T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSKEMİ-REPERFÜZYONUN SIÇAN FRENİK SİNİR DİYAFRAM PREPARATINDA YARATTIĞI ELEKTROFİZYOLOJİK DEĞİŞİMLERİN NUMERİK ANALİZ YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ

Seçkin TUNCER

DOKTORA TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

KONYA – 2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSKEMİ-REPERFÜZYONUN SIÇAN FRENİK SİNİR DİYAFRAM PREPARATINDA YARATTIĞI ELEKTROFİZYOLOJİK DEĞİŞİMLERİN NUMERİK ANALİZ YÖNTEMLERİYLE İNCELENMESİ

Seçkin TUNCER

DOKTORA TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇ

Bu proje Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10102043 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2013

ÖNSÖZ

Doktora tezimin danışmanlığını üstlenen, Biyofizik alanında sahip olduğum bilgi birikiminin çok büyük bölümünü edinmemi sağlayan ve tezimin her aşamasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Nizamettin Dalkılıç'a, emekli oluncaya dek hiçbir desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. İlhami Demirel'e, katkılarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Barkın İlhan'a ve çalışmalarım sırasında emekleriyle her aşamada yardımcı olan Araş. Gör. İlksen Burat'a teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Belma Turan'a yapmış olduğu katkılardan ve desteğinden ötürü teşekkür ederim. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Rüştü Onur'a mikroelektrot tekniğinin uygulanması ve diyafram disseksiyonu konusunda bilgi ve tecrübelerini paylaştığı için teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince göstermiş olduğu anlayış ve destek nedeniyle eşim Gaye Tuncer'e ve manevi desteğini esirgemeyen annem Gülten Tuncer'e teşekkür ederim.

Seçkin Tuncer

Eylül 2013

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ 1
1.1. Abdominal Aorta Cerrahisi ve İskemi-Reperfüzyon Modeli 1
1.1.1. Abdominal Aorta Anevrizması ve Tedavisi 1
1.1.2. Abdominal Aorta Anevrizması Tedavisi Komplikasyonları 4
1.1.3. İskemi ve Reperfüzyon 5
1.1.4. İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Rol Alan Faktörler 5
1.1.5. İskemi ve Reperfüzyonda Uzak Organ Hasarı 8
1.1.6. Deneysel Abdominal Aorta Anevrizması Tedavi Modeli 9
1.2. Solunum Sistemi ve Ventilasyon 9
1.2.1. Ventilasyonda Diyaframın Rolü 9
1.2.2. Diyafram Anatomisi 10
1.3. Diyafram Kası ve Hücre Zarı 11
1.4. Diyafram Kasında Elektriksel Olaylar 13
1.5. Diyafram Kası Aksiyon Potansiyeli ve İyonik Akımlar 15
1.5.1. Aksiyon Potansiyeli Kayıt Edilmesinde Kullanılan Yöntemler 17
1.6. Diyafram Kasında Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi ve Kasılma Mekanizması 18
1.6.1. Kasılmanın Kaydedilmesinde Kullanılan Yöntemler 21
1.7. Çalışmanın Amacı 23
2. GEREÇ ve YÖNTEM 24
2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Genel Bilgiler 24
2.2. Abdominal İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulması 25
2.3. Sıçandan Diyafram İzolasyonu 27
2.4. Kullanılan Kimyasallar 27
2.5. İzometrik Kasılmanın Kaydedilmesi 28
2.6. İzometrik Kasılma Kayıtlarının Analizlenmesi 29
2.7. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi 30
2.8. Aksiyon Potansiyellerinin Analizlenmesi 33
2.9. İstatistiksel Analizler 36
3. BULGULAR 37
3.1. Deneylerle İlgili Genel Veriler 37
3.2. Diyaframın Mekanik ve Elektriksel Aktivitesi ile İlgili Bulgular 37
3.3. Na^+ ve K^+ Akımları Bloke Edilerek Elde Edilen Bulgular 49
4. TARTIŞMA 54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 65
6.ÖZET 67
7. SUMMARY 68
8. KAYNAKLAR 72
9. ÖZGEÇMİŞ 75

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA: Abdominal Aorta Anevrizması
ACh: Asetilkolin
ADP: Adenozin Difosfat
AP: Aksiyon Potansiyeli
APA: Aksiyon Potansiyeli Alanı
APG: Aksiyon Potansiyeli Genliği
APD25: %25 Repolarizasyon Süresi
APD50: %50 Repolarizasyon Süresi
APD75: %75 Repolarizasyon Süresi
APD90: %90 Repolarizasyon Süresi
ATP: Adenozin Trifosfat
c_i: i'inci İyonun Konsantrasyonu
D_i: Difüzyon Kaysayısı
dV/dt_{mak}: Aksiyon Potansiyeli Maksimum Türevi
DZP: Dinlenim Zar Potansiyeli
F: Faraday Sabiti
G: Gibbs Serbest Enerjisi
GS50: Yarı Gevşeme Süresi
KS: Kasılma Süresi
MK: Maksimum Kasılma
MTZ: Maksimum Türev Zamanı
NMDG: N-Metil-D-Glukamin
P_i: İnorganik Pirofosfat
R: Genel Gaz Sabiti
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
RyR: Ryanodine
T: Mutlak Sıcaklık
TÇS: Tepeye Çıkış Süresi
TD: Tepe Değeri
TF: Tetanus Frekansı
TK: Tetanik Kuvvet
$V_{mak/2}$: Tepe Değerin Yarısına Ulaşıldığı Andaki Türev
z_i: İyon Değerliği
4AP: 4-Aminopiridin

1. GİRİŞ

1.1. Abdominal Aorta Cerrahisi ve İskemi-Reperfüzyon Modeli

1.1.1. Abdominal Aorta Anevrizması ve Tedavisi

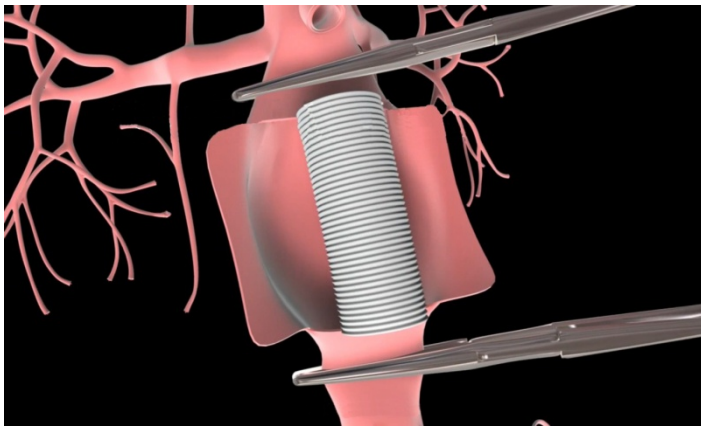
Abdominal aorta, diyaframın altında kalan gövdeye ve alt ekstremitelere kan dağıtımının sağlandığı tek ana damardır. Abdominal aortanın alt ekstremitelere giden iki dala ayrıldığı bifurkasyon bölgesi ile renal arterlerin arasındaki bölüm infrarenal bölge olarak adlandırılmaktadır. Abdominal aortanın infrarenal bölgesinde meydana gelen genişleme Abdominal Aorta Anevrizması (AAA) olarak adlandırılır. Anevrizma Yunanca genişleme anlamına gelen "aneurusma" kelimesinden köken almaktadır. Her ne kadar aortanın diyaframın altında kalan herhangi bir bölümünde meydana gelen genişleme de AAA olarak adlandırılsa da, rastlanma sıklığından ötürü pratikte infrarenal aortada meydana gelen genişleme kastedilmektedir (Sakalihasan ve ark 2005).

Abdominal aortanın normal çapı, yaşa, cinsiyete ve vücut ağırlığına bağlı olarak değişim göstermekte, abdominal kaviteden iliak bifurkasyon bölgesine doğru gittikçe daralmaktadır. Erişkin erkeklerde infrarenal abdominal aorta çapı 15-24 mm arasındadır (Bengtsson ve ark 1996). Çapta ne oranda bir genişleme olduğunda anevrizma teşhisi konulacağı konusunda farklı çalışma grupları farklı kriterler belirlese de genel olarak normal çapının 1,5 katına çıktığında ya da çap 30 mm'yi geçtiğinde anevrizma teşhisi konulacağı konusunda konsensus sağlanmıştır (Johnston ve ark 1991).

Abdominal aorta anevrizması özellikle gelişmiş ülkelerde önemli sağlık sorunları arasında yer almakta ve 65 yaşın üzerindeki erkekleri en çok etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok ölüme sebep olan hastalıklar

arasında 13. sırada yer almaktadır (Gillum 1995). Her ne kadar bir çok insanda semptom gösterse de birçoğunda ise aorta ruptüre oluncaya dek asemptomatik seyretmekte, %65 oranında ölümle neticelenmektedir (Kniemeyer ve ark 2000). Son yüzyılda AAA teşhisi konan hasta sayısında ortalama insan ömrünün uzamasına, sigara içenlerin sayısının artmasına ve görüntüleme tekniklerinin gelişmesine bağlı olarak artış görülmüştür. Her yıl bu anevrizmaların İngiltere'de 8000'i, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 15000'i ruptüre bağlı ölümle sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte AAA'ya erkeklerin %1,3-8,9'unda, kadınların ise %1,0-2,2'sinde rastlanmaktadır (Singh ve ark 2001). Tıbbi görüntüleme yöntemleri kullanılarak tanısı konan birçok anevrizma küçük çaplı olduğundan acil bir cerrahi müdahale gerektirmemektedir. Buna karşın aorta çapındaki büyüme başta yavaş ama daha sonra üssel olarak meydana gelmekte olduğundan takip edilmesi gerekmektedir. Abdominal aorta anevrizmasının oluşumu yalnızca aorta duvarındaki bağ dokusunda meydana gelen değişimlerle ilişkilendirilmektedir. Aortanın mekanik özelliklerini elastik lifler ve fibrillar kollajenler belirlemektedir. Histolojik çalışmalar, elastik liflerin parçalandığını ve elastin konsantrasyonun azaldığını ortaya koymuştur. Elastik liflerin kaybedilmesi ve kollajenin özelliğini kaybetmesi ile aorta duvarı esner ve çap genişlemeye başlar. Neticede ise anevrizma genişleyecek ve mutlaka cerrahi müdahaleye ihtiyaç duyulacaktır. İlaç tedavisi ise yalnızca genişlemenin yavaşlatılmasında işe yaramaktadır (Limet ve ark 1991).

Abdominal aortada meydana gelen anevrizmanın tedavisinde açık cerrahi ya da endovasküler cerrahi yöntem uygulanmaktadır. Açık cerrahi tedavide abdomene uzunlamasına bir median ya da geniş bir transvers insizyonla girilir. Abdominal kavite açıldıktan sonra anevrizmanın başladığı boyun bölgesi belirlenir. Renal arterlerin hemen altına klemp yerleştirilerek kan akışı kesilir. Aynı şekilde iliak arterlere de klemp yerleştirilir. İki klempin arasında kalan anevrizma oluşmuş bölge boylamasına açılarak kollajen ya da albümin ile sertleştirilmiş bir sentetik greft yerleştirilerek aorta duvarına sıkıca dikilir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Abdominal aorta anevrizmasının açık cerrahi ile tedavisinde uygulanan yöntem.

Aorta duvarındaki boylamasına kesinin de dikilip kapatılmasının hemen ardından önce distal sonra proksimal klempler kaldırılarak abdominal bölgeye kan akışı sağlanır. Cerrahi işlem abdomendeki kesi bölgesinin de dikilerek kapatılmasıyla sonlandırılır (Sakalihasan ve ark 2005).

Endovasküler cerrahi tedavide ise kasık bölgesinden endovasküler yola girilerek anjiyogram ya da ultrasonografi eşliğinde renal arterlerin hemen altından iliak arterlere kadar uzanan stent-greft yavaşça bırakılır (Parodi ve ark 1991). Bu yöntemin avantajı, açık cerrahi tedavinin aksine, abdominal kan akışının durdurulmasının gerekmemesidir. Fakat bu yöntemin dezavantajları ya da açık cerrahinin daha avantajlı olduğu durumlar mevcuttur. Endovasküler cerrahi tedavi uygulama kolaylığı açısından pratik olmamasıyla birlikte daha çok teknik ekipman gerektirmektedir ve bu da pahalı olmasına sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra kalıcı bir tedavi sunmamakta, tekrar anevrizma ile karşılaşılabilmektedir. Açık cerrahi ile tedavide tekrar anevrizma ya da ruptür ile karşılaşma sıklığı %0,3 iken endovasküler cerrahi tedavide ise oran %3'tür (%1 ruptür, %2 anevrizma tekrarı). Bununla birlikte, bu yöntem büyük çaplı anevrizmalarda kullanılamamaktadır (Hallett ve ark 1997).

1.1.2. Abdominal Aorta Anevrizması Tedavisi Komplikasyonları

Abdominal aorta anevrizması tedavisinde hem açık hem de endovasküler cerrahi tedavi uygulandığında operasyon sonrası komplikasyonlar görülmektedir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1: Açık ve endovasküler cerrahi tedaviye bağlı komplikasyonların morbiditeleri. (Katzen ve MacLean 2006).

Komplikasyon	**Görülme oranı, %**
Açık cerrahi tedaviye bağlı	
Kardiyak	12,0
Pulmoner	8,4
Renal	4,2
Kanama	5,9
Gastrointestinal	4,2
Enfeksiyon	2,2
Serebrovasküler	1,9
Emboli	1,8
İmpotans	0,2
Hematom	0,2
Endovasküler cerrahi tedaviye bağlı	
Kardiyak	4,9
Pulmoner	2,6
Emboli	7,7
Kanama	5,7
Uygulama hatası	5,0
Renal	3,0
Enfeksiyon	3,0
Gastrointestinal	1,4

Tedaviye bağlı bu komplikasyonlar yaşam kalitesini düşürmekte ve hatta birçoğu ölümle sonuçlanabilmektedir. Cerrahi tedavi kaynaklı olan post-operatif komplikasyonlar %1-15 insidansa sahiptir (Gelman 1995). Başka bir kaynağa göre ise bu hastaların da %8-45'inde solunum fonksiyon bozukluğu görülmekte ve hatta kardiyak komplikasyonlar da solunum fonksiyon bozukluğuyla ilişkilendirilmektedir (Volta ve ark 2003). Geçmişte yapılan çalışmalarda solunum fonksiyon bozukluğunun sebebi olarak vücudun alt bölümünün kan akışının durdurulup yeniden sağlanması gösterilmektedir (Volta ve ark 1999).

1.1.3. İskemi ve Reperfüzyon

Bir doku ya da organa dolaşım sistemi ile ulaştırılan kanın akışının durdurulması iskemi, kan akışının tekrar sağlanması ise reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi doku hasarına sebep olurken beklenenin aksine reperfüzyon sonucunda meydana gelen hasar daha fazladır. Reperfüzyon hasarının daha fazla olması, iskemide oluşan hasarın kümülatif etkisinden ziyade reperfüzyondaki yeniden oksijenlenme ile ilişkilidir. Hem iskemi hem de reperfüzyon önemli klinik durumlarda meydana gelmekte, kalp gibi bazı doku ya da organlarda iskemi-reperfüzyon ölümle dahi sonuçlanabilirken bazılarında ise kalıcı fonksiyonel ya da yapısal hasarlar bırakmaktadır. Temel bazı cerrahi işlemlerde dahi doku ya da organlar iskemi-reperfüzyon hasarına uğramaktadır. İskemi-reperfüzyon çok büyük bir vücut bölgesinde meydana geliyorsa hasarını sadece kan akışının kesildiği dokularda değil, vücudun başka yerlerinde de görmek mümkündür. Abdominal aorta anevrizmasının açık cerrahi yöntemle tedavisi gerçekleştirilirken, abdominal bölgeye kan akışının bir süre durdurulduktan sonra yeniden sağlanması iskemi-reperfüzyona ve iskemi-reperfüzyon kaynaklı uzak organ hasarına önemli bir örnektir (Norwood ve ark 2004).

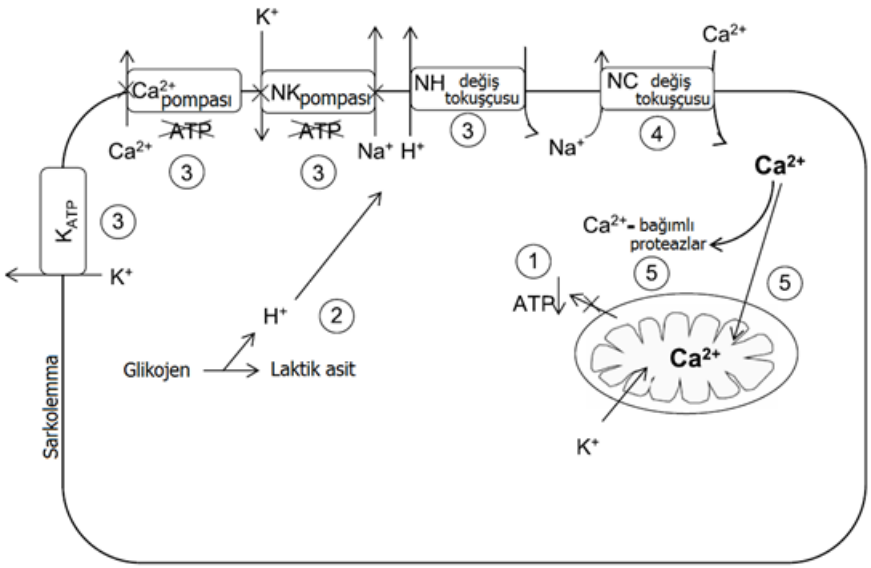
1.1.4. İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Rol Alan Faktörler

İskemi ve reperfüzyonda meydana gelen hasar, iskemi esnasında oksijenden yoksun kalan dokunun reperfüzyon esnasında yeniden oksijenlenmesiyle ilişkilidir. Reperfüzyon hasarı ilk olarak Baue ve McClerkin tarafından 1965'te tanımlanmıştır ve hasarın asidoz, sistemik şok ve hemorajik nekrozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Baue ve McClerkin 1965). Hasarın oluşmasına doğrudan ya da dolaylı yollardan katkıda bulunan birçok kimyasal olay ve madde netice itibariyle serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olur (Sasaki ve Joh 2007).

İskemi, hücrenin metabolizmasında ve yapısal özelliklerinde bazı değişikliklere neden olur. Hücresel oksidatif fosforilasyonun azalması, taşıdığı enerji bakımından zengin ATP ve fosfokreatin gibi fosfat türevlerinin sentezinde azalmaya neden olur. Buna bağlı olarak hücre zarındaki ATP bağımlı iyon kanallarının fonksiyonlarında değişim meydana gelmesi neticesinde hücre içine sodyum ve kalsiyum girişinde artış meydana gelir. Yine iskemi süresince adenin nükleotid katabolizması sonucu, moleküler oksijenin yeniden hücreye ulaşmasına bağlı olarak reaktif oksijen türlerine dönüşebilen hipoksantinin birikmesi meydana gelir. Dolayısıyla iskemi, dokularda reperfüzyon esnasında meydana gelen ve doku hassasiyetini artıran bir proinflamatuvar duruma sebep olur (Collard ve Gelman 2001).

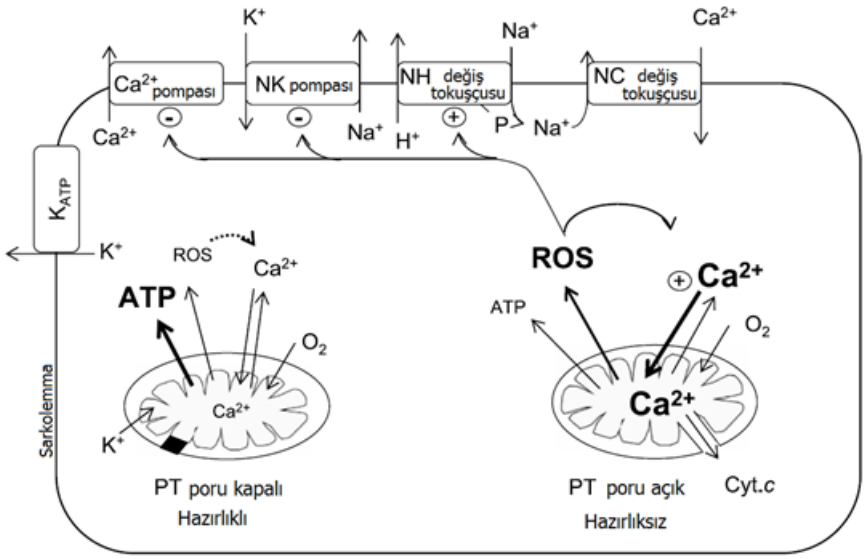
İskemi-reperfüzyon; kalsiyum şarjı, oksidatif stres, metabolit birikimi ve enerji metabolizması bozukluğunu içeren kompleks bir olaylar bütünüdür. Hasarın boyutu bahsedilen bu değişimlerin oranına ve büyüklüğüne bağlıdır. İskemide oksijen kullanılarak gerçekleştirilen mitokondriyal ATP üretimi aniden kesilir ve kompensatuvar bir mekanizma olan anaerobik glikolizi tetikler. Neticede hidrojen iyonları ve laktik asit birikimi sonucunda glikoliz inhibe edilir, enerji hızla tüketilir.

Hücre içerisindeki sodyum konsantrasyonunda artma iki temel nedenle meydana gelir. Bunlardan ilki, ATP bağımlı sarkolemmal sodyum-potasyum kanallarının asidite ve ATP'deki azalma sebebiyle inhibisyonu, ikincisi ise sarkolemmal sodyum-hidrojen değiş tokuşçusunun asidik pH sebebiyle inhibe olmasıdır. Kalp kası hücrelerinde iskemik hasar konusunda yapılan çalışmalarda belirtilen durumların aynı zamanda sarkolemmma ve sarkoplazmik retikulumda lokalize olan kalsiyum pompalarının inhibisyonuna neden olduğu, ATP azalmasının da hem mitokondriyal hem de sarkolemmal ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasına neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.2.). (Starnes ve Taylor 2007). Mitokondriyal ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasının, reperfüzyon sırasında ROS (reactive oxygen species=reaktif oksijen türleri) oluşumunu azalttığı düşünülmektedir (Shinmura ve ark 2005).



Şekil 1.2: İskemi esnasında hücre düzeyinde meydana gelen olaylar (Starnes ve Taylor 2007).

Reperfüzyon gerçekleştirildiğinde yeniden oksijenlenme sonrası mitokondri ve hücrenin diğer bölgelerinde ROS patlaması meydana gelir. Sodyum-hidrojen değiş tokuşçusu ROS tarafından daha sonra aktive edileceği için, reperfüzyonun ilk safhasında hücre içi sodyum konsantrasyonu hala yüksektir. Sodyum-potasyum pompasının aktivasyonu ATP'nin düşük seviyede olması nedeniyle gecikir. Kalp kası hücresinde reperfüzyon konusunda yapılan çalışmalar, bir süre sonra yükselen sodyum konsantrasyonunun sodyum-kalsiyum değiş tokuşçusunu aktive ederek, sitozolde ve mitokondride kalsiyum birikimine neden olduğunu göstermiştir. (Starnes ve Taylor 2007). Diyafram kası hücrelerinde de reperfüzyon sebebiyle hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artma meydana gelmektedir (McLaughlin ve ark 2000). Kalsiyum şarjı, daha fazla mitokondriyal ROS üretimine ve proteazların aktivasyonuna, bu iki durum da kontraktil proteinlerin fonksiyon bozukluğuna yol açar. Neticede sarkoplazmik retikulum kalsiyum taşınımında azalma meydana gelir.



Şekil 1.3: Reperfüzyon esnasında hücre düzeyinde meydana gelen olaylar (Starnes ve Taylor 2007).

1.1.5. İskemi ve Reperfüzyonda Uzak Organ Hasarı

Yapılan birçok çalışmada iskemi-reperfüzyonun sebep olduğu hasarın yalnızca iskemiye maruz kalan dokuyla sınırlı kalmayıp diğer uzak organların da sistemik dolaşıma katılmış oksijen radikallerinden, sitokinlerden, kompleman proteinlerinden, prostaglandinlerden ve toksik ürünlerden etkilendiği gösterilmiştir. Ekstremitelerde meydana gelen akut arteriyal oklüzyon sonrası reperfüzyon ile metabolik asidoz, hiperkalemi, myoglobinüri ve böbrek yetmezliğinin geliştiği gösterilmiştir (Haimovici 1979).

Solunum sistemi iskemi-reperfüzyonun hem uzak organ olarak hem de direkt etkisi altında kalmaktadır. Dolaşımın abdominal aortanın infrarenal hizasından durdurulması ile solunumda önemli işleve sahip diyaframın kan sirkülasyonu çok azalmaktadır. Bununla birlikte uzak organ olan akciğerlerin fonksiyonlarını da etkilemektedir (Norwood ve ark 2004).

1.1.6. Deneysel Abdominal Aorta Anevrizması Tedavi Modeli

Abdominal aorta anevrizması tedavisinde kullanılan cerrahi işlemlerin operasyon sonrasında solunum fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu klinik olarak yaygın bir şekilde bilinen bir gerçektir. Bu ve benzeri durumların mekanizmasının ve olası tedavi yöntemlerinin araştırılması amacıyla deneysel hayvan modelleri sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla McLaughlin ve arkadaşlarının 2000 ve 2001 yıllarında yapmış olduğu çalışmalarda, abdominal aort anevrizması tedavisinin neden olduğu başta solunum fonksiyon bozukluğu olmak üzere birçok fonksiyon bozukluğunun benzerinin meydana geldiği bir deneysel hayvan modeli geliştirilmiştir (McLaughlin ve ark 2000, Moneley ve ark 2001). Bu çalışmalara göre 30 dakika infrarenal bölgeden abdominal iskemi oluşturularak 2 saat reperfüzyon süresi uygulanması sonucu klinik bulgularla benzer sonuçlar elde edilebilmektedir

1.2. Solunum Sistemi ve Ventilasyon

Atmosfer havası ile kan arasında meydana gelen gaz alış verişine solunum, atmosfer havasının akciğerlere giriş ve çıkış süreçlerine ise ventilasyon adı verilir. Solunumda işlev gören birçok kasın aktiviteleri ile atmosfer gazlarının akciğerlere girişine inspirasyon (soluk alma), çıkışına ise ekspirasyon (soluk verme) adı verilir.

1.2.1. Ventilasyonda Diyaframın Rolü

Hem inspirasyonda hem de ekspirasyonda birçok kas işleve sahiptir. En çok rol üstlenen kaslar, kaburgalar arası kaslar, diyafram ve karın kaslarıdır. Hem soluk alma hem de soluk verme esnasında temel amaç akciğer içi basıncın değiştirilmesidir. Diyaframın kasılması göğüs boşluğunun genişlemesine sebep olarak toraks içi ve plevra içi basıncın -0,4 kPa (-3 mmHg) civarına düşmesini sağlar. Kaburgalar arası kasların (intercostalis externi) ve karın kaslarının kasılmaları

diyaframın işlevine katkıda bulunur. Hava, akciğer içi basınç atmosfer basıncından daha düşük olduğu için alveollere girer. Soluk verme esnasında ise diyafram gevşeyerek kubbe biçimini alır ve göğüs içi basınç yaklaşık +0,4 kPa (+3 mmHg) seviyesine yükseltilerek akciğerlerin içinde bulunan havanın dışarı çıkması sağlanır (Pehlivan 1997.).

1.2.2. Diyafram Anatomisi

Diyafram kası göğüs boşluğu ile peritonu birbirinden ayıran gevşemiş haldeyken kubbe biçimine sahip, kas ve fibröz zarlardan meydana gelen bir septumdur. Diyafram toraks alt açıklığının kenarlarına tutunur. Diyaframı meydana getiren kas demetlerinin çıkış noktalarına göre 3 bölümden oluşur; sternal bölüm, kostal bölüm, lumbar bölüm.

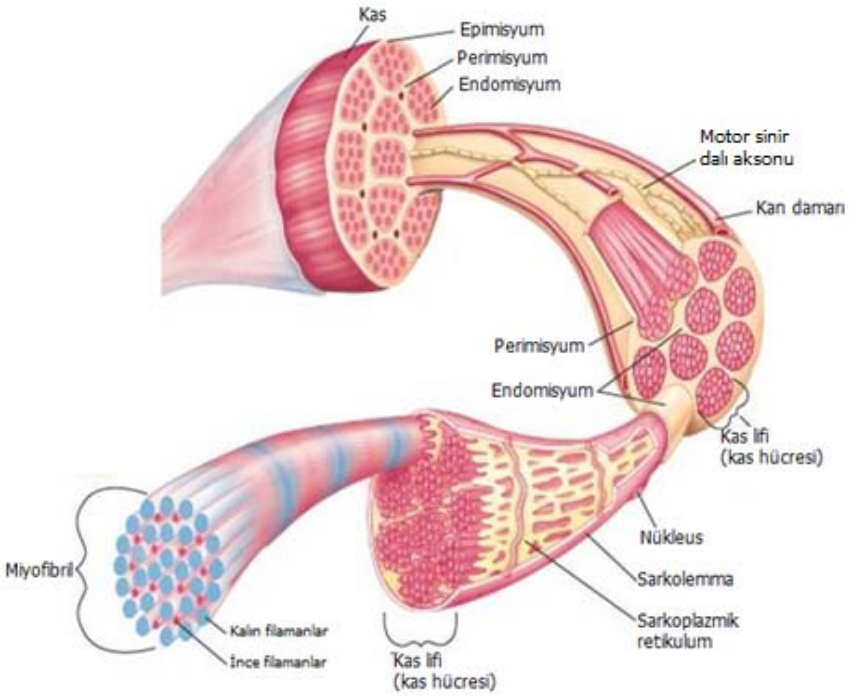
Lumbar bölüm Arcus lumbocostalis lateralis ve arcus lumbocostalis medialis olmak üzere iki demetten oluşur. Bu iki arcus demetine crus adı verilir. Sağda bulunan crus özefagusun geçtiği deliğin etrafını da sarar. Sağ ve sol crusların kenarları tendonumsudur ve orta hatta aortanın ön yüzünde birleşerek ligamentum arcuatum mediana'yı oluştururlar. Cruslardan ayrılan lifler yelpazeyi andırırlar. Bu lifler kubbenin ortasında centrum tendineum'a yapışırlar. Centrum tendineum fibröz yapıdadır. Buradaki fibröz lifler gözle görülür bir çapraz yapı oluştururlar ve bu yapıya "St. Andrew Çaprazı" adı verilir. Çaprazın sağ kolları arasında ise vena cava inferior'un geçtiği bir delik bulunur. Diyaframda toplam 3 delik bulunur. Bunlardan vena cava inferior, hiatus oesophageus ve hiatus aorticus geçer.

Diyaframın torakal yüzeyine aa. phrenica inferiores (frenik sinir) dağılır. Diyafram servikal pleksusun bir dalı olan bu sinir tarafından innerve edilir. Bu sinir diyaframı çalıştıran tek motor sinirdir. Diyafram istemli olarak çalışan bir kas olmasına karşın bu istemlilik belirli bir düzeye kadar sınırlıdır. Örneğin bir kimse boğuluncaya kadar istemli bir şekilde nefesini tutamaz (Taşkınlar 2006).

Diyafram kası, kas lifi renk sınıflandırmasına göre %20 oranında beyaz, %60 oranında kırmızı ve %20 oranında da orta renk liflerden meydana gelmektedir (Gauthier 1969).

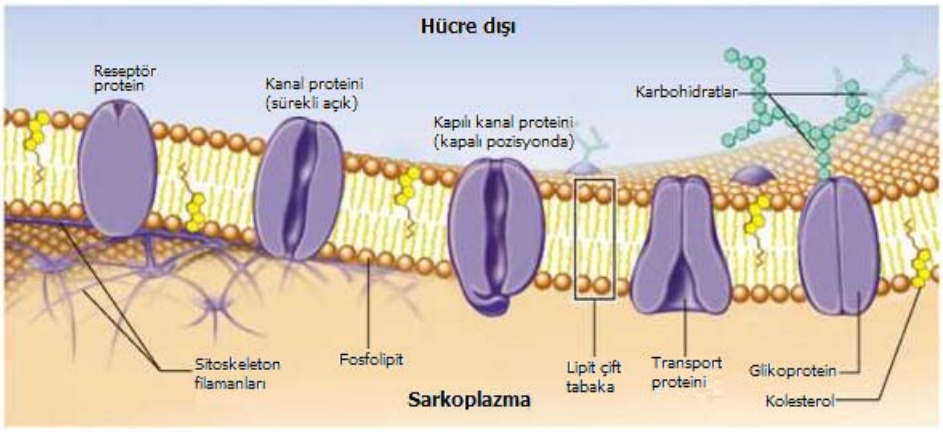
1.3. Diyafram Kası ve Hücre Zarı

Diyafram kası çizgili kaslar arasında sınıflandırılmaktadır. Hücreleri ince uzun mekik benzeri bir şekle sahiptir ve kas lifi olarak adlandırılır. Bir kas lifinin büyüklüğü 10-100 μm arasında değişim gösterirken, diyafram kas liflerinin büyüklüğü ise 30-50 μm arasındadır. Her bir kas lifi endomisyum, birden fazla kas lifi ise perimisyum denilen bağ dokusu ile çevrilidir. Perimisyum ile çevrili demetler ise en dıştan epimisyum ile sarılmış olarak bulunur. Bu kılıflar kollajen ve elastik bileşenler bakımından zengindir. Kas hücreleri çok nükleuslu olup nükleusları sarkoplazmanın altında yer alır. Tüm iskelet kasları için olduğu gibi diyafram kası lifleri için de özel bir terminoloji kullanılır. Buna göre; hücre protoplazması sarkoplazma, mitokondrisi sarkozom, hücre plazmalemması (zarı) sarkolemma ve endoplazmik retikulumu ise sarkoplazmik retikulum olarak adlandırılır (Şekil 1.4). Hücrenin en önemli organelleri ise sarkoplazmik retikulum ve sarkozomdur. Enerji gereksinimi diğer hücrelere oranla oldukça fazla olan hücrede enerji deposu granüller şeklinde depolanmış glikojen ve damlacık şeklinde bulunan yağlardır. Bu hücrelerin sahip oldukları en önemli yapılar ise kasılmayı sağlayan ve kasın çizgili olarak isimlendirilmesine sebep olan kalın ve ince filamentlerden oluşan miyofibrillerdir.



Şekil 1.4.: Kasın yapısının şematik gösterimi

Hücre zarı (sarkolemma) diğer hücrelerdeki gibi temel olarak elektriksel yalıtkan özellikteki lipid çift tabakadan meydana gelmiştir. Uyarılabilen hücre özelliğinde olmasından dolayı ise hücre zarında birçok protein ve özelleşmiş yapılar içermektedir. Zara bu sebeple akışkan mozaik zar denilmektedir. Bu yapıların başında ise hücre zarına gömülü olarak bulunan (intrinsic) protein yapısındaki iyon kanalları gelmektedir. Uyarılabilen hücreler olarak adlandırılan sinir ve kas hücrelerinin ortak özelliği olan iyon kanallarından, hücrenin içi ile dışı arasında iyonların geçişi sağlanmaktadır (Şekil 1.5). Bu sayede hücrenin içi ile dışı arasında bir potansiyel fark meydana getirilerek sürdürülmekte ve bunun bir sonucu olarak da hücrenin uyarılabilirliği mümkün kılınmaktadır. Kasılmanın tetiklenmesi için gerekli olan hücrenin uyarılması ve uyarıldığında meydana gelen iyonik değişimler birtakım karmaşık elektriksel olayı içermektedir.



Şekil 1.5.: Hücre zarının akışkan mozaik yapısının şematik gösterimi (Marieb1995).

1.4. Diyafram Kasında Elektriksel Olaylar

Lipid çift tabaka yapısındaki hücre zarı, yapısal bileşenlerinden dolayı ~1μF/cm^2 düzeyinde bir sığaya sahiptir. Bu yalıtkan özelliği sebebiyle hücre içini ve dışını hem elektriksel hem de kimyasal olarak iki ayrı kompartımana ayırır (Wahler 1997). Diyafram kası hücre zarlarının seçici geçirgenlik özelliklerinden dolayı iyon konsantrasyonları hücre içi ile dışında farklı değerlerdedir. Dinlenim durumunda hücre içi tarafında negatif yüklü iyonlar fazla iken, hücre dışı tarafında ise pozitif yüklü iyonlar daha fazladır. Kanallardan sızıntı şeklinde geçen iyonlar ise pompalar ile geri atılarak iç ve dış iyon konsantrasyonları sabit tutulmaktadır. Bu yük dağılımı sebebiyle hücrenin içi ile dışı arasında zar potansiyeli adı verilen bir potansiyel fark meydana gelmektedir. Zar potansiyeli tanım gereği;

$$E_m = V_{iç} - V_{dış}$$

şeklinde ifade edilmektedir.

Hücre zarının içi ile dışı arasındaki potansiyel farkın ölçülebilmesi için kullanılan yöntemler 1940'lı yıllarda keşfedilmiştir. Mürekkep balığı dev aksonunun içerisine tel yerleştirilerek hücre içi ile dışı arasındaki potansiyel farkın ölçüldüğü çalışma bu konuda günümüzdeki çalışmalara öncülük etmektedir (Hodgkinve Katz

1949). Biri referans diğeri aktif elektrot olarak seçilen elektrotlardan, aktif olan hücre içerisine yerleştirilip referans elektrot hücre dışında tutularak ölçüm yapıldığında -70 ile -90 mV civarında bir negatif potansiyel fark ölçülür. Bu potansiyel fark dinlenim zar potansiyelidir. Uygun bir uyaran ile bu dinlenim zar potansiyeli aksiyon potansiyeli tetiklenmek üzere pozitif yönde bozulur ve aksiyon potansiyeli ile birlikte zar potansiyeli değeri +40 mV ile +60 mV değerlerine kadar ulaşabilir.

Hücre zarı içinde ve dışında dağılmış temel olarak dört tip iyon bulunur. Bunlardan Na^+ ve Cl^- hücre dışında yoğunken, K^+ ve organik anyonlar (A^-) ise hücre içinde daha yüksek yoğunluktadır. Memeli kas hücrelerinde, hücre dışında ($\mu mol/cm^3$); Na^+ 145, K^+ 4,1, Cl^- 118 yoğunluğa sahipken, hücre içinde ($\mu mol/cm^3$); Na^+ 12, K^+ 150, Cl^- 3,9 yoğunluğa sahiptir (Hille 2001). Dinlenim zar potansiyelinin değeri hücre içi ve dışındaki iyonların konsantrasyonlarınca belirlenir. Hücre zarı tarafından ayrılan hücre içi ve dışında herhangi i'inci bir iyonun dengede olabilmesi için mol başına Gibbs serbest enerjilerinin (G) eşit olması gerekir,

$$G_i^{içi} = G_i^{dışı}$$

Bir iyonun Gibbs serbest enerjisi, o iyonun değerliğine (z_i), elektriksel mobilitesine (μ_i), difüzyon katsayısına (D_i) ve mutlak sıcaklığa (T) bağlıdır. Bir iyon için denge potansiyeli hücre içindeki ve dışındaki Gibbs serbest enerjilerinin eşit olduğu düşünülerek;

$$E_m = V_{içi} - V_{dışı} = \frac{RT}{z_i F} ln \frac{c_i^{dışı}}{c_i^{içi}}$$

şeklinde hesaplanır. Bu denklem Nernst denge denklemi olarak da adlandırılır. Denklemde, F: Faraday sabitini, R: genel gaz sabitini, c_i: i'inci iyonun konsantrasyonunu ve T ise Kelvin cinsinden sıcaklığı göstermektedir (Pehlivan 1997).

Kas hücreleri için Nernst denge denklemi kullanılarak her bir iyonun denge potansiyeli hesaplandığında E_{Na}=+55 mV, E_K=-75 mV, E_{Cl}=-90 mV olarak bulunur. Bu değerlere bakıldığında dinlenim durumunda Cl^- iyonları dengedeyken, diğer

iyonların dengede olmadığı görülmektedir. Na^+ iyonunun denge potansiyeli çok daha pozitif bir değere sahip olduğundan bu iyonlar büyük bir elektrokimyasal gradyent sürdürücü kuvveti etkisinde hücre içine girme eğilimindedir. Fakat dinlenim durumunda hücre zarının Na^+'a olan permeabilitesi düşük (açık sodyum kanalı bulunma olasılığı düşük) olduğundan hücre içine Na^+ iyon girişi oldukça azdır (Guyton 2005). K^+ iyonları için elektrokimyasal gradyent ise içten dışa doğrudur ve bu gradyent K^+ iyonlarını içten dışa geçişe zorlar. Dinlenimde zarın K^+ iyonuna geçirgenliği yüksek olduğundan dinlenim zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline daha yakındır. Hücre zarında pasif Cl^- kanalları bulunduğundan, bu iyon her iki tarafa da rahatça geçebilmektedir, bu nedenle Cl^- iyonları dengededir. Tüm bu iyon geçişlerine karşın dinlenim zar potansiyelinin dengede tutulması Na–K pompasının enerji (ATP) harcayarak bu iyonları hücre içine ve dışına pompalanıp konsantrasyonların sabit tutulması ile sağlanır.

Birden fazla iyona geçirgen bir zarda, zar potansiyeli her iyonun iç ve dış ortamlardaki konsantrasyonları ve zarın her bir iyona olan geçirgenlikleri (P_i) tarafından belirlenir. Zar potansiyeli Goldman-Hodgkin-Katz eşitliğine göre,

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

şeklinde verilir. Zarın bir cins iyona geçirgenliği diğerleri yanında çok büyük ise, bu denklem Nernst denge denklemine indirgenir. Bu eşitliğe göre zar potansiyeli, konsantrasyonları yüksek ve zarın iyi geçirgen olduğu iyon veya iyonların denge potansiyeli yakınlarında bulunur (Pehlivan 1997).

1.5. Diyafram Kası Aksiyon Potansiyeli ve İyonik Akımlar

Diyaframı oluşturan kas hücreleri motor özellikteki frenik sinir tarafından innerve edilmektedir. Merkezi sinir sisteminden köken alan motor sinir aksonu ile kas lifi arasında iletişimi sağlayan özelleşmiş bölgeye sinir-kas kavşağı adı verilir. Frenik sinirin aksonları aracılığıyla motor sinir son plağına kadar iletilen aksiyon

potansiyelleri burada Asetilkolin (ACh) veziküllerinin salınımını tetikler. Kas hücresi zarı üzerinde bulunan ACh reseptörlerine ACh bağlanarak ACh-reseptör kompleksinin oluşmasıyla, zardaki ligand bağımlı sodyum kanalları açılarak hücre içine Na^+ iyonlarının girmesi sağlanır. Pozitif yüklü bu iyonların kas hücresinin içerisine girmesiyle depolarizasyon adı verilen zar potansiyelinin dinlenim durumundan daha pozitif değerlere kayması olayı meydana gelir. Depolarizasyonla birlikte voltaj bağımlı olarak çalışan sodyum kanalları açılır ve hücre içerisine daha fazla Na^+ iyonu girişi olur. Hücre içine katyon girişi ile hücre daha fazla depolarize olur. Eğer bu depolarizasyon eşik adı verilen kritik bir değere ulaşırsa kas hücresinde aksiyon potansiyeli tetiklenir. Aksiyon potansiyeli, hücre zarında kendi kendini doğuran pozitif geribeslemeli bir sürecin (Hodgkin çevrimi) gelişmesinin bir sonucudur. Bu süreçte, hücre içerisine Na^+ girişi hücrenin daha fazla depolarizasyonuna, hücre depolarizasyonu ise daha fazla sodyum kanalının açılmasına neden olur. Böylece bu pozitif geribeslemeli süreç zar potansiyelini hızlı bir şekilde Na^+ denge potansiyeline (+55 mV) doğru yaklaştırır. Fakat bu sırada potasyum kanallarının da aktive olmasıyla hücre dışına K^+ iyonu akışı başladığından, bu depolarizasyon +55 mV değerine ulaşamaz (Guyton 2005).

Depolarizasyon sürmesine rağmen Na^+ kanallarının inaktive olmaya başlaması ile açık sodyum kanal sayısı azalmakta, bir yandan da gecikmiş voltaj bağımlı K^+ kanalları açılmaktadır. Hücre zarının potansiyel farkının potasyumun denge potansiyeline (-75 mV) yaklaşma eğilimi göstermesi zarın potansiyelinin yeniden negatif yönde değişim göstermesine yani repolarizasyona neden olur. Potasyum kanallarının inaktivasyonu da gecikmeli olduğundan zar potansiyeli dinlenim zar potansiyelinden daha da negatif değerlere kayarak zarın hiperpolarizasyonuna neden olur. Gecikmeli de olsa K^+ kanallarının inaktive olmasıyla ve aktif Na – K pompalarının da yardımıyla zar potansiyeli yeniden dinlenim değerine döner (Pehlivan 1997). Sodyum kanallarının açılıp hücrenin depolarize olması, kasılma için gerekli olan Ca^{++} iyonlarının sarkoplazmik retikulumdan kas hücresi içerisine girişini tetikler. Diyafram kası gibi birçok kas hücresinde hücre içerisine Ca^{++} iyonlarının girişi, K^+ iyon çıkışına bağlı repolarizasyonun ileri fazlarında da sürdüğünden hiperpolarizasyon görülmez.

Kas hücresinde bir aksiyon potansiyeli oluştuğunda, hücre boyunca bir dalga şeklinde yayılır. Sarkolemma olarak adlandırılan iskelet kası hücresinde bu hücreye özel, t-tübülü adı verilen hücre yüzeyinden hücrenin derinliklerine kadar uzanan girinti şeklinde yapılar bulunmaktadır. Bu tübüler yapıda aksiyon potansiyelinin oluşumu kasın kasılmasını sağlayan kimyasal bir dizi olayı tetikler (Hopkins 2006).

1.5.1. Aksiyon Potansiyeli Kayıt Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

Hayvanlara ait hücrelerden ilk hücre içi ölçümler 1949 yılında Hodgkin ve Huxley tarafından Plymouth'da, Curtis ve Cole tarafından ise Massachusets'de gerçekleştirilmiştir (Curtis ve Cole 1942, Hodgkin ve Huxley 1952). Bu çalışmalarda, akson çapının 1 mm civarında olması sebebiyle bu tip çalışmalar için çok uygun olan ve henüz yeni keşfedilmiş mürekkep balığının dev aksonu kullanılmıştır. İnce metal çubuk elektrot, aksonun kesilmiş olan ucundan hücre içine sokularak hücre içi ile aksonun bulunduğu dış ortam yani deniz suyu arasındaki potansiyel fark ölçülebilmiştir.

Bu çalışmalardan birkaç yıl sonra Ling ve Gerard tarafından hücre içi cam mikroelektrot icat edilmiştir (Ling ve Gerard 1949). Mikropipet erime sıcaklığı düşük sert cam pipetin orta kısmının yüksek sıcaklıkta ısıtılıp iki ucundan hızlı bir şekilde çekilmesiyle elde edilir ve oldukça ince ve düzgün bir uca sahiptir. Mikropipetin içerisine güçlü elektrolitik bir çözelti (3 M KCl) doldurularak mikroelektrot elde edilir. Mikroelektrodun içerisine klor ile kaplanmış gümüş (Ag/AgCl) elektrot yerleştirilerek mikroelektrot bu gümüş tel aracılığı ile giriş empedansı yüksek bir pre-amplifikatörle irtibatlandırılır. Uç çapının 1 μm'den daha az olması sayesinde hücre içerisine rahatlıkla girilir ve girilen yerde mikroelektrodun etrafını hücre zarının sıkı şekilde sarması ile herhangi bir kaçak olmaksızın hücre içi potansiyel gözlemlenir ve kaydedilebilir. Hücre içi mikroelektrotlar 10-100 MΩ arasında değişen dirençlere sahiptir ve direncin büyük olması mikroelektrodun uç

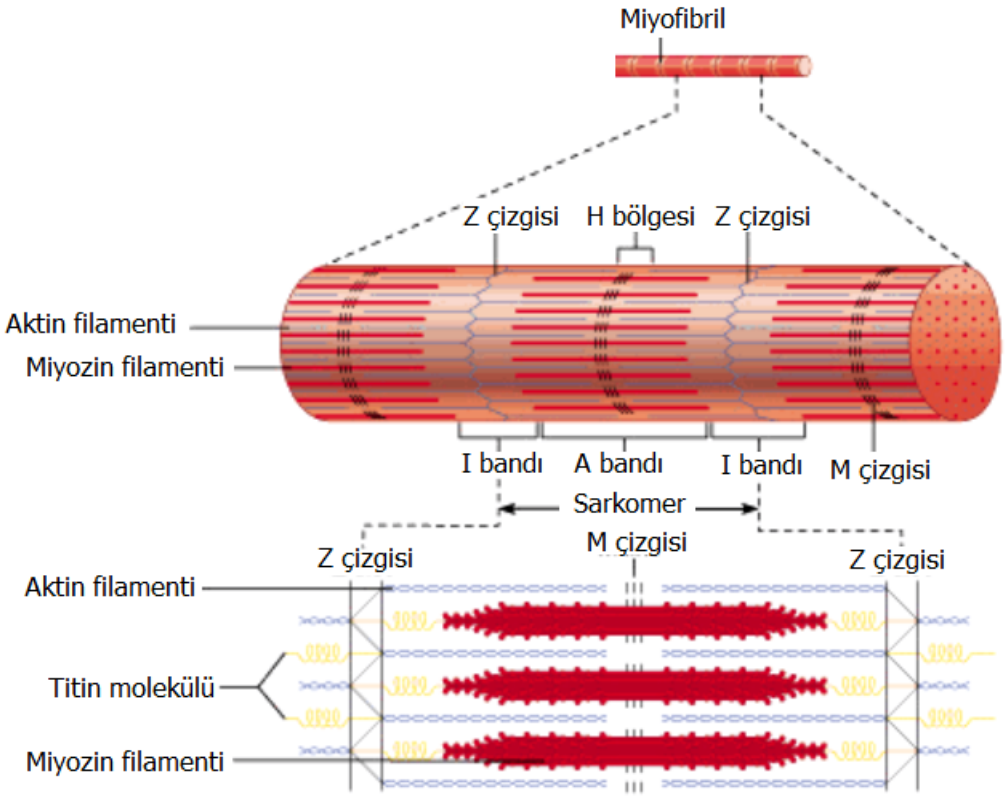
çapının küçüklüğünün bir ifadesidir. Mikroelektrot direncinin büyük oluşu, irtibatlandırıldığı amplifikatörün giriş empedansının daha da büyük olmasını zorunlu kılar. Aksi takdirde gözlenen potansiyel fark değeri gerçek değerden uzaklaşır (Aidley ve Stanfield 1996).

1.6. Diyafram Kasında Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi ve Kasılma Mekanizması

Uyarılma-kasılma çiftlenimi terimi motor sinirler tarafından sarkolemma zarında oluşturulan aksiyon potansiyelinin öncülük ettiği ve hücre içerisinde bulunan kontraktil proteinlerin birbirleriyle etkileşimine kadar süren bir dizi işlemi içermektedir. T-tübüllerinin zarları nifedipin gibi dihidropiridin bileşiklerinin bağlanma bölgelerinin vücudumuzda en yüksek yoğunlukta bulunduğu yerlerdir. Günümüzde, t-tübüler sistemindeki dihidropiridin reseptörlerinin diğer dokularda bulunan L-tipi voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarıyla benzer aminoasit dizilimine sahip olduğu, buna rağmen Ca^{++} kanalı gibi fonksiyon göstermedikleri bilinmektedir. Bu reseptörlerin görevleri yalnızca voltaj değişimlerini algılamaktır. Aksiyon potansiyeli t-tübüllerine ulaştığında zar potansiyelindeki değişim, dihidropiridin reseptörünün α-alt ünitesinde yapısal değişim meydana gelmesine neden olur. Bu değişim, ryanodin reseptörü olarak adlandırılan ve sarkoplazmik retikulumdan Ca^{++}'un salımının gerçekleştiği kanalın da yapısal değişime uğramasına sebep olur. Dihidropiridin ile ryanodin reseptörleri arasındaki etkileşimin sonucu olarak kanal açılır ve Ca^{++} sarkoplazmik retikulumdan konsantrasyon gradyenti etkisinde dışarı akmaya başlar. Sitoplazmaya doğru gerçekleşen bu akış ile kasılma tetiklenir.

Kasın kasılması aktin ve miyozin adı verilen filament biçimli iki proteinin etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Bu proteinler arasında *in vitro* ortamda güçlü bir bağ meydana gelmesine karşın, hücre içerisinde kasılmanın gerçekleştiği ünite olan sarkomerlerde yüksek düzeyde organize olmuş olarak bulunurlar. Her bir sarkomer kas lifinde dikey olarak bulunan bitişik Z proteini tabakaları arasında bulunur. Sarkomer mikroskop altında kalın ve ince çizgili olarak görünür. Kalın filamentler

miyozin, ince filamentler ise aktindir. Aktin ve miyozin filamentlerinin kısmen iç içe girmesi sebebiyle koyu ve açık bantlar görülür. Açık bantlar sadece aktin filamentlerini içerir ve I bandı olarak adlandırılırlar. Koyu bantlar ise miyozin filamentleri ve bu filamentlerin aralarına giren aktin filamentlerini içerirler ve A bandı olarak adlandırılırlar. Aktin filamentlerinin bulunmadığı yalnızca miyozin filamentlerinin orta kısmını içeren banda ise H bandı, bu bandın ortasındaki ince çizgiye ise M çizgisi adı verilir. Miyozin filamentlerinin yan taraflarından küçük uzantılar çıkar ve bu uzantılara çapraz köprüler adı verilir. Çapraz köprülerle aktin filamentleri arasındaki etkileşim kasılmaya neden olur. Miyozin ve aktin filamentleri arasındaki yapısal organizasyonu sürdürmek zordur ve bunu titin adı verilen moleküller sağlar (Şekil 1.6).

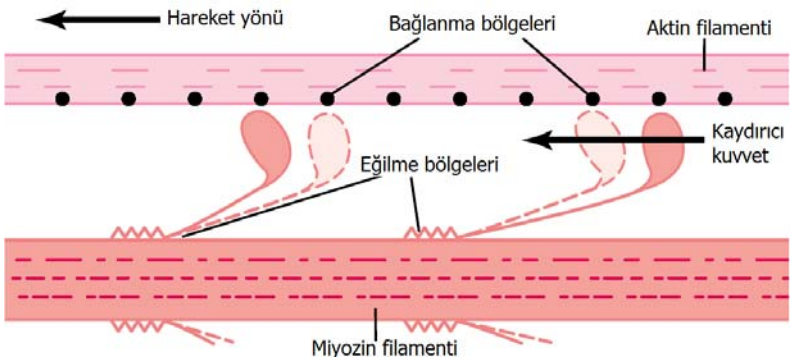


Şekil 1.6: Kas lifinin kasılmayla ilgili elemanlarını ve sarkomerin yapısının şematik gösterimi (Marieb 1995).

Miyozin molekülleri uzun bir kuyruk ile küresele benzer yapıda baş bölgesi içerir. Miyozinin baş kısmında aktin için bağlanma bölgeleri bulunur fakat gevşemiş durumda bu bağlanma, aktin filamentinde bulunan düzenleyici proteinler tarafından engellenir. Aktin monomerlerinin sarmal yapısı nedeniyle oluşan oyukta

tropomiyozin molekülü uzanır. Aktin üzerindeki her bir miyozin bağlanma bölgesinde troponin T (tropomiyozin bağlanan), troponin I (inhibe edici) ve troponin C (Ca^{++} bağlanan) alt ünitelerinden oluşan bir troponin kompleksi bulunur. Gevşeme durumunda miyozinin aktine bağlanması tropomiyozin ve troponin I kombinasyonu tarafından engellenir.

Kasılma başlamadan önce çapraz köprü başları ATP ile bağlanır. Miyozin başının ATPaz aktivitesi ile ATP yıkılır fakat yıkım ürünleri olan ADP ve inorganik fosfat (P_i) başa bağlı kalır. Bu aşamada baş, aktin filamentine doğru uzanmakla birlikte henüz bağlanmamış olarak bulunur. Sarkoplazmik retikulumdan Ca^{++} hücre içerisine salındığında, Ca^{++}, troponin C'ye bağlanarak diğer troponin alt ünitelerinde yapısal değişime sebep olur. Bu yapısal değişim sayesinde miyozinin bağlanma bölgesi açığa çıkar ve bağlanma gerçekleşir. Çapraz köprü başının aktin filamentinin aktif bölgesine bağlanması, başın biçimsel değişikliğe uğrayarak eğilmesine neden olur. Bu sayede miyozin filamenti aktin üzerinde kayar gibi hareket eder. Bu mekanizmaya kayan filamentler teorisi adı verilir (Şekil 1.7). Buna göre, kasılma sırasında iki Z çizgisi birbirine yaklaşır, sarkomerin ve I bandının boyu kısalır fakat A bandının boyu değişmez. Baş kısmı eğildiğinde, bağlı bulunan ADP ve P_i salınır ve buraya yeni bir ATP molekülü bağlanır. Bu bağlanma başın aktinden ayrılmasına neden olur. Kasın gevşemesi ile döngü tamamlanır. Her bir kasılmada bu döngü tekrarlanır.



Şekil 1.7: Kayan filamentler teorisine göre kasılma mekanizmasının şematik gösterimi (Guyton 2005).

Kasılmaların birleşerek kasın kasılma kuvvetini artırmasına sumasyon adı verilir. Sumasyon iki yolla meydana gelir; eşzamanlı kasılan motor ünitelerin sayısını artırarak (mutipl lif sumasyonu), kasılma frekansını artırarak (frekans sumasyonu).

Multipl lif sumasyonunda, merkezi sinir sisteminden gelen zayıf uyarılarla önce sayıca az ve küçük kas lifleri uyarılırken sinyalin şiddeti arttıkça daha büyük motor üniteler de uyarılmaya başlar. Tüm motor ünitelerin kasılmalarının toplanmasıyla multipl lif sumasyonu gerçekleşir. Farklı motor ünitelerin asenkron olarak uyarılması kasılma kuvvetinin dereceli olarak artmasını ve düzgün kasılma meydana gelmesini sağlar.

Frekans sumasyonunda ise uyarım frekansının artırılmasıyla her yeni kasılmanın bir önceki kasılmayla çakışmaya ve üst üste binmeye başladığı bir duruma ulaşılır. Sonuçta ikinci kasılma birinciye eklenir ve toplam kasılma gücü uyarım frekansının artmasıyla birlikte artar. Uyarım frekansı belirli bir kritik değere ulaştığında art arda kasılmalar o kadar hızlıdır ki, kasılmalar birbiriyle kaynaşarak düzgün ve sürekli bir kasılma meydana getirir. Bu duruma tetanus, kritik değere ise tetanus frekansı adı verilir. Kasılma gücü en büyük değerine ulaştıktan sonra uyarım frekansı artırıldığında kasılma gücü artmaz. Birbirini takip eden aksiyon potansiyelleri arasında bile sarkoplazmada yeterince Ca^{++} bulunduğu için kasılma hali sürekliliğini korur (Guyton 2005).

1.6.1. Kasılmanın Kaydedilmesinde Kullanılan Yöntemler

Kas kasıldığında bağlı bulunduğu cisme ya da sisteme bir kuvvet uygular ve eğer sistem mümkün kılıyorsa kasın boyunda kısalma meydana gelir. Bir kasılma olayında her iki aktivite de ölçülebilir; kuvvet ve boydaki kısalma. Genellikle ölçümler kasılma esnasında bu iki değişkenden bir tanesi sabit tutularak gerçekleştirilir. İzometrik kasılma olarak adlandırılan kasılmada, kasın boyunun kısalmasına izin verilmeyerek (boyu sabit tutularak) kasılma kuvveti ölçülür.

İzotonik kasılma olarak adlandırılan kasılmada ise kasın oluşturduğu kuvvet sabit tutularak boyunda meydana gelen kısalma ölçülür. Kas uzunluğunun veya kuvvetin ya da her ikisinin de bir karmaşası olarak kaydedilen değişime sarsı (twitch) adı verilir.

İzometrik kasılmanın ölçüldüğü sistem herhangi bir esnek eleman içermemelidir. Böylece kasın kısalması engellenirken kuvvetin doğru ölçülmesi mümkün olur. Geçmişte izometrik kasılma kuvveti ölçümlerinde kullanılan sistemlerde basitçe sert bir yaya bağlı olan kola kas demetinin bir ucu tutturulup diğer ucu ise hareketsiz bir noktaya sabitlenmekte, yaya bağlı olan kola monte edilmiş bir karbon kalemi ile ölçümler gerçekleştirilmekteydi. Fakat günümüzde çok daha gelişmiş kuvvet çevireçleri kullanılmaktadır. Kuvvet, çevireç aracılığı ile elektriksel gerilime dönüştürülerek, hızlı yanıtlar verebilen elektriksel ölçü ve gözlem araçlarına aktarılabilmekte böylece, zamanla değişim grafikleri de oluşturulabilmektedir.

İzotonik kasılmanın ölçüldüğü sistemlerde, genellikle hareketi kaydedilen bir hareketli kol ve bu kola bağlı bir karbon kalemi bulunmaktadır. Kasın diğer ucu ise bir noktaya sabitlenmekte ya da kütlesel özelliği bilinen herhangi bir ağırlıkla yüklenmektedir. Fakat günümüzde, izometrik kasılma kaydedilmesinde olduğu gibi hareketli kolun hareketi bir çevireç ile elektriksel gerilime dönüştürülerek elektriksel ölçü ve gözlem araçlarına aktarılabilmekte, böylece zamanla değişim grafikleri de oluşturulabilmektedir (Keynes ve Aidley 1981).

1.7. Çalışmanın Amacı

Abdominal aorta, diyaframın altında kalan gövdeye ve alt ekstremitelere kan dağıtımının sağlandığı tek ana damardır. Bu damarın çapında 1,5 katlık artma sonucu anevrizma meydana gelmektedir. Abdominal aorta anevrizması (AAA) adı verilen bu durumun tedavisi aortik cerrahi yöntemler kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Cerrahi işlemler esnasında abdominal aort bir süre kapatılarak anevrizma meydana gelen bölüme greft yerleşitirilip dikilmekte, bu işlemin sonrasında ise yeniden kan akışı sağlanmaktadır (Sakalihasan 2005). İskemi olarak adlandırılan kan akışının durdurulması ve ardından reperfüzyon olarak adlandırılan yeniden kan akışına izin verilmesi, bu işlemin uygulandığı damarın beslediği dokularda bazı fonksiyonel değişikliklerin meydana gelmesine neden olmaktadır. AAA tedavisindeki cerrahi işlem sonrasında meydana gelen solunumsal fonksiyon bozukluğunun mortalite ve morbiditesi oldukça yüksektir (Katzen ve MacLean 2006). Operasyon geçiren hastaların % 60'ında meydana gelen solunum fonksiyon bozukluğu iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalar soluk alıp vermede aktif göreve sahip diyafram kasının bu komplikasyonlarda büyük ölçüde bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (Moneley ve ark 2001).

İnsanlarda meydana gelen buna benzer komplikasyonların ve birçok patolojinin araştırılmasında deneysel hayvan modellerinden yararlanılmaktadır. McLaughlin ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, AAA tedavisinin neden olduğu solunum fonksiyon bozukluğunun benzerinin meydana geldiği bir deneysel hayvan modeli geliştirilmiştir (McLaughlin ve ark 2000).

Yapmış olduğumuz çalışma ile sıçanlarda deneysel AAA tedavi modeli oluşturularak, solunumla ilgili komplikasyonlardan sorumlu tutulan diyafram kasında meydana gelebileceği düşünülen elektrofizyolojik değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, sağlıklı ve deneysel AAA tedavi modeli oluşturulan sıçanlardan izole edilen diyafram kasından tek hücre aksiyon potansiyeli ile izometrik kasılma kuvveti ölçümleri gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Genel Bilgiler

Yapılan deneylerde 14-16 haftalık erişkin 48 adet Wistar türü albino sıçanlar kullanılmıştır. Fizyolojik farklılıklardan kaynaklanabilecek varyasyonlar düşünülerek ağırlıkları 250-350 g arasında değişen yalnızca erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları, 12 saat gece 12 saat gündüz periyodunda su ve yemde herhangi bir kısıtlama olmaksızın kafes başına 5 adet sıçan olmak koşuluyla barındırılmışlardır.

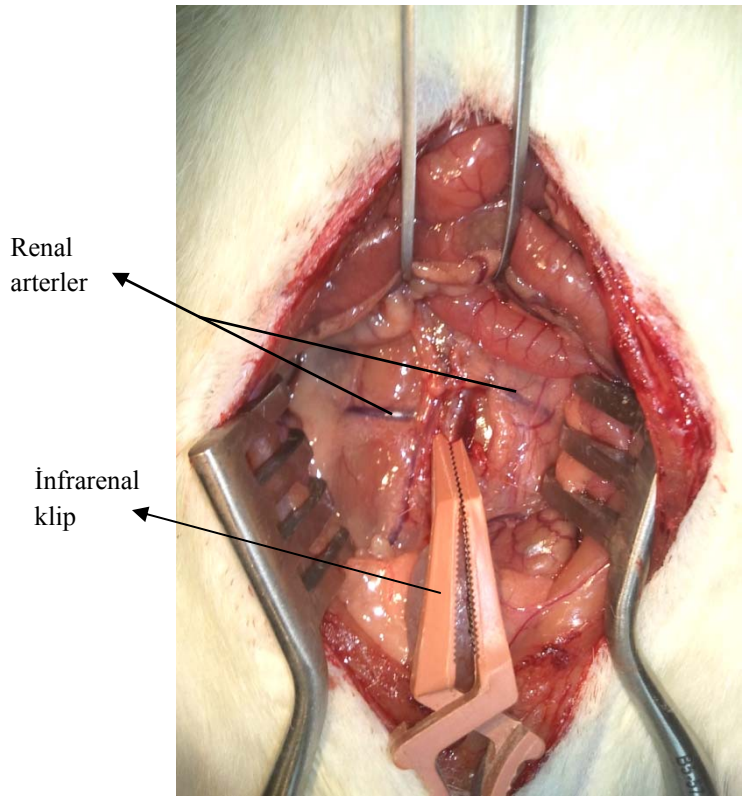
Kullanılan tüm sıçanlar Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilmiştir. Deney hayvanlarına yapılan tüm deneysel ve cerrahi işlemler Meram Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2010-085 sayılı ve 30/09/2010 tarihli onayına dayanarak, ek deneyler ise 2013-074 sayılı ve 17/04/2013 tarihli onayına dayanarak gerçekleştirilmiştir.

Deney grupları her grupta 24'er hayvan olmak üzere iki grup olacak şekilde organize edilmiştir. Bu iki gruptan ilki SHAM grubu olarak adlandırılan, abdominal iskemi-reperfüzyon modelinin uygulanmadığı gruptur. İkinci grup ise IR grubu olarak adlandırılan ve abdominal iskemi-reperfüzyon modelinin uygulandığı gruptur. İskemi-reperfüzyon modelinin uygulandığı ve Ryanodin varlığında kayıt alınan grup IR+RyR, N-metil-D-glukamin varlığında kayıt alınan grup IR+NMDG, 4-aminopiridin varlığında kayıt alınan grup ise IR+4AP olarak adlandırılmıştır. İskemi-reperfüzyon modelinin uygulanmadığı gruplar ise benzer şekilde, SHAM+RyR, SHAM+NMDG, SHAM+4AP olarak adlandırılmıştır. Her bir deney hayvanından 2 adet hemidiyafram preparatı izole edilebilmektedir. SHAM ve IR gruplarında, izole edilen hemidiyaframlardan bir tanesi mikroelektrot ile aksiyon potansiyeli kaydedilmesi deneylerinde, diğeri ise izometrik kasılma kuvveti kaydedilmesi

deneylerinde kullanılmıştır. Deneyler sırasında deneysel iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilirken meydana gelen ölümler nedeniyle 4 adet deney hayvanı elektrofizyolojik kayıt deneylerine alınamamamıştır.

2.2. Abdominal İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulması

Abdominal iskemi-reperfüzyon modelinin oluşturulması için, deney hayvanları 8 mg/100 g ketamin ve 1 mg/100 g ksilazin kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile anestetize edilmiştir. Anestezi altındaki deney hayvanları, vücut sıcaklıklarının 37^{o}C'de sabit tutulabilmesi amacıyla, vücut sıcaklığını sürekli olarak bir rektal prop yardımıyla ölçerek bir geribesleme düzeneğine aktaran alttan ısıtmalı ameliyat masası (MAY RTC 9404-A Animal Rectal Temperature Controller, Commat Ltd., Türkiye) üzerine sabitlenmiştir. Abdominal bölge tüylerden arındırılarak temizlenmiş ve burada yaklaşık 3 cm'lik median kesi oluşturulmuştur. Bir ekartör yardımıyla abdominal aortanın infrarenal bölgesi görünür hale getirilmiştir. Aortaya ulaşılabilmesi amacıyla periton zarı açılmış, abdominal aortadan kan akışını tamamen bloke edecek şekilde bir vasküler klip yerleştirilmiştir (Şekil 2.1). Peritondan su kaybını engellemek amacıyla kesi bölgesi örtülerek 30 dakika beklenmiştir.



Şekil 2.1: Abdominal aortaya ifrarenal bölgeden klip yerleştirilmesi.

Bekleme süresinin ardından klip kaldırılarak abdominal kan akışı sağlanmıştır. Kesi bölgesi 4-0 ipek sutür ile dikilerek kapatılmış 2 saat boyunca deney hayvanı normal yaşam koşullarına döndürülerek gözlem altında tutulmuştur. Bu sürenin ardından uyanmış olan deney hayvanı tekrar 8 mg/100 g ketamin ve 1 mg/100 g ksilazin kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile anestetize edilerek diyafram izolasyonu için disseksiyon aşamasına geçilmiştir.

İskemi-reperfüzyon modelinin uygulanmadığı grup olan SHAM grubu deney hayvanlarına ise IR grubuna uygulanan prosedürden farklı olarak yalnızca abdominal aortadan kan akışının klip ile bloke edilmesi işlemi uygulanmamıştır.

2.3. Sıçandan Diyafram İzolasyonu

Diyaframın izolasyonuna başlanmadan önce deney hayvanları anestezi altındayken öncelikle kanın toraksta toplanmasını önlemek için sıçana servikal dislokasyon uygulanıp baş, boyun hizasından kesilerek ayrılmıştır Diyafram izolasyonu Bülbring'in 1946 yılında tanımlamış olduğu yönteme göre gerçekleştirilmiştir (Bülbring, 1946). Göğüs bölgesindeki tüylü deri tabakası, göğüs kafesi görünecek şekilde temizlenmiş, ksifoid çıkıntının görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Ksifoid çıkıntının kesilmesiyle oluşan boşluktan yararlanarak toraks ön duvarı açıldıktan sonra kostalar kesilerek frenik sinirler görünür hale getirilmiştir. Ardından batın açılarak karaciğer ile diyafram arasındaki bağlar da ayrıldıktan sonra kostalardan destek alınarak diyafram tendon hizasından omurgaya kadar kesilmiştir. Diyaframın bağlantılı olduğu dokulardan ayrılmasının ardından, önce sol frenik sinir daha sonra da aorta ile paralel seyreden sağ frenik sinir timus hizasından diyaframı innerve ettiği bölgeye kadar izole edilmiştir. İzole edilen diyafram-frenik sinir dokusu median bölgede yer alan bağ doku hizasından kesilerek iki adet hemidiyafram-frenik sinir preparatı elde edilmiştir. Frenik sinir-hemidiyafram preparatları kostaların hemidiyaframı taşıyacağı şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen canlı doku preparatı hızlı bir şekilde sıcaklığı fizyolojik sıcaklık olan 37^{o}C'de sabit tutulan ve taze kalması için sürekli perfüze edilen Krebs solüsyonu içerisine alınmıştır.

2.4. Kullanılan Kimyasallar

Deneyler esnasında çalışılan dokunun canlı olması gerektiğinden hücrelerarası sıvıyı taklit edecek aynı özelliklere ve iyonik konsantrasyonlara sahip Krebs solüsyonu kullanılmıştır. Kullanılan solüsyon 133 mM NaCl; 4,9 mM KCl; 1,8 mM $CaCl_2$; 11,9 mM $NaHCO_3$; 0,7 mM NaH_2PO_4; 11 mM Glukoz içermektedir. N-metil-D-glukamin (NMDG) eklenen modifiye Krebs solüsyonu ise 127 mM NMDG; 40 mM NaCl; 4,9 mM KCl; 1,8 mM $CaCl_2$; 11,9 mM $NaHCO_3$; 0,7 mM NaH_2PO_4; 11 mM Glukoz içermektedir. Ryanodin (RyR) ile yapılan deneylerde 3 nM konsantrasyonda RyR içeren, 4-Aminopiridin (4AP) ile yapılan deneylerde ise

0,3 mM konsantrasyonda 4AP içeren Krebs solüsyonu kullanılmıştır. 4-Aminopiridin ve N-metil-D-glukamin Sigma Aldrich Chemicals, USA'dan, diğer kimyasallar Merck Chemicals, Germany'den temin edilmiştir. Deneyler esnasında ve öncesinde sürekli olarak %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımı ile gazlanan solüsyonların pH'ı 7,4 olarak ayarlanmıştır.

2.5. İzometrik Kasılmanın Kaydedilmesi

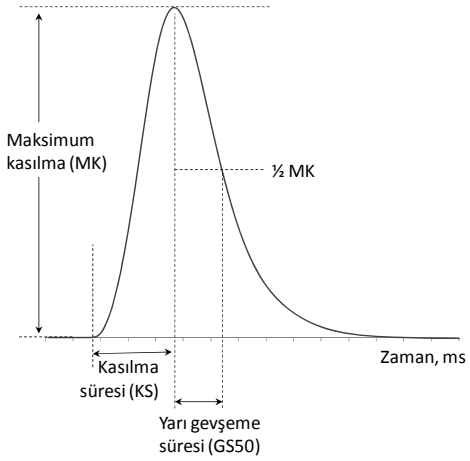
Hemidiyafram preparatı izole edildikten sonra kas liflerinin boylamasına uzandığı eksen uzun kenar olmak üzere 20 mm uzunluğunda 5 mm eninde şerit halinde kesilmiştir. Ardından, içerisi Krebs solüsyonu ile perfüze edilen, dışı 2 mm sıcak su devri sağlanan (MAY WBC 3044 Waterbath and Circulator, Commat Ltd., Türkiye) ısı ceketli 20 mL hacimli organ banyosu (MAY IOBS 99 Isolated Tissue Bath and Circulator, Commat Ltd., Türkiye) içerisine alınmıştır. Diyafram şeridinin tendon ile biten ucu doku klibi ile bir manuel mikromanipülatöre, kostalara bağlı olan ucu ise yine bir doku klibi ile kuvvet çevirecine (FT03 Force Displacement Transducer, Grass Co., USA) bağlanmıştır. Uyarım, anot ve katot uçları diyafram şeridini arasına alacak şekilde tasarlanmış alan uyarısı elektrodundan bir stimülatör (S88 Stimulator, Grass Co., USA) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Kayıt prosedürünün başlamasından önce 20 dakikalık dokunun dengelenmesi için bekleme periyodunun ardından mikromaniplatör ile kasın gerimi 2 g olacak şekilde ayarlanmıştır. İlk olarak 1 Hz frekansta supramaksimal kare biçimli uyaranlar verilerek kasılma yanıtları kaydedilmiştir. Dinlenme periyodunun ardından 50 Hz frekanslı supramaksimal kare biçimli puls deseni uygulanarak tetanik kasılma yanıtı kaydedilmiştir. Tekrar bir dinlenme periyodunun ardından frekansı 20 Hz'den başlayarak 70 Hz'e kadar artırılan supramaksimal kare biçimli puls deseni uygulanmıştır. Eşzamanlı olarak stimülatörden de girdi alan kayıt programı ile puls deseni de kaydedilmiştir. Veriler bir analog dijital çevirici (MP45 Two channel data acquisiton unit, Biopac, USA) üzerinden bir kayıt programı (BSL PRO 3.7.5, Biopac, USA) kullanılarak bilgisayarın sabit belleğinde saklanmak üzere kaydedilmiştir.

İzometrik kasılma kayıtları tamamlandıktan sonra diyafram şeritleri çevreleyen bağ dokudan arındırıldıktan sonra 0,1 mg hassasiyetinde bir terazi (SBA 31, Scaltec) ile ağırlıkları ölçülerek not edilmiştir.

2.6. İzometrik Kasılma Kayıtlarının Analizlenmesi

Frekansı 1 Hz olan supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtlarının analizlenmesi sonucunda genlik (Maksimum Kasılma, MK), kasılma süresi (KS) ve yarı gevşeme süresi (GS50) parametreleri elde edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Frekansı 1 Hz olan supramaksimal kare biçimli uyaranların kasılma yanıtlarının analizinden elde edilen parametreler.

Frekansı 50 Hz olan supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtlarının analizlenmesi sonucunda ise tetanik kuvvet (TK) parametresi elde edilmiştir. Frekansı 25-70 Hz arasında değiştirilen supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtlarının analizlenmesi ile kasın hangi frekanstaki uyaran verildiğinde tetanusa girdiği (Tetanus frekansı, TF) belirlenmiştir.

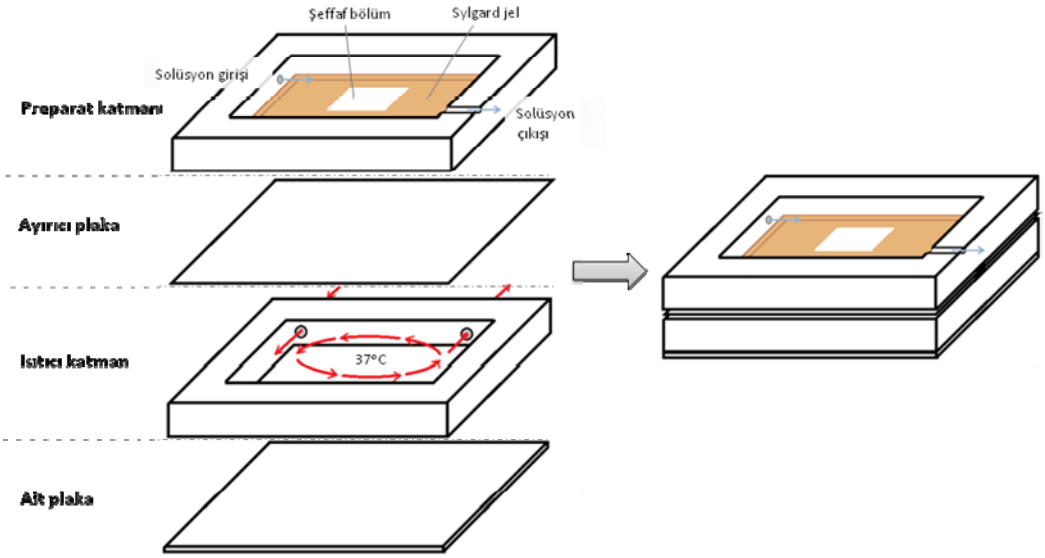
Maksimum kasılma (MK) ve tetanik kuvvet (TK) parametreleri kasılma kuvveti içeren parametreler olup normalize edilen veriler Newton (N) cinsinden verilmiştir. Bu veriler hesaplanırken birim kesit alana karşılık gelen kuvvet değeri ilk olarak 1972'de Close tarafından tanımlanan özel bir formülden yararlanılmıştır (Close, 1972).

$$\frac{Kuvvet}{cm^2} = \frac{(F \times d \times l)}{m}$$

Bu formüle göre F, ölçülen kuvveti (N), d, iskelet kasının spesifik yoğunluğunu (1,06 g/cm^3), l, kas şeridinin uzunluğunu (cm) ve m ise kas şeridinin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

2.7. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi

Hemidiyafram preparatı izole edildikten sonra orta kısmında 20x15 mm ebadında şeffaf pleksiglas bir bölüm içeren ve zemini şeffaf bölümle aynı hizada sylgard jel ile kaplanmış organ banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Organ banyosu deney süresince sürekli olarak taze Krebs solüsyonu ile 3 mL/dk hızında perfüze edilmiş ve özel tasarımı sayesinde sıcaklığı 37^{o}C'de sabit tutulmuştur (Şekil 2.3).

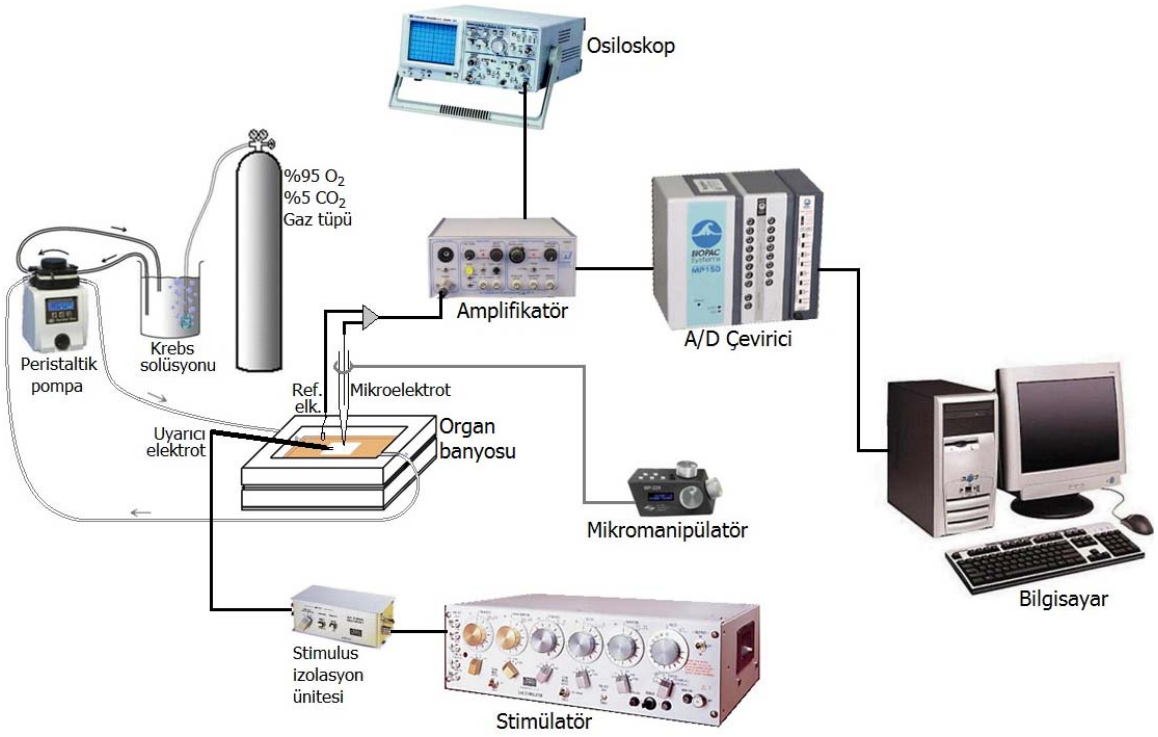


Şekil 2.3: Aksiyon potansiyeli kayıt edilmesi deneylerinde kullanılan organ banyosunun katmanları demonte (solda) ve monte (sağda) halde şematik olarak gösterilmiştir.

Hemidiyafram preparatı yoğunluklu olarak kas dokusunu içeren bölümü şeffaf kısma gelecek şekilde 2-3 mm uzunluğundaki çelik pinler kullanılarak sylgard jel üzerine tamamı solüsyon seviyesinin altında kalacak şekilde sabitlenmiş, 20 dakika dokunun dinlenmesi için beklenmiştir.

Düşük erime sıcaklığına sahip iç filamentli borosilikat pipetler (WPI Instruments Co., UK) bir mikroelektrot çekici ile (PN-31 Miropipette puller, Narishige, Japan) çekilerek içleri bir hamilton tipi enjektör yardımıyla 3 M KCl çözeltisi ile doldurulmuştur. Mikropipetin içerisine klor ile kaplanmış Ag/AgCl tel yerleştirilmiş, mikroelektrot direnci ölçülmüştür. Deneylerde direnci 15-20 MΩ olan mikroelektrotlar kullanılmıştır.

Diyafram dokusu bir stimülatörle (S48 Stimulator, Grass Co., USA) oluşturulan 0,2 ms süreli supramaksimal kare biçimli uyaranlarla bir stimulus izolasyon ünitesi (SIU5, Grass Co., USA) üzerinden 0,1 mm çaplı tungsten telden yapılmış uyaran elektrot kullanılarak uyarılmıştır. Uyaran elektrot, diyafram üzerindeki konumunun değiştirilebilmesi için 3 akslı bir mikromanipülatöre (Narishige, Japan) monte edilmiştir. Mikroelektrot ise 3 akslı bir motorize mikromanipülatöre (MP225 3-axis motorized micromanipulator, Sutter Instrument, USA) monte edilerek kontrol edilmiştir. Sinyaller bir hücre içi kayıt amplifikatörü (IE-251A Intracelluler electrometer, Warner Instruments, UK) ile yükseltilerek bir analog/dijital çevirici (MP100 Data acquisition system, Biopac, USA) üzerinden bilgisayara aktarılmış, yazılım (AcqKnowledge 4.2.1, Biopac, USA) aracılığı ile ileri analizler için bilgisayar sabit belleğine kaydedilmiştir. Kayıtlar 25 kHz örnekleme hızında başlangıcı harici olarak stimülatörle tetiklenen 20 ms süreli sweepler şeklinde alınmıştır. Sinyallerde meydana gelen anlık değişimlerin gözlenmesi amacıyla bir osiloskop kullanılmıştır. Düzenek şematik olarak Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Aksiyon potansiyeli kayıt edilmesinde kullanılan deney düzeneği.

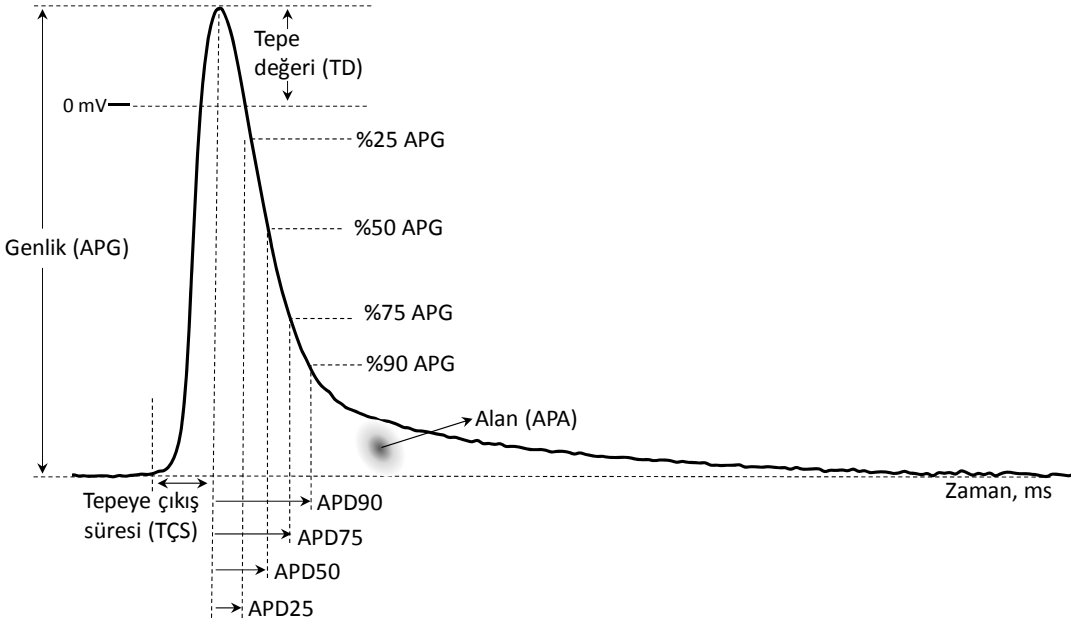
Her bir diyafram preparatı hipotetik olarak 4 bölgeye ayrılmış, her bir bölgeye rastgele 10 dalış gerçekleştirilmiştir. Diyaframın hangi bölgesinde çalışıldığının gözlenmesi için 10X büyütme gücüne sahip bir binoküler mikroskop (Nikon SMZ800, Japan) kullanılmıştır. Bir hücreye yalnızca 1 adet dalış gerçekleştirilmiş ve yalnızca 1 adet aksiyon potansiyeli kaydedilmiştir. Böylece deneyler sonucunda SHAM grubu için 429 adet, IR grubu için ise 412 adet aksiyon potansiyeli kaydedilmiştir.

Kasılma ile eşzamanlı olarak AP kaydedilmesi deneylerinde ise farklı olarak diyaframın kostalara bağlı olan ucu bir doku klibi ile kuvvet çevirecine (FT03 Force Displacement Transducer, Grass Co., USA) bağlanmıştır. Uyarım, anot ve katot uçları diyafram şeridini arasına alacak şekilde tasarlanmış alan uyarısı elektrodundan bir stimülatör (S48 Stimulator, Grass Co., USA) aracılığıyla 0,2 ms süreli supramaksimal kare biçimli uyaranlarla bir stimulus izolasyon ünitesi (SIU5, Grass Co., USA) üzerinden gerçekleştirilmiştir. Kas sarsıları, bir amfi (DA100C Amplifier Module, Biopac, USA) ile yükseltilerek bir analog/dijital çevirici (MP100 Data acquisition system, Biopac, USA) üzerinden AP sinyalleri ile eşzamanlı ve aynı

örnekleme hızında alınıp bilgisayara aktarılmış, yazılım (AcqKnowledge 4.2.1, Biopac, USA) aracılığı ile ileri analizler için bilgisayar sabit belleğine kaydedilmiştir.

2.8. Aksiyon Potansiyellerinin Analizlenmesi

Kaydedilen aksiyon potansiyelleri üzerinden hesaplanan parametreler; Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP), Tepe Değeri (TD), Genlik (APG), Alan (APA), Tepeye Çıkış Süresi (TÇS), Yarı Repolarizasyon Süresi (APR50), Türev Maksimum (dV/dt_{mak}), Türev Minimum (dV/dt_{min}), Maksimum Türev Zamanı (MTZ) ve Çarpıklıktır.



Şekil 2.5: Kaydedilen aksiyon potansiyelleri üzerinden hesaplanan parametreler.

Dinlenim zar potansiyeli (DZP), hücre içerisine girildikten sonra herhangi bir uyaran verilmeden kaydedilmiş tek bir sweepi oluşturan veri noktalarının ortalamaları alınarak her bir hücre için hesaplanmıştır. Birimi milivolt (mV) olarak verilmiştir.

Tepe değeri (TD), hücre zarının depolarizasyonunun sonucunda aksiyon potansiyelinin ulaştığı en büyük potansiyel fark değeridir (Şekil 2.5). Birimi milivolt (mV) olarak verilmiştir.

Genlik (APG), aksiyon potansiyelinin en büyük değere ulaştığı nokta ile dinlenim zar potansiyeli arasındaki fark hesaplanarak bulunan değerdir (Şekil 2.5). Birimi milivolt (mV) olarak verilmiştir.

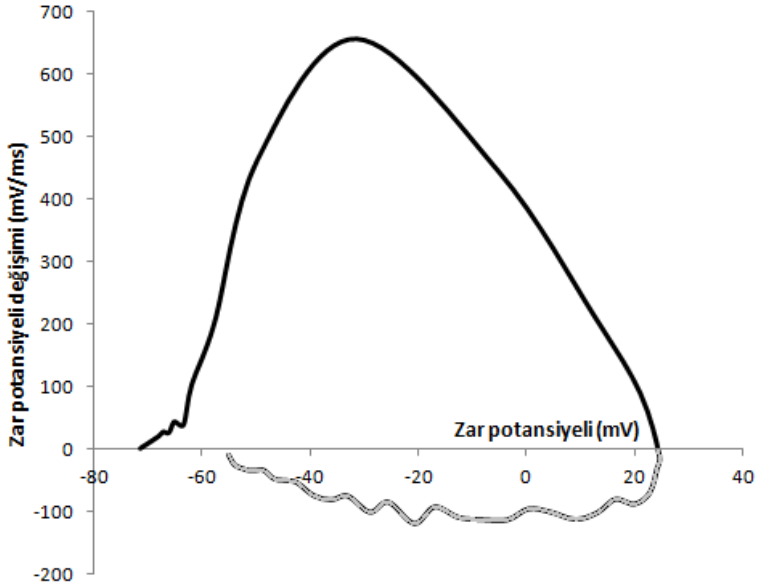
Alan (APA), kaydedilen aksiyon potansiyelinin mutlak değerinin integrali hesaplanarak elde edilen değerdir (Şekil 2.5). Birimi milivolt ile milisaniyenin çarpımı (mV.ms) olarak verilmiştir.

Tepeye çıkış süresi (TÇS), aksiyon potansiyelinin başlangıcı ile zarın potansiyel fark değerinin en büyük olduğu an arasında geçen süredir (Şekil 2.5). Birimi milisaniye (ms) olarak verilmiştir.

Repolarizasyonda, tepe değerinin %25, %50, %75 ve %90 azalması için geçen süreler sırasıyla APD25, APD50, APD75 ve APD90 olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.5). Birimi milisaniye (ms) olarak verilmiştir.

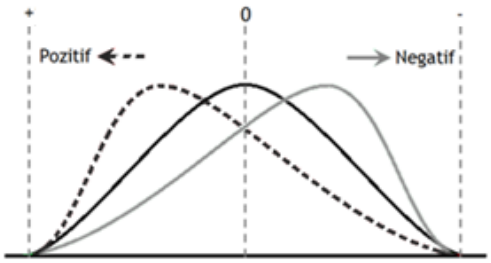
Aksiyon potansiyelinin tümünün türevi hesaplatıldığında, bulunan en büyük değer türev maksimum değeri (dV/dt_{mak}), en küçük değer ise türev minimum değeri (dV/dt_{min})'dir. Her iki parametrenin de birimi milivoltun milisaniyeye bölümü (mV/ms) olarak verilmiştir. Aksiyon potansiyelinin en büyük türev değerine ulaşması için geçen süre ise maksimum türev zamanıdır (MTZ), birimi ise mikrosaniye (μs) olarak verilmiştir.

Aksiyon potansiyeli esnasında hücre zarının her bir örnek alınan andaki potansiyel fark değerine bağlı potansiyel farkın değişimi grafiği oluşturulduğunda Şekil 2.6'daki gibi döngüsel bir grafik meydana gelmektedir.



Şekil 2.6. Hücre zarının her bir örnek alınan andaki potansiyel fark değerine bağlı potansiyel farkın değişimi grafiği.

Bu grafikte bağımsız değişken ekseninin (x ekseni) üzerinde kalan kısım aksiyon potansiyeli türevinin pozitif değerler aldığı anları içermektedir. Aksiyon potansiyeli türevi yalnızca çıkış fazında pozitif değerler alacağından, buradaki dağılım çarpıklık yönünden incelenmiştir. Çarpıklık (Skewness), istatistikte kullanılan bir yöntem olmakla beraber bir dağılımın simetrik olmaktan ne kadar ve ne yönde uzak olduğunun bir ölçüsüdür. Çarpıklık değeri pozitif ya da negatif olabilmektedir (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Simetrik dağılım (siyah), pozitif çarpıklığa (siyah kesikli) ve negatif çarpıklığa (gri) sahip dağılımlar.

Pozitif çarpıklıkta sağdaki kuyruk, negatif çarpıklıkta ise soldaki kuyruk uzundur. Çarpıklığın mutlak değeri, dağılımın simetri ekseninden ne kadar uzakta olduğunu gösterir. Buna göre her bir aksiyon potansiyeli için zar potansiyeline bağlı türevi bulunarak türevinin pozitif olduğu bölge izole edilmiş ve bir dağılım oluşturulmuştur. Bu dağılımın her birinin kendi maksimum değeri 100 kabul edilmek üzere yüzde (%) çarpıklık değerleri hesaplanmıştır. Çarpıklık değeri birimsizdir.

Kas sarsılarıyla eşzamanlı AP kayıtlarından, AP'nin başladığı andan kas sarsısının başlamasına kadar geçen süre olarak tanımlanan Latent Dönem (LD) parametresi hesaplanmıştır. Birimi milisaniye (ms) olarak verilmiştir.

2.9. İstatistiksel Analizler

Tüm veriler ortalama ve ortalamanın standart hatası (ortalama±st.hata) olarak verilmiştir. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnow ile test edilmiş ve $p>0,05$ anlamlılık düzeyindeki verilerin normal dağılıma uyduğu, $p<0,05$ anlamlılık düzeyindeki verilerin normal dağılıma uymadığı kabul edilmiştir.

Normal dağılıma uygunluk gösteren verilerin karşılaştırılması bağımsız t testi (Unpaired Student's t test) kullanılarak yapılırken, normal dağılıma uygunluk göstermeyen verilerin karşılaştırılması ise Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda p değeri 0,01'den küçük olarak bulunan veriler arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Verilerin analizi Microsoft Excel 2007 ve MatLab R2010a kullanılarak yapılırken, istatistiksel testler ise GraphPad Prism 5 Demo for Windows paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

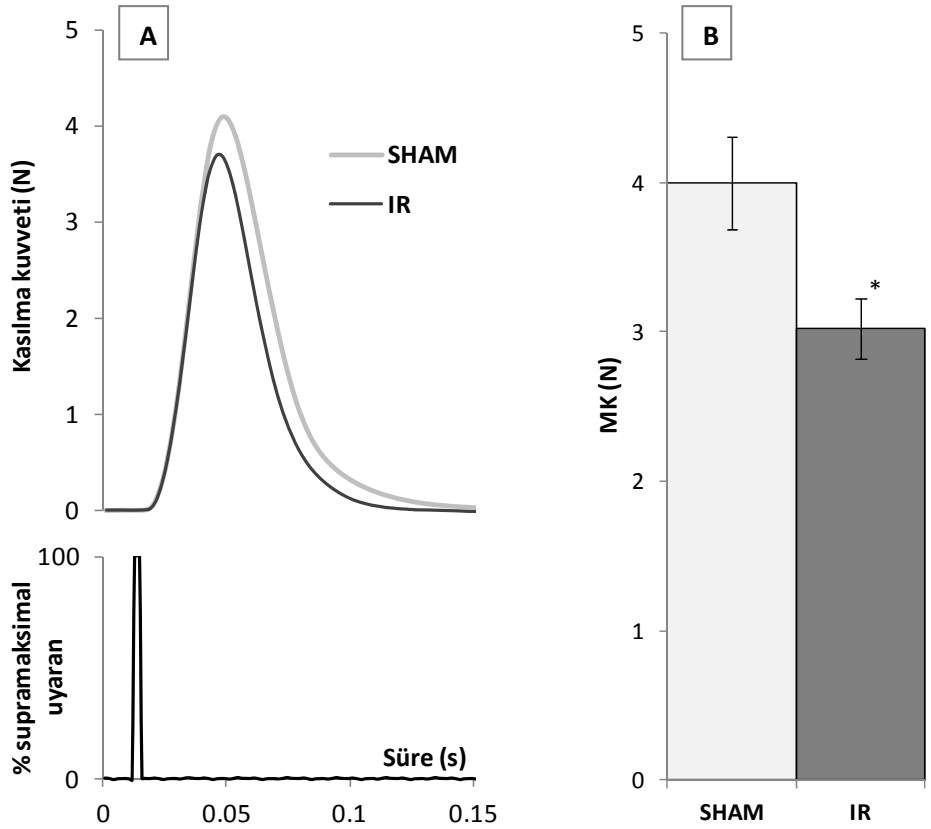
3. BULGULAR

3.1. Deneylerle İlgili Genel Veriler

Deneylerde kullanılan hayvanların ağırlıklarının ortalaması 321,1±7,2 g olarak ölçülmüştür. Deney hayvanlarından izole edilen diyaframların ağırlıkları ise ortalama 96,24±0,43 mg olarak ölçülmüştür. Deney grupları arasında hem vücut hem de diyafram ağırlığı yönünden anlamlı fark bulunmamıştır ($p<0,01$). Her bir deney hayvanına ait diyaframdan tüm gruplar için ortalama 32,2±4,0 adet AP kaydedilmiştir.

3.2. Diyaframın Mekanik ve Elektriksel Aktivitesi ile İlgili Bulgular

Sıçandan izole edilen diyafram kası preparatından fizyolojik koşullara en yakın koşullar altında çeşitli özelliklerdeki direkt uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtları kaydedilmiştir. Frekansı 1 Hz olan supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen ve her bir gruba ait ortalamayı en iyi gösteren birer örnek kasılma yanıtı, altta uyaran pulsu ile eşzamanlı olarak Şekil 3.1A'da görülmektedir. Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği gibi normalize edilmiş Maksimum Kasılma Kuvveti (MK) değerlerinin ortalaması SHAM grubu için 4,00±0,31 N; IR grubu için ise 3,03±0,20 N olarak bulunmuştur (Şekil 3.1B). MK değeri ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).



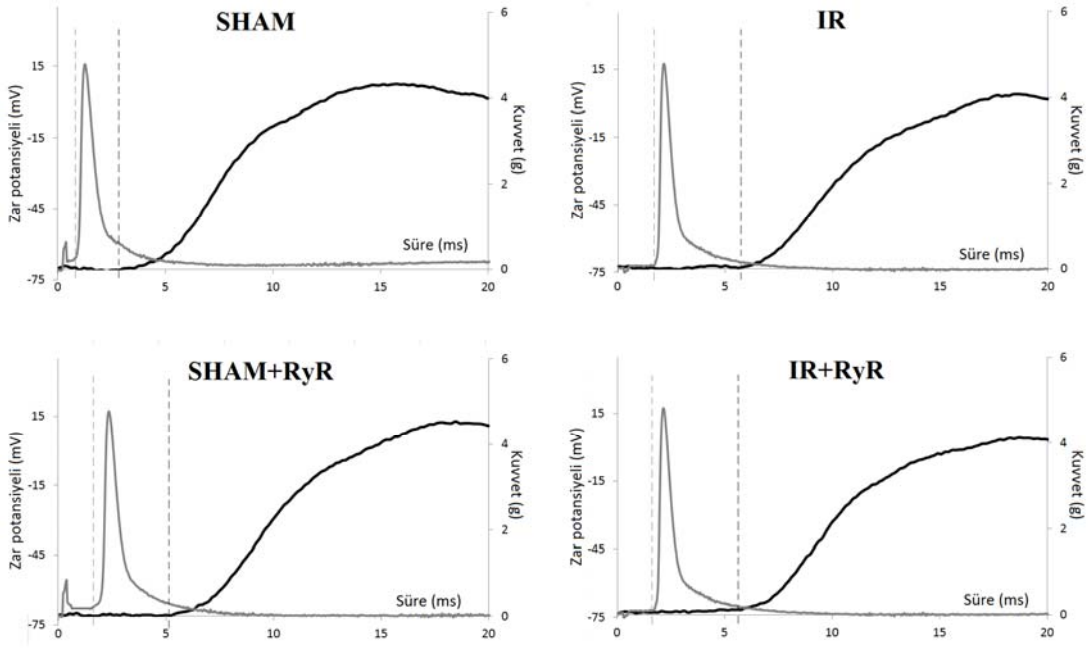
Şekil 3.1: Supramaksimal kare biçimli uyaran ve örnek kasılma yanıtları eşzamanlı olarak çizilmiştir **(A)**. Maksimum Kasılma Kuvveti (MK) değerlerinin ortalaması (SHAM için N=10, n=40, IR için N=10, n=40) **(B)**. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * ise grupların ortalamaları birbiriyle karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Frekansı 1 Hz olan supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtlarından hesaplanan Kasılma Süresi (KS) ve Yarı Gevşeme Süresi (GS50) değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Gruplar arasında bu iki değer için de istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) fark bulunmamıştır.

Çizelge 3.1: Her bir deney grubu için hesaplanan Kasılma Süresi (KS) ve Yarı Gevşeme Süresi (GS50) değerleri. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

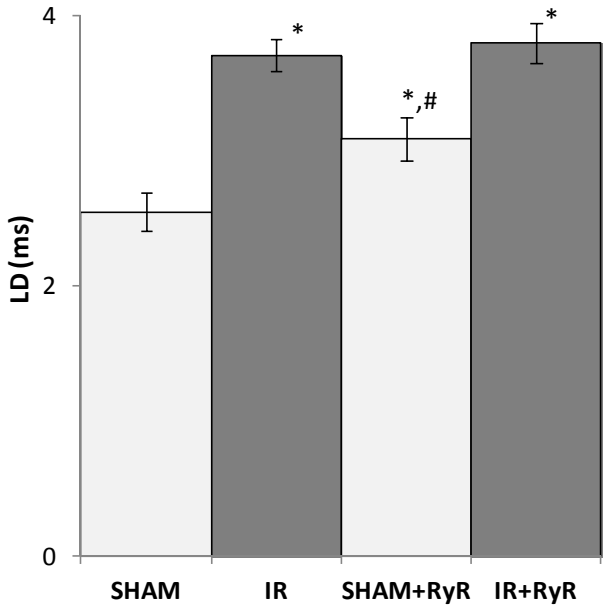
	KS (ms)	GS50 (ms)
SHAM (N=10, n=40)	29,94 ± 0,46	20,62 ± 0,65
IR (N=10, n=40)	28,90 ± 0,45	19,10 ± 0,72

Kas sarsılarıyla eşzamanlı olarak AP kaydedilmesi deneylerinden elde edilen örnek yanıtlar Şekil 3.2'de her bir grup için gösterilmiştir. Kas sarsısının AP'ye göre daha uzun süren bir olay olması nedeniyle Latent Dönem (LD, ms) parametresindeki değişimin daha iyi görülebilmesi için kas sarsılarının yalnızca kasılmanın gerçekleştiği bölümü verilmiştir.



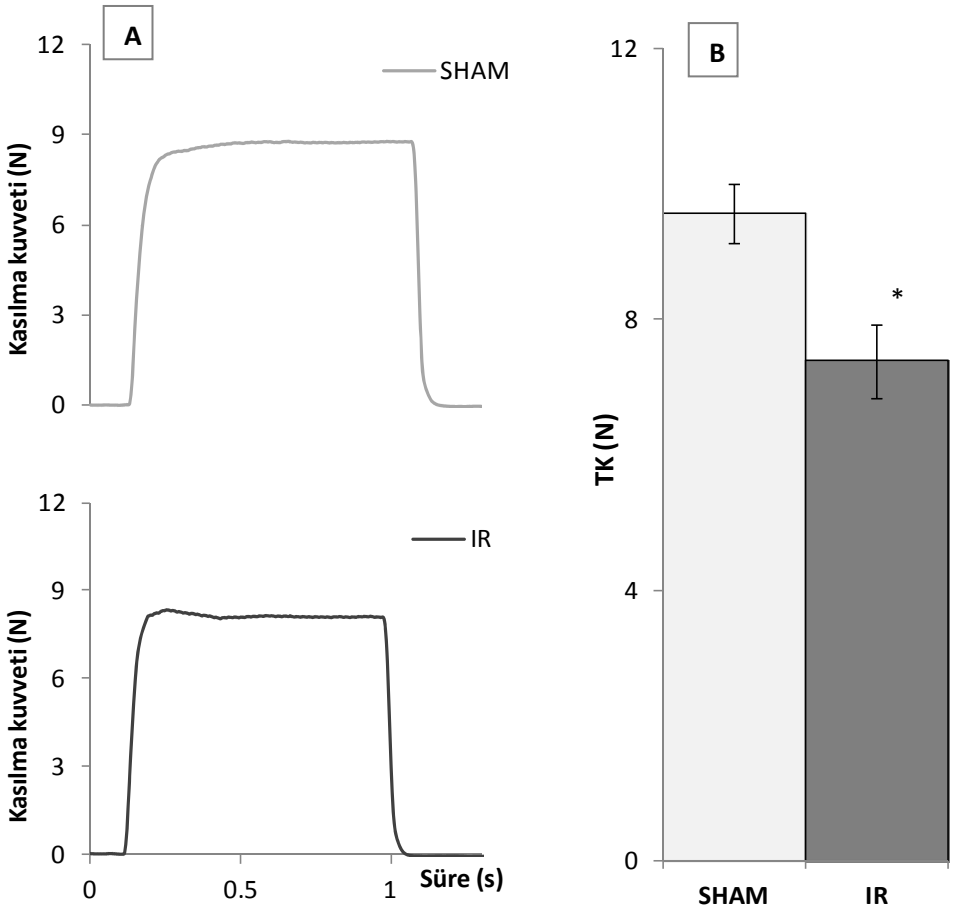
Şekil 3.2: Kas sarsılarıyla eşzamanlı aksiyon potansiyeli (AP) kayıtlarına ait birer örnek kayıt. Kas sarsısının yalnızca kasılma bölümü (siyah çizgi) ile AP kaydı (gri çizgi) aynı zamansal eksende görülmekte olup, her ikisinin de başladığı an kesikli çizgi ile belirtilmiştir.

Her bir deney hayvanının diyaframından Şekil 3.2'de görüldüğü gibi kaydedilen sinyaller üzerinden, AP ile kas sarsısının başlaması arasındaki süre olan Latent Dönem (LD, ms) verileri hesaplanmıştır. SHAM ve IR grupları için ve bunlara Ryanodine uygulaması ile elde edilen ortalama LD değerleri (SHAM için 2,55±0,14 ms, IR için 3,71±0,12 ms, SHAM+RyR için 3,09±0,16 ms, IR+RyR için 3,80±0,15 ms) ait grafik Şekil 3.3'te görülmektedir. Ortalamalar karşılaştırıldığında tüm diğer gruplara ait değerler SHAM grubuna göre anlamlı olarak artmış bulunurken, SHAM+RyR ile IR arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.3).



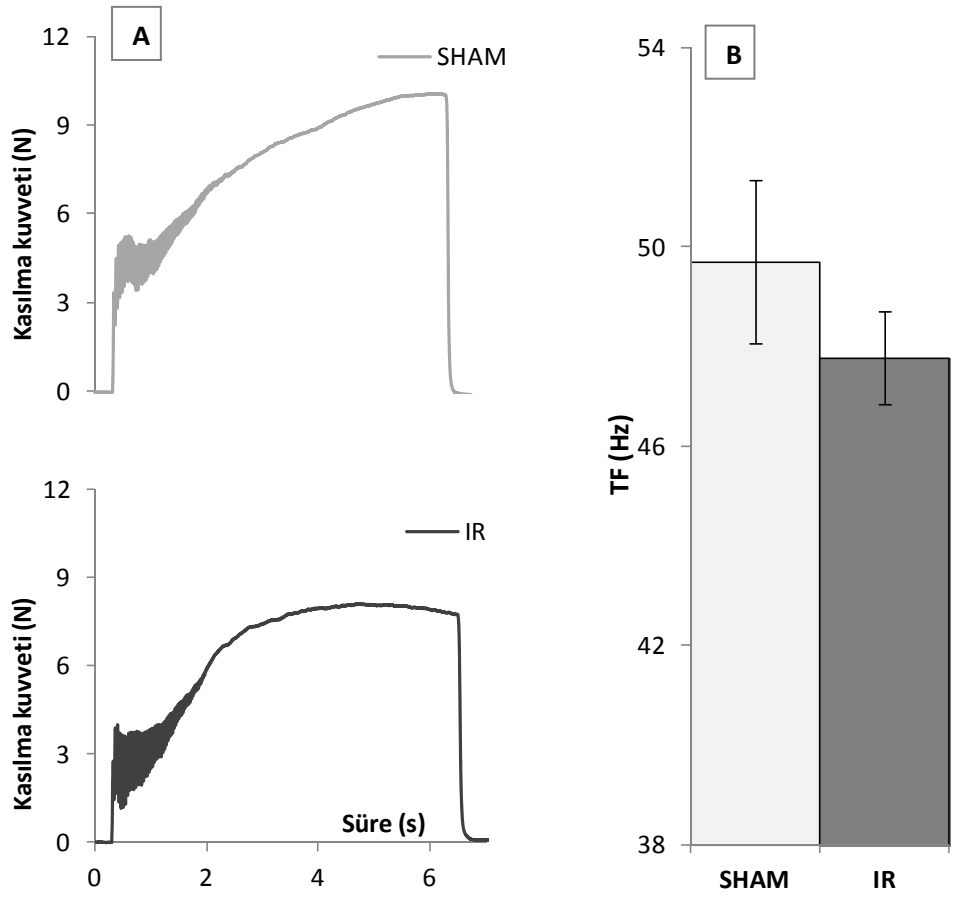
Şekil 3.3: Kas sarsılarıyla eşzamanlı AP kayıtlarından her bir deney grubu için hesaplanan Latent Dönem (LD, ms) değerlerinin ortalamaları (SHAM için N=4, n=25, IR için N=4, n=31, SHAM+RyR için N=4, n=25, IR+RyR için N=4, n=41). Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * SHAM grubu ile karşılaştırıldığında, # ise IR grubu ile karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Frekansı 50 Hz olan supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtlarından her bir gruba ait ortalamayı en iyi gösteren birer örnek eşzamanlı olarak Şekil 3.4A'da görülmektedir. Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde normalize edilmiş Tetanik Kuvvet (TK) değerlerinin ortalaması SHAM grubu için 9,57±0,43 N; IR grubu için ise 7,38±0,53 N olarak bulunmuştur (Şekil 3.4B). Ortalama TK değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).



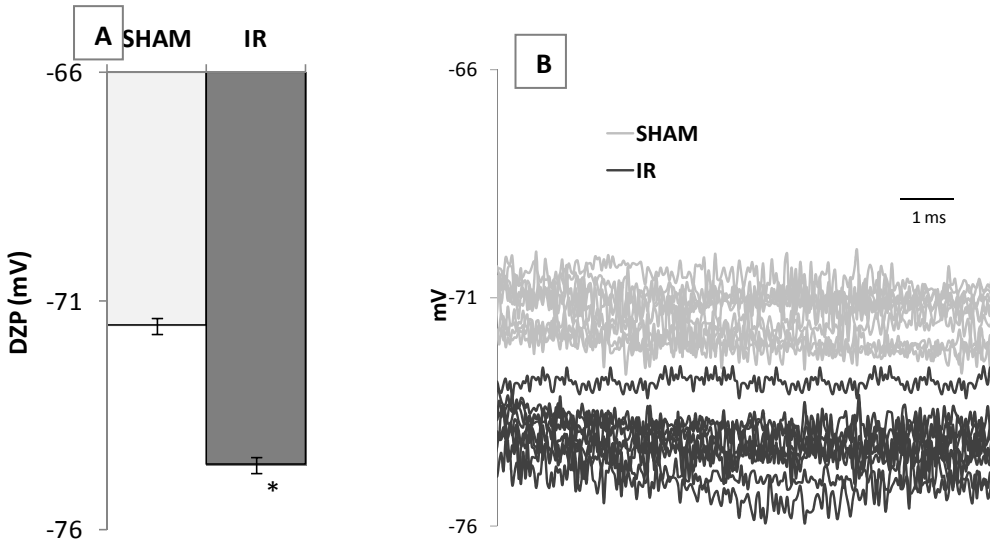
Şekil 3.4: Supramaksimal 50 Hz kare biçimli uyarana kasılma yanıtı örnekleri eşzamanlı olarak gösterimi **(A)**. Tetanik Kuvvet (TK) değerlerinin ortalaması (SHAM için N=10, n=10, IR için N=10, n=10) **(B)**. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * ise grupların ortalamaları birbiriyle karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Frekansı 25-70 Hz arasında değiştirilen supramaksimal kare biçimli uyaranlarla elde edilen kasılma yanıtlarından her bir gruba ait ortalamayı en iyi gösteren birer örnek eşzamanlı olarak Şekil 3.5A'da görülmektedir. Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği gibi hesaplanan Tetanus Frekansı (TF) değerlerinin ortalaması SHAM grubu için 49,71±1,64 Hz; IR grubu için ise 47,78±0,94 Hz olarak bulunurken(Şekil 3.5B), ortalama TF değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) fark bulunmamıştır.



Şekil 3.5: Supramaksimal ve frekansı 25-70 Hz arasında değiştirilen kare biçimli uyarana her bir grup için örnek kasılma yanıtlarının eşzamanlı olarak gösterimi **(A)**. Tetanus Frekansı (TF) ortalaması (SHAM için N=10, n=10, IR için N=10, n=10) **(B)**. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir.

Sıçandan izole edilen diyafram kası preparatından fizyolojik koşullara en yakın koşullar altında tek hücre kas aksiyon potansiyelleri ve dinlenim zar potansiyelleri kaydedilmiştir. Kayıtlar alınmadan hemen önce mikroelektrotların direnci ölçülerek değeri 10-15 MΩ aralığında olanlar kullanılmış, bu değerler dışında bulunan mikroelektrotlar kullanılmamıştır. Belirtilen elektrotlarla her bir grup için ölçülen Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP) değerlerinin ortalaması SHAM ve IR için Şekil 3.6A'da verilmiştir. AAA tedavi modeli gerçekleştirilen sıçanların diyafram kası hücrelerinin zarlarının daha hiperpolarize olduğu bulunmuş, dinlenim zar potansiyelleri ortalaması SHAM grubu için -71,54±0,19 mV ve IR grubu için -74,58±0,17 mV olarak hesaplanmıştır. Kaydedilen DZP'lerden her bir gruptan rastgele seçilen 10 deney hayvanına ait örnekler Şekil 3.6B'de verilmiştir.



Şekil 3.6: Her bir gruba ait ortalama (SHAM için N=10, n=429, IR için N=10, n=412) Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP, mV) değerleri **(A)**, her bir gruptan rastgele seçilen 10 deney hayvanına ait dinlenim zar potansiyeli kayıt örnekleri **(B)**. Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. * ise grupların ortalamaları birbiriyle karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Mikroelektrotla tek hücre içerisinden supramaksimal bir uyaran sonrasında oluşan aksiyon potansiyelleri kaydedilmiştir. Kaydedilen aksiyon potansiyellerinden her bir deney grubu için durumu en iyi gösteren aksiyon potansiyeli örnekleri Şekil 3.7'de aynı zamansal eksende gösterilmiştir.



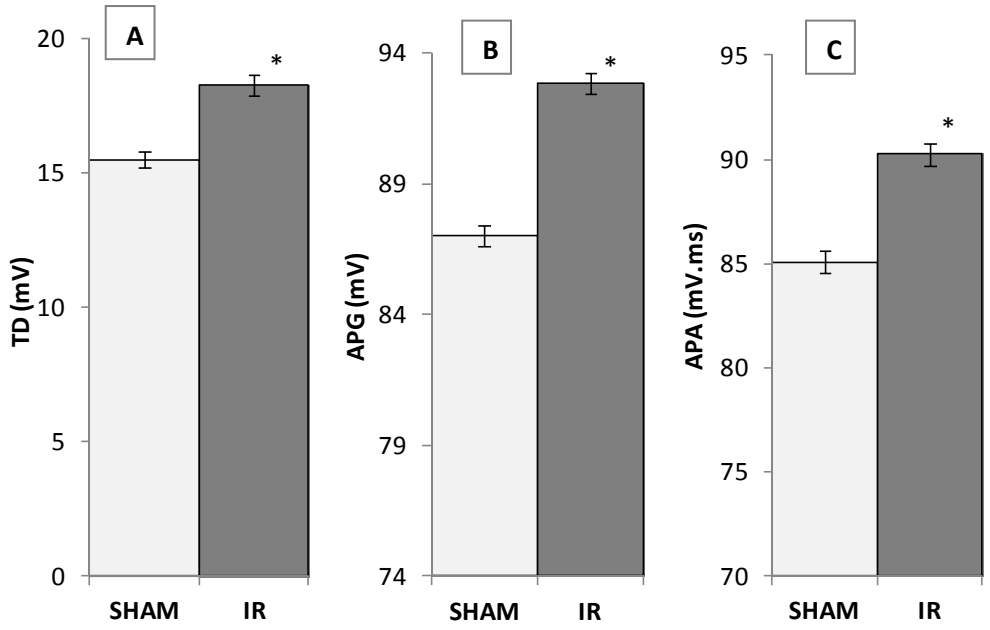
Şekil 3.7: Her bir deney grubu için durumu en iyi gösteren aksiyon potansiyeli örnekleri aynı zamansal eksende görülmektedir.

Mikroelektrotla hücre içerisine girilerek kaydedilen dinlenim zar potansiyeli ile supramaksimal uyaran sonrasında kaydedilen AP'lerden Gereç ve Yöntem bölümünde detaylı olarak anlatıldığı şekilde hesaplanan Tepe Değeri (TD, mV), AP Genliği (APG, mV) ve AP Alanı (APA, mV.ms) değerlerinin ortalaması her bir deney grubuna ait hayvan için Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Her bir deney grubundan birer deney hayvanına ait Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP, mV), Tepe Değeri (TD, mV), AP Genliği (APG, mV) ve AP Alanı (APA, mV.ms)) verileri ile bu veriler için hesaplanan gruplar arası farkın anlamlılık düzeyi verilmiştir.

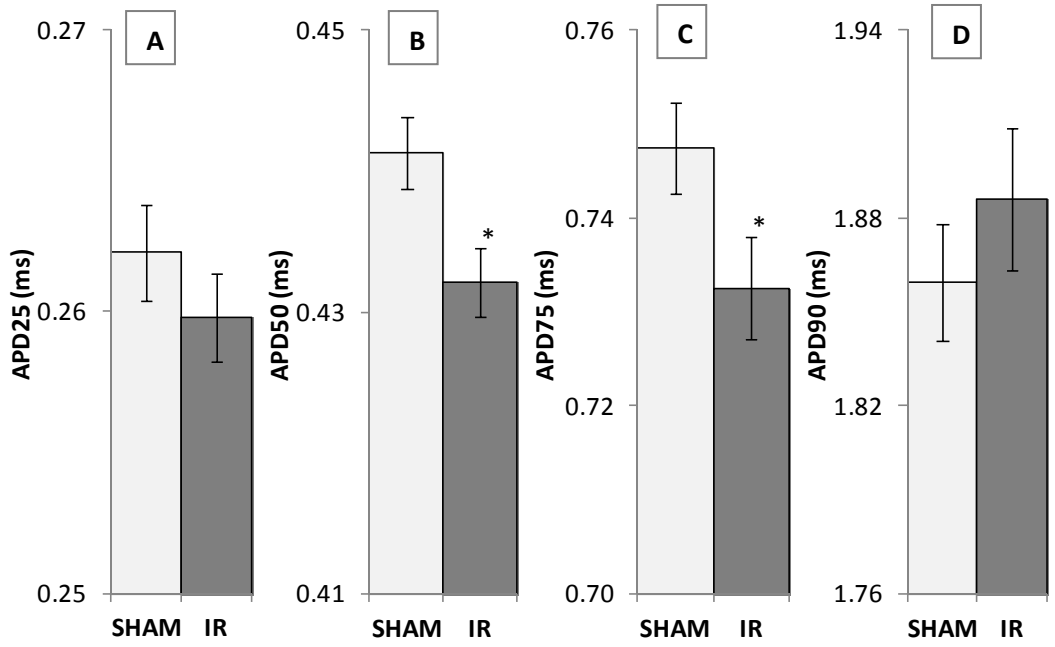
Deney hayv. no	DZP (mV)		TD (mV)		APG (mV)		APA (mV.ms)	
	SHAM	IR	SHAM	IR	SHAM	IR	SHAM	IR
1	-71,13	-76,21	21,72	15,14	92,85	91,35	89,95	97,41
2	-71,96	-73,47	20,36	20,91	92,32	94,38	89,97	78,35
3	-70,12	-73,56	12,56	10,32	82,68	83,88	80,71	90,41
4	-68,29	-75,48	17,72	23,54	86,02	99,01	68,99	84,71
5	-70,65	-75,00	6,69	12,25	77,33	87,25	91,67	91,51
6	-72,72	-75,77	14,78	24,87	87,50	100,63	86,68	97,16
7	-73,08	-72,78	13,22	26,04	86,29	98,82	78,80	85,28
8	-68,89	-72,04	8,39	11,43	77,28	83,47	86,79	87,65
9	-74,30	-74,62	12,56	28,98	86,86	103,60	87,13	91,37
10	-71,34	-74,74	20,05	10,66	91,39	85,40	83,18	96,14
Ort. ±SH	-71,54 ±0,19	-74,58 ±0,17	15,48 ±0,30	18,2 5±0,38	87,01 ±0,38	92,83 ±0,42	85,08 ±0,52	90,24 ±0,56
	p<0,01		p<0,01		p<0,01		p<0,01	

Kaydedilen AP'lerin TD ortalamasının IR grubunda SHAM grubuna göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$) görülmüştür (Şekil 3.8A). Ortalama TD değerleri, SHAM grubu için 15,48±0,30 mV iken IR grubu için 18,25±0,38 mV olarak bulunmuştur. Ortalama AP Genliğinin IR grubunda SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,01$) fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.8B). APG, SHAM grubu için 87,01±0,38 mV, IR grubu için ise 92,83±0,42 mV olarak bulunmuştur. Kaydedilen AP eğrilerinin integralleri hesaplanarak bulunan alan değerlerinin ortalaması ise SHAM grubu için 85,08±0,52 mV.ms, IR grubu için ise 90,24±0,56 mV.ms olarak bulunmuştur. SHAM grubu ile karşılaştırıldığında alan için de gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$) görülmüştür (Şekil 3.8C



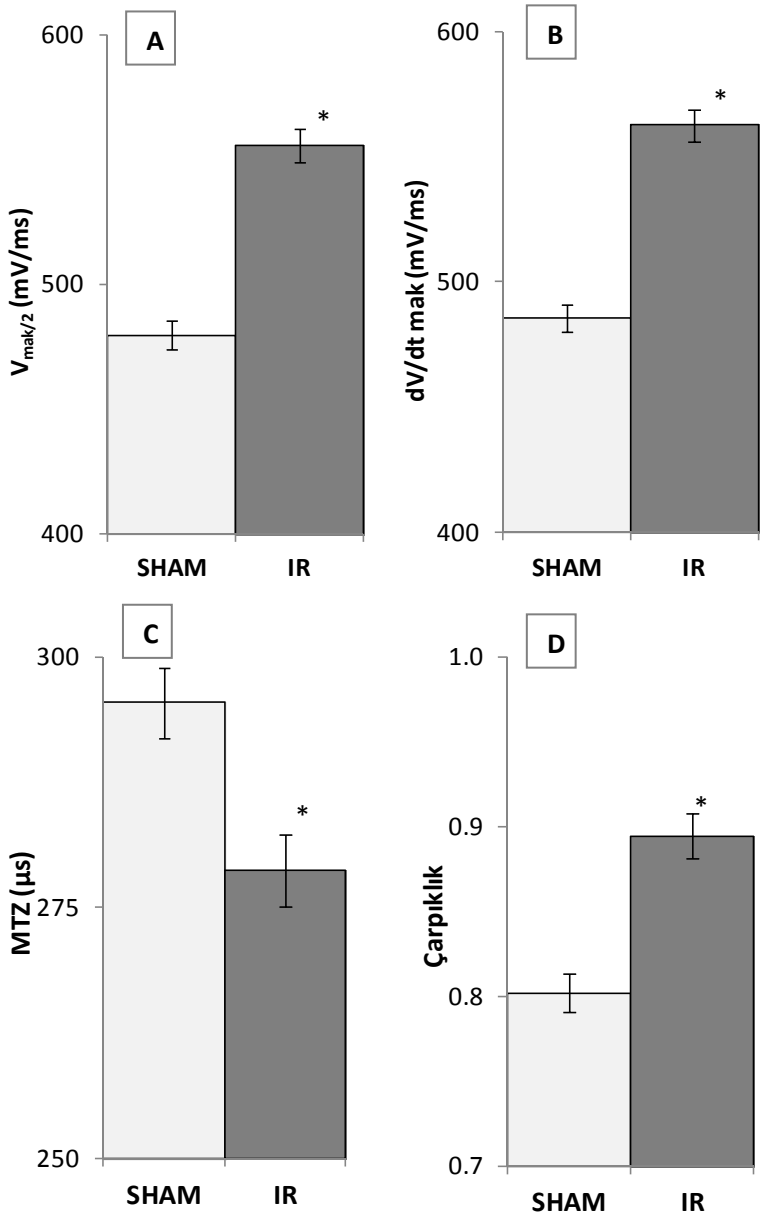
Şekil 3.8: Her bir deney grubuna ait ortalama (SHAM için N=10, n=429, IR için N=10, n=412) Tepe Değeri (TD, mV) **(A)**, AP Genliği (APG, mV) **(B)** ve AP alanı (APA, mV.ms) **(C)** verileri. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * ise grupların ortalamaları birbiriyle karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde hesaplanan, tepe değerinin %25, %50, %75 ve %90 azalması için geçen sürelerin ortalaması (APD25, APD50, APD75 ve APD90) Şekil 3.9'da verilmiştir. IR grubunda SHAM grubuna göre yalnızca APD50 ve APD75 değerlerinin ortalamasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) kısalma görülmüştür.



Şekil 3.9: Tepe değerinin %25, %50, %75 ve %90 azalması için geçen sürelerin (ms) ortalaması (SHAM için N=10, n=429 ve IR için N=10, n=412) sırasıyla APD25 **(A)**, APD50 **(B)**, APD75 **(C)** ve APD90 **(D)**. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * ise grupların ortalamaları birbiriyle karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

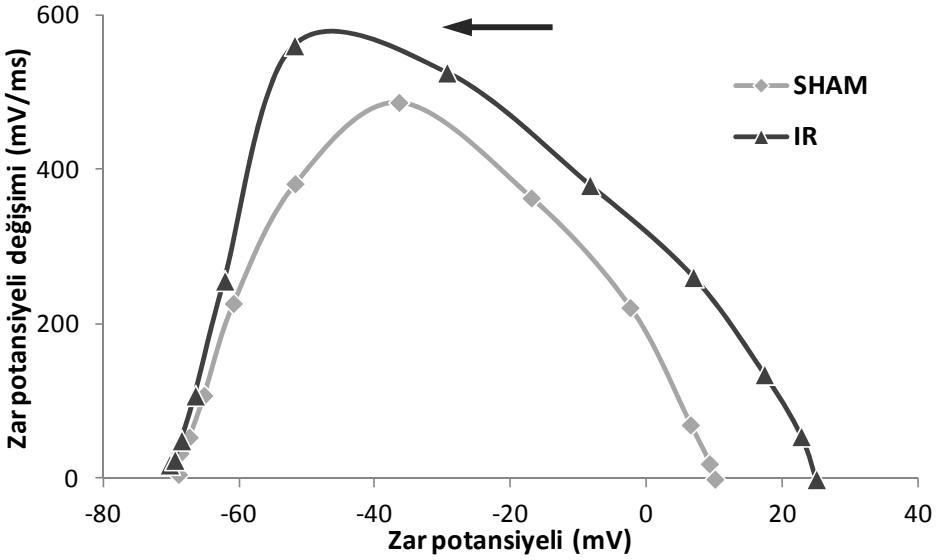
Repolarizasyonla ilgili bir diğer parametre olan, AP eğrilerinin türevinin minimum değeri (dV/dt_{min}) SHAM grubu için ortalama -138,16±1,08 mV/ms olarak hesaplanırken, IR grubu için bu değer ortalama -151,84±1,35 mV/ms olarak hesaplanmıştır. SHAM grubuyla karşılaştırıldığında IR grubunda meydana gelen dV/dt_{min}'deki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$) bulunmuştur.



Şekil 3.10: Depolarizasyon fazında tepe değerinin yarı değerine ulaşıldığı andaki türev değeri ($V_{mak/2}$, mV/ms) **(A)**, türev maksimum (dV/dt_{mak}, mV/ms) **(B),** Maksimum Türev Zamanı (MTZ, µs) **(C)** ve aksiyon potansiyellerinin depolarizasyon fazına ait zar potansiyeline (mV) bağlı zar potansiyeli değişim miktarı (mV/ms) eğrilerinin Çarpıklık değerleri **(D)** ortalamaları (SHAM için N=10, n=429 ve IR için N=10, n=412). Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * ise grupların ortalamaları birbiriyle karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Kaydedilen AP eğrisinin depolarizasyon fazında, tepe değerinin yarı değerine ulaşıldığı andaki türev değeri ortalaması ($V_{mak/2}$, mV/ms) SHAM grubu için 479,50±5,60 mV/ms olarak hesaplanırken, IR grubu için bu değer 555,48±6,85 mV/ms olarak hesaplanmış, farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$)

bulunmuştur (Şekil 3.10A). Yine AP eğrisinin türevinin maksimum değerinin ortalaması (dV/dt_{mak}) SHAM grubu için 485,63±5,41 mV/ms olarak hesaplanırken, IR grubu için bu değer 562,49±6,66 mV/ms olarak hesaplanmıştır. SHAM grubuyla karşılaştırıldığında IR grubunda meydana gelen dV/dt_{mak}'taki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$) bulunmuştur (Şekil 3.10B). Bununla birlikte AP'nin başlangıcından itibaren en büyük türev değerine ulaşması için geçen sürenin (MTZ) ortalaması ise SHAM grubu için 295,38±3,52 µs, IR grubu için 278,64±3,58 µs olarak hesaplanmıştır. IR grubunun ortalama MTZ değerindeki azalma SHAM grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bulunmuştur (Şekil 3.10C).

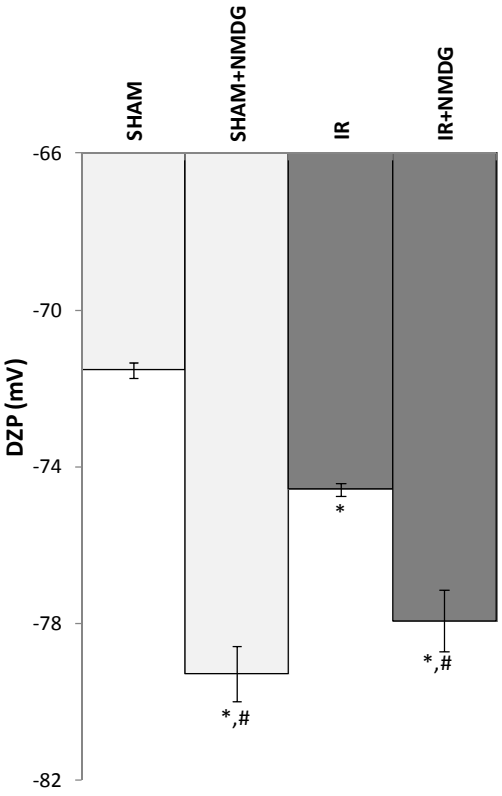


Şekil 3.11: Her bir deney grubu için ortalamayı en iyi yansıtan AP'nin depolarizasyon fazına ait zar potansiyeline (mV) bağlı zar potansiyeli değişim (mV/ms) eğrisi. Eğri üzerindeki ok, IR grubuna ait eğrinin sola doğru kaydığını vurgulamaktadır.

Deney gruplarındaki hayvanlardan kayıt edilen aksiyon potansiyellerinin her birinin Şekil 3.11'deki gibi depolarizasyon fazına ait zar potansiyeline (mV) bağlı zar potansiyeli değişim miktarı (mV/ms) eğrileri oluşturulmuş, her bir eğri için bir Çarpıklık değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan ortalama Çarpıklık değerleri SHAM grubu için 0,80±0,01; IR grubu için ise 0,89±0,01 olarak bulunmuştur (Şekil 3.10E). Ortalama Çarpıklık değerinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) fark görülmüştür.

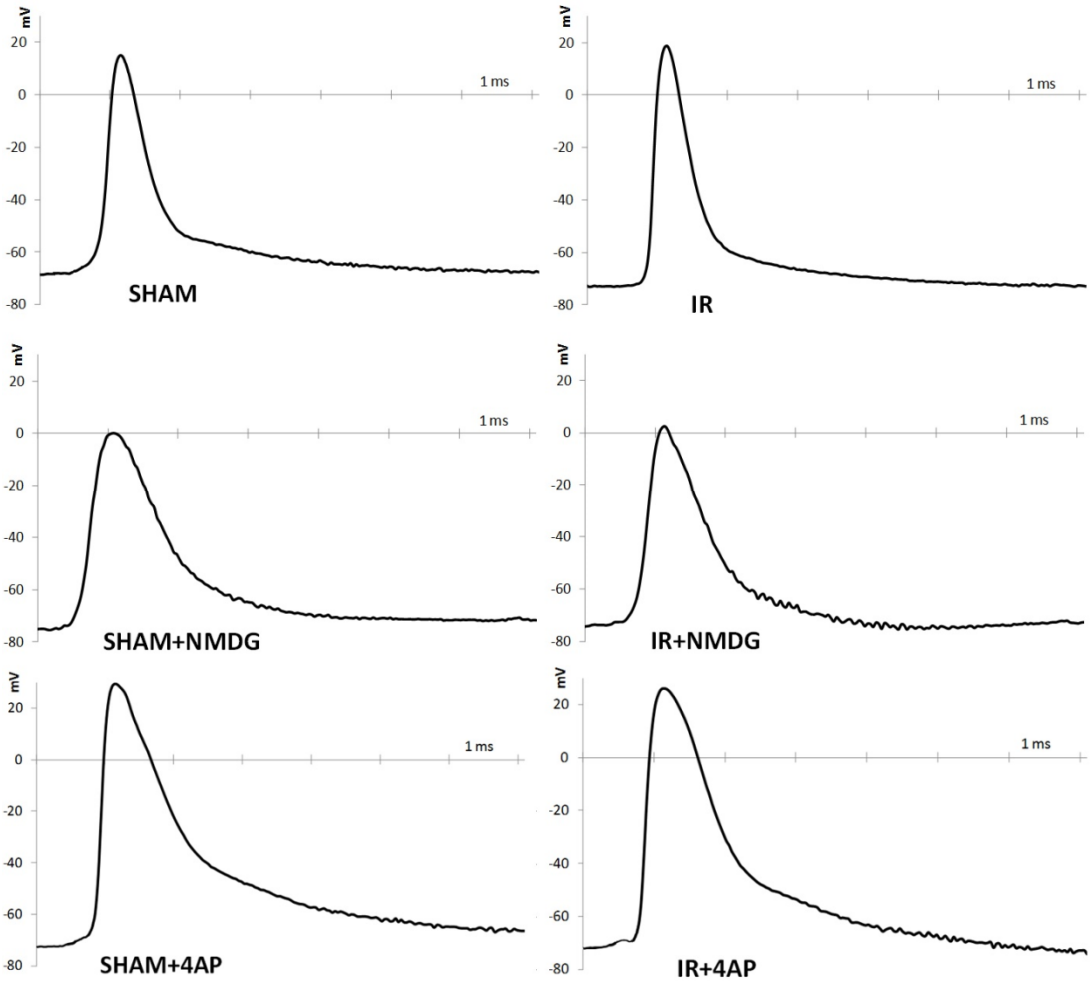
3.3. Na^+ ve K^+ Akımları Bloke Edilerek Elde Edilen Bulgular

Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP) değerlerinin ortalaması SHAM, IR, SHAM+NMDG ve IR+NMDG grupları için Şekil 3.12'de verilmiştir. SHAM ile karşılaştırıldığında tüm diğer grupların ortalamalarının zar potansiyelinin hiperpolarizasyonu yönünde değiştiği görülmüş ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) bulunmuştur.



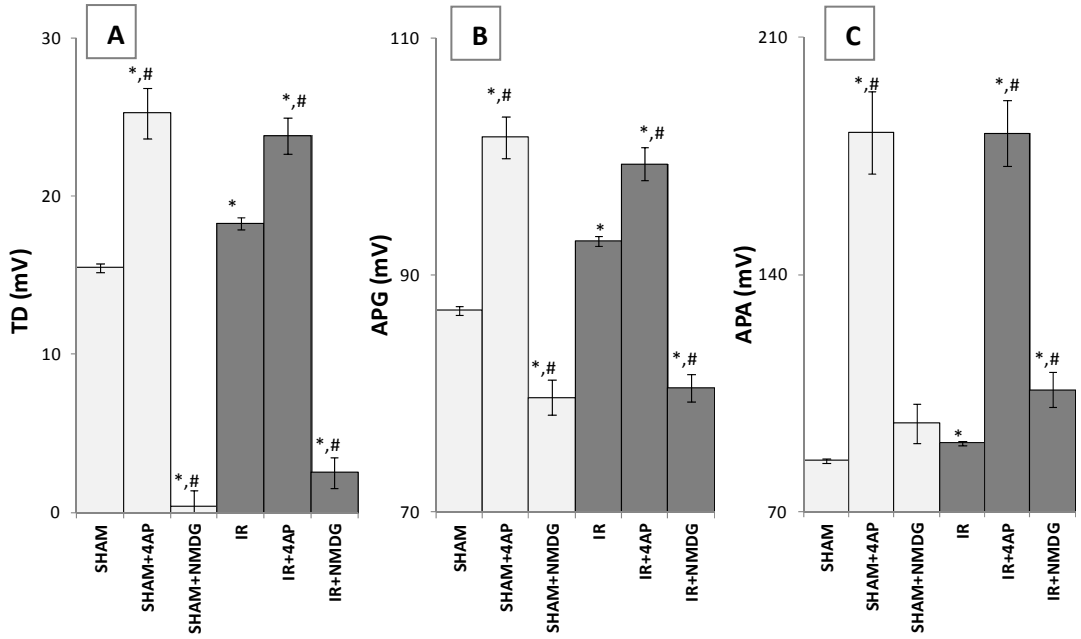
Şekil 3.12: Gruplara ait ortalama (SHAM için N=10, n=429, IR için N=10, n=412, SHAM+NMDG için N=4, n=20 ve IR+NMDG için N=4, n=22) Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP, mV) değerleri. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * SHAM grubu ile karşılaştırıldığında, # ise IR grubu ile karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Diyafram kası hücrelerinin supramaksimal bir uyaran ile uyarılması sonrasında oluşan aksiyon potansiyelleri Na^+ ve K^+ akımları bloke edilerek de kaydedilmiştir. Kaydedilen aksiyon potansiyellerinden her bir deney grubu için durumu en iyi gösteren aksiyon potansiyeli örnekleri Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



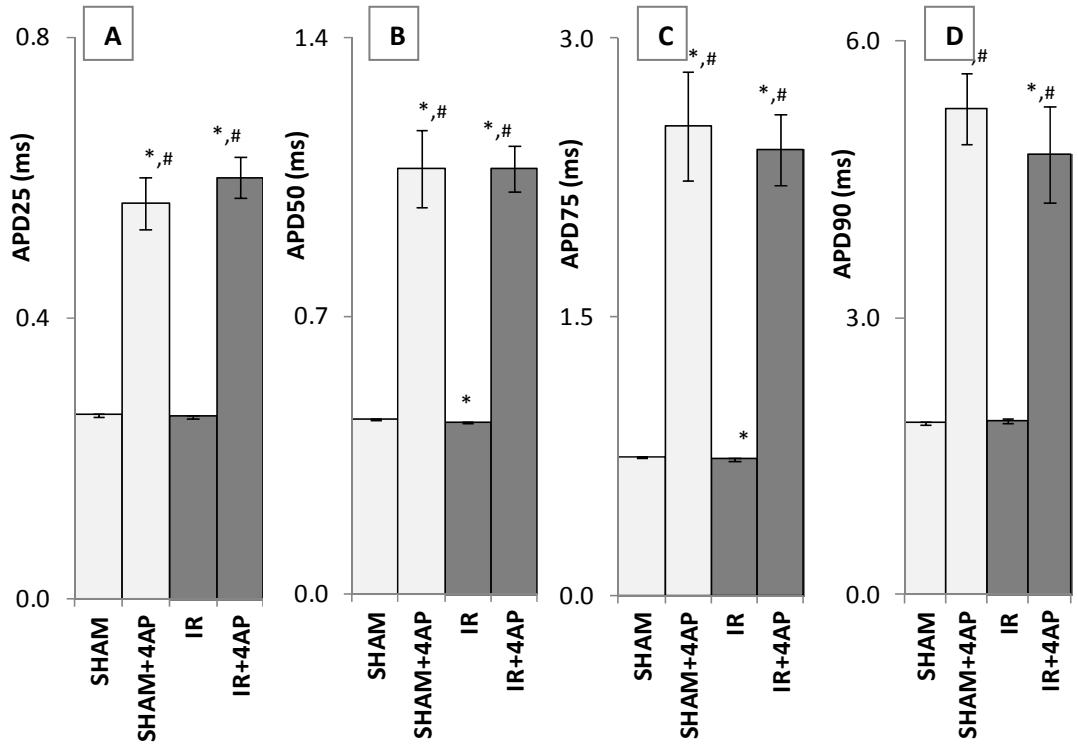
Şekil 3.13: Her bir deney grubu için örnek aksiyon potansiyeli kayıtları.

Deney gruplarından kaydedilen AP'lerin Tepe Değeri (TD, mV) ve AP genliği (APG, mV) ortalamasının her iki akım da (Na^+ ve K^+) bloke edildiğinde hem SHAM grubuna göre hem de IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) değişim gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.14A ve 14B). AP altında kalan alanın (APA, mV.ms) ise SHAM grubunda NMDG bulunan ortamda yapılan deneylerde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) değişim göstermezken IR grubunda gösterdiği, 4AP uygulamasının ise hem SHAM hem de IR grubunda APA'da anlamlı ($p<0,01$) artışa sebep olduğu görülmüştür (Şekil 3.14B).



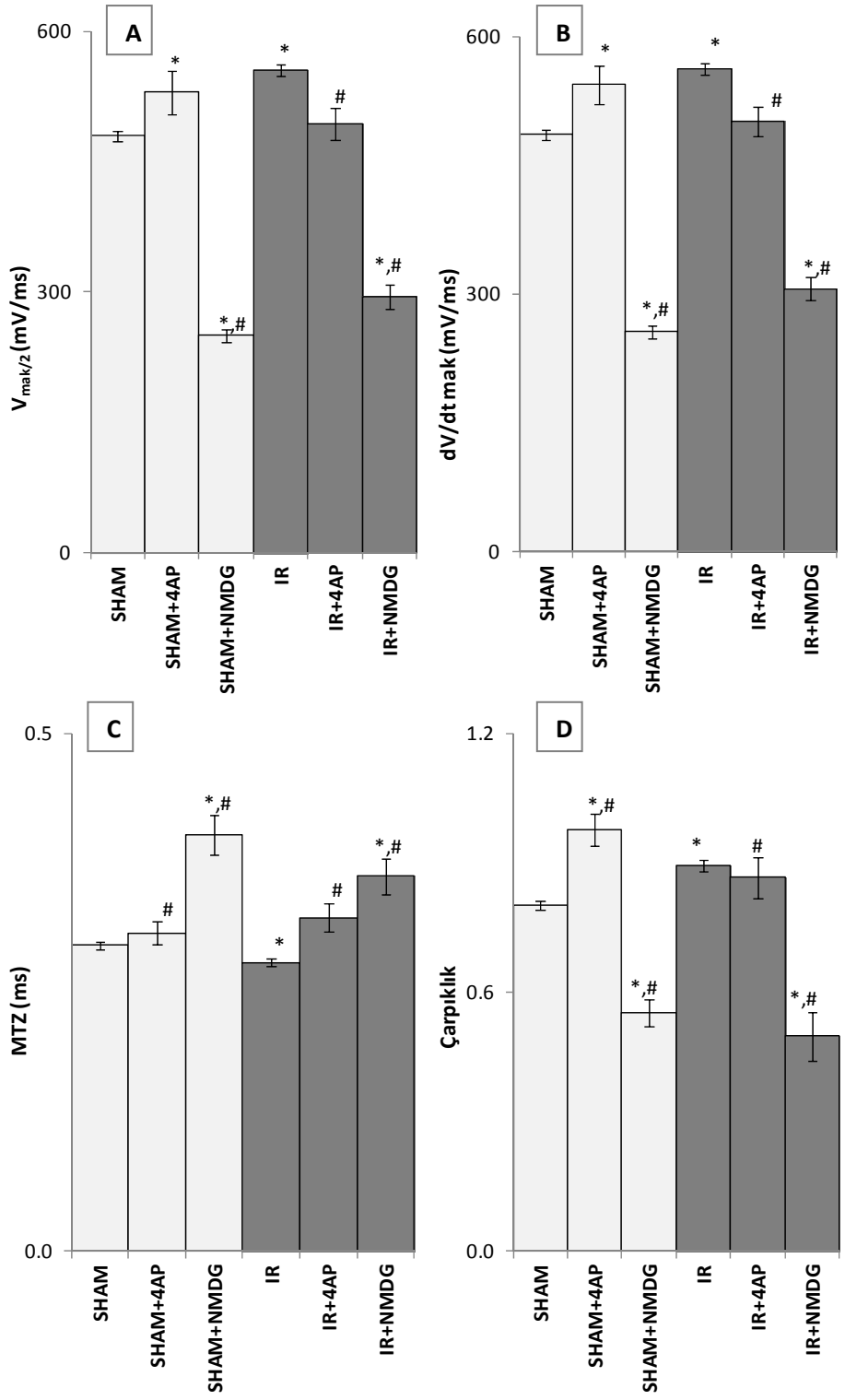
Şekil 3.14: Her bir deney grubuna ait ortalama (SHAM için N=10, n=429, SHAM+4AP için N=4, n=25, SHAM+NMDG için N=4, n=20, IR için N=10, n=412, IR+4AP için N=4, n=19 ve IR+NMDG için N=4, n=22) Tepe Değeri (TD, mV) **(A)**, AP Genliği (APG, mV) **(B)** ve AP alanı (APA, mV.ms) **(C)** verileri. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * SHAM grubu ile karşılaştırıldığında, # ise IR grubu ile karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Tepe değerinin %25, %50, %75 ve %90 azalması için geçen sürelerin ortalaması (APD25, APD50, APD75 ve APD90) Şekil 3.15'te gösterilmiştir. 4AP uygulamasının bu değerlerin ortalamasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) fark meydana getirdiği görülmüştür.



Şekil 3.15: Tepe değerinin %25, %50, %75 ve %90 azalması için geçen sürelerin (ms) ortalaması (SHAM için N=10, n=429, SHAM+4AP için N=4, n=25, IR için N=10, n=412 ve IR+4AP için N=4, n=19) sırasıyla APD25 **(A)**, APD50 **(B)**, APD75 **(C)** ve APD90 **(D)**. Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * SHAM grubu ile karşılaştırıldığında, # ise IR grubu ile karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

Depolarizasyon fazında, tepe değerinin yarı değerine ulaşıldığı andaki türevi ($V_{mak/2}$, mV/ms), AP eğrisinin türevinin maksimum değeri (dV/dt_{mak}) ve AP'nin başlamasından itibaren en büyük türev değerine ulaşması için geçen sürenin (MTZ) ortalaması her bir deney grubu için Şekil 3.16'da görülmektedir. İyonik akımların bloke edildiği durumlarda bu parametrelerin tümünde özellikle NMDG bulunan ortamda alınan AP kayıtlarında hem SHAM hem de IR için istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) fark meydana gelmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: Depolarizasyon fazında tepe değerinin yarı değerine ulaşıldığı andaki türev değeri ($V_{mak/2}$, mV/ms) **(A)**, türev maksimum (dV/dt_{mak}, mV/ms) **(B),** Maksimum Türev Zamanı (MTZ, µs) **(C)** ve depolarizasyonda zar potansiyeline (mV) bağlı zar potansiyeli değişim miktarı (mV/ms) eğrilerinin Çarpıklık değerleri **(D)** ortalamaları (SHAM için N=10, n=429, SHAM+4AP için N=4, n=25, SHAM+NMDG için N=4, n=20, IR için N=10, n=412, IR+4AP için N=4, n=19 ve IR+NMDG için N=4, n=22). Veriler ortalama±standart hata olarak gösterilmiştir. * SHAM grubu ile karşılaştırıldığında, # ise IR grubu ile karşılaştırıldığında farkın $p<0,01$ seviyesindeki istatistiksel anlamlılığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Özellikle vasküler cerrahi operasyon gerektiren hastalıkların tedavisi olmak üzere birçok cerrahi tedavi işlemi, dokulara kan dağıtımının sağlandığı vasküler yolların kapatılmasını gerektirmektedir. Kan akışının kesilip yeniden kanlanmanın sağlanması, iskemi-reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır ve anevrizma tedavilerinde iskemi-reperfüzyon işlemi elzemdir (Norwood ve ark 2004). Abdominal Aorta Anevrizması (AAA), toplumda rastlanma sıklığı oldukça yüksek bir anevrizma tipidir. Bir kişide AAA meydana gelmesi genetik yatkınlık, beslenme ve yaşam tarzı gibi birçok etkene bağlıdır (Powell ve Brady 2004). AAA, diğer anevrizmalardan hayati öneme sahip olması yönüyle farklılık göstermektedir. İnsan vücudunun çok büyük bir bölümünün kan akışının sağlandığı abdominal aortada meydana gelen anevrizma, belirgin komplikasyonlara sahip olmadığından geçmişte teşhisi zor konulmakta ve çoğunlukla ruptüre olarak ölümlere sebep olmaktaydı. Ancak günümüzde görüntüleme tekniklerinin gelişimi sayesinde çok rahatlıkla tespit edilebilmekte ve tedavi edilebilmektedir (Golledge ve ark 2006). Başlıca iki çeşit tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Bunların ikisi de cerrahi olmakla beraber, ilaç uygulanması ise bir tedaviden ziyade ruptüre olma olasılığını azaltıcı ya da anevrizma çapının artışını engelleyici işlev gösterdiğinden tedavi olarak nitelendirilemez (Sakalihasan ve ark 2005). İki cerrahi yöntemden en çok tercih edileni açık cerrahi yöntemdir ve bu yöntemin kalıcılık ve uygulanabilirlik yönünden birçok avantajları vardır. Diğer yöntem ise endovasküler onarımdır (Parodi ve ark 1991) ve hastaya özel oluşu, kalıcı olmayışı, uygulamada yüksek düzey teknik ekipman gerektirmesi gibi nedenlerle çok sık tercih edilmemektedir (Sakalihasan ve ark 2005).

Açık cerrahi yöntem kullanılarak gerçekleştirilen tedavide iskemi-reperfüzyon neticesinde, özellikle abdominal aortanın beslediği vücut bölümlerinde ve diğer doku ve organlarda hasarlar meydana gelmektedir. Operasyon sonrasında hastanın birçok fonksiyonel bozuklukla karşı karşıya kalmasına neden olan bu durum, tıp alanında birçok araştırmanın konusu olmuştur. Fakat hala bazı

bozuklukların nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır. Operasyon sonrası komplikasyonlardan en sık rastlanan ve en yaygın olarak bilineni ise solunumla ilgili fonksiyonel bozukluklardır. Solunum fonksiyonunun yerine getirilmesinde büyük oranda role sahip olan diyafram kası bu komplikasyonla ilişkilendirilmektedir (Volta ve ark 2003). Kas dokusundan oluşan zar yapısındaki diyafram, frenik sinir tarafından innerve edilmektedir. Her iki doku da uyarılabilen hücrelerden meydana geldiği için fonksiyonel değişimin kaynağının, bu dokuların elektrofizyolojik özelliklerindeki farklılaşmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir (McLaughlin ve ark 2000).

Yapmış olduğumuz çalışmada, insanlarda abdominal aortada meydana gelen anevrizmanın tedavisinde uygulanan açık cerrahi yöntemle tedavinin, cerrahi operasyon sonrasında meydana getirdiği solunumla ilgili komplikasyonların altında yatan elektrofizyolojik değişimler gösterilmeye çalışılmıştır. Bu tip bir çalışmanın mümkün olabilmesi deney hayvanlarıyla çalışmayı gerekli kılmaktadır. Çünkü hücresel düzeyde meydana gelen değişimlerin araştırılması ancak izole dokularda mümkün olabilmektedir. McLaughlin ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu bir çalışmada sıçanların hafif anestezi altında abdominal aortalarından kan akışı infrarenal bölgeye bir klip yerleştirilmesi ile durdurulmuştur. Klip yerleştirilme süresi 60 dakika, klibin kaldırılarak reperfüze edilme süresi ise 24 saat, 48 saat ve 7 gün olarak belirlenmiştir. (McLaughlin ve ark 2000). Bu çalışmada alt vücutta gerçekleştirilen iskemi-reperfüzyonun meydana getirdiği hasarın sıcaklık önkoşullaması ile azaltılması amaçlanmış, “Heat shock” protein ekspresyonu miktarları Western Blotlama ile tayin edilmiştir. Protein ekspresyonunun yanı sıra diyafram kasının tek uyarana verdiği kasılma yanıtlarında da olumlu yönde anlamlı bulgular elde edilmesine karşın sağlıklı hayvanlardan elde edilen verilere çok yakın verilere ulaşılamamıştır. Bu çalışmayı önemli kılan bulgu ise çalışma neticesinde 60 dakika iskemiyi takiben 24 saat reperfüzyon işleminde sıçanlarda, klinik bulgulara benzer bulgularla karşılaşılmış olmasıdır. Bu çalışmanın ardından, 2001 yılında Moneley ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışmada ise yine hafif anestezi altındaki sıçanların abdominal aortalarından kan akışı infrarenal bölgeye bir klip yerleştirilmesi ile durdurulmuş, diyaframda meydana gelebilecek disfonksiyon ve bu disfonksiyonun rhGH (Recombinant Human Growth Hormone) uygulaması ile

önlenip önlenemeyeceği araştırılmıştır (Moneley ve ark 2001). Klip yerleştirilme süresinin 30 dakika, bunu takip eden reperfüzyon süresinin ise 2 saat olarak belirlendiği bu çalışmada ise diyafram kasında kas yorgunluğu oluşturulmasından önceki ve sonraki maksimum kasılma yanıtları gözlenmiştir. Abdominal aortada iskemi-reperfüzyon uygulanmasını içeren bu çalışmada iskemi-reperfüzyon grubunda sağlıklı deney grubuna göre anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçların McLaughlin ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış olduğu çalışmadaki bulgulara çok yakın olduğu tartışılmıştır. rhGH'nin olumlu sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu çalışmada, iskemi-reperfüzyon modelinin AAA tedavisinde ortaya çıkan solunum disfonksiyonu ile benzerliğinden de söz edilmiştir. Deneysel AAA tedavi modeli olarak kullanılabileceği gösterilmiş olan 30 dakika iskemiyi takip eden 2 saat reperfüzyon prosedürü yaptığımız çalışmada bu nedenlerle tercih edilmiştir.

Kasın mekanik aktivitesinde olabilecek bir değişim, birçok mikro düzeydeki elektrofizyolojik değişimin toplamını göstermesi açısından önemlidir. Diyafram kasında gerçekleştirilen mekanik ölçüm ve gözlem çalışmaları Bülbring'in 1946'da yaptığı çalışmayı temel almaktadır (Bülbring 1946). Close tarafından 1972 yılında yazılan bir derlemede, bazı kas özelliklerinin de ölçüm verilerine dahil edilmesinin daha doğru sonuçlar vereceği ile ilgili önemli veriler ve bilgiler yer almaktadır (Close 1972). Bu bilgilere dayanarak ölçülen kas kuvvetinde diyafram kası yüzey alanı ile kas yoğunluğunu da içeren bir normalizasyon prosedürü Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Her bir deney hayvanının supramaksimal uyaranla oluşturulan en büyük kasılma değerlerinin normalize edilmiş ortalamaları (MK) her bir grup için hesaplandığında Şekil 3.1B'deki gibi anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Elde edilen bu veriler literatürdeki abdominal aorta iskemi-reperfüzyon çalışmalarıyla çok büyük benzerlik göstermektedir (McLaughlin ve ark 2000, Moneley ve ark 2001). Yine literatürde, iskelet kasının araştırılması için iyi birer preparat olan Gastrocnemius ve Tibialis anterior kaslarında da benzer bulgular elde edilmiştir (Ikebe ve ark 2001). Bunun yanı sıra geçmişte kardiyak kasları da içeren birçok

farklı kasta yapılan iskemi-reperfüzyon çalışmalarında da benzer bulgulara ulaşılmıştır (Reimer ve ark 1983).

Mekanik aktivite ile ilgili bulgulardan IR'nin KS ve GS50 değerlerinde azalma meydana gelmesine karşın bu azalmanın SHAM grubu değerlerine göre anlamlı olmadığı Çizelge 3.1'de görülmektedir. Bu azalma MK bulgusu ile birlikte değerlendirildiğinde hücre içi Ca^{++} homeostazında bir değişim olabileceği akla gelmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada, bunu aydınlatmak amacıyla hem SHAM hem de IR grubuna in vitro Ryanodine uygulanarak Latent Dönem (LD) ölçülmüştür. Aksiyon potansiyelinin başlaması ile kasılmanın başlaması arasındaki süreyi ifade eden LD parametresi, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu ($[Ca^{++}]_i$) değişimleri hakkında bilgi vermektedir. Diyafram kası hücresinde kasılmada gerekli Ca^{++}'un büyük bölümü sarkoplazmik retikulumdan (SR) sağlanmaktadır (Herve ve ark 1988). Diyafram kası hücrelerinde Ryanodine (RyR) kullanılarak yapılan çalışmalarda 3 nM dozda in vitro uygulamanın kasın bazal gerimini artırdığı gösterilmiştir. Bu etkiyi RyR'nin SR'daki reseptörlerine bağlanarak SR'daki Ca^{++}'un, dinlenimde hücre içine akmasını sağlayarak gösterdiği belirtilmiştir (Zavecz ve Anderson 1992). Kas sarsılarıyla eşzamanlı AP kayıtlarından hesaplanan ortalama LD değerlerine bakıldığında, RyR'nin LD'yi uzattığı fakat bunun IR grubundaki kadar olmadığı görülmektedir. Ayrıca IR+RyR grubundaki LD'uzamasının IR grubundaki uzamadan farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 3.2 ve 3.3). Bu bulgular ve RyR uygulamasının daha fazla uzamaya sebep olmaması, IR grubunda SR'daki Ca^{++} stoklarının büyük ölçüde tüketildiğini ve hücre içi bazal Ca^{++} miktarının ise arttığını göstermektedir.

Supramaksimal genlikte 50 Hz frekansa sahip kare biçimli uyaran pulsları ile diyaframın uyarılması sonucu elde edilen kasılma yanıtlarının genliğinde anlamlı azalma olduğu bulunmuştur (Şekil 3.4). Bazı literatür çalışmalarında, seçilen bu uyarım frekansının spontan olarak nefes alan sıçanlardaki frenik sinir ve diyafram kasından oluşan motor ünitenin uyarım frekansına yakın olduğundan söz edilmektedir (Kong ve Berger 1986). Bazı çalışmalarda ise 50 Hz frekansa sahip 0,2 ms süreli supramaksimal uyaran pulsları sıçanın hızlı soluk alıp verme frekansı olarak kabul edilmiş, diyaframa direkt uygulanarak yorgunluk modeli

oluşturulmuştur (Ionno ve ark 2007). Fakat bizim çalışmamızda bu frekanstaki uyaranlarla elde ettiğimiz kasılma kayıtları incelendiğinde kasın tetanusa girdiği görülmüştür. İlginç bir şekilde Şekil 3.4A'daki kasılma kayıt örneklerinden de görüldüğü gibi tüm IR grubu deney hayvanlarının diyaframları, tetanusa SHAM grubundakilere göre daha ani girmektedir. Bununla ilgili herhangi bir literatür bilgisi bulunmamakla birlikte, bu durumun IR grubunda hücre içi Ca^{++} stoklarının daha hızlı tüketilmesine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. 3 nM RyR uygulanarak alınan 1 Hz frekanslı tek sarsı ile AP kayıtlarından hesaplanan LD bulguları ise bu yorumu destekler niteliktedir. Diyafram kasının, frekansı 25-70 Hz arasında değiştirilen uyarıma yanıtı, uyaran pulslarıyla eşzamanlı olarak kaydedilerek, hangi uyarım frekansında tetanusa girdiği ölçülmüştür. Tetanusa girilen frekansı ifade eden ortalama TF değerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmasa da (Şekil 3.5B), IR grubunda daha düşük frekanstaki uyaranlarda tetanusa daha hızlı yaklaşarak ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 3.5).

Çalışmamızda elde ettiğimiz diyafram kasının mekanik aktivitesi ile ilgili bulgular hücrenin Ca^{++} homeostazında değişim meydana geldiğini göstermektedir. ATP duyarlı K^+ kanalları (K_{ATP}) birçok kas hücresinde olduğu gibi diyafram kasında da bulunmaktadır (Van Lunteren ve ark 1998). Bu kanallar hücre içi ATP konsantrasyonu ile kontrol edilmekte ve $[ATP]_i$ 1 mM seviyesinin altına düşmediği sürece kapalı olarak bulunmaktadırlar (Bruton 2010). Herhangi bir nedenle ATP tüketimi hızlandığında ya da hücrenin enerji metabolizması bozulduğunda $[ATP]_i$'nin azalması nedeniyle K_{ATP} kanallarının açıldığı ve hücre içine SR'dan Ca^{++} girişi meydana geldiği gösterilmiştir (Boudreault ve ark 2010). Hücrenin bazal Ca^{++} miktarında artış ve bir miktar depolarizasyonuna neden olan bu durumun kasılma kuvvetinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Bruton 2010). İskemi-reperfüzyon sonucu hiperemi kaynaklı olarak nitrik oksit ve oksijen türevi serbest radikallerin miktarında artma meydana gelmesi hücrenin enerji metabolizmasının bozulmasına ve hücre içi ATP miktarının azalmasına yol açmaktadır (Ikebe ve ark 2001). Bu bilgiler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Bir kasın elektriksel olarak uyarılması ile başlayıp kasılma ile sonlanan olaylar zincirine uyarılma-kasılma çiftlenimi adı verilmektedir. Buna göre bir kasın fonksiyonel değişimlerinde, AP'nin oluştuğu uyarılma aşamasının rolü büyüktür. Çalışmamızda diyafram kası hücresinin içerisine mikroelektrotla girilerek, dinlenim durumundaki hücrenin içi ile dışı arasındaki potansiyel farkı ve sonrasında hücrenin kare biçimli supramaksimal uyaranla uyarılması sonucunda oluşan AP yanıtları kaydedilmiştir. Literatürde diyaframda ya da kalp kası hariç herhangi bir kasta iskemi reperfüzyon sonucu dinlenim durumundaki ve uyarılma durumundaki elektriksel değişiklikleri konu edinmiş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon sonucunda ortalama DZP değerinde hiperpolarizasyon yönünde anlamlı değişim meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.6). Bu bulgu, dinlenim durumundaki hücre içi ile dışı arasındaki iyon dağılımının korunmasını sağlayan mekanizmaların IR grubunda bozulmuş olduğunu göstermektedir. Hiperpolarizasyonla sonuçlanan bu değişimi açıklamak için ortamdaki Na^+'un bir kısmı NMDG ile değiştirilerek gerçekleştirilen deneylerde ise yine NMDG bulunan ortamda SHAM grubu DZP değerlerinde anlamlı düzeyde ($p<0,01$) hiperpolarizasyon meydana geldiği görülmüştür (Şekil 3.12). Ortamda NMDG bulunan IR grubuna ait diyaframların DZP değerlerinin ise aynı ortamdaki SHAM grubu değerleri ile farklı olmadığı görülmüştür. Bu bulgular, IR grubunda meydana gelen hiperpolarizasyon yönündeki değişimin, enerji metabolizmasındaki bozulma nedeniyle dinlenim zar potansiyelini sağlamak ve sürdürmekle görevli ATP bağımlı Na-K pompasının ve persistan Na^+ kanallarının aktivitesinde azalma kaynaklandığını göstermektedir. Literatürde diyabetik deney hayvanlarının iskelet kaslarında yapılan çalışmalarda, oksidatif stres oluşumu ve enerji metabolizmasında bazı değişimler meydana gelmesi, iskemi-reperfüzyon hasarıyla meydana gelen bozukluk bulgularıyla benzerlik göstermektedir (McGuire ve MacDermott 1998). Bununla birlikte geçmişte yapılan çalışmalar, diyaframın birçok patolojik durumunda, egzersizde ve kas yorgunluğunda DZP değerinin değişmediğini göstermektedir (van Lunteren ve ark 2008, van Lunteren ve Moyer 2006, van Lunteren ve Moyer 2003a). Yalnızca streptozotosin kullanılarak oluşturulmuş tipteki diyabetli sıçanlarda DZP değerinin değiştiği ve sağlıklı sıçanların diyafram hücrelerine göre depolarize olduğu gösterilmiştir (van Lunteren ve Moyer 2003b).

Deneysel diyabet oluşturulmuş farelerde yapılan bazı çalışmalarda ise DZP değerindeki değişim dinlenim durumunda zarın K^+ iletkenliğinde artış (Lin-Shiau ve ark 1993) ve Cl^- iletkenliğinde azalma (Grossie 1982) ile ilişkilendirilmektedir.

Çalışmamızda diyafram hücrelerinden kaydedilen AP'lerin TD, APG ve APA değerlerinin ortalamasının IR grubunda SHAM grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Şekil 3.8). Literatürde, genellikle diyabet başta olmak üzere birçok hastalığa bağlı diyafram kası patolojilerinde, bu parametrelerin tümünde azalma meydana geldiği gösterilmiştir (Grossie 1982, van Lunteren ve Moyer 2003b, van Lunteren ve Moyer 2003c). Buna karşın bazı çalışmalarda ise bizim bulgularımızla benzer bulgular elde edilmiştir (van Lunteren ve Moyer 2006). Yapmış olduğumuz çalışmada Na^+ ve K^+ akımlarının bu durumun şekillenmesindeki rolünün anlaşılması için NMDG ve 4AP uygulanarak AP kayıtları alınmıştır. SHAM grubuna 4AP uygulanarak K^+ akımları bloke edildiğinde IR grubundakine benzer şekilde TD, APG ve APA değerlerinde anlamlı artış meydana geldiği görülmüştür. Bu bulguyu destekler şekilde, IR grubuna 4AP uygulandığında ise SHAM grubundaki uygulama sonucu hesaplanan TD, APG ve APA ortalamasından farklı olmadığı görülmüştür. Ayrıca, NMDG bulunan ortamda hem SHAM hem de IR grubunun ortalama TD, APG ve APA değerlerinde anlamlı ($p<0,01$) azalma meydana gelirken IR grubundaki azalmanın daha az olduğu görülmüştür (Şekil 3.14). Bu bulgular, IR grubundaki TD, APG ve APA artışının çok büyük oranda K^+ kanallarının aktivasyonlarının gecikmesinden kaynaklandığını göstermektedir.

Repolarizasyon fazında meydana gelen değişimleri araştırmak amacıyla hesaplanan tepe değerinin %25, %50, %75 ve %90 azalması için geçen sürelerin ortalamalarının (APD25, APD50, APD75 ve APD90) tümünde IR grubunda azalma meydana gelirken, anlamlı ($p<0,01$) azalma yalnızca APD50 ve APD75 değerlerinde görülmüştür (Şekil 3.9). 4AP uygulamasının ise SHAM ve IR grubunun ortalama APD25, APD50, APD75 ve APD90 değerlerini anlamlı olarak artırdığı görülmüştür (Şekil 3.15). Fakat SHAM+4AP ile IR+4AP arasında anlamlı fark görülmemiştir.

SHAM grubuna 4AP uygulamasının TD, APG ve APA bulgularında IR grubundaki değişimle benzer etki göstermesi ilk olarak akla IR grubunda açılan K^+ kanallarının sayısında azalma olabileceğini akla getirmektedir. Fakat IR grubunda SHAM'a göre APD50 ve APD75 değerlerindeki değişimin 4AP uygulaması ile benzer olmaması ise voltaj bağımlı K^+ kanallarının kinetikleriyle ilgili bir değişim olduğunu göstermektedir.

van Lunteren ve Moyer'in diyabetik sıçan diyafram kasında yapmış oldukları çalışmada, birçok tipteki K^+ kanalını bloke ettiği bilinen 3,4-diaminopiridin uygulanarak AP'nin TD, APG ve APA değerlerinde meydana getirdikleri değişimler aydınlatılmaya çalışılmıştır (van Lunteren ve Moyer 2006). Bu çalışmalara göre hem sağlıklı hem de diyabetik sıçanlar için 3,4-diaminopiridin uygulaması, depolarizasyonda bir değişime sebep olmaksızın repolarizasyon süresini uzatmıştır. Yine diyafram kası üzerinde yapılan literatür çalışmalarında 3,4-diaminopiridin, 4-aminopiridin, Tetraetilamonyum, Glibenklamid, Apamid ve Karibdotoksin gibi bazı bilinen K^+ kanal blokörlerinin AP üzerine etkileri araştırılmıştır (van Lunteren ve ark 2001). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular yalnızca Tetraetilamonyumun AP'nin TD değerinde ve TD'nin %10'undan %90'ına ulaşılması için geçen sürede anlamlı artışa neden olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda IR grubunun ortalama TD, APG ve APA değerlerinin SHAM grubuna göre anlamlı artışına benzer bir durum van Lunteren ve Moyer'in 2006 yılında yapmış olduğu çalışmada görülmüş, Na^+ kanallarınının iletkenliğinde artışla açıklanmış ve bu artış iki nedene bağlanmıştır; açılan kanal sayısının artması, kanal inaktivasyonunun gecikmesi. Bunun yanı sıra aynı çalışmada K^+ kanallarının daha geç fakat eşzamanlı açıldığı ve repolarizasyonda açılan K^+ kanalı sayısının da arttığı belirtilmiştir (van Lunteren ve Moyer 2006).

Diyafram kas hücresi AP'sinin depolarizasyon fazının şekillenmesinde en önemli faktörün Na^+ kanallarının sayısı ve kinetikleri olduğu fakat K^+ kanal kinetiklerinin de katkısının olduğu çok iyi bilinmektedir (van Lunteren ve Moyer 2003b). Kaydedilen AP'lerin türevinin en büyük değeri (dV/dt_{mak}) hücrenin depolarizasyonu sırasında birim zamanda açılan Na^+ kanal çokluğunun en büyük değerini ve bu çokluğun açılma anını veren bir parametredir. Yine benzer şekilde

Na^+ kanal kinetikleriyle ilgili bilgi sağlayan bir diğer parametre ise en büyük genliğin yarısı kadar genliğe ulaşıldığı andaki türev olan $V_{mak/2}$ değeridir. Abdominal iskemi-reperfüzyon oluşturulan sıçanlarda ortalama dV/dt_{mak} ve $V_{mak/2}$ değerinde anlamlı artış meydana geldiği görülmektedir (Şekil 3.10A). NMDG bulunan ortamda gerçekleştirilen deneylerde bu iki değerin ortalamasında hem SHAM hem de IR grubu için anlamlı azalma görülmüştür. Fakat 4AP uygulanarak gerçekleştirilen deneylerde ise SHAM grubunda her iki parametrede de (dV/dt_{mak}ve $V_{mak/2}$) IR grubundakine benzer artışa neden olduğu görülmüştür (Şekil 3.16A ve 16B). Bu bulgu, az da olsa K^+ kanallarının kinetiklerine bağlı olarak şekillenen AP çıkış fazında IR sonucu meydana gelen değişimin, bu kanalların daha geç açılmalarıyla açıklanabileceğini göstermektedir. Bunlara ilaveten IR grubunda hücre zarının depolarizasyon hızının en büyük olduğu değere AP'nin başlangıcından SHAM grubuna göre daha kısa süre sonra ulaşıldığı yani ortalama MTZ değerinin anlamlı olarak daha küçük olduğu görülmüştür (Şekil 3.10C). 4AP uygulaması ve NMDG bulunan ortamda kayıt alınması, ortalama MTZ değerinde hem SHAM grubunda hem de IR grubunda benzer etkiye neden olmuştur (Şekil 3.16C).

Bu bulgular aynı zamanda, IR grubunda eşzamanlı açılan Na^+ kanalı sayısının artmış olabileceğini gösterirken, ortalama MTZ değerindeki azalma ise en çok Na^+ kanalının aynı anda açıldığı anın SHAM grubuna göre daha erken gerçekleştiğini göstermektedir. Yine depolarizasyonun hızı ile ilgili bir parametre olan TÇS değerinde ise deney grupları arasında fark görülmemiştir. Çelişki olarak değerlendirilebilecek bu bulgunun nedeni, kaydedilen AP eğrilerinin depolarizasyonları daha detaylı incelendiğinde anlaşılabilmektedir. IR grubuna ait AP'lerin depolarizasyon evresi daha sigmoidale yakın biçimde iken, SHAM grubuna ait AP'lerinki sigmoidal olmaktan çok doğrusala daha yakındır. Bu biçimsel değişikliğe rağmen en büyük depolarizasyon değerine ulaşmaları eşzamanlı olmaktadır (Şekil 3.7). Çalışmamızda bu durumun araştırılması ve daha anlaşılır olması bakımından daha önce literatürde örneği olmayan bir parametre olan Çarpıklık (Skewness) kullanılmıştır. Tüm AP boyunca hücre zarının potansiyel farkı (mV) bağımsız değişken seçilerek, buna bağlı zar potansiyel farkı değişimi (mV/ms) grafiği oluşturulduğunda Şekil 2.6'da görüldüğü gibi bir kapalı döngü ortaya çıkmaktadır. Bu döngünün bağımsız değişken ekseninin üstünde kalan kısmı

depolarizasyon fazına, altında kalan kısmı ise repolarizasyon fazına aittir. Depolarizasyon fazına ait olan eğrinin biçimi, hücrenin depolarizasyonunun hızına göre sola ya da sağa yatık olmaktadır. Çarpıklık, istatistikte bu tip dağılımların yönünün ve çarpıklık miktarının araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir parametredir (Şekil 2.7). Bu konuda daha detaylı bilgiye Gereç ve Yöntem bölümünde yer verilmiştir. Çarpıklık parametresi sayesinde depolarizasyonda meydana gelen Hodgkin çevrimi (Pehlivan 1997) adı verilen pozitif geribeslemeli Na^+ kanallarının açılmasıyla daha çok Na^+ kanalının açılmasının tetiklenmesi sürecinde meydana gelen olaylar ile ilgili bilgi elde edilebilmektedir. Daha çok Na^+ kanalının açılması zarın depolarizasyonuyla pozitif korelasyona sahip bir olay olduğundan, zar potansiyeline bağlı değişim zamana bağlı değişimden daha doğru bilgi vermektedir. Bu nedenle bu parametre ile depolarizasyon fazıyla ilgili pek çok veriyle sağlanan bilgiden çok daha detaylı bilgi sağlanabilmektedir. Her bir AP'nin depolarizasyon fazı için hesaplanan çarpıklık değerlerinin ortalamaları her iki deney grubu için de pozitif bulunmuş, IR grubunun Çarpıklık değerinin ortalamasının SHAM grubuna göre anlamlı olarak daha büyük olduğu görülmüştür (Şekil 3.10D). Şekil 3.11'deki, deney gruplarından rastgele seçilen örnek eğrilerden de anlaşılabileceği gibi IR grubunda eğri sola doğru daha çarpıktır (şekilde ok ile gösterilmiştir). Bu durum depolarizasyonda çıkış hızının en büyük olduğu değere zar potansiyelinin daha düşük depolarizasyon değerlerinde ulaşıldığını göstermektedir. NMDG bulunan ortamda kaydedilen AP'lerin Çarpıklık değerinin hem SHAM hem de IR grubunda daha kçük olduğu yani eğrinin sağa çarpık hale geldiği gösterilmiştir. Bu bulgu, zarın daha düşük depolarizasyon değerlerinde açılan Na^+ kanal sayısının IR grubunda SHAM grubuna göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Buna ilaveten SHAM grubuna 4AP uygulamasının Çarpıklık değerinde yarattığı değişim IR grubunun yarattığı değişimle benzer olmakla beraber, IR grubuna 4AP uygulandığında bir değişime neden olmadığı görülmüştür (Şekil 3.16D). Bu bulgu, abdominal iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilen sıçanların diyafram kası hücresi voltaj bağımlı K^+ kanallarının büyük oranda etkilendiğini göstermektedir.

İskemi-reperfüzyon kaynaklı solunumsal fonksiyon bozukluğunda diyafram kasında meydana gelen değişimler hücresel düzeyde elektrofizyolojik olarak araştırılmış, elde edilen mekanik veriler hücre içi Ca^{++} homeostazının değiştiğini

göstermiştir. Diyafram kası hücrelerinin elektriksel özelliklerinde ise IR modelinde birçok değişimin meydana geldiği görülmüştür. Buna göre hücre dinlenim durumunda daha hiperpolarize olmakla beraber, Na^+ iyon kanalları voltaj değişimlerine daha erken yanıt vermekte ve voltaj bağımlı K^+ kanallarının yanıtları gecikmektedir. AAA tedavi modelinin dokularda oksidatif stres yarattığı biyokimyasal olarak da gösterilmiştir (Collard ve Gelman 2001). Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz bulgular, yine kas dokusunda oksidatif stres kaynaklı hasara sebep olan diyabetle ilgili çalışmalarda elde edilen bulgularla benzerlikler göstermektedir (van Lunteren ve Moyer 2003b).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Vasküler cerrahi operasyonlar başta olmak üzere birçok cerrahi operasyon dokulara kan akışının kesilmesini yani iskemi oluşturulmasını zorunlu kılmaktadır. İskemi esnasında ve bunu takip eden reperfüzyon esnasında ise operasyon bölgesine yakın dokularla birlikte uzak dokularda da çeşitli yapısal ve fonksiyonel hasarlar meydana gelmektedir. Toplumda rastlanma sıklığının oldukça yüksek olduğu rapor edilen abdominal aortada meydana gelen anevrizma (AAA) tedavisinde tercih edilen açık cerrahi yöntemde abdominal aortadan kan akışı kesilerek oluşturulan iskemi-reperfüzyon prosedürü renal bölgenin altında kalan dokular başta olmak üzere diğer organlarda da fonksiyonel bozukluklara yok açmaktadır. Post-operatif komplikasyonlar olarak adlandırılan bu bozuklukların başında da mortalitesi diğerlerine göre oldukça yüksek olan solunumsal fonksiyon bozukluğu gelmektedir.

AAA tedavisinden sonra meydana gelen solunumsal fonksiyon bozukluğunun, frenik sinir tarafından innerve edilen diyaframın fonksiyonundaki değişimden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Diyaframın mekanik ve elektriksel özelliklerinin AAA tedavi modelindeki değişimini araştırmak için deneysel hayvan modeli tercih edilmiştir. Bu hayvan modelinde abdominal aortaya vasküler klip konularak 30 dakika iskemi oluşturulmuş, klip kaldırılarak 2 saat reperfüzyon gerçekleştirilmiştir. İzole diyafram preparatından çeşitli uyaran prosedürlerinde oluşturulan kas sarsıları kaydedilmiş, kas sarsılarıyla eşzamanlı AP kaydedilerek ise latent dönem ölçülmüştür. Elde edilen bulgular, iskemi-reperfüzyonun diyafram kası sarkoplazmik retikulumundaki Ca^{++} stoklarının azalmasına ve hücre içi bazal Ca^{++} miktarının artmasına neden olduğunu göstermiştir. Mikroelektrot ile diyafram kası hücrelerinin içerisine girilerek dinlenim zar potansiyelleri (DZP) ve aksiyon potansiyelleri (AP) kaydedilmiştir. İskemi reperfüzyonun hücrenin dinlenim durumunda daha hiperpolarize olmasına neden olduğu görülmüş, bunun persistan Na^{+} akımlarının azalmasından kaynaklandığı gösterilmiştir. İskemi-reperfüzyonda, AP depolarizasyon hızının ve genliğinin arttığı

görülmüş, bunun nedeninin Na^+ iyon kanallarının zar potansiyeli değişimlerine daha erken yanıt vermesinden ve K^+ kanallarının yanıtlarının gecikmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, AP depolarizasyon fazıyla ilgili daha detaylı bilgi edinilmesi amacıyla zar potansiyeline bağlı, zar potansiyeli değişim miktarı eğrilerinin depolarizasyondaki Çarpıklık değerleri belirlenmiştir. Literatürde daha önce bu tür çalışmalarda kullanılmayan oldukça değerli olduğunu düşündüğümüz bilgiler sağlayan Çarpıklık parametresinin de gelecekte bazı zar özelliklerinin açıklanmasında da kullanılabileceği de gösterilmiştir.

Özetle çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular AAA tedavisi gibi birçok cerrahi operasyon sonrasında meydana gelebilecek solunumla ilgili fonksiyon bozukluğunun, diyaframın mekanik ve elektriksel özelliklerinde değişimlerden kaynaklanabileceğini göstermiştir. Meydana gelen değişimlerin moleküler düzeydeki olası mekanizmalarının anlaşılması daha detaylı araştırmaları gerektirmektedir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İskemi-Reperfüzyonun Sıçan Frenik Sinir Diyafram Preparatında Yarattığı Elektrofizyolojik Değişimlerin Numerik Analiz Yöntemleriyle İncelenmesi

"Seçkin TUNCER"

Biyofizik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2013

Vasküler cerrahi operasyonlar başta olmak üzere birçok operasyon dokulara kan akışının kesilmesini yani iskemi oluşturulmasını zorunlu kılmaktadır. İskemi sonrasında kan akışının tekrar sağlanmasıyla dokuların reperfüzyonu gerçekleştirilmektedir. Reperfüzyon başta olmak üzere her iki aşamada da operasyon bölgesine yakın dokularla birlikte uzak dokularda da çeşitli yapısal ve fonksiyonel hasarlar meydana gelmektedir. Toplumda rastlanma sıklığı oldukça fazla olan Abdominal Aorta Anevrizmasının (AAA) tedavisinde de abdominal aortanın kan dağıtımının infrarenal bölgeden kapatılmasıyla iskemi ve takiben reperfüzyon meydana gelmektedir. Açık cerrahi kullanılarak gerçekleştirilen AAA tedavisinden sonra meydana gelen solunumsal disfonksiyonun sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, diyaframın fonksiyonel bozukluklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, mortalitesi yüksek olan post-operatif solunum disfonksiyonunun diyaframın hangi elektrofizyolojik özelliklerindeki değişimlerden kaynaklanıyor olabileceği araştırılmıştır.

Bunun için, Wistar Albino türü 48 adet sıçan her birinde 24'er tane olmak üzere iskemi reperfüzyon grubu (IR) ve kontrol grubu (SHAM) olarak adlandırılan iki gruba ayrılmıştır. Hafif anestezi altında (8 mg/100 gr ketamin, 1 mg/100 gr ksilazin) IR grubu sıçanların abdominal aortadan kan akışı infrarenal bölgeden vasküler klip ile kapatılmış, 30 dakika sonra klip kaldırılarak 2 saat kan akışı sağlanmıştır. SHAM grubunda ise yalnızca klip yerleştirme işlemi gerçekleştirilmemiştir. Bekleme süresinin ardından diyaframlar izole edilerek, fizyolojik koşullara en yakın koşullar altında kasın mekanik ve elektriksel özellikleri araştırılmıştır. İzole edilen diyaframlara ayrıca in vitro 3 nM Ryanodine uygulaması ile Na^+ ve K^+ akımları blokasyonu (0,3 mM 4-Aminopiridin ve 127 mM N-metil-D-glukamin) deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kare biçimli 0,2 ms süreli supramaksimal uyaranlar, 1 Hz, 50 Hz ve 25-70 Hz aralığında değişen frekansta uygulanarak, elde edilen kas sarsıları kaydedilmiştir. Hücrelerin içerisine 10-20 MΩ dirence sahip mikroelektrotlar ile girilerek Dinlenim Zar Potansiyeli (DZP) ve supramaksimal kare biçimli 0,2 ms süreli uyaranlarla elde edilen hücre içi Aksiyon Potansiyeli (AP) yanıtları kaydedilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, kasılma kuvvetinin (1 Hz ve 50Hz) IR grubunda anlamlı azaldığı ($p<0,01$) ve tetanusa girme frekansının düştüğü gözlenmiştir. Hücrenin dinlenim durumundayken IR grubunda daha hiperpolarize olduğu gözlenmiştir. Kaydedilen AP yanıtlarından elde edilen ortalama tepe değeri, genlik, alan değerlerinin IR grubunda anlamlı olarak arttığı, depolarizasyonun ve repolarizasyonun ise anlamlı olarak hızlandığı bulunmuştur ($p<0,01$).

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, diyafram kasının mekanik özelliklerinin IR grubunda görülen değişimine Ca^{++} homeostazının bozulmasının sebep olduğu gösterilmiştir. Dinlenimde persistan Na^+ akımının IR grubunda azaldığı ve AP biçimindeki değişimlerin ise, Na^+ iyon kanallarının kinetiklerindeki değişimden ve voltaj bağımlı K^+ kanallarının aktivasyonunun gecikmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: İskemi-reperfüzyon; diyafram; abdominal aorta anevrizması; kasılma kuvveti; hücre içi aksiyon potansiyeli

7. SUMMARY

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Investigation of Elecrophysiological Alterations Caused by Ischemia-Reperfusion in Rat Phrenic Nerve-Diaphragma Preparations with Numerical Analysis Techniques

"Seçkin TUNCER"

Biyofizik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2013

Cessation of blood flow that is called ischemia is prerequisite for some surgical operations especially vascular surgery. After ischemia, blood supply to the tissues is provided again and tissues are reperfused. For each process some structural and functional damages occur in tissues that may be both close and far to the operation area. In the Abdominal Aorta Aneurysm (AAA) which has a high prevalence among the human population, by closure of the abdominal aorta's blood delivery from the infrarenal area, ischemia and reperfusion occurs. Reason of respiratory dysfunction after open surgical AAA repair is not known well and thought to be arising from functional changes of diaphragm muscle. In our study, we investigated the changes in the electrophysiological properties of diaphragm that is caused post-operative respiratory dysfunction.

For that purpose, 20 Wistar Albino rats were divided into groups that called ischemia-reperfusion group (IR) and control group (SHAM), by means of 10 rats for each. Under light anesthesia (8 mg/100 gr ketamine, 1 mg/100 gr xsylazine) in IR group blood delivery is occluded from the infrarenal area of the abdominal aorta by using a vascular clamp, after 30 minutes the clamp was removed and blood delivery was alloved for 2 hours. In SHAM group, only clamp was not placed. Following the waiting period diaphragms are isolated and mechanical and electrical properties of muscle was investigated under the physiologic conditions. 3 nM Ryanodine application and Na^+ and K^+ current blockage (0.3 mM 4-Aminopiridine and 127 mM N-methyl-D-glukamine) experiments were carried out on the isolated diaphragms in vitro. Square shaped supramaximal pulses having 0.2 ms duration, 1 Hz, 50 Hz and between 25-70 Hz frequency were applied and muscle twitches were recorded. Resting Membrane Potentials (DZP) and Action Potential (AP) responses to square shaped supramaximal pulses having 0,2 ms duration were recorded by entering into the cell by using microelectrodes that have resistances between 10-20 MΩ.

As a result, for IR group the contraction force (1 Hz and 50 Hz) decreased significantly ($p<0.01$) and there is also decline in tetanus frequency. It is also found that resting state of cells of IR group is more hyperpolarized as compared to SHAM group. Average overshoot, amplitude and area of action potential increased significantly and the rate of depolarization and repolarization found to become faster significantly in the IR group ($p<0.01$).

Evaluating the obtained values, the mechanical alterations in IR group are shown to be caused by deterioration of Ca^{++} homeostasis. In the IR group the persistant Na^+ current is found to be desreased at the resting state and the alterations of the shape of AP has shown to be arised from the changed kinetics of Na^+ ion channels and the delayed activaion of voltage dependent K^+ ion channels.

Key Words: Ischemia-reperfusion; abdominal aorta aneurysm; contraction force; intracellular action potential

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARLARI

Karar Sayısı: 2010-085	**Karar Tarihi: 30/09/2010**

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalından Prof. Dr. Nizamettin DALKILIÇve Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalından Seçkin TUNCER, tarafından sunulan "*İskemi-reperfüzyonun sıçan frenik sinir-diyafram preparatında yarattığı elektrofizyolojik değişimlerin numerik analiz yöntemleriyle incelenmesi*" başlıklı doktora tezi sekiz üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede iki grupta toplam 48 sıçanın kullanılacağı, sıçanların yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde "Başvuru Sahibinin Sorumlulukları" başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6da belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK Başkan	Prof.Dr.Lema TAVLI Üye	Prof.Dr.Said BODUR Üye	Prof.Dr.A.SaideŞAHİN Üye-Katılmadı
Prof.Dr.Faruk Ayhan BAŞÇİFTÇİ Üye-İzinli	Doç.Dr.Nilsel OKUDAN Üye-İzinli	Doç.Dr.H.Serdar GERGERLİOĞLU Üye	Doç.Dr.Mehmet GÜL Üye
Dr. M.Metin ŞENER Üye	Muammer GÜLKAYA Üye	Mustafa ŞİRİN Üye	

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

Aslı gibidir.
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ERGİN
N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Hast.
Acil Tıp A.B.D.
Dip. No: 135

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2013-047	Karar Tarihi: 27.02.2013

30.09.2010 tarih ve **2010-085** sayılı onaya sahip ***"İskemi-Reperfüzyonun Sıçan Frenik Sinir-Diyafram Preparatında Yarattığı Elektrofizyolojik Değişimlerin Numerik Analiz Yöntemleriyle İncelenmesi"*** başlıklı doktora tezi projesi için 2 farklı deney grubunda 2'şer farklı kayıt yöntemi kullanılacağı belirtildiğinden 48 adet sıçan için onay verilmiş olup, çalışma esnasında bir deney hayvanından izole edilen diyaframın iki yarısından da (hemidiyafram-frenik sinir preparatı) faydalanılarak 2 farklı kayıt yönteminin kullanılabileceği anlaşılmış ve yalnızca 24 adet deney hayvanı kullanımının yeterli olduğu belirtilmiştir.

Buna göre proje yürütücüsünün başvurusu doğrultusunda her bir deney grubunda 12 olmak üzere toplamda 24 adet sıçana (Wistar Albino) düşürülüp, onay verilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Başkan

Prof.Dr.Lemal TAVLI
Üye

Prof.Dr.A.Saide ŞAHİN
Üye

Doç.Dr.Mehmet GÜL
Üye

Dr.M.Metin ŞENER
Üye

Mustafa ŞİRİN
Üye

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
(KONÜDAM)

Karar Sayısı: 2013 – 074 **Karar Tarihi: 17.04.2013**

30.09.2010 tarih ve **2010-085** sayılı onaya sahip ***"İskemi-reperfüzyonun sıçan frenik sinir-diyafram preparatında yarattığı elektrofizyolojik değişimlerin numerik analiz yöntemleriyle incelenmesi"*** isimli projenin, proje yürütücüsünün başvurusu doğrultusunda; her bir grupta 8'er adet olmak üzere toplam 24 adet (Wistar Albino) sıçan verilmesinin **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Başkan

Prof.Dr.Lema TAVLI
Üye

Prof.Dr.A.Saide ŞAHİN
Üye

Prof.Dr.Selim KUTLU
Üye

Doç.Dr.Mehmet GÜL
Üye

Doç.Dr.Tevfik KÜÇÜKKARTALLAR
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet ERGİN
Üye

Dr.M.Metin ŞENER
Üye- Katılmadı

Vet.Hek.Alpaslan ÖZKÜRKÇÜLER
Üye

Mustafa ŞİRİN
Üye

Adres:N.E.Ü.Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi, 42080–Meram/KONYA
Tel: (0332) 223 71 11, Faks: (0332) 223 71 24 e–posta: konudam@konya.edu.tr
Web Adresi: http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam Bilgi: 223 71 11

8. KAYNAKLAR

1. Aidley DJ, Stanfield PR. Ion Channels: Molecules in Action. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1996;33-35.
2. Baue AE, McClerkin WW. Study of Shock: Acidosis and the Declamping Phenomenon. Ann Surg. 1965;161:41-5.
3. Bengtsson H, Sonesson B, Bergqvist D. Incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms, estimated by necropsy studies and population screening by ultrasound. Ann N Y Acad Sci 1996;800:1–24.
4. Boudreault L, Cifelli C, Bourassa F, Scott K, Renaud JM. Fatigue preconditioning increases fatigue resistance in mouse flexor digitorum brevis muscles with non-functioning K(ATP) channels. J Physiol. 2010;588(Pt 22):4549-62.
5. Bruton J. What does the membrane KATP channel really do in skeletal muscle? J Physiol 2010;588(22):4333.
6. Bülbring E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Br J Pharmacol Chemother. 1946;1:38-61.
7. Close RI. Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. Physiol Rev. 1972;52:129–197.
8. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology. 2001;94(6):1133-8.
9. Curtis, Cole KS. Membrane resting and action potentials from the squid giant axon. J. cell. comp. Physiol. 1942;19:135-144.
10. Gauthier GF. On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle. Z Zellforsch Mikroskop Anat. 1969;95:462-482.
11. Gelman S. The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. Anesthesiology 1995;82:1026–1060.
12. Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States.J Clin Epidemiol. 1995;48:1289–98.
13. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(12):2605-13.
14. Grossie J. Contractile and electrical characteristics of extensor muscle from alloxan-diabetic rats. An in vitro study. Diabetes. 1982;31:194–202
15. Guyton AC. Resting membrane potential. John E hall eds. Textbook of medical physiology. 11st ed, Saunders, Missouri, 2005.
16. Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myonephropathic-metabolic syndrome. Surgery. 1979;85:461-8.
17. Hallett JW Jr, Marshall DM, Petterson TM, Gray DT, Bower TC, Cherry KJ Jr, Gloviczki P, Pairolero PC. Graft-related complications after abdominal aortic aneurysm repair: reassurance from a 36-year population-based experience. J Vasc Surg 1997;25:277–84; discussion 285–86.
18. Herve P, Lecarpentier Y, Brenot F, Clergue M, Chemla D, Duroux P. Relaxation of the diaphragm muscle: influence of ryanodine and fatigue. J Appl Physiol. 1988;65(5):1950-6.
19. Hille B. Ion channels of excitable membranes, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2001.
20. Hodgkin AL ve Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol 1952;116, 449-472.
21. Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J Physiology. 1949;108:37–77.
22. Hopkins PM. Skeletal Muscle Physiology. Contin Educ Anaesth Crit Care Pain 2006;6 (1):1-6
23. Ikebe K, Kato T, Yamaga M, Hirose J, Tsuchida T, Takagi K. Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. J Surg Res. 2001;99(1):1-6.
24. Ionno M, Moyer M, Pollarine J, van Lunteren E. Inotropic effects of the K+ channel blocker 3,4-diaminopyridine on fatigued diaphragm muscle. Respir Physiol Neurobiol. 2008;160(1):45-53.
25. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L,Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for ArterialAneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Societyfor Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. J Vasc Surg 1991;13:452–58.

26. Katzen BT, MacLean AA. Complications of endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: a review. Cardiovasc Intervent Radiol. 2006;29(6):935-46.
27. Keynes D, Aidley DJ, Nerve and muscle., Cambridge University press, New York, NY, 1981; R163 pp.
28. Kniemeyer HW, Kessler T, Reber PU, Ris HB, Hakki H,Widmer MK. Treatment of ruptured abdominal aortic aneurysm, a permanent challenge or a waste of resources? Prediction of outcome using a multi-organ-dysfunction score. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;19:190–96.
29. Kong FJ, Berger AJ. Firing properties and hypercapnic responses of single phrenic motor axons in the rat. Appl Physiol. 1986;61(6):1999-2004.
30. Limet R, Sakalihassan N, Albert A. Determination of the expansion rate and incidence of rupture of abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg 1991;14:540–48.
31. Ling G ve Gerard RW. The normal membrane potential of frog sartorius fibres. J cell comp Physiol. 1949;34,382-396.
32. Lin-Shiau SY, Liu SH, Lin MJ. Use of ion channel blockers in the exploration of possible mechanisms involved in the myopathy of diabetic mice. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1993;348 311–318.
33. Marieb Elaine Nicpon, Human Anatomy & Physiology, Addison Wesley Longman, 1995.
34. McGuire M, MacDermott M. The influence of streptozotocin-induced diabetes and the antihyperglycaemic agent metformin on the contractile characteristics and the membrane potential of the rat diaphragm. Exp Physiol. 1998;83:481/487.
35. McLaughlin R, Kelly CJ, Kay E, Bouchier-Hayes D.Diaphragmatic dysfunction secondary to experimental lower torso ischaemia-reperfusion injury is attenuated by thermal preconditioning. Br J Surg. 2000;87(2):201-5.
36. Moneley D, Barry MC, McLaughlin R, Kelly CJ, Bouchier Hayes DJ. Preoperative treatment with recombinant human growth hormone prevents ischemia reperfusion-induced diaphragmatic dysfunction. J Surg Res. 2001;97(1):81-4.
37. Norwood MG, Bown MJ, Sayers RD. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004;28(3):234-45.
38. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. Ann Vasc Surg 1991;5:491–99.
39. Pehlivan, F. Biyofizik. Ankara, Hacettepe-Tas Kitapcilik, 1997.
40. Powell JT, Brady AR. Detection, management, and prospects for the medical treatment of small abdominal aortic aneurysms. 2004;24:241–245.
41. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. Am J Cardiol. 1983;52(2):72A-81A.
42. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm, Lancet 2005;365:1577–89
43. Sasaki M, Joh T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. J Clin Biochem Nutr. 2007;40(1):1-12.
44. Shinmura K, Tamaki K, Bolli R. Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K+ channels in both young and aged hearts. J Mol Cell Cardiol. 2005;39(2):285-96.
45. Singh K, Bonaa KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S.Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: the Tromso Study. Am J Epidemiol. 2001;154:236–44.
46. Starnes JW, Taylor RP. Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms. Med Sci Sports Exerc. 2007;39(9):1537-43. Review.
47. Taşkınlar H, İntesitnal İskemi Reperfüzyon Hasarının Diyafram Kası ve Frenik Sinir Üzerine Etkisi ve N-Acetyl Cysteine'in Rolü, Mersin Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, Mersin, 2006
48. Van Lunteren E, Moyer M, Torres A. ATP-sensitive K+ channel blocker glibenclamide and diaphragm fatigue during normoxia and hypoxia. J Appl Physiol. 1998;85(2):601-8.
49. van Lunteren E, Moyer M, Dick TE: Modulation of diaphragm action potentials by K+ channel blockers. Respir Physiol 2001, 124:217-230.
50. van Lunteren E, Moyer M, Pollarine J. Long-lasting in vivo inotropic effects of the K(+) channel blocker 3,4-diaminopyridine during fatigue-inducing stimulation. Muscle Nerve. 2008;38(6):1616-22..
51. van Lunteren E, Moyer M. Slowing of rat diaphragm action potential depolarization by endurance treadmill training. Neurosci Lett. 2003c; 339(3):175-178
52. van Lunteren E, Moyer M. Altered diaphragm muscle action potentials in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. Respir Physiol Neurobiol. 2006;153(2):157-65.

53. van Lunteren E, Moyer M. Streptozotocin-diabetes alters action potentials in rat diaphragm. Respir Physiol Neurobiol. 2003b;135(1):9-16.
54. van Lunteren E, Moyer M. Wheel-running exercise alters rat diaphragm action potentials and their regulation by K+ channels. J Appl Physiol. 2003a;95(2):602-10.
55. Volta CA, Ferri E, Marangoni E, Ragazzi R, Verri M, Alvisi V, Zardi S, Bertacchini S, Gritti G, Alvisi R. Respiratory function after aortic aneurysm repair: a comparison between retroperitoneal and transperitoneal approaches. Intensive Care Med. 2003;29(8):1258-64
56. Volta CA, Verri M, Righini ER, Ragazzi R, Pavoni V, Alvisi R, Gritti G. Respiratory mechanics during and after anaesthesia for major vascular surgery. Anaesthesia 1999;54:1041–1047.
57. Wahler GM. Muscle and other contractile system. Academic Press. 1997. Section VI.
58. Zavecz JH, Anderson WM. Role of extracellular Ca2+ in diaphragmatic contraction: effects of ouabain, monensin, and ryanodine. J Appl Physiol. 1992;73(1):30-5.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı : Seçkin
Soyadı : Tuncer
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 04 / 08 / 1983
Adresi : N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Biyofizik Anabilim Dalı, 42080 Meram-Konya
İş Telefonu : 0 332 223 66 53
e-mail : tuncerseckin@gmail.com

Eğitime Ait Bilgiler:

Lisans	2001-2005	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara
Yüksek Lisans	2005-2008	Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Konya
Doktora	2008-	Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı, Konya

Çalıştığı kurumlar:

2008 - 2011	S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi
2011 - 2012	S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Öğretim Görevlisi
2012 -	N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil:

İngilizce (ÜDS:76,25 puan)

Yüksek Lisans Tezi ve Danışmanı:

Deneysel tip I diyabetin sıçan periferik sinirleri üzerine etkisinin numerik analiz yöntemleri ile incelenmesi, Danışman: Prof. Dr. Nizamettin Dalkılıç, 2008.

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleleri

1. Ayaz, M., Dalkilic N., Bariskaner H., **Tuncer S.** and Demirel I., "Gender-Dependent Effects of Selenite on the Perfused Rat Heart: A toxicological study" Biol. Trace Elem. Res., 2007;116(3):301-10.

2. Ayaz M., Kiziltan E., **Tuncer S.**, Dalkilic N., Demirel I., Bariskaner H., Pehlivan F. "Sexual dependency of rat sciatic nerve fiber conduction velocity distributions." Int J Neurosci. 2007;117(11):1537-49.

3. Ayaz M., **Tuncer S**., Okudan N., Gökbel H., "Coenzyme Q10 And Alpha Lipoic Acid Supplementation To Diabetic Rats: Conduction Velocity Distributions." Methods Find Exp Clin Pharmacol., 2008, 30(5): 367-374.

4. Ayaz M., Dalkilic N., **Tuncer S**., Bariskaner H. "Selenium Induced Changes on Rat Sciatic Nerve Fibers: Compound Action Potentials." Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2008, 30(4): 271-275

5. Dalkilic N., **Tuncer S.,** Bariskaner H., Kiziltan E., "The Effect of Tramadol on the Rat Sciatic Nerve Conduction: A numerical Analysis and Conduction Velocity Distribution Study" Journal of the Pharmaceutical Society of Japan:Yakugaku Zasshi 2009,129(4); 485-93.

6. Tuncer S., Dalkilic N., Dundar M.A., Keles B. "Comparative effects of alpha lipoic acid and melotonin on cisplatin-induced neurotpoxicity." Int. J. Neurosci, 2010;120:655-663.

7. Tuncer S., Dalkilic N., Esen HH., Avunduk M.C. "An early diagnostic tool for diabetic neuropathy: Conduction velocity distribution." Muscle and Nerve, 2011 43(2), 237-244.

Uluslararası Kongrelerde sunulmuş bildiriler:

i- Poster Bildirileri:

1. Ayaz, M., **Tuncer, S.**, Okudan N., Gökbel H. Coenzyme Q10 and Alpha Lipoic Acid Supplementation to Diabetic Rats: Conduction Velocity Distributions. Scandinavian Physiological Society's Annual Meeting, Oulu University, Finland, 15-17 August 2008, Acta Physiologica, Vol:193, Suppl:664, P-50, Page: 127.

2. Tuncer, S., Dalkılıç, N., Streptozotocin Induced Diabetes Changes Conduction Velocity Distribution of Rat Sciatic Nerve in a Time Dependent Manner. 9th International Congress of The

Polish Neuroscience Society, Warsaw, Poland.9-12 September 2009, Acta Neurobiologiae Experimentalis, Vol:69, Number:3, TIII-51.

3. Tuncer, S., Dalkılıç, N., Acikgoz A., Demirel İ. Determination of Cisplatin Induced Neurotoxic Effect on Sciatic Nerve Fiber Groups of Rat by Collision Technique. The 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP (Southeastern Anatolian Project) & the 21st National Biophysics Congress, 5-9 October 2009 Diyarbakir – Turkey, P-06.

4. Tuncer, S., Dalkılıç, N., Dundar M.A., Keles B. Alpha Lipoic Acid and Melatonin Supplementation to Cisplatin Induced Neurotoxicity in Rat Sciatic Nerve. The 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP (Southeastern Anatolian Project) & the 21st National Biophysics Congress, 5-9 October 2009 Diyarbakir – Turkey, P-09.

Ulusal Kongrelerde sunulmuş bildiriler:

i- Sözlü Bildiriler:

1. Ayaz, M., Kızıltan E., **Tuncer, S.**, Barışkaner, H., Dalkılıç, N., Demirel, İ. ve Pehlivan F. "Cinsiyet Farklılığının Sıçan Siyatik Siniri Hız Dağılımı Üzerine Etkisi" 18. Ulusal Biyofizik Kongresi, 6-9 Eylül, Beypazarı, Ankara, Türkiye, Özet Kitapçığı (Sözlü Bildiri) S:11, (2006)

2. Ayaz, M., Dalkılıç, N., **Tuncer, S.**, Barışkaner, H. "Effect of Selenium on the Compound Action Potentials of Rat Sciatic Nerve" VI. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 9-13 Nisan, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Safranbolu, Türkiye, Abstract Book (Sözlü Bildiri) Page:10 Neuroanatomy Vol:6 Supplement 1, (2007)

3. Guney O., **Tuncer, S.**, Ilik MK., Dalkılıç, N., Ayaz, M. "Effects of Hypothermia on Conduction Velocity Distribution of Isolated Rat Sciatic Nerve" VI. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 9-13 Nisan, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Safranbolu, Türkiye, Abstract Book (Sözlü Bildiri) Page:7 Neuroanatomy Vol:6 Supplement 1, (2007)

4. Tuncer, S., Ayaz, M., Dalkılıç, N. "Deneysel diyabetik nöropatinin periferal sinir iletim parametreleri üzerine etkileri" 19. Ulusal Biyofizik Kongresi, 5-7 Eylül, Selçuk Üniversitesi SDKM, Konya, Türkiye, Özet Kitapçığı (Sözlü Bildiri) S-02 Sayfa:9

5. Guney O., **Tuncer, S.**, Ilik MK., Dalkılıç, N., Ayaz, M. "Hipoterminin izole sıçan siyatik siniri iletim hız dağılımı üzerine etkisi" 19. Ulusal Biyofizik Kongresi, 5-7 Eylül, Selçuk Üniversitesi SDKM, Konya, Türkiye, Özet Kitapçığı (Sözlü Bildiri) S-01 Sayfa:8

6. Göncü RG, Kaçıra BK, **Tuncer S**, Dalkılıç N, Güzel Y, Karalezli MN, "Siyatik sinir kesi modelinde eritropoetin ile trombositten zengin plazmanın rejenerasyon üzerine etkisinin sinirin izole edilerek karşılaştırılması" XXII. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, 31 Ekim-5 Kasım 2011, Antalya, Türkiye, Program Kitapçığı (Sözlü Bildiri) S-61 Sayfa:36.

7. Tuncer S., Dalkilic N., Burat İ. "Abdominal Aorta Anevrizması (AAA) Tedavi Modelinin Diyaframda Meydana Getirdiği Elektrofizyolojik Değişimler" 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, 25-28 Eylül 2012, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Özet kitapçığı (Sözlü Bildiri) Sayfa:42.

ii- Poster Bildirileri:

1. Ayaz, M., Dalkılıç, N., Barışkaner, H., **Tuncer, S.** ve Demirel, İ. "Selenit Toksisitesinin Dişi Ve Erkek Sıçan Kalp Dokusundaki Etkilerinin Karşılaştırılması," 17. Ulusal Biyofizik Kongresi, 7-9 Eylül 2005, İzmir, Özet Kitapçığı (Poster) S:46, (2005)

2. Ayaz, M., **Tuncer, S.**, Dalkılıç, N. ve Demirel, İ. "Sodyum Selenitin Sıçan Siyatik Siniri İletim Parametreleri Üzerine Olumsuz Etkisi" 18. Ulusal Biyofizik Kongresi, 6-9 Eylül2006, Beypazarı, Ankara, Özet Kitapçığı (Poster) S:33, (2006)

3. Ayaz, M., Kiziltan, E., Barışkaner, H., **Tuncer, S.**, Dalkılıç, N. "The effects of selenium toxicity on the conduction velocity distribution of isolated rat sciatic nerve" V. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, 10-14 Nisan 2006, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, Türkiye, Abstract Book (Poster) Page:39 Neuroanatomy Vol:5 Supplement 1, (2006)

4. Dalkılıç, N., **Tuncer, S.,** Barışkaner, H., Demirel, İ. Tramadolün Sıçan Siyatik Sinir Lifi İletim Hız Dağılımına Etkisi. 20. Ulusal Biyofizik Kongresi,22-25 Ekim 2008, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, P-58, S:50

5. Tuncer, S., Dalkılıç, N., Deneysel Tip I Diyabetin Sıçan Periferik Sinir İletim Hız Dağılımı Üzerine Etkisi, 20. Ulusal Biyofizik Kongresi,22-25 Ekim 2008, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, P-59, S:51

6. Ayaz, M., **Tuncer, S.**, Okudan N., Gökbel H. Diyabetik Sıçanlara Koenzim Q10 ve Alfa Lipoik Asit Uygulamasının Sinir İletim Hız Dağılımı Üzerine Etkisi. 20. Ulusal Biyofizik Kongresi,22-25 Ekim 2008, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, P-07, S:25

7. Tuncer S., Dalkılıç N., Göncü R.G., Karalezli N. Periferik Sinir Kesilerinde Fonksiyonel İyileşme Süresinin in vitro Elektrofizyolojik Yöntemlerle Araştırılması. Adnan Menderes Ünv. Tıp Fakültesi Dergisi. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi, Suppl vol:2, P-40, 2010

8. Dalkılıç N., **Tuncer S.**, Açıkgöz A., Demirel İ. Diyabetik Nöropatinin Erken Tanısında Fast Fourier Transform (FFT)'nin Kullanılabilirliğinin Karşılaştırmalı Araştırılması. Adnan Menderes Ünv. Tıp Fakültesi Dergisi. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi, Suppl vol:2, P-41, 2010.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Burat İ., **Tuncer S.**, Selimoglu MN., Dalkilic N. Kalsiyum Kanal Blokerleri ile Birlikte Sigara Dumanı Maruziyetinin Sinir İyileşmesine Olan Etkisinin Elektrofizyolojik Yöntemlerle İncelenmesi. 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, 25-28 Eylül 2012, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Özet kitapçığı Sayfa:90.

13. Dalkilic N., **Tuncer S**., Acikgoz A. Lidokain ve Deksmedetomidin'nin Sıçan Periferik Siniri İletimi Blokajının Frekans Güç Yoğunluğu ile Karşılaştırılmalı Olarak Araştırılması. 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, 25-28 Eylül 2012, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye, Özet kitapçığı Sayfa:97.

Araştırma Projeleri:

1. Deneysel tip I diyabetin sıçan periferik sinirleri üzerine etkisinin numerik analiz yöntemleri ile incelenmesi, Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu, Yüksek Lisans Tez Projesi, 2006. (Tamamlandı)

2. Alfa Lipoik Asit ve Melatoninin Cisplatin Uygulaması ile Oluşan Nörotoksisitenin Sıçan Periferal Sinir İletimi Hız Dağılımında Sebep Olduğu Değişimler Üzerine Etkisi, 09401099, Yardımcı Araştırıcı, 2009 (Tamamlandı)

3. Periferik Sinir Uyarılabilirlik Özelliklerinin "Treshold Tracking" Yöntemi ile Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu, 10401020, Yardımcı Araştırıcı. 2010 (Tamamlandı)

4. Nörotoksik ajanların sıçan siyatik siniri üzerine elektrofizyolojik etkilerinin numerik analiz yöntemleriyle araştırılması, N.E. Üniversitesi Araştırma Fonu, Yardımcı Araştırıcı. Araştırma Projesi, 2012 (Devam ediyor).