T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSALİPLATİN VE SİSPLATİNİN SIÇAN PERİFERAL SİNİR UYARILABİLİRLİK VE İLETİM PARAMETRELERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ARAŞTIRILMASI

İlksen BURAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSALİPLATİN VE SİSPLATİNİN SIÇAN PERİFERAL SİNİR UYARILABİLİRLİK VE İLETİM PARAMETRELERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ARAŞTIRILMASI

İlksen BURAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11102056 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin danışmanlığını üstlenmişken emekli olan sayın Prof. Dr. İlhami Demirel'e, daha sonra danışmanlığımı üstlenen ve tezin her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Nizamettin Dalkılıç'a, çalışmalarım sırasında fikirleriyle ve yaptıklarıyla her aşamada yardımcı olan sayın Yard. Doç. Dr. Barkın İlhan'a ve sayın Öğr. Gör. Seçkin Tuncer'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca manevi desteğini esirgemeyen ailem Tevhide & Hüseyin Dinçer'e ve gösterdiği anlayış ve sabırdan dolayı Metehan Şenol'a teşekkür ederim.

İlksen Burat

Temmuz 2013

KONYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i

1.GİRİŞ 1

1.1 Hücre Zarı ve Organizasyonu 1

1.2. Hücre İçi-Dışı İyon Konsantrasyonları 2

1.3. Dinlenim Zar Potansiyeli 4

1.4. Aksiyon Potansiyeli ve İyonik Akımlar (İletkenlikler) 4

1.5. Sinir Hücresi ve Miyelinli Sinir 8

1.5.1 Boğum ve Boğumlar-arası Bölge 9

1.6. İyon Kanalları 10

1.6.1 Sodyum Kanalları 10

1.6.2 Potasyum Kanalları 11

1.7. Çevresel Sinirlerin Kablo Özelliği 12

1.8. Bileşik Aksiyon Potansiyeli 15

1.8.1. BAP Kayıt Yöntemleri 16

Ekstraselüler yöntem (izole sinirden veya yüzeyel) 16

1.8. 2. Suction Yöntemi 17

1.9. Sinir Uyarılabilirliğinin ve Kanal İşlevlerinin Belirlenmesi; Eşik Değer İzleme ("Threshold Tracking") Yöntemi 18

1.9.1. Eşik Elektrotonus (TE: "Threshold Electrotonus") 20

1.9.2. Şiddet-Süre Zaman Sabiti ("SDTC: Strength-Duration Time Constant") 21

1.9.3. Toparlanma Döngüsü ("RC: Recovery Cycle") 22

1.9.4. Akım-Eşik (Current-Threshold) İlişkisi 25

1.10. Kemoterapik Ajanlar: Oksaliplatin ve Sisplatin 27

1.11. Amaç 29

2. GEREÇ VE YÖNTEM 31

2.1. Deneyler 31

2.2. İzole Sinirden BAP Kayıt ("*Suction*") Yöntemi 32

2.2.1. Elektrofizyolojik Kayıt Düzeneği 32

2.2.2. Suction Yöntemiyle Kayıt Alınması 33

2.2.3. Suction Yöntemiyle Elde Edilen Parametreler 34

2.3. Eşik Değer İzleme Yöntemi 34

2.3.1. Eşik Değer İzleme Yönteminde Kullanılan Cihazlar 34

2.3.2. Eşik Değer İzleme Yöntemiyle Kayıt Alınması 36

2.3.3. Eşik Değer İzleme Yöntemi'yle Elde Edilen Parametreler Üzerinde Hesaplamalar 39

2.4. İstatistiksel Analizler 39

3. BULGULAR **40**
3.1. İzole Siyatik Sinir Bulguları 40
3.2.1. Eşik Değer İzleme bulguları 44
4. TARTIŞMA **51**
4.1 Oksaliplatinin ve Sisplatinin İzole Sinir BAP Parametreleri Üzerindeki Etkileri 51
4.2. Oksaliplatinin ve Sisplatinin Eşik Değer İzleme Yöntemi Parametreleri Üzerindeki Etkileri 54
4.2.1 Eşik Elektrotonus Eğrileri 54
4.2.2 Uyaran Yükü – Uyaran Süresi Eğrileri 55
4.2.3 Akım Şiddeti- Eşik Değer Azalması (I-V) Eğrileri 56
4.2.4 Toparlanma Döngüsü (“Recovery Cycle”) Eğrileri 56
4.3 Sonuç ve Öneriler 57
5.ÖZET **59**
6.SUMMARY **61**
7.KAYNAKLAR **63**
8.EKLER **66**
9. ÖZGEÇMİŞ **67**

SİMGELER VE KISALTMALAR

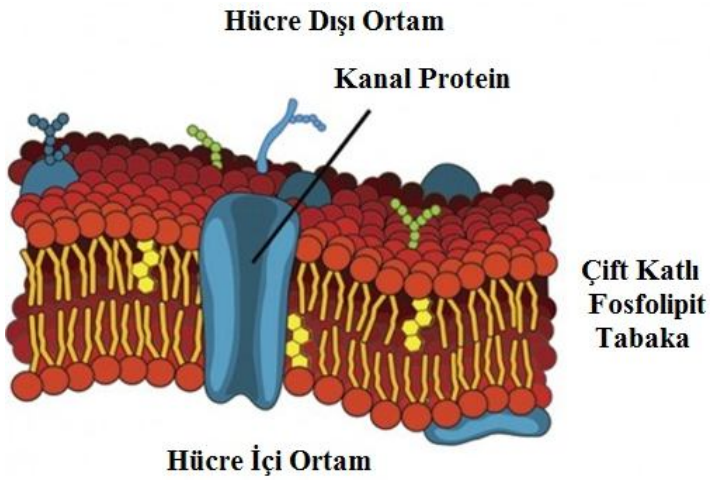
BAP	Bileşik aksiyon potansiyeli
mM	mikromolar
mV	milivolt
F_{dif}	Difüzyon kuvveti
F_{el}	Elektriksel kuvvet
E_i	i. iyonun denge potansiyeli
R	Genel gaz sabiti
T	Kelvin cinsinden sıcaklık
z_i	i. iyonun değerliliği
F	Faraday sabiti
$C_i^{dış}$	i. iyonun hücre dışı konsantrasyon değeri
C_i^{ic}	i. iyonun hücre içi konsantrasyon değeri
E_m	Dinlenim zar potansiyeli
P_i	i iyonunun geçirgenliği
AP	Aksiyon potansiyeli
g_i	i iyonunun iletkenliği
I_i	i iyonunun iyonik akımı
Q	Yük miktarı
τ	Zaman sabiti
R_m	Zar direnci
C_m	Zar kapasitansı
V_m	Zar potansiyeli
λ	Uzay sabiti
R_i	Aksoplazma direnci
BKAP	Bileşik kas aksiyon potansiyeli

BSAP	Bileşik sinir aksiyon potansiyeli
MRP	Mutlak refrakter dönem
BRP	Bağıl refrakter dönem
ISI	Inter stimulus interval (pulslar arası süre)
dap	Depolarize edici ard potansiyel
θ_{BAP}	BAP iletim hızı
θ_{MD}	Maksimum depolarizasyonun hızı
$t_{V_{MAK}}$	BAP türevinin maksimum değerine ulaşma süresi
EE	Eşik elektrotonus
EEd	Depolarize edici eşik elektrotonus
MD	Maksimum depolarizasyon

1.GİRİŞ

1.1 Hücre Zarı ve Organizasyonu

Canlıların temel yapı taşı olan hücre tüm canlılık işlevlerini tek başına yürütebilir. Canlının genel yapısına dahil olmadan sıvı ortamlarda hareket edebilen hücreler (eritrositler, spermler) var olduğu gibi, gruplar halinde ortaklaşa hareket edebilen ve böylece dokuları oluşturan hücreler de mevcuttur. Doku yapılarına giren hücreler, hücrelerarası sıvıdan sahip oldukları zarlar ile ayrılırlar. Hücre zarı adını alan bu zar yapısının temel görevleri hücre bütünlüğünün korunması, iç ortam özelliklerinin sabit kalması, hücrenin çevresi ile seçimli madde alışverişinin yapılması, hücre içerisinde ortaya çıkan artık ürünlerin dışarı atılması ve (uyarılabilen dokularda) biyoelektrik olayların gerçekleştirilmesidir. Biyoelektrik olayların gerçekleşip sürebilmesi için hücre zarı üzerinden madde ve enerji taşınması gerekmektedir; bu taşınma taneciklerin hareketleri vasıtasıyla olur. Hücre zarı üzerinden tanecik geçişlerinin önemli bir kısmı konsantrasyon gradyentlerinden kaynaklanır. Molekül ve iyon taneciklerinin yüksek konsantrasyon bölgelerinden düşük konsantrasyon bölgelerine doğru gerçekleşen net akışlarına *difüzyon* denir (Pehlivan 1997).



Şekil 1.1: Hücre zarı yapısı.

Temel yapıları lipit ve proteinlerden oluşan hücre zarlarının bir çok çeşidinde lipit içeriği proteinlere göre çok daha fazladır. Singer ve Nicholson 1972'de hücre zarı için *akışkan mozaik* modeli geliştirmişlerdir. Hücre zarlarının davranışları ile

ilgili birçok olayı açıklayabilen bu modele göre, proteinlerin lipit çift tabakasından oluşan zar üzerinde rastgele konumlarda bulunmaktadır. Lipit ve fosfolipit molekülleri kutupsal ve bu nedenle hidrofilik davranan bir baş bölgesi ile kutupsal olmayan ve bu nedenle hidrofobik davranan iki karbon kuyruğundan oluşur (Şekil 1.1). Lipit ve fosfolipitler sulu bir ortam içerisinde bulunduklarında su molekülleri tarafından dışlanıp uzaklaştırılırlar. Hücre zarlarının yapısını oluşturan bu lipit çift tabaka hücre içi ortamı dış ortamdan ayırır ve suda çözünmüş iyon ve moleküllerin geçişine engel olarak hücre bütünlüğünü korur. Biyoelektrik olayların meydana gelmesini sağlayan tanecik geçişleri ise lipit çift tabakasına entegre bir şekilde bağlanmış proteinlerin oluşturduğu kanallar üzerinden gerçekleşir (Pehlivan 1997).

1.2. Hücre İçi-Dışı İyon Konsantrasyonları

Hiç bir iyon hücrenin iki tarafında eşit olarak dağılmamıştır. Hücresel ortamda en çok karşılaşılan dört iyondan Na^+ ve Cl^- hücre dışında, K^+ ve organik anyonlar (A^-) ise hücre içerisinde daha fazladır. Dört iyon grubunun mürekkep balığı dev aksonundaki hücre içi ve hücrelerarası sıvıdaki konsantrasyonları Çizelge 1.1'de verilmiştir (Pehlivan 1997).

Çizelge 1.1: Mürekkep balığı dev aksonunda başlıca iyonların konsantrasyonları ve Nerst denge potansiyelleri (Pehlivan, 1997'den alınmıştır).

İyon	Hücre İçi (aksoplazma) sıvısı (mM)	Hücreler arası sıvı (mM)	Denge Potansiyeli (mV)
K^+	400	20	-75
Na^+	50	440	+55
Cl^-	52	560	-60
A^-	385	-	-

Herhangi i'ninci bir iyon, o iyonun konsantrasyon gradyentinin belirlediği bir difüzyon kuvveti (F_{dif}) ile zarın iki tarafı arasında oluşan elektriksel gradyentin belirlediği elektriksel kuvvetin (F_{el}) etkisinde kalır. Bu kuvvetlerin etkisinde i'ninci iyon hücre zarından geçişe zorlanır. Geçiş yönünü bu iki kuvvetin bileşke yönü belirler. Sonuçta net geçişin sıfır olduğu bir duruma ulaşılır ve i'ninci iyon için zarın

iki tarafındaki mol başına Gibbs serbest enerjileri eşitlenir. Bu durumda zarın iki tarafında oluşan potansiyel farkı i'ninci iyonun denge potansiyeli (E_i) olarak adlandırılır ve Nernst denklemi

$$E_i = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{[C_i^{dis}]}{[C_i^{iç}]} \qquad (1.1)$$

ile hesaplanır. Eşitlikte R; genel gaz sabitini, T; Kelvin cinsinden sıcaklığı, z_i: i'ninci iyonun değerliğini, F; Faraday sabitini, $C_i^{dış}$ ve $C_i^{iç}$ ise i'ninci iyonun sırasıyla hücrenin dışı ve içindeki konsantrasyon değerleridir (Ferreira ve Marshall 1985).

Çizelge 1.1 verileri eşitlik 1.1'de yerine yazılarak dört iyonun her biri için denge potansiyeli hesaplandığında, K^+ için -75mV, Na^+ için ise +55mV olarak elde edilir. Dinlenim durumundaki bir aksonda hücre içinin dışına göre potansiyeli (dinlenim zar potansiyeli, E_m) negatiftir ve 70 mV dolaylarındadır. Verilen değerlerden görüldüğü üzere K^+ denge potansiyeli zar potansiyeline yakın iken, Na^+ denge potansiyeli bu değerden oldukça uzaktır. Dolayısıyla Na^+ iyonları üzerinde içeriye doğru etki eden büyük bir elektrokimyasal potansiyel farkı (E_m-E_{Na}= -125 mV) olmasına rağmen, K^+ için bu fark yalnızca (dışarıya doğru) +5 mV'tur. Hücre zarının dinlenim durumundaki Na^+ geçirgenliği düşük olduğundan bu büyük sürdürücü kuvvete rağmen Na^+ iyon girişi sınırlıdır. Zarın K^+ geçirgenliği Na^+'na göre yaklaşık 100 kat daha büyük olmasından dolayı, K^+ iyonlarını dışarı sürükleyen elektrokimyasal potansiyel farkından kaynaklanan K^+ çıkışı, sınırlı düzeyde Na^+ girişini dengeler. Dinlenim durumunda, pasif kuvvetlerin neden olduğu bu süreçte, aktif Na^+-K^+ pompası tarafından, süreğen olarak Na^+ iyonları dışarı atılırken K^+ iyonlarının içeri alınması vasıtasıyla hücre içi-dışı kompozisyonun dinamik dengesi sağlanır (Dalkılıç 1993).

Sinir hücrelerindeki Cl^- kanalları kapısız olduğundan, Cl^- konsantrasyonu pasif kuvvetlerce belirlenir. Bu nedenle de Cl^- denge potansiyeli dinlenim zar potansiyeline oldukça yakındır (Çizelge 1.1) (Dalkılıç 1993).

1.3. Dinlenim Zar Potansiyeli

Seçici geçirgen bir hücre zarının içi ile dışı arasında farklı iyonların farklı konsantrasyonlarda olduğu bilinmektedir (Çizelge 1.1). İyonların bu konsantrasyon farkı hücre zarının iki tarafı arasında dinlenim zar potansiyeli (E_m) olarak adlandırılan bir potansiyel farkının oluşmasını sağlar. Dinlenim zar potansiyeli negatiftir ve

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]^{dis} + P_{Na}[Na^+]^{dis} + P_{Cl}[Cl^-]^{iç}}{P_K[K^+]^{iç} + P_{Na}[Na^+]^{iç} + P_{Cl}[Cl^-]^{dis}} \qquad (1.2)$$

Goldman-Hodgkin-Katz eşitliği ile verilir. Bu eşitlikten de görüldüğü gibi, zar potansiyeli, konsantrasyonları yüksek ve zarın iyi geçirgen olduğu iyon veya iyonların denge potansiyeli yakınlarında bulunmaktadır. Örneğin dinlenim durumunda mürekkep balığı dev aksonu için $P_K \div P_{Na} \div P_{Cl} = 1 \div 0{,}04 \div 0{,}45$ olduğundan $E_m \approx E_K \approx$ -70 mV'tur.

Zardan hücre içine ya da hücre dışına doğru net iyon geçişi olduğunda zarın iki tarafındaki yük farkı ve dolayısıyla zar polarizasyonu değişir. Zar polarizasyonunun dinlenim durumundan daha pozitif değerlere ulaşmasına *depolarizasyon*, dinlenim durumundaki değerine geri dönmesine *repolarizasyon*, dinlenim durumundan daha negatif değerlere ulaşmasına *hiperpolarizasyon* denilmektedir (Vasilescu ve Margineanu 1982, Pehlivan 1997).

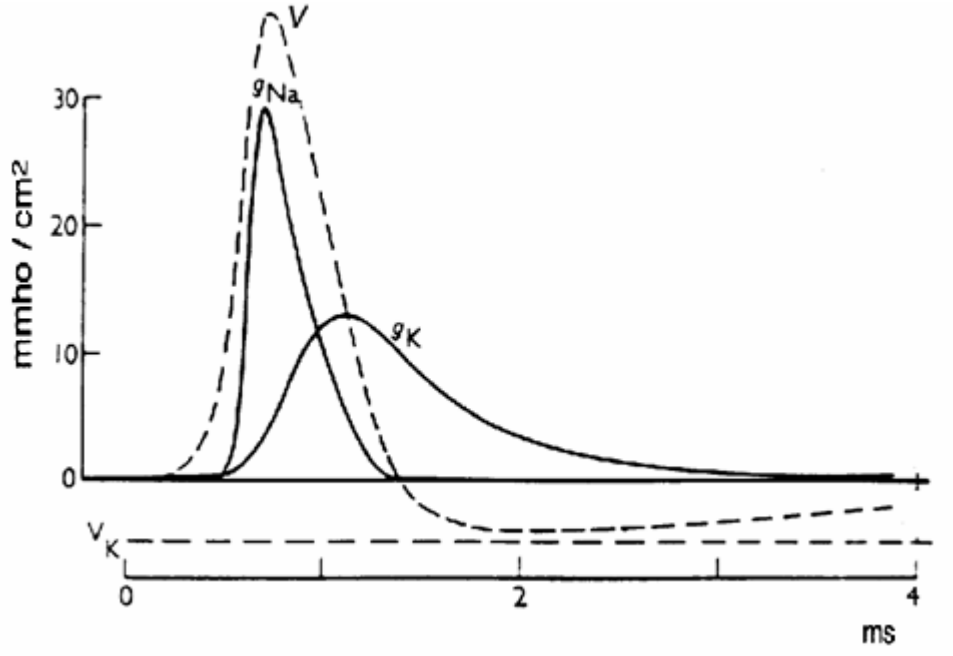
1.4. Aksiyon Potansiyeli ve İyonik Akımlar (İletkenlikler)

Uyarılabilir hücreler eşik altı düzeyde uygun bir uyaran ile uyarıldıklarında hücre zarının iyon geçirgenliklerinde ve dolayısıyla hücre içi iyon dağılımlarında değişimler olur. Na^+ girişi E_m' yi depolarizasyon yönünde değiştirirken, K^+ çıkışı repolarizasyon veya hiperpolarizasyon yönünde değiştirir. Uyaranın yeterli şiddette olması durumunda ise zar potansiyeli hızlı bir şekilde depolarizasyon yönünde

değişerek pozitif değerlere (+30 mV) ulaşır, daha sonra yeniden repolarizasyon yönünde değişerek hiperpolarize olup gecikmeli olarak dinlenim durumuna döner. Potansiyeldeki bu değişiklik belirli bir desene sahiptir ve aksiyon potansiyeli (AP) olarak adlandırılır. Aksiyon potansiyeli tüm canlılarda nöronal bilgi iletiminin temelini oluşturur. Tek bir nöron için AP deseni ve genliğinin, uyarabilir uyaran biçimi ve genliğinden bağımsız olması "hep ya da hiç yasası" olarak anılmaktadır.

Zarda depolarizasyon gelişirse önce voltaj bağımlı Na^+ kanalları açılır ve zar potansiyeli depolarizasyon yönünde değişir. Zar depolarizasyonu arttıkça açılan Na^+ kanal sayısı ve dolayısıyla iletkenliği artar; zar daha fazla depolarize olur, pozitif geri-beslemeli süreç eşitlik 1.2'de belirtildiği üzere zar potansiyelini Na^+ denge potansiyeline iyice yaklaştırır.

Hızlı depolarizasyonun ardından Na^+ kanalları kendiliğinden kapanırken, gecikmeli olarak açılan K^+ kanallarının sayısı da artmaya başlar. Na^+ kanallarına benzer şekilde K^+ kanalları da aktive olur, fakat K^+ kanallarının aktivasyonu ve inaktivasyonu daha yavaş işleyen bir süreçtir. K^+ kanallarının aktivasyonu ile hücre dışına K^+ çıkışı başlamasıyla zar yeniden repolarize olmaya başlar ve zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline yaklaşarak dinlenim değerine döner (Mountcastle 1968, Stein 1981, Ruch-Putton 1982, Schauf ve ark 1990, Sperelakis 1995).



Şekil 1.2: Nöronda aksiyon potansiyeli ve eşlik eden Na^+ ve K^+ kanallarına ait iletkenlik değişimleri (Waxman ve ark 1995).

Hodgkin ve Huxley (1952) geliştirdikleri voltaj kenetleme tekniği sayesinde, aksonal zarlarda oluşan zar akımlarının başlıca iki iyonik akımdan kaynaklandığını göstermişlerdir. Bu akımlar Na^+ ve K^+ iyonlarının oluşturduğu akımlarıdır. Zarın iyonik geçirgenliklerini iyonik iletkenlik katsayıları (g_{Na} ve g_K) olarak belirterek, iyonik akımları (I_{Na} ve I_K)

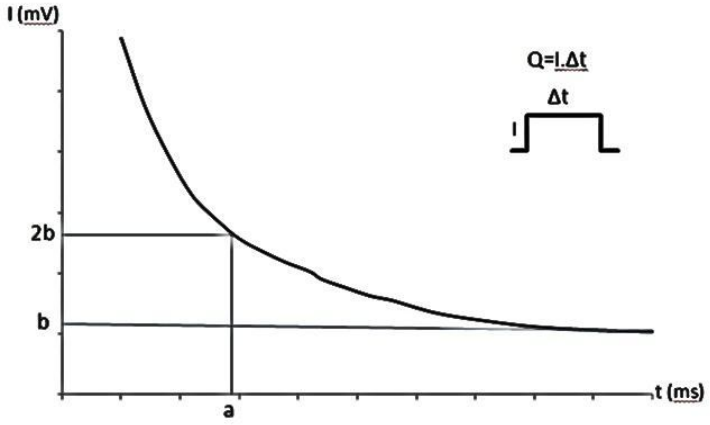
$$I_{Na}=g_{Na}(E_m-E_{Na}) \qquad (1.3)$$

$$I_K=g_K(E_m-E_K)$$

şeklinde tanımlamışlardır (Waxman ve ark 1995, Hodgkin ve Huxley 1952).

Bir nörona şiddeti zamanla artan bir uyaran verildiğinde, uyaranın artış hızı bir minimum değerin altına düşerse nöronun uyarılma eşiği yükselir ve AP oluşmaz. Hücrenin bu davranışına *uyum* denir. Bu nedenle bir hücreyi uyarmak için ideal uyaran olarak puls (kare dalga) uyaranı kullanılmaktadır. Her bir puls, şiddeti ($I_{eşik}$) ile uygulanma süresi (Δt) çarpılarak elde edilen bir yük miktarına (Q) sahiptir ($\Delta Q=I_{eşik}\cdot\Delta t$: Weiss Yasası). Yük miktarı sabit tutularak pulsun şiddeti ve uygulanma süresi değiştirilebilir. Böyle bir durumda şiddetin süre ile değişimi

grafiğine şiddet-süre eğrisi denir (Şekil 1.3). Aynı yük miktarına sahip fakat diğer özellikleri farklı olan pulslar da zarı uyarabilir, ancak pulsun uyarabilirliği sadece yük miktarı ile belirlenemez. Bir pulsun yük miktarı sabit tutulduğunda, belirli bir şiddetin altındaki pulslar uygulanma süresi ne kadar uzun olursa olsun hücreyi uyaramazlar. Bu minimum uyaran şiddetine *reobaz* denir. Benzer şekilde pulsun şiddeti ne kadar artırılırsa artırılsın, uygulama süresi belirli bir değerin altında olan pulslar da zarda uyartı oluşturamazlar. Reobazın iki katı şiddeti için gerekli uyaran süresine eşit olan bu değere ise *kronaksi* denilmektedir (Şekil 1.3). Kronaksi uyarılabilirliğin (excitability) bir ölçüsüdür ve kronaksisi düşük olan liflerin uyarılabilirliği yüksektir (Vasilescu ve Margineanu 1982, Pehlivan 1997).



Şekil 1.3: Uyarılabilir bir zar için şiddet-süre eğrisi; reobaz (b) ve kronaksi (a) değerleri.

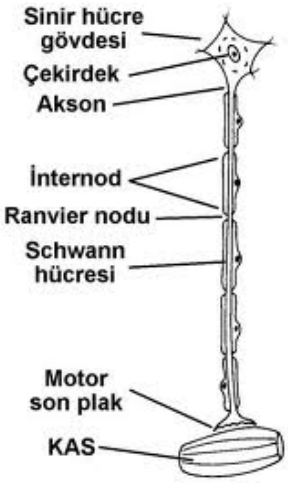
Zarın bir bölgesinde AP oluştuktan hemen sonra, zarın o bölgesinde Na^+ kanalları henüz açık durumda bulunduğu için şiddeti ve süresi ne olursa olsun, ikinci bir uyaran yeni bir AP oluşturamaz. Bu süreye *mutlak refrakter dönem* denir. Mutlak refrakter dönemin hemen ardından verilebilecek ikinci bir uyaran AP oluşturabilir, fakat gerekli şiddet normalden daha fazla olacaktır. Mutlak refrakter dönemden sonra, ikinci uyaranın verilmesi için geçen süre uzadıkça gerekli uyaran şiddeti adım adım düşerek dinlenim durumundaki eşik değere ulaşır. Mutlak refrakter dönem ile dinlenim eşiğine ulaşma arasındaki bu döneme *bağıl refrakter dönem* denir (Pehlivan 1997).

Zara eşik altı bir uyaran verildiğinde küçük genlikli, kısa sürede sönümlenen yerel bir depolarizasyon oluşur. Ancak bu yerel depolarizasyon sırasında

uyarılabilirlik artar. Birinci uyaranın oluşturduğu yerel depolarizasyon sönümlenmeden ikinci eşik altı uyaranın oluşturacağı yöresel depolarizasyonlar toplanarak uyarılabilirliği daha da artırır ve AP oluşturmak kolaylaşabilir. Bu durumun aksine, zarı hiperpolarize edici bir uyaranın hemen ardından depolarize edici bir uyaran uygulandığında ise gerekli eşik şiddeti daha da yükselir ve uyarılabilirlik azalmış olur. Uyarılabilirlikteki bu tür değişimler *elektrotonik değişimler* olarak adlandırılmaktadır (Pehlivan 1997).

1.5. Sinir Hücresi ve Miyelinli Sinir

Sinir sistemi, sinir hücreleri (nöronlar) ve glia hücrelerinden oluşur. Ancak bilgi iletimi sadece nöronlar tarafından sağlanır. Farklı tipleri bulunmakla birlikte, genel olarak bir nöron üç ana kısımdan oluşmaktadır: hücre çekirdeğini içerisinde barındıran gövde, akson (sinir lifi) ve dendritler (Şekil 1.4). İki sinir hücresinin bilgi alışverişi yaptığı bölgelere *sinaps* denir. Sinapsın bir tarafında bilgi veren hücrenin akson ucu, diğer tarafında bilgi alan hücrenin dendritleri yer alır. Nöronlar bilgiyi diğer nöronlardan ya da dış ortamdan bu şekilde dendritleri ile alırlar. Aldıkları bilgiyi geçici potansiyel değişimleri şeklinde aksonları boyunca taşırlar ve yine bir sinaps bölgesinden diğer hücrelere bu bilgiyi aktarırlar (Pehlivan 1997).

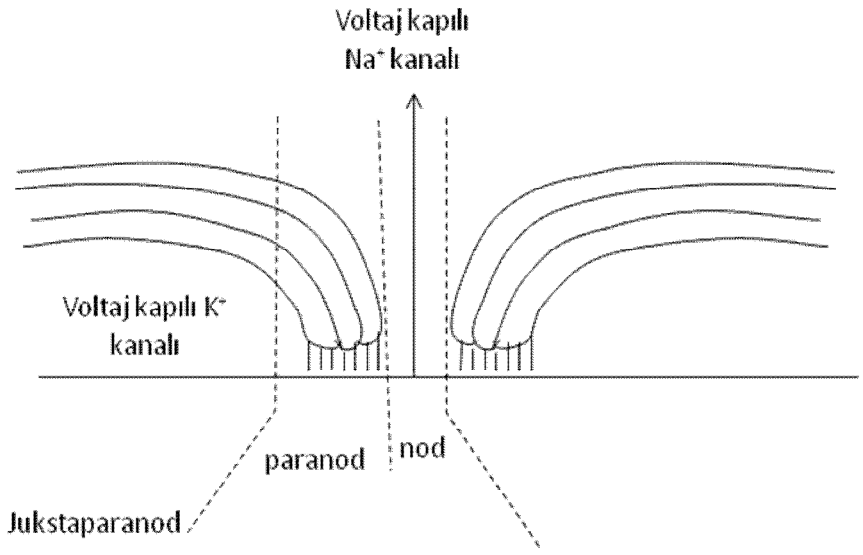


Şekil 1.4: Miyelinli bir sinir hücresi.

1.5.1 Boğum ve Boğumlar-arası Bölge

Miyelinli liflerde, miyelin kılıf miyelinizasyonun kesintiye uğradığı küçük açıklıklar hariç aksonun tümünü kaplar. Na^+ kanallarının yoğun olarak bulunduğu küçük açıklıklar *Ranvier Boğumu* (nod) olarak, miyelinli kısım ise *boğumlar-arası bölge* (internod) olarak adlandırılır (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6). Sinirsel uyartıların iletimi *sıçramalı* (saltatorik) karakterlidir ve aksonda bir boğumdan diğerine atlayarak gerçekleşir. İletim hızı ve distal latans gibi rutin sinir iletim çalışmaları ile elde edilmiş parametreler sıçramalı karakterdeki iletimin değerlendirilmesinde faydalı olsa da, tüm aksonun %99,9 unu oluşturan boğumlar arası bölgenin kendi içindeki işlevselliğinin açıklanması açısından yeterli değildir. Boğumlar-arası bölge dinlenim zar potansiyelinin sürdürülmesi ve hasarlı sinirlerin uyarılabilirliğinde önemli derecede etkilidir (Burke ve ark 2001).

Her bir boğumlar-arası bölge kendi içinde *paranod* ve *jukstaparanod* olarak ayrışır (Şekil 1.5). Paranod, miyelin tabakasının boğumun hemen yanında aksona sıkıca bağlantı yaptığı, jukstaparanod ise miyelin kılıfın altında kalan ve hızlı K^+ kanallarının bulunduğu alandır (Burke ve ark 2001).



Şekil 1.5: Miyelinli periferik bir sinirde Ranvier boğumu bölgesinin uzunlamasına kesitinin şematik gösterimi; şekil üzerinde boğum (nod), paranod ve jukstaparanod bölgeleri gösterilmiştir. Voltaj bağımlı Na^+ kanalları Ranvier boğumunda kümelenirken, voltaj bağımlı K^+ kanalları daha çok jukstaparanod bölgesinde yoğunlaşmıştır. Yavaş K^+ kanalları boğumsal bölgede ve jukstaparanod bölgesinde toplanmıştır.

1.6. İyon Kanalları

İyon kanalları lipit çift tabakasından oluşan zarda, serpiştirilmiş olarak bulunan protein yapılardır. Bu yapıların bazıları belirli iyon ya da iyonlara özelleşmiştir. Bazı kanallar hücre içi ve dışı arasındaki elektriksel potansiyel değişimine bağlı olarak açılıp kapanabilirken (voltaj bağımlı kanallar), bazı kanallar ise daima açık bulunurlar (sodyum-potasyum pompası). Neher'in 1992 yılındaki "*patch*" kenetleme çalışmasıyla voltaj bağımlı kanalların açık ve kapalı olmak üzere yalnızca iki durumda bulunabildiği anlaşılmıştır (Pehlivan 1997).

Aksiyon potansiyelinin oluşumu sırasında zar potansiyelinin değişim hızı 500 V/s'ye kadar çıkabilmektedir. Hiçbir taşınım mekanizması bu hıza ulaşamayacağından dolayı, bu hız iyon kanallarının ancak sulu gözenekler olabileceğinin göstergesidir (Dalkılıç 1993, Pehlivan 1997). İyonların kanallardan geçişleri pasif mekanizmalarla sürdürüldüğü için hücre tarafından herhangi bir enerji harcanmaz. Ancak, bu geçişlerin oluşturduğu iyonik akımların yönünü ve iyon konsantrasyonlarının dengesini hücre içi ile dışı arasındaki elektrokimyasal kuvvetler belirler.

1.6.1 Sodyum Kanalları

Sodyum kanallarının sınıflandırması tetrodotoksin (TTX) tarafından bloke edilip edilmediklerine göre yapılmaktadır (Waxman ve ark 1999). $Na_v1.6$-sub-tipi voltaj bağımlı Na^+ kanalları aksondaki sıçramalı iletimden sorumludur ve bu kanallar aksonun tekrarlı uyarılmasını önlemek için açıldıktan hemen sonra kapanırlar (inaktive olurlar). Kalptekine benzer şekilde, mutlak refrakter dönem boyunca çok güçlü bir uyaran bile zarı depolarize edebilecek yeterli sayıda Na^+ kanalı açılmasını sağlayamamaktadır. Periferik sinir liflerinde refrakter dönem, çift uyaran protokolü ile çeşitli zaman aralıklarında birinci uyaranın ardından ikinciye cevabı test eden bir protokolle (*recovery cycle*: toparlanma döngüsü) belirlenebilmektedir.

Bazı Na^+ kanalları ise yavaş aktive olurlar ve toplam kanalların yaklaşık %5'ini oluşturmaktadırlar. Sürekli ("*persistan*") Na^+ kanalları olarak da tanımlanan bu kanallar, iyonların hücre içerisine sürekli olarak sızmasına neden olurlar ve dolayısıyla zarın polarizasyonunun ve sinir liflerinin uyarılabilirliğinin derecesini belirler. Kanalın açılıp kapanma mekanizmasına bağlı olarak Na^+ kanalındaki belli bir molekülün voltaj bağımlı ya da sürekli tarzda davranabildiği de bilinmektedir (Taddes ve Bean 2002).

1.6.2 Potasyum Kanalları

Sodyum kanalları ile karşılaştırıldığında yavaş aktive olan K^+ kanallarının yaklaşık %30'u dinlenim durumunda açıktır; kanalların geri kalanının açılması ise zar potansiyeline (voltaj bağımlı K^+ kanalları) veya diğer metabolik faktörlere bağlıdır.

Potasyum 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'nın (1949) mürekkep balığı dev aksonunda yaptıkları oldukça iyi bilinen "voltaj kenetleme" deneyi, K^+ kanallarının açılmasının (depolarizasyondan birkaç ms sonra) repolarizasyonu tetiklediğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 1.2). Bununla birlikte, memelilerin miyelinli aksonlarında K^+ kanallarının repolarizasyondaki rolü ihmal edilebilir düzeydedir (Brismar ve Schwarz 1985, Corfas ve ark 2004).

Aslında repolarizasyon evresi büyük oranda voltaj-kapılı kanalların kapanması veya inaktivasyonu ve -sürekli kanalların sızıntı akımlarının aktivasyonu gibi- Na^+ kanallarının davranışı tarafından belirlenir (Beckstein ve ark 2003). Miyelinli aksonlarda hızlı K^+ kanalları jukstaparanod bölgesinde toplandıkları için (Şekil 1.5), sanki saklı gibidirler ve işlevleri ancak paranodal bölge hasar gördüğünde oluşan demiyelinizasyon durumunda ortaya çıkar (Rasband 2004).

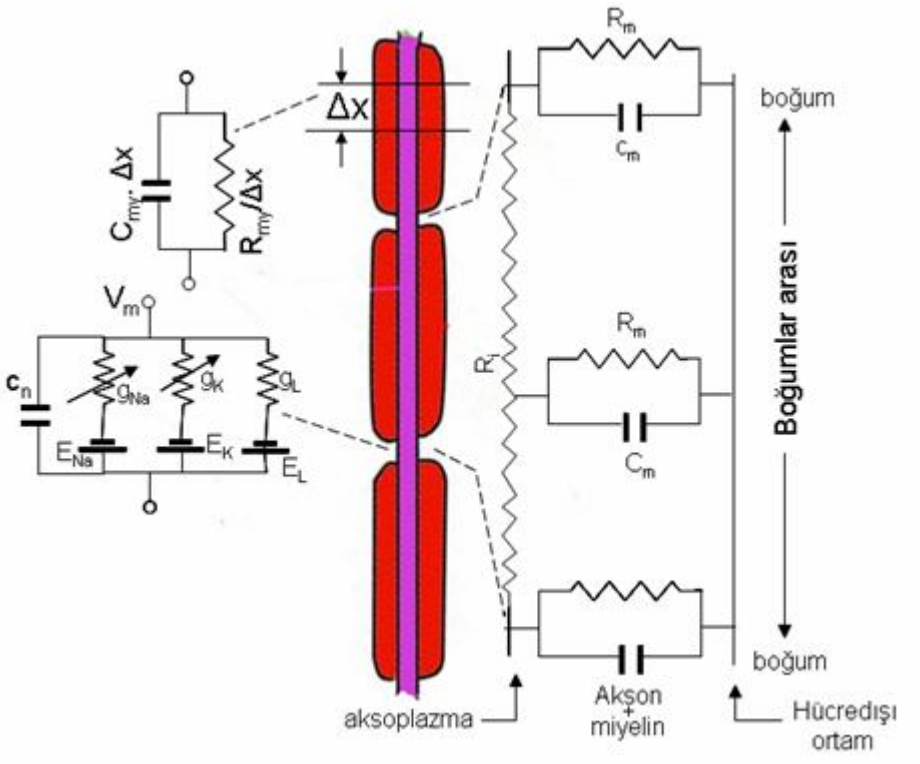
Depolarizasyondan yaklaşık 10 ms sonra açılan ve 100 ms kadar açık kalan yavaş K^+ kanalları Ranvier boğumunda yoğunlaşmakla beraber tüm zarda yayılmış

olarak bulunur (Devaux ve ark 2004). Bu kanalların yavaş kinetikleri sıçramalı iletimin etkinliğini sınırlıyor olsa da, dinlenim zar potansiyelinin sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. Yavaş K^+ kanallarının açılma olasılığı tekrarlı elektriksel uyarımla arttığı için bir diğer işlevleri de aksonal zarın aşırı uyarılmasını önlemektir (zarı hiperpolarize ederek uyarılabilirliği azaltmaktadırlar). Bu bağlamda, epilepsi tedavisinde kullanılan bir ajan olan retigabine'in yavaş K^+ kanallarını açıcı etkisi, bu kanalların epileptik nöbet oluşumunda etkili olabileceğini düşündürmektedir (Lagrange 2005, Wikenden ve ark 2000).

Üçüncü tip K^+ kanalı ise içeri doğrultucu ("*inward rectifier*") kanal olarak adlandırılmaktadır (Guo ve ark 2003, Kubo ve ark 2005, Lu 2004). Bu tip kanallar zarın hiperpolarizasyonu ile aktive olur; kanalın aktivasyonu ile büyük oranda K^+ olmak üzere pozitif yüklü iyonlar konsantrasyon gradyentinin belirlediği yönün tersine, yani hücre içerisine girerek zar potansiyelini depolarizasyon yönünde değiştirir ve bu değişim sonucunda düşük olan zar uyarılabilirliği artar (Kubo ve ark 2005). Fizyolojik şartlarda, telafi edici bu mekanizma genellikle sürekli kasılmayı takiben oluşur (aktivite-bağımlı hiperpolarizasyon). Daha sonra, kasılma sonucu giren fazla Na^+ iyonları ve çıkan fazla K^+ iyonları Na-K-ATPase aktivasyonu ile telafi edilir. Hücre içerisinden bakıldığında, her iki K^+ girişine karşın dışarı üç Na^+ iyonu çıkışı olduğu için hücre hiperpolarizasyona doğru gider. İçeri doğrultucu K^+ kanalları duyusal aksonlarda motor aksonlara göre daha işlevseldir; bu durum belki de çok merkezli motor nöropatilerdeki duyusal semptom eksikliğini açıklayabilir (Nodera ve Kaji 2006).

1.7. Çevresel Sinirlerin Kablo Özelliği

Hücre zarının pasif özelliği zar potansiyelinin uyarılma eşiğine kadar olan davranışını etkilemektedir. Zarın meydana geldiği lipit tabakası, elektriksel direnç ve kapasitörün paralel kombinasyonu olarak düşünülebilir. Bu durumda, zar kapasitansının değişmediği düşünülürse pasif zar özelliğini belirleyen en önemli faktörün zar direnci olduğu görülür.



Şekil 1.6: Miyelinli bir aksonun elektriksel eşdeğeri (Waxman ve ark 1995'ten uyarlanmıştır).

Boğumlar arasında yer alan K^+ kanal akımlarının büyük oranda boğumdaki dinlenim potansiyelinden kaynaklandığı yönünde güçlü bulgular mevcuttur; öyle ki, boğumdaki eşik-altı akımın hemen ardından boğumlar-arası bölge uyarılmaktadır. Dolayısıyla, açılan K^+ kanalı sayısı hem zar iletkenliğini, hem de zar direncini (R_m) belirlemektedir. Zar ne kadar çok depolarize olursa o kadar çok K^+ kanalı açılır; tersi de doğrudur. Sonuç olarak zar direnci depolarizasyonla azalır, hiperpolarizasyonla artar.

Pasif elektrik elemanları ile temsil edilen ve pasif zarın eşdeğeri olan elektriksel devreye (Şekil 1.6) bir akım pulsu verildiğinde, iç ve dış ortamlar arasında gözlenen potansiyelin zamanla değişimi,

$$V_m(t) = I_m.R_m\left[1 - e^{-t/\tau}\right] \qquad (1.3)$$

şeklinde verilir. Burada,

$$\tau = R_m.C_m \qquad (1.4)$$

zarın *zaman sabiti* olarak tanımlanır. Çeşitli tipte zarların zaman sabitleri 1-20 ms arasında değişmektedir. Zaman sabitinin iletim hızıyla ilişkisi ise ters orantılıdır; zaman sabitinin büyük olması bir bölgedeki potansiyel değişiminin komşu bölgede meydana getireceği değişikliğin gecikmesine, dolayısıyla iletim hızının küçülmesine neden olur.

Bir potansiyelin Şekil 1.6'daki gibi bir zarda pasif olarak yayılması esnasında potansiyelin genliği zar boyunca ilerledikçe azalır. Zar potansiyelindeki bu azalmanın üssel olduğu ve

$$\Delta V_m(x) = \Delta V_0 e^{-x/\lambda} \qquad \text{[volt]} \qquad (1.5)$$

denklemine uyduğu gösterilmiştir. Burada λ zarın *uzay sabiti*, x potansiyelin başlangıç noktasından uzaklığı, V_0 ise potansiyelin başlangıç noktasındaki (x=0) değeridir.

Uzay sabiti λ, $\Delta V_m(x)$ 'nin x=0'daki değerinin (ΔV_0) 1/e'sine (yaklaşık olarak %37'sine) düştüğü uzaklık olarak tanımlanır, ve hücre parametreleriyle

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{R_i}} \qquad (1.6)$$

şeklinde ilişkilidir. Zar ne kadar yalıtkan ve hücre içi ortam da ne kadar iyi iletken özelliklere sahip olursa (sırasıyla R_m'nin büyük olması ve R_i nin düşük olması durumları), λ da o kadar büyük olur. Uzay sabitinin büyük olması, akımın zar boyunca yok olmadan önce hücre içi ortamda daha uzak noktalara yayılabilirliği ve dolayısı ile yayılma hızının büyük olması anlamına gelmektedir. İletim hızının akson çapına bağlı olarak artışı da aslında birim uzunluk başına aksoplazma direncinin (R_i) akson kesit alanıyla ters orantılı olmasından kaynaklanmaktadır.

1.8. Bileşik Aksiyon Potansiyeli

Periferik sinirler, geniş bir aralıkta değişen iletim hızlarına sahip aksonların bir kılıf içinde bir arada toplanması ile oluşmaktadır. Her bir periferik sinir, kontrol ettiği son organın işlevi ile uyumlu, farklı çap ve yapıda aksonlardan meydana gelir.

Bir siniri oluşturan liflerin bir kısmı veya tamamı aynı anda uyarılabilir ve liflerin ortaklaşa elektriksel aktiviteleri gözlenebilir. Demeti oluşturan liflerin bireysel aksiyon potansiyellerinin katkıları ile ortaya çıkan bu türde elektriksel aktiviteye bileşik aksiyon potansiyeli (BAP) denir.

Bileşik aksiyon potansiyeli eğrilerinin tek hücrede gözlenen aksiyon potansiyellerinden çok farklı yanları vardır. Hep ya da hiç davranışı BAP'da gözlenmez. Siniri oluşturan demetin topluca uyarılmak istenmesi halinde akım şiddeti zayıfsa ilk önce hiçbir lif uyarılmaz, akım şiddeti artırıldıkça BAP genliği de artar ve biçimi değişir. Bir sinirde oluşan bileşik aksiyon potansiyelinin biçimine uyaranın şiddeti, elektrotların konumları, hacim iletkenliğinden kaynaklanan etkenler yanında, siniri oluşturan liflerin farklı yapılara ve dolayısı ile farklı iletim hızlarına sahip olmaları da etkilidir.

Sinir demetini oluşturan lifler genel olarak birbirlerine benzeseler de yapısal farklılıkları nedeniyle iletim hızı, eşik potansiyel gibi iletimle ilgili parametreler bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler. Siniri oluşturan lifler bir iletim hız dağılımı oluşturduğundan, uyarı bölgesinden uzaklaştıkça kaydedilen BAP'ın genliği azalırken süresinde de artma gözlenir. Fakat planimetrik kayıtlar ideal koşullarda BAP altında kalan alanın sabit kaldığını göstermektedir.

Sinire uygulanan bir uyaranın yanıtı, sinir üzerinde farklı uzaklıklardan kaydedilirse elde edilen yanıtlarda da farklılık görülmektedir. Bunun nedeni, BAP'ın taşındığı mesafe arttıkça, hızlı ileten liflerin yanıtları ile yavaş ve orta hızda ileten liflerin yanıtları arasında zamansal bir farkın ortaya çıkmasıdır. Yeteri kadar uzak mesafede birden fazla BAP bileşeni gözlenebilir. Bu bileşenlerden ilki en hızlı ileten lif grubuna ait olup, diğerleri ise iletim hızlarına göre daha yavaş liflere karşılık gelir.

Bu şekilde siniri oluşturan lif gruplarının dağılımı oluşturulabilmektedir (Pehlivan 1997).

BAP'ın şeklinde oluşan bir değişiklik, liflerin iletim hızlarındaki olası bir değişikliğin ve dolayısıyla nörolojik düzensizliklerin, patolojik ve patofizyolojik bulguların göstergesi olabilmektedir (Dalkilic 1999).

1.8.1. BAP Kayıt Yöntemleri

BAP gözlemleri sinir veya kaslardan konvansiyonel yöntem olan ekstraselüler BAP kaydı veya "suction" yöntemi ile yapılabilmektedir. Bu iki ayrı yöntem kendilerine has bazı avantaj ve dezavantajları beraberlerinde getirmektedirler.

Ekstraselüler yöntem (izole sinirden veya yüzeyel)

Bir hücrenin içinin dışına göre potansiyelini, bir cam mikroelektrot vasıtasıyla, dış ortamda yer alan bir referans elektrota göre ölçmek mümkündür. Bu hücre içi (intraselüler) yöntem örneğin bir kas hücresinin dinlenim zar potansiyelini veya zar potansiyel değişimlerini gözlemek için kullanılabilir. Fakat intraselüler yöntemin omurgalıların sinir liflerinde *in-vivo* şekilde kullanılması zordur ve mikroelektrot etrafındaki dokulara da ciddi zararlar verebilir.

Biyolojik potansiyellerin gözlenmesinde en çok kullanılan ve dokuya zarar verme potansiyeli daha düşük olan ekstraselüler yöntemde ise, kayıt elektrotu kaynak dokuya veya hücreye, referans elektrotu ise yine ekstraselüler ortamdaki başka bir noktaya bağlanır. Bu bağlantı biçimi zar potansiyeli yerine, zarın yüzeyindeki potansiyel değişiminin gözlenmesini sağlar. Dolayısıyla ekstraselüler yöntem vasıtasıyla tek bir hücrenin aktivitesinin gözlenmesinin yanında birçok hücrenin aktivitelerinin toplamını aynı anda gözlemek de mümkündür. Bu nedenle gözlenecek potansiyelin genliği ve biçimi kaynak doku ile kayıt elektrotları arasındaki fizyolojik

koşulların yanında o andaki aktive olmuş hücre sayısına da bağlıdır (Plonsey ve Bar 1988).

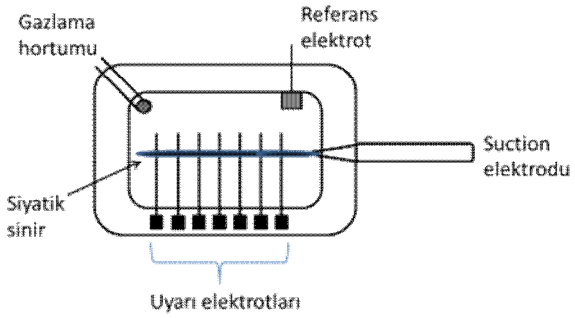
Ekstraselüler yöntem kullanılarak izole bir sinirden BAP kaydı yaparken sinir, hacim iletken etkilerinden korunmak amacıyla, eşit aralıklarla yerleştirilmiş uyarı veya gözlem amaçlı bir dizi elektrottan oluşan bir ızgara üzerine yerleştirilir. Sinirin uyarılması sonucu oluşan elektriksel yanıt (BAP) "*bifazik*" veya "*monofazik*" yöntemle gözlenebilir. Bifazik yöntemde BAP, aktif veya "araştırıcı elektrot" olarak adlandırılan bir elektrot ile "*referans elektrodu*" olarak adlandırılan diğer elektrot sinirin iki ayrı sağlam bölgesine konumlandırılarak, monofazik yöntemde ise referans elektrot sinirin ezilmiş (demarke edilmiş) ve sürekli depolarize duruma gelmiş bir bölgesine, diğeri ise sinirin sağlam yerine konularak oluşan elektriksel aktivite yani BAP yine iki elektrot arasındaki potansiyel farkı olarak ölçülmektedir. Bifazik yöntem nispeten kolay olmasına rağmen, bu yöntemle elde edilen BAP eğrilerinin yorumlanması büyük zorluklar içermektedir (Dalkılıç ve Pehlivan 2002b).

Canlı hayvan veya insandan biyolojik potansiyel kaydı amacıyla geniş yüzeyli veya yüzük biçimli (ring shape) Ag/AgCl veya altın gibi metalden yapılmış kayıt elektrotları kullanılır. Bu tür kayıtlar genellikle "*çok birimli kayıtlama*" ("multi-unit recording") olarak adlandırılır ve birden çok sinir veya kas lifinin elektriksel aktivitesinin gözlenmesini sağlar. Yüzey elektrotun çapı arttıkça, tek tek liflerin aktivitesinden ziyade birçok hücrenin bir arada aktivitesinin oluşturduğu alan potansiyelini ("LFP: Local field potential") ölçer hale gelir (Malmivuo ve Plonsey 1995). Ölçülen potansiyelin biçimi ve genliği referans noktasına da bağlı olduğu için, bu nokta tekrarlanan kayıtlarda sabit tutulmalıdır.

1.8. 2. Suction Yöntemi

İzole sinirlerden BAP kaydetmenin bir diğer yolu ise "*suction*" yöntemidir. Bu yöntemde düşük erime ısısına sahip bir cam kapiller tüpün uç çapı, elektrot çekici yardımıyla üzerinde çalışılacak sinirin distal ucunun kalınlığına göre inceltilir. Cam

elektrot yapay tuz çözeltisi ile doldurulur, Ag/AgCl bir elektrot pipet içerisine daldırılır ve elektrotun diğer ucu amplifikatör/kayıt sistemine irtibatlandırılır. Sinirin distal ucu, pipetin arka ucuna uygulanan negatif basınç yardımı ile pipetin inceltilmiş tarafına çekilir, sinirin proksimal kısmı ise farklı mesafelerde yer alan bir dizi uyarı elektrotu üzerine yatırılarak stimülatörle uyarılır. Gözlenen potansiyelin genliği sinirin distal ucu ile "*suction*" elektrot iç-yüzeyi arasındaki dirence bağlı olduğu için bu değerin mümkün olan en büyük değere ulaştırılması sağlanır (Stys ve ark 1991, Dalkılıç ve Pehlivan 2002b, Tuncer 2008).



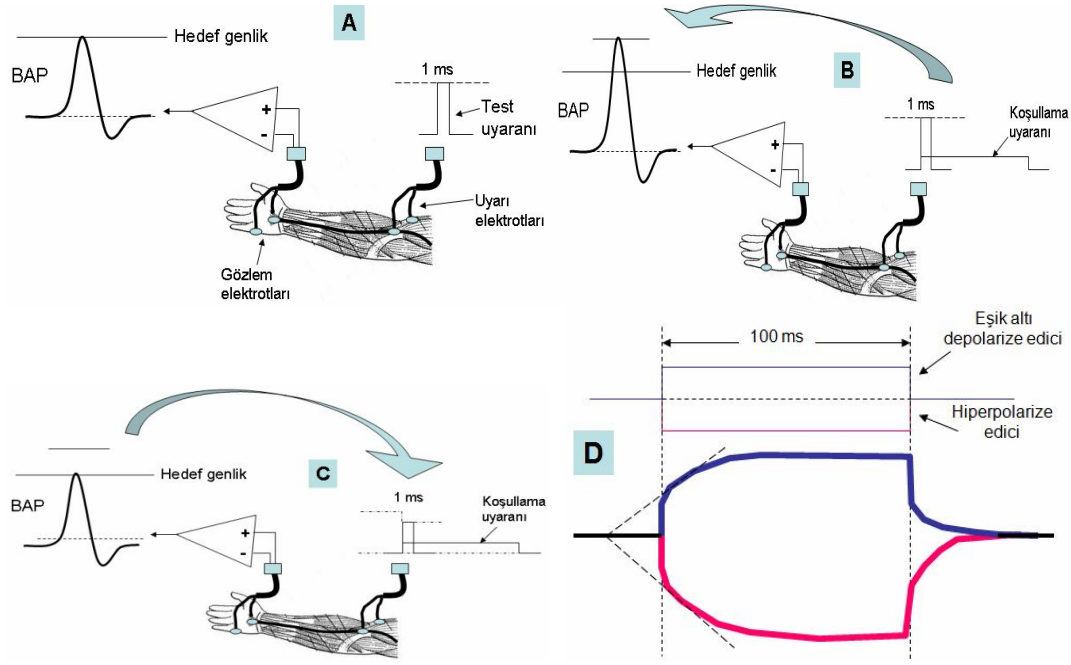
Şekil 1.7: Suction kayıt yöntemi genel şeması.

1.9. Sinir Uyarılabilirliğinin ve Kanal İşlevlerinin Belirlenmesi; Eşik Değer İzleme ("Threshold Tracking") Yöntemi

Elektriksel akım kullanılarak akson uyarılabilirliği aksiyon potansiyeli meydana getirme eşiğini bulacak şekilde dolaylı yoldan belirlenebilir (Bostock ve ark 1998). Zar potansiyelinin depolarizasyon yönündeki değişimi uyarılabilirliği artırır ve böylece uyarmak için gerekli eşik azalır, dolayısıyla zarı uyarmak için daha küçük akım şiddeti yeterli olur. Bunun tersi de geçerlidir; zar potansiyelinin hiperpolarizasyon yönündeki değişimi de uyarılabilirliği azaltır, dolayısıyla aynı uyarılabilirlik eşiğine ulaşmak için daha şiddetli akıma ihtiyaç duyulur.

Eşik değer izleme yönteminde, amaçlanan bileşik kas veya sinir aksiyon potansiyeli genliğini elde etmek için gereken eşik akım şiddetleri otomatik olarak belirlenerek zardaki uyarılabilirlik değişimleri elde edilebilir (Şekil 1.8). Sinir veya kas bileşik aksiyon potansiyelinin referans seçilen genliğe ulaşması için gerekli akım değişimi, "*eşikteki yüzde değişim*" olarak çizdirilir ve aksonal (veya kas) uyarılabilirliğin göstergesi olarak kabul edilir. Örneğin, "*koşullandırıcı*" olarak

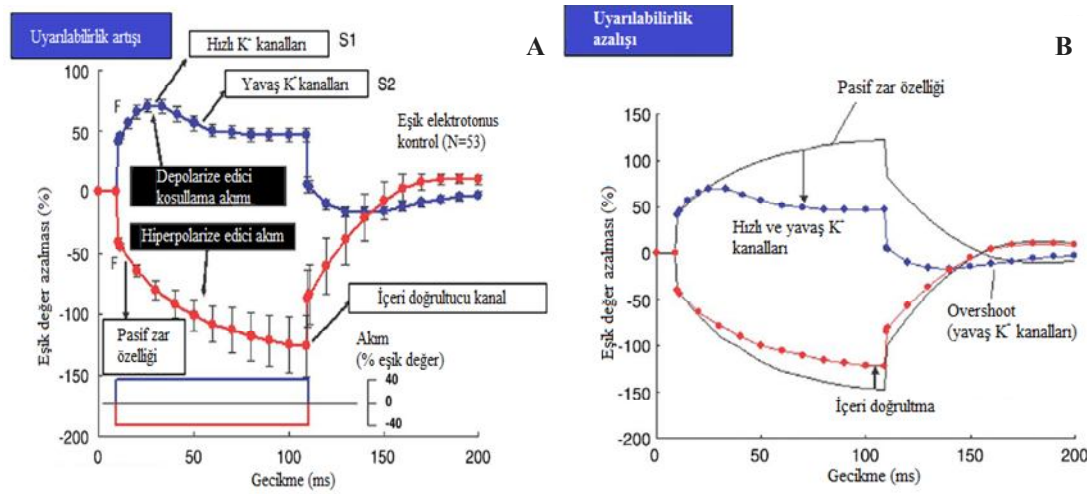
adlandırılan nispeten uzun süreli (100 ms) depolarize edici eşik altı bir uyaran sinir uyarılabilirliğini arttırırken, bu sırada uygulanan normalden daha düşük şiddetteki kısa süreli (1 ms) bir test pulsu istenilen aynı (genellikle supramaksimalin %40'ı kabul edilen) hedef sinyal genliğini oluşturmak için yeterli olur. Hücre içi kompozisyondaki küçük değişimler çeşitli kanal ve pompaların aktiviteleri tarafından telafi edildiği için, koşullandırıcı akımın neden olduğu zar uyarılabilirliği artışı -dolayısıyla eşik akım değerindeki değişim-, uygulanan akımın süresine bağlıdır. Sinir demetinin tümünden kaydedilen BAP, tek aksondan kaydedilen AP'lerin toplamı olduğundan, dolaylı olarak non-invazif BAP ölçümüne dayanan eşik değer belirleme yöntemi tek akson için de kullanılabilir. Dolayısıyla bu yöntem, klinik çalışmalarda klasik BAP kaydına ek olarak veya onun yerine tercih edilebilmektedir.



Şekil 1.8: Eşik değer izleme yönteminin kavramsal temeli. Önce hedeflenen BAP genliği elde edilir (A), daha sonra uzun süreli (100 ms) eşik altı koşullandırıcı akım uygulanır (B), diğer aşamada artan BAP genliğini hedeflenen değerde (%40) sabit tutacak şekilde 1 ms süreli test uyaran şiddeti koşullandırıcı uyaran süresince ve sonrasında ayarlanır (C). Test pulsun şiddetindeki değişim hem depolarize hem de hiperpolarize koşullandırıcı akım için çizdirilir (D) (Nodera ve Kaji 2006'dan modifiye edilmiştir).

1.9.1. Eşik Elektrotonus (TE: "Threshold Electrotonus")

Uzun süreli eşikaltı depolarize ve hiperpolarize edici akımın neden olduğu zar potansiyelindeki değişim eşik elektrotonus (EE) olarak adlandırılır (Nodera ve Kaji 2006, George ve Bostock 2007). Genellikle 100 ms süreli eşik altı depolarize edici koşullandırıcı bir uyaran boğumlar-arası bölgeyi polarize eder ve sinir uyarılabilirliğini etkiler. Uyarılabilirlikteki bu değişim, 1 ms süreli test pulsunun şiddeti önceden belirlenmiş hedef genliği (BKAP veya BSAP nin maksimum genliğinin %20 veya %40'ı) elde edecek şekilde otomatik olarak ayarlanarak belirlenebilir. Toparlanma döngüsünde de görüleceği gibi, hedef genliği elde etmek için gerekli test uyaranının şiddetinin düşük olması uyarılabilirliğin arttığını, tersi durum ise azaldığını göstermektedir. Koşullandırıcı uyaranın hemen sonrasında, zarın kablo özelliğinden dolayı uyarılabilirlik değişmektedir (Şekil 1.9A da F fazı).



Şekil 1.9: Eşik elektrotonus (EE) sırasında gözlenen uyarılabilirlikteki normal değişimin bir örneği. 100 ms'lik koşullandırıcı puls sırasında ve sonrasında ardışık aralıklarla depolarize ve hiperpolarize edici test uyaranları uygulanmaktadır (A). Her bir eğri farklı akson uyarılabilirliklerini yansıtır ve iyon kanallarının işlevselliğinden etkilenir. Depolarize edici EE sırasında, uyarılabilirlikteki küçük değişimlerden hızlı ve yavaş K^+ kanalları sorumludur. Hiperpolarize edici EE sırasında ise içeri rektifiye kanallar eşik uyarılabilirlik değişimlerini dinlenime (baseline) döndürücü etkiler gösterir. Uygulanan akım durdurulduğunda yavaş K^+ kanalları açık kalır ve normalin üzerine çıkan değişiklikler görülür. (B) Hızlı ve yavaş K^+ kanallarının neden olduğu uyarılabilirlikteki azalma (S2 fazı) bu kanalların bloke edilmesi ile ortadan kalkmaktadır (Nodera ve Kaji 2006'dan modifiye edilmiştir).

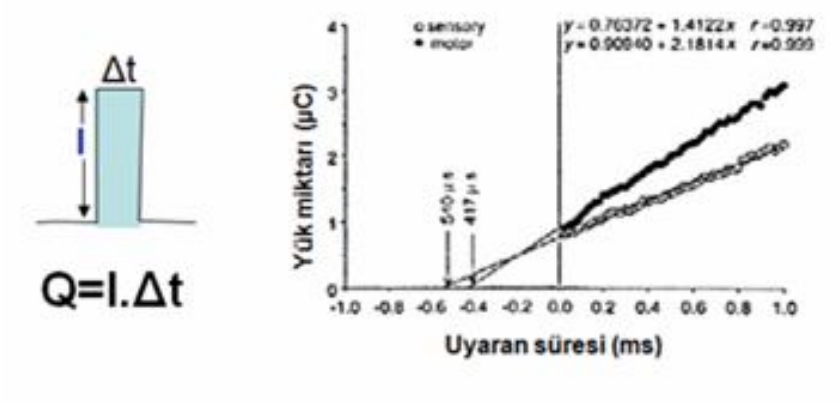
Uyarılabilirliğin başlangıçtaki ani yükselişinin ardından, zar akımının boğumlar-arası bölgedeki yayılımından dolayı uyarılabilirlikteki artış nispeten daha yavaş olmak üzere (S1 fazı) devam etmektedir. S2 fazı olarak tanımlanan fazda ise akson uyarılabilirliği azalmaktadır. Bu durum yavaş K^+ kanallarının aktivasyonu sayesinde nispeten depolarize durumdaki zar potansiyeline uyum göstermesinden kaynaklanmaktadır. Koşullandırıcı uyaran kaldırıldığında, yavaş K^+ kanallarının deaktivasyonundan (kapanmasından) kaynaklanan yavaşça yükselmiş bir eşik fazı görülmektedir (Şekil 1.9A) (Nodera ve Kaji 2006).

Hiperpolarize edici EE'nin ardından, uyarılabilirlikte ani bir düşüş (F fazı) ve sonrasında da hiperpolarizasyon süresince uyarılabilirlikte sürekli azalma görülür. Bu sürekli azalma hiperpolarize edici akımın boğumlar-arası bölgeye yayılmasından kaynaklanmaktadır. Koşullandırıcı uyaranın yaklaşık 30 ms'lik uygulanmasından kaynaklanan eşik akım değişiminin büyüklüğü hiperpolarize edici EE'de depolarize edici EE'ye göre daha anlamlıdır. Çünkü hiperpolarizasyon esnasında yavaş K^+ kanallarının ve hızlı K^+ kanallarının bir kısmının kapanması uyarılabilirliği fazla etkilemezken, depolarize edici EE sırasında açılan K^+ kanalları uyarılabilirlikteki yükselişin devam etmesini önler (Şekil 1.9B'de görülen düz eğri). Uyarılabilirlikteki sürekli azalma koşullandırıcı akım uygulanmasının sonlarına doğru yavaşlar ve sonrasında azalarak normal değerine ("baseline") döner. Normale dönüş süreci aşırı hipo-uyarılabilirliği önleyen içeri-doğrultucu ("inward rectifier") kanalların açılmasından kaynaklanmaktadır ve S3 fazı olarak adlandırılır (Nodera ve Kaji 2006).

1.9.2. Şiddet-Süre Zaman Sabiti ("SDTC: Strength-Duration Time Constant")

Bir uyaranın süresi arttırıldıkça, (genlik, alan, biçim, vs. açısından) aynı özellikteki bileşik kas veya sinir aksiyon potansiyelini (BKAP veya BSAP) elde etmek için gerekli akım şiddeti reobaz değerine kadar azalır. Reobaz, oldukça uzun süreli bir puls uyaranın aksiyon potansiyeli oluşturabilmesi için gerekli minimum akım şiddetidir (Dalkilic ve Pehlivan 1993, Dalkilic ve ark 2009). Kronaksi ise uyarılabilirliğin bir ölçütüdür ve reobaz değerinin iki katı akımın verilebildiği minimum uyaran süresidir. Weiss kuralına göre ($Q=I.\Delta t$), elektriksel bir uyaranın sahip olduğu yük miktarı (Q) akım şiddeti (I) ile süresinin (Δt) çarpımına eşittir.

Reobaz değeri ise uyaran yükü ile orantılıdır. Dolayısıyla sadece iki farklı uyaran süresi için elde edilen yanıtlar bile reobazın hesaplanması için yeterli olabilir (Bostock 1983).



Şekil 1.10: Uyaran süresi-yük miktarı ilişkisinden şiddet-süre zaman sabitinin elde edilmesi. Eğrinin uyaran süresini kestiği (x-eksenindeki) değeri (şiddet-süre zaman sabiti) kronaksiye karşılık gelmektedir (Bostock ve ark 1998'den uyarlanmıştır).

Şiddet-süre zaman sabiti, aslında kronaksiye karşılık gelmektedir ve uyaran yükü-süre grafiğinde doğrunun x-eksenini kestiği nokta olarak tanımlanabilir (Şekil 1.10) (Geddes 2004). Hiperpolarizasyonla artan ve depolarizasyonla azalan reobaz, boğumsal zar uyarılabilirliğindeki değişimlerden etkilenir. Reobazın voltaj bağımlılığı, eşik yakınlarında aktif durumda ve çabuk aktive, yavaş inaktive olma özelliği gösteren sürekli Na^+ kanallarından kaynaklanır (Clay 2003, Meister ve Kearney 2005). Depolarizasyon sürekli kanallardan geçen Na^+ akımını azaltarak reobaz değerinin düşmesine neden olur; hiperpolarizasyon için ise bunun tersi geçerlidir. SDTC depolarizasyonla artan hiperpolarizasyonla azalan zar potansiyelinin tersi yönünde davranış gösterir. SDTC, aynı zamanda diğer zar özelliklerine de bağlıdır, zar kapasitansının artması durumunda da artar. Demiyelinizasyon zar kapasitansını ve dolayısıyla SDTC' yi artırır (Mogyoros ve ark 1998).

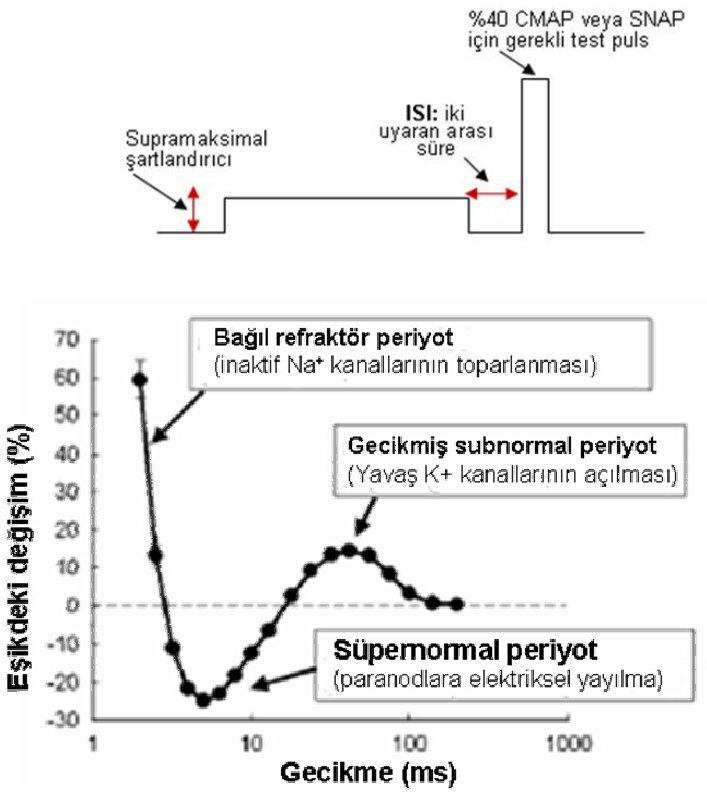
1.9.3. Toparlanma Döngüsü ("RC: Recovery Cycle")

Sinir lifi uyarıldıktan sonra, zar potansiyeli dinlenim değerine dönmeden önce toparlanma döngüsü ("recovery cycle") olarak adlandırılan bir dizi uyarılabilirlik değişimi oluşur. Bu döngü, sinir uyarılabilirliğinin arttığı (supramaksimal dönem)

veya azaldığı (refrakter dönem ve gecikmiş subnormal dönem) bir dizi fazı içermektedir.

Toparlanma döngüsü çift uyaran yöntemi ile değerlendirilir. BKAP veya BSAP'ın maksimum genliğinin belirlenmiş bir oranını (genellikle %40) oluşturacak şekilde test pulsu uygulanır. Supramaksimal koşullandırıcı bir uyarandan sonra, belirlenmiş gecikme süreleri sonrasında hedef değeri (%40) oluşturacak gerekli test uyaranı şiddeti ve iki uyaran arasındaki sürenin ("ISI: Inter-stimulus interval") belirli değerleri için gerekli akım değerleri belirlenir (Bostock 1998).

Koşullandırıcı uyaranın ardından zarda önce mutlak refrakter dönem (MRP) ve sonrasında bağıl refrakter dönem (BRP) oluşur. MRP esnasında çok güçlü uyarımla dahi zarda AP meydana getirilemez. Bunun nedeni geçici, voltaj bağımlı Na^+ kanallarının inaktivasyonudur. Geçici Na^+ kanalların bu inaktivasyon sürecinden derece derece kurtulmalarını takiben başlayan ve 3-4 ms süren BRP sırasında ise aksiyon potansiyeli başlatmak için normalden daha güçlü bir uyaran gerekir (uyarılabilirlik azalmış durumdadır). Na^+ kanalları depolarizasyonla inaktive olduğundan ve hiperpolarizasyonla toparlandığından, BRP'nin süresi ve büyüklüğü zar potansiyeline duyarlıdır. Dolayısıyla refrakter dönem depolarizasyon esnasında uzun ve büyük olur, hiperpolarizasyonda ise bu durumun tersi geçerlidir.



Şekil 1.11: İlk supramaksimal şartlandırıcı pulsun ardından gelen ikinci test pulsun gecikmesi (ISI) 18 adımda 200 ms'den 2 ms'ye kadar azaltılarak, her bir test pulsunun %40 BKAP veya BSAP oluşturulabilmesi için gerekli şiddetin eşiğe göre % değişimi ölçülür (Nodera ve Kaji 2006' dan uyarlanmıştır).

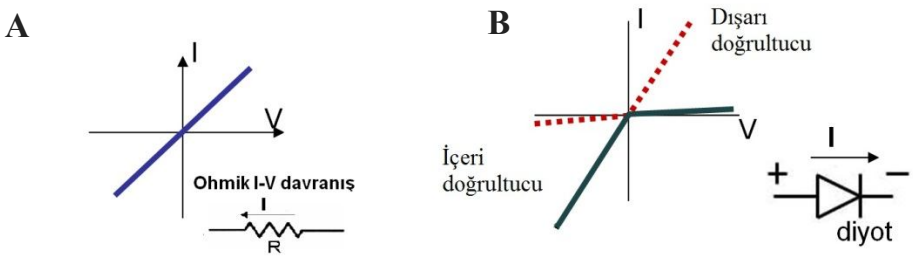
Şekil 1.11'de görüldüğü gibi BRP'yi takip eden ilk 10-30 ms sırasında, akson uyarılabilirliği artmakta (gerekli eşik akım şiddeti azalmakta) ve sinir lifleri kolayca uyarılabilmektedir (süpernormal dönem). Ranvier boğumunun depolarizasyonu komşu boğumlar-arası bölgeyi uyarır, bu bölge daha sonra oluşan elektrik akımıyla, oluşan kapalı devresi üzerinden kapasitör gibi yüklenir. Kısa bir süre sonra, bu yüklü bölge direncin düşük olduğu miyelin boyunca veya miyelin altından geçen akım vasıtasıyla yükünü boşaltır. Bu süreç ekstraselüler olarak ölçüldüğünde "*negatif ard-potansiyeli*" veya intraselüler olarak ölçüldüğünde "*depolarize edici ard-potansiyeli* (DAP)" oluşturur (Şekil 1.11). Elektrik akımı döngüsünün sadece Ranvier boğumlarında gerçekleştiğini varsayan klasik miyelinli akson modelinin aksine, zar polarizasyonunda normal üstü dönemdeki (süper normal dönem) uyarılabilirlik artışını tam olarak açıklayan boğumlar arası sızıntılı elektriksel bölgeyi de içeren revize edilmiş bir model önerilmiştir (Barrett ve Barrett 1982). Süpernormalite depolarizasyonu takiben küçülürken (sürenin kısalması ve eşik akım değişiminin

azalması), hiperpolarizasyonu takiben büyümektedir (sürenin uzaması ve eşik akım değişiminin artması). Hiperpolarize durumdaki Ranvier boğumunda sıçramalı iletimi gerçekleştirmek için güçlü bir akım gerekmektedir. Sonuçta, paranodal ve boğumlar-arası bölgenin elektrik yük yoğunluğu oldukça önemli hale gelmekte, dolayısıyla sızıntı akımı da (DAP) büyük olmaktadır. Tersi durumda ise, küçük DAP'lı, yani bir anlamda düşük süper normal dönemi oluşturan, zar depolarizasyonunun üstesinden gelmek için ise daha az akım miktarı yeterli olmaktadır. Akut demiyelinizasyon süpernormaliteyi artırmaktadır, çünkü paranodal demiyelinizasyon bölgesindeki sıçramalı iletim için gereken güçlü bir akım, ardından güçlü bir DAP oluşturmaktadır (Barrett ve Barrett 1982, Kaji 2003). Sürekli Na^+ kanalları da süpernormalite döneminde önemli rol oynamaktadır (Bostock ve ark 2005).

Süper normal dönemi takip eden ve gecikmiş subnormal dönem olarak adlandırılan süreçte ise akson uyarılabilirliği normale döner ve eşik akım yeniden yükselir (Şekil 1.11). Gecikmiş subnormal dönem sırasında eşik akımdaki değişme koşullandırıcı uyaran uygulanmasından yaklaşık 45 ms sonra maksimum düzeyine ulaşmaktadır ve 100 ms sonunda sona ermektedir. Sonuçta, zarın depolarizasyonu yavaş K^+ kanallarını uyararak zarın hiperpolarizasyonuna neden olmaktadır.

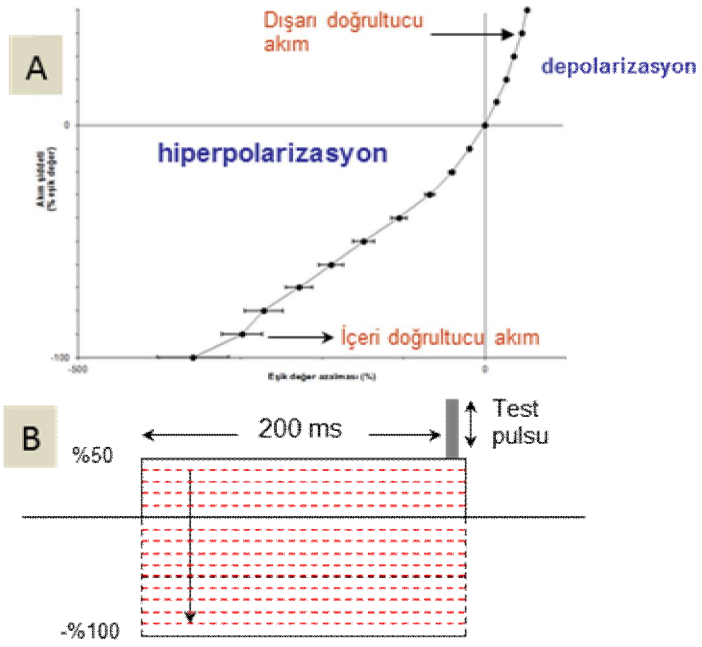
1.9.4. Akım-Eşik (Current-Threshold) İlişkisi

Doğrultucu ("*rectifier*") kelimesi elektronikteki anlamı ile, elektronik bir elemanın (örneğin diyot) voltajın bir yönünde akım geçmesine izin verirken, diğer yönünde akım geçişine izin vermemesini ifade etmektedir. Voltajın negatif değerlerinde akım geçişine izin vermezken pozitif değerlerinde izin veren elemanlar *dışarı doğrultucu* (*outward rectifier*), tersi şekilde davranan elemanlar ise *içeri doğrultucu* (*inward rectifier*) olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 1.12: Basit bir R direnci (A) ve bir diyot (B) için akım-voltaj karakteristiği. İçeri ve dışarı doğrultucu diyot veya rektifiye kanal benzeri elemanların akım-voltaj karakteristikleri.

Eşik değer izleme yönteminde akım-eşik ilişkisi temel olarak EE'nin genişletilmiş halidir. EE de BKAP veya BSAP'nin maksimum genliğinin belirli bir değerini (örneğin %40) elde etmek için koşullandırıcı uyaranın önceden ayarlanmış şiddeti kullanılır ve koşullandırıcı uyaranın süresi değiştirilir, fakat akım-eşik ilişkisi araştırılırken koşullandırıcı akımın süresi (genellikle 100 veya 200 ms olacak şekilde) sabit tutulur ve şiddeti +%50'den -%100'e kadar %10'luk adımlarla değiştirilir (Şekil 1.13). Bu polarize edici akımların bitiminden hemen sonra 1 ms süreli test puls uygulanır ve eşikteki değişim ölçülür, yüzde azalma çizdirilir (Şekil 1.14).



Şekil 1.13: Akım-eşik (%) ("current-threshold") ilişkisi. Akım depolarizasyonda dışarı doğrultucu, hiperpolarizasyonda içeri doğrultucu özellik göstermektedir.

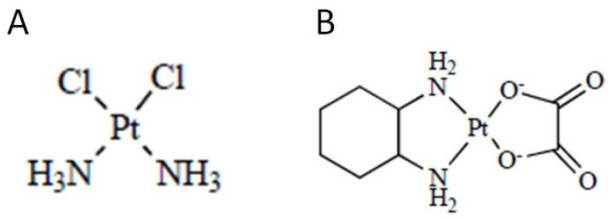
Çizilen eşik-akım eğrisinde yönlendirme, depolarizasyonda sağa doğru, hiperpolarizasyonda ise sola doğru olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 1.13A).

Depolarizasyon veya hiperpolarizasyon sonucunda akım-eşik eğrisinin düşeyde doğrusallaştığı aşamaya kadar K^+ kanallarının veya içeri doğrultucu kanalların doğrultuculuğunun göstergesidir (Nodera ve Kaji 2006).

1.10. Kemoterapik Ajanlar: Oksaliplatin ve Sisplatin

Platin bileşikleri, "*alkilleyici ajan*" olarak tanımlanmış kemoterapik ajanlar sınıfıdır. Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde etkilidirler. Sisplatin, kullanılan en eski ve oksaliplatin de üçüncü nesil platin bileşikleridir (Argyriou ve ark 2008). Yaygın olarak kullanılan platin bileşikli kemoterapik ajanlar DNA sentezinin engellenmesinde etkilidir.

Sisplatin 1978'de testis ve yumurtalık kanserlerini tedavi etmek için kullanılmış olan ilk platin bileşikli ajandır. Periferik nörotoksisite sisplatinin oluşturduğu, doza bağlı en önemli yan etkidir. Önerilen patofizyolojik mekanizmalardan bazıları sisplatinin apoptoz mekanizmasıyla benzeşen bir yolla periferik sinirleri ve zararlı hücreleri öldürdüğüdür. Periferik nörotoksisite, sisplatin kullanan hastaların yaklaşık %50'sinde ortaya çıkmaktadır (Amptoulach ve Tsavaris 2011).



Şekil 1.14: Sisplatin (A) ve oksaliplatin (B) molekülerinin kimyasal yapıları.

Kolorektal kanser tedavisinde kullanılan platin bileşiği oksaliplatin, akut motor ve duyusal belirtilere ve kümülatif dozla artan kronik nöropatiye sebep olur (Gamelin ve ark 2002). Oksaliplatinin anti-tümör etkisinin DNA sentezini aksatan bağlantıların oluşmasından dolayı olduğu düşünülmektedir (Kiernan ve Krishnan 2006).

Oksaliplatin tedavisi infüzyonun hemen ardından oluşan ve tedavi boyunca biriken önemli nörotoksisiteyle sınırlanır. İnfüzyonun hemen sonrasında oluşan akut nöropatik semptomlar hastaların büyük çoğunluğunda gözlenir. Kümülatif dozla artan kronik duyusal nöropatinin uzun süreli işlevsel yetersizliğe yol açtığı bilinmektedir (Park ve ark 2011a).

Oksaliplatin kullanımından sonra kramplar, çenede ağırlaşma, ses değişiklikleri, göz kapağında sarkma gibi semptomlar da gözlenmiştir. Elektrofizyolojik çalışmalarla, oksaliplatinin motor sinirlerde hiperuyarılabilirliğe neden olduğunu kanıtlanmıştır (Wilson ve ark 2002). Oksaliplatinin, voltaj bağımlı K^+ kanallarını etkileyerek nörotoksisiteye sebep olabileceği de öne sürülmüştür (Krishnan ve ark 2005).

Oksaliplatin kullanmış hastalardaki sinir uyarılabilirlik çalışmalarında, hem motor (Krishnan ve ark 2005, 2006) hem duyusal (Park ve ark 2009a,b) aksonlarda aksonal zardaki voltaj-kapılı Na^+ kanallarının işlevinin bozulmasına bağlı olan önemli anormalliklere yol açtığı bildirilmektedir. Bunun yanı sıra, in vitro çalışmalardan elde edilen bulgular, Oksaliplatinin, aktivasyonun voltaj bağımlılığını ya da inaktivasyon kinetiğini etkileyerek Na^+ iletkenliğini değiştirebileceğini göstermektedir. Ancak buna sebep olan mekanizma henüz belirlenememiştir (Park ve ark 2011b).

Platin bileşikleri sitotoksik etkilerini apoptozise neden olmak suretiyle gösterirler. Hücre bölünmesi sırasında DNA eklentileri oluşturarak DNA kopyalama ve uyarmasını bloklarlar ve bu hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Sisplatin ve oksaliplatinin oluşturduğu periferik nörotoksisitenin altında yatan mekanizmanın, en azından kısmen, nöronal DNA'ya doğrudan bağlanma yoluyla oluştuğu tahmin edilmektedir (Carozzi ve ark 2010). Sisplatinden farklı olarak oksaliplatin 1,2 diaminosiklohekzan taşıyıcı eklentisi içerir. Bu yapı değişimi yine apoptozise neden olan ve DNA sentezinin inhibisyonunun artmasına yol açan, belki daha zor tamir edilen daha iri DNA eklentilerinin oluşmasına sebep olur (Wilson ve ark 2002).

Yeni *in-vitro* çalışmalarda, oksaliplatinin aksonal zardaki voltaj kapılı Na^+ kanallarını etkilediği yönünde bulgular bildirilmektedir. Ancak oksaliplatin kaynaklı nörotoksisitenin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (Park ve ark 2009a,b).

1.11. Amaç

Kansere yakalanan kişi sayısı tüm dünyada hızla artmaktadır. Mortalite oranı çok yüksek olan kanserin tedavisi için her geçen gün yeni bir ilaç piyasaya sürülmekte, ancak bu ilaçların bir çoğu sahip oldukları şiddetli yan etkilerden dolayı her hasta için uzun süreli tedavide kullanılamamaktadır. Sisplatin ve oksaliplatin bu duruma örnek gösterilebilir.

Yaklaşık 40 yıldır mide, prostat, akciğer, mesane kanserleri gibi birçok kanser türünde tedavi amaçlı kullanılan sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II), iki klorür ve iki amino grubuyla birleşmiş soy metal bir bileşiktir. Klinikte kötü huylu tümörlere karşı tedavi edici etkisi sıklıkla gözlenmiş bir kemoterapik ajan olan sisplatinin, nefrotoksisite, nörotoksisite, hemolitik üremik sendrom gibi yan etkilerinden dolayı kullanımı sınırlanmıştır. Sisplatinden türetilen oksaliplatin (oxalato (transl-1,2-diamminocyclohexane) platinum (II), OHP), özellikle sisplatine dirençli kanser türlerinde tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Oksaliplatin aynı zamanda ileri derecedeki kolorektal kanser tedavilerinde büyük başarı sağlamıştır. Bununla birlikte oksaliplatin de sisplatinin yan etkilerine benzer birçok yan etkiye sahiptir. Bu yan etkilerden birisi de nörotoksisitedir. Oksaliplatinin uyarılabilirlikte meydana getirdiği artışın, oksaliplatin metabolitlerinin kalsiyumu bağlayarak voltaj kapılı Na^+ kanallarının aktivitesini etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gamelin ve ark 2002, Krishnan ve ark 2006). Oksaliplatin tedavisine maruz kalan hastaların çoğunda periferik nöropati bulgularına rastlanmıştır. Hastaların bazılarında geri-dönebilen akut nörotoksisite görüldüğü gibi diğer bazı hastalarda ise nöropati kronikleşerek geri-dönüşsüz hale gelebilmektedir (Krishnan ve ark 2006).

Klinikte periferik sinirlerden alınan BAP kayıtlarıyla hız ve latans gibi parametreler ölçülerek siniri oluşturan liflerin aktiviteleri belirlenmeye çalışılmaktadır. Ancak bu yöntem, sinir demeti içerisindeki en hızlı lifler dikkate alınarak sinir aktivitesinin belirlenmesi prensibine dayandığından, özellikle erken dönemlerde nöropatinin belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Öte yandan, Bostock ve arkadaşları (1998) tarafından geliştirilen ve non-invazif, hızlı bir yöntem olan Eşik Değer İzleme yöntemi, sinir iletimi hakkında daha detaylı bilgi vermesi açısından, klinikte yaygın olarak kullanılan EMG-temelli yöntemlere üstünlük sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, sinir uyarılabilirliği teknikleri kullanılarak oksaliplatin ve sisplatin nörotoksisitesinin, aksonal iyon kanalı işlevlerinde yaratabileceği değişimleri araştırmaktır. Ek olarak, uyarılabilirlikle ilgili elde edilen verilerin izole sinir iletimi deneylerinden elde edilen verilerle bir arada değerlendirilmesiyle bu iki kemoterapik ajanın, periferik sinir uyarılabilirliğini ve iletim hızını nasıl etkilediğinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Eşik Değer İzleme yönteminin içerdiği ardışık ölçümleri otomatize bir şekilde gerçekleştiren "Qtrac" yazılımı (Bostock ve ark 1998) kullanılarak, 4,5 hafta boyunca ayrı ayrı düzenli şekilde oksaliplatin ve sisplatin enjeksiyonu yapılmış ve bir enjeksiyon yapılmamış (kontrol) sıçan gruplarının kaudal sinirinden *in-vivo* kayıtlar alındı ve bu kayıtların analiziyle iyon kanalı aktiviteleri, zar akımı değişimleri, akson uyarılabilirliği gibi hücresel bilgilerin incelenmesi amaçlandı. Ek olarak, siyatik sinir izole edilerek *in-vitro* sinir iletim ölçümleri vasıtasıyla sisplatin ve oksaliplatinin BAP parametrelerine etkilerinin Eşik Değer İzleme yöntemi sonuçlarıyla bir arada incelenmesi hedeflendi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneyler

Deneylerde 3,5 aylık 38 adet erişkin Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Deneyler süresince sıçanlar 12 saat gündüz, 12 saat gece periyodunda, ad libitum olarak, bir kafeste en fazla 5 tane bulunacak şekilde barındırıldı. Tüm deney hayvanları Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Deney hayvanlarına uygulanmış olan tüm deneysel ve cerrahi işlemler Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu'nun 31.10.2011 tarihli 2011-112 sayılı onayına uygun olarak gerçekleştirildi. Proje tasarlanırken KON, SEF, DEK, OKS, SİS olmak üzere beş denek grubu planlandı. SEF grubuna sisplatinin çözücüsü olan serum fizyolojik; DEK grubuna da oksaliplatinin çözücüsü olan şeker çözeltisi haftada 2 kere olmak üzere 4,5 hafta boyunce intraperitoneal olarak enjekte edilecekti. Ancak bu gruplara dair üçer hayvandan alınan kayıtların KON grubundan anlamlı farkı olmadığı için SEF ve DEK grupları çalışmadan çıkartıldı. Kalan 32 adet hayvanın 8 tanesi enjeksiyon dönemi sırasında, deneysel ölçümler alınmadan önce öldü. Bu sebeple 6 adet KON (etik kurulca izin verilen adet), 9 adet OKS ve 9 adet SİS gruplarında bulunmak üzere çalışma 24 hayvanla tamamlandı.

Oksaliplatin ve sisplatinin uygulama dozları belirlenirken geçmişte yapılan çalışmalar dikkate alındı ancak; (ön çalışmada karşılaşılan) yüksek mortalite (%80) nedeniyle sisplatin dozu haftada 8mg/kg'dan (Joseph ve Levine 2009) 4mg/kg'a düşürüldü (Holmes ve ark 1998). Haftada iki kez olmak üzere 4,5 hafta boyunca OKS grubuna 4mg/kg oksaliplatin, SİS grubuna 2mg/kg sisplatin enjeksiyonu (i.p.) yapıldı; KON grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Hayvanlar her enjeksiyonda tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Son enjeksiyondan sonraki ikinci gün hayvanlar deney laboratuarına alındı ve 8mg/100g ketamin ve 1mg/100g ksilazin kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile anestetize edildi. Anestezi altındayken, yüzeyel kayıt elektrotları yardımıyla hayvanın kuyruğundan (kaudal sinir) eşik değer izleme kayıtları alındı. Eşik değer izleme kaydı tamamlandıktan

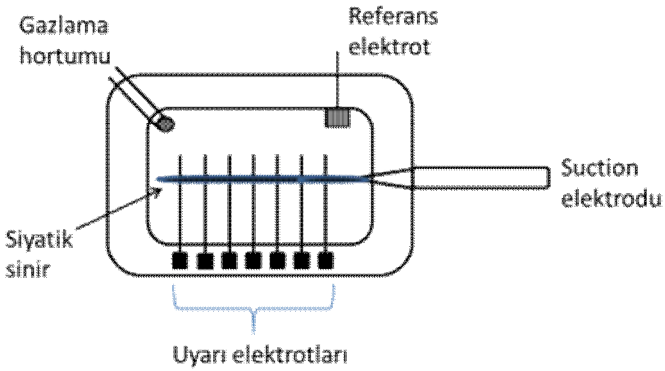
sonra hayvanın ötenazisi servikal dislokasyonla gerçekleştirilerek siyatik sinirin disseksiyonuna geçildi. Disseksiyon işleminde, ameliyat masasına yüzüstü yatırılan hayvanın, kalçasından topuk sonuna kadar kesi oluşturuldu. Çevreleyen kas dokusu tendonlarından kesilmek suretiyle siyatik sinirin tümü görünür hale getirildi. Distal ve proksimal uçlarından tek hamlede cerrahi makas ile kesilerek siyatik sinir izole edildi. Siyatik sinir hızlı bir şekilde fizyolojik sıcaklıkta (37°C) gazlanan (%95 O_2 ve %5 CO_2) taze Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna aktarılarak "*suction*" yöntemiyle BAP kayıtları alındı ve deney sonlandırıldı.

2.2. İzole Sinirden BAP Kayıt ("*Suction*") Yöntemi

2.2.1. Elektrofizyolojik Kayıt Düzeneği

Deneylerde kullanılan düzenek, bir izole organ banyosu, stimülatör (Grass S4), stimulus izolasyon ünitesi (Grass SIU5) ve bir amplifikatör sistemini (Grass CP511) içermektedir. Stimülatör, siniri uyarmak için genliği ve süresi ayarlanabilen pulslar oluşturulmasında, stimulus izolasyon ünitesi ise stimülatörün ürettiği pulsları topraktan bağımsız hale getirmek için kullanılmıştır. Sinirden elde edilen BAP yanıtları, amplifikatör vasıtasıyla yükseltilerek kaydedilmiştir.

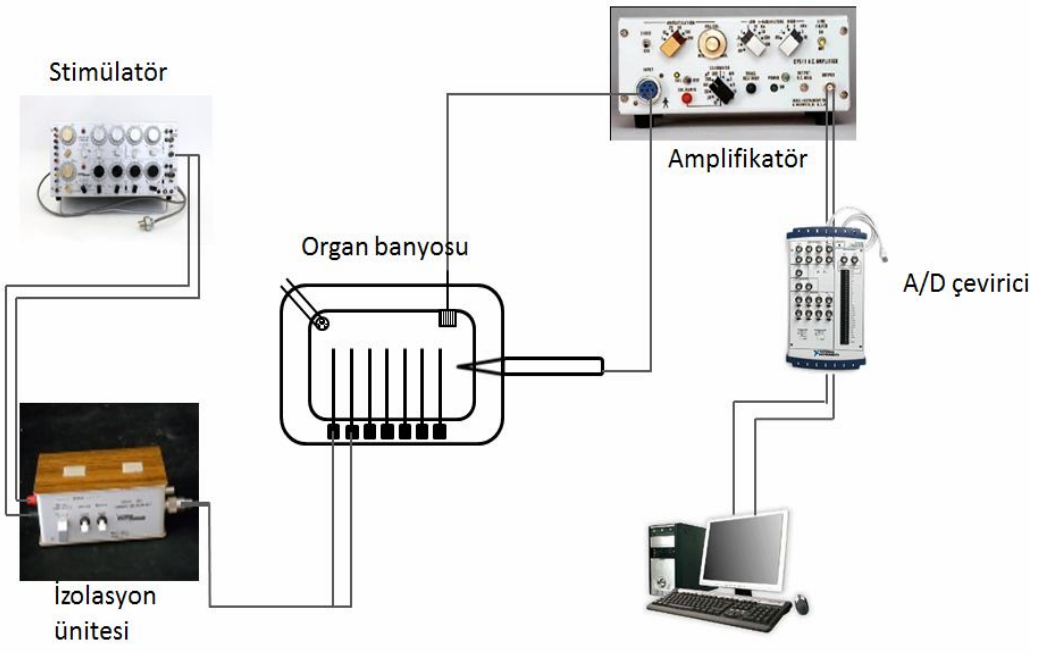
İzole siniri oluşturan hücrelerin canlılıklarının devamlılığı için gereken kimyasalları uygun miktarlarda içerecek şekilde (119 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,8 mM $CaCl_2$; 1,2 mM $MgSO_4$; 1,2mM KH_2PO_4; 20 mM $NaHCO_3$ ve 10 mM glikoz) hazırlanmış ve pH'ı 7.4'e ayarlanmış olan Krebs solüsyonu, sıcaklığı 37°C'de ısıtılmış ve banyo içerisinde perfüze edilmiştir. Aynı zamanda organ banyosunun içinde yer alan solüsyon, %5 O_2 - %95 CO_2 gaz karışımıyla gazlanmıştır. Ag elektrotlar organ banyosuna suction elektrotu hizasında, izole sinirin rahat hareket ettirilebileceği şekilde sabitlenmiştir. Aktif elektrot olarak suction elektrotu kullanılmış, referans elektrot ise sinirle temas etmeyecek şekilde solüsyonun içerisine daldırılmıştır.



Şekil 2.1: Suction elektrodu irtibatlandırılmış organ banyosu şeması.

2.2.2. Suction Yöntemiyle Kayıt Alınması

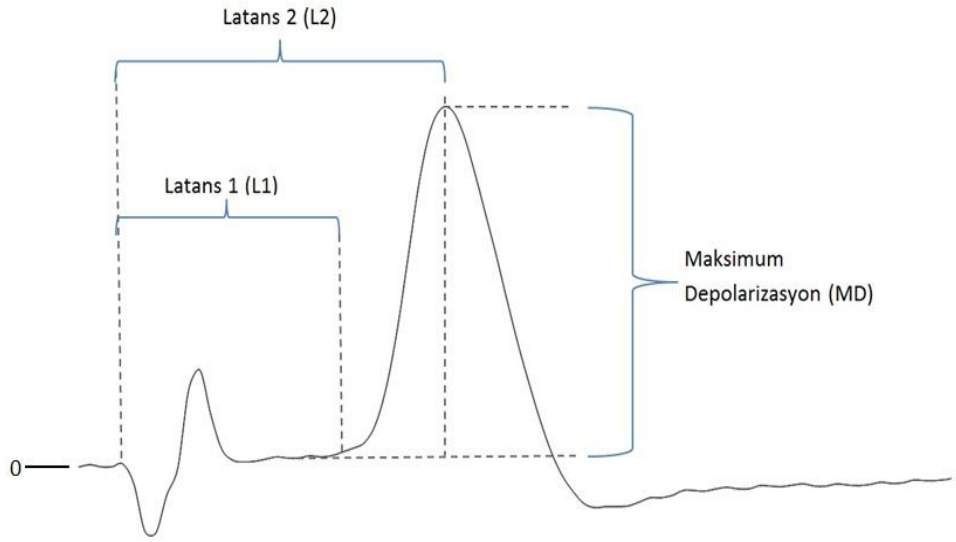
Disseke edilen siyatik sinirler, yıpratılmadan disseksiyonun hemen ardından hızlı bir şekilde organ banyosuna yerleştirildi. İzole sinirin distal ucu negatif basınç uygulanarak, ucu sinir çapına uygun olarak inceltilmiş olan suction elektrodunun (cam) içine çekildi. İzole sinir proksimal ucundan gümüş elektrotlarla uyarıldı ve suction elektrotundan BAP kayıtları alındı. Sinyaller, bir A/D çevirici üzerinden BiosigW programı ile 50 Ksps örnekleme hızında 20,46 ms tarama zamanı olan zaman serileri şeklinde kaydedildi. Tüm kayıtlar Faraday Kafesi içerisinde gerçekleştirilerek elektriksel gürültünün minimum olması sağlandı.



Şekil 2.2: Suction yöntemi ile izole sinirden BAP kayıt düzeneği.

2.2.3. Suction Yöntemiyle Elde Edilen Parametreler

Organ banyosuna alınan siyatik sinirlerin her biri kayıt elektrotuna aynı uzaklıktan (x=20mm) uyarıldı. Reobaz ve kronaksi değerlerini geleneksel yolla belirlemek için uyaran süresi 0,01 ms ile 0,1 ms arasında 0,02 ms'lik adımlarla değiştirilerek BAP yanıtının gözlenmesi için gerekli olan uyaran şiddeti belirlendi. Stimulus artefaktından BAP'ın başlamasına kadar geçen süre Latans1 (L_1), BAP tepe değerine kadar geçen süre ise Latans2 (L_2) olarak adlandırıldı. Buna göre L_1 kullanılarak V_{BAP}, L_2 kullanılarak V_{MD} iletim hızları ve ek olarak MD (maksimum depolarizasyon), BAP alanı ve BAP türevinin maksimum değerine ulaşma süresi ($t_{V_{MAX}}$) hesaplandı. Hesaplanan parametreler örnek bir BAP yanıtı üzerinde Şekil 2.3'te görülmektedir.



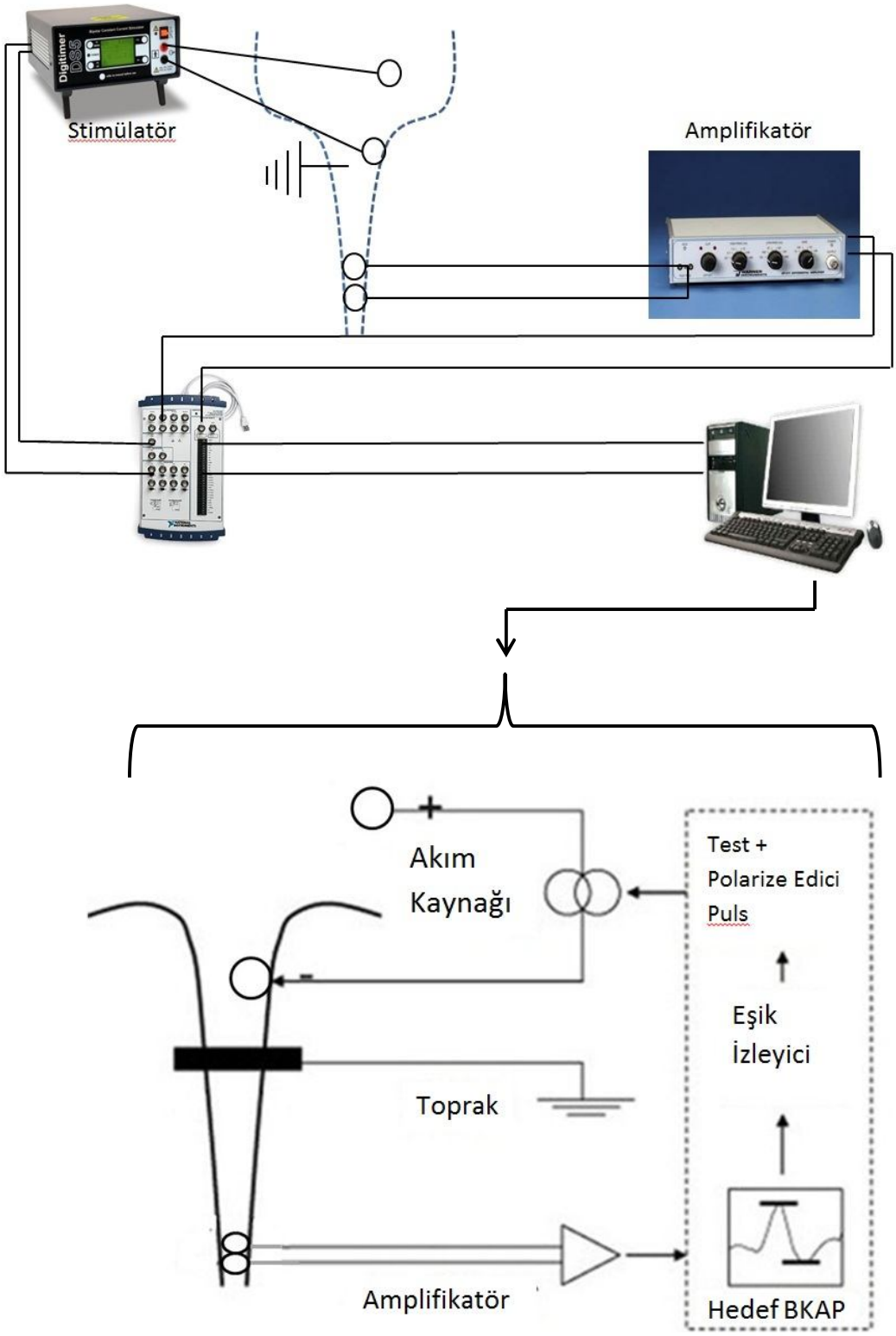
Şekil 2.3: BAP yanıtlarından hesaplanan parametreler.

2.3. Eşik Değer İzleme Yöntemi

2.3.1. Eşik Değer İzleme Yönteminde Kullanılan Cihazlar

Eşik değer izleme yöntemi ile kayıt alınmasında kullanılan sistem bir bilgisayar kontrollü sabit akım stimülatörü (Digitimer DS5), bir elektrofizyolojik amplifikatör (Grass CP511) ve bir veri toplama modülünü (National Instruments USB 6251 BNC)

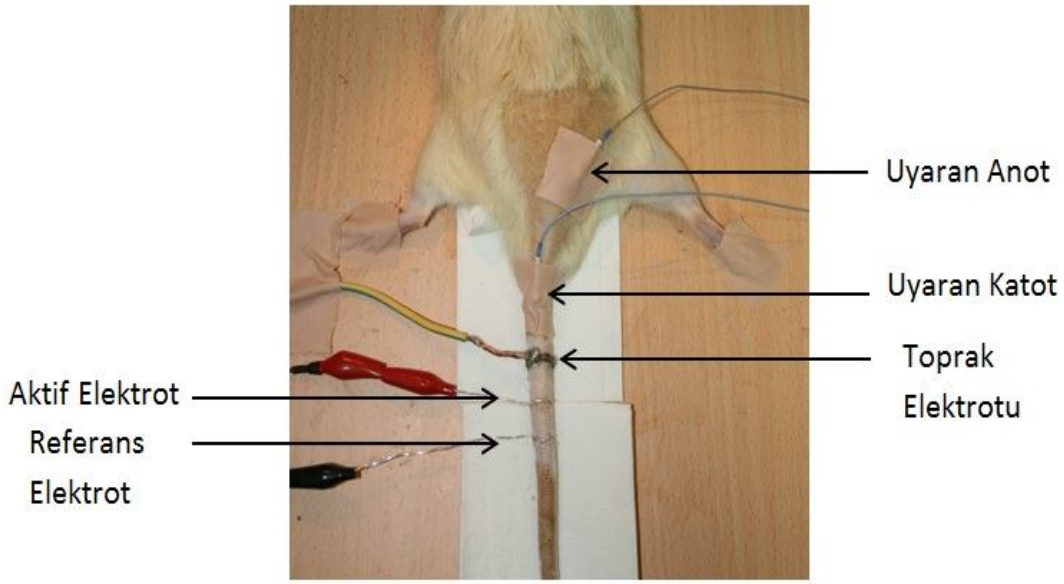
içermekte, sistemin geri-beslemeli kontrolü QtracW yazılımı (Digitimer) vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Sistemin genel görünümü ve çalışma prensibi Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Eşik değer izleme yöntemi genel donanım ve çalışma şeması

2.3.2. Eşik Değer İzleme Yöntemiyle Kayıt Alınması

Anestezi altındaki denekte uyaran ve kayıt elektrotlarının yerleştirildiği bölgeler elektriksel direncin düşürülmesi için tıraş edildi. Uyarım için kullanılan Ag/AgCl yüzey elektrot ve kayıt için kullanılan Ag/AgCl "*ring*" elektrot çiftleri - yüzey empedansını düşürmek amacıyla EKG jeli kullanılarak- yerleştirildi ve kuyruğun proksimalinden verilen uyaranlara ilişkin yanıtlar kaudal sinirin distalinden kaydedildi. Deneylerde toprak elektrotu çevreden kaynaklanabilecek elektriksel gürültüyü azaltmak için uyaran ve kayıt elektrotları arasına yerleştirildi (Şekil 2.5).

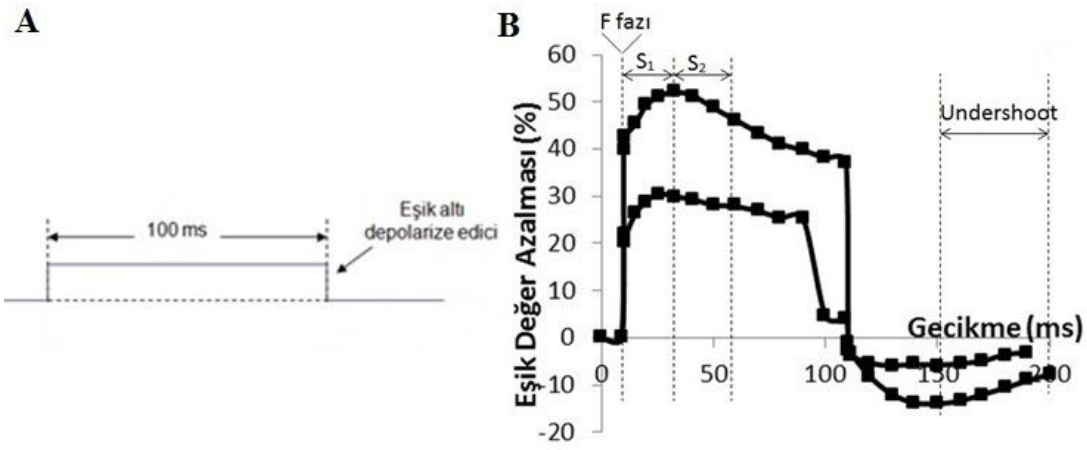


Şekil 2.5: Eşik değer izleme yönteminde elektrotların yerleşimi.

Kayıtlar alınırken TRONDNF/Rodent Regular Trond protokolü kullanıldı. Bu protokolde sırasıyla uyaran-yanıt, eşik elektrotonus, toparlanma döngüsü, akım şiddeti-eşik değişimi (akım-voltaj) ilişkisi ve şiddet-süre zaman sabiti hesaplamaları gerçekleştirildi.

Eşik elektrotonus kaydında uzun süreli (100 ms), eşik altı şiddette, depolarize edici pulslar uygulandı. Bu "*koşullandırıcı*" pulslarına ek olarak, gecikme süreleri gittikçe artacak şekilde ikinci bir "*test*" pulsu uygulandı. Koşullandırıcı ve test pulsları arasındaki farklı gecikme süreleri için eşik değişimleri kaydedildi (Şekil 2.6A).

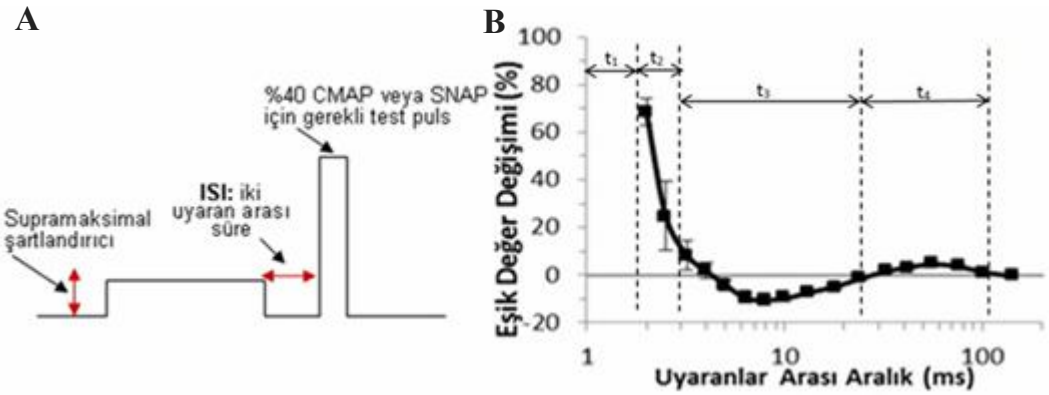
Bir eşik elektrotonus grafiği incelendiğinde, depolarize edici koşullandırıcı pulsunun yanıtının başlangıçta hızlı bir düşüş gerçekleştirdiği görülür. Daha sonra bu düşmenin hızı azalır ve yanıtın ulaştığı bir maksimum değerden sonra eşik değerindeki değişim azalmaya başlar. Maksimum değere ulaşılmasına kadar olan yaklaşık 10-20 ms'lik bu gecikme aralığı S_1 fazı olarak adlandırılmaktadır ve hızlı K^+ kanallarının aktivasyonundan kaynaklanır. Maksimumdan sonraki azalma S_2 fazıdır ve şartlandırıcı pulsunun sonlanmasıyla biter. S_2 fazı, boğum ve boğumlar-arası bölgede bulunan yavaş K^+ kanallarının aktivasyonunun bir sonucudur. Pulsun sonlanması sonrasında eşik değer azalması "*undershoot*" olarak adlandırılan bir çeşit toparlanma sürecinden geçer. Bu dönem ise boğumlar-arası bölgesel zarın pasif repolarizasyonundan kaynaklanmaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 2.6: Elektrotonus eğrilerini elde etmek için kullanılan depolarize edici puls (A). Eşik değer izleme yöntemiyle elde edilen eşik elektrotonus değerleri (+%20; hedef genlik maksimum genliğin +%20'si. +%40; hedef genlik maksimum genliğin +%40'ı) (B).

Şiddet-süre zaman sabitini elde etmek için, TRONDNF protokolüne göre, sırasıyla yükü aynı olan 0,5; 0,4; 0,2; 0,1 ms'lik süreli pulslar uygulandı. Elde edilen yanıtlar ile uyaran yükü-süresi grafiği çizdirildi ve sonrasında Weiss Yasası kullanılarak şiddet-süre zaman sabiti hesaplandı.

Toparlanma döngüsü, 1 ms süreli supramaksimal şartlandırıcı pulsundan kaynaklı olan uyarılabilirlikteki değişimlerin genelini içermektedir. Buna göre, şartlandırıcı pulsu ardından belirli bir süre sonra %40 BKAP yanıtını elde etmek için gereken test pulsu uygulanmış ve pulslar arasındaki gecikme süresi 200 ms'den 2 ms'ye kadar adım adım azaltılarak her bir test pulsu şiddetinin eşiğe göre değişim yüzdesi kaydedilmiştir (Şekil 2.7A).



Şekil 2.7: Toparlanma döngüsü kaydedilirken uygulanan puls protokolü (A), toparlanma döngüsü eğrisi (B).

Şekil 2.7B'de eşik değer izleme yöntemiyle elde edilmiş bir toparlanma döngüsü grafiği görülmektedir. Grafikte t_1 mutlak refrakter dönemi, t_2 bağıl refrakter dönemi, t_3 süpernormal, t_4 ise gecikmiş subnormal dönemleri belirtmektedir.

Akım şiddeti-eşik değişimi ilişkisi kaydedilirken 200 ms süreli bir koşullandırıcı akım ardından 1 ms süreli bir test pulsu uygulandı (Şekil 1.13). Koşullandırıcı akımın genliği eşiğin (BKAP'ın %40'ı) %50'sinden başlayarak -%100'üne kadar %10'luk adımlarla azaltıldı ve bu şekilde eşik azalması yüzdesinin koşullama pulsu şiddetiyle olan ilişkisi elde edildi.

2.3.3. Eşik Değer İzleme Yöntemi'yle Elde Edilen Parametreler Üzerinde Hesaplamalar

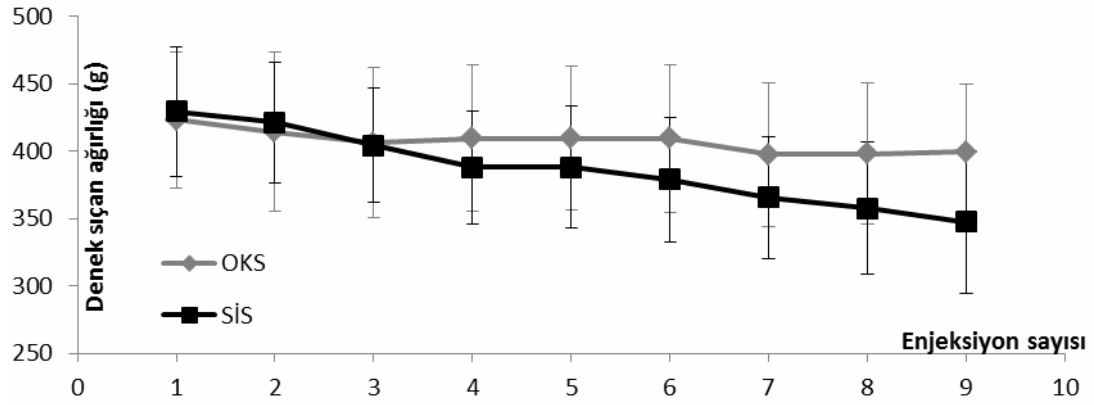
Eşik değer izleme yöntemi TRONDNF protokolüyle elde edilen verilerle dört adet grafik çizdirilmiştir: Eşik elektrotonus, uyaran yükü-uyaran süresi, toparlanma döngüsü, akım şiddeti-eşik değişimi ilişkisi. Uygulanan yüke bağlı uyaran süresi değişimi değerlerine bir doğru oturtularak, bu doğrunun x eksenini kestiği noktadan şiddet-süre zaman sabiti, doğrunun eğiminden reobaz değerleri hesaplanmıştır.

2.4. İstatistiksel Analizler

Verilerin analizinde Microsoft Excel programı kullanıldı. Veri gruplarının normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan gruplar arasındaki farkın belirlenmesi için Tek yönlü ANOVA, ikili gruplar birbiriyle karşılaştırılarak ortalamalar arası farkların belirlenmesi için ise Tukey Post-hoc testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis tek yönlü ANOVA ve sonrasında ikili grupların ortalamalarının birbiriyle karşılaştırılmasında ise Dunn's Post-Hoc testi kullanıldı. Gruplara ait ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık seviyesi ise $p<0,05$ olarak belirlendi.

3. BULGULAR

Haftada iki kere oksaliplatin ve sisplatin enjeksiyonu yapılan her bir hayvanın, enjeksiyon sayısına göre vücut ağırlıklarındaki (g) değişim Şekil 3.1'de verilmiştir. Genel olarak enjeksiyon sayısındaki artışla birlikte sıçanların vücut ağırlığında bir azalma gözlenirken, bu azalmanın SİS grubunda OKS grubuna göre anlamlı olmayan miktarda daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.1).



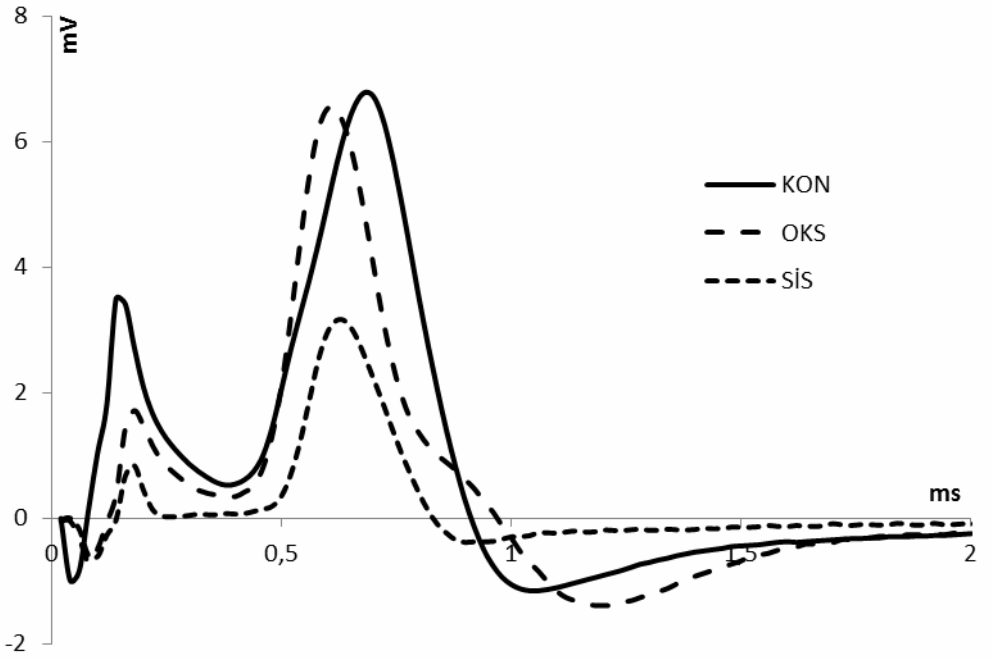
Şekil 3.1: OKS ve SİS gruplarına dahil olan deneklerin vücut ağırlıklarının enjeksiyon sayısına bağlı değişimi.

3.1. İzole Siyatik Sinir Bulguları

İzole sinirden organ banyosu içerisinde "*suction*" elektrodu kullanılarak elde edilen KON, OKS ve SİS gruplarına ait BAP yanıtlarının (kayıt uzaklığı, x=20 mm) birer örneği Şekil 3.2'de verilmiştir. BAP yanıtı öncesindeki düşük genlikli defleksiyonlar (stimulus artefaktı), "*suction*" kayıt sisteminin puls uyaranına olan kapasitif yanıtından kaynaklanmaktadır.

Kaydedilen BAP verileri bilgisayar sabit diskinden geri çağrılarak L_2 latanslarının (Şekil 2.3) analiz edilmesi sonucu elde edilen V_{MD} (m/s) ve maksimum depolarizasyon (MD) ortalamaları (mV) Çizelge 3.1'de verilmiştir. L_1 latansları kullanılarak hesaplanan V_{BAP} (m/s) ve BAP altında kalan alan (mV.ms) ortalama

değerleri ve ek olarak BAP eğrilerinin türev maksimum ($\dot{V}_{max}$) değerine ulaşma sürelerinin (ms) ortalama değerleri her üç deney grubu için Şekil 3.3'te verilmiştir.



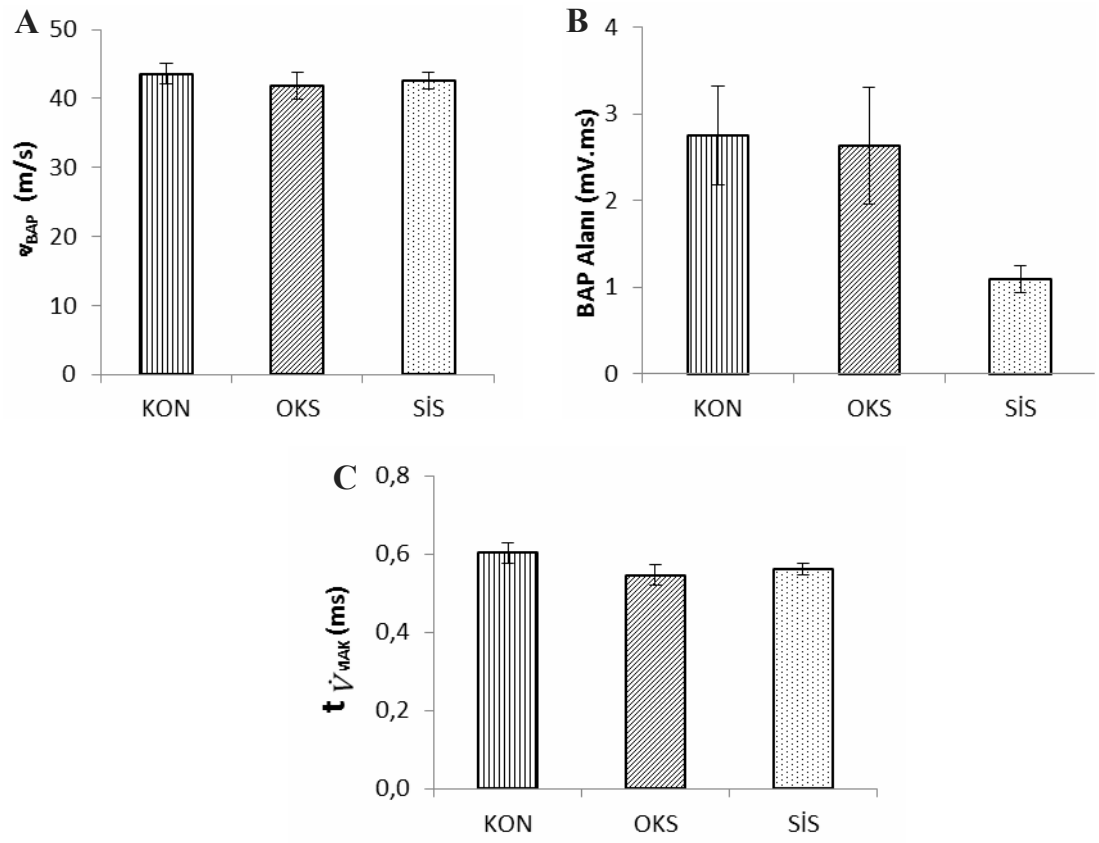
Şekil 3.2: Her gruptan birer deneğe ait örnek BAP yanıtları. BAP yanıtı öncesindeki düşük genlikli defleksiyonlar (stimulus artefaktı), "*suction*" kayıt sisteminin puls uyaranına olan kapasitif yanıtından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 3.1: Suction yöntemiyle elde edilen verilerden hesaplanan parametreler (ortalama±sh). MD: maksimum depolarizasyon değeri (mV). $\dot{V}_{MD}$: MD'yi oluşturan liflerin iletim hızı (m/s).

	KON (N=6)	OKS (N=9)	SİS (N=9)
MD (mV)	4,02±0,96	4,20±1,07	2,33±0,36
$\dot{V}_{MD}$ (m/s)	28,31±1,38	30,54±1,84	28,85±0,87

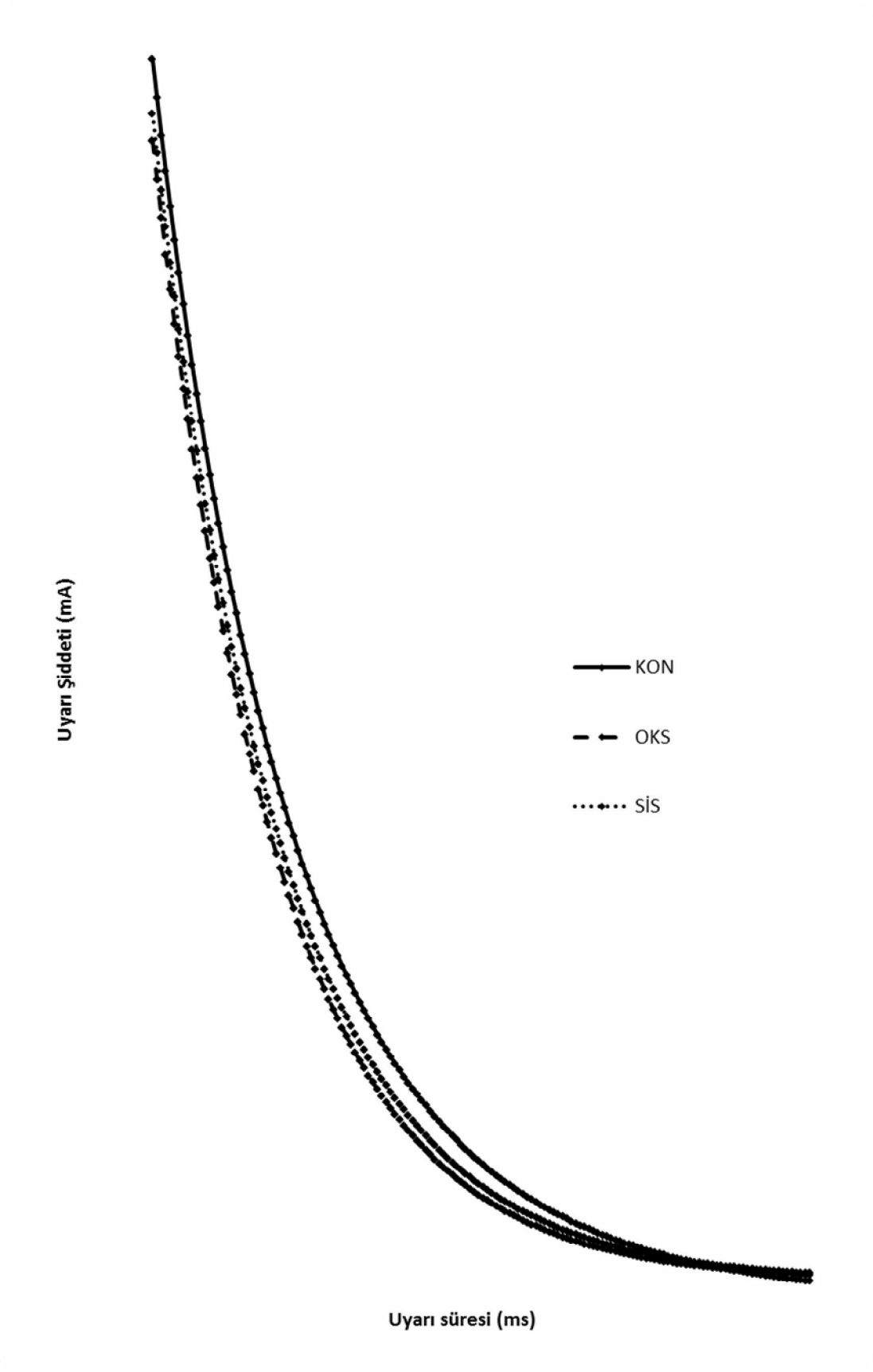
Ortalama MD değerleri karşılaştırmasında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiş olup, SİS grubunda KON grubuna göre yaklaşık %42'lik bir azalma görüldü. OKS grubunda ise KON grubuna göre yaklaşık %4,5'luk artma tespit edildi. Ortalama $\dot{V}_{BAP}$ değeri açısından OKS grubu KON grubuna göre %4,04 azalma gösterirken SİS grubu %2,41'lik azalma gösterdi (Şekil 3.3A). OKS grubunun $\dot{V}_{MD}$ değeri (m/s) KON grubuna göre %7,88'lik bir artış gösterirken SİS grubu %1,91 artış gösterdi. BAP altında kalan alan karşılaştırmasında (Şekil 3.3B) gruplar

arasında anlamlı fark olmadığı görülmektedir. Türev maksimuma ulaşma süresi karşılaştırıldığında ise grupların ortalama değerleri istatistiksel olarak aynıdır (Şekil 3.3C).



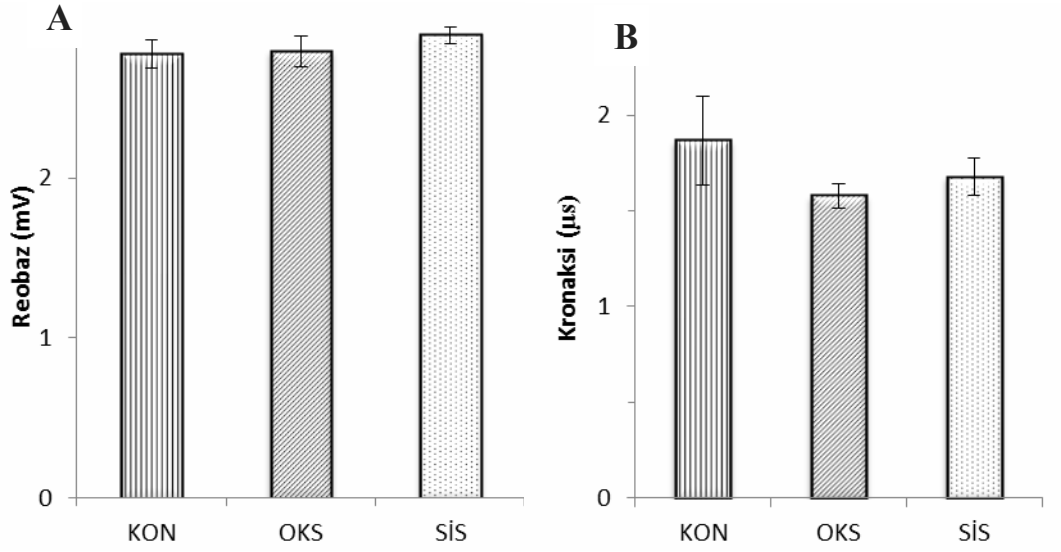
Şekil 3.3: KON, OKS ve SİS için BAP kayıtlarından hesaplanan v_{BAP} (A), BAP alanı (B) ve t_{VMAX} (C) değerleri (ortalama±sh).

Uyaran şiddeti-uyaran süresi eğrilerinden (Şekil 3.4) KON, OKS ve SİS grupları için elde edilen reobaz (mV) ve kronaksi (µs) ortalama değerleri standart hataları ile birlikte Şekil 3.5'te verilmektedir.



Şekil 3.4: KON, OKS ve SİS deney grupları için elde edilen uyaran şiddeti (mA)-uyaran süresi eğrileri (tüm veriler ortalama değerler olarak verilmiştir).

Ortalama reobaz ve kronaksi değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.



Şekil 3.5: KON, OKS ve SİS grupları için reobaz (A) ve kronaksi (B) değerleri (ortalama±sh).

3.2. Eşik Değer İzleme bulguları

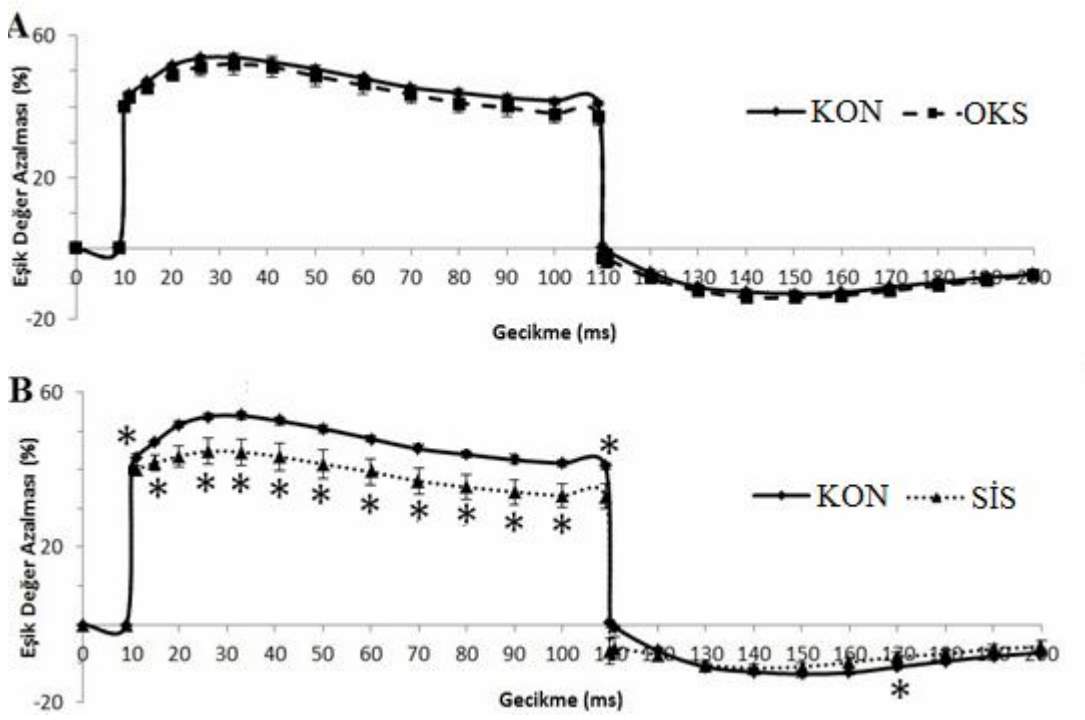
Eşik değer izleme yöntemi ile elde edilen eşik elektrotonus, uyaran yükü-uyaran süresi ilişkisi, akım-eşik ilişkisi ve toparlanma döngüsü eğrilerinden Qtrac yazılımı kullanılarak elde edilen Microsoft Office/Excel programı ile analize tabi tutulmuştur.

Maksimum BAP yanıtının %50 genliğine ulaşmak için gereken uyaranın akım şiddeti her bir denek için gruplara ayrılarak Çizelge 3.2'te verilmektedir.

Çizelge 3.2: KON, OKS ve SİS gruplarında maksimum BAP genliğinin %50'sine ulaşmak için gereken uyaran şiddeti değerleri (*: p=0,008).

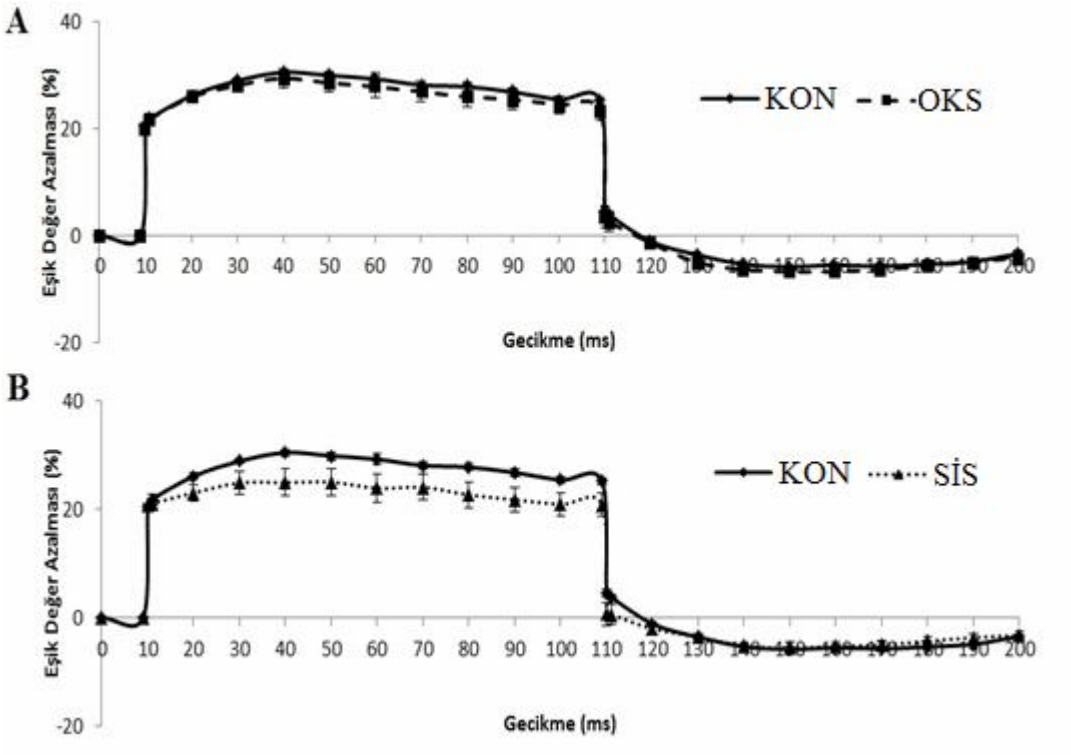
Denek no	Maksimum yanıtın %50'si için gerekli uyaran akımı şiddeti (mA)		
	KON (N=6)	**OKS (N=9)**	**SİS (N=9)**
1	0,85	1,00	1,48
2	1,04	1,31	2,61
3	1,01	1,83	4,31
4	0,99	1,07	1,05
5	0,68	2,52	1,45
6	0,96	1,39	2,16
7		1,19	1,11
8		0,82	1,65
9		1,42	5,40
Ortalama	0,92	1,39	2,36*
St. Hata	0,04	0,16	0,48

Maksimum BAP genliğinin %40'ı referans alınarak depolarize edici şartlandırıcı uyaran için elde edilen eşik elektrotonus eğrileri, SİS ve OKS grupları için KON grubu ile karşılaştırmalı olarak Şekil 3.6'da verilmiştir. Uyarılabilirlikteki değişim, OKS ve SİS gruplarının her ikisi için de uyaranın verildiği 100 ms boyunca ardışık gecikme süreleri için KON grubuna göre azalmış olmakla birlikte, SİS grubundaki azalma hemen hemen tüm gecikme değerleri için istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir ($p<0,05$).



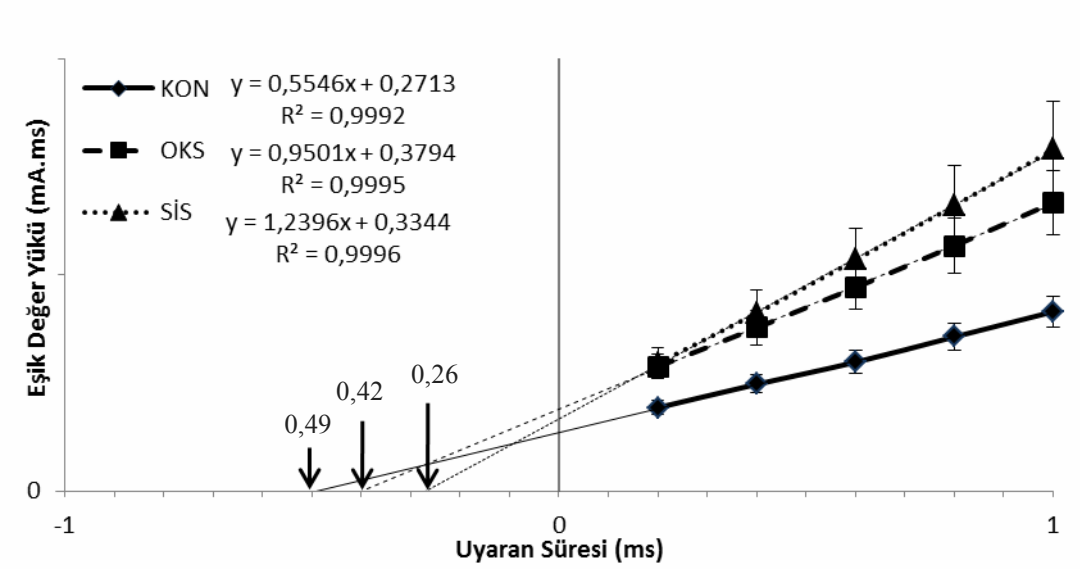
Şekil 3.6: Maksimum BAP genliğinin %40'ı için oluşturulan eşik elektrotonus değişimleri. OKS (N=9) (A) ve SİS (N=9) (B) grupları KON (N=6) grubuyla karşılaştırmalı olarak verilmiştir (ortalama±sh, *: $p<0.05$).

Maksimum BAP genliğinin %20'si referans alınarak depolarize edici koşullandırıcı uyaran için elde edilen eşik elektrotonus eğrileri, SİS ve OKS grupları için KON grubu ile karşılaştırmalı olarak Şekil 3.7'de verilmiştir. KON grubuna göre uyarılabilirlikteki değişim 100 ms'lik uyaran boyunca her iki grupta da azalma yönünde olmaktadır. Uyarılabirlikteki azalma OKS grubuna göre SİS grubunda daha belirgin olmakla birlikte her iki grup için de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

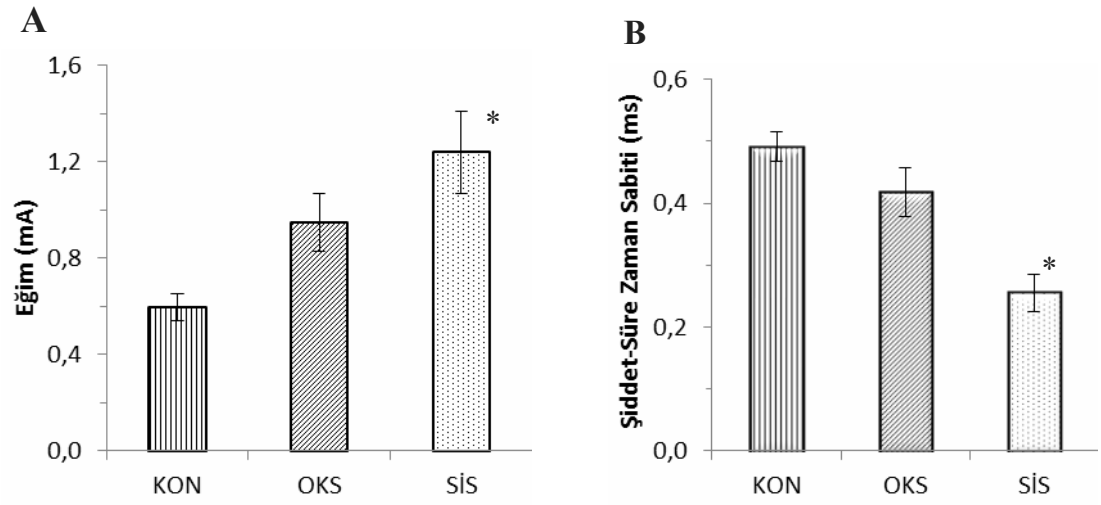


Şekil-3.7: Maksimum BAP genliğinin %20'si için oluşturulan eşik elektrotonus değişimleri. OKS (N=9) (A) ve SİS (N=9) (B) grupları KON (N=6) grubuyla karşılaştırmalı olarak verilmiştir (ortalama±sh).

Gerekli eşik değer uyaran yük miktarının (Coulomb) uyaran süresine bağlı olarak değişimi KON, SİS ve OKS grupları için Şekil 3.8'de verilmiştir. Her bir grubun verilerine birer doğru uydurulduğunda ("*line fitting*"), doğruların eğim ve yatay ekseni kestiği noktaların ifade ettiği reobaz ve şiddet-süre zaman sabitleri hesaplanmış, SİS grubunun reobaz değerinin KON grubuna göre anlamlı derecede azaldığı, şiddet-süre zaman sabitinin ise anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Şekil 3.9)

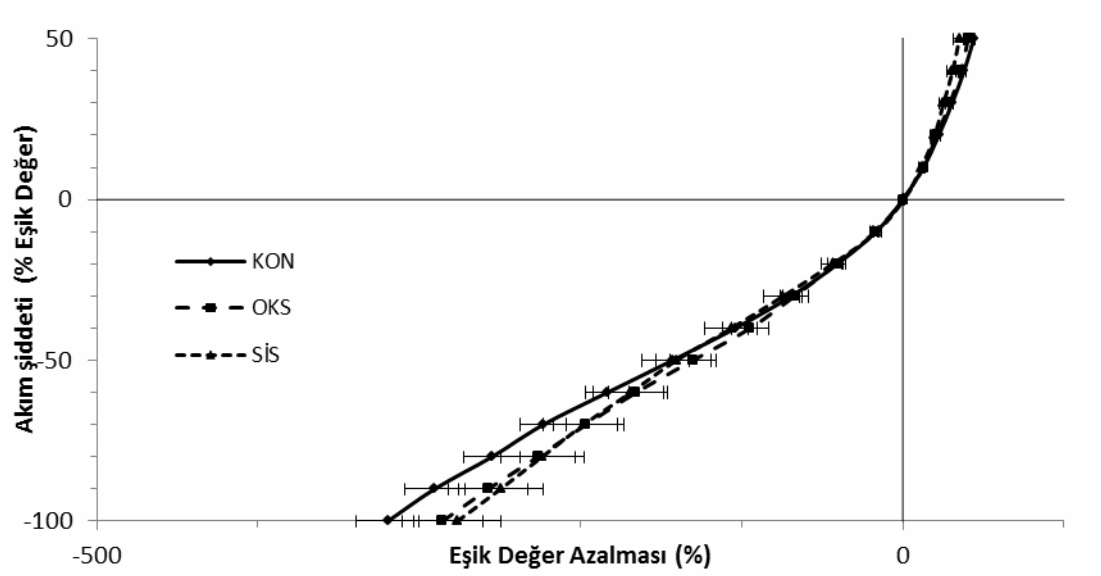


Şekil 3.8: KON, OKS ve SİS grupları için eşik uyaran yük miktarı-uyaran süresi değişimi. Değerler ortalama±sh olarak verilmiştir. Doğru eğimleri reobaz, yatay ekseni kestikleri noktalar ise şiddet süre zaman sabitini vermektedir.



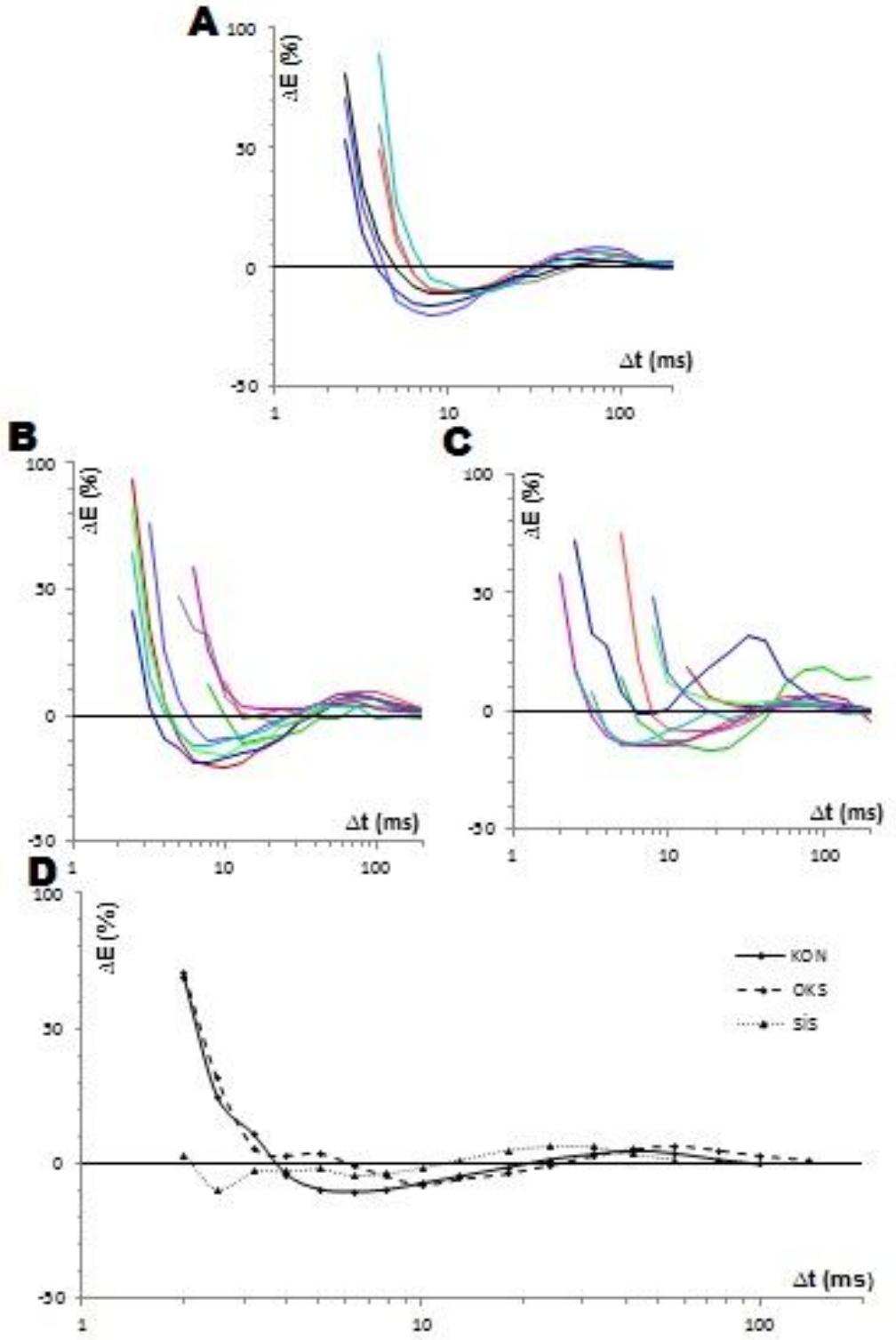
Şekil 3.9: Eşik uyaran yük miktarı-uyaran süresi verilerinden doğru uydurma ("*line fitting*") ile elde edilen eğim (reobaz) (A) ve şiddet-süre zaman sabiti (B) değerleri (ortalama±sh, *: $p<0,05$).

Hücre zarının rektifikasyon özelliğini gösteren akım şiddeti-eşik değer azalması (current-threshold reduction) ilişkisi eğrileri KON (N=6), OKS (N=9) ve SİS (N=9) grupları için Şekil 3.10'da verilmiştir. Değerler %değişim miktarını göstermektedir. Eğrinin yatay eksenin üzerindeki pozitif tarafı zarın dışarı doğrultucu özelliğini, altında kalan negatif tarafı ise içeri doğrultucu özelliğini göstermektedir.



Şekil 3.10: Akım-eşik azalması (current-treshold reduction) ilişkisi. KON, OKS ve SİS grupları eğrileri aynı eksende verilmiştir. Ortalama değerler standart hata ile birlikte çizdirilmiştir.

Zar depolarize edildikten sonra yeniden dinlenime dönünceye kadar olan süreçte uyarılabilirlikteki değişimi gösteren toparlanma döngüsü eğrileri Şekil 3.11'de görülmektedir.



Şekil 3.11: KON (A), OKS (B), SİS (C) gruplarında yer alan denekler için (zar depolarize edildikten sonra yeniden dinlenime dönünceye kadar olan süreçte uyarılabilirlikteki değişimi gösteren) toparlanma döngüsü eğrileri, her üç grubun kendi içindeki ortalamaları (D; farklı veri noktaları farklı serbestlik dereceleri içerdiğinden hata çubukları verilmemiştir). Tüm grafiklerde ΔE eşik değer değişimini, Δt uyaranlar arası süreyi ifade etmektedir.

4. TARTIŞMA

Supramaksimal uyaranla periferik sinirden kaydedilen BAP analizi, periferik sinir hastalıklarının tanısı ve sinirin işlevsel durumu hakkında bilgi vermesi açısından oldukça önem taşımaktadır (Schoonhoven ve ark 1986a,b, Weerasuriya 1990). Bununla birlikte BAP kayıtları bireysel nöron özellikleri yanında nöronların organizasyon biçimine ve gözlem koşullarına da bağlıdır. Bu nedenlerle BAP biçiminin analiz ve yorumlanması tek hücre aksiyon potansiyellerine göre daha büyük zorluklar gösterir (Gu ve ark 1996, Wijesinghe ve Wikswo 1991, Dalkılıç 1999). Kayıt yöntemlerine dayalı belirsizlikleri minimuma indirmek için genellikle yüzeyel elektrot yerine izole sinirden BAP kaydı tercih edilir.

BAP kayıtlarının çok yönlü analizi yanında, bu kayıtlar kullanılarak sinirin uyarılabilirlik parametrelerinin belirlenmesine ilişkin yöntemler de uzun yıllar güncelliğini korumuştur. Uyarılabilirlik parametrelerinin belirlenmesinde son yıllarda tercih edilen Eşik Değer İzleme (Threshold Tracking) yöntemi önemli avantajlar sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında Eşik Değer İzleme Yöntemi ve geleneksel BAP kayıt yöntemleri kullanılarak günümüzde yaygın olarak kullanılan kemoterapik ajanlardan sisplatin ve oksaliplatinin izole siyatik siniri ve kuyruk kaudal siniri iletim ve uyarılabilirlik parametreleri üzerinde oluşturacakları etkiler karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Oksaliplatin ve sisplatin uygulanan sıçanlarda enjeksiyon sayısı arttıkça her iki grubun vücut ağırlıklarında azalma olmakla birlikte, SİS grubu sıçanlarda kaybın daha hızlı olduğu görülmektedir (Şekil 3.1).

4.1 Oksaliplatinin ve Sisplatinin İzole Sinir BAP Parametreleri Üzerindeki Etkileri

İzole sinirlerden her üç grup (KON, OKS ve SİS) için kaydedilen BAP eğrileri karşılaştırıldığında, sisplatinin BAP genliğini belirgin biçimde küçülttüğü, süresini

azalttığı, oksaliplatinin ise BAP eğrisinin iniş fazında değişime neden olduğu görülmektedir (Şekil 3.2). Ortalama MD (mV) değerleri açısından OKS grubu KON grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermezken, SİS grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ciddi bir azalma (%42) görülmektedir. Maksimum depolarizasyonu oluşturan liflerin iletim hızları ($\mathcal{V}_{MD}$) karşılaştırıldığında OKS ve SİS gruplarının hızlarında az da olsa artış (sırasıyla %7.88 ve %1.91) görülmektedir (Çizelge 3.1). BAP'ın maksimum depolarizasyona ulaştığı andaki değeri, sinir demetini oluşturan lifler arasında en büyük orana sahip lif gruplarının toplam katkısı olarak düşünülebilir. Dolayısıyla $\mathcal{V}_{MD}$'deki bu artış, hızlı ileten lif grubunun katkısının orta gruba kaymasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir (Hirose ve ark 1986, Dalkılıç ve Pehlivan 2002a).

BAP'ın başlangıç kısmı, sinir demeti içerisinde bulunan lif gruplarından en yüksek iletim hızına sahip grupların aktivitesine karşılık gelmektedir (Tuncer ve ark 2011). Bu lifler hakkında bilgi elde edebilmek amacıyla, puls artefaktı başlangıcından BAP başlangıcına kadar geçen süre (L_1) kullanılarak her üç grup için hesaplanan $\mathcal{V}_{BAP}$ değerleri arasında fark bulunmamıştır (Şekil 3.3A). Bu sonuç bize her iki nörotoksik ajanın da demet içerisindeki en hızlı ileten liflerin Şekil 1.6'da bahsedilen pasif zar özelliklerini (R_m, C_m) anlamlı düzeyde etkilemediğini göstermektedir.

Bir BAP eğrisi, sinir demetini oluşturan her bir lifin aksiyon potansiyellerinin tek tek katkılarıyla oluşur (Cummins ve ark 1979a,b; Gu ve ark 1996). Bu nedenle BAP eğrisi altında kalan alan, o anda aktif durumdaki liflerin sayısı hakkında bilgi verir. KON grubu ile karşılaştırıldığında OKS grubu BAP alanları farklılık göstermez iken, SİS grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte önemli bir azalmanın olduğu görülmektedir (Şekil 3.3B). Sisplatinin hızlı ileten lif grubunu anlamlı olarak etkilemediği bilindiğine göre alandaki azalmanın nispeten orta ve yavaş ileten lif gruplarını bloke ettiğini göstermektedir.

BAP'ın türev maksimum değerine ulaşma süresi ($t_{V_{MAK}}$: ms) hızlı ileten lif grubunun aktivitesi hakkında bilgi verir. Dolayısıyla, bu sürenin uzaması hızlı ileten liflerin depolarizasyon hızının düştüğü anlamına gelir (Dalkılıç ve ark 2002b). Şekil3.3C'de görüldüğü gibi tüm gruplar için $t_{V_{MAK}}$ ortalama değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Gruplar arasında fark olmaması, oksaliplatin ve sisplatinin belirtilen nörotoksik ajan doz değerleri için (oksaliplatin 8 mg/kg/hafta, sisplatin 4 mg/kg/hafta) hızlı ileten lif gruplarının iletim parametrelerinin anlamlı derecede etkilenmediği bulgumuzu desteklemektedir.

Eşik uyaran şiddeti-uyaran süresi eğrileri sinir demeti içindeki en hızlı ileten lif grubunun uyarılabilirliğinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu eğrilerden elde edilen reobaz (mV) ve kronaksi (ms) parametreleri sinir uyarılabilirliğinin bir göstergesidir. Şekil 3.4'te KON, OKS ve SİS grupları için eşik şiddet-uyaran süresi eğrileri aynı eksende verilmiştir. Hem OKS hem de SİS grubuna ait eğrilerin KON grubu eğrisinden ayrışmadığı görülmektedir. Her üç grup için bu eğrilerden elde edilen ortalama reobaz ve kronaksi değerleri arasında, Şekil 3.5A ve 3.5B'te görüldüğü üzere, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Reobaz ve kronaksi değerleri, uyarılabilirliği en yüksek yani en hızlı ileten lif grubu hakkında bilgi verdiği için, gruplarda anlamlı fark olmaması beklenilen bir durumdur. Dolayısıyla, önceki verilerle uyumlu olarak bu reobaz ve kronaksi değerlerinde gruplar arasında anlamlı farkın bulunmaması, V_{BAP} ve $t_{V_{MAK}}$'a ilişkin bulgularımızı desteklemektedir. Bu sonuç bize oksaliplatin ve sisplatinin belirtilen dozunun hızlı ileten lif grupları üzerinde anlamlı bir etki yaratmadığını göstermektedir.

İzole sinir bulguları, oksaliplatinin 8 mg/kg/hafta doz değerinin, siyatik sinirini oluşturan tüm hız gruplarına ait liflerde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını, sisplatinin 4 mg/kg/hafta doz değerinin uyarılabilirliği yüksek lif grubunda anlamlı etkisi olmaz iken, orta ve yavaş ileten gruplardaki etkisinin ise daha belirgin olduğunu göstermektedir.

4.2. Oksaliplatinin ve Sisplatinin Eşik Değer İzleme Yöntemi Parametreleri Üzerindeki Etkileri

Eşik değer izleme yöntemi, sinirin uyarılabilirlik özelliklerinin kısa sürede ve non-invazif şekilde belirlenebilmesini mümkün hale getirmesi nedeniyle son yıllarda nörobiyofizik ve klinik nöroloji alanlarına yeni bir dinamizm getirmiştir (Nodera ve Kaji 2006, Bostock ve ark 1998).

Sıçan kaudal sinirinde eşik değer izleme yöntemi uygulaması ile maksimum BAP genliğinin %50'sini elde etmek için gerekli uyaran akımı şiddeti demet içerisindeki orta grup liflerin eşiğinin belirlenmesi açısından önemlidir. KON, OKS ve SİS gruplarındaki her bir denek için bulunan akım şiddet değerleri Çizelge 3.2'te görülmektedir. Bu değerlerden, gerekli ortalama akım şiddetinin, hem OKS hem de SİS grubunda KON grubuna göre arttığı anlaşılmaktadır. SİS grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,008$) görülmektedir. Bu sonuç izole siyatik siniri bulguları ile de örtüşmektedir.

4.2.1 Eşik Elektrotonus Eğrileri

Eşik altı ve uzun süreli (100 ms) koşullandırıcı bir uyaran etkisindeki aksonda boğumlararası bölge polarize olur ve dolayısıyla zarda uyarılabilirlik artar (Nodera ve Kaji 2006). Koşullandırıcı uyaran (depolarizasyon yönünde) süresince ve sonrasındaki süreçte uyarılabilirlik değişimi, maksimum BAP genliğinin %40 ve %20'sini oluşturmak için gerekli 1 ms süreli test uyaranın şiddeti ölçülerek elde edilebilmekte, eşik elektrotonus eğrileri (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7) oluşturulabilmektedir. Maksimum genliğin %40'ı için elde edilen elektrotonus eğrisi orta grup liflerin uyarılabilirliğini gösterirken, %20 için elde edilen elektrotonus eğrisi hızlı ileten lif grubuna ait uyarılabilirliği göstermektedir (Bostock ve ark 1998). Maksimum %40'ı için OKS grubu eşik elektrotonus eğrisi KON grubu eğrisi ile karşılaştırmalı olarak çizdirildiğinde (Şekil 3.6A), tüm koşullandırıcı uyaran süresince ve sonrasında OKS grubu uyarılabilirlik eğrisinin KON grubu eğrisinden

ayrışmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, SİS grubu eğrisi, 100 ms koşullandırıcı uyaranın hemen hemen tümü süresince KON eğrisi değerlerinden anlamlı olarak farklılık göstermekte, bu da uyarılabilirliğin azaldığı anlamına gelmektedir (Şekil 3.6B). Elektrotonus eğrisinin yaklaşık 0-20 ms aralığından (Şekil 2.6B, S1 fazı) hızlı K^+ kanalı aktivitesi, 20-50 ms sürecinde (S2 fazı) ise yavaş K^+ kanalı aktivitesinin etkin olduğu ve uyarılabilirliğe sınırlama getirdiği bilinmektedir (Nodera ve Kaji 2006). Dolayısıyla uyarılabilirlikteki azalma, sisplatinin K^+ kanallarından ziyade zarın diğer pasif özelliklerini etkilemiş olabileceğini göstermektedir.

Depolarize edici koşullandırıcı pulsun ardından hedef genliğin %20'si için elde edilen eşik elektrotonus eğrileri, çapı daha büyük, uyarılabilirliği daha yüksek, yani hızlı ileten lif gruplarının aktiviteleri hakkında bilgi verir. OKS için elde edilen %20 elektrotonus eğrisi KON grubu için elde edilen eğri ile tamamen aynı seyri izlemektedir. SİS grubu %20 eğrisinin değerleri KON grubu değerlerine göre azalma gösterse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu sonuç sisplatinin hızlı ileten lif gruplarının pasif zar özellikleri üzerinde orta hızda ileten lif gruplarındaki kadar etkili olmadığını göstermektedir. Bu durum, (hızlı ileten lif grubunda lif çaplarının daha büyük olması nedeniyle) nörotoksik ajanın birim yüzeydeki etkisinin nispeten düşük çaplı liflere göre daha az olması şeklinde açıklanabilir.

4.2.2 Uyaran Yükü – Uyaran Süresi Eğrileri

Hedef seçilen maksimum BAP yanıtının %40 değerini elde etmek için gerekli akım şiddetinin (mA) uygulanan akım süresine (ms) bağlı değişim eğrisi yine orta hız grubu için şiddet-süre zaman sabiti ve reobaz değerlerini verir (Bölüm 1.9.2). Orta hız grubundaki sinirler için bu değerleri geleneksel izole sinir kayıt yöntemiyle ölçmek mümkün değildir. Her üç grup için elde edilen ortalama uyaran yük (μC)-uyaran süresi (ms) eğrileri Şekil 3.8'de görülmektedir. Doğruların yatay ekseni kestiği değerler (şiddet-süre zaman sabitleri), her üç grup için de farklı değerlerden oluşmaktadır (Şekil 3.9B). Bu farklılık KON grubu ile karşılaştırıldığında OKS grubu için anlamlı değil iken SİS grubu için anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Sisplatinin şiddet-süre zaman sabiti değerini azaltması, zarın uyarılabilirliğini azalttığını göstermektedir. Benzer şekilde, doğruların eğim (reobaz) değerleri KON ile karşılaştırıldığında da SİS grubu için anlamlı iken OKS grubu için anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.9A). Reobazın voltaj bağımlılığının, eşik yakınlarında aktif halde bulunan, ve hızlı aktive olması yanında yavaş inaktive olma özelliği gösteren, sürekli Na^+ kanallarından kaynaklandığı bilinmektedir (Clay 2003, Meisler ve Kearney 2005). Sürekli Na^+ kanallarından geçen akım miktarının artması_reobaz değerinin azalmasına neden olur. Reobazın anlamlı derecede artması, orta hız grubu sinirlerde sisplatinin Na^+ kanalı aktivitelerini de etkilediğini göstermektedir.

4.2.3 Akım Şiddeti- Eşik Değer Azalması (I-V) Eğrileri

Eşik izleme yönteminin bu protokolü ile dolaylı olarak zarın akım şiddeti-eşik değişimi karakteristiği, rektifikasyon (doğrultucu) özelliği ile ilgili bilgi elde edilir. Depolarizasyon sırasında akımın pozitif yöndeki değişimi dışarı doğrultucu K^+ kanal özelliğini gösterirken, hiperpolarizasyon sırasındaki negatif yönlü değişim ise içeri doğrultucu K^+ kanal özelliğini gösterir. Şekil 3.10'daki I-V eğrisinde zarın depolarizasyonu esnasında eğriler arasında fark görülmezken, yüksek hiperpolarizasyon değerlerinde hem OKS hem de SİS grubu KON grubundan ayrılmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu sonuç bize hem oksaliplatin hem de sisplatinin orta hızda ileten lif gruplarındaki dışarı doğrultucu ve içeri doğrultucu K^+ kanallarını anlamlı olarak etkilemediğini göstermektedir.

4.2.4 Toparlanma Döngüsü ("Recovery Cycle") Eğrileri

Sinir supramaksimal uyaranla depolarize edildikten sonra, zarın yeniden dinlenime dönünceye kadar uyarılabilirliğindeki değişim sürecinin gözlendiği bu protokolde, deneklere ait eğrilerin serbestlik dereceleri farklılık gösterdiğinden KON, OKS ve SİS gruplarının tüm toparlanma döngüsü eğrileri aynı eksende ayrı ayrı (Şekil 3.11A, 11B, 11C) verilmiştir. Serbestlik derecesindeki farklılık nedeniyle OKS ve SİS gruplarının ortalama değer eğrilerinde oluşan biçim bozukluğu, eğrileri yorumlama zorluğu getirmiştir (Şekil 3.11D). Buna rağmen eğriler incelendiğinde,

OKS grubu eğrisinin KON grubu eğrisi ile benzer seyri gösterdiği görülmektedir. Şekil 2.7B'de t_1 olarak adlandırdığımız süreçte, zar mutlak refrakter dönemde (tüm Na^+ kanalları açık), t_2 sürecinde ise bağıl refrakter dönemdedir. OKS grubu ve KON grubunun t_1 ve t_2 (Şekil 2.7B) süreçlerinde benzer seyirlere sahip oldukları, SİS grubunun ise KON grubundan tamamen ayrıştığı görülmüştür. Uyarılabilirliğin arttığı ve süpernormal dönem olarak adlandırılan t_3 sürecinde ise uyarılabilirliğin SİS grubunda azaldığı anlaşılmaktadır. Süpernormal dönemde Na^+ kanallarının rolünün olduğu bilindiğine göre sisplatinin Na^+ kanallarını etkilediği söylenebilir (Nodera ve Kaji 2006, George ve Bostock 2007). Uyarılabilirliğin nispeten azaldığı t_4 sürecinde ise OKS grubu KON grubu ile benzer eğriyi izlerken, SİS grubu eğrisinde ise t_4 süreci KON grubuna kıyasla sola kaymıştır. Bu dönemde yavaş K^+ kanalları aktif olduğundan, sisplatinin bu kanalların aktivasyonunu geciktirdiği anlaşılmaktadır.

4.3 Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasında, iki kemoterapik ajan olan oksaliplatin ve sisplatinin sinir iletim ve uyarılabilirlik parametrelerine etkileri hem izole siyatik sinirden BAP kayıtlarının numerik analizi, hem de kuyrukta kaudal sinirden yüzeyel elektrot eşik değer izleme yöntemi ile araştırıldı. Oksaliplatinin 8 mg/kg/hafta doz değerinin 4,5 hafta uygulanmasının hem hızlı hem de nispeten yavaş ileten lif gruplarında iletim ve uyarılabilirlik parametrelerinde her iki yöntemden elde edilen bulgularda anlamlı değişime neden olmadığı görülmüştür. Ancak sisplatinin 4 mg/kg/hafta doz değerinin 4,5 hafta uygulanması (8 mg/kg/hafta doz değeri çalışma açısından önemli sayıda sıçan ölümlerine neden olmuştur) hızlı ileten liflerin iletim parametrelerinde anlamlı değişimlere neden olmasa da, orta ve yavaş ileten lif gruplarının anlamlı derecedeki iletim bloğuna ve uyarılabilirlik parametrelerinin bozulmasına neden olmaktadır. Sisplatinin aşırı kilo kaybına da neden olduğu düşünüldüğünde zorunlu olmayan durumlar hariç, oksaliplatin ajanı sisplatine tercih edilmelidir.

Hacim iletken özelliklerinden kaynaklanan bilgi kayıplarını önlemek için tercih edilen izole sinir BAP kayıtlarının numerik analizi önemli bilgiler sağlasa da

çalışılan hayvanın sakrifiye edilme zorunluluğu ve izole sinir kaydına uygun organ banyosu hazırlanması gibi gereklilikler yöntemi zorlaştırmaktadır.

Özellikle bu durumların ön planda olduğu çalışmalarda, eşik değer izleme yöntemi, yüzeyel elektrotlarla hem insan hem de hayvan çalışmalarına uygun olması, non-invazif olmasına rağmen sinir veya kas zarının pasif özellikleri ve zardaki kanalların tür ve aktiviteleri hakkında bilgi vermesi, istenilen hız gurubundaki liflerin tüm uyarılabilirlik özelliklerini sağlayabilmesi açılarından sıklıkla tercih nedeni olabilir.

5.ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Oksaliplatin ve Sisplatinin Sıçan Periferal Sinir Uyarılabilirlik ve İletim Parametrelerine Etkilerinin Karşılaştırmalı Araştırılması

İlksen Burat

Biyofizik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2013

Bu tez çalışmasında, günümüzde yaygın olarak kullanılan kemoterapik ajanlardan sisplatin (SİS) ve oksaliplatinin (OKS) sıçan izole siyatik siniri ve kuyruk kaudal sinirinin iletim ve uyarılabilirlik parametreleri üzerinde oluşturduğu etkiler karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Deneylerde 38 adet Wistar albino türü erkek sıçan, kontrol (KON, N=6), oksaliplatin (OKS, N=9) ve sisplatin (SİS, N=9) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Dört buçuk hafta süresince OKS grubuna 8 mg/kg/hafta oksaliplatin, SİS grubuna 4 mg/kg/hafta sisplatin verilirken KON grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. SİS grubu sıçanlarda KON ve OKS grubuna göre önemli miktarda kilo kaybı gözlendi

Enjeksiyon sonrasında ilk olarak, sıçanların kuyruk kaudal sinirinden eşik izleme ("threshold tracking") yöntemi ile uyarılabilirlik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla sırasıyla şiddet-süre zaman sabiti, akım-eşik azalması ("current-threshold reduction"), eşik elektrotonus, toparlanma döngüsü ("RC: recovery cycle") incelemelerini içeren bir kayıt protokolü uygulandı. Eşik izleme kayıtlarını takiben her bir sıçan sakrifiye edildi ve siyatik siniri izole edilerek bileşik aksiyon potansiyeli (BAP) kayıtları alınmak üzere "suction" kayıt sistemi fizyolojik koşulların sağlandığı (37 °C, pH=7,4) izole organ banyosuna alındı ve proksimal tarafından 1 ms süreli izole puls uyaran ile uyarılarak, distal ucundan "*suction*" pipeti ile BAP kayıtları alındı.

BAP alanı, maksimum depolarizasyon (MD), MD iletim hızı gibi BAP parametrelerinde KON grubuna göre SİS grubunda anlamlı düzeyde farklılıklar gözlenmiştir ($p<0,05$). Her iki kemoterapik ajan için en hızlı ileten lif grubunun iletim hızlarında, maksimum türev değerine ulaşma

süresi ($t_{V_{MAK}}$), reobaz ve kronaksi değerlerinde anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu izole sinir bulguları, sisplatinin orta ve yavaş ileten lif gruplarında anlamlı değişimlere neden olduğunu göstermiştir.

Eşik izleme yöntemi ile maksimum BAP genliğinin % 40'ı için elde edilen eşik elektrotonus eğrilerinin karşılaştırılmasında yine SİS grubu KON grubuna göre anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. Bu sonuç, sisplatinin orta grup liflerin pasif zar özelliklerinde anlamlı düzeyde etkileri olduğunu göstermektedir. BAP genliğinin %20'si için elde edilen eşik elektrotonus eğrilerinde ise ajanların ikisi için de fark bulunmamış, bu sonuç ajanların hızlı ileten lif grubuna herhangi bir etkisi olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Eşik izleme yöntemi ile maksimum BAP genliğinin %40'ı için eşik yük değeri-uyaran süresi, eşik akım şiddeti-eşik değer azalması ve toparlanma döngüsü eğrilerinin analizi sonucunda yine SİS grubu, tüm uyarılabilirlik parametreleri açısından anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

Elde edilen tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde sisplatin ve oksaliplatinin belirtilen doz değerlerinin, hızlı ileten liflerin iletim ve uyarılabilirlik parametrelerinde anlamlı değişimlere neden olmadığı, bununla birlikte yalnızca sisplatinin orta ve yavaş ileten lif gruplarının iletiminin tamamen blokajına ve uyarılabilirlik parametrelerinin bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir. Sisplatinin önemli düzeyde kilo kaybına da neden olduğu düşünüldüğünde, bu tez çalışmasında detaylı şekilde incelenmiş olan nörotoksik yan etkiler açısından, oksaliplatin ajanının tercih edilmesi uygun olacaktır.

Eşik izleme yöntemi, yüzeyel elektrotlarla hem insan hem de hayvan çalışmalarına uygun olması, non-invazif şekilde sinir veya kas hücresine ait zar pasif özellikleri, kanalların tür ve aktiviteleri hakkında bilgi vermesi, istenilen iletim hızı gurubundaki liflerin tüm uyarılabilirlik özelliklerini sağlayabilmesi nedeniyle sinir elektrofizyolojisiyle ilgili pek çok çalışmada tercih edilebilir.

Anahtar Sözcükler: Bileşik aksiyon potansiyeli, eşik-izleme yöntemi; sıçan siyatik siniri; sisplatin, oksaliplatin; "*suction*" yöntemi.

6.SUMMARY

Investigation Of Comparative Effects Of Oxaliplatin And Cisplatin On Rat Peripheral Nerve Excitability And Conduction Parameters

In this thesis study, the effects of widely used chemotherapeutic agents cisplatin (SIS) and oxaliplatin (OKS) on nerve conduction and excitability parameters of rat isolated sciatic nerve and tail caudal nerve were comparatively investigated.

The experiments consisted of 38 Wistar albino type male rats equally divided into three groups for control (KON, N=6), oxaliplatin (OKS, N=9) and cisplatin (SIS, N=9). During 4,5 weeks, OKS group was administered an injection of oxaliplatin (8 mg/kg/week) and SIS group was administered cisplatin (4 mg/kg/week), while KON group was not injected. Compared to KON and OKS groups, significant weight loss was observed in SIS group.

After the injections, in order to compute the excitability parameters from the rats' tail caudal nerve via Threshold-Tracking Method, a protocol including (in exact order) strength-duration time constant (SDTC), current-threshold reduction, threshold electrotonus, and recovery cycle was applied. Following the Threshold-Tracking recordings each rat was sacrificed and, in order to realize Compound Action Potential (CAP) recordings, sciatic nerve was transferred to an isolated tissue bath fulfilling physiological conditions (37 °C, pH=7,4), connected to the suction recording system. CAPs were recorded from the distal end of the nerve via a suction pipette, while stimulating from the proximal end with isolated pulse stimuli lasting 1 ms.

In terms of CAP-related parameters, such as area under CAP, maximum depolarization (MD), conduction velocity at MD, significant difference was found in SIS group, as compared to KON ($p<0,05$). On the other hand, no significant difference was observed for neither of the chemotherapeutic agents, in terms of conduction velocities, instants of reaching the maximum time derivative ($t_{V_{MAX}}$), and, rheobase and chronaxie of the fastest conducting fibers. These findings for the isolated nerve have demonstrated that cisplatin causes significant changes in middle and slow conducting fiber groups.

When threshold electrotonus curves computed using Threshold-Tracking Method for 40% of the maximum CAP amplitude, SIS group was found again significantly different, compared to KON group. This result means that cisplatin has significant effects on passive membrane properties of fibers with mid-range conducting velocity. However, no significant difference was found in threshold electrotonus curves computed for 20% of CAP amplitude for neither of the agents, and this result was interpreted as the agents' not having any effect on fast conducting fiber group. The results for the analysis of threshold charge-stimulus duration, threshold current-threshold decrease, and recovery cycle curves for 40% of CAP amplitude, again demonstrated significant difference of the SIS group, in terms of all excitability parameters ($p<0.05$).

When all results are interpreted together, it can be concluded that the given doses of cisplatin and oxaliplatin do not cause any significant change in conduction and excitability parameters of fast

conducting fibers; only cisplatin, on the other hand, causes total blocking of the conduction of medium and slow conducting fiber groups, and disturbance in excitability parameters. Interpreted together with the finding that cisplatin causes significant amounts of mass loss, it would be appropriate to clinically prefer oxaliplatin to cisplatin in terms of neurotoxic side effects.

Given its compatibility via surface electrodes in both human and animal studies and also considering that it makes possible to non-invasively acquire information about passive membrane properties of nerve or muscle cells and excitability properties of fiber conductivity group of interest, Threshold-Tracking Method can be chosen as the preferred method of choice in many different nerve electrophysiology-related studies.

Keywords: Cisplatin, oxaliplatin; compound action potential; rat sciatic nerve; suction method; threshold-tracking method.

7. KAYNAKLAR

1. Amptoulach S, Tsavaris N. Neurotoxicity caused by treatment with platinum analogues. Chemoter Res Pract. 2011; 843019.
2. Argyriou AA, Polichronopoulos P, Iconomou G, Chroni E, Kalofonos HP. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. Cancer Treat Rev. 2008;34:368-337.
3. Barrett EF, Barrett JN. Intracellular recording from vertebrate myelinated axons: mechanism of the depolarizing afterpotential. J. Physiol. 1982;323:117-144.
4. Beckstein O, Biggin PC, Bond P, Bright JN, Domene C, Grottesi A, Holyoake J, Sansom MS. Ion channel gating: insights via molecular simulations. Fed Eur Biochem Soc Lett. 2003;555:85–90.
5. Bostock H. The strength-duration relationship for excitation of myelinated nerve: computed dependence on membrane parameters. J Physiol. 1983; 341:59-74.
6. Bostock H, Cikurel K, Burke D. Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. Muscle Nerve 1998;21:137–58.
7. Bostock H, Lin CS, Howells J, Trevillion L, Jankelowitz S, Burke D. After-effects of near-threshold stimulation in single human motor axons. J Physiol 2005;564:931–40.
8. Brismar T, Schwarz JR. Potassium permeability in rat myelinated nerve fibres. Acta Physiol Scand. 1985;124(2):141-8.
9. Burke D, Kiernan MC, Bostock H. Excitability of human axons. Clin Neurophysiol. 2001;112(9):1575-85.
10. Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, Sala B, Chiorazzi A, Meregalli C, Bossi M, Marmiroli P, Cavaletti G. Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies. Exp Neurol. 2010;226(2):301-9.
11. Clay JR. On the persistent sodium current in squid giant axons. J Neurophysiol. 2003;89:640-644.
12. Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-schwann cell interactions. J Neurosci. 2004;24:9250–60.
13. Cummins KL, Perkel DH, Dorfman LJ. Nerve fiber conduction-velocity distribution. I. Estimation based on the single-fiber and compound action potantials. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1979;46: 634-646 (a).
14. Cummins K.L, Dorfman LJ, Perkel DH. Nerve fiber conduction-velocity distribution. II. Estimation based on two compound action potantials. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1979;46: 647-658 (b).
15. Dalkılıç, N. Kurbağa siyatik sinirinde bileşik aksiyon potansiyeli'nin gözlenmesi ve aksiyon potansiyeli biçiminin türev ve integral analizi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 1993.
16. Dalkılıç, N. Ekstraselüler kayıt ve "suction" yöntemleri kullanılarak kaydedilen siyatik siniri bileşik aksiyon potansiyellerinden iletim hız dağılımı belirlenmesinin karşılaştırmalı olarak araştırılması. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 1999.
17. Dalkilic N, Pehlivan F. Comparison of fiber diameter distribution deduced by modelling compound action potentials recorded by extracellular and suction techniques. Int J Neurosci. 2002;112:913–930 (a).
18. Dalkilic N, Pehlivan F. A correction procedure for the volume conductor effect in the compound action potential recorded from isolated nerve trunk. Int J Neurosci. 2002;112:1013–1026 (b).
19. Dalkilic N, Tuncer S, Bariskaner H, Kiziltan E. The effect of tramadol on the rat sciatic nevre. A numerical analysis and conduction velocity distribution study. Yakugaku Zasshi, 2009; 129:485-493.
20. Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS. KCNQ2 is a nodal K^+ channel. J Neurosci. 2004;24:1236–44.
21. Ferreira HG, Marshall MW. The biophysical basis of excitability. Cambridge University Press, Cambridge. 5-194, 1985.
22. Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S. Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. Semin Oncol. 2002; 29: 21-33.
23. Geddes LA. Accuracy limitations of chronaxie values. IEEE Trans Biomed Eng. 2004; 51:176-181.
24. George A, Bostok H. Multiple measures of axonal excitability in peripheral sensory nerves: An in vivo rat model. Muscle Nerve. 2007; 36:628-636.

25. Gu D, Gander RE, Crichlow EC. Determination of nerve conduction velocity distribution from sampaled compound action potantial signals. IEEE Trans Biomed Eng. 1996;45(8):829-838.
26. Guo D, Ramu Y, Klem AM, Lu Z. Mechanisim of rectification in inward-rectifer K^+ channels. J Gen Physiol. 2003; 121:261-75.
27. Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir iiiiiiiGV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, iiiiiiiKuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, iiiiiiiO'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun iiiiiiiMM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS. International Union of Pharmacology. iiiiiiiXLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. Pharmacol Rev. iiiiiii2003;55:583–6.
28. Hirose G, Tsuchitani Y, Huang J. A new method for estimation of nerve conduction velocity biiiiiiiiiidistribution in the frequency domain.Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1986;63(2):192-iiiiiiiiii202.
29. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J Physiol. 1949;108:37–77.
30. Hodgkin AL, Huxley AF A quantitative description of membrane current and its application to iiiiiiiiiiconduction and excitation in nerve. J Physiol. 1952;117(4):500-44.
31. Holmes J,Stanko J, Varchenko M, Ding H, Madden VJ, Bagnell CR,Wyrick SD, Chaney SG. Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a wistar rat model. Toxicol Sci. 1998;46(2):342-51.
32. Joseph EK, Levine JD. Comparison of oxaliplatin- and cisplatin-induced painful peripheral neuropathy in the rat. J Pain. 2009;10(5): 534–541.
33. Kaji R. Physiology of conduction block in multifocal motor neuropathy and other demyelinating neuropathies. Muscle Nerve. 2003;27:285–96.
34. Kiernan MC, Krishnan AV. The pathophysiology of oxaliplatin-induced neurotoxicity. Curr Med Chem. 2006;13:2901-2907.
35. Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. Oxaliplatin-induced neurotoxicity and the development of neuropathy. Muscle Nerve. 2005;32:51-60.
36. Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. Oxaliplatin and axonal Na^+ channel function in vivo.Clin Cancer Res. 2006;12(15):4481-4.
37. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. Pharmacol Rev. 2005;57:509–26.
38. Lagrange A. Retigabine: bending potassium channels to our will. Epilepsy Curr. 2005;5:166–8.
39. Lu Z. Mechanism of rectification in inward-rectifier K^+ channels. Annu Rev Physiol. 2004;66:103–29.
40. Malmivuo J, Plonsey R. Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields. Oxford University Press. 1995;438-461.
41. Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. J Clin Invest. 2005; 115:2010–2017.
42. Mountcastle VB. Medical physiology. Saint Louis:12. Edd. The C.V. Mosby Company, 1968. Volume II. p. 1064-1120.
43. Mogyoros I, Kiernan MC, Burke D, Bostock H. Strength–duration properties of sensory and motor axons in amyotrophic lateral sclerosis. Brain 1998;121(Pt 5):851–9.
44. Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. Methods Enzymol. 1992;207:123-31.
45. Nodera H, Kaji R. Nerve excitability testing and its clinical application to neuromuscular diseases. Clin Neurophysiol. 2006;117:1902–1916
46. Ocana M, Cendan CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM. Potasium channels and pain: present realities and future opportunities. Eur J Pharmacol 2004; 500:203-19.
47. Park SB, Goldstein D, Lin CS. Y, Krishnan AV, Friedlander ML, Kiernan MC. Acute abnormalities of sensory nerve function associated with oxaliplatin induced neurotoxicity. J Clin Oncol. 2009;27:1243-1249 (a).
48. Park SB, Lin CS, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy. Brain. 2009;132:2712-23 (b).

49. Park SB, Lin CSY, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. Dose effect of oxaliplatin on persistent and transient Na^+ conductances and the development of neurotoxicity. Plos One 2011; 8;6(4):e18469 (a).
50. Park SB, Lin CSY, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. Utilizing natural activity to dissect to pathophysiology of acute oxaliplatin-induced neuropathy. J Expneurol.2011;227:120-127 (b).
51. Pehlivan F. Biyofizik, 4, Ankara, Hacettepe-Taş,1997.
52. Plonsey R, Barr RC. Bioelectricity:A Quantitative Approach. Plenum Press, New York and London, 1988; p.226-243.
53. Rasband MN. It's ''juxta'' potassium channel! J Neurosci Res. 2004;76:749–57.
54. Ruch TC, Putton HD. Physiology and Biophysics. Philadelphia and London: Volume IV 1982. W.B. Sounders Campany.
55. Schauf CL, Moffett DF, Moffett SB. Human Physiology, USA: Times Mirror Mosby Collage Publishing. 1990;p.116-162.
56. Schoonhoven R, Stegeman DF, De Weerd JP. The Forward Problem in Electroneurography I: A Generalized Volume Conductor Model. IEEE Trans Biomed Eng. 1986;33(3): 327-334 (a).
57. Schoonhoven R, Stegeman DF, Van Oosterom A. The forward problem in electroneurography II: comparison of models. IEEE Trans Biomed Eng. 1986;33(3): 335-341 (b).
58. Sperelakis N. Cell Physiology. USA: Academic Press. 1995;p. 245-278.
59. Stein RB. Nerve and Muscle: Membrane cell, and systems. New York and KLondon. Plenum pres. 1981;p. 65-86.
60. Stys PK, Ransom BR, Waxman SG. Compound action potential of nerve recorded by suction electrode: a theoretical and experimental analysis. Brain Res. 1991; 12;546(1):18-32.
61. Taddese A, Bean BP. Subtreshold sodium current from rapidly inactivating sodium channels drives spontaneous firing of tuberomammillary neurons. Neuron. 2002; 33:587-600.
62. Tuncer S. Deneysel tip 1 diyabetin sıçan periferik sinirleri üzerine etkisinin numerik analiz yöntemleri ile incelenmesi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans Tezi 2008.
63. Tuncer S, Dalkilic N, Esen HH, Avunduk MC. An early diagnostic tool for diabetic neuropathy: conduction velocity distribution. Muscle Nerve. 2011;43(2):237-44. doi:10.1002/mus.21837.
64. Vasilescu V, Margineanu DG. Introduction to neurobiophysics. Abacus Press, Kent. 1982; 13-142.
65. Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK. The axon:structure, function and pathophysiology. Oxford University Press, Oxford, 1995. 68-96.
66. Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj S, Fjell J, Black JA. Sodium channels, excitability of primary neurons, and the molecular basis of pain. Muscle Nerve. 1999; 22-1177-87.
67. Weerasurıya A. Patterens of change in endoneurial capillary permeability and vascular space during nerve regeneration. Brain Research. 1990;510:135-139.
68. Wickenden AD, Yu W, Zou A, Jegla T, Wagoner PK. Retigabine, a novel anti-convulsant, enhances activation of KCNQ2/Q3 potassium channels. Mol Pharmacol. 2000;58:591–600.
69. Wijesinghe RS, Wikswo JP. A model for compound action potantials and currents in a nerve bundle II: a sensitivity analysis of model parameters for the forward and inverse calculations. Ann Biomed Eng. 1991;19: 73-96.
70. Wilson RH, Lehky T, Thomas RR, Quinn MG, Floeter MK, Grem JL. Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability. J Clin Ongol. 2002;20:1767-1774.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı: İlksen BURAT

Doğum yeri ve Tarihi: Ankara, 8 Şubat 1988

Adres: Meram Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Biyofizik Anabilim Dalı 2. Kat Meram-KONYA

Tel: 0332 2236235

Cep tel: 0531 3401023

E-posta: ilksenburat@gmail.com

Eğitim:

İlkokul	1993-1998	Hamdullah Suphi İlköğretim Okulu, Ankara
Ortaokul	1998-2001	Türkiye Noterler Birliği İlköğretim Okulu, Ankara
Lise	2001-2004	Çankaya Kılıçarslan Lisesi, Ankara
Lisans	2004-2010	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü
Yüksek Lisans Anabilim Dalı	2010-	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Biyofizik

Çalıştığı kurumlar:

2011- Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Araştırma Görevlisi

Sertifikalar ve Deneyimler:

• Web Yazılım Uzmanlığı : Bilişim Eğitim Merkezi (Haziran, 2012)

• Akademik Personel ve Lisansüstü Eğitimi Giriş Sınavı (ALES) puanı: 88

(Sayısal, Aralık 2012).

• Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı (ÜDS) puanı: 55 (İngilizce, Kasım 2012).

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde sunulmuş bildiriler:

i- Poster Sunumları:

1. Dalkılıç N, Açıkgöz A, Tuncer S, Burat İ, Eşik değer izleme yöntemi kullanılarak insan ulnar siniri uyarılabilirlik parametrelerinin belirlenmesi 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, 13-16 Eylül 2011, Edirne, Türkiye, Özet Kitapçığı, P-24, Sayfa:44.

2. Peker TT, Tuncer S, Burat İ, Dalkılıç N, Kronik Organofosfat İntoksikasyonu Oluşturulan Ratlarda N-Asetil Sisteinin Siyatik Sinir Bileşik Aksiyon Potansiyeli

Üzerine Etkilerinin Araştırılması 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, 13-16 Eylül 2011, Edirne, Türkiye, Özet Kitapçığı, P-25, Sayfa:45.

3. Tuncer S, Burat İ, Dalkılıç N, Açıkgöz A, Eşik Değer İzleme Yöntemi Kullanılarak İnsan Ulnar Siniri Aktivitesine İyon Kanallarının Katkılarının ve Kanal Geçirgenliklerinin Belirlenmesi 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, 13-16 Eylül 2011, Edirne, Türkiye, Özet Kitapçığı, P-26, Sayfa:46.

4. Burat İ, Tuncer S, Selimoğlu MN, Dalkılıç N, Kalsiyum Kanal Blokerleri ile Birlikte Sigara Dumanı Maruziyetinin Sinir İyileşmesine Olan Etkisinin Elektrofizyolojik Yöntemlerle İncelenmesi 24. Ulusal Biyofizik Kongresi, 13-16 Eylül 2012, İstanbul, Türkiye, Özet Kitapçığı, P-38, Sayfa:90.

ii- Sözlü Sunumları:

1. Tuncer S, Dalkılıç N, Burat İ, Abdominal Aorta Anevrizması (AAA) Tedavi Modelinin Diyaframda Meydana Getirdiği Elektrofizyolojik Değişimler 24. Ulusal Biyofizik Kongresi, 25-28 Eylül 2012, İstanbul, Türkiye, Özet Kitapçığı, Sayfa:42.

Araştırma Projeleri:

- Periferik Sinir Uyarılabilirlik Özelliklerinin "Threshold Tracking" Yöntemi ile Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu, 10401020, Yardımcı Araştırıcı. 2010.
- Kalsiyum Kanal Blokerleri İle Birlikte Sigara Dumanı Maruziyetinin Sinir İyileşmesine Olan Etkisinin Elektrofizyolojik Yöntemlerle İncelenmesi, Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu, Yardımcı Araştırıcı. 2010.