40 μm 'den büyükler A tipi, 20 ve 40 μm arasındakiler orta boyuttaki B tipi ve 20 μm 'den küçüklerin ise C tipi nöron oldukları varsayılmıştır (135,136). C ve B tipi duyu nöronlarının sıcaklık ve ağrı ile ilgili duyu veriyi iletmekle sorumluluğu olduğu, büyük boyuttaki A tipi duyu nöronlarının ise mekanik değişiklikleri algılayan mekanoreseptör oldukları ileri sürülmüştür (29,136). Kabul gören duyu nöron hücre gövdesi boyutuna göre sınıflandırma göz önüne alındığında, genel olarak 20 μm 'den küçük hücre gövde çapına sahip olduğu bulunan AKG ve NG kardiyak aferentlerin küçük boyutlu C tipi nöron grubuna ait olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre gövde alan ve çap analizinin yanında, bu tez çalışması kapsamında kalbe özgü duyu nöronları ilk defa doku bazında 3D görüntülenmiş ve hücrelerin dokudaki dağılımları analiz edilmiştir. Yapılan 3D haritalama, Di-8-ANEPPQ işaretli kalbe özgü duyu nöronlarının AKG ve NG'da homojen dağıldıklarını göstermiştir.

Yapılan literatür taraması sonucu bilimiz ışığında, kalbe özgü AKG ve NG duyu nöronları doku boyutunda incelenmiş, primer kültürü ise saflaştırılmadan yapılarak gerçekleştirilmiştir (12,14,16). DiI ile *in vivo* işaretlenmiş ve enzimatik aşamalardan geçirilerek hücre kaplarına saflaştırılmadan ekilen NG ve AKG kardiyak aferentlerin ağrı duyarlılıkları ATP, serotonin gibi kimyasallara verdikleri cevap ile değerlendirilmiştir (16). Bu tez ilk defa kardiyak aferentler Di-8-ANEPPQ ile *in vivo* işaretlenmiş kalbe özgü duyu nöronları FACS cihazı ile saflaştırılmış ve *in vitro* ortamda canlılıklarını sürdürmüşlerdir. Yapılan floresan ayırıştırma ve hücre kültürü koşulları ile yüksek saflıkta ve canlılıkta kalbe özgü duyu nöronları elde edilmiş ve incelenmesine olanak sağlamıştır. Ayrıca, FACS ile saflaştırılmadan Di-8-ANEPPQ

işaretle hücre kaplarına ekilen heterojen nöron topluluğunun %34'nü kalbe özgü duyu nöronlarını oluşturduğu ilk defa bu tez çalışması ile ortaya koyulmuştur.

Literatürde, periferik sinir sisteminin elemanları olan AKG ve NG duyu nöronları ile merkezi sinir sistemindeki nöron ve astrosit hücre toplulukları RNA dizilime analizi ile incelenmiş ve yüksek veya düşük ifade ettikleri gen grupları göz önünde bulundurularak sınıflandırılabilmiştir (19–21). Periferik sinir hücrelerinin RNA dizilime yöntemi ile doku (137,138), zenginleştirilmiş nöron alt grupları (78,80,139) veya tek hücre düzeyinde (19,20,140) incelendiği raporlanmıştır. Nöronları herhangi bir saflaştırma işleminden geçirilmeden doku boyutunda araştıran çalışmalarda glia, bağ doku ve fibroblast gibi nöron olmayan hücelere ait gen ifadelerinin varlığı analizleri zorlaştırmıştır (137,138). Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla, analiz edilecek genel veya belirlenen bir sınıfa ait sinir hücre grubu transgenik hayvan hatları, floresan boya veya manyetik boncuk ile işaretlemiş ve incelenecek nöronlar FACS veya manyetik ayırıştırma cihazı kullanılarak saflaştırılabilmiştir (78,80). Benzer şekilde, Di-8-ANEPPQ ile *in vivo* işaretlenen kalbe özgü duyu nöronları FACS cihazında 488 nm dalga boyu ile uyarılmış, 630 ± 30 ile 513 ± 40 ışımaya filtreleri kullanılarak alınan kapılama yöntemi ile başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır. FACS işlemi sırasında, kardiyak aferentlerle karşılaştırılmak üzere Di-8-ANEPPQ ile işaretlenmeyen hücreler de belirlenmiş ve inceleme için ayırıştırılarak kültüre edilmiştir. Ancak, yapılan analizler sonucu Di-8-ANEPPQ (-) AKG nöronlarının floresanca işaretli AKG hücrelerine göre sayıca az ve küçük gövdeli olması total nöron popülasyonunun verimli bir şekilde elde edilemediğini göstermektedir. Diğer taraftan, alınan floresan görüntülerde kalbe özgü nöronların Di-8-ANEPPQ boyasını hücre gövdelerinde içerdikleri, kültürde uzun süre canlılıklarını korudukları ve Tuj-1 protein işaretleyici kullanılarak nöron oldukları teyit edilmiştir. Yapılan immün boyamalar, Tuj-1 işaretli nöronlar dışında sadece DAPI ile boyanan ve sayıca az glia hücresi varlığını göstermiştir. FACS'tan hemen sonra gözlemlenmeyen ancak kültürün ilerleyen günlerinde ortaya çıkan glia hücrelerinin, FACS sırasında nöron somasına birleşik halde geldiğini ve zamanla nörondan ayrılarak bölünerek çoğaldığını düşünmekteyiz. RNA dizi analizi analizlerinde kullanılan hücreler FACS cihazı ile saflaştırmadan hemen sonra alındığı için, az da

olsa RNA örneklerimizdeki glia kontaminasyonunun analizleri etkilemediğini düşünmekteyiz. Ayrıca, RNA dizilime ve sonrasında yapılan kantitatif revers-transkriptaz reaksiyonu ile saflaştırılan kalbe özgü AKG veya NG nöronlarının vGlut2 ve Tuj-1 genlerini mRNA seviyesinde ifade ettikleri tespit edilerek nöron oldukları sonucuna varılmıştır. Bu yöntem, nöron olmayan hücrelere ait mRNA kontaminasyonunu önleyerek kalbe özgü duyu nöronlarının başarılı şekilde incelenmesine olanak sağlamıştır.

Sinir sistemi hücreleri, kütle (bulk) mRNA analizlerinin yanında son zamanlarda geliştirilen tek hücre düzeyinde RNA dizi analizi tekniği kullanılarak da sınıflandırabilmiştir (19,20). Ray ve ark. fare ve insan kökenli AKG nöronlarını RNA düzeyinde karşılaştırarak benzerliklerini ortaya koymuş ve fare modelinin insan AKG nöronlarını çalışmak için güvenilir olduğunu tespit etmişlerdir (141). Ancak bilginiz dahilinde kısıtlı sayıdaki çalışma, organa özgü nöronları RNA dizi analizi yöntemi ile incelemiştir (24,25). Diğer taraftan, bir organa özgü olması gözetilmeden, NG veya AKG hücrelerinin kanal ve transkripsiyon faktörleri bakımında gen ifadelerinin karşılaştırarak inceleyen çalışmalar mevcuttur (82). Bu tez çalışması ile literatürde ilk defa, RNA dizi analizi yöntemi kullanılarak kalbe özgü duyu nöronlarının genel gen profili incelenmiştir. Çalışmamız kapsamında, kalbe özgü duyu sinirlerinin gen ifadelerinin tanımlanması, diğer duyu sinirleri ile gen ifade seviyesinde farklarının tespit edilmesi ve kardiyomyosit ile olan kokültürlerinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirmek amacıyla global gen ekspresyonu analizleri RNA sekanslama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalbe özgü AKG ve NG nöronları ile total AKG ve NG nöron popülasyonunun genel gen profilleri karşılaştırıldığında, kökenlerine göre AKG ve NG nöronlarının birbirlerinden; kalbe özgü duyu nöronlarının ise genel duyu nöron popülasyonundan ayrıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, diferansiyel analiz yöntemi kullanılarak kalbe özgü AKG nöronlarının total AKG nöronlarına göre Scn10a (Nav1.8), Scn11a (Nav 1.9), P2Xr2, Chrn4a, Kcnp2i, Kcnp4, Fxyd2 iyon kanalları ile Mrgrpa3, Mrgrpx1, Mrgrpb4, Cystlr2 G protein kapılı iyon kanallarına ait genleri 1.5 kat ve üstü olacak şekilde ifade ettiği tespit edilmiştir. Yapılan diferansiyel ekspresyon analizine göre kalbe özgü duyu nöronlarının özelleşmesinde az sayıda genin yüksek

ifadesinin yanında, bazı özelliklerin baskılanması için belirtilen 300 üzeri genin baskılanması gerektiği sonucu çıkarılmıştır.

Kalbe uygulanan MI sonrası, bir purinerjik reseptör olan P2Xr2 üretiminin AKG ve NG duyu nöronlarında arttığı ve bu reseptörlerin ağrı iletiminden sorumlu oldukları raporlanmıştır (44,45). RNA dizi analizi sonucunda, kalbe özgü AKG ve NG nöronlarındaki P2Xr2 reseptörünün yüksek ifadesi, bu genlerin ağrı ile ilişkili ve kalple ilişkili olabileceğini göstermektedir. Kalbe özgü AKG nöronlarında yüksek ifade edilen bir başka reseptör olan MrgprX1'nin, kaşıntı ile ilintili duyu veriyi iletmekle sorumlu olduğu raporlanmıştır (142). MrgprX1 reseptörünün fonksiyonel ortoloğu olan ve jugular ganglionda bulunan Mrgpr11 reseptörünün ise kolinerjik bronş lümenin daralması (bronchoconstriction) ve solunum yollarının hassasiyetini arttırmada rol oynadığı ve MrgprX1'den farklı bir görev üstlendiği tespit edilmiştir (23). Ayrıca, kalbe özgü AKG nöronlarında yüksek ifade edildiği tespit edilen Mrgpa3, Mrgpb4, Mrgpx1 reseptörlerinin, ağrıya duyarlı AKG nöronlarında bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (87). Bu veri, literatürde belli fonksiyonları tanımlanmış reseptörlerin farklı dokularda görevlerinin değişebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, kalbe özgü AKG nöronlarında yüksek ifade edilen Nppb ve somastation nörotransmitterlerinin, derideki kaşıntıyı iletilmesinden sorumlu oldukları literatürde raporlanmıştır (143). Ancak, kalbe özgü duyu nöronlarında yüksek ifade edildikleri bulunan Nppb ve Somastatinin kalpteki duyu veri iletimindeki görevi merak konusudur.

Patojen veya yaralanma sırasında immün hücreleri NGF, Il-6, TNF gibi inflamatör sitokinler ile serotonin, histamin ve prostaglandin olan PGE2'nin salgılanmasına neden olmaktadır. Salgılanan bu faktörler, ağrıya duyarlı duyu nöronlarında bulunan Trpv1, Scn10a reseptörleri ile etkileşim haline geçerek, bu nöronların depolarizasyonu için gerekli eşik değerini düşürerek veya üretimini artırarak ilgili nöronda hassasiyete (sensitization) neden olmaktadır (89,90). Literatürde, duyu nöronlarının inflamasyon sonrası immün hücreleri ile etkileşim haline geçerek aktif olması ve çalışma mekanizmasını değiştirmesi organizma üzerinde pozitif olduğu gibi negatif etki de oluşturduğu raporlanmıştır (91). İmmün

sistem ve AKG nöronları arasındaki ilişki sadece organ ve sinir ucu ile sinir gövdelerinin bulunduğu gangliyonlarda sınırlı kalmamakla beraber, AKG nöronları ve omurilik arasındaki bağlantıda da varlığı raporlanmıştır (21). RNA dizi analizi sonucunda, kalbe özgü AKG nöronlarında Il-6 reseptörü olan Il31ra, Tnfa8 ve Prostaglandin E3 genlerin yüksek ifade edildiği ve bu genlerin fonksiyonel olarak immün sistem başlığı altında sınıflandığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, kardiyak aferentlerin immün sistemle ilişkili ağrıya duyarlı nöron olduklarını vurgulamaktadır. Ancak, kalbe özgü AKG nöronlarında yüksek ifade edildiği bulunan Il31ra, Ptges3, Nppb, Somatostatin, Tnfaip8 ve Tnfaip8 baskılayıcısı olan Nlrp4c gibi genlerin doku düzeyinde veya fonksiyonel olarak incelenmesinde hangi bölgelerde aktif olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Son zamanlarda geliştirilen RNA dizi analizi tekniği kullanarak ağrıya duyarlı AKG duyu nöronlarını, yüksek veya düşük ifade ettikleri gen gruplarına göre sınıflandıran çalışmalar bulunmaktadır (19,20,139). Bu çalışmalardan, Thakur ve arkadaşları Na⁺ iyon kanalı (Nav1.8) ifade eden ağrıya duyarlı AKG duyu nöronlarını saflaştırarak RNA tekniği ile incelemişlerdir. Yapılan RNA dizi analizi sonucunda, ağrı nöronlarının Fxyd2, Kcnip2, kcnip4, P2Xr2, Scn10a, Scn11a gibi iyon kanalları ile Cysltr2, Mrgpra3, Mrgprb4, Mrgprx1 gibi G kapılı iyon kanallarını; Cyp2j12, Dock11, Mal2, Sst, Nppb, Il31ra gibi immün sistemle ilişkili genleri; Osmr, Nnat, Synpr gibi sinaptik proteinleri üreten ve son olarak Pcfgf6, Zfp760, Zfp946 gibi transkripsiyon faktörlerini ilintili gen listesine ulaşımlardır (80). Diğer bir çalışmada ise transgenik hayvan hatları kullanılarak AKG nöronları, nosiseptif, pruriseptif ve proprioseptif olmak üzere üç gruba ayrıştırılmış ve mRNA düzeyinde incelemiştir. RNA dizilime sonucunda, nosiseptif nöronlarda Kcnip4, Scn10a, Scn11a iyon kanallarının ve pruriseptif grupta ise Chrna4, P2Xr2, Nppb gibi genlerinin yüksek ifade edildiği raporlanmıştır (139). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, bu tez çalışmasında elde edilen kalbe özgü AKG duyu nöronlarının peptiderjik olmayan ağrı nöronu veya pruriseptif nöron tipine ait özellikleri taşıdığı sonucuna ulaşılmıştır.

RNA dizi analizi tekniğindeki gelişmeler, AKG nöronlarının sadece total popülasyon değil ayrıca tek hücre düzeyinde de gen profillerinin incelenmesine olanak

sağlamıştır (19,20,140). Tek hücre düzeyinde transkripsiyon teknolojisini kullanan Zeisel ve ark., AKG nöronlarını temel olarak nörofilament peptiderjik olmayan ve peptiderjik olmak üzere 17 farklı sınıf ile gruplandırmışlardır (20). Elde edilen nöron grupları kendi aralarında karşılaştırılarak, bu sınıflardan nörofilamentin beş farklı, peptiderjik sınıfın iki farklı ve peptiderjik olmayan sınıfının ise üç farklı alt gruba ayrıldığı gösterilmiştir. kalbe özgü AKG nöronlarında yüksek ifade edilen genler göz önüne alındığında, kalbe özgü duyu nöronlarının oluşturulan 17 farklı gruptan peptiderjik olmayan iki nosiseptif alt sınıfına ait olduğu sonucuna ulaşıldı. Tek hücre RNA analiz yöntemi kullanılan diğer bir çalışmada ise lomber seviyesindeki AKG nöronlarının nörofilament, peptiderjik, peptiderjik olmayan ve tirozin hidroksilaz grubu olmak üzere 5 farklı nöron popülasyonuna sahip olduğu raporlanmıştır. Kalbe özgü AKG nöronlarının Usoskin ve ark. oluşturduğu nöron alt grupları ile karşılaştırıldığında, peptiderjik olmayan gruplardan Mrgprd ve P2Xr3 genlerini yüksek ifade eden ile Somastatin adlı geni yüksek ifade ederken P2Xr2 geninin düşük ifade eden diğer alt sınıfa benzer olduğu görülmüştür (19). Bu çalışmalara ek olarak, Li ve ark. tarafından elde edilen ve merkez (hub) olarak adlandırılan Nppb (başlıca genler: Il31ra, Somastatin, Osmr), Scg3 (başlıca genler: Synaptoporin, Mrgprd) ve Ador2b (başlıca genler: Mrgprb4, Mrgpra3) AKG kümelerinin sahip olduğu gen profili ile kalbe özgü AKG nöronlarının benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (140).

Kalbe özgü NG nöronlarında yüksek ifade edilen fibroblast büyüme faktörü 3'ün (fgf3) kalbin gelişimsel sürecinde rol oynayı; Cytochrome P450 epoxygenases (Cyp2j5) ise kardiyovasküler inflamasyonunun düzenlenmesinde aktif görev aldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (144,145). Diğer taraftan, kalbe özgü NG nöronlarında yüksek ifade edildiği tespit edilen Lynx protein LY6/PLAUR domain-containing 6 (Lypd6)'nın nikotik asetil kolin düzenleyici olarak görev aldığı raporlanmıştır (146).

RNA dizi analizi analizlerinde, AKG ve NG örneklerinde ortak olan biyolojik işlemler arasında "Blood Vessel Morphogenesis", "Regulation of Cell Proliferation" ve "Cell Adhesion" başlıkları bulunmaktadır. Kalbe özgü nöronlarda yüksek ifade

edilen genlerin düşük ifade edilenlere göre sayıca az olmasından dolayı Gen Ontoloji Zenginleştirme Analizi'nden sonuç alınamamıştır. Alternatif olarak, Gen Ontoloji terimleri üzerinden yapılan gruplandırmada yüksek ifade edilen genlerin genel olarak "Regulation of Metabolic Process" başlığı ile ifade edilen biyolojik fonksiyon ile ilişkili olduğu tespit edildi. Önemli olarak, metabolik reaksiyonları düzenlemede görev alan genlerin kardiyak aferentlerin fonksiyonel olarak özelleşmesinde rolü olduğu önerilmiştir.

RNA dizi analizi sonucunda yüksek ve düşük ifade edilen genlerin doğrulanması amacıyla literatürde de sıklıkla tercih edilen RT-qPCR tekniği kullanıldı (20,24,81,147). Yapılan RT-qPCR sonucunda, RNA dizi analiziden elde edilen gen profiline benzer şekilde kalbe özgü AKG nöronlarında total duyu nöronlarına kıyasla Ms4a3 genin yüksek, Cx37 genin düşük ifade edildiği, diğer taraftan Beta3 ve vGlut2 genlerinde ise anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç ile, RNA dizi analizi işlemi sonucunda ortaya çıkan gen listesinin güvenilirliği teyit edilmiştir. Ancak, ilerleyen deneylerde, RNA dizilime sonuçlarını güçlendirmek için RT-qPCR yöntemi ile incelenen gen sayısı arttırılmalı ve immunohistokimyasal yöntem ile belirlenen proteinlerin varlığı doku veya hücre kültürü boyutunda kalbe özgü duyu nöronlarında gösterilmelidir.

Kalbe özgü duyu nöronları ve kardiyomiyosit arasındaki elektriksel iletişimi ve hücrelerin birbirleri üzerindeki olası trofik etkisini incelemek amacıyla, iki hücre tipi aynı hücre kabına ekilerek kokültürler oluşturuldu. Ancak kokültürlerin oluşturulması sırasında, glia ve fibroblast hücrelerinin çoğalarak rekabet yarattığı ve analizleri zorlaştırdığı görüldü. Literatür taraması sonucunda, kardiyomiyosit kültüründeki fibroblast sayısını en aza indirmek amacıyla TMRM mitokondri boyası (109), percoll gradyan yöntemi (108) ve AraC antimitotik olmak üzere üç farklı kimyasal test edildi (110,111). Literatürde raporlanan çalışmaların aksine, TMRM boyası ve percoll gradyanı kullanılarak saflaştırılan kardiyomiyosit kültüründe hücre sayısının ve canlılığın az olduğu (108,109), AraC uygulaması sonrasında ise literatüre benzer şekilde kardiyomiyosit kültüründeki fibroblast ve nöron kültüründeki glia hücre çoğalmasının büyük çoğunlukla durduğu tespit edilmiştir (110,111). Bu tez

çalışmasında oluşturulan kültürlerde kullanılan AraC uygulaması, kardiyomiyosit ve nöronların çoğalabilen diğer hücreler baskın hale gelmeden uzun süreli takibine ve analiz edilmesine imkan sağlamıştır.

Literatürde sempatik ve parasempatik otonom sinir sisteminin kalbin işleyişi üzerindeki etkileri ayrıntılı şekilde ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların bazılarında kokültürde nöron ve kardiyomiyosit hücreleri birbirinden fiziksel olarak ayrı tutularak, fizyolojik koşula en uygun şartlar oluşturulmaya çalışılmıştır (49,148). Bu çalışmalar, sıçandan elde edilen sempatik veya parasempatik nöronlar ile sıçan veya UPK hücre temelli kardiyomiyositleri çoklu-elektrot dizisine (MEA) sahip ayrı bölümlere ekerek hücreler arası ilişkiyi elektrofizyolojik düzeyde inceleyebilmişlerdir (49,148). Aynı yaklaşımla bu tez çalışmasında, kardiyomiyosit ve kalbe özgü duyu nöronları aynı hücre kabına farklı bölmelere ekilerek aralarındaki elektriksel iletişim incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, yara iyileşme çalışmalarında kullanılan ibidi 2-insert (149) ile hücreleri koloni halinde büyütmek amacıyla kullanılan cloning-ring aparatları kullanılarak kültür kaplarında ayrı bölmeler oluşturulmuş, ancak bu aparatların kullanımı sırasında hücrelerin kalktığı veya bölmeler arasında çoğalabilen hücrelerin yayılması analizleri zorlaştırmıştır. Buna ek olarak, kokültürlerin hücreleri birbirinden ayırmadan karışık şekilde kokültürlerin oluşturulması, birbiriyle bağlantı kurabilecek kardiyomiyosit ve nöronların taranmasında kolaylık sağladığı deneyimlenmiştir.

Literatürde, MI sonrası vagus sinirin kalpteki hücre canlılığı ve fonksiyonunu iyileştirici etkisi olduğu raporlanmıştır (50). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında da duyu nöron ve kardiyomiyositler arası olası trofik veya canlılık etkisi canlı hücreleri işaretleyen calcein-AM boyası ile, ölü hücre zarından geçebilen propidyum iodür kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, kardiyomiyosit ve kalbe özgü duyu nöron hücreleri tek başına veya birlikte olan kokültürlerinde immün boyama yapılarak nöron hücreleri sayılmıştır. Bulgularımız, ikili kültürlerde tekli kültürlerle oranla hücre canlılık veya ölümünde istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı yönündedir.

Kalbe özgü AKG ve kardiyomiyosit arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla ayrıca elektron mikroskobu ile görüntülemeye başvurulmuştur. Taramalı elektron mikroskobu kullanılarak, AKG eksplant ve kardiyomiyositlere ait kokültürde iki hücre arasında nöron-kas kavşağı görüntülenebilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada kardiyomiyostlerin bağlantılı olduğu AKG nöronlarında ağrı iletiminden sorumlu nöropeptitiler olan SP ve CGRP sentezini arttırdığı raporlanmıştır (43). Benzer şekilde, alınan SEM görüntüleri incelendiğinde, kalbe özgü AKG duyu nöronlarının kardiyomiyositlerle fiziksel bağlantının varlığı tespit edilmiştir.

Bu tezin bir diğer temel amaçlarından biri olan kardiyomiyosit ve kalbe özgü duyu nöronları arasında elektrofizyolojik etkileşim incelemek amacıyla çeşitli yöntemlere başvurulmuştur (49,148). Bu yöntemlerden biri, petri yüzeyindeki elektriksel aktivitenin Xcelligence RTCA Cardio-ECR (ACEA Biosciences) cihazı ile ölçülmesidir. Kardiyomiyositlerden kayıt almak üzere tasarlanmış olan bu cihazda, duyu nöronlarından alan potansiyeli kaydı alınmaya çalışılmış ancak nöronlarının elektriksel aktiviteleri eşik değerinin altında kaldığı için elektrofizyolojik ölçüm alınamamıştır. Ayrıca, tek başına ekilen kardiyomiyosit ile kokültürdeki kardiyomiyositlere ait alan potansiyel değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu nedenle, hücresel elektriksel aktiviteyi incelemek amacıyla Ca^{+2} iyonuna duyarlı Fluo-4 boyası değerlendirilmeye alınmıştır. Literatürde, insan UPK hücre kökenli nöron ve kardiyomiyosit arasındaki elektriksel değişim Fluo-4 Ca^{+2} işaretleyici kullanılarak incelemiş, ancak Ca^{+2} iyonuna bağlı değişiminin özellikleri ve hücreler arası Ca^{+2} iyonuna bağlı senkronizasyon olup olmadığı hakkında bilgi verilmemiştir (150). Her ne kadar, Fluo-4 floresan boyası hücrelerin gerçek zamanlı takibine olanak sağlasa da zamanla solması ve hücreden atılması nedeniyle uzun süreli hücre takibi yapılamamış ve alternatif yöntemler araştırılmıştır. Literatür taraması sonucunda, Fluo-4 gibi sentetik Ca^{+2} işaretleyicilerine kıyasla hücrenin kendi üretmesi, uzun süreli ve gerçek zamanlı hücre takibine olanak sağlaması ve SABITA imkanları dahilinde bulunan GCaMP6s Ca^{+2} işaretleyici kalbe özgü duyu nöronu ve kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişim incelemek amacıyla kullanıldı. Literatürde, GCaMP üreten primer veya UPK temelli AKG hücrelerinin farklı uyaranlara verdikleri cevap incelenmiş ve oluşan floresan

değişimine göre nöronlar fonksiyonel olarak sınıflandırabilmiştir (65,151). Bu tez çalışmasında, AKG ve NG duyu nöronları ile kardiyomiyositlerde GCaMP6s üretimi sağlanarak, hücreler arası Ca^{+2} iyonuna bağlı senkronizasyon gerçek zamanlı ve sonrasında yapılan Matlab analizi kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca, kokültürlerde kardiyomiyositlerle etkileşim halinde bulunan spontan aktif kalbe özgü duyu nöronlarının yüzdesinin tek başına ekilen duyu nöronlarına kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Farklı günlerde incelenen kokültürlerde birbiriyle etkileşim halinde bulunan kardiyomiyosit ve nöronlar arasında Ca^{+2} iyonuna bağlı pozitif veya negatif korelasyon gösterilmiş ve bu hücrelerin *in vitro* ortamda da etkileşim halinde olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, nöronların aynı alan içerisinde birden fazla kardiyomiyosit ile ilişkisi olma olasılığı, görüntü dahilindeki alanlar dışında başka kardiyomiyositlerle de etkileşim halinde olabilme ihtimali ve kardiyomiyosit hücrelerinin atımından kaynaklı oluşabilecek sinyaldeki bozulmalar hücreleri arası senkronizasyonun tespitini zorlaştırabilmektedir. Diğer taraftan, kardiyomiyositlere ait atım hızı sinyali ile nöronlara ait Ca^{+2} değişim sinyali arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Bunun nedeni, saniyede 200-300 kere atan yenidoğan fare kalbine ait kardiyomiyositlerin atım hızlarının çekilen mikroskop görüntü ayarları ile yakalanamaması ihtimali yüksektir. Saniyede iki pencere (frame) çekiminin yapıldığı kayıtlarda, tek başına ekilen veya kokültürdeki kardiyomiyosit hücrelerine ait dakikada atım değerleri 45-60 aralığında bulunmuş ve iki farklı ortamdaki kardiyomiyosit atım hızının farklı olmadığı görülmüştür. Bunun yanında, nöron ve kardiyomiyositlere ait zamana bağlı Ca^{+2} sinyallerinin birebir benzerlikle çalışılması, bazı örneklerde yüksek frekansa sahip kardiyomiyositlerin incelenmesinde kısıtlamalara neden olmuştur. Ayrıca, FACS sırasında elde edilen saflaştırılmış NG nöronlarının sayıca az olması, yüksek sayıda nöron elde edebilmek için hayvan sayısında arttırılması gerekliliği ve RNA dizilme analize öncelik verilmesinden dolayı, kardiyomiyosit ve kalbe özgü duyu nöronları arasındaki elektriksel iletişim sayıca fazla elde edebildiğimiz AKG nöronu kullanılarak tamamlanmıştır. Gelecek deneylerde, floresan görüntüleme ile birlikte yapılan ışık alan çekimlerinin ayrı olarak yapılması ve yüksek pencere/saniye (frame/sec) ile yenidoğan fare kalbine ait kardiyomiyositlerin atım hızının yakalanması hedeflenmiştir. Ayrıca, yapılan zamana bağlı birebir sinyal korelasyon analizinin yanında, yüksek frekansa sahip

kardiyomiyosit hücrelerine ait Ca^{+2} değişim sinyalleri belirli sayıdaki olay içerecek şekilde bloklara bölünerek duyu nörona ait sinyal ile karşılaştırılabilir.

Kokültürlerde spontan aktivitenin incelenmesinin yanında, hücreler arası elektriksel iletişim isoproterenol, CNQX, mecamylamine ve carbenoxolone (cbx) kimyasallar kullanılarak takip edilmiştir. Seçici olmayan β adrenoreceptor agonist olan isoproterenol uygulaması ile kardiyomiyositlerin dakikada atım hızının artırılması hedeflenmiş, buna bağlı olarak ilişkili olabileceği kardiyak aferentlerdeki Ca^{+2} değişimi takip edilmiştir. İsoptererenol uygulaması sonrasında, atım hızı artan kardiyomiyositlerle bağlantılı olduğu düşünülen ve spontan aktiviteye sahip kardiyak duyu nöronlarında Ca^{+2} değişim frekansında artış gözlemlenmiş ve hücresel bağlantının varlığı incelenen alanlar için teyit edilmiştir. Ancak yapılan korelasyon analiz sonrasında, belirlenen nöron ve kardiyomiyositler arasında ilaç uygulaması öncesi veya sonrasında Ca^{+2} sinyal benzerliği tespit edilmemiştir. Bunun nedeni, AKG nöronu ile bağlantılı olabilecek kardiyomiyositlerin GCaMP6s üretmediği için analiz edilememesi veya görüntülenen alanın dışında kalmasından kaynaklanabilir. Diğer taraftan, AMPA/kainate antagonisti CNQX, genel nikotonik asetilkolin antagonisti mecamylamine ve oluk bağlantı bloklayıcısı carbenoxolone kimyasal ajanlar kullanılarak, hücreler arası bağlantının tipi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Kokültürlere CNQX eklenmesi sonrası nöron ve kardiyomiyositlerin Ca^{+2} değişiminde herhangi bir etki görülmezken, mecamylamine ve carbenoxolone uygulaması sonrasında nöronların floresan şiddet genliklerin artış gözlemlenmiştir. Elde edilen bu veri, *in vitro* ortamdaki nöron ve kardiyomiyositler arasındaki bağlantının asetilkolin reseptörü veya oluk bağlantıları üzerinden olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, tek başına ekilen nöronların olmaması ve deney sayısının azlığından dolayı, yapılan değerlendirilmelerin ilerleyen deneylerle güçlendirilmesi gerekmektedir. Bunun yanında, RNA dizi analizi analizi sonucunda elde edilen bilgi ile P2Xr2 gibi kalbe özgü duyu nöronlarına özgü kanal proteinleri hedeflenerek, nöronlar ile kardiyomiyositler arasında olabilecek bağlantılar tipi sayısı artırılabilir ve bu doğrultuda çalışılabilir.

Literatürde, nöronlar ve kardiyomiyositler arasındaki elektriksel ilişkiyi optogenetik yöntemler kullanarak *in vivo* ve *in vitro* boyutta araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Chr2 üreten UPK hücre temelli sempatik nöronları mavi ışık ile uyarılarak depolarizasyonu sonucu bağlantı kurduğu kardiyomiyositlerde atım hızının arttığı gözlemlenmiştir (47). Yapılan başka bir çalışmada ise, birlikte aynı kültür kabına ekilen UPK hücre kökenli motor nöronları ve fare iskelet kası arasındaki bağlantı optogenetik yöntem ile gösterilmiş ve bu elektiriksel bağlantının kök hücre temelli nöronların olgunlaşmasına olanak sağladığı raporlanmıştır (71). Reinshagen ve ark. ise *in vitro* ortamda NG duyu nöronları ile Chr2 üretemi sağlanan enteroendokrin hücrelerini mavi ışıkla uyarılmış ve NG duyu nöronlarının aksiyon potansiyelindeki değişimi raporlanmışlardır (152). Aynı çalışmada, Sinapsin 1 protein işaretleyici kullanılarak enteroendokrin hücreleri ve NG duyu nöronları arasında sinaptik bağlantının varlığını göstererek bu bağlantı aracılığıyla elektriksel olarak haberleştikleri tespit edilmiştir (152). Benzer şekilde, bu tez çalışmasında, Chr2 üreten kardiyomiyositler mavi ışık ile uyarılarak bağlantı kurduğu düşünülen GCaMP6s üreten heterojen veya kalbe özgü duyu nöronları sinir hücresindeki floresan değişim analiz edilmiştir. Uyarılma sonucunda, suskun olan nöronların aktif, spontan aktif olan nöronların ise frekanslarında değişimler belirlenmiştir. Sonuç olarak, spontan aktif kalbe özgü duyu nöronu ve kardiyomiyositlerin bulunduğu kokültürlerde görülen hücreler arası sinyal korelasyonu uygulanan optogenetik araç ile aralarındaki bağlantı teyit edilmiştir.

Yapılan optogenetik çalışmalarda, sahip oldukları reseptörlerle midedeki gerilim veya nefes alıp verme esnasında akciğer hacminin değişimi gibi iç organlara ait belirli bir duysal veriyi iletmek için özelleşmiş vagal duyu nöronlarının varlığı bu nöronların sadece duysal iletiyi beyne iletmekle kalmayıp, bağlantılı oldukları iç organı fonksiyonel olarak da kontrol ettikleri raporlanmıştır (10,22,153). Chang ve ark. P2ry1-NG nöronlarının ışık ile uyarımı sonucunda solunum durdururken, Npy2r-NG nöronların aktif olması ile solunumun hızlandığını tespit etmişlerdir (22). Aynı grup, benzer strateji ile Piezo2-NG-Chr2 üreten transgenik hayvanları mavi ışık ile uyararak Piezo-2 reseptörüne sahip NG nöronlarının solunumun dengede kalmasında rol oynadığını raporlamışlardır (9). Bir diğer grup ise deride kaşıntıya dair duysal veriyi

algılamaktan sorumlu Mas-ilişkili G protein kapılı reseptör C11 (MrgprC11) reseptörünün jugular nöronlarda farklı bir görev üstlendiğini göstermişlerdir. Optogenetik yöntem kullanılarak, jugular gangliyondaki MrgprC11 bağlı Chr2 üreten nöronların akciğere dallandığını ve bu nöronların kolinerjik bronkokonstrüksiyon ve solunumda hassasiyeti kontrol edilmesinde rol oynadıkları raporlanmıştır (23). Ayrıca NG duyu nöronlarının bağırsak üzerindeki etkileri de optogenetik aracı ile incelenmiş ve yapılan çalışma sonucunda GPR65 reseptörüne sahip NG nöronlarının bağırsak hareketlerinden, GLP1R üreten NG nöronlarının ise mide ve bağırsaktaki mekanik değişimden sorumlu olduğu raporlanmıştır (10). Piezo1/Piezo2 reseptörüne sahip NG nöron grubun ise vagus sinirin carotoid sinüs ile bağlantı kurduğu bölge optogenetik ile aktif hale getirilmiş ve barorefleksin düzenlendiğini gözlemlemişler. Diğer tarafta, Piezo1/Piezo2-Chr2 üreten hayvanda vagus sinirin carotoid sinüs ile bağlantılı olmayan kalple ilgili olan kısmı uyardıklarında bir etki görmemişler (154). Yapılan bu çalışmalar ile, belirli reseptörlere sahip farklı duyu nöron gruplarının farklı organlara özelleştiği ve iç organlara ait motor komutların düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Kalbe özgü AKG duyu nöronlarında Gpr65, P2ry1, piezo2 anlamlı farklılık olmamakla birlikte yüksek ifade edilirken, Npy2r, Glpr1r ve piezo1 anlamlı farklılık olmamakla birlikte düşük ifade edilmek ve Mrgprx1 ise anlamlı olarak kontrole göre yüksek ifade edilmektedir ($p > 0.05$). NG duyu nöronlarında ise Gpr65, P2ry1, Npy2r, Glpr1r, Mrgprx1 anlamlı farklı olmamakla beraber yüksek, piezo1 ve piezo2 ise anlamlı farklı olmamakla beraber düşük ifade edildiği bulunmuştur ($p > 0.05$). Elde edilen veriler ve literatür bilgisi ışığında, bağırsağa ve akciğere özgü duyu nöronlarında bulunan reseptörlerin kardiyak aferentlerde yüksek veya düşük ifadesine rastlanmamıştır.

Tez çalışması kapsamında, kalbe özgü duyu nöronlarının genel gen profilleri, kardiyomiyosit ile aralarındaki elektriksel iletişim ve bu iletişimin tipi literatürde ilk kez değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, kalbe özgü AKG ve NG nöronlarının birbirilerinden ve diğer genel nöron popülasyonundan belirli gen ifadeleri ile ayrıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, kalbe özgü AKG nöronları ile kardiyomiyositler arasındaki elektriksel iletişim zamana bağlı Ca^{+2} değişimi ile takip edilmiş, hücrelerin spontan ve optogenetik/ilaç uygulaması sonrası sinyal korelasyonları ortaya koyulmuştur. İleriki

çalışmalarda, kalbe özgü duyu nöronları tek hücre RNA dizilime yöntemi ile daha ayrıntılı incelenerek, alt gruplara sınıflandırılabilir. Böylelikle, total popülasyon içerisindeki glia ve nöron olmayan hücrelere ait RNA sorunu ortadan kalkarak, sadece kardiyak aferentler ve alt tipleri tanımlanabilir. Ayrıca, RNA dizi analizi sonucunda elde edilen ait gen listesinden aday belirlenerek, overekspresyon ve/veya knockdown stratejisi ile kalbe-özgü duyu sinirlerinin işlevlerinin ortaya konabilir ve kardiyak fonksiyondaki rolleri incelenebilir. Benzer şekilde, aday genler ile üretilecek transgenik hayvanlarda optogenetik veya kimyasal yöntemler kullanılarak kalbe özgü duyu nöronlarının kalp üzerindeki etkisi fonksiyonel olarak incelenebilir.



8. KAYNAKLAR

- 1 Christoffels VM, Moorman AFM. Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others? *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2009;doi: 10.1161/CIRCEP.108.829341.
- 2 Mitchell GAG. the Innervation of the Heart. *Heart* 2007;15:159–71.
- 3 ROBINSON BF, EPSTEIN SE, BEISER GD, BRAUNWALD E. Control of Heart Rate by the Autonomic Nervous System. *Circ Res* 2012;19:400–11.
- 4 Kawano H, Okada R, Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels* 2003;doi: 10.1007/s003800300005.
- 5 Vaseghi M, Armour JA, Ardell JL. Atlas of Cardiac Innervation. *Atlas Card Inn* 2016;doi: 10.1007/978-3-319-45800-7:45–7.
- 6 San Mauro MP, Patronelli F, Spinelli E, Cordero A, Covello D, Gorostiaga JA. Nerves of the heart: A comprehensive review with a clinical point of view. *Neuroanatomy* 2009.
- 7 Foreman RD, Garrett KM, Blair RW. Mechanisms of cardiac pain. *Compr Physiol* 2015;doi: 10.1002/cphy.c140032.
- 8 Liu Y, Ma Q. Generation of somatic sensory neuron diversity and implications on sensory coding. *Curr Opin Neurobiol* 2011;doi: 10.1016/j.conb.2010.09.003.
- 9 Nonomura K, Woo SH, Chang RB, et al. Piezo2 senses airway stretch and mediates lung inflation-induced apnoea. *Nature* 2017;541:176–81.
- 10 Williams EKK, Chang RBB, Strohlic DEE, Umans BDD, Lowell BBB, Liberles SDD. Sensory Neurons that Detect Stretch and Nutrients in the Digestive System. *Cell* 2016;doi: 10.1016/j.cell.2016.05.011.
- 11 Armour JA. The little brain on the heart. *Cleve Clin J Med* 2007;doi: 10.3949/ccjm.74.Suppl_1.S48.
- 12 Guić MM, Košta V, Aljinović J, Sapunar D, Grković I. Characterization of spinal afferent neurons projecting to different chambers of the rat heart.

- Neurosci Lett 2010;doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.016.
- 13 Quigg M, Elfvin LG, Aldskogius H. Distribution of cardiac sympathetic afferent fibers in the guinea pig heart labeled by anterograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Syst* 1988;doi: 10.1016/0165-1838(88)90015-X.
 - 14 Košta V, Guić MM, Aljinović J, Sapunar D, Grković I. Immunohistochemical characteristics of neurons in nodose ganglia projecting to the different chambers of the rat heart. *Auton Neurosci Basic Clin* 2010;doi: 10.1016/j.autneu.2010.01.001.
 - 15 Hayakawa T, Kuwahara-Otani S, Maeda S, Tanaka K, Seki M. Projections of calcitonin gene-related peptide immunoreactive neurons in the vagal ganglia of the rat. *J Chem Neuroanat* 2011;41:55–62.
 - 16 Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW. Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circ Res* 1999;doi: 10.1161/01.RES.84.8.921.
 - 17 Thorén PN, Donald DE, Shepherd JT. Role of heart and lung receptors with nonmedullated vagal afferents in circulatory control. *Circ Res* 2012;doi: 10.1161/01.res.38.6.2.
 - 18 Thoren PN. Characteristics of left ventricular receptors with nonmedullated vagal afferents in cats. *Circ Res* 1977;doi: 10.1161/01.RES.40.4.415.
 - 19 Usoskin D, Furlan A, Islam S, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2015;doi: 10.1038/nn.3881.
 - 20 Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, et al. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 2018;doi: 10.1016/j.cell.2018.06.021.
 - 21 Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, et al. Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* 2018;doi: 10.1038/s41593-018-0141-1.
 - 22 Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal sensory neuron subtypes that differentially control breathing. *Cell* 2015;doi:

- 10.1016/j.cell.2015.03.022.
- 23 Han L, Limjunyawong N, Ru F, et al. Mrgprs on vagal sensory neurons contribute to bronchoconstriction and airway hyper-responsiveness. *Nat Neurosci* 2018;doi: 10.1038/s41593-018-0074-8.
- 24 Hockley JRF, Taylor TS, Callejo G, et al. Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut* 2019;doi: 10.1136/gutjnl-2017-315631.
- 25 Kaelberer MM, Jordt S-E. A Method to Target and Isolate Airway-innervating Sensory Neurons in Mice. *J Vis Exp* 2016;doi: 10.3791/53917.
- 26 Robin R. Preston TEW. *Fizyoloji-Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitapları. Tıpkı Bası. nobel tıp kitabevleri, 2016.*
- 27 Fox stuart ira. *Human Physiology. vol. 12th editi. 12th ed. Mg Graw Hill, 2011.*
- 28 Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science, fourth addition. 2000.*
- 29 Marmigère F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci* 2007;doi: 10.1038/nrn2057.
- 30 Caspary T, Anderson K V. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: What the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* 2003;doi: 10.1038/nrn1073.
- 31 Ma Q. Population coding of somatic sensations. *Neurosci Bull* 2012;doi: 10.1007/s12264-012-1201-2.
- 32 Baker C. *The Embryology of Vagal Sensory Neurons, 2010.*
- 33 Zhuo H, Ichikawa H, Helke CJ. Neurochemistry of the nodose ganglion. *Prog Neurobiol* 1997;52:79–107.
- 34 Yuan H, Silberstein SD. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part i. Headache 2016;doi: 10.1111/head.12647.
- 35 Yuan H, Silberstein SD. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part II. Headache 2016;doi: 10.1111/head.12650.
- 36 Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. *Essential Cell Biolog. 2013.*
- 37 Patch Clamp Electrophysiology n.d.
<https://www.moleculardevices.com/applications/patch-clamp->

electrophysiology.

- 38 Bohnen MS, Peng G, Robey SH, et al. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev* 2016;doi: 10.1152/physrev.00008.2016.
- 39 Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac Innervation and Sudden Cardiac Death. *Circ Res* 2015;doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304679.
- 40 Shen MJ, Zipes DP. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ Res* 2014;doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302549.
- 41 De Ferrari GM, Crijns HJGM, Borggrefe M, et al. Chronic vagus nerve stimulation: A new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur Heart J* 2011;doi: 10.1093/eurheartj/ehq391.
- 42 Tse HF, Turner S, Sanders P, et al. Thoracic spinal cord stimulation for heart failure as a restorative treatment (SCS HEART study): First-in-man experience. *Hear Rhythm* 2015;doi: 10.1016/j.hrthm.2014.12.014.
- 43 Liu Z, Liu H, Li Z. Formation of neuromuscular junctions and synthesis of sensory neuropeptides in the co-cultures of dorsal root ganglion and cardiac myocytes. *Cell Mol Neurobiol* 2008;doi: 10.1007/s10571-008-9268-z.
- 44 Wang Y, Li G, Yu K, et al. Expressions of P2X2 and P2X3 receptors in rat nodose neurons after myocardial ischemia injury. *Auton Neurosci Basic Clin* 2009;doi: 10.1016/j.autneu.2008.11.006.
- 45 Gao Z, Xing J, Sinoway L, Li J. P2X receptor-mediated muscle pressor reflex in myocardial infarction. *Am J Physiol Circ Physiol* 2006;doi: 10.1152/ajpheart.00911.2006.
- 46 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* 2003;doi: 10.1113/jphysiol.2003.048207.
- 47 Oh Y, Cho G-S, Li Z, et al. Functional Coupling with Cardiac Muscle Promotes Maturation of hPSC-Derived Sympathetic Neurons. *Cell Stem Cell* 2016;doi: 10.1016/j.stem.2016.05.002.

- 48 Hick A, Wattenhofer-Donzé M, Chintawar S, et al. Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *DMM Dis Model Mech* 2013;doi: 10.1242/dmm.010900.
- 49 Takeuchi A, Nakafutami S, Tani H, et al. Device for co-culture of sympathetic neurons and cardiomyocytes using microfabrication. *Lab Chip* 2011;doi: 10.1039/c0lc00327a.
- 50 Mahmoud AI, O'Meara CC, Gemberling M, et al. Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Dev Cell* 2015;doi: 10.1016/j.devcel.2015.06.017.
- 51 Schultz HD. The spice of life is at the root of cardiac pain. *J Physiol* 2003;551:400.
- 52 Wang HJ, Wang W, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension* 2014;doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03699.
- 53 Wang HJ, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent reflex control of cardiac function in normal and chronic heart failure states. *J Physiol* 2017;595:2519–34.
- 54 Moore A, Goerne H, Rajiah P, Tanabe Y, Saboo S, Abbara S. Acute Myocardial Infarct. *Radiol Clin North Am* 2019;57:45–55.
- 55 Rajendran PS, Nakamura K, Ajjola OA, et al. Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. *J Physiol* 2016;doi: 10.1113/JP271165.
- 56 Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 2005;doi: 10.1038/nn1525.
- 57 Editorial. Method of the Year 2010 optogenetics. *Nat Methods* 2011;doi: 10.1038/nMeth.F.321.
- 58 Fearnley CJ, Llewelyn Roderick H, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac

- myocytes. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;doi: 10.1101/cshperspect.a004242.
- 59 Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008;doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.025.
- 60 Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2001;doi: 10.1038/84397.
- 61 Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 2013;doi: 10.1038/nature12354.
- 62 Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 2013;doi: 10.1038/nature12354.
- 63 Tian L, Andrew Hires S, Looger LL. Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harb Protoc* 2012;doi: 10.1101/pdb.top069609.
- 64 Dana H, Chen TW, Hu A, et al. Thy1-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS One* 2014;doi: 10.1371/journal.pone.0108697.
- 65 Emery EC, Luiz AP, Sikandar S, Magnúsdóttir R, Dong X, Wood JN. In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv* 2016;doi: 10.1126/sciadv.1600990.
- 66 Tallini YN, Ohkura M, Choi B-R, et al. Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proc Natl Acad Sci* 2006;doi: 10.1073/pnas.0509378103.
- 67 Zhang F, Wang LP, Boyden ES, Deisseroth K. Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 2006;doi: 10.1038/nmeth936.
- 68 Zhang F, Wang LP, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 2007;doi: 10.1038/nature05744.
- 69 Wikipedia. Channelrhodopsin n.d.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Channelrhodopsin>.
- 70 Nussinovitch U, Gepstein L. Optogenetics for in vivo cardiac pacing and

- resynchronization therapies. *Nat Biotechnol* 2015;doi: 10.1038/nbt.3268.
- 71 Steinbeck JA, Jaiswal MK, Calder EL, et al. Functional Connectivity under Optogenetic Control Allows Modeling of Human Neuromuscular Disease. *Cell Stem Cell* 2016;doi: 10.1016/j.stem.2015.10.002.
- 72 Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008;doi: 10.1038/nmeth.1226.
- 73 Griffith M, Walker JR, Spies NC, Ainscough BJ, Griffith OL. Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud. *PLoS Comput Biol* 2015;doi: 10.1371/journal.pcbi.1004393.
- 74 Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- 75 Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 2010;doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r14.
- 76 Yu G, He QY. ReactomePA: An R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol Biosyst* 2016;doi: 10.1039/c5mb00663e.
- 77 Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *Omi A J Integr Biol* 2012;doi: 10.1089/omi.2011.0118.
- 78 Lopes DM, Denk F, McMahon SB. The Molecular Fingerprint of Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Neurons. *Front Mol Neurosci* 2017;doi: 10.3389/fnmol.2017.00304.
- 79 Chiu IM, Barrett LB, Williams EK, et al. Correction: Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *Elife* 2015;doi: 10.7554/elife.06720.
- 80 Thakur M, Crow M, Richards N, et al. Defining the nociceptor transcriptome. *Front Mol Neurosci* 2014;doi: 10.3389/fnmol.2014.00087.

- 81 Wu S, Marie Lutz B, Miao X, et al. Dorsal root ganglion transcriptome analysis following peripheral nerve injury in mice. *Mol Pain* 2016;doi: 10.1177/1744806916629048.
- 82 Peeters PJ, Aerssens J, de Hoogt R, et al. Molecular profiling of murine sensory neurons in the nodose and dorsal root ganglia labeled from the peritoneal cavity. *Physiol Genomics* 2005;doi: 10.1152/physiolgenomics.00169.2005.
- 83 Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* 2001;doi: 10.1016/S0301-0082(01)00005-3.
- 84 Burnstock G. Purinergic mechanosensory transduction and visceral pain. *Mol Pain* 2009;doi: 10.1186/1744-8069-5-69.
- 85 Rong W, Gourine A V, Cockayne DA, et al. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* 2003.
- 86 Cockayne DA, Dunn PM, Zhong Y, et al. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J Physiol* 2005;doi: 10.1113/jphysiol.2005.088435.
- 87 Dong X, Han S kyou, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 2001;doi: 10.1016/S0092-8674(01)00483-4.
- 88 Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro MA, Santos RA. Mas and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. *Pharmacol Rev* 2014;doi: 10.1124/pr.113.008136.
- 89 Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* 2017;doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.008.
- 90 Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol* 2017;doi: 10.1016/j.it.2016.10.001.
- 91 Baral P, Umans BD, Li L, et al. Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil

- and $\gamma\delta$ T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. *Nat Med* 2018;doi: 10.1038/nm.4501.
- 92 Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, et al. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci* 2011;doi: 10.1073/pnas.1019418108.
- 93 Ramachandra R, McGrew S, Elmslie K. Identification of Specific Sensory Neuron Populations for Study of Expressed Ion Channels. *J Vis Exp* 2013;doi: 10.3791/50782.
- 94 Wang T, Miller KE. Characterization of glutamatergic neurons in the rat atrial intrinsic cardiac ganglia that project to the cardiac ventricular wall. *Neuroscience* 2016;doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.05.002.
- 95 Corbett EKA, Batten TFC, Kaye JC, Deuchars J, McWilliam PN. Labelling of rat vagal preganglionic neurones by carbocyanine dye Dil applied to the heart. *Neuroreport* 1999;doi: 10.1097/00001756-199904260-00004.
- 96 Hopkins DA, Andrew Armour J. Ganglionic distribution of afferent neurons innervating the canine heart and cardiopulmonary nerves. *J Auton Nerv Syst* 1989;doi: 10.1016/0165-1838(89)90170-7.
- 97 Guić MM, Runtić B, Košta V, Aljinović J, Grković I. Age-related changes of neurochemically different subpopulations of cardiac spinal afferent neurons in rats. *Exp Gerontol* 2013;doi: 10.1016/j.exger.2013.04.006.
- 98 Loew LM. Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes. *Pure Appl Chem* 2007;doi: 10.1351/pac199668071405.
- 99 Friedrich RW, Korsching SI. Chemotopic, Combinatorial, and Noncombinatorial Odorant Representations in the Olfactory Bulb Revealed Using a Voltage-Sensitive Axon Tracer. *J Neurosci* 1998;18:9977–88.
- 100 Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 1986;doi: 10.1016/0006-8993(86)91199-6.
- 101 Choi D, Li D, Raisman G. Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: A comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald,

- Fluoro-Gold and DiI. *J Neurosci Methods* 2002;doi: 10.1016/S0165-0270(02)00098-5.
- 102 Žele T, Sketelj J, Bajrović FF. Efficacy of fluorescent tracers in retrograde labeling of cutaneous afferent neurons in the rat. *J Neurosci Methods* 2010;doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.06.021.
- 103 Naumann T, Härtig W, Frotscher M. Retrograde tracing with Fluoro-Gold: Different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies. *J Neurosci Methods* 2000;doi: 10.1016/S0165-0270(00)00292-2.
- 104 Tervo DGR, Hwang BY, Viswanathan S, et al. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 2016;doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.021.
- 105 Cengiz N, Öztürk G, Erdoğan E, Him A, Oğuz EK. Consequences of Neurite Transection *In Vitro* . *J Neurotrauma* 2010;doi: 10.1089/neu.2009.0947.
- 106 Lee MY, Sun B, Schliffke S, et al. Derivation of functional ventricular cardiomyocytes using endogenous promoter sequence from murine embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2012;doi: 10.1016/j.scr.2011.08.004.
- 107 abcam. Counting cells using a hemocytometer n.d. <https://www.abcam.com/protocols/counting-cells-using-a-hemocytometer>.
- 108 Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;doi: 10.1161/01.RES.0000035254.80718.91.
- 109 Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 2010;doi: 10.1038/nmeth.1403.
- 110 Piper HM, Jacobson SL, Schwartz P. Determinants of cardiomyocyte development in long-term primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 1988;doi: 10.1016/S0022-2828(88)80007-5.
- 111 Zhang Y, Li TS, Lee ST, et al. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS One* 2010;doi: 10.1371/journal.pone.0012559.

- 112 Bauer A, Nolden T, Schroter J, et al. Anterograde Glycoprotein-Dependent Transport of Newly Generated Rabies Virus in Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Virol* 2014;doi: 10.1128/jvi.02254-14.
- 113 Biggs JE, Boakye PA, Ganesan N, et al. Analysis of the long-term actions of gabapentin and pregabalin in dorsal root ganglia and substantia gelatinosa. *J Neurophysiol* 2014;doi: 10.1152/jn.00168.2014.
- 114 Vandivort TC, An D, Parks WC. An Improved Method for Rapid Intubation of the Trachea in Mice. *J Vis Exp* 2016;doi: 10.3791/53771.
- 115 Cox G, Kable E. Second-harmonic imaging of collagen. *Methods Mol Biol* 2006;doi: 10.1007/978-1-59259-993-6_2.
- 116 Andrews S. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed May 7, 2019).
- 117 Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 2017;doi: 10.1038/nmeth.4197.
- 118 Huber W, Carey VJ, Gentleman R, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 2015;doi: 10.1038/nmeth.3252.
- 119 Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research* 2016;doi: 10.12688/f1000research.7563.2.
- 120 Weiner J. CRAN - Package pca3d 2017. <https://cran.r-project.org/web/packages/pca3d/index.html> (accessed May 7, 2019).
- 121 Gregory R, Warnes, Ben Bolker, Lodewijk Bonebakker, Robert Gentleman, Wolfgang Huber Andy Liaw, Thomas Lumley, Martin Maechler, Arni Magnusson, Steffen Moeller, Marc Schwartz BV. CRAN - Package gplots 2016. <https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html> (accessed May 7, 2019).

- 122 Hochberg B. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc* 1995;doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- 123 Gover TD, Kao JPY, Weinreich D. Calcium signaling in single peripheral sensory nerve terminals. *J Neurosci* 2003.
- 124 Nathaniel Huebsch, PhD, Peter Loskill, PhD, Mohammad A. Mandegar, DPhil, Natalie C. Marks, BA, Alice S. Sheehan, BA, Zhen Ma, PhD, Anurag Mathur, PhD, Trieu N. Nguyen, BS, Jennie C. Yoo, BS, Luke M. Judge, MD, PhD, C. Ian Spencer, PhD, Anand C. Chukka, 1 P. Automated Video-Based Analysis of Contractility. *Tissue Eng - Part C Methods* 2015.
- 125 Verkerk AO, Veerman CC, Zegers JG, Mengarelli I, Bezzina CR, Wilders R. Patch-clamp recording from human induced pluripotent stemcell-derived cardiomyocytes: Improving action potential characteristics through dynamic clamp. *Int J Mol Sci* 2017;doi: 10.3390/ijms18091873.
- 126 Stein W, Städele C, Andras P. Optical Imaging of Neurons in the Crab Stomatogastric Ganglion with Voltage-sensitive Dyes. *J Vis Exp* 2011;doi: 10.3791/2567.
- 127 Wenner P, Tsau Y, Cohen LB, O'Donovan MJ, Dan Y. Voltage-sensitive dye recording using retrogradely transported dye in the chicken spinal cord: Staining and signal characteristics. *J Neurosci Methods* 1996;doi: 10.1016/S0165-0270(96)00108-2.
- 128 Hasan W. Autonomic cardiac innervation: Development and adult plasticity. *Organogenesis* 2013;doi: 10.4161/org.24892.
- 129 Tsau Y, Wenner P, O'Donovan MJ, Cohen LB, Loew LM, Wuskell JP. Dye screening and signal-to-noise ratio for retrogradely transported voltage-sensitive dyes. *J Neurosci Methods* 1996;doi: 10.1016/S0165-0270(96)00109-4.
- 130 Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods* 2015;doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.021.
- 131 Spoelstra EN, Ince C, Koeman A, et al. A novel and simple method for

- endotracheal intubation of mice. *Lab Anim* 2007;doi: 10.1258/00236770779399400.
- 132 Rivera B, Miller S, Brown E, Price R. A novel method for endotracheal intubation of mice and rats used in imaging studies. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2005.
- 133 Prendiville TW, Ma Q, Lin Z, Zhou P, He A, Pu WT. Ultrasound-guided Transthoracic Intramyocardial Injection in Mice. *J Vis Exp* 2014;doi: 10.3791/51566.
- 134 Danielson NB, Turi GF, Ladow M, et al. In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron* 2017;doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.019.
- 135 Price J. An immunohistochemical and quantitative examination of dorsal root ganglion neuronal subpopulations. *J Neurosci* 1985;doi: 10.1523/jneurosci.05-08-02051.1985.
- 136 Papka RE. Sensory Ganglia. *Encycl. Neurosci.*, 2009.
- 137 Flegel C, Schöbel N, Altmüller J, et al. RNA-Seq analysis of human trigeminal and dorsal root ganglia with a focus on chemoreceptors. *PLoS One* 2015;doi: 10.1371/journal.pone.0128951.
- 138 Paul JA, Aich A, Abrahante JE, et al. Data Descriptor: Transcriptomic analysis of gene signatures associated with sickle pain. *Sci Data* 2017;doi: 10.1038/sdata.2017.51.
- 139 Erratum to: Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *eLife* 3:04660. doi: 10.7554/eLife.04660. *Elife* 2015;doi: 10.7554/eLife.06720.
- 140 Li CL, Li KC, Wu D, et al. Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Res* 2016;doi: 10.1038/cr.2015.149.
- 141 Ray P, Torck A, Quigley L, et al. Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia. *Pain* 2018;doi: 10.1097/j.pain.0000000000001217.

- 142 Bandell M, Patapoutian A. Itching for Insight. *Cell* 2009;doi: 10.1016/j.cell.2009.12.012.
- 143 Huang J, Polgár E, Solinski HJ, et al. Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. *Nat Neurosci* 2018;doi: 10.1038/s41593-018-0119-z.
- 144 Urness LD, Bleyl SB, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL. Redundant and dosage sensitive requirements for Fgf3 and Fgf10 in cardiovascular development. *Dev Biol* 2011;doi: 10.1016/j.ydbio.2011.05.671.
- 145 Deng Y, Theken KN, Lee CR. Cytochrome P450 epoxygenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.10.022.
- 146 Arvaniti M, Jensen MM, Soni N, et al. Functional interaction between Lypd6 and nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 2016;doi: 10.1111/jnc.13718.
- 147 Wang H, Zhou Y, Cong M, Zhang L, Gu X, Tang X. Comparative transcriptomic profiling of peripheral efferent and afferent nerve fibres at different developmental stages in mice. *Sci Rep* 2018;doi: 10.1038/s41598-018-30463-0.
- 148 Oiwa K, Shimba K, Numata T, Takeuchi A, Kotani K, Jimbo Y. A device for co-culturing autonomic neurons and cardiomyocytes using micro-fabrication techniques. *Integr Biol (United Kingdom)* 2016;doi: 10.1039/c5ib00273g.
- 149 ibidi n.d. <https://ibidi.com/culture-inserts/24-culture-insert-2-well.html>.
- 150 Takayama Y, Kida YS. In vitro reconstruction of neuronal networks derived from human iPS cells using microfabricated devices. *PLoS One* 2016;doi: 10.1371/journal.pone.0148559.
- 151 Alshawaf AJ, Viventi S, Qiu W, et al. Phenotypic and Functional Characterization of Peripheral Sensory Neurons derived from Human Embryonic Stem Cells. *Sci Rep* 2018;doi: 10.1038/s41598-017-19093-0.
- 152 Reinshagen M. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Z Gastroenterol* 2019;doi: 10.1055/a-0821-1865.

- 153 Han W, Tellez LA, Perkins MH, et al. A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. *Cell* 2018;doi: 10.1016/j.cell.2018.08.049.
- 154 Zeng W-Z, Marshall KL, Min S, et al. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. *Science* (80-) 2018;doi: 10.1126/science.aau6324.



9. ETİK KURUL ONAYI

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

Sayı : 38328770 –30
Konu: Etik Kurulu Kararı

24/02/2015

Sayın Yrd. Doç. Dr. Esra ÇAĞAVI

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Sinir hücreleri ile kalp kası hücreleri arasındaki etkileşimin moleküller ve elektrofizyolojik düzeyde araştırılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Tel: (0216)681 51 37
Faks:(0212)531 75 55
E-mail:ilkurfil@medipol.edu.tr

Adres:Kavacık Mah.Ekinciler Cad.No:19.34810
Kavacık/BEYKOZ



T.C.

**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
24/02/2015	23		Yrd. Doç. Dr. Esra ÇAĞAVI

“Sinir hücreleri ile kalp kası hücreleri arasındaki etkileşimin moleküler ve elektrofizyolojik düzeyde araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 3 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	