



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE KOHLEAR ÇEKİRDEK NÖRONLARINDA ERG
KANALLARININ ELEKTROFİZYOLOJİK OLARAK
İNCELENMESİ**

Caner YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ramazan BAL

Gaziantep

2017



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE KOHLEAR ÇEKİRDEK NÖRONLARINDA ERG
KANALLARININ ELEKTROFİZYOLOJİK OLARAK
İNCELENMESİ**

Caner YILDIRIM
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ramazan BAL

Gaziantep
2017

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARE KOHLEAR ÇEKİRDEK NÖRONLARINDA ERG
KANALLARININ ELEKTROFİZYOLOJİK OLARAK
İNCELENMESİ

CANER YILDIRIM

Tez Savunma Tarihi: 26.05.2017
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ramazan BAL
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan BAL
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi
Prof. Dr. Ramazan BAL
Prof. Dr. Lütfi ÇAKAR
Prof. Dr. Erdal AĞAR
Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK
Yrd. Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN

İmzası
.....
.....
.....
.....
.....
.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26.05.2017

Caner YILDIRIM



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek engin bilgi ve birikimiyle, tecrübesiyle, hoşgörüsüyle, sonu gelmez destek ve yardımları ile birlikte, rahat bir çalışma ortamı sağlayan, her zaman öğrencileri olmaktan onur ve gurur duyduğum emeklerini ve haklarını bu dünyanın kıstaslarıyla ödeyemeyeceğim değerli hocam **Prof. Dr. Ramazan BAL'a**,

Güçlü bir akademik altyapıya sahip olmam için verdiği önemli katkılarından ötürü hocam **Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK'e**,

Eğitimim süresince bilimsel ve manevi olarak her zaman katkı ve desteğini gördüğüm değerli büyüğüm, hocam **Yrd. Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN'a**,

Pozitif bakış açısıyla beni sürekli ümitlendiren, destekleyen ablam **Nadide ÖZKUL DOĞRU** ve laboratuarda beraber çalıştığım arkadaşım **Ziya ÇAKIR'a**, bu tezin yazımı sırasında yardım ve katkılarından dolayı arkadaşlarım **Asuman ÇANAK** ve **Beytullah ÖZKAYA'ya**

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yardımcı olan **Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nin** saygıdeğer çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasına etki ederek maddi ve manevi olarak desteklerini her zaman yanımda hissettiğim **değerli aileme**,

En içten dileklerimle, sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Tübitak hızlı destek programları kapsamında (1002) 116 S 130 ve Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF.16.10 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İşitme yolağı	5
2.1.1. Giriş	5
2.1.2. Kulak anatomisi	5
2.1.3. İşitsel sinir (8. kranial sinir).....	8
2.2. Kohlear çekirdek.....	9
2.2.1. Kohlear çekirdek anatomisi.....	9
2.2.2. Kohlear çekirdek fizyolojisi.....	11
2.2.3 Ventral kohlear çekirdek	12
2.2.3.1. Anteroventral kohlear çekirdek	13
2.2.3.2. Posteroventral kohlear çekirdek	13
2.2.4. Dorsal kohlear çekirdek.....	13
2.2.5. Superior oliver kompleks	14
2.2.6. Medial süperior oliver	14
2.2.7. Lateral süperior oliver	15
2.2.8. Trapezoid cismin medial çekirdeğı	15
2.3. Ventral kohlear çekirdeğın hücre tipleri ve projeksiyonları	15
2.3.1. Yıldız hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve projeksiyonları	16
2.3.2. Çalı hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve projeksiyonları.....	17
2.3.3. Ahtapot hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve projeksiyonları	19
2.4. Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin sinaptik bağlantıları	20
2.5. Kohlear çekirdeğın tonotopik organizasyonu	21
2.6. Kohlear çekirdek nöronlarının ateşleme desenleri	22

2.6.1. Chopper nöronlar (düzenli ateşleme yapan nöronlar)	23
2.6.2. Primary like nöronlar (düzensiz ateşleme yapan nöronlar)	24
2.6.3. Onset nöronlar	24
2.7. İyon kanalları	25
2.7.1. Giriş	25
2.7.2. İyon kanallarının sınıflandırılması ve çeşitliliği	26
2.7.3. Voltaj bağımlı iyon kanalları	26
2.8. Araştırma yöntemi	35
2.8.1. Yama kenetleme elektrofizyoloji tekniği	36
2.8.2. Akım kenetleme	37
2.8.3. Voltaj kenetleme	37
2.8.4. Yama kenetleme konfigürasyonları	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Beyin kesitlerinin alınması ve kesitlerin kayıt odacığına transferi	40
3.2. Solüsyonlar	42
3.3. Yama kenetleme kayıtları	43
3.4. Hücrelerin identifikasyonu	45
3.5. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi:.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Akım kenetleme çalışmaları	47
4.1.1. Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin intrinsik özellikleri	47
4.1.2. Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri.....	51
4.1.3. ERG kanal blokörlerinin yıldız tipi nöronlar üzerindeki etkisi	56
4.1.4 ERG akımlarının çalı tipi nöronlar üzerindeki etkisi	63
4.1.5. ERG akımlarının ahtapot tipi nöronlar üzerindeki etkisi	66
4.2. Voltaj kenetleme çalışmaları	70
4.2.1. ERG kanallarının voltaj bağımlı kararlı durum (steady state) aktivasyon kinetiği.....	70
4.2.2. ERG kanallarının voltaj bağımlı kararlı durum (steady state) inaktivasyon kinetiği.....	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	85
7. KAYNAKLAR	98

KISALTMALAR

ERG	<i>Ether a go - go geni</i>
MSS	Merkezi sinir sistemi
SOK	Süperiyor oliver kompleks
VKÇ	Ventral kohlear çekirdek
DKÇ	Dorsal kohlear çekirdek
AVKÇ	Anteroventral kohlear çekirdek
PVKÇ	Posteroventral kohlear çekirdek
EPSP	Eksitatorik post sinaptik potansiyel
LSO	Lateral süperiyor oliver
MSO	Medyal süperiyor oliver
TCMÇ	Trapezoid cismin medyal çekirdeği
TEA	Tetra etil amonyum
HCN	Hiperpolarizasyonla aktive olan katyon kanalları
yBOS	Yapay beyin omurilik sıvısı
mOSm	Miliozmol
TTX	Tetradotoksin
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
KOH	Potasyum hidroksit
ATP	Adenozin trifosfat
Cs	Sezyum
4-AP	4-aminopiridin
DMSO	Dimetil sülfoksit
I _{KDR}	Gecikmiş rektifiye edici potasyum akımı (I _{KDR})
I _{KS}	Yavaş aktive olan (K _s) K akımı
V _m	İstirahat zar potansiyeli
pA	Pikoamper
nA	Nanoamper
mV	Milivolt
I _h	Karışık katyon (I _h) akımı
PTSH	Peri stimulus time histogram grafiği
S.H	Standart Hata
AHP	After Hiperpolarizasyon
İPSP	İnhibitör post sinaptik potansiyel
AP	Aksiyon Potansiyeli

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kulak anatomisi ve kulağın bölümleri.....	6
Şekil 2. Kohleanın zarsı yapısı.	7
Şekil 3. Kohlear sinirin kohlear çekirdeğe projeksiyonu..	8
Şekil 4. Kohlear çekirdeğin morfolojisi, hücre tipi ve lokalizasyonları.	10
Şekil 5. Ventral kohlear çekirdeğin bölümleri ve işitsel sinirin seyri.....	11
Şekil 6. Kohlear çekirdeğin bölümleri ve ahtapot tipi hücre bölgesi	12
Şekil 7. Held kaliks yapısı.	18
Şekil 8. Kohlear çekirdek hücre tipleri ve tonotopik organizasyonu.	22
Şekil 9. Yıldız tipi nöronlara karakteristik olan “chopper S” ve “chopper T” ateşleme deseni örnekleri.....	23
Şekil 10. Çalı tipi nöronlara karakteristik olan “Primary like” ve “Primary like with notch” ateşleme deseni örnekleri.....	24
Şekil 11. Ahtapot tipi nöronlara karakteristik olan “onset” ateşleme deseni..	25
Şekil 12. EAG potasyum kanal ailesi ve ERG kanal yapısı.....	31
Şekil 13. ERG K ⁺ kanalının kinetik özellikleri.....	32
Şekil 14. Kardiyak aksiyon potansiyelinin plato fazında ERG akımları	34
Şekil 15: On-cell pozisyonunda mikropipet ile hücrenin konumu	38
Şekil 16. Diseksiyon aşamaları	41
Şekil 17. Hücrelerin input direnci ölçümünün şematik gösterimi.....	48
Şekil 18. Hücrelerin zaman sabiti ölçümünün şematik gösterimi.....	48
Şekil 19. T ve D tipi yıldız nöronların ateşleme desenleri	51
Şekil 20. Yıldız hücresinin depolarize ve hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar.....	52
Şekil 21. Çalı hücresinin depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar..	53
Şekil 22. Çalı hücresinin hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar.	54
Şekil 23. Birden fazla sayıda aksiyon potansiyeli oluşturan çalı hücresi.....	55
Şekil 24. Ahtapot hücresinin depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar	55
Şekil 25. Ahtapot hücresinin hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar.....	56

Şekil 26. Terfenadinin yıldız tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi	57
Şekil 27. E-4031 yıldız tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi	57
Şekil 28. Terfenadin ve E-4031'in yıldız tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi.....	58
Şekil 29. Terfenadinin yıldız tipi bir nöronda spontan aktivite üzerine etkisi.....	58
Şekil 30. E-4031'in yıldız tipi bir nöronda spontan aktivite üzerine etkisi	59
Şekil 31. Terfenadin ve E-4031 in latens süresi üzerine etkisi	60
Şekil 32. Terfenadin ve E-4031' in yıldız hücrelerinde AP şekli üzerine etkileri.....	61
Şekil 33. Terfenadin ve E-4031 in AP yarı yükseklik genişliği üzerine etkisi.....	62
Şekil 34. Terfenadin ve E-4031 in hücrelerin input direnci üzerine etkisi.....	62
Şekil 35. Terfenadin ve E-4031 in hücrelerin input direnci üzerine etkisi..	63
Şekil 36. Terfenadin ve E-4031 in AP yarı yükseklik genişliği süresi üzerine etkisi	64
Şekil 37. E-4031' in çalı hücrelerinde AP şekli üzerine etkileri	64
Şekil 38. Terfenadin ve E-4031 in latens süresi üzerine etkisi	65
Şekil 39. Çalı hücrelerinde E-4031'in uyarılabilirlik üzerine etkisi.	66
Şekil 40. Terfenadin ve E-4031 in hücrelerin input direnci üzerine etkisi.	67
Şekil 41. Terfenadin ve E-4031 in AP yarı yükseklik genişliği üzerine etkisi	68
Şekil 42. E-4031' in ahtapot hücrelerinde AP şekli üzerine etkileri	68
Şekil 43. Terfenadin ve E-4031 in latens süresi üzerine etkisi	69
Şekil 44. Ahtapot tipi hücrelerde terfenadinin uyarılabilirlik üzerine etkisi.	69
Şekil 45. Yıldız hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon kayıtları.....	71
Şekil 46. Yıldız hücrelerinin kararlı durum aktivasyon eğrisi.	72
Şekil 47. Çalı hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon kayıtları	73
Şekil 48. Çalı hücrelerinin kararlı durum aktivasyon eğrisi	74
Şekil 49. Ahtapot tipi hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon kayıtları.....	75
Şekil 50. Ahtapot hücrelerinin kararlı durum aktivasyon eğrisi.....	76
Şekil 51. Yıldız tipi hücrelerinin voltaj bağımlı inaktivasyon kayıtları.	77
Şekil 52. Yıldız hücrelerinin kararlı durum inaktivasyon eğrisi.....	78
Şekil 53. Yıldız hücrelerinin deaktivasyon kinetiği (● $\tau_{yavaş}$, ■ $\tau_{hızlı}$; semi-logaritmik tablo)	79
Şekil 54. Çalı tipi hücrelerinin voltaj bağımlı inaktivasyon kayıtları	80
Şekil 55. Çalı hücrelerinin kararlı durum inaktivasyon eğrisi	80
Şekil 56. Çalı hücrelerinin deaktivasyon kinetiği (● $\tau_{yavaş}$, ■ $\tau_{hızlı}$; semi-logaritmik tablo).....	81
Şekil 57. Ahtapot tipi hücrelerinin voltaj bağımlı inaktivasyon kayıtları.....	82
Şekil 58. Ahtapot hücrelerinin kararlı durum inaktivasyon eğrisi.....	83

Şekil 59. Ahtapot hücresinin deaktivasyon kinetiği	83
---	----



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Ventral kohlear çekirdek (VKÇ) hücrelerinin intrinsik özellikler	50
Tablo 2: Ventral kohlear çekirdek (VKÇ) hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri.....	85
Tablo 3: Ventral kohlear çekirdek (VKÇ) hücrelerinin voltaj bağımlı deaktivasyon kinetikleri.....	85



ÖZET

KOHLER ÇEKİRDEK NÖRONLARINDA ERG KANALLARININ ELEKTROFİZYOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Caner YILDIRIM

Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ramazan BAL

Mayıs 2017, 112 sayfa

ERG (*Ether a go go ilişkili gen*) kanalları (Kv 11); voltaj bağımlı potasyum kanal ailesine ait olan, kendi içerisinde ERG1 (Kv11.1), ERG2 (Kv11.2) ve ERG3 (Kv11.3) olmak üzere üç alt tipi bulunan bir iyon kanal grubudur. ERG kanallarının işitme yolağının ilk çekirdeği olan kohlear çekirdek nöronlarında nasıl bir farmakolojik ve biyofiziksel özelliklere ve fonksiyona sahip olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle ventral kohlear çekirdek (VKÇ) nöronlarından yıldız tipi (stellate), ahtapot tipi (octopus) ve çalı tipi (bushy) hücrelerinde ERG kanallarının biyofiziksel ve elektrofizyolojik özellikleri ile fonksiyonel rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma için 14-17 gün yaşta toplamda 70 adet fare kullanıldı. Kohlear çekirdekten kesitler alınarak ERG kanallarının elektrofizyolojik karakterizasyonu yama kenetleme (patch clamp) tekniği kullanılarak yapıldı.

Akım kenetleme çalışmalarında, ERG kanal blokörleri olan terfenadin (10 μ M) ve E-4031 (10 μ M) uygulaması her üç hücre grubunda input direncini arttırmıştır ($p<0,05$). Yıldız tipi nöronlarda spontan aktiviteyi ve kare dalga akımına yanıt olarak oluşan aksiyon potansiyeli (AP) frekansının arttırdığı gözlemlendi ($p<0,05$). Her üç hücre grubunda da uyarılabilirlik eşik değerini düşürdüğü tespit edildi ($p<0,05$).

Voltaj kenetleme çalışmalarında ERG kuyruk akımının kararlı durum aktivasyon eğrisi çizilerek, kanalların yarı aktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) bulundu. Bu değerler her üç hücre tipi için ortalama olarak yaklaşık -50 mV ve 7 mV olarak hesaplanmıştır. İnaktivasyon eğrisinden belirlenen $V_{0,5}$, -70 ila -78 mV arasında ve k faktör ise 7-10 mV arasında bulunmuştur.

Sonuç olarak, elde edilen veriler, ERG kanallarının yıldız tipi nöronlarda AP frekansına, yine her üç hücre tipinde de uyarılabilirlik eşik değerine ve istirahat zar potansiyelinin oluşmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ERG kanalları, yama kenetleme, elektrofizyoloji, kohlear çekirdek, işitme yolağı

ABSTRACT

ELECTROPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION OF ERG CHANNELS IN THE COCHLEAR NUCLEUS NEURONS

Caner YILDIRIM

Ph.D Thesis, Department of Physiology

Supervisor: Prof. Dr. Ramazan BAL

May 2017, 112 page

ERG (*Ether a go go related gene*) channels (Kv 11) are the members of the voltage-dependent potassium channel family, which have three subtypes as ERG1 (Kv 11.1), ERG2 (Kv 11.2), ERG3 (Kv11.3). Electrophysiological, biophysical properties of ERG channels and their functions are not known in the cochlear nucleus (CN) neurons, which is the first relay station of auditory pathway. For that reason, we aimed to study pharmacological and biophysical properties and their functions in the stellate, bushy and octopus neurons of the ventral cochlear nucleus (VCN).

A total of 70 mice at 14-17 day-old were used for this study. Electrophysiological characterization of ERG channels was performed using patch clamp technique in CN slices.

In current clamp, application of ERG channel blockers, terfenadine (10 μ M) and E-4031 (10 μ M), significantly increased input resistance in all the three cell types ($p < 0,05$). In stellate cell, they also increased a spontaneous activity and frequency of action potential (AP) induced by square current pulse ($p < 0,05$). In all the cell types, it was found that terfenadine (10 μ M) and E-4031 (10 μ M) significantly reduced threshold for induction of APs with square current pulses ($p < 0,05$).

Tail ERG currents were measured under voltage-clamp. Steady state activation curve for ERG tail current was determined, yielding a half-activation voltage ($V_{0,5}$) and slope factor (k factor) of approximately -50 mV and 7 mV respectively for all the three cell types. Steady-state inactivation curve had half-inactivation voltages ($V_{0,5}$) and k factors between -70, -78 mV and 7-10 mV respectively.

In conclusion, the findings obtained in the present study suggest that ERG channels appear to contribute AP frequency in stellate cells, threshold for AP induction by current injection and resting membrane potentials in all the three cell types.

Keywords: ERG channels, patch clamp, electrophysiology, cochlear nucleus, auditory pathway

1. GİRİŞ VE AMAÇ

ERG “*ether a go - go geni* ile ilişkili” kanalları, 1969 yılında eter ile anestezi edilen sineklerdeki bacak hareketlerinin, zamanın popüler dansı olan “the go-go” dansına benzetilmesi nedeniyle, “*ether a go-go*” şeklinde isimlendirilmiştir (1). Voltajla aktive olan potasyum kanal ailesinin bir alt grubu olan ERG kanalları hem merkezi sinir sisteminde (MSS) hem de kalpte yaygın olarak ifade edilmiştir. Beyinde ilk olarak hipokampus bölgesinden izole edilen bu kanal akımlarının nöronal sistemde elektrofizyolojik özellikleri ve fonksiyonel rollerine dair pek fazla bilgi bulunmamaktadır (2). ERG kanalları ile ilgili yapılan çalışmaların beyinden ziyade daha çok kalp üzerine odaklandığı görülmüştür. Pek çok dokuda ifade edilmesine rağmen ERG kanallarının fizyolojik rolleri en iyi kardiyak ventriküler hücrelerde ortaya konmuştur (3).

Kalp hücrelerinin yanı sıra diğer uyarılabilir hücrelerde de ifade edildiği bilinen ERG kanallarının istirahat zar potansiyelinin belirlenmesinde ve düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir (3). Nöronlarda ise bu kanalların aksiyon potansiyelinin süresi, frekansı, hücrelerin ateşleme deseni ve uyarılabilirliğin kontrolü gibi önemli bazı fizyolojik fonksiyonlarda aktif olarak rol oynadığı rapor edilmiştir (4-7).

Kohlear çekirdek, MSS’de işitme sinyallerinin işlendiği ilk yer olması nedeniyle önemlidir. Burada yer alan nöronların sahip olduğu iyon kanal tipleri, bu kanalların ifade edilme dereceleri, nöronlardaki lokalizasyonları ve biyofiziksel özellikleri, işlenen işitsel sinyallerin özelliklerini belirlediği ileri sürülmüştür (8). Kohlear çekirdekte iyon kanallarının biyofiziksel, farmakolojik ve elektrofizyolojik özelliklerinin anlaşılması ve fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda birbirinden tamamen farklı biyofiziksel ve fonksiyonel özelliklere sahip olan üç ayrı nöron grubu morfolojik ve elektrofizyolojik açıdan tanımlanmıştır. Bu nöron gruplarında pek çok iyon kanalının fizyolojik, farmakolojik ve biyofiziksel karakterizasyonları yapılmış olup ilgili çekirdekte nasıl bir fonksiyon üstlendikleri, sinyal oluşumuna ve iletimine ne derecede katkıda bulundukları tanımlanmıştır (9-11).

MSS’de ERG kanalları üzerine yapılan çalışmalar ve elde edilen veriler çok sınırlı düzeydedir. Söz konusu kanalın kohlear çekirdek nöronlarında bulunup bulunmadığı;

bulunuyorsa nasıl bir farmakolojik, elektrofizyolojik ve biyofiziksel özelliklere sahip olduğu, işitsel sinyallerin oluşumunda, işlenmesinde ve iletilmesinde ne tür bir fonksiyon üstlendiğine dair hiçbir çalışma ve veriye rastlanılmamıştır. Oysa beynin diğer bazı bölgelerinde hem immunohistokimyasal hem de elektrofizyolojik metodlar kullanılarak ERG kanallarının farmakolojik ve biyofiziksel karakterizasyonu yapılmış olup üstlendikleri fonksiyonlar açığa çıkarılmıştır (1, 12-14).

Bu çalışma ile önce ventral kohlear çekirdekte karakterize edilmiş olan üç farklı nöron grubunda (yıldız, ahtapot ve çalı tipi nöronlar) ERG kanallarının hücre uyarılabilirliğini nasıl etkilediği, aksiyon potansiyelinin şekli ve frekansına katkıda bulunup bulunmadığı akım kenetleme tekniği ile araştırıldı. Daha sonra voltaj kenetleme tekniği kullanılarak spesifik iyon kanalı antagonisti kimyasal ajanlar (terfenadin ve E-4031) yardımıyla ERG kanal akımları kuyruk akımı olarak izole edildi. Bu akımların analiz edilmesiyle birlikte kanalların aktivasyon, inaktivasyon ve deaktivasyon kinetikleri ile biyofiziksel özellikleri söz konusu kohlear çekirdek nöronlarında ilk kez ortaya konarak literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme yolağı

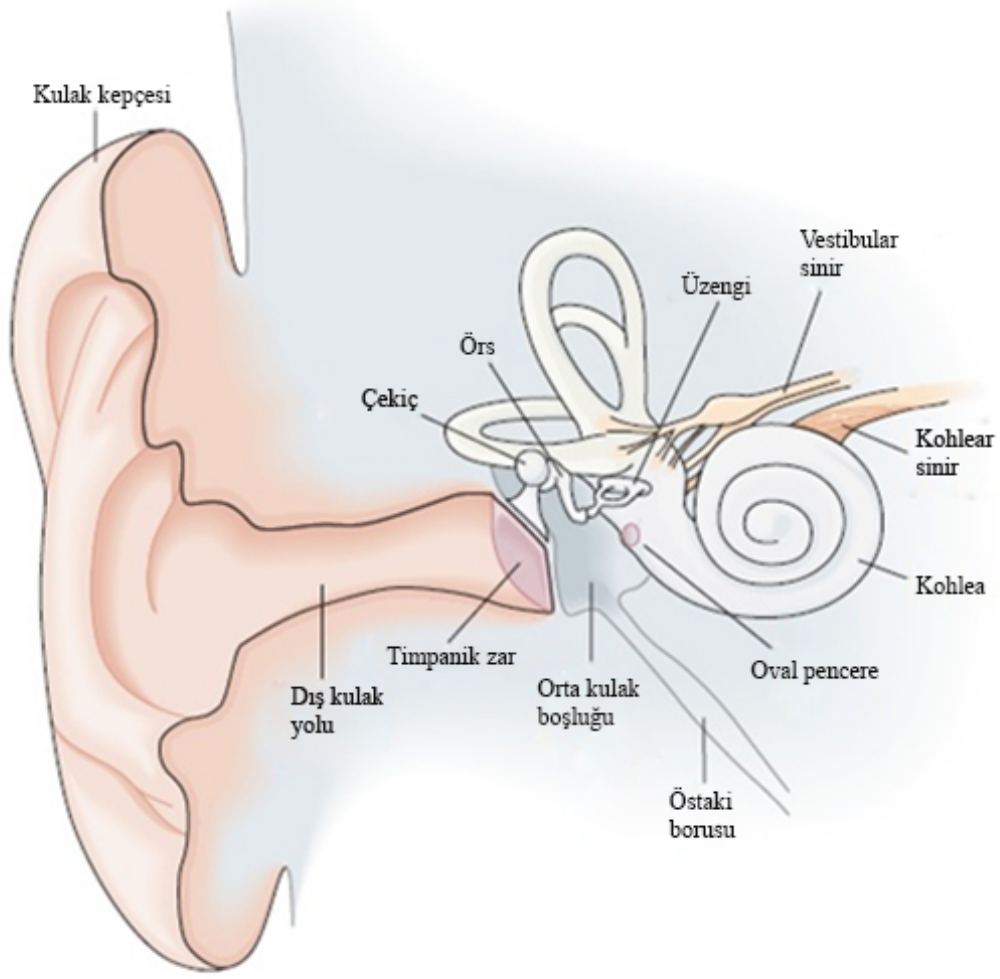
2.1.1. Giriş

Ses, hava veya su gibi ortamlarda iletilen basınç değışimleri ya da dalgalarıdır. Ses; deniz seviyesinde havada yaklaşık olarak 340 m/sn hızla yayılır iken suda 1500 m/sn hızla yayılır. Sesin doğal özelliğı iki parametre ile belirlenir. Bunlardan birisi ses frekansdır ve saniyedeki döngü sayısı olup hertz birimi (Hz) ile ölçölmektedir. Diğer parametre ise sesin şiddeti ya da yoğunluğudur. Sesin yoğunluğu, kaynağından olan uzaklığının karesi ile ters orantılı olarak azalır ve birimi desibeldir (15).

Kulakların işitebileceğı frekans aralığı türler arasında değışkenlik göstermektedir. Sıçanlarda 0.25-70 kHz, farelerde 2-70 kHz, kobaylarda 0.2-45 kHz, kedilerde 0.125-60 kHz ve insanlarda 0.02-20 kHz aralığında değıştiğı belirtilmiştir (15). Yarasa gibi bazı memeli hayvanların kulakları 150 kHz'e kadar ses frekanslarına duyarlıdır (16). Kohlear çekirdeğın rezonans özelliğinden dolayı kohleanın uzunluğu boyunca tüy hücrelerinin pozisyonu ile kulakların yanıt verebileceğı frekans duyarlılığı arasında direkt bir ilişki olduğı belirtilmektedir. Oval pencereye yakın olan kohleanın taban bölümü yüksek frekanslı seslere duyarlı iken, kohleanın uç (apeks) kısmı düşük frekanslı seslere duyarlıdır. Kohleanın uzunluğu boyunca tüy hücrelerinin pozisyonu, kulakların yanıt verebileceğı frekans duyarlılığını belirler. Bu durum "tonotopik organizasyon" olarak bilinmektedir (15).

2.1.2. Kulak anatomisi

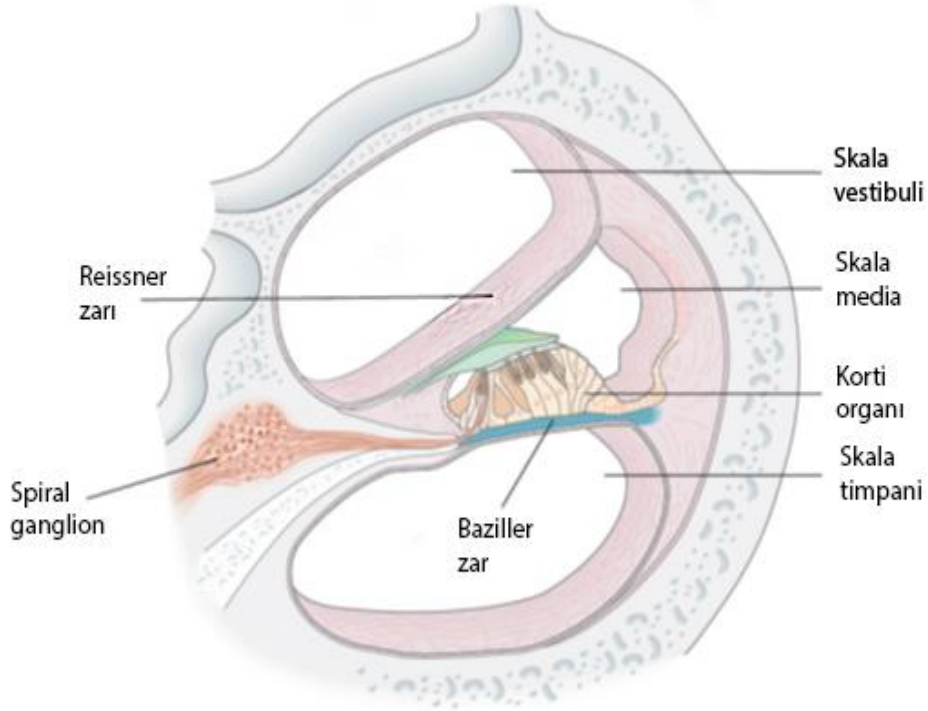
Kulak; kulak kepçesi (aurikula) ve kulak zarından oluşan dış kulak, çekik (malleus), örs (incus) ve üzengi (stapes) kısımlarından oluşan orta kulak, kemiksi ve zarsı labirentlerden oluşan iç kulak olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Şekil 1) (17). Kulak kepçesi denilen dış kulak, deri ile kaplı ve kıkırdak ile desteklenmektedir. Sesleri etkili bir şekilde toplayarak dış kulak yolu (meatus auditory externus) aracılığıyla işitme kanalına yönlendirir. Fakat kulak kepçesi herhangi bir yönden gelen seslere aynı duyarlılığı göstermemektedir. Bu özelliğı ile kulak kepçesi seslerin uzaysal lokalizasyonunu belirleme yeteneğine sahiptir. İşitme kanalı ses dalgalarını yaklaşık 9 mm çapında olan timpanik ya da kulak zarına iletir. Dış kulak ile orta kulak birbirinden kulak zarı ile ayrılmaktadır (17).



Şekil 1. Kulak anatomisi ve kulağın bölümleri. Ref. (20)'den uyarlanmıştır.

Orta kulak; içerisi hava ile dolu olan boşluklu bir yapıdır ve östaki borusu vasıtasıyla farinksle bağlantı halindedir. Ses dalgalarının oluşturmuş olduğu titreşimler çekiç, örs ve üzengi kemikcikleri aracılığıyla orta kulak boyunca iletilir. Çekiç kemiğinin tabanı timpanik zara yapışmıştır ve diğer ucu ligamentöz bir yapı ile örs kemikçığı ile bağlantı kurar. Benzer bir şekilde örs kemikçığı de ligament yapı aracılığıyla üzengi kemiği ile bağlantı kurmaktadır. Üzengi kemikçığı ise oval pencere aracılığıyla kemiksi labirenti zarsı labirentte bağlar. Oval pencerenin hemen altında ise kohlea yer almaktadır (17). Kohlea; baziller ve reissner adındaki iki zar ile skala vestibuli, skala media ve skala timpani olmak üzere üç bölüme ayrılır. Reissner zarı, skala vestibuli ile skala medyayı

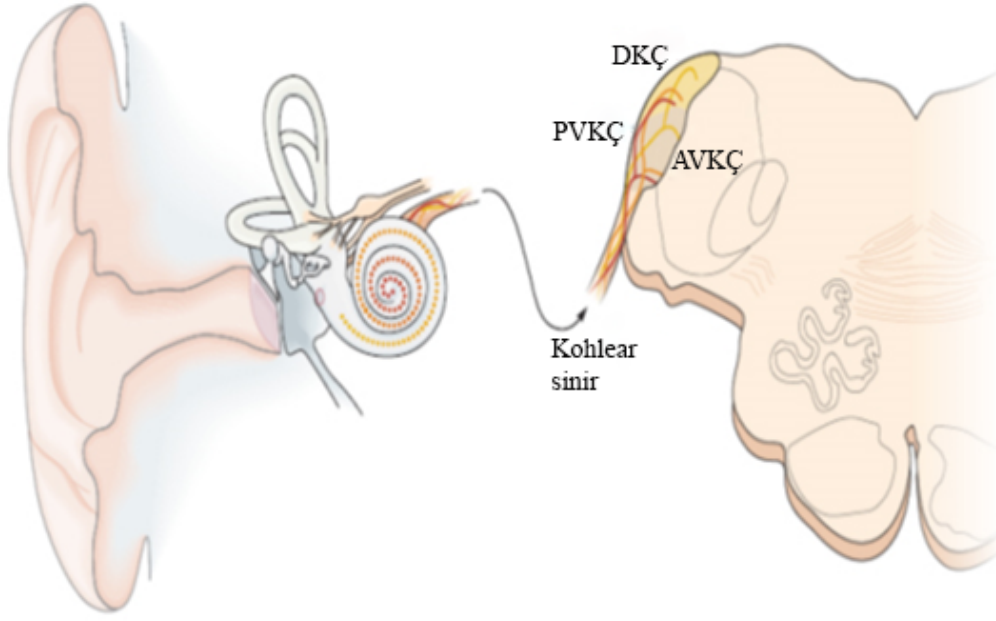
birbirinde ayırırken, baziller zar skala medya ile skala timpaniyi birbirinden ayırmaktadır (Şekil 2) (17).



Şekil 2. Kohleanın zarsı yapısı. Ref. (20)'den uyarlanmıştır.

Ses basıncının kulak zarını içeriye doğru itirmesi neticesinde kemikçiklerden sonuncu olan üzengi kemiği, taban yüzeyini oval pencereye doğru hareket ettirir. Üzengi kemiğinin taban bölümünün bu hareketi skala vestibuli içerisinde bulunan sıvının yer değiştirmesi ile sonuçlanır. Böylece sıvı içerisinde oluşan basınç dalgası kohleanın baziller zarı ile skala timpaniye aktarılır. Bu basınç dalgası iç kulakta bulunan tüy hücrelerinin mekanik olarak yer değiştirmesine neden olur ve sonuç olarak ses dalgaları nöral sinyallere dönüştürülür (18).

İşitsel sistem; işitsel sinir aracılığıyla (8. ön kafa siniri, kohlear sinir) kohleanın spiral ganglionlarından inputlar alır. Spiral ganglionda bulunan hücrelerin aksonlarından oluşan işitsel sinir; dış kulaktan gelen işitsel sinyallerin işlendiği ilk çekirdek olan kohlear çekirdeğe projekte olur (Şekil 3).



Şekil 3. Kohlear sinirin kohlear çekirdeğe projeksiyonu. Ref. (17)'den uyarlanmıştır.

2.1.3. İşitsel sinir (8. kranial sinir)

İşitsel sinir; afferent ve efferent olmak üzere iki tip sinir lifinden oluşmaktadır. Afferent sinir lifleri işitsel sinyalleri kohlear çekirdek kompleksine taşıırken, efferent sinir lifleri superior oliver çekirdekten (SOK) korti organına taşır. Afferent işitsel sinir liflerinin; iç tüy hücrelerini innerve eden tip I bipolar spiral ganglion hücrelerinden gelen kalın miyelinli olan sinir lifleri ve dış tüy hücrelerini innerve eden tip II monopolar spiral ganglion hücrelerinden gelen ince miyelinsiz sinir lifleri olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (19).

Kedilerde yapılan çalışmalarda afferent işitsel sinir liflerinin % 90-95'inin tip I sinir lifleri olduğu ve bunların sadece iç tüy hücreleri ile bağlantı kurduğu gösterilmiştir. Her lif dallanma yapmaksızın tek bir iç tüy hücresi üzerine uzanır. Her iç tüy hücresi yaklaşık olarak 20 farklı lifle sinaps yapmaktadır (20). Aynı çalışmada tip I sinir liflerinin eşik değeri hassasiyeti, spontan aktivitesi ve morfolojik özelliklerine bakılarak üç tipi karakterize edilmiştir. Bunlar arasında; çapları büyük olan lifler; düşük eşik değeri hassasiyetine, yüksek spontan aktiviteye sahiptir ve iç tüy hücrelerinin lateral tarafları üzerine yerleşik olduğu belirtilmiştir. Aksine yüksek eşik değeri ve düşük spontan aktiviteye sahip olan lifler ise ince bir yapıda olup iç tüy hücrelerinin medyal yüzleri

üzerine yerleşim gösterdikleri rapor edilmiştir (21). Tip II lifler, miyelinsiz yapıda olup küçük unipolar ganglion hücrelerinden gelen tüm işitsel liflerin % 5'ini oluşturlar. Tip I liflerinin aksine tip II lifleri oldukça dallanmış bir morfolojiye sahip olmakla birlikte yaklaşık olarak 6-100 arasında dış tüy hücresi ile sinaps yaptıkları bildirilmiştir (20). İşitsel sinirin afferent liflerin yanı sıra, lateral ve medyal olmak üzere iki efferent lif sistemi de bulunmaktadır. Lateral efferent sistem iç tüy hücrelerini innerve ederken medyal efferent sistemin dış tüy hücrelerini innerve ettiği bilinmektedir (22).

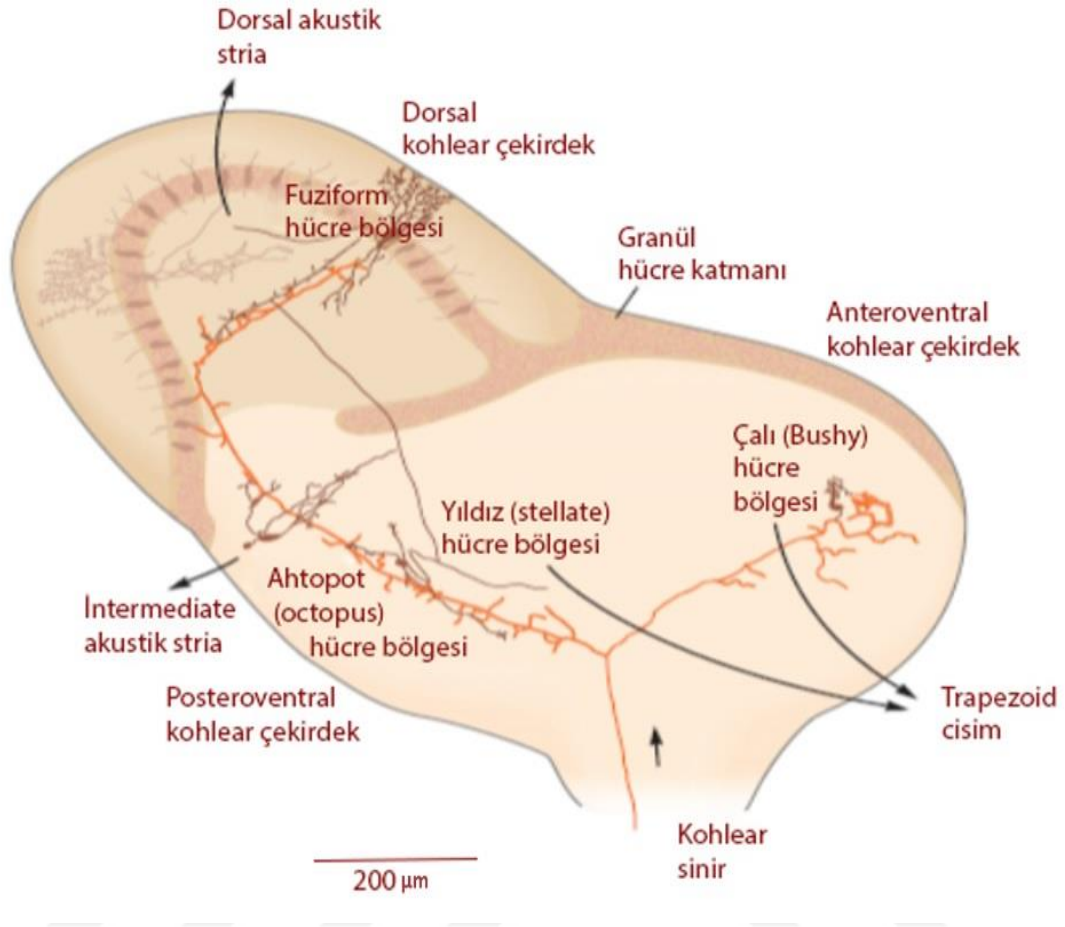
2.2. Kohlear çekirdek

2.2.1. Kohlear çekirdek anatomisi

Kohlear çekirdek, işitsel sinir kökünün girişinde pons ile medulla oblongata arasındaki sınırdaki yerleşen ve kohleadan gelen tüm efferent çıkışları alan işitsel bilgilerin işlendiği ve bu bilgilerin daha üst merkezlere iletilmesiyle görevli olan hücrelerin bulunduğu bir nöral yapıdır (9, 23). Kohlear çekirdek nöronlarının aksonları işitsel bilgiyi daha yüksek işitsel merkezlere iletmek için dorsal, intermedyal ve ventral akustik stria olmak üzere üç temel yolu kullanmaktadır. Bazı kaynaklarda ventral akustik stria, trapezoid cisim olarak da adlandırılmaktadır. Aynı zamanda kohlear çekirdeğin; korteks, orta beyin ve işitsel beyin sapı çekirdeklerinden gelen inisi projeksiyonları da aldığı rapor edilmiştir (16).

Kohlear çekirdek, anatomik olarak; projeksiyonları, afferent innervasyonları ve fonksiyonları farklı olan ventral kohlear çekirdek (VKÇ) ve dorsal kohlear çekirdek (DKÇ) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Ventral kohlear çekirdek (VKÇ) kedilerde hem hacimsel olarak, hem de hücre sayısı bakımından kohlear çekirdeğin en büyük bölümüdür. VKÇ işitsel sinirin innervasyon seyrine bağlı olarak anteroventral kohlear çekirdek (AVKÇ) ve posteroventral kohlear çekirdek (PVKÇ) olmak üzere iki farklı anatomik bölgeye ayrılır (Şekil 4). AVKÇ işitsel sinirin yükselen dalı (ascending) ile innerve olurken, PVKÇ'nin ise inen (descending) dalı ile innerve olduğu bildirilmektedir (Şekil 5) (24).

Dorsal kohlear çekirdekte fusiform, cartwheel, granül ve giant olmak üzere dört ayrı hücre tipi karakterize edilmiştir. Bu hücrelerin doğrudan inferior kollikulusa projekte oldukları tespit edilmiştir. Ventral kohlear çekirdekte ise yıldız (stellate), ahtapot (octopus) ve çalı (bushy) olmak üzere üç farklı hücre tipinin bulunduğu ve bu hücrelerin farklı elektrofizyolojik özellikleri olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (25).

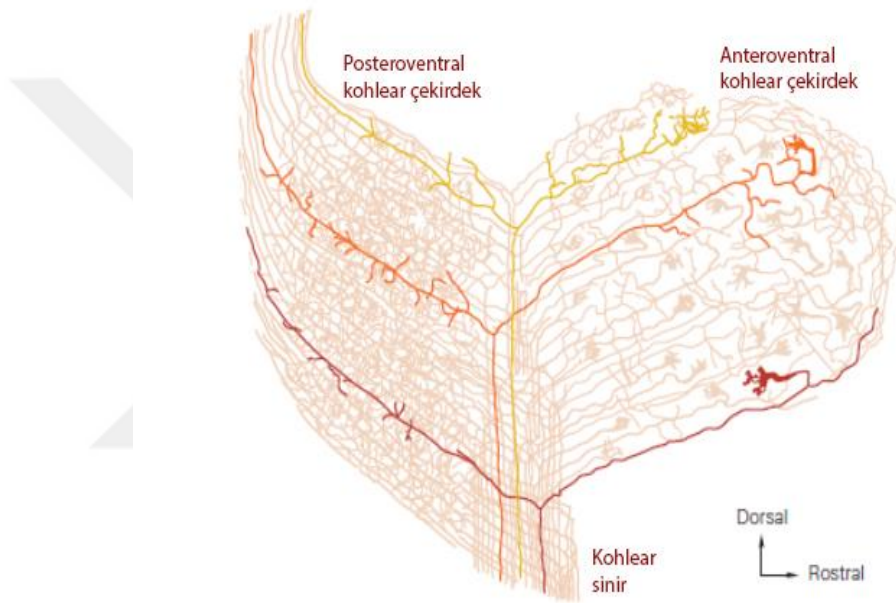


Şekil 4. Kohlear çekirdeğin morfolojisi, hücre tipi ve lokalizasyonları. Ref. (23, 24)'den uyarlanmıştır.

Kedilerde VKÇ'de bulunan toplam hücre sayısı, yaklaşık olarak işitsel sinir lifinin toplam sayısına çok benzerdir. 50.000'e yakın işitsel sinir lifi bulunan kedi kohlear çekirdeğinde en çok bulunan hücre 36.600'ü küresel ve 6.300'ü globüler olmak üzere 40.000'i aşkın sayıda bulunan çalı hücreleridir (26). Bu sayıların küresel ve globüler çalı hücrelerinin innervasyon oranları ile de tutarlı olduğu bildirilmiştir. Her bir küresel çalı hücresi 1-3 arası işitsel sinir lifi ile uyarılırken, globüler çalı hücresi yaklaşık olarak 35 işitsel sinir lifi ile uyarılmaktadır (21). Yıldız tipi nöronların sayısı ise yaklaşık olarak 9.400'dür ve bu hücrelerin farklı elektrofizyolojik özelliklere sahip olduğu bilinen iki tipi bulunduğu tespit edilmiştir (T ve D yıldız hücreleri) (26). VKÇ'de bulunan yıldız tipi nöronların çoğunluğunu T yıldız hücreleri oluşturmaktadır (T yıldız: D yıldız hücre oranı yaklaşık olarak 15:1'dir) (27). Ahtapot tipi nöronların sayısı ise yaklaşık olarak 1.500 civarındadır (26). Her işitsel sinir lifinin ahtapot tipi hücre alanında ortalama olarak iki hücrenin

soması ile bağlantı kurduğu ve her bir ahtapot hücresinin yaklaşık olarak 67 işitsel sinir lifi ile uyarıldığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Kedi kohlear çekirdeklerinde belirlenen bu sayıların fare kohlear çekirdek ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (21).

Dorsal kohlear çekirdek içerisinde en çok bulunan hücre tipi sayıları yaklaşık olarak 60.000 civarında olduğu tahmin edilen granül hücreleridir. Ayrıca çekirdeğin bu bölümünde 18.000 cartwheel, 4.400 piramidal, 4.000 yıldız, 2.300 golgi ve 1.300 civarında giant hücrelerinin de bulunduğu tespit edilmiştir (23, 28).



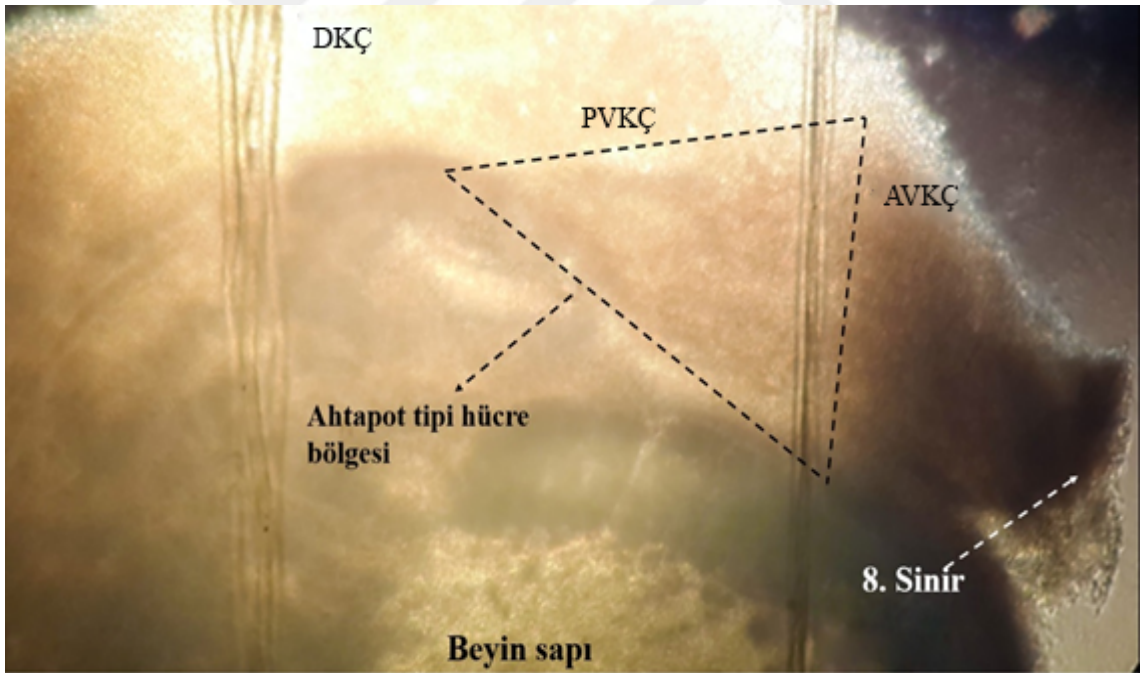
Şekil 5. Ventral kohlear çekirdeğin bölümleri ve işitsel sinirin seyri. Ref. (17)'den uyarlanmıştır.

2.2.2. Kohlear çekirdek fizyolojisi

Kohlear çekirdek; kohleadan gelen ve tüy hücrelerinden kaynaklanan sesle ilgili nöral sinyallerin çekirdekte bulunan ve daha önceki çalışmalarda karakterize edilen farklı tipteki hücreler tarafından şiddet, frekans, tını ve zamanlamasının kodlanması gibi sesin temel niteliklerinin işlendiği ve üst işitsel çekirdeklere iletildiği nöral bir yapıdır. Ses kaynağının uzaysal konumunun belirlenmesi ve sesin tanınmasında kohlear çekirdeğin rol aldığı daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (29).

2.2.3 Ventral kohlear çekirdek

Ventral kohlear çekirdekte (VKÇ) yıldız, çalı (globüler çalı-küresel çalı), ve ahtapot olmak üzere birbirinden farklı biyofiziksel ve elektrofizyolojik özellikler gösterdiği bilinen üç hücre tipi tespit edilmiştir (23). Ventral kohlear çekirdekte bulunan bu hücrelerin ayrıca anatomik olarak ayrımı yapılabilen farklı bölgelerde bulundukları rapor edilmiştir. Buna göre çalı hücreleri ile yıldız hücreleri aynı bölgede birbirine karışmış halde bulunurlar. Bununla birlikte yıldız hücreleri, yaygın olarak çekirdeğin posterior bölgesinde bulunurken, çalı hücreleri daha ziyade anterior bölgesinde bulunmaktadır (25, 30). Ahtapot hücrelerinin VKÇ'nin dorsalinde ve en kaudalinde sınırları açık bir şekilde görülen üçgenimsi bir bölgede bulunduğu bildirilmiştir (31). Şekil 6' da kohlear çekirdek dokusundan elde edilen bir kesitte kohlear çekirdeğin bölümleri ve ahtapot hücre alanı fotoğraflanmıştır. Ahtapot hücrelerinin koyu miyeline sahip aksonlar ile sınırlandırılmış olan bir bölgede bulundukları rapor edilmiştir (31, 32).



Şekil 6. Kohlear çekirdeğin bölümleri ve ahtapot tipi hücre bölgesi

2.2.3.1. Anteroventral kohlear çekirdek

Anteroventral kohlear çekirdek bölgesi işitsel sinir lifinin yükselen dalı (ascendes) ile innerve olur. Bu bölgenin nöronal ateşleme bilgisinin temporal zamanlamasını koruyarak daha da geliştirdiği tespit edilmiştir (33). Burada bulunan hücrelerin fonksiyonları açığa çıkarılarak, bu hücreler tarafından her iki kulaktan gelen seslerin relatif zamanlaması ve şiddetinin kıyaslanmasıyla ses kaynağının yerinin belirlendiği açıklanmıştır (33, 34). Anteroventral kohlear çekirdek bölgesinde globüler çalı ve küresel çalı olmak üzere iki önemli hücre tipinin bulunduğu bildirilmiştir (35, 36). Her iki hücre grubunun da işitsel sinirden doğrudan inputlar aldığı ve özelleşmiş sinapslar yaptıkları belirlenmiştir. Küresel çalı hücrelerinin 1-4 arasında değişen sayıda işitsel sinir lifinden inputlar aldığı ve *Held End Bulbus* veya *Calyx of Held* olarak adlandırılan, hücre gövdesi yüzey alanının büyük bir kısmını sararak kaplayan büyük sinapslar yaptıkları tespit edilmiştir (37). Globüler çalı hücreleri ise 4-40 arasında değişen sayıda işitsel sinir lifinden input alarak çok daha küçük olan ve modifiye *Held End Bulbus* olarak adlandırılan sinapsları yaptıkları gösterilmiştir (35).

2.2.3.2. Posteroventral kohlear çekirdek

Posteroventral kohlear çekirdek sesin hem zamanlamasını hem de spektral analizini üstlenen, işitsel sinir lifinin inen dalı (descendes) tarafından innerve olan ve büyük oranda sadece tek tip bir hücre bulunduran ventral çekirdeğin diğer bölümüdür. Bu bölgede çok sayıda ahtapot hücresi ve çok az sayıda yıldız hücresinin bulunduğu tespit edilmiştir (38, 39). Her bir ahtapot hücresinin 60'dan fazla işitsel sinir lifi ile sinaptik bağlantı kurması nedeniyle, pekçok kaynaktan gelen eksitatorik post sinaptik potansiyellerin (EPSP) toplanmasıyla (sumasyon) çok kısa bir zaman diliminde uyarılırlar (24, 40).

2.2.4. Dorsal kohlear çekirdek

Dorsal kohlear çekirdek, VKÇ'den daha kompleks bir yapıya sahip olmakla birlikte morfolojik olarak üç katmana ayrıldığı tespit edilmiştir (41, 42). En dışındaki katman süperfisyal ya da moleküler hücre katmanı olarak bilinir ve bu katmanda küçük popülasyonlarda bulunan internöronların yanı sıra küçük granül hücrelerinin aksonları bulunmaktadır (43). Granül hücreleri kohlear çekirdeğin en küçük hücreleridir (çapları yaklaşık olarak 8 µm dir). Bu hücreler göz ardı edilebilecek seviyede önemsiz inputlara sahiptir ama ilginç bir şekilde intrinsik özelliklerinden dolayı sürekli aktif durumda bulundukları için spontan olarak aksiyon potansiyeli ürettikleri belirlenmiştir (44).

Dorsal kohlear çekirdeğin ikinci katmanı piramidal hücrelerin bolca bulunmasına istinaden piramidal hücre katmanı olarak bilinmektedir. Ayrıca bu katmanda cartwheel hücreleri olarak bilinen inhibitörük internöronlar da bulunur (28). Cartwheel hücrelerinin yalnızca işitsel sinir lifleriyle innervasyonu varken aynı zamanda küçük granül hücrelerinden de intrinsik inhibitörük inputlar aldıkları tespit edilmiştir (28, 45). Cartwheel hücrelerinin yine aynı katmanda bulunan fusiform hücrelere de projekte oldukları açıklanmıştır (46). Bu hücrelerin GABA ve glisin boyası almalarına rağmen piramidal ve cartwheel hücreleriyle glisinerjik sinapslar vasıtasıyla bağlantı kurdukları bildirilmektedir (47). Dorsal kohlear çekirdeğin en iç katmanı derin katman olarak bilinir ve bu katmanda işitsel sinir liflerinin yanı sıra giant hücrelerin de bulunduğu tespit edilmiştir. Dorsal kohlear çekirdeğin işitsel sinir lifleri ve granül hücrelerinin aksonları olmak üzere iki büyük afferent sistemi bulunmaktadır (48).

2.2.5. Superior oliver kompleks

Ponsun kaudalinde bulunan ve bir grup çekirdekten oluşan superior oliver kompleks (SOK) kohlear çekirdeğin aksine türler arasında önemli farklılıklar göstermektedir (26). SOK'da lateral süperior oliver (LSO), medyal süperior oliver (MSO) ve trapezoid cismin medyal çekirdeği (TCMÇ) olmak üzere üç temel çekirdek karakterize edilmiştir (49, 50). Sıçanlarda MSO'nun çok küçük bir yapıya sahip olduğu buna karşı kedi ve insanlarda çok iyi geliştiği bilinmektedir. Lateral süperior oliver ve TCMÇ hem sıçanlarda hem de kedilerde çok iyi gelişmiş bir yapıya sahipken insanlarda oldukça küçük bir yapıya sahiptir. Türler arasındaki bu farklılığın sebebi muhtemelen türlerin duyabileceği ses frekans aralıklarının farklı olmasıdır. Medyal süperior oliver, düşük frekanslı seslerin ve iki kulak arası (interaural) zaman farklılığının analizini yaparak işitilen ses kaynağının lokalizasyonunu belirlerken, LSO ve TCMÇ tarafından iki kulak arasındaki (interaural) ses şiddetinin kıyaslaması yapılarak ses kaynağının lokalizasyonu belirlenir (16).

2.2.6. Medial süperior oliver

Lateral süperior oliver ve TCMÇ arasında uzanan MSO'da; pirinsipal ve non-prinsipal olmak üzere iki hücre tipi karakterize edilmiştir. Medyal süperior oliver tüm işitme yolağında olduğu gibi tonotopik bir organizasyon göstermektedir. Düşük frekanslı sesler dorsalde, yüksek frekanslı sesler ventralde temsil edilmesine rağmen, genelde MSO hücrelerinin çoğunluğunun düşük frekanslı seslere duyarlı olduğu tespit edilmiştir (51). MSO'nun doğrudan AVKÇ'de bulunan küresel çalı hücrelerinden bilateral olarak

eksitatorik inputlar aldıkları belirlenmiştir (52). Genellikle lateralinde bulunan dentritlerinin ipsilateral tarafından gelen inputları aldığı, medyal tarafında bulunan dentritlerinin ise kontralateral tarafından gelen inputları aldıkları rapor edilmiştir (53). Medyal süperior oliver'in aynı zamanda trapezoid cismin medyal ve lateral çekirdeklerinden temelde glisinerjik inhibitör inputlar da aldığı bilinmektedir (54).

2.2.7. Lateral süperior oliver

Lateral süperior oliver'de diğer işitme çekirdekleri gibi tonotopik bir organizasyon göstermektedir. Çekirdeğin medyali yüksek frekanslı seslere duyarlı iken, düşük frekanslı sesler çekirdeğin lateralinde temsil edilir. Lateral süperior oliver her iki yanından AVKÇ hücrelerinden kaynaklanan inputlar alır. İpsilateral inputların doğrudan küresel çalı hücrelerinden geldiği ve çekirdeği uyarıcı bir özelliği olduğu bilinmektedir. Oysa kontralateral AVKÇ'den gelen inputlar indirekt bir yol izlemektedirler. Globüler çalı hücrelerinden kaynaklanan bu yolak önce trapezoid cismin medyal çekirdeğine projekte olduktan sonra TCMÇ'nin aldığı bu inputu LSO'ya glisinerjik inhibitör output (çıktı) olarak gönderdiği tespit edilmiştir (55). Lateral süperior oliver aynı zamanda bilateral olarak inferior kollikulusun merkezi çekirdeğine de projekte olmaktadır. Projekte olan ipsilateral hücrelerin çoğu glisinerjik ve inhibitöriktir. Buna karşı çekirdeğe kontralateral olarak projekte olan hücrelerin muhtemelen eksitatorik olabileceği düşünülmektedir (48).

2.2.8. Trapezoid cismin medial çekirdeği

Trapezoid cismin medyal çekirdeğinde glisinerjik prinsipal hücreler bulunmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi VKÇ'deki globüler çalı hücrelerinden gelen kalın aksonlar TCMÇ hücre somaları üzerinde büyük sinapslar yaparlar (Held kaliks). Her bir prinsipal hücre bir globüler çalı hücre aksonuyla sinaps yapar. Bu kalikslerin memeli beyinde bulunan en büyük sinaptik terminalleri oluşturduğu ve işitsel sinyalin globüler çalı hücrelerinden LSO'ya çok hızlı aktarılmasını sağladığı belirtilmiştir (56). TCMÇ'nin glisinerjik inhibitör nöronları çoğunlukla ipsilateral SOK'a ve lateral lemniskusun ventral kompleksinin dorsal kısmına projekte olduğu tespit edilmiştir (48).

2.3. Ventral kohlear çekirdeğin hücre tipleri ve projeksiyonları

Ventral kohlear çekirdekten elde edilen kesitlerde yapılan çalışmalarda farklı elektrofizyolojik ve morfolojik özellikler gösteren üç hücre tipi karakterize edilmiştir. Bu hücrelerden ahtapot tipi nöronlar PVKÇ'nin dorsal ve kaudalinde sınırları açık bir şekilde

görülen bir bölgede bulunurlar. Yıldız tipi ve çalı tipi nöronlar ise kohlear çekirdeğin özellikle ventral bölümünde yerleşim göstermektedirler (10, 23, 45). Kohlear çekirdekte anatomik olarak farklı bölgelerde bulundukları görülen bu hücrelerin farklı biyofiziksel özelliklere sahip oldukları da bilinmektedir. Yama kenetleme ile yapılan *in vitro* çalışmalarda çalı tipi ve ahtapot tipi nöronlara, eşik değeri aşacak miktarda depolarize edici bir akım verildiğinde sadece tek bir aksiyon potansiyeli oluşturdıkları gözlenirken, yıldız tipi nöronların ise eşik değeri aşacak bir akıma yanıt olarak tonik, çok sayıda düzenli aksiyon potansiyeli oluşturdıkları belirtilmiştir (10).

2.3.1. Yıldız hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve projeksiyonları

Yıldız şeklinde morfolojiye sahip olmalarından dolayı bu isim verilen yıldız hücrelerinin VKÇ'nin hemen hemen tüm alanlarında bulunabileceği tespit edilmiştir. Kohlear çekirdekte dentritik yapılarına, akson uzantılarına ve biyofiziksel özelliklerine bakılarak T ve D olmak üzere iki tip yıldız hücresi tanımlanmıştır. Eskiden multipolar hücreler olarak bilinen bu hücrelerin farklı özelliklerine bakılarak birden fazla isimlendirmeleri yapılmıştır. Fare beyninden elde edilen kohlear çekirdek kesitlerinde bu hücreler genellikle projeksiyon desenlerine bakılarak isimlendirilmişlerdir. Her ikisi de lokal olarak ventral ve dorsal kohlear çekirdeğe projekte olsalar da aksonları Trapezoid cisme projekte olanlar T-yıldız, intermediate akustik strianın Dorsaline projekte olanlar D-yıldız hücresi olarak tanımlanmıştır (57). Bazı araştırmacılar elektron mikrograflardaki somatik innervasyonlarının farklılığına bakarak tip 1 ve tip 2 hücreler olarak da isimlendirmelerini yapmıştır (58).

T-yıldız hücrelerinin aksonları inferior kollikulusa projekte olur ve çekirdeği uyarıcı özellikte iken, D-yıldız hücreleri ipsi ve kontralateral kohlear çekirdeğe projekte olur ve genellikle inhibitör bir etkisi bulunmaktadır. Her iki grup hücre de depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı tonik olarak düzenli bir şekilde ateşleme yaparlar ve çok sayıda aksiyon potansiyeli dizisi oluşturmaları nedeniyle ventral kohlear çekirdekte bulunan diğer hücre gruplarından basit şekilde ayırt edilirler (7, 59). T-yıldız hücrelerinin major eksitatorik inputları işitsel sinir liflerinden gelir. Her bir T-yıldız hücresi çok az sayıda (5 ya da 6) işitsel sinir lifinden input alırken, ahtapot hücreleri yaklaşık olarak 60'dan fazla işitsel sinir lifinden input alır (23, 31, 60, 61). T-yıldız hücrelerinin işitsel sinir liflerinden aldığı inputlar düzensiz ve fazik karakterdedir, fakat hücrelerin kendi intrinsik özelliklerinden dolayı fazik ve düzensiz olarak aldıkları inputlara yanıt olarak

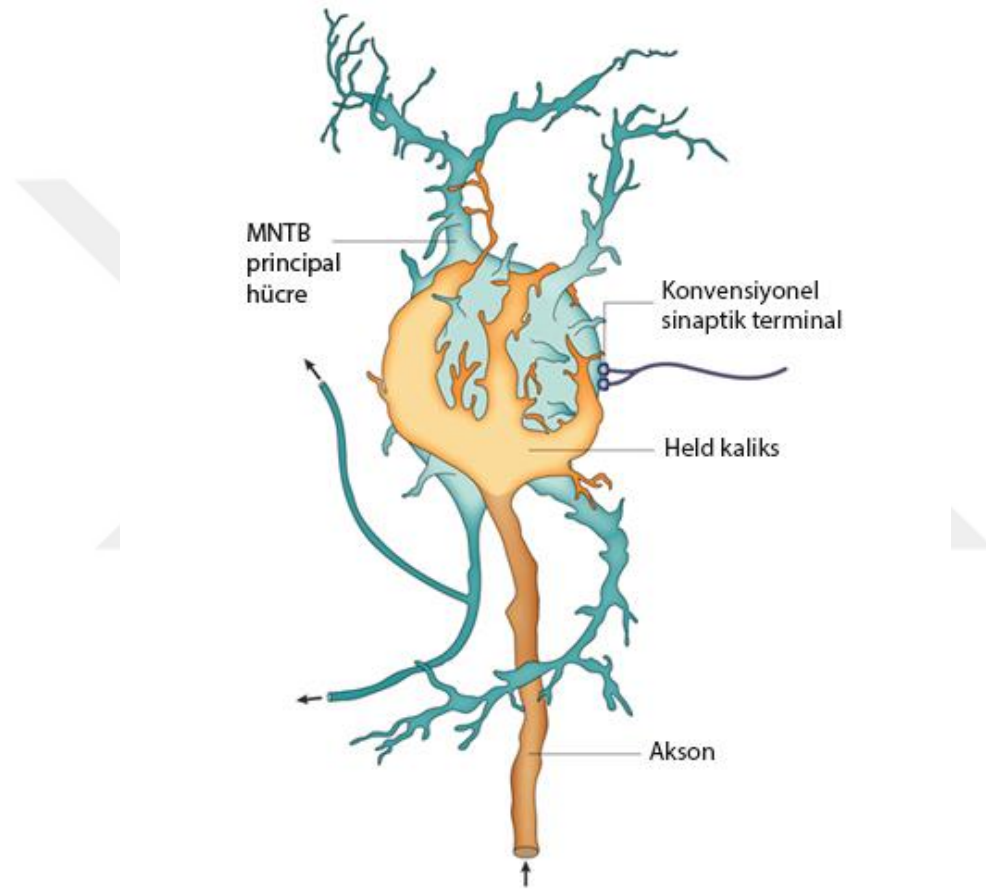
düzenli aralıklarla tonik bir şekilde ateşleme yaptıkları tespit edilmiştir. Bu ateşleme deseni “chopping firing pattern”, hücreler ise “chopper hücre” şeklinde tanımlanmıştır (62). T-yıldız hücrelerinin VKÇ bölgesinde sinir kökü ile ahtapot hücre alanı arasında bulunan multipolar hücre alanında yoğun şekilde bulundukları tespit edilmiştir. Bu hücre grubunun beyin sapında bulunan lateral lemniskusun ventral çekirdekleri, olivokohlear efferent nöronlar ve inferior kollikulusu da kapsayan birçok entegratif çekirdek grubu ile bağlantı kurduğu belirlenmiştir (11, 23, 43, 45).

2.3.2. Çalı hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve projeksiyonları

Ventral kohlear çekirdekte posterioventral yerleşimli olan ve bölgede çok sayıda bulunan büyük hücre gruplarından bir diğer hücre grubu çalı hücreleridir. Bu hücrelerin bilateral projeksiyonlara sahip oldukları yani SOK ve lateral lemniskusun ventral çekirdeğine projekte oldukları bildirilmiştir. Çalı hücrelerinin sesin tınısı, zamanlaması, yoğunluğu gibi doğal özellikleri hakkında bilgi taşıdıkları bilinmektedir (49). Çalı hücreleri genellikle 200 µm’den kısa, çok az sayıda dentritik dallanmalar yapan ve sinaptik inputları somaları üzerine yerleşik olan hücrelerdir (35). Çalı hücrelerinin projeksiyonlarının yanı sıra histolojik boyanmalarının da farklılığına bakılarak; büyük ve küçük küresel çalı (spherical bushy) ile globüler çalı (globular bushy) hücreleri olmak üzere üç alt tipi tanımlanmıştır (23, 45, 52). Bu hücrelerin aynı zamanda kohlear çekirdekte lokalizasyonların da farklı olduğu belirtilmiştir. Büyük küresel çalı hücreleri AVKÇ’nin rostralinde bulunur ve bu hücrelerin genellikle düşük frekanslı sesleri kodlayarak kontralateral MSO çekirdeğinin medyali ile ipsilateral MSO çekirdeğinin lateraline projekte oldukları tespit edilmiştir (36). Küresel çalı hücreleri ipsilateral olarak LSO’ya projekte olurken bilateral olarak da MSO’ya projekte oldukları bildirilmiştir. Globüler çalı hücreleri ise genellikle işitsel sinir kökünün yakınlarında bulunurlar. Bu hücrelerin yüksek frekanslı sesleri kodlayarak primer olarak kontralateral TCMÇ’ye projekte olduktan sonra ipsilateral olarak hem MSO’ya hem de LSO’ya projekte oldukları gösterilmiştir (49). Globüler çalı hücrelerinin TCMÇ’ye yapmış olduğu bu projeksiyon *Held kaliks (Calyx of Held)* olarak adlandırılır (21, 63). Held kaliks sinaps yapısının büyüklüğünün daha kolay anlaşılması için globüler bir çalı hücresi aksonunun TCMÇ prensipal hücrelerinde yapmış olduğu bu tip bir sinaps şekil 7’ de gösterilmiştir. Held kaliks yapısının eksitator presinaptik terminali o kadar büyüktür ki biyofiziksel çalışmalarda nörotransmisyon mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalarda aynı anda

hem pre hem de postsinaptik terminalden simultane kayıt alma imkanı verdiği için model olarak kullanılmaktadır (64).

Fareler düşük frekanslı sesleri çok az duydukları için bu hayvanlarda büyük küresel çalı hücrelerinin sayısının çok az olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple fare VKÇ’de bulunan çalı hücrelerinin büyük çoğunluğunun küçük küresel ve globüler çalı hücrelerinden oluştuğu belirlenmiştir (65).



Şekil 7. Held kaliks yapısı. Ref. (66)’den uyarlanmıştır.

Çalı hücreleri arasında en az anlaşılmış olanı ve fonksiyonel olarak en az bilineni küçük küresel çalı hücreleridir. Bu hücrelerin çoğunlukla ipsilateral SOK’a projekte oldukları ama bu çekirdeğin eksitasyon kaynağının baskın olarak; T-yıldız hücrelerinden mi yoksa küçük küresel çalı hücrelerinden mi geldiği henüz net olarak bilinmemektedir (52). Hem küresel hem de globüler çalı hücreleri işitsel sinirden eksitatorik inputlar almalarının yanı sıra aynı zamanda kaynağı tam olarak belli olmayan inhibitörük inputlar da aldıkları tespit edilmiştir. Bu inhibitörük sinapslar genellikle dentritler üzerinde bulunmaktadır (35).

2.3.3. Ahtapot hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri ve projeksiyonları

Tüm memelilerde ahtapot sinir hücreleri PVKÇ'nin dorsal ve kaudalinde sınırları açık şekilde görülebilen bir bölgede bulunmaktadır. Bu bölgede özellikle de insanlarda diğer hücre tiplerinin olmadığı belirlenmiştir (10, 23, 45). Her ahtapot sinir hücresi hem soma hem de dentritleri üzerinde bulunan sinapslar aracılığıyla pek çok sayıda işitsel sinir lifinden inputlar almaktadırlar. Bu bölgede farelerde her bir kohlear çekirdekte yaklaşık olarak 200 ahtapot sinir hücresi bulunur (61). Her ahtapot hücresi, hücre gövdesinin rostral yanından çıkan büyük pek çok sayıda (3-5 adet) kısa dentrite ve uzun tek bir aksona sahiptir (23). Ahtapot sinir hücresi dendritlerinin, tonotopik olarak organize bir şekilde birleşim gösteren liflerinin birlikte seyrettiği dorso-kaudal alanda, PVKÇ'deki işitsel sinir liflerinin yolu üzerine dikey olarak yerleşim gösterdiği rapor edilmiştir (31, 57, 61, 67). Ahtapot sinir hücreleri VKÇ'den çıkan ana yolaklardan birini oluşturarak intermediate akustik striya ile kontralateral superiyor paraoliver çekirdeğinde ve lateral lemniskus'un ventral çekirdeğinde sonlanan projeksiyonlar yaparlar. Bu projeksiyonların özellikle insanlarda belirgin olmakla birlikte tüm memelilerde bulunduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir (38, 68, 69).

Memeli PVKÇ'sinde bulunan ahtapot sinir hücrelerinin işitsel sinir liflerinde oluşan ateşlemeyi zamansal olarak mükemmel bir şekilde belirleyerek bu bilgiyi beynin daha üst işitsel çekirdeklerine ilettiği belirtilmektedir. Ahtapot sinir hücreleri "click" uyarılarına, saf tondaki (tek bir frekanstan oluşan ses tonu ile yapılan uyarı) seslerin başlangıcında ve periyodik olarak oluşan seslere karşı mükemmel bir zamanlama ile aksiyon potansiyelleri oluşturdıkları bildirilmektedir (70, 71). Uyarının başlangıcında oluşan aksiyon potansiyelinin zamanlaması ahtapot sinir hücrelerinde, diğer hiçbir sinir hücresiyle kıyaslanmayacak derecede, çok küçük bir "jitter" (zamansal olarak değişim gösteren) aralığına sahiptir (70). "Click" serilerine veya düşük frekanslarda yüksek genliğe (amplitüd) sahip saf tondaki seslere yanıt olarak ahtapot sinir hücrelerinin 1 kHz frekansa kadarki her bir uyarıya karşı bir aksiyon potansiyeli oluşturabildiği tespit edilmiştir (25, 70).

Pozitif akım enjeksiyonlarına karşı ahtapot sinir hücreleri eşik değere ulaştıktan sonra sadece bir tek aksiyon potansiyeli oluştururken, negatif akım enjeksiyonlarına karşı hiperpolarize olan voltaj yanıtlarda bir çökme (sag) görülmesi ahtapot tipi sinir hücreleri için karakteristik elektrofizyolojik bir özelliktir. Pozitif ve negatif akım enjeksiyonlarının ahtapot tipi sinir hücrelerinde çok hızlı ve çok küçük voltaj değişimleri

oluşturduğu bilinmektedir. Bu değişimlerin ahtapot tipi sinir hücrelerinin input dirençlerinin çok düşük olmasının bir sonucu olduğu tespit edilmiştir. Input dirençlerinin düşük olmasının nedeni ise fizyolojik voltaj sınırları içerisinde çok fazla sayıda voltaj-kapılı iyon kanallarının aktivasyonundan kaynaklandığı açıklanmıştır (10). Ahtapot tipi sinir hücreleri işitsel sinir liflerinin çok kısa bir süre içerisinde hep birlikte ateşlenmesini belirlediği ve bu hücrelerin dentritleri ile işitsel sinir lifi demetlerinin kesişim gösterdiği rapor edilmiştir. Bu kesişim hücrelerin birçok farklı sinir lifinden input aldığı anlamına gelmektedir. Pek çok işitsel sinir lifinden aldığı inputların sumasyonu, ahtapot hücrelerinin çok çabuk bir şekilde eşik değere ulaşması ve kısa sürede uyarılabilmesi anlamına gelmektedir (45, 61).

Ahtapot hücrelerinin hiperpolarizasyonla aktiflenen karışık katyon kanalı kondüktansı (g_h) ve düşük voltajla aktiflenen K^+ kondüktansından (g_{KL}) dolayı input dirençleri oldukça düşüktür. Bu özellik ile ahtapot hücrelerinin sinaptik akımlara karşı; hızlı ve kesin zamanlı cevap verdikleri bilinirken (25, 30), yıldız hücrelerinde potasyum kondüktansının (g_{KL}) çok az miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle yıldız tipi nöronların ateşleme oranları istirahat zar potansiyelindeki küçük değişimlere çok hassastır (72). Bunun sonucu olarak da bu hücrelerin depolarize olduklarında tonik bir şekilde ateşleme yaptıkları tespit edilmiştir (32). Ahtapot tipi sinir hücrelerinin kısa “zaman sabitine” ve düşük input direncine sahip olmalarından dolayı genellikle yaklaşık olarak 1 ms süre içerisinde sumasyonun gerçekleşmesi gereklidir (30).

2.4. Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin sinaptik bağlantıları

Ventral kohlear çekirdek, işitsel sinir lifleri ve granül hücrelerinin yosunsu terminalleri olmak üzere eksitatorik tabiatla olan iki büyük ekstrasik aksonal input alır İşitsel sinir liflerinin kohleadan aldığı akustik bilgiyi kohlear çekirdeğe getirdiği bilinmektedir. Granül hücrelerin yosunsu terminalleri ise pontin motor sistemden (73), işitsel çekirdeklerden (74), somatosensori (75) ve vestibular çekirdeklerden (76) olmak üzere beynin yaygın bölgelerinden multimodal inputlar getirmektedir. Bunlara ek olarak kohlear çekirdek aynı zamanda beyin sapının diğer çekirdeklerinden eksitatorik ve inhibitör efferent inputlar da almaktadır (77). T-yıldız hücrelerinin ve piramidal hücrelerin lokal kollateral terminalleri aracılığıyla glutamaterjik eksitasyon sağladıkları bilinmektedir (60, 62). D-yıldız ve cartwheel hücreleri ise glisinergic tabiatla olup, inhibitör bir etki göstermektedirler (46, 78). Ventral kohlear çekirdeğin ana uyarıcı

kaynağını glutamaterjik işitsel afferent sinirler oluşturmaktadır. VKÇ'nin aynı zamanda trapezoid cisimciğin ventral çekirdeğinden kaynaklanan iki grup kolinerjik efferent innervasyonu da bulunmaktadır. Bu iki grup efferent'den birini medyal olivokohlear efferent sinir lifleri oluştururken, diğerini VKÇ'ye projekte olan sinir liflerinin oluşturduğu tespit edilmiştir (72).

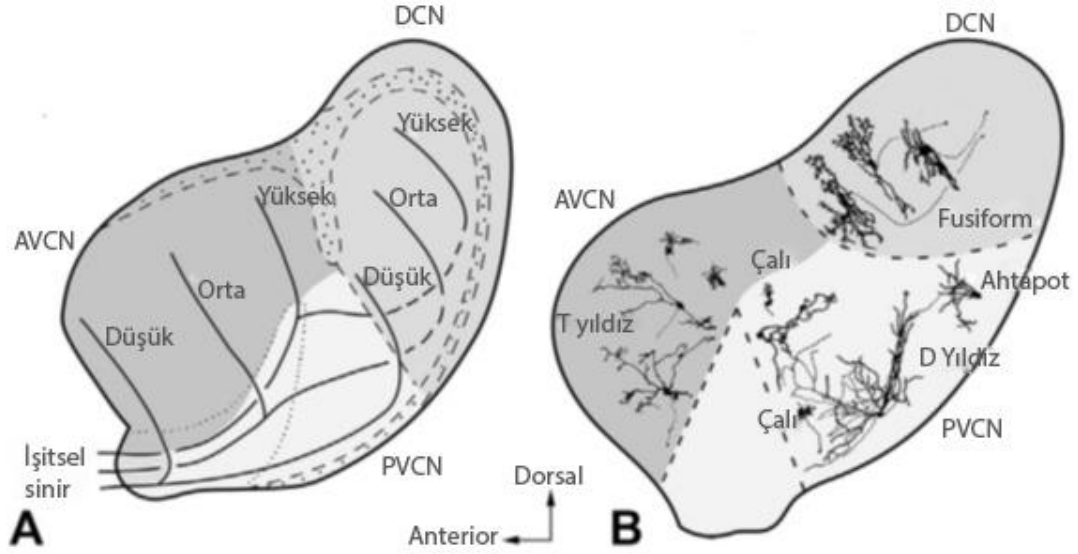
İşitsel sinir liflerinin kohlear çekirdekte bulunan hemen hemen tüm hücre grupları ile sinaps yaptığı belirtilmiştir (53). AVKÇ'de her küresel çalı hücresi "end bulb of held" aracılığıyla üç işitsel sinir lifinden input alırken, globüler çalı hücreleri daha küçük sayıda modifiye endbulbus'lar aracılığıyla 4-40 arasında işitsel sinir lifinden input almaktadır (35, 79). Yıldız tipi nöronlar işitsel sinir lifinin kollaterallerinden küçük sonlanmalar şeklinde inputlar alırlar. Kedilerde T ve D yıldız tipi nöronların somatik innervasyonları arasında açık bir farklılık tanımlanmıştır. D-yıldız tipi nöronların hücre gövdeleri yoğun bir şekilde sinaptik terminal ile örtülü olmakla birlikte, bu terminallerin yaklaşık olarak yarısı işitsel sinir liflerinden gelmektedir. Aksine T-yıldız tipi nöronların hücre gövdeleri üzerinde çok az sayıda terminal bulunur ve bu terminallerin yaklaşık olarak 10:1'inin işitsel sinir liflerinden geldiği belirtilmiştir (80).

İşitsel sistemin nörotransmitter maddesinin glutamat olduğuna dair pek çok kanıt vardır. İşitsel sinir liflerinde ve terminallerinde glutamat ve prekürsörü olan glutaminin yüksek seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir (81). VKÇ'de işitsel sinir lifinin postsinaptik terminallerindeki glutamat reseptörü temelde AMPA alttipidir. Genç hayvanlarda NMDA reseptörlerinin işitsel sinirin uyarılması neticesinde verilen yanıtta önemli derecede katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Fakat artan yaşla birlikte bu reseptörlerin işlenen yanıtta katkısı giderek azalmakta ve erişkin hayvanlarda önemsiz bir duruma geldiği belirtilmektedir. Bununla birlikte ifade etmek gerekir ki, işitsel AMPA reseptörleri çok hızlı kinetik özelliklere ve yüksek üniter bir iletkenliğe (kondüktansa) sahiptir (82).

2.5. Kohlear çekirdeğin tonotopik organizasyonu

Tıpkı kohlea ve diğer işitsel çekirdeklerde olduğu gibi kohlear çekirdek de tonotopik bir organizasyon göstermektedir. Kohlea'dan kaynaklanan işitsel sinir liflerinin kohlear çekirdeğe projekte olduğu süreçte uzaysal düzlemleri korunur ve kohlear çekirdek bölümleri de; gelen bu sinir liflerinin karakteristik frekanslarına göre innerve olmaktadır. Dolayısıyla kohlear çekirdeğin her bir bölümü innerve oldukları işitsel sinir liflerinin

karakteristik frekanslarına göre tonotopik organizasyon göstermektedirler. Daha üst merkezi işitsel yapılarda da bu tonotopik organizasyonun korunduğu çok sayıda araştırma neticesinde ortaya konmuştur (Şekil 8) (40).



Şekil 8. Kohlear çekirdek hücre tipleri ve tonotopik organizasyonu. A: İşitsel sinirin seyri boyunca kohlear çekirdeğin tonotopik organizasyonu, B: kohlear çekirdek hücre tiplerinin tonotopik haritada lokalizasyonları. Ref. (40)’den uyarlanmıştır.

2.6. Kohlear çekirdek nöronlarının ateşleme desenleri

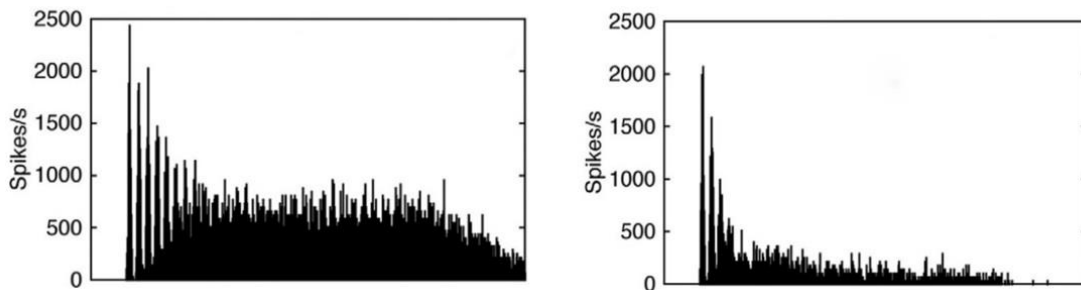
Ekstrasellüler kayıt sonuçları ve mikroskopik gözlemler neticesinde spesifik olarak farklı morfolojilere sahip olan kohlear çekirdek nöronlarının aynı zamanda farklı ateşleme desenlerine sahip olduğu da bilinmektedir. Kohlear çekirdek nöronlarından alınan intrasellüler kayıtlar; farklı morfolojik özellikleri olan bu hücrelerin üç farklı ateşleme desenine sahip olduğunu göstermiştir (83).

Kohlear çekirdek nöronlarının ateşleme desenleri; *in vivo* deney şartları altında anestezi edilmiş hayvanlara timpanumun merkezine 1-2 mm yakınlıkta yerleştirilmiş olan bir ses dağıtım probu ya da mikrofonu aracılığıyla akustik uyarı verilerek bu nöronlardan alınan ekstrasellüler kayıtlarla karakterize edilmiştir (83). Bu araştırmalar sonucunda AVKÇ nöronlarından yıldız tipi hücrelerin “chopper”, çalı tipi hücrelerin “primary like” ateşleme desenlerine sahip oldukları (84), PVKÇ’de bulunan ahtapot tipi hücrelerin ise “onset” ateşleme deseni gösterdikleri daha önceki birçok çalışma ile rapor edilmiştir (45, 79).

Ventral kohlear çekirdeklerinden çalı hücrelerinin akım voltaj eğrileri incelendiğinde hücre dışına doğru (outward) bir rektifikasyon gösterdikleri bildirilmiştir. Bu hücrelerin zar dirençleri düşük bulunmuştur (33). Dolayısıyla bunun sonucu olarak bu hücrelerin “zaman sabitleri” kısadır. Zaman sabitlerinin kısa olması; EPSP’lerin sumasyonu sonucu, hücrelerin çabuk bir şekilde uyarılma eşik değerini aşıp ateşleme yapması anlamına gelmektedir. Çalı hücrelerinin çok hızlı şekilde uyarılmasıyla, işitsel sinir liflerinden aldığı inputlarla temporal desenler korunmuş olur. Böylece “primary like” ateşleme desenine sahip olan bu hücrelerin düzensiz aksiyon potansiyelleri oluşturdıkları belirtilmektedir (84, 85). Çalı hücrelerinin aksine yıldız hücreleri daha düz bir akım voltaj eğrisine sahiptir (86). Depolarize edici akım enjeksiyonlarına yanıt olarak düzenli deşarjlarla sürekli tonik (sustain) tarzda aksiyon potansiyelleri oluşturmaktadırlar (87).

2.6.1. Chopper nöronlar (düzenli ateşleme yapan nöronlar)

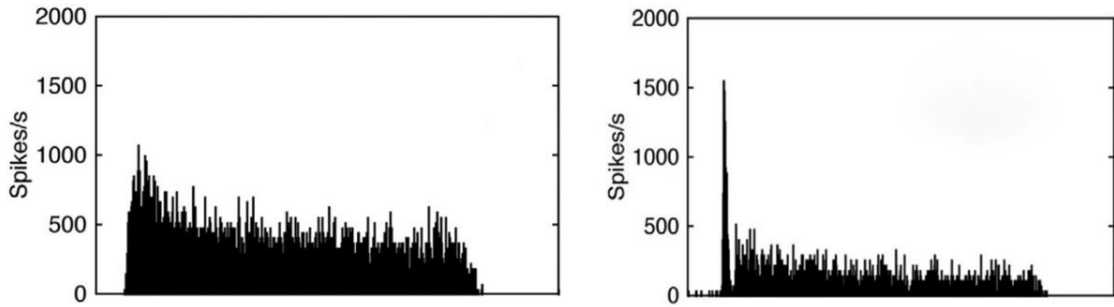
“Chopping” desen; hücrenin akustik bir uyarıya yanıt olarak oluşturduğu aksiyon potansiyellerinin Peri Stimulus Time Histogram (PSTH) grafiğinde, özellikle yanıtın hemen başlarında periyodik olarak pik değerlere ulaştığını anlatmak için kullanılan bir terimdir. Yapılan analizler neticesinde “chopper” ateşleme deseni, “chopper sustained” (chop-s) ve “chopper transient” (chop-t) olarak ikiye ayrılmıştır. “Chop-s” ve “chop-t” desenleri arasındaki farklılıklar intrasellüler kayıt traselerinde de görülmektedir. “Chop-s” ateşleme desenine sahip yıldız tipi nöronların enjekte edilen akım süresince düzenli aksiyon potansiyelleri oluşturduğu belirtilmiştir. Buna karşın “chop-t” ateşleme desenine sahip nöronlar, akustik stimulusun başlarında düzenli aksiyon potansiyelleri oluşturma eğilimindeyken stimulus süresinin ortalarına doğru düzensiz ve küçük aksiyon potansiyelleri oluşturdıkları tespit edilmiştir (83) (Şekil 9).



Şekil 9. Yıldız tipi nöronlara karakteristik olan “chopper S” ve “chopper T” ateşleme deseni örnekleri. Ref. (88)

2.6.2. Primary like nöronlar (düzensiz ateşleme yapan nöronlar)

Çalı hücreleri düzensiz olarak ateşleme yapan “primary like” ateşleme desenine sahip olan nöron tipidir. Bu ateşleme deseninde hücreler sürekli (sustain) tarzda düzensiz aksiyon potansiyelleri oluşturmaktadırlar (84). Fakat burada yıldız tipi nöronlarda olduğu gibi düzenli aralıklarla aksiyon potansiyeli oluşması söz konusu değildir. “Primary like” ateşleme deseninde akım enjeksiyonlarına düzensiz yanıt verilmesi neticesinde PSTH grafiğinde patlayıcı tarzda büyük dalgalanmalar görülmektedir. İntrasellüler olarak alınan kayıtlarda değişen genliklerde hızlı dalgalanmalar meydana gelir ki, aksiyon potansiyelinden sinaptik potansiyelleri ayırmak oldukça güçtür. “Primary like” ateşleme deseninin ayrıca farklı bir türü daha tanımlanmıştır. “Primary like with notch” denilen bu desende stimulusun hemen başında verilen yanıt, pik yanıtı takiben 1-2 ms duraksayarak yanıt oluşturmadığı ve daha sonra sürekli yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 10) (88).



Şekil 10. Çalı tipi nöronlara karakteristik olan “Primary like” ve “Primary like with notch” ateşleme deseni örnekleri. Ref. (88).

2.6.3. Onset nöronlar

Depolarize edici akım enjeksiyonları süresince “onset” ateşleme desenine sahip olan nöronlar akımın başlangıcında bir ya da iki tane aksiyon potansiyeli oluşturma eğilimindedir. Ahtapot tipi hücreler “onset” ateşleme desenine sahip nöronlardır. Bu nöronların ateşleme deseni aynı zamanda depolarize edici akım enjeksiyonlarına spesifik deşarj desenleriyle de ilişkilidir. “Chopper” nöronlarında enjekte edilen akımın büyüklüğü arttıkça bu nöronların deşarj oranları akım seviyesine bağlı olarak artmaktadır. “Primary like” ve “onset” nöronların ateşleme desenleri ve deşarj oranları akımın büyüklüğünden bağımsız olduğu gösterilmiştir (Şekil 11) (83).



Şekil 11. Ahtapot tipi nöronlara karakteristik olan “onset” ateşleme deseni. Ref. (88).

2.7. İyon kanalları

2.7.1. Giriş

Nöronların elektriksel özellikleri büyük ölçüde voltaj kapılı iyon kanalları tarafından şekillendirilir. İntegral zar proteinleri yapısında olan bu kanalların, zardan sadece belirli iyonların geçişine izin veren oldukça seçici por (gözenek) kısımları vardır (89). Zarın elektriksel potansiyelinin değişmesi neticesinde iyon kanalının yapısında meydana gelen konformasyonel değişikliklere bağlı olarak kanalın por bölgeleri açık ya da kapalı halde bulunabilirler. Bu durumlar arasındaki geçişler kanalın kapı (gating) özellikleri olarak adlandırılmaktadır (90).

Kanallar; açık, kapalı ya da inaktif olmak üzere üç temel konfigürasyon da bulunabilirler. Kapalı bir kanalın açılması; aktivasyon, açık bir kanalın tekrar kapanması; deaktivasyon olarak bilinmektedir. İnaktivasyon ise kanalın yapısının konformasyonel olarak değişikliğe uğrayarak, aktivasyon kapısının açık ama inaktivasyon kapısının kapanması anlamına gelir. Fakat kanal açık olmasına rağmen iyonlar geçemez (91, 92). Kanalın açılması ya da kapanması voltaj değişimine bağlı olarak meydana gelirse bu tür kanallar voltaj duyarlı iyon kanalları olarak tanımlanırlar. Sodyum (Na^+), potasyum (K^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyonları için oldukça seçici olan voltaj duyarlı iyon kanalları nöronlarda zarın elektriksel potansiyelini belirleyen ana unsurlardır (93).

Altmış yıldan fazla bir süredir memeli beyinde voltaj ya da ligand duyarlı iyon kanallarının dağılımını çalışmak için elektrofizyolojik metodlar öncelikli olarak kullanılmıştır. Bu çalışmaların iki temel amacı vardır. Bunlardan ilki; nöronlar karmaşık, entegre ateşleme özelliklerine sahip belirli bir iyon kanalı sınıfının örneğinin (Na , K^+ , Ca^{+2}) spesifik olarak nasıl katkıda bulunduğunu araştırmak olmuştur. Son yıllarda bu çabalar akım yada voltaj kenetleme metodları kullanılarak her bir iyon kanalının zar

uyarılabilirliğine spesifik katkısını ortaya çıkarmak için tek bir nöronun dentritinden hatta akson terminalinden kayıtlar alınarak başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Elde edilen bulgular nöronal uyarılabilirlik mekanizmasına katkıda bulunan karmaşık iyon kanallarının alt tipleri ve biyofiziksel özellikleri hakkında zengin bilgiler vermiş olmakla birlikte, kanalın moleküler yapısı hakkında elde edilen bilgiler sınırlı düzeyde kalmıştır. Bu dezavantajdan kurtulmak için sinir bilimciler ikinci amaçları doğrultusunda çalışmalara başlayarak uyarılabilirliğe etkisi olan her bir kanalın moleküler yapısını ortaya çıkarmaya çalışmışlardır. Bu moleküler yaklaşımlar neticesinde voltaj duyarlı iyon kanallarının por bölgesini oluşturan α alt tiplerini belirleyen cDNA ekspresyonu ve klonlanması yapılarak nöronların elektriksel uyarılabilirliğine katkıda bulunan çok geniş bir iyon kanalı ailesini ortaya çıkarılmıştır (94).

2.7.2. İyon kanallarının sınıflandırılması ve çeşitliliği

Araştırmalar neticesinde çok fazla iyon kanalı ailesinin bulunması ve bunların isimlendirilmesi bir takım karışıklıklara yol açmaktaydı. Pek çok alt tipi bulunan potasyum iyon kanallarındaki bu karışıklığı gidermek amacıyla Chandy geniş ölçekte kabul gören sistematik bir isimlendirme yöntemi önermiştir (95). Bu sistem ilerleyen zamanlarda sodyum ve kalsiyum iyon kanalları için de benimsenerek kabul görmüştür. Neticede hemen hemen tüm voltaj duyarlı iyon kanalları için açık, sistematik ve terminolojik olarak isimlendirmeleri ve sınıflandırılmaları yapılmıştır (96, 97).

Bu sistem, kanal hangi iyon fizyolojik olarak seçici ve geçirgen ise o iyonun kimyasal simgesinin kısaltılması esasına dayanmaktadır ve protipi potasyum kanalları (Kv) olmuştur. Protipik Kv kanalları sekans benzerliğine bağlı olarak Kv1 (Shaker), Kv2 (Shab), Kv3 (Shaw) ve Kv4 (Shal) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Kalsiyum kanalları (Cav), hem sekans hem de fonksiyonel benzerliğine bağlı olarak Cav1, Cav2 ve Cav3 olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Sodyum kanalları (Nav), tüm sodyum kanallarını kapsayan klasik voltajla aktive olan tek tip sodyum kanalından oluşmaktadır (94).

2.7.3. Voltaj bağımlı iyon kanalları

2.7.3.1. Sodyum kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanalları sinir, kas ve diğer uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin başlamasına öncülük eden kanallardır. Sodyum akımlarının aksiyon potansiyelini başlattığını Hodgkin ve Huxley voltaj kenetleme tekniğini ilk defa kullanarak 1950 yılında keşfetmişlerdir. Buna göre fonksiyonel bir sodyum kanalı 260

kDa ağırlığında büyük bir α altünitesi ve 30-40 kDa ağırlığında küçük β altünitesinden oluşmaktadır (98-100). Alfa altünitesi kanalın primer olarak yapısal özelliklerini belirler iken; β altünitesi voltaj duyarlı bu kanalların aktivasyon, inaktivasyon ve kinetik özelliklerini modüle etmektedir. Sodyum kanallarının α altünitesi 10 gen tarafından kodlanır. Bu alttipi kanalların farklı uyarılabilir dokularda ifade edildiği bildirilmektedir (73). Bunlar arasında Nav1.1, Nav1.3, ve Nav1.6 alttipleri MSS'de, Nav1.7, Nav1.8, ve Nav1.9 alttipleri ise periferik sinir sisteminde primer olarak bulunan sodyum kanal tipleridir. Nav1.4 alttipi primer olarak iskelet kasında ve Nav1.5 alttipi ise primer olarak kalp kasında bulunmaktadır. Bu sodyum kanallarının büyük bir çoğunluğunun primer olarak bulunduğu dokunun dışında diğer pek çok uyarılabilir dokuda da bulunduğu gösterilmiştir (101).

Sodyum kanalları antiepileptik, antiaritmik ve lokal anestezikler gibi klinik olarak kullanılan çok sayıda kimyasal ajan tarafından bloklanır. Bu ilaçlar çoğunlukla kanalın por bölgesine bağlanarak iyon geçişini engellemek suretiyle etki göstermektedirler (102). Sodyum kanal aktivitesinin, zar potansiyelinin değişimine bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir. Fakat beyinde eksprese edilen diğer bazı alttiplerinin (Nav1.1, Nav1.2) serotonin, dopamin, asetilkolin ve diğer bazı nörotransmitter maddelerin aracılığıyla protein kinaz A ve protein kinaz C'yi aktifleyerek G protein üzerinden kanalın aktivitesini modüle ettiği rapor edilmiştir (103). Sodyum kanalı genleriyle ilişkili patolojilerde pek çok genetik hastalık tespit edilmiştir. Bunlar arasında kardiyak aritmi, epilepsi, kronik ağrı, periyodik paralizin kalıtsal formları ve uzamış QT sendromu gibi önemli patolojiler yer almaktadır (101).

2.7.3.2. Kalsiyum kanalları

Voltaj duyarlı kalsiyum (Ca^{++}) kanalları zar depolarizasyonuna bağlı olarak açılan ve elektrokimyasal gradyanta göre hücre dışından hücre içine doğru kalsiyum iyonlarının geçişine izin veren kanal grubudur (104). İlk Ca^{++} akımları kardiyak miyositlerden kaydedildiğinden beri, farmakolojik ve fizyolojik kriterlere bakılarak birçok Ca^{++} kanal alttipi tanımlanmıştır (105). Memeli hücrelerinde fonksiyonel ekspresyonları ve cDNA klonlanmasına bağlı olarak $\alpha 1$ alt biriminin farklılığına göre 10 farklı Ca^{++} kanal tipi belirlenmiştir. Bu kanallar yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre Cav1, Cav2 ve Cav3 olmak üzere üç gruba ayrılır. Bu grupların herbirinde pek çok kanal üyesi bulunmaktadır (96). Cav1 kanal ailesi L tipi kalsiyum kanalları olarak bilinmektedir (Cav1.2, Cav1.3, and Cav1.4). Bu kanallar yavaş voltaj bağımlı kapı özelliklerine sahiptir ve dihidropiridin

agonist ve antagonistlerine yüksek derecede affinite göstermektedirler (106). Cav2 kanal ailesi üyeleri kendi aralarında aminoasit diziliminde farklılık gösterirler ve temelde (Cav2.1, Cav2.2, and Cav2.3) olarak tanımlanmıştır (107). Cav2 kanalları Q ve P tipi kalsiyum kanallarını kodlar ve bu kanal akımları ω -agatoksin tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir. Cav2.2 ailesi N tipi kalsiyum akımlarından sorumludur ve bu akımlar ω -konotoksin tarafından bloklanır. Cav2.3 ailesi R tipi kalsiyum akımlarına karşılık gelir. R-tipi kalsiyum kanalları hem Ca kanal antagonistlerine hemde diğer kalsiyum kanallarının hassas olduğu toksinlere karşı oldukça dirençlidir (108). R tipi kalsiyum akımları tarantula toksini olan SNX-482 tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (109). Cav3 ailesinin tüm kanal tipleri (Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3) ise T tipi akımlardan sorumludur. Cav3 kanal ailesinin akımları nikel ile bloklanabilir ayrıca kadmiyum tüm yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarının tamamını düşük konsantrasyonlarda (mikromolar) inhibe edebilir (105).

Kalsiyum kanalları aynı zamanda düşük voltajla aktive olan ve yüksek voltajla aktive olan kanal grupları olarak da sınıflandırılırlar. Düşük voltajla aktive olan kanallar küçük kondüktansa sahiptirler ve bu kanalların aktive olabilmesi için zar potansiyelinde hafif depolarize edici küçük potansiyel değişimleri yeterlidir (110). T tipi kalsiyum kanalları düşük voltajla aktive olan kanallardır. Aksine yüksek voltajla aktive olan kalsiyum kanallarının aktive olabilmesi için zar potansiyelinde büyük depolarizasyon dalgası gereklidir. Yüksek voltajla aktive olan kanalların kondüktans, kinetik, farmakolojik özelliklerine bakılarak pek çok alt tipi bulunmuştur. Bu kanallar temelde P/Q, N, L ve R tipi kalsiyum kanalları olarak sınıflandırılabilir (111).

2.7.3.3. Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı katyon kanalları

Hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı katyon kanalları (HCN) bilinen diğer birçok iyon kanalının aksine zarın hiperpolarize olması ile aktive olur. Memelilerde MSS ve kalpte ekspresyonları gösterilen bu kanal ailesi dört gen tarafından kodlanır ve dört üyesi bulunmaktadır (HCN1-4) (112). Kalpte eşsiz biyofiziksel özelliklerinden dolayı bu kanallar “tuhaf, ilginç” anlamına gelen “funny” kanalları olarak da bilinmektedirler (113). Genellikle -55, -60 mV yakınlarında negatif hiperpolarize potansiyellerde açılan bu kanalların aktivasyonu siklik adenosin monofosfat (cAMP) ile doğrudan ilişkilidir. Siklik adenosin monofosfat seviyesini yükselten hormonlar ve nörotransmitter maddeler HCN kanal aktivasyonunu da kolaylaştırırlar. Kalpte sinoatriyal düğümdeki uyarı çıkışından ve düzenlenmesinden sorumlu olan bu kanalların

aktivasyon sürecinin siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve nitrik oksit konsantrasyonuyla da yakından ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (114). HCN kanalları karışık katyon kanallarıdır. Yani hem potasyum hem de sodyum iyonlarının geçişine izin veren spesifik bir por bölgesi bulunur. Sodyum iyonlarının potasyum iyonlarına göre geçiş oranları ($\text{Na}^+:\text{K}^+$, 1:3-1:5) arasında değişir. Kanalin por bölgesi anyonların geçişine izin vermez iken kanal kondüktansının ekstrasellüler klor konsantrasyonuna duyarlı olduğu bildirilmiştir (115).

Uzun zamandır HCN kanallarının tek değerlikli katyonların geçişine izin veren bir yapısı olduğu düşünülmekteydi. Yakın zamanda ise elde edilen veriler iki değerlikli kalsiyum iyonlarına küçük miktarlarda geçirgen olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır. HCN kanalları çok düşük konsantrasyonlarda sezyum, ZD7288 ve ivabridin gibi kimyasal ajanlarla selektif şekilde bloklanır (30).

HCN kanalı alt tiplerinin aktivasyon kinetikleri birbirinden farklıdır. HCN1 en hızlı kanal aktivasyonuna sahip kanal iken HCN4 en yavaş aktive olandır (116). Temelde sinir sisteminde ve kalpte ifade edilen HCN kanallarının ifade edilme dereceleri de farklıdır. HCN1'in beyinde; neokorteks, serebellar korteks, spinal kord ve beyin sapı çekirdeklerinde, HCN2'nin talamus ve beyin sapı çekirdeklerinde, HCN4'ün olfaktor bulbusda ve talamik çekirdeklerde yoğun şekilde ifade edildiği saptanmıştır. HCN3 beyinde en az ifade edilen kanal alttipidir. HCN kanal alt tiplerinin tamamının kalp dokusunda ifade edildiği bilinmektedir (117).

2.7.3.4. Potasyum kanalları

Potasyum iyon kanalları farklı biyofiziksel özelliklere sahip olan ve pek çok alt tipi bulunan büyük, heterojen bir iyon kanalı grubudur. Hemen hemen tüm hayvan ve bitki türlerinde bulunmaktadır (118). Potasyum iyon kanalları; iyon akımının yönüne ve aktive olma mekanizmalarına bakılarak dışarıya doğru (outward) ya da içeriye doğru (inward) akımlara sahip olan kanallar şeklinde gruplandırılır. Potasyum akımları yaklaşık olarak 60 yıl kadar önce Huxley ve Hodgkin'in mavi mürekkep balığının dev aksonunda yaptığı aksiyon potansiyelinin temelini iyonik analizinde voltaj bağımlı olarak "outward" şeklinde tanımlanmıştır. Bu akımlar klasik potasyum akımları olarak da bilinmekte olup, istirahat potansiyelinde genellikle kapalı olmakla birlikte depolarizasyon altındayken aktive olurlar. Bu tip K^+ kanallarında dışarıya doğru (outward) akımın önemi; çoğu

uyarılabilir hücrede aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazına büyük oranda katkıda bulunmasıdır. Klasik K^+ kanallarının aksine içeriye doğru (inward) K^+ kanalları ise istirahat potansiyellerinde aktif olmakla birlikte depolarizasyon altında kapalıdır (118). Potasyum kanalları biyofiziksel, fonksiyonel ve farmakolojik özelliklerinin farklı olmasına bağlı olarak 12 alt gruba ayrılmıştır (Kv1.x-Kv12.x). Bunlar arasında yer alan Kv10, Kv11 ve Kv12 aileleri EAG (*ether a go go*) geni ile ilişkili kanallardır.

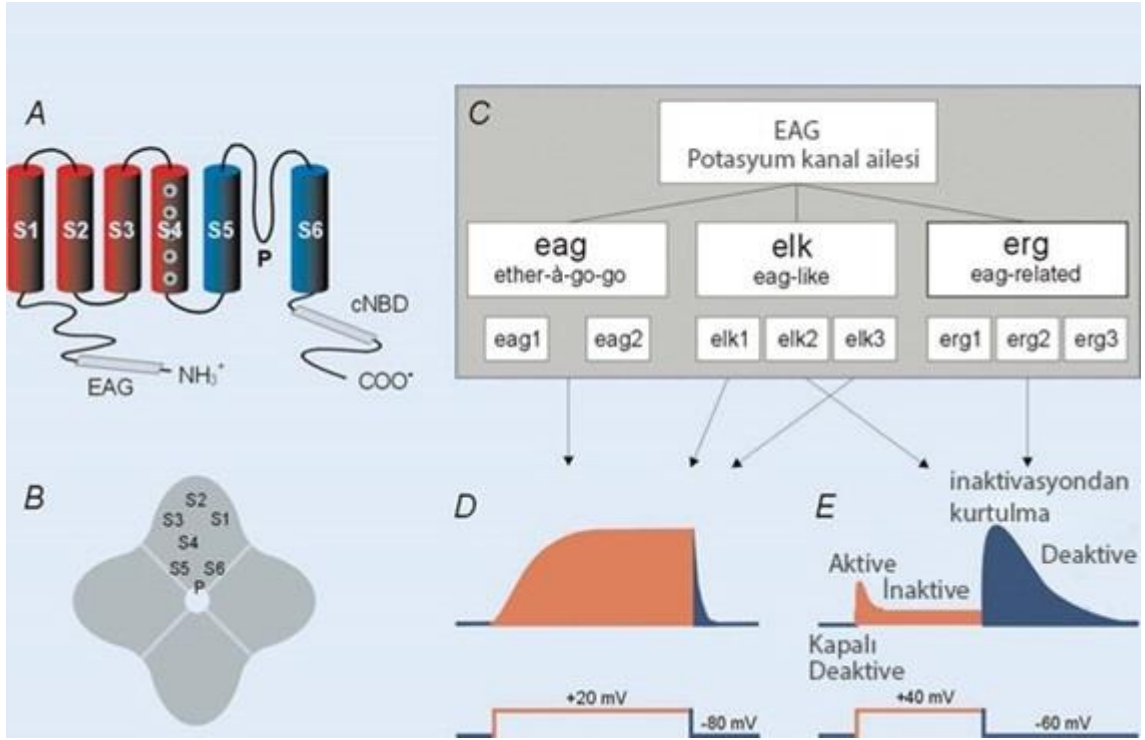
2.7.3.5. ERG kanalları

Ether a go go geni ile ilişkili kanallar (EAG); voltaj kapılı potasyum kanal ailesinin KCNH familyasına ait olan kendi içerisinde EAG (*ether a go go*, Kv.10x), ERG (*ether a go go related*, Kv.11x) ve ELK (*ether a go go- like*, Kv.12x) olmak üzere üç alt tipi bulunan iyon kanalı grubudur (Şekil 12) (2). ERG kanalları kendi içerisinde ERG1 (Kv11.1), ERG2 (Kv11.2) ve ERG3 (Kv11.3) olmak üzere farklı biyofiziksel özellikler gösteren üç farklı gruba ayrılır (119, 120). Bu kanallar literatürde hERG, Ikr, KCNH2 kanalları olarak temsil edilirler (1). ERG kanalları istirahat zar potansiyelinin düzenlenmesinde (121), hormon salınımında (5), aksiyon potansiyelinin ateşleme deseni, frekansı ve süresinin belirlenmesinde (6) kritik rol oynadığı bildirilmiştir (122).

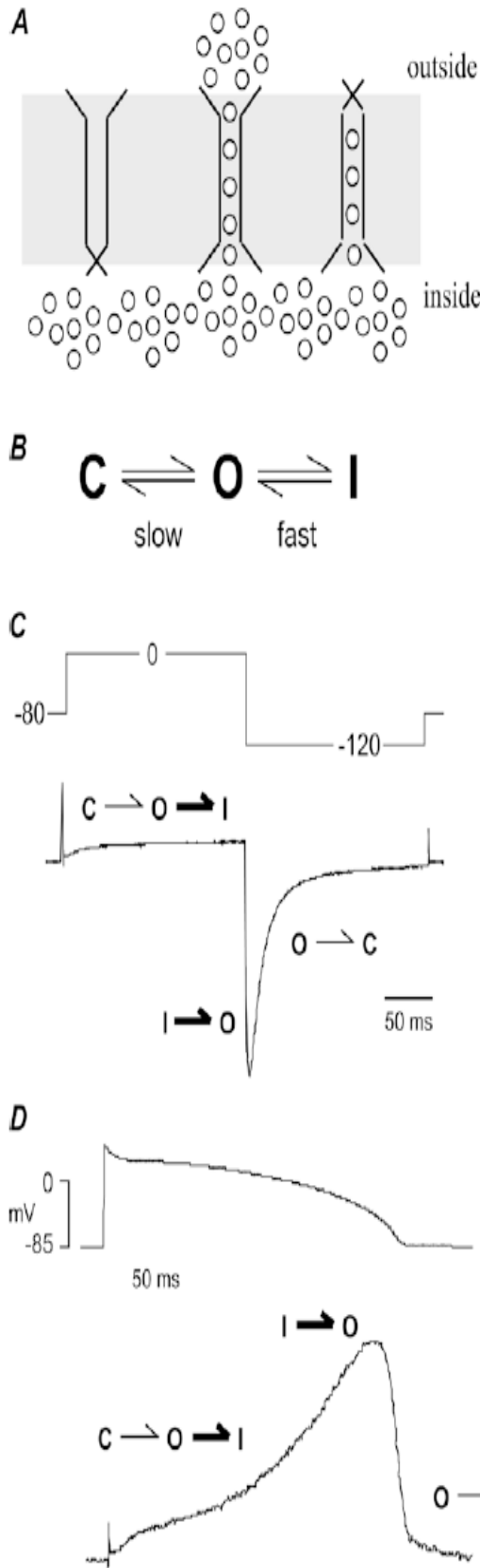
İnsan *ether a go go related* geni (*human-ERG*, *hERG*) ilk olarak 1994 yılında hipokampus bölgesinden klonlanarak voltaj duyarlı içeriye doğru iyon akışına müsaade eden (inward rectifier) K^+ kanalı olarak karakterize edilmiştir (2, 123). Kanalin por bölgesinin eşsiz yapısı sayesinde kardiyak aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazı için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Şekil 13) (2, 4). Voltajla aktive olan çoğu K^+ kanalının aksine ERG kanalları K^+ iyonlarının hücre içine doğru girmesine müsaade ettiği (inward) için, kalp ventriküler hücrelerinde aksiyon potansiyelinin plato fazı süresince hücreden K^+ çıkışını sınırlandırmada rol aldığı düşünülmektedir (124). Böylece ERG kanallarına kardiyak aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının süresini belirleme gibi bir görev addedilmiştir.

ERG kanallarının alışılmışın dışında aykırı biyofiziksel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu kanalların yapısal özelliklerinden dolayı inaktivasyon kinetikleri aktivasyon kinetiklerine göre çok hızlıdır. Şekil 12 E grafiği incelendiğinde grafinin alt kısmında akım protokolünün uygulanması neticesinde alınan voltaj yanıt temsili olarak görülmektedir. ERG kanalları istirahat zar potansiyelinin depolarize değerlere doğru

gitmesiyle beraber aktive olur. Fakat inaktivasyon kinetiklerinin çok hızlı olmasından dolayı kanal hemen inaktive olur. Şekil 12 E’de görüldüğü gibi ERG kanalları inaktivasyondan kurtulduğunda ölçülen akımın büyüklüğü kanal aktive olduğunda ölçülen akımın büyüklüğünden daha fazladır. Bu durum ERG kanallarını diğer kanallardan ayıran önemli bir özelliktir.



Şekil 12. EAG potasyum kanal ailesi ve ERG kanal yapısı. **A.**ERG kanalları dört alt üniteden oluşur ve bu alt ünitelerin her birinde altı transmembran segment (S1-S6) bulunur. **B.** Dört alt ünitenin her birinde bulunan ve birlikte S5 segmentinden başlayarak S6 segmentinin sonuna kadar uzanan aminoasit sekansı bir açıklık bölgesi (por) oluşturur ve bu açıklık kanaldan hangi iyonun geçeceğini belirleyen seçici bir filtre olarak fonksiyon görür. **C.** EAG potasyum kanal ailesi, üyeleri ve alttipleri. **D** ve **E.** ERG kanallarının kinetik özelliklerinin şematik gösterimi. Ref. (3)’ten uyarlanmıştır.



A. ERG kanallarının üç konfigürasyonu bulunmaktadır: kapalı (C), açık (O), inaktif (I). Kapalı (C) bir kanalın açılması (O), aktivasyon olarak tanımlanır. İyon kanalının zarın hücre içine bakan tarafındaki aktivasyon kapısının açılması olarak düşünülür. Aktif durumda bulunan bir kanalın inaktif duruma geçmesi ise inaktivasyon (I) olarak tanımlanır ve kanalın hücre dışına bakan tarafına açılan kapısının kapanması olarak düşünülür.

B. ERG kanallarını diğer potasyum kanallarından ayıran en önemli özellik aktivasyon ve deaktivasyon süreçlerinin çok yavaş, inaktivasyondan kurtulma “recovery” ve inaktivasyon süreçlerinin çok hızlı meydana gelmesidir.

C. ERG kanalının yavaş aktivasyon ve hızlı inaktivasyon kinetiklerinden dolayı depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı kanaldan çok küçük bir akım geçer. Bu olay kardiyak ventriküler miyositlerde kardiyak aksiyon potansiyelinin plato fazına karşılık gelir (yaklaşık olarak 0 mV düzeylerinde). Ancak plato fazından sonraki repolarizasyon fazında K^+ için dönüşüm (reversal) potansiyelinden daha negatif düzeylerde (-120 mV) ERG kanalı çok hızlıca inaktivasyondan kurtulur, daha sonra akım giderek küçülür ve kanal deaktive olur (125).

Şekil 13. ERG K^+ kanalının kinetik özellikleri (125).

2.7.3.5.1. ERG kanallarının yapısal özellikleri

ERG kanalları voltaj bağımlı K^+ kanal ailesinin bir üyesidir. Tıpkı bu ailenin diğer üyelerinde olduğu gibi fonksiyonel olarak homotetramerik bir yapıya sahiptir; yani birbirinin aynısı olan dört alt üniteden oluşur ve bu alt ünitelerin her birinde altı transmembran segment (S1-S6) bulunur (2, 123). Kanalin her alt birimi sitoplazmik bir N terminal ve C terminal uca sahiptir. Bunların kanalın aktivitesinin düzenlenmesinde katkıda bulundukları tespit edilmiştir (126-130). Dört alt ünitenin her birinde bulunan ve birlikte S5 segmentinden başlayarak S6 segmentinin sonuna kadar uzanan aminoasit sekansı bir açıklık bölgesi (por) oluşturur ve bu açıklık kanaldan hangi iyonun geçeceğini belirleyen seçici bir filtre olarak fonksiyon görür (Şekil 12). Her alt ünitenin ilk dört transmembran segmentinin α sarmalı (S1-S4) kanalın açılıp-kapanma durumunu kontrol eden primer voltaj sensörü olarak görev yapar. Bu nedenle S4 transmembran segmentinin elektriksel yükünün değiştirilmesiyle kanalın aktivasyon kapısının açılması sağlanır (125).

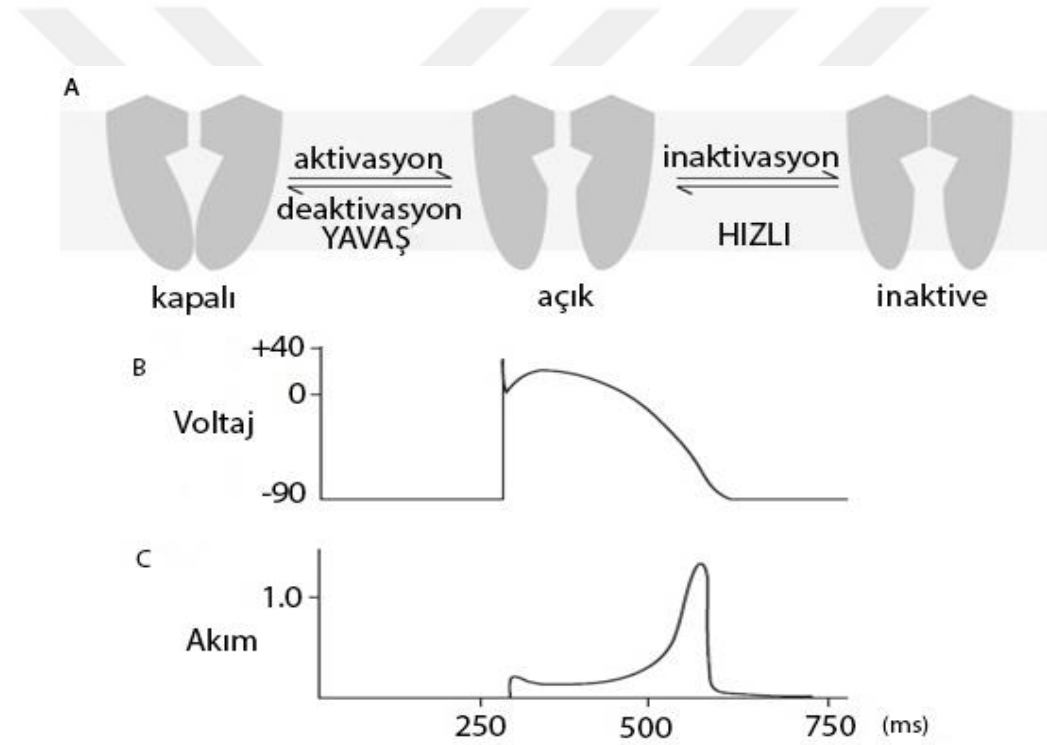
Yapısal olarak diğer K^+ kanal ailesi üyelerine benzemekle birlikte ERG kanalını onlardan ayıran en önemli özelliklerden birisi inaktivasyon kinetiklerinin aktivasyon kinetiklerinden çok daha hızlı olmasıdır (3). -20 ve +20 mV arasındaki zar potansiyellerinde yüzlerce milisaniye içerisinde kanal aktivasyonunu tamamlarken sadece 5-7 milisaniye gibi çok kısa bir süre içerisinde kanal inaktive olur (124). Ayrıca kanalın inaktivasyon süreci de voltaj bağımlı olması nedeniyle önem arz etmektedir (4). Kv11.1 (ERG 1) ve Kv11.2 (ERG 2) kanalları yavaş aktivasyon kinetikleriyle beraber güçlü içeriye doğru (inward rectifier) akım özelliği gösterirken, Kv11.3 (ERG 3) kanalları tam aksi bir özellik göstererek hızlı aktivasyon kinetikleriyle beraber zayıf içeriye doğru (inward rectifier) akım özelliği göstermektedir (3).

2.7.3.5.2. ERG kanallarının kalp üzerine etkileri

Kalp ventriküler miyositlerde gecikmiş rektifiyer K^+ (I_{KDR}) akımlarının; hızlı (I_{Kr}) ve yavaş (I_{Ks}) aktive olan iki komponenti bulunur (3). Hızlı K^+ akımlarının (I_{Kr}) modülasyonu ERG kanalları aracılığıyla düzenlenir (4). Hızlı K^+ akımlarının biyofiziksel özellikleri atrial ve ventriküler miyositlerin yanı sıra (131), sinoatriyal düğüm hücrelerinde de çalışılmıştır (132, 133). Sinoatriyal düğüm hücrelerinde yapılan çalışmalar neticesinde I_{Kr} 'nin bu hücrelerde kalbin ritim belirleyici (pacemaker) aktivitesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (133, 134). Ventriküler miyositlerde ise

I_{Kr} 'in aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazına ve plato fazı oluşumuna katkıda bulunduğu belirtilmiştir (3).

Özellikle kalpte ERG kanal proteinlerini ifade eden genlerde (7. kromozom) meydana gelen mutasyonlar nedeniyle oluşan kardiyak aritmiler neticesinde “Uzamış QT sendromu” (long QT) ve ani ölümler görülmektedir (4). Uzamış QT sendromu elektrokardiyogram üzerinde Q-T segmenti süresinin uzamasıyla karakterize olan kalbin elektriksel sisteminin bir bozukluğudur. QT segmentleri arasındaki süre kalbin depolarizasyonu ve repolarizasyonun tamamlanması için gerekli sürenin bir ölçüsüdür. Bu sürenin uzaması ventriküler aritmi riskini önemli ölçüde artırır ve “torsades de pointes” olarak bilinen özel bir aritmiye sebep olmaktadır (135).



Şekil 14. Kardiyak aksiyon potansiyelinin plato fazında ERG akımları

Kalpte aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazı Na^+ kanalları tarafından başlatılır. Na^+ kanallarının hızlı aktivasyon ve hızlı inaktivasyon kinetiklerinden dolayı kanal hızlı bir şekilde açılıp kapanarak zarı depolarize eder. Takiben pek çok potasyum kanal tiplerinin de katkısıyla zar yavaşça repolarize olmaya başlar. Bu repolarizasyon fazının son döneminin önemli komponentlerinden birisi de ERG kanallarından geçen ERG akımlarıdır (4, 123). Şekil 14 incelendiğinde kalpte ventriküler aksiyon potansiyelinde plato fazının son dönemlerine doğru ERG akımlarının genliklerinin pik yaptığı

görülebilecektir. Buradan hareketle ERG akımlarının plato fazı repolarizasyon süresini belirleyen akım komponentlerinden birisi olduğu tespit edilmiştir (4, 136). Hücre zarının depolarize olmasını takiben açılan kanaldan geçen akımın pik değerine aktivasyon fazında değilde inaktivasyondan kurtulma “recovery” sürecinde ulaştığını belirtmekte yarar vardır. Çünkü kanalın alışılmışın dışında biyofiziksel özelliklere sahip olmasının altında yatan temel nedenin bu olduğu sonucuna varan pekçok çalışma mevcuttur.

ERG kanallarının özellikle kalpteki atriyal ve ventriküler miyositlerde aksiyon potansiyeli plato fazı süresinin belirlenmesine de katkı sağladığı bildirilmiştir (136). Aksiyon potansiyelinin plato fazında kalpte etkin bir kontraksiyonun olabilmesi için ventriküler miyosit hücrelerindeki sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonu (Ca^{++}) salınması gerekir. Dolayısıyla ERG kanalının fonksiyon bozukluklarında plato süresi etkilenecek kalbin kasılma gücü ve kasılma süresi değişecektir. Bunun yanı sıra sinoatriyal ve atriyoventriküler düğümlerde ERG kanallarının ifade edildiği ve bu şekilde kalbin ritmik aktivitesinin belirlenmesinde önemli olduğu rapor edilmiştir. Buradaki fonksiyon bozukluklarında ise aritmiler ve ani ölümler görülebilmektedir (136).

2.7.3.5.3. ERG kanallarının farmakolojisi

Tıpkı diğer voltaj bağımlı iyon kanallarında olduğu gibi ERG kanallarının da statik bir yapısı yoktur. Bu kanallar da voltaj değişimine, kimyasal ajanlara ve bazı toksinlere maruz kaldıklarında ya da bırakıldıklarında konformasyonel değişiklikler göstererek ya açılır, ya kapanır, ya da inaktive olurlar (1). ERG kanallarının, dofetilide, E-4031, WAY 123-398, terfenadine, azimilid gibi kimyasal ajanlar ile seçici bir biçimde bloke oldukları birçok çalışma tarafından rapor edilmiştir (12, 13, 137). Ayrıca çeşitli akrep türlerinden elde edilen peptid yapılı toksinlere karşı da yüksek derecede affinite gösterdikleri ve güçlü bir şekilde bloklandıkları bildirilmiştir (4, 138). Bunlar arasında yer alan Ergtoksin ve BEKm 1 gibi toksinler nanomolar düzeylerde kullanıldıklarında dahi ERG kanalları üzerine spesifik olarak inhibitör etki göstermektedirler (139). ERG kanallarının agonistleri arasında ise VU0405601, PD118057 ve NS1643 yer almaktadır (1, 125, 140)

2.8. Araştırma yöntemi

Çalışma kapsamında ERG kanallarının kohlear çekirdek dokusunda varlığının elektrofizyolojik olarak saptanması, biyofiziksel farmakolojik ve fizyolojik fonksiyonlarının karakterizasyonu amacıyla yama kenetleme (patch clamp) tekniğinden

yararlanılmıştır. Bu teknik nöronlardan hücre içi kayıt almayı gerektiren ve çok güçlü verilerin alınmasına olanak sağlayan zor bir tekniktir.

2.8.1. Yama kenetleme elektrofizyoloji tekniği

Hücre uyarılabilirliği ve elektrofizyolojik çalışmaların temeli 20. yüzyılın başlarına dayanmaktadır. İyon kanallarına ait ilk çalışmalar Birleşik Devletler'den Kenneth Cole ve Howard Curtis ile Büyük Britanya'dan Bernard Katz tarafından yapılmıştır. 1941 yılında ilk kez Andrew Fielding Huxley ve Alan Lloyd Hodgkin mürekkep balığı dev aksonunda hücre içi elektrodları kullanarak aksiyon potansiyelini kaydetmiş ve pasif zar özellikleri incelemişlerdir (89). Alan Hodgkin ve Andrew Huxley'e sinir hücrelerinin merkezi ve periferal kısımlarında eksitasyon ve inhibisyonun iyonik mekanizmalarını açıklamalarına dair yaptıkları çalışmalarından dolayı 1963 yılında Nobel Tıp / Fizyoloji ödülü verilmiştir (89). Dilimize yama kenetleme /mühürleme/kıskacı olarak çevirebileceğimiz “patch clamp” hücre zarındaki fizyolojik süreçlerde görev alan ve patolojik birçok durumla ilişkisi olduğu düşünülen iyon kanallarının biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerinin güçlü bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olan elektrofizyolojik bir tekniktir.

Yama kenetleme tekniği ilk keşfedildiği zamanlarda küçük bir hücre zarı parçasının voltajının kontrol edilmesi amacıyla kullanılırken, günümüzde daha ziyade zar üzerinde mikropipet yardımıyla hem voltaj kenetlemenin hem de akım kenetlemenin her ikisinin birden ölçümüne karşılık gelmektedir. Aslına bakılırsa voltaj kenetleme tekniğinin geliştirilmiş bir uygulaması olan yama kenetleme tekniği hücre zarında iyonların hareketine bağlı olarak oluşan elektriksel potansiyellerin ölçümü esasına dayanır.

Yama kenetleme tekniğinin akım kenetleme (current clamp) ve voltaj kenetleme (voltage clamp) olmak üzere iki ayrı uygulanma alanı vardır. Voltaj kenetlemede, hücre zarının voltajı manipüle edilerek kontrol edilmek suretiyle, iyon kanallarından geçen akım miktarı ölçülürken, akım kenetlemede ise hücreye büyüklüğü bilinen akım enjekte edilerek verilen akıma karşı hücrenin göstermiş olduğu voltaj yanıt ölçülmektedir (141).

Yama kenetleme tekniğinin ilk zamanlarında yapılan çalışmalar kanalların; sınıflandırılması ve iletkenlik değerleri, voltaj bağımlılıkları, açılıp-kapanma kinetikleri, seçicilik ve farmakolojik profili gibi biyofiziksel özelliklerini tanımlamaya yönelik iken,

günümüzde daha ziyade çalışılan iyon kanalının hücrede ne tür bir fizyolojik rolü olduğunu, mutasyon ya da fonksiyon bozukluklarında ne tür bir patolojiye sahip olduklarını araştıran, güçlü verilerle araştırma sonuçlarını destekleyen bir teknik olarak bilinmektedir.

Çalışma fare beyin kesitlerinde yama kenetleme metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda hayvan materyalı olarak albino BALB/c ırkı 14-17 günlük yaşta genç fareler kullanılmıştır. Bu yaştaki fareler; işitme yolağındaki nöronları gelişimlerini büyük oranda tamamladığı için duyabilmektedirler (12). Bu yaştan daha genç hayvanlarda yolaklar tam olarak gelişmediği ve hücreler gelişimlerini tamamlayamadıkları için elde edilen veriler yetişkin hayvanlardaki durumu yansıtmayacağından bu verileri yorumlamak güç ve karmaşıktır (142). Daha yaşlı farelerde ise bağ doku çok fazla geliştiği için kesit alma sırasında hücrelerin aşırı hasarlanmasına yol açacak ve hücre içi kayıt yapmak neredeyse imkânsız hale gelecektir. Bu olumsuzluklardan kaçınmak amacıyla 14-17 günlük yaşta hayvanlar kullanılmıştır.

2.8.2. Akım kenetleme

Akım kenetleme deneylerinde hücreye büyüklüğü bilinen miktarda akım enjekte edilir ve hücrenin bu akıma karşı göstermiş olduğu voltaj yanıt ölçülür. Uygulanan her bir akım adımı fizyolojik şartlarda hücreleri uyarıcı ya da inhibe edici karakterde olan sinaptik inputları temsil etmektedir. Bu yüzden akım kenetleme çalışmaları hücrelerin sinaptik aktivitelerinden kaynaklanan EPSP ya da İPSP durumlarını değerlendirmek için yapılmaktadır.

2.8.3. Voltaj kenetleme

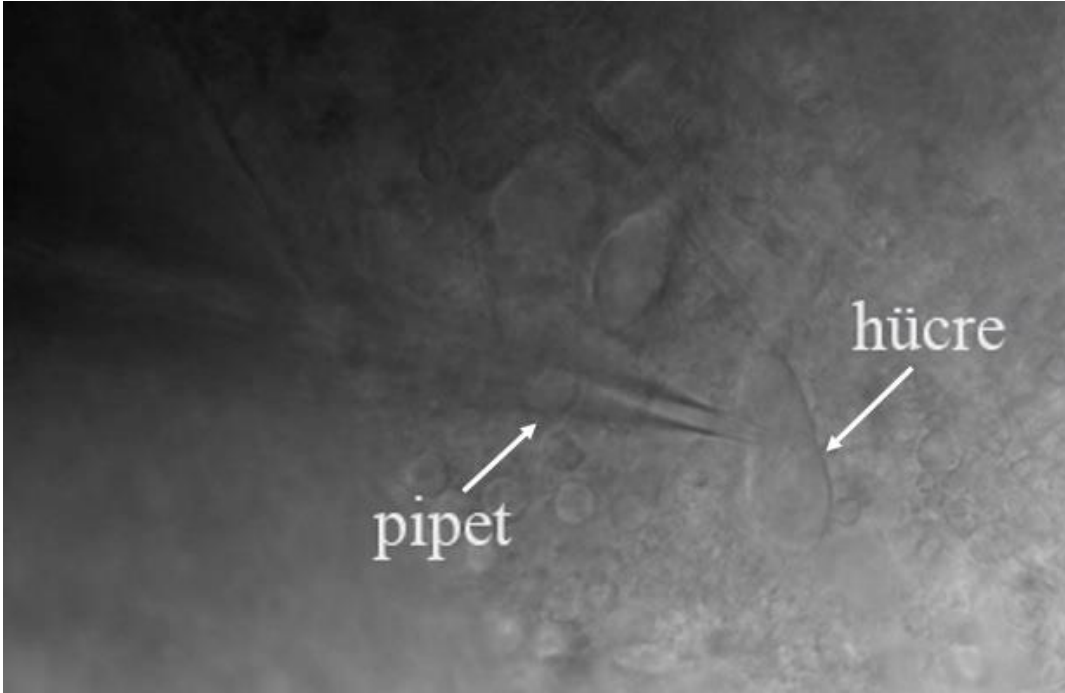
Voltaj kenetleme deneylerinde hücre belirli bir potansiyelde tutulur ve bu potansiyelde hücreden geçen akım miktarı ölçülür. Voltaj kenetleme çalışmalarıyla iyon kanallarının sahip olduğu aktivasyon, inaktivasyon ve deaktivasyon kinetikleri gibi kanalın sahip olduğu elektrofizyolojik ve biyofiziksel özellikleri belirlenmektedir.

2.8.4. Yama kenetleme konfigürasyonları

Tekniğin çalışma amacına bağlı olarak uygulanma alanı bulmuş olan farklı konfigürasyonları vardır. Bunlar; hücreye yapışık kayıt (“on-cell” ya da “cell-attached”), tüm hücre kaydı (“whole cell”), içi-dışarda kayıt (“inside-out”), dışı-dışarda kayıt

(“outside-out”) olarak sınıflandırılabilir. Her bir konfigürasyonun kendini özgü uygulanma alanı, avantajı ve dezavantajı vardır. Hangi konfigürasyonun seçileceği; çalışılan iyon kanalının tipine ve çalışmanın amacına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Bu çalışmada tüm hücre kayıt konfigürasyonu (“whole cell” recording) kullanılmıştır. Bu konfigürasyon pipet hücreye yapışık (cell-attached) konfigürasyonunda iken pipet ucu tarafından izole edilen zar kısmı hafif negatif bir basınçla yırtılması suretiyle elde edilmektedir (şekil 15’de pipet ile hücrenin pozisyonu gösterilmiştir). Negatif basınç nedeniyle zar bütünlüğü bozulduğu için, pipet solusyonu ile hücre içindeki sitoplazma karışır. Dolayısıyla pipet içindeki solusyon ile intrasellüler sıvı içerik bakımından benzerlik göstermelidir. Aksi halde hücre çok kısa zaman dilimi içerisinde canlılığını yitirecektir.



Şekil 15: On-cell pozisyonunda mikropipet ile hücrenin konumu

Tüm hücre kayıt konfigürasyonu kullanıldığı zaman seri direncinden ve hücre kapasitansından kaynaklanan hatalar olabileceğini unutmamak ve bunları kompanse etmek gerekmektedir. Hücre zarının pipet ağzı tarafından izole edilmesini takiben hafif negatif bir basınçla yırtılması neticesinde pipet içindeki solusyon ile sitozoldeki sıvı arasında hızlı şekilde iyonik yüklerin eşitlenmesi amacıyla difüzyon gerçekleşir. Bu, hücre morfolojisini gözlemlemek için hücre içine; floresan boyaların verilmesi, hücre içi

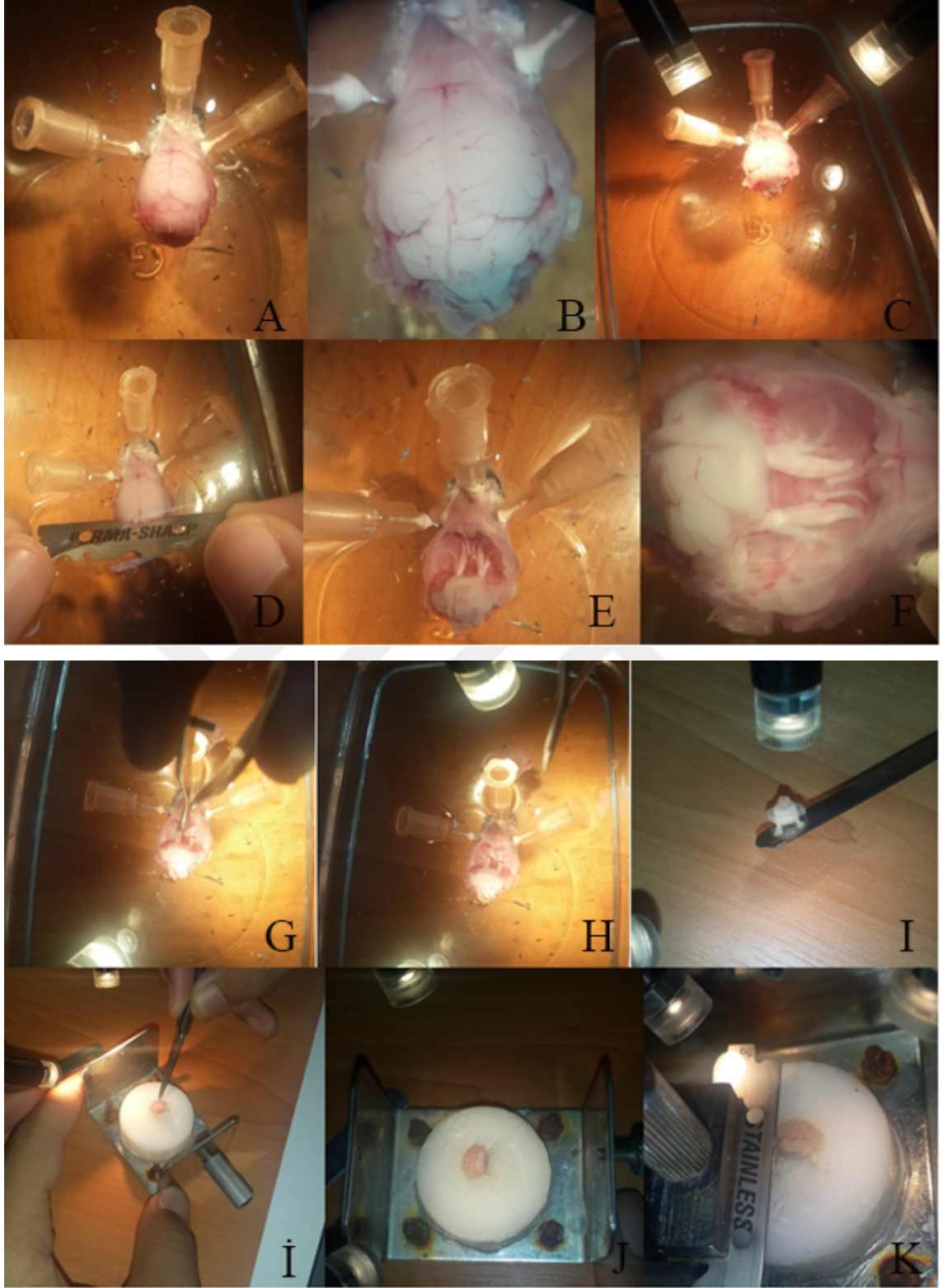
iyonik kompozisyonu kontrol etme ve hücre içi ikincil habercileri manipüle etme gibi avantajlar sağlasa da, zamanla hücre içi sitoplazmal sıvının seyreltilmesi, sitoplazmal solüsyonunun bileşiminin değişmesi, hücre içi önemli komponentlerin kaybı ve hücrelerin canlılıklarını kaybetmesi gibi dezavantajlara da sahiptir.

Pipet solusyonu ile sitoplazma sıvısı arasında iyonların konsantrasyonun farklı olması nedeniyle meydana gelen difüzyon neticesinde kavşak “junction” potansiyeli oluşur. Bu potansiyel kullanılan solüsyon bileşiminin farklılıklarından dolayı değişmekle birlikte; deneysel olarak ölçümü yapılarak her deneyin sonunda istirahat zar potansiyeline eklenmelidir. Bu değer bizim deneylerde kullandığımız normal yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) ve pipet solüsyonu için yaklaşık olarak -12 mV kadar olup, pipet ve perfüzyon solusyonunun iyon içeriğine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. İlerideki bölümlerde neden kullanıldığı açıklanacak olan 40 mM K⁺ solüsyonu için kavşak potansiyeli değeri -16 mV olarak ölçülmüştür. Bu değerler kayıtların analizi aşamasında dikkate alınmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Beyin kesitlerinin alınması ve kesitlerin kayıt odacığına transferi

Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden etik kurul onayı alınarak çalışmalara başlanmıştır (protokol no:3). Anestezi altında kafası kesildikten sonra (dekapite) hayvanın başı sürekli oksijenlenen normal yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) içerisine alınarak fiziki olarak hasar oluşturmada, özellikle beyin sapından çıkan kraniyal sinirleri gerdirmeden diseksiyon yapıldı (86). Beyin bir bütün halinde kafatasının dışını alındıktan sonra inferior kollikulus-superior kollikulus seviyesinden yaklaşık olarak 60° açıyla koronal bir şekilde kesildi (Şekil 16 D). Beyin sapının bulunduğu kısım inferior kollikulus aşağıya gelecek şekilde cyanoacrylate bir yapıştırıcı (japon) aracılığıyla teflon blok üzerine yapıştırıldıktan sonra sürekli oksijenlenen normal yBOS sıvısının bulunduğu vibratomdaki yerine yerleştirildi. Daha sonra titreşimli bir vibratomla 175-200 µm kalınlığında koronal kesitler alındı (Şekil 16). Elde edilen kesitler yaklaşık olarak 15-30 dakika süresince sürekli oksijenlenmekte olan normal yBOS solüsyonunda inkübe edildikten sonra intrasellüler kayıt almak üzere 0.3 ml solusyon hacmine sahip olan ve içerisinden 4-5 ml/dakika hızda taze oksijenlenmiş normal yBOS solusyonunun perfüze edildiği kayıt odacığına alınmıştır. Perfüze edilen yBOS solüsyonun sıcaklığı perfüzyon sisteminin kayıt odacığına döküldüğü kısmında negatif geri beslemeli (negatif feedback) devre komponenti probunun bulunduğu termoregülatörle 33 °C 'de sabit tutulmuştur.



Şekil 16. Diseksiyon aşamaları; **A:**başın sabitlenmesi, **B ve C:** bregmanın açılması, **D:** inferior kollikulus-süperiyor kollikulus seviyesinden kesi, **E:** serebellumun çıkarılması, **F:** kranial sinirlerin seyri, **G ve H:** optik sinirin kesilmesi, **I:** beyin sapının kafatasından çıkarılmış hali, **İ ve J:** teflon bloğa japon yapıştırıcısı yardımıyla sabitlenmesi, **K:** vibratom yardımıyla kesit alınması

3.2. Solüsyonlar

Yama kenetleme deneylerinde iki tip solüsyon kullanıldı. Bunlardan ilki pipet solüsyonu denilen ve iyonik kompozisyonu açısından hücre içi sıvıya benzerlik gösteren solüsyondur. İkincisi ise perfüzyon solüsyonu denilen iyonik kompozisyon olarak hücre dışı sıvıyı taklit eden ve beyin omurilik sıvısına benzerlik gösteren solüsyondur.

Pipet solüsyonu: Pipet solüsyonun bileşimi (mM olarak) 108 potasyum glukonat, 9 HEPES, 9 EGTA, 4,5 MgCl₂, 14 fosfokreatinin (tris tuzu), 4 ATP (Na-tuzu) ve 0,3 GTP (tris tuzu) şekilde düzenlendi. Solüsyonun pH'sı 7,40 olacak şekilde potasyum hidroksit (KOH) ile ayarlandı (143). Pipet solüsyonuna ATP, GTP ve fosfokreatinin eklenmesi sinir hücrelerinde uzun süre stabil kayıtların alınabilmesine olanak sağlamaktadır (144). Pipet solüsyonu her deney öncesi kullanılmak üzere stok solüsyon şeklinde hazırlandı ve -40°C de muhafaza edildi.

Perfüzyon solüsyonu: Akım kenetleme çalışmalarında perfüzyon solüsyonu olarak “**normal yBOS**” kullanıldı. Normal yBOS solüsyonunun bileşimi 138 mM sodyum klorür (NaCl) (Merck), 4,2 mM potasyum klorür (KCl) (Merck), 2,4 mM kalsiyum klorür (CaCl₂) (Fluka), 1,3 mM magnezyum sülfat (MgSO₄) (Merck), 10 mM HEPES (4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Merck), 10 mM glukoz (Sigma aldrich) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu solüsyon beyin kesitlerinin alınmasından en az 30 dk öncesinden başlamak koşuluyla deney süresince sürekli karbojen gazıyla (95 % O₂ + 5% CO₂) oksijenlendirilmiştir. Solüsyonun pH'sı 1 M'lık sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak 7,35-7,40 arasında olacak şekilde hazırlanmıştır (10, 30).

Voltaj kenetleme çalışmalarında iki türlü perfüzyon solüsyonu kullanıldı. Bunlardan birisi ERG kanal akımlarının genliğini arttırmak için yüksek K⁺ konsantrasyonuna (40 mM) sahip olan solüsyondur. Bu solüsyon aynı zamanda Ca⁺² ile aktiflenen K⁺ akımlarını engellemek için Ca⁺² içermemiştir. Potasyum konsantrasyonu 4,2 mM'dan 40 mM'a çıkartılırken, solüsyon içerisindeki NaCl aynı oranda azaltılarak solüsyonun ozmolaritesi 295-305 mOsm/L değerinde sabit tutuldu. Bu solüsyonun bileşimi (mM olarak) 102 NaCl, 40 KCl, 3,7 MgSO₄, 10 HEPES ve 10 glukoz olarak düzenlenmiştir. Bu solüsyona sodyum akımlarını engellemek için 1 µM tetradoksin (TTX) (Alexis Biochemicals (USA)), I_{KDR} ve I_A akımlarını engellemek için sırasıyla 1mM 4-aminopiridin (4-AP) (Sigma aldrich), 1mM tetraetil amonyum (TEA) (Fluka), hiperpolarizasyonla aktive olan

nonspesifik katyon kanal akımlarını (I_h) akımlarını bloklamak için 2 mM sezyum (Cs) (Sigma aldrich) eklendi. Ayrıca glutamat, GABA ve glisinergik reseptörlerden kaynaklanan sinaptik aktivitelerin bloklanması amacıyla sırasıyla 5 μ M 6,7-Dinitroquinoksalin-2,3-dione (DNQX), 10 μ M 2-amino-5-fosfonopentanoik asid (APV-5) ve 1 μ M striknin solüsyona eklendi. Bu solusyon “**kontrol yBOS**” olarak adlandırıldı.

“**Kontrol yBOS**” solusyonuna ERG akımlarını izole edebilmek için spesifik blokörü olan 10 μ M 1-[2-(6-metil-2-piridil)etil]-4-(4-metilsülfonil-aminobenzoil) piperidin’nin (E-4031) (Alemon lab-Israel) eklendi ve “**E-4031 içeren kontrol yBOS**” adında üçüncü bir solüsyon daha hazırlandı.

Kullanılan kimyasal ajanlardan E-4031, terfenadin, APV-5 ve Cs (final konsantrasyonu 1/1000)’i geçmeyecek şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülmüştür. Hücreler üzerine toksik etkiye neden olabileceği için DMSO’ nun konsantrasyonunun daha yüksek düzeyde kullanılmasından kaçınılmıştır. Diğer tüm kimyasal maddeler yBOS solüsyonu içerisinde çözündürülmüştür. Solusyonlar hazırlanırken pH ve ozmolaritelerine de dikkat edildi. Perfüzyon solüsyonunun pH’sı yaklaşık olarak 7,4 pipet solüsyonun pH’sı ise 7,35 olarak ayarlandı. Her iki solüsyonun ozmolaritesi 295-310 mOSm arasında tutuldu. Farmakolojik ajan içeren test solüsyonları kayıt odacığına, boru ve vanalardan oluşan perfüzyon sistemiyle uygulanmıştır.

Voltaj kenetleme çalışmalarında söz konusu antagonistlerin (1 mM 4-AP, 1mM TEA ve 2 mM Cs) varlığında, bir miktar akım, özellikle de kuyruk akımları kaydedilmiştir. Bu akımın tamamının ERG akımından ibaret olmadığı, kısmen de, tam bloklanmamış diğer akımlar olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla E-4031 (10 μ M) eklendiğinde spesifik olarak ERG kanallarının bloke edilmesi beklenir. E-4031 öncesi alınan kayıtlardan E-4031 uygulanması sonrası elde edilen kayıtlar çıkartıldığında ERG kuyruk akımının izole edildiği düşünülmektedir.

3.3. Yama kenetleme kayıtları

Brown-Flaming P-97 model Sutter puller cihazı ile borosilikat cam pipetler kullanılarak (1.2 mm dış çapa sahip olan) yama kenetleme mikropipetleri üretilmiştir. Elde edilen pipetlerin uç dirençleri 4-7 M Ω (pipet solüsyonu doldurulduktan sonraki değeri) olanları deneylerde

kullanıldı. Daha önce anlatıldığı gibi VKÇ hücrelerinden alınan kesitlerden “tüm hücre kayıt” konfigürasyonu kullanılarak kayıtlar elde edildi. Tüm hücre kaydına gitmeden önce on cell pozisyonunda iken pipet hücre zarına sıkı bir şekilde yapışmış (“gigaseal direnci”) (>1 gigaohm) olmasına dikkat edildi (Şekil 15). Tüm kayıtlar, “gigaseal” oluştuktan sonra insülin enjektörü vasıtasıyla mikropipet içerisine zayıf negatif basınç uygulanarak pipetin ucundaki zar kısmı yırtıldıktan sonra alındı. Bu aşamada seri direnci ve kapasitans kompenzasyonu yapılmasına özen gösterildi.

Elde edilen kayıtlarda her kayıt sonunda pipet hücreden çıkarıldıktan sonra okunan potansiyel değeri (V_{tip}) kaydedildi. Bu pipet potansiyeli (V_{tip}), 5 mV’dan daha büyük olarak ölçüldüğü hücreler analize dahil edilmedi. V_{tip} ’in geçerli aralıkta olduğu hücrelerde ölçülen değerler kayıtların analizi sırasında dikkate alındı. Ayrıca Pipet uç dirençleri 6-9 M Ω arasında olan pipetler kullanıldı. Pipet direnci ve kapasitans kompenzasyonu voltaj kenetleme konfigürasyonlarında tüm hücre kapasitans ve seri direnç kompenzasyonu on-line olarak cihaz üzerinden yapıldı.

Voltaj bağımlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerinin analizi ile kararlı durum (steady state) aktivasyon ve inaktivasyon eğrileri OriginLab pro 2016 versiyon 9.3 kullanılarak elde edildi. Aktivasyon ve inaktivasyon eğrileri OriginLab’ta Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit yapılarak) kanalların yarı aktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri elde edilmiştir. Boltzman fonksiyonu;

$$I(v) = 1/(1 + \exp (V_{0,5} - V_m)/k)$$

$I(v)$ = Normalize akım

V_m = Zar potansiyeli

$V_{0,5}$ = Zar potansiyeli için orta yükseklik noktası

k = Aktivasyon için eğim(slope) faktörü

denklemden elde edilmiştir.

Deaktivasyon kinetiklerini belirlemek için eksponensiyel fonksiyonundan yararlanıldı. Bunun için inaktivasyon protokolünden elde edilen E-4031’ e duyarlı kuyruk akım Clampfit programı ile tek ya da çift eksponensiyel formuna en uygun olan form ile uyarlanarak (fit yapılarak) zaman

sabitleri elde edildi. Böylece kanalların deaktivasyon kinetikleri belirlendi. Ekspansiyal fonksiyonu;

$$I(t) = A \exp(t/\tau) + C$$

t = Deaktivasyon için “zaman sabiti”

A = Genlik

C = Sabit değer

denkleminde elde edilmiştir.

Akım ve voltaj kenetleme deneylerinde veriler Axopatch 200B model yama kenetleme amplifikatörü kullanılarak elde edildi. Analog kayıtlar 5-10 kHz bandında filtrelendikten sonra elektrofizyolojik veriler analog/dijital dönüştürücü Digidata 1440 serisi (Axon Instruments, Foster City, CA) ile bilgisayara aktarıldı. Uyarı oluşturulması ve veri toplanması (data acquisition) için yazılım olarak Clampex (Axon Instruments), verilerin analizi için Clampfit ile şekillerin çizimi OriginLab pro 2016 versiyon 9.3 paket programları ile yapıldı.

3.4. Hücrelerin identifikasyonu

Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin lokalize oldukları bölgelere ve hücreye enjekte edilen akımlara karşı göstermiş oldukları voltaj yanıtlarına bakılarak identifikasyonu ve karakterizasyonu yapıldı. Kohlear çekirdek nöronlarında yapılan çalışmalarda farklı biyofiziksel özellikler gösteren üç hücre tipi karakterize edilmiştir (10, 30, 145, 146). Bu hücrelerden ahtapot tipi sinir hücreleri PVKÇ'nin dorsal ve kaudalinde sınırları açık bir şekilde görülebilen koyu miyelin bir tabaka tarafından sınırlandırılan üçgenimsi bir bölgede bulunurlar (Şekil 6). Yıldız tipi ve çalı tipi sinir hücreleri ise kohlear çekirdeğin özellikle AVKÇ bölümünde yerleşiktir (11). Ventral kohlear çekirdek hücrelerinde yapılan çalışmalar neticesinde kohlear çekirdekte anatomik olarak farklı bölgelerde bulundukları görülen bu hücrelerin farklı biyofiziksel özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir. *In vitro* çalışmalar ve bu çalışmalardan elde edilen yama kenetleme kayıtlarında hücrelere eşik değeri aşacak miktarda depolarize edici akım verildiğinde çalı ve ahtapot tipi hücrelerde, sadece bir aksiyon potansiyeli oluşurken, yıldız tipi hücrelerde

tonik fazda, çok sayıda düzenli aksiyon potansiyeli oluşturdıkları belirtilmiştir (9, 11, 147).

3.5. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi:

İstatistiksel değerlendirme, Statistical Package for Social Science (SPSS) Versiyon 23.0 (SPSS inc, Chicago, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. ERG kanal antagonistlerinin uygulanma öncesinde alınan kayıtlar “kontrol” olarak, bu antagonistlerin uygulanmasından sonra alınan kayıtlar ise “test grubu” olarak kullanıldı. İki grup arasında istatistiksel olarak ERG kanal antagonistinin uygulama öncesi ve sonrası gözlenen farklılıklarını değerlendirmek için grupların normal dağılım gösterip göstermedikleri incelendi. Hücrelerde akım voltaj eğrisini incelemek için regresyon analizi yapıldı. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler grup ortalaması $\pm$ standart hata (S.H.) şeklinde ifade edilmiştir (n deneyde kullanılan hayvan sayısını göstermektedir). Normal dağılım gösterdikleri belirlenen gruplarda istatistiksel değerlendirme için parametrik Student- t testi kullanıldı ve $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Akım kenetleme çalışmaları

14-17 günlük fare kohlear çekirdeklerinden alınan kesitlerde akım kenetleme kayıtlarında çalı tipi, yıldız tipi ve ahtapot tipi hücrelerinde spesifik ERG kanal antagonistleri olan E-4031 ve terfenadin uygulandı. Hücrelerin uygulama öncesi ve sonrası her iki antagonist için istirahat zar potansiyelleri, input dirençleri, aksiyon potansiyeli frekansları, aksiyon potansiyeli yarı yükseklik genişliği, latens süreleri ve ateşleme eşik değerleri karşılaştırıldı. Kohlear çekirdek bölgesinden 128 yıldız, 50 çalı ve 50 ahtapot tipi hücre olmak üzere toplamda 228 stabil hücre içi kayıt alındı. Kayıtların süreleri 15 ile 120 dakika arasında değişti. Pipet ucu direncinin değiştiği hücrelerden alınan kayıtlar analiz dışı bırakıldı. Hücrelerin identifikasyonu, anatomik lokalizasyonlarına, elektrofizyolojik ve intrinsik özelliklerine bakılarak yapıldı.

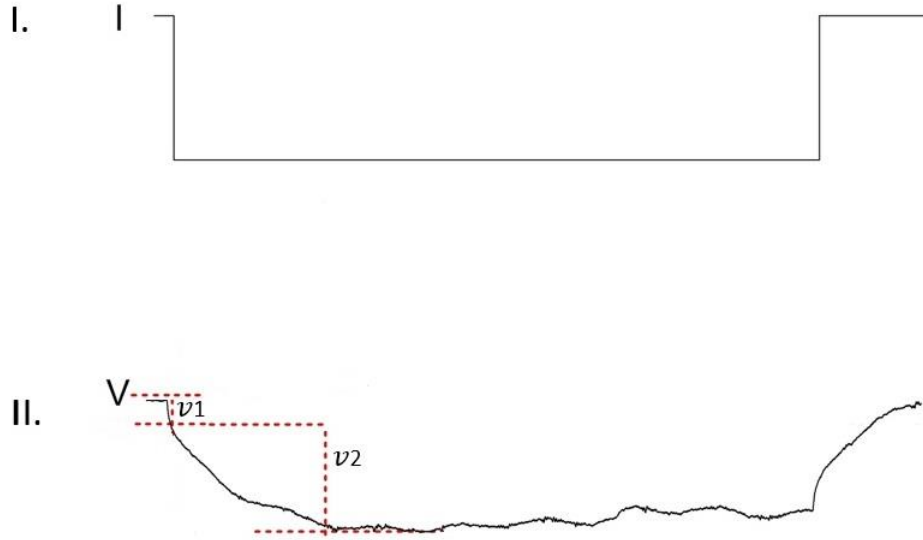
4.1.1. Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin intrinsik özellikleri

Yıldız, çalı ve ahtapot tipi nöronların istirahat zar potansiyeli, input direnci, zaman sabiti, kapasitans, aksiyon potansiyeli genliği, aksiyon potansiyeli yarı yükseklik genişliği (halfwidth) ve akım enjeksiyonu neticesinde ilk aksiyon potansiyeli oluşuncaya kadar geçen süreyi belirten latens süresi gibi pasif ve aktif zar özelliklerini kapsayan temel elektrofizyolojik ve intrinsik özellikleri Tablo 1’de verilmiştir. Bu parametrelerin nasıl elde edildiğini kısaca açıklamak gerekirse;

Input direnci (R_{input}): Bir nöronun input direncini belirleyen en önemli etken hücre zarı üzerinde bulunan açık iyon kanalı sayısıdır. Hücre zarı üzerinde birim alanda bulunan iyon kanalı sayısının fazla olması input direncinin düşük olmasına sebep olur. Input dirençleri istirahat zar potansiyeline en yakın negatif lineer voltaj yanıt baz alınarak hesaplanmıştır (Şekil 17).

$$\Delta V = V_2 - V_1$$

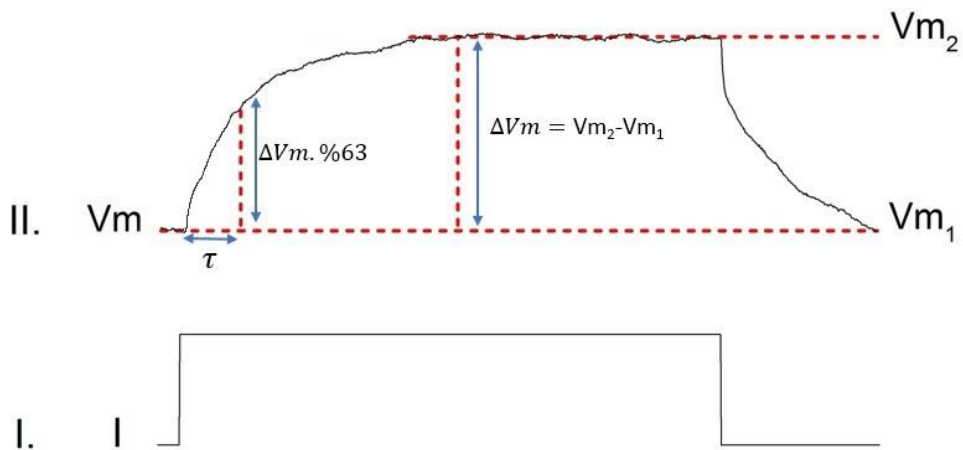
$$\Delta V = I \cdot R_{input}$$



Şekil 17. Hücrelerin input direnci ölçümünün şematik gösterimi

Zaman sabiti (τ) : Hücreye akım enjeksiyonu neticesinde zarda meydana gelen total voltaj yanıt değişiminin % 63'üne ulaşana kadar geçen süre zaman sabiti (τ) olarak tanımlanır. Zaman sabiti kısa olan hücreler uzun olan hücreler göre daha çabuk uyarılırlar. Zaman sabiti (τ), zar direnci (R_m) ile kapasitansın (C) çarpımı neticesinde bulunur (Şekil 18).

$$(\tau) = (R_m) \cdot (C_m).$$



Şekil 18. Hücrelerin zaman sabiti ölçümünün şematik gösterimi. Örnek olarak verilen bu trasede tip direnci elimine edilmiştir.

Kapasitans (C) : Kapasitans zarın yük tutabilme özelliğine denir. Zarın iç yüzü ve dış yüzünde iletken bir ortam ve ortada yalıtkan bir zar tabakası olduğu için esasında zar bir kapasitör görevi görür. Bu özelliği itibariyle zarın iki yüzünde yük toplanabilir. Dolayısıyla zara verilen bir uyarana karşı kapasitör olarak görev yapan zarın ne kadar gecikme ile cevap vereceği hücre zarının yüzey alanına bağlıdır. Kapasitans şu formülle hesaplandı;

$$C_m = (\tau) / R_m$$

τ : Zaman sabiti

R_m : zar direnci

C : Farad cinsinden kapasitans

Kapasitans Farad (F) birimi ile ifade edilir. Yani zarın kapasitansı her bir cm^2 lik zar alanı için 1 μF dır.

Latens süresi (latency): Hücreye akımın verildiği andan itibaren oluşan ilk aksiyon potansiyelinin pik yaptığı zaman aralığına kadar geçen süre olarak kabul edilmiştir.

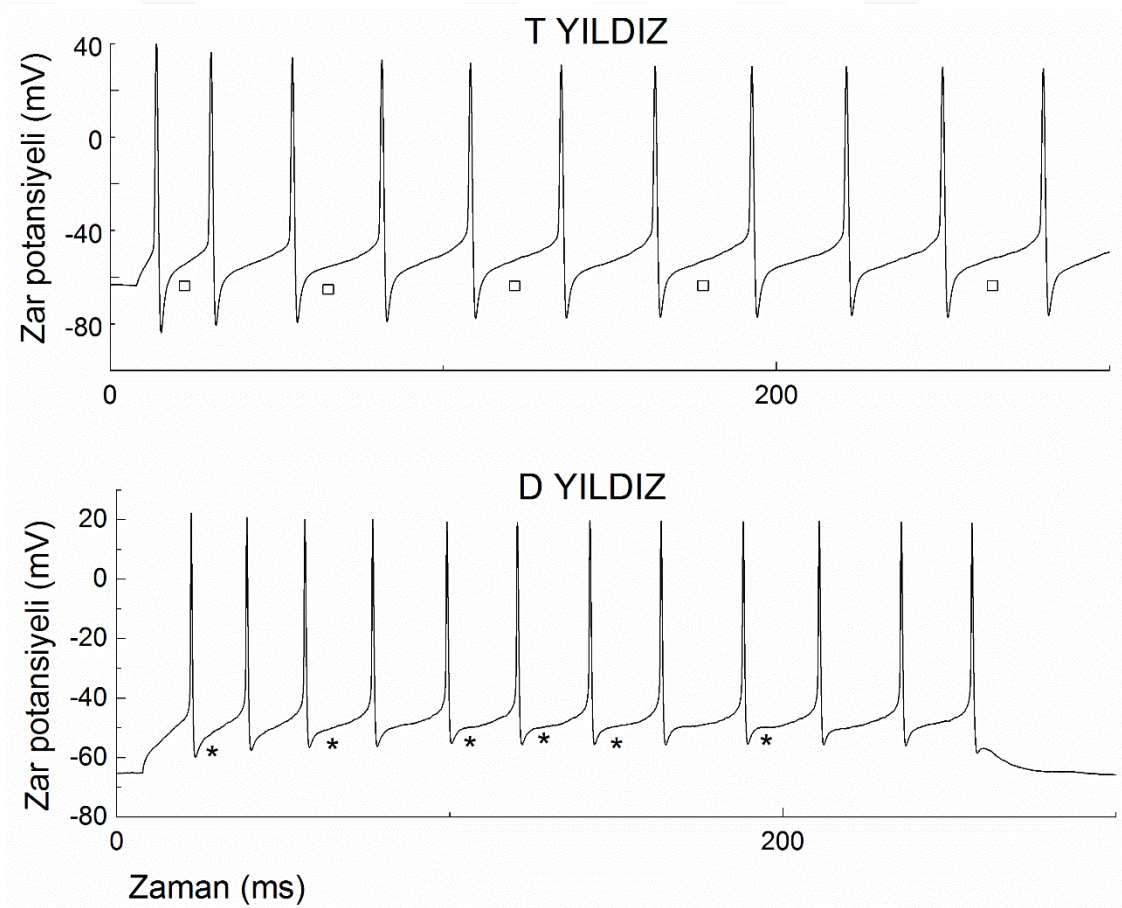
Tablo 1: Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin intrinsik özellikler

Hücreler	Ateşleme deseni	İstirahat zar potansiyeli (mV)	İnput direnci (M Ω)	Kapasitans (PF)	Zaman sabiti (ms)	AP genliği (mV)	AP yarı yükseklik genişliği (ms)	Latens süresi (ms)
Yıldız tipi Nöronlar	Tonik	-65,2 $\pm$ 0,5 (n=103)	63,9 $\pm$ 1,85 (n=93)	70,6 $\pm$ 2,34 (n=12)	22,52 $\pm$ 1,4 (n=95)	76,08 $\pm$ 1,7 (n=102)	0,58 $\pm$ 0,08 (n=55)	1,420 $\pm$ 0,05 (n=25)
Çalılıp tipi Nöronlar	Onset	-60,7 $\pm$ 0,93 (n=36)	64,6 $\pm$ 5,4 (n=33)	64,1 $\pm$ 3,18 (n=12)	1,69 $\pm$ 0,4 (n=24)	54,8 $\pm$ 1,75 (n=34)	0,672 $\pm$ 0,06 (n=21)	0,762 $\pm$ 0,02 (n=22)
Ahtapot tipi nöronlar	Onset	-61,1 $\pm$ 0,75 (n=35)	4,91 $\pm$ 0,38 (n=32)	5,56 $\pm$ 0,47 (n=12)	0,51 $\pm$ 0,5 (n=32)	44,1 $\pm$ 2,45 (n=30)	0,601 $\pm$ 0,06 (n=30)	0,778 $\pm$ 0,04 (n=30)

4.1.2. Ventral kohlear çekirdek hücrelerinin elektrofizyolojik özellikleri

4.1.2.1. Yıldız hücreleri

Yıldız hücreleri kohlear çekirdeğin hemen hemen tüm bölgelerinde rastlanan, en çok bulunan hücre tipidir. Karakteristik biyofiziksel özelliklerinden dolayı kolayca tanınırlar (7, 59). Yıldız tipi hücelere artan şiddette kare dalga akımı verildiğinde eşik değere ulaştıktan sonra tonik tarzda çok sayıda aksiyon potansiyeli oluşturdıkları bilinmektedir. Bu çalışmada T ve D yıldız tipi hücre ayırımına gidilmemiştir fakat alınan kayıtların büyük çoğunluğunun T yıldız hücresi olduğu düşünülmektedir. T yıldız hücrelerinde aksiyon potansiyelinden sonra monotonik fazda bir yükselme görülürken ($\square$), D yıldız hücrelerinde küçük ikinci bir hiperpolarizasyon dalgası daha görülür (*) (7) (Şekil 19.).

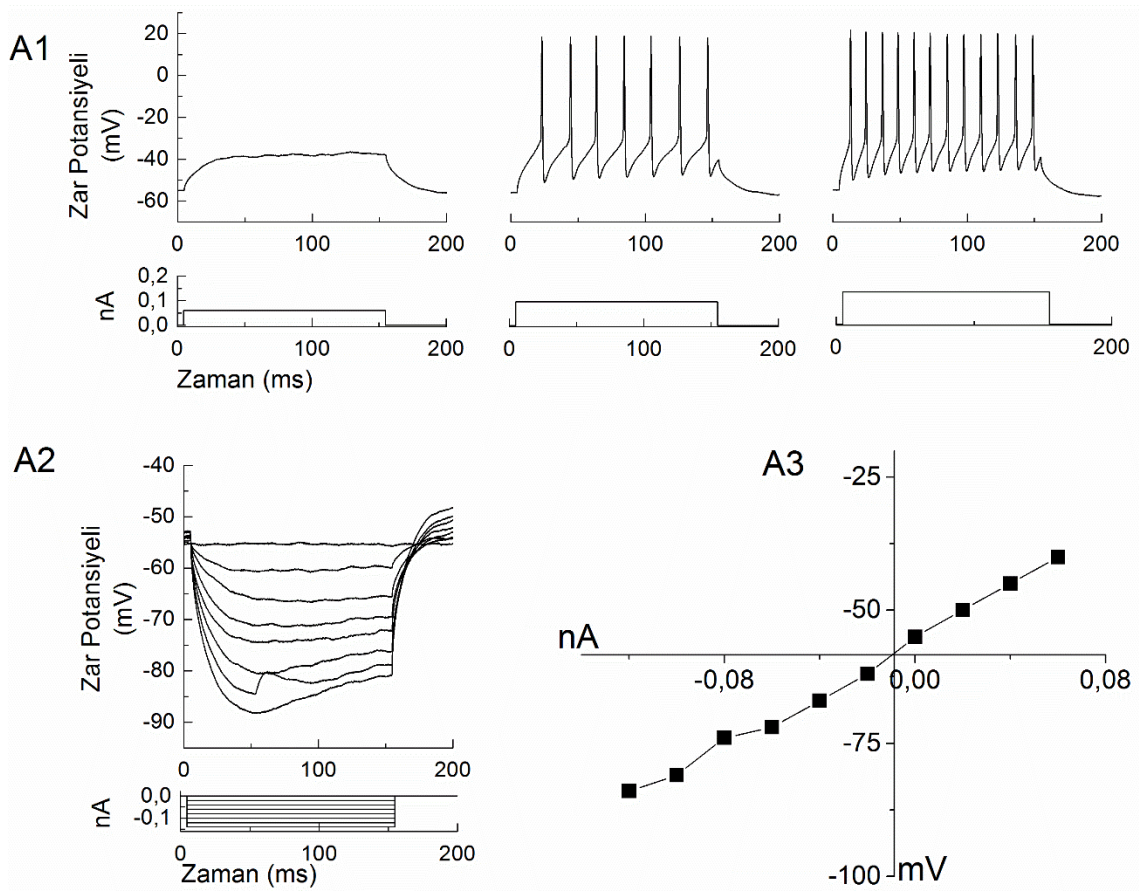


Şekil 19. T ve D tipi yıldız nöronların ateşleme desenleri

Hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı hem T hem de D yıldız hücrelerinde negatif voltaj yanıtının pik yaptığı değerlerde bir çöküntü (sag) oluşur sonra bu çöküntü geriye doğru tekrar döner. D yıldız hücrelerinde bu çöküntü T yıldız hücrelerine nazaran

daha yavaş gelişir ve daha küçüktür. Bu çöküntü I_h akımının aktivasyonundan kaynaklanır ve HCN kanal blokörü ZD7288 ile kaybolmaktadır (72).

Yıldız tipi hücreler depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı büyük, geniş, düzenli aralıklarla ateşleme yapan seri aksiyon potansiyeli dizileri oluştururlar. Yıldız tipi bir nörondan alınan depolarize ve hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verilen yanıtları gösteren bir kayıt temsili olarak verilmiştir. (Şekil 20). Bu nöronlarda hücreye verilen akımın büyüklüğü arttıkça oluşan aksiyon potansiyeli frekansının da artması VKÇ hücreleri arasında hücrenin tanımlanmasında ayrıcalık bir özelliktir (Şekil 20-A1).



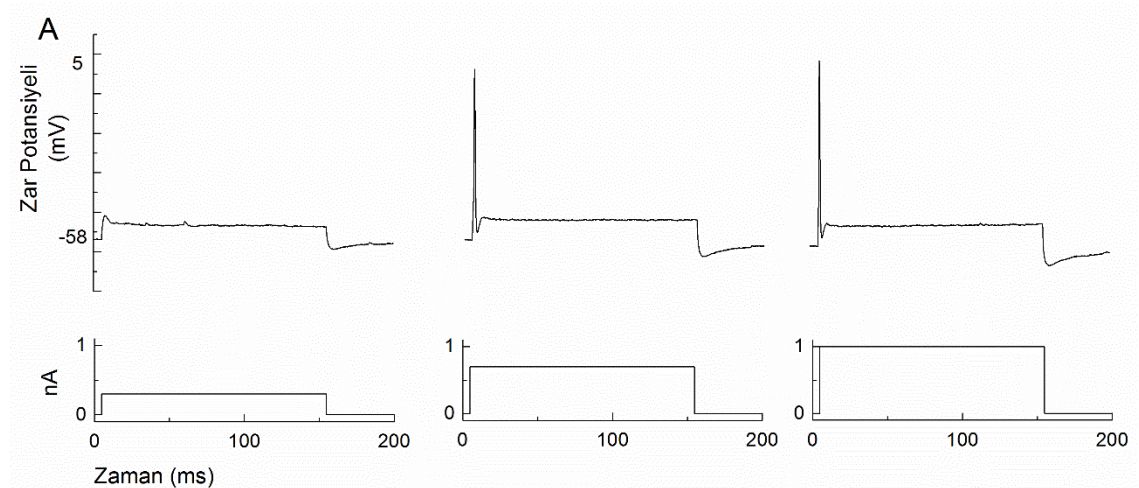
Şekil 20. Yıldız hücresinin depolarize ve hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar. A1: depolarize, A2: hiperpolarize akım enjeksiyonu ve hücrenin vermiş olduğu yanıtlar, A3: akım voltaj ilişkisini gösteren grafik

Şekil 20-A2’de, hiperpolarize edici negatif akım enjeksiyonları ve verilen akıma karşı oluşan voltaj yanıtların pik değerleri ölçülerek oluşturulan akım-voltaj eğrisi

görülmektedir. Bu eğride akım voltaj ilişkisinin lineer bir eğriye sahip olduğu olduğu görülmektedir (Şekil 20-A3). Hücreye verilen akım 0,1 nA büyüklüğüne ulaştığında nöron eşik değere ulaşarak aksiyon potansiyeli oluşturmaktadır. Enjekte edilen akımın büyüklüğü arttıkça (sırasıyla 0.06 nA, 0.08 nA ve 0.1 nA) verilen akıma yanıt olarak oluşan aksiyon potansiyeli frekansı artmıştır. Hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı hücrenin vermiş olduğu voltaj yanıtlar (A2) ve verilen akıma karşı elde edilen voltaj, akım voltaj eğrisinde (A3) gösterilmiştir. Kare dalga akım enjeksiyonlarına karşı yıldız tipi nöronlar eşik değere ulaştıktan sonra düzenli bir şekilde ateşleme yaparak aksiyon potansiyeli oluşturmaya devam ederler. Kararlı durum akımlarına karşı hücrelerin eşik değerlerini aştıktan sonra düzenli şekilde ateşleme yaptıkları Şekil 20’de gösterilmiştir.

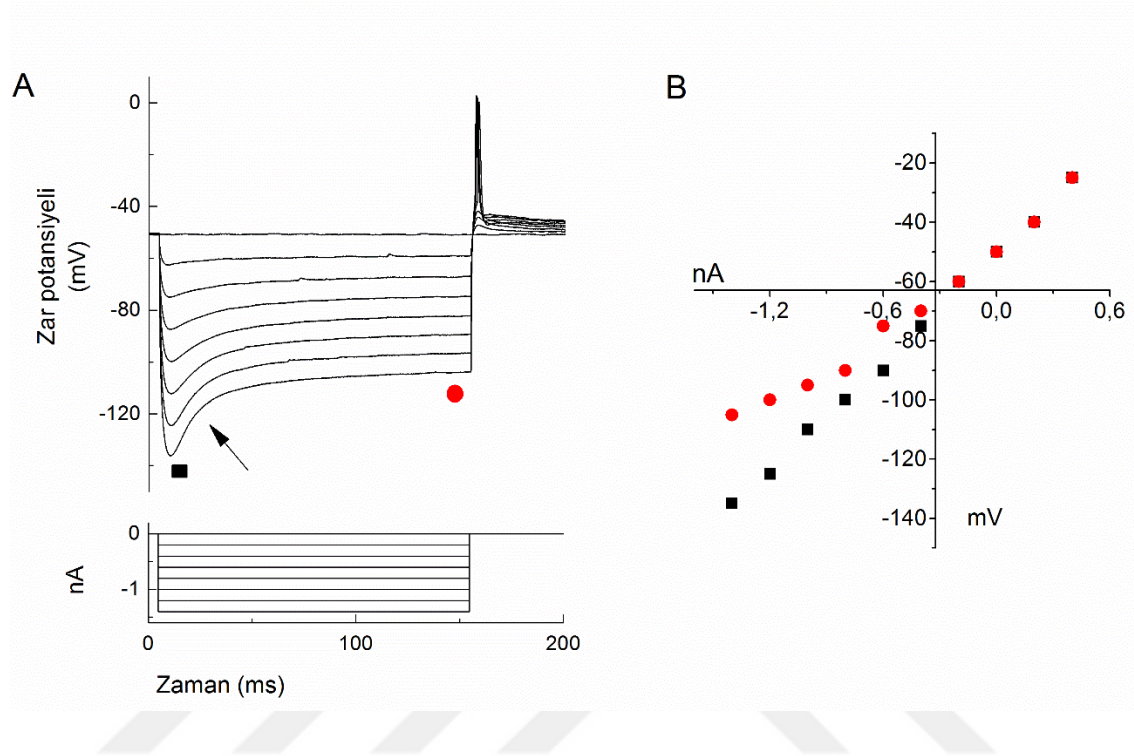
4.1.2.2 Çalı hücreleri

Çalı tipi hücreler daha önce de belirtildiği gibi eşik değere ulaştıran depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı akımın büyüklüğünden bağımsız olarak bir aksiyon potansiyeli oluştururlar (59, 72) (Şekil 21). Depolarize edici pozitif akım enjeksiyonlarına karşı çalı tipi hücrelerin vermiş olduğu voltaj yanıtlar şekil 23 de temsili olarak verilmiştir. Elde edilen kayıtlarda hücrelere ortalama 0.6 nA akım seviyelerinde maksimal optimum yanıt verdikleri görülmüş ve bu literatürle uygun bulunmuştur (33). Verilen akımın büyüklüğü artmasına karşın aksiyon potansiyeli frekansının değişmemesi bu hücre tipi için önemli bir özelliktir.



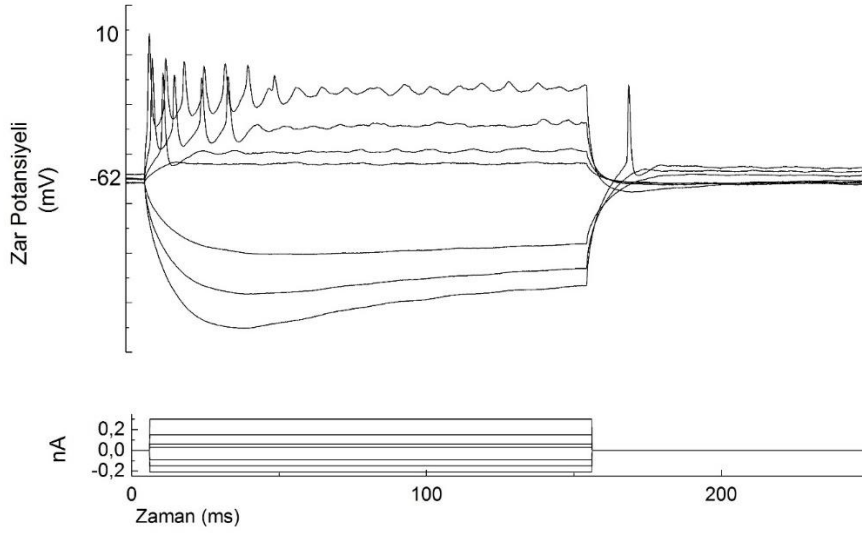
Şekil 21. Çalı hücresinin depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar. Hücre eşik değere ulaştıktan sonra akımın büyüklüğü artsa da aksiyon potansiyelinin frekansı değişmedi.

Hiperpolarize edici negatif akım enjeksiyonlarına karşı çalı tipi hücrelerin vermiş olduğu voltaj yanıtlar şekil 22’de verilmiştir. Çalı hücrelerinde hiperpolarize akım enjeksiyonlarına karşı verilen yanıtlarda bir çökme görüntüsü oluşabilir (Şekil 22’de okla gösterilmiştir). Akım voltaj ilişkisinde non-lineer bir eğri oluşmaktadır.



Şekil 22. Çalı hücresinin hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar. A; Çalı hücresinde hiperpolarize edici yanıtlar ve B; Çalı hücresinin akım/voltaj eğrisi.

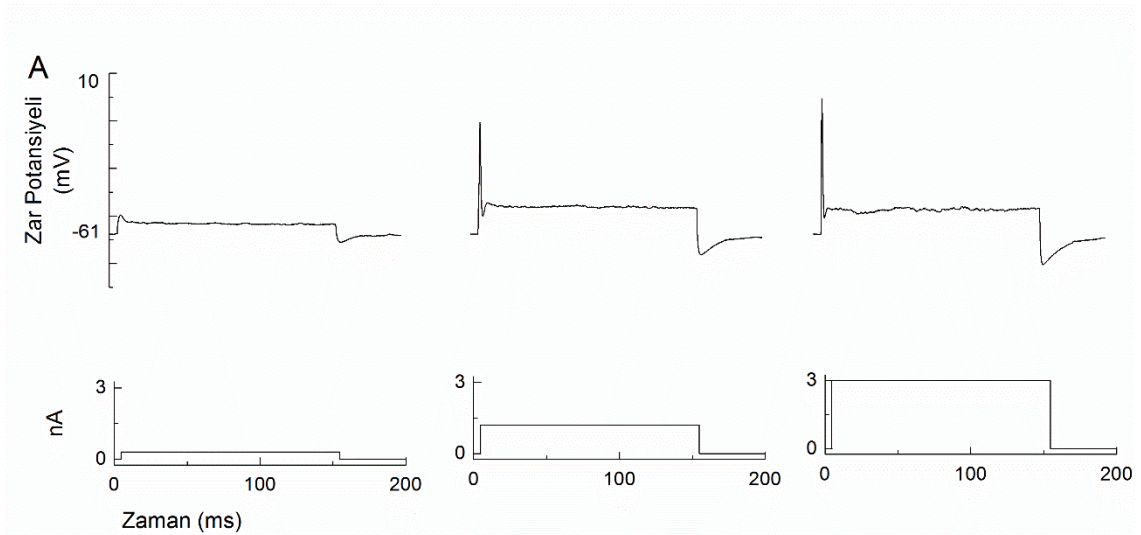
Bazı çalı hücrelerinin ilk aksiyon potansiyelinden sonra çok az sayıda küçük genlikli aksiyon potansiyeli oluşturdukları rapor edilmiştir (33). Mevcut çalışmada bu şekilde bir çalı tipi hücrelerinden alınan kayıt örneği şekil 23’de gösterilmiştir, fakat bu çalışmada çalı hücreleri arasında böyle bir ayrıma gidilmemiştir.



Şekil 23. Birden fazla sayıda aksiyon potansiyeli oluşturan çalı hücresi

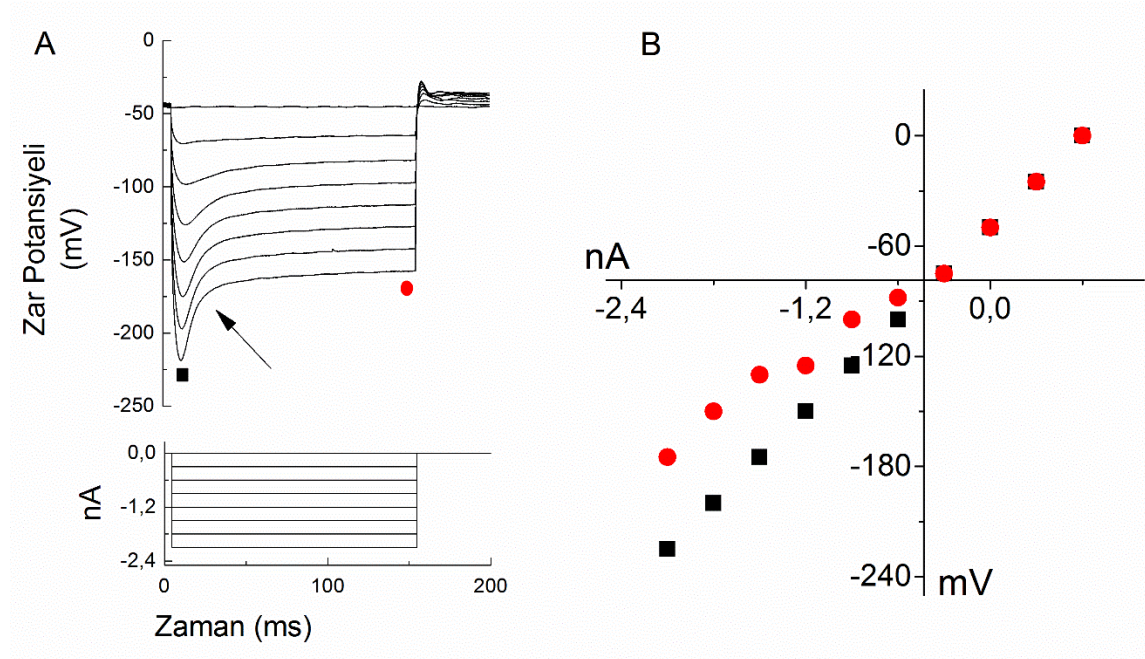
4.1.2.3. Ahtapot hücreleri

Ahtapot hücreleri de tıpkı çalı hücreleri gibi akımın büyüklüğünden bağımsız olarak tek bir aksiyon potansiyeli oluştururlar. Şekil 24’ da hücreye verilen akım 1 nA büyüklüğüne ulaştığında nöron eşik değere ulaşarak aksiyon potansiyeli oluşturmaktadır. Enjekte edilen akımın büyüklüğü arttıkça verilen akıma yanıt olarak oluşan aksiyon potansiyelinin sayısının değişmediği görülmektedir. Bu durum ahtapot hücre tipi için karakteristik bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 24. Ahtapot hücresinin depolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar

Hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı hücrenin vermiş olduğu voltaj yanıtlar ve verilen akıma karşı elde edilen voltaj; akım voltaj eğrisinde gösterilmiştir. Negatif akım enjeksiyonlarına karşı oluşan voltaj yanıtlarındaki çökme (sag) ahtapot hücresi için tipiktir (Şekil 25).



Şekil 25. Ahtapot hücresinin hiperpolarize edici akım enjeksiyonlarına karşı verdiği elektrofizyolojik yanıtlar, A; Ahtapot hücresinde hiperpolarize edici yanıtlar ve B; Ahtapot hücresinin akım/voltaj eğrisi.

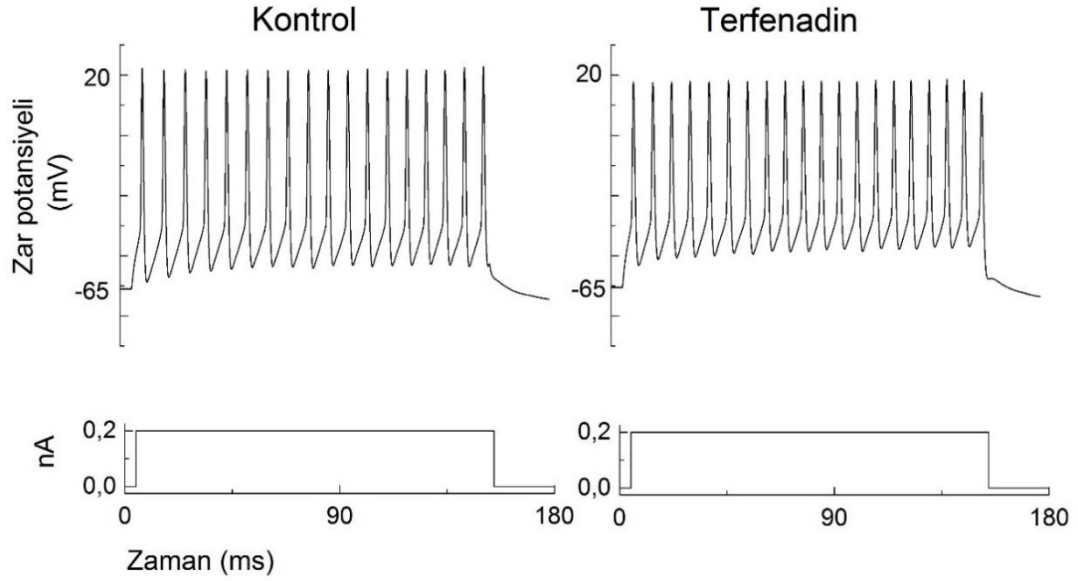
4.1.3. ERG kanal blokörlerinin yıldız tipi nöronlar üzerindeki etkisi

4.1.3.1 Ateşleme frekansı üzerine etkisi

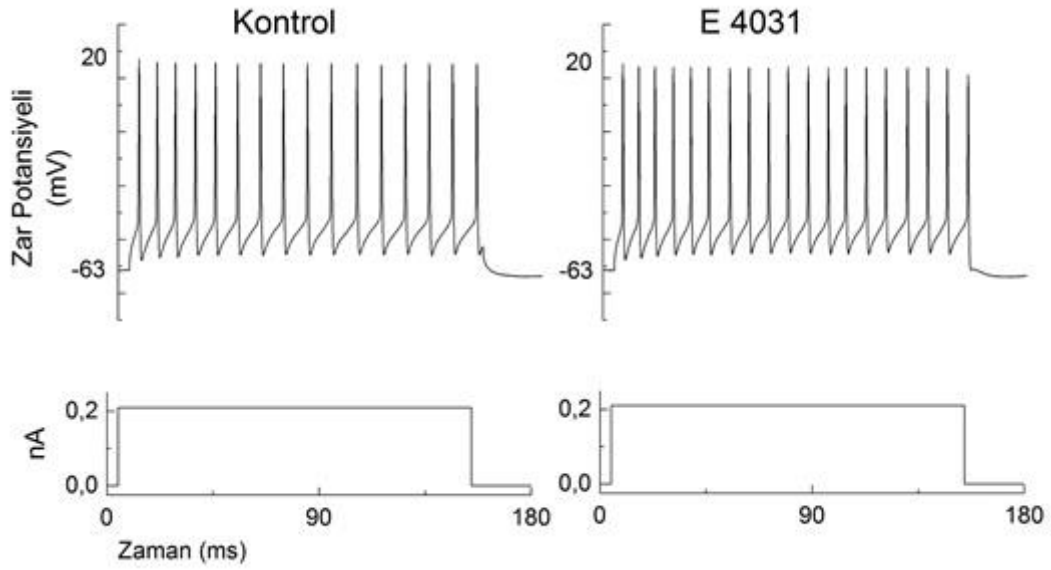
Karakteristik olarak yıldız tipi nöronlar tonik ateşleme desenine sahiptir. Bu hücrelerde ERG akımlarının bloklanması aksiyon potansiyeli sayısı üzerinde arttırıcı bir etki göstermiştir. Yıldız tipi nöronlarda kontrol durumunda 150 msn'lik akım enjeksiyonunda oluşan aksiyon potansiyeli sayısı $13,16 \pm 1,41$ iken, terfenadin uygulandıktan sonra aynı akım enjeksiyonuna karşı oluşan aksiyon potansiyeli sayısı $15,58 \pm 1,56$ ($n=12$) olarak bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 26).

Spesifik ERG kanal blokörü olan E-4031 uygulanmadan önce yıldız tipi nöronlar 150 ms süren akım enjeksiyonunda oluşan aksiyon potansiyeli sayısı $20,72 \pm 1,72$ iken, E-4031 uygulandıktan sonra ise $23,54 \pm 2,38$ ($n=11$) olarak bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 27).

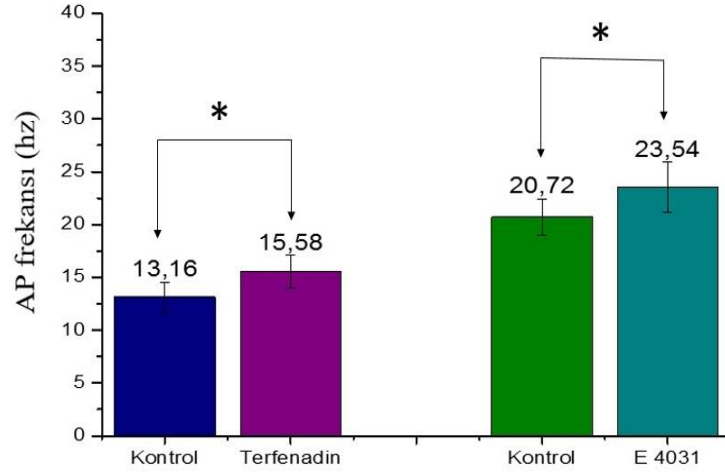
Her iki ajanın da hücrelerin ateşleme frekansı üzerine arttırıcı bir etkisinin olduğu ve bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu görülmüştür (Şekil 28).



Şekil 26. Terfenadinin yıldız tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi



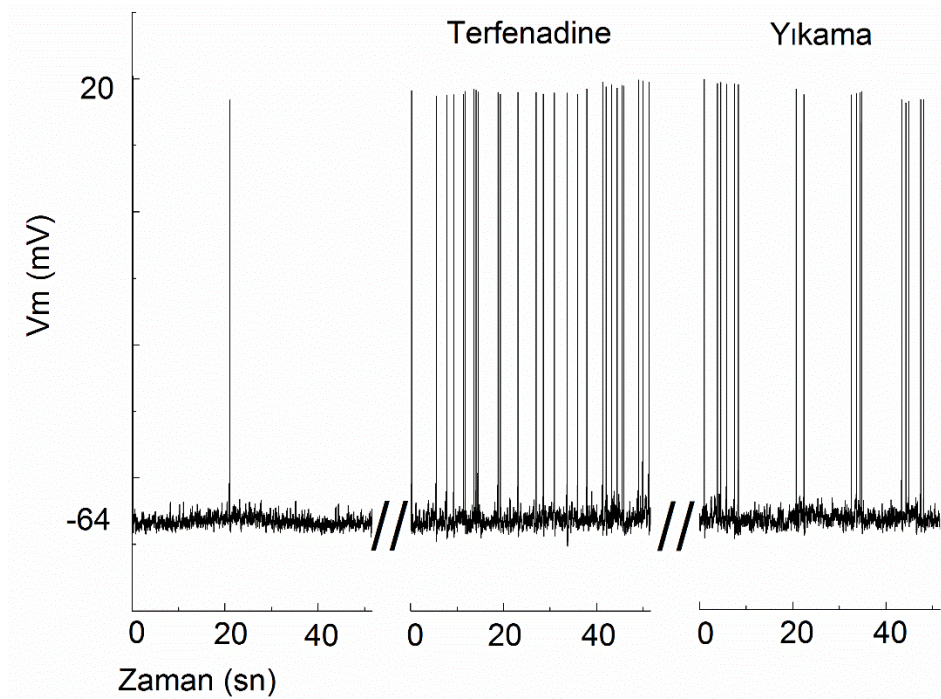
Şekil 27. E-4031 yıldız tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi



Şekil 28. Terfenadin ve E-4031'in yıldız tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi. *: Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

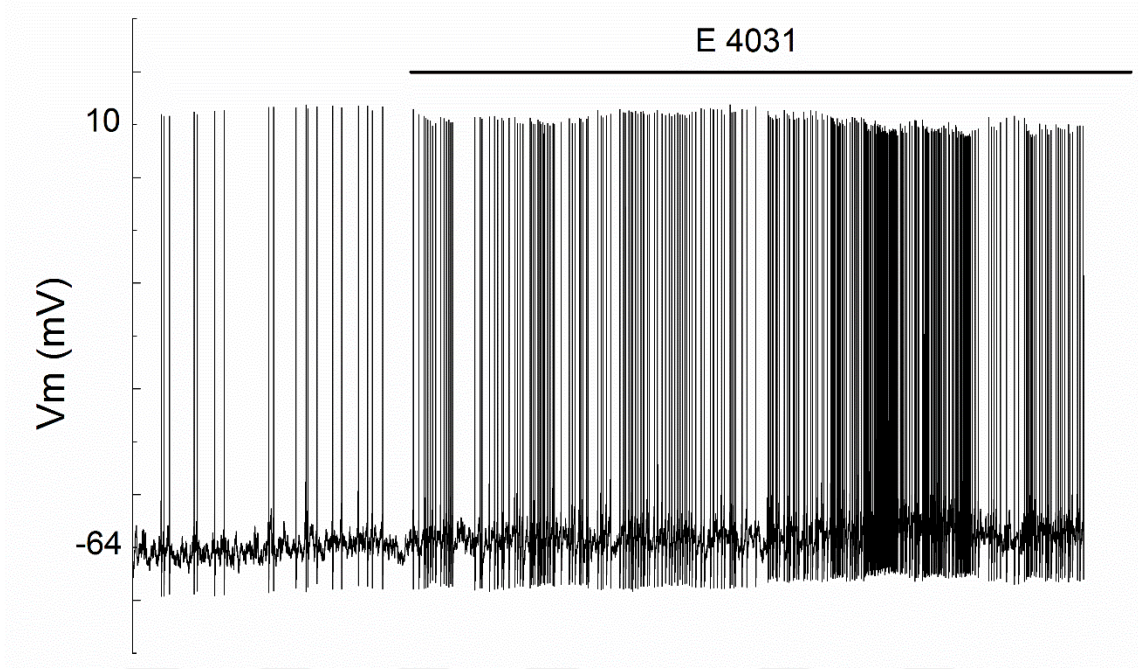
4.1.3.2 Spontan aktivite üzerine etkisi

Yıldız tipi nöronlarda terfenadin ve E-4031'in spontan aktivite üzerine etkisi incelendi. Terfenadin ile yapılan deneylerde kontrol durumlarına göre hücrelerin spontan aktivitelerinde 50 ms'lik kayıtlar süresince artış meydana geldiği gözlenmiştir ($8\pm0,81$ den, $14,5\pm1,25$ 'e; aksiyon potansiyeli sayısı/dk), ($n=5$), ($p<0,05$) (Şekil 29).



Şekil 29. Terfenadinin yıldız tipi bir nöronda spontan aktivite üzerine etkisi.

Normal yBOS solusyonunda kontrol kaydı alındıktan sonra E-4031 varlığında da kayıtlar alındı. Terfenadin ile yapılan deneylerde kontrol durumlarına göre hücrelerin spontan aktivitelerinde 50 ms'lik kayıtlar süresince artış meydana geldiği gözlenmiştir ($12 \pm 2,81$ den, $16,5 \pm 3,25$ 'e; aksiyon potansiyeli sayısı/dk), ($n=7$), ($p<0,05$) (Şekil 30).



Şekil 30. E-4031'in yıldız tipi bir nöronda spontan aktivite üzerine etkisi

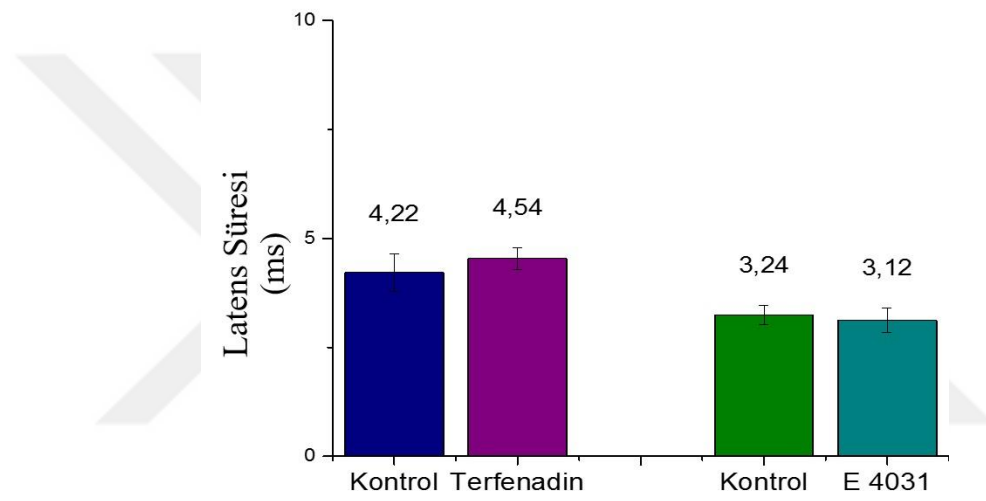
Spontan aktivite üzerinde depolarize edici etkisi görüldükten sonra, istirahat zar potansiyeli üzerine bir etkisi olup olmadığı incelendi. On hücrede E-4031'in, 22 hücrede terfenadin'in zar potansiyeli üzerine etkilerine bakıldı. Terfenadin uygulanan hücrelerde kontrol durumlarında istirahat zar potansiyeli $-61,94 \text{ mV} \pm 1,13$; olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $-61,78 \text{ mV} \pm 1,15$ ($n=22$) olarak ölçüldü ($p > 0,05$). Diğer taraftan E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında istirahat zar potansiyeli $-67,64 \text{ mV} \pm 1,92$; olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $-67,34 \text{ mV} \pm 1,78$ ($n=10$) olarak ölçüldü ($p > 0,05$).

Hem E-4031 hem de terfenadin hücreler üzerinde hafif depolarize edici bir etki göstermesine rağmen bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür.

4.1.3.3. Latens süresi üzerine etkisi

ERG kanal blokörlerinin latens süresi üzerine bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Terfenadin uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında latens süresi $4,24 \text{ ms} \pm 0,43$ olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $4,54 \text{ ms} \pm 0,25$; ($n=10$) olarak ölçülmüştür ($p>0,05$). Diğer taraftan E-4031 uygulanan hücrelerde kontrol durumlarında hücrelerin latens süresi $3,24 \text{ ms} \pm 0,22$ olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $3,12 \text{ ms} \pm 0,28$; ($n=10$) olarak ölçülmüştür ($p>0,05$).

Her iki blokörün de hücrelere uygulandıktan sonra ilk aksiyon potansiyeli oluşumu için geçen süreler üzerine etki ettiği gözlenmiştir fakat bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 31).

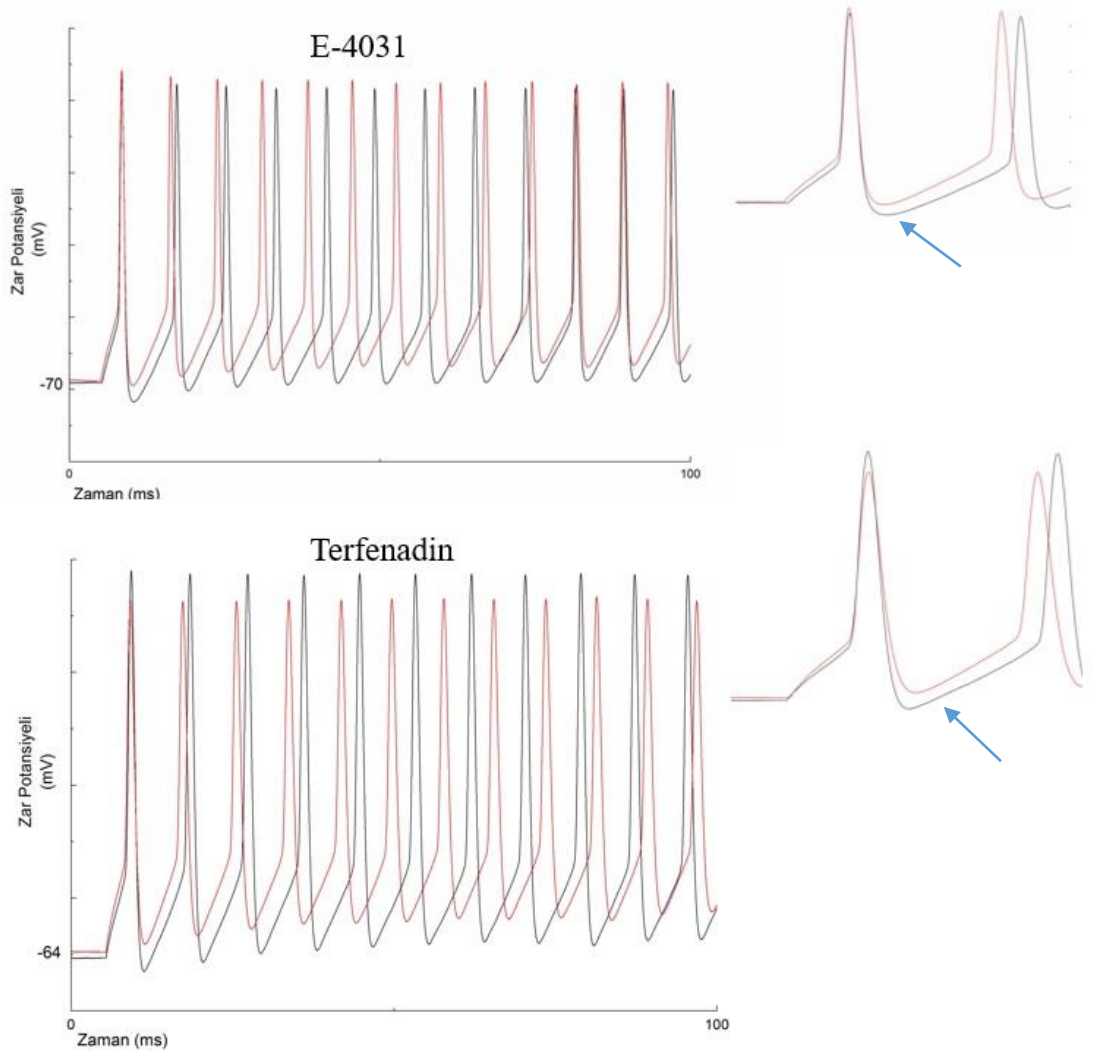


Şekil 31. Terfenadin ve E-4031 in latens süresi üzerine etkisi

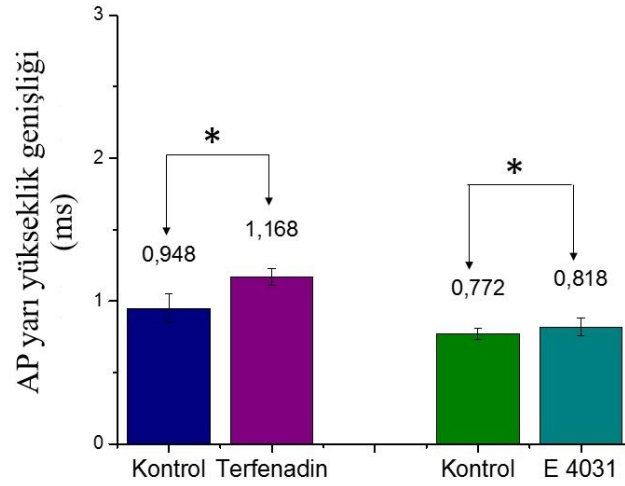
4.1.3.4. Aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkisi

ERG akımlarının bloke olması neticesinde aksiyon potansiyelinin şeklinde bir değişiklik olup olmadığı incelendi. Hem ilk aksiyon potansiyelinde hem de rastgele herhangi bir aksiyon potansiyelinin şeklinde ERG akımlarının bloklanması öncesi ve sonrasında herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 32). Şekilde siyah renk ile gösterilen traseler kontrol, kırmızı renk ile gösterilen traseler ise terfenadin ve E-4031 uygulaması sonrası elde edilen traselerdir. Daha kolay karşılaştırma yapabilmek için terfenadin ve E-4031 uygulama sonrası elde edilen traseler, dinlenim potansiyeli açısından kontrol kayıtları seviyelerine getirilerek hizalanmıştır. Böylece traseler birbiri üzerine örtüştürülerek gösterilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak, aksiyon potansiyel genliği değerlendirilmiştir. Terfenadin ve E-4031 aksiyon potansiyel genliğini değiştirmediği saptanmıştır ($p>0,05$).

Daha sonra ERG kanallarının bloklanmasının aksiyon potansiyeli yarı yükseklik genişliği üzerine bir etki gösterip göstermediği araştırıldı. Terfenadin uygulanan hücrelerde kontrol durumlarında AP yarı yükseklik genişliği $0,948 \text{ ms} \pm 0,10$ olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $1,168 \text{ ms} \pm 0,06$ ($n=12$) olarak ölçülmüştür ($p<0,05$). Terfenadine maruz kaldıktan sonra aksiyon potansiyeli yarı yükseklik genişliğinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzadığı belirlenmiştir. Diğer taraftan E-4031 uygulanan hücrelerde, kontrol durumlarında hücrelerin AP yarı yükseklik genişliği $0,772 \text{ ms} \pm 0,04$ olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $0,818 \text{ ms} \pm 0,06$ ($n=10$) olarak ölçülmüştür ($p<0,05$). E-4031'e maruz kaldıktan sonra aksiyon potansiyeli yarı yükseklik genişliğinin yine istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uzadığı belirlenmiştir (Şekil 33).



Şekil 32. Terfenadin ve E-4031' in yıldız hücrelerinde AP şekli üzerine etkileri. Siyah renkli olan trase kontrol, kırmızı renkli olan trase E-4031 varlığında alınmıştır.

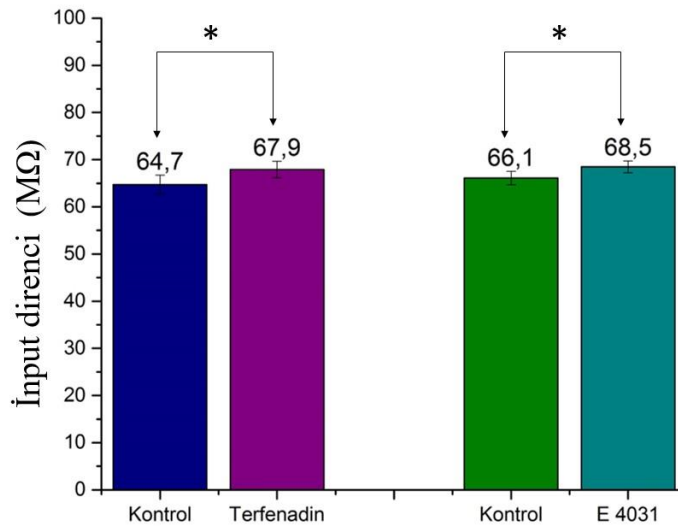


Şekil 33. Terfenadin ve E-4031 in AP yarı yükseklik genişliği üzerine etkisi. *: Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

4.1.3.5. İntput (İntput) direnci üzerine etkisi

Terfenadin uygulanmadan önce hücrelerin input dirençleri $64,7 \text{ M}\Omega \pm 2,01$ olarak, uygulandıktan sonra ise $67,9 \text{ M}\Omega \pm 1,75$; ($n=13$) olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$). E-4031 uygulanmadan önce hücrelerin input dirençleri $66,10 \text{ M}\Omega \pm 1,42$ olarak, uygulandıktan sonra ise $68,50 \text{ M}\Omega \pm 1,25$; ($n=10$) olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$).

ERG akımlarının her iki blokörle bloklanması neticesinde input dirençlerinde yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 34).



Şekil 34. Terfenadin ve E-4031 in hücrelerin input direnci üzerine etkisi. *: Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

4.1.4 ERG akımlarının çalı tipi nöronlar üzerindeki etkisi

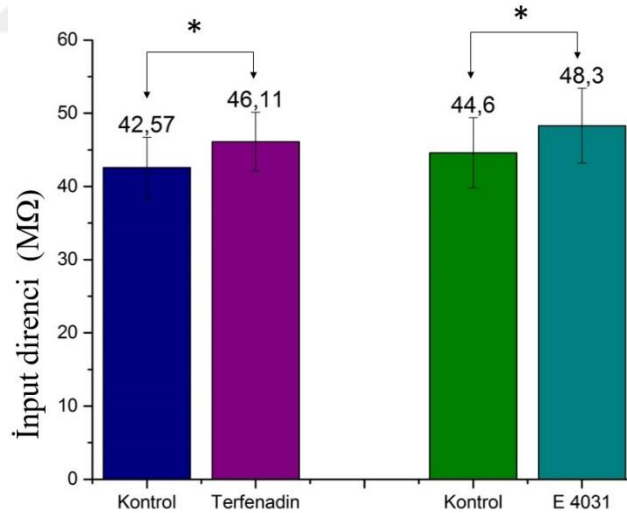
4.1.4.1. İstirahat zar potansiyeli üzerine etkisi

Terfenadin uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında istirahat zar potansiyeli $-58,7 \text{ mV} \pm 2,01$ olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $-57,9 \text{ mV} \pm 1,76$; ($n=6$) olarak ölçülmüştür ($p > 0,05$). E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında istirahat zar potansiyeli $-63,7 \text{ mV} \pm 2,24$ olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $-61,9 \text{ mV} \pm 2,96$; ($n=3$) ölçülmüştür ($p > 0,05$). Hem E-4031, hem de terfenadin hücreler üzerinde hafif depolarize edici bir etki göstermiştir, fakat bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.1.4.2. İnpıt direnci üzerine etkisi

Terfenadin uygulanmadan önce hücrelerin input dirençleri $42,57 \text{ M}\Omega \pm 4,16$ olarak, uygulandıktan sonra ise $46,11 \text{ M}\Omega \pm 4,04$; ($n=6$) olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$). E-4031 uygulanmadan önce hücrelerin input dirençleri $44,6 \text{ M}\Omega \pm 4,80$; olarak, uygulandıktan sonra ise $48,3 \text{ M}\Omega \pm 5,11$; ($n=3$) olarak ölçülmüştür ($p < 0,05$).

ERG akımlarının her iki blokörle bloklanması neticesinde input dirençlerinde yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 35).

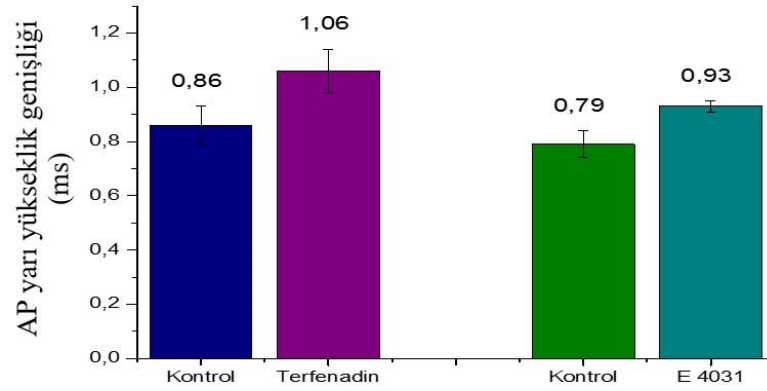


Şekil 35. Terfenadin ve E-4031 in hücrelerin input direnci üzerine etkisi. *: Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$).

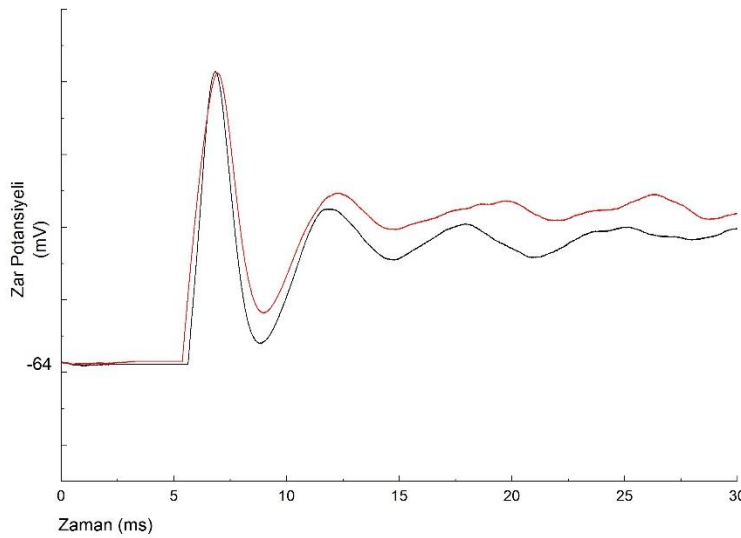
4.1.4.3. Aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkisi

ERG kanallarının bloklanmasının AP yarı yükseklik genişliği üzerine bir etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. Terfenadin uygulanan hücrelerde, kontrol durumlarında AP

yarı yükseklik genişliği $0,86 \text{ ms} \pm 0,07$ olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $1,06 \text{ ms} \pm 0,08$; ($n=6$) olarak ölçülmüştür ($p>0,05$). E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında hücrelerin AP yarı yükseklik genişliği $0,79 \text{ ms} \pm 0,05$ olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $0,93 \text{ ms} \pm 0,02$; ($n=3$) ölçülmüştür ($p>0,05$). Hücreler hem E-4031, hem de terfenadine maruz kaldıktan sonra AP yarı yükseklik genişliği uzamıştır fakat bu uzama istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir (Şekil 36). Spesifik ERG kanal blokörü E 4031’in çalı tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkisine bakılmıştır (Şekil 37).



Şekil 36. Terfenadin ve E-4031 in AP yarı yükseklik genişliği süresi üzerine etkisi

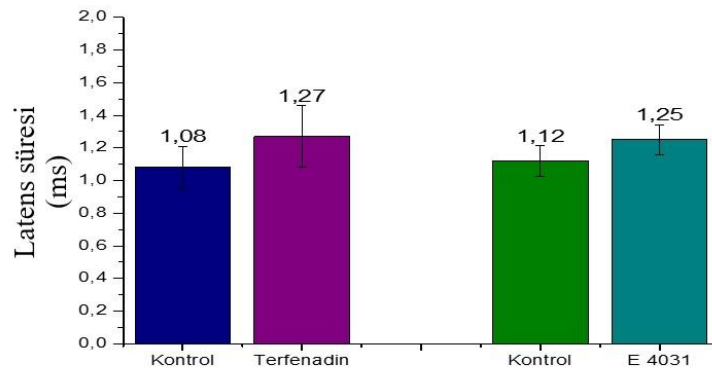


Şekil 37. E-4031’ in çalı hücrelerinde AP şekli üzerine etkileri. Siyah renkli olan trase kontrol, ve kırmızı renkli olan trase E-4031 varlığında alınmıştır.

4.1.4.4. Latens süresi üzerine etkisi

ERG kanal blokörlerinin latens süresi üzerine bir etkisinin olup olmadığı incelendi. Terfenadin uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında latens süresi $1,08 \text{ ms} \pm 0,10$; olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $1,27 \text{ ms} \pm 0,19$; ($n=6$) olarak ölçülmüştür ($p>0,05$). E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında hücrelerin latens süresi $1,12 \text{ ms} \pm 0,94$ olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $1,25 \text{ ms} \pm 0,93$; ($n=3$) ölçülmüştür ($p>0,05$).

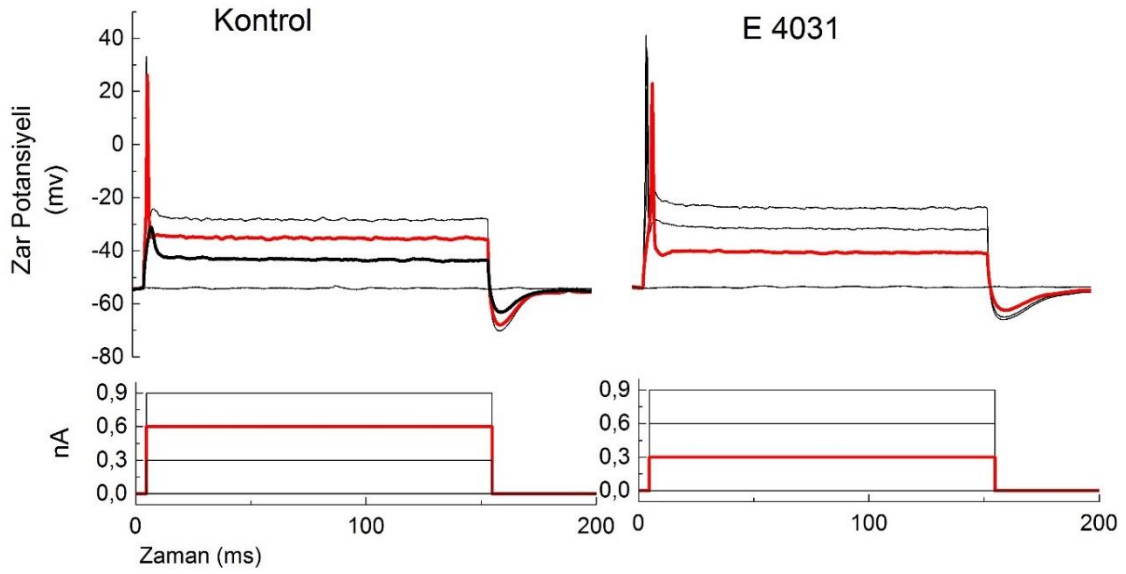
Her iki blokörün de hücrelere uygulandıktan sonra ilk aksiyon potansiyeli oluşumu için geçen süreler üzerine bir etkisinin olduğu gözlenmiştir fakat bu etki istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 38).



Şekil 38. Terfenadin ve E-4031 in latens süresi üzerine etkisi

4.1.4.5. Eşik değeri ve uyarılabilirlik üzerine etkisi

Çalı tipi nöronlarda E-4031'in eşik değeri ve uyarılabilirlik üzerine etkisi incelendi. Yapılan deneylerde 12 hücrenin 6 tanesinde kontrol durumlarına göre yaklaşık olarak ortalama 120 pA değerinde daha az akımla uyarıldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 39).



Şekil 39. Çalı hücrelerinde E-4031'in uyarılabilirlik üzerine etkisi. Kontrol durumunda hücre 0,6 nA ile ilk aksiyon potansiyelini oluştururken, E-4031 varlığında 0,3 nA ile oluşturmuştur. Buradan hareketler ERG kanal antagonistleri eşik değeri düşürmektedir.

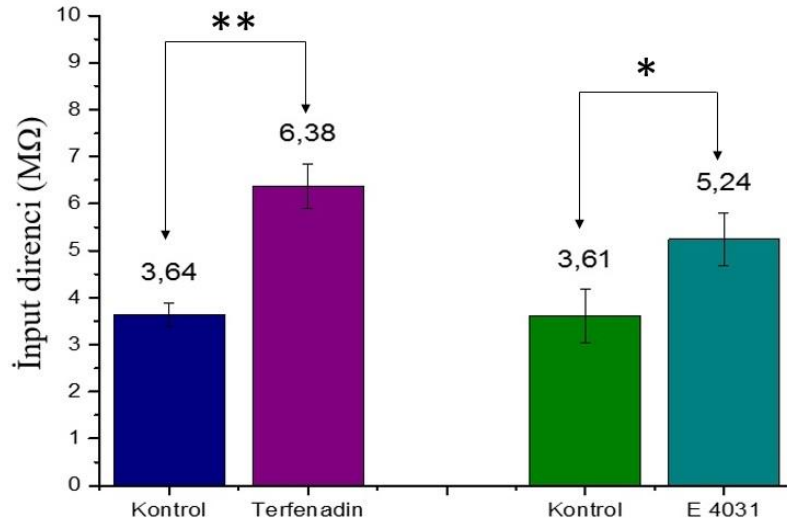
4.1.5. ERG akımlarının ahtapot tipi nöronlar üzerindeki etkisi

4.1.5.1. İstirahat zar potansiyeli üzerine etkisi

Stabil olarak hücre içi kayıt alınan 6 hücrede E-4031'in, 10 hücrede terfenadin'in zar potansiyeli üzerine etkilerine bakılmıştır. Terfenadin uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında istirahat zar potansiyeli $-61,84 \text{ mV} \pm 2,05$; olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $-61,54 \text{ mV} \pm 1,90$; ($n=10$) ölçülmüştür ($p>0,05$). E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında istirahat zar potansiyeli $-62,1 \text{ mV} \pm 1,34$ olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $-61,7 \text{ mV} \pm 1,69$; ($n=6$) ölçülmüştür ($p>0,05$). E-4031 ve terfenadinin istirahat zar potansiyeli üzerine bir etkisi görülmemiştir.

4.1.5.2. Input direnci üzerine etkisi

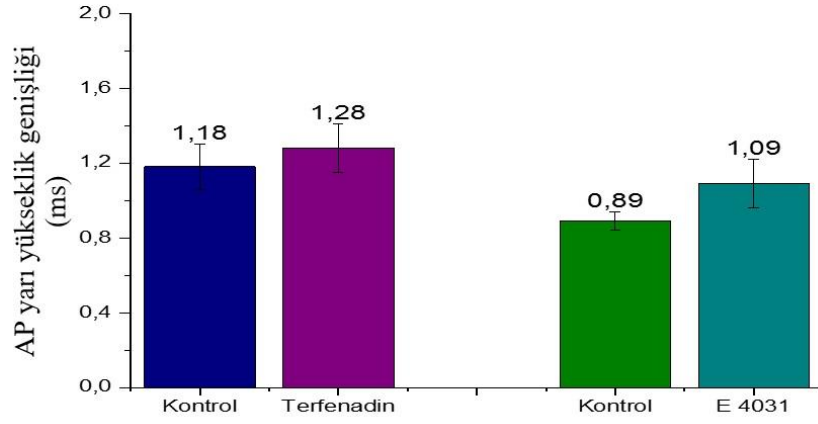
Terfenadin uygulanmadan önce hücrelerin input dirençleri $3,64 \text{ M}\Omega \pm 0,25$ olarak, uygulandıktan sonra ise $6,38 \text{ M}\Omega \pm 0,47$; ($n=8$) olarak ölçülmüştür ($p < 0,01$). E-4031 uygulanmadan önce hücrelerin input dirençleri $3,61 \text{ M}\Omega \pm 0,56$ olarak, uygulandıktan sonra ise $5,24 \text{ M}\Omega \pm 0,56$; ($n=8$) olarak ölçülmüştür ERG akımlarının her iki blokörle bloklanması neticesinde input dirençlerinde yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 40).



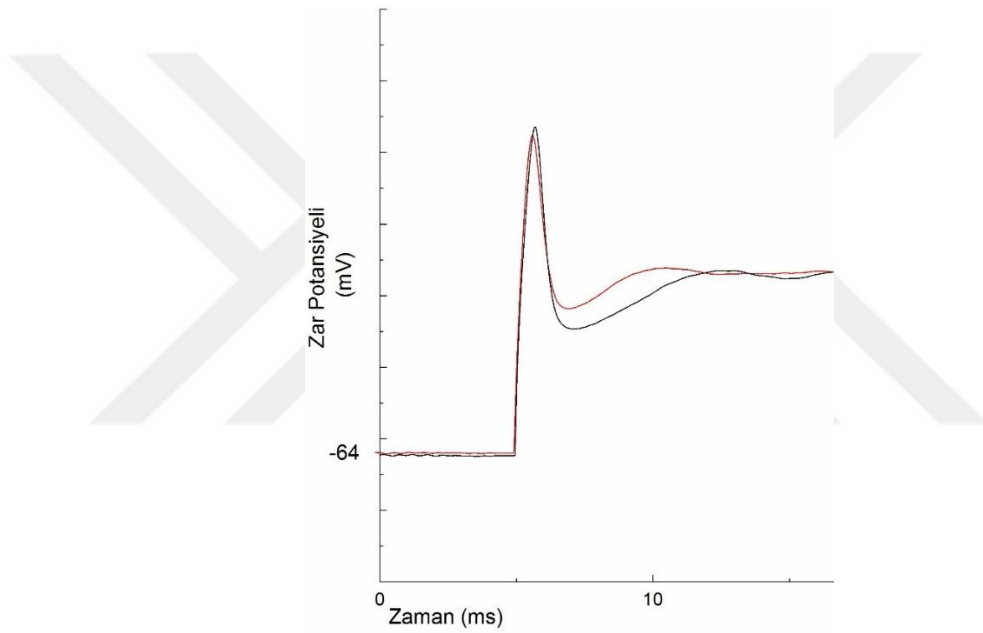
Şekil 40. Terfenadin ve E-4031 in hücrelerin input direnci üzerine etkisi. *: Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). **: Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).

4.1.5.3. Aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkisi

ERG kanallarının bloklanmasının aksiyon potansiyeli yarılanma zamanı üzerine bir etki gösterip göstermediği araştırıldı. Terfenadin uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında AP yarılanma zamanı $1,18 \text{ ms} \pm 0,12$ olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $1,28 \text{ ms} \pm 0,13$; ($n=8$) olarak ölçülmüştür. E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında hücrelerin AP yarılanma zamanı $0,89 \text{ ms} \pm 0,05$; olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $1,09 \text{ ms} \pm 0,13$; ($n=8$) ölçülmüştür. Hücreler hem E-4031 hem de terfenadine maruz kaldıktan sonra AP yarı yükseklik genişliği uzamıştır fakat bu uzama istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p>0,05$) (Şekil 41). Spesifik ERG kanal blokörü E 4031'in ahtapot tipi nöronlarda aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkisine bakılmıştır (Şekil 42).



Şekil 41. Terfenadin ve E-4031 in AP yarı yükseklik genişliği üzerine etkisi

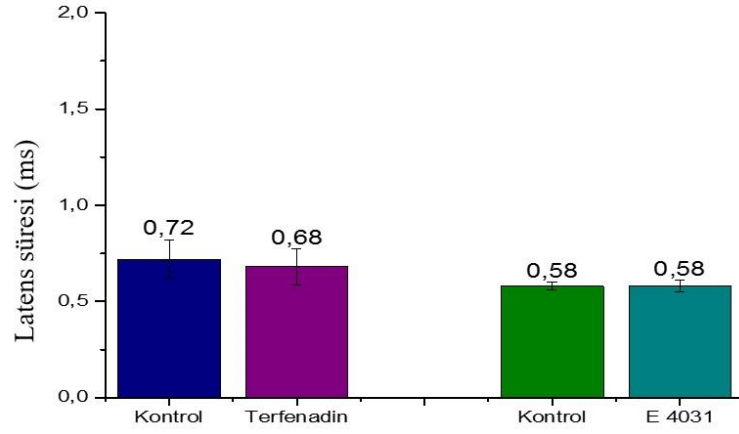


Şekil 42. E-4031' in ahtapot hücrelerinde AP şekli üzerine etkileri. Siyah renkli olan trase, kontrol ve kırmızı renkli olan trase E-4031 varlığında alınmıştır.

4.1.5.4. Latens süresi üzerine etkisi

ERG kanal blokörlerinin latens süresi üzerine bir etkisinin olup olmadığı incelendi. Terfenadin uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında latens süresi $0,72 \text{ ms} \pm 0,10$; olarak, terfenadin uygulandıktan sonra ise $0,68 \text{ ms} \pm 0,09$; ($n=8$) olarak ölçülmüştür. E-4031 uygulanan hücrelerde; kontrol durumlarında hücrelerin latens süresi $0,58 \text{ ms} \pm 0,20$; olarak, E-4031 uygulandıktan sonra ise $0,58 \text{ ms} \pm 0,30$; ($n=8$) ölçülmüştür.

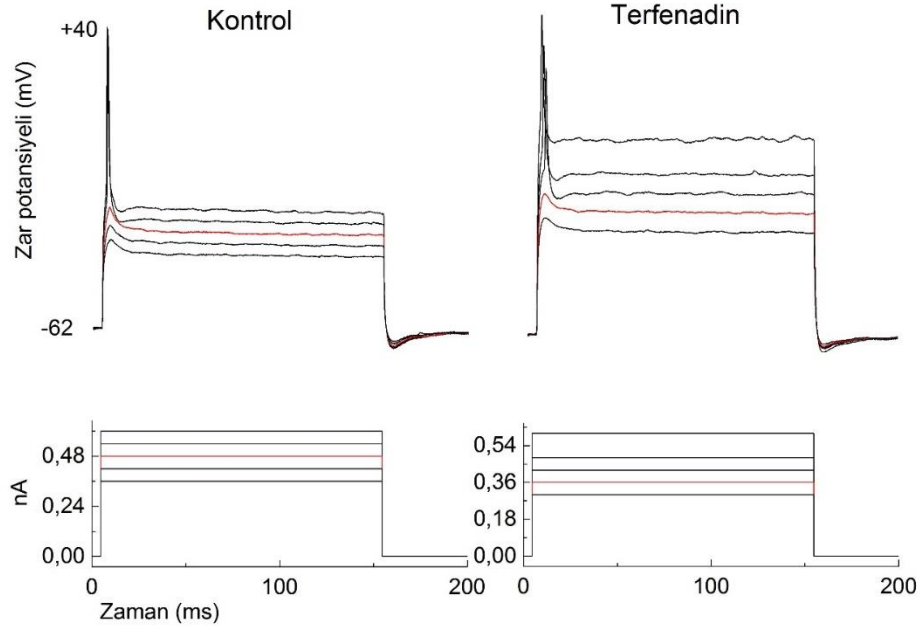
Her iki blokörün de hücrelere uygulandıktan sonra ilk aksiyon potansiyeli oluşumu için geçen süreler üzerine bir etkilerinin olduğu gözlenmiştir fakat bu etki anlamlı düzeyde bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 43).



Şekil 43. Terfenadin ve E-4031 in latens süresi üzerine etkisi

4.1.5.5. Eşik değeri ve uyarılabilirlik üzerine etkisi

Ahtapot tipi nöronlarda terfenadinin'in eşik değeri ve uyarılabilirlik üzerine etkisi incelendi. Yapılan deneylerde 14 hücrenin 9 tanesinde kontrol durumlarına göre hücrelerin eşik yaklaşık olarak 180 pA değerinde daha az akımla uyarıldığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 44).



Şekil 44. Ahtapot tipi hücrelerde terfenadinin uyarılabilirlik üzerine etkisi. Kontrol durumunda 0,48 nA ile ilk aksiyon potansiyeli oluşurken, terfenadin varlığında 0,36 nA ile oluşmuştur. ERG kanal blokörleri kanalların uyarılabilirliğini eşik değeri düşürerek arttırdı.

4.2. Voltaj kenetleme çalışmaları

ERG kanalları voltaj bağımlı yavaş deaktivasyon ve inaktivasyondan kurtulma (recovery) kinetiklerinin çok hızlı olması ile karakterize kanallardır (148). ERG kanalları, hücre içine doğru K^+ girişine sebep olan (inward rectification) kanallardır ve bu nedenle ekstrasellüler K^+ konsantrasyonunun artmasıyla ERG akım genliklerinin de artması beklenir (120). Aynı zamanda Ca^{+2} ile aktive olan K^+ akımlarından dolayı ERG kanal akımını kontamine ederek izole edilmesini güçleştirir. Daha büyük amplitüdlerde ERG akımı elde etmek için ekstrasellüler K^+ konsantrasyonu 40 mM'a yükseltildi (132, 149). Buna ek olarak "kontrol yBOS" solüsyonunda, voltaj bağımlı Ca^{+2} kanal akımlarını ve dolayısıyla Ca^{+2} ile aktive olan K^+ akımlarını engellemek için Ca^{+2} konsantrasyonu 0 mM'a indirildi (14).

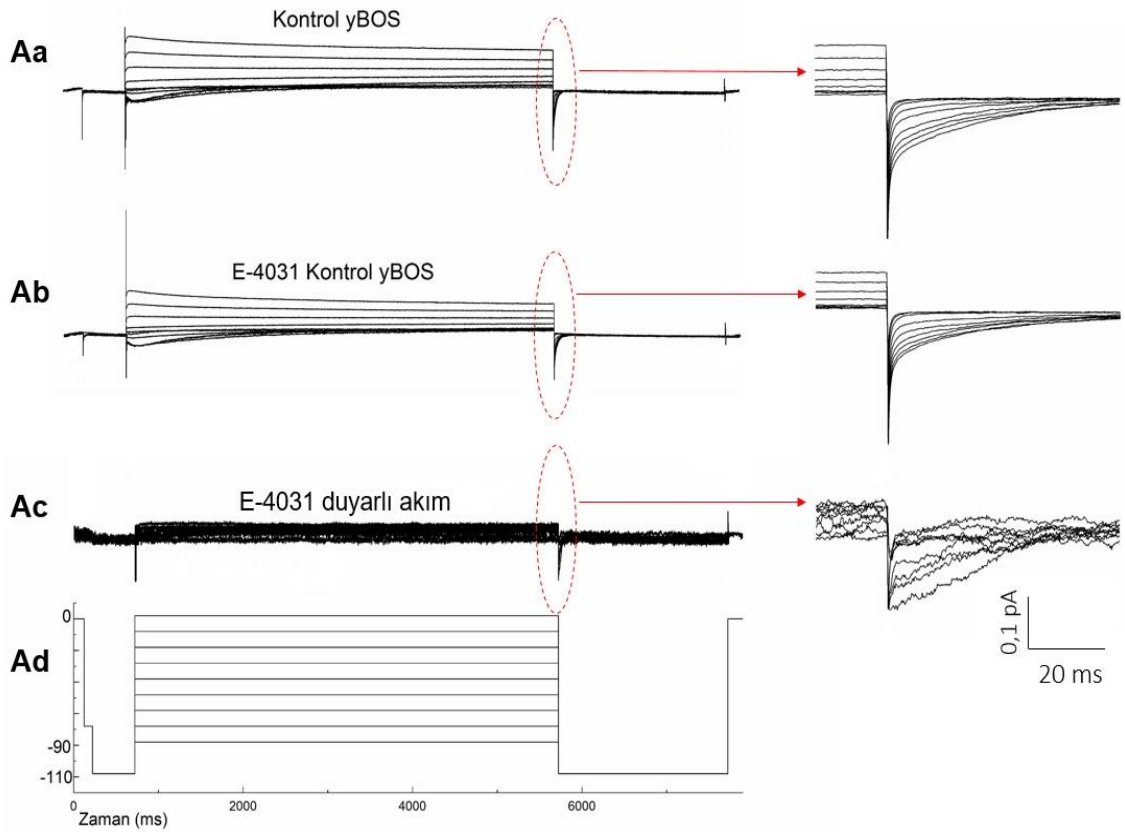
Voltaj kenetleme çalışmalarında kontrol yBOS solüsyonu ile belirgin ERG kuyruk akımları alınmıştır. Aynı solüsyonda bulunan antagonistlerin (4-AP, TEA ve Cs, DNQX, APV-5, Striknin) varlığında kohlear çekirdek nöronlarında karakterize edilen büyük akımlar inhibe edilmeye çalışılmıştır. Bunun neticesinde minimal kontaminasyonla ERG akımlarının izole edilmesi amaçlanmıştır. Fakat elde edilen bu kuyruk akımının tamamının ERG akımından ibaret olmadığı, kısmen de, tam bloklanmamış düşük eşik değerlikli potasyum akımı ve yüksek eşik değerlikli karışık katyon kanalı akımlarının varlığı muhtemeldir. Bu akımların hem kontrol yBOS solüsyonunda, hem de E-4031 kontrol yBOS solüsyonunda alınan kayıtlarda benzer genliklerde olacağı beklenmektedir. İki solüsyon arasında tek farkın ikinci solüsyonda bulunan E-4031 toksinin bulunmasıdır. Dolayısıyla E-4031 (10 μ M) eklendiğinde spesifik olarak ERG kanallarının bloke olması beklenilir. Böylece E-4031 öncesi alınan kayıtlardan E-4031 uygulanması sonrası elde edilen kayıtlar çıkartıldığında ERG kuyruk akımının izole edildiği düşünülmektedir.

4.2.1. ERG kanallarının voltaj bağımlı kararlı durum (steady state) aktivasyon kinetiği

ERG kanallarının akım kinetiklerini ve biyofiziksel özelliklerini ortaya koyabilmek için Şekil 45'de verilen aktivasyon protokolü uygulandı. Bu protokole göre hücrelerin zar potansiyelleri 100 ms süre ile -80 mV'a sabitlendi. Daha sonra -110 mV'a indirildi ve bu seviyede 400 ms bekletildikten sonra yaklaşık olarak 5 saniyelik süre boyunca -90 mV ile -10 mV arasında 10'ar mV'luk artışlar yapacak şekilde voltaj adımlar uygulandı. Daha sonra -110 mV'a indirildi ve 1 sn bu seviyede tutuldu. Burada oluşan kuyruk (tail) akımları incelendi.

4.2.1.1. Yıldız tipi hücrelerin voltaj bağımlı aktivasyon kinetiği

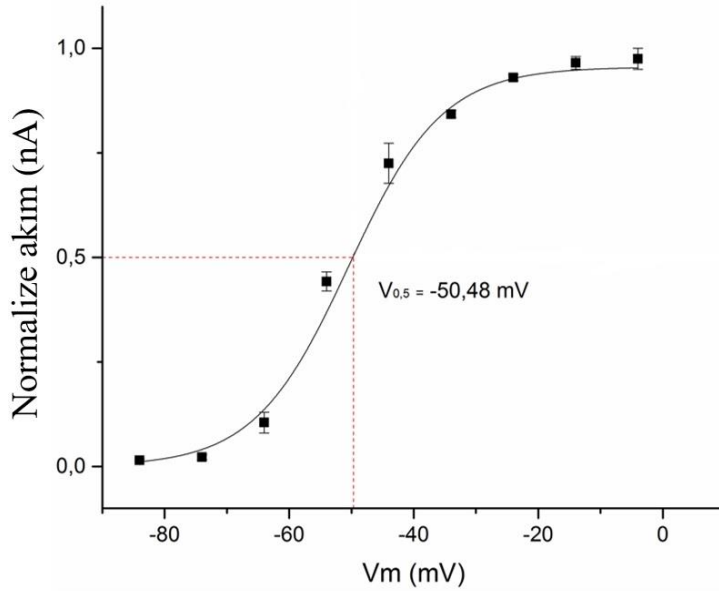
Yıldız tipi nöronların ERG akımları spesifik ERG kanal blokörü olan E-4031 kullanılarak Şekil 45 Ad’de verilmiş olan protokol ile izole edilmiştir. Şekil 45 Aa traseleri “kontrol yBOS” solüsyonu ile perfüze edilen hücreden alınan, Ab traseleri ise “E-4031 içeren kontrol yBOS” solüsyon perfüze edilirken alınan trase örnekleridir. Aa traselerinden Ab traseleri çıkarıldığı zaman E-4031 tarafından bloklanan ve E-4031 duyarlı ERG kanal akımlarını gösteren Ac traseleri elde edilmiş olur. Şeklin sağ tarafında ise daha iyi görülmesi ve anlaşılması için kuyruk akımlarının büyük ölçekli gösterilmiş hali verilmiştir.



Şekil 45. Yıldız hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon kayıtları. Kararlı-durum aktivasyon grafiğini elde etmek için kullanılan voltaj protokolü. Kırmızı renkli kesikli çizgilerle sınırlandırılmış alanda oluşan kuyruk akımları incelendi

Şekil 46’da yıldız hücrelerinden alınan kuyruk akımı kayıtlarında her bir hücrenin aktivasyon eğrisi normalize edildikten sonra ortalama değerleri bulunarak tek bir eğri elde edilmiştir. Daha sonra Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit edilerek), ERG kanallarının yarı aktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri bulundu.

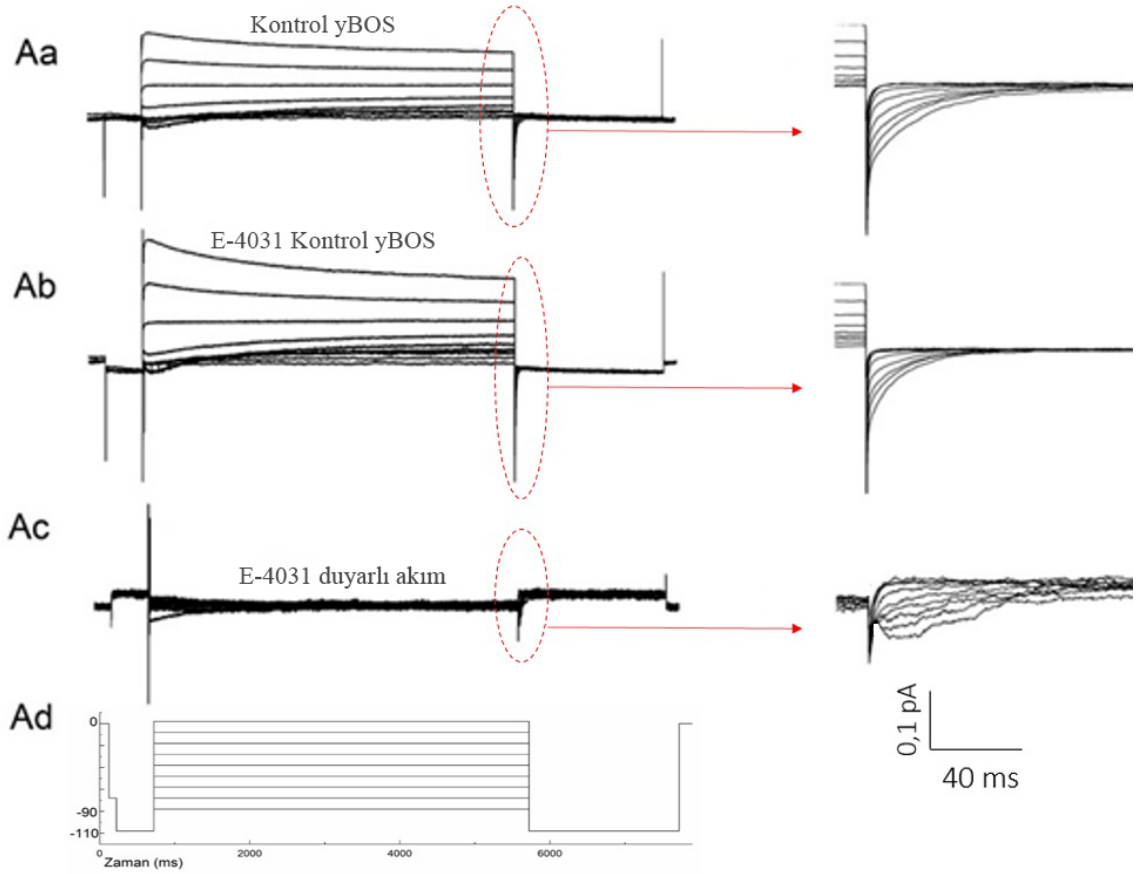
Buna göre $V_{0,5}$ değeri $-50,48 \pm 1,45$ ve eğrinin eğimi (slope = k Faktör) $7,53 \pm 0,95$ olarak belirlenmiştir (n=4). Bu eğri incelendiğinde yıldız tipi nöronlarda ERG kanal akımı aktivasyonunun -70 mV'dan daha depolarize değerlerde gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 46. Yıldız hücrelerinin kararlı durum aktivasyon eğrisi.

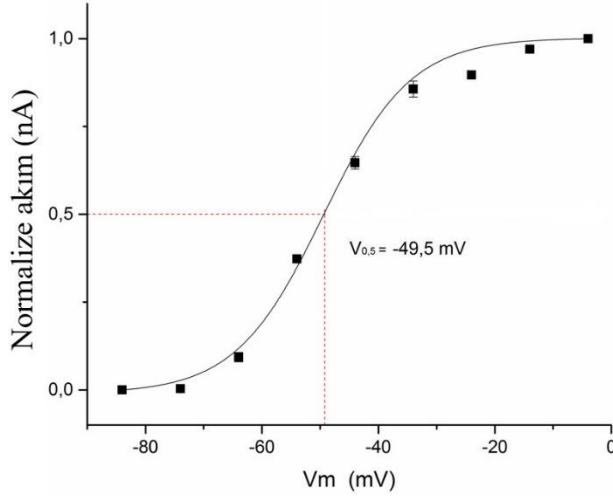
4.2.1.2. Çalı tipi hücrelerin voltaj bağımlı aktivasyon kinetikleri

Çalı tipi nöronların ERG akımları spesifik ERG kanal blokörü olan E-4031 kullanılarak Şekil 47 Ad'de verilmiş olan protokol kullanılarak izole edilmiştir. Şekil 47 Aa grafiğinde kontrol solüsyonu ile perfüze edilen hücreden alınan, Ab grafiğinde ilaç solüsyonu varlığında alınan kayıt örnekleridir. Aa grafiğinden ab grafiği çıkarıldığı zaman E-4031 tarafından bloklanan ve ERG kanal akımlarını gösteren Ac grafiği elde edilmiştir. Grafiğin sağ tarafındaki traselerde ise daha iyi görülmesi ve anlaşılması için kuyruk akımlarının büyük ölçekli gösterilmiş hali verilmiştir.



Şekil 47. Çalı hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon kayıtları

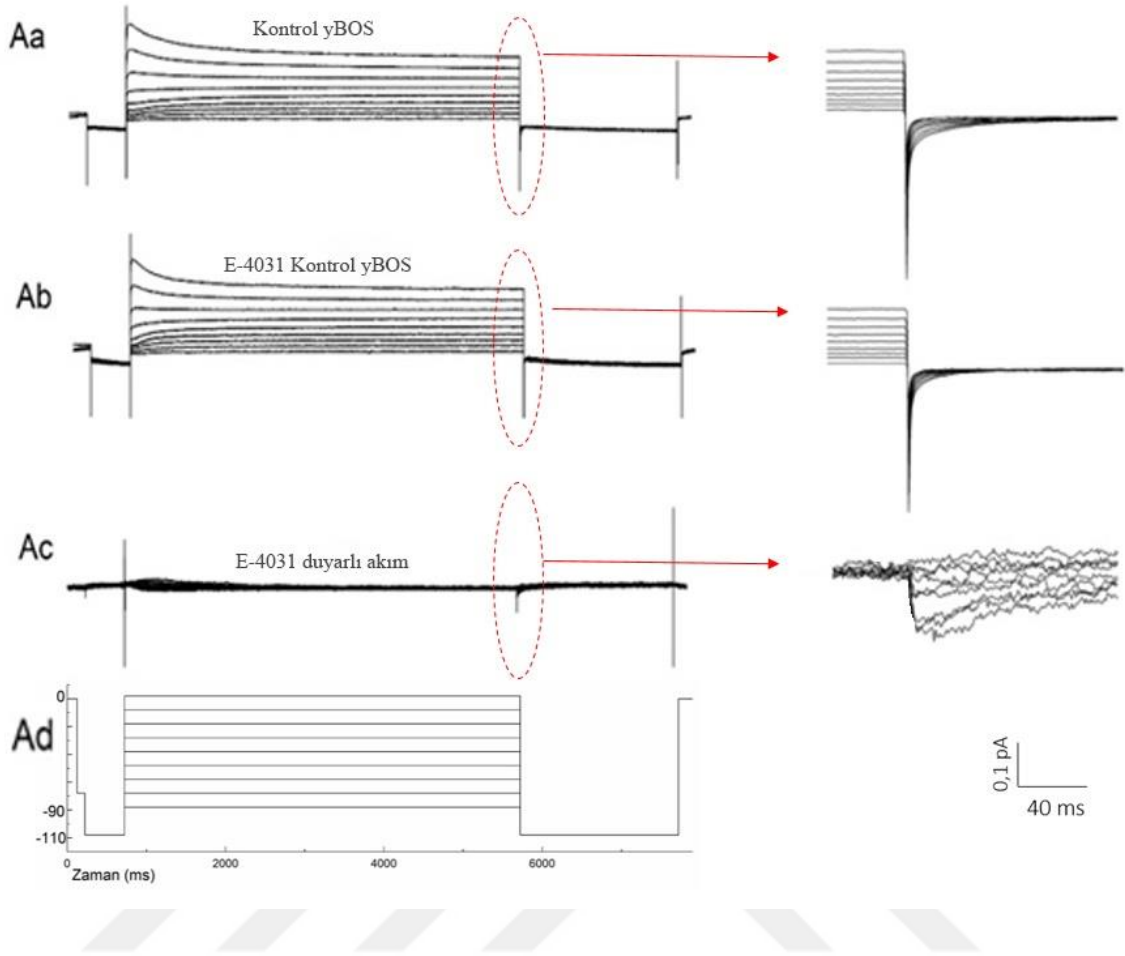
Çalı hücrelerinden alınan kayıtlardan kararlı durum eğrisi kullanılarak akım/voltaj eğrileri oluşturulmuştur. Alınan kuyruk akımı kayıtlarında her bir hücrenin aktivasyon eğrisi normalize edildikten sonra ortalama değerleri bulunarak tek bir eğri elde edilmiştir. Daha sonra Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit edilerek), ERG kanallarının yarı aktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri bulundu. Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldığında $V_{0,5}$ değeri $-49,5 \pm 1,23$ ve eğrinin eğimi (k faktör) $7,51 \pm 1,33$ olarak ölçülmüştür ($n=3$) (Şekil 48). Bu eğri incelendiğinde çalı tipi nöronlarda ERG kanal akımı aktivasyonunun -70 mV dan daha depolarize değerlerde gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 48. Çalı hücrelerinin kararlı durum aktivasyon eğrisi

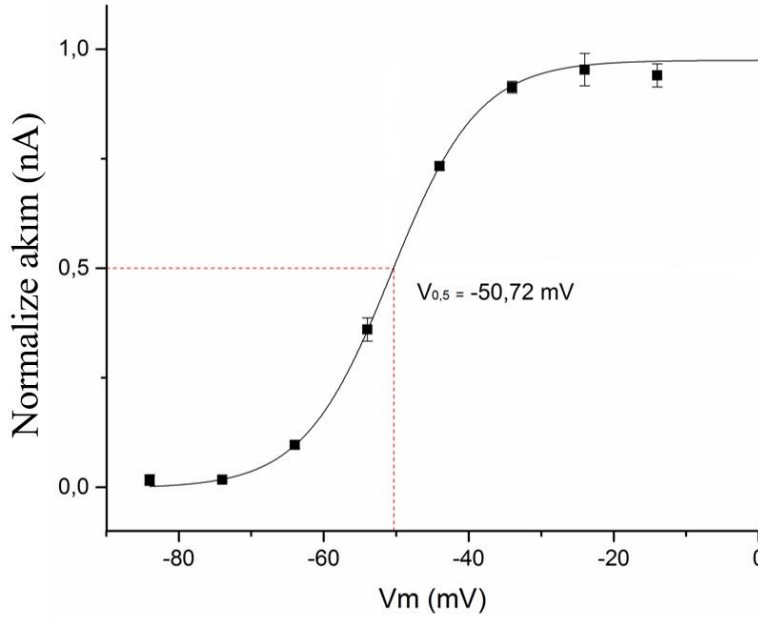
4.2.1.3. Ahtapot tipi hücrelerin voltaj bağımlı aktivasyon kinetikleri

Ahtapot tipi nöronlarda Şekil 49'da Aa grafiğinde kontrol solüsyonu ile perfüze edilen hücreden alınan, Ab grafiğinde bileşiminde ilaç solüsyonu varlığında alınan kayıt örnekleridir. Aa grafiğinden ab grafiği çıkarıldığı zaman E-4031 tarafından bloklanan ve ERG kanal akımlarını gösteren Ac grafiği elde edilmiştir. Grafiğin sağ tarafındaki traseler ise daha iyi görülmesi ve anlaşılması için kuyruk akımlarının büyük ölçekli gösterilmiş hali verilmiştir.



Şekil 49. Ahtapot tipi hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon kayıtları

Şekil 50'de ahtapot hücrelerinden alınan kayıtlardan akım/voltaj eğrileri oluşturulmuştur. kararlı durum eğrisi kullanılarak akım/voltaj eğrileri oluşturulmuştur. Alınan kuyruk akımı kayıtlarında her bir hücrenin aktivasyon eğrisi normalize edildikten sonra ortalama değerleri bulunarak tek bir eğri elde edilmiştir. Daha sonra Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit edilerek), ERG kanalların yarı aktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri bulundu. Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldığında $V_{0,5}$ değeri -50.72 ± 0.32 ve eğrinin eğimi (k faktör) 6.04 ± 0.23 olarak ölçülmüştür ($n=3$). Bu eğri incelendiğinde ahtapot tipi nöronlarda ERG kanal akımı aktivasyonunun -60 mV dan daha depolarize değerlerde gerçekleştiği belirlenmiştir.



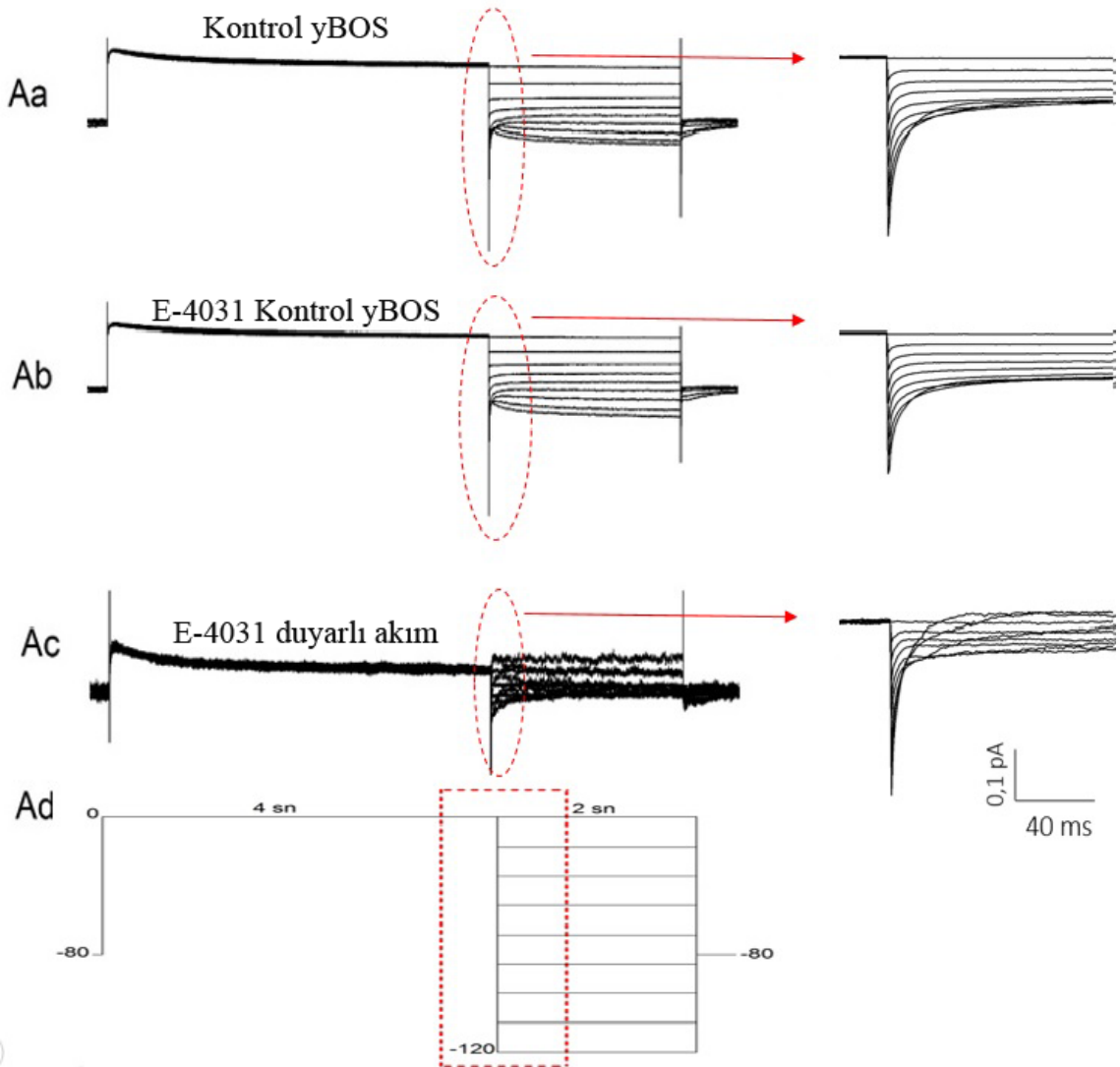
Şekil 50. Ahtapot hücrelerinin kararlı durum aktivasyon eğrisi

4.2.2. ERG kanallarının voltaj bağımlı kararlı durum (steady state) inaktivasyon kinetiği

ERG kanallarının voltaj bağımlı inaktivasyon kinetiklerini ve biyofiziksel özelliklerini ortaya koyabilmek için Şekil 51 Ad'de verilen inaktivasyon protokolü uygulandı. Bu protokole göre hücrelerin zar potansiyelleri 100 ms süre ile -80 mV'a sabitlendi. Daha sonra 0 mV'a çıkarıldı. Bu seviyede 4 saniye bekletildikten sonra, önce -120 mV'tan başlayarak -120 mV ile 0 mV arasında 15 mV'luk basamaklar şeklindeki artışlarla 2 saniye süre ile farklı potansiyellerde tutuldu. -120 mV voltaj değerinde tüm ERG kanallarının inaktivasyondan hızlı bir şekilde kurtularak (recovery), deaktivasyon tail akımlarının oluşması beklenir. Dolayısıyla deaktivasyon tail akımının genliği maksimum düzeyde gerçekleşir. Buna karşın 0 mV voltaj değerinde tutulduğunda ise, inaktif durumda olan ERG kanallarının hiç biri inaktivasyondan kurtulamayacak (recovery) ve bu nedenle de deaktivasyon kuyruk akımının genliğinin sıfır düzeyinde olması beklenir. Bu nedenle kararlı durum (steady state) inaktivasyon kinetiği böyle bir protokol ile elde edilen tail akımlarının genliği analiz ederek çalışıldı.

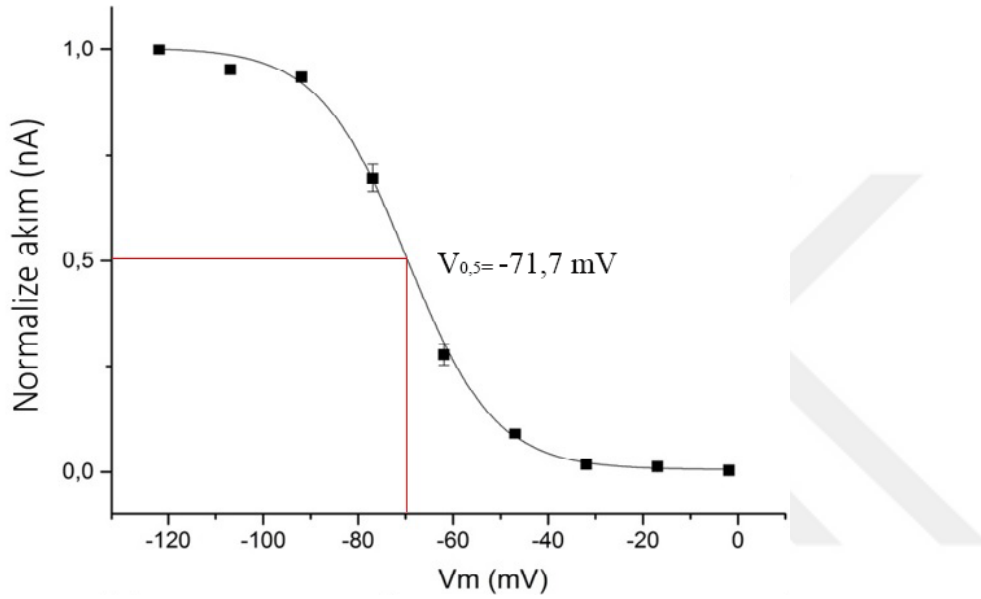
4.2.2.1. Yıldız tipi hücrelerin voltaj bağımlı inaktivasyon kinetikleri

Yıldız tipi nöronların ERG akımları spesifik ERG kanal blokörü olan E-4031 kullanılarak Şekil 51 Ad’de verilmiş olan inaktivasyon protokolü ile izole edilmiştir. Şekil 52’de Aa grafiğinde kontrol solüsyonu ile perfüze edilen hücreden alınan, Ab grafiğinde ilaç bulunan solüsyon varlığında alınan kayıt örnekleridir. Aa grafiğinden ab grafiği çıkarıldığı zaman E-4031 tarafından bloklanan ve ERG kanal akımlarını gösteren Ac grafiği elde edilmiştir. Grafiğin sağ tarafındaki traselerde ise daha iyi görülmesi ve anlaşılması için kuyruk akımlarının büyük ölçekli gösterilmiş hali verilmiştir.



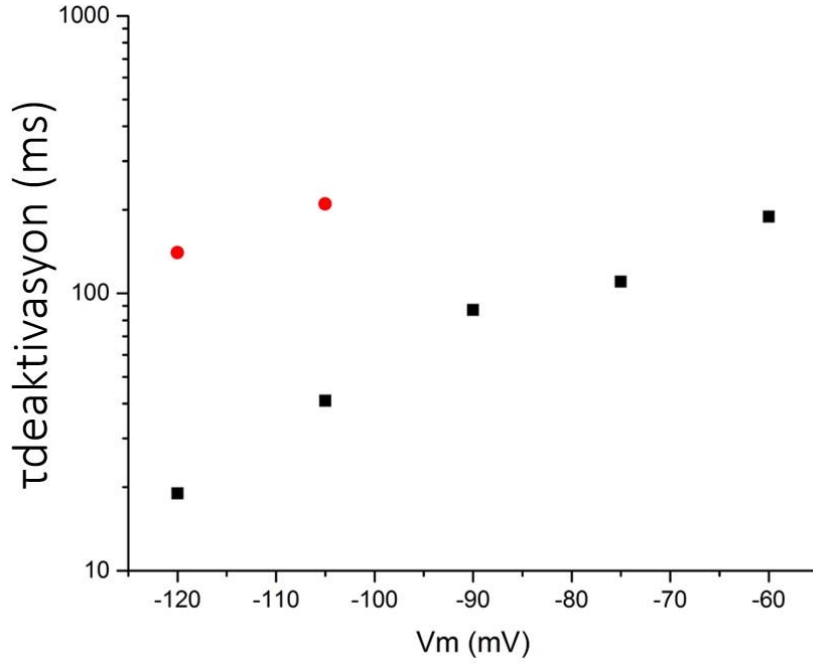
Şekil 51. Yıldız tipi hücrelerinin voltaj bağımlı inaktivasyon kayıtları. İnaktivasyon protokolü, kırmızı renkli kesikli çizgilerle sınırlandırılmış alanda oluşan kuyruk akımları incelendi.

Yıldız hücrelerinden alınan kayıtlardan kararlı durum eğrisi kullanılarak akım/voltaj eğrileri oluşturulmuştur. Alınan kuyruk akımı kayıtlarında her bir hücrenin aktivasyon eğrisi normalize edildikten sonra ortalama değerleri bulunarak tek bir eğri elde edilmiştir. Daha sonra Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit edilerek), ERG kanalların yarı inaktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri bulundu. Yıldız tipi nöronlarda Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldığında $V_{0,5}$ değeri $-71,7 \pm 1,34$ ve eğrinin eğimi (k faktör) $9,21 \pm 0,71$ olarak ölçülmüştür ($n=4$) (Şekil 52).



Şekil 52. Yıldız hücrelerinin kararlı durum inaktivasyon eğrisi

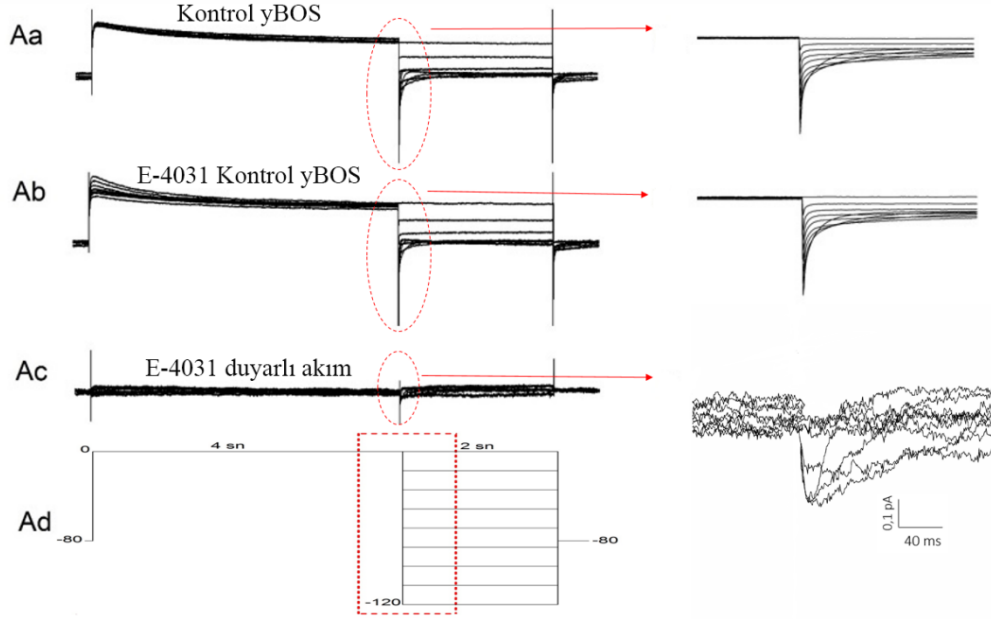
Yıldız tipi hücrelerin deaktivasyon kinetikleri Şekil 52 Ad'de verilen protokol kullanılarak belirlendi. ERG duyarlı kuyruk akımlarının pik değerlerinden azalarak sabit değere inen komponenti bir veya iki eksponensiyel fonksiyon ile uyarlandı (fit edildi). -120 ile -100 mV arasındaki potansiyeller iki eksponensiyel fonksiyon ile, -100 ile -60 mV arasındaki potansiyeller ise bir eksponensiyel ile en uyumlu olarak uyarlandı (fit edildi). Zar potansiyeli -120 mV' da iken zaman sabiti; 19 ms, -75 mV' da iken 189 ms olarak ölçülmüştür. Buna göre istirahat potansiyeli negatif değerlere doğru gittikçe deaktivasyon hızının arttığı görülmektedir (Şekil 53).



Şekil 53. Yıldız hücresinin deaktivasyon kinetiği (● $\tau_{yavaş}$, ■ $\tau_{hızlı}$; semi-logaritmik tablo)

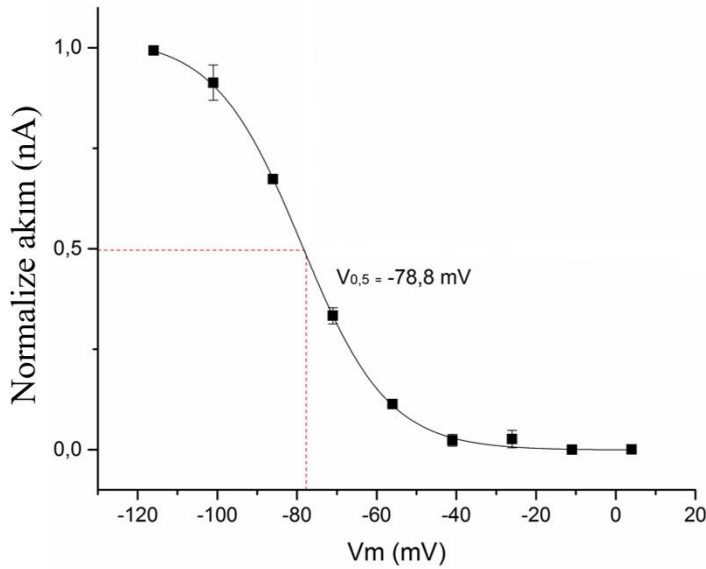
4.2.2.2. Çalı tipi hücrelerin voltaj bağımlı inaktivasyon kinetikleri

Çalı tipi nöronlarda Şekil 54 Aa grafiğinde kontrol solüsyonu ile perfüze edilen hücreden alınan, Ab grafiğinde ilaç bulunan solüsyon varlığında alınan kayıt örnekleridir. Aa grafiğinden ab grafiği çıkarıldığı zaman E-4031 tarafından bloklanan ve ERG kanal akımlarını gösteren Ac grafiği elde edilmiştir. Grafiğin sağ tarafındaki traseler ise daha iyi görülmesi ve anlaşılması için kuyruk akımlarının büyük ölçekli gösterilmiş hali verilmiştir.



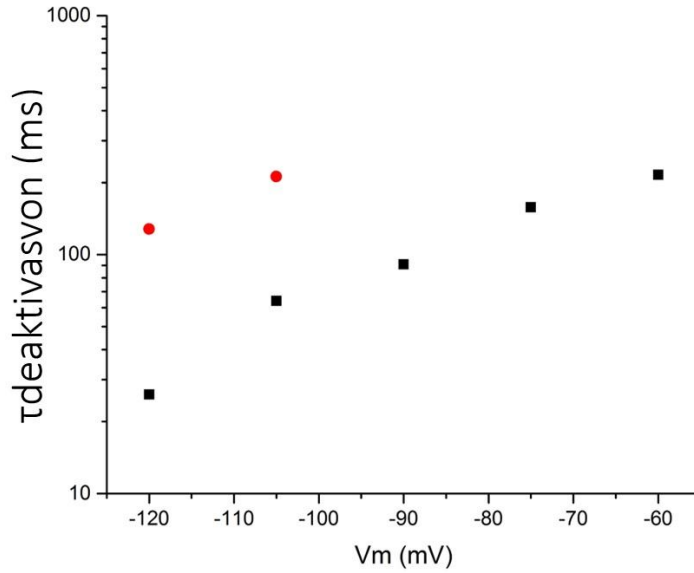
Şekil 54. Çalı tipi hücrelerinin voltaj bağımlı inaktivasyon kayıtları

Çalı hücrelerinden alınan kayıtlardan kararlı durum eğrisi kullanılarak akım/voltaj eğrileri oluşturulmuştur. Alınan kuyruk akımı kayıtlarında her bir hücrenin aktivasyon eğrisi normalize edildikten sonra ortalama değerleri bulunarak tek bir eğri elde edilmiştir. Daha sonra Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit edilerek), ERG kanalların yarı inaktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri bulundu. Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldığında $V_{0,5}$ değeri $-78,80 \pm 0,43$ ve eğrinin eğimi (k faktör) $10,85 \pm 0,26$ olarak ölçülmüştür ($n=3$) (Şekil 55).



Şekil 55. Çalı hücrelerinin kararlı durum inaktivasyon eğrisi

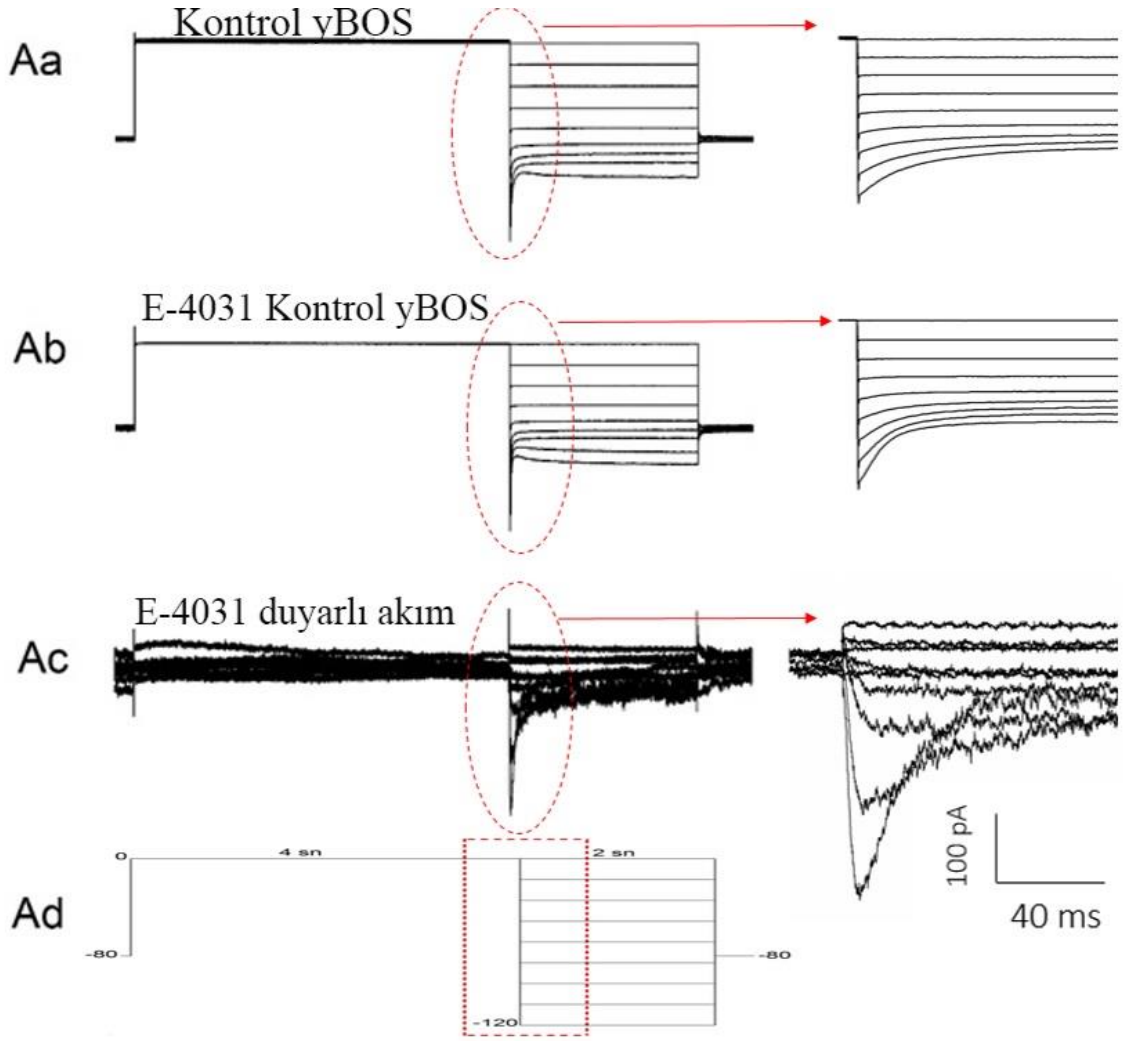
Aynı protokol kullanılarak çalı tipi hücrelerin deaktivasyon kinetikleri belirlendi. -120 ile -100 mV arasındaki potansiyeller double eksponensiyal ile, -100 ile -60 mV arasındaki potansiyeller single eksponensiyal ile en uyumlu olarak fit edilmiştir. Zar potansiyeli -120 mV’ da zaman sabiti; 26 ms, -80 mV’da 158 ms olarak ölçülmüştür. Buna göre istirahat potansiyeli negatif değerlere doğru gittikçe deaktivasyon hızının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 56).



Şekil 56. Çalı hücrelerinin deaktivasyon kinetiği (● τ_{yavaş}, ■ τ_{hızlı}; semi-logaritmik tablo)

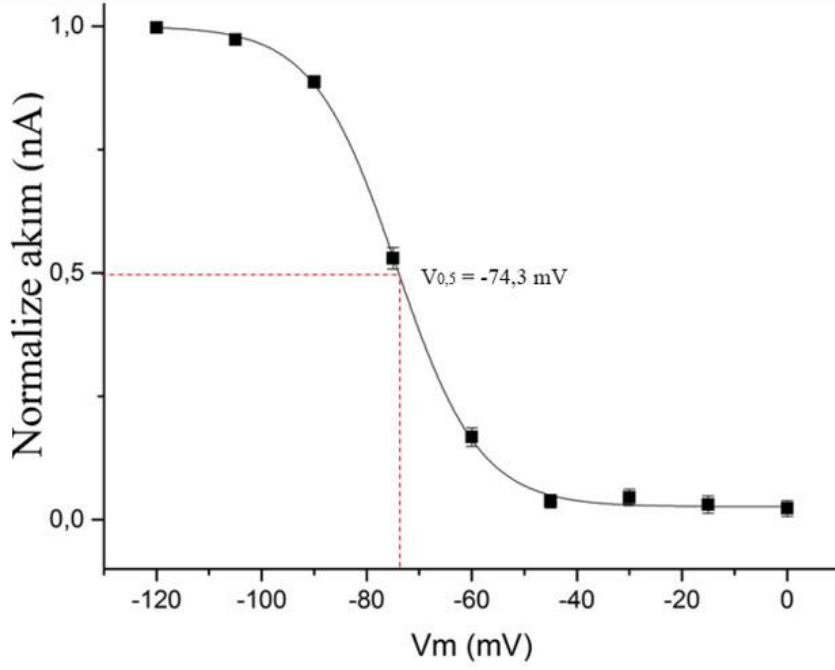
4.2.2.3. Ahtapot tipi hücrelerin voltaj bağımlı inaktivasyon kinetikleri

Çalı tipi nöronlarda Şekil 57’de Aa grafiğinde kontrol solüsyonu ile perfüze edilen hücreden alınan, Ab grafiğinde bileşiminde ilaç bulunan solüsyon varlığında alınan kayıt örnekleridir. Aa grafiğinden ab grafiği çıkarıldığı zaman E-4031 tarafından bloklanan ve ERG kanal akımlarını gösteren Ac grafiği elde edilmiştir. Grafiğin sağ tarafındaki traseler ise daha iyi görülmesi ve anlaşılması için kuyruk akımlarının büyük ölçekli gösterilmiş hali verilmiştir.



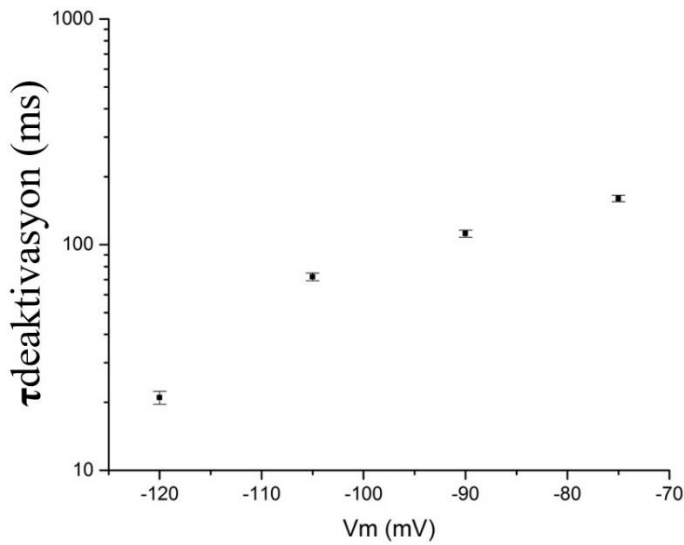
Şekil 57. Ahtapot tipi hücrelerinin voltaj bağımlı inaktivasyon kayıtları

Şekil 58'de ahtapot hücrelerinden alınan kayıtlardan kararlı durum eğrisi kullanılarak akım/voltaj eğrileri oluşturulmuştur. Alınan kuyruk akımı kayıtlarında her bir hücrenin aktivasyon eğrisi normalize edildikten sonra ortalama değerleri bulunarak tek bir eğri elde edilmiştir. Daha sonra Boltzman fonksiyonu ile uyarlanarak (fit edilerek), ERG kanallarının yarı inaktivasyon voltaj değeri ($V_{0,5}$) ve eğrinin eğim derecesi (k faktör) değerleri bulundu. Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldığında $V_{0,5}$ değeri $-74,34 \pm 0,46$ ve eğrinin eğimi (k faktör) $7,89 \pm 0,32$ olarak ölçülmüştür ($n=3$) (Şekil 58).



Şekil 58. Ahtapot hücrelerinin kararlı durum inaktivasyon eğrisi

Aynı protokol kullanılarak ahtapot tipi hücrelerin deaktivasyon kinetikleri belirlendi. Zar potansiyeli -120 mV’ da zaman sabiti; 17 ms, -80 mV’da 196 ms olarak ölçülmüştür. Buna göre tıpkı çalı hücrelerinde olduğu gibi ahtapot hücrelerinde de istirahat potansiyeli negatif değerlere doğru gittikçe deaktivasyon hızının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 59).



Şekil 59. Ahtapot hücrelerinin deaktivasyon kinetiği

Tablo 2: VKÇ hücrelerinin voltaj bağımlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri

	Yıldız tipi hücre		Çalı tipi hücre		Ahtapot tipi hücre	
	$V_{0,5} \pm S. hata$	$k faktör \pm S. hata$	$V_{0,5} \pm S. hata$	$k faktör \pm S. hata$	$V_{0,5} \pm S. hata$	$k faktör \pm S. hata$
Aktivasyon Kinetikleri	-50.48 $\pm$ 1,45 (n=4)	7,53 $\pm$ 0,95	-49,5 $\pm$ 1,23 (n=3)	7,51 $\pm$ 1,33	-50.72 $\pm$ 0,32 (n=3)	6,04 $\pm$ 0,23
İnaktivasyon kinetikleri	-71,7 $\pm$ 1,34 (n=4)	9,21 $\pm$ 0,71	-78.80 $\pm$ 0,43 (n=3)	10,8 $\pm$ 0,26	-74,34 $\pm$ 0,46 (n=3)	7,89 $\pm$ 0,32

Tablo 3: VKÇ hücrelerinin voltaj bağımlı deaktivasyon kinetikleri

	Yıldız tipi hücre		Çalı tipi hücre		Ahtapot tipi hücre	
	$\tau_{hızlı} (ms) \pm S.hata$	$\tau_{yavaş} (ms) \pm S.hata$	$\tau_{hızlı} (ms) \pm S.hata$	$\tau_{yavaş} (ms) \pm S.hata$	$\tau_{hızlı} (ms) \pm S.hata$	$\tau_{yavaş} (ms) \pm S.hata$
-120 mV	19 $\pm$ 2,61	140 $\pm$ 11,4	26 $\pm$ 3,12	128 $\pm$ 10,64	17 $\pm$ 3,69	-
-105 mV	41 $\pm$ 3,42	216 $\pm$ 14,7	64 $\pm$ 5,16	212 $\pm$ 14,42	27 $\pm$ 4,42	-
-90 mV	63 $\pm$ 5,75	-	91 $\pm$ 7,42	-	43 $\pm$ 6,67	-
-75 mV	104 $\pm$ 8,69	-	158 $\pm$ 11,75	-	189 $\pm$ 12,42	-
-60 mV	189 $\pm$ 12,62	-	216 $\pm$ 14,36	-	217 $\pm$ 16,6	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada, postnatal 14-17 günlük fare ventral kohlear çekirdek nöronlarında, ERG kanal akımlarının farmakolojik ve biyofiziksel özellikleri ile olası fonksiyonları araştırılmıştır. Bu çalışma, kohlear çekirdek dokusunda ERG kanallarının varlığı ve burada karakterize edilen nöronlarda uyarılabilirlik eşik değeri ve aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Daha önce yapılan araştırmalarda ERG kanalları kapsamlı olarak kalpte çalışılmıştır. Kalp ventriküler hücrelerinde, kanalı kodlayan gende oluşan mutasyonlar sonucu, kanalın fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan kalbin ileti sistemi bozuklukları tanımlanmıştır (4, 124, 136).

ERG kanalları, kardiyak aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazı süresinin ve kardiyak ventriküler ritmin belirlenmesinde fonksiyonel olarak önemli rol oynarlar (1). Kardiyak aksiyon potansiyelinin plato fazı süresince aktive olan iki farklı outward (dışarıya çıkan) potasyum akımı bulunmaktadır. Bunlardan birisi hızlı aktive olan I_{KR} akımı, diğeri ise yavaş aktive olan I_{KS} akımıdır. I_{KR} , aksiyon potansiyelinin plato fazı süresince küçük outward (dışarıya çıkan) bir akım olup, plato oluşumuna katkıda bulunur. Bu I_{KR} akımı, aslında tipik olarak “inward rectifier” (içeriye giren) tabiatındadır ve ERG kanalları tarafından modüle edildiği bildirilmiştir (122). Repolarizasyon fazının dinlenme potansiyeline yaklaşan kısımlarında ERG kanalları karakteristik kinetik özelliklerinden dolayı, “outward” (dışarıya çıkan) nitelikte bir akımın oluşmasına yol açarak aksiyon potansiyeline katkıda bulunurlar. Yani ERG akımları, klasik kardiyak inward rektifier kanallarının aktivasyonu ile birlikte, aksiyon potansiyelini hızlı bir şekilde repolarize ederler. Bauer ve Schwarz (1999), kedi ventriküler miyosit hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda üçüncü sınıf antiaritmik bir ilaç olan selektif ERG kanal blokörü WAY-123,398’in repolarizasyon fazını etkilemesi suretiyle aksiyon potansiyelinin süresini yaklaşık olarak 80-100 ms uzattığını göstermişlerdir. Bu kayıtlarda repolarizasyon süresi haricinde aksiyon potansiyelinin hiçbir komponenti ERG kanal blokörlerinden etkilenmemiştir.

Bu çalışmalarda spesifik ERG kanal antagonistlerinin kardiyak ventriküler hücrelerde diğer hiçbir parametreyi değiştirmeksizin aksiyon potansiyelinin süresini uzatması, bu kanalların kardiyak aksiyon potansiyeli süresini belirleyen akımlar arasında yer aldığını göstermektedir.

ERG kanalları sınırlı düzeyde nöron ve nöroblastoma hücrelerinde de çalışılmıştır. Kanal ilk olarak 1994'te hipokampus bölgesinde çalışıldıktan sonra erişkin ve neonatal serebellar purkinje hücrelerinde, medyal vestibular çekirdek nöronlarında, trapezoid cismin medyal çekirdeğinde ve serotonerjik nöronlarda yapılan çalışmalar mevcuttur (3, 6, 14, 122, 150-154)

Hücrelerin intrinsik özellikleri

Nöronların intrinsik zar özellikleri, sinaptik inputlara yanıt olarak oluşan sinaptik potansiyellerin ve aksiyon potansiyeli ateşleme deseninin oluşumundan önemli derecede sorumludur. Bu çalışmada istirahat zar potansiyeli, input direnci, zar kapasitansı, zaman sabiti, AP yarı yükseklik genişliği ve ateşleme deseni gibi kohlear çekirdek nöronlarının pasif ve aktif zar özellikleri değerlendirilmiştir.

Herbir parametre için çalışmadan elde edilen ortalama veriler literatürde kohlear çekirdek nöronlarıyla ilgili olarak yapılan aşağıdaki çalışmalarla tutarlılıklar göstermektedir. Kısaca özetlemek gerekirse;

İstirahat zar potansiyeli, yıldız tipi nöronların verileri Fujino ve Oertel (2001), çalı tipi hücrelerinin verileri McGinley ve Oertel (2006) ve ahtapot tipi nöronların verileri ve Oertel (2000)'in çalışmalarındaki ortalama değerler ile uyumlu bulunmuştur.

Input direnci değerleri, yıldız tipi nöronların ortalama değerleri, Fujino ve Oertel (2001), çalı tipi nöronlar Cao ve arkadaşları (2007) ve ahtapot tipi nöronlar Bal ve Oertel (2000)'in bulduğu değerlerle uyumludur.

Zaman sabiti değerleri, Çalı tipi nöronlar Cao ve arkadaşları (2007) ve ahtapot tipi nöronlar Bal ve Oertel (2000)'in bulduğu değerlerle benzerlik göstermektedir.

Kapasitans değerleri, yıldız tipi ve çalı tipi nöronlar için Oertel ve Wu (1983), ahtapot tipi nöronlar için Ferragamo ve Oertel (2001)'in değerleri ile tutarlı bulunmuştur.

Aksiyon potansiyeli genlikleri, yıldız tipi nöronlar için Oertel (1983), ahtapot ve çalı tipi hücreler için Bal ve Oertel (2000) paralellik göstermektedir.

Aksiyon potansiyeli yarı yükseklik genişliği, yıldız tipi nöronlar için Bal ve Baydaş'ın (2009) sonuçlarıyla tutarlı bulunmuştur.

Bu verilerin literatürle uyumlu olması, elektrofizyolojik kayıtların stabilitesini göstermesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Eğer yama pipeti yapışması (seal-mühür)

zayıf olmuş olsaydı veya nöron hasarlı olsaydı, elde edilen istirahat potansiyelinin daha pozitif değerlerde olması, input direncinin daha düşük olması, zaman sabitinin kısalması beklenirdi.

Akım kenetleme çalışmaları

ERG kanal blokörlerinin hücrelerin input direnci üzerine etkileri

ERG kanal blokörü olarak hem terfenadinin hem de E4031'in her üç hücre tipinde de kontrol durumlarına göre input direncini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 35, 36, 41). Bu durum bir takım iyon kanalların bu spesifik blokörler tarafından kapanması anlamına gelmektedir. Bir nöronun input direnci zar üzerinde açık olarak bulunan iyon kanallarının miktarı ile ilişkilidir. Düşük input direncine sahip olan nöronlar yüksek kondüktansa sahiptir ve bu durum zar üzerinde bulunan çok sayıda iyon kanalının açık olduğu anlamına gelmektedir. Yüksek input direncine sahip nöronlar ise düşük bir kondüktansa sahiptir ve bu durum zar üzerinde bulunan çoğu iyon kanalının kapalı olduğunu gösterir. Gerek terfenadin gerekse E-4031'in selektif olarak güçlü bir şekilde ERG kanallarını spesifik olarak blokladığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (12). Bu blokörler varlığında kontrol durumlarına göre input dirençlerinin yükselmesi, ERG kanallarının kohlear çekirdek nöronlarında var olduğu anlamına gelmektedir. Nöronların input direncinin artması nedeniyle, $\tau = C \times R_{input}$ denkleminde göre zaman sabiti de artmıştır. Kapasitans, hücrelerin yüzey alanı ile ilişkili olduğundan ve ERG kanal blokörlerinin bu parametreyi değiştiremeyeceğinden dolayı input direncinin artması zaman sabiti değerlerini de arttırmıştır. Bu durum nöronlarda sinaptik potansiyellerin ve aksiyon potansiyellerin yavaş gelişmesi anlamına gelecektir (89).

ERG kanal blokörlerinin istirahat zar potansiyeli üzerine etkisi

Yapılan bu çalışmada ventral kohlear çekirdekte bulunan her üç hücre tipinde de ERG kanallarının hem terfenadin hem de E-4031 ile spesifik olarak bloke olması neticesinde istirahat zar potansiyelinde hafif şekilde depolarizasyon meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu depolarizasyon miktarı; yıldız tipi nöronlarda yaklaşık 0,30 mV, çalı tipi nöronlarda 0,80 mV ve ahtapot tipi nöronlarda ise 0,20 mV'a kadardır. Fakat bu depolarize edici etkiler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır. Pessia ve ark. (2008) medyal vestibular çekirdek nöronlarında, Hardman ve Forsythe (2009) trapezoid cismin medyal çekirdek nöronlarında, Sacco ve ark. (2003) ile Niculescu ve ark. (2013) serebellar purkinje nöronlarında yaptıkları çalışmalarda; çalışmanın yapıldığı hücrelerde ERG

kanallarının spesifik blokörlerle inhibe edilmesi ile hücrelerin yaklaşık olarak ortalama 0,30-2,50 mV değer aralığında depolarize olduklarını fakat bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığını rapor etmişlerdir. Bu yönüyle çalışmamız ilgili çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Bauer ve Schwarz'ın da (2004) rapor ettiği üzere, hem bizim ve hem de beynin diğer bölgelerinde yapılmış olan söz konusu yukarıdaki çalışmalarda ERG kanallarının bloklanması neticesinde istirahat zar potansiyelinin depolarize olduğu görülmüştür. Bu durum ERG kanallarının istirahat zar potansiyeline sınırlı düzeyde de olsa katkı sağladığı yönünde (bu katkı ERG akımlarının hücreyi hiperpolarize edici tabiatta olduğu) bir izlenim bırakmıştır.

ERG kanal blokörlerinin aksiyon potansiyeli frekansı üzerine etkisi

Yıldız tipi nöronlarda hem E-4031 hem de terfenadin ile ERG kanallarının inhibe edilmesi neticesinde aksiyon potansiyeli frekansında artış gözlenmiştir. Yıldız tipi nöronlar, “tonik” (sustain) ateşleme desenine sahip olan, düzenli aralıklarla aksiyon potansiyeli oluşturabilen hücrelerdir. Diğer taraftan, çalı tipi ve ahtapot tipi nöronlar ise onset ateşleme desenine sahip olan hücreler olup, tek bir aksiyon potansiyeli oluştururlar (Agar ve ark. 1996). Dolayısıyla onset ateşleme desenine sahip bu nöron tiplerinde, ERG kanal antagonistlerinin uygulanması ile oluşan aksiyon potansiyel sayısı beklenildiği gibi değişmedi. Fakat bu antagonistlerin varlığında hücrelerin ateşleme yapabilmek için aşmaları gereken eşik değere daha düşük akımlar ile ulaştığı gözlenmiştir. Yıldız tipi nöronlarda ateşleme eşik değerinin düşmesinin, aksiyon potansiyeli frekansının artmasının muhtemel sebeplerinden birisi olduğu düşünülmektedir. ERG kanal blokörü varlığında eşik değerin düşmesi hücrenin uyarılabilirliğini kolaylaştırarak aksiyon potansiyeli frekansının artmasına neden olacaktır. Benzer bir mekanizmayla yıldız tipi nöronlarda ERG kanal blokörlerinin etkisiyle spontan aktivitenin artması, bu kanalların hücre uyarılabilirliği üzerine olan etkisinin bir göstergesi olabilir.

Pessia ve ark. (2008), medyal vestibular çekirdek nöronları üzerinde ERG kanalları ile ilgili yaptıkları çalışmada bu kanalların nöronal hücrelerde özellikle ateşleme frekansı üzerine etkili olduklarını, hücre aktivitesine bağlı olarak aksiyon potansiyelinin şeklini değiştirmeksizin ateşleme frekansınının deşarj düzeni üzerine ve kontrolüne katkı sağladıklarını göstermişlerdir. Aksiyon potansiyeli süresince ERG kanallarının yavaş aktivasyon, hızlı inaktivasyon kinetiklerinden dolayı ERG kanal akımlarının aksiyon

potansiyeli üzerine etkisinin minimal düzeyde olduğu düşünülmektedir. Ancak yavaş deaktivasyon kinetiklerinin bir sonucu olarak aksiyon potansiyelinin frekansı üzerine etkisi olduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir (3, 6, 13, 14, 150-153, 155).

Yine Hardman ve Forsythe (2009), trapezoid cisim mediyal çekirdeğindeki nöronlarda ERG kanalları üzerine yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri verilerde, ERG kanal blokörlerinin aksiyon potansiyeli frekansını net bir biçimde arttırdığını göstermişlerdir. Söz konusu araştırmacılar aksiyon potansiyel frekansını sınırlandıran ERG kanallarının ağırlıklı olarak ERG-3 alttipinden oluştuğunu dolayısıyla da total ERG akımlarına bu nöronlarda en çok ERG3 alttipinin katkısı olduğunu rapor etmişlerdir (12).

ERG kanal blokörlerinin aksiyon potansiyeli şekli üzerine etkisi

ERG kanal blokörleri, aksiyon potansiyeli şeklinde bir değişikliğe yol açmamıştır. Fakat gerek hücreye akım verildiği andan aksiyon potansiyeli oluşuncaya kadar geçen depolarizasyon öncesi dönemde, gerekse de aksiyon potansiyelinin “after hiperpolarizasyon” komponenti döneminde daha depolarize potansiyellere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum ilk aksiyon potansiyeli ile sonrakiler kıyaslandığında, sonraki aksiyon potansiyellerinin daha çabuk eşik değere ulaştığı anlamına gelmektedir. İlk aksiyon potansiyelinin oluşması için geçen latens süresinin etkilenmemesiyle birlikte aksiyon potansiyeli frekansının artması bu hipotez desteklemektedir.

Kohlear çekirdeğin yıldız hücre tipinde aksiyon potansiyellerin repolarizasyonunun normalde istirahat zar potansiyeli seviyesinden daha negatif değerlere indiği görülmektedir. Burada bahsedilen istirahat zar potansiyeli seviyesinden daha negatif değerlere indiği kısım, afterhiperpolarizasyon (AHP) olarak tanımlanır. Her iki ERG kanal antagonistleri uygulandığında, aksiyon potansiyellerinin AHP komponentlerinin azaldığı görülmektedir. AHP'nin ERG kanal blokörleri tarafından küçülmesi, ERG kanallarının AHP oluşumuna katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanabilir.

Her üç hücre tipinde de ERG kanal blokörlerinin ilk aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazını etkilemediği belirlendi. ERG kanallarının bloklanması neticesinde aksiyon potansiyelinin yarı yükseklik genişliğinin kontrol durumlarına göre uzadığı tespit edilmiştir. Ancak bu uzama istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p>0,05$). AP yarı yükseklik genişlik değerinin ölçüldüğü seviyede değişiklik olmamasına karşın, bu seviyeden daha negatif değerlerde, yani istirahat zar potansiyeline daha yakın seviyelerde

aksiyon potansiyelinin şeklinin değiştiği ve repolarizasyon fazının kısmi olarak uzadığı tespit edilmiştir. Bu durum ERG kanal akımlarının, repolarizasyon fazının son dönemlerine katkıda bulunduklarını göstermektedir. Bu etki ERG kanallarının yavaş kinetiğe sahip olmalarının bir sonucudur. Repolarizasyon fazı ilerledikçe, açılan kanal yoğunluğunun artması neticesinde etki repolarizasyonun son dönemlerinde görülmektedir. Bu durum 2003 yılında Sacco ve ark., 2013 yılında Niculescu ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi ERG kanallarının AP repolarizasyon fazına katkıda bulunabilmesi için öncesinde aksiyon potansiyelinin pik değeri ile depolarize olması gerekliliğinden kaynaklanmaktadır. Hatta bundan sonra da maksimal ERG akımı için repolarizasyon fazında outward kuyruk akımının oluşması gereklidir. Yani ERG kanallarının açılması için öncesinde bir depolarizasyon dalgasına gereksinim duyması ve maksimal etkisinin depolarizasyonla indüklenmesi gerekliliğinden ötürü aksiyon potansiyelinin düşme fazından itibaren etki edeceği düşünülmektedir. Bu nedenle aksiyon potansiyelinin yarılanma zamanının uzaması beklenen bir durumdur. Bahsi geçen çalışmalar, serebellar purkinje hücrelerinde yapılmıştır. Tonik tarzda aksiyon potansiyeli oluşturan bu nöronlarda ERG akımlarının, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazına katkısının mekanizmasını açıklarken, araştırmacılar ERG akımlarının repolarizasyon dalgasına etkisinin olabilmesi için ERG kanallarının yeterli sayıda ve tekrarlayıcı tarzda ateşleme deşarjı yapması gerektiğini ve bu şekilde kanaldan geçen akımların artması gerekliliğini ifade etmişlerdir (14). Böylece tekrarlayıcı şekilde kanalların açılmasıyla birlikte kanaldan geçen akımlar aksiyon potansiyelleri oluşumuyla artarak birikecek ve ateşleme frekansı üzerine etkilerini yavaş deaktivasyon kinetiklerinin bir sonucu olarak gecikmiş bir şekilde göstereceklerdir.

Sacco ve ark. (2003) serebellar neonatal immatür purkinje hücrelerinde yaptıkları çalışmada; ERG kanallarının bloklanması, ilk aksiyon potansiyeli süresi üzerine bir etkisinin olmadığını fakat daha sonraki aksiyon potansiyellerinin süresinin arttığını (5,1 ms'den 6,3 ms'e) rapor etmişlerdir. Fakat olgun serebellar purkinje hücrelerinde bu denli bir artışın gözlenmediği not düşülmüştür. Bunun muhtemel sebebi, neonatal purkinje hücrelerinde, olgun purkinje hücrelerine göre aksiyon potansiyeli ortalama süresini yaklaşık olarak 4 kat daha uzun olmasıdır (immatür purkinje hücrelerinde ortalama aksiyon potansiyeli süresi 2,5 ms, olgun purkinje hücrelerinde 0,7 ms). Hemen hemen kohlear çekirdek nöronlarında da ortalama aksiyon potansiyeli süresinin olgun serebellar purkinje hücresindeki aksiyon potansiyeli süresine yakın değerlerde olduğu görülmüştür.

Bundan dolayı ERG kanallarının aksiyon potansiyeli yarılanma zamanı üzerindeki etkisi, aksiyon potansiyeli süresinin kısa olmasından dolayı dikkat çekici düzeyde değildir. Çünkü yukarıda da bahsedildiği üzere ERG kanallarının depolarizasyon dalgası ile indüklenerek açılması ve kanalların tedrici olarak artan oranda aktivasyonu ile birlikte de biriken akımlar neticesinde maksimal etkisinin göstermesi gibi bir özelliği vardır. ERG kanallarının kalpte ventriküler miyosit hücrelerinde aksiyon potansiyeli üzerine de aynı etkiyi gösterdiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (4, 123, 136, 154, 156). ERG kanallarının etkisinin en iyi kalp ventriküler hücrelerinde göstermesinin temel nedeninin bu özelliği olduğu düşünülmektedir. Çünkü kardiyak ventriküler hücrelerde aksiyon potansiyeli süresi yaklaşık olarak 250-300 ms'dir. Kanallar tam olarak aktivasyonunu sağlaması için gerekli zamanı gördüğünden etkileri en iyi bu hücrelerde açıklanmış hatta çok ciddi ileti sistemi bozuklukları, kalp kası kasılma gücü yeteneğinde bozukluklar gibi fonksiyon bozukluğu tespitleri en iyi yine bu hücrelerde açıklanmıştır.

Voltaj kenetleme çalışmaları

ERG akımlarının izolasyonu

Kohlear çekirdek nöronlarında ERG kanallarının voltaj bağımlı biyofiziksel özelliklerinin karakterize edilmesi için ERG akımlarının izolasyonu gerekmektedir. Bu izolasyon iki şekilde yapılabilir. İlk olarak hücrenin sahip olduğu diğer tüm iyon kanal akımları tamamen bloklandığında geriye sadece ERG kanal akımlarının kalması beklenir. Fakat diğer iyon kanallarının tamamen bloklanabilmesi için kullanılacak olan antagonistlerin konsantrasyonları, kısmen ERG kanallarını da blokladığı için geriye ölçülebilir düzeyde ERG akımı kaydedilememiştir. Bu nedenle, bu izolasyon yönteminin uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. İkinci yöntem olarak ise, ERG akımlarının toplam hücre akımları içinden seçici bir şekilde bloklanarak izole edilmesidir. Çalışmamızda iki yaklaşımın kombinasyonu kullanılmıştır. Şöyle ki, diğer iyon kanallarını büyük oranda bloke etmek için bu iyon kanallarının blokörleri düşük dozlarda kullanılmıştır. Bu amaçla I_{KDR} akımı 1 mM TEA ile, I_A akımı 1 mM 4-AP ile, I_h akımı ise 2 mM Cs^{+2} ile bloklanmıştır. Bu çalışmada yBOS solüsyonunda K^{+} iyon konsantrasyonu 40 mM'a yükseltince potasyum için elektrokimyasal konsantrasyon gradyanı azalacağından ($[K^{+}]_o=4,2$ mM yerine $[K^{+}]_o=40$ mM kullanılmış; $[K^{+}]_i=110$ mM) outward yönlü olan I_{KDR} ve I_A akımların genliği daha da azalmıştır. Ayrıca ekstrasellüler yBOS solüsyonundan kalsiyum iyonu tamamen çıkarılarak Ca ile aktive olan potasyum akımları

da ($I_{K(Ca)}$) inhibe edilmiştir. Daha sonra ikinci yaklaşım ile E-4031 eklenerek ERG akımı spesifik olarak bloklanmış ve bloklanan akım izole ERG akımı olarak kullanılmıştır.

Yapılan voltaj kenetleme çalışmalarında inward rektifiyer olarak bilinen ERG kanallarından geçen akım, ekstrasellüler K^+ iyonu konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu sebeple ERG kanal akımlarını arttırmak ve voltaj bağımlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerini daha iyi analiz edebilmek için yBOS'ta K^+ iyon konsantrasyonu 40 mM seviyesine yükseltilmiştir. Bu şekilde ERG kuyruk akımlarının genliğinin büyüdüğü rapor edilmiştir (132). Çünkü yBOS içerisindeki K^+ konsantrasyonu ($[K^+]_o$) 4,2 mM iken potasyum iyonu için Nerst denklemine göre denge potansiyeli -83,4 mV olarak, K^+ iyon konsantrasyonu 40 mM seviyesine yükseltildiğinde ise -25,4 mV olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla istirahat zar potansiyeline yakın voltajlarda ERG kanallarından hücre içine giren ERG akımı için konsantrasyon gradyanı artacağından ERG kuyruk akım genliği de artmış olacaktır (12-14).

Literatürde ERG kanallarının “inward” tabiatı olduğu ifade edilmekle birlikte, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon komponentine katkısının, “outward” K^+ kanallarının katkısına benzer şekilde olduğu birçok çalışma tarafından rapor edilmiştir (3, 5, 118, 122). Esasında burada bir anlam kargaşası oluşmaktadır. Pek çok çalışmada kanalın inward yönlü çalışan bir kanal olduğu ifade edilmesine karşın, biyofiziksel özelliklerini açıklamak için çalışma içerisinde verilen pekçok şekilde ve trasede (bu çalışmanın genel bilgiler kısmında olduğu gibi) kanalın akım yönü outward olarak verilmektedir. Sınırlı sayıda çalışılmasının sebebi belki de inward tabiatında olduğu bilinen bu kanalın çalışma sonuçlarında aksi veriler elde edilmesidir. Neticede kanal hem potasyum kanal ailesi üyelerine hem de bilinen pek çok diğer iyon kanallarına göre farklı mekanizmalarla çalışmaktadır. Deneylerimiz sonucunda ERG kanallarının bilinen tüm iyon kanallarından farklı olarak iki yönlü çalıştığını düşünmekteyiz. Şöyle ki; Potasyum için Nerst denklemine göre denge potansiyelinden daha negatif voltajlarda ERG kanalları “inward” şeklinde çalışırken, daha pozitif potansiyellerde ise “outward” şeklinde çalışmaktadır. Normal ekstrasellüler solüsyon için K^+ konsantrasyonu ($[K^+]_o$) 4 mM olduğundan, potasyum iyonu için Nerst denklemine göre denge potansiyeli yaklaşık olarak -83 mV olarak hesaplanmıştır. Yukarıda anlatıldığı gibi ($[K^+]_o$) konsantrasyonu 40 mM' a yükseltildiğinde K^+ iyonu için Nerst denge potansiyeli daha pozitif değerlere kaymıştır (yaklaşık olarak -25 mV düzeylerine). Bu şartlarda outward bir akım için elektrokimyasal

gradyantın da etkisiyle kuyruk akımının genliği artmıştır. Kuyruk akımının genliğinin ekstrasellüler K^+ konsantrasyonunun artması neticesinde büyümesi literatürde ERG kanalları ile ilgili yapılan pek çok çalışma tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca akım kenetleme çalışmalarında da görüldüğü üzere, kanalın bloklanması neticesinde zar potansiyelinin depolarize olması, aksiyon potansiyeli frekansının artması gibi etkiler bu kanalın fizyolojik şartlarda “outward” tabiatında işlev yaptığını göstermektedir.

ERG kanallarının aktivasyon kinetikleri

Voltaj kenetleme çalışmaları neticesinde kohlear çekirdekte bulunan üç hücre tipinde de ERG kanallarının aktivasyon eşik değerinin istirahat zar potansiyeline yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Kararlı-durum aktivasyon eğrileri incelendiğinde, ERG kanallarının kuyruk akımının; yıldız tipi nöronların istirahat zar potansiyelinde (-65,2mV) %27’si, çalı tipi nöronların istirahat zar potansiyelinde (-60,7 mV) %24’ü ve ahtapot tipi nöronların istirahat zar potansiyelinde (-61,1 mV) %32’si aktive olmuş durumda olduğu görülmüştür. Yani her üç hücre tipinde de ERG kanallarının istirahat zar potansiyeline göre daha pozitif değerlerde daha yüksek oranlarda aktive oldukları tespit edilmiştir. Fakat bu aktivasyon, depolarizasyonu müteakiben gerçekleşecektir. Bu depolarizasyon, *in vivo* şartlarda fizyolojik olarak EPSP durumunda olabileceği gibi spontan olarak gelişebilen aksiyon potansiyelleri sırasında da gerçekleşebilir.

Kararlı durum aktivasyon eğrisine göre yıldız tipi nöronlarda $V_{0,5}$ değeri -50,5 ve k faktör 7,5 olarak, çalı tipi nöronlarda $V_{0,5}$ -49,5 ve k faktör 7,5 olarak, ahtapot tipi nöronlarda ise $V_{0,5}$ -50,7 ve k faktör 6,0 olarak belirlenmiştir. Bu durum kanalların yaklaşık olarak -50 mV civarlarında %50 oranında aktivasyonlarını tamamladıkları anlamına gelmektedir. Niculescu ve ark. (2013) serebellar purkinje hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda ERG kanallarının aktivasyon değerinin $V_{0,5}$ = -44,1 mV seviyelerinde ölçtüklerini rapor etmişlerdir. Hardman ve Forsythe (2009) TCMÇ nöronlarında yapmış oldukları çalışmalarda, postnatal 12 ve 25 günlük farelerde voltaj bağımlı aktivasyon kinetiği analizlerinde $V_{0,5}$ değerlerini sırasıyla -58 ve -56 mV seviyelerinde olduğunu rapor etmişlerdir. Yaşa bağımlı olarak $V_{0,5}$ değerlerinde benzerlik söz konusu olsa da asıl çarpıcı farkın eğrinin eğim değerlerinde görüldüğü not düşülmüştür. 12 günlük farelerde eğrinin k faktörü 3,28 iken 25 günlük farelerde bu değer 8,61’ e yükselmiştir. Sacco ve ark. (2003) yılında yaptıkları çalışmada purkinje hücrelerinde $V_{0,5}$ değerini -50,7 mV seviyelerinde bulduklarını rapor etmişlerdir. Kohlear çekirdek nöronlarında ERG

kanallarının aktivasyon değerlerinin serebellar purkinje hücrelerinde ve TCMÇ nöronlarındaki hücrelerde aktivasyon değerlerine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Kohlear çekirdekte elde edilen verilerin, Sacco ve ark. (2003) ile Niculescu ve ark. (2013) yaptığı çalışmalarda olduğu gibi Ca içermeyen yBOS kullanılarak elde edildiğinin vurgulanması gerekmektedir. Buna karşın, Hardman ve Forsythe (2009)'ın yaptığı çalışmada ise 0,5 mM kalsiyum klorür kullanılmıştır. Hardman ve Forsythe (2009)'ın yaptığı çalışmada rapor edilen k faktör yani aktivasyon eğrisinin eğimi, bu çalışmada ve yukarıda bahsedilen diğer çalışmalarda elde edilen değerlerden çok daha düşük olduğu görülmüştür. Bu da yBOS sıvısı içerisinde bulunan kalsiyuma bağlı olabilir.

ERG kanallarının inaktivasyon kinetikleri

Kararlı-durum inaktivasyon eğrileri incelendiğinde, ERG kanallarının kuyruk akımının; yıldız tipi nöronların istirahat zar potansiyelinde (-65,2 mV) %40'ı, çalı tipi nöronların istirahat zar potansiyelinde (-60,7 mV) %32'si ve ahtapot tipi nöronların istirahat zar potansiyelinde (-61,1 mV) %34'ü inaktivasyondan kurtulmuş (recovery) durumda olduğu anlaşılmaktadır. Hücrelerin voltaj bağımlı kararlı durum inaktivasyon eğrisi incelendiğinde yıldız tipi nöronlarda $V_{0,5}$ -71,7 ve k faktör 9,21 olarak, çalı tipi nöronlarda $V_{0,5}$ -78,80 ve k faktör 10,8 olarak, ahtapot tipi nöronlarda ise $V_{0,5}$ -78,34 ve k faktör 7,89 olarak belirlenmiştir.

Sacco ve ark. (2003) purkinje hücrelerinde yaptıkları çalışmada $V_{0,5}$ değerini -70 mV olarak, heterolog ekspresyon çalışmalarında ise Shoen ve ark. (2003) daha depolarize değerlerde (-36 mV), Shi ve ark. (1997) ile Smith ve ark. (1996) ise daha negatif değerlerde (sırasıyla -102 mV ve -90 mV) bulmuşlardır. Hardman ve Forsythe (2009) TCMÇ nöronlarında yapmış oldukları çalışmalarda postnatal 12 ve 25 günlük farelerde voltaj bağımlı inaktivasyon kinetiği analizlerinde $V_{0,5}$ değerlerini sırasıyla; -76,17 ve -70,77 olarak bulduklarını rapor etmişlerdir. Yapılan tüm çalışmalarda inaktivasyon eğrilerinin eğimi $k = 10-20$ mV arasında değişen değerlerde bulunmuştur. Örneğin Hardman ve Forsythe (2009) TCMÇ nöronlarında 17 mV olarak bulmuştur. Bu değer bizim çalışmamızda daha düşük (9-10 mV) bulunmuştur. Bunun muhtemel nedeninin bizim çalışmalarımızda yBOS'un kalsiyum içermemesinden kaynaklanabilir.

ERG kanallarının deaktivasyon kinetikleri

Her üç hücre grubunda da deaktivasyon kinetikleri, kuyruk akımlarından elde edilmiştir.

Deaktivasyon kinetikleri yıldız tipi nöronlar için -120 mV'da; 19 ms, -60 mV'da; 189 ms olarak, çalı tipi nöronlar için -120 mV'da; 26 ms, -60 mV'da; 216 ms olarak, ahtapot tipi nöronlar için -120 mV'da; 17 ms, -60 mV'da; 217 ms olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu verilere göre hücrelerde zar potansiyeli negatif değerlere doğru gidildikçe deaktivasyon kinetiğinin de hızlandığı tespit edilmiştir. Bu durumda kuyruk akımı fonksiyonel olarak hücre zar potansiyelinin negatifliği nispetinde hızlı bir şekilde sıfırlanacaktır. Dolayısıyla aksiyon potansiyel repolarizasyon fazına katkısı da daha sınırlı olacaktır. Hücre kuyruk akımlarının zaman sabitleri -60 ile -100 mV arasındaki potansiyellerde en uyumlu olarak tek (single) eksponensiyel fonksiyonu ile fit edilirken, -100 ile -120 mV arasındaki potansiyellerde çift eksponensiyel ile fit edilmiştir. Ohya ve ark. (2002) çalışmasıyla kıyaslandığında çalışmamızda elde edilen deaktivasyon zaman sabitlerinin daha hızlı (küçük) olduğu görülecektir. Bu da ERG kanallarının ağırlıklı olarak ERG-3 alt tipinden kurulu olduğuna işaret etmektedir, çünkü ERG-3 alt tipinin deaktivasyon kinetiğinin ERG kanal alttıpleri arasında en hızlı (küçük) olduğu bildirilmiştir (157).

Genel değerlendirme

Akım kenetleme çalışmaları neticesinde ERG kanalları, istirahat zar potansiyellerinde kısmi olarak açık bir durumda bulunur. Zar potansiyeli depolarize olmaya başladığında, bu depolarizasyon dalgasına yanıt olarak kanalın aktivasyon kapısı yavaşça açılır. Buna karşın o kadar hızlı inaktive olur ki aksiyon potansiyelinin pik yaptığı değerlerde çok az bir outward akım meydana gelir. Ancak hücre repolarize olurken, özellikle AP'nin repolarizasyon ve AHP komponenti sırasında, kanal çok hızlı bir şekilde inaktivasyondan kurtulur (recovery). İnaktivasyondan kurtulma hızı, deaktivasyon hızına oranla çok büyük olduğu için zar potansiyelinin repolarize olduğu değerlerde kanaldan çok büyük miktarlarda akım geçer. Yani kanal, K^+ iyonu için denge potansiyelinden daha hiperpolarize zar potansiyellerinde inward bir akım oluştursa da, aslında daha depolarize değerlerde "outward rectifier" bir kanal gibi rol oynar. Ancak klasik inward rektifier kanalların aksine ERG kanallarının açılması için mutlaka depolarizasyonla indüklenmeleri gerekir.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada kohlear çekirdek nöronlarında ERG kanallarının elektrofizyolojik olarak karakterizasyonu yapılmıştır. Her üç hücre grubunda ERG kanallarının spesifik blokörleri kullanılarak istirahat zar potansiyeli, input direnci, ateşleme deseni, aksiyon potansiyeli

şekli, aksiyon potansiyeli yarı yüksekliği genişliği, latens süresi, ateşleme frekansı ve eşik değeri ile spontan aktivite üzerine olası etkileri akım kenetleme metodu kullanılarak incelenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda kontrol gruplarına göre ERG kanal blokörlerinin kullanıldığı test gruplarında bazı parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir. Kohlear çekirdek hücrelerinden elde edilen bu verilerin daha önce beynin başka bölgelerinde ERG kanalı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerliği dikkat çekmektedir. Elde edilen bu veriler neticesinde ERG kanallarının kohlear çekirdek nöronlarında;

- 1- Spesifik blokörlerle bloklanması ile her üç hücre grubunda input direncinin artması neticesinde bu hücrelerde ERG kanallarının varlığına,
- 2- ERG akımlarının bloklanması sonucunda hücrede hafif şekilde depolarizasyon meydana gelmesinden dolayı ERG kanallarının fizyolojik şartlar altında, hücreyi hiperpolarize edici bir etki ile istirahat zar potansiyeline katkıda bulunduğu ve istirahat zar potansiyelinin dengede kalmasına yardımcı olduğuna,
- 3- Yıldız tipi nöronlarda ERG kanalları bloklanınca aksiyon potansiyeli frekansı artmasından dolayı fizyolojik şartlar altında ateşleme frekansını sınırlandırdığına,
- 4- Çalı ve ahtapot tipi nöronlarda kontrol durumlarına göre ERG kanalları bloklanınca hücrenin ateşleme yapabilmesi için gerekli akım miktarını düşürdüğü ve buradan hareketle hücre uyarılabilirliğini zorlaştırdığı ve bu yüzden eşik değerin belirlenmesine katkıda bulunduğu, (ERG kanallarının bloklanmasının yıldız tipi nöronlarda da uyarılabilirlik eşik değerini düşürdüğünü unutmamak gerekir, fakat yıldız tipi nöronların küçük zar potansiyeli değişimlerine oldukça hassas olması ve aniden çok hızlı bir şekilde ateşleme yapması nedeniyle grafi verilmemiştir.)
- 5- Spontan olarak aktif olan yıldız tipi nöronlarda ERG kanallarının bloklanmasının spontan aktiviteyi arttırdığı, dolayısıyla ERG kanallarının normalde hücreyi susturduğu,
- 6- Aksiyon potansiyelinin şeklini değiştirmede fakat süresini etkileyerek özellikle repolarizasyon fazının şekillenmesine katkı sağladığı ve aksiyon potansiyeli süresinin belirlenmesine etki ettiği sonuçlarına varılmıştır. Ayrıca;
- 7- Voltaj kenetleme çalışmalarında ERG kanal akımları izole edilerek kohlear çekirdek nöronlarında ilk defa gösterilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde; ERG kanallarının nöronların istirahat dinlenim potansiyellerinde aktif olduğu ve bu şekilde istirahat membran potansiyelinin oluşmasına katkı sağladığı sonucuna

varılmıştır. Ayrıca kanalların literatürde yer alan diğer çalışmalarda da olduğu gibi depolarizasyonla indüklenerek aktiflendiği görülmüştür.

- 8- Kohlear çekirdek hücrelerinde ERG kanallarının deaktivasyon kinetiklerinin istirahat zar potansiyelinin hiperpolarizasyonu nispetinde hızlandığı görülmüştür.
- 9- Yama kenetleme çalışmaları neticesinde ERG kanallarının istirahat zar potansiyellerinde açık olduğu, hücrenin depolarize olmasıyla birlikte aktivasyonun büyüdüğü ve sonuçta kanaldan outward bir akımın geçtiği gösterilmiştir. Buna ilaveten tam tersi durumda istirahat zar potansiyelinden daha negatif değerlere gidildikçe inward bir akım tabiatına sahip olduğu kanısına varılmış ve ilk defa speküle edilmiştir.

Daha önce gerek kalpte gerekse diğer uyarılabilir hücrelerde yapılan çalışmalarda ERG kanallarının fizyolojik rollerinin tanımlanmış olmasına rağmen bu akımların yoğunluğunun kohlear çekirdek nöronlarında oldukça düşük olduğu ve istirahat zar potansiyeli seviyelerinde minimal etki gösterdiği düşünülmektedir. Tüm bu veriler ışığında her ne kadar ERG kanallarının kohlear çekirdek nöronlarında elektrofizyolojik olarak tespit edildiğini söylemek mümkün olsa da; kanalın hem protein hem de gen düzeyinde varlığını göstermek üzere immunohistokimyasal çalışmalardan ve PCR çalışmalarından yararlanılması gerekmektedir. Ayrıca kanalın her bir hücre tipindeki uzaysal lokalizasyonları (somatik mi? aksonik mi? yoksa dentritik mi?), ERG alttipi kanallarının (ERG1, ERG2 ve ERG3) ifade edilme dereceleri ve total ERG akımlarına ne oranda katkıda bulunduklarının açığa çıkarılması için ileri görüntüleme teknikleriyle (konfokal görüntüleme) desteklenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1393-478.
2. Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):3438-42.
3. Schwarz JR, Bauer CK. Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *J Cell Mol Med.* 2004;8(1):22-30.
4. Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell.* 1995;81(2):299-307.
5. Bauer CK, Schafer R, Schiemann D, Reid G, Hanganu I, Schwarz JR. A functional role of the erg-like inward-rectifying K⁺ current in prolactin secretion from rat lactotrophs. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1999;148(1-2):37-45.
6. Chiesa N, Rosati B, Arcangeli A, Olivotto M, Wanke E. A novel role for the HERG K⁺ channels: Spike-frequency adaptation (vol 501, pg 313, 1997). *Journal of Physiology-London.* 1997;502(3):715-.
7. Rodrigues ARA, Oertel D. Hyperpolarization- activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology.* 2006;95(1):76-87.
8. Bal R, Oertel D. Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology.* 2001;86(5):2299-311.
9. Bal R, Baydas G. Electrophysiological properties of octopus neurons of the cat cochlear nucleus: an in vitro study. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2009;10(2):281-93.
10. Bal R, Oertel D. Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol.* 2001;86(5):2299-311.
11. Oertel D, Wright S, Cao XJ, Ferragamo M, Bal R. The multiple functions of T stellate/multipolar/chopper cells in the ventral cochlear nucleus. *Hear Res.* 2011;276(1-2):61-9.
12. Hardman RM, Forsythe ID. Ether-a-go-go-related gene K⁺ channels contribute to threshold excitability of mouse auditory brainstem neurons. *J Physiol.* 2009;587(Pt 11):2487-97.

13. Niculescu D, Hirdes W, Hornig S, Pongs O, Schwarz JR. Erg potassium currents of neonatal mouse Purkinje cells exhibit fast gating kinetics and are inhibited by mGluR1 activation. *J Neurosci*. 2013;33(42):16729-40.
14. Sacco T, Bruno A, Wanke E, Tempia F. Functional roles of an ERG current isolated in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol*. 2003;90(3):1817-28.
15. ID. F. Auditory Processing encyclopedia of life sciences. 2002.
16. Malmierca MS. The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. *Int Rev Neurobiol*. 2003;56:147-211.
17. A. J. Hudspeth. The Inner Ear. Eric R. Kandel JHS, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum. *Kandel Principles of Neural Science Fifth Edition*. 2013 by The McGraw-Hill Companies. 2013:654-82.
18. <Berne & Levy Physiology, Sixth Updated Edition- Bruce M Koeppen.pdf>.
19. Slepecky NB. Structure of the mammalian cochlea. *Springer Handbook of Auditory Research*. 1996;8:44-129.
20. Spoendlin H. Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol*. 1972;73(2):235-48.
21. Liberman MC. Central Projections of Auditory-Nerve Fibers of Differing Spontaneous Rate .1. Anteroventral Cochlear Nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. 1991;313(2):240-58.
22. Warr WB. Organization of Olivocochlear Efferent System in Mammals. Chapter: The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy. 1992;1:410-38.
23. Osen KK. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol*. 1969;136(4):453-84.
24. Young EDO, D. Cochlear nucleus In: Shepherd, G.M., (Ed.), *The synaptic organization of the brain*. 2004:125-63.
25. Oertel D, Bal R, Gardner SM, Smith PH, Joris PX. Detection of synchrony in the activity of auditory nerve fibers by octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(22):11773-9.
26. Osen KK, Roth K. Histochemical localization of cholinesterases in the cochlear nuclei of the cat, with notes on the origin of acetylcholinesterase-positive afferents and the superior olive. *Brain Res*. 1969;16(1):165-85.
27. Doucet JR, Ryugo DK. Projections from the ventral cochlear nucleus to the dorsal cochlear nucleus in rats. *Journal of Comparative Neurology*. 1997;385(2):245-64.

28. Wouterlood FG, Mugnaini E. Cartwheel Neurons of the Dorsal Cochlear Nucleus - a Golgi-Electron Microscopic Study in Rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1984;227(1):136-57.
29. Oertel D. The role of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Annual Review of Physiology*. 1999;61:497-519.
30. Bal R, Oertel D. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology*. 2000;84(2):806-17.
31. Golding NL, Robertson D, Oertel D. Recordings from Slices Indicate That Octopus Cells of the Cochlear Nucleus Detect Coincident Firing of Auditory-Nerve Fibers with Temporal Precision. *Journal of Neuroscience*. 1995;15(4):3138-53.
32. Ferragamo MJ, Oertel D. Octopus cells of the mammalian ventral cochlear nucleus sense the rate of depolarization. *Journal of Neurophysiology*. 2002;87(5):2262-70.
33. Cao XJ, Shatadal S, Oertel D. Voltage-sensitive conductances of bushy cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology*. 2007;97(6):3961-75.
34. Wright S, Hwang Y, Oertel D. Synaptic transmission between end bulbs of Held and bushy cells in the cochlear nucleus of mice with a mutation in Otoferlin. *Journal of Neurophysiology*. 2014;112(12):3173-88.
35. Ostapoff EM, Morest DK. Synaptic Organization of Globular Bushy Cells in the Ventral Cochlear Nucleus of the Cat - a Quantitative Study. *Journal of Comparative Neurology*. 1991;314(3):598-613.
36. Smith PH, Joris PX, Yin TCT. Projections of Physiologically Characterized Spherical Bushy Cell Axons from the Cochlear Nucleus of the Cat - Evidence for Delay-Lines to the Medial Superior Olive. *Journal of Comparative Neurology*. 1993;331(2):245-60.
37. Ryugo DK, Sento S. Synaptic connections of the auditory nerve in cats: relationship between endbulbs of held and spherical bushy cells. *J Comp Neurol*. 1991;305(1):35-48.
38. Adams JC. Projections from octopus cells of the posteroventral cochlear nucleus to the ventral nucleus of the lateral lemniscus in cat and human. *Auditory Neuroscience*. 1997;3(4):335-50.

39. Cao XJ, McGinley MJ, Oertel D. Connections and synaptic function in the posteroventral cochlear nucleus of deaf jerker mice. *Journal of Comparative Neurology*. 2008;510(3):297-308.
40. PICKLES JO. Auditory System; Handbook of Clinical Neurology, Vol. 129 (3rd series); Editors; G.G. Celesia and G. Hickok; The Human Auditory System. 2015.
41. Fujino K, Oertel D. Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):265-70.
42. Zhang S, Oertel D. Cartwheel and Superficial Stellate Cells of the Dorsal Cochlear Nucleus of Mice - Intracellular-Recordings in Slices. *Journal of Neurophysiology*. 1993;69(5):1384-97.
43. Oertel D, Wu SH. Morphology and Physiology of Cells in Slice Preparations of the Dorsal Cochlear Nucleus of Mice. *Journal of Comparative Neurology*. 1989;283(2):228-47.
44. Mugnaini E, Warr WB, Osen KK. Distribution and Light Microscopic Features of Granule Cells in the Cochlear Nuclei of Cat, Rat, and Mouse. *Journal of Comparative Neurology*. 1980;191(4):581-606.
45. Brawer JR, Morest DK, Kane EC. The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol*. 1974;155(3):251-300.
46. Golding NL, Oertel D. Physiological identification of the targets of cartwheel cells in the dorsal cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology*. 1997;78(1):248-60.
47. Kolston J, Osen KK, Hackney CM, Ottersen OP, Stormmathisen J. An Atlas of Glycine-Like and Gaba-Like Immunoreactivity and Colocalization in the Cochlear Nuclear-Complex of the Guinea-Pig. *Anatomy and Embryology*. 1992;186(5):443-65.
48. Rees A, Palmer AR. Oxford Handbook of Auditory Science: The Auditory Brain. 2012.
49. Schofield BR, Cant NB. Organization of the Superior Olivary Complex in the Guinea-Pig .1. Cytoarchitecture, Cytochrome-Oxidase Histochemistry, and Dendritic Morphology. *Journal of Comparative Neurology*. 1991;314(4):645-70.
50. Schofield BR, Cant NB. Organization of the Superior Olivary Complex in the Guinea-Pig .2. Patterns of Projection from the Periolivary Nuclei to the Inferior Colliculus. *Journal of Comparative Neurology*. 1992;317(4):438-55.

51. Osen KK, Mugnaini E, Dahl AL, Christiansen AH. Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cochlear and superior olivary nuclei. A reappraisal with emphasis on the cochlear granule cell system. *Arch Ital Biol.* 1984;122(3):169-212.
52. Cant NB, Casseday JH. Projections from the Anteroventral Cochlear Nucleus to the Lateral and Medial Superior Olivary Nuclei. *Journal of Comparative Neurology.* 1986;247(4):457-76.
53. Cant NB, Hyson RL. Projections from the Lateral Nucleus of the Trapezoid Body to the Medial Superior Olivary Nucleus in the Gerbil. *Hearing Research.* 1992;58(1):26-34.
54. Smith PH. Structural and functional differences distinguish principal from nonprincipal cells in the guinea pig MSO slice. *J Neurophysiol.* 1995;73(4):1653-67.
55. Thompson AM, Schofield BR. Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech.* 2000;51(4):330-54.
56. Malmierca MS, Storm-Mathisen J, Cant NB, Irvine DRF. From cochlea to cortex: A tribute to Kirsten Kjelsberg Osen. *Neuroscience.* 2008;154(1):1-9.
57. Oertel D, Wu SH, Garb MW, Dizack C. Morphology and Physiology of Cells in Slice Preparations of the Posteroventral Cochlear Nucleus of Mice. *Journal of Comparative Neurology.* 1990;295(1):136-54.
58. Cant NB. The Fine-Structure of two Types of Stellate Cells in the Anterior Division of the Anteroventral Cochlear Nucleus of the Cat. *Neuroscience.* 1981;6(12):2643-55.
59. Wu SH, Oertel D. Intracellular Injection with Horseradish-Peroxidase of Physiologically Characterized Stellate and Bushy Cells in Slices of Mouse Anteroventral Cochlear Nucleus. *Journal of Neuroscience.* 1984;4(6):1577-88.
60. Ferragamo MJ, Golding NL, Oertel D. Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. *Journal of Neurophysiology.* 1998;79(1):51-63.
61. Willott JF, Bross LS. Morphology of the Octopus Cell Area of the Cochlear Nucleus in Young and Aging C57bl/6j and Cba/J Mice. *Journal of Comparative Neurology.* 1990;300(1):61-81.
62. Smith PH, Rhode WS. Structural and functional properties distinguish two types of multipolar cells in the ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol.* 1989;282(4):595-616.

63. Liberman MC. Central Projections of Auditory-Nerve Fibers of Differing Spontaneous Rate .2. Posteroventral and Dorsal Cochlear Nuclei. *Journal of Comparative Neurology*. 1993;327(1):17-36.
64. Barnes-Davies M, Forsythe ID. Pre- and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. *J Physiol*. 1995;488 (Pt 2):387-406.
65. Fay RR. The Auditory Psychobiology of the Mouse - Willot,Jf. *Contemporary Psychology*. 1984;29(2):161-.
66. von Gersdorff H, Borst JGG. Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(1):53-64.
67. Hackney CM, Osen KK, Kolston J. Anatomy of the Cochlear Nuclear-Complex of Guinea-Pig. *Anatomy and Embryology*. 1990;182(2):123-49.
68. Schofield BR. Projections from the Cochlear Nucleus to the Superior Paraolivary Nucleus in Guinea-Pigs. *Journal of Comparative Neurology*. 1995;360(1):135-49.
69. Schofield BR, Cant NB. Ventral nucleus of the lateral lemniscus in guinea pigs: Cytoarchitecture and inputs from the cochlear nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. 1997;379(3):363-85.
70. Rhode WS, Smith PH. Encoding Timing and Intensity in the Ventral Cochlear Nucleus of the Cat. *Journal of Neurophysiology*. 1986;56(2):261-86.
71. Rhode WS, Smith PH, Oertel D. Physiological-Response Properties of Cells Labeled Intracellularly with Horseradish-Peroxidase in Cat Dorsal Cochlear Nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. 1983;213(4):426-47.
72. Fujino K, Oertel D. Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(18):7372-83.
73. Ohlrogge M, Doucet JR, Ryugo DK. Projections of the pontine nuclei to the cochlear nucleus in rats. *J Comp Neurol*. 2001;436(3):290-303.
74. Weedman DL, Pongstaporn T, Ryugo DK. Ultrastructural study of the granule cell domain of the cochlear nucleus in rats: mossy fiber endings and their targets. *J Comp Neurol*. 1996;369(3):345-60.
75. Itoh K, Kamiya, H., Mitani, A., Yasui, Y., Takada, M., and Mizuno, N. Direct projection from the dorsal column nuclei and the spinal trigeminal nuclei to the cochlear nuclei in the cat. *Brain Res*. 400:145-150. . 1987.
76. Burian M, Gstoettner W. Projection of primary vestibular afferent fibres to the cochlear nucleus in the guinea pig. *Neurosci Lett*. 1988;84(1):13-7.

77. Cant NB, Hyson RL. Projections from the lateral nucleus of the trapezoid body to the medial superior olivary nucleus in the gerbil. *Hear Res.* 1992;58(1):26-34.
78. Wickesberg RE, Oertel D. Delayed, Frequency-Specific Inhibition in the Cochlear Nuclei of Mice - a Mechanism for Monaural Echo Suppression. *Journal of Neuroscience.* 1990;10(6):1762-8.
79. Tolbert LP, Morest DK. The neuronal architecture of the anteroventral cochlear nucleus of the cat in the region of the cochlear nerve root: electron microscopy. *Neuroscience.* 1982;7(12):3053-67.
80. Alibardi L. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of neurons in the rat ventral cochlear nucleus projecting to the inferior colliculus. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger.* 1998;180(5):415-26.
81. Hackney CM, Osen KK, Ottersen OP, StormMathisen J, Manjaly G. Immunocytochemical evidence that glutamate is a neurotransmitter in the cochlear nerve: A quantitative study in the guinea-pig anteroventral cochlear nucleus. *European Journal of Neuroscience.* 1996;8(1):79-91.
82. Wickesberg RE, Oertel D. Auditory-Nerve Neurotransmitter Acts on a Kainate Receptor - Evidence from Intracellular-Recordings in Brain-Slices from Mice. *Brain Research.* 1989;486(1):39-48.
83. Feng JJ, Kuwada S, Ostapoff EM, Batra R, Morest DK. A Physiological and Structural Study of Neuron Types in the Cochlear Nucleus .1. Intracellular Responses to Acoustic Stimulation and Current Injection. *Journal of Comparative Neurology.* 1994;346(1):1-18.
84. Agar E, Anson L, Green GGR, Sanders DJ. Ionic Currents in Bushy-Like Cells of the Mouse Anteroventral Cochlear Nucleus Invitro. *Journal of Physiology-London.* 1993;459:P159-P.
85. Agar E, Anson L, Green GGR, Sanders DJ. Ionic Currents in Stellate-Like Cells of the Mouse Anteroventral Cochlear Nucleus Invitro. *Journal of Physiology-London.* 1993;459:P158-P.
86. Agar E, Green GG, Sanders DJ. Membrane properties of mouse anteroventral cochlear nucleus neurons in vitro. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1996;7(3):179-98.
87. Ostapoff EM, Feng JJ, Morest DK. A Physiological and Structural Study of Neuron Types in the Cochlear Nucleus .2. Neuron Types and Their Structural Correlation with Response Properties. *Journal of Comparative Neurology.* 1994;346(1):19-42.

88. Roos MJ, May BJ. Classification of unit types in the anteroventral cochlear nucleus of laboratory mice. *Hearing Research*. 2012;289(1-2):13-26.
89. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2001.
90. Bezanilla F, Perozo E. The voltage sensor and the gate in ion channels. *Membrane Proteins*. 2003;63:211-41.
91. Yellen G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1998;31(3):239-95.
92. Yellen G. Premonitions of ion channel gating. *Nature Structural Biology*. 1998;5(6):421-.
93. Llinas RR. The Intrinsic Electrophysiological Properties of Mammalian Neurons - Insights into Central Nervous-System Function. *Science*. 1988;242(4886):1654-64.
94. Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annual Review of Physiology*. 2004;66:477-519.
95. Chandy KG, Douglas J, Gutman GA, Jan L, Joho R, Kaczmarek L, et al. Simplified Gene Nomenclature. *Nature*. 1991;352(6330):26-.
96. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 2000;25(3):533-5.
97. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;28(2):365-8.
98. Hartshorne RP, Catterall WA. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(7):4620-4.
99. Hartshorne RP, Keller BU, Talvenheimo JA, Catterall WA, Montal M. Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(1):240-4.
100. Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, Catterall WA. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *J Biol Chem*. 1982;257(23):13888-91.
101. Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*. 2012;590(11):2577-89.
102. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. 2011;475(7356):353-8.
103. Cantrell AR, Catterall WA. Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(6):397-407.

104. Wadel K, Neher E, Sakaba T. The coupling between synaptic vesicles and Ca²⁺ channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron*. 2007;53(4):563-75.
105. Catterall WA. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(8).
106. Randall A, Tsien RW. Pharmacological Dissection of Multiple Types of Ca²⁺ Channel Currents in Rat Cerebellar Granule Neurons. *Journal of Neuroscience*. 1995;15(4):2995-3012.
107. Starr TVB, Prystay W, Snutch TP. Primary Structure of a Calcium-Channel That Is Highly Expressed in the Rat Cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(13):5621-5.
108. Perez-Reyes E. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1998;30(4):313-8.
109. Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, et al. Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophysical Journal*. 2001;81(1):79-88.
110. Armstrong CM, Matteson DR. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science*. 1985;227(4682):65-7.
111. Zamponi GW, Snutch TP. Advances in voltage-gated calcium channel structure, function and physiology. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2013;1828(7):1521-.
112. Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*. 2009;89(3):847-85.
113. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*. 1979;280(5719):235-6.
114. Pape HC, Mager R. Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron*. 1992;9(3):441-8.
115. Wahl-Schott C, Baumann L, Zong X, Biel M. An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13694-700.
116. Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem*. 1999;274(18):12835-9.

117. Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(3):470-94.
118. Schwarz JR, Bauer CK. The ether-a-go-go-Related Gene K(+) Current: Functions of a Strange Inward Rectifier. *News Physiol Sci.* 1999;14:135-42.
119. Bauer CK, Engeland B, Wulfsen I, Ludwig J, Pongs O, Schwarz JR. RERG is a molecular correlate of the inward-rectifying K current in clonal rat pituitary cells. *Receptors & Channels.* 1998;6(1):19-29.
120. Shibasaki T. Conductance and Kinetics of Delayed Rectifier Potassium Channels in Nodal Cells of the Rabbit Heart. *Journal of Physiology-London.* 1987;387:227-50.
121. Akbarali HI, Thatte H, He XD, Giles WR, Goyal RK. Role of HERG-like K⁺ currents in opossum esophageal circular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 1999;277(6):C1284-C90.
122. Wimmers S, Bauer CK, Schwarz JR. Biophysical properties of heteromultimeric erg K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 2002;445(3):423-30.
123. Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science.* 1995;269(5220):92-5.
124. Piper DR, Hinz WA, Tallurri CK, Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. Regional specificity of human ether-a'-go-go-related gene channel activation and inactivation gating. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7206-17.
125. Vandenberg JJ, Torres AM, Campbell TJ, Kuchel PW. The HERG K⁺ channel: progress in understanding the molecular basis of its unusual gating kinetics. *Eur Biophys J.* 2004;33(2):89-97.
126. Akhavan A, Atanasiu R, Shrier A. Identification of a COOH-terminal segment involved in maturation and stability of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40105-12.
127. Aydar E, Palmer C. Functional characterization of the C-terminus of the human ether-a-go-go-related gene K(+) channel (HERG). *J Physiol.* 2001;534(Pt 1):1-14.
128. Gong Q, Anderson CL, January CT, Zhou Z. Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(1):H77-84.
129. Gong Q, Keeney DR, Robinson JC, Zhou Z. Defective assembly and trafficking of mutant HERG channels with C-terminal truncations in long QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(6):1225-33.

130. Gustina AS, Trudeau MC. A recombinant N-terminal domain fully restores deactivation gating in N-truncated and long QT syndrome mutant hERG potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):13082-7.
131. Liu SG, Rasmusson RL, Campbell DL, Wang SM, Strauss HC. Activation and inactivation kinetics of an E-4031-sensitive current from single ferret atrial myocytes. *Biophysical Journal*. 1996;70(6):2704-15.
132. Shibasaki T. Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart. *J Physiol*. 1987;387:227-50.
133. Zaza A, Micheletti M, Brioschi A, Rocchetti M. Ionic currents during sustained pacemaker activity in rabbit sino-atrial myocytes. *Journal of Physiology-London*. 1997;505(3):677-88.
134. Verheijck EE, Vanginneken ACG, Bourier J, Bouman LN. Effects of Delayed Rectifier Current Blockade by E-4031 on Impulse Generation in Single Sinoatrial Nodal Myocytes of the Rabbit. *Circulation Research*. 1995;76(4):607-15.
135. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A Molecular-Basis for Cardiac-Arrhythmia - Herg Mutations Cause Long Qt Syndrome. *Cell*. 1995;80(5):795-803.
136. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006;440(7083):463-9.
137. Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR. The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH(3)/B-6 cells). *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 1997;434(1):1-10.
138. Snyders DJ, Chaudhary A. High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol*. 1996;49(6):949-55.
139. Gurrola GB, Rosati B, Rocchetti M, Pimienta G, Zaza A, Arcangeli A, et al. A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *FASEB J*. 1999;13(8):953-62.
140. Mitcheson JS, Hancox JC. An investigation of the role played by the E-4031-sensitive (rapid delayed rectifier) potassium current in isolated rabbit atrioventricular nodal and ventricular myocytes. *Pflugers Arch*. 1999;438(6):843-50.
141. Molleman A. Patch Clamping An introductory guide to patch clamp electrophysiology. University of Hertfordshire, UK. 2003 John Wiley&Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. 2003.

142. Wu SH, Oertel D. Maturation of Synapses and Electrical-Properties of Cells in the Cochlear Nuclei. *Hearing Research*. 1987;30(1):99-110.
143. Forscher P, Oxford GS. Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J Gen Physiol*. 1985;85(5):743-63.
144. Golding NL, Ferragamo MJ, Oertel D. Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(8):2897-905.
145. Bal R, Oertel D. Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus (vol 86, pg 2299, 2001). *Journal of Neurophysiology*. 2004;92(2):1263-.
146. Bal R, Oertel D. Voltage-activated calcium currents in octopus cells of the mouse cochlear nucleus. *JARO-Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2007;8(4):509-21.
147. Bal R, Baydas G, Naziroglu M. Electrophysiological properties of ventral cochlear nucleus neurons of the dog. *Hear Res*. 2009;256(1-2):93-103.
148. Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR. An Inward-Rectifying K⁺ Current in Clonal Rat Pituitary-Cells and Its Modulation by Thyrotropin-Releasing-Hormone. *Journal of Physiology-London*. 1990;429:169-89.
149. Sturm P, Wimmers S, Schwarz JR, Bauer CK. Extracellular potassium effects are conserved within the rat erg K⁺ channel family. *J Physiol*. 2005;564(Pt 2):329-45.
150. Hirdes W, Schweizer M, Schuricht KS, Guddat SS, Wulfsen I, Bauer CK, et al. Fast erg K⁺ currents in rat embryonic serotonergic neurones. *J Physiol*. 2005;564(Pt 1):33-49.
151. Pessia M, Servettini I, Panichi R, Guasti L, Grassi S, Arcangeli A, et al. ERG voltage-gated K⁺ channels regulate excitability and discharge dynamics of the medial vestibular nucleus neurones. *J Physiol*. 2008;586(Pt 20):4877-90.
152. Schonherr R, Rosati B, Hehl S, Rao VG, Arcangeli A, Olivotto M, et al. Functional role of the slow activation property of ERG K⁺ channels. *Eur J Neurosci*. 1999;11(3):753-60.
153. Shepard PD, Trudeau MC. Emerging roles for ether-a-go-go-related gene potassium channels in the brain. *J Physiol*. 2008;586(20):4785-6.
154. Wang J, Della Penna K, Wang H, Karczewski J, Connolly TM, Koblan KS, et al. Functional and pharmacological properties of canine ERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(1):H256-67.

155. Perrin MJ, Subbiah RN, Vandenberg JJ, Hill AP. Human ether-a-go-go related gene (hERG) K⁺ channels: function and dysfunction. *Prog Biophys Mol Biol.* 2008;98(2-3):137-48.
156. Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature.* 1996;379(6568):833-6.
157. Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA. Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2002;283(3):C866-C77.



EK1

Etik kurul kararı;

		T.C. GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ UNIVERSITY OF GAZİANTEP		
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI LOCAL ETHICS COMMITTEE OF ANIMAL EXPERIMENTS				
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI RESEARCH APPLICATION CONSENT				

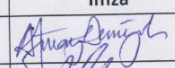
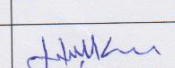
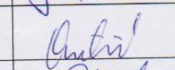
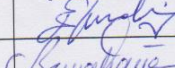
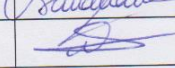
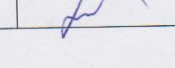
TOPLANTI TARİHİ (Meeting Date)	TOPLANTI SAYISI (Meeting No)	TOPLANTI YERİ (Meeting Place)
02.05.2016	3	Temel Tıp Bilimleri

BAŞVURU BİLGİLERİ Application Information	Araştırmanın Başlığı Research Title	Kohlear çekirdek nöronlarında ERG kanallarının elektrofizyolojik olarak incelenmesi
	Başvuru Tarihi Application Date	06.01.2016
	Protokol no Protocol no	3

KARAR BİLGİLERİ Decision	Karar No: 3	Decision No: 3
	☒ Kabul (Accepted)	☐ Red (Not Accepted)
Arş. Gör. Caner YILDIRIM'ın yürütücüsü olduğu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik olarak sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.		

Yürütücü Coordinator	Arş. Gör. Caner YILDIRIM Fizyoloji Anabilim Dalı
--------------------------------	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU YÖNERGESİ

Ünvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İlişki	Katılım	İmza
Prof. Dr. A. Tuncay Demiryürek (Başkan)	GAÜN Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Davut Sinan Kaplan (Başkan Yardımcısı)	GAÜN Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	H	E	
Prof. Dr. Behçet Al (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Acil Tıp AD.	H	E	
Doç. Dr. İbrahim Halil Kılıç (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat F. Biyoloji	H	E	
Doç. Dr. Mehmet Kahraman (Üye)	GAÜN Fen Edebiyat F. Kimya	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Ebru Deniz Karslı (Üye)	GAÜN Diş Hekimliği F. Çene Cerrahisi AD.	H	E	
Yrd. Doç. Dr. Berna Kaya Uğur (Üye)	GAÜN Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon AD	H	E	
Öğr. Gör. Ahmet Sarper Bozkurt (Üye)	GAÜN Teknik Bilimler MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim	H	E	
Veteriner Hekim Celal Özsöyler (Üye)	Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçesi	H	E	
Tekniker Ahmet Özkul (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır

ÖZGEÇMİŞ

Caner YILDIRIM 1989 yılında KİLİS'te doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Gaziantep'te tamamladıktan sonra 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesine yerleşti. 2012 yılında yüksek lisans derecesiyle bu fakülteden mezun olduktan sonra aynı yıl içinde Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Halen aynı kürsüde Araştırma Görevlisi olarak hizmet etmektedir.

