156435

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

PULSLU ELEKTROMANYETİK ALANIN REJENERE OLAN SIÇAN SİYATİK SİNİR DEMETİNDE POTASYUM KANALLARINA ETKİSİNİN SUKROZ-GAP YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Tufan MERT

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail GÜNAY

ADANA-2004

156435

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

PULSLU ELEKTROMANYETİK ALANIN REJENERE OLAN SIÇAN SİYATİK SİNİR DEMETİNDE POTASYUM KANALLARINA ETKİSİNİN SUKROZ-GAP YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Tufan MERT

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail GÜNAY

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
SBE2002 D.18 nolu proje olarak desteklenmiştir

Tez No:

ADANA-2004

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

BİYOFİZİK Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "*Pulslu Elektromanyetik Alanın Rejenere Olan Sıçan Siyatik Sinir Demetinde Potasyum Kanallarına Etkisinin Sukroz-Gap Yöntemi İle İncelenmesi*" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/~~Yüksek Lisans~~ tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi :25/06/2004

Prof. Dr. İsmail GÜNAY
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ayşe DOĞAN
Çukurova Üniversitesi

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Cemil GÖÇMEN
Çukurova Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mustafa EMRE
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 07.07.2004 tarih ve 18/09-5 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sait POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Periferik sinir demetlerinde yaralanma sonrası sinir liflerinin yapısında ve fonksiyonlarında meydana gelebilecek değişikliklere, özel desenli pulslu elektromanyetik alan terapisinin etkili olup olmadığının tartışıldığı bu çalışma, TIBDAM ameliyathanesi, Biyofizik anabilim dalı ve Histoloji anabilim dalı laboratuarlarında gerçekleştirildi.

Tez çalışmasının projelendirilmesinde, deneysel çalışmaların yapılmasında, bulguların analiz ve değerlendirilmesinde, sonuçların tartışılmasında, yorumlanmasında ve teze son şeklinin verilmesinde hiçbir yardımını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. İsmail GÜNAY'a çok teşekkür ederim.

Sıçanların siyatik sinirlerinde yaralanma oluşturulmasına katkısından dolayı Vet. Hek. Y. Kenan DAĞLIOĞLU'na, histolojik çalışmaların yapılmasında ve sonuçların yorumlanmasına büyük emeği geçen sayın Prof. Dr. Sait POLAT'a, tez çalışması boyunca tüm bulguların tartışılmasında ve yorumlanmasında düşünce ve analizleriyle katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Atilla DİKMEN'i saygıyla anarken, sayın Prof. Dr. Ayşe DOĞAN'a ve Doç. Dr Cemil GÖÇMEN'e teşekkür ederim. Çalışmalar sırasında, teknik yardımlarından dolayı Dr. Mustafa GÜVEN'e ve ihtiyaç olduğunda yardımlarını esirgemeyen tüm Biyofizik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm tez çalışması boyunca, kendileri ile birlikte zaman geçirmeyi esirgemek zorunda kaldığım eşim Sevgi, kızım İrem ve oğlum Tayfun'a da gösterdikleri anlayış için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1 Periferik Sinir Sistemi	2
2.2 Periferik Sinir Sisteminde Dejenerasyon ve Rejenerasyon	3
2.3 Pulslu Elektromanyetik Alan	5
2.4 Pulslu Elektromanyetik Alannın Muhtemel Etki Mekanizmaları	7
2.5 Periferik Sinir Sisteminde İyon Kanalları	7
2.5.1 Sodyum Kanalları	8
2.5.2 Potasyum Kanalları	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Deney Hayvanları ve Cerrahi Uygulama	13
3.2 Pulslu Elektromanyetik Alan Uygulaması	14
3.3 Elektrofizyolojik Kayıtlar	14
3.3.1 Siyatik Sinirin Çıkarılması	14
3.3.2 Kullanılan Aletler ve Çözeltiler	15
3.3.3 Sukroz-Gap Kayıtlama Tekniği	15
3.3.4 İletim Hızının Ölçülmesi	16
3.4 Histolojik Çalışmalar	16
3.5 Ölçüm ve Analiz	18
3.5.1 Sukroz-Gap Kayıtları	18
3.5.2 İletim Hızının Ölçülmesi	20

3.6 İstatistiksel Değerlendirme 20
4. BULGULAR 21
4.1. Elektrofizyolojik Bulgular 21
4.1.1. PEMA Uygulanmış ve Uygulanmamış Rejenere Olan Siyatik Sinir Demetlerinde BAP Parametrelerinin ve BMP Değerlerinin Karşılaştırılması 21
4.1.1.1. BAP Genlik-Frekans İlişkisi 22
4.1.1.2. Hiperpolarize Edici Ard Potansiyeller 22
4.1.2. PEMA Uygulanmış ve Uygulanmamış Rejenere Olan Siyatik Sinirlere 4-Ap nin Etkilerinin Karşılaştırılması 24
4.1.2.1 BAP Genlik-Frekans ilişkisi 26
4.1.2.2. Hiperpolarize Edici Ard Potansiyeller 27
4.1.3. PEMA Uygulanmış ve Uygulanmamış Rejenere Olan Sinir Demetlerine TEA nın Etkisi 28
4.1.3.1 BAP Genlik-Frekans İlişkisi 29
4.1.3.2. HAP ların Karşılaştırılması 30
4.1.4. PEMA Uygulanmış ve Uygulanmamış Sinirlerde 4-Ap Uygulaması Sonrasında 4-Ap +TEA nın Etkileri 30
4.1.4.1 HAP ların Karşılaştırılması 34
4.1.5. İletim Hızlarının Karşılaştırılması 36
4.2 Elektron Mikroskobik Bulgular 36
4.2.1 Sağlam (normal) Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi 36
4.2.2 Yaralanmadan Beş Gün Sonra Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi 37
4.2.3 Yaralanmadan On Beş Gün Sonra Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi 40
4.2.4 Yaralanmadan Otuz Sekiz Gün Sonra Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi 41
4.2.5 PEMA'nın Normal (intact) Siyatik Sinirlere Etkisinin Elektron Mikroskobik Olarak İncelenmesi 42

4.2.6 Yaralanma Sonrası On Beş Gün PEMA Uygulanan Siyatik Sinirlerin Elektron Mikroskobik Olarak İncelenmesi 42
4.2.7 Yaralanma Sonrası Otuz Sekiz Gün PEMA Uygulanan Siyatik Sinirlerin Elektron Mikroskobik İncelenmesi 44
5. TARTIŞMA 45
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
7. KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ 59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Periferik sinir demeti 2

Şekil 2.2. Bir nöronun yapısı 2

Şekil 2.3. Bir sinir hücresin de transport 3

Şekil 2.4. Miyelinli bir aksonun yatay kesiti 3

Şekil 2.5. Periferik sinir lifinde dejenerasyon ve rejenerasyon 4

Şekil 2.6. Aksonun rejenerasyonu 5

Şekil 2.7. Helmholtz bobin çiftinde oluşan manyetik alanın akım çizgilerinin yönü ve manyetik alan şiddetini hesaplamakta kullanılan denklem 6

Şekil 2.8. Sistemik olarak uygulanan elektromanyetik alanların iyileşmeyi hızlandırmasındaki muhtemel mekanizmalar. 6

Şekil 2.9. 4-Ap uygulaması sonrasında siyatik sinir demetinde oluşan delayed depolarizasyon 12

Şekil 2.10. Siyatik sinir demetinin 100 Hz lik uyarılma sonucunda meydana getirdiği HAP'ın genliği ve süresi artmaktadır. 12

Şekil 3.1. Operasyon sonrası sıçanların sağ (sağlam sinir) ve sol (yaralanmış sinir) siyatik sinirlerinin çalışma diyagramı. 13

Şekil 3.2. Yaralanacak sinir bölgesinin ortaya çıkarılması 13

Şekil 3.3. Forseps ile sinirde 2 mm lik yaralanma oluşturulması 13

Şekil 3.4. PEMA uygulama sistemi ve uygula ma protokolü 14

Şekil 3.5. Sukroz-gap kayıtlama tekniği. 15

Şekil 3.6. BKAP ların kayıtlanmasıyla iletim hızının ölçülmesinde kullanılan sistemin şematik resmi. 16

Şekil 3.7. Sukroz-gap kayıtları DC olarak yapıldığı zaman BMP ler ve BAP lar aynı anda ölçülebilir. 18

Şekil 3.8. BAP parametreleri 18

Şekil 3.9. 4-Ap uygulaması sonrasında görülen delayed depolarizasyon ve ölçülen parametreleri. 19

Şekil 3.10. 40 ve 100 Hz lik uyarım frekanslarında oluşan HAP ve parametreleri 19

Şekil 3.11. BAP genlik-uyarım frekansı arasındaki ilişkisi tanımlamak için kullanılan örnek kayıtlar. 19

Şekil 3.12. İki farklı noktadan uyarılma sonucu elde edilen BKAP lar ve iletim hızının hesaplanması 20

Şekil 4.1.. O.S 5, 15 ve 38. günlerde BMPler ve BAPlar 22

Şekil 4.2. PEMA uygulanmış ve uygulanmamış O:S 5, 15 ve 38. günlerdeki BAP genliklerine frekansın etkisi 22

Şekil 4.3. O.S 15., 38. gün ve sağlam sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP 23

Şekil 4.4. Yaralanmanın 15. günündeki sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi 24

Şekil 4.5. Yaralanmanın 38. günündeki sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi 25

Şekil 4.6. 30. dakikadaki BAP ve delayed depolarizasyon 25

Şekil 4.7. PEMA altında yaralanmanın 38. günündeki sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi 25

Şekil 4.8. 30. dakikadaki BAP ve delayed depolarizasyon 25

Şekil 4.9 Sağlam sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi 25

Şekil 4.10 30.dakikadaki BAP ve delayed depolarizasyon 25

Şekil 4.11. 4-Ap varlığında PEMA uygulanmış ve uygulanmamış O.S günlerdeki BAP genliklerine frekansın etkisi 26

Şekil 4.12. Yaralanma sonrası 15, 38. günlerdeki ve sağlam sinirlerde 4-Ap varlığında 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lar 28

Şekil 4.13. Yaralanma sonrası PEMA altında 38. gündeki sinirlere 4-Ap uygulandığında 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lar 28

Şekil 4.14. PEMA uygulanmış ve uygulanmamış yaralanma sonrası 5, 15 ve 38. günlerdeki BAP genliklerine 10 mM TEA varlığında uyarım frekansın etkisi 29

Şekil 4.15. Yaralanma sonrası 15. gündeki sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara TEA nın etkisi 31

Şekil 4.16. Yaralanma sonrası 38. gündeki sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara TEA nın etkisi 31

Şekil 4.17. Sağlam sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara TEA nın etkisi 31

Şekil 4.18. Yaralanmanın 38. gününde 4-Ap sonrası 4-Ap+TEA nın etkisi 33

Şekil 4.19. Yaralanmanın 38. gününde PEMA uygulanmış sinirde 4-Ap sonrası 4-Ap+TEA nın etkisi 33

Şekil 4.20. Yaralanmanın 38. gününde 4-Ap sonrası 4-Ap+TEA nın etkisi 33

Şekil 4.21. Yaralanma sonrası 38. gündeki sinirlerde 4-Ap sonrası 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara 4-Ap+TEA nın etkisi 35

Şekil 4.22. Yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış 38. gündeki sinirlerde 4-Ap sonrası 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara 4-Ap+TEA nın etkisi 35

Şekil 4.23. Sağlam sinirlerde 4-Ap sonrası 40 ve 100 Hz te oluşan HAP lara 4-Ap+TEA nın etkisi. 35

Şekil 4.24. Sağlam, yaralanma sonrası 38.gündeki ve yaralanma sonrası 38gün PEMA uygulanmasına maruz kalmış sıçanlardan kayıtlanan BKAPlar ve iletim hız değerleri 36

Şekil 4.25. Sağlam (normal) siyatik sinir ince kesitinde miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıf (MK) ve aksonun normal yapıda olduklar gözlenmektedir. Akson (a), mitokondriyon (m), nörofilamanlar (nf), kollajen lifler (Kol). X 10100 36

Şekil 4.26. Ezilmeyi takiben 5. günde, miyelinli sinir liflerinde (oklar) akson (a) ve miyelin kılıfta (MK) yapısal bozulmalar görülmektedir. Schwann hücrelerinin (SH) sitoplazmasında miyelin kılıf artıkları (ok başları) izlenmektedir. Kollajen lifler (Kol). X5000. 37

Şekil 4.27. Ezilmeyi takiben 5. günde elde edilen siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinde (SH), çekirdekte (Ç) kromatin artışı, çekirdek kılıfında genişleme (oklar) sitoplazmada organel harabiyeti izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde (ok başları) akson (a) ve miyelin kılıfta (MK) dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Ortamda yer alan fibroblastlarda (FB) endoplazmik retikülümde (Er) genişleme ve lipid (L) damlacıklarında artış görülmektedir. Kollajen lifler (Kol). X 6300. 38

Şekil 4.28. Ezilmeyi takiben 15.günde siyatik sinir ince yapısında, bazı Schwann hücrelerinin (SH) sitoplazmasında çok sayıda fagozom (F) gözlenmektedir. Miyelinli (oklar), miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri, akson (a), kollajen lifler (Kol). X10100. 38

Şekil 4.29. Ezilmeyi takiben 15. günde siyatik sinir kesitinde miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri ve Schwann hücreleri (SH) izlenmektedir. Schwann hücre sitoplazmalarında lizozomlar (Li) görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın nispeten normal yapılarını korudukları izlenmekle birlikte, bazı sinir liflerinde (çift oklar) akson ile miyelin kılıf arasında dejeneratif miyelin kılıf artıkları dikkati çekmektedir (*). Akson (a), çekirdek (Ç), kollajen lifler (Kol). X10100. 39

Şekil 4.30. Ezilme sonrası 15. gündeki siyatik sinirlerin elektron mikroskobik incelemesinde, Schwann hücreleri (SH), miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir liflerinin genellikle normal yapıda oldukları görülmektedir. Schwann hücrelerinin çekirdeklerinde (Ç) heterokromatin artışı dikkati çekmektedir. Akson (a), mitokondriyon (m), nörofilaman (nf), kollajen lif (Kol). X 16100. 39

Şekil 4.31. Ezilmeyi takiben 15.günde siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinin (SH) sitoplazmasında mitokondriyonların (m) genişlemesine bağlı vakuolizasyon izlenmektedir. Miyelinli sinir lifinde (ok) miyelin kılıf nispeten normal yapıda izlenmekle beraber, akson (a) içerisinde mitokondriyonlarda (m) genişleme ve yapısal bozukluklar görülmektedir. Fibroblastlarda (FB) lipid (L) artışı dikkati çekmektedir. Endoplazmik Retikülüm (Er), kollajen lifler (Kol). X20000. 39

Şekil 4.32. Ezilmeyi takiben 38.gündeki siyatik sinirlerin ince yapısında, Schwann hücrelerinin (SH) normal yapıda oldukları izlenmektedir. Bazı hücrelerin sitoplazmasında (çift oklar) miyelin kılıf artıkları ve miyelin kılıf lamellerinde (*) ayrışma dikkati çekmektedir. Miyelinli sinir lifleri (oklar), miyelinsiz sinir lifleri (ok başları), miyelin kılıf (MK) akson (a), kollajen lifler (Kol). X12400. 40

Şekil 4.33. Ezilmeyi takiben 38.gündeki siyatik sinirler kesitlerinde, miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında miyelin kılıfta yapısal bozulmalar izlenmektedir (çift oklar). Akson (a), Kollajen lifler (Kol). X12400. 40

Şekil 4.34. Ezilmeyi takiben 38.gündeki siyatik sinirlerin ince yapısında, miyelinli sinir liflerinde (oklar), miyelin kılıf (MK) ve aksonların (a) nispeten normal yapıda oldukları izlenmektedir. Sitoplazmasında, fagozomlar (F) ve lipid (L) damlacıkları bulunan bir fagositik hücre (FH) gözlenmektedir. Kollajen lifler (Kol). X12400. 41

Şekil 4.35. Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücre (SH) sitoplazmalarında lizozomal yapılar (Li) izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında (ok başı) miyelin kılıf hasarı gözlenmekle beraber, miyelin kılıfın (MK) normale yakın olduğu izlenmektedir. Akson (a) ve miyelin kılıf arasında meydana gelen boşluklar dikkati çekmektedir (*). Miyelinsiz sinir liflerinde (çift oklar) Schwann hücresinde (SH) çekirdekte (Ç) heterokromatin artışı, bazı aksonlarda (X) dejenerasyon izlenmektedir. Fibroblastlarda (FB) sitoplazmada lipid (L) damlacıklarında artış dikkati çekmektedir. Kollajen lifler (Kol). X 6300. 42

Şekil 4.36. Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücre sitoplazmaları (SH) miyelin kılıf artıkları izlenmektedir (oklar). Miyelinli sinir liflerinin çoğunda miyelin kılıfın (MK) normal yapıda olduğu izlenmektedir. Akson (a) içerisinde bazı mitokondriyonların (m) genişlediği ve iç membranlarının parçalandığı görülmektedir. Kollajen lifler (Kol). X20000 42

Şekil 4.37. Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinin (SH) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik özellikleri ile normale yakın oldukları izlenmektedir. Fibroblastlarda (FB), sitoplazmada lipid damlacıklarında (Li) artış dikkati çekmektedir. Kollajen lifler (Kol). X6300. 43

Şekil 4.38. Ezilmeyi takiben 38 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinde (SH) miyelinli (oklar) ve miyelinsiz sinir liflerinde (ok başları) normal yapının korunduğu izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında, akson (a) ve miyelin kılıf arasında boşluklar (*) izlenmektedir. Kollajen lifler (Kol). X10100. 43

Şekil 4.39. Ezilmeyi takiben 38 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücreleri (SH) miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri normal yapıda görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında (çift oklar), miyelin kılıfta bozulmalar izlenmektedir. Akson (a), çekirdek (Ç), kollajen lifler (Kol). X8100. 44

Şekil 5.1. Hızlı ve yavaş K^+ kanallarının yerleşimi 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Miyelinli aksonlarda iyon kanalları 10

Çizelge 2.2 Potasyum kanalları ve fonksiyonlar 10

Çizelge 4.1. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası BAP parametreleri ve BMP nin değerleri (ort±SEM). 5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. 21

Çizelge 4.2. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanların siyatik sinirlerinde BAP parametreleri ve BMP nin değerleri (ort±SEM). 5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 21

Çizelge 4.3. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası HAP değerleri (ort±SEM). 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 23

Çizelge 4.4. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanların siyatik sinirlerinde HAP (ort±SEM). 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 23

Çizelge 4.5. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası BAP parametreleri ve BMP ye 4-Ap nin etkisi (ort±SEM). 5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 24

Çizelge 4.6. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanların siyatik sinirlerinde BAP parametreleri ve BMP ye 4-Ap nin etkisi (ort±SEM). 5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 24

Çizelge 4.7. Yaralanma sonrası 38.günde 4-Ap nin etkisiyle oluşan delayed depolarizasyona PEMAnın etkisi. Değerler ort±SEM olarak verilmiştir 26

Çizelge 4.8. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası günlerde 4-Ap uygulamasıyla oluşan HAP değerleri (ort±SEM). 15 ve 38. günlerde HAP genlik değişimlerinin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 27

Çizelge 4.9. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanların siyatik sinirlerinde 4-Ap uygulamasıyla oluşan HAP (ort±SEM). 15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki genlik değişimleri P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 27

Çizelge 4.10. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası BAP parametreleri ve BMP ye TEA nın etkisi BAP parametre değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). 15 ve 38. günlerdeki T_{DE} ve ½RT değişimleri P<0.05 düzeyinde anlamlıdır 28

Çizelge 4.11. Yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalan sinir demetinde BAP parametreleri ve BMP ye TEA nın etkisi BAP parametre değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). 15 ve 38. günlerdeki T_{DE} ve ½RT değişimleri P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. 29

Çizelge 4.12. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası sinirlerin HAP değerlerine TEA nın etkisi. Değerler % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). 15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki HAP genlik değişimleri P< 0.05 düzeyinde anlamlıdır 30

Çizelge 4.13. Yaralanma sonrası BAP parametrelerine ve BMP ye 4-Ap uygulamasının sonrasında 4-Ap+TEA nın etkisi. BAP değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). 15 ve 38. günlerdeki T_{DE}, ½RT ve Y-GEN değişimleri ile BMP nin tüm değerleri arasındaki farklar P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. 32

Çizelge 4.14. Yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalan sinir demetinin BAP parametreleri ve BMP sine 4-Ap uygulamasının sonrasında 4-Ap+TEA nın etkisi. BAP değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). 15 ve 38. günlerdeki tüm BAP parametreleri ve BMP değerleri arasındaki farklar P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. 32

Çizelge 4.15. Yaralanma sonrası PEMA uygulanmış ve uygulanmamış 38.gün ve sağlam sinir demetlerine 4-Ap sonrası oluşan delayed depolarizasyona 4-Ap+TEA nın etkisi. Delayed depolarizasyon değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). 32

Çizelge 4.16. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası sinirlerde 4-Ap sonrası oluşan HAP değerlerine 4-Ap+TEA nın etkisi. Değerler % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). Sağlam, 15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki HAP genlik ve süre değişimleri P<0,05 düzeyinde anlamlıdır. 34

Çizelge 4.17. Yaralanma sonrası PEMA uygulanmış sinirlerde 4-Ap sonrası oluşan HAP değerlerine 4-Ap+TEA nın etkisi. Değerler % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM). Sağlam, 15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki HAP genlik değişimleri P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. 34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4-Ap: 4-Aminopiridin

BAP: Bileşik Aksiyon Potansiyeli

BMP: Bileşik Membran Potansiyeli

HAP: Hiperpolarize edici Ard Potansiyel

O.S: Operasyon Sonrası

PEMA: Pulslu Elektromanyetik Alan

½RT: Yarı-Repolarizasyon Süresi

T_{DE}: Depolarizasyon süresi

TEA: Tetraetilamonyum

$T_{del\text{-}dep}$: Delayed depolarizasyon süresi

T_L: Latans süresi

V_{BAP}: Bileşik Aksiyon Potansiyel genliği

V_{HAP}: Hiperpolarize edici Ard Potansiyel genliği

T_{HAP}: Hiperpolarize edici Ard Potansiyel süresi

$V_{del\text{-}dep}$: Delayed depolarizasyon genliği

Y-GEN: Yarı-Genişlik süresi

ÖZET

Pulslu Elektromanyetik Alanın Rejenere Olan Sıçan Siyatik Sinir Demetinde Potasyum Kanallarına Etkisinin Sukroz-Gap Yöntemi İle İncelenmesi

Periferik sinir sisteminde, sinir yaralamasının ardından yeniden miyelinlenme sinir iletim fonksiyonlarının tam olarak düzelmesi için çok önemlidir. Araştırmalar pulslu elektromanyetik alanın (PEMA) rejenerasyonu hızlandırabileceğini göstermiş, fakat PEMA'nın sinir rejenerasyonunu hızlandırma mekanizması çözümlenememiştir. Bu nedenle, bu çalışmanın esas amacı yaralanma sonrası PEMA etkisinde rejenere olan siyatik sinirlerde elektrofizyolojik ve yapısal değişikliklerin olup olmadığını belirlemektir.

Yaralanma sonrasında sıçan siyatik sinirlerinin elektrofizyolojik fonksiyonlarına iyon kanallarının katkılarını göstermek için sukroz-gap tekniğini kullandık. Yeniden miyelinlenme sırasında ve sonrasında K^+ kanal duyarlılığını belirlemek için 4-Aminopiridinin (Ap) ve Tetraetilamonyum (TEA) kullanıldı. Ayrıca, sinirlerin iletim hızlarını ölçtük ve elektron mikroskobu ile sinirlerdeki yapısal değişiklikleri araştırdık.

Bulgular, PEMA nın sinir rejenerasyonu üzerindeki etkisinin yaralanmadan 38 gün sonra ortaya çıktığını gösterdi. PEMA özellikle 4-Ap'nin etkilerini değiştirdi. Delayed depolarizasyonun genliği düştü, süresi uzadı ve hiperpolarize edici ard potansiyel aktivitesi azaldı. Bunların dışında, PEMA iletim hızında bir artışa neden oldu.

Bu araştırmanın sonuçları, sinirlerin elektriksel iletim özellikleri ile miyelin oluşması arasında çok önemli ilişkinin varlığını gösterdi. Miyelinli bölgelerdeki küçücük hasarlar bile iyon kanallarının fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olabilir. Yaralanma öncesiyle karşılaştırıldığında, rejenere olan sinir liflerinin elektrofizyolojik özellikleri ve yapılarında çeşitli farkların bulunduğu belirlendi. Siniri yaralanmış sıçanlara uzun süreli PEMA uygulandığı zaman, miyelinizasyon sürecinin PEMA tarafından hızlandırılabildiği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Pulslu elektromanyetik alan, Sinir rejenerasyonu, Sinir ezilme yaralanması, Bileşik aksiyon potansiyeli, Sıçan Siyatik sinir

ABSTRACT

Investigation of pulsed electromagnetic fields effects on potassium channels in regenerated rat sciatic nerves by sucrose-gap recording technique

In the peripheral nerve system, remyelination is more important for full restoration of nerve conduction functions following a nerve crush. Investigations have demonstrated that pulsed electromagnetic field (PEMF) can promote regeneration, but the mechanisms of PEMF that stimulates nerve regeneration unresolved. Therefore, the main objective of this work was to determinate whether electrophysiological changes occurring in the regenerating sciatic nerves after injury under the PEMF.

We used sucrose-gap technique to demonstrate the contributions of ion channels in the electrophysiological functions of the rat sciatic nerves after crush injury. 4-Aminopyridine (Ap) and Tetraethylammonium were used to assess K^+ channel sensitivity during after remyelination. In addition, we made the measurements of conduction velocity of nerves and the structural changes in the nerves investigated with electron microscope.

The results showed that the influence of PEMF on nerve regeneration was appeared after 38 days following the injury. PEMF particularly changed the actions of 4-Ap. Namely, amplitude of the delayed depolarization dropped, its duration prolonged and activity of the hyperpolarizing afterpotential decreased. Furthermore, PEMF caused an increase in the conduction velocity.

These results suggest that full axonal myelination more critical for the electrical properties of the nerves. Even minimal damage at myelinated regions can cause significant functions of the ion channels. There are several differences in architecture and electrophysiological properties of regenerating nerve fibers, as compared with the nerves before injury. When PEMF apply to the rat with injured nerve for a long period, the myelination process may be accelerated by PEMF.

Key Words: Pulsed electromagnetic field, Nerve regeneration, Nerve crush injury, Compound action potential, Rat Sciatic nerve.

1. GİRİŞ

Miyelinli liflerin yapısal ve fonksiyonel organizasyonu, demiyelinizasyon bozuklukları içeren birçok hastalığın patofizyolojisini göstermesi açısından çok önemlidir. İnternodal akson zarındaki Na^+ kanallarının yoğunluğu, miyelin kılıfının hasarını takiben sinirde iletim bloğunun olup olmayacağının belirlenmesinde önemli bir bulgudur. Demiyelinizasyonu takiben değişen Na^+ kanal yoğunluğu ve Na^+ kanal biyosentezi ile dağılımından sorumlu olan mekanizmalar halen birçok çalışmaya konu edilmektedir.

Tetraetilamonyum (TEA) duyarlı ve 4-Aminopiridin (4-Ap) duyarlı K^+ kanallarının akson boyunca homojen olarak dağılmamış olması, demiyelinizasyon bozukluklarında ilaç tedavilerinin gelişimi için önemli bir şans olarak değerlendirilebilmektedir. Bir nöropati modeli olan periferik sinir ezilme yaralanması, ezilme bölgesinden distale aksonal dejenerasyona ve daha sonrada sağlam distal sinir kılıfı boyunca rejenerasyona neden olur. Klinik iyileşme ve periferik hedeflerle bağlantının yeniden kurulmasına rağmen, yaralanma sonrasında rejenere olmuş sinir lifleri anormal morfolojik ve fizyolojik özelliklerini uzun süre devam ettirmektedir. Demiyelinizasyon sonrası sıçan siyatik sinirlerinde yapılan voltaj-kenetleme çalışmalarında, 4-Ap duyarlı K^+ iletiminin arttığı gösterilmiştir. Bu özellik, multiple skleroz gibi demiyelinize edici hastalığı olanlarda yapılan klinik çalışmalarda yoğun olarak 4-Ap kullanılmasına neden olmuştur. Ayrıca, nöromüsküler iletim bozukluklarında, 4-Ap nin sinir uçlarında akım yoğunluğunu arttırarak ve nörotransmitter salınmasını artırarak iyileşme etkisi yapabileceği gösterilmiştir. 4-Ap uygulaması sonrasında demiyelinli liflerde iletimin yeniden kurulması, multiple sklerozisli hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, 4-Ap tedavisini takiben nörolojik işaret ve semptomlardaki geçici iyileşmeleri açıklamaktadır. Demiyelinize edici hastalıklar için etkili semptomatik tedavilerin gelişmesine katkıda bulunan bu tür yaklaşımlar, çeşitli K^+ kanal tiplerinin fonksiyonlarını ve katkılarını daha iyi anlayabilmek için gereklidir.

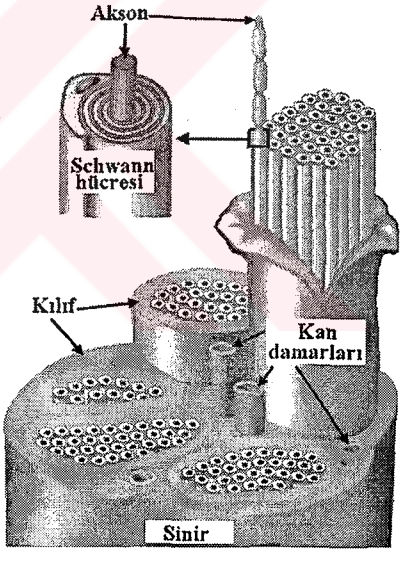
Demiyelinizasyon bozuklukları içeren birçok hastalığın patofizyolojisini göstermesi açısından sinir lifi zarlarının moleküler organizasyonundaki ve iyon kanalları düzeyindeki değişiklikleri belirlemek çok önemlidir. Bu çalışmada, yaralanma

modeli olarak seçilen ezilme tipi yaralanma sonrasında, sıçan siyatik sinirinin dejenerasyon ve rejenerasyon süreçlerinde meydana gelebilecek yapı ve iyon kanalları düzeyindeki bozukluklara PEMA'nın etkisini, elektrofizyolojik (bileşik sinir zar, aksiyon potansiyeli ve iletim hızı ölçümleri) ve histolojik olarak araştırmak amaçlanmıştır. Özellikle, çalışmada K^+ kanal blokörleri (4-Ap ve TEA) kullanılarak, miyelin yapının bozulması ile bu kanalların elektrofizyolojik özelliklerinin nasıl değiştiğini ve PEMA'nın iletime ve miyelin oluşumuna etkilerini belirlemek ana amaç olarak alınmıştır.

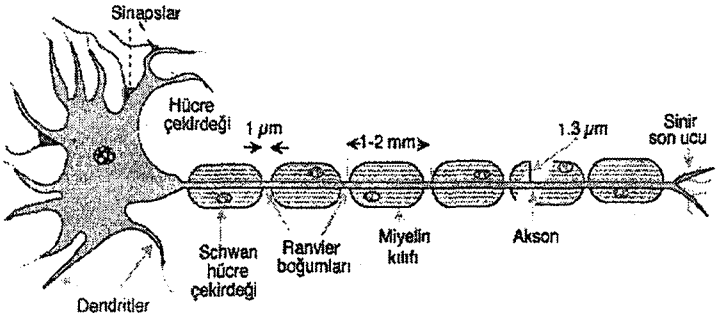
2. GENEL BİLGİ

2.1 Periferik Sinir Sistemi

Gelişmiş hayvanların sinir sistemi, santral sinir sistemi (SSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak ikiye ayrılır. Periferik sinir sistemi kranial sinirler (kafa çiftleri), spinal sinir kökleri, dorsal kök ganglionu, periferik sinirlerin trunkusları ve periferik otonomik sinir sisteminden oluşmaktadır[1]. Ön boynuz hücrelerinden başlayan periferik sinirler kasta sonlanan motor liflere ve periferden medulla spinalise ulaşan duysal liflere sahiptir. Bir periferik sinir olan siyatik sinir; ayak ve bacakların duyu ve hareket sinirlerinin bir araya gelmesiyle oluşan, vücuttaki en kalın sinirdir. Bir dizi kök alarak omuriliğin tabanından çıkar ve pelvisten geçerek uyluğun arkasından devam eder[2]. Memelilerde periferik sinirler, epinöriyum denen fibröz bir zarla sarılmış çok sayıda aksondan meydana gelir (Şekil 2.1)[3]. Yapıları veya işlevlerine göre sinir lifleri farklı şekillerde

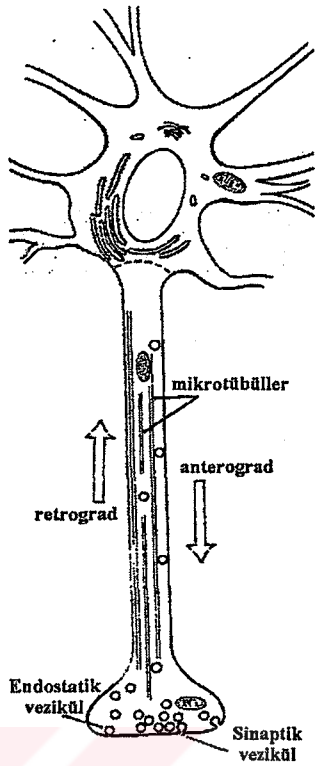


Şekil 2.1. Periferik sinir demeti[1]



Şekil 2.2. Bir nöronun yapısı[4]

sınıflandırılabilmektedir[4]. En önemli morfolojik parametre olan miyelin kılıfının varlığına veya yokluğuna göre sinir lifleri miyelinli ve miyelinsiz olarak ikiye ayrılabilir. Siyatik sinir gibi tipik, karmaşık bir periferik sinir, hem efferent s.C liflerini hem de afferent d.r.C liflerini birlikte içerir[1,4]. PSS de akson, Schwann hücrelerinin bir çok tabakasından oluşmuş bir protein-lipid bileşiği olan miyelin kılıfı ile sarılıdır. Miyelin kılıf, aksonun sonuna kadar, 1-2 mm aralıklarla, ranvier düğümleri dışında aksonu sarar[5] (Şekil 2.2).

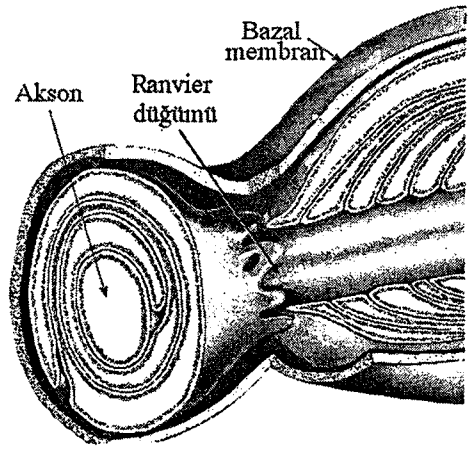


Şekil 2.3. Bir sinir hücresin de transport[1]

Sinir hücreleri, makromolekül ve organelleri hücre gövdesi ile akson terminalleri arasında taşıyan transport sistemine sahiptir. Sinir hücrelerinde salgı yapan bölge, sıklıkla hücre gövdesinden uzakta aksonun sonundadır. Aksonlarda ve sinir uçlarında ribozomlar yoktur ve gerekli proteinin tümü, hücre gövdesinin endoplazmik retikülüm ve Golgi aygıtında sentezlenerek akson boyunca aksoplazmik akım süreci ile sinaptik düğümlere iletilir (anterograd taşınım). Hücre uçlarından hücre gövdesine doğru olan retrograd taşınım da ise, sinaptik veziküller hücre gövdesine geri taşınır ve lizozomlarda depolanır. Uçta endositozla alınan materyalin bir kısmı sinir büyüme faktörleri ve çeşitli viruslar dahil hücre gövdesine geri taşınır [1-5] (Şekil 2.3).

2.2 Periferik Sinir Sisteminde Dejenerasyon ve Rejenerasyon

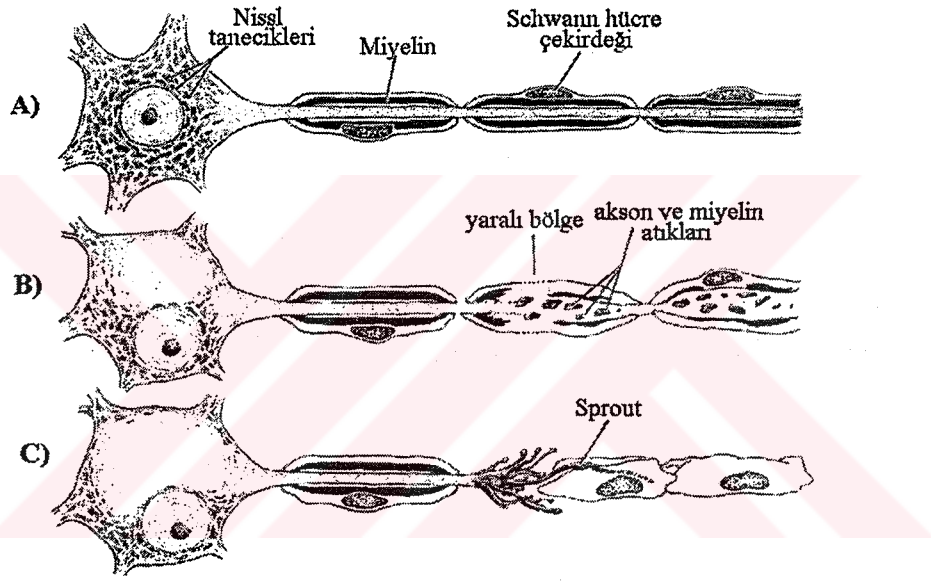
Periferik sinir sistemindeki her bir lif, önemli gerilme direnci olan uzunlamasına yerleşmiş kollajen fibrillerle çevrelenmiştir. Her lifin Schwann hücresi, ekstrasellüler matriks materyalleri ve kendi kollajen tipi olan tip-IV kollajen içeren bir bazal lamina üretir. Bazal lamina içerisinde Schwann hücresinin kendisi, miyelin kılıf ve aksonu vardır [6,7] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Miyelinli bir aksonun yatay kesiti[2]

Akson devamlılığını bozacak derecede ciddi sinir yaralanmaları, lezyon distalinde dejenerasyona neden olur (Wallerian dejenerasyon)[6]. Hücrenin iyileşmesi

veya tamamen ölmesi zedeleyici etkenin şiddet ve süresine bağlıdır. Kısa ve odaksal olarak uygulanan bir miktar basınç aksoplazmanın hücre iskelet elamanlarını sıkıştırır ve akson çapını azaltır. Bu hemen geri dönebilen bir değişikliktir ve distal akson dejenerasyonu ile ilgili değildir. Wallerian dejenerasyon olmaksızın iletim bloğu olan bu tip sinir yaralanması neurapraxia olarak adlandırılır. Daha fazla basınçla akson ve miyelin kılıf kesilerek lezyon bölgesinden ayrılmasına rağmen çevreleyen bazal lamina ve kollajenin devamlılığı sürebilir. Sinir ezilmesi yada donma gibi fiziksel yaralanmayla oluşan bu tip yaralanmalara axonotmesis denir ve lezyon distalinde Wallerian dejenerasyonu gelişir. Bazal laminayı oluşturan ekstrasellüler matriksin devamlılığının



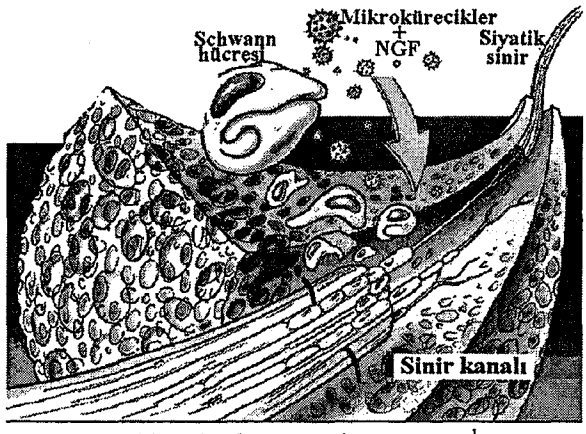
Şekil 2.5. Periferik sinir lifinde dejenerasyon ve rejenerasyon[6]

sürmesi aksonlara rejenerasyon için yol sağlar [3,6].

Yaralanmış nöronlar retrograd kromatolizis ve Wallerian dejenerasyon olarak 2 tip reaksiyon vermektedir[2,6].

Akson hasarlandığında hücrede 1-2 gün içerisinde retrograd chromatolysis başlayarak sonraki 1-2 hafta içinde maxsimum değişiklikler gözlenir. Sinir hücre gövdesi şişer ve yuvarlaklaşır, çekirdek ise şişerek perifere doğru kayar, Nissl cisimcikleri dağılır ve perifere doğru çekilirler. Bu değişiklikler; yaralanmış bölgenin hücre gövdesine olan uzaklığı, yaralanma süresi, yaralanma çeşitleri ve nöron tipi gibi bir çok faktöre bağlıdır. Bazı nöronlar chromotolytic değişiklik göstermezken, bazıları ölüm noktasına kadar dejenere olabilir [3,6,8].

Distal parçanın dejenerasyonunda (Wallerian dejenerasyon) 1. gün akson şişer ve düzensiz bir hal alır. 4. ve 5. günlerde parçalara ayrılır ve yıkıntılar Schwann hücreleri ve makrofajlar tarafından sindirilir. Bir hafta içinde tüm akson ortadan kaldırılır. Ancak miyelin kılıf daha zor parçalanır. Schwann hücrelerinin stoplazmasında lipit damlacıkları belirir. Doku makrofajları, damlacıkları fagosite eder. Eğer aksonda bir rejenerasyon olmaz ise, Schwann hücrelerinin yerini bir süre sonra lokal fibroblastların yaptığı fibröz doku alır [8-11] (Şekil 2.5).



Şekil 2.6. Aksonun rejenerasyonu[1]

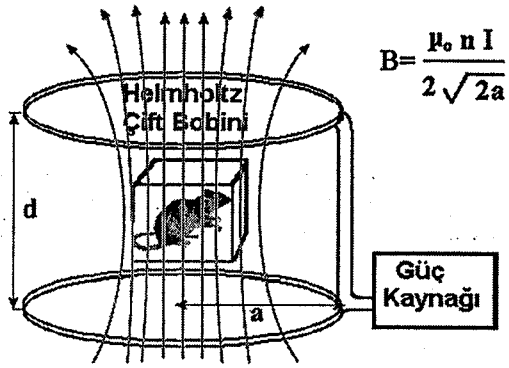
Sinir yaralanması aksonun silindirik yapısını bozar, fakat sağlam olan Schwann hücrelerinin temel zar yapısını (endonöral kılıf) etkilemez. Schwann hücreleri sağlam kalmış olan endonöral kılıf üzerinde çoğalarak dizilirken, aynı zamanda kesik uçlar arasındaki boşluğu da onarırlar. Sağlam olan endonöral tüpler rejenere olan akson dallarına yön gösteren yolakları hazırlar ve akson bu kılıfın içinde perifere doğru ilerleyerek rejenere olabilir. Endonöral kılıf yoksa rejenerasyonda olmaz. Bu kılıflar içinde birçok akson rejenere olarak hedef organlara ulaşır ve kalıcıdır. Bir kısmı ise ulaşamaz ve dejenere olur. Akson bir defa hedef organa ulaşınca Schwann hücreleri, miyelin kılıfı kesik uçtan hedef organa doğru oluşturur [3,6,8-11] (Şekil 2.6).

Fonksiyonel iyileşme ve periferik hedeflerle bağlantının yeniden kurulmasına rağmen, yaralanma sonrasında rejenere olmuş sinir lifleri, anormal morfolojik ve fizyolojik özelliklerini uzun süre devam ettirmektedir[12,13]. İletim özelliği kaybolmuş veya azalmış sinirlerin tekrar normal fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi için uzun yıllardır cerrahi, kimyasal, elektrik ve manyetik alan uygulaması gibi pek çok farklı yöntem uygulanmaktadır.

2.3 Pulslu Elektromanyetik Alan

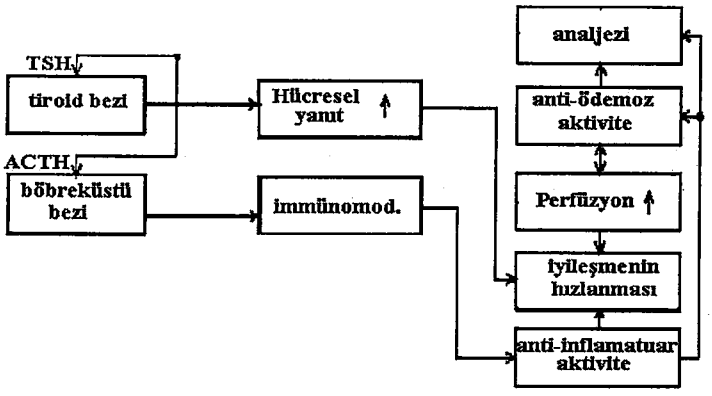
Bir iletken üzerinden geçen elektrik akımının iletken etrafında oluşturduğu elektromanyetik alanın (EMA) şiddeti zamanla değişmiyorsa DC manyetik alan, zamanla değişiyorsa AC manyetik alan olarak tanımlanır.

Manyetik alanlar, 0 Hz ile 10^{22} Hz arasında geniş bir spektruma sahiptir. Dokuda yaptığı tahribata göre ise, EMA'lar, iyonize etmeyen (düşük frekanslı ve düşük şiddetli) ve iyonize eden (x-ışını, gama ışını gibi 10^{15} Hz üzeri yüksek frekanslı EMA'lar) olmak üzere iki grupta toplanmaktadır[14]. Düşük frekanslı iyonize etmeyen pulslu elektromanyetik alanların (PEMA), sinir lifi rejenerasyonunun hızlandırılması amacıyla kullanılabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir[15-17]. Bu çalışmalarda genellikle Helmholtz bobin çifti kullanılarak manyetik alan üretilmiştir. Yarıçapı a olan ve birbirinden d kadar uzaklıkta yerleştirilmiş iki dairesel kangaldan (bobinden) oluşan Helmholtz bobin çiftinin orta noktasında yaklaşık olarak düzgün manyetik alan üretilir. Kangalların arasındaki d uzaklığı kangalların çapına (2a) eşittir (Şekil 2.7). Orta noktada oluşan manyetik alan şekilde gösterilen formül ile hesaplanabilir. Bu formülde geçen $\mu_0=4\pi x10^{-7}$ $N.s^2/C^2$ manyetik geçirgenlik, n her bir kangaldaki sarım sayısı, I kangallardaki akımdır[14]. Düzgün manyetik alan üreten böyle bir sisteme programlanabilir bir sinyal jeneratörü eklenerek değişik frekans modülasyonlu manyetik alanlar üretilebilir.



Şekil 2.7. Helmholtz bobin çiftinde oluşan manyetik alanın akım çizgilerinin yönü ve manyetik alan şiddetini hesaplamakta kullanılan denklem

Sıçanlarla yapılan bu çalışmalarda, manyetik alan uygulamasının yaralanma sonrası sinirdeki rejenerasyonu ve fonksiyonel geri dönüşü hızlandırabileceği bildirilmektedir. Davranış testleri ile yapılan bu çalışmalarda sabit frekanslı pulslu elektro manyetik alanların (PEMA) siyatik sinirin fonksiyonel iyileşmesini yaklaşık %20 hızlandırdığı ileri sürülmektedir[15-17]. Bugüne kadar yapılan



Şekil 2.8. Sistemik olarak uygulanan elektromanyetik alanların iyileşmeyi hızlandırmasındaki muhtemel mekanizmalar[23].

çalışmalarda PEMA uygulamalarında, dokuların etkilenme derecesinin, manyetik alanın şiddetine, frekansına ve süresine bağlı olacağı bildirilmiş, fakat rejenerasyonu nasıl hızlandırdığı ile ilgili bir mekanizma net bir şekilde ortaya konamamıştır[14,18-20].

2.4 PEMA nın Muhtemel Etki Mekanizmaları

Sistemik olarak uygulanan PEMA'nın biyolojik etkilere sahip olduğu ve uygulanan canlının pek çok yaşamsal organ ve dokularını etkilediği bilinmektedir[17]. Tıbbi uygulamalarda kullanılan PEMA'nın yara ve kırık iyileşmelerini arttırdığı, iyileşme ve rehabilitasyon için gerekli süreyi kısalttığı belirlenmiştir. Bu şekilde seçilmiş frekanslı PEMA uygulamalar, pek çok hastanın başarılı bir şekilde tedavi edilmesine katkıda bulunmuştur[18-22]. Sistemik olarak uygulanan manyetik alanın insanda: 1-Hücreler arası iletişimi bozarak, 2-Kalsiyum metabolizmasında meydana getirdiği değişikliklerle hücre büyümesinin modülasyonunu değiştirerek, 3-Onkojenik gen dizilişini aktive ederek, 4-Hormon ve immün sistemi değiştirerek etkili olabileceği ileri sürülmektedir.

Ayrıca yaralanmış sinirlerde yapılan bazı çalışmalarda, PEMA'nın büyüme faktör aktivitesini ve düzeyini etkileyerek, yaralanmanın başında az olan NGF (nöron büyüme faktör) aktivitesini arttırarak rejenerasyonu hızlandırabileceği gösterilmiştir[17,19,21]. Jarabek[23] sistemik olarak uygulanan manyetik alanların etkisini Şekil 2.8'deki gibi olabileceğini ifade etmiştir. Buna göre, manyetik alanlar, tiroid ve böbreküstü bezini etkileyerek immun sistemi module ederek anti-inflamatuar aktivite etkisine sahip olur ve bu etki manyetik alanın (MA) analjezi ve anti-ödematöz aktivite etkilerinin ortaya çıkmasına (polimorf çekirdekli lökositlerin fagositoz aktivitesi artar) neden olarak iyileşmenin hızlanmasına katkıda bulunur. Ayrıca MA'ların tiroid bezlerine etkisi de hücresel yanıtı artırarak iyileşmeyi hızlandırabilir.

2.5 Periferik Sinir Sisteminde İyon Kanalları

Periferik sinir sisteminde elektriksel sinyallerin (aksiyon potansiyelleri) iletiminde (perifere veya merkeze) miyelinli akson yapısı çok önemlidir. Bu sinir liflerinin dejenerasyonu ve rejenerasyonu sırasında ve sonrasında yapılan çalışmalarla, nöronal süreçlerin yürütülmesini sağlayan ve zar içine yerleşmiş çok çeşitli iyon kanalının varlığı gösterilmiştir[5,6,24,25]. Sinir liflerinin tüm fizyolojik özellikleri, bu iyon kanal tiplerinin ve pompaların katkılarını yansıtmaktadır.

Bu konuda şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, periferik sinir sistemindeki miyelinli aksonlarda, aksiyon potansiyel oluşumuna ve ateşleme özelliklerinin belirlenmesine katkıda bulunan çeşitli tipte iyon kanalının olduğu belirlenmiştir. Ligandlar veya mekanik uyarılara seçici cevap veren uyarılabilir zar proteinleri olarak tanımlanan iyon kanalları, hücre zarlarında kesikli olarak çalışan iyon seçici moleküler gözeneklerdir. Kanal yapısını meydana getiren içsel (integral) proteinler, iç çeperleri polar ve yüklü gruplarca sıvanmış içi su dolu gözeneklerden oluşmaktadır[26,27]. Yapılan çalışmalar sonunda, sinir liflerinin miyelinli aksonlarındaki Na^+ kanallarının oldukça homojen fakat K^+ kanallarının daha önce düşünülenden de çok daha kompleks bir yapıya sahip oldukları belirlenmiştir[5,28].

2.5.1 Sodyum Kanalları

Sinir hücre zarlarında yaygın bir şekilde dağılım gösteren, kompleks zar proteinleri olan Na^+ kanalları, aksiyon potansiyelinin oluşmasında ve yayılmasında belirleyici bir rol oynar[26,27].

Voltaj kenetleme, akım kenetleme ve sukroz gap gibi elektrofizyolojik tekniklerle sinir hücreleri, lifleri veya demetlerinde yapılan çalışmalar, miyelinli sinir lifleri boyunca Na^+ kanallarının benzer yapısal ve kinetik özelliklere sahip olduklarını ve benzer işlevler yaptıklarını göstermiştir[26]. Adı geçen bu çalışmalarda, ayrıca birim yüzeydeki Na^+ kanal sayılarının akson boyunca bölgeden bölgeye değiştiği de belirlenmiştir. Na^+ kanalları, Ranvier düğümlerindeki akson zarında oldukça yoğun olarak bulunurken (1300/μm^2), miyelin kılıf altındaki internodal akson zarlarında oldukça düşük yoğunlukta (75-150/μm^2) bulunmaktadır[5,7,27].

Demiyelinli siyatik sinirlerde yapılan çalışmalar, internodal bölgelerdeki Na^+ kanal yoğunluğu ile ilgili tahminler yapılmasına olanak sağlamıştır. Na^+ kanallarının sinir hücresi zarındaki dağılımı göz önüne alındığında, demiyelinizasyonun Na^+ kanal yapısında değişiklik yapmayacağı beklenebilir. Fakat yaralanma sonrasında akson yapısında meydana gelen iletim ve taşınım mekanizmalarının bozulması, akson zarının Na^+ kanal yoğunluğunda değişiklikler oluşturabilir. Lisolesitin kullanılarak demiyelinizasyon (lizolesitin enjeksiyonundan 2-3 hafta sonra) oluşturulan sıçan siyatik sinirlerinde patch-kenetleme yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, tek bir Na^+ kanal iletimi ve Ranvier düğümündeki toplam Na^+ kanal iletimi birlikte ölçülerek,

demiyelinli bir akson zarının 20-25/μm^2 Na^+ kanal yoğunluğuna sahip olabileceği ve bu Na^+ kanal yoğunluğunun aksiyon potansiyel iletimini sağlayabilmek için yeterli olduğu ifade edilmiştir[5,7,26,27].

Periferik sinir sisteminde yapı olarak tek tip Na^+ kanalının varlığından bahsedilirken arka kök ganglionlarında (AKG) ve kutanöz afferent sinir liflerinde yapılan çalışmalarda farmakolojik ve kinetik olarak birbirinden farklı olan en az üç tip Na^+ kanal akımları varlığı gösterilmiştir. kutanöz afferent sinirlerinin özelliklerini göstermek için seçilen sural sinir ve anterior tibial sinirlerde yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda kutanöz afferent nöronların hücre gövdeleri üzerinde kinetik olarak hızlı ve yavaş Na^+ akımlarının bulunduğu belirlenmiştir[29-31].

2.5.2 Potasyum Kanalları

Potasyum kanalları ile yoğun çalışmalara başlanana kadar, sinir liflerinin aksonlarında aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresinde rol alan ve TEA tarafından bloklanan tek tip K^+ kanalının olduğu düşünülmekteydi. Fakat sinir liflerindeki K^+ kanal organizasyonunu ve fonksiyonlarını belirlemek için yapılan elektrofizyolojik çalışmalarla (ligandlarla ve morfolojik işaretleyicilerle) çeşitli tiplerde K^+ kanalının varlığı belirlenmiş olmakla birlikte, bunların bazılarının sinir lifindeki fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır. Voltaj-kenetleme, akson içi kayıt ve sukroz-gap kayıtları ile çeşitli tipte K^+ kanalını bloklayan farmakolojik ajanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda sinir lifi zarında tek tip yapı gösteren Na^+ kanallarına göre, K^+ kanallarının çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonrasında belirlenen potasyum kanallarından bazıları Çizelge 2.1 de gösterilmiştir[27,28,32-34].

Sinir lifi aksonlarındaki yerleşimlerine ve kinetiklerine göre yapılabilecek diğer bir sınıflandırmada Çizelge 2.2 de gösterilmiştir. Özellikle iki farmakolojik ajan olan 4-Ap ve TEA, bu çalışmalarda çok önem kazanmıştır. İlk olarak sıçanların ön ve arka köklerinde, sukroz-gap ve akson içi kayıtlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, iki tip K^+ kanalının olduğu gösterilmiştir. Bunlar; 4 Ap'ye duyarlı yaklaşık 1 ms de aktive olan hızlı K^+ kanalları ve TEA'a duyarlı 10 ms den fazla sürede aktive olan yavaş K^+ kanalları olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra sıçan siyatik siniri gibi periferik sinirlerde de bu kanalların olduğu gösterilmiştir. İn-vivo olarak insan aksonlarında yapılan çalışmalarda da aynı kanalların var olduğu ispatlanmıştır[7,12,35,36].

Çizelge 2.1. Miyelinli aksonlarda iyon kanalları.

Kanal tipi	Bloke eden ajan	Fonksiyonları	Yerleşimi
Na^+	TTX, STX	Aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazı	Nodlarda yüksek internodlarda düşük yoğunlukta
K^+ (hızlı)	4-Ap	Aksiyon potansiyel sonrasında hızlı repolarizasyon (modulate)	İnternod
K^+ (yavaş)	TEA, Ba^{2+}	Düzenlenmiş ardışık uyarımlarda; uzatılmış depolarizasyona yanıt olarak repolarizasyon	Nod

STX:Saksitoksin, TTX: Tetradotoksin

Çizelge 2.2 Potasyum kanalları ve fonksiyonlar

POTASYUM (K^+) KANALLARI			
Voltaj Bağımlı K^+ Kanalları		Diğer K^+ Kanalları	
Gecikmiş düzeltici	"A" akımları	İçeri doğru düzelticiler	Ca bağımlı K^+ kanalları
Temel K^+ akımı	Gecikmiş düzeltici ve diğer K^+ akımları ile birlikte bulunur.		
Zar depolarizasyonu ile iletimi artar, repolarizasyon sonrası exponansiyel olarak kapanır. İnaktivasyonu yavaştır.	Zar depolarizasyonu ile iletimi artar. İlk depolarizasyon sırasında inaktive durumda kalır (~100 ms). Zar potansiyeli civarında aktive olur ve in aktivasyonunu tamamlar.	K^+ girişini takiben hiperpolarizasyonla iletimi artar.	İletim voltaj ve zamana bağlı olarak hücre içine giren Ca a bağlıdır.
Ca, Ba ve TEA bloklar. İyonik seçicilik: Tl > K > Rb > NH_4 >> Na	mM konsantrasyonlarda 4-Ap bloklar. İyonik seçicilik: K >> Na	TEA, Cs ve Ba tarafından bloklanabilir. İyonik seçicilik: Tl > K > Rb > NH_4 >> Na	TEA ve charybdotoxin tarafından bloklanır. İyonik seçicilik: Tl > K > Rb ~ NH_4 >> Na.
Tek kanal iletkenliği:~15-20 pS. Depolarizasyon frekansını ve ateşlenmesini artırır	Tek kanal iletkenliği = 15-20 pS. 4-Ap açılma süresini ve iletimini azaltır.	Tek kanal iletkenliği <20 pS.	Uyarılabilir hücrelerde katkısı vardır.
Fonksiyonları: 1.AP repolarizasyon ve süresine, 2.Refraktör periyoda katkıda bulunur	Fonksiyonları: 1. İlk APnin latansı, 2. Ateşleme hızının düzenlenmesi, 3. AP repolarizasyonu	Fonksiyonları :1.Dinlenim durumunu devam ettirmek, dışarı doğru olan akımları baskılamak, 2.APde uzun platonun devam ettirilmesi. 3.ateşleme frekansının düzenlenmesi	Fonksiyonları : 1. Ca girişini düzenlemek. 2. AP repolarizasyonu. 3. After hiperpolarizasyon. 4.Ateşleme frekansının düzenlenmesi. 5. Spike frekans adaptasyonu. 6. ateşlemenin sona erdirilmesi

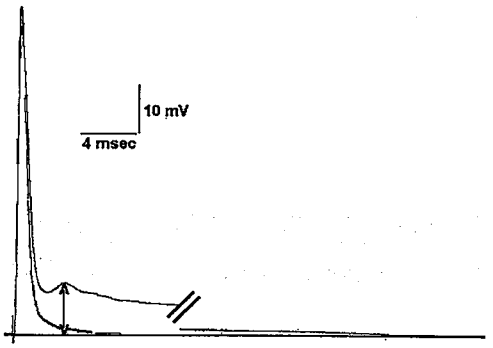
İlk olarak TEA-duyarlı ve kinetik olarak daha yavaş K^+ kanalının varlığı, miyelinli sinir liflerinin akson zarlarında ortaya çıkarılmıştır. TEA daha önceden K^+ kanallarını bloklayan tek farmakolojik ajan olarak bilinmekteydi. Daha sonra yapılan çalışmalarda, TEA'nın kinetik olarak daha yavaş olan K^+ kanallarını blokladığı

belirlenmiş ve bu kanallar, TEA-duyarlı K^+ kanalları olarak anılmaya başlanmıştır. Bu kanallar, sadece aksiyon potansiyel sonrasında repolarizasyona aracılık etmezler, depolarizasyon uzatılarak da aktive edilebilmektedir. Miyelinli sinir liflerindeki yavaş K^+ kanallarının sorumlu olduğu aksiyon potansiyel sonrasındaki hiperpolarize edici ard potansiyeller (pozitif ard potansiyel) TEA a duyarlıdır. Sinir liflerinin yüksek frekanslı uyarımlarında TEA-duyarlı K^+ kanalları aktive olur. TEA duyarlı K^+ kanallarının blokajını takiben, bazı liflerin yüksek frekanslı uyarımlar sonrasında ateşleme eğiliminin arttığı gösterilmiştir. Böylece, yavaş K^+ kanallarının, yüksek frekanslı iletimin düzenlenmesine katkıda bulunduğu ifade edilmiştir[37-40].

Miyelinli sinir liflerinde elektriksel yanıtların hızlı (depolarizasyon) ve yavaş (repolarizasyon) kısımları üzerine TEA'un etkileri, TEA-duyarlı yavaş K^+ kanallarının genel olarak sinir lifi zarlarının Ranvier düğümlerinde yerleştiğini göstermektedir. Eng ve ark.[13], siyatik sinirlerinde TEA-duyarlı hiperpolarize edici ard potansiyelin, yüksek frekans aktivitesi ile ortaya çıktığını ve bunun hem genç hem de yetişkin siyatik sinirlerinde bulunduğunu göstermişlerdir. Yaralanma sonrası, dejenere ve sonrasında rejenere olmuş sıçan siyatik sinirinde yapılan çalışmalarda, TEA duyarlılığının değişmeden devam etmesi yavaş K^+ kanallarının nodlarda yerleştiğinin bir işareti olarak kabul edilmiştir. Sıçan siyatik sinirlerde miyelinizasyonun tamamlanmasından önce ve sonra yapılan voltaj-kenetleme ölçümlerinde, yavaş K^+ kanal yoğunluğunun, internodal aralığa göre nodlarda yaklaşık 30 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir[5,7,13].

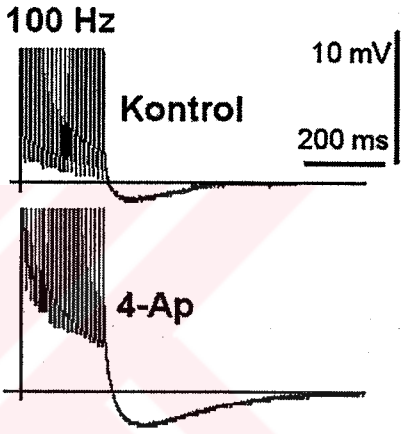
4-Aminopiridin ile yapılan çalışmalarda, aksiyon potansiyelinin süresi üzerine 4-Ap'nin miyelinizasyon öncesi etkisi, miyelinizasyonun tamamlanmasından sonraki etkisinden daha büyük olduğu bulunmuş ve bu bulgu 4-Ap duyarlı K^+ kanallarının internodal bir yerleşim gösterdiğinin önemli bir kanıtı olarak değerlendirilmiştir. Bir nöropati oluşturma modeli olarak seçilen sinirin ezilerek yaralanması sonrasında rejenere olan sıçan siyatik sinir liflerinde yapılan başka bir çalışmada, hücre dışından uygulanan 4-Ap ile K^+ kanallarının blokajını takiben aksiyon potansiyelinin süresini uzatarak gecikmiş repolarizasyon oluşturmuştur[7,31,37,]. Miyelinizasyonun tamamlanmasından sonra, siyatik sinir aksonlarının aksiyon potansiyelleri dışardan uygulan 4-Ap'e daha az duyarlı hale gelir. Bu bulgular, akson zarında 4-Ap duyarlı K^+ kanalların lokalize olduğu bölgelerin miyelin kılıf tarafından örtüldüğünü göstermektedir. Hızlı K^+ kanallarının blokörü olan 4-Ap, sağlam sinir demetlerine

uygulandığında delayed depolarizasyon da denen BAP'ı takiben meydana gelen ikinci depolarizasyon dalgasına neden olmaktadır (Şekil 2.9). 4-Ap etkisinde delayed depolarizasyon oluşumundan hızlı K^+ kanallarının bloklanması sonucu ortaya çıkan yavaş Na^+ akımlarının sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca 4-Ap nin bu bloke edici etkisi Na^+ kanallarının inaktivasyonunu uzattığı da belirlenmiştir[12,13,36,37].



Şekil 2.9. 4-Ap uygulaması sonrasında siyatik sinir demetinde oluşan delayed depolarizasyon (çift yönlü ok)[37]

Sinir demetlerinin yüksek uyarım frekansları ile uyarılmasının (100 Hz gibi), hiperpolarize edici ard potansiyellerin (HAP) ortaya çıkmasına neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 2.10).



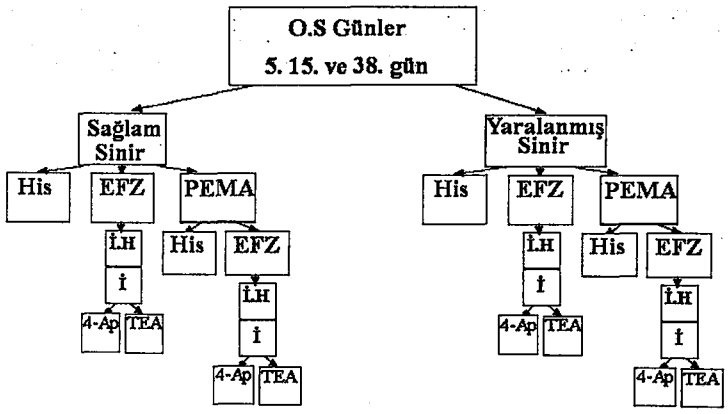
Şekil 2.10. Siyatik sinir demetinin 100 Hz lik pulslarla uyarılması sonucunda meydana gelen HAP'ın genliği ve süresi artmaktadır[37].

Hiperpolarize edici ard potansiyellerin yüksek frekanslı uyarımlara karşı sinirin kendisini koruma veya uyum için geliştirdiği bir oluşumu olduğu düşünülmekte, fakat altında yatan mekanizma için farklı spekülasyonlar yapılmaktadır. HAP oluşumuna Na^+/K^+ATPaz pompasının katkısı göz ardı edilemezken, yavaş K^+ kanallarının, Na^+-bağımlı K^+ iletiminin ve Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanallarının da bu oluşuma katılabileceği ileri sürülmektedir. 4-Ap uygulaması sonrasında HAP'ın genliğinin ve süresinin artmasıyla ilgili olarak ta benzer şekilde tartışmalar yapılmaktadır[12,13,37-41].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

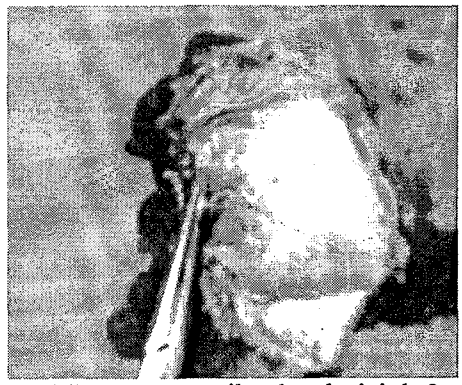
3.1. Deney Hayvanları ve Cerrahi Uygulama

Bu çalışmalarda deney hayvanı olarak 8 haftalıktan büyük, 220-250 gram ağırlıklarında olan dişi Wistar türü sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, Şekil 3.1. de gösterildiği gibi operasyon sonrası (O.S) çalışma günleri olan 5, 15 ve 38. gün olmak üzere 3 alt gruptan oluşturuldu. Her bir sıçandan sağlam sinir (sağ bacak) ve yaralanmış sinir (sol bacak) olarak hazırlanan preparatlar 2 ana gruba ayrıldı. Sağlam ve yaralanmış sinir gruplarının her biri histoloji çalışma grubu (His), elektrofizyoloji çalışma grubu (EFZ) ve pulslu elektromanyetik alan (PEMA) uygulama gruplarına bölündü. PEMA grupları da kendi içinde His ve EFZ gruplarına ayrıldı. EFZ gruplarına ayrılan siyatik sinirlerde önce in-situ olarak iletim hızı (İ.H) ölçümleri yapıldı, ardından da sinire in vitro ortamda 4-Ap ve TEA dan oluşan ilaçlar (İ) uygulandı.



Şekil 3.1. Operasyon sonrası sıçanların sağ (sağlam sinir) ve sol (yaralanmış sinir) siyatik sinirlerinde yapılan çalışmaların diyagramı.

Şekil 3.2. Yaralanacak sinir bölgesinin ortaya çıkarılması



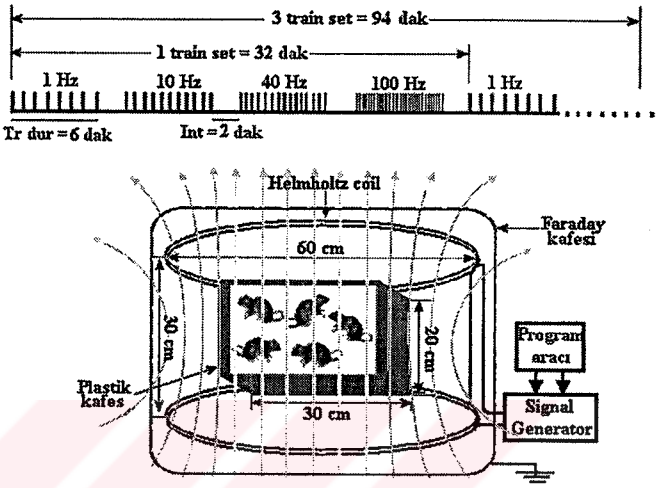
Şekil 3.3. Forseps ile sıkarak sinirde 2 mm lik yaralanma oluşturulması

Yaralanma grubundaki sıçanların sol bacak siyatik sinirlerine yapılan cerrahi işlemler tıbbi bilimler deneysel araştırma merkezi (TIBDAM) ameliyathanesinde, veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirildi. Sıçanlar, intraperitonal olarak ketamin (80 mg/kg), ksilazine (2,5 mg/kg) verilerek anestezi edildi. Aseptik şartlar altında, siyatik sinir orta uyluk düzeyinde yaklaşık 1 cm lik

bir kesi ile ortaya çıkarıldı (Şekil 3.2), sıçan sinirleri, forseps ((Martin; no: 1332414) kullanılarak 30 saniye süre ile ezildi (forseps tam sıkılarak) (Şekil 3.3). Daha sonra, kesi 4.0 ipek sütur kullanılarak kapatıldı.

3.2 Pulslu Elektro Manyetik Alan Uygulaması

Sıçanlara, PEMA özel olarak planlanmış manyetik alan uygulama sistemi ile uygulandı. Pulslu elektromanyetik alan (PEMA) sistemi, dairesel yapıda bir çift Helmholtz bobini ve programlanabilir pulslu bir güç kaynağından oluşturuldu (Şekil 3.4). 1,5 mT şiddetindeki PEMA uygulamasında, her bir puls treni seti, aralarında 2 dakikalık interval bulunan 6 dakikalık 1, 10, 40, 100 Hz lik kare dalga biçimindeki puls trenlerinden oluşturuldu. PEMA uygulama süresi, bir seansta tekrarlanan 3 tren setinden meydana getirildi ve 72 dakika uygulama + 22 dakika susma olmak üzere toplam 94 dakika sürdü. Sıçanlar, her gün yaklaşık aynı saatlerde (9-11 saatleri arasında) plastik bir kafes içerisinde Helmholtz bobinlerinin orta bölümüne konularak, oda sıcaklığında (20-22 °C) manyetik alana maruz bırakıldı.



Şekil 3.4. PEMA uygulama sistemi ve uygulama protokolü

3.3 Elektrofizyolojik Kayıtlar

3.3.1 Siyatik Sinirin Çıkarılması

Cerrahiden sonraki 5, 15 ve 38. günlerde, sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra siyatik sinirleri hızlı bir şekilde çıkartılarak %95 O_2 + %5 CO_2 lik gaz karışımı ile gazlandırılan Krebs çözeltisine yerleştirildi. Sinirin kılıfının soyulmasının (desheathed) ardından sinir demeti aynı çözelti içerisinde yaklaşık 45 dakika bekletildi.

3.3.2 Kullanılan Aletler ve Çözeltiler

Sinirlerin uyarımı ve elektriksel sinyallerin kayıtlanmasında Grass S48 stimulator ve stimulus izolasyon birimi (SIU5), Grass P16 AC/DC mikroelektrot amplifikatörü, Hitachi VC-6523 dijital storage osiloskop kullanıldı. Kayıtlanan sinyaller PC-LAB 818 A/D kartı ile dijitize edilerek bilgisayara aktarıldı. Bileşik aksiyon potansiyel (BAP) üzerindeki ölçüm ve analizlerde AcqKnowledge Software (ACK100W (ACKv3.7.1 for Windows)) yazılımı kullanıldı.

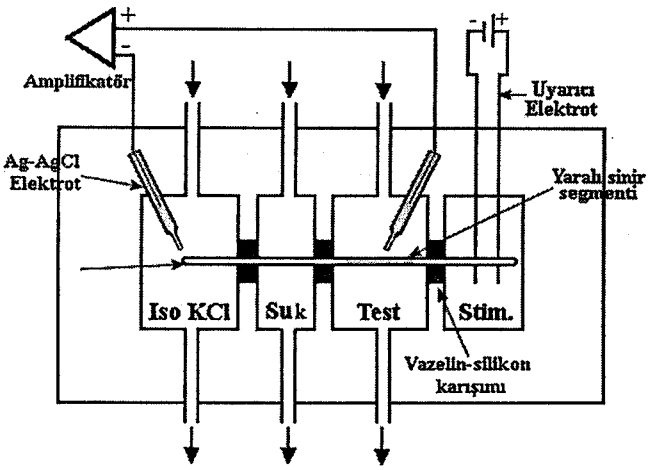
Deneyler sırasında Krebs çözeltisi (mM: 124,0 NaCl, 3,0 KCl, 1,3 NaH_2PO_4, 2,0 Mg Cl_2, 2,0 CaCl2, 26,0 $NaHCO_3$, 10,0 Glukoz), izotonik KCl çözeltisi (mM: 7,0 NaCl, 120,0 KCl, 1,3 NaH_2PO_4, 2,0 $MgCl_2$, 2,0 $CaCl_2$, 26,0 $NaHCO_3$, 10,0 Glukoz) ve izotonik sukroz çözeltisi (320 mM Sukroz) kullanıldı.

Çözeltiler deiyonize ve bidistile su ile hazırlandı ve bütün çözeltiler % 95 O_2 + % 5 CO_2 ile gazlandırıldı. Çözeltilerin pH'ları gerektiğinde NaOH ve HCl kullanılarak 7,4'e ayarlandı.

3.3.3 Sukroz-Gap Kayıtlama Tekniği

Sukroz-gap aparatı (Şekil 3.5): Pleksiglas kullanılarak yapılan sukroz-gap aparatı 4 havuzcuktan oluşmaktadır. A havuzcuğunda; bir çift platin uyarı elektrodu ve krebs çözeltisi, B havuzcuğunda; krebs veya test çözeltisi, C havuzcuğunda; izotonik sukroz, D havuzcuğunda; izotonik KCl bulunmaktadır. Silikon-vazelin (1:1) yağ karışımıyla havuzcuklar birbirinden izole edildi. B ve D havuzcukları arasındaki potansiyel farkı agar-jel Ag-AgCl elektrotlarla ölçüldü. Tüm çözeltiler 1-2 mL/dak hızla perfüze edildi.

Sinir demeti, krebs çözeltisi içerisinde yaklaşık 45 dakika bekletildikten sonra, sinirin yaralı kısmı test bölmesine gelecek şekilde sukroz-gap aparatına yerleştirildi. Yaklaşık 30 dakikalık dengelenme



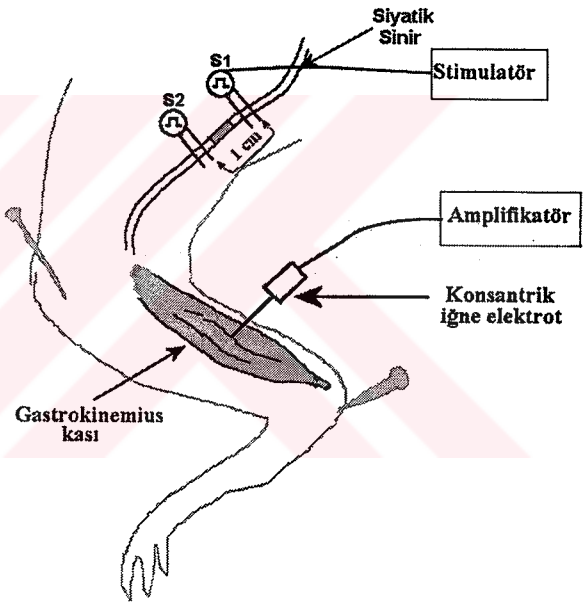
Şekil 3.5. Sukroz-gap kayıtlama tekniğinin şeması[42].

periyodu sonrasında bileşik membran potansiyel (BMP) leri ve BAP lar kayıtlanmaya başlandı. Deneylerde sinir demeti, 50 μs süreli maksimalin 1,5 katı büyüklüğünde elektriksel kare pulslarla uyarıldı. Kontrol kayıtları alınırken (ilaçsız); sinir tonik olarak dakikada bir, tek pulslarla ve fazik olarak tekrarlanan pulslarla (10, 40 ve 100 Hz puls trenleri ile, her trende 20 puls olacak şekilde) uyarıldı[43].

Kontrol kayıtları alındıktan sonra test havuzcuğuna araştırılacak test çözeltisi konuldu ve sinir demeti tonik olarak uyarılarak 30 dakika süresince kayıt alındı. Bu süre sonunda ölçülen BAP, frekansa-bağlı olmayan yanıt (tonik yanıt) olarak değerlendirildi. Daha sonra sinir, fazik olarak yukarıda anlatılan protokole göre uyarıldı ve frekansa-bağlı yanıtlar (fazik yanıt) kayıtlandı.

3.3.4 İletim Hızının Ölçülmesi

Yaralanma sonrası siyatik sinirin iletim hızındaki değişiklikleri belirlemek için düzenlenen bu sistemde (Şekil 3.6), sıçanın bacağı sabitlendikten sonra siyatik sinir ve gastrokinemius kası ortaya çıkarıldı. Siyatik sinir yaralanmış bölgenin proksimalinden (S1) ve distalinden (S2) supramaksimal olarak uyarıldı ve gastrokinemius kasından konsantrik iğne elektrodu ile bileşik kas aksiyon potansiyelleri (BKAP) kayıtlandı.



Şekil 3.6. BKAP ların kayıtlanmasıyla iletim hızının ölçülmesinde kullanılan sistemin şeması.

3.4 Histolojik Çalışmalar

Sıçanlar, ketamin (80 mg/kg), ksilazine (2,5 mg/kg) ile anestezi edildikten sonra göğüs kafesi açılarak kalp ortaya çıkarıldı. Sol ventriküle mavi intraket ile girildi ve sağ kulakçıkta küçük bir insizyon yapıldı. İlk olarak sol ventrikülden 100-150 ml serum fizyolojik gönderilerek sağ kulakçıktan kan gelmesi kesilinceye kadar işleme devam edildi ve ardından aynı işlem yaklaşık 100 mL fiksatif. (Karnowsky solüsyonu) kullanılarak tekrarlandı.

Elektron mikroskobik değerlendirme için siyatik sinirden alınan doku örnekleri hemen Millonig fosfat tamponu (pH:7,4) ile hazırlanmış %5'lik gluteraldehit solüsyonuna yerleştirildi. Bir saat kadar bekletilerek tespit edilen doku parçaları, içinde bir miktar %5'lik gluteraldehit bulunan, dibi dişçi mumu ile kaplanmış petri kutularına alındı. Jilet yardımıyla yaklaşık 1 mm^3 büyüklükte parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar %5'lik gluteraldehit solüsyonuna alınarak üç saat kadar tespit edildi. Böylece dokular toplam dört saat kadar tespit edilmiş oldu. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponuna alınıp 10 dakika çalkalandı, yeniden hazırlanan aynı tampon içerisinde bir gece bekletildi. Dokular ertesi gün Millonig fosfat tamponuyla hazırlanmış %1'lik osmium tetroksit (OsO_4) solüsyonu ile ikinci defa tespit edildikten sonra, Millonig fosfat tamponu ile iki kez onar dakika yıkandı. Tüm bu işlemler buzdolabında +4 °C'de gerçekleştirildi. Dokular daha sonra aşağıdaki sıraya göre dehidrate edildi:

%50 Etil alkolde+4 °C'de 15 dak
%70 Etil alkolde+4 °C'de 15 dak
%86 Etil alkolde+4 °C'de 15 dak
%96 Etil alkolde+4 °C'de 15 dak
%100 Etil alkolde+4 °C'de 10 dak
%100 Etil alkolde+4 °C'de 10 dak
%100 Etil alkolde+4 °C'de 10 dak
Propilen oksitte oda ısısında 15 dak
Propilen oksitte oda ısısında 15 dak

Dehidrate edilen doku parçaları daha sonra aşağıdaki solüsyonlar içerisinde immerse edildi:Bir kısım Propilen oksit + bir kısım gömme materyali: 30 dakika

Bir kısım Propilen oksit + bir kısım gömme materyali: 30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (rezin) bulunan tüplere alındı ve bir gece süre ile rotatorda karıştırıldı.

Gömme Materyali

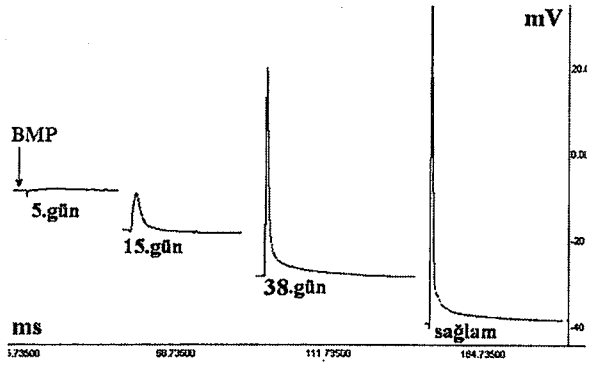
Araldite	CY 212	20 ml
Sertleştirici	HY 964	20 ml
Hızlandırıcı	DY 064	20 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat		1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüller gömüldü ve 60 °C etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Daha sonra elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak yavaş yavaş soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 500 A° kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı ve %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat (Lead sitrat) solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler Zeis E.M. 10 B elektron mikroskobu ile incelendi. Mikrograflar Dupont filmler ile çekildi. Resimler fohar ve fortezo kağıtlarına basıldı. Ayrıca, elektron mikroskop öncesi ultramikrotomda alınan bir mikron kalınlığındaki yarı ince kesitler, toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi ve elektron mikroskobik incelemeler için uygun alanlar belirlendi.

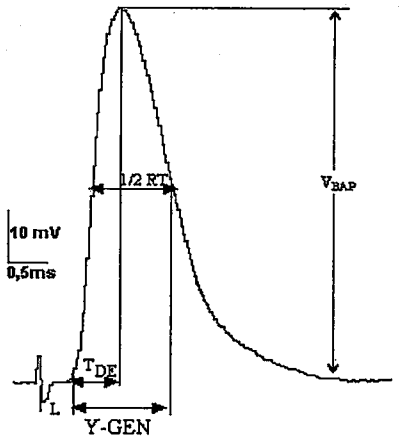
3.5 Ölçüm ve Analiz

3.5.1 Sukroz-Gap Kayıtları

Sukroz-gap kayıtları DC olarak yapılarak hem BMP (DC potansiyeldeki kayma olarak ta değerlendirilebilir) hem de BAP lar aynı anda kayıtlandı (Şekil 3.7). Ölçülen ve değerlendirilen BAP parametreleri Şekil 3.8 de görülmektedir: V_{BAP}; BAP genlik, L: latans, T_{DE} : depolarizasyon zamanı, ½ RT: yarı-repolarizasyon zamanı, Y-GEN: BAP yarı-genişlik süresi. Sinir demetine 4-Ap uygulaması BAP'ı takiben oluşan delayed depolarizasyona neden oldu. Delayed depolarizasyonun genlik ($V_{del-dep}$) ve süre ($T_{del-dep}$) parametreleri Şekil 3.9 da tanımlandığı gibi ölçüldü.



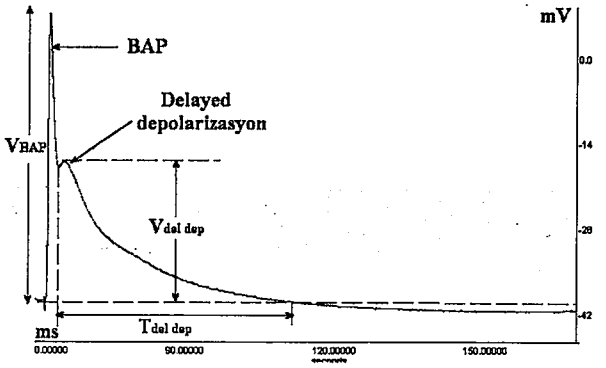
Şekil 3.7. Sukroz-gap kayıtları DC olarak yapıldığı zaman BMP ler ve BAP lar aynı anda ölçülebilir.



Şekil 3.8. BAP parametreleri

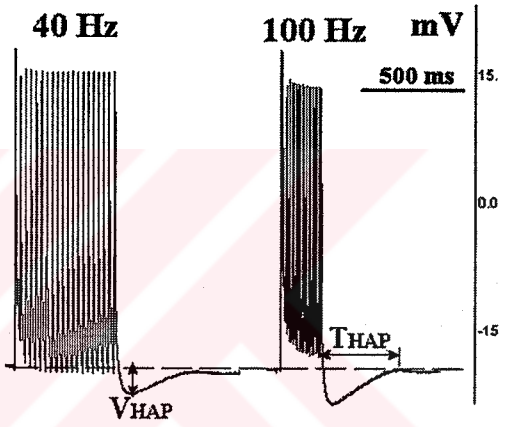
Çoğunlukla yüksek uyarım frekanslarında görülen HAP'ların (Şekil 3.10) genlikleri (V_{HAP}) baseline den daha negatife sapan maksimum değer olarak ölçüldü.

Hiperpolarize edici ard potansiyel süresi (T_{HAP}) ise baseline den sapma ve tekrar dönüş arasında geçen süredir. Bu çalışmada uyarım frekansına bağlı olarak BAP genliğinde meydana gelen değişimler; kontrol değerinin (dinlenim periyodu sonrasında veya 30 dakikalık ilaç uygulaması sonrasında tek bir uyarıyla kaydedilen BAP) normalize edilmesiyle (%100) kontrole göre % değişimler şeklinde gösterildi.

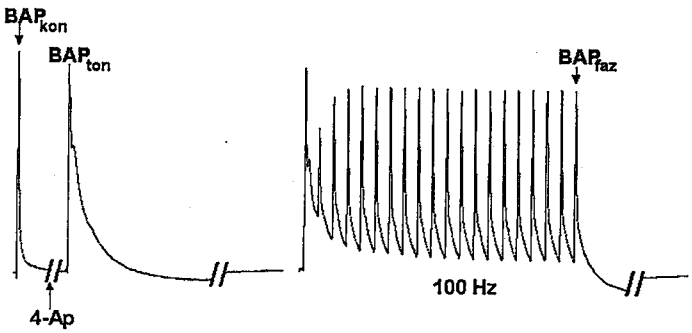


Şekil 3.9. 4-Ap uygulaması sonrasında görülen delayed depolarizasyon ve ölçülen parametreleri.

Tonik etki BAP_{kon} ile BAP_{ton} (30 dak. ilaç uygulanması sonrasındaki BAP) arasındaki değişimlerden, fazik etki BAP_{ton} ile BAP_{faz} (frekans uygulamasında kaydedilen son BAP) arasındaki değişimlerden belirlendi (Şekil 3.11). İlaç uygulamalarında, fazik etkiyi belirlemek için BAP_{ton} değerleri kontrol kabul edildi, böylece uyarım frekansının tonik inhibisyon sonrasında meydana getirdiği ilave inhibisyonlar belirlendi.



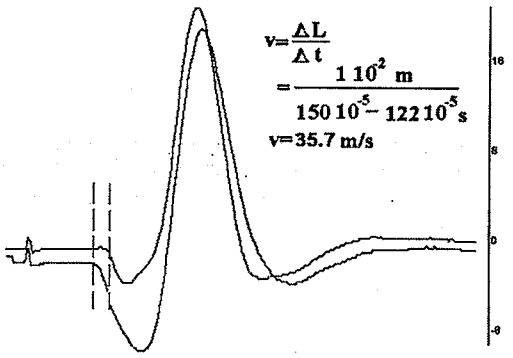
Şekil 3.10. 40 ve 100 Hz lik uyarım frekanslarında oluşan HAP ve parametreleri



Şekil 3.11. BAP genlik-uyarım frekansı arasındaki ilişkiyi tanımlamak için kullanılan örnek kayıtlar. // işareti sürelerin kısaltıldığını göstermek için kullanıldı.

3.5.2 İletim Hızının Ölçülmesi

Siyatik sinirin yaralanmış bölgesinin proksimalinden ve distalinden supramaksimal olarak uyarılması sonunda kayıtlanan BKAP ların latansları ölçüldü ve latanslar arasındaki fark bulundu. Uyarı elektrotları arasındaki uzaklılığın (ΔL) latans farkına (Δt) oranı iletim hızı olarak belirlendi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. İki farklı noktadan uyarılma sonucu elde edilen BKAP lar ve iletim hızının hesaplanması

3.6 İstatistiksel Değerlendirme

Her bir deneysel çalışma grubu için bulunan ortalama değerler ort±SEM (standart hata) olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar Mann-Whitney *U* testi ve Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Önemlilik (anlamlılık) düzeyi $P<0.05$ olarak kabul edildi.

4-BULGULAR

4.1. Elektrofizyolojik Bulgular

4.1.1. Pulslu Elektromanyetik Alan Uygulanmış ve Uygulanmamış Rejenere Olan Siyatik Sinir Demetlerinde Bileşik Aksiyon Potansiyel ve Membran potansiyel Değerlerinin Karşılaştırılması

Yaralanma sonrası normal yaşam ortamında iyileşmeye bırakılan ve iyileşme sürecinde periyodik olarak PEMA uygulamasına maruz bırakılan sıçanların siyatik sinirleri operasyon sonrasındaki (O.S günler) 5, 15, ve 38. günler de çıkarılarak BAP ve BMP değerleri ölçüldü (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Ameliyat sonrası günlerde BAP parametrelerinin ve BMP değerinin anlamlı bir şekilde değiştiği görüldü. BAP'ın genliği (V_{BAP}) artarken süre değerleri giderek küçüldü. BMP değeri de yükseldi (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). PEMA uygulanmış ve uygulanmamış olan iki grubun değerleri (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2) karşılaştırıldı ve yalnız 38 günlük rejenerasyon sonrasındaki BAP ların latansları (T_L) arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($P<0.05$). 38 günlük PEMA uygulaması latansın süresini kısalttı.

Çizelge 4.1. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası BAP parametreleri ve BMP nin değerleri (ort±SEM).

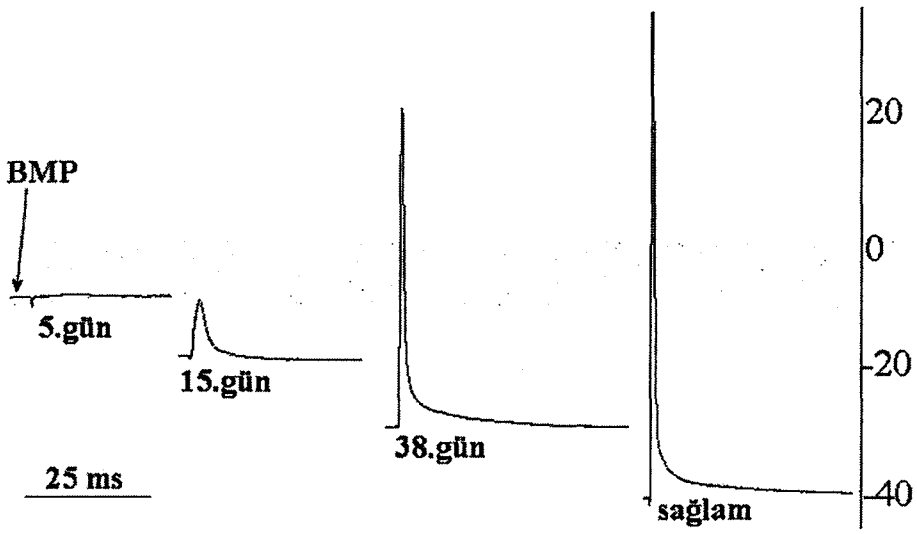
	BAP parametreleri					
O.S Günler	**V_{BAP} (mV)**	**T_L (ms)**	**T_{DE} (ms)**	**½RT (ms)**	**Y-GEN (ms)**	**BMP (mV)**
Sağlam(n=26)	77,5±1,7	0,142±0,01	0,525±0,01	0,525±0,09	0,840±0,05	39,0±0,3
5 (n=8)	0,5±0,01	2,6±0,1	-	-	-	10,0±0,3
15 (n=17)	9,1±0,2	0,385±0,05	1,73±0,30	1,53±0,20	2,31±0,30	20,8±0,5
38 (n=20)	46,6±2,2	0,235±0,07	0,661±0,05	0,537±0,02	0,900±0,02	28,2±0,4

Sağlama göre 5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü $P< 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.2. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanların siyatik sinirlerinde BAP parametreleri ve BMP nin değerleri (ort±SEM).

	BAP parametreleri					PEMA
O.S Günler	**V_{BAP} (mV)**	**T_L (ms)**	**T_{DE} (ms)**	**½RT (ms)**	**Y-GEN (ms)**	**BMP (mV)**
Sağlam(n=14)	74,2±1,9	0,135±0,08	0,490±0,09	0,550±0,02	0,850±0,09	37,0±0,3
5 (n=8)	0,53±0,02	2,54±0,50				9,5±0,2
15 (n=10)	8,5±0,1	0,325±0,05	1,76±0,30	1,47±0,20	2,76±0,20	18,8±0,4
38 (n=18)	51,1±2,4	0,161±0,07	0,721±0,08	0,634±0,02	0,980±0,03	27,8±0,6

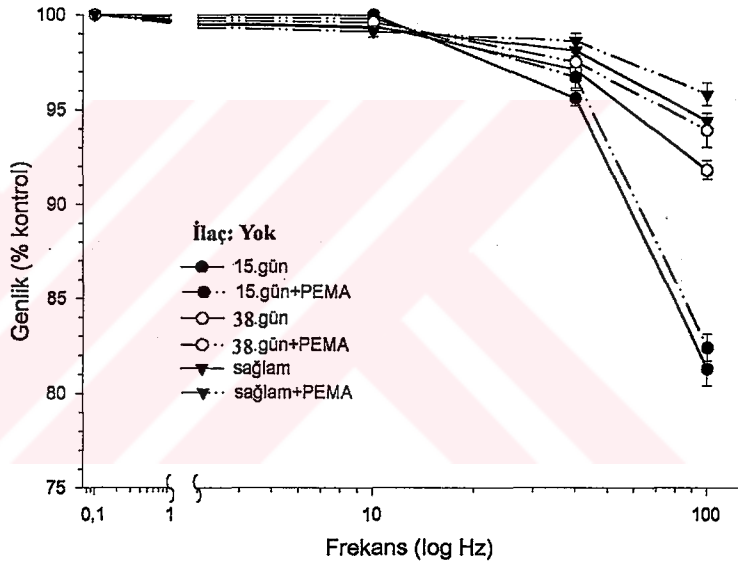
Sağlama göre 5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü $P< 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.



Şekil 4.1.. O.S 5., 15. ve 38. günlerde BMP değerleri ve BAP'lar

4.1.1.1. Bileşik Aksiyon Potansiyeli Genlik-Frekans İlişkisi

Uyarım frekansının artırılması ile sağlam sinir demetlerinde meydana gelen inhibisyonun rejenerasyonun 15. gününde çok daha yüksek olduğu belirlendi. Özellikle 100 Hz lik uyarım frekansında bu farkların çok daha belirgin olduğu Şekil 4.2. de görülmektedir. 15. günde 100 Hz lik uyarım frekansı, genliği %81,3±0,9'a kadar düşürürken, 38. günde bu değer %91,8±0,5 olarak gerçekleşti. PEMA uygulanmış ve uygulanmamış aynı günlerdeki grupların frekansa bağlı genlik inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (P>0,05).

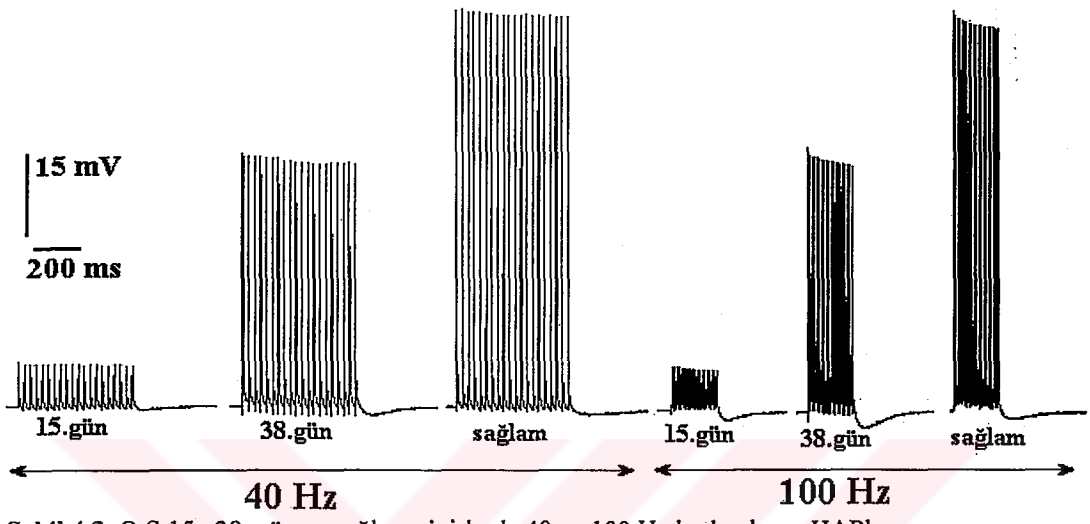


Şekil 4.2. PEMA uygulanmış (kesikli çizgi) ve uygulanmamış O:S 5, 15 ve 38. günlerdeki BAP genliklerine uyarım frekansın etkisi.

4.1.1.2. Hiperpolarize Edici Ard Potansiyeller

Yaralanmanın 15. ve 38. günlerinde tonik uyarımlarda görülen HAP ların genlikleri uyarım frekansının artırılması ile (40 → 100 Hz) artmaktadır (Çizelge 4.3 ve

Şekil 4.3) (P<0,05). HAP ların süreleri ise anlamlı olarak değişmemektedir (P>0,05). Rejenerasyonun 38. günündeki HAP genlik değeri 15. gün değerinin yaklaşık 2 katı iken, süreleri birbirine yakındır (Çizelge 4.3). Yaralanmış sıçanlara PEMA uygulaması HAP değerlerinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı değişikliğe neden olmadı (P>0,05) (Çizelge 4.4).



Şekil 4.3. O.S 15., 38. gün ve sağlam sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAPlar.

Çizelge 4.3. Yaralanma sonrası HAP değerleri (ort±SEM).

	HAP (V (mV) / T (ms))			
O.S.	**Uyarım Frekansı**			
Günler	**0 Hz**	**10 Hz**	**40 Hz**	**100 Hz**
Sağlam	-	-	0,4±0,02/ 180,0±7,0	0,8±0,02/ 220,0±9,0
5	-	-	-	-
15	0,4±0,03/-	0	0,7±0,03/300,0±3,5	1,2±0,04/ 300,0±4,3
38	0,4±0,05/-	0	1,3±0,02/ 250,0±2,8	2,4±0,06/ 200,0±3,7

Sağlam gruba göre 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P< 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.4. Yaralanma sonrası PEMA etkisinde kalmış sıçanların siyatik sinirlerindeki HAP değerleri (ort±SEM).

	HAP (V (mV) / T (ms))			PEMA
O.S	**Uyarım Frekansı**			
Günler	**0 Hz**	**10 Hz**	**40 Hz**	**100 Hz**
Sağlam	-	-	0,5±0,02/ 210,0±7,0	0,8±0,04/ 230,0±9,0
5	-	-	-	-
15	0,6±0,07/-		0,7±0,01/240,0±5	1,4±0,09/260,±5,0
38	0,3±0,08/-	0	1,4±0,06/ 200,0±4,6	2,6±0,6/170,0±3,9

15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P< 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

4.1.2. Pulslu Elektromanyetik Alan Uygulanmış ve Uygulanmamış Rejenere Olan Siyatik Sinirlere 4-Ap nin Etkilerinin Karşılaştırılması

Yaralanma sonrası siyatik sinire in vitro koşullarda 4-Ap uygulanması 5. ve 15. günde BAP genliğini düzeltici yönde etkilerken, 38. günde ve sağlam sinirde çok küçük de olsa genlikte azalma meydana getirdi. 4-Ap BAP'ın süre parametrelerini uzatırken, BMP yi anlamlı olarak değiştirmedi (Çizelge 4.5). PEMA uygulaması BAP'ın V ve T_{DE} ile BMP de bir fark ortaya çıkarmadı. Buna karşın PEMA uygulaması 38. günde ½RT ve Y-GEN parametrelerini anlamlı olarak kısalttı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5. Yaralanma sonrası BAP parametreleri ve BMP ye 4-Ap nin etkisi (ort±SEM).

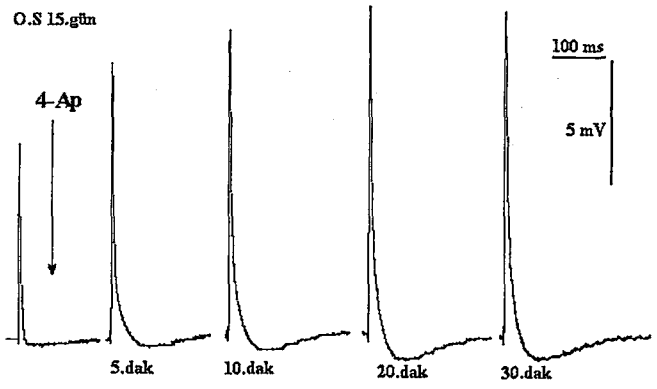
2 mM 4-AP	BAP Parametreleri (% kontrol)				
O.S Günler	V	T_{DE}	½RT	Y-GEN	BMP (mV)
Sağlam(14)	96,5±0,6	99,8±0,5	110,2±0,9	112,5±1,1	44,0±0,9
5 (n=4)	240,0±0,05				11,3±0,4
15 (n=10)	150,0±0,3	189,0±0,7	307,0±0,8	302,0±0,9	23,4±1,0
38 (n=14)	97,2±0,8	104,9±1,5	469,0±1,4	387,0±1,4	33,4±0,8

5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. İlaç uygulama öncesi son BAP kontrol kabul edildi.

Çizelge 4.6. Siyatik sinir demetinde yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanların siyatik sinirlerinde BAP parametreleri ve BMP ye 4-Ap nin etkisi (ort±SEM).

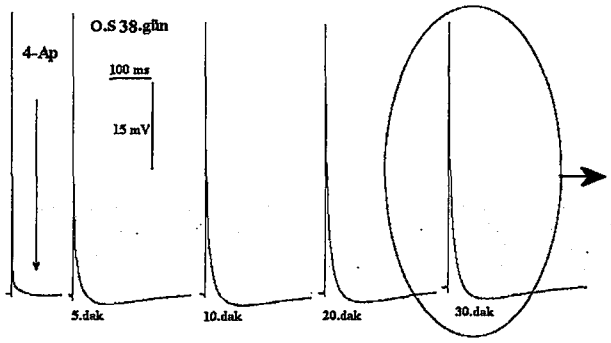
2 mM 4-AP	BAP Parametreleri (% kontrol)				PEMA
O.S Günler	V	T_{DE}	½RT	Y-GEN	BMP (mV)
Sağlam (n=10)	97,4±0,8	100,0±0,2	109,2±0,6	110,8±0,9	43,8±0,3
5 (n=4)	235,0±0,1				13,3±0,7
15 (n=10)	143,0±0,8	192,0±1,1	304,0±1,5	300,0±1,2	19,4±1,0
38 (n=13)	98,4±0,7	103,4±1,3	149,5±3,2	133,5±4,2	34,4±0,6

5, 15 ve 38. günlerdeki değişimlerin tümü P<0.05 düzeyinde anlamlıdır. İlaç uygulama öncesi son BAP kontrol kabul edildi.

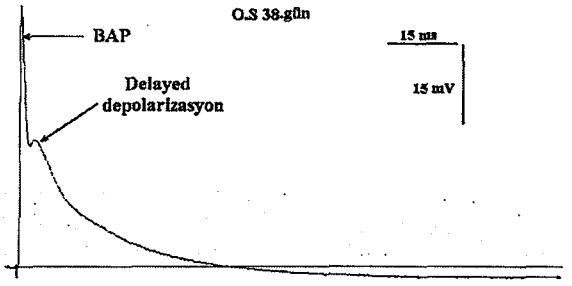


Şekil 4.4. Yaralanmanın 15. gündeki sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi

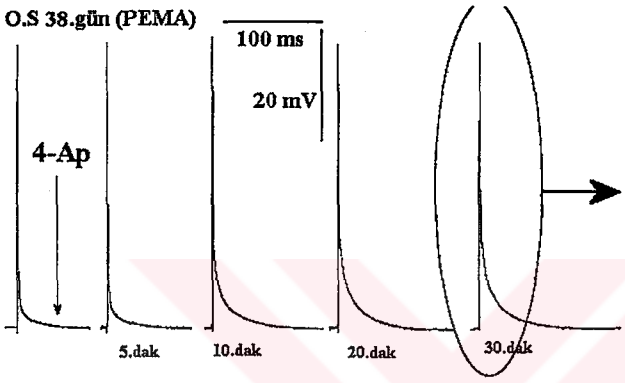
Yaralanmanın 15. gününde sinir demetine 30 dakikalık 4-Ap uygulamasının BAP genliğini artırdığı, süresini uzattığı ve HAP oluşturduğu Şekil 4.4 te görülmektedir. 4-Ap özellikle ilk 20 dakikada çok etkilidir.



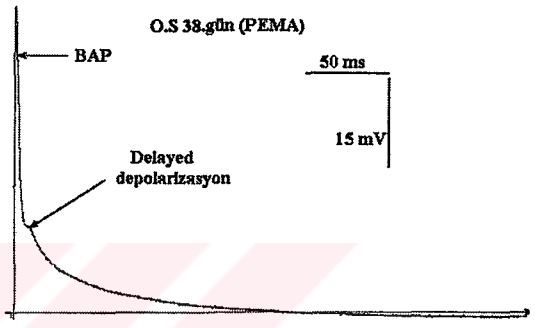
Şekil 4.5. Yaralanmanın 38. günündeki sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi



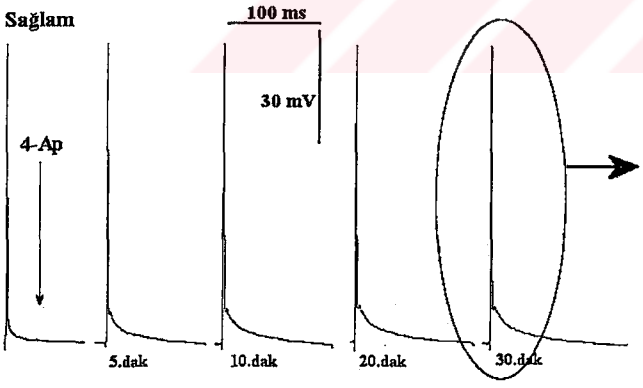
Şekil 4.6. 30. dakikadaki BAP ve delayed depolarizasyon



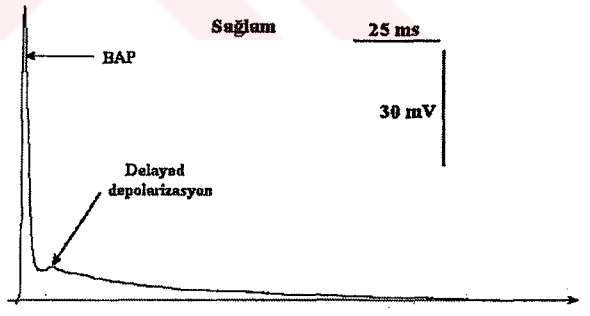
Şekil 4.7. PEMA altında yaralanmanın 38.günündeki sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi



Şekil 4.8. 30. dakikadaki BAP ve delayed depolarizasyon



Şekil 4.9 Sağlam sinir demetine 4-Ap nin 30 dakikalık uygulama süresince etkisi



Şekil 4.10 30. dakikadaki BAP ve delayed depolarizasyon

Yaralanmanın 38. gününde sinir demetine 30 dakikalık 4-Ap uygulamasının BAP genliğini anlamlı olarak değiştirmediği, süresini uzattığı ve HAP oluşturduğu Şekil 4.5 de görülmektedir. 38. gündeki sinire 4-Ap uygulaması normal sinire göre (Şekil 4.9 ve 10, Çizelge 4.7) daha büyük genlikli fakat daha kısa süreli delayed depolarizasyon

oluşumuna neden oldu (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.7). PEMA uygulaması sonrasında delayed depolarizasyonun genliği küçülürken süresi de uzadı (Çizelge 4.7, Şekil 4.7, 8).

Çizelge 4.7. Yaralanma sonrası 38. günde 4-Ap nin etkisiyle oluşan Del-dep'lere PEMAnın etkisi.

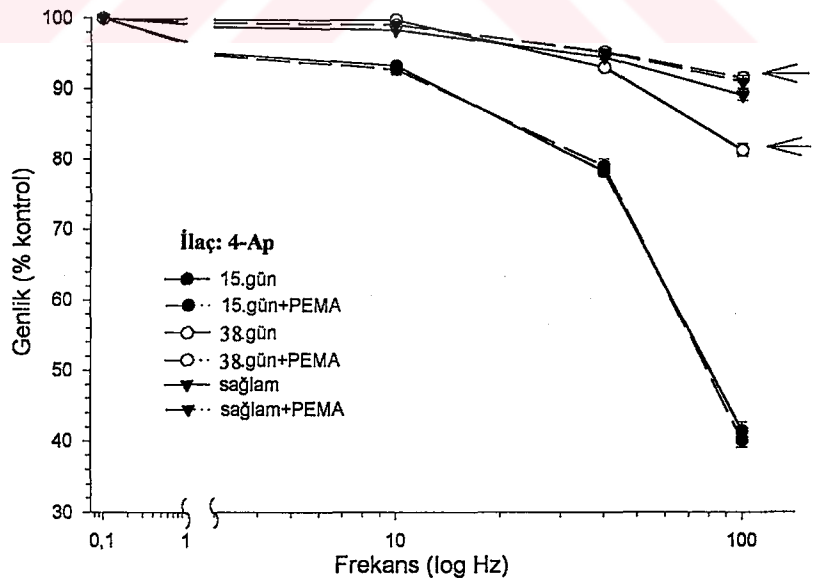
2 mM 4-AP		Del-dep (A_2)		
O.S Günler		A_2		A_2/A_1
		V (mV)	T (ms)	%
Yaralı	sağlam	9,7±0,3	106,0±2,1	12,9±0,4
	38.gün	23,4±1,0	44,2±1,2	52,1±1,4
PEMA	sağlam	9,9±0,2	103,0±2,3	12,7±0,3
	38.gün	12,6±1,1	87,8±3,4	23,5±2,4

Değerler ort±SEM olarak verilmiştir. Yaralı 38. gün ile PEMA 38. gün değerleri birbirinden anlamlı olarak farklıdır. $A_2/A_1 = V_{Del\text{-}dep}/V_{BAP}$

Şekil 4.7,8 ve 9,10 ile Çizelge 4.7 de görüldüğü gibi yaralanmış sinir demetine 38 günlük PEMA uygulaması, 4-Ap nin etkiyle oluşan delayed depolarizasyonun genliğini ve süresini, sağlam sinirdeki değerlerine yaklaştırmaktadır.

4.1.2.1 Bileşik Aksiyon Potansiyeli Genlik-Frekans ilişkisi:

Uyarım frekansının artırılması ile sağlam sinir demetlerinde meydana gelen inhibisyonun yaralanma sonrası iyileşme sürecinde ve özelliklede 15. günde çok daha yüksek olduğu Şekil.4.11 de gösterilmişti. 4-Ap uygulaması hem sağlam sinir hem de yaralı sinirlerde inhibisyonu artırmaktadır. PEMA uygulanmış ve uygulanmamış grupların frekansa bağlı genlik inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında sadece 38.



Şekil 4.11. 4-Ap varlığında PEMA uygulanmış ve uygulanmamış O.S günlerdeki BAP genliklerine frekansın etkisi. Yaralı 38. gün ile PEMA 38. gün arasındaki anlamlı değişimler ok ile gösterilmiştir.

gündeki sinirlerin 100 Hz lik uyarım frekansındaki genlik inhibisyon değerleri (81,4±0,9 ve 91,7±0,7) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu (P<0,05) görüldü. 38 günlük PEMA uygulaması genlik inhibisyonunu sağlam sinirin değerine (91,1±0,9) yaklaştırdı.

4.1.2.2. Hiperpolarize Edici Ard Potansiyeller

Çizelge 4.8. Yaralanma sonrası günlerde 4-Ap uygulamasıyla oluşan HAP değerleri (ort±SEM).

2 mM 4-Ap	HAP (V (mV) / T (ms))			
O.S	Uyarım Frekansı			
Günler	0 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz
Sağlam	0	0	1,4±0,1/400,0±8,3	1,8±0,1/360,0±9,1
5	0	0	0	0
15	1,0±0,03/215,0±4,7	0	1,3±0,05/356,0±3,5	1,8±0,05/357,0±5,3
38	2,2±0,05/275,0±5,2	0	2,5±0,1/335,0±8,2	3,7±0,1/345,0±7,1

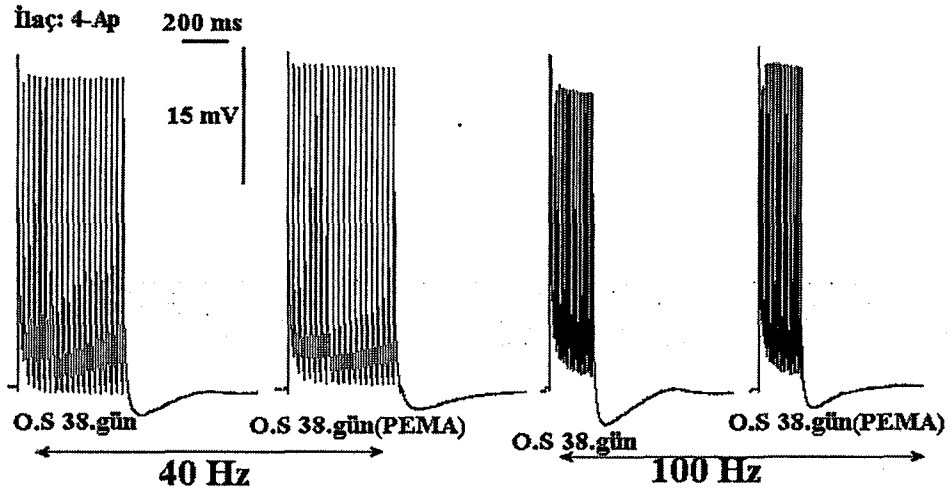
15 ve 38. günlerde HAP genlik değişimleri tümü P< 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

Çizelge 4.9. Yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalmış sıçanlarda 4-Ap uygulamasıyla oluşan HAP (ort±SEM).

2 mM 4-Ap	HAP (V (mV) / T (ms))			PEMA
O.S	Uyarım Frekansı			
Günler	0 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz
Sağlam	0	0	1,3±0,2/400,0±7,8	1,9±0,2/350,0±9,0
5	0	0	0	0
15	1,0±0,03/215,0±4,2	0	1,2±0,1/365,0±4,5	1,6±0,1/360,0±3,0
38	1,0±0,1/320,0±2,3	0	1,8±0,2/365,0±9,2	2,6±0,5/355,0±10,1

15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekanslarındaki HAP genlik değişimleri P< 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

Yaralanmanın 15. ve 38. günlerinde tonik uyarımlar ile 40 ve 10 Hz lik uyarım frekanslarında görülen HAP ların genlikleri ve süreleri 4-Ap uygulaması ile arttı (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.12). Sağlam sinirde de aynı etkiler görüldü. PEMA uygulaması sadece 38. gün deki HAP'ın genliğini anlamlı olarak azalttı (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.13) (P<0,05).



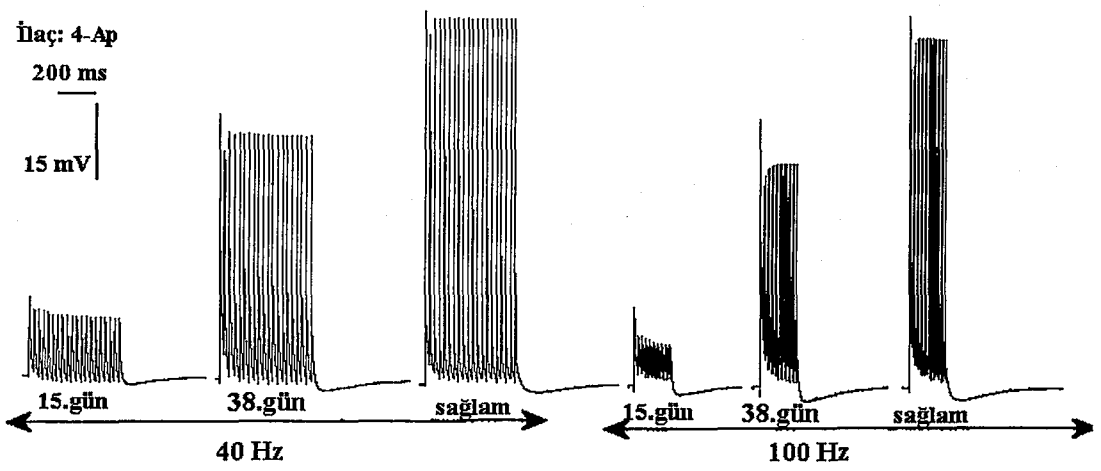
Şekil 4.13. Yaralanma sonrası PEMA altında 38. gündeki sinirlere 4-Ap uygulandığı zaman 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lar.

4.1.3. Pulslu Elektromanyetik Alan Uygulanmış ve Uygulanmamış Rejenere Olan Sinir Demetlerine Tetraetilamonyumun Etkisi

Çizelge 4.10. Yaralanma sonrası BAP parametreleri ve BMP ye TEA nın etkisi. BAP parametre değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

10 mM TEA	BAP Parametreleri (% kontrol)				
O.S Günler	V	T_{DE}	½RT	Y-GEN	BMP (mV)
Sağlam (8)	91,9±0,6	100,0±0,02	109,8±0,8	105,1±0,8	41,0±0,6
5 (n=4)	100,0±0,01				11,3±0,4
15 (n=6)	89,4±1,6	90,1±0,5	103,9±0,9	107,3±1,1	19,8±1,0
38 (n=6)	90,1±0,3	104,8±0,5	112,9±1,1	107,7±0,6	32,6±0,8

15 ve 38. günlerdeki T_{DE} ve ½RT değişimleri $P<0.05$ düzeyinde anlamlıdır. İlaç uygulama öncesindeki son BAP parametreleri kontrol kabul edildi.



Şekil 4.12. Yaralanma sonrası 15, 38. günlerdeki ve sağlam sinirlerde 4-Ap varlığında 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lar

Çizelge 4.11. Yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalan sinirde BAP parametreleri ve BMP ye TEA nın etkisi. BAP parametre değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

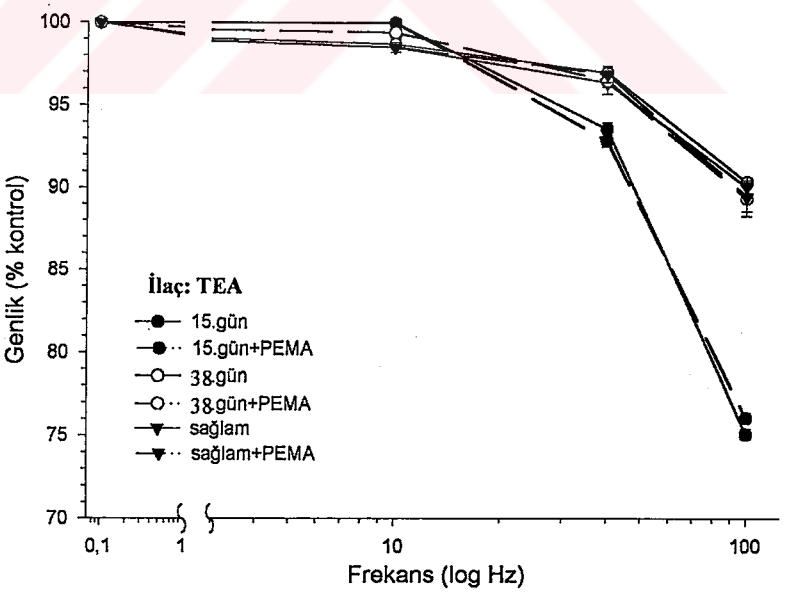
10 mM TEA	BAP Parametreleri (% kontrol)				PEMA
O.S Günler	V_{BAP}	T_{DE}	½RT	Y-GEN	BMP (mV)
Sağlam(n=4)	92,5±0,6	100,0±0,2	119,2±1,1	104,8±0,9	41,7±1,3
5 (n=4)	100,0±0,1				10,8±0,5
15 (n=5)	88,8±1,6	91,1±0,5	102,7±0,8	106,3±1,0	17,8±0,9
38 (n=5)	89,3±0,9	99,2±1,1	108,0±0,9	106,5±1,0	32,4±0,7

15 ve 38. günlerdeki T_{DE} ve ½RT değişimleri $P<0.05$ düzeyinde anlamlıdır. İlaç uygulama öncesindeki son BAP parametreleri kontrol kabul edildi.

Yaralanma sonrası sinirlere 30 dakikalık in vitro 10 mM TEA uygulaması 5. gün sinirlerinde bir değişiklik oluşturmazken, 15 ile 38. günlerde ve sağlam sinirlerde yaklaşık aynı değerde genlik inhibisyonuna neden oldu. TEA, 15. günde T_{DE} yi kısaltırken, 38. günde uzattı. 38. günde ½RT parametresi TEA nın etkisiyle daha fazla uzadı (Çizelge 4.10). PEMA uygulaması herhangi bir anlamlı değişikliğe neden olmadı (Çizelge 4.11).

4.1.3.1 Bileşik Aksiyon Potansiyel Genlik-Frekans İlişkisi:

Şekil 4.2 de ilaçsız ortamda uyarım frekansının etkisi ile meydana gelen inhibisyonlar, TEA varlığında çok yükseldi. 15. günde ilaçsız ortamda 100 Hz lik uyarım frekansı genliği %81,3±0,9'a kadar düşürürken, TEA varlığında bu değer 75,1±0,3 e kadar düştü. 15. günde oluşan bu inhibisyon değeri, aralarında anlamlı fark olmayan 38. gün (90,4±0,6) ve sağlam grup (90,1±0,9) değerine göre oldukça düşüktür. PEMA uygulamasının bu inhibisyon değerlerinde herhangi bir anlamlı değişikliğe neden olmadığı bulundu (Şek 4.14) .



Şekil 4.14. Yaralanma sonrası PEMA uygulanmış ve uygulanmamış 5, 15 ve 38. günlerdeki sinirlerin BAP genliklerine 10 mM TEA varlığında uyarım frekansın etkisi

4.1.3.2. Hiperpolarize Edici Ard Potansiyellerin Karşılaştırılması

15, 38. gün ve sağlam sinir gruplarında oluşan HAP lara 10 mM TEA nın etkisi birbirinden farklıdır (Çizelge 4.12). 15. gün de genliği sadece 100 Hz te küçültürken, süreyi hem 40 hem de 100 Hz te uzatmaktadır (Şekil 4.15). 38. günde genliği yarı yarıya azaltırken, süreyi 15. gündeki kadar uzatmıştır (Şekil 4.16). Sağlam sinirde ise tam inhibisyon oluşturdu (Şekil 4.17). PEMA uygulaması bu değerlerde herhangi bir değişikliğe neden olmadı.

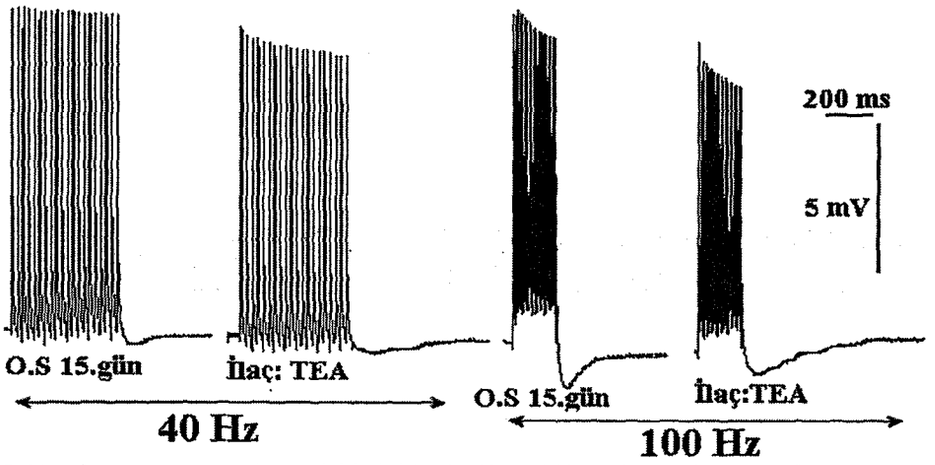
Çizelge 4.12. Yaralanma sonrası sinirlerin HAP değerlerine TEA nın etkisi. Değerler % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM)..

10 mM TEA	**HAP (V (mV) /T (ms) ; % Kontrol)**			
O.S	**Uyarım Frekansı (% Kontrol)**			
Günler	**0 Hz**	**10 Hz**	**40 Hz**	**100 Hz**
Sağlam	0	0	0	0
5	0	0	0	0
15	0	0	100,0±0,1/215,0±7,2	90,0±0,8/297,0±6,3
38	0	0	50,0±0,1/224,0±8,3	50,0±0,1/244,0±3,1

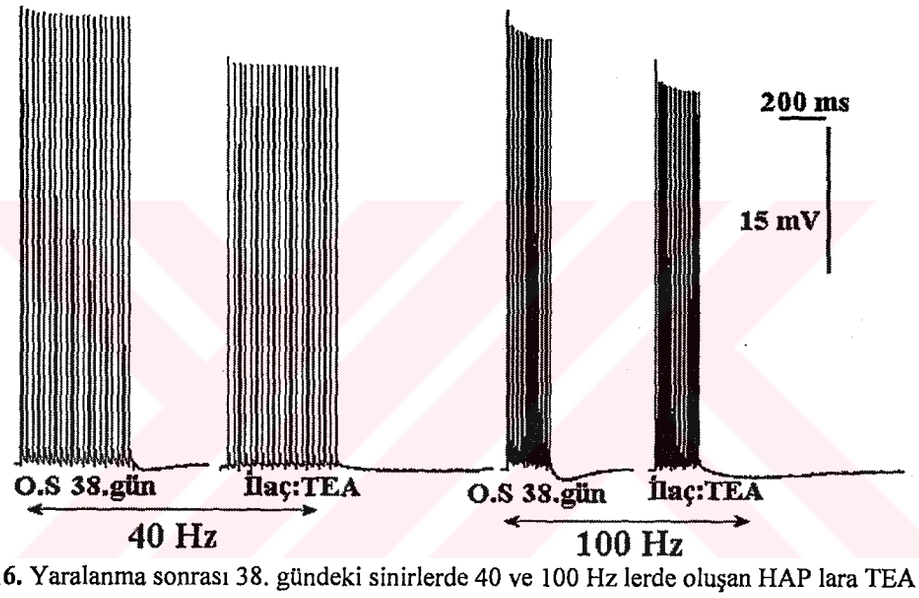
15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki HAP genlik değişimleri $P< 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. İlaç uygulama öncesindeki son HAP kontrol kabul edildi

4.1.4. Pulslu Elektromanyetik Alan Uygulanmış ve Uygulanmamış Sinirlerde 4-AP Uygulaması Sonrasında 4-Ap +TEA nın Etkileri

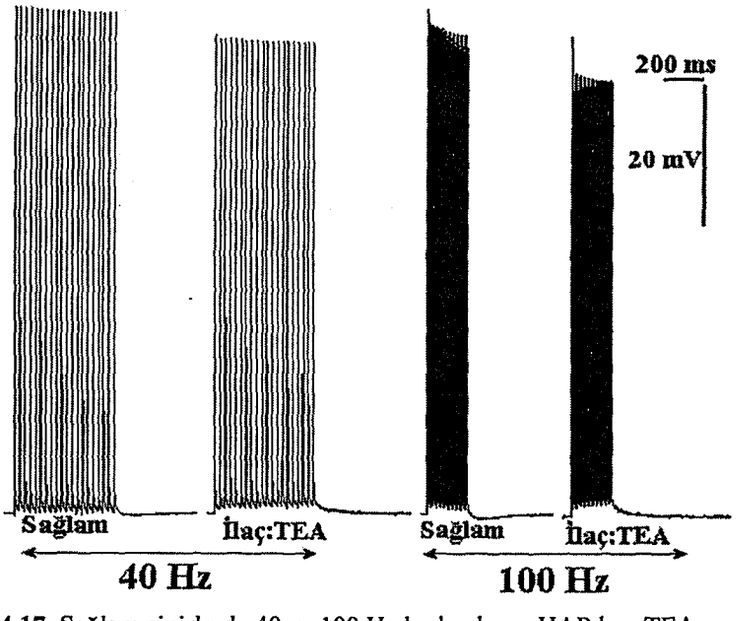
4-Aminopiridin uygulaması sonrası 4-Ap+TEA tüm grupların BAP genliğinde ilave inhibisyon meydana getirdi. 4-Ap+TEA BAP süre parametrelerini sağlam sinirde değiştirmezken, 15. günde daha etkili olmak üzere hem 15 hem de 38. günde uzattı. BMP değerinde ise ilave bir değişiklik meydana gelmedi (Çizelge 4.13). PEMA uygulaması 38. gün BAP'ın genlik, ½RT ve Y-GEN parametrelerinde anlamlı ($P<0,05$) olarak fark oluşturdu. PEMA uygulaması genlik inhibisyon değerini azaltırken, yarı repolarizasyon ve yarı genişlik süresindeki uzamayı da azalttı (Çizelge 4.14).



Şekil 4.15. Yaralanma sonrası 15. gündeki sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara TEA nın etkisi



Şekil 4.16. Yaralanma sonrası 38. gündeki sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara TEA nın etkisi



Şekil 4.17. Sağlam sinirlerde 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara TEA nın etkisi

4-Ap uygulaması sonrasında 38. gün ve sağlam sinirlerde meydana gelen delayed depolarizasyonun genliği (Çizelge 4.7) 4-Ap+TEA sonrasında bir miktar inhibe olurken, süresi çok fazla uzamaktadır (Çizelge 4.15 Şekil 4.18 ve 20). PEMA uygulaması sağlam sinir değerlerinde değişiklik oluşturmazken, 38. günde delayed depolarizasyonun süresinde meydana gelen uzama yaklaşık sağlam sinirdeki kadar olmaktadır (Şekil 4.18, 19 ve 20). A_2/A_1 oranı da PEMA uygulanmış grupta, sağlam sinir değerine yaklaşmaktadır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.13. Yaralanma sonrası BAP parametrelerine ve BMP ye 4-Ap uygulaması sonrasında TEA nın etkisi. BAP değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

2 mM 4-Ap+10 mM TEA	BAP Parametreleri (% kontrol)				
O.S Günler	**V_{BAP}**	**T_{DE}**	**½RT**	**Y-GEN**	**BMP (mV)**
Sağlam (n=5)	81,5±1,1	100,0±0,1	99,0±0,5	98,7±0,6	40,1±1,1
5 (n=5)	0,2				13,3±0,7
15 (n=5)	76,2±1,4	143,4±5,9	260,0±9,0	242,0±11,0	18,0±0,9
38 (n=5)	73,1±1,3	103,5±0,2	202,8±3,4	193,0±3,2	30,4±0,9

15 ve 38. günlerdeki T_{DE}, ½RT ve Y-GEN değişimleri ile BMP nin tüm değerleri arasındaki farklar $P<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 4-Ap değerleri kontrol kabul edildi.

Çizelge 4.14. Yaralanma sonrası PEMA uygulamasına maruz kalan sinirlerin BAP ve BMP sine 4-Ap sonrası TEA nın etkisi. BAP değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

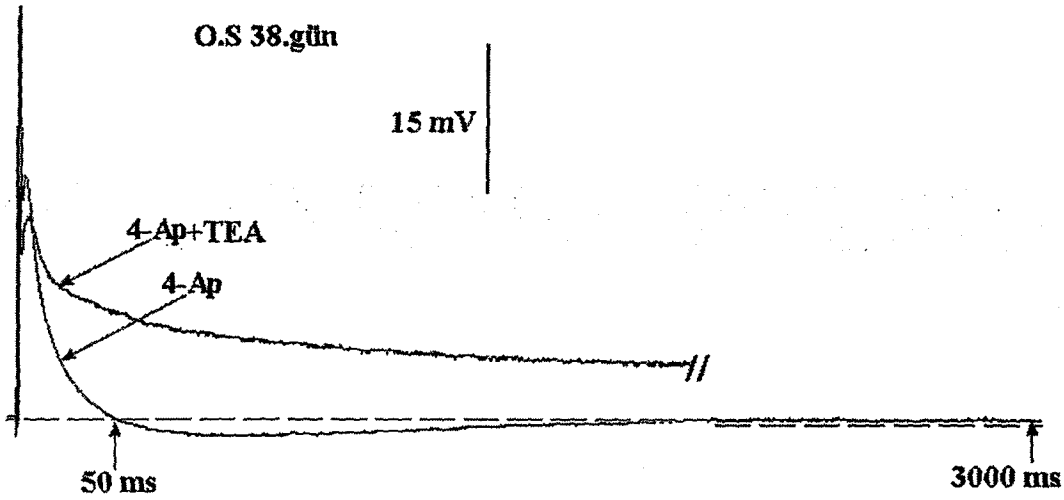
2 mM 4-Ap+10 mM TEA	BAP Parametreleri (% kontrol)				PEMA
	BAP Parametreleri (% kontrol)				BMP
O.S Günler	**V_{BAP}**	**T_{DE}**	**½RT**	**Y-GEN**	**(mV)**
Sağlam (n=5)	82,8±0,9	100,0±0,2	98,2±1,4	99,1±0,9	39,4±0,3
5 (n=5)	0,2±0,1				12,8±0,8
15 (n=5)	75,0±1,6	139,0±6,5	257,0±8,2	245,0±10,0	17,8±1,0
38 (n=5)	83,7±1,7	100,0±0,5	115,0±1,9	108,0±1,2	31,0±1,1

15 ve 38. günlerdeki tüm BAP parametreleri ve BMP değerleri arasındaki farklar $P<0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 4-Ap değerleri kontrol kabul edildi.

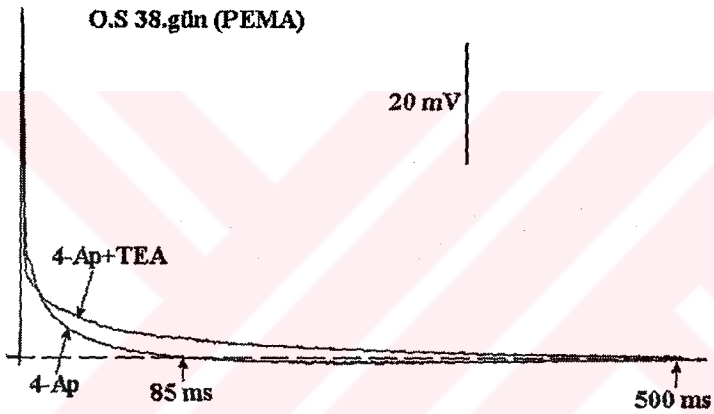
Çizelge 4.15. Yaralanma sonrası PEMA uygulanmış ve uygulanmamış 38. gün ve sağlam sinir demetlerinde 4-Ap sonrası oluşan Del-dep'e TEA nın etkisi. Del-dep değerleri % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

2 mM 4-Ap+10 mM TEA		Del-dep (A_2)		
O.S Günler		A_2 (% kontrol)		A_2/A_1
		$V_{Del\ Dep}$	**$T_{Del\ Dep}$**	**%**
Yaralı	**sağlam**	85,0±1,6	300,0±2,1	13,2±1,4
	38.gün	80,0±1,4	6000,0±0,7	61,8±1,6
PEMA	**sağlam**	82,0±1,2	500,0±2,3	12,9±0,9
	38 gün	84,6±1,9	550,0±1,6	18,5±1,4

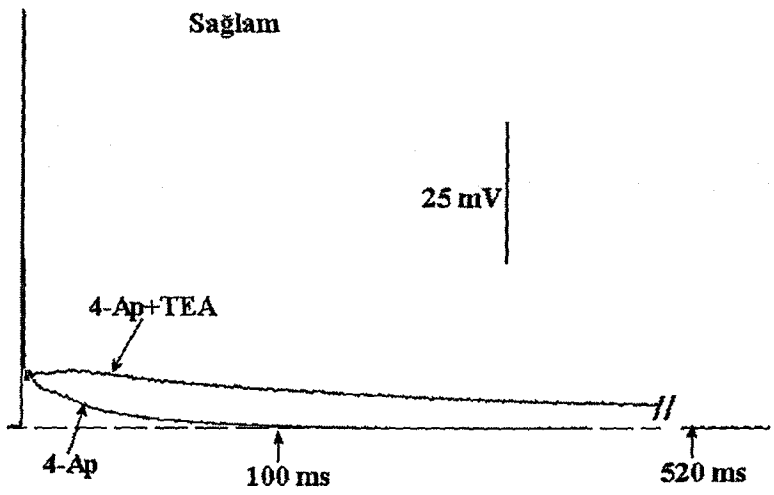
4-Ap değerleri kontrol kabul edildi. $A_2/A_1 = V_{Del\text{-}dep}/V_{BAP}$. Yaralı 38. gün ve PEMA 38. gün gruplarının Del-dep süresi (T) ve A_2/A_1 oranı birbirinden farklıdır ($P<0,05$).



Şekil 4.18. Yaralanmanın 38. gününde 4-Ap sonrası 4-Ap+TEA nın etkisi



Şekil 4.19. Yaralanma sonrası 38 gün PEMA uygulanmış sinirde 4-Ap sonrası 4-Ap+TEA nın etkisi.



Şekil 4.20. Sağlam sinirde 4-Ap sonrası 4-Ap+TEA nın etkisi

4.1.4.1 Hiperpolarize Edici Ard Potansiyellerin Karşılaştırılması

Yaralanmanın 15. ve 38. günlerinde tonik uyarımlar ile 40 ve 10 Hz lik uyarım frekanslarında görülen HAP ların genlikleri ve sürelerinin 4-Ap uygulaması ile arttığı Çizelge 4.8 ve Şekil 4.12 de gösterilmişti. 4-Ap+TEA uygulaması tonik uyarımda oluşan HAP ları tamamen ortadan kaldırırken, 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP ların genliklerinde kısmi inhibisyon oluşturdu (Çizelge 4.16). 4-Ap+TEA HAP'ın sürelerini sağlam ve 38. gün sinirlerde uzattı. PEMA uygulaması sadece 38. gündeki HAP'ın genliğinde meydana gelen inhibisyonu anlamlı olarak azaltırken, süresinde meydana gelen uzama miktarını arttırarak sağlam sinir değerine doğru yaklaştırdı (Çizelge 4.17 ve Şekil 4.21, 22 ve 23).

Çizelge 4.16. Yaralanma sonrası sinirlerde, 4-Ap sonrası HAP değerlerine TEA nın etkisi. Değerler % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

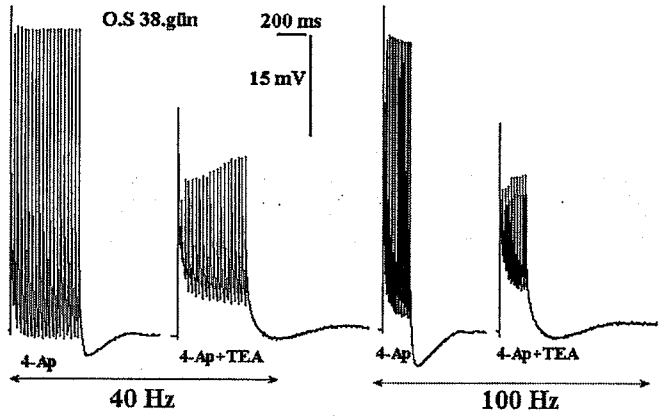
2 mM 4-Ap+10 mM TEA	HAP (V(mV)/T(ms) ; % Kontrol)			
O.S	Uyarım Frekansı			
Günler	0 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz
Sağlam	0	0	100,0±0,1/400,0±8,3	95,5±0,8/360,0±9,1
5	0	0	0	0
15	0	0	85,0±0,9/100,0±0,1	46,0±0,7/100,0±0,3
38	0	0	75,0±0,4/160,0±4,2	65,0±0,1/170,0±3,0

Sağlam, 15 ve 38. günlerde 40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki HAP genlik ve süre değişimleri $P<0.05$ düzeyinde anlamlıdır. 4-Ap değerleri kontrol kabul edildi.

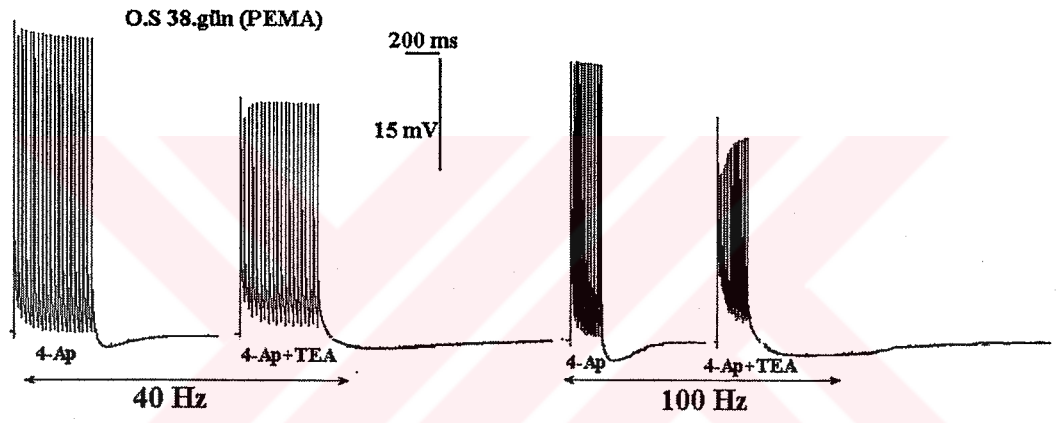
Çizelge 4.17. Yaralanma sonrası PEMA uygulanmış sinirlerde 4-Ap sonrası HAP değerlerine TEAnın etkisi. Değerler % normalize edilerek verilmiştir (ort±SEM).

2 mM 4-Ap+10 mM TEA	HAP (V(mV)/T(ms) ; % Kontrol)			PEMA
O.S	Uyarım Frekansı			
Günler	0 Hz	10 Hz	40 Hz	100 Hz
Sağlam	0	0	100,0±0,2/400,0±7,8	94,2±0,4/400,0±7,0
5	0	0	0	0
15	0	0	83,5±1,4/100±0,1	45,0±0,9/100,0±0,5
38	0	0	95,0±0,7/300,0±9,4	88,5±1,5/450,0±6,7

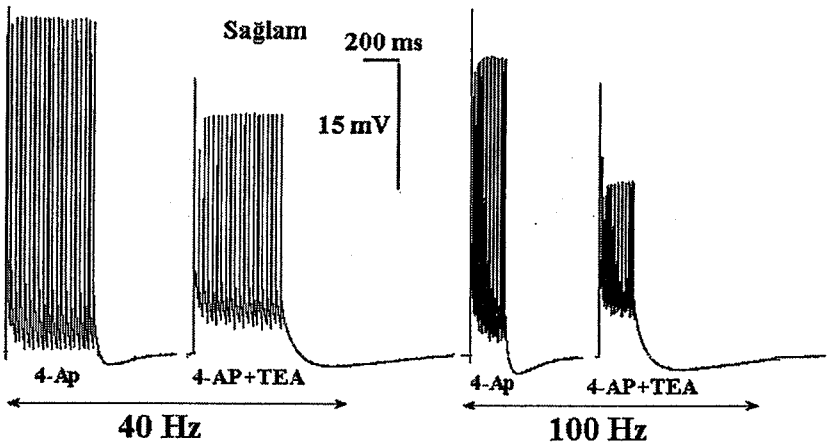
40 ve 100 Hz uyarım frekansındaki HAP genlik değişimleri $P< 0,05$ düzeyinde anlamlıdır. 4-Ap değerleri kontrol kabul edildi.



Şekil 4.21. Yaralanma sonrası 38. gündeki sinirlerde 4-Ap sonrası 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara 4-Ap+TEA nın etkisi



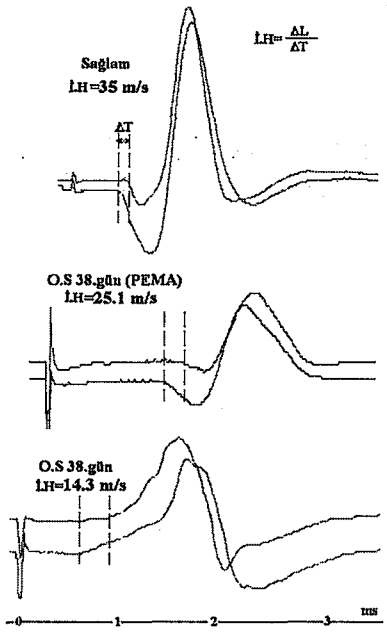
Şekil 4.22. Yaralanma sonrası 38 gün PEMA uygulamasına maruz kalmış sinirlerde 4-Ap sonrası 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara 4-Ap+TEA nın etkisi.



Şekil 4.23. Sağlam sinirlerde 4-Ap sonrası 40 ve 100 Hz lerde oluşan HAP lara 4-Ap+TEA nın etkisi.

4.1.5. İletim Hızlarının Karılaştırılması

Yaralanma sonrası 5. ve 15. günde yaralanmış bölgenin proksimali ile distali arasında bir latans farkı belirlenemedi. Sadece 38. günde her iki bölgeden uyarıya yanıt olarak BKAP oluştu ve latans farkı belirlenebildi. Sağlam sinir de iletim hızı 35,0±2,1 m/s olarak bulundu. Yaralanmış sinirin 38. gününde iletim hızı 14,3±1,8 m/s olarak ölçüldü. 38 gün PEMA uygulamasına maruz kalmış sinirin iletim hızı ise 25,1±2,3 m/s bulundu (Şekil 4.24).

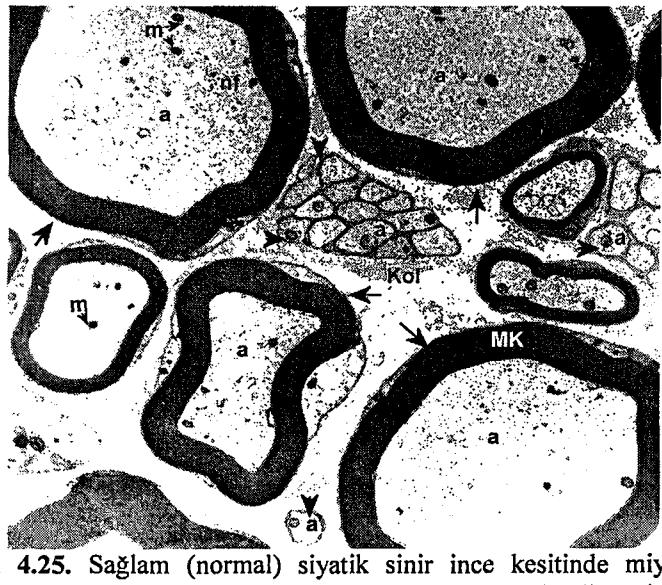


Şekil 4.24. Sağlam, yaralanma sonrası 38. gündeki ve yaralanma sonrası 38 gün PEMA uygulanmasına maruz kalmış sıçanlardan kayıtlanan BKAPlar. İletim hız değerleri birbirinden anlamlı olarak farklıdır.

4.2 Elektron Mikroskobik Bulgular

4.2.1 Sağlam (normal) Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi

Siyatik sinirden alınan doku kesitlerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, sinir demetinin, miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri (aksonlar), Schwann hücreleri, fibroblastlar, bağ dokusu lifleri ve kapiller damarlardan oluştuğu gözlendi.



Şekil 4.25. Sağlam (normal) siyatik sinir ince kesitinde miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıf (MK) ve aksonun normal yapıda olduklar gözlenmektedir. Akson (a), mitokondriyon (m), nörofilamanlar (nf), kollajen lifler (Kol). X 10100

Schwann hücreleri, dıştan bir bazal lamina ile bağ dokusundan ayrılmıştı. Hücreler genellikle merkezi yerleşimli bir çekirdek ve belirgin bir sitoplazmaya sahipti. Sitoplazmada mitokondriyonlar, ribozomlar, endopolazmik retikülüm ve lizozomlar yer almaktaydı. Schwann hücreleri hem miyelinli, hem de miyelinsiz sinir liflerini sarmaktaydı. Miyelinli sinirlerde bir Schwann hücresi tek bir aksonu sararken, miyelinsiz sinirlerde 2 veya daha fazla sayıda aksonu sarmaktaydı.

Miyelinsiz sinir lifleri Schwann hücre sitoplazmasına gömülü olarak izlenmekteydi. Schwann hücreleri, birden fazla miyelinsiz sinir lifini birlikte sarmaktaydı. Sinir lifleri Schwann hücreleri sitoplazması içerisinde bir aksolemma ile sarılı idi. Akson içerisinde çok sayıda nörotübül ve nörofilamanlar ve kesit seviyesine bağlı olarak mitokondriyonların varlığı görülmekteydi.

Miyelinli sinir lifleri, Schwann hücresi tarafından oluşturulmuş belirgin bir miyelin kılıf ile sarılmışlardı. Akson içerisinde nörotübüller, nörofilamanlar, mitokondriyon ve agranüler endoplazmik retikülüme ait veziküler yapılar ayırt edilmekteydi. Sinir lifleri ve Schwann hücrelerinin araları kollajen liflerden zengin fibröz bağ dokusundan oluşmuştu (Şekil 4.25). Bağ dokusu içerisinde bağ dokusu liflerini sentezleyen fibroblastlar ve kapiller damarlar yer almaktaydı.

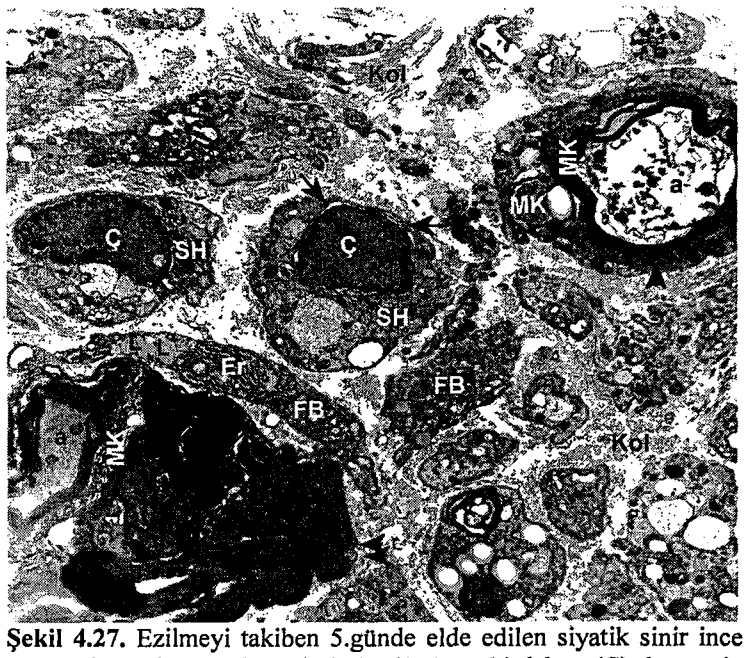
4.2.2 Yaralanmadan Beş Gün Sonra Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi

Ezilmeyi takiben 5. günde elde edilen sinir kesitlerinin ince yapısında, Schwann hücreleri, miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri ve fibroblastlarda belirgin yapısal değişiklikler kaydedildi. Yapısal bozukluklar; periferik sinirlerdeki tipik, yaralanmaya karşın oluşan anterograde (Wallerian) dejenerasyonu idi (Şekil

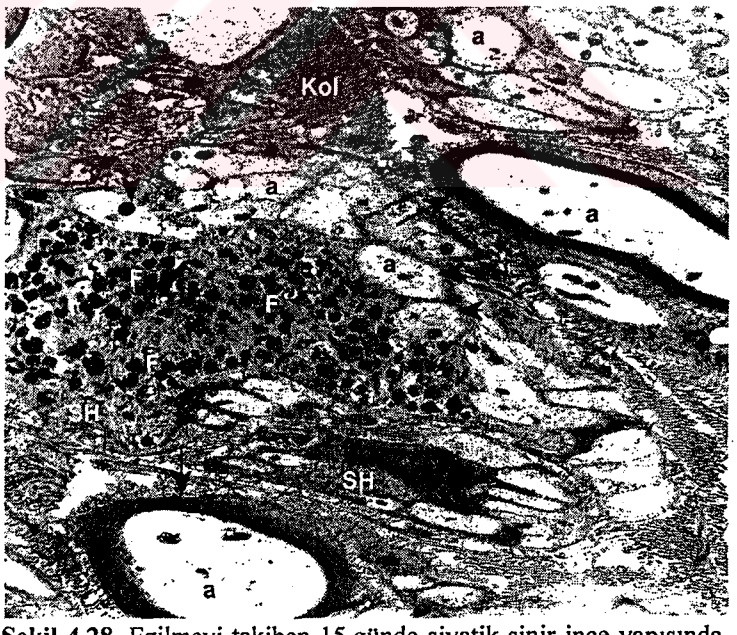
Şekil 4.26. Ezilmeyi takiben 5. günde, miyelinli sinir liflerinde (oklar) akson (a) ve miyelin kılıfta (MK) yapısal bozulmalar görülmektedir. Schwann hücrelerinin (SH) sitoplazmasında miyelin kılıf artıkları (ok başları) izlenmektedir. Kollajen lifler (Kol). X5000.

4.26 ve 4.27).

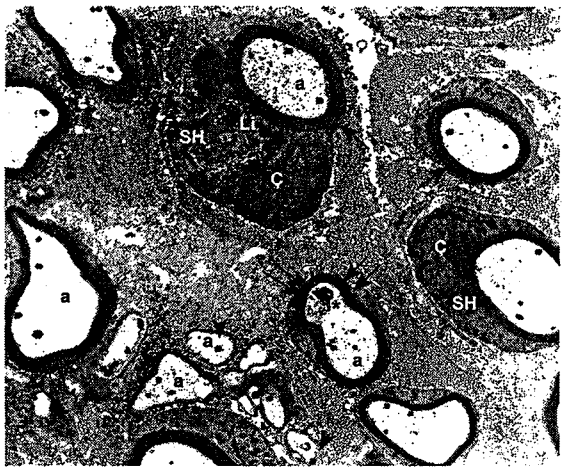
Schwann hücrelerinde; çekirdekte heterokromatin artışı, çekirdek kılıfında hafif genişleme ve lizozomlarda artış belirgindi. Ayrıca, ortamda bulunan fagositik hücrelerin sitoplazmasında, fagosite edilmiş dejeneratif miyelin kılıf ve değişik büyüklüklerde vakuollerin bulunduğu gözlenmekteydi (Şekil 4.27). Miyelinli sinir liflerini saran Schwann hücreleri de fagositik hücrelere benzer yapısal değişikliklere sahipti. Schwann hücresi içerisinde yer alan miyelinli sinir liflerinde, akson ve miyelin kılıfta önemli yapısal değişikliklere rastlandı. Aksonların yapısal bütünlüğünün bozulduğu ve akson içerisindeki organellerde belirgin dejeneratif değişikliklerin oluştuğu görüldü.



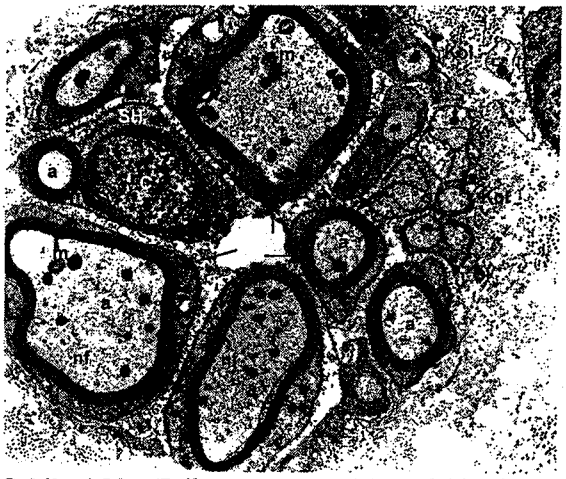
Şekil 4.27. Ezilmeyi takiben 5.günde elde edilen siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinde (SH), çekirdekte (Ç) kromatin artışı, çekirdek kılıfında genişleme (oklar) sitoplazmada organel harabiyeti izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde (ok başları) akson (a) ve miyelin kılıfta (MK) dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Ortamda yer alan fibroblastlarda (FB) endoplazmik retikülümde (Er) genişleme ve lipid (L) damlacıklarında artış görülmektedir. Kollajen lifler (Kol). X 6300.



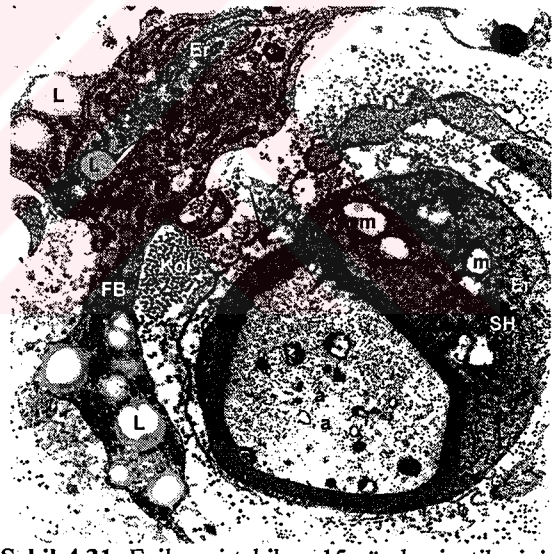
Şekil 4.28. Ezilmeyi takiben 15.günde siyatik sinir ince yapısında, bazı Schwann hücrelerinin (SH) sitoplazmasında çok sayıda fagozom (F) gözlenmektedir. Miyelinli (oklar), miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri, akson (a), kollajen lifler (Kol). X10100.



Şekil 4.29. Ezilmeyi takiben 15.günde siyatik sinir kesitinde miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri ve Schwann hücreleri (SH) izlenmektedir. Schwann hücre sitoplazmalarında lizozomlar (Li) görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfın nispeten normal yapılarını korudukları izlenmekle birlikte, bazı sinir liflerinde (çift oklar) akson ile miyelin kılıf arasında dejeneratif miyelin kılıf artıkları dikkati çekmektedir (*). Akson (a), çekirdek (Ç), kollajen lifler (Kol). X10100.



Şekil 4.30. Ezilme sonrası 15.gündeki siyatik sinirlerin elektron mikroskobik incelemesinde, Schwann hücreleri (SH), miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir liflerinin genellikle normal yapıda oldukları görülmektedir. Schwann hücrelerinin çekirdeklerinde (Ç) heterokromatin artışı dikkati çekmektedir. Akson (a), mitokondriyon (m), nörofilaman (nf), kollajen lif (Kol). X 16100.



Şekil 4.31. Ezilmeyi takiben 15.günde siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinin (SH) sitoplazmasında mitokondriyonların (m) genişlemesine bağlı vakuolizasyon izlenmektedir. Miyelinli sinir lifinde (ok) miyelin kılıf nispeten normal yapıda izlenmekle beraber, akson (a) içerisinde mitokondriyonlarda (m) genişleme ve yapısal bozukluklar görülmektedir. Fibroblastlarda (FB) lipid (L) artışı dikkati çekmektedir. Endoplazmik Retikülüm (Er), kollajen lifler (Kol). X20000.

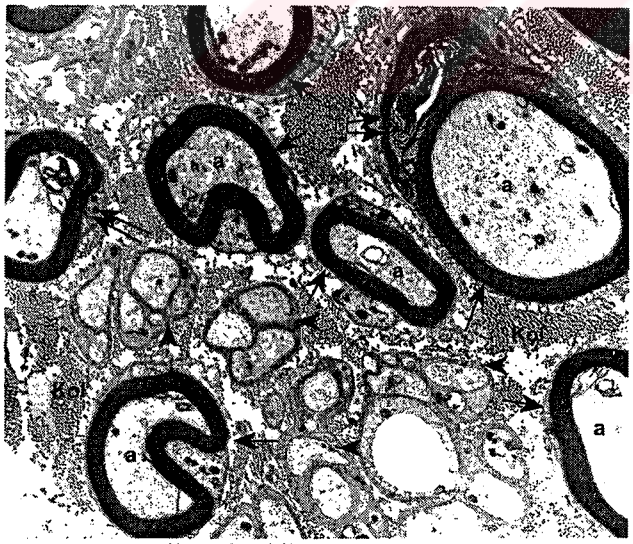
Miyelinli sinir liflerinin çoğunda, aksonun ileri derecede dejenerasyona uğradığı dikkati çekti. Ayrıca, miyelin kılıfta kalınlaşma, kıvrılma, normal yapısal bütünlüğünde bozulma, miyelin lamellerinde ayrışma ve miyelin kılıfın akson içerisine veya dışa doğru girinti-çıkıntı oluşturması gözlenen ortak değişikliklerdi. Bazı liflerde, miyelin kılıfın ileri derecede dejenere olarak parçalandığı da görülmekteydi (Şekil 4.26 ve 4.27). Fibroblastlarda hücre sitoplazmasında granüler endoplazmik retikulüm sisternalarında genişleme ve lipid damlacıklarında belirgin bir artış görüldü. İntersellüler aralıklarda kollajen lifler yer almaktaydı (Şekil 4.27).

4.2.3 Yaralanmadan On Beş Gün Sonra Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi

Sinir ezilmesini takiben 15.gündeki sıçanların siyatik sinirlerinin incelendiği grupta, Schwann hücrelerinde ve sinir liflerinde ultrastrüktürel görünümün, bir önceki incelenen gruba (O.S 5.gün) göre daha iyi durumda olduğu dikkati çekti.

Schwann hücrelerinin, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerini sardığı gözlendi. Schwann hücre sitoplazmasında elektron dens görünümlü lizozomlar, endoplazmik retikülümün sisternalarında hafif genişleme ve bazı hücrelerin sitoplazmasında yer alan

Şekil 4.32. Ezilmeyi takiben 38.gündeki siyatik sinirlerin ince yapısında, Schwann hücrelerinin (SH) normal yapıda oldukları izlenmektedir. Bazı hücrelerin sitoplazmasında (çift oklar) miyelin kılıf artıkları ve miyelin kılıf lamellerinde (*) ayrışma dikkati çekmektedir. Miyelinli sinir lifleri (oklar), miyelinsiz sinir lifleri (ok başları), miyelin kılıf (MK) akson (a), kollajen lifler (Kol). X12400.



Şekil 4.33. Ezilmeyi takiben 38.gündeki siyatik sinirler kesitlerinde, miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri izlenmekte dir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında miyelin kılıfta yapısal bozulmalar izlenmektedir (çift oklar). Akson (a), Kollajen lifler (Kol). X12400

fagozomlar dışında, hücrelerin genellikle normale yakın oldukları belirlendi (Şekil 4.28 ve 4.30). Bu grupta incelenen miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf kalınlığının, normal gruba göre daha ince olduğu ve miyelin kılıfların, daha çok yeni oluşmuş, miyelin kılıf görünümünde oldukları dikkati çekti (Şekil 4.29 ve 4.30).

Ezilmeyi takiben fagositik karakter kazanan Schwann hücrelerinin sitoplazmalarında, çok sayıda fagosite edilen miyelin kılıf

artıkları bulunmaktaydı (Şekil 4.28). Sinir lifleri ve Schwann hücreleri arasında aşırı fibrosizin oluşması ilgi çekiciydi. İntersellüler aralıklarda bulunan fibroblastlarda, sitoplazmada endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme ve lipid damlacıklarında artış gözlendi (Şekil 4.31). Fibroblastlara komşu bölgelerde, çok miktarda kollajen lifler yer almaktaydı.

Şekil 4.34. Ezilmeyi takiben 38. gündeki siyatik sinirlerin ince yapısında, miyelinli sinir liflerinde (oklar), miyelin kılıf (MK) ve aksonların (a) nispeten normal yapıda oldukları izlenmektedir. Sitoplazmasında, fagozomlar (F) ve lipid (L) damlacıkları bulunan bir fagositik hücre (FH) gözlenmektedir. Kollajen lifler (Kol). X12400.

Miyelinsiz sinir liflerinde, aksonların genellikle kontrol grubuna benzedikleri ve normal yapılarını korudukları görüldü. Ezilmeyi takiben 15. günde, kontrol grubuna göre miyelinli ve miyelinsiz lif sayılarında belirgin bir azalmanın oluştuğu dikkati çekmekteydi (Şekil 4.29 ve 4.30).

4.2.4 Yaralanmadan Otuz Sekiz Gün Sonra Siyatik Sinirin Elektron Mikroskobik İncelemesi

Siyatik sinir ezilmesini takiben 38 gün sonra alınan sinirlerin ince yapısında, Schwann hücrelerinin normal ultrastrüktürel özelliklerini korudukları ve hücrelerin miyelinli ve miyelinsiz aksonları sardıkları gözlendi (Şekil 4.32 ve 4.33). Bu grupta, sinir lif rejenerasyonunun 15. güne göre daha belirgin olduğu dikkati çekmekteydi. Bununla birlikte, intersellüler aralıklarda bazı fagositik hücrelerin yer aldığı ve bu hücrelerin sitoplazmalarında miyelin kılıf artıkları ve lipid damlacıklarının bulunduğu dikkati çekmekteydi (Şekil 4.34). Ayrıca, sinir ince yapısında fibroblastlarda belirgin proliferasyon ve fibrozisin meydana geldiği de gözlenmekteydi.

Miyelinli sinir liflerinde, akson ve miyelin kılıfın, genellikle normal yapıların korudukları, ancak bazı sinir liflerinde, miyelin kılıfın aksolemma ile birleşim bölgelerinde belirgin olmak üzere, miyelin kılıf bozulmalarına rastlandı. Miyelinsiz lifler, genellikle normal olarak değerlendirildi (Şekil 4.32, 4.33 ve 4.34).

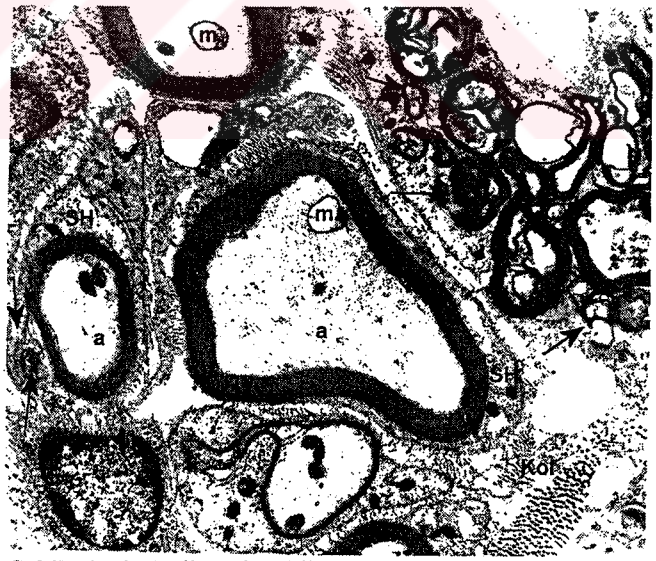
4.2.5 PEMA'nın Normal (intact) Siyatik Sinirlere Etkisinin Elektron Mikroskobik Olarak İncelenmesi

Beş, on beş ve otuz sekiz gün boyunca PEMA uygulanmış sıçanlara ait siyatik sinir kesitlerinin elektron mikroskobik incelemesinde, Schwann hücrelerinin, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin genellikle normal yapılarını korudukları ve hücresel yapının ilk gruba (intact, kontrol) benzerlik gösterdiği ve PEMA'nın intact siyatik sinirler üzerinde elektron mikroskobik olarak herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.

Şekil 4.35. Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücre (SH) sitoplazmalarında lizozomal yapılar (Li) izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında (ok başı) miyelin kılıf hasarı gözlenmekle beraber, miyelin kılıfın (MK) normale yakın olduğu izlenmektedir. Akson (a) ve miyelin kılıf arasında meydana gelen boşluklar dikkati çekmektedir (*). Miyelinsiz sinir liflerinde (çift oklar) Schwann hücresinde (SH) çekirdekte (Ç) heterokromatin artışı, bazı aksonlarda (X) dejenerasyon izlenmektedir. Fibroblastlarda (FB) sitoplazmada lipid (L) damlacıklarında artış dikkati çekmektedir. Kollajen lifler (Kol). X 6300.

4.2.6 Yaralanma Sonrası On Beş Gün PEMA Uygulanan Siyatik Sinirlerin Elektron Mikroskobik İncelenmesi

Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan siyatik sinirde, Schwann hücreleri ve sinir liflerinin elektron mikroskobik görünümü, PEMA uygulanmayan gruba (O.S.15.gün) benzemekteydi.

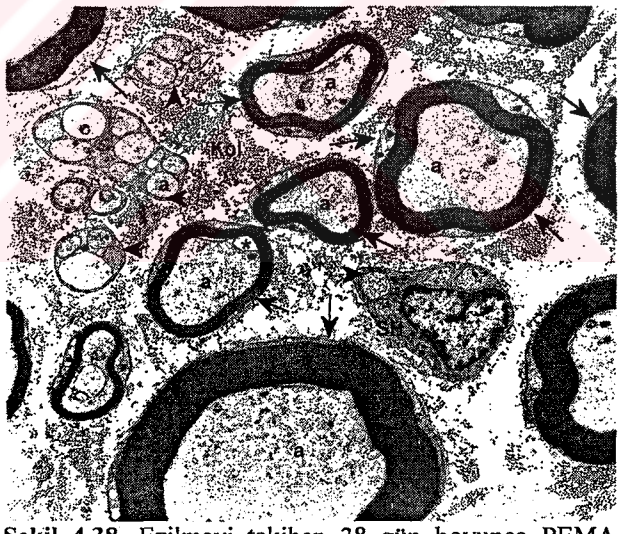


Şekil 4.36. Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücre sitoplazmaları (SH) miyelin kılıf artıkları izlenmektedir (oklar). Miyelinli sinir liflerinin çoğunda miyelin kılıfın (MK) normal yapıda olduğu izlenmektedir. Akson (a) içerisinde bazı mitokondriyonların (m) genişlediği ve iç membranlarının parçalandığı görülmektedir. Kollajen lifler (Kol). X20000

Miyelinli ve miyelinsiz lifler, Schwann hücreleri tarafından sarılmıştı. Bazı Schwann hücrelerinin sitoplazmasında dejenerasyona uğramış miyelin kılıfa ait yapılar bulunmaktaydı (Şekil 4.35 ve 4.36). Miyelinli liflerin bazılarında, akson büzüşmesine bağlı olarak, akson ve miyelin kılıf arasında boşlukların oluştuğu izlenmekteydi (Şekil 4.35).

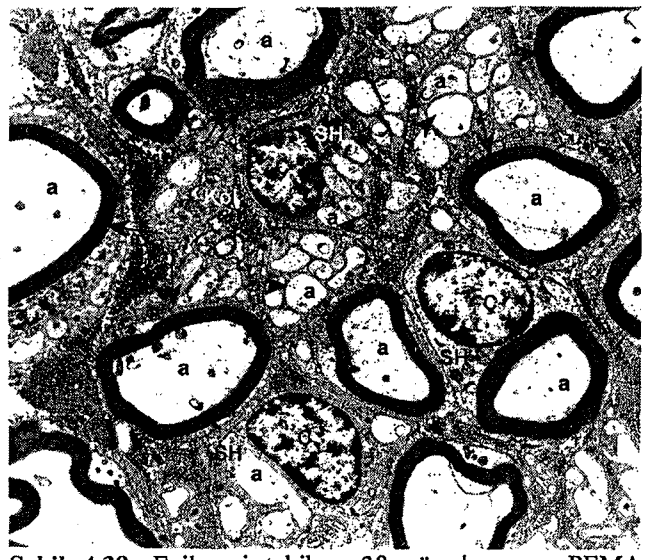
Şekil 4.37. Ezilmeyi takiben 15 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinin (SH) çekirdek (Ç) ve sitoplazmik özellikleri ile normale yakın oldukları izlenmektedir. Fibroblastlarda (FB), sitoplazmada lipid damlacıklarında (Li) artış dikkati çekmektedir. Kollajen lifler (Kol). X6300

Fibroblastlarda, çekirdek ve sitoplazmanın normal yapısal özelliklerini koruduklarını gözlenmekle birlikte, bazı hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıklarının varlığı izlenmekteydi (Şekil 4.35 ve 4.37). İntersellüler aralıklarda kollajen liflerden oluşan belirgin fibrozisin varlığı, bu grupta da dikkati çekmekteydi (Şekil 4.35 ve 4.36).



Şekil 4.38. Ezilmeyi takiben 38 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücrelerinde (SH) miyelinli (oklar) ve miyelinsiz sinir liflerinde (ok başları) normal yapının korunduğu izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında, akson (a) ve miyelin kılıf arasında boşluklar (*) izlenmektedir. Kollajen lifler (Kol). X10100.

4.2.7 Yaralanma Sonrası Otuz Sekiz Gün PEMA Uygulanan Siyatik Sinirlerin Elektron Mikroskobik İncelenmesi



Şekil 4.39. Ezilmeyi takiben 38 gün boyunca PEMA uygulanan sıçanların siyatik sinir ince yapısında, Schwann hücreleri (SH) miyelinli (oklar) ve miyelinsiz (ok başları) sinir lifleri normal yapıda görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında (çift oklar), miyelin kılıfta bozulmalar izlenmektedir. Akson (a), çekirdek (Ç), kollajen lifler (Kol). X8100.

Ezilmeyi takiben 38 gün süreyle PEMA uygulanan deneklere ait sinirlerin incelenmesinde, Schwann hücreleri, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin görünümünün, ezilmeyi takiben 38 gün (O.S 38.gün) sonra alınan gruba benzemekle birlikte, hücrelerin ve sinir liflerin ince yapısının, bu grupta daha iyi korunduğu ve çoğu alanlarda, yapısal görünümün daha çok intact gruba benzerlik gösterdiği belirlendi.

Bununla birlikte, miyelinli sinir liflerinin bazılarında hafif miyelin kılıf değişiklikleri ve akson ile miyelin arasında boşlukların varlığı, bu grupta da izlenmekteydi. Schwann hücreleri, çekirdek ve sitoplazmik özellikleri ile normal yapıda izlenmekteydi. Miyelinsiz lifler genellikle normaldi. Akson içerisinde yer alan nörotübül ve nörofilamanlar, mitokondriyonlar ve agranüler endoplazmik retikülüm sisternalarının yapı ve dağılımları intact gruba benzerlik göstermekteydi. İntersellüler aralıklarda yer alan fibroblast ve kollajen liflerin yapıları da normal olarak değerlendirildi (Şekil 4.38 ve 4.39).

5. TARTIŞMA

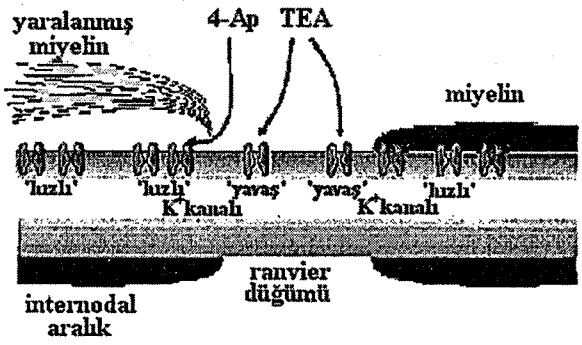
Periferik sinir demetlerinin yaralanma sonrası, yaralanmanın şiddetine ve şekline bağlı olarak tam veya kısmi iyileşmenin olduğu yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. Siyatik sinirde meydana getirilen ezilme tipi yaralanma sonrası BAP parametre ölçümleri iyileşme sürecinin değerlendirilmesinde bir kriter olarak ele alınabilmektedir.

Yaralanma sonrasında ilk 5. günde sinir demetlerinin yaralanmış bölgelerinde, histolojik incelemelerde de net bir şekilde gösterilen Wallerian dejenerasyon nedeniyle, sinir demetlerinden BAP kayıtlanamadı. 15 gün sonra sinir demetinde iyileşmenin başlamasıyla beraber BAP ta belirgin şekilde ortaya çıktı. Yaralanmadan 38 gün sonra elde edilen BAP genliği, sağlam sinir demetinden elde edilen BAP genliğinden hala küçük iken, süre parametreleri sağlam sinirin değerlerine yaklaşmaktadır. Aynı grupta bulunan sinirlerin ultrastrüktürel incelenmesinde de sinir lif rejenerasyonunun 15. güne göre daha belirgin olduğu belirlendi.

Ayrıca, yaralanma sonrası 15. gündeki sinirlerin yüksek uyarım frekansı sonrasında BAP genliğinde kaydedilen yüksek inhibisyon da ilginç bir bulgudur. Yüksek frekanslı uyarmalar (40 ve 100 Hz), hem sağlam hem de yaralı sinirlerde hiperpolarize edici ard potansiyelin (HAP) oluşmasına neden oldu. Yaralanma sonrası 38. gündeki sinirin HAP aktivitesi 15. gündeki değerden daha büyüktür.

Bu çalışmada, BAP parametrelerinde meydana gelen bu değişikliklerin nedenlerini açıklayabilmek için, iki farklı K^+ kanal blokörü, 4-Ap ve TEA kullanıldı. Sinir demetine uygulanan bir hızlı K^+ kanal blokörü olan 4-Ap, yaralanma sonrası 5. ve 15. gündeki sinirlerde BAP genliklerinin artmasına neden olurken, 38. gündeki etkisi sağlam sinirdeki gibi küçük bir inhibisyondur.

Hızlı K^+ kanallarının internodal aralıklarda (paranodal yada juxtaparanodal) yerleşim gösterdikleri ve miyelin kılıfı tarafından izole edildikleri yapılan deneysel



Şekil 5.1. Hızlı ve yavaş K^+ kanallarının muhtemel yerleşimleri.

çalışmalarda gösterilmiştir[12,24] (Şekil 5.1). Yaralanma sonrası, iyileşme sürecinde, önce tamamen ortadan kaldırılan miyelin yapı, süreç içerisinde tekrar oluşmaktadır[3,9].

5. ve 15. günde miyelin yapı hiç oluşmadığı veya kısmen oluştuğu için, hızlı K^+ kanallarından dışarıya doğru olan sızıntı şeklinde de tarif edilebilecek bir K^+ akımı meydana gelmektedir. Normal şartlarda zarı dinlenim değerinde tutan K^+ akımları, miyelinin hasarlanması durumunda aksiyon potansiyelinin oluşumuna katkıda bulunan, açılabilecek Na^+ kanal sayısını azaltarak daha küçük genlikli BAP oluşmasına veya iletimin tamamen bloke olmasına neden olabilmektedir.

4-Ap uygulamasının iyileşme sürecinin 38. gününde ve sağlam sinir demetlerindeki etkisi ise 5 ve 15. gündekilerden oldukça farklıdır. 4-Ap uygulamasının BAP genliğini artırmaması, bu sinirlerdeki miyelin yapının normale yakın olabileceğini ve miyelin tarafından internodal aralıktaki hızlı K^+ kanallarının izole edilebileceğini düşündürmektedir. 38. gündeki ve sağlam sinir demetlerine uygulanan 4-Ap, BAP sonrası delayed depolarizasyon oluşumuna neden oldu. 38. gündeki sinirde oluşan delayed depolarizasyonun genliği sağlam sinir değerlerine göre daha büyük, süresi ise daha kısadır. Sağlam sinirde oluşan delayed depolarizasyona yavaş Na^+ akımlarının neden olduğu ve bu akımlarında 4-Ap tarafından hızlı K^+ kanallarının bloklanması sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir[29,30]. İyileşmenin 38. günündeki ve sağlam sinir demetlerinde 4-Ap uygulamaları arasındaki farklar, iyileşmenin 38. günündeki sinirde miyelin yapının hala tam olarak oluşmadığını göstermektedir.

4-Ap nin ardından TEA uygulaması (4-Ap+TEA) delayed depolarizasyon genliğinde inhibisyon meydana getirirken (sağlam sinirde %15, 38. gün sinirinde %20) asıl etkisini süreyi çok uzatarak göstermektedir (sağlam sinirde 3 kat, 38. gün sinirde 60 kat). Bu bulgular TEA-duyarlı yavaş K^+ akımlarının delayed depolarizasyonun düşme fazını (dinlenim durumuna dönme fazı) kontrol ettiğini düşündürmektedir. 38. gün sinirindeki düşme fazının çok yavaş olması muhtemelen, delayed depolarizasyonun genliğinin çok büyük olmasından olabilir (sağlam sinirde A_2/A_1=%13.2, 38. gün sinirde A_2/A_1=%61.8).

4-Ap uygulaması iyileşme sürecindeki sinirlerde (15. gün ve 38. gün) hem tek puls uyarımı hem de yüksek frekanslı uyarımlar sonrasında HAP'ın genliğinin ve süresinin artmasına neden oldu. Sağlam sinirde ise sadece yüksek frekans uyarımı altında oluşan HAP aktivitesini artırdı. Genel olarak HAP, K^+ nun elektrokimyasal

gradienti etkisi altında, dışarı doğru yönelmiş K^+ iletimi nedeniyle oluşmaktadır. Bu K^+ iletiminin kaynağının farklı iyon kanalları yada pompaların olabileceği yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. HAP oluşumuna katkıda bulunan kaynaklar; Na^+/K^+ ATPaz elektrojenik pompası, TEA duyarlı yavaş K^+ iletimi, Ca^{2+} ile aktive olan K^+ akımı, Na^+ ile aktive olan K^+ akımları olarak sayılabilir[5,27,37,38,39,40].

4-Ap varlığında iyileşme sürecindeki sinirlerde ve sağlam sinirlerde tek pulsla uyarım sonrasında HAP aktivitesinin artması, hücre içine giren Na^+ konsantrasyonun artmasının HAP oluşumuna neden olabileceği görüşünü desteklemektedir. Çünkü, 4-Ap delayed depolarizasyonu oluşturan yavaş Na^+ akımlarının ortaya çıkmasına neden olmakta ve hücre içi Na^+ konsantrasyonunun artmasını sağlamaktadır. Artan hücre içi Na^+, bu iyonla aktive olan K^+ akımları ve Na^+/K^+ ATPaz pompa aktivitesini arttırarak hücre dışına doğru olan K^+ iletimini arttırabilir.

Aynı şartlarda iyileşmenin 15. ve 38. günlerindeki sinire tek başına TEA uygulaması ve 4-Ap'nin ardından, 4-Ap ile birlikte TEA (4-Ap+TEA) uygulaması HAP ları tamamen ortadan kaldırmaktadır. Bu bulgular, TEA duyarlı yavaş K^+ kanallarının da HAP oluşumuna etkili bir şekilde katkıda bulunduğunu göstermektedir. BAP sürelerinin uzun olması yavaş aktive olan bu kanalların aktivasyonu için gerekli süreyi sağlayabilir. 4-Ap uygulaması sonrasında BAP'ın daha fazla uzaması TEA duyarlı bu kanalların aktivasyonunu daha da arttırabilir.

Özellikle iyileşmenin 38.günündeki sinirlerde 4-Ap sonrası HAP genliğin 15.gün değerinden 2 kat daha yüksek olması çok ilginçtir. Ranvier düğümlerinde yoğun olarak yerleşim gösteren yavaş K^+ kanalları ve Na^+ kanalları miyelinizasyon sürecinden etkilenmemektedir. 15.güne göre miyelin yapının daha gelişmiş olduğu 38.günde hızlı K^+ kanallarının 4-Ap tarafından bloklanması ile ortaya çıkan yavaş Na^+ kanal iletimi ile artan hücre içi Na^+ konsantrasyonu (aksiyon potansiyeli genişledi ve delayed depolarizasyon oluştu) bu iyona bağlı K^+ iletimini artırarak HAP genliğinin artmasına neden olabilir.

Tek puls uyarımı sonrasında iyileşme sürecindeki sinirlerde görülen HAP'ın dışında, yüksek uyarım frekansı hem iyileşme sürecindeki sinirlerde hem de sağlam sinirlerde HAP oluşumuna neden oldu. Özellikle 100 Hz lik uyarım frekansında tüm bu sinirlerde belirgin bir şekilde HAP oluştu. İyileşmenin 15.gününde oluşan HAP'ın genliği, sağlam sinir değerine yakın iken, 38.gün değerinin yaklaşık yarısı kadardır. 4-

Ap uygulaması tüm sinirlerde HAP'ın genlik ve süresini artırdı. 4-Ap uygulaması sonucunda ölçülen HAP genlikleri 15.gün ve sağlam sinirlerde birbirine yakın değerlerde iken, 38.gündeki sinirlerde yaklaşık 2 kat daha büyüktür. Bu etkinin açıklaması tek puls uyarımlarında olduğu gibi yapılabilir. İlave olarak, uyarım sıklığına ve şiddetine bağlı olarak, BAPlar sırasında hücre içine giren Na^+ konsantrasyonunun artmasına paralel olarak hücre dışına doğru olan K^+ iletiminin artmasıyla HAP aktivitesi artabilir.

TEA'nın, sağlam sinirde HAP'ı tamamen ortadan kaldırması, 38.gündeki sinirde HAP genliğini yarı-yarıya azaltması ve 15 gün sinirinde ise fazla etki göstermemesi TEA nın etkisinin de miyelinizasyon ile değişebileceğini göstermektedir. Muhtemelen, 15.gün sinirlerinde HAP oluşumunda, yavaş K^+ akımlarının dışında sızıntı şeklinde olan K^+ iletimi çok baskın bir rol üstlenmektedir. Miyelinizasyonla beraber sızıntı akımları kaybolmakta ve baskın rolü yavaş K^+ akımları almaktadır.

4-Ap'nin ardından 4-Ap+TEA uygulamasının sağlam sinirde HAP genliğini çok fazla değiştirmez iken, süresini çok fazla uzatması ve 15.gün sinirlerinde genlik inhibisyonu çok yüksek iken süresinin değişmemiş olması, TEA nın 4-Ap ile birlikte oluşturduğu etkinin tek başına oluşturduğu etkilerden çok farklı olduğunu göstermektedir. Bu bulgulara göre, TEA duyarlı K^+ iletiminin daha çok HAP'ın süresini kısaltmakta rol aldığı söylenebilir. 15.gündeki yüksek genlik inhibisyonu; 4-Ap+TEA nın BAP repolarizasyonunda meydana getirdiği gecikme nedeniyle BAP süresini (38.günde daha az) ve dolayısıyla da refraktör periyodu uzatması sonucu, katkıda bulunan Na^+ kanal sayısı ve hücre içine giren Na^+ miktarının azalmasıyla açıklanabilir. Miyelin yapının gelişmesiyle beraber 4-Ap+TEA nın BAP'ın süre parametrelerine olan etkisinin azalmasıyla, yukarıda sözü edilen etkiler azalacağından, 4-Ap sonrası TEA nın HAP genliğini azaltıcı etkisi azalabilir.

Yüksek frekanslı uyarımlar, hem sağlam sinirlerde hem de iyileşme sürecindeki sinirlerde BAP genliklerinde düşmeye neden oldu. Özellikle 100 Hz lik uyarım frekanslarında bu fark daha belirgindir. 100 Hz lik uyarım frekansı iyileşmenin 15.günündeki sinirlerde %20 (18.7) ye yakın inhibisyon gerçekleştirirken, bu değer 38.gün de %10'a (8.2), sağlam sinirde ise %5'e (5.6) yakındır. Frekansa bağlı iletim bloklarının puls treninde her bir puls sonrası oluşan BAP'a katkıda bulunan Na^+ kanal

sayısındaki azalmanın (inaktif durumdaki Na^+ kanal sayısının artması) neden olduğu bilinmektedir[27,36].

BAP repolarizasyonuna katkıda bulunan hızlı ve yavaş K^+ kanallarının 4-Ap ve TEA tarafından bloklanması, yüksek uyarım frekansının neden olduğu inhibisyonların daha da artmasına neden oldu. TEA varlığında 15.gün sinirlerinde meydana gelen ilave inhibisyon yaklaşık %25 iken, 38.gün ve sağlam sinirde aynı değerdedir (%10). Hızlı K^+ kanallarının 4-Ap tarafından bloklanması durumunda sağlam sinirde 100 Hz lik uyarım frekansının meydana getirdiği ilave inhibisyon yaklaşık olarak TEA değeriyle aynı iken, 15.günde ilave inhibisyon %60 lara, 38.günde ise %20 lere kadar yükselmiştir. Bu bulgular yüksek uyarım frekanslarında BAP oluşumuna katkıda bulunan K^+ kanallarının etkinliğini göstermesi açısından çok önemlidir. 4-Ap varlığında meydan gelen ilave inhibisyonlar, 4-Ap nin BAP'ın süresini uzatması ile açıklanabilir. Süresi uzun olan BAP'ların refraktör periyotları da uzayacağından, puls sıklığı arttıkça, BAP depolarizasyonuna katkıda bulunan Na^+ kanal sayısı azalacak ve BAP genliği daha fazla azalacaktır.

Pulslu Elektromanyetik Alanın Yaralanmış Sinirlere Etkisi

Pulslu elektromanyetik alanların (PEMA) siyatik sinirin fonksiyonel iyileşmesini yaklaşık % 20 hızlandırdığı, yapılan farklı davranış testi çalışmaları ile gösterilmiştir, fakat sinir iyileşmesini nasıl hızlandırdığı ile ilgili net bir mekanizma ortaya konamamıştır[15,16]. Çalışmamızda, sıçanlara uygulanan PEMA protokolünün sinir demetlerinde meydan getirdiği etkiler, elektrofizyolojik olarak, kayıtlanan BAP'ların parametreleri ve bu parametrelere K^+ kanal blokörlerinin etkileri ölçülerek ve histolojik olarak her iki gruptaki sinirlerin ince yapısının incelenmesiyle değerlendirildi.

PEMA, 38 günlük uygulama içerisinde, sadece 38 gün sonrasındaki BAP'ın latans parametresini anlamlı olarak kısalttı. Özellikle miyelin yapının oluşup oluşmadığı hakkında elektrofizyolojik olarak değerlendirmelerde bulunabilmemizi sağlayan 4-Ap uygulaması sonrasında PEMA nın 38 günlük uygulama sonrasında daha etkili olduğu bulgularda net bir şekilde ortaya çıktı. 4-Ap varlığında 38.gün sinirleri (PEMA uygulanmış ve uygulanmamış) karşılaştırıldığında, PEMA etkisindeki sinirlerde BAP'ın repolarizasyon ve yarı genişlik sürelerinin anlamlı bir şekilde kısaldığı belirlendi. Ayrıca, 4-Ap uygulamasıyla ortaya çıkan delayed depolarizasyonun genliğinin ve

süresinin sağlam sinir değerlerine yaklaştığı tespit edildi. Tüm bu bulgular yaralanma sonrası uzun süreli (38 gün) PEMA uygulamasının miyelin yapının oluşumunu hızlandırdığını göstermektedir. Daha önce anlatıldığı gibi, 4-Ap nin blokör etki gösterdiği hızlı K^+ kanalları miyelin yapı tarafından maskelenmektedir. Miyelin yapıdaki bozukluk veya hasar 4-Ap nin etkisinin de yüksek olmasına neden olur.

İyileşmenin 38.günündeki sinirlerde 4-Ap uygulaması sonrasında görülen HAP'ların genlikleri, PEMA uygulaması sonrasında anlamlı bir şekilde azaldı. Bu etki yukarıda yaptığımız açıklamayla bağlantılı olarak şu şekilde ifade edilebilir; PEMA miyelin yapının iyileşmesini arttırarak 4-Ap tarafından bloklanan hızlı K^+ iletiminin azalmasına ve dolayısıyla da bu kanalların bloklanmasıyla ortaya çıkan yavaş Na^+ akımlarının azalmasına neden olur. Hücre içi Na^+ konsantrasyonunda azalmaya neden olabilecek bu etki, muhtemelen Na^+ bağımlı K^+ iletimi ve Na^+/K^+ ATP az aktivitelerinde azalmaya neden olarak HAP genliğinin düşmesine neden olabilir.

Tek başına TEA uygulamalarında PEMA nın herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi, fakat 4-Ap sonrası TEA uygulandığında (4-Ap+TEA) iyileşmenin 38.gündeki PEMA uygulanmış ve uygulanmamış sinirler arasında bazı parametrelerde anlamlı farklar bulundu. 4-Ap+TEA nın özellikle delayed depolarizasyon süresinde meydana getirdiği 60 katlık uzamanın PEMA etkisiyle 5 kata kadar düşmesi çok ilginçtir. Bu etki 4-Ap+TEA nın BAP repolarizasyon ve yarı genişlik sürelerinde yaptığı uzatmanın PEMA etkisiyle kısalmasıyla bağlantılı olabilir. Ayrıca, 100 Hz lik uyarım frekansıyla oluşan HAP'ın genliğinde 4-Ap+TEA tarafından meydan getirilen inhibisyonun ve süreyi uzatma etkisinin, PEMA uygulandığında sağlam sinir değerlerine yaklaşması da önemli bulgulardır. Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, PEMA miyelin tabakanın kalınlaşmasını arttırarak, bu tabakanın altındaki K^+ iletimini sona erdirebilir. HAP oluşmasına ve BAP repolarizasyonunda rol alan yavaş K^+ kanalları nodlarda yerleşim gösterdiği için miyelin yapının gelişiminden etkilenmezken, internodal yerleşim gösteren hızlı K^+ kanalları, miyelin tabakanın hasarlı olduğu durumlarda, BAP ve hemen sonrasında oluşan delayed depolarizasyonun repolarizasyonunda ve HAP oluşmasında çok etkili olabilir.

PEMA nın ancak uzun süreli uygulama sonrasında, yaralanmış sinirlerde rejenerasyonu hızlandırabileceğinin diğer bir kanıtı da iletim hızı ölçümlerinde elde edilen bulgulardır. Bilindiği gibi miyelinli sinirlerde iletim hızı miyelinsizlerden çok

fazladır. Bunun nedeni miyelinli sinirlerin saltatorik (sıçramalı) iletim göstermesidir. Miyelin yapı kapladığı bölgeyi (internodal aralık) elektriksel olarak izole ederek, sinyallerin sadece nodlar üstünden ilerlemesine neden olmaktadır. Miyelin yapı hasarlandığında bu izolasyon bozulacağından iletim hızı da azalır. Sinirleri yaralanmış sıçanlara 38 gün boyunca uygulanan PEMA izolasyondaki hasarı aza indirerek iletim hızını artırabilir.

Bu elektrofizyolojik bulgulara ilaveten yaralanma sonrası 38 gün boyunca PEMA uygulamasına maruz kalmış ve kalmamış sinirlerin elektron mikroskobik incelemelerinde de iki grup arasında önemli farkların bulunduğu belirlendi. PEMA uygulanan gruptaki sinirlerin yapısal görünümünün daha çok intact gruba benzerlik gösterdiği fakat miyelinli sinir liflerinin bazılarında hafif miyelin kılıf değişiklikleri ve akson ile miyelin arasında boşlukların varlığının düzelmekle beraber halen devam ettiği belirlendi. PEMA uygulanmayan grupta, intersellüler aralıklarda bazı fagositik hücrelerin yer aldığı ve bunların sitoplazmalarında miyelin kılıf artıkları ile lipid damlacıklarının bulunduğu ve fibroblastlarda belirgin proliferasyon ve fibrozisin meydana geldiği de gözlenirken, PEMA uygulanan grupta intersellüler aralıklarda yer alan fibroblast ve kollagen liflerin yapılarının sağlam sinirlerdeki gibi olduğu ve fagositik aktivitenin bulunmadığı tespit edildi.

Siyatik sinirleri yaralanmış sıçanlara sistemik olarak uygulan PEMA nın miyelin tabakanın kalınlaşması veya iyileşmesini hangi mekanizma/lar ile hızlandırabileceğini, bu çalışmada elde edilen elektrofizyolojik veya histolojik verileri kullanarak açıklamak oldukça güçtür. Sistemik olarak uygulanan PEMA nın uygulanan canlının pek çok yaşamsal organ veya dokuları üzerinde pek çok farklı biyolojik etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Özellikle, sinir büyüme hormonu ve sinir büyüme faktör (NGH ve NGF) aktivitesini arttırması ve bağışıklık sistem üzerindeki etkileri sinir iyileşmesinde PEMA nın etki mekanizmasını açıklamak için çok önemli olabilir[19,22,23]. İnflamatuar reaksiyon dokuların yaralanma sonrası iyileşmesinde, yaralanmış doku ile yerleşik makrofajlar ve kan yoluyla gelen makrofajlar arasında aktif iletişim için (doku formasyonu için gerekli olan etkileşimler; humoral-matrix, humoral-cell, cell-cell, cell-matrix) gerekli olan önemli bir parçadır[44,45]. Makrofajlar, periferik sinir sisteminde aksonal iyileşme için anahtar rol oynar. Periferik sinirlerde yerleşik makrofaj populasyonu çok küçüktür (rat siyatik sinirlerde, tüm hücre populasyonunun yaklaşık

%1-4). Bu makrofaj miktarı yaralanma sonrası miyelin kılıfın temizlenmesi için yeterli olmadığı için, periferik sinir hasarlarında, dolaşım sistemiyle bölgeye gelen makrofajlar, miyelin kılıf ve dejenere olmuş akson artıklarını ortadan kaldırmakla iyileşme sürecine önemli katkıda bulunur. Makrofajlar artıkları temizlemenin dışında, rejenerasyonun hızını arttıran NGF-β sentezini ve IL-1 sekresyonunu hızlandırır[42,46,47].

Bu çalışma bulguları, uygulanan PEMA protokolünün inflamatuar reaksiyonları ve immun sistem reaksiyonlarını (özellikle makrofaj infiltrasyonunu) etkileyerek periferik sinirlerde yaralanma sonrası miyelin kılıf sentezini hızlandırabileceğini, ispatlamamakla beraber, önerebilmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Periferik sinir demetlerinin ezilme tipi yaralanma sonrasında fonksiyonel olarak tama yakın bir şekilde iyileştiği bilinmekle beraber, sinir demetlerinin yapılarında meydana gelen bozukluklar uzun süre varlığını sürdürebilir.

Bu yapı bozukluklarının elektrofizyolojik olarak incelenmesinde sinirdeki yerleşimleri farklı olan iki K^+ kanalı çok önemlidir: 4-Ap ye duyarlı hızlı K^+ kanalları ve TEA ya duyarlı yavaş K^+ kanalları.

Hızlı K^+ kanalları internodal (paranodal/juxtaparanodal) yerleşim gösterir ve miyelin tabaka tarafından maskelenirken, yavaş K^+ kanalları nodal yerleşim gösterir ve miyelin varlığından veya yokluğundan direkt etkilenmez.

Miyelin yapının hasarlanması, sürekli K^+ sızıntısı şeklinde olan, hızlı K^+ kanal aktivitesini ortaya çıkarır ve K^+ sızıntısı aksiyon potansiyel oluşumunda ve iletiminde kısa-devre etkisine neden olur.

4-Ap hızlı K^+ kanallarını bloklayarak aksiyon potansiyelinin genliğinde artışa neden olur. 4-Ap nin etkisi miyelin tabakanın kalınlığı hakkında bilgi verdiği için, 4-Ap etkisinde oluşan BAP'ın hemen hemen tüm parametreleri bu amaca yönelik değerlendirmelerde kullanılabilir.

4-Ap uygulaması yavaş Na^+ akımlarının aktivitesini gösteren delayed depolarizasyon oluşumuna neden olur. Bu iyonik akımların dolaylı da olsa miyelin değişiminden etkilenmesi, bu akımların kaynağı olan Na^+ kanallarının çoğunun internodlarda yerleşebileceğini düşündürmektedir.

Uzun süreli PEMA uygulaması (38 gün) yaralanmış sinirlerde miyelin sentezini (kalınlığını) arttırarak rejenerasyonun hızlanmasına neden olabilir. Özellikle, sinirlerde 4-Ap nin etkisinin PEMA varlığında azalması, PEMA altında iyileşmeye bırakılan sıçanların siyatik sinirinde iletim hızının yüksek olması bu görüşü destekleyebilen elektrofizyolojik bulgulardır. Bunun dışında elektron mikroskobik incelemelerde de PEMA nın iyileşmeyi hızlandırabileceği görülmektedir.

PEMA nın rejenerasyonu hızlandırabileceğini gösteren tüm bu bulgulara rağmen, sistemik olarak uygulanan PEMA nın nasıl ve hangi etki mekanizmalarıyla rejenerasyonu hızlandırdığı sorularının cevaplarına bu çalışmanın bulgularıyla ulaşılamamaktadır. Muhtemelen, PEMA nın bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri bu

hızlı iyileşmenin nedeni olabilir. Bu sonucun ışığında, PEMA nın etki mekanizmasının net olarak ortaya konabilmesi için aynı uygulama protokollerine maruz kalmış sıçanlara, fonksiyonel gelişiminin değerlendirilebileceği davranış testleri (palantar test, rota-rot, pinch testi vb.), biyokimyasal testler (hormonlar; TSH, ACTH, NGF vb, serbest radikaller: NO, SOD vb.), bağışıklık sistem aktivitelerini gösterecek immünolojik testler, iyon kanalları düzeyinde daha ayrıntılı bilgiler alabilmek için farklı sinir preparatları (optik sinir, vagus siniri, tibial sinir gibi) ve farklı deneysel araştırma teknikleri (voltaj-clamp, akım-klamp gibi) önerilmektedir.

Sistemik uygulama yerine lokal olarak uygulanabilecek şekilde tasarlanabilecek bir PEMA uygulama sisteminde elde edilecek sonuçların daha net olarak ortaya konulabileceğini ve daha kolay yorumlanabileceği düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. **Willis WD and Grossman RG.** *Medical Neurobiology* **1981**: 1-48.

2. **Dere F.** *Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji*, **1996**: 18-27.

3. **Ide C.** Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.* 1996; 25:101–121.

4. **Pehlivan F.**: *Biyofizik.* 2. baskı, A.Ü.Tıp Fakültesi, **1997.**

5. **Waxman SG and Ritchie JM.** Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann. Neurol*, **1993**; 33, 121-136.

6. **Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı.** *Periferik Nöropati*, **1995.**

7. **Black JA, Kocsis JD and Waxman SG.** Ion channel organization of Myelinated fiber. *Trends in Neurosciences*, **1990**;13: 48-54.

8. **Stoll G and Müller HW.** Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration: Basic Insights. *Brain Pathology* **1999**;9: 313-325.

9. **Garbaya B, Heapec AM, Sargueila F and Cassagnea C.** Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progs Neurobio* 2000;61: 267-304.

10. **Gold R, Archelos JJ and Hartung HP.** Mechanisms of Immune Regulation in the Peripheral Nervous System. *Brain Pathology* **1999**; 9: 343-360.

11. **Liua T, Rooijenb NV and Traceya DJ.** Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain* **2000**;86:25-32.

12. **Gordon TR, Kocsis JD and Waxman SG.** TEA–sensitive Potassium channels and inward rectification in regenerated rat sciatic nerve. *Muscle and nerve*, **1991**, 14:640-646

13. **Eng DL, Gordon TR, Kocsis JD and Waxman SG.** Current clamp analysis of time-dependent rectification in rat optic nerve. *J. Physiol*, **1990**; 421:185-202.

14. **Malmivuo J and Plonsey R.** *Bioelectromagnetism* Oxford University Press, **1995.**

15. **Kanje M, Rusovan A, Sisken B and Lundborg G.** Pretreatment of rats with pulsed EMFs enhances regeneration of the sciatic nerve. *Bioelectromagnetics*, **1993**; 14(4): 353-359

16. **Walker J, Evans JM, Resig P, Guarnieri S, Meade P and Sisken BF.** Enhancement of functional recovery following crush lesion to the rat sciatic nerve by exposure to pulsed electromagnetic fields. *Exper. Neurol*, **1994**;125:302-305.

17. **Bassett CA.** Effects of Electric and Magnetic Fields. Report 7 of the Council on Scientific Affairs (I-94) **1994.**

18. **Aaron R.** *Tissue Healing.* EMF Science Review Symposium Breakout Group Reports for Clinical and In Vivo Laboratory Findings, **1998.**

19. **Longo FM, Yang T, Hamilton S, Hyde JF, Walker J, Jennes L, Stach R and Sisken BF.** Electromagnetic Fields Influence NGFActivity and Levels Following Sciatic Nerve Transection. *J Neurosci Res* **1999**;55:230–237.

20. **Weaver JC, Vaughan TE and Martin GT.** Biological Effects Due to Weak Electric and Magnetic Fields: The Temperature Variation Threshold. *Biophys. J*, **1999**;76:3026–3030.

21. **Macias MY, Battocletti JH, Sutton CH, Pintar FA and Maiman DJ.** Directed and Enhanced Neurite Growth With Pulsed Magnetic Field Stimulation *Bioelectromagnetics* **2000**;21:272-286.

22. **Lacy-Hulbert A, Metcalfe, JC and Hesketh R.** Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB J.* **1998**; 12:395–420.

23. **Jerabek J.** Magnetotherapy,http://www.magnetotherapy.com /default.htm? mma2. htm.

24. **Vabnick I and Shrager P.** Ion Channel Redistribution and Function during Development of the Myelinated Axon. *J Neurobiol* **1998**;37: 80–96.

25. **Rasband MN and Trimmer JS.** Developmental Clustering of Ion Channels at and near the Node of Ranvier. *Develop Biology* **2001**;236: 5–16.

26. **Catterall WA.** From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, **2000**; 26: 13–25.

27. **Hille B.** *Ionic channels of excitable membranes*, 2nded. Sinauer Associates, Sunderland, MA, **1992.**

28. **Aronson JK.** Potassium channels in nervous tissue. *Biochem. Pharmacol.* **1992**; 43(1): 11-14.

29. **Honmou O, Utzschneider DA, Rizzo MA, Bowe CM, Waxman SG and Kocsis JD.** Delayed depolarization and slow sodium currents in cutaneous afferents. *J. Neurophysiol.* **1994**; 7(5): 1627-1637.

30. **Nonaka T, Honmou O, Sakai J, Hashi K and Kocsis JD.** Excitability changes of dorsal root axons following nerve injury: implications for injury-induced changes in axonal Na^+ channels. *Brain Res.* **2000**;859: 280-285.

31. **Rizzo MA, Kocsis JD and Waxman SG.** Slow Na^+ conductance of dorsal root ganglion neurons: intra neuronal homogeneity and inter neuronal heterogeneity. *J. Neurophysiol.* **1994**; 72:2796-2815.

32. **Mert T ve Günay İ.** Periferik sinirlerde voltaj-bağımlı sodyum ve potasyum kanalları. *Arşiv*, **2002**; 11:272-287.

33. **Miller C.** An overview of the potassium channel family. *Gen Biology* **2000**;1(4):reviews0004.1–0004.5.

34. **Fedida D and Hesketh JC.** Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog Biophysics & Mol Biology* **2001**;75:165–199.

35. **Devaux J, Gola M, Jacquet G and Crest M.** Effects of K^+ Channel Blockers on Developing Rat Myelinated CNS Axons: Identification of Four Types of K^+ Channels *J Neurophysiol* **2002**;87: 1376–1385.

36. **Drachman D and Strichartz GR.** Potassium channel blockers potentiate impulse inhibition by local anaesthetics. *Anaesthesiology* **1991**; 75: 1051-1061.

37. **Mert T, Gunes Y, Guven M, Gunay I and Göçmen C.** Differential effects of lidocaine and tramadol on modified nerve impulse by 4-aminopyridine in Rat. *Pharmacology*, **2003**; 69(2): 68-73.

38. **Jirounek P, Chardonnens E and Brunet PC.** After potentials in non-myelinated nerve fibers. *J. Neurophysiol.* **1991**; 65(4), 860-873.

39. **Mcintyre CC, Richardson AG and Grill WM.** Modeling The Excitability Of Mammalian Nerve Fibers:Influence Of Afterpotentials On The Recovery Cycle. *J Neurophysiol*,**2002**; 87: 995–1006.

40. **Robert A and Jirounek P.** Axonal and glial currents activated during the post-tetanic hyperpolarization in non-myelinated nerve. *Pflügers Arch – Eur J Physiol,* **1998**; 436:529–537.

41. **Shieh C, Coghlan M, Sullivian JP and Gopalakrishnan M.** Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol.Rev,* **2000**; 52 (4): 557-593.

42. **Mert T, Gunes Y, Guven M, Gunay I and Ozcengiz D.** Comparison of nerve conduction blocks by an opioid and a local anesthetic. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**;439: 77-81.

43. **Mert T, Guven M and Günay I.** Effects of calcium and magnesium on peripheral nevre conduction. *Pol.J.Pharmacol.*, **2003**; 55: 25-30.

44. **Dailey AT, Avellino AM, Benthem L, Silver J and Kliot M.** Complement Depletion Reduces Macrophage Infiltration and Activation during Wallerian Degeneration and Axonal Regeneration. *J Neurosci*, **1998**; 18(17):6713–6722.

45. **Ebadi M, Bashır RM, Heıdrıck ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A and Helal G.** Neurotrophıns And Their Receptors In Nerve Injury And Repair. *Neurochem Int.* **1997**;30(4/5): 347–374.

46. **Perkıns NM and Tracey DJ.** Hyperalgesia Due to Nerve Injury: Role Of Neutrophils *Neuroscience* **2000**; 101(3):745-757.

47. **Zeev-Brann AB, Spiegler OL, Brenner T and Schwartz M.** Differential Effects of Central and Peripheral Nerves on Macrophages and Microglia. *Glia,* **1998**; 23:181–190.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Adana da doğdu. ilkokulu, Baklalı köyü ilkokulunda, ortaokulu, Adana Cumhuriyet ortaokulunda, liseyi, Adana Karşıyaka lisesinde tamamladı. 1993 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünden mezun oldu. Çukurova Üniversitesi yabancı diller eğitim merkezinde bir yıllık İngilizce hazırlık eğitiminin ardından, 1994 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 1997 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak Biyofizik uzmanı oldu. Aynı yılda Biyofizik Anabilim dalında doktora eğitimine başladı ve halen devam etmektedir. 1995 yılından beri Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsünün araştırma görevlisi kadrosunda, Biyofizik Anabilim Dalında çalışmaktadır.

Bugüne kadar, Çukurova Üniversitesi Araştırma fonu destekli 8 ve TUBİTAK destekli 1 araştırma projesinde araştırmacı olarak görev aldı. Bu araştırma projeleri ile ilgili olarak, 7 yurtdışı, 6 yurtiçi makale ve 1 yurtdışı 16 bildirisi bulunmaktadır. 1995, 1996 ve 2003 yıllarında Biyofizik kongrelerinde düzenlenen poster yarışmalarında, sırasıyla I., III. ve I. ödüllerini aldı.

1995 yılında başlayan akademik geçmişinde, özellikle in vitro olarak periferik sinir sisteminde, periferik sinir modeli olarak seçilen siyatik sinir demetlerinin dejenerasyon ve rejenerasyon süreçlerinde elektrofizyolojik ve farmakolojik özellikleri ile bazı ilaçların (lokal anestetik, opioid ve 2 değerlikli katyonlar) etki mekanizmalarının araştırılması önemli bir yer tutmaktadır.

1995 yılında evlendi, bir kız bir erkek iki çocuk babasıdır.