

78184

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELEKTRONİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TEK KANALLI MİKROELEKTRODLARLA AKSİYON POTANSİYELLERİNİN
KAYDI VE ANALİZİ

Elektronik Müh. Kadir TÜRK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

“Elektronik Yüksek Mühendisi”

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.01.1998

Tezin Savunma Tarihi : 02.02.1998

Tez Danışmanı

: Yrd. Doç. Dr. Temel KAYIKÇIOĞLU

Jüri Üyesi

: Yrd. Doç. Dr. Şükrücan BAYTAN

Jüri Üyesi

: Yrd. Doç. Dr. Ali GANGAL

Enstitü Müdürü

: Prof. Dr. Fazlı ARSLAN

OCAK 1998
TRABZON

78184

ÖNSÖZ

Tek kanallı mikropipetlerle aksiyon potansiyellerinin kaydı ve analizi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü Hücre Kayıt Laboratuvarında hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tezi danışmanlığımı üstlenerek gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Temel KAYIKÇIOĞLU' na teşekkür ederim.

Trabzon, Ocak 1998

Kadir TÜRK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
TABLO LİSTESİ	X
SEMBOL LİSTESİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Membran Potansiyelleri ve Aksiyon Potansiyelleri	1
1.2.1. Membran Potansiyellerinin Temel Fiziği	1
1.2.1.1. Difüzyonun Yarattığı Membran potansiyelleri	3
1.2.1.1.1. Nernst Denklemi	4
1.2.1.1.2. Membran Çeşitli İyonlara Geçirgen Olduğunda Difüzyon Potansiyelinin Hesaplanması	7
1.2.1.2. Sodyum Potasyum “Elektrojenik Pompası” ve Aktif Transportun Yarattığı Membran Potansiyelleri	8
1.2.1.3. Bir Elektriksel Kapasitör Olarak Hücre Membranı	9
1.2.2. Sinirlerde Membran Sükun Potansiyeli	10
1.2.2.1. Sodyum-Potasyum Pompası, Membrandan Sodyum ve Potasyumun Aktif Transportu	11
1.2.2.2. Sinir Membranından Sodyum ve Potasyum Sızması	11
1.2.3. Sinir Aksiyon Potansiyeli	12
1.2.3.1. Voltaj-Kapılı Sodyum ve Potasyum Kanalları	13
1.2.3.1.1. Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalları ve Aktivasyon, İnaktivasyonu	14
1.2.3.1.2. Voltaj-Kapılı Potasyum Kanalları, Aktivasyonları	15
1.2.3.1.3 Voltaj Klampı	15
1.2.3.2. Aksiyon Potansiyelini Yaratan Olayların Özeti	18

1.2.3.3. Aksiyon Potansiyeli Sırasında Öteki İyonların Rollerini	19
1.2.3.3.1. Akson İçindeki Membrandan Geçmeyen Negatif Yüklü İyonlar (Anyonlar) ..	19
1.2.3.3.2. Kalsiyum İyonları	19
1.2.3.3.3. Kalsiyum İyonlarının Eksikliğinde Sodyum Kanalları Geçirgenliğinin Artması	20
1.2.3.3.4. Klorür İyonları	20
1.2.3.4. Aksiyon Potansiyelinin Başlaması	21
1.2.3.4.1. Aksiyon Potansiyelinin Başlaması İçin Eşik Değer	21
1.2.3.4.2. Membranda Uyum, Voltaj Yükselmesine Rağmen Aksiyon Potansiyelinin Doğması	22
1.2.3.5. Bileşik Aksiyon Potansiyeller	22
1.2.4. Aksiyon Potansiyelinin Yayılması	22
1.2.4.1. Yayılmanın Yönü	23
1.2.4.2. Hep ya da Hiç ilkesi	23
1.2.4.3. Repolarizasyonun Yayılması	24
1.2.5. Aksiyon Potansiyelinden Sonra Lif Membranının “Tekrar yüklenmesi”, Enerji Metabolizmasının Önemi	24
1.2.6. Sivri Potansiyeller ve Art-Potansiyeller	25
1.2.6.1. Bazı Aksiyon Potansiyellerindeki Düzlük	26
1.2.6.2. Uyarılabilen Bazı Dokularda Ritmik Faaliyet-Tekrarlayan Deşarjlar	27
1.2.7. Eksitasyon, Aksiyon Potansiyelini Yaratın Olay Dizisi	28
1.2.7.1. Kimyasal Uyarılma	28
1.2.7.2. Mekanik Uyarılma	28
1.2.7.3. Elektriksel Uyarılma	28
1.2.7.4. Katot ve Anod Akımları	29
1.3. Mikroelektrodlar ve Mikropipetler	29
1.3.1. Mikroelektrodlar, Elektrodlar, Mikropipetler, Pipetler ve Pipet Solüsyonları	29
1.3.2. Patch Pipetlerin Yapımı	31
1.3.3. Tek Kanal ve Diğerlerinde Tüm-Hücre Kaydı İçin Pipet Özellikleri	33
1.3.4. Camların Tipleri ve Özellikleri	33
1.3.5. Camların Termal Özellikleri	34

1.3.6. Camların Gürültü Özellikleri	35
1.3.7. Tipik Bir Cam Pipetin Eşdeğer Devresi	36
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	42
2.1. Geliştirilen Sistem	42
2.1.1. Mikropipetlerin Hazırlanması	43
2.1.2. Amplifikatör Devresi	44
2.1.3. Sinyallerin Bilgisayara Kaydedilmesi	47
2.1.4. Termostat	48
2.1.5. Filtre Programı	48
2.2. Deneysel Çalışma	49
3. BULGULAR	52
4. İRDELEME	58
5. SONUÇLAR	59
6. ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	63
9. ÖZGEÇMİŞ	74

ÖZET

Bazı hücre sınıflarının elektrokimyasal aktivitelerinin sonucu olarak biyoelektriksel potansiyeller üretilir. Elektriksel olarak istiharat ve aksiyon potansiyeli ortaya çıkar.

Aksiyon potansiyeli hücre zarının zaman içinde özel iyonlara karşı özellikle sodyum ve potasyuma geçirgenliğinin değişmesiyle ortaya çıkar.

Bu çalışmada, serebellar (beyincik) hücrelerinden tek kanallı mikropipetlerle spontan aksiyon potansiyellerinin kaydı için bir donanım gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu donanımla, anti-psikotik ilaçların bu hücrelere olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Geliştirilen sistem şunları içerir; 1) solüsyondaki iyonik akımı, teldeki elektron akımına dönüştüren mikroeletrod, 2) hücre içine giren mikropipet manipulatör, 3) biopotansiyel sinyallerini yükselten amplifikatör, 4) 50Hz ve onun harmoniklerini süzen filtre, 5) A/D çevirici ve 6) aksiyon potansiyellerini görüntüleyen ve katdeden bilgisayar.

Mikropipet mikromaniplatöre sabitlenir ve mikromaniplatör hareket ettirilerek hücreye girilmeye çalışılır. Hücreye girildiğinde beynin normal çalışması sırasında oluşan aksiyon potansiyeli hem osiloskop ekranında görülür. İstenirse bilgisayara kayıt yapılır. Daha sonra gerçekleştirilen bilgisayar programıyla yapılan kayıtlar filitrelenir ve incelenir.

Bu sistem kullanılarak Sprogue-Dowley sıçanlarından (rat) hem in-vivo hem de in-vitro olarak aksiyon potansiyellerinin kaydını yapmak mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler : Aksiyon Potansiyeli, Membran Potansiyeli, Mikropipet, Yüksek Empedans, Gürültü, purkinje Hücreleri, Beyincik

SUMMARY

Design of a single-channel micropipette amplifier for recording and analysis of action potential

Bioelectric potential are produced as a result of electrochemical activity of a certain class of cells. Electrically they exhibit a resting and action potential.

The origin of the action potential lies in the voltage and time-dependent nature of the membrane permabilities to specific ions, notably sodium and potassium.

In this thesis, a setup was designed to record the spontaneous action potential from the cerebellum cells. This set up was aimed to observed the effect of anti-psychotic drugs on the cells.

The whole steep consist of 1) microelectrode, converting Ionic current in solution into electron currents to the gold wire, 2) the micropipette manipulator, providing insert drift operation into the cells, 3) the amplifier, amplifying the action potential, 4) the high pass filter, suppressing out frequency of 50Hz and its harmonics 5) the A/D converter, and 6) a PC, displaying and storing the action potential.

Micropipette is fixed to manipulator and by moving manipulator it is tried to be entered to cell. When entered to cell, action potential which constituted during normal brain actions is observed on oscilloscope and computer screens. If desired, the data can be stored. Later, records are filtered and examined.

Using this setup we have successfully recorded the action potential from cerebellar purkinje cells. The experiment was done not only in-vivo but also in-vitro.

Key words : Action Potential, Membrane Potential, Micropipette, High Impedance, Noise, Purkinje Cells, Cerebellum

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Ekstrasellüler ve İntrasellüler Sıvıların Kimyasal Bileşimleri	2
Şekil 2.	Yalnız Potasyuma Geçirgen Olan Membrandan Difüzyona Uğrayan Potasyum İyonlarının ve Yalnız Sodyuma Geçirgen Membrandan Sodyum İyonlarının Yarattığı Difüzyon Potansiyeli	3
Şekil 3.	Üç Ayrı Koşulda, Sinir Liflerinde Membran Sükun Potansiyelinin Gelişimi	6
Şekil 4.	Sinir Membranından Na^+ - K^+ Elektrojenik Pompasıyla Sodyum ve Potasyum İyonları Pompalanırken Gelişen Membran Potansiyeli	8
Şekil 5.	Na^+ - K^+ Pompasının Fonksiyonel Karakteristikleri ve Sızma Kanalları	11
Şekil 6.	Bir Aksiyon Potansiyeli Ölçme Yöntemi ve Bu Yöntemle Kaydedilen Tipik Bir Aksiyon Potansiyeli	12
Şekil 7.	Voltaj Kapılı Sodyum ve Potasyum Kanallarının Karakteristikleri	14
Şekil 8.	Özgün Kanallardan İyon Akımını İncelemede Kullanılan Voltaj Klambı Metodu	16
Şekil 9.	Sodyum ve Potasyum İyon Kanallarının İletkenliğinin Membran Potansiyeli 2msn İçin Sükun Değeri Olan -90mv'tan Ani Olarak 10mv'a Çıkışı Sırasındaki Değişimi	17
Şekil 10.	Aksiyon Potansiyelinin İletken Bir Lifte Her İki Yönde Yayılması	24
Şekil 11.	Repolarizasyonun İletken Bir Lifte Her İki Yönde Yayılması	24
Şekil 12.	Tek Kanallı Mikropipetle Tipik Bir Ölçüm	30
Şekil 13.	Bazı Mikropipetlerin Uçlarının Mikroskop Altındaki Görüntüsü	33
Şekil 14.	Değişik Camların Gürültüsel Özellikleri	36
Şekil 15.	Cam Mikropipet Mikroelektrodun Eşdeğer Devresi	37
Şekil 16.	İntrasellüler Ölçümde Seal Direncinin Oluşumu	38
Şekil 17.	İyi ve Kötü Açılmış Delikte Oluşan Seal Direncinin Ölçüme Etkisi	39
Şekil 18.	Aksiyon Potansiyelinin Kaydı İçin Geliştirilen Donanım	42
Şekil 19.	Vakumlama Tekniğiyle Mikropipetlerin Doldurulması	44
Şekil 20.	Instrumentation Amplifikatörün Blok Şeması	45
Şekil 21.	Ölçüm İçin Kullanılan Devrenin Blok Şeması	46

Şekil 22. Baskı Devrede Kullanılan Guard Ring	47
Şekil 23. Termostad Devresi Blok Şeması	48
Şekil 24. Kaydedilen İşaret ve Süzgeçlenerek Aksiyon Potansiyelleri Belirlenen İşaret	51



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hücre İçindeki ve Dışındaki Na ⁺ K ⁺ Konsantrasyonları	12
Tablo 2. Na ⁺ ve K ⁺ 'un Hücre İçi İle Dışı Arasındaki Konsantrasyonlarının Birbirine Oranı	12
Tablo 3. Farklı Camların Kimyasal Yapıları	34
Tablo 4. Krebs Solüsyonunun İçeriği	35



SEMBOL LİSTESİ

- R : elektriksel direnç
 ρ : öz direnç
L : uzunluk
A : alan
C : kapasite
 ϵ_r : herhangi bir malzemenin manyetik geçirgenliği
 ϵ_0 : boşluğun manyetik geçirgenliği
d : uzunluk
f : frekans
E : elektriksel potansiyel
EMF : elektro motor kuvveti

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Vücudun çeşitli bölgelerinin birbiriyle haberleşebilmesi ve benzeri işler için özelleşmiş bazı hücrelerde, özellikle kas ve sinir hücrelerinde istirahat potansiyeli denilen potansiyel farkı devamlı olarak mevcuttur. Bu gibi hücrelerde, hücrenin çeşitli yollarla ya da kendiliğinden oluşan (spontaneous) olaylarla hücre içi ile dışı arasındaki elektriksel potansiyel pozitif ve negatif bir değişim gösterir. Buna aksiyon potansiyeli adı verilir. Bu bölümde, membran potansiyeli, aksiyon potansiyeli, aksiyon potansiyelinin ortaya çıkışı, yayılması ve karakteristiği, bu elektriksel potansiyel farklarının ölçüm yöntemleri hakkında genel bilgiler verilmiştir. Ayrıca, mikropipetlerden, mikropipet solüsyonlarından ve deneyler sırasında beynin in-vitro çalışmalarda içinde saklandığı solüsyondan bahsedilmiştir.

1.2. Membran Potansiyelleri ve Aksiyon Potansiyelleri

Vücudun bütün hücrelerinde membranın (hücre zarı) iki tarafı arasında genliği hücrenin türüne göre farklılık gösteren elektriksel potansiyel mevcuttur. Sinir ve kas hücreleri gibi bazı hücreler ise “uyarılabilir” yani membranlarında elektrokimyasal impulslar yaratarak, bazı hallerde bu impulslar yardımıyla membran boyunca sinyalleri iletebilirler. Bazı hücreleri, makrofajlar ve silyar hücreleri gibi hücrelerde ise membran potansiyelindeki değişikliklerin birçok hücre fonksiyonlarının kontrolünde önemli rol oynaması olasıdır. Ancak burada, uyarılabilir hücreler olan sinir (nöron) ve kas hücrelerinde sükun ve faaliyet sırasında gelişen membran potansiyelleri hakkında bilgi verilecektir [1].

1.2.1. Membran Potansiyellerinin Temel Fiziği

Vücutta intrasellüler bölümdeki hücre içi sıvısı, ekstrasellüler sıvı adı verilen hücre dışı sıvıdan çok farklıdır. Hücreler arasında dolaşan intersitisyel sıvı ve kapiller çeperinden

geçebilen kan plazması ile birlikte ekstrasellüler sıvıyı oluştururlar. Ekstrasellüler sıvı hücrelere fonksiyonları için gerekli besin maddelerini, oksijeni ve öteki gerekli maddeleri sağlar. Fakat hücrelerin bu maddelerden yararlanması için hücre membranından taşınmaları gerekir.

Şekil 1, ekstrasellüler ve intrasellüler sıvıların bileşimlerini yaklaşık olarak göstermektedir. Ekstrasellüler sıvının büyük miktarda sodyum fakat ancak az miktarda potasyum içerdiği görülüyor. İntrasellüler sıvı için bunun tam tersi doğrudur. Ekstrasellüler sıvının fazla miktarda klorür içermesine karşın, intrasellüler sıvı çok az klorür içerir. Fakat intrasellüler sıvıda, organik metabolizma ara maddelerinin hemen hepsinde bulunan fosfat ve protein konsantrasyonu, ekstrasellüler sıvıdan daha yüksektir. İntrasellüler ve ekstrasellüler sıvıların bileşimleri arasındaki bu farklar hücrelerin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için hayati öneme sahiptir.

Ekstrasellüler sıvı		İntrasellüler sıvı	
Na ⁺	142 mEq/l	10 mEq/l	
K ⁺	4 mEq/l	140 mEq/l	
Ca ⁺⁺	5 mEq/l	1 mEq/l	
Mg ⁺⁺	3 mEq/l	58 mEq/l	
Cl ⁻	103 mEq/l	4 mEq/l	
HCO ₃ ⁻	28 mEq/l	10 mEq/l	
Fosfatlar	4 mEq/l	75 mEq/l	
SO ₄ ⁻	1 mEq/l	2 mEq/l	
Glükoz	90 mgm%	0 - 20 mgm%	
Amino asitler	30 mgm%	300 mgm%	
Kolesterol			
Fosfolipitler	0.5 gm%	2 - 95 gm%	
Nötral yağ			
PO ₂	35 mm Hg	20 mm Hg?	
pH	7.4	7.0	
proteinler	2 gm%	16 gm%	

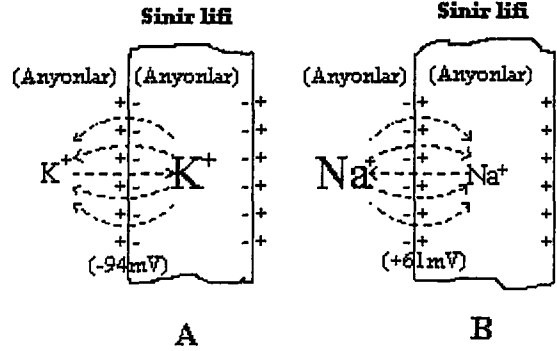
Şekil 1. Ekstrasellüler ve intrasellüler sıvıların kimyasal bileşimleri [1].

Genel olarak negatif iyonların (anyonların) çok küçük bir fazlalığı hemen hücre membranının iç yüzü boyunca Şekil 2 A'da gösterildiği gibi sıralanırken, buna eş sayıda pozitif iyonlar (kasyonlar) da hücre membranının hemen dış yüzeyinde toplanır. Bunun sonucunda hücre içi ile dışı arasında bir membran potansiyeli gelişir.

Membran potansiyelini yaratan nedenler:

1-Membranın iki tarafında iyonların, konsantrasyon farkına dayalı difüzyonu, negatif ve pozitif yükler arasında bir dengesizlik yaratır.

2-İyonların membrandan aktif transportu da yükler arasında dengesizliğe yol açar [1].



Şekil 2. A) yalnız potasyuma geçirgen olan membrandan hücre içinden hücre dışına doğru difüzyona uğrayan potasyum iyonlarının yarattığı, B) yalnız sodyuma geçirgen membrandan sodyum iyonlarının yarattığı difüzyon potansiyeli [1].

Hücre zarlarının ortak özellikleri şunlardır;

- 1- Kalınlığı 70 ile 100 Å⁰ arasındadır.
- 2- Hücre zarları elektriksel olarak yalıtıcıdır ve kapasitesi 1 µF/cm² olan kondansatörlere benzerler.
- 3- Proteinlerden ve çeşitli lipid moleküllerinden yapılmışlardır.
- 4- Su, küçük moleküller ve yağda eriyen maddeler hücre zarından kolayca geçebilirler. Yüklü moleküller ve büyük moleküller hücre zarından geçemezler ya da güçlükle geçebilirler.
- 5- Hücre zarının çeşitli kısımları transport, uyarılma, ileti ve metabolizma gibi fonksiyonlar için özelleşmiştir.

Membranların en önemli fizyolojik özellikleri difüzyon, osmoz ve transport olayları ile açıklanabilir [2].

1.2.1.1. Difüzyonun Yarattığı Membran Potansiyelleri

Şekil 2 A ve B'de sodyum ve potasyum aktif transportu bulunmayan bir sinir lifi görülmektedir. Şekil 2 A'da membranın içinde potasyum konsantrasyonu çok yüksek,

dışında ise düşüktür. Bundan başka membran potasyuma çok geçirgen olduğu halde öteki iyonlara geçirgen değildir. Hücrenin içinden dışına doğru büyük potasyum gradyanı nedeniyle potasyum iyonları dışarıya doğru büyük bir difüzyon eğilimi gösterirler. Difüzyon sırasında potasyum iyonları yükleri dışarı taşıyarak membranın dış yüzünü elektropozitif yaparken, onlarla birlikte büyüklüğü nedeniyle dışarıya doğru difüzyona uğrayamayan negatif anyonlar membranın iç yüzünü elektronegatif yapar. Membranın iki tarafı arasındaki bu potansiyel farkı potasyum iyonlarını dışarıdan içeriye çekme yönünde etkili olur. Hemen hemen bir milisaniye içinde bu potansiyel potasyum iyonlarının dışarıya difüzyonunu durduracak bir düzeye yükselir. Bu noktadaki potansiyele potasyum iyonları için Nernst potansiyeli denir. Şekil 2 B’de aynı etki görülmektedir. Ancak Şekil 2 A’dan farklı olarak, hücre membranının dış yüzeyinde sodyum iyon konsantrasyonu yüksek, içinde ise sodyum konsantrasyonu düşüktür. Bu iyonlarda pozitif yüklüdür. Ancak, bu kez membran sodyum iyonlarına çok geçirgen olduğu halde bütün öteki iyonları geçirmez. Sodyum iyonlarının içeriye doğru difüzyonu şimdi ters yönde, dış tarafta negatif, içte pozitif olmak üzere bir kutuplaşma yaratır. Membran potansiyeli yine bir kaç milisaniye içinde sodyum iyonlarının daha fazla difüzyonunu önleyecek bir düzeye yükselir. Bu andaki potansiyele sodyum iyonları için Nernst potansiyeli denir [1].

Böylece Şekil 2 A ve B’de görüldüğü gibi seçici geçirgen bir membranın iki tarafındaki iyon konsantrasyonları arasındaki fark, uygun koşullar altında membran potansiyelini yaratabilir. Bu bölümde daha sonra inceleneceği gibi, sinir ve kaslarda impuls iletisi sırasında meydana gelen potansiyel değişiklikleri, hızla gelişen difüzyon membran potansiyelinin değişmesi sonucudur [1].

1.2.1.1.1. Nernst Denklemi

Görüldüğü gibi tek bir iyonun konsantrasyon farkı membrandan difüzyona neden olarak membran potansiyelini yaratır. Bu potansiyelin büyüklüğü iyonların bir yönden ötekine doğru difüzyon oranına bağlıdır. Pozitif iyonlar için aşağıdaki formülle bu potansiyel hesaplanabilir:

$$\text{EMF (milivolt)} = -61 \log (\text{kons}_{\text{iç}} / \text{kons}_{\text{dış}}) \quad (1)$$

Böylece, pozitif iyonların membranın içindeki konsantrasyonu dışındakinin on katı ise $\log 10 = 1$ olacak ve potansiyel farkı -61 milivolt bulunacaktır. Bu denkleme Nernst denklemi ve gelişen potansiyele de Nernst potansiyeli adı verilir.

Nernst potansiyelinin difüzyon sonucu olarak gelişmesi için iki koşul gereklidir:

- 1- Membran seçici geçirgen olmalı ve yalnız bir çeşit iyonun difüzyonuna elverişli bulunmalı bütün öteki iyonları geçirmemelidir.
- 2- Geçebilen iyonun konsantrasyonu membranın bir tarafında ötekine göre daha yüksek olmalıdır.

Nernst denklemini kullanarak sinir membranında Nernst potansiyelini hesaplamak için ilk olarak membranın yalnız sodyum iyonlarına, ikinci olarak da, yalnız potasyum iyonlarına geçirgenliğini kabul edelim.

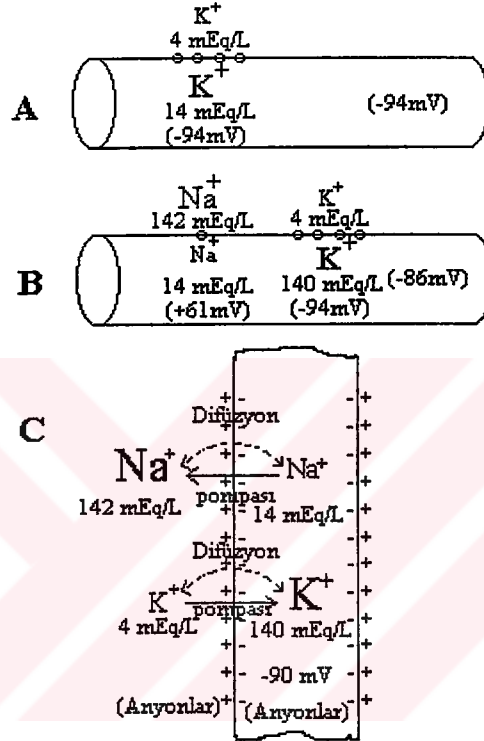
Potasyum iyonlarının sinir lifi içinde normal konsantrasyonu yaklaşık litrede 140mEq gram ve dışında 4 mEq/L gramdır. Bunların oranı 35, $\log 35$ de 1.54 bulunur. Bunu -61'le çarparsak potasyum için Nernst potansiyeli membranın içinde -94 milivolt hesaplanır [1,3].

Şekil 3 A'da membranın yalnız potasyum iyonlarına geçirgen olduğu kabul edilerek bu durum, membranın içi ile dışındaki potasyumlar arasında açık bir kanal temsil edilmiştir. İçerdeki ile dışardaki potasyumlar arasındaki yüksek oran (35/1) nedeniyle, Nernst potansiyeli bu orana uygun olarak -94 mV hesaplanır. Böylece eğer membran istirahat potansiyelini yaratan tek faktör bu olsaydı, potasyumun yaratacağı difüzyon potansiyeli sinir lifinin içinde, sağda gösterdiği gibi, -94 mV olacaktı.

Sodyum iyonlarının sinir membranı içindeki konsantrasyonu yalnız 14mEq/L dışında da 142mEq/L dir. Böylece ikisinin oranı 0.10, $\log 0.10$ da -1.00 olarak hesaplanır. Bunu -61'le çarparsak sodyum için Nernst potansiyeli sinir lifi membranı içinde +61 milivolt bulunur.

Şekil 3 B'de membranın K^+ - Na^+ sızma kanallarından küçük miktarda sodyumun sızmasıyla, yani membranın sodyum iyonlarına çok az da olsa, geçirgen olmasıyla ortaya çıkan durumu göstermektedir. Membranın içi ile dışı arasında sodyum iyonlarının oranı 0.1, buna göre hesaplanan Nernst potansiyeli de içerisi pozitif olmak üzere +61 mV'dir. Fakat Şekil 3 B'de görüldüğü gibi potasyum difüzyonu için Nernst potansiyeli -94 mV'dur. Acaba, bunlar nasıl etkileşir ve sonuçta nasıl bir potansiyeli olduğu ortaya çıkar? Bunun cevabı Goldman denklemiyle daha önce verilmişti. Bunları göz önünde tutmasak da

potasyuma yüksek geçirgenlik gösteren, buna karşın sodyuma çok az geçirgen olan bir membranda, potasyum difüzyonununun sodyum difüzyonundan çok daha fazla membran potansiyeline katkıda bulunması akla yakındır. Normal sinir lifinde membranın potasyuma geçirgenliği sodyumun yaklaşık 100 katı kadardır. İleride göreceğimiz Goldman eşitliğine bu değer yerleştirilirse membranın içindeki potansiyel şeklin sağında görüleceği gibi -86 mV bulunur [1,3].



Şekil 3. Üç ayrı koşulda, sinir liflerinde membran istirahat potansiyelinin gelişimi [1].

Bu nedenle, sinir membranından iyonlar pompalanmadığı takdirde, membran yalnız sodyuma geçirgen olup, bütün öteki iyonları geçirmeseydi, sinir lifi içinde potansiyel +61 milivolt olacaktı. Aksine membran yalnız potasyuma geçirgen olup, öteki iyonları geçirmeseydi membran potansiyeli -94 milivolt olacaktı. Daha ilerideki konularda göreceğimiz gibi sükun koşullarında membran potansiyeli -90 milivolt olup, potasyum Nernst potansiyeli olan -94 milivolta çok yakın bir değerdir. Gerçekten de sükun durumunda membran potasyum iyonlarına çok geçirgen, halbuki sodyum iyonlarına çok az

geçirgendir. Öte yandan bir sinir impulsu iletilirken yani aksiyon potansiyeli varken membran bir saniyenin küçük bir bölümünde sodyuma karşı, potasyumdan çok daha geçirgen olur. Bu saniye dilimi içinde membran potansiyeli yaklaşık +45 milivolta, yani potasyumun Nernst potansiyeline yakın bir değere yükselir.

1.2.1.1.2. Membran Çeşitli İyonlara Geçirgen Olduğunda Difüzyon Potansiyelinin Hesaplanması

Membran farklı bir çok iyonlara geçirgen olduğu zaman gelişen difüzyon potansiyeli üç faktöre bağlıdır:

- 1- Her iyonun elektriksel yükünün çeşidi
- 2- Membranın her iyonla geçirgenliği (P)
- 3- Membranın içindeki (i) ve dışındaki (o) konsantrasyonuna (C).

Aşağıdaki sabit alan denklemi, Goldman-Hodgkin-Katz denklemi ile membranın içinde gelişen membran potansiyeli hesaplanabilir. Burada (Na^+), (K^+) pozitif iyonlarıyla klorür iyonu (Cl^-) tek negatif iyon olarak dikkate alınmıştır.

$$\text{EMF (milivolt)} = -61 \log \frac{C_{\text{Na}^+}^i P_{\text{Na}^+} + C_{\text{K}^+}^i P_{\text{K}^+} + C_{\text{Cl}^-}^o P_{\text{Cl}^-}}{C_{\text{Na}^+}^o P_{\text{Na}^+} + C_{\text{K}^+}^o P_{\text{K}^+} + C_{\text{Cl}^-}^i P_{\text{Cl}^-}} \quad (2)$$

Bu denklemin anlamını ve önemini görelim. İlk olarak, sodyum, potasyum ve klorür iyonları sinir ve kas liflerinde olduğu gibi merkezi sinir sisteminin nöron hücrelerinde de membran potansiyelinin gelişmesine katkıda bulunan en önemli iyonlardır. Bu iyonların membrandaki konsantrasyon gradyanları membran potansiyelinin voltajını saptayan elemanlardır.

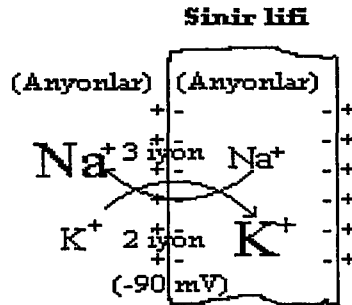
İkinci olarak voltajın belirlenmesinde her bir iyonun önemi, o iyonla karşı membranın geçirgenliği ile doğru orantılıdır. Böylece eğer membran potasyum ve klor iyonlarına geçirgen değilse yalnız sodyumun konsantrasyon gradyanı membran potansiyelini belirler ve gelişen potansiyel sodyumun Nernst potansiyeline eşit olur. Aynı ilke membranın yalnız birine seçici geçirgen olması halinde öteki iyonlar için de geçerlidir.

Üçüncü olarak bir pozitif iyon için membranın içinden dışına doğru bir konsantrasyon gradyanı, membranın içinde elektronegatiflik yaratır. Bunun nedeni içeride daha yüksek konsantrasyonda bulunan pozitif iyonların dışarıya doğru difüzyonu sırasında, pozitif yükleri dışarıya doğru taşıırken, negatif olan anyonları içeride bırakmasıdır. Negatif bir iyon için eğer böyle bir gradyan varsa olay ters yönde gelişir. Yani, dışarıdan içeriye doğru bir gradyana sahip olan klorür iyonları hücre içinde negatiflik yaratır. Çünkü negatif yüklü klorür iyonları içeriye doğru difüzyona uğrarken pozitif iyonları dışarıya bırakır.

Dördüncüsü, daha sonra görüleceği gibi, sodyum ve potasyum kanallarının permeabilitesi sinir impulsunun iletisi sırasında çok hızlı değişirken, klorür kanallarında büyük bir değişme görülmez. Bu nedenle sinir impulslarının iletisinde sodyum ve potasyum geçirgenliğindeki değişiklikler en önemli rolü oynarlar [1].

1.2.1.2. Sodyum Potasyum “Elektrojenik Pompası” ve Aktif Transportun Yarattığı Membran Potansiyelleri

Şekil 4, membran potansiyelinin başka bir yoldan gelişmesini gösteriyor, bu da aktif trasporttur. Sodyum potasyum pompasıyla, 2 potasyum içeriye pompalanırken, 3 sodyum iyonu hücreden dışarıya atılır. Böylece pompanın her siklusunda sinir lifinin iç tarafı bir pozitif yük kaybeder. Membran hücrenin içindeki negatif yüklü iyonların (anyonların) çoğuna geçirgen olmadığı için, bu olayın devamı membranın içindeki negatif yükleri çoğaltacak, dışında da pozitif yükleri arttıracaktır. Şekil 4’te görüldüğü gibi sinir membranının iç yüzü negatif yüklenecektir. Sodyum-potasyum pompasına, böyle bir membran potansiyeli yaratabildiği için elektrojenik pompa da denilmektedir.



Şekil 4. Sinir membranından Na^+ - K^+ elektrojenik pompasıyla sodyum ve potasyum iyonları pompalanırken gelişen membran potansiyeli [1].

Yine, önceki bölümdeki tartışmadan çıkan sonuca göre, hücre membranının iki tarafı arasındaki sodyum ve potasyum gradyanlarından $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompası sorumludur. Yani sodyumun dışarıya doğru sürekli pompalanması sinir lifi içinde sodyum konsantrasyonunu normalde çok azaltırken, potasyum iyonlarının içe doğru pompalanması da hücre içinde potasyum iyonlarının yüksek konsantrasyona ulaşmasına yardımcı olur. Bu bölümde daha sonra görüleceği gibi, birçok sinir impulsları iletildikten sonra, hücre membranından sodyum ve potasyum konsantrasyon gradyanları, aksiyon potansiyelleri sırasında bu iyonların difüzyonu nedeniyle azalır, fakat $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompası hızla, tekrar uygun konsantrasyonları sağlar [1].

Şekil 3 C'de sodyum-potasyum pompasının da ek katkısı görülmektedir. Şekilde sodyum iyonlarının çok az, potasyum iyonlarının çok daha büyük difüzyonu ile, sodyum iyonlarının sürekli olarak dışarıya, potasyum iyonlarının da eş zaman olarak içeriye pompalandıkları görülmektedir. Fakat daha önce söylendiği gibi, pompalanan sodyumla potasyumun oranları $3/2$ 'dir. Sodyum iyonlarının dışarıya pompalanması potasyumun içeriye pompalanmasından daha fazla olduğundan, membranın içindeki pozitif yükler sürekli olarak kaybedilir. Bu da difüzyonun tek başına yaratacağından daha büyük negatifliğe yol açar. Böylece Şekil 3 C'de görüldüğü gibi, net membran potansiyeli bütün bu faktörlerin aynı zamanda etkisiyle -90 mV bulunur.

Özetle, yalnız sodyum ve potasyum difüzyonunun yaratacağı difüzyon potansiyeli membran potansiyelini yaklaşık -86 mV yapacaktı ve bunun hemen hepsi potasyum difüzyonu ile belirlenecekti. Membran potansiyeline -4 mV eklenmesinde $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompalanmasının katkısı vardır, böylece membranın net istirahat potansiyeli -90 mV olur.

Membran istirahat potansiyeli geniş iskelet kas liflerinde, kalın sinir liflerinde olduğu gibi yaklaşık -90 mV'dur. Buna karşın küçük sinir lifleri ve küçük kas liflerinde, örneğin düz kas ve merkezi sinir sisteminin bir çok nöronlarında -90 mV değil -40 ile -60 mV arasında bulunur.

1.2.1.3. Bir Elektriksel Kapasitör Olarak Hücre Membranı

Şimdiye kadar verilen şekillerde daima membran potansiyelini yaratan negatif ve pozitif iyon yüklerini membranın her iki yüzüne dizilmiş olarak gördük. Elektrik yüklerinin sinir lifinin içinde ya da dışında intersitisyel sıvıdaki düzeninden söz edilmedi. Negatif ve

pozitif yükler hücre membranına komşu olanlar dışında, tamamen birbirine eşittir. Buna elektriksel nötrlük ilkesi adı verilir ve her pozitif iyonun yanında onu nötrleştirecek bir negatif iyonun bulunduğunu belirtir. Aksi takdirde sıvılar içinde milyarlarca voltluk elektriksel potansiyel ortaya çıkacaktı.

Pozitif yükler membranın dışına pompalandığı zaman membranın dış yüzünde dizilirken, iç yüzünde onların geride bıraktıkları anyonlar dizilir. Bu membranın dış ve iç yüzleri arasında pozitif ve negatif yüklerden oluşan bir dipol tabakası yaratır. Bunların dışında sıvının her yerine dağılmış eş sayıda pozitif ve negatif yükler bulunmaktadır. Aynı olay bir kondansatörün plakaları elektrikle yüklendiği zaman da görülür. Böylece, pozitif ve negatif yükler plakaları arasındaki yalıtkan membranın karşıt yüzeylerinde dizilirler.

Hücre membranının aşırı inceliği nedeniyle (yalnız 7-10 nm) kapasitesi yüzeyine göre çok büyük, her santimetrekare için yaklaşık 1mikro Faraddır.

Elektrod sinir membranının dışında olduğu zaman kaydedilen potansiyel sıfır olup, ekstrasellüler sıvının potansiyelini göstermektedir. Kaydedici elektrod hücre membranının elektrikselsel dipol tabakasını geçerken potansiyel ani olarak -90 milivolta düşer. Elektrod lifin iç bölümünü geçerken elektriksel potansiyel sabit bir düzeyde kalır, fakat membranın karşıt yüzeyinde tekrar ani olarak sıfıra döner. Sinir membranının bir kondansatör gibi görev yapmasının özellikle bir noktadan büyük önemi vardır. Membranın iç yüzünde negatif bir potansiyelin yaratılması için mutlaka yeteri kadar pozitif iyonun dışarıya taşınarak membranın kendisinde bir elektriksel dipol tabakası yaratılması gerekir. Bu sırada sinir lifi içinde kalanlar hem negatif hem de pozitif olabilir. Sinir lifinin içinde -90 milivolt kadar normal bir potansiyel yaratmak için inanılmayacak kadar az sayıda iyonun aktarılmasının yeterli olduğu görülür. Lifin içindeki tüm pozitif yüklerin ancak 1/500 000 'inin transferi gerekir. Aynı şekilde lifin içine göçen buna eşit az sayıdaki pozitif iyon da -90 milivoltluk potansiyeli saniyenin 1/10 000' i kadar kısa sürede +35 milivolta yükseltir. İyonların bu şekilde hızlı kayması ileride tartışılacağı gibi sinir impulsunu oluşturur [1].

1.2.2. Sinirlerde Membran İstirahat Potansiyeli

Kalın sinir liflerinde membran potansiyeli, sinir sinyalleri iletilmediği zaman yani sükun durumunda yaklaşık -90 milivolt (mV) kadardır. Bu lifin içindeki potansiyelin, lifin dışındaki interstisyel sıvıya göre 90 milivolt daha negatif olduğu anlamını taşır. Bu

potansiyelin oluşunu açıklamadan önce, sükun durumundaki membrandan sodyum ve potasyumun taşınma özelliklerini ele alalım [1].

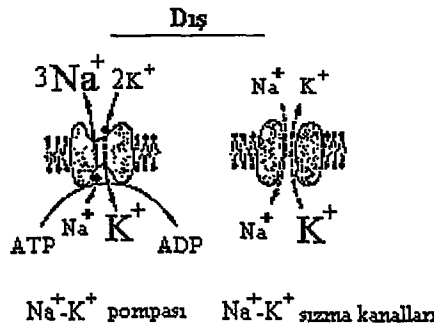
1.2.2.1. Sodyum-Potasyum Pompası, Membrandan Sodyum ve Potasyumun Aktif Transportu

Önceki bölümden hatırlanacağı gibi, vücuttaki bütün hücre membranlarında güçlü bir sodyum-potasyum pompası bulunur ve sodyumu hücre dışına, potasyumu hücre içine pompalar. Bir kere daha hatırlayalım ki, bu bir elektrojenik pompadır. Çünkü pozitif yükleri içeriden daha çok dışarıya pompalayarak, içerde pozitif iyon eksikliği yaratır ve böylece hücre membranının içi negatif yüklenir.

Sodyum-potasyum pompası, sodyum, potasyum için sinir membranında sükun durumunda çok büyük bir konsantrasyon gradyanı yaratır. Bu gradyanlar aşağıdaki gibidir;

1.2.2.2. Sinir Membranından Sodyum ve Potasyum Sızması

Şekil 5'de sağda hücre membranında sodyum ve potasyum iyonlarının sızabileceği kanal tipindeki bir taşıyıcı protein görülmektedir. Bu proteinlerin kanallarına potasyum-sodyum sızma kanalları adı verilmektedir. Potasyum üzerinde durulmasının nedeni, bu kanalların potasyuma normalde sodyumdan 100 kat daha geçirgen olmasıdır. Bu farklı geçirgenliğin normal membran istirahat potansiyelinin oluşumundaki önemi daha sonra tartışılacaktır.



Şekil 5. Na^+-K^+ pompasının fonksiyonel karakteristikleri ve sızma kanalları [1].

Tablo 1. Hücre içindeki ve dışındaki Na^+ K^+ konsantrasyonları [1].

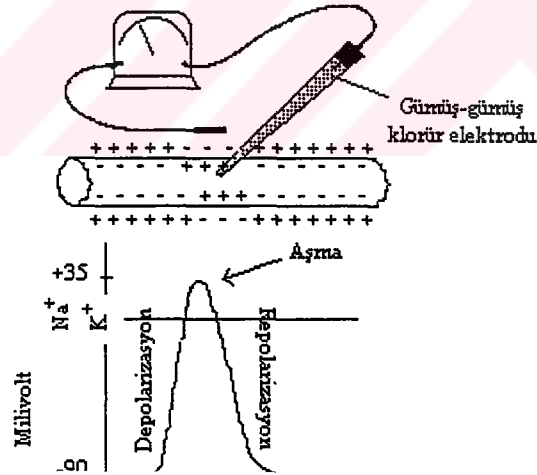
iyon	iç	dış
Na^+	14 mEq/L	142 mEq/L
K^+	140 mEq/L	4 mEq/L

Tablo 2. Na^+ ve K^+ 'un hücre içi ile dışı arasındaki konsantrasyonlarının birbirine oranı [1].

Na^+ iç / Na^+ dış	0.1
K^+ iç / K^+ dış	35.0

1.2.3. Sinir Aksiyon Potansiyeli

Sinir sinyalleri, membran potansiyelindeki hızlı değişimlerden ibaret olan aksiyon potansiyelleri ile iletilir. Her aksiyon potansiyeli normal istirahat potansiyelinin negatif değerden ani olarak pozitif bir değere doğru yükselmesiyle başlar ve hemen hemen aynı



hızla tekrar negatif potansiyele dönüş olur. Aksiyon potansiyelinin oluşabilmesi için eşik bir değerin aşılması gerekir. Bu eşik değer her nöron grubu için değişik olup genelde ortalama 20-30 mV civarındadır. Yani istirahat potansiyelinin 20-30 mV kadar pozitif yöne kayması aksiyon potansiyelinin oluşmasını sağlar. Sinir sinyalinin iletisinde aksiyon potansiyeli sinir lifi boyunca sinir ucuna kadar yayılır. Şekil 6'nın üst bölümünde membranda aksiyon potansiyeli sırasında meydana gelen değişiklikler görülmektedir. Şekilde pozitif yüklerin başlangıçta lifin içine doğru göçtüğü ve sonunda da tekrar dışa doğru döndüğü dikkati çekmektedir. Şeklin alt bölümünde, membran potansiyelinin saniyenin onbinde biri gibi kısa bir süre içinde değişimiyle aksiyon potansiyelinin ani olarak ortaya çıktığı, sükun dönüştün de hemen hemen eşit hızda olduğu belirtilmiştir.

Aksiyon potansiyelinin birbirini izleyen aşamaları aşağıdaki terimlerle belirtilir:

Sükun Dönemi: Aksiyon potansiyelinden önceki istirahat potansiyelini belirtir. Bu aşamada büyük bir negatif membran potansiyeli bulunması nedeniyle, membran polarize durumdadır.

Depolarizasyon Dönemi: Bu sırada membran sodyuma karşı büyük bir geçirgenlik kazanarak, çok büyük miktarda sodyum iyonunun aksonun içine akmasına yol açar. Normal -90 mV'luk "polarize" durum kaybolur ve potansiyel hızla pozitif yönde yükselir. Buna depolarizasyon denir. Kalın sinir liflerinde membran potansiyeli genellikle sıfır düzeyini "aşarak" hafifçe pozitif olur. Fakat bazı küçük lifler ve merkezi sinir sistemi nöronlarının çoğunda potansiyel ancak sıfır düzeyine yaklaşır ve pozitif duruma geçmez.

Repolarizasyon Dönemi: Membranın sodyuma geçirgenliği çok arttıktan sonra, saniyenin onbinde birleri kadar bir süre içinde sodyum kanalları, hemen hemen açıldıkları hızda kapanırlar. Daha sonra potasyum iyonlarının dışa doğru hızlı difüzyonu normal negatif istirahat potansiyelinin tekrar oluşmasını sağlar. Buna membranın repolarizasyonu adı verilir.

Depolarizasyon ve repolarizasyon olaylarını ayrıntılarıyla incelemeden önce sinir membranında bulunan başka tipteki iki taşıma kanalının özelliklerini tanımlayalım:

1.2.3.1. Voltaj-Kapılı Sodyum ve Potasyum Kanalları

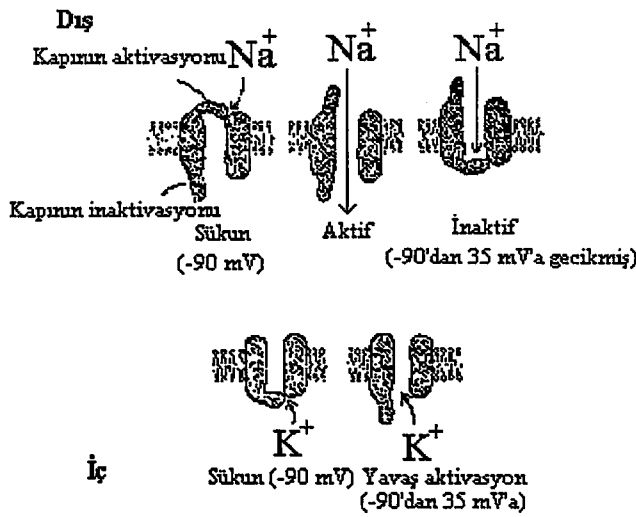
Aksiyon potansiyeli anında sinir membranının depolarizasyon ve repolarizasyonunda baş rolü oynayanlar voltaj kapılı sodyum kanallarıdır. Bunun yanında

voltaj kapılı potasyum kanalları da bazı sinir liflerinde membranın hızlı repolarizasyonu bakımından önemli rol oynar. Bu iki voltaj kapılı kanal, sodyum-potasyum pompasına ve sodyum potasyum sızma kanallarına ek bir görev yaparlar. Voltaj kapılı kanallardan başka mekanik kapılı ve kimyasal kapılı kanallar da mevcuttur [1].

1.2.3.1.1. Voltaj-Kapılı Sodyum Kanalları ve Bunların Aktivasyonu, İnaktivasyonu

Şekil 7'nin üst bölümünde voltajla kapanıp açılan voltaj kapılı kanalların üç ayrı durumu görülmektedir. Bu kanal, biri dış tarafa yakın aktivasyon kapısı öteki de iç tarafa yakın inaktivasyon kapısı adı verilen iki ayrı kapıya sahiptir. Sol tarafta bu iki kapının membran potansiyeli -90 mV olduğu zaman normal sükun halindeki durumu göstermiştir. Bu durumda, aktivasyon kapısı kapalı olduğundan, sodyum iyonlarının bu sodyum kanallarından lifin içine girmesi önlenmiştir. Öte yandan inaktivasyon kapısı açık olduğu için sodyum iyonlarının hareketine engel olmaz.

Sodyum Kanalının Aktivasyonu: Membran potansiyeli sükun durumundan daha az negatif olursa, yani, -90 mV'dan sıfıra yükselirse genellikle -70 ve -50 mV'da aktivasyon kapısında ani bir konformasyon değişikliği yaratarak, onu açık duruma getirir. Aktif durumda denenen bu durumda sodyum iyonları bu kanaldan içeriye akarak, membranın sodyum geçirgenliğini 500-5000 kat artırır.



Şekil 7. Voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanallarının karakteristikleri [1].

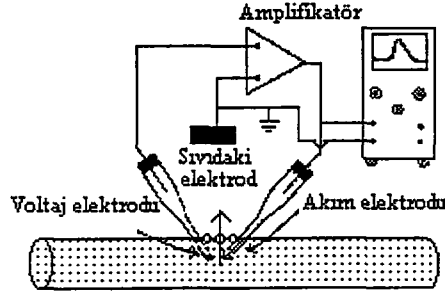
Sodyum Kanalının İnaktivasyonu: Şekil 7'nin üst bölümünde en sağda sodyum kanalının son durumu görülmektedir. Aktivasyon kapısını açan voltaj yükselmesi, inaktivasyon kapısını da kapatır. Ancak, inaktivasyon kapısının kapanması aktivasyon kapısının açılmasından saniyenin onbinde birleri kadar sonra meydana gelir. Yani, inaktivasyon kapısını kapanmış duruma geçiren konformasyon değişikliği yavaş bir olay olduğu halde, aktivasyon kapısını açan konformasyon değişikliği çok hızlı bir olaydır. Bu nedenle, sodyum kanalı, saniyenin onbinde birleri kadar açık kaldıktan sonra, ani olarak kapanır ve sodyum iyonları artık membranın içine akamaz. Bu anda membran potansiyeli tekrar sükun durumuna doğru dönmeye başlayarak repolarizasyon olayı gerçekleşir.

Sodyum kanalının çok önemli karakteristiği, inaktivasyon kapısının, membran potansiyeli tam başlangıç istirahat potansiyeli düzeyine ya da ona yakın bir değere dönünceye kadar tekrar açılmamasıdır. Böylece sodyum kanallarının, sinir lifi repolarize olmadan tekrar açılması mümkün değildir.

1.2.3.1.2. Voltaj-Kapılı Potasyum Kanalları ve Aktivasyonları

Şekil 7'nin alt bölümünde voltajla açılıp kapanan potasyum kanallarının iki ayrı durumu görülmektedir: Membran sükun durumunda aksiyon potansiyeli sırasında. Sükun durumunda potasyum kanalının kapısı kapalıdır. Şeklin sol tarafında görüldüğü gibi potasyum iyonlarının dışarıya çıkması engellenir. Membran potansiyelinin -90 mV 'dan sıfıra doğru yükselmesi, kapının yavaşça açılmasını sağlayacak bir konformasyon değişikliği yaratır ve bu potasyumun membrandan dışarıya doğru difüzyonunu artırır. Ancak potasyum kanallarının açılmasındaki yavaşlık nedeniyle bu açılma sodyum kanallarının inaktivasyonla kapanmasına rastlar. Böylece sodyumun hücreye girişi azalırken, aynı zamanda potasyumun hücreden çıkışı repolarizasyon olayını çok hızlandırır ve potansiyel saniyenin onbinde birleri kadar bir süre içinde tamamen istirahat

ve Huxley Nobel ödülüne layık görüldüler. Bu çalışmaların ilkesi Şekil 8 ve 9'da görülmektedir.



Şekil 8. Özgün kanallardan iyon akımını incelemede kullanılan voltaj klampı metodu [1].

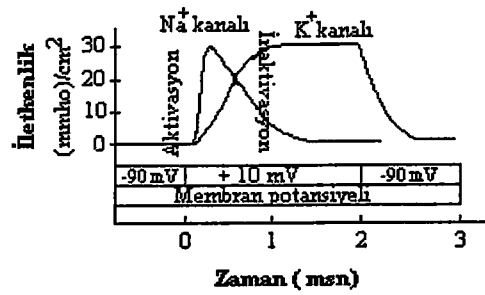
Şekil 8'de farklı kanallardan iyon akımlarını ölçmek için kullanılan ve voltaj klampı adı verilen deneysel düzenek görülmektedir. Şimdi bu voltaj klampını açıklayalım. Sinir lifine iki elektrod sokulu. Bunlardan biriyle membran potansiyelinin voltajı ölçülür. Ötekisiyle sinir lifinin içine yahut bu liften dışarıya doğru elektrik akımı verilir. Bu cihaz şu şekilde kullanılır: Araştırmacı sinir lifi içinde hangi voltajı yaratacağına karar verir, sonra aygıtın elektronik bölümünü istenen voltaja ayarlar. Önceden operatör tarafından saptanan değerdeki voltajı sabit tutmak için gereken pozitif ya da negatif elektrik akımı, otomatik olarak akım elektrodu ile gönderilir. Gönderilen voltaj düzeyi de voltaj elektrodu ile ölçülür.

Örneğin, eğer membran potansiyeli bu voltaj klampı ile -90 mV'dan ani olarak sıfıra yükselirse, voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanalları açılarak, sodyum ve potasyum bu kanallardan akmaya başlar. Bu sırada voltaj klampının akım elektrodundan da intrasellüler voltajı sıfır düzeyinde tutacak elektrik akımı enjekte edilir. Bunu sağlamak için, akım elektrodundan enjekte edilen akımın, membran kanallarından net akıma tam eşit, fakat ters yönlü olması gerekir. Her an için ne kadar akım geçtiğini ölçmek üzere akım elektrodu bir osiloskoba bağlanarak, akım şeklindeki gibi, osiloskop ekranında gözlenir. Nihayet araştırmacı sinir lifinin iç ve dışında iyonların konsantrasyonunu ayarlayarak deneyi tekrarlar.

Bu deney ilk olarak yumuşakçalardan mürekkep balığının dev aksonunda yapılabilmektedir. Eğer bu aksonun iç ve dışına membrandan geçen iyon olarak sodyum

konursa voltaj klampı yalnız sodyum kanallarından geçen akımı ölçer. Eğer membrandan geçen iyon olarak yalnız potasyum bulunursa, potasyum kanallarından geçen akım ölçülür.

Belirli kanallardan iyon akımını incelemek için uygulanan başka bir yöntem de aynı tipteki kanalları kapatan maddeleri ayrı ayrı uygulamaktır. Örneğin, sodyum kanalları, sodyum aktivasyon kapılarının bulunduğu hücre membranının dış yüzeyine uygulanan tetradotoksin adı verilen bir zehirle inaktif edilir. Tetraetilamonyum iyonu ise sinir lifinin içine uygulandığı zaman potasyum deliklerini kapatır.



Şekil 9. Sodyum ve potasyum iyon kanallarının iletkenliğinin membran potansiyeli 2msn için sükun değeri olan -90mV'dan ani olarak 10mV'a çıkışı sırasındaki değişimi [1].

Şimdi, potasyum kanallarının açılışındaki (aktivasyon) farkı görelim. Bunlar yavaş açılarak, ancak sodyum kanalları tamamen kapanmış duruma geçtikten sonra tam açık duruma geçerler. Bundan başka potasyum kanalları bir kere açıldıktan sonra pozitif membran potansiyeli süresince açık kalıp membran potansiyeli tekrar -90 mV'a düşünceye kadar kapanmazlar.

Voltaj kanallarının normalde açık ya da kapalı duruma ani olarak geçtiklerini hatırlarsak, Şekil 9'daki eğrilerin böyle düzgün eğimini nasıl açıklayabiliriz? Bu sorunun cevabı, eğrilerin binlerce kanaldan aynı zamanda sodyum ve potasyum iyonlarının akışını temsil etmeleridir. Bunların bazıları, bir voltaj düzeyinde, ötekiler başka bir voltaj düzeyinde açılırlar. Aynı şekilde, inaktivasyon da değişik kanallarda farklı noktalarda olur. Böylece eğriler birçok kanallardan akımın toplamını göstermektedir.

1.2.3.2. Aksiyon Potansiyelini Yaratan Olayların Özeti

Aksiyon potansiyelini ve hemen ondan sonra birbirini izleyen olayları göstermektedir. Bunlar şöyle sıralanabilir:

En altta membranın sodyum ve potasyum iyonlarına geçirgenliğindeki değişimler görülmektedir. Sükun durumunda aksiyon potansiyeli başlamadan önce, potasyum iyonlarına iletkenlik, görüldüğü gibi, sodyum iyonları iletkenliğinin 50-100 katı kadar büyüktür. Bu potasyum iyonlarının, sızma kanallarından sodyum iyonlarına göre çok daha fazla geçişine bağlıdır. Aksiyon potansiyelinin başlangıcında sodyum kanalları ani olarak aktive olup, sodyum iletkenliğini 5000 kat artırır. Daha sonra, inaktivasyon olayı hemen aynı çabuklukta, milisaniyenin birkaç bölümü içinde sodyum kanallarını kapatır. Aksiyon potansiyelinin başlaması, voltaj kapılı potasyum kanallarının da sodyum kanalları açıldıktan sonra, milisaniyenin bölümleri içinde açılmaya başlamasına neden olur. Aksiyon potansiyelinin sonunda membran potansiyelinin negatif duruma dönmesiyle, potasyum kanalları da tekrar orjinal durumlarına dönerek, kısa bir gecikmeden sonra kapanırlar.

Aksiyon potansiyelinin başlangıç bölümünde sodyum iletkenliğinin potasyum iletkenliğine oranı 1000 kattan fazla artar. Böylece, potasyum iyonlarının dışarı akışından çok daha fazla sodyum iyonu life girer. Bu da membran potansiyelini pozitif yapar. Bu sırada sodyum kanalları inaktive olmaya başlarken, potasyum kanalları açılır. İletkenlik oranı potasyum iletkenliği lehine artarken, sodyum iletkenliği düşer. Bu da potasyum iyonlarının son derece hızlı kaybına götürür; bu sırada içeriye hemen hemen sodyum akışı yoktur. Sonuçta aksiyon potansiyeli hızı sıfır düzeyine iner.

Membran potansiyelinin aksiyon potansiyeli bittikten sonra, birkaç milisaniye için orjinal membran istirahat potansiyelinden daha da negatif oluşu dikkat çekicidir. Buna pozitif artpotansiyel adı verilir fakat aslında bu ismin verilmesi yanlıştır. Çünkü pozitif

artpotansiyel aslında istirahat potansiyelinden daha negatiftir. Ama buna “pozitif” denilmesi eskiden, ilk olarak potansiyel ölçümlerinin sinir membranının içinden değil dışından yapılmasına dayanır. Böyle ölçümlerde bu potansiyel pozitif tarafa kayma şeklinde kaydedilir.

Pozitif artpotansiyelin başlıca nedeni, membranda repolarizasyon olayı tamamlandıktan sonra birçok potasyum kanalının birkaç milisaniye açık kalmasıdır. Böylece potasyum iyonları sinir lifinden dışarıya çıkararak içeride pozitif iyonları daha da eksiltip negativiteyi artırmaktadır.

1.2.3.3. Aksiyon Potansiyeli Sırasında Öteki İyonların Rollerini

Şimdiye kadar aksiyon potansiyelinin oluşumunda yalnız sodyum ve potasyum iyonlarının rollerini dikkate aldık, halbuki en az üç başka tipteki iyonun da göz önünde tutulması gerekir. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

1.2.3.3.1. Akson İçindeki Membrandan Geçemeyen Negatif Yüklü İyonlar

Akson içinde membran kanallarından geçmeyen birçok negatif yüklü iyon vardır. Bunlar arasında protein molekülleri, birçok organik fosfat bileşikler, sülfat bileşikler vb. sayılabilir. Bunlar, aksondan çıkmadıkları için, membranın içinde pozitif iyonların azalması, membrandan geçmeyen iyonların negatif yüklerini artırır. Bu nedenle liflerin içindeki negatif yükten, membrandan geçemeyen negatif iyonlar sorumludur.

1.2.3.3.2. Kalsiyum İyonları

Vücuttaki hücrelerin hemen hepsi de, belki tümü, membranlarında sodyum pompasına benzeyen kalsiyum pompasına sahiptir. Bunlar sodyum pompası gibi kalsiyum iyonlarını hücre membranının içinden dışına pompalayarak, yaklaşık 10000 katlık bir kalsiyum iyon gradyanı yaratır. Hücre içindeki kalsiyum iyon konsantrasyonu 10^{-7} molar, dışardaki konsantrasyon da 10^{-3} molar düzeyinde tutulur.

Bunlara ek olarak, voltaj kapılı kalsiyum kanalları da vardır. Bu kanallar kalsiyum iyonlarına olduğu gibi sodyum iyonlarına da hafifçe geçirgendir. Açıldıkları zaman hem kalsiyum hem de sodyum iyonları lifin içine akar. Bu nedenle bu kanallara $Ca^{+2}-Na^{+}$ kanalları adı verilir. $Ca^{+2}-Na^{+}$ kanalları çok yavaş aktive olduklarından, aktivasyonları normal sodyum kanallarından 10-20 kat uzun sürer. Bunun için çoğu kez normal sodyum kanallarına hızlı kanallar denirken, bunlara yavaş kanallar adı verilir.

$Ca^{+2}-Na^{+}$ kanalları kalp kası ve düz kaslarda çok sayıda bulunur. Gerçekten bazı düz kas çeşitlerinde hızlı sodyum kanalları hemen hiç yoktur ve yalnız yavaş $Ca^{+2}-Na^{+}$ kanallarının aktivasyonu aksiyon potansiyelini yaratır.

1.2.3.3.3. Kalsiyum İyonlarının Eksikliğinde Sodyum Kanallarının Geçirgenliğinin Artması

Sodyum kanalları aktive edildiği sırada voltaj düzeyi üzerine interstisyel sıvıdaki kalsiyum konsantrasyonunun etkisi çok büyüktür. Kalsiyum iyonları eksikliğinde, sodyum kanalları, membran potansiyelinin normal sükun düzeyi üzerine hafifçe yükselmesiyle kolayca aktive olur. Böylece eksitabilitesi çok artan sinir lifleri bazen sükun durumunda kalmayarak, hiçbir uyarı olmadan tekrarlayan deşarjlar gösterirler. Bir çok periferik sinirde spontan deşarjların meydana gelmesi için kalsiyum iyon konsantrasyonunun normalin % 30-50 altına inmesi yeterlidir. Bu deşarjlar aşırı olursa kaslarda "tetani" yaratarak, solunum kaslarındaki tetanik kontraksiyonlarla ölüme götürebilirler. Öte yandan kalsiyum iyon konsantrasyonunun normalin üstüne çıkması sinir liflerinde eksitabiliteyi azaltır.

Kalsiyum iyonlarının, sodyum kanallarına etkisi şöyle açıklanabilir: Bu iyonlar, sodyum kanallarının protein molekülerinin dış yüzüne tutunurlar. Kalsiyum iyonlarının pozitif yükleri kanal proteininin elektriksel durumunu değiştirerek, kapıları açmak için gerekli voltaj düzeyini yükseltirler.

1.2.3.3.4. Klorür İyonları

Klorür iyonları da istirahat halindeki membranda sodyum ve potasyum iyonları gibi az miktarda sızma gösterirler. Normal sinir lifinde potasyum iyonlarının hemen yarısı

göre klorür için Nernst potansiyeli aktif pompalanmayan bir iyon için beklendiği gibi -90 milivoltluk membran potansiyeline tam eşittir.

Aksiyon potansiyeli sırasında, içerdeki negatifliğin geçici olarak kaybı sonucu az miktarda klor iyonu sinir lifinin içinde difüzyona uğrar. Klor iyonlarının bu hareketi aksiyon potansiyeli sırasında elektriksel potansiyel değişikliğindeki zamanlamayı hafifçe değiştirirse esas olayı etkilemez.

1.2.3.4. Aksiyon Potansiyelinin Başlaması

İlk olarak, sinir lifinin membranına bir etki olmadıkça normal sinirde aksiyon potansiyeli gelişmez. Membran potansiyelini -90 milivoltluk düzeyinden sıfıra doğru değiştirecek olayların hepsinde voltajın yükselmesi ve eşik değere ulaşılması, voltaj kapılı sodyum kanallarını etkileyerek aktive olmalarına (açılmalarına) neden olur. Bu sodyum iyonlarının hızla içeriye akışına yol açarak membran potansiyelinin daha da yükselmesine, böylece daha çok voltajla açılıp kapanan sodyum kanalının açılmasına ve lifin içine sodyum akışına neden olur. Pozitif feedback (geri besleme) bir kısır döngü ile voltaj kapılı sodyum kanallarının tümü tam aktive oluncaya kadar bu olay devam eder. Fakat daha sonra milisaniyenin birkaç bölümü içinde yükselen membran potansiyeli sodyum kanallarında inaktivasyon yaratır ve aksiyon potansiyeli hemen sona erer.

1.2.3.4.1. Aksiyon Potansiyelinin Başlaması İçin Eşik Değer

Son paragrafta açıklandığı gibi membran potansiyeli kısır döngüyü yaratacak belirli bir noktaya gelinceye kadar aksiyon potansiyeli meydana gelmez. Genellikle membran

potansiyelinde 15-30 milivoltluk ani bir yükselme gerekir. Kalın bir sinir lifinde membran potansiyelinin -90 milivolttan ani olarak -65 milivolta yükselmesi birden aksiyon potansiyelinin gelişmesini sağlar. Bu -65 milivoltluk düzeye sinir hücresinin eşik değeri denir.

1.2.3.4.2. Membranda Uyum, Voltaj Yükselmesine Rağmen Aksiyon Potansiyelinin Doğmaması

Eğer membran potansiyeli milisaniyenin bir bölümü içinde değil de, birçok milisaniyede, çok yavaş yükselirse, aktive edici sodyum kanallarının aktive edici kapıları açılırken inaktive edici kapılarına da kapanmak için gerekli zaman kalır. Sonuçta inaktive edici kapıların bir çoğu kapanmış olacağından, aktive edici kapılar normalde, sodyum iyon akımını sağlayamazlar. Böylece, sinir lifinin iç potansiyelinin yavaş artışı nedeniyle normal deşarjın başlayabilmesi için bazen daha yüksek bir eşik voltajı gerekir, bazen de voltaj sıfıra hatta pozitif değere bile yükselse deşarj tamamen engellenmiş olur. Bu olaya membranın uyarana uyumu (akomodasyonu) denir.

1.2.3.5. Bileşik Aksiyon Potansiyeller

Karışık sinirlerin, tek aksonların aksine, bir başka özelliği de aksiyon potansiyelinde çok sayıda tepe noktasının görünmesidir. Çok tepeli aksiyon potansiyele bileşik aksiyon potansiyel denir. Tek bir şekli vardır, çünkü karışık bir sinir farklı iletim hızlarındaki lif türlerinden ibarettir. Bu nedenle, tüm lifler uyarıldığında, hızlı ileten liflerdeki aktive kaydedici elektrodan ne kadar uzak olursa, hızlı ve yavaş liflerin tepeleri arasındaki ayırım o kadar büyük olur. Tepelerin sayısı ve büyüklüğü çalışılan o sinirdeki liflerin tipine göre değişir. Maksimum uyarandan daha az güçte uyarın kullanılırsa bileşik aksiyon potansiyelin şekli de uyarılan liflerin tipine ve sayısına bağlıdır [4].

1.2.4. Aksiyon Potansiyelinin Yayılması

Geçen paragraflarda aksiyon potansiyelinin bir noktada doğuşu ele alındı. Ancak uyarılabilen bir membranın herhangi bir noktasında doğan aksiyon potansiyeli, membranın

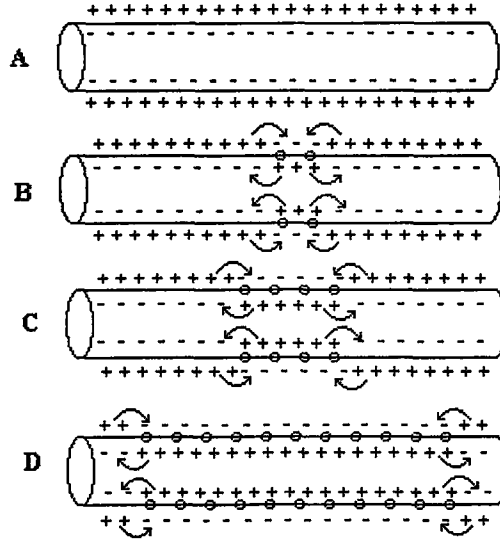
komşu bölgelerini de uyardığından, aksiyon potansiyeli yayılır. Şekil 10 A'da normal sükun halinde bir sinir lifi görülmektedir. Şekil 10 B'de ise sinir lifinin orta bölgesi uyarılmış, yani orta bölgede sodyum geçirgenliği birden artmıştır. Oklar membranın depolarize alanları ile, sükun halindeki komşu membran alanları arasında gelişen “yerel devreleri” işaret etmektedir. Pozitif elektrik yükleri depolarize membranda içeriye doğru akarak aksonun içinde birkaç milimetre boyunca ilerler. Bu pozitif yükler kalın liflerin içinde 1-3 milimetre kadar uzaklıktaki voltajı eşik değerini üstüne yükselterek aksiyon potansiyelini başlatır. Böylece Şekil 10 C ve D'de gösterildiği gibi bu yeni alanlardaki sodyum kanalları derhal aktive olur ve birden başlayan aksiyon potansiyeli yayılır. Bu yeni depolarize alanlar membranın daha uzak bölgeleri arasında yerel devreler yaratarak membran boyunca gittikçe daha çok depolarizasyon alanları yaratıp, lif boyunca her iki yönde depolarizasyonun yayılmasını sağlar. Depolarizasyon işleminin sinir ya da kas lifinde yayılmasına sinir ya da kas impulsu denir.

1.2.4.1. Yayılmanın Yönü

Görülüyor ki uyarılabilen membranda tek bir yayılma yönü yoktur. Aksiyon potansiyeli uyarılan bölgeden başlayarak her iki yönde, hatta sinir lifinin bütün dalları boyunca, membran tümüyle depolarize oluncaya kadar yayılır. Ancak bu sinir sisteminde uyarının her iki yöne de gidebileceği anlamına gelmez. Nöron üzerindeki dentritler kapasitör vazifesi görerek akımın ters yöne doğru ilerlemesini engellerler. Bu yüzden sinir sistemindeki sinirsel iletinin yönü tek yönlüdür.

1.2.4.2. Hep ya da Hiç İlkesi

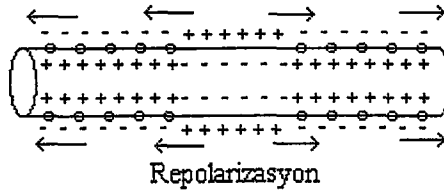
Açıkça görülüyor ki, normal bir lif membranının herhangi bir noktasında bir kere aksiyon potansiyeli başladıktan sonra depolarizasyon olayı bütün membrana yayılır. Bu hep ya da hiç ilkesi bütün normal uyarılabilen dokulara uygulanabilir. Bazen sinirin anormal bir durumu nedeniyle aksiyon potansiyeli bir noktaya ulaştığı zaman membranda komşu bölgeleri uyarmaya yeterli voltajı yaratamaz. Bu durumda depolarizasyonun yayılması duraklar. Bu nedenle impulsun normal yayılması için, aksiyon potansiyelinin uyarma eşik değerine oranını belirten güvenlik faktörü daima birden büyük olmalıdır.



Şekil 10. Aksiyon potansiyelinin iletken bir lifte her iki yönde yayılması [1].

1.2.4.3. Repolarizasyonun Yayılması

Normalde aksiyon potansiyelinin sinirin her noktasından geçiş zamanı aynı sürede olur. Bu nedenle repolarizasyon normalde ilk olarak orjinal stimulus bölgesinden başlayarak, daha önce depolarizasyonun yayıldığı yönlerde membran boyunca yayılır. Şekil 11’de, Şekil 10’daki sinir lifinde repolarizasyonun, depolarizasyon yönünde fakat saniyenin onbinde birleri kadar bir zaman sonra yayılışı görülmektedir.



Şekil 11. Repolarizasyonun iletken bir lifte her iki yönde yayılması [1].

1.2.5. Aksiyon Potansiyelinden Sonra Lif Membranının “Tekrar Yüklenmesi” ve Enerji Metabolizmasının Önemi

Sinir lifi boyunca her impuls iletisi membranın içi ile dışı arasında sodyum ve potasyum konsantrasyonları arasındaki farkı azaltır. Çünkü depolarizasyon sırasında

sodyum iyonları içeriye, repolarizasyonda da potasyum iyonları dışarıya difüzyona uğrar. Tek bir aksiyon potansiyelinin bu etkisi ölçülemeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, konsantrasyon farkı aksiyon potansiyelinin iletisini durduracak bir düzeye inmeden sinir lifinde 100.000-500.000 impuls iletebilir. Öyle olsa bile, membrandaki sodyum ve potasyum konsantrasyon farkları zamanla tekrar sağlanır. Bunu sağlayan Na^+ - K^+ pompasının çalışma biçimi aynen, önceki bölümde tanımlanan orjinal istirahat potansiyelinin oluşumundaki gibidir. Öyle ki, aksiyon potansiyeli sırasında hücrenin içine geçen sodyum iyonları ve dışına difüzyona uğrayan potasyum iyonları sodyum ve potasyum pompası yardımıyla orjinal durumuna dönerler. Bu pompanın çalışması için enerji gerektiğinden, sinir lifinin bu “tekrar yükleme” işlemi bir aktif metabolik olaydır. Gerekli enerji hücrede adenzin trifosfattan (ATP) sağlanır.

Membrandaki sodyum potasyum ATP-az pompasının önemli bir özelliği de hücre membranı içinde sodyum iyonlarının artmasıyla kuvvetle uyarılmasıdır. Gerçekten, pompalama aktivitesi sodyum konsantrasyonunun üçüncü kuvvetiyle orantılı olarak artar. Öyle ki, içteki sodyum konsantrasyonu litrede 10’dan 20 mEq’a çıkarsa pompanın aktivitesi yalnız iki kat değil, yaklaşık sekiz kat artar. Bu nedenle, membranda sodyum ve potasyum konsantrasyonları arasındaki fark azalmaya başlar başlamaz sinir lifinin ne kadar hızla tekrar yüklenmeye başladığını anlamak kolaydır.

1.2.6. Sivri Potansiyel ve Art-Potansiyeller

Sivri Potansiyel: A tipi kalın miyelinli sinir liflerinde aksiyon potansiyeli ancak 0.4 milisaniye sürer. Sivri potansiyel önceki paragrafta ele alınan aksiyon potansiyeliyle aynıdır. Buna aynı zamanda sinir impulsu da denir.

Negatif Art-Potansiyel: Sivri potansiyelin bitmesinden sonra membran potansiyeli bazen birkaç saniye daha sükun düzeyine dönemez. Bu özellikle bir seri yüksek frekansdaki aksiyon potansiyelinden sonra görülür. Negatif artpotansiyel adı verilen bu potansiyelin, hiç değilse kısmen, membranın hemen dışında artan potasyum iyonlarının membranındaki potasyum konsantrasyon farkını kısa bir süre geçici olarak azalması sonucu ortaya çıktığı, böylece birkaç milisaniye için membran potansiyelinin normal sükun değerine dönemediği kabul edilmektedir.

Pozitif Art-Potansiyel: Membran potansiyeli, sükun değerine döndükten sonra normal sükun değerine göre biraz daha negatif olur. Bu pozitif art potansiyel daha önce tartışıldı. Normal istirahat potansiyeline göre 1 milivoltan daha az ya da birkaç milivolt daha negatif olan bu potansiyel 50 milisaniyeden birçok milisaniyeye kadar sürebilir.

Pozitif art potansiyelinin ilk bölümü sinir membranının daha önce tartışıldığı gibi, potasyum iyonlarına artan permeabilitesi sonucudur. Bununla beraber, bu potansiyelin uzayan süresi başlıca, daha önce tartışıldığı gibi, sodyum fazlasının sinir lifi membranından elektrojenik pompa yardımıyla dışarı atılmasına bağlıdır. Eğer aktif transportla tekrar doldurma olayı duraklatılırsa pozitif art potansiyelin bu bölümü kaybolur [1].

1.2.6.1. Bazı Aksiyon Potansiyellerindeki Düzlük

Bazı durumlarda uyarılabilen membran, depolarizasyondan sonra hemen repolarize olmaz. Fakat sivri potansiyelin tepesine yakın bir düzeyde, repolarizasyon başlamadan birçok saniye süren bir düzlük (plato) çizer. Böyle bir plato depolarizasyon süresini çok uzatır. Kalpte görüldüğü gibi saniyenin onda üçü-dördü kadar sürebilen bu platoya sahip aksiyon potansiyeli bu zaman süresinde kalp kasının kontraksiyonuna neden olur.

Aksiyon potansiyelindeki platonun oluşumunda bir çok faktör rol oynar. İlk olarak kalp kasındaki depolarizasyon olayında iki ayrı tipteki kanalın katkısı vardır:

1- Bilinen voltajla aktive olan sodyum kanalları, hızlı kanallar ve

2- Voltajla aktive olan ve yavaş bir aktivasyon gösteren kalsiyum-sodyum kanalları.

Kalsiyum iyonlarıyla birlikte biraz sodyum iyonunun da difüzyonunu sağlayan bu kanallara yavaş kanallar adı da verilir. Hızlı kanalların aktivasyonu, aksiyon potansiyelinin sivri bölümünü yaratırken yavaş kanalların, yavaş fakat uzayan aktivasyonu aksiyon potansiyelinin plato bölümünü oluşturur.

Düzlükten kısmen sorumlu olan başka bir faktör de bazı uyarılabilen dokulardaki voltaj kapılı potasyum kanallarının çok yavaş aktive olmaları ve platonun sonuna kadar açılmamalarıdır. Bu, membran potansiyelinin sükun değerine dönüşünü geciktirir. Fakat sonra, potasyum kanallarının açılmasıyla birlikte yavaş kanalların kapanmaya başlaması platonun sonunda aksiyon potansiyelinin hızla düşerek negatif sükun durumuna inmesini sağlar.

1.2.6.2. Uyarılabilen Bazı Dokularda Ritmik Faaliyet, Tekrarlayan Deşarjlar

Bütün uyarılabilen dokularda eğer uyarın için eşik değeri yeteri kadar düşmüşse tekrarlayan deşarjlar görülür. Örneğin, normalde yüksek düzeyde kararlılık gösteren sinir ve iskelet kası lifleri eğer veratrin içeren bir eriyiğe konursa ya da kalsiyum iyon konsantrasyonu kritik bir değerin altına inerse tekrarlayan deşarjlar yaparlar. Tekrarlayan deşarjlar ya da ritmik faaliyet normalde kalpte düz kaslarda ve merkezi sinir sisteminin birçok nöronunda görülür. Bu ritmik deşarjlar kalp vurumlarını, peristaltik dalgalar ve solunumun ritmik kontrolünde olduğu gibi sinirsel olayları yaratırlar.

Ritmik Faaliyet İçin Gerekli Tekrar-Uyarılma Olayı: Ritmik faaliyetin oluşması için membranın doğal durumunda da sodyum iyonlarına (ya da Ca^{+2} - Na^{+} yavaş kanallarından kalsiyum ve sodyum iyonlarına) yeteri kadar geçirgen olması gerekir. Böylece membranın otomatik depolarizasyonu sağlanır. Membran yalnız -60, -70 milivoltluk bir istirahat potansiyeline sahiptir. Bu negatif voltaj sodyum ve Ca^{+2} - Na^{+} kanallarını kapalı tutmaya yeterli değildir. Öyke ki,

- 1- Sodyum ve kalsiyum iyonları içeriye doğru akar
- 2- Bu membran permeabilitesini daha arttırır
- 3- Daha fazla iyon içeri akar
- 4- Permeabilite daha da artar

ve böylece devam ederek, aksiyon potansiyeli doğuncaya kadar sodyum ve sodyum-kalsiyum kanallarının açılması sağlanır. Daha sonra aksiyon potansiyelinin bitiminde membran repolarize olur. Fakat kısa bir süre sonra depolarizasyon olayı tekrar başlayarak yeni aksiyon potansiyeli spontan gelişir. Bu dönemsel olay tekrar tekrar gelişmeye devam ederek uyarılabilen dokularda spontan, ritmik kendi kendini yaratan eksitasyonları sürdürür.

Acaba membran niçin repolarizasyondan hemen sonra depolarize olmuyor ve ondan sonraki aksiyon potansiyelinin başlaması hemen hemen bir saniye kadar gecikiyor. Her aksiyon potansiyelinin sonuna doğru başlayarak kısa bir süre için devam eden dönemde membranın potasyuma geçirgenliğinin ileri derecede artar. Potasyum iyonlarının dışarıya büyük miktarda akışı, pozitif yüklerin membran dışına çıkmasını sağlar. Böylece, lifin içinde aksiyon potansiyelinin bitiminde, beklenenden daha negatif, potasyumun denge potansiyeline yakın bir değeri gözlenir. Bu duruma hiperpolarizasyon

denmektedir. Bu durumda tekrar uyarılma mümkün olmaz fakat potasyum iletkenliğinin (hiperpolarizasyon durumunun) bu yüksek değeri yavaş yavaş kaybolarak, membran potansiyeli eksitasyon için eşik değere yükselip yeni bir aksiyon potansiyeli doğar ve bu olay tekrar tekrar devam eder.

1.2.7. Eksitasyon, Aksiyon Potansiyelini Yaratan Olay Dizisi

1.2.7.1. Kimyasal Uyarılma

Temelde, yeterli sayıda sodyum iyonunun membrandan içeriye difüzyonunu sağlayan herhangi bir faktör sodyum kanallarının daha önce bildirildiği gibi, otomatik ve geri dönüşümlü açılmasını sağlayan aksiyon potansiyelini başlatır. Böylece bazı kimyasal maddeler sinir lifini membran permeabilitesini yükselterek uyarabilir. Bunlar arasında asitleri, bazları ve hemen bütün yüksek konsantrasyondaki tuz eriyiklerini ve daha önemlisi asetilkolini sayabiliriz. Bir çok sinir lifleri uyarıldıkları zaman öteki nöronlarla sinaps yapan uçlarında ya da kas liflerindeki sonlanma bölgelerinde asetilkolin salgılar. Asetilkolin de o nöron ya da kas liflerinde 0.6-0.7 nm çapındaki membran deliklerini sodyumun (öteki iyonların da) kolayca geçebileceği kadar genişletir. Bu kimyasal kapılı kanalların aktivasyonu ile olur.

1.2.7.2. Mekanik Uyarılma

Bir sinir lifinin ezilmesi ya da sıkıştırılması, sodyumun ani içe akışı ile bir aksiyon potansiyeli yaratabilir. Bazı özelleşmiş sinir uçlarına uygulanan hafif bir basınç onları uyarabilir.

1.2.7.3. Elektriksel Uyarılma

Bir sinire dışardan uygulanan elektrik akımı da akson membranından büyük bir iyon akımı yaratarak aksiyon potansiyelini başlatabilir. Ancak elektriksel uyarın her zaman eksitasyon yaratmaz. Laboratuvar incelemelerinde sinir liflerini uyarmak için genellikle kullanılan bu yöntemin dikkatle uygulanması gerekir.

1.2.7.4. Katod ve Anod Akımları

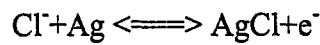
Eğer bir sinir üzerine bir elektrod pozitif, öteki negatif olmak üzere, iki elektrod direkt olarak uygulanıp, elektrik akımı geçirilirse sinir lifleri “katod” adı verilen negatif elektrodda uyarılır. Öte yandan “anod” adı verilen pozitif elektrodda sinir lifleri eksitasyona normalden daha dirençli olur. Bu nedenle katot akımının sinir lifini eksite ettiği, anod akımının ise inhibe ettiği söylenir.

Bunun nedeni şöyle açıklanabilir: Hatırlanacağı gibi, aksiyon potansiyeli voltaj kapılı sodyum kanallarının açılmasıyla başlar. Bu kanallar da membranın elektrikselsel potansiyelinin azalmasıyla açılır. Katottaki negatif akım membranın hemen dışındaki potansiyeli azaltarak, lifin içindeki negatif membran istirahat potansiyeline yakın bir değere doğru düşürür. Membrandaki elektrikselsel potansiyelin bu azalması, sodyum kanallarının aktivasyonu sonucu aksiyon potansiyelini başlatır. Aksine, anodda sinir membranının dışına pozitif yüklerin verilmesi, membrandaki voltaj farkını azaltmak yerine yükseltir bu “hiperpolarizasyon” durumu da lifin eksitabilitesini azaltır.

1.3. Mikroelektrodlar ve Mikropipetler

1.3.1. Mikroelektrodlar, Elektrodlar, Mikropipetler, Pipetler ve Pipet Solüsyonları

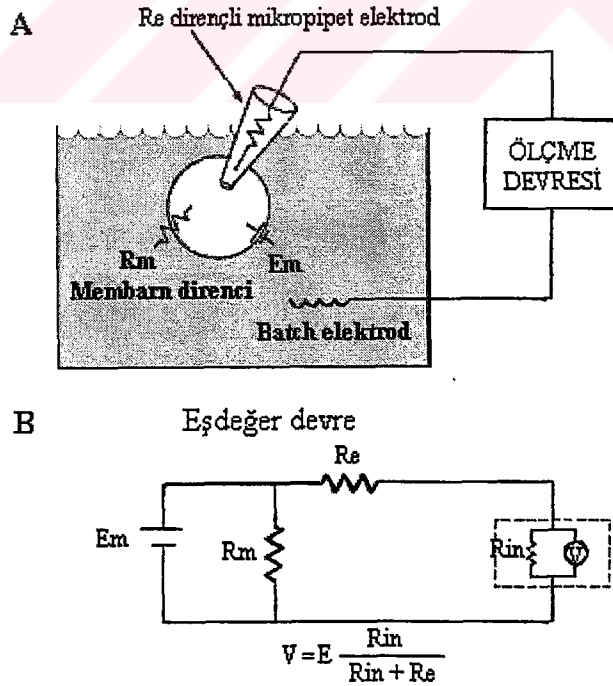
Elektrodlar içine batırıldıkları solüsyondaki iyonik akımı, iletken teldeki elektron akımına çevirirler. Elektrodlar solüsyondaki iyonlardan biriyle geri dönüşebilen reaksiyona girebilecek maddelerden yapılırlar. Elektrofizyolojide en çok kullanılan elektrod materyali gümüş (Ag) ve gümüş-klorürdür (AgCl). Bu elektrodda, klor iyonları (Cl⁻) gümüşle gümüş-klorür ve bir elektron oluşturmak için ya da bir elektron gümüş-klorürle (AgCl) gümüş (Ag) ve klor iyonu (Cl⁻) oluşturmak için tepkimeye girerler. Böylece aşağıdaki geri dönüşebilir reaksiyona uygun olarak solüsyonda klorür iyonları (Cl⁻) tarafından oluşturulan akım elektrodda elektron akımına dönüştürülür [5].



Bu elektronların birindeki elektriksel potansiyel standart elektrokimyasal potansiyele $Ag/AgCl$ artı $RT/F(aCl^-)$ eşittir. Burada R gaz sabiti ($8.314 \text{ VCK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T Kelvin cinsinden mutlak sıcaklık, F Faraday sabiti ($9.648 \times 10^4 \text{ Cmol}^{-1}$) ve Cl^- 'un aktivitesi yani efektif konsantrasyonudur. Eğer birbirine bağlanmış elektrodlar, klor konsantrasyonu eşit solüsyonlara daldırılırsa aralarındaki potansiyel farkı sıfır olur. Bu konsantrasyonlar deney boyunca sabit tutulmalıdır. Yoksa bir offset voltajı oluşacaktır.

$AgCl$ -kaplamalı Ag tel intrasellüler mikroeletrodlar ve patch mikroeletrodları pipet solüsyonuyla doldurulmuş cam mikropipetlerin içine yerleştirilir. Elektrolit solüsyon, hücreden elektroda sıvı bağlantısı sağlar. Yani pipetler ya da mikropipetler bu sıvı köprüsüne geometrik şeklini vermiş olur.

Pipet solüsyonunun ne olacağı yapılacak ölçümün türüne bağlıdır. Hücre zarını korumak için kullanılan standart hücre içi mikroeletrodlar yüksek konsantrasyonlu bir elektrolit solüsyon ile doldurulmalıdır (genellikle 2-4 M $NaCl$ veya KCl). Yüksek konsantrasyonlu elektrolit elektrod direncini azaltır. Bu ise rectifying (düzeltme) akışını azaltır, daha düşük gürültü gerilimi ve kayıt yapmak için daha geniş bir band genişliği sağlar. Konsantre bir solüsyon pipet solüsyonu ve hücre stoplazması arasındaki sıvı eklem potansiyelini baskın hale getirir ve sonuçta anyonların ve katyonların relativ hareketine



Şekil 12. Tek kanallı mikropipetle tipik bir ölçüm [5].

bağlı olan bir eklem potansiyeli oluşturur. Bu, DC gerilimlerin ölçümleri için önemlidir. Çünkü sitoplazma anyonları düşük hareketli iyonlardır. Fakat katyonlar küçüktürler ve hızlı hareket edebilirler. Hücre içindeki anyon ve katyonların hızlarındaki bu fark pozitif bir sıvı eklem potansiyeli oluşturur. Konsantre pipet solüsyonu önemlidir çünkü, sıvı eklem potansiyelinin gelişimini sağlar. Fakat konsantre solüsyon kullanmanın bir dezavantajı da vardır. Hücre içine girebilir ve hücrenin bozulmasına ve normal anyon, katyon miktarlarını değiştiren bir hiper osmotik yük üretebilir. Çok küçük çaplı pipetler konsantre solüsyonun hücre içine girmesini engellerken, aynı şeyi gürültünün yok edilmesi için de yaparlar, fakat akımın geçme yeteneğini azaltırlar ve band genişliğini sınırlarlar.

Hücre içi mikroelektrodun çapıyla (0.01-0.1 μ m) karşılaştırıldığında patch pipetin çapı (1-2 μ m) çok daha büyüktür. Doldurma solüsyonunun seçimi yapılacak özel deneye bağlıdır. Eklem potansiyel etkilerini azaltmak için çok dikkat edilmelidir. Pipet içeri sokulduğunda, bir eklem potansiyeli oluşur. Bunun büyüklüğü iyonların hareketlerine ve konsantrasyonlarına bağlıdır. Eklem potansiyeli hücre içinde değişir.

Bir patch pipetin içindeki solüsyon, pipetin arkasına bir tüp bağlayarak deney sırasında değiştirilebilir. Tüp içine farklı solüsyonlar enjekte edilebilir. Tüp, pipetin hemen yakınına yerleştirildiğinde solüsyon kısa bir difüzyon gecikmesinden sonra pipetin ucuna ulaşır. Bu işlem özel bir ayar gerektirir. Bu teknik standart hücre içi mikroelektrodlara uygulanamaz. Çünkü küçük boyutları yüzünden, tüp yeteri kadar yakın yerleştirilemez.

Pipet, Ag/AgCl veya altın (Au) elektrod ve uygun bir konnektör içeren bir taşıyıcıya yerleştirilir. Taşıyıcı, düşük gürültülü bir materyalden yapılır. Akson parçaları taşıyıcıları düşük gürültü veren polikarbonattan yapılır. HL-1-17 ve HL-2-17 taşıyıcıları, 1.5-1.7 mm dış çaplı bir elektroda sahiptir. HL-1-12 ve HL-2-12 taşıyıcıları 1.0-1.2 mm dış çaplı elektroda sahiptir. Bu pipet boyutu Ag telden yapılmış bir elektroda gerek duyar. Basit fakat etkili bir örtme işlemi, gümüş teli iyi kum kağıdı kullanarak temizlemek ve temizlenmiş teli 20-30 dakika için Chloroks beyazlatıcının içinde bekletmektir [5].

1.3.2. Patch Pipetlerin Yapımı

Patch pipetlerin yapımı için kullanılan cam 0.2-0.3 mm kalınlığa sahiptir. İnce bir duvar daha düşük elektriksel gürültü üretir. Birçok araştırma sırasında 1.5-2.0 mm dış çapa ve 1.15-1.2 mm iç çapa sahip camlar kullanılır.

Patch pipetler de standart intrasellüler mikropipetler gibi hücreye girebilmek için kör delme denemelerine ihtiyaç duyarlar ve genellikle tek bir işlemde yeteri kadar yerlerine itilmeleri mümkün olmaz. Bir çok laboratuvar standart yatay pipet sürücülerini çok evreli pipet sürücüsü olarak değiştirmiştir.

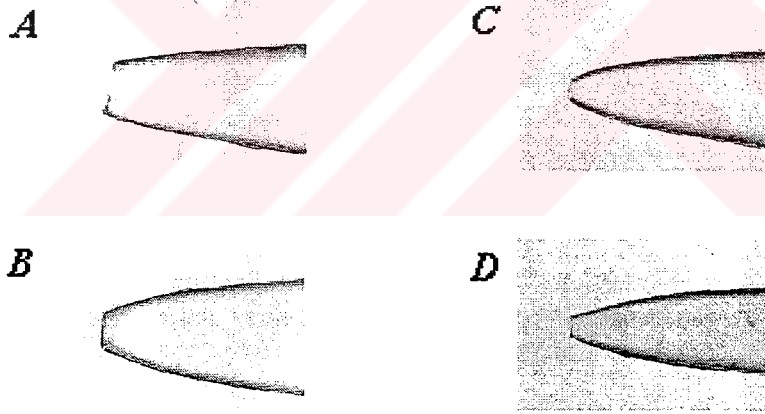
En düşük gürültü değeri için, patch pipetler hidrophobik bir materyalle sarılmalıdır. Böylece gürültü kaynağı sınırlandırılmış olur. Çok sık kullanılan bir bileşik Dow Corning Sylgard #184'dür. Camı Sylgard'la kaplamak ayrıca camın elektriksel özelliklerini de değiştirir. Üreticinin talimatları doğrultusunda Sylgard solüsyonu hazırlandıktan sonra küçük, iyi kapatılmış santrifüj tüplerinde dondurucuda haftalarca saklanabilir.

Pipet hücre içine girerken membranda açtığı delikten intrasellüler ve ekstrasellüler sıvı arasında oluşan delik (seal) direncini (şekil 16) gigaohmlara çıkarmak ve delme işlemi sırasında ucun hücre içine girme olasılığını arttırmak için ucu firepolish edilmelidir. Firepolish işlemi mikromaniplatöre pilatinyum iridyum kablo bağlanmasıyla yapılabilir. Bu kablonun son kısmı, platin kablodan akım geçişine izin verecek akım ya da gerilim kaynağına bağlanabilmesi için iki uca ayrılmalıdır. Bu platin halka genellikle çok ince bir saç kılı gibi kıvrılır ki böylece karmaşık bir mikroskopla direkt inceleme için elektrod ucunun birkaç mikronuna getirilsin. Yeterli bir görünürlük için 600x-1500x büyütme gereklidir. Platin kablo genellikle paraziti engellemek için Pyrex veya Corning #7052 gibi bir camla kaplanır. Bu işlem platin kabloyu aşırı ısıtıp pipet ucunun çekilmiş bir parça pipet camının içine itilerek yapılır. Yüksek sıcaklıkta cam erir, platin üzerine akar ve onu kaplayarak sonlanır. Elektrod ucu camla kaplanmış kablo yanına yerleştirildikten sonra, ısıtmak için bundan akım geçirilir. Bu işlem için gerekli akım miktarı pipetin oluşturduğu camın yumuşama sıcaklığına bağlıdır. Sıcak platin kablo elektrod ucunu ısıtır ve bu pürüzlü ve keskin köşeli yüzeylerin pürüzsüz hale gelmesine sebep olur.

Şekil 13'de mikropipetlerin yapım aşamalarının dördü görülmektedir. A firepolishten önce oocyte mikropipettin görünüşü, B firepolishten sonra oocyte mikropipettin görünüşü, C firepolish ve kesme işleminden sonra myocyte mikropipettin görünüşü, D firepolishten sonra myocyte mikropipettin görünüşü (kesme işlemi uygulanmamış) [5].

1.3.3. Tek Kanal ve Diğerlerinde Tüm-Hücre Kaydı İçin Pipet Özellikleri

Tek kanal ve tüm hücre kaydı için kullanılan pipetlerin bazı özellikleri benzer olduğu halde diğer özellikleri tamamen farklıdır. En önemlisi, gürültünün azaltılması tek kanal kaydında tüm hücre kaydına oranla çok daha önemli olmasıdır. Tüm hücre kaydındaki baskın gürültü kaynağı tüm hücre kapasitesiyle ilişkili pipet direncidir. Pipetin gürültü iştiraki çok fazla önemli değildir. Tüm hücre akım kaydı için yeterli band genişliğini sağlamak ve emir gerilim hatalarını sınırlamak için, tüm hücre kaydında kullanılan pipet dirençleri megaohmları geçmemelidir. Tek kanal kayıta pipet direncini sınırlamak gerekmez. Yine de birkaç mega ohm'a kadar pipet direncini arttırmak anlamlı bir gürültü artışına sebep olur. Tek kanal ve tüm hücre kaydının her ikisinde de voltaj adımlarını takip eden kapasite akımları zamanda yeterince küçük ve basit olmalıdır ki araştırmacıya basit patch-klamp yükselteç devreleriyle bunları kompanze etmeye izin verebilsin. Buna ilaveten, ister tek kanal isterse tüm hücre kaydı için kullanılsın pipetler camdan yapılmış olmalıdır [5].



Şekil 13. Bazı mikropipetlerin uçlarının mikroskop altındaki görüntüsü [5].

1.3.4. Camların Tipleri ve Özellikleri

Patch klamp pipet camları, yapıldıkları sıcaklıklara ve kendi elektriksel özellikleri ve kimyasal içeriklerine göre sınıflandırılabilirler. Bu özelliklerin çoğu üreticiler tarafından başlıklanmıştır. Böylece özelliklerine bakarak en etkili olan camı seçmek mümkün olabilir.

Camların elektriksel ve temel özelliklerinin birbiriyle ilgili olmadıklarına dikkat ediniz. Sylgard, tabloda gösterilen birçok camdan daha fazla elektriksel özelliğe sahiptir. Bu yüzden Sylgard'la sarılmış pipetler elektriksel özelliklerini geliştirirler. Tablo 3, hangi camların kanal akımlarını etkilediğini bulmak için kullanılabilir [5].

Tablo 3. Farklı camların kimyasal yapılarından birkaçının örneği [5].

Cam	SiO ₂	B ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	PbO	BaO	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	Li ₂ O
7070	70.7	24.6	1.9	---	---	0.2	0.8	0.8	---	---	0.56
8161	38.7	---	0.2	---	51.4	2.0	0.3	0.04	0.2	6.6	---
7059	50.3	13.9	10.4	---	---	25	---	---	0.08	---	---
7760	78.4	14.5	1.7	---	---	---	0.1	0.1	2.7	1.5	---
EG-6	54.1	---	1.0	3.9	27.1	---	0.1	0.1	3.4	9.2	---

1.3.5. Camların Termal Özellikleri

Düşük sıcaklıklardaki camlar yüksek sıcaklıklardaki camlara göre pipetlerin yapımında daha fazla avantajlara sahiptirler. Bu camlar için düşük-filamen akımı gerektiği için, filamenler özelliklerini değiştirirler. Bu camlarla yapılan pipetler diğer yüksek sıcaklıklardaki camlarla yapılanlardan daha iyidirler. Ayrıca, hücre zarına doğru bastırarak delme işlemi sırasında kör-sivrilmiş pipetler hücre içine girmede daha fazla güçlük çıkarırlar. High-lead camlar en düşük sıcaklıkta yumuşar ve firepolish işlemine iyi uygulanabilir. Böyle düşük sıcaklıklarda pipetleri çekmek mümkündür. Uçları kırık ve pürüzlü pipetler, 50µm çaplı uç haline getirilebilir ve kolaylıkla firepolish yapıp kullanılabilir patch pipetleri yapılabilir. Sonuçta oluşan uçlar kör olduğu halde , bu pipetler sıkı bir delik oluşturmada etkilidirler ve pipet direnci 0.5 MΩ'dan küçüktür.

Kör uçlar delikli patch kaydı için çok faydalıdır. Çünkü bunlar membranın omega şekilli parçacıkları üzerine çizim yapma yeteneğine sahiptirler. Omega şekli membranın büyük yüzey alan ampoterisin B veya nistatin tarafından oluşturulan birçok paralel kanalı maximize eder. Böylece elde edilebilir son Ra'yı minimize eder. Delikli patch kaydı için kullanılan birçok pipet borosilikat camından yapılır. Bu camlar 700-850°C aralığında

yumuşar. Bu aralığın alt limitindeki camlar kolaylıkla çekilebilir olmalarına rağmen yüksek limitteki camlar kadar iyi değildirler. Yüksek limitteki camlarla karşılaştırıldığında borosilikat camların firepolish işlemindeki başarısı daha çok yumuşamadan sonra elde edilen ucun şekline bağlıdır. Fakat çok seviyeli olmasının avantajıyla ve hesaplanabilen pipet çekicileriyle herhangi bir kimse hem patch hem de tüm hücre pipetlerini herhangi bir camdan yapabilir [5].

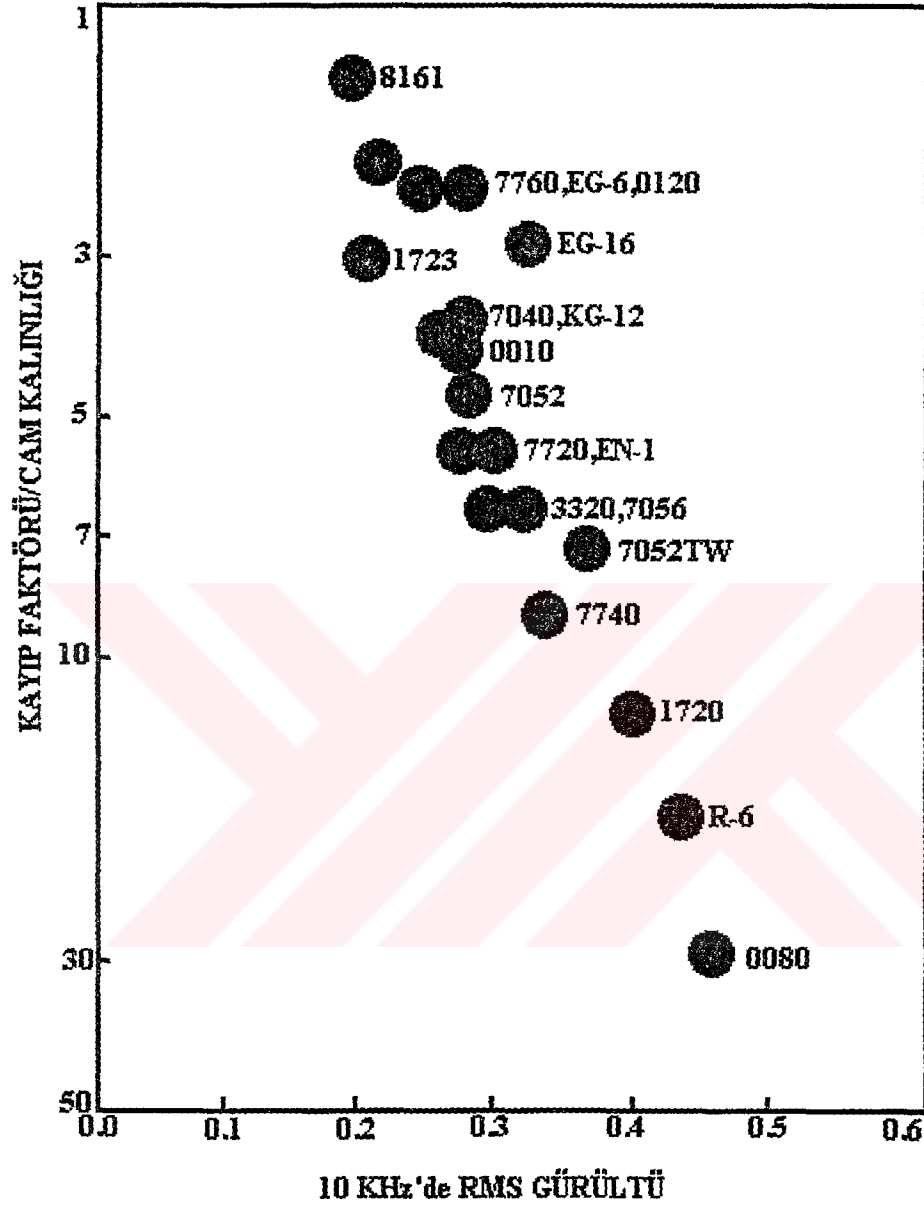
Aleminyumsilikat camlar yüksek yumuşama sıcaklığına sahip çok sert camlardır. Bunlar tek kanal kayıtlarında düşük gürültü üretirler. Fakat, bunların düşük gürültüleri yüksek fiyat getirir. Bu sınıftaki camlar 800°C'in üzerinde yumuşarlar ve bunları çekmek pipet çekici filamentlerini ve bobinleri epeyce eskitir. Bundan dolayı bobinlerin zamanla özellikleri değişir ve değiştirilmeleri veya sık sık yeniden ayar yapılmalıdır. Buna ilaveten, aleminyumsilikat'dan yapılan camlar çekmeden sonra istenmeyen ince duvarlı uçlar meydana getirir. Bu, camların firepolish edilebilmelerini yumuşak camlara oranla daha zor kılar.

1.3.6. Camların Gürültü Özellikleri

Tek kanal patch klamp için kullanıldığında bir camın üreteceği gürültüyü azaltmanın kolay bir yolu olmadığı halde, bir patch pipetin gürültüsünün kendi kayıp faktörüyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Kayıp faktörü camın dielektrik özelliklerini açıklamak için cam üreticileri tarafından kullanılan bir parametredir. Şekil 14 bir patch pipetin gürültüsünün camın kayıp faktörüyle ilişkisini göstermektedir. Değişik camlardan yapılmış, ucun 100µm'si kadar Sylgard'la kaplanmış ve solüsyonla doldurulmuş patch pipetler akıcı dolu kabın dibinde yatan Sylgard'la kaplanır. RMS gürültü, bir rms metre ile hemen banyo üzerinde havadaki pipetle ve daha sonra tekrar Sylgard'la kaplanmış pipetle ölçülür. Şekildeki 10KHz rms gürültü, havada ölçülmüş gürültüden, Sylgard'la kaplanmış pipetle ölçülen gürültüden çıkarılarak hesaplanmıştır.

Camdan uygun tekniklerle patch pipet imal etme olayı geliştirilirse, Corning 7070 (düşük elektriksel kayıplı) veya Corning 1724 (aleminyumsilikat) camından imal edilen bu pipetin gürültüsü iyileştirilebilir. Şekil 14'de gösterilen gürültü değerleri tek kanallı Axopatch 200'den elde edilen değerlerden daha yüksektir. Çünkü onun kapasitif ana

safhası standart resistif ana safhadan daha düşük gürültü üretir. Görüldüğü gibi gürültü düşünce diğer elektriksel bileşenler de aynı şekilde düşer [5].

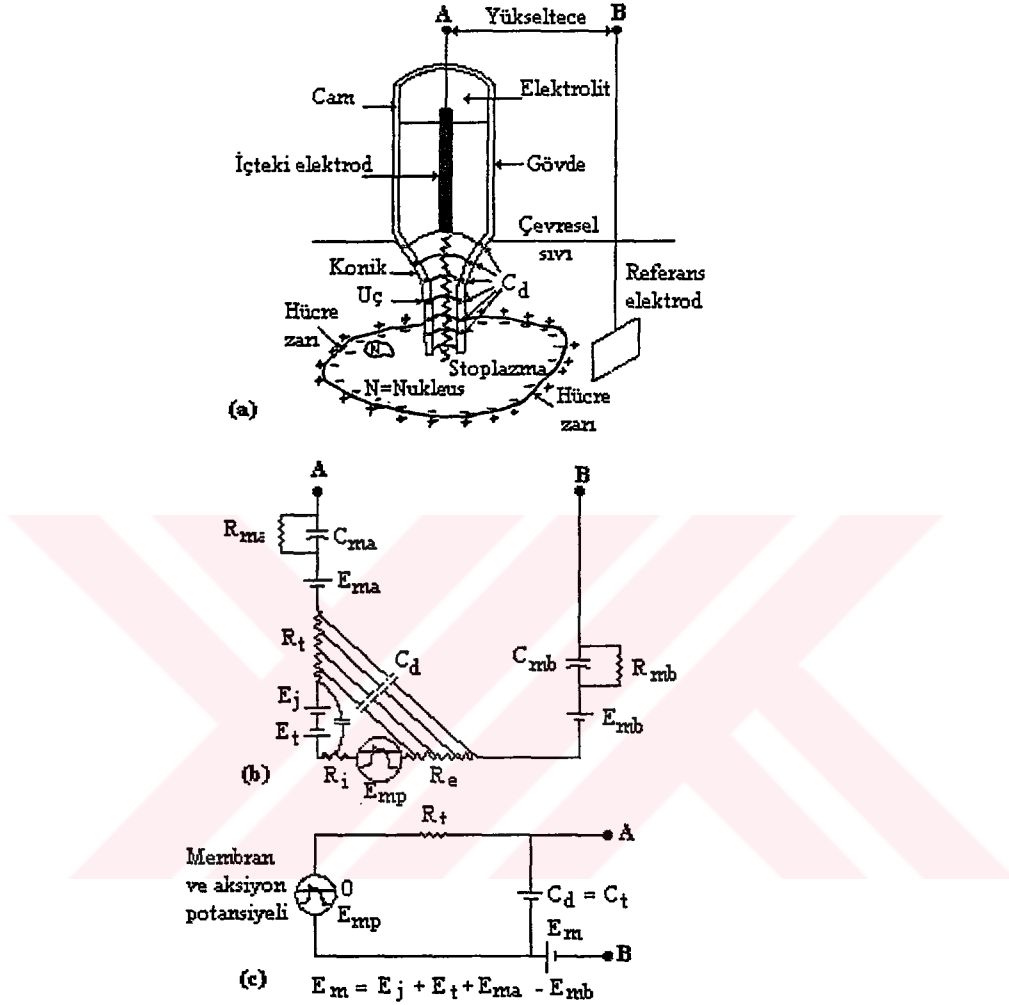


Şekil 14. Değişik camların gürültüsel özellikleri [5].

1.3.7. Tipik Bir Cam Mikropipetin Eşdeğer Devresi

Şekil 15'de bir cam intrasellüler mikropipetle yapılmaya çalışılan tipik bir membran potansiyeli ya da aksiyon potansiyeli kaydının yaklaşık modeli ve bu modelin elektriksel eşdeğer devresi görülmektedir. Şekil 15 (c)'de görülen devrede hücre içi sıvı olan

intraselüler sıvıyla mikroeletrod arasında elektriksel bağlantıyı sağlayan ve geometrik şekli mikropipet tarafından oluşturulan pipet solüsyonu sıvı köprüsünün oluşturduğu direnç R_t ile gösterilmiştir. Bu direnç, mikropipet solüsyonunun konsantrasyonuna, yukarıda

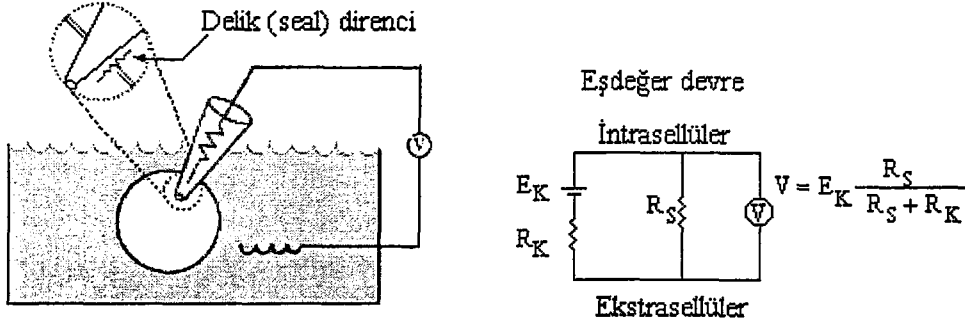


Şekil 15. Cam mikropipet mikroeletrodun eşdeğer devresi [6].

bahsedildiği gibi elektriksel bağlantıyı sağlayan sıvı köprüsünün kesit alanına ve uzunluğuna bağlıdır ve 1-100M Ω arasındadır. Mikropipetin sıvı ortamın içine giren kısmında (gerek ekstraselüler, gerekse de intraselüler sıvı) oluşan ve şekilde dağılmış olarak gösterilen kapasite ise eşdeğer devrede C_t ile gösterilmiştir. C_t kapasitesinin değeri on pikofaradlar mertebesinde ve bu değer mikropipetin duvar kalınlığı, pipet hammaddesi olan cam çeşidinin dielektrik sabiti, kayıp faktörü, pipetin sıvıya giren

kısımının uzunluğu ve benzeri parametreler tarafından belirlenir. Son olarak da oluşan tüm d.c. potansiyelse E_m ile gösterilmiştir.

$$E_m = E_j + E_t + E_{ma} - E_{mb} \quad (3)$$



Şekil 16. İntrasellüler ölçümde seal direncinin oluşumu [5].

Bu d.c. potansiyeller mikroeletrod ile pipet solüsyonu arasında, pipet solüsyonuyla intrasellüler sıvı arasında (bu iki sıvı arasındaki d.c. potansiyeli iki sıvıdaki konsantrasyon seviyesi ve iyonların hızları belirler) referans elektroduyla ekstrasellüler sıvı vs. arasında oluşular [6].

Görüldüğü gibi mikropipetin hücreye girmesiyle bir alçak geçiren filtre oluşur. Bu filtre kayıt bandgenişliğini sınırlar. Örnek olarak tipik değerlerle bu band genişliğini hesaplamaya çalışalım. Tipik değerler şöyle olsun;

pipet ucunun dış çapı	1.5 μ m
pipet ucunun iç çapı	1.0 μ m
sıvı köprüsünün uzunluğu	3mm
pipet solüsyonunun öz direnci	2.0 Ω cm
camın dielektrik sabiti	1.82

Direnç hesabı için aşağıdaki fomülü kullanalım;

$$R = \rho \frac{L}{A} \quad (4)$$

Bu formülde;

ρ : dielektrik sabiti

L : direnci hesaplanacak materyalin boyu

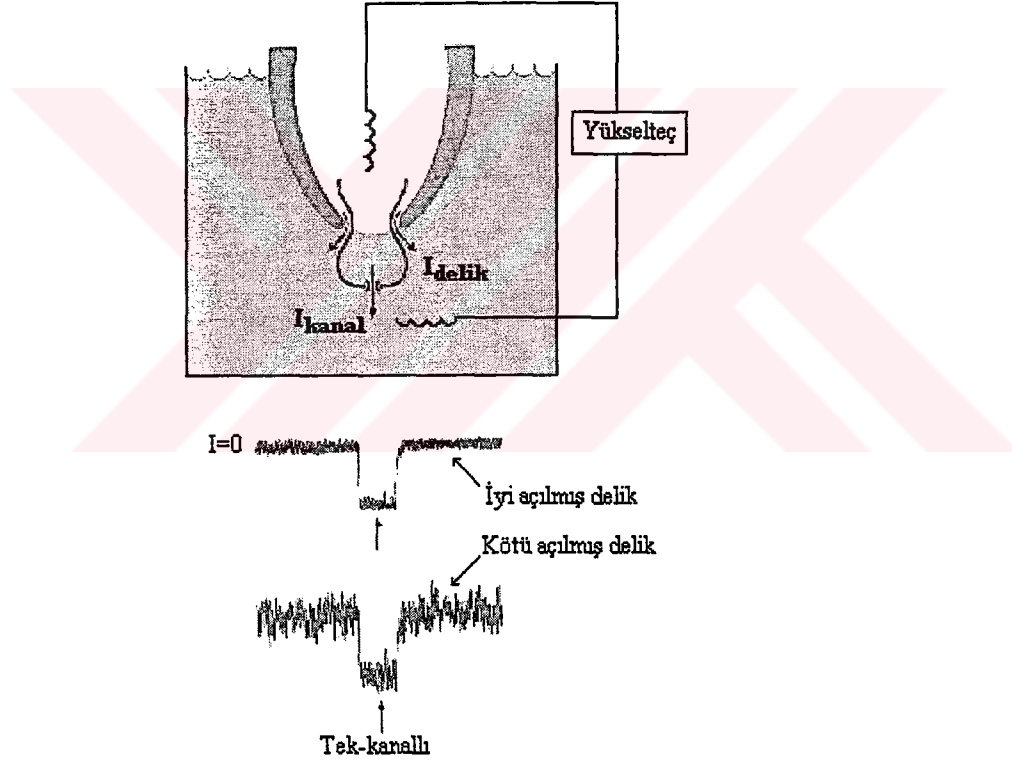
A : direnci hesaplanacak materyalin ortalama kesit alanı

$$R = 2.0\Omega cmx \frac{3mm}{(\frac{\pi}{4})(1.0\mu m)^2} = 76.4 M\Omega \quad (5)$$

Kapasite değeri ise aşağıdaki gibi hesaplanabilir;

$$C = \frac{2\pi\epsilon_r\epsilon_0 L}{\ln(D/d)} = \frac{2\pi \times 1.82 \times 8.8 \times 10^{-12} \text{ F/m} \times 3mm}{\ln(1.5/1.0)} \quad (6)$$

$$C = 7.43 \times 10^{-13} \text{ F}$$



Şekil 17. İyi ve kötü açılmış delikte oluşan seal direncinin ölçüme etkisi [5].

Sonuçta hesaplanan direnç ve kapasite değerleriyle oluşan alçak geçiren filtrenin kesim frekansı şöyle hesaplanabilir;

$$f = \frac{1}{2\pi RC} = \frac{1}{2\pi \times 7.64 \times 10^7 \times 7.43 \times 10^{-13}} = 2.80 \text{ KHz} \quad (7)$$

Görüldüğü gibi en yüksek frekanslı bileşeni yaklaşık 10KHz olan aksiyon potansiyelini bu mikroeletrod, mikropipet ve pipet solüsyonu sistemiyle tam doğru olarak ölçmek mümkün olmaz [6].

Bu arada ölçmeye etkisi olan seal direncinden de bahsetmek gerekir. Şekil 16'da seal direnci görülmektedir. Görüldüğü üzere mikropipet hücre membranını delip içeri girdiğinde oluşan delikle intrasellüler sıvı ile ekstrasellüler sıvı arasında elektriksel bağlantı kurulmuş olur. Böylece seal direnci oluşmuş olur. Şekil 17'de ise seal direncinin hücreden alınan kayıta yaptığı olumsuz etki de açıkça görülmektedir.

Anestezi edilmiş kedinin beyincisindeki purkinje hücrelerinin kendiliğinden deşarjı üzerindeki mikroiontoforik uygulamalı ve hava basıncı uygulamalı morfinin etkileri incelenmiştir. Morfinin mikroiontoforik uygulaması purkinje hücrelerinin hem engelleyici hem de kolaylaştırıcı tepkilerini üretti. Morfinin hava basıncı ile uygulanması durumunda aynı etkiler görüldü. Morfinin her iki uygulaması da dozdan bağımsız tepkiler üretti. Sonuçlardan morfinle üretilmiş uyarmanın opiate sisteme bağlı olduğu ve yasaklamanın da GABAergic sisteme bağlı olduğu görüldü [7].

Önceki çalışmalar göstermiştir ki etanol hem in vitro hem de in vivo olarak purkinje hücrelerinin ateşleme miktarını engeller. Bununla birlikte beyincik internöronlarının etanole olan tepkisi çok az bilinmektedir. Bu çalışmada, beyincik internöronlarının, Golgi nöronlarının ve vitrodaki purkinje hücrelerinin ateşlemesi üzerinde lokal olarak uygulanmış etanolün etkilerini anlatıyor [8].

Bu çalışmanın en büyük bulgusu iontoforik uygulamalı serotonin, beyincikteki purkinje hücrelerinin çoğunluğu (%74) içindeki kompleks deşarj sayısını belirgin şekilde (ortalama %94.0) arttırdığıdır. Hücrelerin %23'ü kompleks deşarjda ortalama %23 azalma göstermiştir, bu sırada hücrelerin %1 tepki verememiştir. Şimdiki çalışmamız ve daha önceki arasında serotonin miktarının etkileri bağlamında bir karşılaştırma yapılmıştır [9].

Anestezi edilmiş veya diğer hayvanların beyincik vermesinin elektriksel uygulamasının etkileri açıklandı. Ayrıca bu çalışma kan basıncındaki ve kalp atışındaki değişimleri de incelendi. Bu etkiler, log IX'a yasaklanmış gibi görünmektedirler ve kimyasal uyarı ile ikiye katlanabilir [10].

Serotonin, purkinje hücrelerinin aminoasit endüklü uyarımları üzerindeki etkileri anestezi edilmiş ebebeyin erkek fareler üzerinde mikroiontoforik ve hücre dışı kayıtlar

kullanılarak incelendi. 5-HT'nin uygulanması PC'lerin kendiliğinden ateşleme oranlarında minimal etkiler gösterdi. Bu bulgulardan şu anlaşılır ki 5-HT PC'lerin EAA'sının modülasyonunda bir seçicilik gösterir ve bu yüzden beyincikte önemli bir nöromodülatör role sahiptir [11].

5-HT reseptörleri, doğumdan sonraki ilk ay içinde farelerde normal beyincikte ve doğumdan sonraki 5. Günde x ışınına tabi tutulmuş granül hücresinde incelendi. Hem normal hem de x ışınına tutulmuş farelerde kıça yakın loplar ön taraftakilerden daha fazla sınıflandırılmıştır. Sonuçlar gösterir ki 5-HT reseptörleri granül hücrelerinin gelişiminde yer almazlar. Doğumdan sonraki ilk ay içinde 5-HT reseptörlerinin yoğunluğundaki azalma yeri doğmuş farenin beyinciğinde 5-HT resöptörlerinin oluşumunu ifade etmez. X ışınlarına tabi tutulmuş farelerde 5-HT yoğunluğunun artması doğumu gecikmiş farenin beyinciğine daha az su katılmasına sebep olur [12].

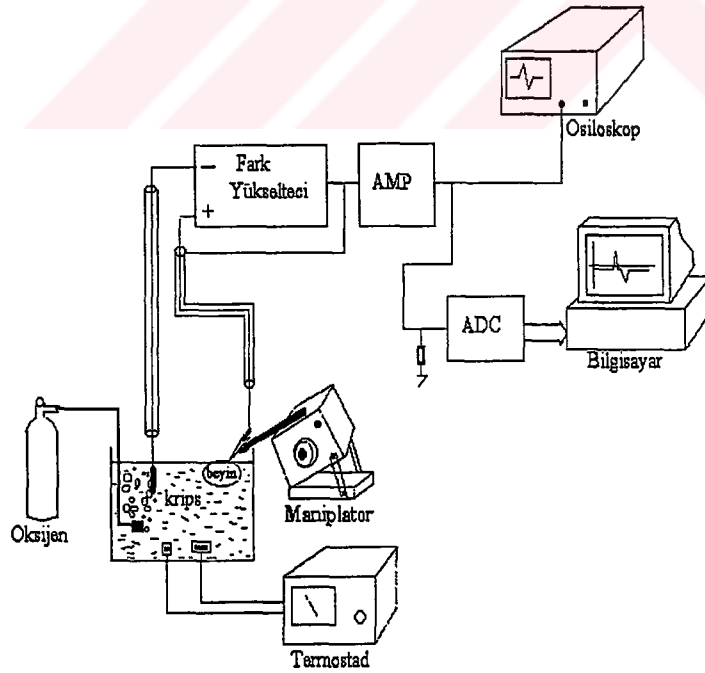


2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu bölümde yapılan çalışmalar, geliştirilen sistem ve deneysel çalışma adlı iki ana kısımda verilmeye çalışılacak. İlk kısım olan geliştirilen sistem kısmında mikropipetlerin nasıl hazırlandığı, amplifikatör devresi ve amplifikatör devresinin çıkışında oluşan sinyallerin analog-dijital çevirici (ADC) vasıtasıyla nasıl bilgisayara alınıp kaydedildiği konusunda bilgi verilecektir. Ayrıca elde edilen sinyallerin nasıl filtrelenip incelendiği ve sistemi tamamlayan termostat devresi hakkında da açıklama yapılacaktır. İkinci kısım olan deneysel çalışmalarda ise deneyin hangi şartlar altında hangi materyallerle yapıldığı ve sonuçta elde edilen dataların ne olduğu konusunda bilgi verilecektir.

2.1. Geliştirilen Sistem

Geliştirilen donanım Şekil 18’de sunulmuştur. Öncelikle deney sırasında kullanılan Sprague-Dowley sıçanlarının (rat) çıkarılan beyinleri ölmemeleri için içinde besin maddeleri ihtiva eden kreps sıvısına konulurlar. Yine, beyin ölmemesi için kreps sıvısının



Şekil 18. Aksiyon potansiyelinin kaydı için geliştirilen donanım

sıcaklığı bir termostat vasıtasıyla 37°C'de sabitlenir. Bu termostat ölçüm sırasında pipet solüsyonunda, krepste ya da elektrotta gürültü oluşturmamak için d.c. gerilimle beslenir. Ama yine de termostadın ısıtıcı kısmının açılıp kapanması sırasında çok kısa süreli olsa gerilim endükleneceği unutulmamalıdır. Son olarakta kreps %95 O₂ %5CO₂ içeren bir hava tüpüyle oksijenlendirilir. Eğer bu şartlar sağlanırsa beyin en fazla 7-8 saat süreyle yaşamsal aktivitelerini sürdürebilir. Bu da deney çalışmaları için yeterli bir süredir.

Mikromaniplatöre sabitlenmiş borosilikat camdan yapılmış ve içi vakumlama tekniği kullanılarak 4mol NaCl ile doldurulmuş mikropipet sinir hücrelerine daldırılır. Mikropipet içine yerleştirilmiş altın elektrod vasıtasıyla elektron akımına çevrilen işaret fark yükselteciye iletilir. Bu yükselteç çıkışındaki işaret ise hem osiloskop ile incelenir hem de ADÇ vasıtasıyla bilgisayara kaydedilir.

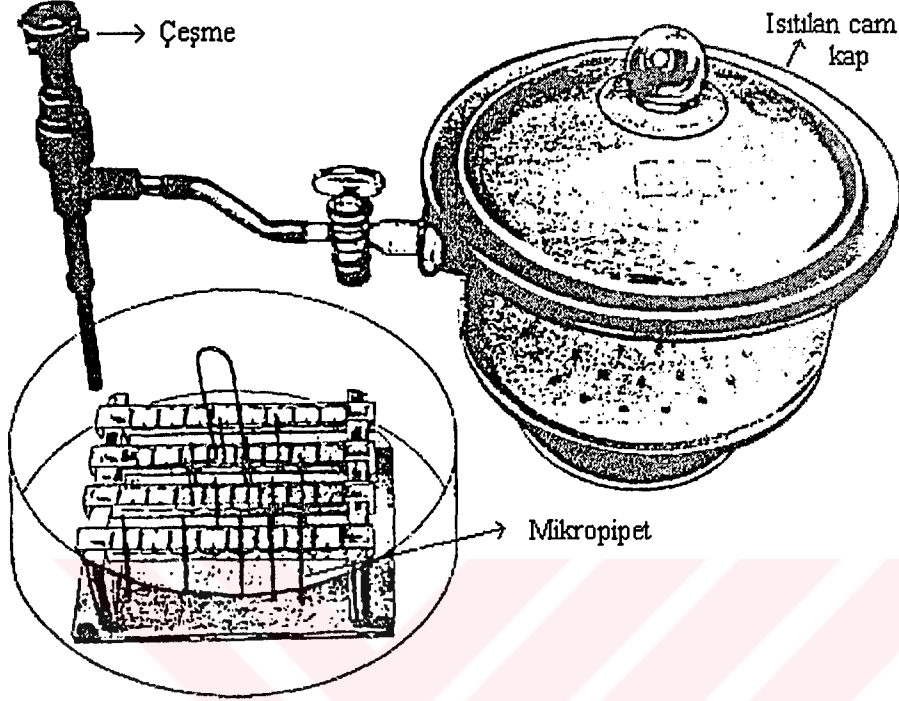
Aşağıda geliştirilen sistemin parçaları hakkında ayrıntılı bilgi verilecektir.

2.1.1. Mikropipetlerin Hazırlanması

Hücre içine girecek olan intrasellüler mikropipetlerin yapımında borosilikat cam kullanılmıştır. Boru halindeki borosilikat cam orta bölgesinde erime sıcaklığına kadar ısıtılıp iki uç tarafından çekilerek birbirinden ayrılıp mikropipet haline getirilir. Bu yöntem bölüm 1.3'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Yine aynı bölümde hatırlanacağı gibi borosilikat cam pipetler hakkında geniş açıklama da vardır.

Hazırlanan mikropipetlerin içi Şekil 19'de gösterilen sistem vasıtasıyla vakumlama tekniğiyle doldurulmuştur. Cam kaba mikropipetlerin doldurulmak istendiği pipet solüsyonu koyulur. Pipet solüsyonundan sonra çekilerek hazırlanan mikropipetler de şekildeki gibi toplu olarak kabın içine konulur. Daha sonra cam kabın kapağı bir yapıştırıcıyla yapıştırılarak kapatılır ve böylece dışarıya ile hava giriş çıkışı engellenmiş olur. Yine şekilde görüldüğü gibi cam kabın dışarıyla basınç bakımından tek ilişkisi herhangi bir çeşmeye takılmış ve içinde suyun akabildiği bir hortuma yandan yaptığı bağlantıdır. Böyle olunca cam kabın içindeki hava basıncı hortumdan akan suyun hortum çeperine yaptığı basınç ile belirlenir ki bu da yaklaşık olarak 0.3-0.4 atmosfer civarında tutulur. Suyun hortum çeperine yaptığı basınç hortumun uç kısmının çapına, çeşmenin açılma miktarına ve çeşmenin bağlı olduğu su şebekesinin su basıncına bağlıdır. Sonuç

olarak ısıtılan kap içerisindeki pipet solüsyonu kabın basıncı ayarlanarak yaklaşık 30-40°C'de kaynatılır.



Şekil 19. Vakumlama tekniğiyle mikropipetlerin doldurulması [13].

Böylece hem içi başlangıçta 1 atmosfer hava ile dolu mikropipetler vakumlama tekniği kullanılarak pipet solüsyonu ile doldurulmuş olur hem de sıcaklığın 30-40°C'de sınırlandırılmış olmasından dolayı çok ince ve hassas olan mikropipetlerin uçları korunmuş olur [13,14,15].

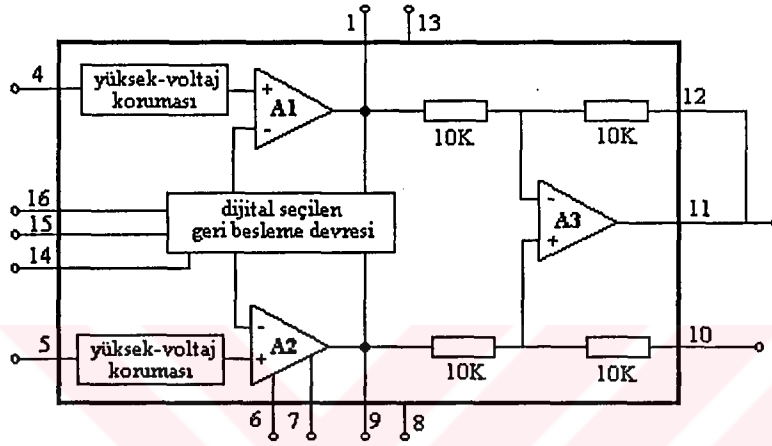
İçi doldurulan mikropipetler 1µm mertebesinde hareket sağlayabilen bir mikromaniplatore sabitlenir ve hücreye girmeye hazır hale getirilmiş olur.

2.1.2. Amplifikatör Devresi

Pipet solüsyonu içindeki iyon akımı, elektrotta elektron akımına dönüşünce iş Şekil 15 (c)'de gösterilen devre üzerinden Emp işaretini alabilme haline gelir. Eşdeğer devrede görüldüğü gibi amplifikatör devresi Emp işaretini araya seri olarak gelen Rt direnci üzerinden almak zorundadır. Daha önce açıklandığı gibi Rt 1-100MΩ arasında, Emp ise on

milivoltlar mertebesinde. Ayrıca C_t 'nin etkisiyle de kesim frekansı bazen 2-3KHz'e kadar düşebilen alçak geçiren filtre oluşturduğu da unutulmamalıdır [16,17].

İşareti, değeri 1-100M Ω olabilen seri R_t direnci üzerinden alabilecek devrenin giriş direncinin 100M Ω 'dan çok daha büyük olması gerekir. Bu nedenden dolayı elektrodan sonra gelen ve asıl amacı sinyal amplifikasyonundan çok empedans dönüşümü olacak olan fark yükselteci için en uygun seçim bir FET ya da FET girişli amplifikatördür.



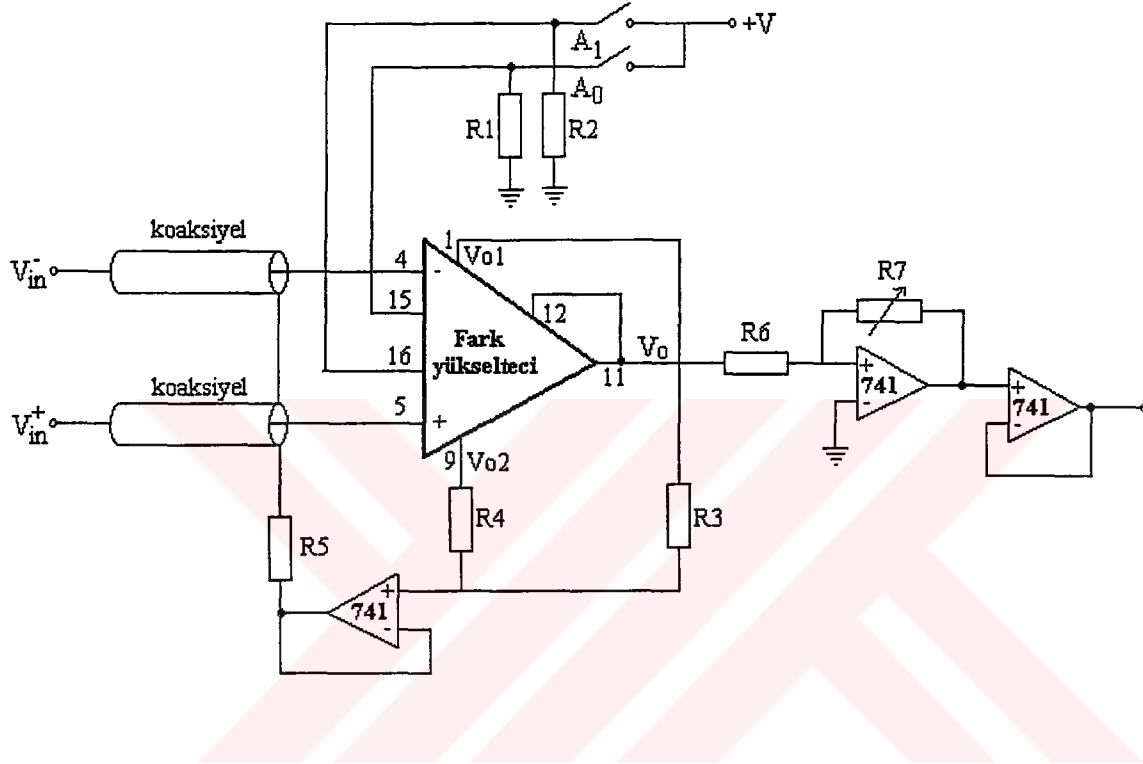
Şekil 20. Instrumentation amplifikatörün blok şeması

Yapılan deneyler sırasında hem FET'li hem de FET girişli işlemsel yükselteçlerle oluşturulmuş devreler denenmiştir. Bunların sonunda en iyi sonuç bir FET girişli instrumentation amplifikatörden alınmıştır. Şekil 20'de iç yapısı blok şema halinde gösterilen bu fark yükseltecinin giriş direnci $10^{12}\Omega$ civarındadır.

Kullanılan fark yükseltecinin kazancı Şekil 21'de gösterilen A1 ve A2 anahtarları yardımıyla dijital olarak 1,2,4,8 olarak ayarlanabilir. Fark yükseltecinden sonra ise kazancı bir potansiyometreyle değiştirilebilen ikinci bir amplifikatör vardır. Devrenin gerilim kazancı saturasyon olmayacak şekilde ve ADC'ye uygun bir değere ayarlanır [18,19].

Ölçüm yapmak için geliştirilen devrenin blok şeması Şekil 21'de verilmiştir. Fark yükseltecinin giriş empedansının çok büyük olmasından dolayı fark yükseltecine doğru akan akım pikoamperler mertebesinde. Bu ise işaretin elektrodan yükseltece iletilmesi için kullanılan telin gürültülere çok hassas olmasına neden olur. Gürültülerden etkilenmemek için elektrodla fark yükselteci arasındaki bağlantı koaksiyel kabloyla yapılır. Koaksiyel kablonun dış kısmıyla iç kısmı arasında kapasite olmaması içinse, koaksiyel

kablonun dış kısmının da iç kısmıyla aynı potansiyelde sahip olması sağlanır. Şekil 21’de görüldüğü gibi girişle aynı potansiyelde olan V_{o1} ve V_{o2} toplanıp bir gerilim izleyicisiyle izole edildikten sonra koaksiyel kablonun dışına bağlanır. Her ne kadar bu önlemler alınsa da yine de giriş işaretini zayıflatacak bir kapasite oluşacağından koaksiyel kablo mümkün olduğu kadar kısa yani fark yükselteci mümkün olduğunca elektroda yakın tutulmuştur.



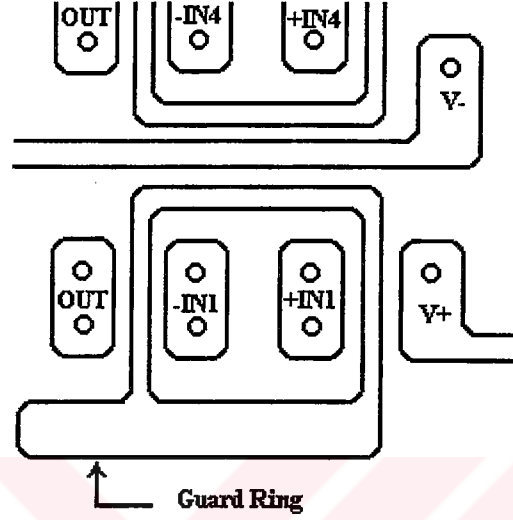
Şekil 21. Ölçüm için kullanılan devrenin blok şeması

Girişe, giriş empedansını düşürmemek için başka hiçbir şey bağlanmaz. Ayrıca girişte gürültü oluşumunu azaltmak için baskı devre hazırlanırken “guard ring” uygulanmıştır. Bu yöntem Şekil 22’te gösterilmiştir.

Devre yukarıda da bahsedildiği gibi baskı devre olarak hazırlanmıştır. Baskı devre hazırlanırken çift yüzü bakır pertinaks kullanılmıştır. Bunun nedeni ekranlanmış devrenin gürültüden daha az etkilenmesidir. Baskı devrenin bakır yolların olmadığı taraf ekranlı taraf toprağa bağlanmıştır.

Devre, şebekeden gelebilecek 50 Hz’lik bileşenden etkilenmemek için pille beslenmiştir. 9V’luk iki pil seri bağlanarak +9V,0V,-9V’luk potansiyellerle simetrik besleme sağlanmıştır.

Son olarak da devre demir bir kutunun içine konularak çalışılan ortamda mevcut olan elektromanyetik dalgalardan izole edilmeye çalışılmıştır. Buna rağmen yine de deney düzeneği ortamın oluşturacağı elektromagnetik gürültüden korunamaz. Bu çeşit gürültüden korunabilmenin en iyi yolu Faraday kafesi kullanmaktır.



Şekil 22. Baskı devrede kullanılan guard ring

2.1.3. Sinyallerin Bilgisayara Kaydedilmesi

İşaret, yükselteç çıkışından sonra ADC'ye ulaşır. Gerçekleştirilen program aracılığıyla yükselteçten gelen elektriksel sinyaller bilgisayar ekranından gözlenebilir ve gerektiğinde de kayıt yapılabilir.

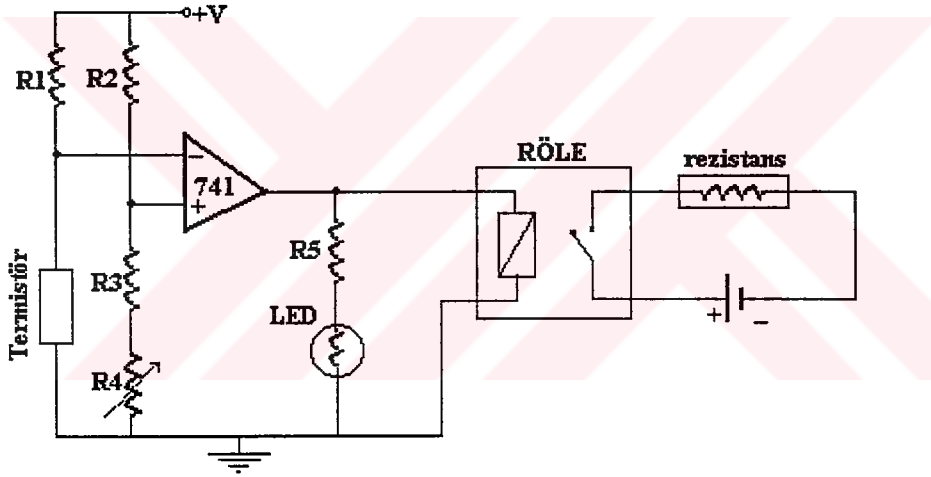
Gerçekleştirilen program, kullanılan ADC ve bilgisayar sistemiyle işaretlerin yaklaşık 100KHz'de örneklenebilmesi mümkün olmuştur. Fakat örnekleme frekansının büyük olması kaydedilen data dosyalarının da büyük boyutlu olmasına neden olacağından, işaretlerin de yeterince iyi kaydedilebilmesi açısından deneyler süresince örnekleme frekansı olarak 30KHz seçilmiştir. Kayıt sırasında alınan işaretler ekranda gösterilmez. Çünkü bu hem örnekleme hızını çok düşürür hem de her örnek alıfta farklı sayıda emir kodu koşulması gerekeceğinden örneklerin eşit zaman aralıklarında alınamamasına yani düzgün olmayan örneklemenin gerçekleşmesine neden olur. Sinyal ekranda görüldükten sonra kayıt tuşuna basıldığında yaklaşık 17 saniyelik bir kayıt yapılır ve kayıt sonunda tekrar sinyal görüntülenmeye başlanır. Gerektiğinde tekrar tekrar kayıt alınır. Sinyal 256

seviyede kuantalanır ve her bir örnek 8 bit yani bir bayt olur. 30 KHz örnekleme frekansında, 256 kuantalama seviyesinde yaklaşık 17 saniyelik bir kayıt dosyaya binary olarak kaydedilirse yaklaşık 524 kilobyte yer kaplar.

Deneyler sırasında kullanılan bu yazılım Ek 1'de sunulmuştur.

2.1.4. Termostat

Deneyler sırasında kafatası açılan hayvanın solunum ve dolaşımı durduktan sonra hayvan dekapite edilir yani beyin uygun şekilde çıkartılır. Deneyin devam edebilmesi için beyin faaliyetlerini sürdürebileceği besin maddeleri ihtiva eden kreps sıvısına konulur. Kreps oksijenlendirilir ve 37°C sabit sıcaklıkta tutulur. İşte bunun için Şekil 23'te blok şeması verilen termostat devresi kullanılır.



Şekil 23. Termostat devresi blok şeması

Deneyler sırasında termostat, deney düzeneği üzerinde gürültü oluşturmamak için d.c. akımla beslenmiştir. Bunun için kavnak olarak aküden yararlanılmıştır.

verilerin süzgeçlenmesi gerekli hale gelmiştir. Bu ise yazılan bir program ile sağlanmıştır [20,21,22].

Gerçekleştirilen program verileri sayısal olarak süzgeçlemektedir. Süzgeç olarak kesim frekansı 260Hz olan yüksek geçiren süzgeç (YGS) kullanılmıştır. Bunun nedeni 50Hz ve harmonikleri olan 150Hz, 250Hz frekanslı gürültüleri süzebilmektir. 50Hz'in diğer harmonikleri alınan aksiyon potansiyelerinin şeklini bozmamak için süzülmemiştir. Sonuçta elde edilen veriler Şekil 24'te görülmektedir. Gerçekleştirilen program ise Ek 2'de sunulmuştur [23,24].

2.2. Deneysel Çalışma

Deneyler Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü Hücre Kayıt Laboratuvarında yapılmıştır. Laboratuvarında Şekil 18'da blok şeması gösterilen sistem kurulmuştur. Sistemi oluşturan öğeler yukarıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Çalışmada ağırlığı 200-350 gram arasında değişen Sprgue-Dowley sıçanlar (rat) kullanılmıştır. Hayvanların anestezisi intraperitoneal olarak 1.25 gr/kg ürethan ile sağlanmıştır. Sonra kafatasının oksipital ve arka temporal bölgesi kaldırılarak özellikle serebellumun vermis bölgesinin görülebilmesi sağlanmıştır. Daha sonra mikromaniplatöre bağlı mikroelektrod ile purkinje hücresi aranır. Osiloskop yardımıyla tespit edilen purkinje hücresinin potansiyeli yukarıda izah edilen donanım ile bilgisayara kaydedilir. Mikropipet cam borosilikattan hazırlanmıştır. Mikropipetlerin içi vakumlama tekniğiyle 4 mol NaCl ile doldurulmuştur. Elektrod olaraksa altın tel kullanılmıştır.

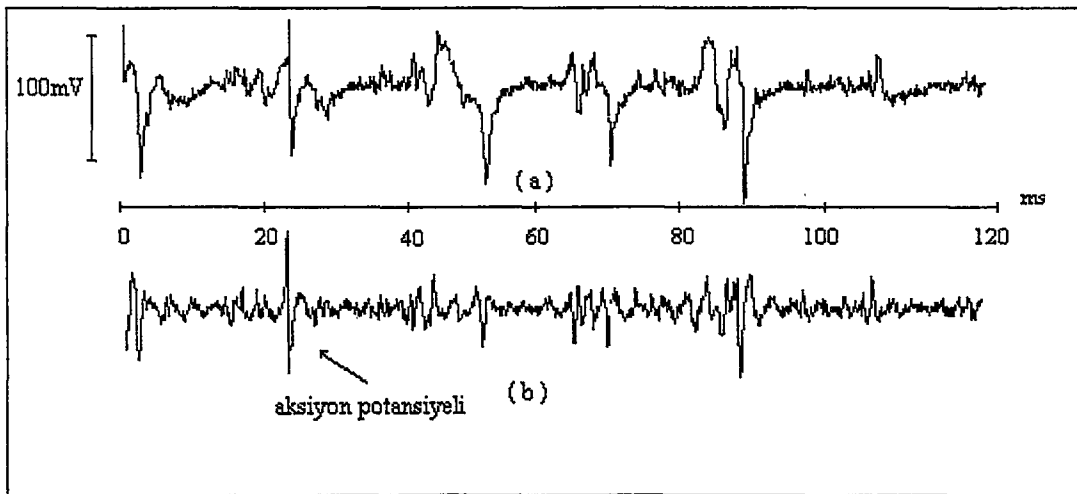
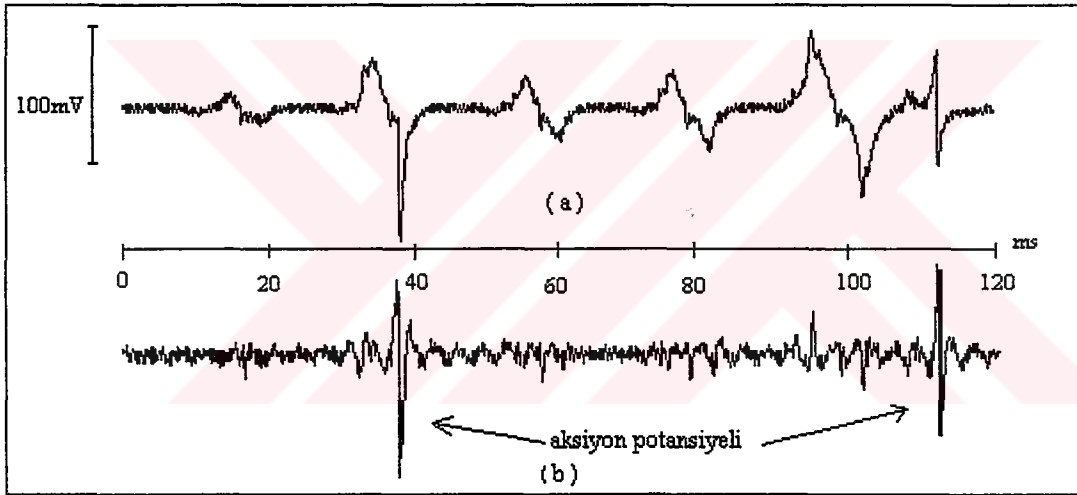
Aksiyon potansiyelleri hayvan canlı iken in-vivo olarak alındığı gibi, hayvanın solunum ve dolaşım sistemi durduktan sonra 3 dakika içinde ve ölmesinden çok kısa bir süre önce hayvan dekapite edilerek ve beyin-beyincik-beyin sapı bölümleri çıkarıldıktan sonra 37°C'ye kadar ısıtılmış ve sıcaklığı termostat yardımıyla sabit tutulan, %95 O₂ ve % 5 CO₂ ile oksijenlenmiş krebs solüsyonuna konarak in-vitro olarak da kayıt yapılmıştır. Kullandığımız krebs solüsyonunun içeriği Tablo 4'te verilmiştir.

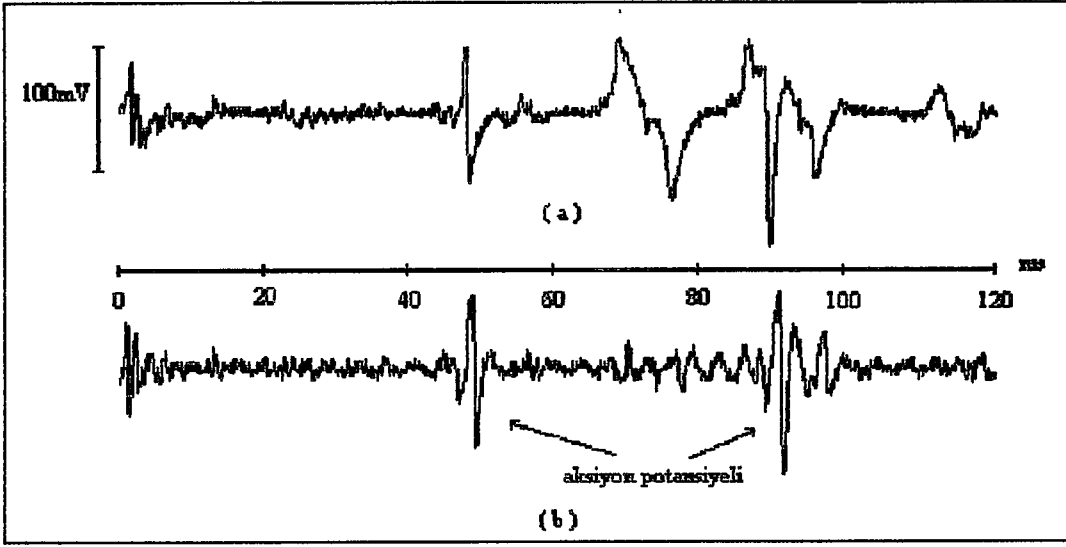
Geliştirilen donanımla pek çok aksiyon potansiyeli kaydı yapılmış olup aşağıda Şekil 24'te bunların sadece kısa bir dönemi gösterilmektedir. (a) şekilleri yapılan kayıt olup (b) şekilleri bu kayıtların kesim frekansı 260 Hz olan bir yüksek geçiren süzgecin

(YGS) girişine uygulanarak elde edilmiştir. Alınan veriler daha geniş olarak bulgular bölümünde sunulmuştur.

Tablo 4. Krebs solüsyonunun içeriği

124	NaCl	58,44	14,493
5	KCl	74,56	0,746
25	NaHCO ₃	84,01	4,201
10	D-Glucose	180,16	3,603
1,15	KH ₂ PO ₄	136,09	0,313
1,15	MgSO ₄	120,38	0,277
2	CaCl ₂	110,99	0,444

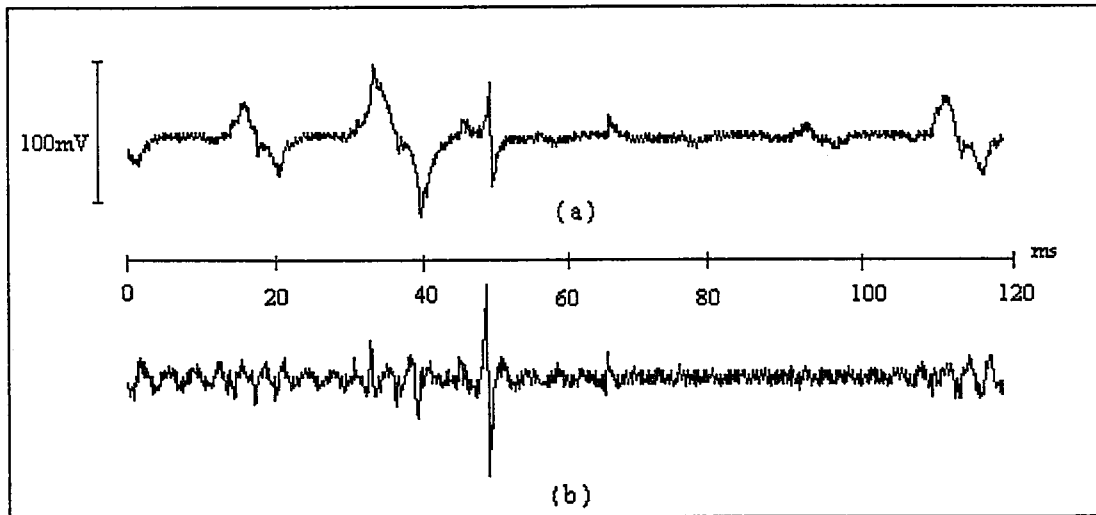
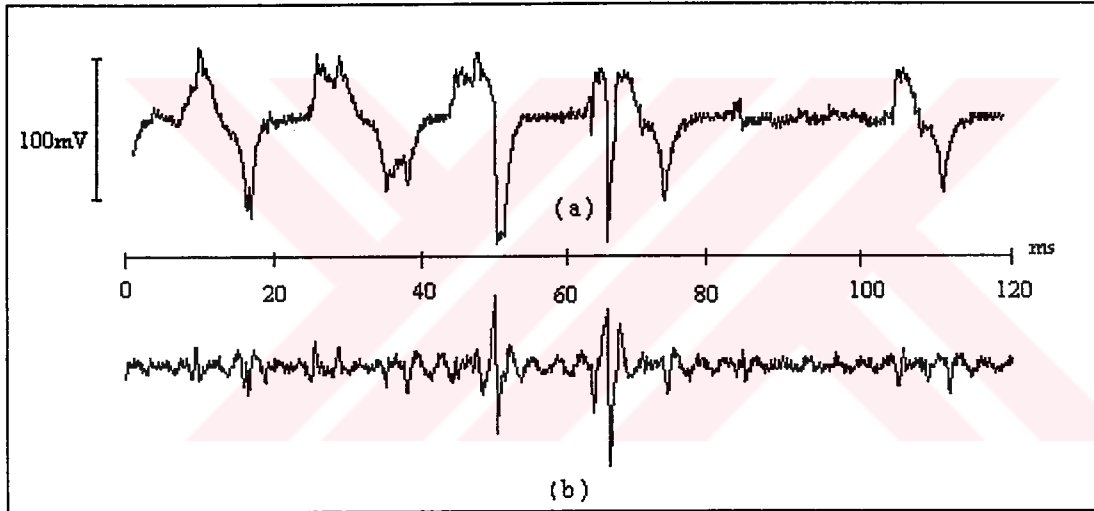




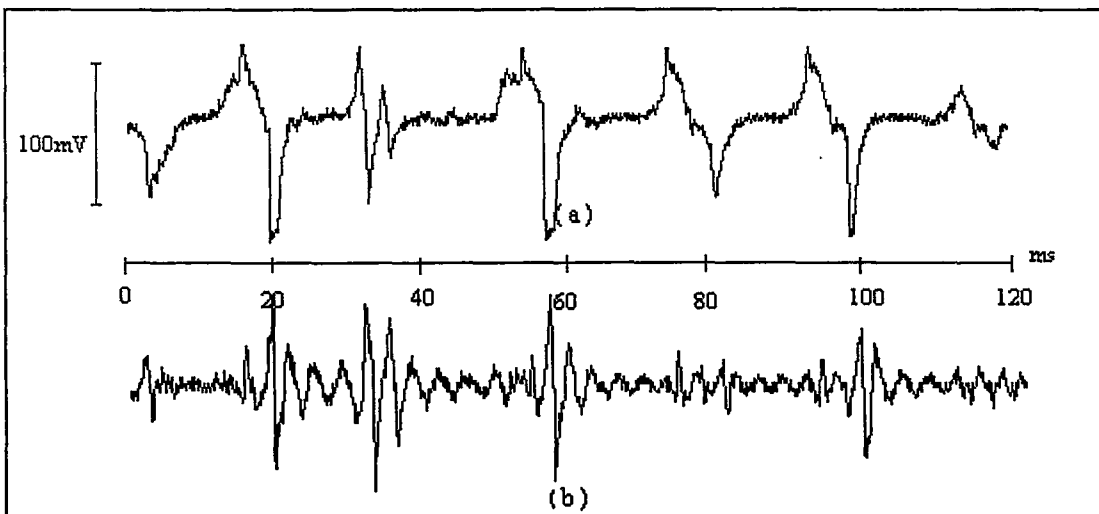
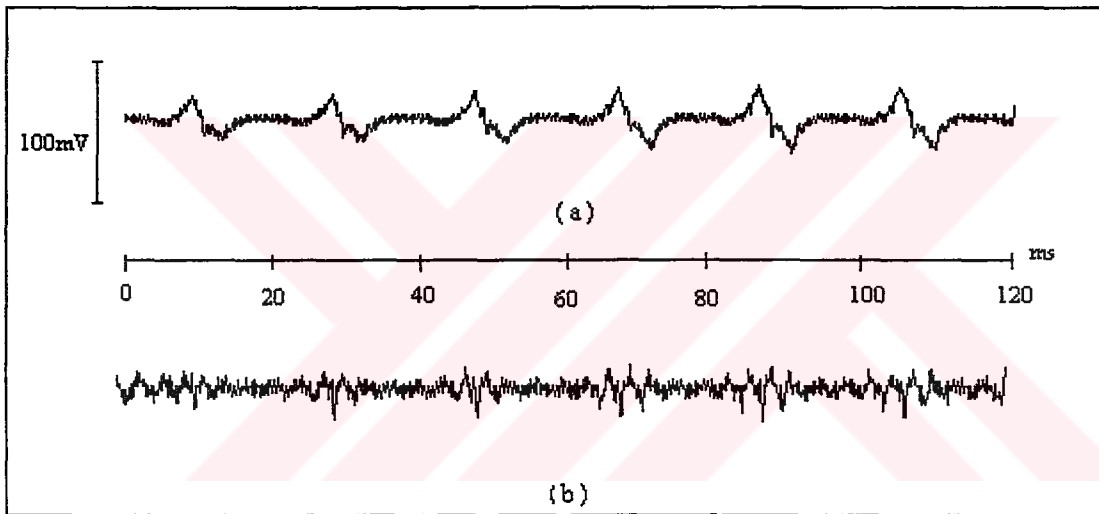
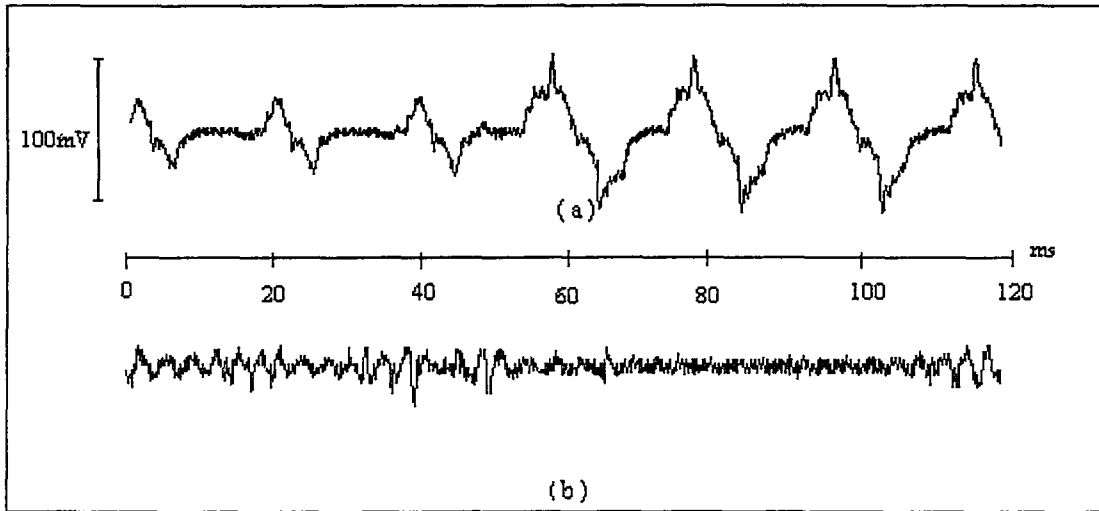
Şekil 24. (a)Kaydedilen işaret (b)Süzgeçlenerek aksiyon potansiyelleri belirlenmiş işaret [25].

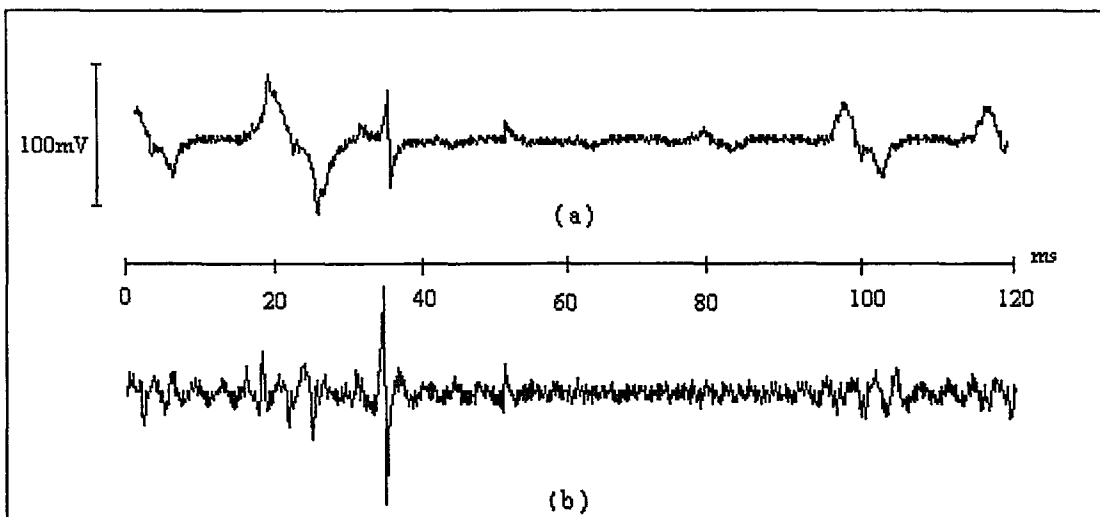
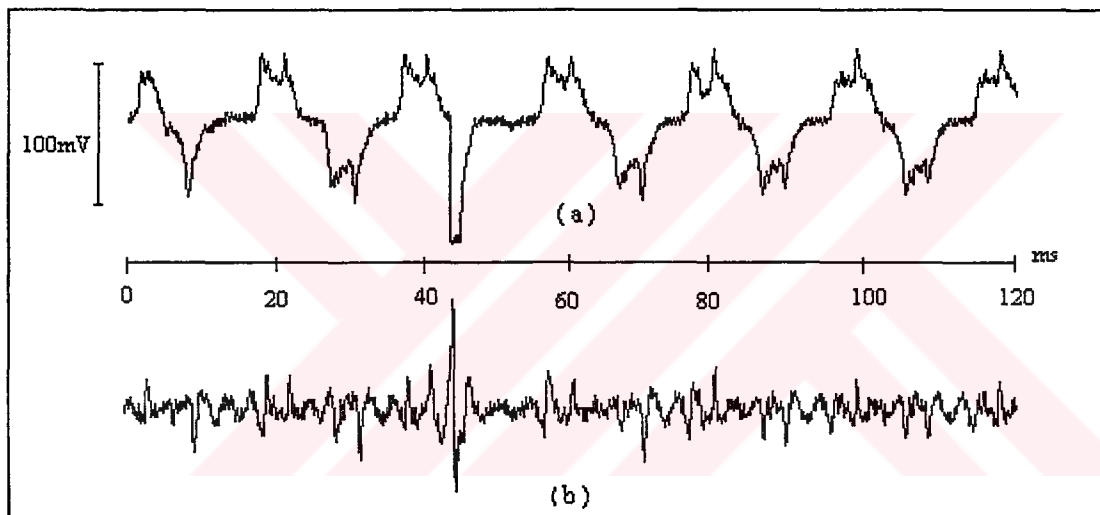
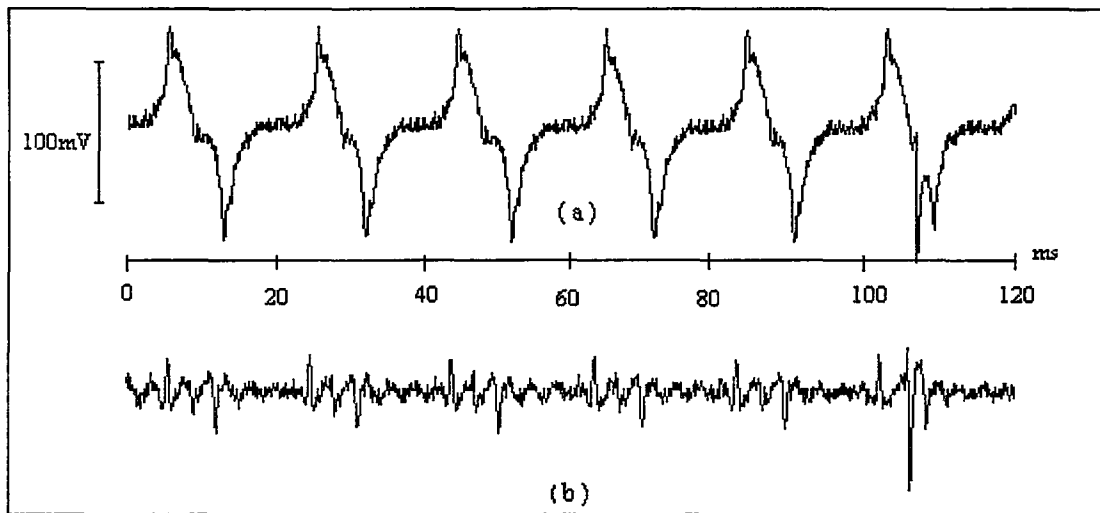
3. BULGULAR

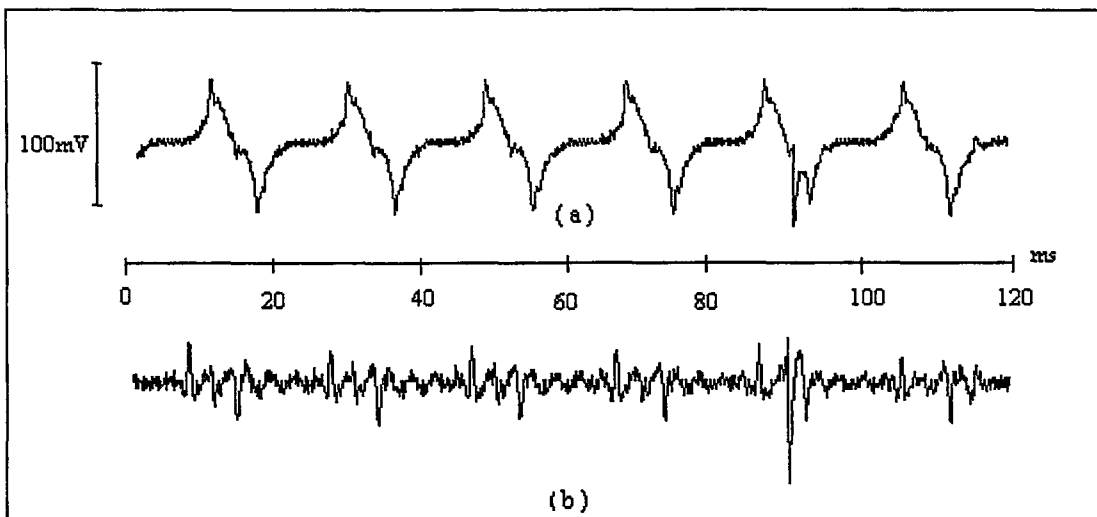
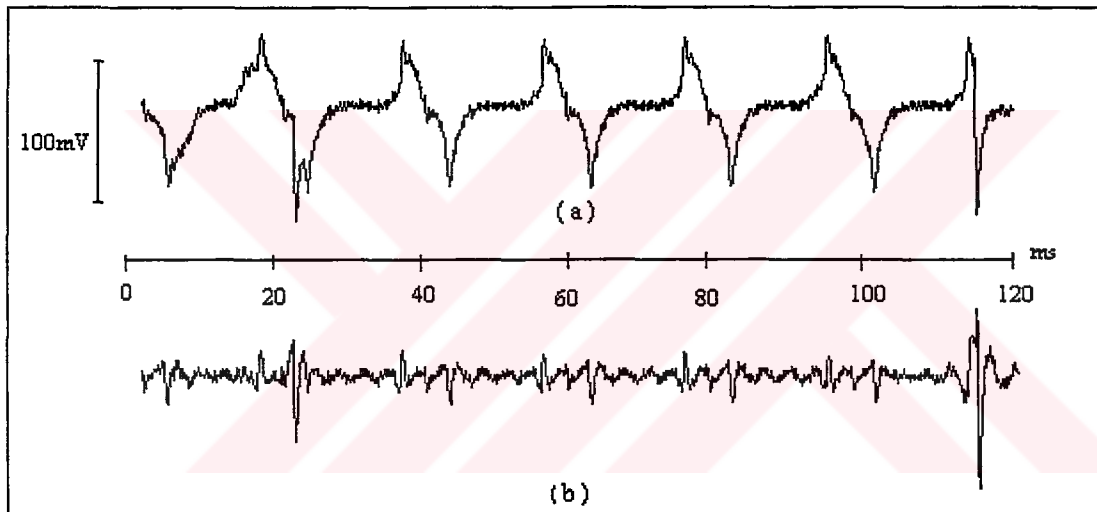
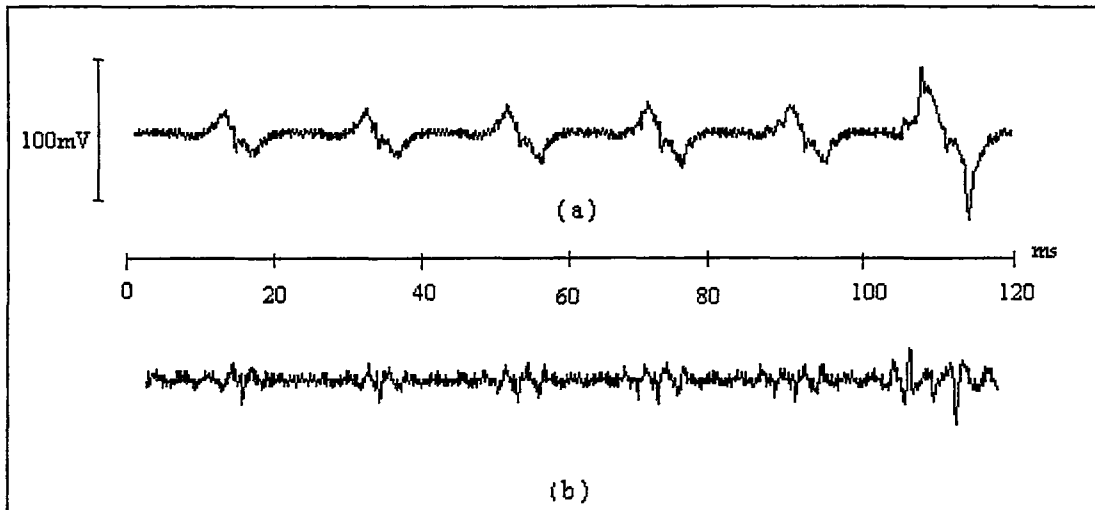
Yapılan deneyler sounda bir çok veri alınmıştır. Burada sadece her birinde yaklaşık 17 saniyelik kayıt bulunan veri dosyalarından birinin yaklaşık 1.8 saniyelik kısmı verilmiştir. Aşağıdaki şekillerde (a) kısmında alınan orjinal datalar yer almaktadır, (b) kısmında ise alınan dataların süzgeçlenmiş halleri görülmektedir. Ölçüm sırasında deney düzeneğinde dış etkilerden dolayı oluşan bu gürültülerden en etkilisi 50Hz ve harmoniği şeklinde olan gürültüdür. Süzgeçlemenin asıl amacı da bunları süzmektir. 260Hz yüksek geçiren süzgeçle yapılan filtreleme sonunda aksiyon potansiyellerinin belirgin olarak ortaya çıktığı görülmektedir.

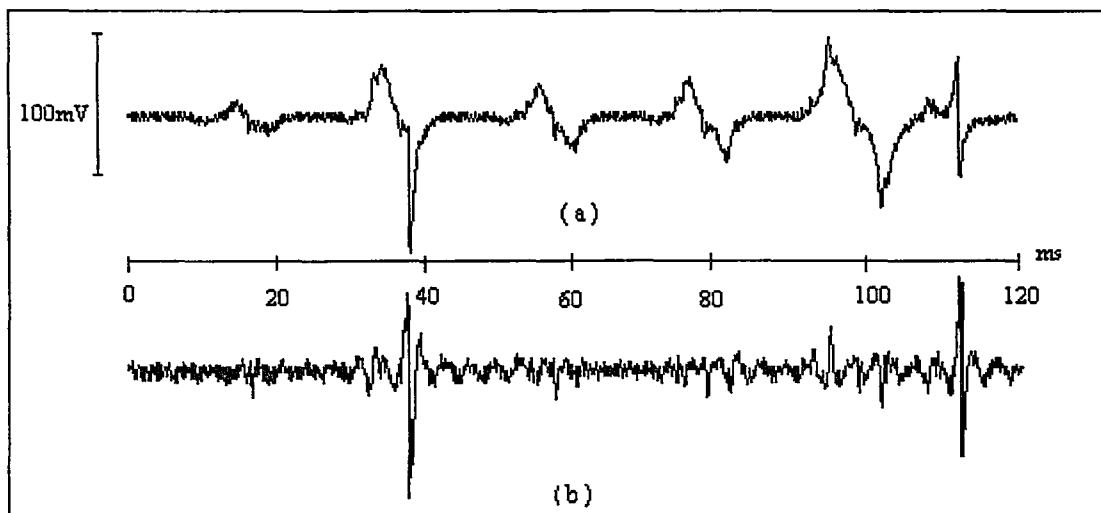
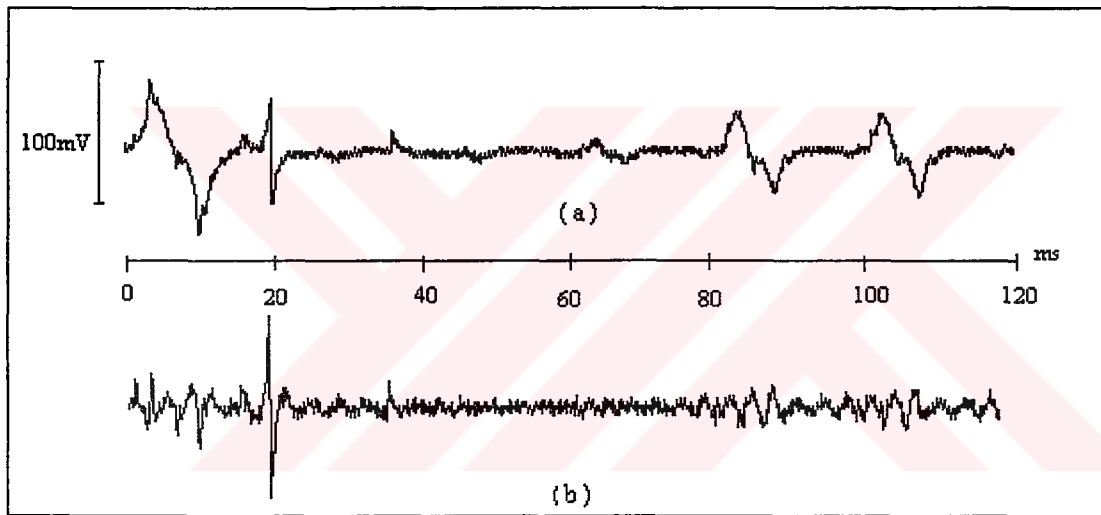
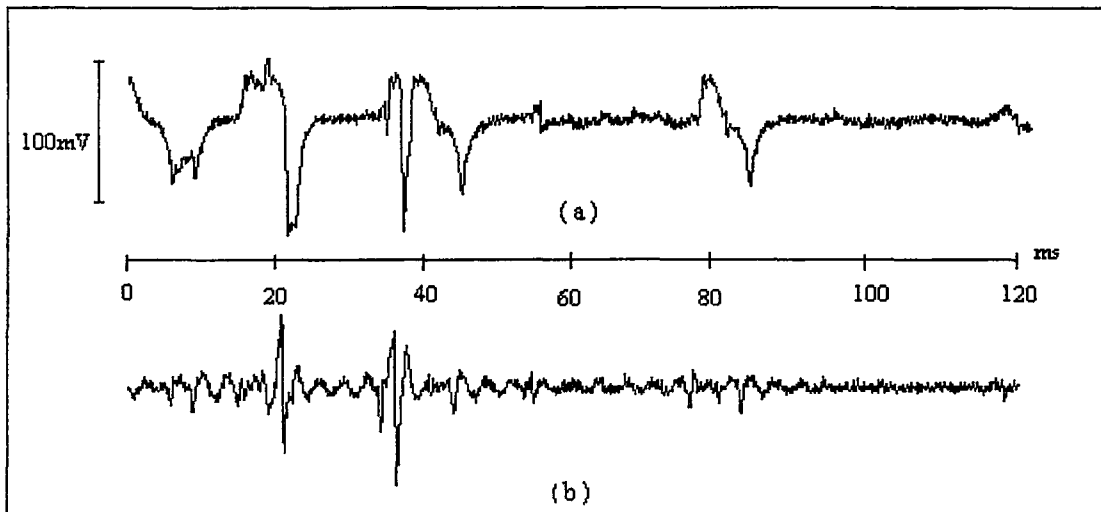


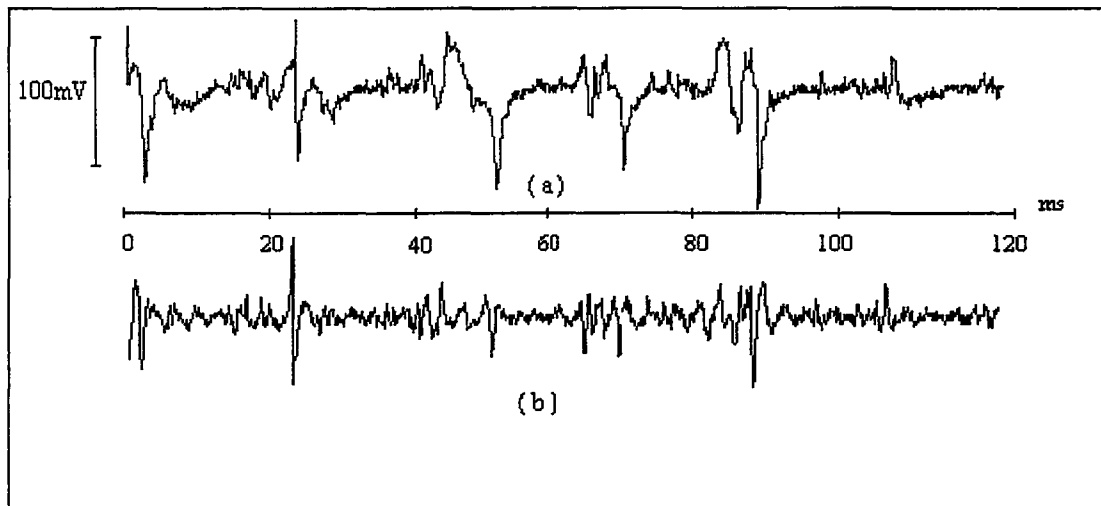
www.ck12.org











4. İRDELEME

Bu çalışmada rat serebellar (beyincik) purkinje hücrelerinden tek kanallı mikroelektrodlarla spontan aksiyon potansiyellerinin kaydı için bir donanım gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu donanımla, serotonin reseptörlerinin etki gösterdiği bu hücrelerde serotonin inhibitörleri ve yeni bulunmuş olan anti-psikotik ilaçların bu hücrelere olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Tek kanallı mikroelektrod kullanan bu donanım ile aksiyon potansiyelinin kaydı başarılı bir şekilde mümkün olmuştur. Fakat serotonin inhibitörleri ve yeni bulunmuş olan anti-psikotik ilaçların etkileri konusunda çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmayı zorlaştıran ve yavaşlatan en büyük problemler ölçüm düzeneğinin modellenememesi ve deneyler sırasında uyulması gereken çalışma sisteminin hazırlanamaması olmuştur. Bu problemlere daha çok mikropipetlerin kalite kontrolünün yapılamaması, beyin aktivitelerinin devam edebilmesi için gerekli ortam şartlarının tam olarak hazırlanamaması ya da bunda geç kalınması neden olmuştur. Bunun sebebi ise genellikle gerekli malzemelerin zamanında, yeterince ve uygun şekilde temin edilememesi olmuştur. Ayrıca mikronlar mertebesinde çalışıldığı için fiziksel sorunlarla da karşılaşmıştır. Yani deney düzeneğinin bulunduğu masanın ya da içinde beyin bulunduğu sıvının mikron mertebesinde sallanmasıdır. Yine de aksiyon potansiyellerinin kaydının gerçekleştirilebilmesine rağmen bu işlem arzu edildiği kadar gürültüsüz ve standart olarak yapılır hale getirilememiştir.

Bu çalışmanın devamında, mikroiontoferez ve patch clamp tekniklerinin uygulanması amacıyla daha karmaşık bir donanımın gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

5. SONUÇLAR

Çalışmanın amacı olan serebellar (beyincik) purkinje hücrelerinden tek kanallı mikroelektrodlarla spontan aksiyon potansiyelinin kaydı gerçekleştirilmiştir.

Deneyler sırasında birçok spontan aksiyon potansiyeli kaydedilmiştir. Elde edilen birçok veriden sadece küçük bir kısmı 3. bölümde sunulmuştur. Bunlara rağmen, serotonin inhibitörleri ve yeni bulunmuş olan anti-psikotik ilaçların etkileri konusunda çalışma yapılması daha ilerideki planların gerçekleştirilmesiyle mümkün olacaktır.



6. ÖNERİLER

Bu çalışma sonunda daha önce bahsedildiği gibi, geliştirilen donanımla serebellar (beyincik) purkinje hücrelerinden tek kanallı mikroelektrodlarla spontan aksiyon potansiyelinin kaydı mümkün olmuştur. Çalışmanın devamında geliştirilen donanımla serotonin inhibitörleri ve yeni bulunmuş olan anti-psikotik ilaçların serebellar purkinje hücrelerine ya da diğer nöronlara etkileri konusunda araştırma yapılabilir.

Ayrıca bu çalışmanın devamında, mikroiontoferez ve patch clamp tekniklerinin uygulanması amacıyla daha karmaşık bir donanımın gerçekleştirilebilir.



7. KAYNAKLAR

1. Guyton, A. C., Textbook of Medical Physiology, Seventh Edition, Dreibelbis, D., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
2. Tan, Ü., Temel Fizyoloji Ders Kitabı, Birinci Baskı, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum, 1986.
3. Bullock, J., Boyle, J., Wang, M. B., Physiology, Seconde Edition, Harwal Publishing Company, Pennsylvania, 1996.
4. Ganong, W. F., Tıbbi Fizyoloji, Onyedinci Baskı, Barış Kitap Evi, Ankara, 1996.
5. Axon Instruments, Inc., The Axon Guide For Electrophysiology&Biophysics Laboratory Techniques, First Edition, Rivka, S.G., Axon Instruments, Inc., California, 1993
6. Michael, R. N., Medical Instrumentation Application and Design, First Edition, Webster, J.G., Houghton Mifflin Company, Boston 1978.
7. Taguchi, K., Suzuki, Y., Effects of Microiontophoretically-Applied Morphine on The Purkinje Cell in The Cerebellum of The Cat, *Neuropharmacology*, 28,3 (1989) 235-242.
8. Freund, K. R., Differential Effects of Ethanol on The Firing Rates of Golgi-Like Neurons And Purkinje Neurons in Cerebellar Slices in Vitro, *Neuroscience Letters*, 164,1 (1993) 9-12.
9. Strahlendorf, J.C., Strahlendorf, H.K., Lee M., Enhancement of Cerebellar Purkinje Cell Complex Discharge Activity by Microiontophoretic Serotonin, *Exp Brain Res* 61 (1986) 614-624.
10. Bradley, D. J., Ghelarducci, B., Spyer, K. M., The Role of The Posterior Cerebellar Vermis in Cardiovascular Control, *Neuroscience Research*, 12 (1991) 45-56.
11. Netzeband, J. G., Weathers, L. B., Strahlendorf, H. K., Strahlendorf, j.C., Serotonin Depresses Excitatory Amino Acid-Induced Excitation of Cerebellar Purkinje Cells in The Adult Rat in Vivo, *Brain Research*, 608,1 (1993) 145-149.

12. Matthiessen, L., Daval, G., Bailly, Y., Gozlan, H., Hamon, M., Verge, D., Quantification of 5-Hydroxytryptamine Receptors in The Cerebellum of Normal And X-Irradiated Rats During Postnatal Development, Neuroscience, 51,2 (1992) 475-485.
13. Kapp, H., Döring, H. J., Micro Electrodes, First Edition, Biomess teknik, 1986.
14. Miller, H.A., Biomedical Electrode Technology, Academic, New York, 1974.
15. Neuman, M.R., Flexible Thin Film Skin Electrodes For Use With Neonates, Dig. Int. Conf. Med. Biol. Eng., 35,11(1973) 10-12.
16. Richardson, P.C., The Insulated Electrode, Proc. Ann. Conf. Eng. Med. Biol.,15, 7 (1967) 30-31.
17. Robinson, D.A., The Electrical Properties of Metal Microelectrodes, IEEE, 56 (1968) 1065-1071.
18. Schean, H.P., Determination of Biological Impedances, Pysical Techniques in Biological Research, New York, 1963 323-407.
19. Webster, J.G., Interference and Motion Artifact in Biopotentials, IEEE 1977 Region 6 Conference Record, 1977, 134-139.
20. Schaumann, R., Design of Analog Filters, First Edition, Schuster, New Jersey, 1990.
21. Roberts, R., Digital Signal Processing, First Edition, Addison C., America, 1987.
22. Bozic, S.M., Digital and Kalman Filtering, First Edition, Gresham Press, Surrey, 1979.
23. Johnson, D.E., Introduction to Filter Theory, First Edition, Prentice-Hall, New Jersey, 1976.
24. Haddad, R. A. ve Parsons, T. W., Digital Signal Processing Theory, Applications and Hardware, First Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1991.
25. Kayıkçıoğlu, T., Baytan, Ş., Türk, K., Ulutaş, M., Altan, C., Tek Kanallı Mikroeletrodlarla Serebellar Purkinje Nöronlarından Aksiyon Potansiyellerinin Kaydı, 5. SİU, Mayıs 1997, İzmir, Bildiriler Kitabı, Cilt I, 115-118.

8. EKLER

Ek 1. Verileri Ekranlayan ve Kaydeden Yazılım

Deneyleer sırasında kullanılan C dilinde yazılmış program aşağıda verilmiştir.

```
#include <stdio.h>
#include <alloc.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>
#include <graphics.h>
unsigned char far *fa;
unsigned char *a;
int i,j;
int cnt=0;
unsigned long int fi;
char c;
int gdriver = DETECT, gmode, errorcode;
char ver[3],filename[16];
FILE *fp1;

char port_oku(void)
{
    outportb(657,8);
    do{}while((inportb(660)&1)==0);
    return inportb(658);
}

void main (int argc, char *argv[ ])
{
    /* paremetre sayısı tam mı? */
```

Ek 1'in devamı

```

if (argc < 2)
{
printf ("usage: p2 base_filename\n");
exit (1);
}
else initgraph(&gdriver, &gmode, "c:\\compiler\\tc\\bgi");

```

```

fa = (unsigned char far *) farmalloc(64000*8);
yine:
cleardevice();
outtextxy(13,5,"b:bellege kayit  c:cikis");

```

```

a = (unsigned char *) malloc(650);
i=0;
do{
putpixel(i,368-a[i],0);
a[i]=port_oku();
putpixel(i,368-a[i],15);
i=fmod(i+1,640);
if(i==639)
if(kbhit())
{
c=getch();
if((c=='c')+(c=='b'))
i=641;
}
}while(i<640);
free(a);

if(c=='c') {farfree(fa);closegraph();exit(1);}

```

Ek 1'in devamı

```

if(c=='b')
{

    for(fi=0;fi<500000;fi++)
        fa[fi]=port_oku();
cleardevice();
outtextxy(13,5,"v:veriyi kontrol k:kayit c:cikis");
c=getch();
    if(c=='v')
    {
        for(fi=0;fi<30;fi++)
            { cleardevice();
              outtextxy(13,5,"diger sayfa k:kayit c:cikis");
              moveto(0,368-fa[0+640*fi]);
              for(i=1;i<640;i++)
                  lineto(i,368-fa[i+fi*640]);
              c=getch();
              if((c=='c')+(c=='k')) fi=187;
            }
    }
if(fi!=187)
{
do{
    outtextxy(13,15,"veri sonu ");
    c=getch();
    }while((c!='c')&&(c!='k'));
}
}
if(c=='k')
{
    strcpy (filename,argv[1]);
    itoa (cnt,ver,10);
}

```

Ek 1'in devamı

```

strcat (filename,ver);
strcat (filename,".dat");
cnt++;
if ((fp1 = fopen (filename,"w")) == NULL)
{
closegraph();
printf ("Can not open %s for output\n",filename);
getch();
exit (1);
}
for(fi=0;fi<500000;fi++)
putc(fa[fi],fp1);
fclose(fp1);
}
if(c=='c') {farfree(fa);closegraph();exit(1);}
}
goto yine;
}

```

Ek 2. Verilerin Filtrelenmesinde Kullanılan Yazılım

Deneyler sırasında elde edilen gürültülü verileri filtrelemek için kullanılan C dilinde yazılmış program aşağıda sunulmuştur.

```

#include <stdlib.h>
#include <conio.h>
#include <alloc.h>
#include <math.h>
#include <graphics.h>

```

Ek 2'nin devamı

```

#include <stdio.h>
#include <svga256.h>
float Ts,fc1,fc2,fs;
int i,N=100,NN;
int Gd = DETECT, Gm;
int pa,i,j;
char c;
float dft[1000],dft_p[1000],f[1500],t,suz[500],y[1500],suz1[500];

FILE *fd,*ff,*fff;

int huge DetectVGA256()
{return 4;}

void ok_ust(int x1,int y1)
{char in1;
 setcolor(0);
 for(in1=1;in1<5;in1++)
 line(x1+2-in1,y1+in1,x1+2+in1-1,y1+in1);
}

void ok_alt(int x1,int y1)
{char in1;
 setcolor(0);
 for(in1=1;in1<5;in1++)
 line(x1+2-in1,y1-in1+4,x1+2+in1-1,y1-in1+4);
}

void ok_gr_sag(int x,int y)
{line(x-3,y-3,x,y);line(x-3,y+3,x,y);}
void ok_gr_sol(int x,int y)
{line(x+3,y-3,x,y);line(x+3,y+3,x,y);}
void ok_gr_ust(int x,int y)

```

Ek 2'nin devamı

```

{line(x-3,y+3,x,y);line(x+3,y+3,x,y);}
void ok_gr_alt(int x,int y)
{line(x-3,y-3,x,y);line(x+3,y-3,x,y);}
void sec(int x1,int y1,int x2,int y2,int color1,int color2)
{ setcolor(color1);
  line(x1,y1,x2,y1);line(x1,y1+1,x2,y1+1);
  line(x1,y1,x1,y2);line(x1+1,y1,x1+1,y2);
  setcolor(color2);
  line(x1,y2,x2,y2);line(x1+1,y2-1,x2-1,y2-1);
  line(x2,y1,x2,y2);line(x2-1,y1+1,x2-1,y2);
}

void plot(float *xx,int x1,int y1,int x2,int y2,int bas)
{float Bu,Ku,b,u;
  int in1;
//sec(x1,y1,x2,y2,160,120);
  x1++;y1++;x2--;y2--;
  Bu=0;Ku=0;
  for(in1=0;in1<N;in1++)
    {if(xx[in1]<Ku) Ku=xx[in1];
      if(xx[in1]>Bu) Bu=xx[in1];
    }
  if(Bu==Ku) Bu=0.0001;
  b=(y2-y1)*0.6/(Bu-Ku);u=(x2-x1)*0.8;
  if(bas<0) bas=-bas; else bas=0;
  setcolor(195);
  line((bas+0.5)*u/N+x1+u/8,y1+(y2-y1)*0.05,(bas+0.5)*u/N+x1+u/8,y2-(y2-y1)*0.05);
  ok_gr_ust((bas+0.5)*u/N+x1+u/8,y1+(y2-y1)*0.05);
  ok_gr_alt((bas+0.5)*u/N+x1+u/8,y2-(y2-y1)*0.05);
  y1=y2-(fabs(Ku)*b+(y2-y1)*0.2);
  ok_gr_sol(x1+(x2-x1)*0.05,y1);
}

```

Ek 2'nin devamı

```

ok_gr_sag(x2-(x2-x1)*0.05,y1);
line(x1+(x2-x1)*0.05,y1,x2-(x2-x1)*0.05,y1);
setcolor(180);
in1=0;moveto(((in1-0.5)*u/N)+x1+(x2-x1)*0.1,y1-xx[in1]*b);
for(in1=1;in1<N;in1++)
  lineto(((in1-0.5)*u/N)+x1+(x2-x1)*0.1,y1-xx[in1]*b);
}

```

```

void d_fourier(float *f_ic,float *dft_ic)
{ int in1,in2;
  float reel,sanal,w;
  for(in1=0;in1<N;in1++)
  {
    w=(2.0*in1*M_PI/N);//printf("w= %f\n",w);getch();
    reel=0;sanal=0;
    for(in2=0;in2<N;in2++)
      {reel+=f_ic[in2]*cos(w*in2);
       sanal+=f_ic[in2]*sin(w*in2);
      }
    dft_ic[in1]=sqrt(pow(reel,2)+pow(sanal,2));
  }
}

```

```

void katla(float *xx,int boyo1,float *hh,int boyo2,float *yy)
{unsigned int in1,in2;
  float ara1,ara2;
  for(in1=0;in1<(boyo1+boyo2-1);in1++)
    {yy[in1]=0;
     for(in2=0;in2<in1+1;in2++)
       {if(in2>(boyo1-1))ara1=0;else ara1=xx[in2];
        if((in1-in2)>(boyo2-1)) ara2=0;else ara2=hh[in1-in2];
       }
    }
}

```


Ek 2'nin devamı

```

        yy[in1]+=ara1*ara2;
    }
}

```

```

void lpf(float *xx,float fcc,float Tsi,float lamda)
{int in1;
float ara;
for(in1=0;in1<N;in1++)
    if((in1-lamda)==0) xx[in1]=2*fcc*Tsi;
    else {ara=in1-lamda;
        xx[in1]=sin(ara*2*M_PI*fcc*Tsi)/(M_PI*ara);
    }
}

```

```

void hpf(float *xx,float *yy,float lamda)
{int in1;
for(in1=0;in1<N;in1++)
    yy[in1]=pow(-1,in1-lamda)*xx[in1];
}

```

```

void bpf(float *xx,float *yy,float foo,float Tsi,float lamda)
{int in1;
for(in1=0;in1<N;in1++)
    yy[in1]=xx[in1]*2*cos((in1-lamda)*foo*2*M_PI*Tsi);
}

```

```

void bsf(float *xx,float *yy)
{int in1;
for(in1=0;in1<N;in1++)
    yy[in1]=-xx[in1];
}

```

Ek 2'nin devamı

```

yy[0.5+(N/2)]=1-xx[0.5+(N/2)];
}

void set_gri_palette()
{char par;
for(par=0;par<63;par++)
{
setrgbpalette(par*3,par,par,par);
setrgbpalette(par*3+1,par+1,par,par);
setrgbpalette(par*3+2,par,par+1,par+1);
}
setrgbpalette(189,63,63,63);
for(par=0;par<6;par++) setrgbpalette(par+190,par*10+10,10,10);
for(par=0;par<6;par++) setrgbpalette(par+196,10,par*10+10,10);
for(par=0;par<6;par++) setrgbpalette(par+202,10,10,par*10+10);
}

void main (void)
{int page=0,cur_page;
installuserdriver("Svga256",DetectVGA256);
initgraph(&Gd,&Gm,"c:\\com\\tc\\bgi");
set_gri_palette();
fc1=260.0;fc2=3000.0;fs=7.5e+3;Ts=1.0/fs;
N=499;
lpf(suz,(fc2-fc1)/2.0,Ts,(N-1)/2.0);
bpf(suz,suz1,(fc2+fc1)/2.0,Ts,(N-1)/2.0);
bsf(suz1,suz);
plot(suz1,50,10,350,210,0);
d_fourier(suz1,dft);plot(dft,360,10,660,210,0);
fd = fopen("c:\\com\\tc\\works\\data\\c4.dat", "rb");
ff = fopen("c:\\com\\tc\\works\\data\\akgrf4.dat", "wt");
}

```

Ek 2'nin devamı

```

fff= fopen("c:\\com\\tc\\works\\data\\akgr4.dat", "wt");

// page=6;

do{

    if((c=='i')&&(page<125)) page++;
    if((c=='g')&&(page>0)) page--;
N=499;
lpf(suz,(fc2-fc1)/2.0,Ts,(N-1)/2.0);
bpf(suz,suz1,(fc2+fc1)/2.0,Ts,(N-1)/2.0);
bsf(suz1,suz);
plot(suz1,50,10,350,210,0);

fseek(fd,page*4000,SEEK_SET);
for(i=0;i<1500;i++)
    {f[i]=fgetc(fd)-100;fgetc(fd);fgetc(fd);fgetc(fd);}

setfillstyle(0,0);bar(50,220,1000,630);
N=1000;
plot(f,50,220,1000,420,0);
katla(f,1500,suz1,499,y);
for(t=0;t<1250;t++) y[t]=y[t+250];
c=getch();
if(c=='e')
    {
for(t=0;t<1000;t++) fprintf(ff,"%f\n",y[t]);
for(t=0;t<1000;t++) fprintf(fff,"%f\n",f[t]);
    }
plot(y,50,430,1000,630,0);
c=getch();

```

Ek 2'nin devamı

```
}while(c!=27);  
fclose(fd);fclose(ff);fclose(fff);  
closegraph();  
}
```



9. ÖZGEÇMİŞ

13-12-1973 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlk okul, orta okul ve lise eğitimini Trabzon'da tamamladıktan sonra, 1990 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü'nü kazandı. 1994 yılında Elektronik Mühendisi ünvanı ile mezun oldu ve aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Elektronik Bölümü Yüksek Lisans Programı'na başladı. İngilizce bilmektedir.

