



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Biyofizik Anabilim Dalı
Nörobiyofizik

[Doktora Tezi]

**DENEYSEL DEMİYELİNİZASYON SÜRECİNİN PERİFERİK SINIRLARIN HIZ
VE UYARILABİLİRLİĞİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İlksen BURAT
ORCID: 0000-0003-4979-7877

Danışman
Prof. Dr. Barkın İLHAN
ORCID: 0000-0001-5757-9568

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171418004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2023



TEŞEKKÜR

Biyofizik alanına girmeme vesile olan sayın hocam Prof. Dr. Niyazi MERİÇ'e, yıllarca eğitimime ve işime yönelik sayısız katkı sağlayan, uzun süre tez danışmanlığını yapan ve bu tezin son aşamalarında emekli olmasına rağmen değerli katkılarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ'a, hem akademik hem sosyal alanlarda liderlik yapan ve sonradan tez danışmanlığını üstlenen sayın hocam Prof. Dr. Barkın İLHAN'a ve deney çalışmalarına tecrübeleriyle katkı sunmuş olan sayın Prof. Dr. Erhan Kızıltan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hem deneylerden önce hem de ön denemeler sırasında, izole sinirden eşik izleme uygulaması hakkında verdiği tavsiyeler ve yol göstermeleri için sayın Prof. Dr. Hugh Bostock'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatta her konuda bana destekçi olan, bu süreçte de düştüğümde, vazgeçtiğimde beni tekrar kaldırıp yola koyulmamı sağlayan çok sabırlı sevgili ailem Tevhide ve Hüseyin DİNÇER'e sonsuz teşekkür ederim.

İlksen BURAT

Haziran-2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Zarı	3
2.2. İyon Konsantrasyonları ve Hücre Zarından Tanecik Geçişleri.....	3
2.3. Zara Eşdeğer Elektrik Devresi	6
2.4. Sinir Sistemi ve Nöron	7
2.5. Aksiyon Potansiyeli.....	8
2.5.1. Zar potansiyelinin ölçülmesi	8
2.5.2. Ya hep ya hiç davranışı	9
2.5.3. Eşik uyaran	9
2.5.4. Yöresel depolarizasyonlar	10
2.5.5. Uyum.....	11
2.5.6. Ard potansiyeller	11
2.5.7. Refrakter dönem	11
2.5.8. Aksiyon potansiyeli hakkında daha detaylı bilgiler	12
2.6. Pasif Zar Modeli ve Kablo Teorisi	14
2.7. Aktif Zar Modeli ve Aksiyon Potansiyeli	16
2.8. Voltaj Kenetleme Tekniği	17
2.9. İyon Kanalları.....	20
2.9.1. Voltaj bağımlı sodyum kanalı (Na _v)	21
2.9.2. Voltaj bağımlı potasyum kanalları	23
2.10. Bileşik Aksiyon Potansiyeli	25
2.11. Miyelinizasyon ve Demiyelinizasyon	27
2.12. Bir BAP Kayıt Yöntemi Olarak Eşik İzleme	28
2.12.1. Uyaran-yanıt ilişkisi	30
2.12.2. Şiddet-süre zaman sabiti.....	30
2.12.3. Eşik elektrotonus	30
2.12.4. Akım-eşik (I/V)	32

2.12.5. Toparlanma döngüsü	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Deneyle	35
3.2. Mikroenjeksiyon.....	36
3.3. Organ Banyosu ve Suction Elektrodu	37
3.4. Eşik Değer İzleme Yöntemi ile Uyarılabilirlik Ölçümleri	38
3.4.1. Uyarıcı-yanıt ilişkisi	39
3.4.2. Şiddet-süre ilişkisi	40
3.4.3. Eşik elektrotonus	41
3.4.4. Akım-eşik değişimi	41
3.4.5. Toparlanma döngüsü	42
3.5. Analiz ve İstatistik.....	42
4. BULGULAR	43
4.1. Uyarıcı-Yanıt İlişkisi	43
4.2. Şiddet-Süre İlişkisi	44
4.3. Eşik Elektrotonus	46
4.4. Akım-Eşik Değişimi.....	48
4.5. Toparlanma Döngüsü	50
5. TARTIŞMA	53
5.1. Uyarıcı-Yanıt İlişkisi	53
5.2. Şiddet-Süre İlişkisi	54
5.3. Eşik Elektrotonus	55
5.4. Akım-Eşik Değişimi.....	57
5.5. Toparlanma Döngüsü	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR.....	61
8. EKLER.....	65

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **İlksen BURAT**'ın "**DeneySEL Demiyelinizasyon Sürecinin Periferik Sınırların Hız ve Uyarılabilirliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 19/06/2023

Tez Danışmanı Prof. Dr. Barkın İLHAN
Necmettin Erbakan Üniv/Meram Tıp Fakültesi / Biyofizik A.D.

Jüri Üyesi Prof.Dr. Salim Yalçın İNAN
Necmettin Erbakan Üniv/Meram Tıp Fakültesi/Tıbbi Farmakoloji A.D.

Jüri Üyesi Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ
Başkent Üniv / Tıp Fakültesi /Biyofizik A.D.

Jüri Üyesi Prof. Dr. Erhan KIZILTAN
Başkent Üniv / Tıp Fakültesi /Biyofizik A.D.

Jüri Üyesi Doç. Dr. Seçkin TUNCER
Osmangazi Üniv / Tıp Fakültesi /Biyofizik A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 12/07/2023 tarih ve 16/20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL
Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Deneyel Demiyelinizasyon Sürecinin Periferik Sinirlerin Hız ve Uyarılabilirliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması başlıklı tez çalışmamın toplam **65** sayfalık kısmına ilişkin, 10/07/2023 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%5** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

10/07/2023

İlksen BURAT

Danışman Prof. Dr. Barkın İLHAN

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

19/06/2023

İlksen BURAT

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

c_i : i iyonunun molar konsantrasyonu

C_m : Zar sığası

Δt : puls süresi

ΔQ : elektrik yükü

E_i : i iyonunun denge potansiyeli

E_m : Zar potansiyeli

F: Faraday sabiti

g_i : i iyonunun iletkenliği

I: Puls şiddeti

I_c : Kapasitif akım

I_i : i iyonunun akımı

I_m : Zara uygulanan akım

λ : Zarın uzay sabiti

P_i : Zarın i iyonuna geçirgenliği

R: Genel gaz sabiti

R_d : Hücrelerarası sıvı direnci

R_i : Sitoplazma direnci

r_i : Aksoplazma direnci

R_L : Sızıntı direnci

R_m : Zar direnci

T: K° cinsinden sıcaklık

τ : Zarın zaman sabiti

V_m : Zar potansiyeli

z_i : i iyonunun değerliği

KISALTMALAR

AP: Aksiyon Potansiyeli

ATP: Adenozin trifosfat

BAP: Bileşik aksiyon Potansiyeli

LPC: Lizofosfotidilkolin (lysophosphatidyl choline)

mA: Miliamper

ms: Milisaniye

MSS: Merkezi sinir sistemi

mV: Milivolt

PSS: Periferik sinir sistemi

RC: Toparlanma Döngüsü (recovery cycle)

SDTC: Şiddet-süre zaman sabiti (strenght-duration time constant)

TE: Eşik Elektrotonus (threshold tracking)

TTX: Tetrodotoksin

TABLolar LİSTESİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 4.1. Her bir grup için eşik elektrotonusa ait parametrelerin ortalama değerleri ve standart hataları. * KON grubundan farklılığı, # 7G grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).. ..	48
Tablo 4.2. I/V alt-protokolü ile elde edilen parametreler grup ortalamaları±standart hata şeklinde verilmiştir. * KON grubundan farklılığı, # 7G grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).....	49
Tablo 4.3. Toparlanma döngüsüne ait diğer parametrelerin grup ortalamaları±standart hata şeklinde verilmiştir. #: 7G grubundan anlamlı farklılığı ifade eder. #, 7G grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).....	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Hücre zarı (Britannica, 2023).....	3
Şekil 2.2. Taşınım mekanizmaları (Homeworklib, 2023).....	4
Şekil 2.3. Zar elektriksel eş değer devresi (Pehlivan, 1997).....	6
Şekil 2.4. Sınır hücresi.	7
Şekil 2.5. AP evreleri (Pehlivan, 1997'den uyarlanmıştır).	9
Şekil 2.6. Şiddet (mV) – Süre (ms) eğrisi.	10
Şekil 2.7. Zarın iyon iletkenliklerinin değişimi (Kandel ve ark., 2014).	12
Şekil 2.8. AP'nin aksonda iki yönlü yayılması (Pehlivan, 1997).	14
Şekil 2.9. Pasif zar eşdeğer devresi (Pehlivan, 1997).	15
Şekil 2.10. Zara uygulanan puls (üstte) ve pulsun etkisiyle oluşan zar potansiyeli değişimi (altta) (Hodgkin ve Rushton, 1946'den uyarlanmıştır).....	15
Şekil 2.11. Aktif zar eşdeğer devresi (Pehlivan, 1997).....	17
Şekil 2.12. Voltaj kenetleme tekniği (Purves, 1997).....	18
Şekil 2.13. Voltaj kenetleme tekniği ile elde edilen akım değişimleri (Pehlivan, 1997).	18
Şekil 2.14. Voltaj kenetleme tekniği ile elde edilen iyon iletkenlik değişimleri.	19
Şekil 2.15. Yama kenetleme yöntemi ve tek kanal akımları (Pehlivan, 1997).	21
Şekil 2.16. Voltaj kapılı sodyum kanalı için bir model gösterim (Homeworklib, 2023).....	22
Şekil 2.17. Voltaj kapılı potasyum kanalı için bir model gösterim (Homeworklib, 2023).....	23
Şekil 2.18. Periferik sinir yapısı (Studyblue, 2023).	25
Şekil 2.19. BAP gözlemi yöntemleri (Pehlivan, 1997).....	26
Şekil 2.20. Suction kayıt yöntemi (Tuncer, 2008).	27
Şekil 2.21. Bifazik BAP (Dalkılıç, 1993).....	27
Şekil 2.22. Eşik izleme yönteminin çalışmasını gösteren çizim (Nodera ve Kaji, 2006'dan uyarlanmıştır).	29
Şekil 2.23. Eşik Elektrotonus alt-protokolünde depolarize ve hiperpolarize edici koşullama akımları için eşik azalması (%) eğrileri Nodera ve Kaji, 2006'dan modifiye edilmiştir).....	32
Şekil 2.24. I/V ilişkisi (current-threshold) ilişkisi.....	33

Şekil 2.25. Barret ve Barrett sızıntı akımları. Internoddan geçen akım depolarize edici ard potansiyel (dap) olarak adlandırılır. Zar hiperpolarize iken dap belirgin gözlenirken, zarın depolarize olduğu durumda dap zayıf olur (Kaji, 2003'den uyarlanmıştır.).....	34
Şekil 2.26. Toparlanma döngüsü (Nodera ve Kaji, 2006'dan uyarlanmıştır).	34
Şekil 3.1. Mikromanüplatör ile kontrol edilen hamilton enjektörü.....	36
Şekil 3.2. Epinöryum içerisine yerleştirilmiş hamilton enjektörü.....	37
Şekil 3.3. Epinöryum içerisine yerleştirilmiş hamilton enjektörünün yakından (25x) görüntüsü.	37
Şekil 3.4. Organ banyosu (Tuncer, 2008).	38
Şekil 3.5. Deney sistemi genel şeması.	39
Şekil 3.6. Sabit süreli (ms)-şiddeti kademeli artan uyaran akım (mA) ile genliği kademeli artan BAP (mV). Uyaran şiddeti (mA)- yanıt ilişkisi, ve zarın %10 depolarize ve %10 hiperpolarize edilmesi durumunda uyarılabilirlikteki değişim eğrileri.....	40
Şekil 3.7. Uyarılabilirlik bilgisi veren; Uyarının şiddeti (mA)-uyaran süresi (ms) ilişkisi (A) ve benzer şekilde Eşik yük miktarı (mA.ms)-Uyaran süresi (ms) ilişkisi (B), eğrileri. τ_{SD} uyaran süresi kısaltıkça eşik şiddet değerindeki artma hızının bir göstergesidir, bir bakıma zarın görünür zaman sabitidir.....	41
Şekil 3.8. Uzun süreli (100 ms) eşik altı depolarize veya hiperpolarize edici bir akım ile belirli zamansal gecikmelerle uygulanan test akımı (1 ms) ile aksonda uyarılabilirliğin test edilmesi işlemi, eşik elektrotonus.....	41
Şekil 3.9. Akım şiddeti, kontrol eşiğin +%50 (depolarize edici) değerinden -%10 adımlarla -%100 (hiperpolarize) değerine kadar basamaklı (ramp) biçiminde değiştirilmesi, ve şiddet-eşik azalması (%) eğrisi.	42
Şekil 4.1. Her bir grup için elde edilen maksimum BAP genliği (mV) ortalamaları ve standart hataları (sırayla grupların N=12, 10, 9, 10, 9).....	43
Şekil 4.2. Maksimum BAP yanıtının %50'sini elde etmek için gerekli uyaran şiddetinin (mA) her bir grup için ortalama değerleri (sırasıyla grupların N=12, 10, 12, 11, 12) ve standart hataları. * KON grubundan, # ise 7G grubundan $p<0,05$ 'lik farkı göstermektedir..	43
Şekil 4.3. Kontrol grubundan bir deneğe ait yük-süre eğrisi ve değerlere oturtulan doğru.	44
Şekil 4.4. Her bir grup için ortalama reobaz (mA) değerleri (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 10, 9) standart hataları ile birlikte verilmiştir. * KON grubundan farklılığı, # 7G grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).....	44
Şekil 4.5. Her bir grup için SDTC ortalama değerleri (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 10, 9) ve standart hataları birlikte verilmiştir.....	45

Şekil 4.6. Her bir grup için ortalama (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 10, 9) SDTC dağılımı	45
Şekil 4.7. Grupların uyaran yükünün süresiyle değişimlerinin bir doğru üzerine oturtulduğu grafik. Grup ortalamaları (sırasıyla grupların N=12, 6, 7, 9, 9) ve standart hata kullanılarak çizdirilmiştir.	46
Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait bir deneğin eşik elektrotonus eğrisi.	47
Şekil 4.9. Grupların TEd40(uyum) ortalamaları (N=12, 10, 9, 11, 10) ve standart hataları.	47
Şekil 4.10. Grupların TEh (overshoot) ortalamaları (sırasıyla grupların N=12, 7, 11, 10, 6) ve standart hataları. * KON grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).	47
Şekil 4.11. Kontrol grubundan bir deneğe ait I/V grafiği.	49
Şekil 4.12. I/V eğrisinden hiperpolarizasyon bölgesinin gruplara ait ortalama (sırasıyla grupların N=8, 7, 8, 7, 8) eğim değerleri ve standart hataları. * KON grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).	49
Şekil 4.13. Kontrol grubundan bir deneğe ait toparlanma döngüsü eğrisi.	50
Şekil 4.14. Her bir grup için elde edilen ortalama (N=11, 6, 8, 10, 11) % eşik değişimi standart hatalar ile çizdirilmiş toparlanma döngüsü eğrileri.	50
Şekil 4.15. Gruplara ait 2 ms'de refrakterlik değerleri ortalamaları (sırasıyla grupların N=10, 5, 3, 8, 5) ve standart hataları.	51

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalı
Nörobiyofizik
[Doktora Tezi]

DENEYSEL DEMİYELİNİZASYON SÜRECİNİN PERİFERİK SINIRLARIN HIZ VE UYARILABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI İLKSEN BURAT

Konya-2023

Periferik sinir sistemini oluşturan nöronların Schwann hücrelerinde hasar oluşması demiyelinizasyon; bu hasarın iyileşme süreci de remiyelinizasyon olarak adlandırılır. Remiyelinizasyon her durumda tam olarak gerçekleşmez; bu nedenle çeşitli periferik sinir hastalıkları oluşur. Bu hastalıkların hayvanlar üzerinde modellenmesi için kullanılan yöntemlerden bir tanesi lizofosfotidilkolinin sinir kılıfı içerisine, mikroenjeksiyon ile zerk edilmesidir. Lizofosfotidilkolinin geçici ve lokal demiyelinizasyona sebep olduğu literatürde görülmektedir.

Sinir hücrelerinde oluşan yaralanmaların tespiti için, bu hücrelerin zarlarının elektriksel özellikleri incelenir. Eşik izleme yöntemi, sinirlere farklı puls desenleri uygulanarak, sinir hücresinin zar sığası ve direnci gibi elektriksel özellikleri ile iyon kanal kinetikleri hakkında veri toplanmasını sağlar. Uyarı-yanıt ilişkisi, şiddet-süre zaman sabiti, toparlanma döngüsü, eşik elektrotonus ve akım-eşik isimli alt-protokoller sinir hücrelerinde iletimden sorumlu farklı mekanizmalar hakkında bilgi verir.

Bu çalışmada, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerini izlemek, başlangıçlarını yakalamak ve bu süreçlerde sinir lifindeki kanal kinetiklerinin nasıl değiştiğini incelemek için, farklı hayvanlara lizofosfotidilkolin enjeksiyonu yapıldıktan 3, 7, 10 ve 20 gün sonra, hayvanların izole siyatik sinirlerinden uyarılabilirlik ölçümleri alınmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular incelendiğinde, birçok parametrede grup ortalamalarının seyri, genel olarak literatüre uyumlu sonuçlar vermektedir. Maksimum BAP genliğinde anlamlı fark bulunmasa da, maksimum yanıtın %50'si için gereken uyarı şiddeti ile birlikte ele alındığında demiyelinizasyonun ve remiyelinizasyonun gerçekleştiği ve LPC mikroenjeksiyonu modelinin başarıyla uygulandığı kabaca görülmektedir. Reobaz ve SDTC değerleri LPC ile demiyelinizasyonun ortalama 3 günde sağlandığını ve daha sonra remiyelinizasyonun 20 günden önce başladığını göstermektedir. Akım-eşik ve eşik elektrotonus değerleri de önceki cümledeki sonucu desteklemektedir. Bu çalışmada, iyon kanal dağılımının demiyelinizasyonla değiştiği ve remiyelinizasyonla önceki haline, kısmen de olsa, döndüğü uyarılabilirlik yönünden gösterilmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Demiyelinizasyon, Eşik izleme yöntemi, Lizofosfotidilkolin, Periferik sinir, Remiyelinizasyon,.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Biophysics
Neurobiophysics
[Doctoral Thesis]

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF EXPERIMENTAL DEMYELINIZATION PROCESS ON PERIPHERAL NERVE VELOCITY AND EXCITABILITY

İlksen BURAT

KONYA-2023

Damage to Schwann cells of neurons forming the peripheral nervous system, demyelination; the healing process of this damage is also called remyelination. Remyelination does not complete in all cases; therefore, various peripheral nerve diseases occur. One of the methods used to model these diseases on animals is injecting lysophosphatidylcholine into the nerve sheath by microinjection. It is seen in the literature that lysophosphatidylcholine causes temporary and local demyelination.

In order to detect injuries in nerve cells, the electrical properties of these cells' membranes are examined. Threshold tracking method provides data collection about electrical properties such as membrane capacitance and resistance and ion channel kinetics of neuron membranes by applying different pulse patterns to nerves. Sub-protocols named stimulus-response relationship, strength-duration time constant, recovery cycle, threshold electrotonus and current-threshold, provide information about different mechanisms responsible for conduction in nerve cells.

In this study, in order to track demyelination and remyelination processes, to capture their onset, and to examine how nerve fiber channel kinetics change during these processes, excitability measurements were taken from isolated sciatic nerves of animals at 3, 7, 10 and 20 days after injection of lysophosphatidylcholine in different animals and they are compared with control group.

When the findings obtained are examined, the alteration of group averages in many parameters give results that are generally compatible with the literature. Although there is no significant difference in maximum BAP amplitude when considered together with the stimulus intensity required for 50% of the maximum response, it is roughly seen that demyelination and remyelination occur and the LPC microinjection model is successfully applied. Rheobase and SDTC values show that LPC-induced demyelination is achieved in 3 days on average, and then remyelination begins before 20 days. Current-threshold and threshold electrotonus values also support the result in the previous sentence. In this study, it was shown in terms of excitability that the ion channel concentration changes with demyelination and returns to their previous state, albeit partially, with remyelination.

Keywords: Demyelination, Lysophosphatidylcholine, Peripheral nerve, Remyelination, Threshold tracking method.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sinir sistemi vücudumuzun kendi içerisindeki ve dış dünya ile olan iletişimi ve tepkileri sağlayan sistemdir. Merkezi sinir sistemi beyin ve omirilikten oluşurken, bunların dışında kalan sinirler de periferik sinir sistemini oluştururlar. Çevresel ve/veya genetik faktörlerden zarar gören sinir hücrelerinin iyileşme süreci tam olarak çözülememiştir. Sinir lifi üzerindeki Schwann hücrelerinin zarar görmesiyle ortaya çıkan demiyelinizasyon, periferik sinir sisteminde Guillain-Barre sendromu, Charcot-Marie-Tooth Hastalığı gibi hastalıklara yol açmaktadır. Bu hasar, sinir uyarılabilirliğini etkileyerek, iletim parametrelerinde gerilemeye sebep olur.

Lizofosfotidilkolinin (LPC) sinir kılıfı içerisine mikroenjeksiyonu, hayvanlar üzerinde demiyelinizasyon sürecinin çalışılmasında kullanılan bir modeldir. Eşik izleme yöntemi, sinir uyarılabilirliğini farklı puls paternleri uygulayarak takip eden; sinir hücrelerindeki iyon kanallarında, çeşitli sebeplerle oluşan farklılıkları tespit etmek için son yıllarda tercih edilen otomatize bir yöntem olmuştur.

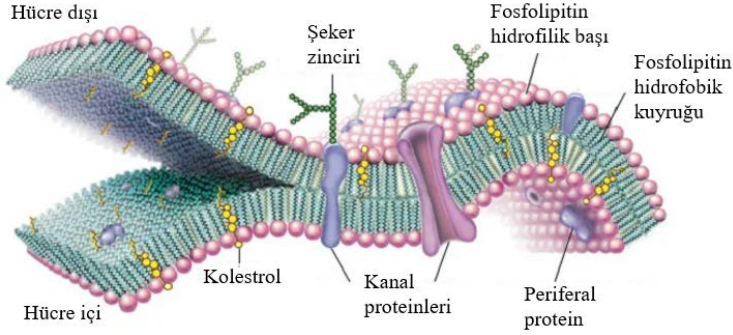
Bu tez çalışması ile LPC mikroenjeksiyonu modeli ile oluşturulan demiyelinizasyon ve sonrasında gerçekleşen remiyelinizasyon süreçleri izlenmek amaçlanmıştır. Süreçlerin modele yansımaları için kontrol grubu ile LPC mikroenjeksiyonundan sonraki 3., 7., 10. ve 20. günler karşılaştırılmıştır. Verilerin toplanmasında QtracS programı ile eşik izleme yöntemi ve analiz ve istatistik için Microsoft Office Excel 2016 programı tercih edilmiştir. Böylece demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon sürecini uyarılabilirlik parametreleri ve iyon kanallarının dağılımı üzerinden yorumlamak hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Zarı

Hücreyi çepeçevre saran hücre zarının asıl görevi hücrenin bütünlüğünü korumaktır. Bunun yanında hücre zarının iç ortam özelliklerinin sabit tutulması, dış ortam ile seçimli madde alışverişinin sağlanması, artık ürünlerin hücre dışına atılması gibi yan işlevleri de vardır.



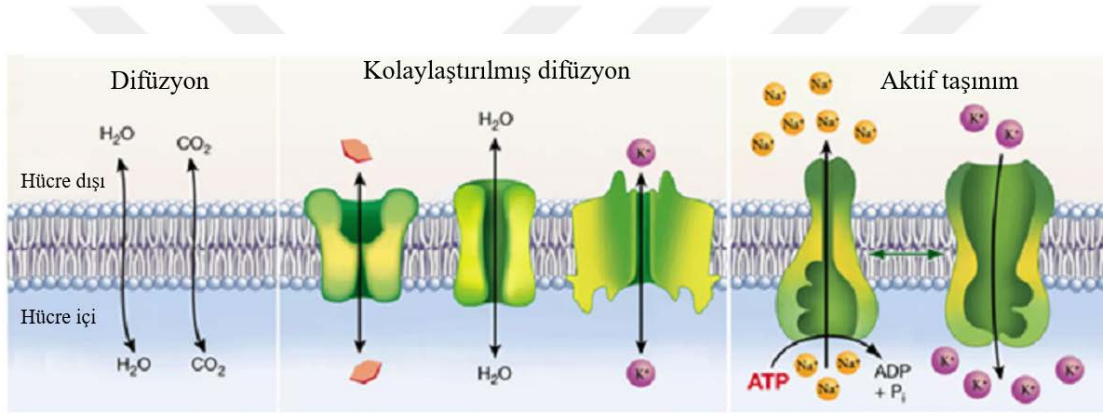
Şekil 2.1. Hücre zarı (Britannica, 2023).

Hücre zarının temel yapı taşı lipitlerdir. Lipitler hidrofilik bir baş ile, hidrofobik bir çift kuyruktan oluşur. Sulu ortamda hidrofobik kuyruklar birbirlerine dönerek; misel veya çift tabaka gibi gruplaşmalar yaparlar. Bu yüzyılın başından beri kabul gören ‘akışkan-mozaiik zar’ modeli (Şekil 2.1), lipit çift tabakanın akışkan bir şekilde hücreyi sardığını ve protein yapıların mozaiik gibi bu akışkanda dağıldıklarını öne sürer. Bu lipit tabakadan su, azot, oksijen, alkol gibi moleküller rahatlıkla geçebilirken; iyonların, aminoasitlerin, yağ asitlerinin vb. geçişi zordur. Zarda bulunan protein yapılar (kanallar) özellikle iyon geçişlerini kolaylaştırmaktadır (Neher ve Sakmann, 1992).

2.2. İyon Konsantrasyonları ve Hücre Zarından Tanecik Geçişleri

Zarın iç ve dış ortamlarında farklı konsantrasyonlarda bulunan moleküller ve iyonlar, çeşitli mekanizmalarla zardan geçiş sağlarlar. Bu mekanizmalar pasif ve aktif taşınım şeklinde ikiye ayrılırlar. Pasif taşınımın gerçekleşmesi için enerji harcanmaz; taneciklere etkiyen konsantrasyon, elektriksel potansiyel gibi pasif gradientler tanecik hareketlerine yol açar. Tanecik zardan tek başına geçiş yapıyorsa bu olaya ‘basit difüzyon’; bir taşıyıcı proteinle birlikte geçiş yapıyorsa bu olaya ‘kolaylaştırılmış difüzyon’ denir. Basit difüzyonun iki farklı şekli vardır: Oksijen, azot gibi yağda çözünen moleküllerin lipit çift tabakadan kolaylıkla geçişine ‘doğrudan geçiş’ denir. İyonlar gibi yağda çözünmeyen moleküllerin geçişleri proteinlerden oluşan kanallardan gerçekleşir ve ‘protein kanallarından geçiş’ şeklinde adlandırılır. Zardan tek başına geçemeyen bazı tanecikler, zarı geçebilen proteinlere bağlanırlar ve böylece zardan geçiş yaparlar. Bu şekilde gerçekleşen geçişlere ‘kolaylaştırılmış difüzyon’

denir. Pasif gradyentlerin taneciklere uyguladığı net kuvvetin tersi yönde taneciğe zardan geçiş yaptırmak için enerji harcanması gerekir. Bu nedenle bu tür taşınımlara aktif taşınım denir. İki şekli vardır: Birincil aktif taşınımada adenozin trifosfat (ATP) kullanılır; ikincil aktif taşınım ise yine iki farklı şekilde gerçekleştirilir. Taşıyıcı protein iki farklı reseptöre sahiptir. Bunlardan birine Na^+ bağlanırken; diğerine glikoz veya aminoasit bağlanır. Sodyum iyonunun konsantrasyon gradyenti etkisiyle içeri taşınması, glikozun yokuş yukarı taşınmasını sağlar. Bu olay sodyumla ortak taşınım olarak adlandırılır. Taşıyıcı proteinin hücre dışı tarafında Na^+ reseptörü var iken, hücre içi bölgesinde başka bir iyonla bağlanan reseptörü varsa (Ca^{+2} , K^+ gibi), Na^+ pasif gradyent etkisi ile içeri taşınırken, içerideki iyonlar yokuş yukarı olarak dışarı taşınmış olur. Bu tür taşınıma sodyumla karşıt taşınım (veya değiş-tokuş) denir (Hille, 2001; Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Taşınım mekanizmaları (Homeworklib, 2023).

Sadece pasif kuvvetlerin etkisinde olan bir iyonun zardan net geçiş akısı sıfır ise bu iyonun dengede olduğu söylenir. Ancak; pasif geçişlerle birlikte, o iyonun aktif geçişleri de mevcut ise ve bununla birlikte zamanla zarın iki tarafındaki konsantrasyonu değişmiyorsa bu durum kararlı veya dinamik denge durumu adını alır (Pehlivan, 1997).

Zarın iki tarafında konsantrasyon farkı yokken zara elektriksel potansiyel uygulanırsa iyonlar zardan geçerler. Bir süre sonra zarın bir tarafında bir çeşit yükün fazlalığı oluşacağından, bu yüklere elektriksel gradyente ek bir de konsantrasyon gradyenti etkir. Yarı geçirgen zarın iki tarafındaki konsantrasyon farkı iyonlara kuvvet uygulayarak iyon geçişine ve böylece zar potansiyeline yol açar. Bu hareketler 1 ms gibi sürelerde zar potansiyelini iyonla bağlı olarak belli değerlerde değiştirir. Bu değişim potasyum iyonları için -94 mV iken sodyum iyonları için +61 mV'tur. Uyarılabilir hücrelerdeki impuls iletimi bu şekilde kısa sürede gerçekleşir (Pehlivan, 1997; Guyton ve Hall, 2001).

Yukarıdaki olayda zarın iki tarafı arasındaki elektriksel potansiyel farkı iyonun difüzyon etkisi ile hareket etmesine engel olabilir. Bu potansiyel değerine o iyon için “Nernst Potansiyeli” denir. Nernst potansiyelini belirleyen ana etken iyon konsantrasyonlarıdır. Bu potansiyeli hesaplamak için Nernst denge denklemi (eşitlik 2.1) kullanılır (Pehlivan, 1997; Guyton ve Hall, 2001).

$$E_i = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{c_i^{dış}}{c_i^{iç}} \quad (2.1)$$

Bu denklem bize konsantrasyon farkından kaynaklanan göçü dengelemek için iç-dış potansiyel farkının ne olması gerektiğini söyler (Guyton ve Hall, 2001; Ferreira ve Marshall, 1985).

Aktif ve pasif geçişler altında dinlenimde olan, yani bir enformasyon taşımayan bir zarın iki tarafında bir potansiyel fark oluşur. Dinlenim zar potansiyeli olarak adlandırılan bu fark, memeli sinir hücrelerinde (-20)-(-100) mV değerlerindedir. Bu potansiyel fark, zar üzerinde elektriksel alan oluşturur. Bu alanın zar kalınlığı doğrultusunda düzgün ve sabit kabul edilmesi ve bu duruma etken üç iyonun (Na^+ , K^+ , Ca^{+2}) katkılarıyla (zarın geçirgenliği bu üç iyona daha fazla olduğundan (Guyton ve Hall, 2001) dinlenim zar potansiyeli değeri elde edilir. Bunun için Goldman-Hodgkin-Katz denklemi (eşitlik 2.2) kullanılır.

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]^{dış} + P_{Na}[Na^+]^{dış} + P_{Cl}[Cl^-]^{iç}}{P_K[K^+]^{iç} + P_{Na}[Na^+]^{iç} + P_{Cl}[Cl^-]^{dış}} \quad (2.2)$$

Denklemden P_i iyonunun geçirgenliğini, E_m zar potansiyelini gösterir. İyonlardan birinin geçirgenliği, diğerlerine oranla çok büyükse bu denklem Nernst denge denklemine indirgenir.

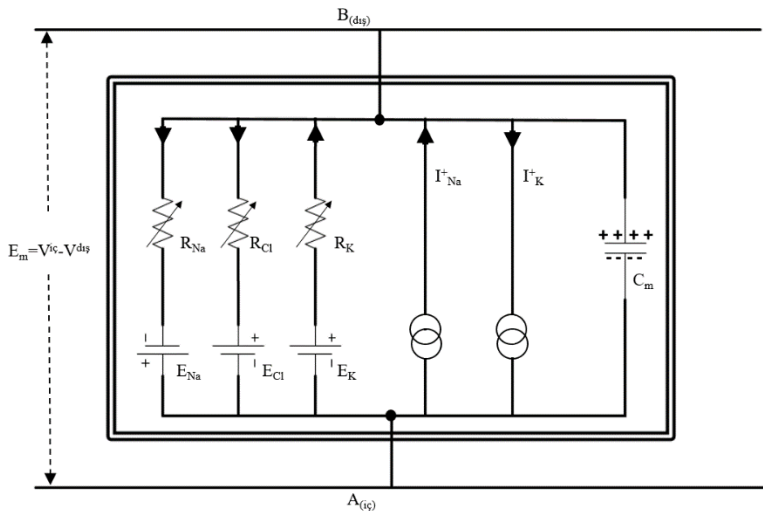
Dinlenim durumunda Na^+ ve K^+ iyonlarının sadece pasif geçişleri mevcut olsa idi iyon konsantrasyonları zamanla değişirdi. Gerçekte konsantrasyonlar değişmediğine göre bu pasif hareketleri dengeleyen bir aktif mekanizma olması gerekliliği düşünülmüştür. Bunun sonucunda, sodyum iyonlarını dışarıya ve potasyum iyonlarını içeriye taşıyan aktif Na^+-K^+ pompanın olması gerektiği kavramına ulaşılmıştır. Pompanın işleyişi tam olarak bilinmiyor olsa da yaygın kabul görmüş modellerden birisi bağlantılı iki reaksiyonu öne sürer (eşitlik 2.3). Potasyum iyonlarına ilgisi daha yüksek olan taşıyıcı protein E ve sodyum iyonlarına ilgisi daha yüksek olan fosforlanmış taşıyıcı enzim EP olmak üzere;



reaksiyonu zarın iç tarafında sağa, dış tarafında sola doğru gerçekleşmektedir. Hücre dışı ortamda K^+ 'un, hücre içi ortamda Na^+ 'un yokluğu söz konusu ise pompa çalışmaz. Pompanın Na^+ - K^+ taşıma oranı ise hücreden hücreye değişmektedir. Genellikle nöron liflerinde bu yapı 3 adet sodyum iyonunu hücre dışına taşıırken 2 adet potasyum iyonunu hücre içine taşır. ATP harcanan bu hareketle hem hücre içi negatifleşir hem de Na^+ ve K^+ 'un konsantrasyon farkları korunmuş olur (Pehlivan, 1997; Guyton ve Hall, 2001; Vasilescu ve Margineanu, 1982).

2.3. Zara Eşdeğer Elektrik Devresi

Zardan geçen yüklü taneciklerin elektrik akımı oluşturması, zarın elektriksel yalıtkan olması ve iyonlara farklı dirençler uygulaması gibi özelliklerden yola çıkılarak hücre zarı için elektriksel eşdeğer devre oluşturulabilir. Hücre zarı iki tarafı iletken çözelti olan bir yalıtkan tabaka olarak, sığası C_m ile ifade edilen bir kondansatör gibi davranır. Dinlenim zar potansiyeli E_m , iyonları zardan geçişe zorlayan elektromotor kuvvetler E_{Na} , E_K , E_{Cl} ; zarın her bir iyonla farklı değerlerde uyguladığı dirençler R_{Na} , R_K , R_{Cl} ; iyon geçişlerinin oluşturduğu akımlar ise I_{Na} , I_K , I_{Cl} ile gösterilir. Pompaların akım kaynağı olarak davrandığı düşünülerek zar için elektriksel bir eş değer devre Şekil 2.3'teki gibi oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Zarda elektriksel eş değer devresi (Pehlivan, 1997).

Hücre dinlenimdeyken klor iyonları dengede olduğundan I_{Cl} sıfırdır. Kirchhoff yasaları bu devreye uygulanıp, gerekli çözümler yapıldığında iyonik akımlar

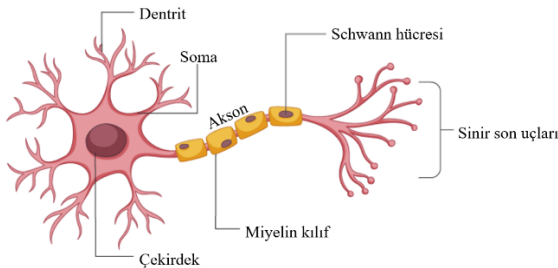
$$I_{Na} = 25 \text{ nA}; I_K = 25 \text{ nA}$$

olarak bulunur. Herhangi bir iyonla ait koldan zar potansiyeli $E_m = -70 \text{ mV}$ olarak hesaplanır.

2.4. Sinir Sistemi ve Nöron

Sinir sistemi organizmanın hem dışarıyla iletişimini hem de iç kontrolünü sağlayan sistemdir. Çevreden gelen bilgiyi ve çevreye verdiğimiz tepkileri içeren enformasyon iletimini sağlayan ağdır. Merkezi (MSS) ve periferik (PSS) sinir sistemi şeklinde ikiye ayrılan sistem; farklı amaçlar doğrultusunda özelleşmiş hücre tiplerine sahiptir. MSS beyin ve omirilikten oluşur ve karar alma, tepki verme, hormonların düzenlenmesi gibi işlevlere sahiptir. PSS ise beyin ve omirilik dışında kalan sinir hücrelerinden (nöronlardan) oluşur ve dış ortamdan sıcaklık, basınç gibi bilgileri almakla ve MSS'den gelen emirleri (duyusal ve motor) yerine getirmekle görevlidir. Nöronlar bu bilgileri ve emirleri elektriksel sinyallerle taşırlar. Bu sinyaller, temelde iyonların zardan geçişleri sayesinde gerçekleşir ve aksiyon potansiyeli (AP) olarak adlandırılır. Nöronda bir AP oluşabilmesi için, nöronun uyarılması gerekir.

Bir nöron 3 ana bölümden oluşur: gövde, dentritler ve akson (sinir lifi) (Şekil 2.4). Hücreyi kontrol eden çekirdek gövdede bulunur. Gövdeden dışarıya doğru uzanan ipsi yapılar dentrit adını alır. Akson ise gövdeden aldığı bilgiyi aktif olarak taşıyan kısımdır. Akson sonundaki yapılara sinir son ucu denir. Dentritler ile diğer nöronlardan alınan informasyon gövde üzerinden aksona ve buradan da sinir son uçları aracılığıyla sinaps, bir diğer nöron vb. hedeflere iletilir.



Şekil 2.4. Sinir hücresi.

Nöronlardan bazıları schwann hücreleri ile çevrili aksonlara sahiptir. Bu schwann hücreleri akson üzerinde bölgesel olarak katlanıp kılıf benzeri bir yapı oluştururlar. Bu yapıya miyelin kılıf adı verilir. Akson üzerindeki miyelin kılıf 2-3 μm 'lik kesintilere uğrar. Bu çıplak bölgeler Ranvier Boğumları olarak adlandırılırlar. Akson içerisine tanecik giriş çıkışları bu Ranvier Boğumlarında gerçekleşir. Bu nedenle aslında AP'nin kendisini yenileyerek oluştuğu bölge boğumlardır. Uyarılmış boğum ile komşu uyarılmamış boğum arasında oluşan akım çizgileri sayesinde yeni bir AP oluşur; böylece AP bir boğumdan diğerine sıçrayarak 'saltatorik' iletilir. (Guyton ve Hall, 2001; Burke ve ark., 2001).

2.5. Aksiyon Potansiyeli

2.5.1. Zar potansiyelinin ölçülmesi

Uç çapı mikrometre mertebesinde olan bir cam tüpün içerisine kuvvetli bir elektrolit çözelti (KCl) doldurularak içine yerleştirilen AgCl kaplı bir gümüş tel ile bu tüp bir mikroelektrota dönüştürülebilir. Hücre içerisine yerleştirilen bu mikroelektrot ile hücre dışındaki bir referans elektrot birlikte kullanılarak zar potansiyel değişimleri ölçülür (Guyton ve Hall, 2001).

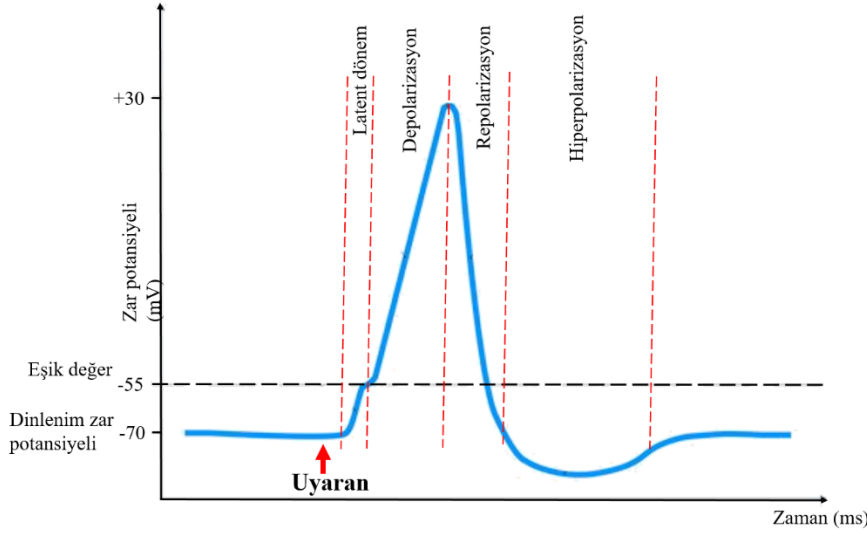
Bir AP şu şekilde dönemlere ayrılmıştır:

Dinlenme dönemi: zarda uyarı taşınmadığı dönemdir. Hücre içi hücre dışına göre -65 mV ile -90 mV arasında bir potansiyele sahiptir (dinlenme zar potansiyeli) (Guyton ve Hall, 2001).

Depolarizasyon dönemi: uyarılan zarın Na^+ geçirgenliği ani bir şekilde artarak hücre içerisine çok fazla miktarda Na^+ girmesine yol açar. Böylece zar potansiyeli hızlıca pozitif değerlere yükselir. Buna zarın depolarizasyonu denir (Guyton ve Hall, 2001).

Repolarizasyon dönemi: AP'nin tepe noktasından (pik yaptığı) sonra zarın Na^+ geçirgenliği hızlıca azalmaya yani Na^+ kanalları hızlıca kapanmaya başlar. Bu sırada K^+ kanalları daha da açılarak zarın K^+ geçirgenliğini artırır ve böylece zar potansiyeli negatif yönde değişmeye başlar. Bu aşamadan dinlenme zar potansiyeline ulaşmaya kadar olan dönem repolarizasyon olarak adlandırılır (Guyton ve Hall, 2001).

Depolarizasyon ve repolarizasyon süreçleri voltaj kapılı iyon kanalları tarafından yönetilir (Şekil 2.5). Membran potansiyelindeki değişim süreçlerini içeren bir AP biçimi Şekil 2.5 ile verilmiştir (Guyton ve Hall, 2001).



Şekil 2.5. AP evreleri (Pehlivan, 1997'den uyarlanmıştır).

2.5.2. Ya hep ya hiç davranışı

Farklı amaçlara hizmet eden nöronların oluşturduğu AP deseni ve AP'nin yayılma hızı farklılık gösterir. Bu farklılığa yol açan sebepler arasında miyelin kılıfın varlığı ve kalınlığı, akson çapı ve iyon kanallarının birim alandaki yoğunlukları arasındaki farklar gibi sebepler vardır. Ancak bir cins nöron grubu her zaman, yeterli her uyarıya aynı özelliklerdeki AP ile yanıt verir. AP'nin süresi, genliği uyarının özellikleri ile değişmez. Yani bir nöronda ya hiç AP yoktur ya da tamamen aynı özelliklere sahip AP'ler oluşur. Nöronların bu davranışı ya hep ya hiç davranışı olarak tanımlanır (Pehlivan, 1997).

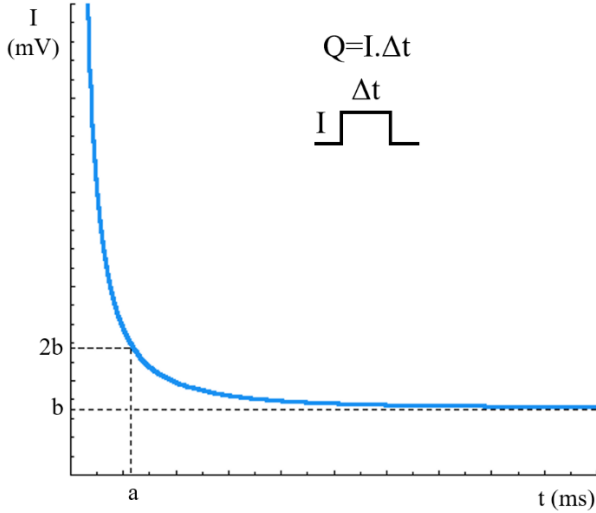
2.5.3. Eşik uyarı

Bir nöronda AP oluşturabilmek için uyarının membran potansiyelini eşik bir değere kadar ulaştırması gerekmektedir. Örneğin uyarın türü olarak elektriksel uyarıları dikkate alırsak, membran potansiyelinin eşik değere ulaşması uyarının sadece genliği ile ilgili değildir. Nörona uygulanan pulsun şiddeti (I) ile süresinin (Δt) çarpımı olan elektrik yükü ($\Delta Q = I \cdot \Delta t$, Weiss yasası) belirli bir değerin (eşik değeri) üzerinde ise uygulanan bu elektriksel puls AP oluşturur. Eşik değerin üzerindeki, aynı yüke sahip, farklı genlikteki pulsların farklı sürelerde uygulanmasıyla da AP elde edilebilir. Böyle bir puls grubuna ait I- Δt değişim eğrisi Şekil 2.6 ile görülmektedir. Bu hiperbol şeklinde azalan eğriye şiddet-süre (strength-duration) eğrisi denir ve matematiksel olarak

$$I_{eşik} = \left(\frac{a}{\Delta t} \right) + b \quad (2.4)$$

eşitliği ile ifade edilir. Grafikteki b değeri reobaz adını alır ve bu değer altında şiddete sahip pulsların uygulanma süreleri ne kadar fazla olursa olsun AP oluşturamazlar. Reobazın iki katı

şiddete sahip pulsların AP oluşturabilmesi için gereken Δt değerine ise kronaksi denir. Reobaz ve kronaksi değerleri doğrudan nöron uyarılabilirliğinin bir ölçütüdür. Bir nöronun kronaksisi ne kadar düşükse uyarılabilirliği de o kadar yüksektir.



Şekil 2.6. Şiddet (mV) – Süre (ms) eğrisi.

İyon kanalları perspektifinden baktığımızda, hücreye gelen her uyarının bir miktar Na^+ kanalı açtığını, yani çok zayıf da olsa Na^+ akımına yol açtığını görürüz. Ancak bu minik depolarizasyon K^+ ve sızıntı akımlarını da tetikler. Sızıntı akımlarının kaynağı pasif (kapısız) kanallardır. K^+ 'un dışarı yönde, Na^+ 'un içeri yönde geçtiği bu kanallar K^+ 'u 100 kat daha fazla geçirir (Guyton ve Hall, 2001). Bu nedenle, yeterli sayıda Na^+ kanalı açılmadıysa oluşan depolarizasyon (diğer bir deyişle yöresel depolarizasyon) sönümlenir ve zar dinlenime döner. Uyarın şiddeti membran potansiyelini eşik değere ulaşacak akımı sağlayacak Na^+ kanalı açacak düzeyde ise, oluşan depolarizasyon tersi yöndeki etkileri yenerek AP oluşumunu başlatır. Uyarının verilmesiyle AP oluşması arasında geçen süreye latent dönem (Şekil 2.5) denir ve uyarın şiddeti arttıkça latent dönem kısalır.

2.5.4. Yöresel depolarizasyonlar

Aksona uygulanan her uyarı uygulama noktasında potansiyel değişimine neden olur. Fakat sadece eşike ulaştırabilen uyarınların yanıtları AP'ye dönüşerek taşınır. AP'ye dönüşemeyen potansiyel değişimleri ise, uyarı bölgesinde oluşup sönümlendikleri için yöresel yanıtlar (local response) adını alır. Zar potansiyelinin dinlenimden daha pozitif değerlere doğru değişimi depolarizasyon, tekrar dinlenim değerine dönmesi sürecine repolarizasyon, dinlenim potansiyelinden daha negatif değerlere inmesine hiperpolarizasyon denir. Eşik altı uyarın uygulanmasıyla, o bölgede oluşan yöresel depolarizasyon, uyarın şiddetiyle artar ve eğer yöresel depolarizasyon kritik değeri (eşik) aşarsa AP'ye dönüşür ve aksonun diğer bölgelerine

doğru yayılır. Eşik altı uyaran sonucunda oluşan yöresel depolarizasyon sönümlenmeden, bir eşik altı uyaran daha uygulanırsa ikincinin yanıtı ilk yöresel depolarizasyona eklenir ve toplamları yeterli gelirse AP oluşur. Bu yöresel toplama işlemi (summation) iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Bir bölgeye aynı odaktan çok kısa zaman aralığında ardışık olarak eşik altı uyaranlar ulaşıyorsa, oluşan yöresel depolarizasyonların toplanarak AP oluşturmaya zamansal toplama denir. Farklı noktalardan ulaşarak gelen eşik altı uyaranların yanıtlarının toplanıp AP oluşturmaya ise uzaysal toplama denir.

2.5.5. Uyum

Nöronun uyarılabilmesi için uygulanan akım şiddetinin, zar potansiyelini eşik değere ulaştırması gerektiği bilinmektedir. Ancak bu eşik değeri aynı nöron için her zaman aynı değeri değildir. Nöronun geçmişine bağlı olduğu kadar uyarının değışim biçimine de bağlıdır. Puls biçimli uyarılara nöronun verdiği yanıt sabitken, uyarın şiddetinin zamanla değıştiği durumlarda bu yanıt sabit değildir. Zamanla artan bir uyarının artış hızı belli bir değerin altında kalırsa, uyarının değışen şiddeti sonunda ne kadar yüksek olursa olsun hücreyi uyaramaz. Bu duruma iyon kanallarının kinetikleri neden olmaktadır. Uyarı başladığında, uyarım bölgesinde bir miktar Na^+ kanalı açılır ve Na^+ akışı başlar. Ancak uyarın şiddetinin eşik değere ulaşması için geçen sürede ilk açılan Na^+ kanalları inaktive olmaya başlar ve kapanır; bu esnada K^+ kanalları açılmış olur. Uyarın şiddetinin sürekli arttığı bu durumda oluşan yöresel depolarizasyonlar sönümlenir ve AP oluşturmazlar. Zamanla artan uyarın şiddetine hücrenin verdiği bu tepki uyum olarak adlandırılır. Uyum sebebiyle sinir dokusuna yönelik deneylerde uyarın olarak puls biçimli akımlar kullanılır (Pehlivan, 1997).

2.5.6. Ard potansiyeller

AP repolarizasyon evresinde zar potansiyeli, bir süre dinlenme değeri üzerinde veya altında seyredebilir. Bu döneme ard potansiyel adı verilir. Dinlenme değeri üzerindeki ard potansiyele depolarize edici ard potansiyel denir. Na-K pompasının bir süre hızlı tempo ile çalışmasından kaynaklanır. Dinlenme değeri altındaki ard potansiyele hiperpolarize edici ard potansiyel denir ve zarın K^+ geçirgenliğinin bir süre yüksek kalmasından dolayı oluşur. Ard potansiyellerin izlediği süreç (patern) hücre türüne göre değışmektedir (Pehlivan, 1997).

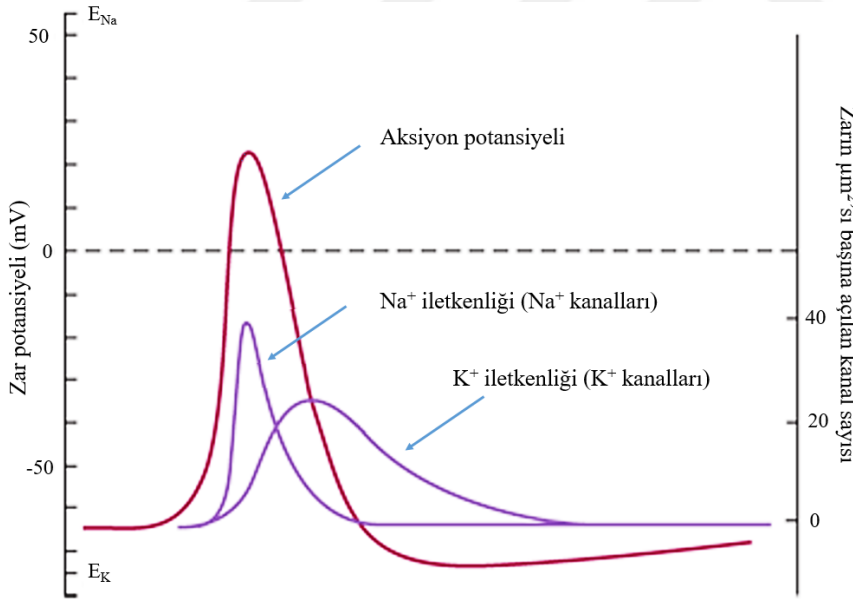
2.5.7. Refrakter dönem

Zara uygulanan uyarın şiddetine bağlı olarak, zardaki Na^+ kanallarının açılmasıyla AP başlar. Açılan bu Na^+ kanallarının inaktive olup tekrar açılma süreci depolarizasyondan bir süre sonrasına kadar sürer. Na^+ kanalları tekrar aktive olana kadar zarın bu bölgesinde yeni bir AP

oluşamaz. Uyarın ne kadar şiddetli olursa olsun zarın uyarılmadığı bu döneme mutlak refrakter dönem denir. Depolarizasyondan bir süre sonra bu Na^+ kanalları adım adım aktive olurlar. Bu sırada hücre, normal eşikten daha şiddetli uyarılara yanıt verebilir. Aktive olan Na^+ kanalı sayısı arttıkça AP için gerekli uyarın şiddeti de adım adım azalır ve dinlenimdeki eşik değerine döner. Mutlak refrakter dönemden sonra başlayan ve zar potansiyeli dinlenim değerine ulaşmıyca kadar devam eden bu döneme bağıl refrakter dönem denir.

2.5.8. Aksiyon potansiyeli hakkında daha detaylı bilgiler

Hücre dinlenimdeyken sızıntı kanalları K^+ 'a daha geçirgen oldukları için zarın K^+ iletkenliği Na^+ iletkenliğinin yaklaşık yüz (100) katı kadardır. AP'nin başlamasıyla zarın Na^+ geçirgenliği beşyüz (500) kat artar. Artan potansiyel fark ile voltaj kapılı Na^+ kanallarının inaktivasyon kapıları kapanmaya başlarken; K^+ kanalları da açılmaya başlar. Bu esnada AP maksimum depolarizasyon değerine ulaşmış olur ve ivmelenen Na^+ akışı yavaşlaması ile repolarizasyon hızlanır. Membran potansiyelinin negatif değerlere dönmesiyle birlikte K^+ kanalları da kapanmaya başlar. Zar potansiyelindeki ve zarın iyonlara karşı iletkenliğindeki bu değişim süreçleri Şekil 2.7'da eş zamanlı olarak özetlenmiştir (Guyton ve Hall, 2001).



Şekil 2.7. Zarın iyon iletkenliklerinin değişimi (Kandel ve ark., 2014).

Pozitif ardpotansiyel: repolarizasyon döneminde, bir çok K^+ kanalı bir kaç ms için açık kalır ve bu nedenle zar potansiyeli dinlenim değerinin altına düşer. İlk potansiyel ölçümleri lifin dışından yapıldığı için bu küçük potansiyel değişimi pozitif olarak yorumlanmış ve bu hareketlenmeye, yanlış bir ifade olan pozitif ardpotansiyel adı verilmiştir (Guyton ve Hall, 2001).

AP sırasında diğ er iyonların rolleri

Anyonlar: Akson zarından geçemediğ i için hücre içinden ç ikamayan anyonlar (protein molekülleri, organik fosfat bileş ikleri, sülfat bileş ikleri vb.), hücre içinden pozitif yüklü iyonların (K^+ gibi) ç ıkmasıyla hücre içini negatif hale getirirler (Guyton ve Hall, 2001).

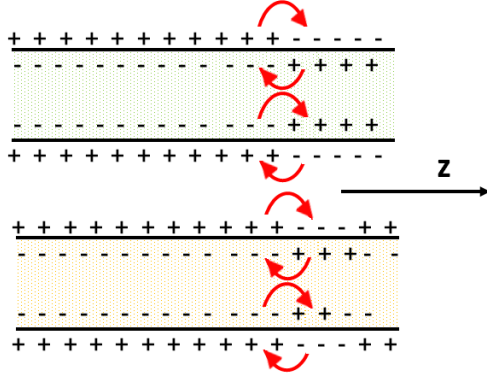
Kalsiyum iyonları: bir çok hücrede bulunan Ca^{++} pompası hücre içinden dış arıya Ca^{++} pompalayarak hücrenin iç i ile dış ı arasında 104 katlık bir konsantrasyon gradyenti oluşturur. İlaveten Ca^{++} 'la birlikte Na^+ 'a da hafif geçirgen olan Ca^{++} - Na^+ kanalları bulunur. Bunlar Na^+ kanallarına göre yavaş kinetiklidir (Guyton ve Hall, 2001). Kalsiyum iyonları Na^+ kanallarına bağ lanarak pozitif bir etki yaratır. Böylece kanalın aç ılması için daha yüksek voltaj gerekir. Eğer ekstraselüler ortamdaki Ca^{++} konsantrasyonu %50 veya daha fazla azalırsa; Na^+ kanalları dinlenim zar potansiyelinden küçük sapmalarda bile aç ılabilir. Böylece uyarı olmadığ halde sürekli deş arjlar oluş ur. Bu durum solunum kaslarını uyaran sinir liflerinde oluş ursa, kiş iyiyi ö lüme götürebilir (Guyton ve Hall, 2001).

AP'nin baş laması

Herhangi bir nedenle zar potansiyeli 0 V'a doç ru yükseliyorsa voltaj kapılı Na^+ kanalları aç ılmaya baş lar. Böylece zar potansiyeli daha da yükselerek pozitif geri beslemeli bir süreçte daha çok voltaj kapılı Na^+ kanalı aç ılmasına yol aç ar. Bu süreç yeteri kadar güçlüyse tüm voltaj kapılı Na^+ kanalları aç ılıncaya kadar devam ederek zar potansiyelini yükseltir. Ardından K^+ kanalları aç ılır ve bu sırada Na^+ kanalları da kapanmaya ve AP sonlanmaya baş lar. Hücre iç erisine giren Na^+ iyonlarının sayısı, ç ıkan K^+ iyonlarının sayısından daha fazla olduğ unda AP baş lar. Bu durumun sağ landığ ı voltaj değerine eş ik değer denir ve hücrede AP oluşturmak için gerekli alt limittir (Guyton ve Hall, 2001).

AP'nin yayılması

Akson herhangi bir noktasından uyarıldığ ında, eğer uyarı ş iddeti eş ik değerin üzerindeyse, lokal Na^+ kanalları aç ılarak AP'yi baş latır. Buradaki elektriksel yük hareketi (yerel akım devresi) yakındaki Na^+ kanallarını aktive eder ve depolarizasyon yakın bölgelere taş ınırken; önceki bölge repolarizasyon sürecine geç er (Ş ekil 2.8) (Guyton ve Hall, 2001).



Şekil 2.8. AP'nin aksonda iki yönlü yayılması (Pehlivan, 1997).

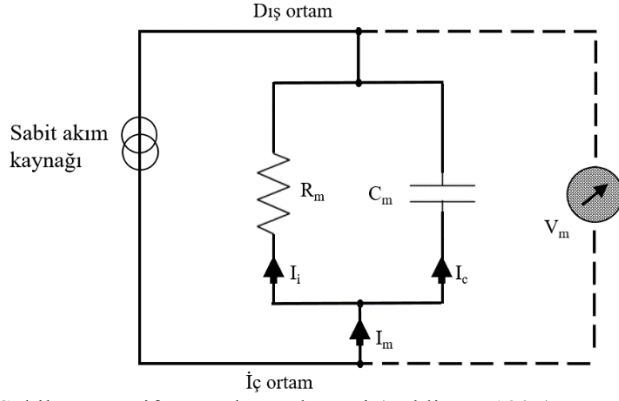
Akson üzerinde herhangi bir noktada oluşan depolarizasyon, iki yönde de akson boyunca yayılır (Pehlivan, 1997; Guyton ve Hall, 2001).

AP'den sonra Na^+ ve K^+ gradyantının yeniden oluşması

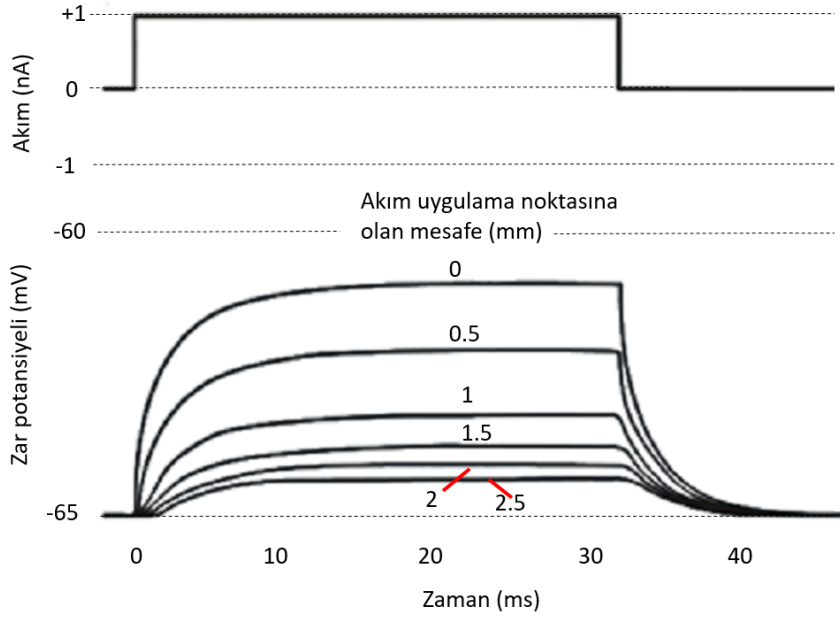
Depolarizasyon sürecinde Na^+ iyonları içeriye, repolarizasyon sürecinde K^+ iyonları dışarıya difüze olduğundan, AP sırasında iyon gradyantları azalır. Bir AP oluşumu ile belli belirsiz olan bu fark yine de zamanla tekrar oluşturulmazsa süreci olumsuz etkiler. Na-K pompasının aktivitesi, hücre içi Na^+ iyon gradyantının üçüncü kuvvetiyle orantılı şekilde artar. Böylece sinir lifi AP iletimi sonrasında hızlıca yeniden iyonik gradyant oluşturulur (Guyton ve Hall, 2001).

2.6. Pasif Zar Modeli ve Kablo Teorisi

Uyarının tetiklemesiyle oluşan AP akson boyunca kendini yineleyerek iletilir. Bu olaylar zincirini açıklamak için iki teori geliştirilmiştir. Bunlardan ilki olan pasif zar modeli ve kablo teorisi, hücre zarının direnç, sığa gibi özelliklerinin zar potansiyeli ile değişmediğini varsayar. İletken sıvılar olan hücre içi ve hücreler arası sıvılar birbirinden yalıtkan lipit tabaka yani hücre zarıyla ayrılmıştır. Bu teoride akson, deniz içerisindeki bir kablo gibidir. Pasif bir zarın elektriksel eş değer devresi Şekil 2.9'de görülmektedir. Zar direnci R_m ile, zar sığası ise C_m ile gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Pasif zar eşdeğer devresi (Pehlivan, 1997).



Şekil 2.10. Zara uygulanan puls (üstte) ve pulsun etkisiyle oluşan zar potansiyeli değişimi (altta) (Hodgkin ve Rushton, 1946'den uyarlanmıştır).

Zara uygulanan I_m akımı, iyonik akım I_i ve kapasitif akım I_c olmak üzere iki koldan akar. Şekil 2.10'de ise, bu RC devresine uygulanan bir puls biçiminde bir akım (I) ve buna bağlı olarak oluşan zar potansiyeli (V_m) değişimi görülmektedir. Bu değişim

$$V_m(t) = I_m \cdot R_m \left[1 - e^{-t/\tau} \right] \quad (2.5)$$

denklemleri ile ifade edilir. Bu denklemlerdeki

$$\tau = R_m \cdot C_m \quad (2.6)$$

zarın zaman sabiti (τ) olarak adlandırılır. Zaman sabiti nöronların iletim hızının ve iletebilecekleri maksimum frekansın belirlenmesinde ve zamansal toplamada etkilidir. Zaman sabitinin küçük olması zarın daha kolay depolarize olacağını ve bu nedenle daha hızlı

ileteceğinin bir göstergesidir. Uzunca bir aksonun çok sayıda Şekil 2.9'deki devrenin seri bağlanmasıyla oluştuğunu varsayalım. Bu durumda birim uzunluk başına zar direnci R_m , zar sığası C_m , sitoplazma direnci R_i ve hücrelerarası sıvı direnci R_d olur. Aksona bir noktada uygulanan akım, akson boyunca ilerlerken karşılaştığı tek farklılık sitoplazma direncidir. Bu nedenle uyarım noktasından uzaklaştıkça akım yoğunluğu azalır. Zar potansiyelinin akson boyunca uzaysal değişimi ise

$$V_m(x) = V_0 \cdot e^{-x/\lambda} \quad (2.7)$$

şeklinde gerçekleşir. Burada

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{R_i + R_d}} \quad (2.8)$$

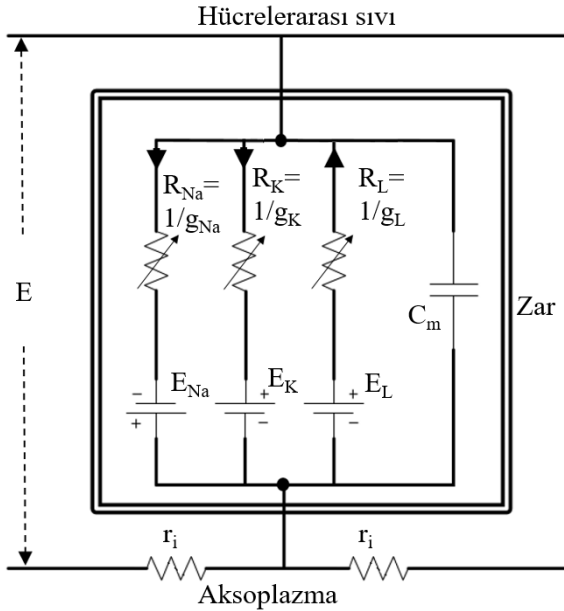
zarın uzay sabitidir (λ) ve potansiyelin başlangıç değerinin %37'sine düştüğü uzaklıktır. Uzay sabiti AP hızına, uzaysal toplama ve elektrotonik yayılımlara etkilidir. Miyelin kılıfa sahip bir aksonu incelediğimizde, yalıtkan olan miyelin kılıfın olduğu bölgelerde sığa düşük olacağı için daha kısa sürede depolarizasyon oluşur ve böylece akım bir Ranvier Boğumundan diğerine hızlıca geçer. Yani miyelinli bölgelerde zaman harcanmadığından Ranvier Boğumlarından sıçramalı (saltatorik) iletim gerçekleşir (Pehlivan, 1997). Böylece AP iletim hızı 50 kat fazlasına kadar çıkabilir. Bunun yanında, iyon geçişi çok küçük bir kısımda olduğundan Na^+ ve K^+ konsantrasyon farkı yaratmak daha kolaydır ve böylece daha az enerji harcanır (Guyton ve Hall, 2001).

2.7. Aktif Zar Modeli ve Aksiyon Potansiyeli

Lipit çift tabakanın elektriksel olarak yalıtkan olması membran direncinin yüksek olduğu anlamına gelir. Ancak zara gömülü olan protein kanalları belirli koşullarda açılıp kapanarak (bu nedenle aktif kanallar adını alırlar) zarın farklı iyonlara karşı olan direncinin değişmesine (zar iletkenliğinin artmasına) sebep olur. Bu değişimler kabaca AP'nin farklı dönemlerini ifade eder. Şekil 2.11'de aktif bir zar için oluşturulmuş elektriksel eşdeğer devre verilmiştir. Burada C_m zarın değişmeyen sığasını (gerçekte iletim sırasında %2 kadar değiştiğinden bu değişim ihmal edilir), R_L daha çok klor iyonlarını geçiren pasif kanalların yol açtığı sızıntı direncini, r_i aksoplazma direncini göstermektedir. Aktif elektriksel eşdeğer devreye göre zar potansiyeli

$$E_m = \frac{g_K \cdot E_K + g_{Na} \cdot E_{Na} + g_{Cl} \cdot E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}} \quad (2.9)$$

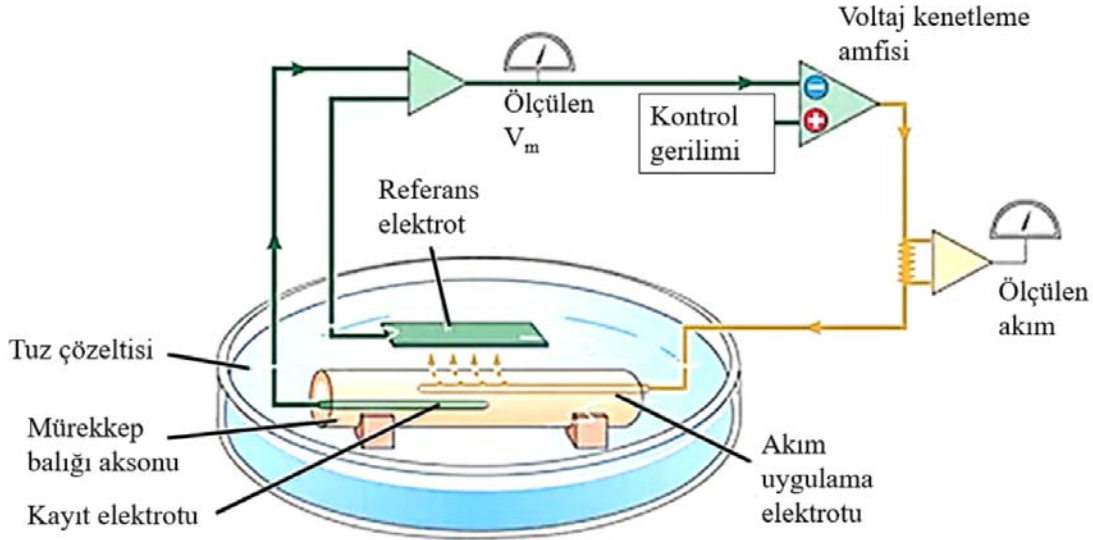
eşitliği ile ifade edilir. Burada g_K , g_{Na} ve g_{Cl} sırasıyla K^+ , Na^+ ve Cl^- iletkenliklerini E_K , E_{Na} ve E_{Cl} ise sırasıyla K^+ , Na^+ ve Cl^- için Nernst denge potansiyelini ifade etmektedir. Birim uzunluk için Şekil 2.11'deki devre ile gösterilen çok sayıda elektriksel devrenin seri bağlanması ile akson için bir model elde edilir. AP hem zamansal hem uzaysal yayıldığı için her bir devre eş zamanlı olarak özdeş olmaz. Akson boyunca bir bölge depolarize iken, başka bir bölge o anda hiperpolarize olabilir. Bu nedenle zarın farklı bölgelerindeki iyon geçirgenlikleri farklılık gösterir. Bu şekildeki uzaysal ve zamansal değişimleri birlikte gözlemek ve iyonik akımlara dair çıkarımlar yapmak oldukça zordur. 1952 Yılında Hodgkin ve Huxley, iri olduğu için tercih edilen mürekkep balığı dev aksonunda yaptıkları voltaj kenetleme deneyleri ile iyonik akımlar hakkında önemli bilgilere ulaşmışlardır (Hodgkin ve Huxley, 1952).



Şekil 2.11. Aktif zar eşdeğer devresi (Pehlivan, 1997).

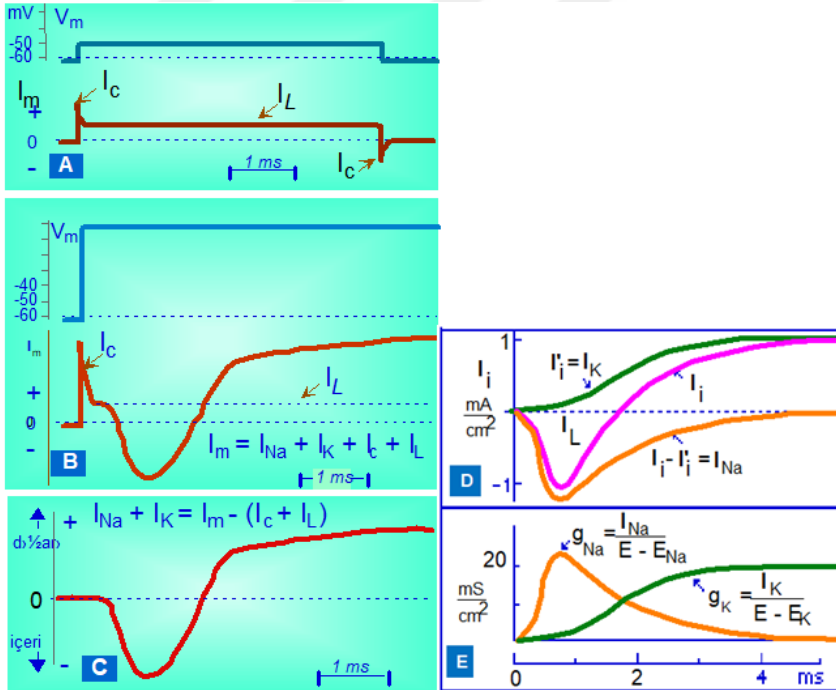
2.8. Voltaj Kenetleme Tekniği

Akson boyunca gerçekleşen uzaysal değişimleri elimine edebilmek için akson içerisine akson boyunca bir akım uygulama elektrodu yerleştirilir (Şekil 2.12). Yine akson içerisine yerleştirilen voltaj gözlem elektrodu, amplifikatör, sinyal jeneratörü ve operasyonel amplifikatör ile geri besleme bilgisi elde edilir. Aksonu etrafınca saran halka şeklindeki elektrot ile zar akımları gözlenir. Böylece akson bir voltaj değerine getirilip sabit tutulur ve uzaysal değişimlerden arındırılmış olarak zamansal değişimler gözlenir.



Şekil 2.12. Voltaj kenetleme tekniği (Purves, 1997).

Aksona çok küçük şiddetli (eşik altı) depolarize edici akım uygulandığında, zardan alınan yanıtın iki bileşeni olur (Şekil 2.13). İlk bileşen, akımın başlangıcı ve bitişinde (ters yönlü) gözlenen, çok kısa süreli kapasitif akımdır (I_c). Akımın uygulanması süresince sabit bir değerde olduğu gözlenen ikinci bileşen ise zayıf genlikli sızıntı akımıdır (I_L). Akson eşik üstü bir değere kenetlendiğinde zar akımı Şekil 2.13'teki gibi gözlenir. Eşik üstü uyarı ile birlikte zar yanıtına Na^+ ve K^+ iyonik akımları da eklenmiştir.



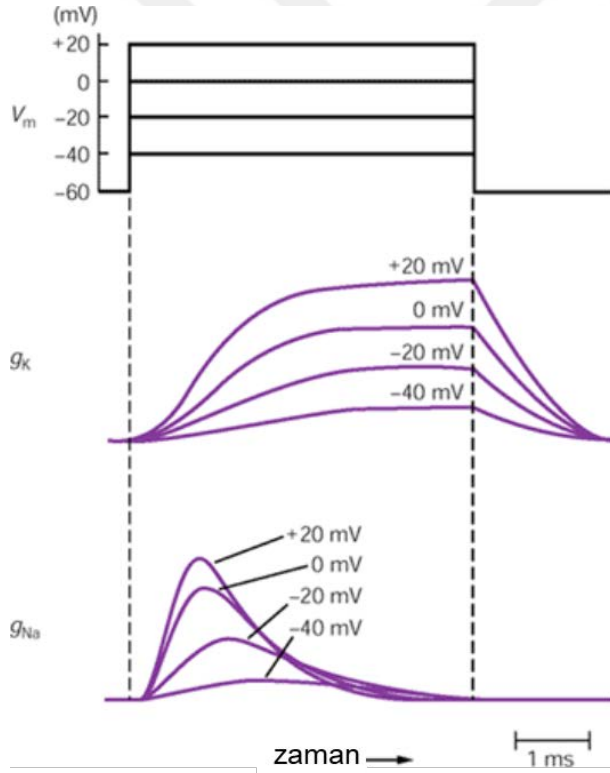
Şekil 2.13. Voltaj kenetleme tekniği ile elde edilen akım değişimleri (Pehlivan, 1997).

Şekil 2.13b'deki eğriden a'daki eğri çıkarıldığında $((I_c + I_L + I_{Na} + I_K) - (I_c + I_L))$ Na^+ ve K^+ akımları toplamı elde edilir (Şekil 2.13c). Aynı deneyde Na^+ kanallarını bloke eden

tetrodotoksin (TTX) gibi maddelerin hücre dışı ortama eklenmesiyle Şekil 2.13d’de gösterilen sadece K^+ iyonik akımları (I_K) elde edilebilmektedir. Böylece daha önceden elde edilmiş olan toplam iyonik akım eğrisinden bu I_K eğrisi çıkarıldığında I_{Na} akımı elde edilir. Na^+ ve K^+ iyonik akımların anlık değerleri denklem 2.10 da kullanılarak bu kanallarının anlık iletkenlik değişimleri elde edilir. Denklem 2.10 kullanılarak elde edilmiş değerler ile çizdirilen iyon iletkenlik eğrileri Şekil 2.13c’de verilmiştir.

$$g_i = \frac{I_i}{E - E_i} \quad (2.10)$$

Zar potansiyelinin farklı değerlere (-40,-20, 0, +20 mV) kenetlenerek tekrarlanan deneyler sonucunda elde edilmiş Na^+ ve K^+ kanallarına ait geçirgenlik (g_{Na} ve g_K) değişim eğrileri Şekil 2.14’deki gibi bulunmaktadır.



Şekil 2.14. Voltaj kenetleme tekniği ile elde edilen iyon iletkenlik değişimleri.

Buraya kadar çizdirilmiş olan iyonik akımların ve iletkenliklerin eğrileri yorumlandığında Na^+ ve K^+ kanalları ile ilgili bulgular şu şekilde özetlenebilir;

1. Depolarize edici akıma maruz kalan Na^+ ve K^+ kanalları açılmaya başlarlar.
2. Depolarizasyon arttıkça birim zamanda açılan her iki tür kanal sayısı da artar.

3. Depolarizasyonun her düzeyinde Na^+ kanalları, K^+ kanallarından daha çabuk açılırlar. Depolarize edici puls sonlandığında Na^+ kanalları daha çabuk kapanırlar.
4. Depolarizasyon sürdükçe Na^+ kanalları kendiliğinden kapanırken; K^+ kanalları depolarizasyon boyunca açık kalırlar (Hodgkin ve Katz, 1949; Pehlivan, 1997; Guyton ve Hall, 2001).

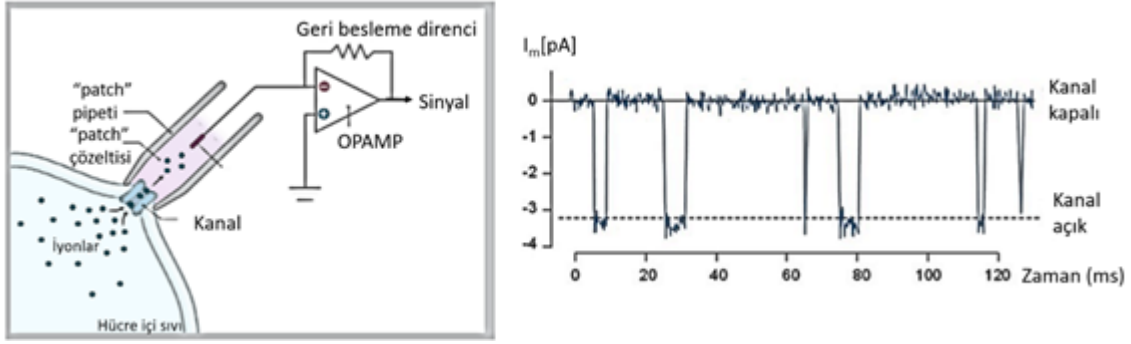
Uyarılabilirliğe etken faktörler

Kimyasal, mekanik veya elektriksel uyaranlara yanıt veren hücrelere uyarılabilir hücreler denir. Hücrenin verdiği yanıt ise AP'dir. Hücrenin AP oluşturma kolaylığına uyarılabilirlik denir. Uyarılabilirliği yüksek olan liflerin eşik değeri daha düşük, AP iletim hızları daha yüksektir. Uyarılabilirliği etkileyen parametreler;

1. Birim yüzey başına zar sığasının (C_m) küçülmesi iletim hızını, yani uyarılabilirliği artırır. Elektriksel yalıtkan tabaka olan miyelin kılıf bu nedenle iletim hızını artırır.
2. Miyelinli ve miyelinsiz liflerde akson yarıçapı iletim hızı ile doğru orantılıdır.
3. Birim yüzeydeki Na^+ kanal sayısı (dolaylı olarak Na^+ iletkenliğinin mümkün olan maksimum değeri) arttıkça iletim hızı artar.
4. Aksoplazmanın öziletkenliği, iletim hızını doğru orantılı bir şekilde etkiler.
5. Sıcaklık, iletim hızı ile doğru orantılıdır.

2.9. İyon Kanalları

Hücre zarının lipit çift tabakasından kolaylıkla geçemeyen moleküller, zardan geçişler için protein yapılardan yararlanır. Çaplarına, şekillerine ve iç yüzeyindeki elektriksel yük gibi parametrelerine bağlı olarak belirli iyon veya moleküle geçirgen (Guyton ve Hall, 2001) olan bu yapılara iyon kanalları denir. İyon kanalları lipit çift tabaka içerisinde gömülü halde bulunurlar. Kanalların hidrofobik olan yan duvarları lipit tabaka ile temastayken, hidrofilik olan orta kesimleri de su ile dolu bir gözenek gibidir (Dalkılıç, 1993; Pehlivan, 1997)



Şekil 2.15. Yama kenetleme yöntemi ve tek kanal akımları (Pehlivan, 1997).

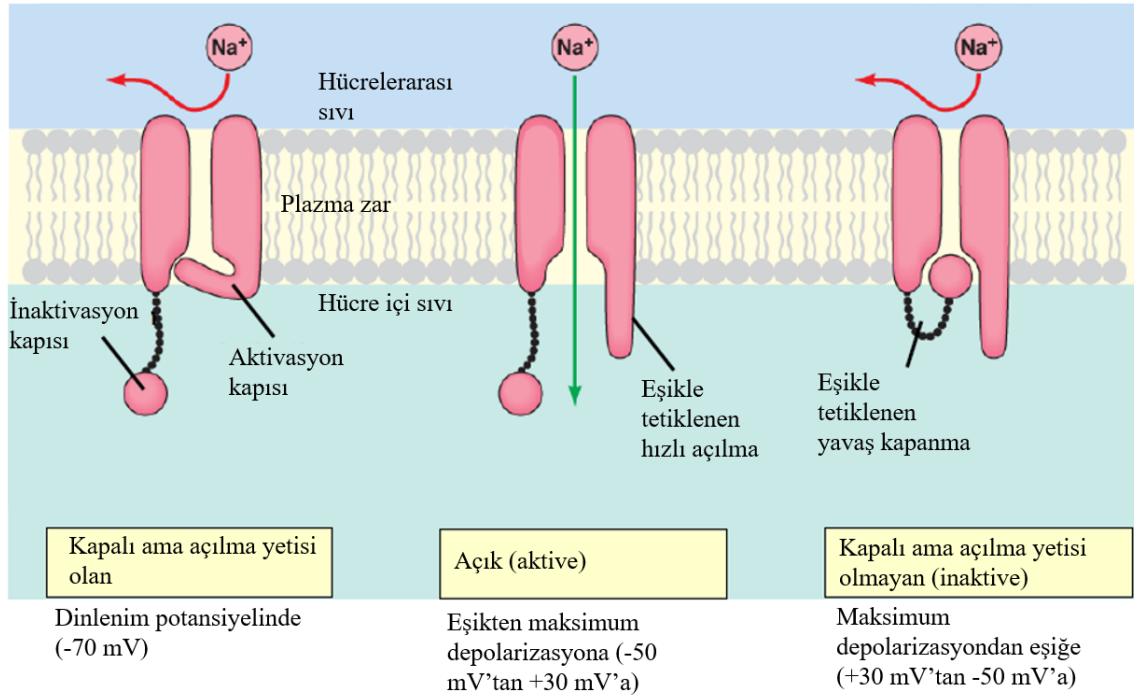
Camdan yapılmış, 1-2 mikrometre çapındaki bir mikropipet hücre zarına yapıştırılıp bir miktar içeri çekilerek zar ile mikropipet ağzı sıkıca tutundurulduğunda, zarın kenetlenmiş kısmı koparılıp bir çözelti içine alınabilir. Bu şekilde bir tek kanal proteini mikropipet ucuna hapsedilebilir. Böylece iyon konsantrasyonları ve voltaj değiştirilerek o kanalın çalışması hakkında bilgi edinilir (Guyton ve Hall, 2001). Bu yöntem patch clamp (yama kenetleme) yöntemi (Neher, 1992) denir. Bu şekilde gözlenen tek kanal akımlarından kanalların açık ve kapalı olmak üzere sadece iki farklı konformasyonda bulunduğu anlaşılmıştır (Şekil 2.15).

Temel olarak iyon kanalları kapısız (pasif) ve kapılı (aktif) olmak üzere iki çeşide ayrılır. Kapısız kanallar her koşulda iyon geçişine izin verirlerken; kapılı kanallar belirli koşullar altında iyon geçişlerini mümkün kılar. İyon kanallarından yüklü tanecikler geçtiği yani elektrik akımı oluştuğu için, bu yapıların elektriksel direnci önemli bir parametredir. Kapının kapalı olduğu durumda iyon geçişi gerçekleşmediği için kanalın direnci sıfırdır. Kanal kapısı açıkken ise direnç değişkendir. İyon kanalları belirli iyonlara özelleşmişlerdir. Seçici geçirgen olan bu yapılar iyi geçirdikleri iyonlara göre Na^+ kanalı, K^+ kanalı vb. şekilde isimlendirilir. Kapılı iyon kanalları kapılarını açıp kapatan etkenlere göre sınıflandırılır. Bir veya bir kaç molekülün bağlanması ile açılıp kapanan kanallara ligand bağımlı kanallar; gerilme, basınç gibi etkenlerle açılıp kapanan kanallara mekanik etkilere bağımlı kanallar; hücre içindeki bazı kimyasal moleküllerin bağlanmasıyla açılıp kapanan kanallara içerden habercilerle kontrol edilen kanallar denir. Zarın iki tarafı arasındaki potansiyel farkın değişmesi sonucu kapıları açılan ve kapanan kanallara ise voltaj bağımlı kanallar denir. Kas, sinir, kalp kası gibi uyarılabilir hücre zarlarında bulunan ve AP'de doğrudan rol alan Na^+ , K^+ , Ca^{+2} kanalları bu tür kanallardır.

2.9.1. Voltaj bağımlı sodyum kanalı (Na_v)

Na^+ kanalları hücre içi daha pozitif yüklendiğinde açılır ve bol miktarda sodyum iyonu geçişi olur. Bu olay AP'nin temel nedenidir. Bu kanallar oldukça hızlı açılıp kapanan iki adet

kapıya sahiptirler: kanal dışına yakın aktivasyon kapısı ve kanal içine yakın inaktivasyon kapısı. Hücre dinlenimdeyken aktivasyon kapısı kapalı, inaktivasyon kapısı açıktır. Zar potansiyeli pozitifleşirken aktivasyon kapısı da açılır ve voltaj kapılı Na^+ kanalı 'aktif durum'a geçer. Böylece zarın Na^+ geçirgenliği 5000 kata kadar artar. Artan zar potansiyeli bir değere ulaştıkça inaktivasyon kapısı kapanır ve Na^+ 'un hücre içine girişi kesilir (Şekil 2.16). Bunun sonucunda hücre repolarizasyon dönemine girer. İnaktivasyon kapısı, hücre dinlenime ulaşmadan tekrar açılmaz (Guyton ve Hall, 2001; Pehlivan, 1997).

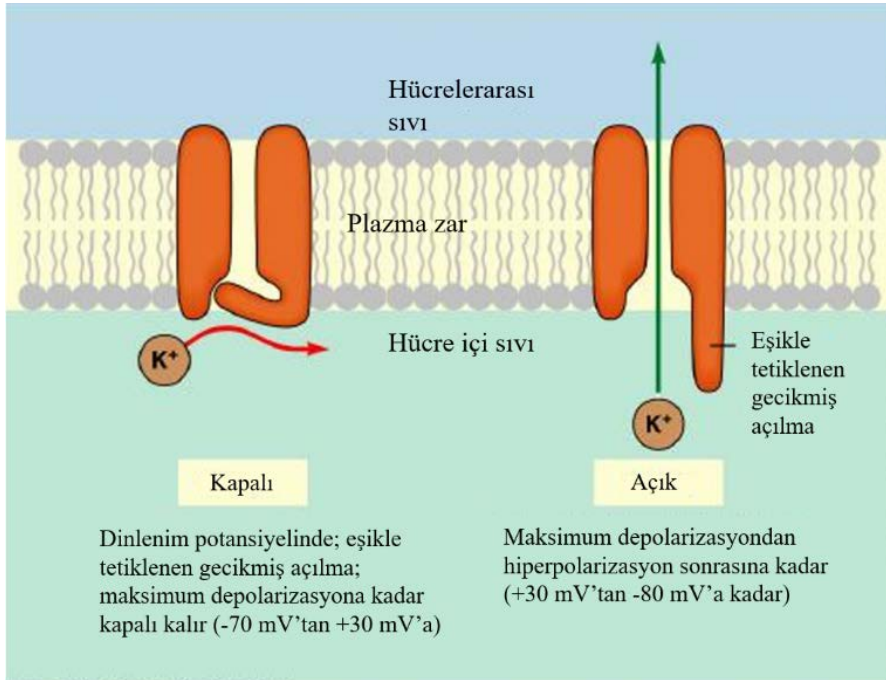


Şekil 2.16. Voltaj kapılı sodyum kanalı için bir model gösterim (Homeworklib, 2023).

Na^+ kanalları TTX tarafından bloke edilip edilmediklerine bakılarak sınıflandırılmaktadır (Waxman ve ark., 1999). Geçici (transient) Na^+ kanalları AP oluşumunda rol alırlar; Na^+ akımının çoğunluğunu oluştururlar ve Ranvier Boğumunda yüksek yoğunlukta bulunurlar (Kiernan ve ark., 2020). $\text{Na}_v1.6$ -sub-tipi voltaj bağımlı Na^+ kanalları ise, aksondaki sıçramalı iletimden sorumludur ve bu kanallar aksonun tekrarlı uyarılmasını önlemek için açıldıktan hemen sonra inaktive olurlar. Bazı Na^+ kanalları ise, yavaş aktive olurlar ve toplam kanalların yaklaşık %5'ini oluştururlar, sürekli (inatçı) olarak da tanımlanabilen bu kanallar, Na^+ iyonlarının hücre içerisine sürekli olarak sızmasına neden olurlar (Taddese ve Bean, 2002). Dolayısıyla, sürekli Na^+ kanalları membran polarizasyonunun ve sinir liflerinin uyarılabilirliğinin derecesini belirler. Kanalın kapanma mekanizmasına bağlı olarak Na^+ kanalındaki aynı bir molekülün ya voltaj bağımlı ya da sürekli tarzda davrandığı da bilinmektedir.

2.9.2. Voltaj bağımlı potasyum kanalları

Bu kanallar hem AP hem de dinlenme zar potansiyeli oluşumunda etkilidir. Aslında AP'nin sonlanmasını sağlarlar. Aksonlardaki K^+ kanalları zar potansiyeli değişiminden bir süre sonra açıldıkları için gecikmiş doğrultucu kanallar olarak adlandırılırlar (kanal akımı I_K ile gösterilir). Zar hiperpolarize olduğunda açılan ve depolarize olduğunda kapanan içeri doğrultucu K^+ kanalları (K_{ir}), zar potansiyelinin stabilize edilmesine katkı sağlar.



Şekil 2.17. Voltaj kapılı potasyum kanalı için bir model gösterim (Homeworklib, 2023).

Bu kanalların sahip olduğu tek kapı, zar potansiyeli pozitifleşirken açılır ve kinetiği yavaştır (Şekil 2.17). Öyle ki bu kapının açılması voltaj kapılı Na^+ kanallarının inaktivasyon kapısının kapanmaya başladığı döneme denk gelir. Na^+ 'un hücre içine girişinin azalmaya başladığı sırada hücreden çıkan potasyum iyonları da repolarizasyonu hızlandırır (Guyton ve Hall, 2001).

Na^+ kanalları ile karşılaştırıldığında yavaş aktive olan K^+ kanallarının yaklaşık %30'u dinlenimde açık durumdadırlar, kanalların geri kalan kısmının açılması ise zar potansiyeline (voltaj bağımlı K^+ kanalları) veya diğer metabolik faktörlere bağlıdır.

K^+ kanalları üç ana alt gruba ayrılırlar, hızlı kanallar, yavaş kanallar ve içeri doğrultucu (inward rectifier) kanallar (Gutman ve ark., 2003; Ocana ve ark., 2004). Hodgkin ve Katz'ın (Hodgkin ve Katz, 1949) mürekkep balığı dev aksonunda yaptıkları ünlü deneyi (voltaj kenetleme) K^+ kanallarının açılmasının (depolarizasyondan birkaç ms sonra) repolarizasyonu tetiklediğini ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, memelilerin miyelinli aksonlarında K^+

kanallarının repolarizasyondaki rolü ihmal edilebilir düzeydedir (Brismar ve Schwarz, 1985; Corfas ve ark., 2004).

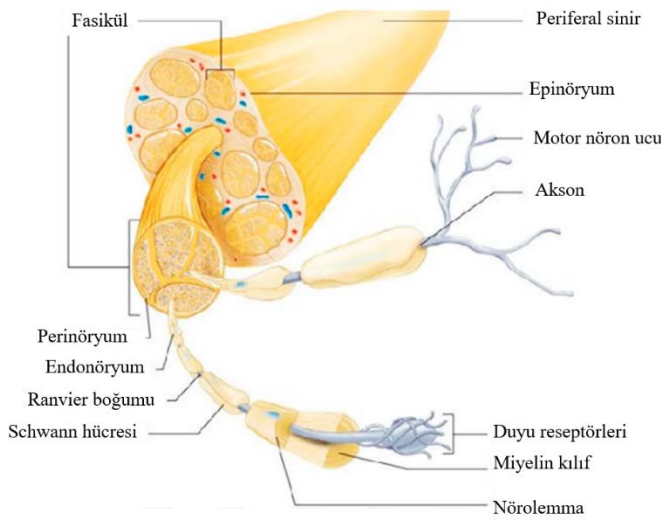
Aslında, repolarizasyon evresini büyük oranda voltaj-kapılı kanalların kapanması veya inaktivasyonu ve sürekli kanalların sızıntı akımlarının aktivasyonu gibi Na^+ kanallarının davranışları belirler (Beckstein ve ark., 2003). Ancak; hızlı K^+ kanalları AP oluşumu ardından, yeniden uyarılmayı engellemek için, zar uyarılabilirliğini azaltırlar. Miyelinli aksonlarda hızlı K^+ kanalları juxtapanod bölgesinde toplandıkları için, bu kanallar sanki saklı gibidirler ve fonksiyonları ancak paranodal bölge hasar gördüğünde oluşan demiyelinizasyon durumunda ortaya çıkar (Rasband, 2004; Kiernan ve ark., 2020).

Depolarizasyondan yaklaşık 10 ms sonra açılan ve 100 ms kadar açık kalan yavaş K^+ kanallarının en yoğun bulunduğu bölge Ranvier Boğumu olmakla beraber tüm zarda yayılmış olarak bulunur (Devaux ve ark., 2004; Kiernan ve ark., 2020). Dışarı doğrultucu (outward rectification) akımları bu kanallar oluşturur. Bu tür kanalların yavaş kinetikleri sıçramalı iletimin etkinliğini sınırlamaktadır, fakat dinlenim zar potansiyelinin sürdürülmesinde yavaş K^+ kanallarının önemli rolü vardır. Yavaş K^+ kanallarının açılma olasılığı tekrarlı elektrik uyarı tarafından artırıldığı için, yavaş K^+ kanallarının bir diğer işlevi de aksonal zarın aşırı uyarılmasını önlemektir (zarı hiperpolarize ederek uyarılabilirliği azaltmaktadırlar) (Wickenden ve ark., 2000; Lagrange, 2005; Kiernan ve ark., 2020).

Üçüncü tip K^+ kanalı ise içeri doğrultucu (inward rectifier) kanal olarak adlandırılır (Guo ve ark., 2003; Lu, 2004; Kubo ve ark., 2005). Membranın hiperpolarizasyonu ile bu tip kanallar aktive olur, kanalın aktivasyonu ile pozitif yüklü iyonlar, büyük oranda K^+ , konsantrasyon gradyentinin belirlediği yönün tersine yani hücre içerisine girer, iyon girişi membran potansiyelini depolarizasyon yönünde değiştirir, bu değişim düşük olan zar uyarılabilirliğini artırıcı yönde etki eder (Kubo ve ark., 2005). Fizyolojik şartlarda, telafi edici bu mekanizma genellikle sürekli kasılmayı takiben oluşur (aktivite-bağımlı hiperpolarizasyon). Daha sonra Na-K-ATPase aktivasyonu ile giren fazla Na iyonu ve çıkan fazla K iyonunun telafisi kasılma sayesinde sağlanır. Hücre içerisinden bakıldığında, her 2 K^+ girişine karşın dışarı 3 Na^+ iyonu çıkışı olduğu için, hücre hiperpolarizasyonu görülür. İçeri doğrultucu K^+ kanalları duyuşal aksonlarda motor aksonlara göre daha fonksiyoneldir, bu durum belki de çok merkezli motor nöropatilerdeki duyuşal semptom eksikliğini açıklayabilir (Kaji, 2003).

2.10. Bileşik Aksiyon Potansiyeli

Aksonlar organizma içerisinde gruplar halinde bulunur. Belirli bir bölgedeki belirli görevler için özelleşmiş lifler perinöryum adı verilen kılıf içerisinde, bu şekildeki diğer gruplarla da birleşerek epinöryum içerisinde organizma içerisinde yayılırlar (Şekil 2.18). Bu şekilde gruplaşmış liflere sinir denir. Anlaşılacağı üzere bir sinir, içerisinde farklı türden bilgileri taşıyan ve dolayısıyla farklı özelliklerdeki liflerden oluşur. Böyle bir sinire uyarın verildiğinde, siniri oluşturan liflerin bir kısmının veya tamamının yanıtının toplamı ölçülebilir. Bu şekilde elde edilen bu AP'ler toplamına bileşik aksiyon potansiyeli (BAP) denir (Pehlivan 1997; Guyton ve Hall, 2001).

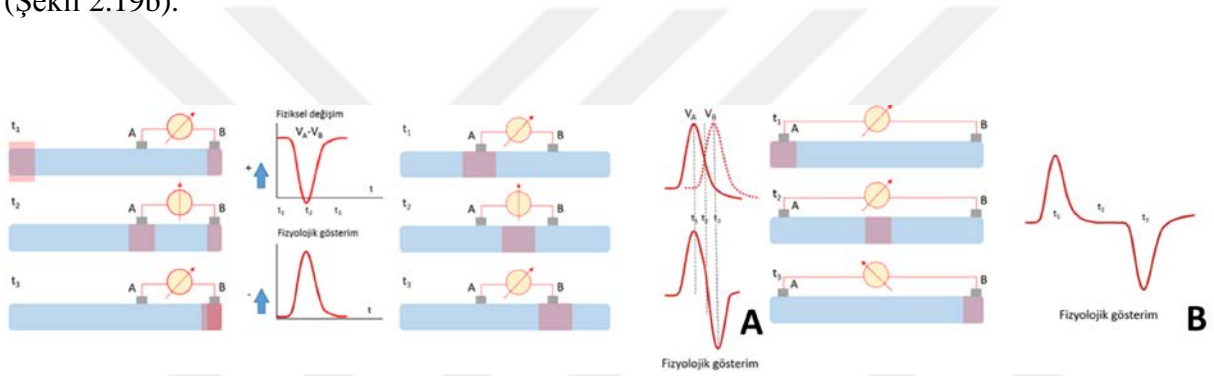


Şekil 2.18. Periferik sinir yapısı (Studyblue, 2023).

BAP paterni ve elektriksel özellikleri AP'den farklıdır. Çok düşük şiddetli bir uyarın ile sinirdeki hiçbir lif uyarılamayabilir ve bu durumda BAP gözlenmez. Uyarın şiddeti arttıkça, önce düşük eşikli lifler, daha sonra yüksek eşikli lifler uyarılır ve BAP genliği gittikçe artar. Yeteri kadar yüksek şiddetli bir uyarın ile sinirdeki tüm lifler uyarıldığında maksimum BAP eğrisi gözlenir ve bundan sonra uyarının şiddetinin artması eğride bir değişikliğe neden olmaz. BAP, AP'ler toplamı olduğundan; BAP eğrisi altında kalan alan uyarılan lif sayısı hakkında, BAP şekli uyarılan lif grupları hakkında bilgi verir. Tek bir life ardışık uyarılar verildiğinde, uyarılar arasındaki süre çok azsa tekrar AP oluşmaz. Uyarılar arasındaki süre yeteri kadar uzun olduğunda tıpatıp aynı AP oluşur. Bir sinire ardışık uyarılar verildiğinde ise durum böyle değildir. Çünkü BAP ya hep ya hiç davranışı sergilemez. İlk uyarın ile sinirdeki a (en hızlı), b (orta hızlı) ve c (en yavaş) lifler uyarılmış olsun. İlk uyarına ait BAP bu üç grubun AP'leri toplamından oluşur. İkinci uyarın kısa süre sonra uygulandığında b ve c grubu lifler henüz mutlak refrakter dönemden çıkmamış olduğundan uyarılamazken, a grubu lifler tekrar AP oluştururlar. Böylece ikinci uyarın yanıtı olan BAP sadece a grubunun AP'lerinden oluşur. İki uyarın

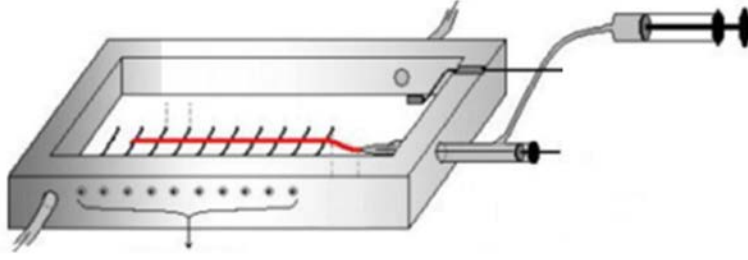
arasındaki süre uzadıkça bu BAP'a b ve daha sonra c grubu liflerin AP'leri de eklenir. İki uyarı arasındaki süre çok çok kısa olduğunda tabii ki ikinci uyarı hiçbir lifte AP oluşturamaz ve BAP gözlenmez (Dalkılıç, 1993; Pehlivan, 1997).

BAP gözlemi için farklı yöntemler vardır. İlkinde sinirin bir ucu kesilir veya sıkıştırılmış halde tutulur ki bu bölge, bu nedenle sürekli depolarize durumdadır. Bir elektrot bu depolarize bölgeye yerleştirilir. Diğer elektrot ise sağlam bir bölgeye yerleştirilir. Bu şekilde iki elektrot arasındaki potansiyel fark değişimi (tek fazlı BAP) Şekil 2.19b'deki gibi olur. Estetik nedenlerden dolayı Şekil 2.19'daki fizyolojik görünüm tercih edilir. İkinci yöntemde ise iki elektrot da sinirin sağlam bölgesindedir. Elektrotlar arası potansiyel farkı değişimi iki fazlı gözlenir. Elektrotlar arasındaki mesafenin artması, BAP fazlarını birbirinden uzaklaştırır (Şekil 2.19b).



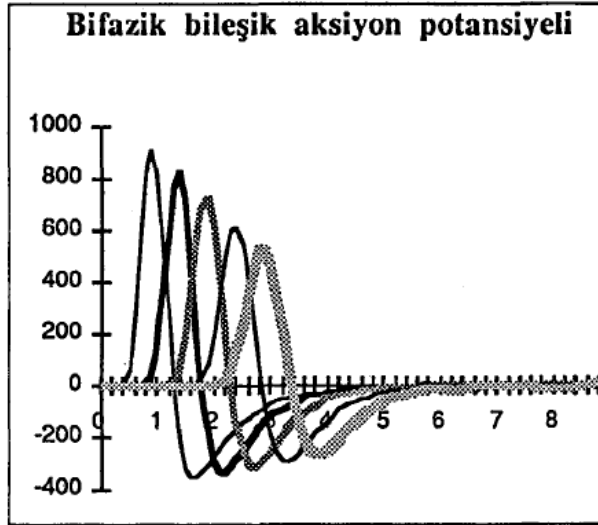
Şekil 2.19. BAP gözlemi yöntemleri (Pehlivan, 1997).

BAP kaydetmek için kullanılan bir diğer yöntem de suction yöntemidir. İçerisinde uygun sıcaklıkta tutulan uygun bir çözeltinin devirdaim ettirildiği bir organ banyosu üzerine, ızgara şeklinde yerleştirilmiş uyarı elektrotları ile sinire pulslar uygulanır. Sinirin distal ucu ise negatif basınç kullanılarak bir mikroelettrotta çekilir. Bu mikroelettrot, cam bir tüpün ısıtılmasıyla oluşturulan mikropipetin, bir insülin enjektörüne entegre edilmesiyle ve enjektör içerisindeki iletken sıvıyla temasta olan bir Ag/AgCl telden oluşur (Şekil 2.20). Suction elektrodu olarak adlandırılan bu elektrot uyarıya karşın oluşan BAP kayıtlarını toplamak için kullanılır (Stys ve ark., 1991; Dalkılıç ve Pehlivan, 2002; Tuncer, 2008). Solüsyonun sürekli gazlanması için bir gazlama aparatı ile elektriksel gürültüyü biyopotansiyellerden uzaklaştırmak için de bir toprak elektrotu organ banyosu içerisine yerleştirilir.



Şekil 2.20. Suction kayıt yöntemi (Tuncer, 2008).

Bir sinirden BAP kaydı alınırken gözlem elektrotları ile uyarı elektrotları arasındaki mesafe BAP şeklinde etkilidir (Şekil 2.21). Bu mesafenin artması önce BAP genliğinde azalma ile birlikte BAP eğrisinde yayvanlaşmaya neden olur. Elektrotlar arası mesafe arttıkça BAP'ta tepecikler belirir. Mesafenin daha da artması bu tepeciklerin iyice ayrışmasına neden olur. BAP içerisindeki farklı iletim hızlarına sahip lifler bu tepecikleri oluşturur. Bu yöntem ile siniri oluşturan lif gruplarına ait hız dağılımı elde edilir. Bu tür ölçümler belirli ajanlar kullanılarak yapıldığında ajanların hangi lif grubunu etkiledikleri anlaşılabilir. Hızlı ileten lifler genellikle duyuşal lifler olduğundan fizyolojik çıkarımlar yapılabilir.



Şekil 2.21. Bifazik BAP (Dalkılıç, 1993).

2.11. Miyelinizasyon ve Demiyelinizasyon

Miyelin kılıfın meydana gelme sürecine miyelinizasyon adı verilmektedir. Kalıtsal hastalıklar, çeşitli kimyasallara maruziyet gibi durumlarda miyelin kılıf zarar görebilir; aksondan uzaklaşabilir. Bu süreç de demiyelinizasyon olarak adlandırılır. Demiyelinizan hastalıklara örnek olarak optik nörit, optik nöromiyelit (Devic's hastalığı), transvers miyelit, akut dissemine ensefalomyelit ve santral pontin miyelinoliz gösterilebilmektedir.

Kazalar, mekanik hasarlar, metabolik süreçler sonucunda ortaya çıkan periferik sinir zararlanmaları; Wallerian dejenerasyon, segmental demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon şeklinde karşımıza çıkmakla birlikte periferik nöropatilerde patolojik süreçler sonucunda son iki zararlanma şekli görülmektedir.

Segmental demiyelinizasyon durumunda miyelinli sinir liflerinde, periferik sinir aksonunda zararlanma olmadan miyelin kılıfında hasar oluşmaktadır. Demiyelinizasyon saltatorik iletimde dolayısıyla iletim hızında azalmaya ya da iletim bloğuna neden olabilmektedir (Agamanolis, 2011).

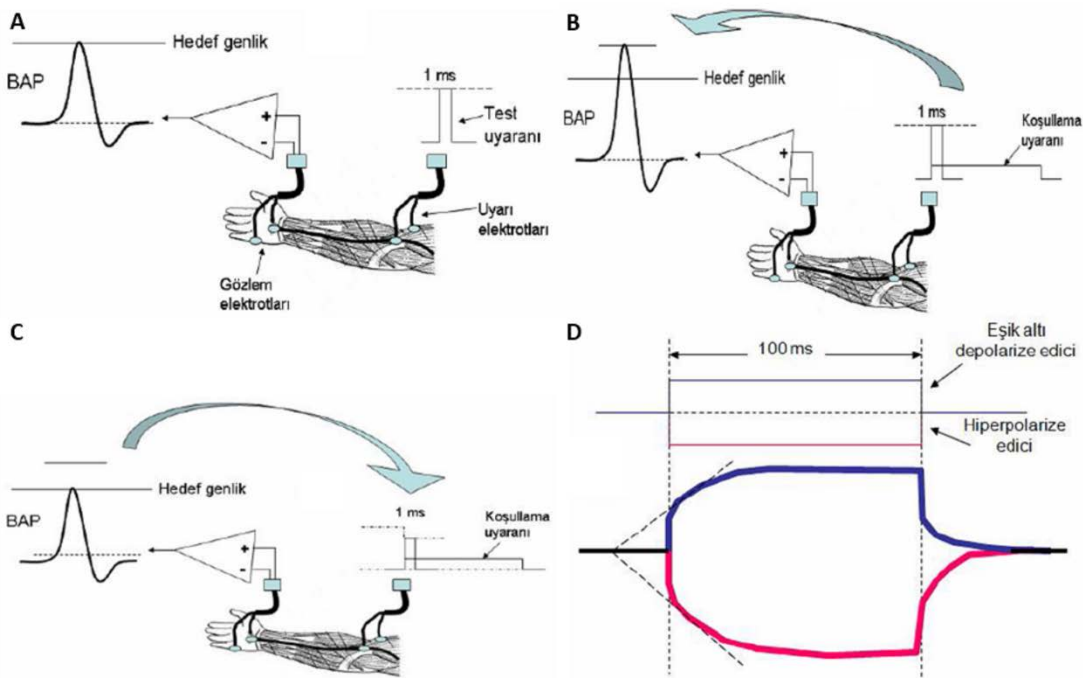
Aksonal dejenerasyonda sinir uyarılabilir durumdaysa, iletim hızı normal veya normale yakın değerlerde, aksonal dejenerasyonun olduğu motor sinirin sonlandığı kasta bileşik kas aksiyon potansiyeli genliği, duysal sinirde ise duysal sinir aksiyon potansiyeli genliği normalden küçük bulunur. Kısmi dejenerasyonun olduğu durumlarda motor birim potansiyelleri polifazik, süresi artmış, normal veya büyük genlikli kaydedilir. Segmental demiyelinizasyonda miyelinli sinir liflerinde, periferik sinir aksonunda zararlanma olmadan miyelin kılıfında hasar söz konusudur. Demiyelinizasyon saltatorik iletimde ve iletim hızında kayba veya iletim bloğuna neden olur (Agamanolis, 2011).

2.12. Bir BAP Kayıt Yöntemi Olarak Eşik İzleme

Zarın uyarılabilirliği zarın geçmişine de bağlıdır. Dinlenimdeki bir zara eşik altı şiddete sahip depolarize edici bir puls uygulandığında zar daha kolay uyarılabilir hale gelmiş olur. Yani bu eşik altı depolarize edici pulstan çok kısa bir süre sonra eşikaltı bir puls daha uygulanarak hücrede AP oluşturulabilir. Ancak eğer dinlenimdeki hücreye hiperpolarize edici bir puls uygulanırsa, zar potansiyeli dinlenimden daha düşük değerde olacağı için, hücreden AP yanıtı almak daha şiddetli bir puls ile olacaktır. Hiperpolarize edici eşik altı puls hücrenin uyarılabilirliğini zorlaştırır. Bu şekilde uygulanan bu ilk eşik altı depolarize ve hiperpolarize edici pulslara koşullama pulsu denir. Bu pulslardan sonra, AP elde etmek için uygulanan ikinci pulslar ise test pulsu adını alır. Eşik altı uyarıların neden olduğu küçük çaplı hücre içi kompozisyon değişimleri, çeşitli kanal ve pompaların aktiviteleri tarafından telafi edildiği için, koşullama akımın neden olduğu uyarılabilirlikteki ve böylelikle eşik akım değerindeki değişim, akımın süresine bağlıdır. Koşullama ve test pulsları kullanılarak bir sinirden kaydedilen BAP üzerinden, iyon kanallarına dair bilgi edinmek, eşik değer izleme (threshold tracking) yöntemi ile mümkündür. Bu yöntem Bostock tarafından otomatize edilmiş ve hem araştırma deneylerinde hem de klinikte büyük kolaylık sağlamıştır (Bostock ve ark., 1998). Hem deri

üzerinden hem de izole sinirlerden ölçüm almanın mümkün olduğu bu yöntemin temel bir şeması Şekil 2.22’de gösterilmiştir.

Öncelikle adım adım uyarın şiddetini artırarak hedef yanıt olan BAP belirlenir (Şekil 2.22-A). Sinirdeki uyarılabilirlik değişimlerini izleyebilmek için 100 ms süreli eşik altı polarize akım (koşullama uyararı) uygulanır (Şekil 2.22-B). Bunun üzerine, geri besleme ile takip edilerek, 1 ms süreli test uyarının şiddeti, hedef yanıtı elde edecek değerde ayarlanır ve uygulanır (Şekil 2.22-C). Test uyarınının genlik değerleri polarize koşullama uyarınları için çizilir (Şekil 2.22-D).



Şekil 2.22. Eşik izleme yönteminin çalışmasını gösteren çizim (Nodera ve Kaji, 2006’dan uyarlanmıştır).

Stimulatör üzerinden pulsların amaca yönelik paternde uygulanmasını sağlayan otomatik QtracS programının hayvan, insan, izole veya non-invazif seçenekler için farklı protokolleri olmakla birlikte, dört temel alt-protokolü vardır. Bu alt-protokoller farklı uyarılabilirlik parametrelerine yönelik tasarlanmıştır (Bostock ve ark., 1998; Burke ve ark., 2001; Nodera ve ark., 2004).

Alt-protokoller aracılığıyla yapılan küçük değişikliklerle, sinirin uyarılabilme özelliklerinin belirlenmesi mümkündür.

2.12.1. Uyarı-yanıt ilişkisi

Puls Şiddetinin adım adım artırılmasıyla elde edilen yanıtların kaydedildiği bu alt-protokolde BAP için minimum ve maksimum yanıtları veren uyarılar belirlenir. Daha sonra çizdirilen grafik üzerinden hedef yanıtı (% 40*maksimum BAP) oluşturan uyarı Şiddeti belirlenir. Kullanıcı katkısıyla elde edilen bu bilgiler, sonraki alt-protokollerde kullanılacak olan uyarı Őiddetlerini belirlerken, otomatik program tarafından kullanılır.

2.12.2. Şiddet-süre zaman sabiti

Weiss yasasına (eşitlik 2.4) dayanarak hiperbol Şeklinde bir puls süresi-puls Şiddeti ilişkisi elde edilir (Şekil 2.6). Deneysel olarak aynı yük, farklı Şiddet değerindeki pulslar farklı sürelerde uygulanır. Eşik yükü-uyarı süresi değişimi bir doğruya oturtulur ve bu doğrunun eğimi reobazı, zaman eksenini kestiği nokta Şiddet-süre zaman sabitini (SDTC-kronaksi) verir (Geddes, 2004). SDTC değeri azaldıkça, lif uyarılabilirliği artar. Nodlarda fazlaca bulunan sürekli Na⁺ kanalları zar potansiyelinin eşiğe yaklaşmasıyla hızlıca aktive olan; inaktivasyonu yavaş gerçekleşen kanallardır. Nodlar depolarize olduğunda, sürekli Na⁺ kanallarında Na⁺ akımı azalır; bu nedenle reobaz azalır; hiperpolarize olduğunda reobaz artar (Clay, 2003; Meisler ve Kearney, 2005). SDTC'nin daha uzun olması, noddaki sürekli Na⁺ kanallarının (daha uzun süre açık kalırlar) daha fazla olduğu anlamına gelirken; uyarılabilirliğin de düşük olduğunu ifade eder. Buna ek olarak zar kapasitansının artması da SDTC'yi yükseltir (Bostock, 1983). Miyelinizasyonun bozulmasıyla zar kapasitansı ve dolayısıyla SDTC artar (Mogyoros ve ark., 1998; Taddese ve Bean, 2002).

2.12.3. Eşik elektrotonus

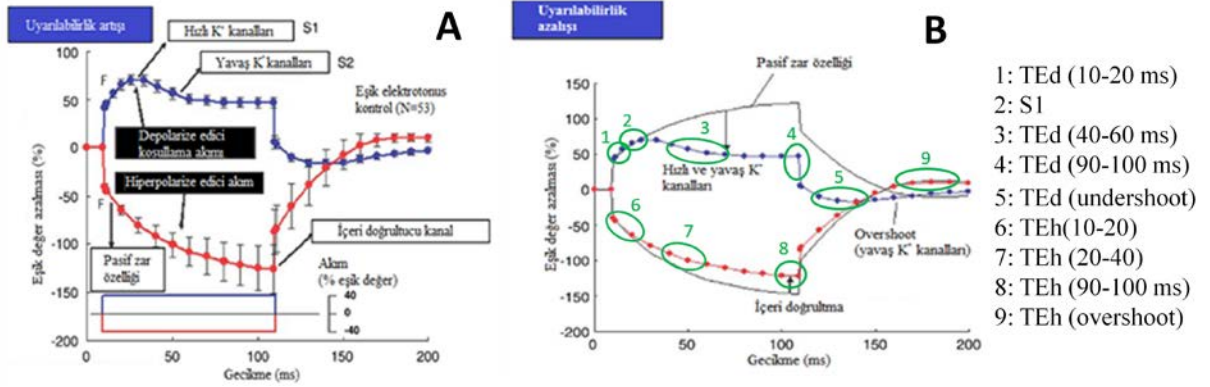
Eşik altı akımlar AP oluşturamasa da zar potansiyelinde değişikliklere neden olurlar. Bu değişiklikler uyarının depolarize veya hiperpolarize edici olmasına göre farklılık gösterir. Nörona uzun süreli (100 ms) eşik altı uyarı (koşullama pulsu) verildiğinde oluşan değişikliklere eşik elektrotonus denir. Depolarize edici koşullama pulsunun başlangıcında uyarılabilirlik hızla artar (F fazı). Zar akımının internoda yayılmasıyla birlikte, ilerleyen anlarda uyarılabilirlikteki artışın hızı düşer (S1 fazı). Buraya kadar geçen zaman zarında yavaş K⁺ kanalları aktive olmaya başlar ve bu nedenle uyarılabilirlik azalmaya başlar (S2 fazı). Depolarize edici koşullama pulsunun sonlanması, yavaş K⁺ kanallarının kapanarak eşiği yükseltmesiyle sonuçlanır (undershoot). Nörona hiperpolarize edici koşullama pulsu uygulandığında zar uyarılabilirliği hızlı bir Şekilde düşer (F fazı). Puls uygulandığı sürece, akım internodal bölgeye yayılarak uyarılabilirlikteki azalmayı sürdürür. Bu düşüş koşullama

pulsunun sonuna doğru azalır. Pulsun sonlanmasıyla birlikte içeri doğrultucu kanallar açılır ve uyarılabilirlik azalması normal değerine ulaşır (S3 fazı-overshoot) (Nodera ve Kaji, 2006).

Uzun süreli (100-200 ms), eşik altı depolarize edici koşullama bir uyarının verilmesiyle aksondaki internod bölgesi polarize olur ve sinir uyarılabilirliği de değişmiş olur. Belirlenmiş hedef genliği (BAP'ın maksimum genliğinin %20 veya %40'ını) oluşturabilecek şiddete sahip test uyarını ile uyarılabilirlikteki bu değişim belirlenebilir. Uyarılabilirliğin arttığı durumda test uyarını şiddeti nispeten düşük iken; aksi durumda test uyarını şiddeti yüksek olur. Koşullama uyarınının hemen ardından, zarın kablo özelliği sebebiyle uyarılabilirlikte değişimler görülür (Şekil 2.23, F fazı, Nodera ve Kaji, 2006).

Depolarizasyon 20 ms kadar bir süre içerisinde internoda yayılır ve bunu eşik elektrotonus grafiğinde S1 fazı olarak görürüz. Ardından eşğin % 40'ına iner (TEd90-100 ms). Basit bir şekilde 10-20 ms'deki depolarizasyon değişiminin (TEd 10-20 ms), 90-100 ms'deki depolarizasyon değişimine (TEd 90-100 ms) oranı, nod ve internodda yer alan yavaş K⁺ kanalları etkisiyle oluşan S2 uyum değerini verir. Uyarının kesilmesiyle yavaş K⁺ kanalları etkili olup; zar potansiyelindeki düşmeyi hızla düzeltirken; biraz sonrasında eşikte az miktarda yükselmeye neden olduğu bir salınım yaratır (TEd undershoot). Hiperpolarize edici uyarınla karşılaşan zar ise hızlı bir şekilde hiperpolarize olur (F fazı). Bu hiperpolarizasyon noddan sonra internoda yayılarak; aksonal hiperpolarizasyonun artarak devam ettiği bir süreci başlatır (TEh 20-40 ms). Böylece yavaş ve hızlı K⁺ kanalları kapanmaya başlar ve bu da hiperpolarizasyon artışını hızlandırır (TEh 90-100). Akımın kesilmesiyle içeri doğrultucu kanallar kapanıp; yavaş K⁺ kanalları aktive olur. Böylece zar potansiyeli hızla eşik değerine yönelip; bu değeri biraz aşarak salınım (TEh overshoot) yapar (Şekil 2.23).

Eşik elektrotonus eğrisindeki depolarizasyon ve hiperpolarizasyon bölgeleri karşılaştırıldığında; hiperpolarizasyon bölgesinde eşikten daha fazla uzaklaşma olduğu fark edilir. Bunun açıklaması, zar depolarizasyonunun K⁺ kanalları tarafından kısıtlanmasıdır. Bu etki hiperpolarizasyonla aynı yönlü olduğundan, eğrinin bu kısmında daha büyük bir açılma gözlenir. Hiperpolarize edici akımın bitişiyle ise içeri doğrultucu kanalların etkisi görülür (Nodera ve Kaji, 2006; George ve Bostok, 2007).

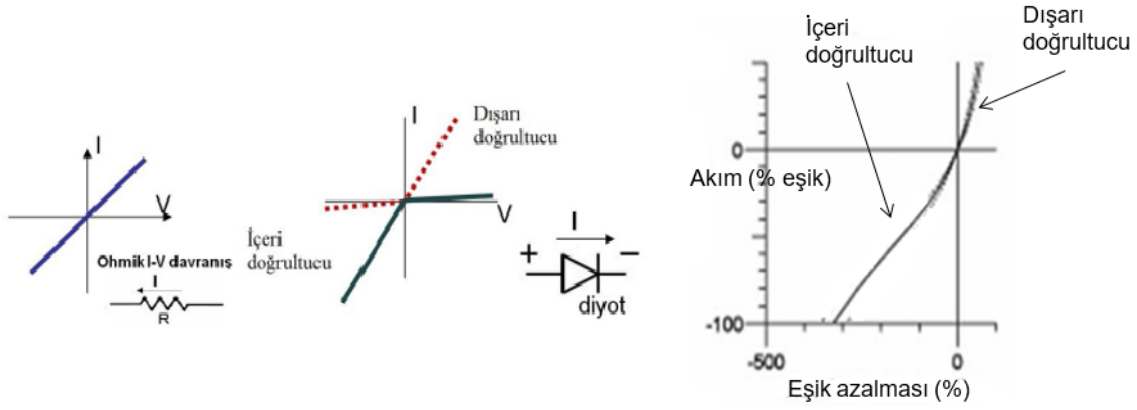


Şekil 2.23. Eşik Elektrotonus alt-protokolünde depolarize ve hiperpolarize edici koşullama akımları için eşik azalması (%) eğrileri Nodera ve Kaji, 2006'dan modifiye edilmiştir.

2.12.4. Akım-eşik (I/V)

Son prosedür I/V ilişkisidir ve değişen akıma karşılık eşik değeri değişim grafiği çizdirilir. İki bölümden oluşan grafikte depolarizasyon bölgesi K⁺ kanallarının aktivitesi, hiperpolarizasyon bölgesi içeri doğrultucu kanalların aktivitesi hakkında bilgi verir. Öncelikle supramaksimal bir puls uygulanır, maksimal yanıt gözlenir. Bu maksimal yanıtın % 40'ı hedef yanıt olarak belirlenir. Daha sonra 100 ms süreli polarize edici puls uygulanır. Hedef yanıtı ulaşmak için geribeslemeli olarak genliği kontrol edilen test pulsü, bu polarize edici puls üzerine bindirilir. Polarize edici puls başlangıcı ile test pulsü başlangıcı arasındaki gecikme belirli adımlarla değiştirilerek, bu değişime karşı eşik değeri azalması kaydedilir (Nodera ve Kaji, 2006).

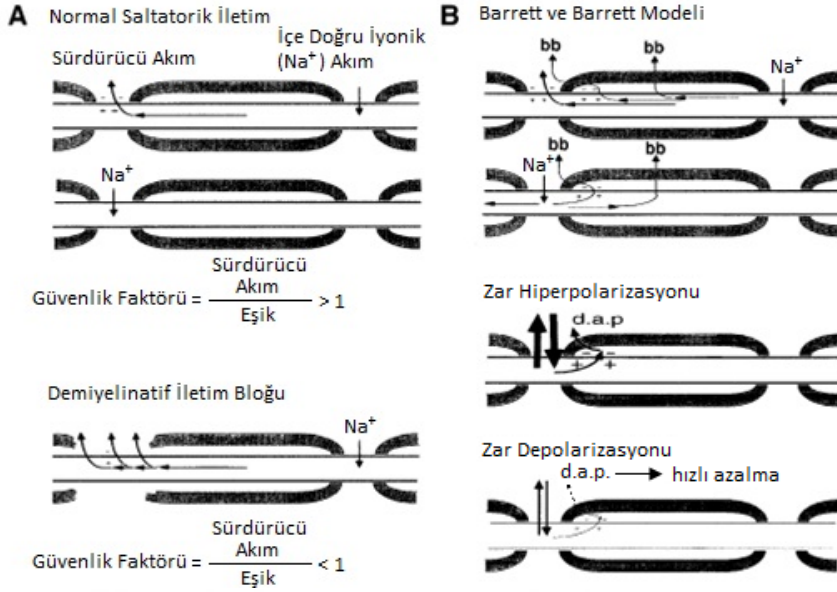
Bir elektronik komponentin iki yönde de doğrusal bir şekilde akım geçirmesine ohmik davranış denir. Ancak diyot gibi sadece belirli bir yönde akım geçiren komponentler de vardır. Bunlar voltajın pozitif yönünde akım geçiriyorlarsa dışarı doğrultucu (outward rectifier), voltajın negatif yönünde akım geçiriyorlarsa içeri doğrultucu (inward rectifier) eleman olarak adlandırılırlar. Hücrelerin zarlarında bu davranışı gösteren doğrultucu voltaj bağımlı iyon kanalları bulunur. Bu kanalların kinetiklerini belirlemek için süresi sabit, şiddeti değişen uyarılabilir akımlar kullanılır (Şekil 2.24). I/V alt-protokolünde uygulanan akımın şiddeti, hedef yanıt şiddetinin +%50'sinden -%100'üne kadar %10'luk adımlarla azaltılır. Elde edilen akım şiddeti-eşik değeri değişimi grafiğinde sağ üst kısım dışarı doğrultucu akımı, sol alt kısım içeri doğrultucu akımı ifade eder (Nodera ve Kaji, 2006; Bostock ve ark., 1998; Burke ve ark., 2001).



Şekil 2.24. I/V ilişkisi (current-threshold) ilişkisi.

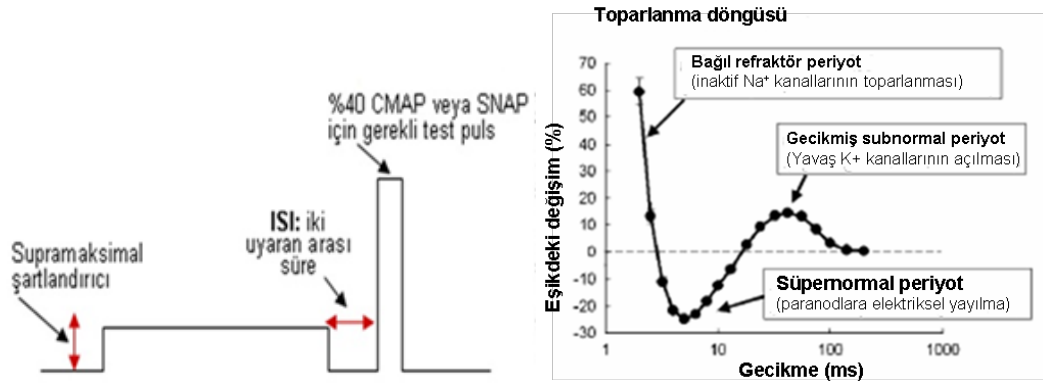
2.12.5. Toparlanma döngüsü

AP'deki depolarizasyon süresince voltaj bağımlı Na^+ kanalları yeni aktive olduklarından yeni bir uyarıya cevap veremezler. Bu nedenle AP'nin başlangıç kısmında zar hiç uyarılamaz. Bu döneme mutlak refrakter dönem denir. Bir süre sonra voltaj bağımlı Na^+ kanalları adım adım aktivasyon sürecini tamamlar ki bu an mutlak refrakter dönemin sonlandığını gösterir. Bu esnada bu kanallar grup grup açıldığından hücreyi uyararak mümkün olur. Ancak bu, daha yüksek şiddete sahip uyarılarla gerçekleşir. Bu dönem de bağıl refrakter dönem olarak adlandırılır. Aktivasyonunu tamamlayan voltaj bağımlı Na^+ kanal sayısı arttıkça, AP oluşması için gerekli eşik değeri azalır ve normale döndüğünde bağıl refrakter dönem bitmiş olur. Sonraki 10-30 ms içinde eşik normalden daha da düşer ve hücre uyarılabilirliği artar. Bu döneme de süpernormal dönem denir (Taddese ve Bean, 2002). Süpernormal dönemde uyarılabilirlik pasif zar özelliklerinden dolayı artar. Nodda oluşan depolarizasyon internoda yayılarak bir süre daha devam eder. Bir diğer değişle, süpernormal dönem nodun oluşturduğu bir ard depolarizasyondur. Süpernormal dönemin kısalması (toplam döngüdeki oranının azalması) uyarılabilirliğin arttığını gösterir (Şekil 2.25). Bu dönemden sonra eşik değeri bir an için dinlenimdeki değerine ulaşır; ancak bu değeri geçerek yine bir miktar yükselir; daha sonra dinlenime ulaşır. Toparlanmanın bu son evresi subnormal dönemdir ve yavaş K^+ kanallarının aktivitesinden kaynaklı oluşur (Şekil 2.26). Bu dönemin artması uyarılabilirliğin arttığını gösterir (Bostock ve ark., 1998; Bostock ve ark., 2005).



Şekil 2.25. Barret ve Barrett sızıntı akımları. Internoddan geçen akım depolarize edici ard potansiyel (dap) olarak adlandırılır. Zar hiperpolarize iken dap belirgin gözlenirken, zarın depolarize olduğu durumda dap zayıf olur (Kaji, 2003'den uyarlanmıştır.).

Sürekli Na⁺ akımlarının da normalüstü döneme etkili olduğu bilinmektedir (Bostock ve ark., 2005). Subnormal dönemde eşik akımların değişimi, koşullama pulsundan yaklaşık 45 ms sonra maksimale ulaşır ve 100 ms sonunda sonlanır. Böylece zar depolarizasyonu yavaş K⁺ kanallarını uyarır ve zar potansiyeli değeri hiperpolarizasyonla sonuçlanır (Barrett ve Barrett, 1982; Kaji, 2003; Nodera ve Kaji, 2006).



Şekil 2.26. Toparlanma döngüsü (Nodera ve Kaji, 2006'dan uyarlanmıştır).

Uyarılabilirlik arttığında refrakter periyot uzar, supernormal dönem gecikir, subnormal dönem erkene gelir ve şiddeti artar. Yani toparlanma döngüsü eğrisi tümüyle yükselir. Uyarılabilirlik azaldığında tersi etkiler olur, toparlanma döngüsü eğrisi aşağı iner (Kuwabara ve ark., 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DeneYler

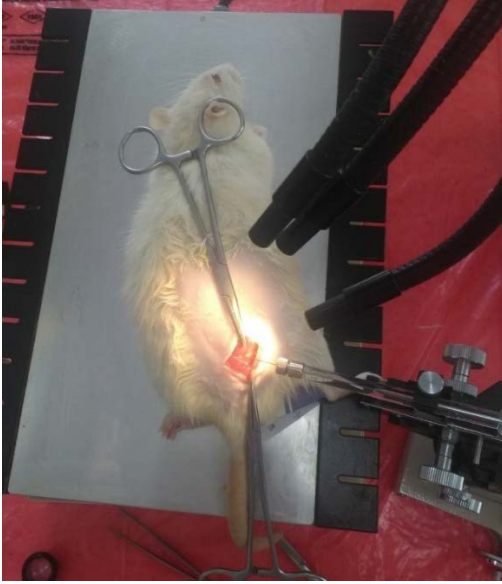
DeneYlerde 6 haftalık 60 adet yetişkin Wistar Albino türü dişi sıçan kullanılmıştır. DeneYler süresince sıçanlar 12 saat gece 12 saat gündüz periyodunda ad libitum olarak beslenmiştir. Bir kafeste en fazla beş adet sıçan bulundurulmuştur. Tüm deney hayvanları Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (NEÜ-KONÜDAM) temin edilmiştir. Hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler için NEÜ hayvan deneYleri yerel etik kurulundan 10.01.2017 tarihli ve 2017-004 sayılı onay alınmıştır (Bkz. Ek 1).

DeneY hayvanları rastgele seçilerek beş gruba ayrılmıştır. DeneY grupları hayvanların sakrifiye edildikleri gün ile isimlendirilmiştir. Gruplar; kontrol (KON), 3 günlük (3G), 7 günlük (7G), 10 günlük (10G), 20 günlük (20G) olarak belirlenmiştir. Hayvanların her biri ketamin (8mg/100g) / ksilazin (1mg/100g) kombinasyonu ile anesteziye sokularak kalça bölgesi açılmış, siyatik sinirin omiriliğe girdiği bölge ortaya çıkarılmıştır. Omirilik girişinden itibaren 2 cm distali mikroenjeksiyon bölgesi olarak belirlenmiştir. Mikromanüplatöre yerleştirilmiş olan 30 G'lik hamilton mikroenjektörü, endonöryum içerisine, sinire zarar vermeyecek ve paralel olacak şekilde, büyüteçle (25x) izlenerek uygun açıda yerleştirilmiştir. Daha sonra kontrol grubu hayvanlarına 2µl serum fizyolojik çözeltilisi, 3G, 7G, 10G ve 20G grubu hayvanlarına 2µl LPC çözeltilisi endonöryum içerisine, taşmaya sebep olmayacak şekilde yavaşça zerk edilmiştir. Çözeltinin kılıf dışına sızması için, literatüre uygun olarak (Zhang ve ark., 2010), enjektör çıkarılmadan önce 2-3 dk bekletilmiştir. Enjeksiyonun tamamlanmasının ardından her doku katmanına sütur atılmıştır. Hayvanlar anesteziden çıkana kadar vücut sıcaklıklarını korumaları sağlanmıştır. Kontrol grubu hayvanları cerrahi operasyondan 3 gün sonra, diğer gruplardaki hayvanlar gruplarına uygun olarak 3, 7, 10 veya 20 gün sonra teker teker alınarak, ketamin (8mg/100g) / ksilazin (1mg/100g) kombinasyonu ile anesteziye sokulmuştur. Anestezi altındaki sıçanların ötenazisi gerçekteştirilmiştir. Daha sonra ameliyat masasına yüzüstü yatırılan hayvanların topuklarından omiriliklerine kadar kesi oluşturulmuş; çevreleyen kas dokusu tendonlarından kesilmek suretiyle siyatik sinir tamamen görünür hale getirilmiştir. Distal ve proksimal uçlarından cerrahi makas ile tek hamlede kesilerek sinirin disseksiyonu tamamlanmıştır. İzole edilen siyatik sinirler, bekletilmeden gaz karışımı (%95 O₂ ve %5 CO₂) ile gazlanan krebs solüsyonununun (133 mM NaCl; 4,9 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 11,9 mM NaHCO₃; 0,7 mM NaH₂PO₄; 11 mM Glukoz) perfüze edildiği organ banyosuna

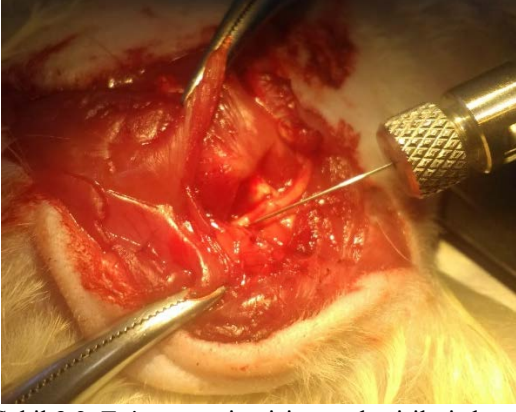
yerleştirilmiştir. Siyatik sinirin distal ucu, negatif basınç uygulanarak, suction elektrodu içerisine çekilmiştir. Siyatik sinir mikroenjeksiyon yapılmış olan proksimal bölgeden uyarılmış, yanıtlar suction elektrodu ile sinirin distal ucundan kaydedilmiştir. Tüm kayıtlar Faraday Kafesi içerisinde gerçekleştirilerek elektriksel gürültünün minimum olması sağlanmıştır.

3.2. Mikroenjeksiyon

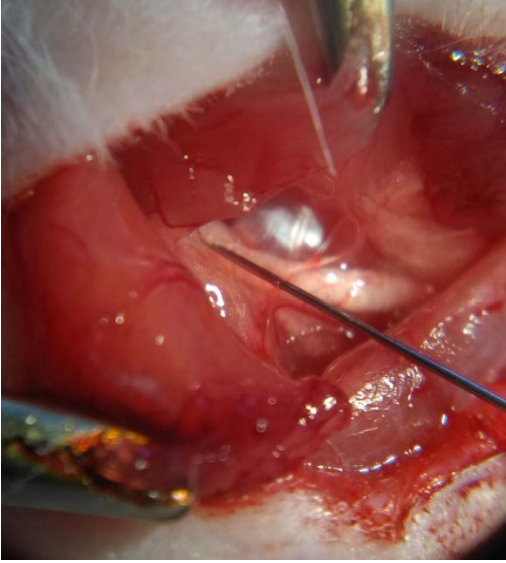
Mikroenjeksiyon çeşitli ajanları sinir dokusu içine zerk etmede kullanılan bir yöntemdir. Etkisi lokal ve hızlı olduğu için tercih edilen bu yöntemde cam pipetlerden yapılan enjektörler veya hazır olarak tedarik edilebilen Hamilton Enjektörleri kullanılmaktadır. Dayanıklılık, temizlik kolaylığı ve çok kez kullanım imkânı gibi sebeplerden dolayı mikroenjeksiyon için hamilton enjektörü kullanımı uygun bulunmuştur. Enjektör ucu için, epinöryuma ve sinire zarar vermeyecek şekilde 30G ve uç tipi 2 olan iğneler seçilmiştir (Şekil 3.1; Şekil 3.2; Şekil 3.3). Deneyle sırasında Hamilton Enjektörü bir mikromanüplatöre (Narishige MMO-4) sabitlenerek, enjektör yüksekliği ve hareketi bu manüplatör ile kontrol edilmiştir. Saline kullanılarak %1'lik LPC çözeltisi hazırlanarak, hayvanların siyatik epinöryumu içerisine 2 μ l solüsyon zerk edilmiştir (Şekil 3.3). Mikroenjeksiyon süreci uygun bir büyüteç ile izlenmiştir.



Şekil 3.1. Mikromanüplatör ile kontrol edilen Hamilton Enjektörü.



Şekil 3.2. Epinöryum içerisine yerleştirilmiş hamilton enjektörü.

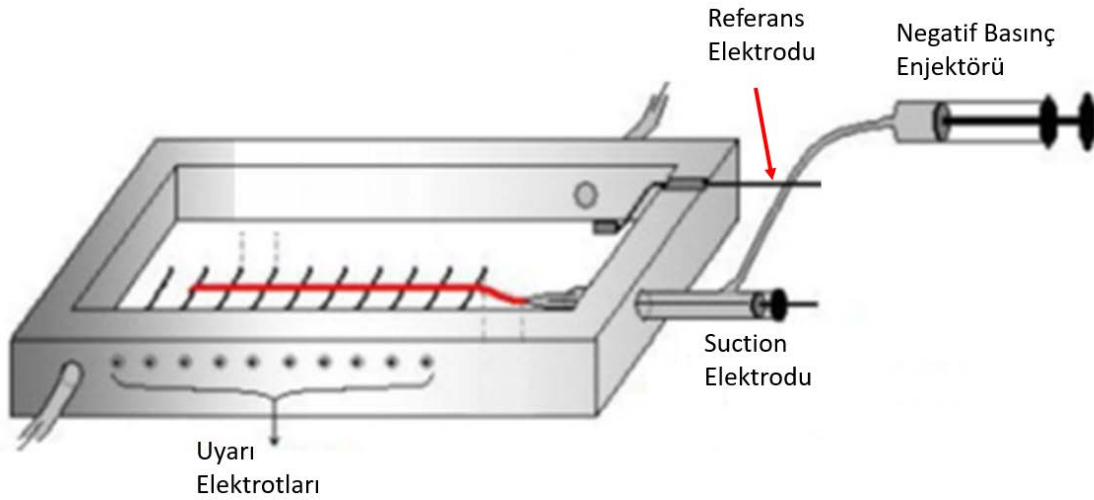


Şekil 3.3. Epinöryum içerisine yerleştirilmiş hamilton enjektörünün yakından (25x) görüntüsü.

3.3. Organ Banyosu ve Suction Elektrodu

Organ banyosu, izole edilen dokuların hem deneyler süresince canlılığını korumasını sağlayacak hem de deney kayıt sistemine uyumlu olacak şekilde, ana bilim dalımızda, pleksiglastan dikdörtgen prizma formunda üretilmiştir (Şekil 3.4). Organ banyosunun uzun kenarına 0,5 cm aralıklarla 10 adet gümüş uyarı elektrotu, kısa kenarına suction elektrodu sabitlenmiştir. Uyarı elektrotları olarak kullanılan gümüş teller organ banyosuna sabitlenmeden önce, üzerlerinden akım geçirilerek, tuz çözeltisi yardımıyla AgCl ile kaplanmıştır. Suction elektrodu optimum kuvvet ve sıcaklık ayarları belirlenmiş olan bir mikropipet çekici (PN-31 Micropipette puller, Narishige, Japan) ile çekilmiş cam pipetin, modifiye edilmiş bir 1 cc'lik enjektöre (insülin enjektörüne) yerleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Çekilen cam pipetin uç bölgesinin siyatik sinir distal ucuna zarar vermeyecek formda ve boyutta olmasına dikkat edilmiştir. İnsülin enjektörünün organ banyosu dışında kalan bölgesinde bir noktaya negatif basınç enjektörü irtibatlandırılmıştır. İnsülin enjektörü içine yerleştirilen bir kablo üzerinden, suction elektrodu içerisine sinirle beraber çekilen solüsyon ile amplifikatör arasında irtibat

kurulmuştur. Referans elektrodu olarak bir gümüş plaka organ banyosu zeminine konumlandırılmıştır. Organ banyosunun bir köşesine yol açılarak, gaz çıkışı solüsyon içerisinde kalacak şekilde gazlama borusu yerleştirilmiştir. Bir diğer köşeye de, çevresel faktörlerden kaynaklı elektriksel gürültüyü azaltmak için solüsyonla temas edecek şekilde toprak elektrotu irtibatlandırılmıştır. Fizyolojik sıcaklıkta (37°C) tutulan Krebs' solüsyonu (133 mM NaCl; 4,9 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 11,9 mM NaHCO₃; 0,7 mM NaH₂PO₄; 11 mM Glukoz; pH 7.4) uygun periyotta yıkama usulüyle yenilenmiştir. Organ banyosunun kapağı kapalı tutularak sıcaklığın korunması hedeflenmiştir



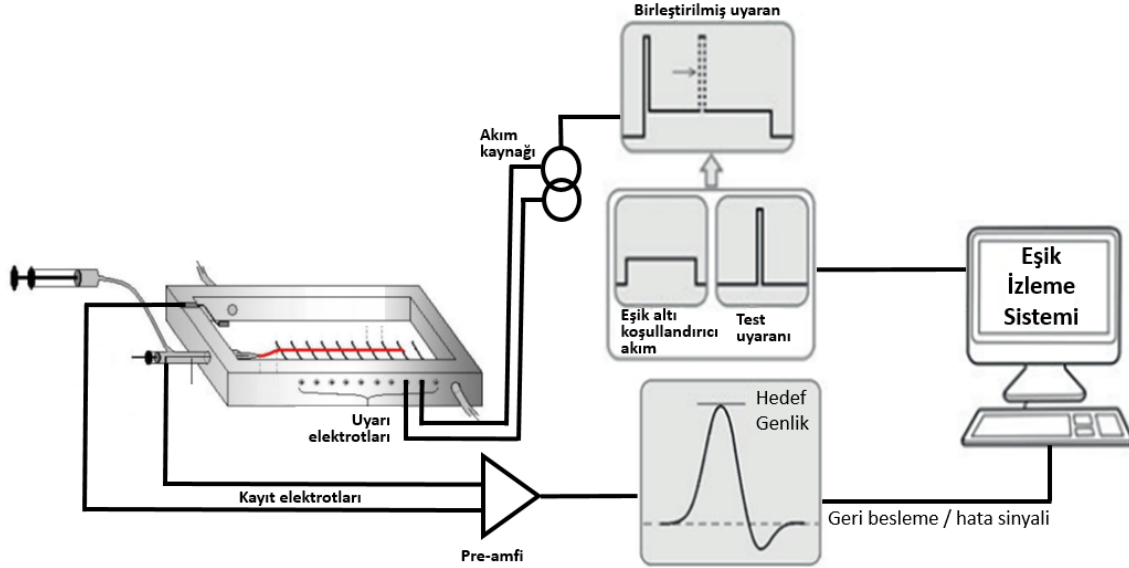
Şekil 3.4. Organ banyosu (Tuncer, 2008).

Hayvanlardan izole edilen siyatik sinirler, mikroenjeksiyon bölgesi her bir sinir için uygun elektrot çiftine denk gelecek şekilde organ banyosundaki uyarı elektrotlarının üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra negatif basınç uygulanarak sinirlerin distal uçları, bir miktar solüsyonla birlikte suction elektrodu içerisine çekilmiştir.

3.4. Eşik Değer İzleme Yöntemi ile Uyarılabilirlik Ölçümleri

Deney kayıt sisteminin genel şeması Şekil 3.5'te verilmiştir. Organ banyosuna yerleştirilen izole sinirleri uyarmak için Digitimer DS4-bifazik stimülatör, Humbug (50/60Hz Noise Eliminator, Digitimer Co., UK) ile özellikle 50 Hz gürültüsünden arındırılmış BAP sinyallerinin amplifiye edilmesi için giriş empedansı yüksek bir pre-amplifikatör (Warner DP-311A) ve analog sinyalleri sayısallaştıran (dijitalize eden), diğer cihazların bağlandığı veri toplama modülü (NI USB 6251 BNC) deney setinin temel öğeleridir. Veri toplama modülü bilgisayara irtibatlandırılarak QtracS yazılımı tarafından DS4 ile uygun paternde uyarılar verilmesini sağlamaya yönelik ve geri beslemeleri olanaklı kılacak bağlantılar yapılmıştır. Amfi ve stimulatör uygun kablolarla, sırasıyla organ banyosundaki suction ve uyarı elektrotlarına

bağlanmıştır. Organ banyosu tek başına faraday kafesi içerisine yerleştirilmiş ve cihazlarla bağlantıları sağlayan kablolar kafesten uygun patikalarla çıkarılmıştır. Faraday kafesi yalnız toprak hattına bağlanmıştır. Böylece çevreden gelen çeşitli elektriksel gürültünün azaltılması amaçlanmıştır.



Şekil 3.5. Deney sistemi genel şeması.

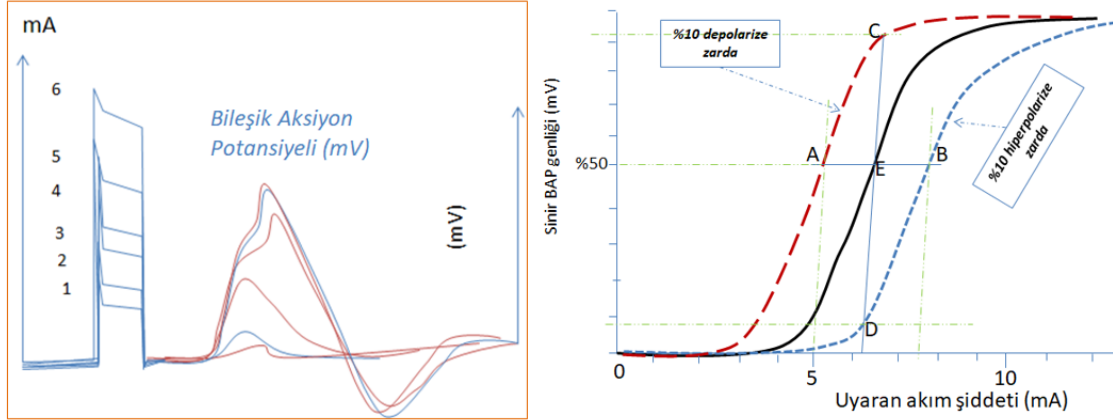
İzole edilen siyatik sinirler organ banyosuna yerleştirilirken, mikroenjeksiyon bölgesinin uyarı elektrotları üzerinde olması sağlanmıştır. Sinirin distal ucu suction elektrotuna yerleştirildikten sonra çevreden kaynaklı elektriksel gürültü kontrol edilmiş; uygun düzeylerde olduğunda deney setinin içerisinde bulunduğu faraday kafesinden uzaklaşmıştır. Bilgisayarda QtracS programı açılmış, TrondNF/ Rodent SNAP protokolü seçilmiştir. Ekranda görülen BAP için uygun pencere seçildikten sonra Regular Trond uyarılabilirlik ölçümleri seti seçilerek; sırasıyla uyarı-yanıt, şiddet-süre, eşik elektrotonus, akım-eşik ilişkisi (I/V), toparlanma döngüsü alt-protokolleri uygulanarak gerekli veriler kaydedilmiştir.

TrondNF protokolü ile öncelikle supramaksimal uyarana yanıt belirlenir. Daha sonra deney planına göre bu maksimal genliğin istenilen bir yüzde değeri seçilir (% 40 ya da % 20). Bu % genlik değeri, hedef yanıt olarak isimlendirilir. Protokol geri besleme yolu ile istenilen bu hedef yanıtı oluşturacak pulslar uygulanır. Bu amaçla uygulanan pulslara “test pulsu” denir.

3.4.1. Uyarı-yanıt ilişkisi

Sinirin yanıtına göre uyarının özelliklerini belirleyen geribesleme mekanizmasının kontrolü gerekli olduğundan, ilk önce bu prosedür kaydı gerçekleştirilmiştir. Bu prosedür sayesinde maksimum yanıt genliği, hedef yanıt genliği ve izleme adımı süreci belirlenmiştir.

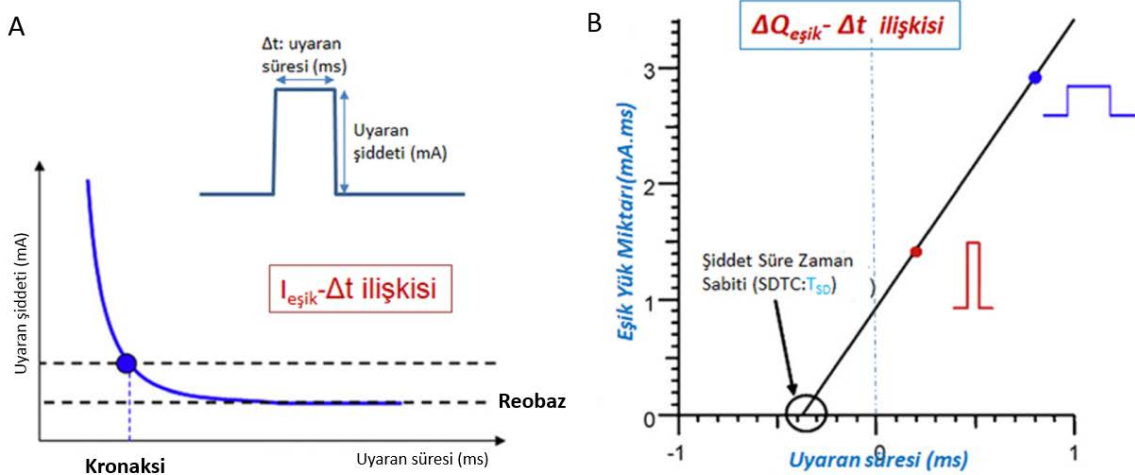
Uyaran şiddeti sıfırdan başlayarak % 2'lik adımlarla yanıtın maksimum değerine kadar artırılmıştır. Maksimum yanıtı ulaşıldığını anlamak için ekrandaki mavi izler takip edilmiştir. Maksimum uyaran değeri belirlendikten sonra, uyaran şiddeti düşmeye başlamış ve yanıt anlamsız boyuta geldiğinde kayıt durdurulmuştur. Daha sonra program uyaran-yanıt verilerini bir doğruya oturtmuştur (Şekil 3.6). Bu doğrunun eğimi, seçilmiş olan maksimum hedef yanıtın genliğinin % 40'ına eşittir. Bu adımdan sonra şiddet-süre ilişkisi takip edilmiştir.



Şekil 3.6. Sabit süreli (ms)-şiddeti kademeli artan uyaran akım (mA) ile genliği kademeli artan BAP (mV). Uyaran şiddeti (mA)- yanıt ilişkisi, ve zarin %10 depolarize ve %10 hiperpolarize edilmesi durumunda uyarılabilirlikteki değişim eğrileri.

3.4.2. Şiddet-süre ilişkisi

Bu prosedürde 1 ms test pulsı ve aynı yük miktarına sahip ve 0,5; 0,4; 0,2; 0,1 ve 1 ms süreli uyarılara verilen yanıtlar izlenmiştir. Her adımda uyaran süresi azalır, pik yanıt başlangıçta düşer, ama test uyarısının artmasıyla hedef yanıt düzeyine geri getirilir. Ekrandaki delay grafiği test uyarısının süresini belirtir. Program kaydedilen bu verilere uygun bir doğru oturtarak, yük-süre eğrisi çizdirir (Şekil 3.7). Doğrunun eğimi reobazı, yatay eksenini kestiği nokta SDTC'yi verir.

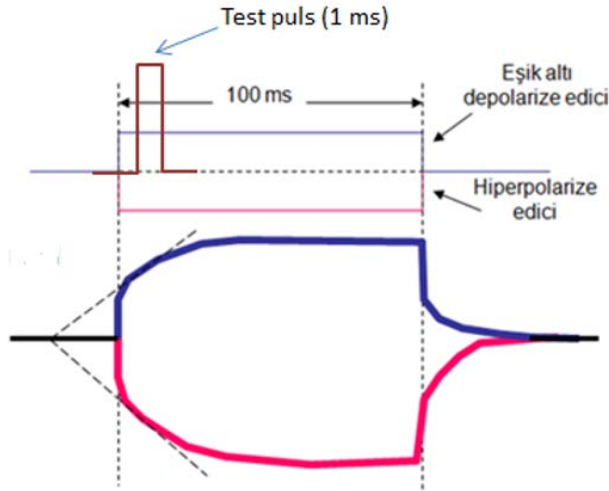


Şekil 3.7. Uyarılabilirlik bilgisi veren; Uyarının şiddeti (mA)-uyaran süresi (ms) ilişkisi (A) ve benzer şekilde Eşik yük miktarı (mA.ms)-Uyaran süresi (ms) ilişkisi (B), eğrileri. τ_{SD} uyarın süresi kısaltıldıkça eşik şiddet değerindeki artma hızının bir göstergesidir, bir bakıma zarın görünür zaman sabitidir.

3.4.3. Eşik elektrotonus

Eşik elektrotonus kaydında 1ms'lik test pulsu ile kontrol eşik akımının genliğinin %20'si ve %40'ı değerinde genliğe ve 100 ms süreye sahip eşikaltı polarizan koşullama pulsları uygulanarak uyarılabilirlik değişimleri izlenmiştir. Koşullama ve test pulsları arasındaki süre - 10 ms'den +190 ms'ye kadar (başlangıçta test pulsu polarize edici pulsa bindirilmişken, artan gecikme süresi ile test pulsu polarize edici pulsun takipçisi haline gelir) değişir. Her seferinde anlamlı eşik yanıtına ulaştıran 3 uyarandan sonra pulslar arası süre değişir. Kayıt sonlandığında eşik elektrotonus grafiği ekranda görülür (Şekil 3.8).

Eşik elektrotonus prosedüründe, depolarize ve hiperpolarize edici 100 ms süreli eşikaltı pulsların üzerine 0,1 ms süreli, maksimal genliğin %20 ve %40'ı olacak şekilde hedef yanıt oluşturabilen test pulsları bindirilerek bu pulsların şiddetlerinin eşiğe göre azalması ölçülür.

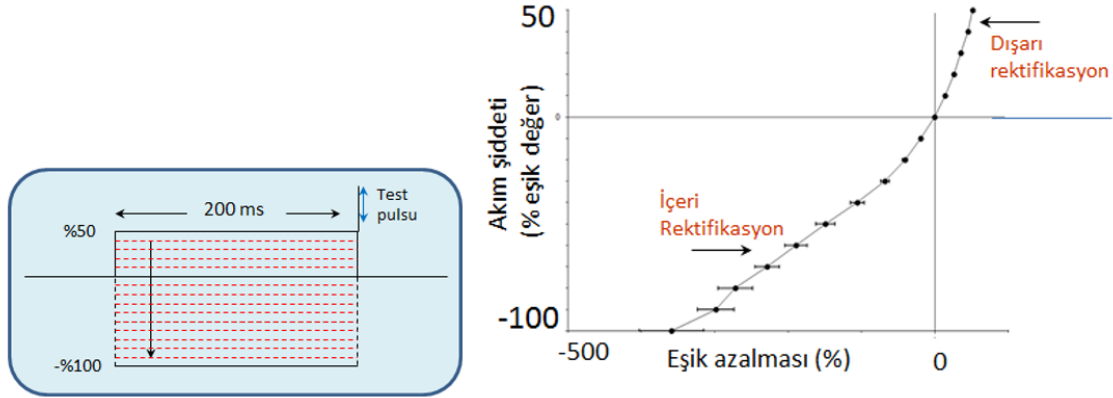


Şekil 3.8. Uzun süreli (100 ms) eşik altı depolarize veya hiperpolarize edici bir akım ile belirli zamansal gecikmelerle uygulanan test akımı (1 ms) ile aksonda uyarılabilirliğin test edilmesi işlemi, eşik elektrotonus.

3.4.4. Akım-eşik değişimi

Akım-eşik değişimi, süresi 200 ms'de sabit tutulan koşullama pulsu ardından 1 ms süreli test pulsu ile ölçülür ve genellikle internodal aksolemmmanın doğrultucu özelliklerine bağlıdır. Uygulanan akımın genliği, eşik değerinin %50'sinden %100'üne kadar %10'luk adımlarla değişir. Akımdaki değişime bağlı olarak eşik değeri azalması grafiği çizdirilir (Şekil 3.9). Eğrinin üst kısmının dikliği, depolarize edici akıma uyuma karşılık, hızlı ve yavaş K^+ kanallarının aktivasyonunu yansıtan dışa doğrultucu özelliği göstermektedir. Alt çeyrekte kalan

kısının kademeli dikliği ise, hiperpolarize edici akıma uyuma karşılık, zarın içeri doğrultucu özelliğini ve içeri doğrultucu katyon iletkenliği I_H , göstermektedir.



Şekil 3.9. Akım şiddeti, kontrol eşiğin +%50 (depolarize edici) değerinden -%10 adımlarla -%100 (hiperpolarize) değerine kadar basamaklı (ramp) biçiminde değiştirilmesi, ve şiddet-eşiğ azalması (%) eğrisi.

3.4.5. Toparlanma dđngüsü

Programın son kısmı, bir supramaksimal koşullama akımından sonra, 200 ms'den 2 ms'ye kadar çeşitli sürelerde oluşan uyarılabilirlik değişimlerini kaydeder. Bunun için 1 ms süreli supramaksimal koşullama pulsu ve ardından belirli bir süre sonra % 40 BAP yanıtını elde etmek için gereken test pulsu uygulanır. Toparlanma dđngüsü aslında 3 fazdan oluşur: refrakter dönem, süperuyarılabilir dönem, subuyarılabilir dönem. Pulslar arasındaki süre düzensiz, yaklaşık bir logaritmik sekansta azaltılmıştır. Kayıt bittiğinde iki pulsun arasındaki gecikmeye bağlı olarak, eşiğ değeri yüzde azalması logaritmik skalaya oturtulmuş olarak çizilir (Şekil 2.26).

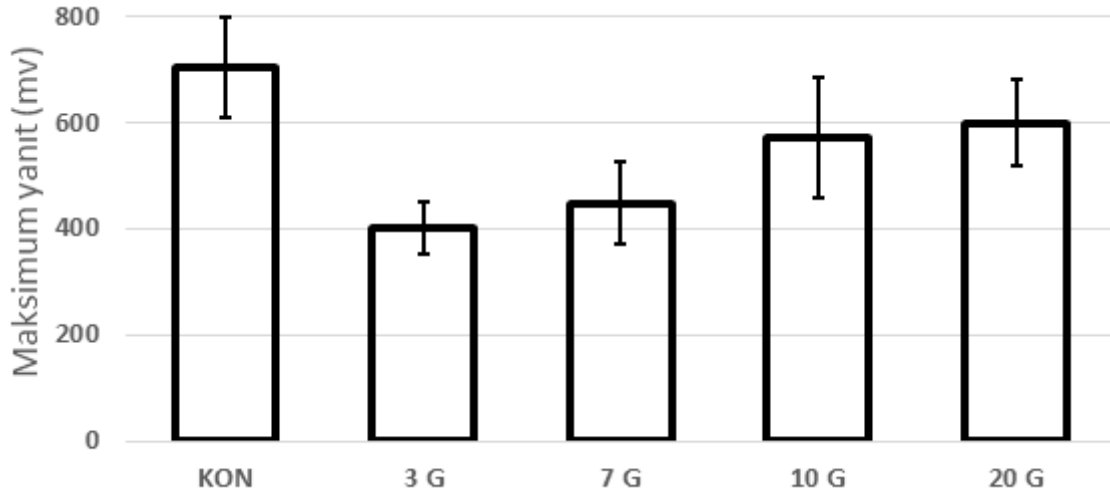
3.5. Analiz ve İstatistik

QtracW'ya ait olan QtracP programı üzerinden deney süresince kaydedilmiş veriler, excel dosyası olarak dışa aktarılmıştır. MS Office Excel 2016 programı üzerinde gerekli grafikler çizdirilmiş, veriler analizlenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar Graphpad Prism programı ile yapılmıştır. Gruplar One-Way ANOVA ve Tukey's post-hoc testleri ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ alınmıştır.

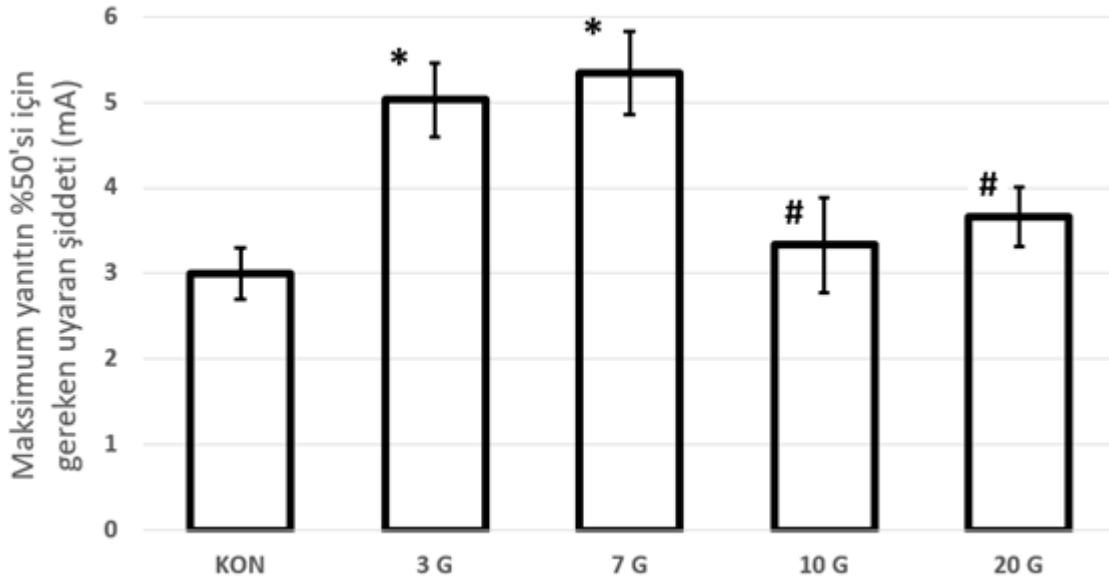
4. BULGULAR

4.1. Uyarın-Yanıt İlişkisi

Eşik izleme yöntemindeki ilk alt-protokol olan uyarın (mA) - yanıt (mV) ilişkisi verilerinden elde edilmiş olan maksimum yanıt genliği (mV) ve hedef yanıt (%50*maxBAP) için gerekli uyarın şiddetinin (mA) deney gruplarına ait ortalama değerleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



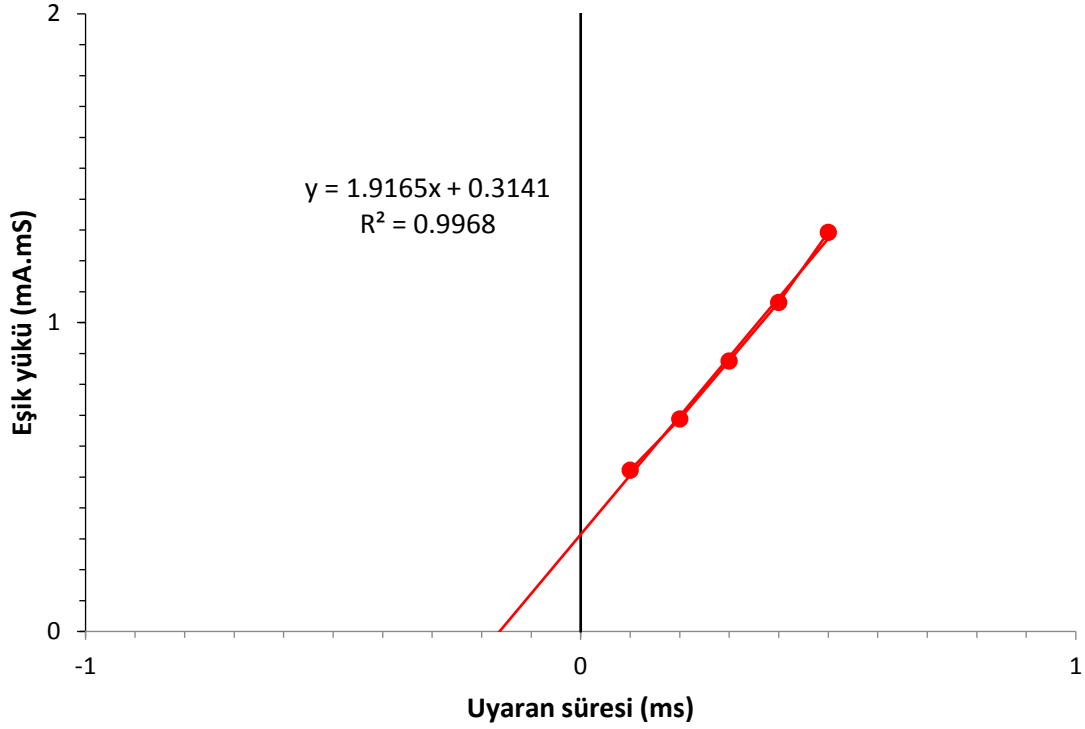
Şekil 4.1. Her bir grup için elde edilen maksimum BAP genliği (mV) ortalamaları ve standart hataları (sırayla grupların N=12, 10, 9, 10, 9).



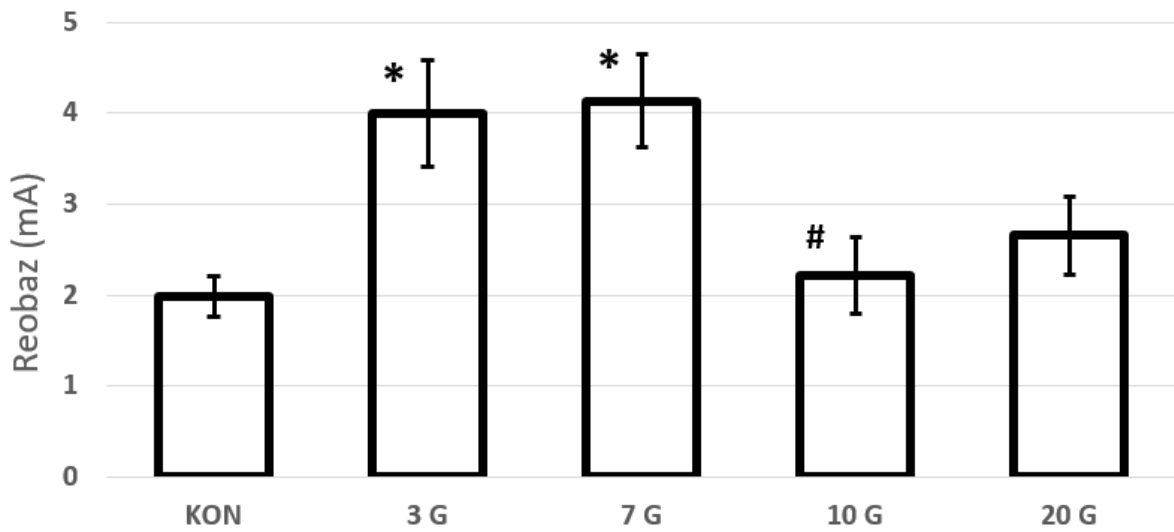
Şekil 4.2. Maksimum BAP yanıtının %50'sini elde etmek için gerekli uyarın şiddetinin (mA) her bir grup için ortalama değerleri (sırasıyla grupların N=12, 10, 12, 11, 12) ve standart hataları. * KON grubundan, # ise 7G grubundan $p < 0,05$ 'lik farkı göstermektedir.

4.2. Şiddet-Süre İlişkisi

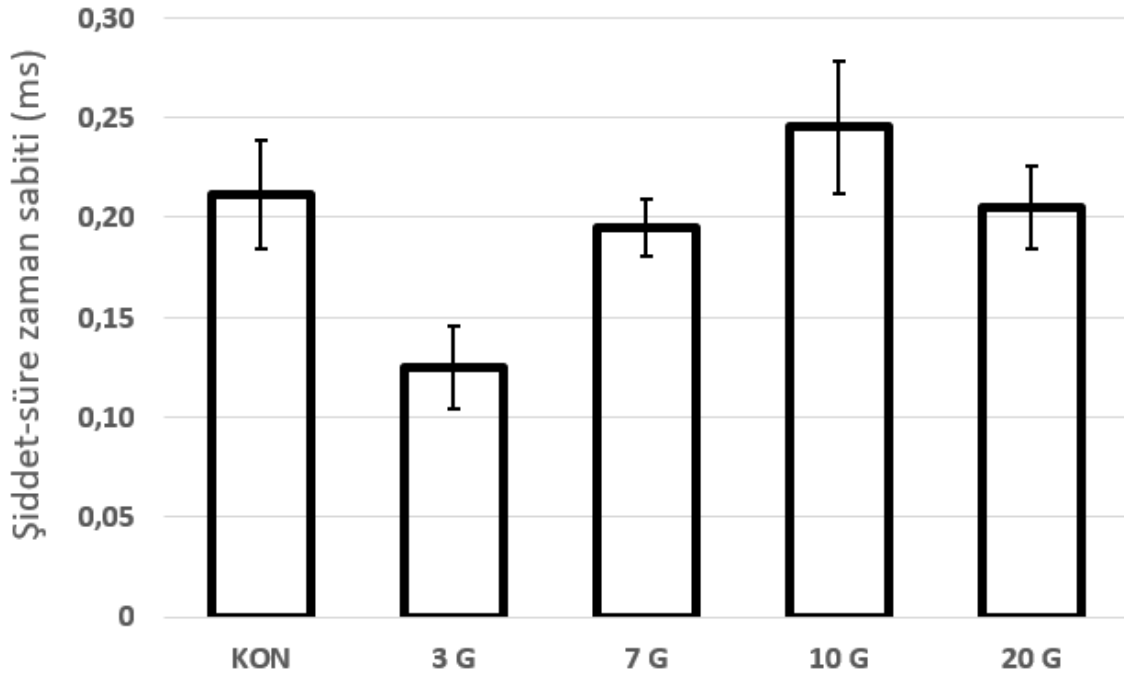
Kontrol grubundan bir deneğe ait yük-süre eğrisi ve değerlere oturtulan doğru Şekil 4.3'te verilmiştir. İki önemli uyarılabilirlik parametresinin, reobaz ve SDTC, elde edilebildiği ikinci alt-protokol olan şiddet-süre ilişkisi ile elde edilen veriler sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. SDTC'nin dağılımının daha kolay görülebilmesi için Şekil 4.6 eklenmiştir.



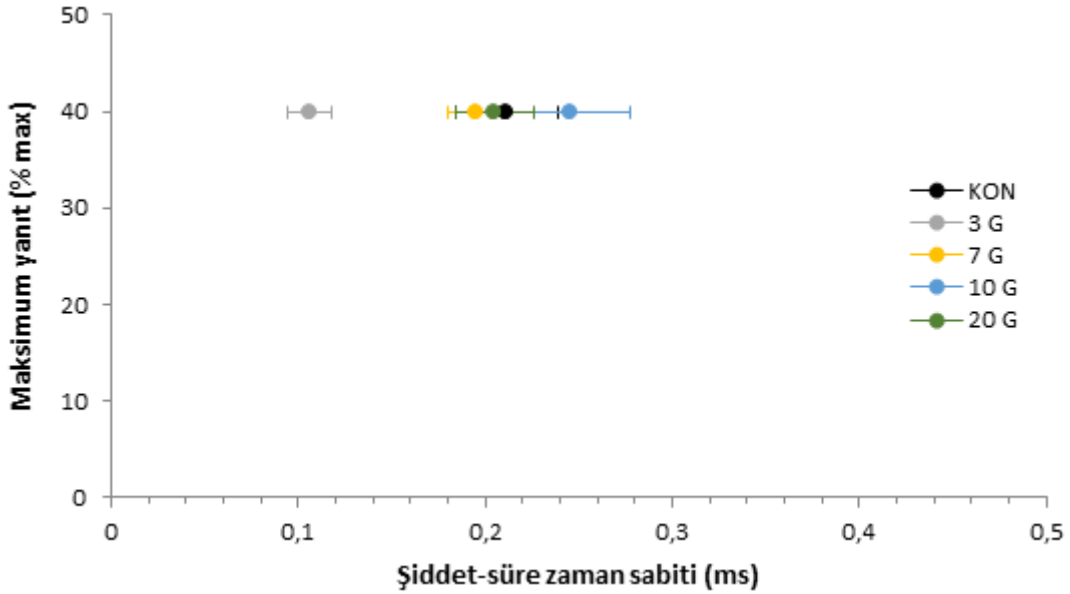
Şekil 4.3. Kontrol grubundan bir deneğe ait yük-süre eğrisi ve değerlere oturtulan doğru.



Şekil 4.4. Her bir grup için ortalama reobaz (mA) değerleri (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 10, 9) standart hataları ile birlikte verilmiştir. * KON grubundan farklılığı, # 7G grubundan farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

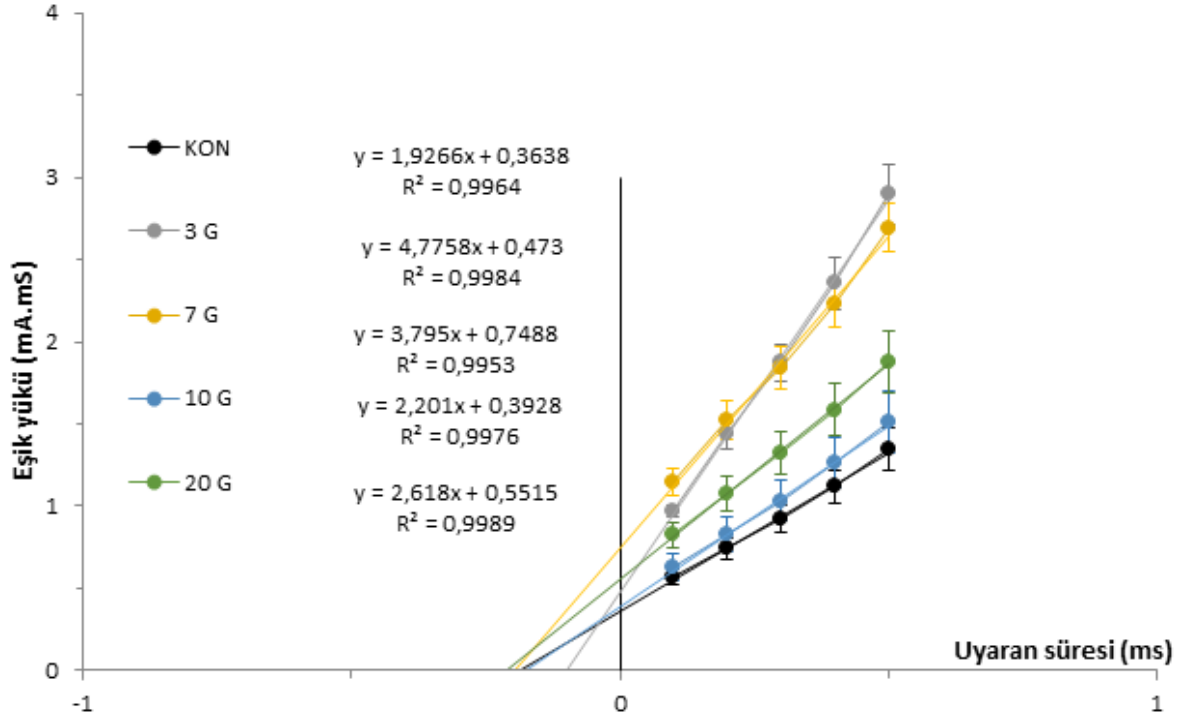


Şekil 4.5. Her bir grup için SDTC ortalama değerleri (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 10, 9) ve standart hataları birlikte verilmiştir.



Şekil 4.6. Her bir grup için ortalama (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 10, 9) SDTC dağılımı.

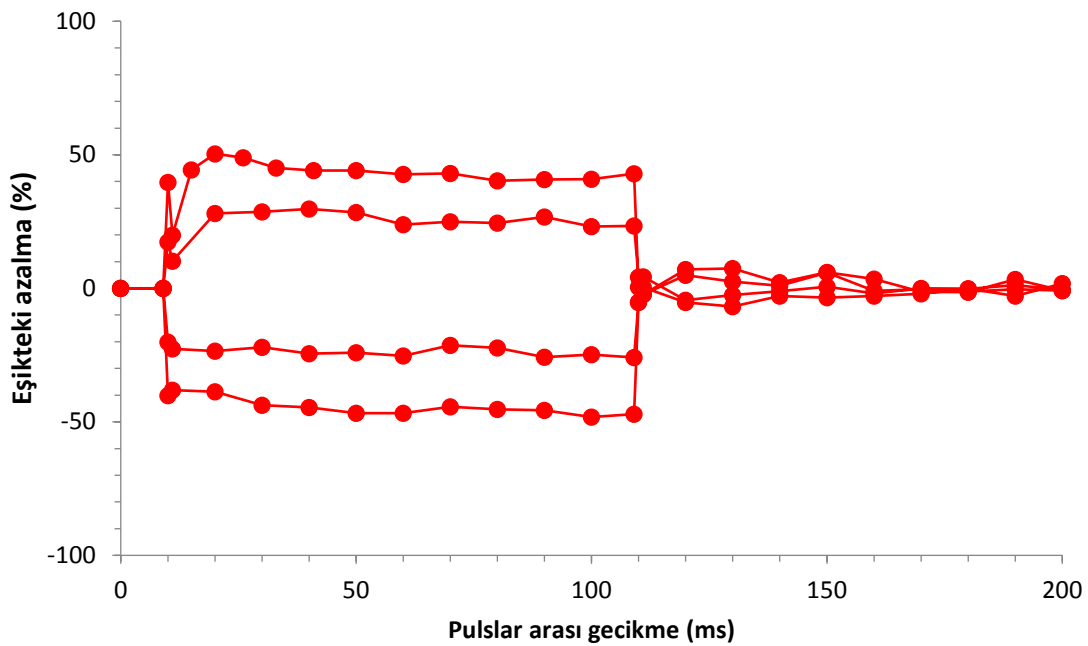
Uyaran yükünün yanıt oluşturabilmesi için uygulanması gereken süreyle ilişkisi Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



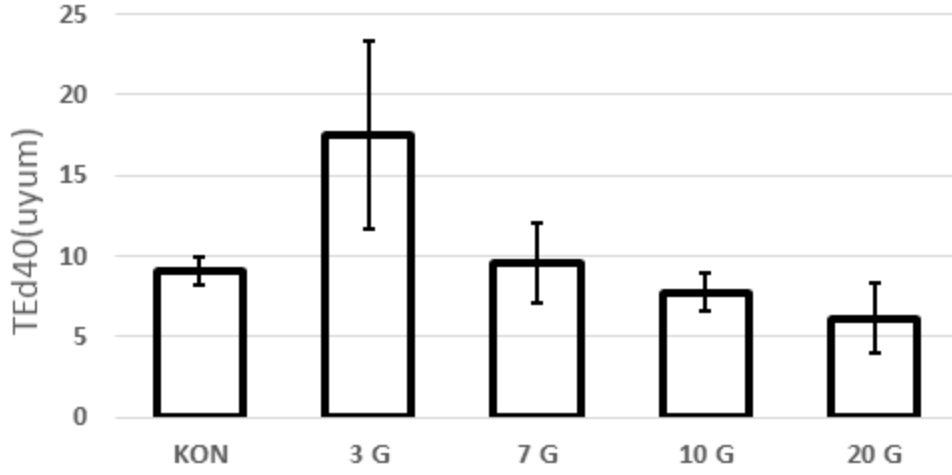
Şekil 4.7. Grupların uyarın yükünün süresiyle değişimlerinin bir doğru üzerine oturtulduğu grafik. Grup ortalamaları (sırasıyla grupların N=12, 6, 7, 9, 9) ve standart hata kullanılarak çizdirilmiştir.

4.3. Eşik Elektrotonus

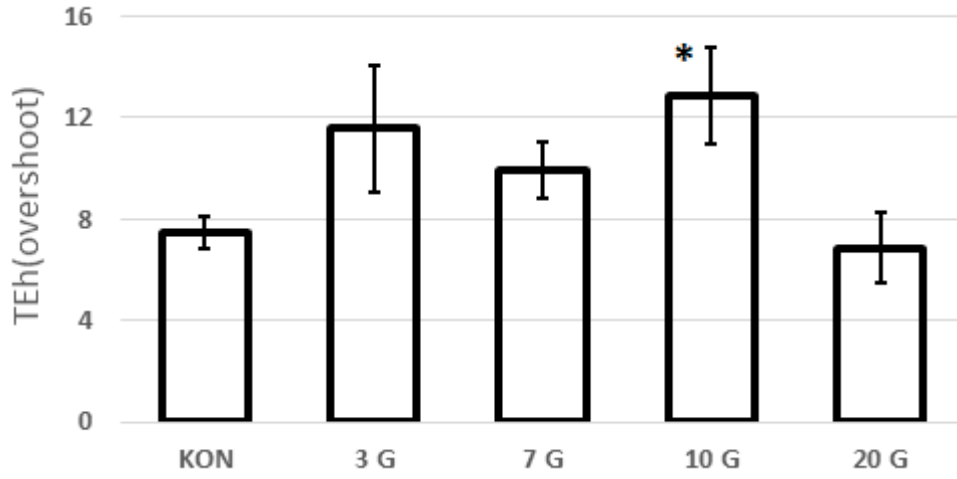
Eşik elektrotonus alt-protokolünde hedef genlik olarak %20 ve %40 seçilmiştir. Örnek olması için kontrol grubundan bir deneye ait eşik elektrotonus eğrisi Şekil 4.8’de verilmiştir. Bu alt-protokolle elde edilmiş olan TEd40(uyum), TEh(overshoot) grup ortalamaları sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait bir deneğin eşik elektrotonus eğrisi.



Şekil 4.9. Grupların TE40(uyum) ortalamaları (sırasıyla grupların N=12, 10, 9, 11, 10) ve standart hataları.



Şekil 4.10. Grupların TEh (overshoot) ortalamaları (sırasıyla grupların N=12, 7, 11, 10, 6) ve standart hataları. * KON grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

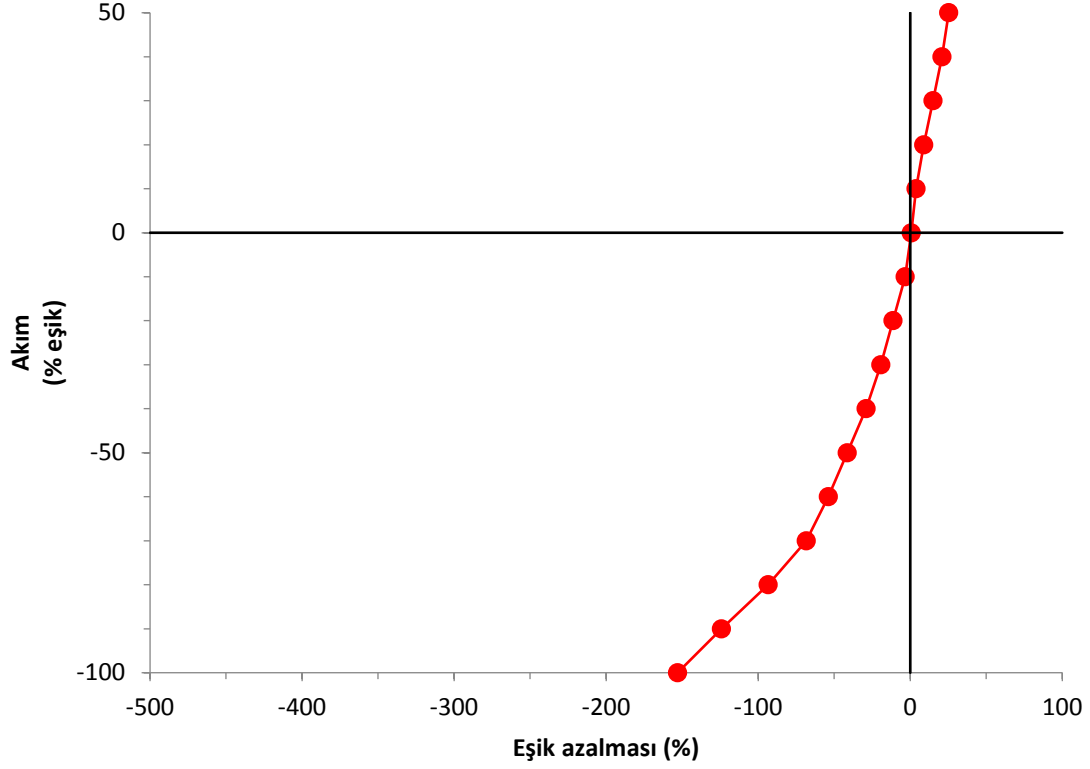
Eşik elektrotonusa ait diğer parametrelerin her bir grup için ortalama değerleri ve standart hataları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Her bir grup için eşik elektrotonusa ait parametrelerin ortalama değerleri ve standart hataları. * KON grubundan farklılığı, # 7G grubundan farklılığı göstermektedir (p<0,05).

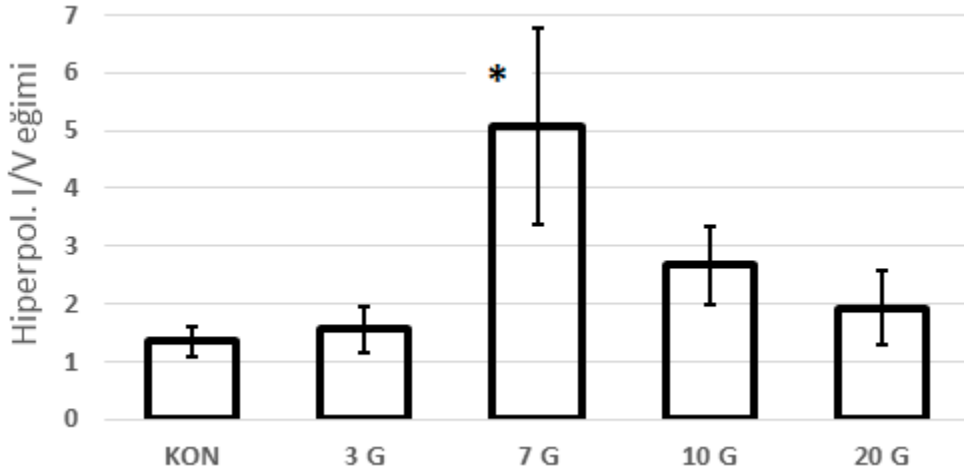
	KON	3 G	7 G	10 G	20 G
TEh (90-100ms)					
N: 12, 7, 12, 11, 8	-13,57±4,13	-10,49±3,39	-25,86±21,26	-31,33±18,92	-36,79±24,38
TEd (10-20ms)					
N:12, 10, 10, 11, 11	11±4,12	21,91±8,55	35,69±13,29	31,27±11,54	55,85±13,83*
TEd (40-60ms)					
N: 12, 10, 10, 11, 12	6,58±4,02	30,17±12,75	35,96±15,1	32,74±12,81	66,66±13,53*
TEd (90-100ms)					
N: 12, 10, 10, 11, 12	5,79±3,99	33,45±13,79	35,73±15,68	30,5±12,82	66,04±13,73*
TEh (10-20ms)					
N: 12, 7, 12, 11, 8	-18,89±3,13	-16,38±2,79	-29,59±18,73	-39,03±16,02	-43,21±23,89
TEd (undershoot)					
N: 12, 7, 6, 9, 4	-15,33±1,81	-14,08±1,03	-14,17±1,82	-15,49±1,14	-12,23±2,57
TEd (pik)					
N: 12, 10, 11, 11, 9	13,9±3,81	40,11±12,37	34,47±11,34	38,14±11,82	62,76±14,43*
S2 uyum					
N: 12, 10, 11, 11, 10	8,1±0,89	6,66±1,56	11,08±2,81	7,63±1,78	3,52±1,51
Uyum yarı zamanı (ms)					
N: 12, 10, 11, 11, 10	17,4±1,87	38,57±10,04	22,36±6,99	37,35±9,35	53,77±10,94*
TEh (20-40ms)					
N: 12, 7, 12, 11, 8	-16,59±3,64	-14,64±2,67	-27,08±19,32	-33,05±17,56	-39,15±24,11
TEh (eğim 101-140ms)					
N: 12, 7, 12, 11, 8	-0,19±0,04	-0,36±0,08	-0,25±0,17	0±0,19	0,23±0,21
TEd20 (pik)					
N: 11, 10, 11, 11, 12	8,44±2,38	18,04±8,73	30,31±12,12	22,14±9,56	51,22±13,02*

4.4. Akım-Eşik Değişimi

Örnek olması için kontrol grubundan bir deneğe ait I/V grafiği Şekil 4.11'de verilmiştir. I/V değişimindeki hiperpolarize bölgeye ait eğim değerinin ortalamaları ve standart hataları Şekil 4.12'da; I/V alt-protokolü ile elde edilen diğer parametreler Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Kontrol grubundan bir deneğe ait I/V grafiği.



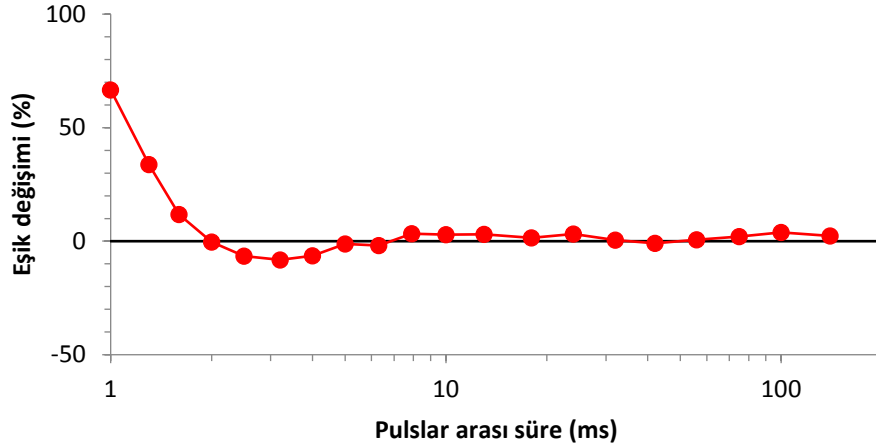
Şekil 4.12. I/V eğrisinden hiperpolarizasyon bölgesinin gruplara ait ortalama (sırasıyla grupların N=8, 7, 8, 7, 8) eğim değerleri ve standart hataları. * KON grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

Tablo 4.2. I/V alt-protokolü ile elde edilen parametreler grup ortalamaları±standart hata şeklinde verilmiştir. * KON grubundan farklılığı, # 7G grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

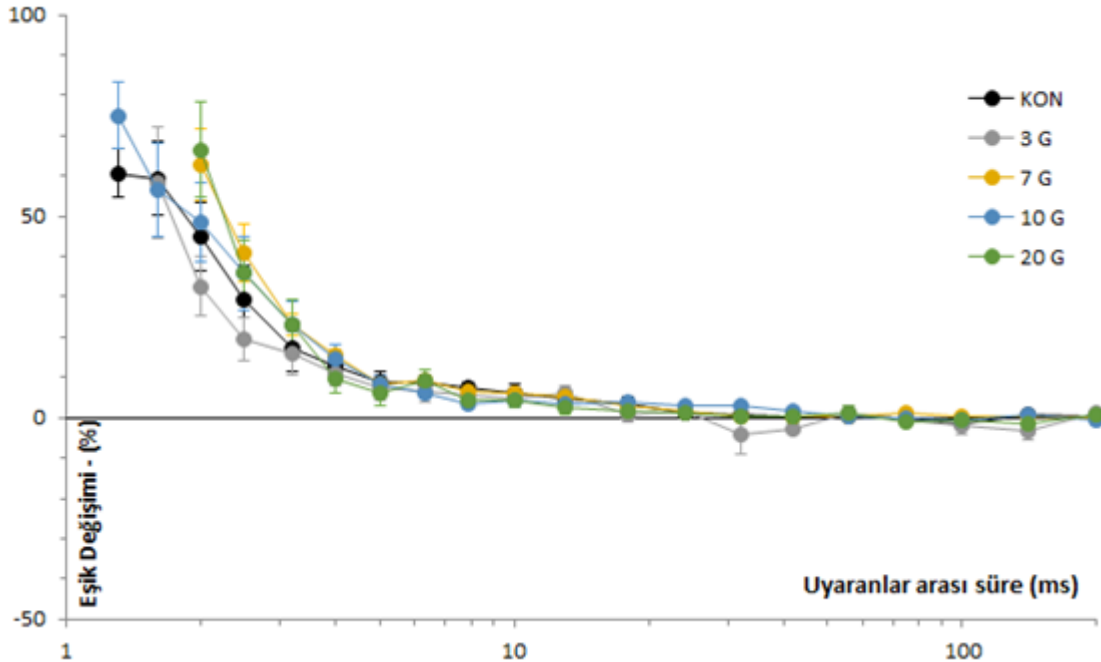
	KON	3 G	7 G	10 G	20 G
Dinlenim I/V eğimi (N=6, 3, 4, 4, 9)	7,24±2,17	5,04±1,69	63,91±30,47	30,48±16,06	7,22±5,17
Minimum I/V eğimi (N=9, 8, 8, 9, 9)	1,17±0,19	0,79±0,09 [#]	2,78±0,48 [*]	0,98±0,25 [#]	0,56±0,18 [#]

4.5. Toparlanma Döngüsü

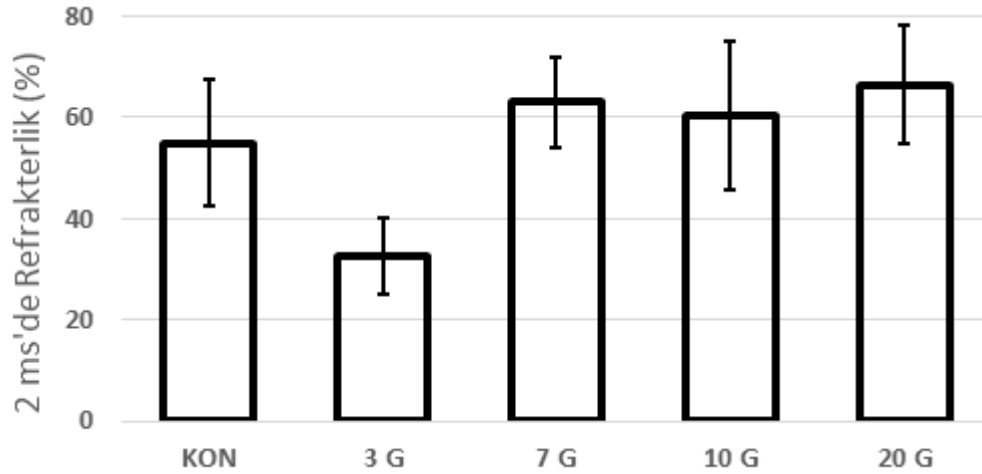
Kontrol grubundan bir deneğe ait toparlanma döngüsü eğrisi, örnek olarak Şekil 4.13'te verilmiştir. Her bir grup için elde edilen toparlanma döngüsü eğrileri Şekil 4.14'da, 2 ms'deki ortalama refrakterlik değerleri Şekil 4.15'de ve bu alt-protokole ait diğer parametreler Tablo 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.13. Kontrol grubundan bir deneğe ait toparlanma döngüsü eğrisi.



Şekil 4.14. Her bir grup için elde edilen ortalama (sırasıyla grupların N=11, 6, 8, 10, 11) % eşik değişimi standart hatalar ile çizdirilmiş toparlanma döngüsü eğrileri.



Şekil 4.15. Gruplara ait 2 ms'de refrakterlik değerleri ortalamaları (sırasıyla grupların N=10, 5, 3, 8, 5) ve standart hataları.

Tablo 4.3. Toparlanma döngüsüne ait diğer parametrelerin grup ortalamaları±standart hata şeklinde verilmiştir. #: 7G grubundan anlamlı farklılığı ifade eder. #, 7G grubundan farklılığı göstermektedir (p<0,05).

	KON	3 G	7 G	10 G	20 G
Süperuyarılabirlik (%) (N=9, 7, 5, 6, 9)	-1,81±0,64	-3,19±0,93 [#]	-0,51±0,23	-1,14±0,5	-3,16±1,01
Subuyarılabirlik (%) (N=10, 8, 8, 10, 10)	3,68±0,93	2,59±0,99	3,01±0,64	3,95±0,81	3,19±0,94
2.5ms'de Refrakterlik (%) (N=10, 5, 5, 8, 6)	29,14±8,62	19,37±5,32	41,1±7,11	35,83±9,04	54,78±19,95
7 ms'de Süperuyarılabirlik (%) (N=11, 7, 7, 10, 9)	8,04±1,62	5,93±1,69	7,91±0,65	4,84±1,24	6,49±2,39
5 ms'de Süperuyarılabirlik (%) (N=11, 7, 6, 10, 7)	8,9±2,79	7,44±3,1	8,36±1,12	8,5±1,96	6,28±3,3



5. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte daha çok bireyde görülen bir çok kalıtsal demiyelinizan hastalık (multiple skleroz, amiyotrofik lateral skleroz, Guillain-Barre sendromu, Charcot-Marie-Tooth Hastalığı) olduğu gibi, başka kronik hastalıkların (nefropatiler, diyabet vb.) sekonderi olarak da ortaya çıkabilen periferik demiyelinizasyon, stres, kötü içerikli beslenme, meslek sebebiyle maruz kalınan çeşitli kimyasallar sebebiyle de tersinir şekilde oluşabilmektedir. Akson zarında bulunan iyon kanallarını etkilediği bilinen demiyelinizasyonun oluşma sürecini araştırmak için hayvanlar üzerinde çeşitli modeller kullanılmaktadır. LPC'nin epinöryum içerisine mikroenjeksiyonunun lokal (enjeksiyon bölgesi civarında 3-8 mm) demiyelinizasyona yol açtığı literatürde yer etmiştir (Blakemore ve Franklin, 2008). Bu model ile oluşturulan demiyelinizasyonun tersinir olduğu ve 2-3 hafta içerisinde demiyelinizasyonun başladığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Kızıltan, 1995). İyon kanal dağılımının yeniden ve yeniden düzenlendiği bu süreçleri takip edebilmek için, çalışmamızda LPC demiyelinizasyon modelini uyguladığımız hayvanların siyatik sinirlerinden uyarılabilirlik parametrelerini inceledik.

Aksonun uyarılabilirliği zarda dağılmış olan iyon kanal kinetikleri ile belirlenir. Son yıllarda kullanım kolaylığından dolayı non-invazif insan çalışmalarında tercih edilen eşik izleme yöntemi, kanallar hakkında detaylı bilgi vermesiyle dikkat çekmektedir. Çalışmamızda hayvan modeli kullandığımız için hem uyarının uyarım bölgesinden yayılması engellemek hem de tam olarak enjeksiyon bölgesini uyarabilmek için non-invazif uyarım yerine, izole sinirlerde çalışmayı tercih ettik. Bu amaçlar doğrultusunda, yapılan tez çalışmasında suction elektrotlu organ banyosu, eşik izleme sistemine entegre edilerek, anabilim dalımızdaki gelecek çalışmalara da hazırlık yapılmış oldu.

5.1. Uyarın-Yanıt İlişkisi

Maksimum BAP genliği bize siniri oluşturan liflerin işlevselliği hakkında bilgi verir. Siniri oluşturan tüm liflerin AP'lerinin bir araya gelerek oluşturduğu yanıt maksimum BAP genliği olarak elde edilir. Maksimum BAP genliğinin azalması, BAP'a katkı sağlayan liflerin bir kısmının hasar görmüş olduğunu gösterebilir. BAP'ı oluşturan tüm liflerde AP yanıtı ortaya çıksa da, demiyelinizasyon veya benzeri bir etkiyle, liflerin iletim hızları azaldığında, BAP altındaki alan aynı kalsa bile, BAP eğrisinde yayvanlaşma olabilir. Bu da maksimum BAP genliğinin azalmasına neden olabilir. Şekil 4.1'de 3G ve 7G gruplarında azalma, 10G ve 20G gruplarında ise kontrol değerine yaklaşma görülmektedir. Maksimum BAP genliğinde, 3G ve

7G gruplarında azalma görülmesi, istatistiksel olarak fark olmasa da, demiyelinizasyonun olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, 10G ve 20G gruplarında bu değer artarak kontrol grubu değerine yaklaşmış olması, remiyelinizasyonun en azından 10. günde başladığını düşündürmektedir.

Bu çalışmadaki uyarılabilirlik kayıtları için seçilmiş olan TRONDNF protokolü, hedef yanıtı, maksimum yanıtın %40'ı olarak tanımlar (Tuncer ve ark., 2017). Bir sinir demeti uyarıldığında ilk önce en hızlı olan lifler AP oluşturacağı için, BAP eğrisinin kabaca, pikten hemen önceki bölgesinde bu liflerin katkıları yer alır. Bu nedenle maksimum BAP'ın bu %40'lık diliminde görece hızlı ileten, büyük miyelinli liflerin katkısı daha çoktur (Kiernan ve ark., 2020). Bu hedef yanıtı oluşturmak için gereken uyaran şiddetinin artması, en hızlı ileten lif gruplarının daha zor uyarıldığı, diğer bir deyişle bu grupları oluşturan liflerin uyarılabilirliklerinin azaldığı anlamına gelir (Tuncer ve ark., 2017). Şekil 4.2'de 3G ve 7G için bu değer anlamlı olarak artmış olması demiyelinizasyonun 3. günde başladığına ve 7. günde devam etmekte olduğuna yorumlanabilir. Aynı grafikte 10G ve 20G gruplarının 7G grubundan anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. Demiyelinizasyonun gerçekleştiği düşünülen 7G grubundan anlamlı farklılık, LPC mikroenjeksiyonu yapılan sinirde 10. günde remiyelinizasyonun başladığını düşündüren bir bulgudur. 20G grubunun da 7G'den farklı olması bu bulguyu desteklemektedir. Ek olarak 10G ve 20G grupları ile KON grubu arasında bu parametrede fark olmaması remiyelinizasyonun en hızlı lif gruplarında neredeyse kontrol düzeyinde AP oluşturduğunu düşündürmektedir. Maksimum BAP genliğinde anlamlı fark bulunmasa da, maksimum yanıtın %50'si için gereken uyaran şiddeti ile birlikte ele alındığında demiyelinizasyonun ve remiyelinizasyonun gerçekleştiği ve LPC mikroenjeksiyonu modelinin başarıyla uygulandığı kabaca görülmektedir.

5.2. Şiddet-Süre İlişkisi

Uyarılabilirliğin doğrudan göstergesi olan Reobaz ve SDTC özellikle nodal zar uyarılabilirliğinden etkilenir. Demiyelinizasyon, zar bünyesindeki iyon kanallarının dağılımını değiştirdiği için (Kızıltan, 1995), bu çalışmanın bulgularında, bu iki parametrede özellikle farklılık görülmesi beklenmiştir. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere 3G ve 7G grupları KON grubuna göre anlamlı düzeyde artmıştır. Nodal Na⁺ kanallarının işlevinin azalması reobazın artmasına yani uyarılabilirliğin azalmasına yol açar (Moldovan ve ark., 2009; Tuncer ve ark., 2017). Miyelin kılıfın yıkılmasıyla daha önceden nod olan bölgelerdeki Na⁺ kanallarının zar boyunca yayılımı varsayılırsa, birim alan başına Na⁺ kanal sayısı azalmış olabileceğinden, AP

oluşturmak için yeterli eşik değerini geçecek kadar akım oluşturmak daha zor olacaktır. Yani uyarılabilirlik demiyelinizasyonla azalmış olacaktır. Aynı grafikte reobaz değerinin 10G grubunda 7G'ye göre anlamlı azaldığı görülmektedir. Bu bulgu, yukarıdaki yorumların devamında, remiyelinizasyonun başlayarak, Na⁺ kanallarının yeni oluşan nodlarda yoğunlaşmaya başladığı anlamına gelebilir. 20G grubunda 7G grubuna göre reobazda düşme olsa da anlamlı fark bulunmamıştır.

Şekil 4.5 incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmamakla beraber 3G ve 7G gruplarında görülen nispeten SDTC azalması da uyarılabilirliğin azaldığını göstermektedir. Şekil 4.6'da her bir grubun SDTC ortalamasına bakıldığında, 3G grup ortalamasının diğer grupların oluşturduğu buluttan net bir şekilde ayrıştığı görülmektedir. Akut demiyelinizasyonun SDTC'yi artırdığı literatürde görülmüştür (Kaji, 2003). Daha önceki çalışmalarda SDTC'de azalmanın, nodal Na⁺ kanal konsantrasyonundaki azalmadan kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Krishnan ve Kiernan, 2005; Misawa ve ark., 2005). Özellikle Şekil 4.6'daki ayrışma demiyelinizasyonun 3 günde maksimum seviyeye ulaşmış olabileceği anlamına gelir. Literatüre göre de LPC mikroenjeksiyonu ile 3 günde demiyelinizasyon tamamlanır (Kızıltan, 1995). Zar direnci ve zar sığası gibi pasif zar özelliklerindeki değişimler, SDTC'yi doğrudan etkiler (Tuncer ve ark., 2017). Miyelin kılıfın yıkımı, lifin zar sığasını yükselttiği için, SDTC'de azalmaya yol açması beklenen bir sonuçtur. SDTC'nin 7G ve 10G gruplarında adım adım artarak KON grubuna yaklaşması, remiyelinizasyonun bu günlerde bir dalga şeklinde oluştuğunu düşündürmektedir. Bu yorumlar bizim beklentimizi desteklemektedir.

Uyaran yükü-süresi (Şekil 4.7) değerleri üzerine oturtulan doğrunun eğimi ile bu doğrunun zaman eksenini kestiği nokta sırasıyla reobazı ve SDTC'yi verir. Grafikteki eğilim çizgilerine bakıldığında yine 3G ve 7G gruplarının, diğer gruplardan ayrıştığı görülür. Bu durum önceki yorumlarla örtüşmektedir.

5.3. Eşik Elektrotonus

Eşik elektrotonus verileri incelendiğinde, grupların birbirinden açıkça ayrıştığı görülmemektedir. Depolarize edici koşullama uyarınının yanıtında, hızlı, neredeyse ani eşikte azalma, takiben internod depolarize olduğu için 10-20 ms'yi aşkın daha da düşüş olur. Eşik azalması bir pik yapar ve daha sonra uyum olarak bilinen süreçte kontrol değerine dönmeye başlar. Uyuma neden olan nodal ve internodal yavaş K⁺ kanallarıdır (Baker ve ark., 1987; Trevillion ve ark., 2007). Şekil 4.9'a bakıldığında, Ted40(uyum) parametresinde, 3G grubunun

ayrışması, demiyelinizasyon sonucu bozulan K^+ kanal dağılımındaki değişimle ilişkilendirilebilir. Ancak eşik elektrotonusun diğer parametreleriyle birlikte yorumlayarak bir sonuç çıkarmak, standart hataların içiçe geçmesi nedeniyle mümkün olmamıştır.

Segmental demiyelinizasyonun kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropatili ve Kennedy hastalığına sahip bireylerde (Cappelen-Smith ve ark., 2002; Sung ve ark., 2004; Vucic ve Kiernan, 2007) eşik elektrotonus eğrisinde fanning-out olarak da isimlendirilen bir saçılmaya neden olduğu literatürde mevcuttur (Kiernan ve ark., 2020). Bu saçılmanın sayısal olarak gözlenebileceği parametreler (hedef %40 için) grafikteki sırayla TEd(10-20 ms), TEd(40-60 ms), TEd(pik), TEd(90-100 ms), TEd(undershoot), TEh(10-20 ms), TEh(20-40 ms), TEh(90-100 ms), TEh(overshoot)'tur. Tablo 4.1'e bakıldığında, bu parametrelerin grup ortalamalarının hemen hemen hepsinde KON grubundan 20G grubuna gidildikçe fanning-out benzeri değişim gözlenmektedir. TEd(10-20 ms), TEd(40-60 ms), TEd(pik), TEd(90-100 ms) değerlerinde 20G grubunun KON grubundan anlamlı fark ile açıldığı gözlenmektedir. Aynı değişim ve fark TEd20(pik) parametresinde de bulunmaktadır. Ancak; TEd(undershoot)'ta grup ortalamaları yakın seyretmektedir. S2(uyum) parametresinde göze çarpan bir değişim görülmezken, uyum yarı zamanı'nda benzer eğilim olup, 20G grubu KON grubundan anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Eşik elektrotonus eğrisinin depolarizasyon kısmındaki S1 bölgesinde (TEd(10-20 ms)) artış olması hızlı K^+ kanal aktivitesinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Kaji, 2003). TEd(undershoot) dışındaki depolarize edici EE bölgesindeki bu değişim, hızlı ve yavaş K^+ kanal akımlarının azalması nedeniyle zar uyarılabilirliğinin azaldığını ifade edebilir (Krishnan ve Kiernan, 2005; Misawa ve ark., 2005). TEd(undershoot) sırasında yavaş K^+ kanalları kapanır. Bu bölgede değişim olmaması önceki yorumlarımızla uyumlu değildir.

Tablo 4.1'ten eşik elektrotonus eğrisinin hiperpolarizasyon bölgesine baktığımızda, TEh(10-20 ms), TEh(20-40 ms), TEh(90-100 ms) parametrelerinin de KON grubundan 20G grubuna doğru fanning-out davranışı sergilediği, ancak anlamlı fark oluşturmadığı görülmektedir. İstatistiksel olarak farklı olmasa da burada da görülen fanning-out değişimi literatürdeki demiyelinizasyon-eşik izleme çalışmalarının sonuçları ile uyumludur (Kaji, 2003). Şekil 4.10'daki TEh(overshoot) parametresinde bu açılma hafif seyretmekle beraber, 10G grubunun KON grubundan anlamlı artış gösterdiği görülmektedir. Bu kısmı oluşturan etki yavaş K^+ kanallarının aktive olmasıdır. 10G grubundaki anlamlı artış bu aktivasyonun gecikmesine bağlanabilir. 20G grubunda TEh(overshoot) değerinin KON grubuna yaklaşmış

olması, yavaş K^+ kanallarındaki bu davranışın değişmesinden kaynaklı olabilir. Literatürde TEh(overshoot) parametresi TEh(eğim 101-140 ms) ile birlikte yorumlanmaktadır (Lai ve ark., 2015). Bizim bulgularımıza göre, TEh(eğim 101-140 ms) parametresinde gruplar arasında bir değişim trendi görülmemesi, önceki yorumlarımızı desteklememektedir.

5.4. Akım-Eşik Değişimi

Akım-eşik ilişkisi alt-protokolü ile elde ettiğimiz parametreler hiperpolarize I/V eğimi (Şekil 4.12), dinlenim I/V eğimi ve minimum I/V eğimidir (Tablo 4.2). Hiperpolarize I/V eğimi parametresinde KON, 3G, 10G ve 20G gruplarının ortalamaları çok yakın iken, 7G grubunun ortalaması KON grubundan anlamlı düzeyde artmıştır. Hiperpolarize I/V eğiminin artması, eğrinin dikleştiği anlamına gelir. I/V eğrisindeki hiperpolarize bölgenin dikleşmesi, yani sağa kayması zarın, hiperpolarize edici akıma uyum sağladığını gösterir. Literatürde bu durum içeri doğrultma akımının (I_H) artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Krishnan ve ark., 2009; Tuncer ve ark., 2017; Farra ve ark., 2011; Kiernan ve ark., 2020). TEh(90-100)'ün 7. günden itibaren azalması ve hiperpolarize edici I/V eğiminin 7. günden itibaren artması içeri doğrultucu kanalların işlevinde artma olduğunu göstermektedir (Bostock ve ark., 1998; Kiernan ve ark., 2000; Nodera ve Kaji, 2006; Pape, 1996).

Tablo 4.2'deki minimum I/V eğimi parametresinde 7G grubu KON ve 3G gruplarından anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Daha önceki çalışmalara göre bu artış, zarın içeri doğrultucu iletkenliğindeki artışla (Kiernan ve ark., 2000) ve internodal aksolomadaki yapısal değişikliklerle (Makker ve ark., 2021) ilişkilendirilmiştir. 10G ve 20G gruplarının 7G grubundan anlamlı şekilde azalmış olması, önceki yorumla tutarlı olarak, yapısal değişikliğin yenilenmesini yani remiyelinizasyonu çağrıştırmaktadır. Dinlenim I/V eğiminde grupların ortalamaları, minimum I/V eğimi ve hiperpolarize I/V eğimi parametrelerindeki değişime benzer değişim göstermiştir; ancak istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmamıştır. SDTC'nin 3G grubunda azalması ve dinlenim I/V eğiminin 7G grubunda anlamlı olmasa da artması birlikte değerlendirildiğinde, hem voltaj bağımlı Na^+ kanallarının hem de voltaj bağımlı K^+ kanallarının iletkenliklerinin arttığı anlamına gelmektedir (Moldovan ve ark., 2009).

5.5. Toparlanma Döngüsü

Gruplara ait toparlanma döngüsü eğrilerine (Şekil 4.14) bakıldığında mutlak refrakter döneme yaklaşıldıkça gruplar arasında ayrışma olduğu görülmektedir. Şekil 4.15'teki 2 ms'de refrakterlik parametresinde 3G grubunun KON grubuna göre azaldığı, 7G'den itibaren KON grubu ortalamasına yaklaştığı görülmektedir. Tablo 4.3'teki 2,5 ms'deki refrakterlik

parametresinde ise 3G grubu KON grubuna yakın iken, 7G, 10G ve 20G grupları ilk iki gruptan daha yüksek değerlerde seyretmektedir. Bu iki parametre, geçici Na⁺ kanallarının kademeli olarak inaktivasyondan çıktığı bağıl refrakter dönemi yansıtmaktadır. 2,5 ms'deki refrakterlik değerlerinin LPC uygulaması ardından uzaması, LPC maruziyetinin uyarılabilirliği azalttığını göstermektedir (Tuncer ve ark., 2017). Maurer ve arkadaşlarının çalışmasından yola çıkarak, 7G, 10G ve 20G gruplarındaki hayvanlarda nodal Na⁺ kanallarının inaktivasyondan çıkması daha uzun zaman alır; yani bu kanalların inaktivasyon kinetikleri düşüktür (Maurer ve ark., 2007). Ancak bu 3 günde değil daha sonrasında gerçekleşen demiyelinizasyona yorulabilir. Literatürde de akut demiyelinizasyonun bağıl refrakter dönemi uzattığı kaydedilmiştir (Kaji, 2003). 2 ms'deki refrakterlik ve subuyarılabilirlik (Tablo 4.3) parametrelerinin 2,5 ms'deki refrakterlik parametresindeki değişimi desteklememektedir.

Miyelinli liflerde hızlı K⁺ kanalları juxta-paranodal bölgede bulunduğu için, etkileri çok görülemez. Ancak miyelinizasyon bozulduğunda bu kanallardan geçen akım etkili olmaya başlar. Zar uyarılabilirliğinin düşmesi bu kanalların kapanma olasılığını artırarak, süperuyarılabilirliği artırır (Kiernan ve ark., 2020). Bizim bulgularımızda süperuyarılabilirlik ile 5 ve 7 ms'deki süperuyarılabilirlik değerlerinde gruplar arasında istikrarlı bir değişim gözlenmemiştir. Süperuyarılabilirlik'te 3G grubunun 7G'den istatistiksel olarak farklılık göstermesi, toparlanma döngüsü alt-protokolü ile elde edilen diğer verilerdeki durum gözönünde bulundurulduğunda, bir anlam ifade etmemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile, LPC mikroenjeksiyonu yapılarak oluşturulan model aracılığıyla, sinir liflerindeki demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerine dair uyarılabilirlik parametrelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu bakış açısı ile kapsamlı bir demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon haritası çıkarmak hedeflenmiştir.

Kosins ve arkadaşları sıçan siyatik epinöryumuna demiyelinizan bir ajan olan anti-galaktosilseramid enjekte ederek yaptıkları çalışmada, 3. günde demiyelinizasyonun bariz olduğunu, 7. günde ise maksimum düzeyde gözlendiğini; remiyelinizasyonun ise 14. günde maksimum olduğunu belirtmişlerdir. Mikroenjeksiyonun yapıldığı siyatik sinirin uyardığı ayak parmaklarında, enjeksiyon ile aynı gün içerisinde güçsüzlük tespit etmişlerdir. Bunun sebebi sıçanların kalça bölgelerindeki kesiden kaynaklı ağrı da olabilir. Ancak bu durumun 6. günde iyileştiğini, 14. günde ise tüm semptomların kaybolduğunu belirtmişlerdir. Farklı görüntüleme yöntemleri ve histokimya analizleri ile 7. günde ince miyelin kılıflar gözlemişler; 14. günde ise bir çok sinir lifinde remiyelinizasyon oluştuğunu görmüşlerdir. Deneyler 14. günde tamamlanmıştır. Yaptıkları analizler sonucunda remiyelinizasyon ile oluşan miyelin kılıfların, demiyelinizasyon modelinin uygulanmadığı sinirlerdeki liflerin miyelin kalınlığına ulaşmadığını bulmuşlardır (Kosins ve ark., 2009). LPC demiyelinizasyon modelinin kullanıldığı farklı çalışmalarda da remiyelinizasyon ile başlangıçtaki miyelin kılıf kalınlığına ulaşılmadığı (Blakemore ve Franklin, 2008; Zhou ve Notterpek, 2016; Powers ve ark., 2013| Schroder, 1972), remiyelinli internodların daha düzensiz ve kısa olduğu bulunmuştur (Blakemore ve Franklin, 2008; Griffin ve Thompson, 2008). Demiyelinizasyonun ilk önce paranodu etkilediği, sonrasında internodlara doğru geliştiği bilinir (Berger ve Gupta, 2006).

Siyatik sinir içerisinde hem motor hem de duyuşal lifler bulunmaktadır. Bazı çalışmalar motor ve duyuşal lifler arasında TE'deki S3 fazı (Kaji, 2003), SDTC (Bostock ve Rothwell, 1997) gibi farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak literatürde bu iki lif grubunu da içeren sinirler üzerinde yapılmış elektrofizyolojik çalışmalar da vardır (Tuncer ve ark., 2017). Kiernan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada farklı liflerde toparlanma döngüsünde farklılık gözlememişlerdir (Kiernan ve ark., 1996).

Yaptığımız çalışmada hayvan sayısını artırmak bir çok parametrede standart hatanın azalmasını sağlayabilirdi. Ancak teknik sıkıntılar nedeniyle hayvan sayısı artırılmamıştır. Bu çalışma ile elde ettiğimiz bir çok uyarılabilirlik bulgusu öncelikle LPC modelinin başarıyla

uygulandığını göstermektedir. Özellikle uyarı-yanıt ilişkisi, şiddet-süre ilişkisi ve eşik elektrotonus alt-protokolleri ile elde ettiğimiz bulgulardaki 3G ve 7G gruplarının farklı parametrelerde demiyelinizasyonu doğrular sonuçlar vermesi literatürdeki eşlenikleriyle uyumludur. Toparlanma döngüsü ve I/V değişimi alt-protokollerine ait bulguların, diğerleriyle uyumlu sonuçlar vermemesinin, hem demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerinin bir dalga demeti benzeri gelişim göstermesinden, hem de farklı lif türlerinin ayrıştırılmamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü, farklı lif gruplarının demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon başlangıçlarının farklı günlerde olduğunu ve farklı sürelerde tamamlandığını düşünmekteyiz. Yukarıdaki yorumlara ek olarak, genel olarak bulgularımız, demiyelinizasyon süreci ile iyon kanal konsantrasyonunun değişmesinin ve remiyelinizasyon ile iyon kanal konsantrasyonunun yeniden toparlanmasının farklı aksonal bölgelerde farklı zamanlarda gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Literatürde eşik izleme ve izole sinir yöntemlerinin ayrı ayrı kullanıldığı, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonu araştırmış olan çalışmalarda genellikle 3., 7. ve 14. günler incelenmiştir. Eşik izleme yöntemi kullanılarak izole sinirden kayıt alınan bu çalışmamızın benzeri olmadığından; 3., 7., 10. ve 20. günlerden oluşan planın uyarılabilirlik parametreleri açısından yeteri kadar hassas olmayacağı tahmin edilememiştir. Hem bu nedenle hem de izole sinirden kayıt alınması bir denek için bir kez mümkün olduğundan ve deney çalışmalarında yerel etik kurulu tarafından hayvan sayısı kısıtlamaları olması sebepleriyle, çalışma bu şekilde planlanmıştır. İlerleyen çalışmalarımızda 3., 7., 10. ve 20. günler yerine daha sıkı takip yapılabilecek bir plan oluşturarak, gözlem çözünürlüğünü artırmayı düşünüyoruz.

Bu çalışma ile anabilim dalımızda ilk defa mikroenjeksiyon yöntemi kullanılarak çalışma grubumuza yeni bir yetenek kazandırılmış olup; demiyelinizasyon-remiyelinizasyon sürecinin incelenmesi için eşik izleme yönteminden izole sinir kaydı alınması ile de yerel ve uluslararası literatüre katkı sağlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Agamanolis, D. P. (Updated: February, 2011). *Neuropathology*. Retrieved from [http://www.neuropathologyweb.org/chapter12/ chapter12 Neuropathy.html](http://www.neuropathologyweb.org/chapter12/chapter12%20Neuropathy.html).
- Baker, M., Bostock, H., Grafe, P., & Martius, P. (1987). Function and distribution of three types of rectifying channel in rat spinal root myelinated axons. *J Physiol*, pp. 383:45-67.
- Barrett, E., & Barrett, J. (1982). Intracellular recording from vertebrate myelinated axons: mechanism of the depolarizing afterpotential. *J. Physiol*, 323:117-144.
- Beckstein, O., Biggin, P., Bond, P., Bright, J., Domene , C., Grottesi, A., Sansom, M. (2003). Ion channel gating: insights via molecular simulations. *Fed Eur Biochem Soc Lett.*, 555:85-90.
- Bostock, H. (1983). The strength-duration relationship for excitation of myelinated nerve: computed dependence on membrane parameters. *J Physiol*, 341:59-74.
- Bostock, H., Cikurel, K., & Burke, D. (1998). Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve*, 21, 137–158.
- Bostock, H., Lin, C. S., Howells, J., Trevillion, L., Jankelowitz, S., & Burke, D. (2005). After-effects of near-threshold stimulation in single human motor axons. *J Physiol*, 40, 564:931.
- Brismar, T., & Schwarz, J. (1985). Potassium permeability in rat myelinated nerve fibres. *Acta Physiol Scand*, 124(2):141-8.
- Britannica. (2023). Retrieved Mayıs, from <https://www.britannica.com/science/cell-membrane>
- Burke, D., Kiernan , M., & Bostock, H. (2001). Excitability of human axons. *Clin Neurophysiol*, 112(9):1575-85.
- Cappelen-Smith, C., Kuwabara, S., Lin, C. S., & Burke, D. (2002). Abnormalities of axonal excitability are not generalized in early multifocal motor neuropathy. *Muscle Nerve*, p. 26:769.
- Clay, J. (2003). On the persistent sodium current in squid giant axons. *J Neurophysiol*, 89:640-644.
- Corfas, G., Velardez, M., Ko, C., Ratner, N., & Peles, E. (2004). Mechanisms and roles of axon-schwann cell interactions. *J Neurosci.*, 24:9250–60.
- Dalkilic, N., & Pehlivan, F. (2002). Correction procedure for the volume conductor effect in the compound action potential recorded from isolated nerve trunk. *Int J Neurosci*, 112:1013–1026.
- Dalkılıç, N. (1993). *Kurbağa siyatik sinirinde bileşik aksiyon potansiyeli'nin gözlenmesi ve aksiyon potansiyeli biçiminin türev ve integral analizi*. Ankara: A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Devaux, J., Kleopa, K., Cooper, E., & Scherer, S. (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *J Neurosci*, 24:1236–44.
- Ferreira, H. G., & Marshall, M. W. (1985). *The biophysical basis of excitability*. (5-194 ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Geddes, L. (2004). Accuracy limitations of chronaxie values. *IEEE Trans Biomed Eng*, 51:176-181.
- George, A., & Bostok, H. (2007, 36). Multiple measures of axonal excitability in peripheral sensory nerves: An in vivo rat model. *Muscle Nerve*, pp. 628-636.
- Guo, D., Ramu, Y., Klem, A., & Lu, Z. (2003). Mechanisim of rectification in inward-rectifer K⁺ channels. *J Gen Physiol*, 121:261-75.
- Gutman, G., Chandy, K., Adelman, J., Aiyar, J., Bayliss, D., Clapham, D., Wymore, R. (2003). Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*, 55:583–6.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2001). *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes* (3. baskı ed.). Sunderland: Sinauer Associates.
- Hodgkin, A. L., & Rushton, W. A. (1946). The Electrical Constants of a Crustacean Nerve Fibre. *Proc R Soc Med*, pp. 134(873):444-79.
- Hodgkin, A., & Huxley, A. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4):500-44.

- Hodgkin, A., & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol*, 108:37–77.
- Homeworklib. (2023). Retrieved Mayıs, from https://www.homeworklib.com/images/viewer?src=//img.homeworklib.com/questions/147527d0-de60-11ea-8b10-43996f251303.png?x-oss-process=image/resize,w_560/format,webp
- Kaji, R. (2003). Physiology of conduction block in multifocal motor neuropathy and other demyelinating neuropathies. *Muscle Nerve*, 27:285–96.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2014). Propagated signaling: the action potential. In *Principles of Neural Science*. McGraw Hill.
- Kiernan, M. C., Bostock, H., Park, S. B., Kaji, R., Krarup, C., Krishnan, A. V., Burke, D. (2020). Measurement of axonal excitability: Consensus guidelines. *Clin Neurophysiol*, pp. 131(1):308-323.
- Kızıltan, E. (1995). *Yapay demiyelinizasyonun aksiyon potansiyeli üzerine etkisinin gözlenmesi ve sayısal analiz yöntemleri ile yorumlanması*. Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Kubo, Y., Adelman, J., Clapham, D., Jan, L., Karschin, A., Seino, S., & Vandenberg, C. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57:509–26.
- Kuwabara, S., Kanai, K., Sung, J.-Y., Ogawara, K., Hattori, T., Burke, D., & Bostock, H. (2002). Axonal hyperpolarization associated with acute hypokalemia: multiple excitability measurements as indicators of the membrane potential of human axons. *Muscle Nerve*, pp. 26(2):283-7.
- Lagrange, A. (2005). Retigabine: bending potassium channels to our will. *Epilepsy Curr*, 5:166–8.
- Lai, H.-J., Chiang, Y.-W., Yang, C.-C., Hsieh, S.-T., Chao, C.-C., Lee, M.-J., & Kuo, C.-C. (2015). The Temporal Profiles of Changes in Nerve Excitability Indices in Familial Amyloid Polyneuropathy. *PLoS One*, p. 3;10(11):e0141935.
- Lu, Z. (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol*, 66:103–29.
- Meisler, M., & Kearney, J. (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest*, 115:2010–2017.
- Mogyoros, I., Kiernan, M. C., Burke, D., & Bostock, H. (1998). Strength–duration properties of sensory and motor axons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 121(Pt 5), 851–9.
- Neher, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol*, 207:123-31.
- Neher, E., & Sakmann, B. (1992). The patch clamp technique. *Sci. Am.*, pp. 266(3)44-51.
- Nodera, H., Bostock, H., Kuwabara, S., Sakamoto, T., Asanuma, K., Jia-Ying, S., Kaji, R. (2004). Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain*, 127(Pt 1):203-11.
- Nodera, H., & Kaji, R. (2006). Nerve excitability testing and its clinical application to neuromuscular diseases. *Clin Neurophysiol*, 117:1902–1916.
- Ocana, M., Cendan, C., Cobos, E., Entrena, J., & Baeyens, J. (2004). Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *Eur J Pharmacol*, 500:203-19.
- Pehlivan, F. (1997). *Biyofizik*. Ankara: Hacettepe-Taş.
- Purves, D. (1997). *Neuroscience*. Sinauer Associates.
- Rasband, M. (2004). It's “juxta” potassium channel! *J Neurosci Res*, 76:749–57.
- Studyblue. (n.d.). studyblue. Retrieved Mayıs 2023, from <https://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-11-nervous-system-ii-divisions-of-the-nervous-system/deck/8819508>
- Stys, P., Ransom, B., & Waxman, S. (1991). Compound action potential of nerve recorded by suction electrode: a theoretical and experimental analysis. *Brain Res*, 12;546(1):18-32.
- Sung, J. Y., Kuwabara, S., Kaji, R., Ogawara, K., Mori, M., Kanai, K., Bostock, H. (2004). Threshold electrotonus in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: correlation with clinical profiles. *Muscle Nerve*, pp. 29(1):28-37.

- Taddese, A., & Bean, B. (2002). Subthreshold sodium current from rapidly inactivating sodium channels drives spontaneous firing of tuberomammillary neurons. *Neuron*. 2002; 33:587-600. *Neuron*, 33:587-600.
- Trevillion, L., Howells, J., & Burke, D. (2007). Outwardly rectifying deflections in threshold electrotonus due to K⁺ conductances. *J Physiol*, pp. 15;580(Pt. 2):685-96.
- Tuncer, S. (2008). *DeneySEL tip 1 diyabetin sıçan periferik sinirleri üzerine etkisinin numerik analiz yöntemleri ile incelenmesi*. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans tezi.
- Tuncer, S., Peker, T. T., Burat, İ., Kızıltan, E., İlhan, B., & Dalkılıç, N. (2017). Axonal excitability and conduction alterations caused by levobupivacaine in rat. *Acta Pharm*, pp. 1;67(3):293-307.
- Vasilescu, V., & Margineanu, D. G. (1982). Introduction to neurobiophysics. (13-142 ed.). *Kent: Abacus Press*.
- Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2007). Pathophysiologic insights into motor axonal function in Kennedy disease. *Neurology*, pp. 6;69(19):1828-35.
- Waxman, S., Cummins, T., Dib-Hajj, S., Fjell, J., & Black, J. (1999). Sodium channels, excitability of primary neurons, and the molecular basis of pain. *Muscle Nerve*, 22-1177-87.
- Wickenden, A., Yu, W., Zou, A., Jegla, T., & Wagoner, P. (2000). Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. *Mol Pharmacol*, 58:591-600.
- Zhang, Y., Zheng, Y., Zhang, Y. P., Shields, L. B., Hu, X., Yu, P., . . . Shields, C. B. (2010). Enhanced adenoviral gene delivery to motor and dorsal root ganglion neurons following injection into demyelinated peripheral nerves. *J Neurosci Res*, pp. 15;88(11):2374-84.



8. EKLER

EK 1 Etik Kurul Onayı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2017 – 004

Karar Tarihi: 10.01.2017

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyofizik A.D.'den Prof.Dr.Nizamettin DALKILIÇ, Arş.Gör.İlksen BURAT ve Öğr.Gör.Dr.Seçkin TUNCER tarafından sunulan "**Deneysel Demiyelinizasyon Sürecinin Periferik Sinirlerin Hız ve Uyarılabilirliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı tez projesi 9 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede 5 grupta toplam 60 adet sıçan kullanılacağı ve sıçanların anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**Uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Selim KUTLU
Başkan

Prof. Dr. Lema TAVLI
Üye

Prof. Dr. Ayşe Saide
ŞAHİN
Üye

Prof. Dr. Mehmet GÜL
Üye-Katılmadı

Doç. Dr. Ercan KURAR
Üye

Doç. Dr. Tefrik
KÜÇÜKARTALLAR
Üye-Katılmadı

Yrd. Doç. Dr. Hasan
Hüseyin KOZAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer
TANYELİ
Üye

Vet. Hek. Halil Aydın
ŞİMŞEK
Üye

Vet. Hek. Alpaslan ÖZKÜRKÇÜLER
Üye

Mustafa ŞİRİN
Üye

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>