

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

LOKAL ANESTEZİKLERİN TONİK VE FAZİK ETKİLERİNİN SUKROZ-GAP TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

MASTER TEZİ

DANIŞMANI
Prof.Dr.İsmail GÜNAY

Arş.Gör.Tufan MERT

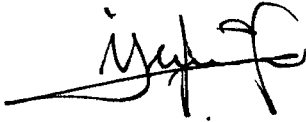
ADANA-1997

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ç.Ü.SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Tufan MERT'in MASTER tezi olarak hazırladığı "Lokal Anesteziklerin Tonik ve Fazik Etkilerinin Sukroz-Gap tekniği ile incelenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Gereğini arz ederiz.



Başkan: Prof.Dr.İsmail GÜNAY

25.7.1997

Üye : Prof.Dr.Ayşe DOĞAN



Üye : Prof.Dr.Atilla DİKMEN



Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 13.8.1997. gün ve 17.18.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr. Kadri ÖZCAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR ve DESTEKLEYEN KURULUŞ

Tez konumun seçilmesinde, yürütülmesinde ve tamamlanmasında desteğini esirgemeyen ve her türlü fedakarlığa katlanan Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı, saygıdeğer hocamız Prof.Dr.İsmail GÜNAY'a ve Yrd.Doç.Dr.Mustafa İTEĞİN'e, manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Sevgi MERT'e, bilgisayar programını hazırlayan Uzm.Aykut PELİT'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezin yazılıp bitirilmesini büyük bir sabırla tamamlayan Perihan YEŞİL'e teşekkür ederim.

SBE-95-16 nolu projeyi destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Araştırma Fonu'na ayrıca teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
RESİM LİSTESİ	vi
KISALTMALAR.....	vii
ÖZ	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sinir Dokusu	4
2.1.1. Sinir Hücresinin Morfolojisi	4
2.1.2. Bileşik Sinirlerin Özellikleri	6
2.1.3. Sinir Liflerinin Sınıflandırılması	7
2.1.4. Hücre Zar Yapısı	8
2.1.5. Sıvı Mozaik Zar Modeli	9
2.2. İyon Kanalları	10
2.2.1. İyon Kanallarının Seçici Geçirgenliği	10
2.2.2. İyon Kanallarının Kapıları	11
2.2.3. Sodyum Kanalları	12
2.2.4. Sodyum Kanallarının Fonksiyonel Durumları	13
2.2.5. Kapı Akımları	14
2.2.6. Potasyum Kanalları	15
2.3. Lokal Anestezikler	15
2.3.1. Yapı Etki İlişkisi	16
2.3.2 Etki Mekanizması	17
2.3.3. Lokal Anesteziklerin Sınıflandırılması	18
2.3.4. Ester Yapılı Lokal Anestezikler	18
2.3.5. Amid Yapılı Lokal Anestezikler	19

2.4. Zar Potansiyelleri	19
2.5. Aksiyon Potansiyelleri	20
2.6. Sukroz-Gap Tekniği	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.1. Deney Hayvanı	26
3.1.2. Siyatik Sinir Diseksiyonu	26
3.1.3. Ringer Çözeltisi	26
3.1.4. İzotonik KCl Çözeltisi	26
3.1.5. İzotonik Sukroz Çözeltisi	27
3.1.6. Test Çözeltileri	27
3.2. Blok Diyagramı	27
3.3. Ölçüm ve Kayıtlarda Kullanılan Cihazlar	28
3.4. Kayıt Elektrotları	29
3.5. Sukroz-Gap Aparatı	32
3.6. Sukroz-Gap Tekniği	33
3.6.1. Sukroz-Gap Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları	34
3.6.2. Kısa Devre Çarpanı	35
3.6.3. Kavşak Potansiyelleri	35
3.7. Sinirin Hazırlanması ve Yerleştirilmesi	36
3.8. Sinirin Uyarılma Modları	36
3.9. Uyarma Protokolü, Kayıt ve Gözlem	36
3.10. Bifazik ve Mozofazik Aksiyon Potansiyelleri	37
3.11. Bileşik Dinlenim Potansiyelleri	39
3.12. Osiloskoba ve Bilgisayara Kayıt	39
3.13. Analiz	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR	53

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo I. Memelilerde Sinir Liflerinin Özellikleri	7
Tablo II. Sinir, iplik ve gerçek DC potansiyelleri	42
Tablo III. Sukroz-gap aparatının D bölmesine izotonik potasyum çözeltisinin konmasıyla ölçülen BDP'ler	43
Tablo IV. Farklı KCl konsantrasyonlarının BDP'ye etkileri	45
Tablo V. Prokain ve lidokain konsantrasyonlarının BDP'ye etkileri	46
Tablo VI. BAP parametrelerine prokain ve lidokain konsantrasyonlarına etkisi	47
Tablo VII. 0, 10 ve 40 Hz frekanslarda BAP genliğinin 2.1 mM prokain ve lidokain konsantrasyonlarında değişimi	49

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Nöronun yapısı	5
Şekil 2. Sıvı-mozaiik zar modeli şeması	9
Şekil 3. Sodyum ve potasyum iyonlarının protein kanallarından taşınması	10
Şekil 4. Beyin sodyum kanallarının alt üniteleri	12
Şekil 5. Uyarılabilir hücre zarındaki heterotrimerik sodyum kanalı protein kompleksinin alfa alt-biriminin hipotetik yapısı	13
Şekil 6. Voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanallarının karakteristikleri	14
Şekil 7. Kanal kapılarının durum değıştirmelerinde muhtemel aşamalar...	14
Şekil 8. Mürekkep balığı dev aksonunda bir aksiyon potansiyeli ile sodyum ve potasyum denge potansiyelleri	22
Şekil 9. Sukroz-gap tekniğinin şematik blok diyagramı	27
Şekil 10. Klorla kaplama devresi	30
Şekil 11. Ag-AgCl kayıt elektrodu	32
Şekil 12. Sukroz-gap aparatı	32
Şekil 13. Hücrenin eşdeğer devresi	35
Şekil 14. Hücre dışından kayıtlanan aksiyon potansiyelleri	38
Şekil 15. Monofazik aksiyon potansiyeli ve aksiyon potansiyeli parametreleri	40
Şekil 16. Perfüzyonun DC potansiyel değışimlerine etkileri	43
Şekil 17. BDP (perfüzyonun yapılmadığı şartlarda)	44
Şekil 18. BDP (perfüzyonun yapıldığı şartlarda)	44
Şekil 19. Farklı KCl konsantrasyonlarının BDP'ne etkisi	45
Şekil 20. BDP'ne prokainin etkisi	46
Şekil 21. BDP'ne lidokainin etkisi	47
Şekil 22. BAP parametrelerine prokainin etkisi	48
Şekil 23. BAP parametrelerine lidokainin etkisi	48
Şekil 24. BDP ve BAP'nin konsantrasyonla değışimleri	49
Şekil 25. Frakensa bağılı olarak genliğin değışmesi	50

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. Sukroz-gap tekniğinin toplu görüntüsü	28
Resim 2. Sukroz-gap tekniğinin yakından görünümü	33



KISALTMALAR

BDP: Bileşik Dinlenim Potansiyeli
BAP: Bileşik Aksiyon Potansiyeli
DC: Direct Current
AP: Aksiyon Potansiyeli
AC: Alternatif Current
V: Genlik
L: Latans
T_{DE}: Depolarizasyon Zamanı
½ T_{RE}: Yarı-Repolarizasyon Zamanı
BİSİP: Bilgisayar Sinyal Analiz Programı
SSS: Santral Sinir Sistemi
g_K: Potasyum İletkenliği
g_{Na}: Sodyum İletkenliği
C_m: Zar Sıçası
S₁ ve S₂: Uyarı Elektrotları
R₁ ve R₂: Kayıt Elektrotları
R_e: Dış Direnç
R_i: İç Direnç
V_e: Potansiyel Farkı
V_s: Sinirde Ölçülen Potansiyel Farkı
V_i: İplikte Ölçülen Potansiyel Farkı
V_g: Gerçek Potansiyel Farkı
V_{BD}: B ile D Bölümleri Arasında Ölçülen Potansiyel Farkı
Ag-AgCl: Gümüş-Gümüş Klorür Elektrot

ÖZ

LOKAL ANESTEZİKLERİN TONİK VE FAZİK ETKİLERİNİN SUKROZ-GAP TEKNIĞİ İLE İNCELENMESİ

Lokal anesteziğin zar ve aksiyon potansiyeli üzerine etkileri intrasellüler ve ekstrasellüler olarak çeşitli tekniklerle belirlenebilmektedir. Bu çalışmada, sukroz-gap tekniğiyle lokal anesteziğinden prokain ve lidokainin, kurbağa siyatik sinir demetlerinin bileşik dinlenim potansiyeli (BDP) ve bileşik aksiyon potansiyeli (BAP) parametreleri (genlik (V), latans (T_L), depolarizasyon zamanı (T_{DE}), yarı-repolarizasyon zamanı ($\frac{1}{2} T_{RE}$)) üzerine olan etkileri araştırıldı.

BDP ve BAPları kayıtlamak için beş bölümlü ve her bölümü perfüze edilebilen bir sukroz-gap aparatı geliştirildi. Kayıtlanan DC ve AC potansiyelle perfüzyonun ve asimetrinin etkileri belirlendi. Ayrıca ekstrasellüler KCl'ün konsantrasyonlarına bağlı olarak zarda oluşan depolarizasyon da ölçüldü.

Çalışmada ağırlıkları 70-80 gram arasında değişen kurbağalardan (*Rana cameranoi*) çıkarılan 5-7 cm uzunluğundaki siyatik sinir demetleri kullanıldı. Sukroz-gap tekniğiyle bu sinirlerin BAP parametreleri ve BDP'leri kontrol, 1, 2.1, 4.2, 8.4 mM Prokain ve 1, 2.1, 4.2 mM lidokain konsantrasyonlarında, tek uyarımla uyarılarak ve tonik ve frekansa bağlı uyarılarla kayıtları yapıldı.

Sonuç olarak, tek puls uyarımlarında prokain ve lidokain konsantrasyonuna bağlı olarak BAP'nin genliğini düşürdüğü, latans, depolarizasyon zamanı ve yarı-repolarizasyon zamanını arttırdığı ve bileşik dinlenim potansiyelini çok az hiperpolarize ettiği belirlendi. 2.1 mM prokain ve lidokain konsantrasyonlarının frekansa bağlı uyarımlarda genliği daha fazla düşürdüğü belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Bileşik Dinlenim Potansiyeli, Bileşik Aksiyon Potansiyeli, Sukroz-Gap Tekniği, Prokain, Lidokain.

ABSTRACT

TONIC AND PHASIC EFFECTS OF LOCAL ANESTHETICS SEARCHED WITH SUCROSE-GAP TECHNIQUE

Effects of local anesthetics on membrane and action potentials can be determined by various intracellular and extracellular recording techniques. In this study, we explored the effects of procaine and lidocaine on compound resting potential (CRP) and compound action potential (CAP) parameters (such as amplitude (V), latent period (T_L), depolarisation time (T_{DE}), and half-repolarisation time ($\frac{1}{2}T_{RE}$)) in the frog sciatic nerve bundles.

We used 5-7 cm length of nerve bundles which were dissected from 70-80 g weight of frogs (*Rana cameranoi*). CRP and CAP parameters were recorded with sucrose-gap technique at 1, 2.1, 4.2 and 8.4 mM procaine and 1, 2.1 and 4.2 mM lidocaine concentrations. Nerve fibers were stimulated with single, tonic and frequency-dependent stimulations.

We found that procaine and lidocaine reduced the amplitude of BAP and extended latent period, depolarisation time and half-repolarisation time of BAP and hyperpolarised the CRP with these concentrations at single stimulation. BAP was more reduced at 2.1 mM of procaine and lidocaine concentrations when nerve fibers were stimulated with frequency-dependent stimulations.

Key Words: Compound Resting Potential, Compound Action Potential, Sucrose-Gap Technique, Procaine, Lidocaine.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlı organizmalarda uzak mesafeler arası iletişim aksiyon potansiyeli denen sinir sinyalleri aracılığı ile yapılmaktadır. Ani ve özel komutların değişik hücrelere kontrol altında gönderilmesi gerekmektedir. Bunu sağlayan sinir sistemidir. Sinirsel iletişim sistemimizin yapısal birimi sinir hücresi (nöron) dir. Her bir nöron başlı başına bir sinir sistemi gibi davranmaktadır^(16,17,23).

Günümüzde uzun yapılı uyarılabilir ve uyarıtıyı iletebilir dokulardaki biyolojik sinyallerin oluşum ve iletim mekanizması bilinmektedir. Sinir sinyalleri, zar potansiyellerindeki hızlı değişimlerden ibaret olan aksiyon potansiyelleri (AP) ile iletilmektedir. Her aksiyon potansiyeli, zar dinlenim potansiyelinin negatif değerinden ani olarak pozitif bir değere doğru yükselmesiyle başlar ve hemen hemen aynı hızda tekrar negatif potansiyele dönmesiyle oluşur. Aksiyon potansiyelleri hep veya hiç yasasına uymakta ve oluştuğu noktadan itibaren zayıflamadan, sabit genlikle yayılmaktadır. Aksiyon potansiyeli iletimi, sabit hızlı kendi kendini besleyen bir süreçtir^(17,18).

Lokal anestezipler, sinir lifleri ile uygun konsantrasyonlarda karşılaştıklarında bu liflerdeki impuls iletimini tersinir olarak bloke eden ilaçlardır. Sadece sinir liflerinde değil, genel olarak bütün uyarılabilir hücrelerde depolarize olma özelliğini ve depolarizasyon dalgasının yayılmasını engelleyebilirler. Lokal anestezipler zarda sodyum kanallarının açılmasını engelleyerek içe yönelik hızlı sodyum akımını konsantrasyona bağlı olarak azaltırlar^(24,31,33,34).

Lokal anestezipler sinir gövdeleri veya dalları üzerine uygulandıklarında bu yapılarda bulunan çeşitli çap ve özellikteki sinir liflerini aynı çabukluk ve derecede bloke etmezler.

Lokal anestezipler zarda Na^+ 'a karşı geçirgenliğin artmasını önlerler ve böylece sinir zarını stabilize ederler; bu ilaçların sinirdeki uyarılabilmeyi ve impuls iletimini engellemelerinin ana nedeni bu etkidir. Lokal anestezipler ikinci bir etki olarak K^+ 'a karşı geçirgenliğin artmasını da bloke edebilirler. Lokal anesteziplerin etkisi deneysel

olarak dış ortamda Na^+ konsantrasyonunu artırmakla azalır, dış ortamda Na^+ konsantrasyonunun düşmesi ise sinir lifini lokal anesteziğin etkisine duyarlı kılar. Lokal anesteziğin yüksek konsantrasyonlar hariç sinir lifi veya nöronun dinlenme potansiyelini etkilemezler^(3,15,24,31).

Na^+ kanalının ilaca karşı afinitesi aktivasyon ve onu izleyen inaktivasyon sırasında, dinlenme halindeki çok daha yüksek olduğu için, lokal anesteziğin etki veya sodyum kanalı blokajı, kullanıma ve impuls frekansına yakından bağlıdır ("use-dependence" veya "frequency-dependence"). Kullanıma bağımlılığının bir nedeni lokal anesteziğin moleküllerinin iç delikten kanal içine girdikten sonra bağlanma yerlerine erişebilmeleri için kapakçığın açık durumda olmasının gerekmesidir. Sinir stimülasyonu, bu olanağı stimülasyon frekansı ile doğru orantılı bir şekilde artırır^(3,5,6,8,10,30,31,33).

Sabit frekansta bir dizi stimulus uygulandığında ilk stimuluslar yukarıda belirtilen iki parametrede ufak bir azalma yaptığı halde, daha sonraki her bir stimulus giderek artan bir düşme yapar. Kullanıma bağımlı (veya diğer adıyla duruma-bağımlı) blok nedeniyle, sinir üzerine belirli bir konsantrasyonda uygulanan lokal anesteziğin, düşük frekanslı stimulusların iletimini bloke etmediği halde yüksek frekanslı olanların iletimini bloke edebilir.

Yüksek frekanslı stimülasyon, sodyum kanallarının yüksek afiniteli aktif ve inaktif durumda kalmasının toplam süresini artırır ve böylece ilaç moleküllerinin daha fazlasının etki yerine bağlı kalmasını sağlar^(3,6,8,31,33).

Aksiyon potansiyelleri hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki yöntemle gözlenmekte ve kayıtlanmaktadır. AP'nin gerçek büyüklük, biçim ve süresi doğru bir şekilde hücre içi kayıt yöntemi ile kayıtlanabilir. Hücre dışı kayıt yöntemleriyle ölçülen zar ve aksiyon potansiyeli, bunların gerçek değerlerinden kısa-devre çarpanı ($R_e/R_o + R_i$) kadar daha küçüktür^(2,20,22).

Sukroz-Gap Yöntemi, dinlenme zar ve aksiyon potansiyellerinin hücre dışından ölçülebilmesi için geliştirilen bir yöntemdir. Dinlenme ve aksiyon potansiyellerinin, tek miyelinli sinir lifi ve sinir veya kas demetleri gibi yalnız hücre dışından ölçülebildiği dokularda sukroz-gap yöntemi kullanılmaktadır. Hücre dışı kayıt yöntemleriyle ölçülen zar ve aksiyon potansiyelinin gerçek değerlerine en yakın değeri bu yöntemle

ölçülebilmektedir⁽³²⁾.

Tekli sukroz-gap yöntemi ilk olarak 1954 yılında Stampfli tarafından miyelinli sinirler için tasarlanmış ve daha sonra miyelinsiz (c) liflerine, düz kaslara, iskelet kaslarına, kalp kasına ve dev sinir liflerine uygulanmıştır ⁽³²⁾.

Bu çalışmamızın amacı ana bilim dalımızda geliştirilen tekli sukroz-gap tekniği kullanılarak, lokal anesteziklerden prokain ve lidokainin, siyatik sinir demetlerinin bileşik dinlenim potansiyeli (BDP) ve bileşik aksiyon potansiyelinin (BAP) parametreleri (genlik, latans, depolarizasyon zamanı, yarı-repolarizasyon zamanı) üzerine olan etkilerini, tek uyarımlarıda, tonik ve frekansa (10 ve 40 Hz) bağlı uyarımlarda belirlemektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Dokusu

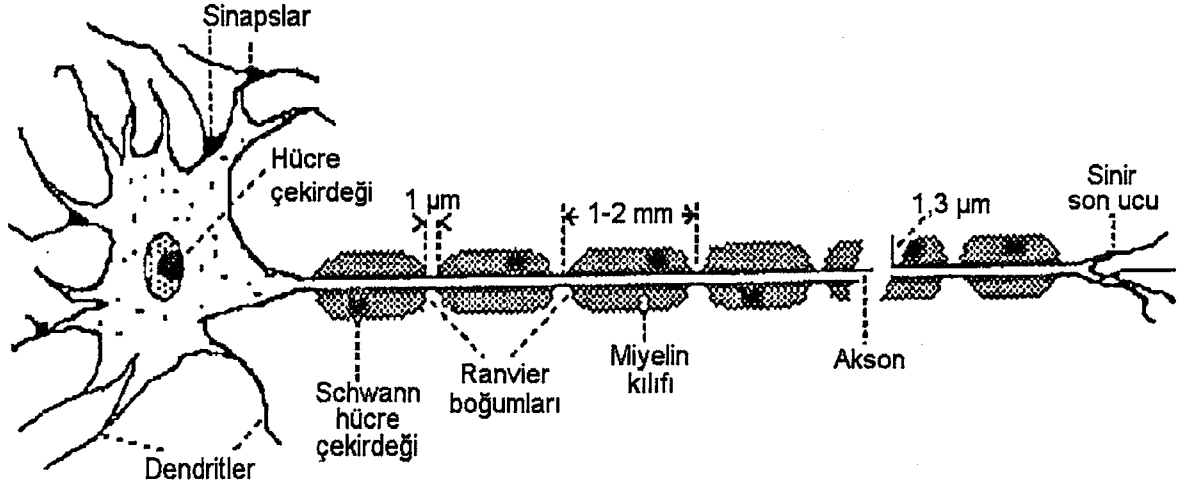
Bedenin tüm yaşamsal işlevleri, çok karmaşık bir sistem olan sinir sistemi ile yönetilir. Çok geniş ve son derece karmaşık bir telefon ağıyla karşılaştırılabileceğimiz bu sistem, bedenin çeşitli bölümlerinin durumuyla ve dış dünyadaki değişikliklerle ilgili bilgileri alır ve çevre sinirleri aracılığıyla merkezi sinir sistemine iletir. Orada, hızla çözülür, sonra bedenin çeşitli organlarına, yerine getirilmesi gereken uyarılar gönderilir. Böylece, dış koşullara uyabilme ve yaşamın uyumlu biçimde sürdürülmesi sağlanır.

Gelişmiş hayvanların sinir sistemi, kural olarak santral sinir sistemi (SSS) ve periferik sinir sistemi olarak ikiye ayrılır. Periferik sinir sistemi, merkezi yerleşim gösteren sinir hücrelerinin (nöron) uzantıları olan uzun bağlantı kablolarını (sinir lifleri ya da aksonları) içermektedir. İşlevi, SSS ve perifer arasında, sinyallerin hızlı ve hatasız bir şekilde getirilip götürülmesidir. Aferent sinyaller duyu organlarından SSS'ne, eferentler ise SSS'den kaslar ve bezler gibi efektör organlarına gider.

Kısaca özetlemek gerekirse: Sinyalin alınması hücre gövdesi ve dendritik dallanmalardaki özel temas bölgelerinde olur, giriş sinyalinin düzenlenmesi ise yine aynı bölgenin hücre zarında cereyan eder. Yanıt, yani eferent sinyalin oluşturulması ve iletilmesi aksonun görevidir^(16,23).

2.1.1. Sinir Hücresi Morfolojisi

Haberleşme sistemimizin yapısal elemanını tek bir sinir hücresi (nöron) oluşturur (Şekil 1). Memeli santral sinir sisteminde nöronlar çok farklı şekil ve büyüklükte olabilirler. Nöronların çoğu tipik spinal motor nöron ile aynı yapılara sahiptir. Bu hücrelerde dendrit adı verilen, hücre gövdesinden başlayıp dallanan 5-7 adet uzantı bulunur. Sinir hücresinin gövdesinde, kalınlaşmış bölümü olan akson hillock'dan başlayan uzun, fibröz bir akson'u vardır. Akson, herbiri birkaç sinaptik yumru'da sonlanan son dallara ayrılır. Bu dallara son (terminal) tomurcuk veya akson telodentritleri de denir, bu tomurcuklar sinir hücreleri tarafından yapılan



Şekil 1. Miyelinli aksonu ile bir motor nöronun yapısı.⁽²⁸⁾

nörotransmitterlerin depolandığı granül ve veziküller içerirler. Akson miyelin veya miyelinsizdir, diğer bir deyişle, SSS'nin dışındaki akson, schwann hücrelerinin hücre membranlarının bir çok tabakasından oluşmuş bir protein-lipid bileşiği olan miyelin kılıfı ile sarılıdır. Schwann hücreleri periferik sinirler boyunca bulunan glia benzeri hücrelerdir. Miyelin kılıf, aksonun sonu ile 1 μm 'lik ve 1 mm aralıkla düzenli daralmalar şeklinde olan Ranvier düğümleri dışından aksonu sarar. Bütün memeli nöronları miyelinli değildir; bazıları miyelinsiz'dir, yani schwann hücre zarının akson etrafını sarmasıyla oluşan miyelin olmadan nöronlar basitçe schwann hücreleriyle çevrilmiştir. Omurgasızlarda nöronların çoğu miyelinsizdir. Memeli santral sinir sisteminde nöronların çoğu miyelindir, fakat miyelini oluşturan schwann hücreleri yerine oligodendroglia hücreleri bulunmaktadır. Tek bir nöron üzerinde iki ranvier düğümü arasında miyelini oluşturan schwann hücrelerinin aksine, oligodendroglia hücreleri birden çok uzantı yollayarak çevredeki birçok aksonda da miyelin oluşturmalar.

İşlevsel bakış açısından nöronların genellikle 4 önemli bölgesi vardır. Bunlar: sinaptik bağlantılarla oluşturulan birçok lokal potansiyel değişikliğinin entegre bölgesi, ilerleyen aksiyon potansiyellerin kaynaklandığı bir nokta, ilerleyen uyarıları sinir ucuna taşıyan akson uzantısı ve aksiyon potansiyellerinin sinaptik transmitterin salınımını

sağladığı sinir uçlarıdır. Hücre gövdesi, sıklıkla aksonun dendrit bölgesi ucunda yer alır, fakat aksonun içinde veya aksonun yanına birleşik olabilir^(16,23,28).

2.1.2. Bileşik Sinirlerin Özellikleri

Memelilerde periferik sinirler epinörium denen fibröz bir zarla birarada sarılmış bir çok aksondan meydana gelir. Bu nedenle bu tür sinirlerden kaydedilen potansiyel değişiklikler birçok aksonun hep ya da hiç özelliğindeki aksiyon potansiyellerinin toplamını temsil etmektedir. Sinirdeki aksonların eşikleri ve uyarıcı elektrottan uzaklıkları değişmektedir. Eşik altı uyarılarla aksonların hiç biri uyarılamaz ve hiç bir yanıt oluşturamaz. Uyarılar eşik şiddette ise düşük eşikli aksonları ateşler ve küçük bir potansiyel değişiklik gözlenir. Uyarıcı aksonun şiddeti arttıkça daha yüksek eşikli aksonlarda uyarılır. Uyarının sinirdeki tüm aksonları uyarmaya yetecek kuvvette olmasına kadar elektiriksel yanıt orantılı olarak artar^(16,28).

Yapıları veya işlevlerine göre, sinir lifleri farklı şekillerde sınıflandırılabilir. En önemli morfolojik parametre olan miyelin kılıfının varlığına veya yokluğuna göre sinir lifleri miyelinli ve miyelinsiz olarak ikiye ayrılabilir. Bir diğer önemli yapısal parametre ise çaptır.

Sinir liflerine ait iletim hızı, eşik değeri, aksiyon potansiyelinin genliği, süresi vb. işlevsel parametrelerin yapısal parametrelere nasıl bağlı olduğu birçok deneysel ve teorik çalışmaya konu edilmiştir. Miyelinli liflerde iletim hızının (v) çapa (a) bağılılığı $v=6.10^6.a$ (m/s) şeklinde ifade edilebilmektedir. Bu bağıntıya göre, iletim hızı deneyle ölçülen bir lifin çapı hesaplanabilir veya histolojik olarak ölçülen çap bilgisinden iletim hızı belirlenebilir. Genel olarak, çap büyüdükçe iletim hızı artmakta, eşik değeri ise düşmektedir^(28,37).

Tek sinir liflerinde, dışardan iki elektrot dokundurularak gözlenen aksiyon potansiyeli genliğinin de akson çapı ile orantılı olduğu saptanmaktadır. Aksiyon potansiyelinin süresi ve tepeye yükselme zamanı ise akson çapı arttıkça azalmaktadır, ancak orantı basit değildir.

Memelilerin miyelinsiz aksonlarında, hem yokluğu hem de çaplarının küçük olması nedenleri ile iletim hızı düşüktür. Miyelinsiz aksonlarda iletim hızının çapa

bağılılığı konusunda teorilerle deney sonuçları arasında bir uyumsuzluk vardır. Teorilere göre, tıpkı miyelinlilerde olduğu gibi, çapla orantılı bulunmaktadır^(16,17,28).

2.1.3. Sinir Liflerinin Sınıflandırılması

Çeşitli sinirlere ait bileşik aksiyon potansiyellerinin sistematik olarak incelenmesi ile, aksonlar A, B, s.C ve d.r.C olmak üzere dört tipe ayrılmaktadır. Bu gruplara ait liflerin yapısal ve işlevsel hızı bazı özellikleri Tablo I de görülmektedir.

Siyatik sinir gibi tipik, karmaşık bir çevresel sinir, hem aferent hem de eferent s.C liflerini ve aferent d.r.C liflerini birlikte içerir. A ve C tipi liflerin iletim hızları genellikle çok farklı olduğundan tek taramalı bir ossiloskopta tüm bir bileşik aksiyon potansiyelini gözlemek zordur^(16,17,28,37).

Sinir lifleri başka ölçütlere göre de sınıflandırılmaktadır. Bir sınıflama biçimine göre A lifleri Grup I (12-22 μm), Grup II (6-12 μm), Grup III (1-6 μm) şeklinde üç gruba ayrılmakta, tüm C lifleri ise Grup IV olarak adlandırılmaktadır⁽²⁸⁾.

Tablo I. Memelilerde Sinir Liflerinin Özellikleri.⁽²⁸⁾

		Miyelinli		Miyelinsiz	
		A	B	s.C	d.r.C
Lif çapı, μm		1-22	≤ 3	0.3-1.3	0.4-1.2
İletim hızı, m/s		5-120	3-15	0.7-2.3	0.6-2.0
Sivri uç (spike) süresi, ms		0.4-0.5	1.2	2.0	2.0
Mutlak refrakter dönem, ms		0.4-1.0	1.2	2.0	2.0
Depolarize edici (negatif) ard potansiyel	genliği, sivri uç yüzdesi olarak	3-5	yok	3-5	yok
	süresi, ms	12-20	-	50-80	-
Hiperpolarize edici (pozitif) ard potansiyel	genliği, sivri uç yüzdesi olarak	0.2	1.5-4.0	1.5	?
	süresi, ms	40-60	100-300	300-1000	?

2.2. Hücre Zar Yapısı

Hücreler birim halinde faaliyette bulunmak ve varlıklarını devam ettirebilmek için çeşitli kısımlarını fiziksel olarak bir arada tutmak mecburiyetindedirler. Bu amaçla sitoplazmanın çevresinde hücre zarı meydana gelmiştir.

Hücre zarların işlevleri:

1. Plazma zarları kanallar vasıtası ile hücreiçi ve dışı arasındaki madde alış verişini gerçekleştirerek hücre içi molekül ve iyon kompozisyonunu düzenlerler.

2. Plazma zarları hücreler arası haberleşmede de rol oynarlar. Bunun için zar yüzeyinde dıştan gelen uyarılara özgül (spesifik) duyarlılığa sahip reseptörler vardır.

3. Bazı hücrelerin plazma zarları kimyasal ve elektriksel sinyaller üretebilirler. Nöroendokrin, sinir ve kas hücrelerinde yer alan bu olaylar biyolojik haberleşmenin temelini oluşturur.

4. Canlılardaki enerji dönüşümlerinden en önemli ikisi yapılarında yüksek düzeyde örgütlü enzim sistemlerinin ve diğer proteinlerin yer aldığı uzmanlaşmış zarlarda gerçekleşir.

Görevleri bu kadar çeşitli olan biyolojik zarlar yapıları itibarı ile de çeşitlidirler. Bununla birlikte tüm zarlar aşağıdaki ortak yapısal özelliklere sahiptir.

1. Biyolojik zarlar yaprak biçiminde yassı yapılardır.

2. Lipidler ve proteinler olmak üzere başlıca iki çeşit makromolekül içerirler. Çoğu zarın yapısındaki protein/lipid oranı 1/4 ile 4/1 arasında değişir.

3. Zar lipidleri biri hidrofobik diğeri hidrofilik olmak üzere iki ayrı uç grubu taşıyan nisbeten küçük moleküllerdir. Zar lipidleri sulu ortamlarda spontan olarak çift tabakalı yapılar oluşturma özelliğine sahiptirler. Böyle bir lipid çift tabakasının polar moleküllere geçirgenliği yoktur.

4. Zarlar yukarıda sayılan işlevlerini içerdikleri çeşitli proteinler aracılığı ile gerçekleştirirler. Zar proteinleri pompa, kanal, reseptör, enzim, enerji transdüseri ve yapı elemanı olarak rol oynarlar.

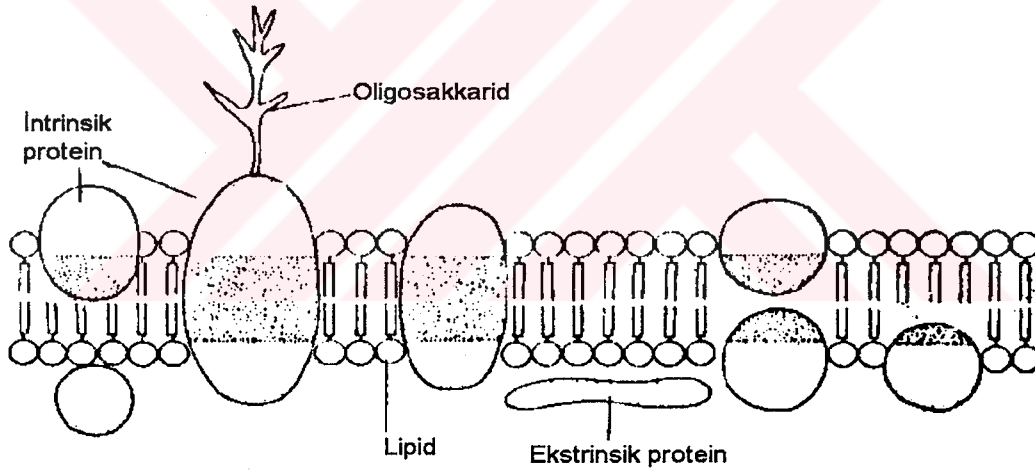
5. Tüm biyolojik zarlar kendilerini oluşturan makromoleküllerin non-kovalent

etkileşimleri ile ortaya çıkmış yapılardır.

6. Zarlar asimetrik yapılardır. Yani bir taraf yüzeyi ile diğer taraf yüzeyi genellikle farklıdır^(11,28).

2.2.1. Sıvı-Mozaik Zar Modeli

Zarların moleköl düzenlemesi hakkındaki bugünkü bilgiler çeşitli biyofiziksel tekniklerle kimyasal analizlerin birleştirilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. S.J.Singer ve Wallach lipidlerle proteinlerin mozaik şeklinde düzenlendiğini ileri sürmüşlerdir (Şekil 2). Daha sonraları, biyolojik zarların yarı-sıvı zarlar olduğu, 1972 de Singer ve G.L.Nicolson tarafından ileri sürülerek zarın statik değil dinamik bir yapı gösterdiği anlaşılmıştır. Gerek integral proteinler gerekse lipidler görev sırasında çift tabaka içinde yer değiştirme yapmaktadırlar. Buna dayanarak bu iki araştırmacı zarın sıvı-mozaik bir modele sahip olduğunu söylemektedirler. Bu modele göre bimoleküler lipid tabakalarının arasına mozaik şeklinde proteinler serpiştirilmiş olup yerleri sabit değildir.



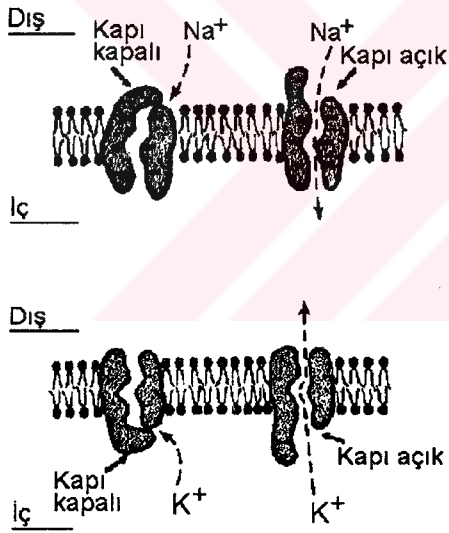
Şekil 2. Sıvı-mozaik zar modeli şeması.

2.3. İyon Kanalları

Hücre zarlarındaki iyon kanallarının kesikli olarak çalışan iyon seçici moleküler gözenekler olduğu bilinmektedir^(18,26).

2.3.1. İyon Kanallarının Seçici Geçirgenliği

Protein kanallarının hepsi değilse de, çoğu bir ya da daha çok sayıdaki özel iyon ya da molekülün transportuna yüksek düzeyde seçici bir nitelik gösterir. Bu olay kanalların çapı, şekil ve yüzeysel elektrik yükleri gibi kendi karakteristiklerinden kaynaklanır. Örneğin protein kanallarının en önemlilerinden biri olan sodyum kanallarının iç yüzleri, Şekil 3'de üstte görüldüğü gibi kuvvetle negatif yüklüdür. Bu kuvvetli negatif yükler sodyum iyonlarını, fizyolojik önem taşıyan öteki iyonlara göre daha kuvvetli olarak kanallara doğru çekerler. Çünkü sodyum için çekme oranı iyon çapına göre, ötekilerinkinden çok daha büyüktür. Kanal içine giren sodyum iyonu, difüzyon yasalarına göre her iki yönde de difüzyona uğrar. Sodyum kanalları böylece sodyum iyonlarının geçişi için özgün bir seçicilik gösterir.



Şekil 3. Sodyum ve potasyum iyonlarının protein kanallarından taşınması. Şekilde, kanalları koruyan "kapılar"ı açıp, kapatan kanal proteinlerindeki konformasyon değişiklikleri görülmektedir⁽¹⁷⁾

Başka bir protein kanal seti, Şekil 3'ün alt bölümünde görüldüğü gibi, potasyum transportu için seçici nitelik taşır. Bu kanallar sodyum kanallarından hafifçe küçüktür. Fakat negatif yük taşımazlar. Bu nedenle iyonları kanallara çeken kuvvetleri o kadar

büyük değildir. Öte yandan, sodyum iyonları potasyum iyonlarından oldukça küçüktür. Çünkü sodyum iyonlarında, potasyum iyonlarına göre, bir yörüngedeki tüm elektron seti eksiktir. Bu olay sodyum çekirdeğinin potasyuma göre çok daha fazla su molekülünü çekebilmesini sağlar. Sodyum iyonları itilirken, daha küçük hidrate potasyum iyonları bu kanallardan kolayca geçer. Böylece, belirli bir iyon için seçici geçirgenlik bir kere daha sağlanmış olur^(17,28).

2.3.2. İyon Kanallarının Kapıları

Protein kanallarının kapıları yardımıyla kanalların geçirgenliği kontrol edilir. Bu olay Şekil 3'deki üst ve alt sıralarda sodyum ve potasyum iyonları için gösterilmiştir. Bu kapıların, kanal protein molekülünün konumundaki değişikliklerle kanalın aralığını kapatabilir ya da açabilir. Sodyum kanallarında bu kapı hücre membranının dış yüzünde kapanıp açılırken, potasyum kanallarında iç yüzde açılıp kapanır^(24,28).

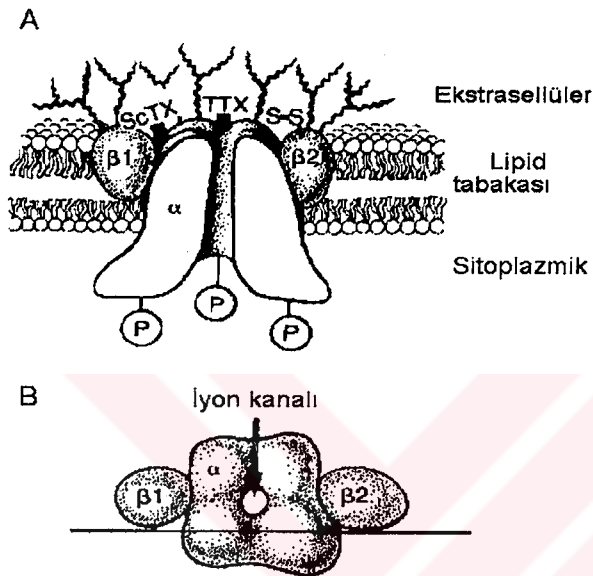
Kapıların açılıp kapanması en az iki temel yoldan kontrol edilir.

1) Voltaj kapıları: Kapının moleküler konumu hücre zarındaki elektriksel potansiyele göre değişir. Yani, hücre zarının iç yüzündeki kuvvetli negatif yük sodyum kapısının sıkıca kapalı kalmasını sağlar; zarın iç yüzü negatif yükünü kaybettiği zaman, bu kapılar ani olarak açılıp büyük miktarda sodyumun, sodyum deliklerinden içeri geçmesine izin verirler. Bu, sinirlerde, sinyallerin doğuşundan sorumlu aksiyon potansiyelinin temel nedenidir. Potasyum kapıları zarın iç yüzü pozitif yüklendiği zaman açılır. Bu cevap kapının çok yavaş açılmasıyla sodyumunkinden ayrılır. Sonuç olarak, potasyum iyonlarının hücreden dışarıya akışı, sinir lifi zarının aksiyon potansiyelinin sonunda eski haline dönmesine yardım eder.

2) Ligand kapıları: Bazı protein kanalları başka bir molekülün proteine bağlanmasıyla açılır. Bu, protein molekülünde kapıyı açan ya da kapayan konum değişiklikleri yaratır. Bu sisteme ligand kapıları ve bağlanan maddeye de ligand adı verilir. Bu kapılar, sinyallerin bir sinir hücresinden ötekine ve sinir hücrelerinden kas hücrelerine iletisinde son derece önemlidir^(26,28).

2.3.3. Sodyum Kanalları

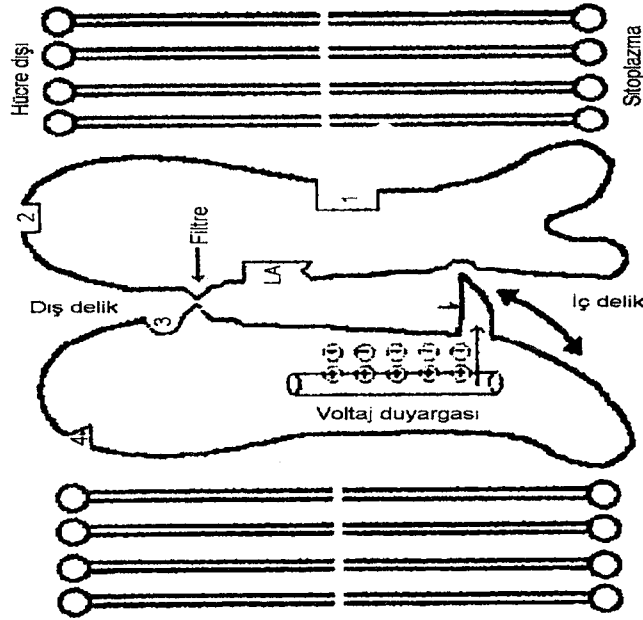
Sodyum kanal proteini ilk olarak elektrik balığının elektrik organı zarlarından izole edilmiştir ve yaklaşık 1850 aminoasit rezidüsü içeren 280 kilodalton molekül ağırlığında bir protein olduğu saptanmıştır. Ayrıca complemanter DNA'sı yapılmış ve klonlanmıştır. Sodyum kanalı proteini heterotrimetrik bir yapı gösterir; içinden kanalın geçtiği ana alt-birim olan alfa alt-biriminden ve çok daha ufak olan beta-1 ve beta-2 alt-birimlerinden oluşur (Şekil 4).



Şekil 4. Beyin sodyum kanallarının alt üniteleri⁽²⁶⁾.

Kanalın çevresinde, sitoplazmaya açılan iç deliğine yakın bir yerde kanalı açık kapayan bir kapakçık ve dış deliğine yakın bir yerde darlık yani Na^+ filtresi vardır (Şekil 5).

Uyarılabilir hücre zarlarında tüm sodyum kanallarının küçük ayrıntılar dışında benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Bu kanallar peralitik ve öldürücü etkilerinden tetrodotoksin (TTX) ve saxitoxin (STX) tarafından bloke edilmektedir. Sodyum kanalları düşük pH'lerde bloke olmaktadır^(24,26).



Şekil 5. Uyarılabilir hücre zarındaki heterotrimerik sodyum kanalı protein kompleksinin alfa alt-biriminin hipotetik yapısı, fonksiyonel önemi olan kısımları ve ilaç ve toksin bağlanma yerleri. LA: Lokal anestezi bağlanma yeri. 1. Batrakotoksin bağlanma yeri. 2. Akrep peptid beta toksini (β -ScTX) bağlanma yeri. 3. Tetrodotoksin (TTX) bağlanma yeri. 4. Akrep ve sölenkere peptid alfa toksinlerinin (α -ScTX ve ATX) bağlanma yeri. Dış deliğin üzerinde, delikle 2 numaralı bağlanma yeri arasında Ca^{++} bağlanma yeri vardır ve şekilde gösterilmemiştir; Ca^{++} , kanalı depolarizasyona karşı stabilize etmeye çalışır⁽²⁴⁾.

2.3.4. Sodyum Kanalının Fonksiyonel Durumları

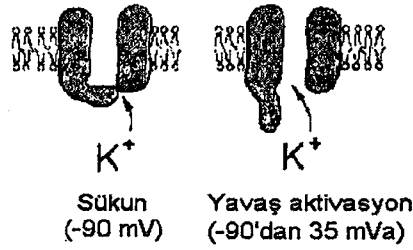
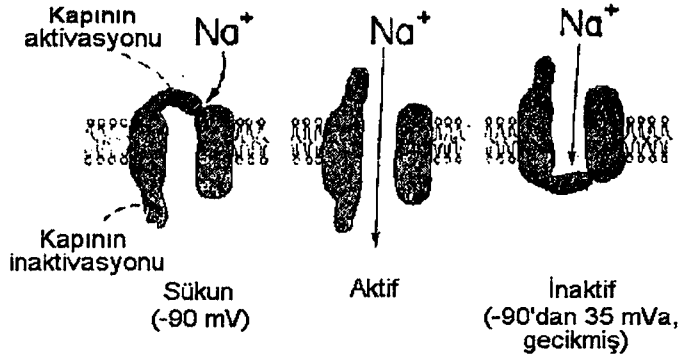
Bu kanallar üç durumlu bir konformasyon değişikliği gösterir (Şekil 6).

1. Aktif (açık) durum: Aksiyon potansiyelinin başlangıcında kısa bir süre için sodyum kanalları bu durumdadır.

2. İnaktif (kapalı durum): Aksiyon potansiyelinin düşme döneminde ilkinden daha uzun bir süre sodyum kanalı bu durumdadır ve Na^+ geçişine kapalıdır, bu durum hücrenin refrakter periyoduna uyar.

3. İstirahat durumu (kapalı, fakat hemen açılmaya hazır): Bu durumda sodyum kanalı kapalıdır; fakat ikinci durumdan farklı olarak açılmaya elverişlidir. Sinire bir dizi stimulus uygulandığında her bir stimulus uygulandığında her bir stimulus esnasında,

Dış



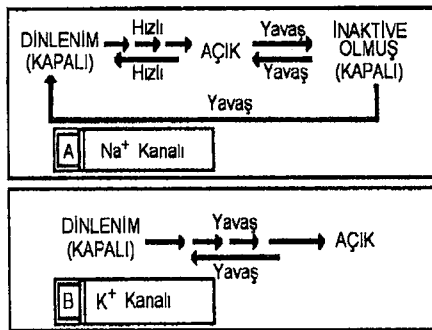
İç

Şekil 6. Voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanallarının karakteristikleri. Sodyum kanallarının aktivasyon ve inaktivasyonları ve potasyum kanallarının yalnız zar potansiyelinin normal dinlenim değerinden pozitif değere dönüşümü sırasında aktive oldukları görülmektedir⁽¹⁷⁾.

zardaki Na^+ kanalları peş peşe bu durumlardan tekrar tekrar geçer. Aktif ve inaktif durumlarda iken sodyum kanalı proteinin lokal anesteziğe afinitesi, dinlenimi durumundakine göre çok daha yüksektir^(17,24).

2.3.5. Kapı Akımları

Şekil 7'de sağa doğru olan adımlar depolarizasyon, sola doğru adımlar ise repolarizasyon veya hiperpolarizasyon sırasında gerçekleşmektedir. Dinlenim



Şekil 7. Kanal kapılarının durum değiştirmelerinde muhtemel aşamalar. A: Sodyum kanalı, B: Potasyum kanalı. Soldan sağa doğru oklar depolarizasyonla, sağdan sola doğru oklar hiperpolarizasyon veya repolarizasyonla gerçekleşen dönüşümlere karşılıktır. Çoklu oklar muhtemel birkaç aşamalı durum değişmelerini göstermektedir⁽²⁸⁾.

durumundan açık duruma doğru çoklu oklar, kanalın açılmadan önce birkaç farklı aşamadan geçebileceğini belirtmek için konmuştur⁽²⁸⁾.

2.3.6. Potasyum Kanalları

Aksonlarda aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresinde rol alan tek tipte K^+ kanalı vardır. Yine hep ya da hiç kuralına göre çalışan kanal kapısının açık ve kapalı durumlar arasındaki geçişleri muhtemelen Şekil 7B'de görülen şemaya uymaktadır. İletkenliği $g_K = 4-14$ pS olan uzun ve dar yapıdaki bir K^+ kanalı bulunabilmektedir. Potasyum kanalları tetraetilamonyum (TEA) ile bloke edilebilmektedir.

Aksonlar dışındaki uyarılabilir zarlarda çok çeşitli tiplerde K^+ kanalları, zarın depolarize olması halinde, K^+ iyonu dışarıya doğru zayıf olarak iletilirken, hiperpolarize olması halinde içeriye doğru çok kolay iletmektedirler⁽²⁸⁾.

2.4. Lokal Anestezikler

Lokal anestezikler, sinir lifleri ile uygun konsantrasyonlarda karşılaştıklarında bu liflerdeki impuls iletimini tersinir olarak bloke eden ilaçlardır. Sadece sinir liflerinde (akson veya dendritlerde) değil, nöronun somasında ve genel olarak bütün uyarılabilir hücrelerde (çizgili kas, myokard, düz kas v.b.), onların depolarize olma özelliğini ve depolarizasyon dalgasının yayılmasını engelleyebilirler. Esas olarak, ağrılı stimulusların periferden santral sinir sistemine iletimini geçici olarak kesmek için kullanılırlar.

Lokal anestezikler zarda sodyum kanallarının açılmasını engelleyerek içe yönelik hızlı sodyum akımını konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltırlar. Buna bağlı olarak sinir lifi ve diğer uyarılabilir yapılarda: 1) Uyarılabilirlik azalır ve uyarılma eşiği yükselir. 2) İmpulsun iletim hızı azalır, sonuçta uygun konsantrasyondaki ilaçla iletim tam olarak bloke edilir. 3) Aksiyon potansiyelinin yükselme (depolarizasyon) hızı azalır ve genliği küçülür veya tamamen ortadan kalkar. 4) Refraktör periyodu uzatırlar. 5) İletim güvenlik faktörünü azaltırlar. Yüksek konsantrasyon hariç, nöronun dinlenim potansiyelini etkilemezler^(8,24,27,31).

Eğer invitro sinir preparatları çok düşük frekanslarda (<0.1 Hz) stimule edilirse ve düşük konsantrasyonda lokal anestezie maruz bırakılırsa, impuls geçişinde minör

bir azalma gözlenir. Stimulus frekansındaki artış (> 1 Hz), blokajın gücünü artırır. Tonik (dinlenim) ve fazık (frekansa bağlı) blokajların açıklanması kolay olmamakla beraber, lokal anestezikler sodyum kanallarını tıkayarak periyodu uzatırlar. Sodyum kanalları ise uzayan bu periyodu inaktive duruma gelmek için kullanır^(2,6).

2.4.1. Yapı-Etki İlişkisi

Lokal anestezikler, genellikle tersiyer veya sekonder amin bileşikler olup suda çözünmezler, bundan dolayı suda çözünen tuz şekilleri kullanılır^(5,6,24,33,34).

Lokal anesteziklerin sodyum kanalında bağlandıkları reseptörler, kanalın sitoplazmaya açılan iç deliğine yakın bir yerdedir. Bağlanan moleküller, iyonize (katyonik) moleküllerdir. Non-iyonize moleküller ise yeterince bağlanamazlar. Lokal anestezik molekülleri kanalın iç deliğe yakın etki yerine, kanalın içinden geçerek değil, ancak hücre içinden ulaşabilirler⁽²⁴⁾.

Bunun içinde önce non-iyonize şekilde sinir lifinin sitoplazma zarının lipid tabakası içinden geçip, sitoplazmaya ulaşmaları gerekir. Bu moleküllerin hücre içinde iyonizasyonu ile oluşan katyonik moleküller, iç deliğe yakın etki yerine bağlanırlar. Sinir gövdesi etrafına uygulanan lokal anestezik moleküllerinin sinir kılıflarını aşabilmesi ve sinir lifler ile temasa geçebilmeleri için non-iyonize durumda olmaları gerekir. Non-iyonize şekil molekülün etki yerine ulaşmasına dolaylı (indirekt) olarak yardım eder. Sinir fonksiyonlarının farklı modalitelerinden dolayı aynı oranda bloke olmazlar^(4,10,12,24,31,33).

Periferal sinir lifleri, modaliteleri ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu durum impuls iletiminde önemlidir. İmpuls iletim derecesi axon çapına, miyelinizasyon derecesine bağlıdır. Lokal anestezik blokaja en duyarlı lifler C tipi en az duyarlılığı olan A tipi liflerdir. C lifleri etrafında diffüzyon tamponları A liflerinden daha azdır ve bloke oranı daha yüksektir^(12,15,24,36,37).

2.4.2. Etki Mekanizması

Lokal anestezikler, zarı Na^+ karşı geçirirliğinin (permeabilitenin) artmasını önlerler ve böylece sinir zarını stabilize ederler. Sinirlerdeki uyarılabilirliği ve impuls

iletimini engellemelerinin ana nedeni bu etkidir.

Lokal anestezipler ikincil bir etki olarak, K^+ a karşı geçirgenliğin artmasında bloke edebilirler. Bu etki, deneysel olarak dış ortamda Na^+ konsantrasyonunu arttırmakla azalır, dış ortamda Na^+ konsantrasyonunun dışmesi ise sinir lifini lokal anesteziplere duyarlı kılar^(3,5,6,13,14,31,33,34).

2.4.3. Lokal Anesteziplerin Sodyum Kanallarına (Na^+) Etkisi

Lokal anestezipler sodyum kanallarını oluşturan özel protein moleküllerini direkt olarak etkileyerek depolarizasyon yapabilecek nitelikteki stimulusların sodyum kanalını açmasını engeller^(5,6,24).

Sodyum kanalının lokal anesteziplere affinitesi, dinlenim durumunda ileri derecede azalması nedeniyle, stimulus kesilince kanal, lokal anesteziğin etkisinden inaktivasyon halinden 10-1000 kez daha yavaş kurtulur. Bu nedenle lokal anestezipler refraktr periyodu uzatırlar^(13,24).

Lokal anesteziplerin parsiyel blok yapan konsantrasyonda aksiyon potansiyeli veya ie yönelik sodyum akımında yaptığı dışmenin maksimumu, stimulasyon frekansı ile doğru orantılı olarak artar^(3,5,6,31,33,34).

Kullanıma bağımlı olarak lokal anesteziplerin meydana getirdiği blokaj, sinir üzerine belirli bir konsantrasyonda uygulandığı zaman dışk frekanslı stimulusların iletimini bloke etmediği halde, yüksek frekanslı stimulusların iletimini bloke eder^(3,6,8,14,31,33).

Yüksek frekans, sodyum kanallarının yüksek afinite de aktif ve inaktif durumda kalmasının toplam süresini artırır ve böylece ilaç moleküllerinin daha fazlasının etki yerine bağlı kalmasını sağlar. Stimulasyon kesilince moleküller etki yeri olan sodyum kanallarından uzaklaşır^(1,3,5,7,8,13,24).

Lokal anestezipler, gösterdikleri farklı fizikokimyasal özelliklerinden ve farklı aktivitelerinden dolayı birbirlerinden ayrılırlar. Bu faktörler, pKa (iyonizasyon derecesi), yağda çözülebilirlik katsayısı ve protein bağlama derecesidir⁽²⁴⁾.

2.4.4. Lokal Anesteziklerin Sınıflandırılması

Aşağıda lokal anestezikler kimyasal yapılarına göre, ester yapılı olanlar, amid yapılı olanlar ve diğerleri şeklinde üç gruba ayrılarak incelenmişlerdir. Ester yapılı olanlar plazma psödokolinesterazı ve ayrıca karaciğer esterazları tarafından parçalandıklarından kısa etki sürelidirler. Amid yapılı olanlar bu enzimler tarafından değil, karaciğerdeki mikrozomal enzimler tarafından parçalanırlar; gerek lokal ve gerekse sistemik etkileri ester yapılı olanlarınkinden daha uzundur.

Ester yapılı olan lokal anesteziklerin pKa değerleri, amid yapılı olanlardan daha yüksektir, fizyolojik pH çözeltilerinde non-iyonize formları amid yapılı olanlardan daha büyüktür. Zira en iyi girebilen ilaçlar yağda çözülebilen ilaçlardır^(13,24,27).

2.4.5. Ester Yapılı Lokal Anestezikler

Prokain (Novocain)

Prokain, PABA'nın dietilaminoetanol ile yaptığı esterdir. Hidroklorür tuzunun solüsyonu halinde kullanılır. Prokain sentez edilen ilk lokal anesteziktir. Vücutta, esterazlar tarafından PABA ve dietilaminoetanola hidroliz edilir.

Etki gücü fazla olmadığından ve etkisi geç başladığından, daha sonra çıkan amid türevi lokal anestezikler prokain'in yerini almışlardır.

Prokain kanda, plazma psödokolinesterazı ile eritrositlerin asetilkolinesterazı tarafından ve kısmen de karaciğerdeki esteraz tarafından çabuk bir şekilde hidroliz edilerek inaktive edilir. Bu nedenle toksisitesi düşük olan bir lokal anesteziktir.

Prokain mukozalarda çok az emildiği için yalnızca injeksiyondan sonra lokal anestezik özelliği gösterebilmektedir. Prokain toksisitesinin az oluşu, özellikle plazma kolinesterazı tarafından inaktive edilmesine ve gücünün düşük olmasına bağlıdır. Toksisitesinin düşük olması nedeniyle prokain ile merkez sinir sistemine ve kardiyovasküler sisteme ait etkiler, diğer lokal anesteziklere göre daha az gözlenir; bununla birlikte, yüksek dozlarda verilecek olursa, lidokainde olduğu gibi aynı toksik belirtileri prokainde de görmek mümkündür.

Prokain, bileşik aksiyon potansiyelinin genliğini doza bağlı olarak geri dönüşlü bir şekilde azaltmaktadır. Yapılan araştırmaların sonucunda prokainin, iletimi bloke

eden konsantrasyonlarda zarı depolarize etmediği görülmüştür. Prokain'in indirekt bir davranışla zara bağlı kalsiyumun yerini değiştirdiği ve sodyum iyon transportunu etkilediği düşünülmektedir^(4,15,19,24,37).

Diğer ester yapılı lokal anestezikler ise kokain, kloroprokian (Nesacain) ve tetrakain (pentocain) dir.

2.4.6. Amid Yapılı Lokal Anestezikler

Lidokain (Xylocaine)

Kimyasal yapısı N-diethylaminoasetil-2,6-ksilidin hidroklorür'dür. Diğer amid türevidir. Lidokain gibi, kandaki kolinesterazlar tarafından parçalanmaz, sadece karaciğerde hidroliz edilerek parçalanır. Minimum etkin konsantrasyonu üzerinden değerlendirildiğinde prokain'e göre aşağı yukarı üç kez daha güçlü lokal anestezik etkiye sahiptir, ondan yaklaşık iki kez daha toksik bir ilaçtır.

Tek başına lidokain içeren solüsyonu doku içine enjekte edildiğinde etkisi, uygulanan konsantrasyona göre, bir saat veya daha fazla sürdüğü halde, adrenalin içeren solüsyonu uygulanırsa etkisi en az 2 saat sürer. Lokal anestezik etkisi, uygulandıktan 3-5 dakika sonra başlar ve 10-15 dakika da maksimuma erişir. Lidokain'in prokain'e göre üstünlüğü, yüzeysel anesteziye de olanak vermesi, etkisinin daha çabuk başlaması, dokuda daha iyi yayılması, etkisinin daha güçlü ve uzun olmasıdır. Ancak lidokain, amid yapılı lokal anestezikler arasında en kısa etki süreli iki ilaçtan biridir^(24,36,34).

Diğer amid yapılı lokal anestezikler ise Mepivakain (Carbocain) , prilokain hidroklorür (Citanest) ve dibukain (Nupercaine) dir.

2.5. Zar Potansiyelleri

Bir zarla ayrılan farklı elektrolitik bileşimli, iki sıvı bölmesi arasında var olan potansiyele zar potansiyeli ya da dinlenim potansiyel denir.

Biyoelektrik potansiyeller, aslında zar potansiyelleridir. Biyoelektrik potansiyeller bazı yüklü maddelere karşı seçici özelliğe sahip zarların her iki tarafındaki konsantrasyon farkı ve zarın seçici özelliğinden ötürü oluşurlar.

Zar potansiyellerini oluşturan faktörler:

1. Hücre zarının özellikleri

2. Zarın her iki tarafında, pozitif ve negatif yüklerin farklı dağılımını sağlayan aktif ileti mekanizması

3. İyonların, konsantrasyon gradyentinden ötürü diffüzyonları

4. Hücre içinde dışarı çıkamayan anyonların varlığı.

Eğer zardan az miktarda maddenin taşınması için bir iş gerekmiyorsa o maddenin dağılımının dengede olduğu kabul edilir. Dinamik dengede, her iki yöndeki akışlar eşittir. İyonlara etki eden bir kuvvet varsa, bir potansiyel farkı da vardır. Yüksüz moleküllerin denge durumunda, iç ve dış konsantrasyonlar eşittir ve bu nedenle net akış sıfırdır.

İyon dengesinin belirlenmesi için, zarın her iki tarafındaki iyon konsantrasyonları ve potansiyel farkının bilinmesi gerekir. Bir iyon türünün, iç ve dış konsantrasyonları zara uygun bir voltaj uygulanarak dengeye getirilebilir. Her iyonun zardan geçişini dengede tutan potansiyele, o iyonun denge potansiyeli denir.

Uyarılmamış dinlenim halinde bulunan hücre zarının içi ve dışı arasında var olan potansiyel farkına, dinlenim zar potansiyeli ya da denge potansiyeli denir. Denge potansiyelleri Nernst denklemiyle tayin edilirler^(16,17,18).

Nernst denklemi

$$V \text{ (Volt)} = (61 \times 10^{-3}) \log \left(\frac{C_2}{C_1} \right)$$

2.6. Aksiyon Potansiyelleri

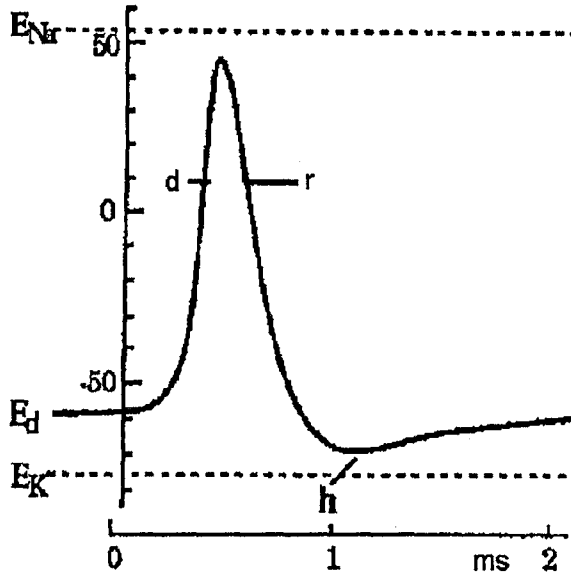
Bir hücrenin uyarılan ve dinlenimde bulunan bölümleri arasında yayılan geçici elektriksel potansiyel değişikliklerine aksiyon potansiyeli denir. Uyarılma sonucu uyarılan bölgede oluşan impuls, dalga biçiminde, hücrenin bir tarafından diğer tarafına iletilir.

Uyarılabilen bir hücre zarının iki yüzü arasında bir zar potansiyeli vardır. Zar uyarıldığında, sodyuma karşı geçirgenliği artar ve hücreye fazla sayıda sodyum iyonları girer ve zarın içi pozitif yüklü olana kadar devam eder. Bu sürece depolarizasyon denir. Bu ters yönlü potansiyel uzun süre devam etmez ve zar tekrar dinlenim durumuna döner. Potansiyelin ani azalışı, tersine dönüşü ve bunun arkasından yeniden dinlenim potansiyelinin oluşması aksiyon potansiyelini oluşturur.

Aksiyon potansiyeli hakkında bugünkü bilgilerimizin çoğu Cole, Curtis, Hodgkin-Huxley ve Katz'ın 1940 ve 1950'li yıllarda yaptıkları denel çalışmalarına dayanır. Çalışmalarında kalınlığı 1 mm'ye ulaşan bir cins mürekkep balığının dev aksonunu kullanmışlardır. Dev akson üzerinde yapılan ilk deneylerden aksiyon potansiyeli sırasında zar iletkenliğinin arttığı, dış ortamda Na^+ konsantrasyonu azaltıldığında aksiyon potansiyeli genliğinin azaldığını, dış ortamdaki K^+ konsantrasyonu arttırıldığında ise aksiyon potansiyelinin repolarizasyon temposunun düştüğünü gözlemişlerdir.

Aksiyon potansiyelinin yükselme evresinde (depolarizasyon) zar potansiyeli Na^+ denge potansiyeline doğru değişmektedir. Zarın sodyuma karşı geçirgenliği azalıp, potasyuma geçirgenliği artmaya başlayınca, zar potansiyeli tekrar potasyum denge potansiyeline yaklaşmakta (repolarizasyon) ve dinlenim değerine dönmektedir.

Zarda herhangi bir nedenle bir depolarizasyon gelişirse voltaj-bağımlı Na^+ kanalları açılmaya başlar. Bu sürece, Na^+ kanallarının aktivasyonu denir. Açılan kanallardan Na^+ girişi zarın daha fazla depolarizasyonuna, bu durum ise daha fazla Na^+ kanalı açılmasına ve zarın sodyuma geçirgenliğinin daha fazla artmasına neden olur.



Şekil 8. Mürekkep balığı dev aksonunda bir aksiyon potansiyeli ile sodyum ve potasyum denge potansiyelleri (d:depolarizasyon süresi, r: repolarizasyon süresi, h: hiper polarize edici ard potansiyeller). Ed: Dinlenme potansiyeli, ENa: sodyum denge potansiyeli, EK: Potasyum denge potansiyeli⁽²⁸⁾

Şekil 8’de görüldüğü gibi aksiyon potansiyeli eğrisi dört evreye ayrılır.

I. Evrede aktif bölgeden kaynaklanan yöresel akımlar, zarın dinlenme durumunda bulunan bölgesini bir miktar depolarize etmektir. Bu evrede, iyonik iletkenlik oldukça düşük olup zarda kapasitif akım egemendir. Fakat depolarizasyonla birlikte Na^+ kanalları da açılmaya başlamıştır.

II. Evrede açılan kanallardan Na^+ iyonları içeriye girmeye başlar ve Hodgkin çevrimine göre, kendi kendini doğuran süreç gelişir ve zar potansiyeli sodyum denge potansiyeline doğru hızla yaklaşır. Ancak bu evrenin sonlarına doğru daha yavaş açılan K^+ kanallarının sayısı giderek artarken Na^+ kanalları inaktive olmaya başlar. Zardaki Na^+ ve K^+ akımlarının net yoğunluğu sıfıra eşit olur. Bu anda aksiyon potansiyeli de tepe noktasına ulaşmıştır.

III. Evrede, inaktivasyon nedeni ile sodyum iletkenliği (g_{Na}) azalırken, potasyum iletkenliği (g_{K}) yükselmesini sürdürür. Dışarı doğru potasyum akımı egemenliğinde zar yeniden polarize olurken (repolarizasyon) zar potansiyeli dinlenme değerine doğru düşer.

IV. Evrede ard potansiyel görülür. Potasyum iletkenliği (g_{K}) yüksek değerlerde

iken Na^+ kanalları inaktive olmuşlardır. Bu nedenle zar potansiyeli potasyum denge potansiyeline oldukça yaklaşmış, zar hiperpolarize olmuştur. Potasyum iletkenliği derece derece azalırken zar da hiperpolarize durumdan dinlenim durumuna ağır ağır döner.

Uyarılabilirliği yüksek olan liflerde iletim hızı büyüktür. Uyarılabilirliğe ve iletim hızına etkili faktörler özetlersek;

a) Sodyum iletkenliği tepe değeri, g_{Na} büyüdükçe, yani birim yüzeydeki sodyum kanalları sayısı çoğaldıkça iletim hızı artmaktadır.

b) Eşiğe ulaşmak için gerekli depolarizasyon miktarı ($\Delta V = E_c - E_d$) küçüldükçe, hız artmaktadır.

c) Birim yüzey başına zar sığası (C_m), küçüldükçe hız artar. Miyelin tabakası sığayı küçülttüğünden iletim hızının artmasında rol oynar.

d) Aksoplazmanın öziletkenliği büyüdükçe, iletim hızı artmaktadır.

e) İletim hızı, sıcaklıkla artmaktadır.

f) Akson yarıçapı arttıkça, iletim hızı da artmaktadır.

Miyelinsiz liflerde iletim hızı yarıçapın kare kökü ile miyelinli liflerde ise yarıçapla doğru orantılıdır.

Aktif $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompası aksiyon potansiyeli oluşumunda ve iletiminde doğrudan rol almaz. Pompanın temel işlevi zarı iletme hazır tutmaya yöneliktir. Her bir lif her aksiyon potansiyeli iletiminden sonra bir miktar Na^+ kazanır, bir miktar K^+ kaybeder. Dinlenim durumunu sürdürmek için gerekli olan pompa, iletimin ardından biraz daha yüksek bir tempoda çalışır. Sodyum ve potasyum iyonlarının iletim sırasında, zardan geçiş mekanizmaları pompa ile taşınma mekanizmalarından tamamen farklıdır.

1) Bu iyonlar, kanallardan serbest enerjinin azaldığı yönde (yokuş-aşağı), aktif pompa ile serbest enerjinin arttığı yönde (yokuş-yukarı) taşınırlar.

2) Enerji kaynağı, kanallardan geçiş için önceden var olan elektrokimyasal gradyent, pompa için ise ATP'dir.

3) Belirli konsantrasyonlarda tetradotoksin (TTX) Na^+ kanallarını, tetraetilamanyum (TEA) ise K^+ kanallarını bloke ederken, pompa üzerine bir etkileri yoktur. Ouabain ise pompayı durdururken, kanal geçişlerinde etkisizdir.

- 4) Dış ortamdaki $[Ca^{++}]$ artması eşiği yükseltirken, pompa üzerinde etkisizdir.
- 5) Na^+ kanallarında Li^+ iyonları Na^+ iyonlarından pek ayırt edilemezken Li^+ iyonları pompa aracılığı ile taşınmamaktadır.
- 6) Çeşitli zarlarda birim yüzeydeki Na^+ kanalı sayısı $70-500/1\mu m^2$ ken, aktif pompa sayısı $4000/1\mu m^2$ 'dir^(16,17,28).

2.7. Sukroz-Gap Tekniği

Aksiyon Potansiyelleri hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki yöntemle gözlenmekte ve kayıtlanmaktadır. Hücre içi yöntemleri (a) mürekkep balığı dev aksonu gibi büyük liflerin içine boylamasına bir elektrod yerleştirmek ve (b) bir mikroelektrodlarla bir lifin içine girmek şeklinde ikiye ayrılır. Hücre dışı yöntemler de üçe ayrılabilir: (a) Hava-gap, (b) sukroz-gap, (c) partision kayıt tekniği

Aksiyon potansiyelleri'nin gerçek büyüklük, biçim ve süresi doğru bir şekilde hücre içi kayıt yöntemi ile kayıtlanabilir. Hücre dışı kayıt yöntemleriyle ölçülen zar ve aksiyon potansiyeli, bunların gerçek değerlerinden kısa-devre çarpanı kadar daha küçüktür^(21,22).

Sukroz-Gap Yöntemi, dinlenim zar ve aksiyon potansiyellerinin hücre dışından ölçülme gereksinimi sonucu geliştirilen bir yöntemdir. Dinlenim ve aksiyon potansiyellerinin, tek miyelinli sinir lifi ve sinir veya kas demetleri gibi yalnız hücre dışından ölçülebildiği dokularda sukroz-gap yöntemi kullanılmaktadır.

Hücre dışı kayıt yöntemlerinden zar ve aksiyon potansiyelinin gerçek değerine en yakın değer sukroz-gap yöntemiyle ölçülür. Sukroz-gap tekniğinin uygulanması diğer iki tekniğe göre daha zor ve daha çok maharet gerektirmektedir. Sukroz-gap tekniğinde tekli sukroz-gap ve çiftli sukroz-gap tekniği olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır.

Tekli sukroz-gap yöntemi ilk olarak 1954 yılında Stampfli tarafından miyelinli sinirler için tasarlanmış ve daha sonra miyelinsiz (c) liflerine, düz kaslara, iskelet kaslarına, kalp kasına ve dev sinir liflerine uygulanmıştır⁽³²⁾.

Tekli-sukroz gap yönteminde zaman içinde, sukroz bölgesinin iki tarafına lastik

zarların veya vazelin yalıtkanların eklenmesi, çift sukroz yalıtkanı kullanılması, voltaj-klamp koşullarının eklenmesi gibi çeşitli değişiklikler yapılmıştır.

Sukroz-gap yöntemiyle 50-70 mV genlikli bileşik sinir aksiyon potansiyeli (BAP) ve 30-60 mV büyüklüğünde de bileşik dinlenim potansiyeli (BDP) ölçülebilmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Preparat ve Kimyasal Bileşikler

3.1.1. Deney Hayvanı

Çalışmalarda 70-80 g ağırlıklarındaki su kurbağaları (*Rana cameranoi*) kullanıldı.

3.1.2. Siyatik Sinir Diseksiyonu

Kurbağa, makasla gözlerinin hemen üzerinden üst çenesinden kesilir. Bir tel veya enjektör iğnesi ile vertebral kolona girilir, medulla spinalis haraplanır. Kurbağa mantar zemin üzerine yatırılır ve uyluğun arkasındaki kaslar ayrılarak, dizden bacağın tepesine kadar olan mesafede siyatik sinir açığa çıkarılır. Vertebral kolona girdiği yerde sinire iplikte bir düğüm atılarak, düğümün proksimalinden sinir kesilir. Siyatik sinir dize kadar olan bağ dokusundan ayrılır. Bu esnada siniri germemeye özen gösterilir. Dizde sinire bir düğüm daha atılarak distalinden kesilir.

5-7 cm uzunluğunda çıkarılan siyatik sinir demeti, ringer içerisine konur, mikroskop altında iğne ve mikro pensetlerle kılıfı yırtılır. Kılıfı yırtılan sinir demeti ringer içerisinde 6-8°C'de yaklaşık bir gün bekletilir.

3.1.3. Ringer Çözeltisi

Soğuk kanlı hayvanlardan izole edilen dokuları canlı tutmak için kullanılır.

NaCl :115 mM KCl :2.5 mM CaCl₂ :1.8 mM

Na₂HPO₄:2.15 mM NaH₂PO₄:0.95 mM

3.1.4. İzotonik KCl çözeltisi

NaCl :2.5 mM KCl :115 mM CaCl₂ :1.8 mM

Na₂HPO₄:2.15 mM NaH₂PO₄:0.95 mM

Ringer ve izotonik KCl çözeltileri % 95 O₂, % 5 CO₂ gaz karışımı ile oksijenlendirildi. Çözeltiler deiyonize ve bidistile su ile hazırlandı.

3.1.5. İzotonik Sukroz Çözeltisi

214 mM iyonşuz sukroz çözeltisidir. Sukroz-gap aparatında test ve izotonik KCl bölümlerini birbirinden ayırmak için kullanıldı.

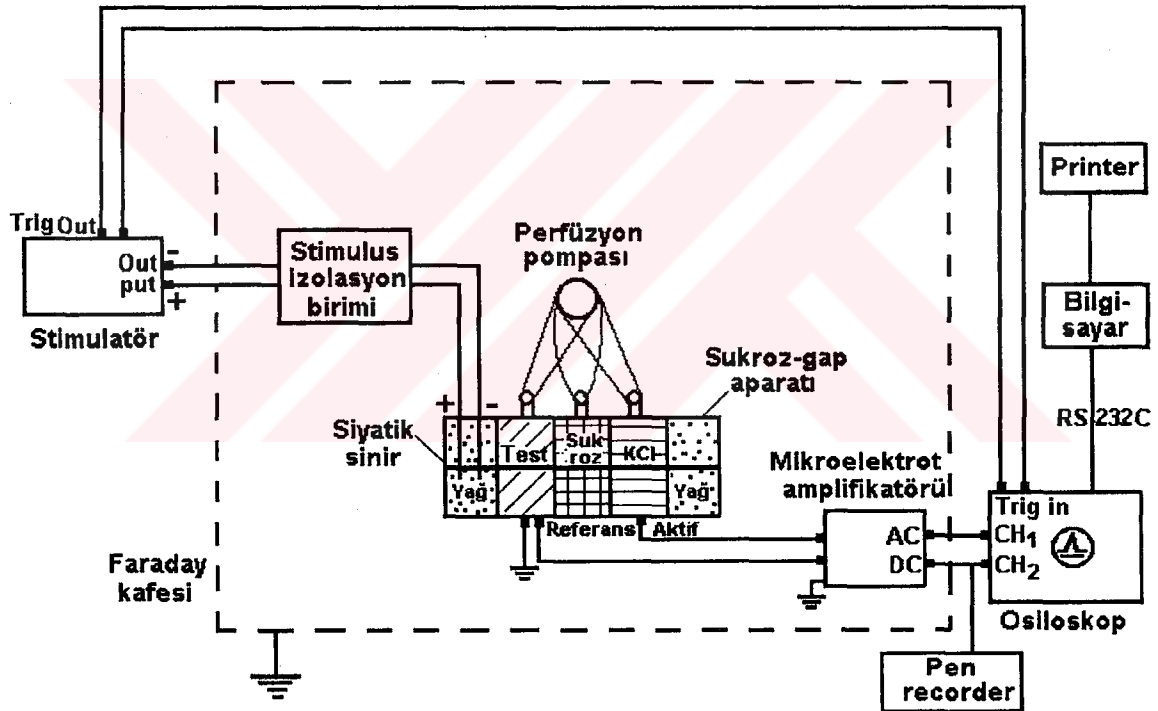
3.1.6. Test Çözeltileri

80 mM KCl ve 100 mM KCl çözeltileri hazırlandı.

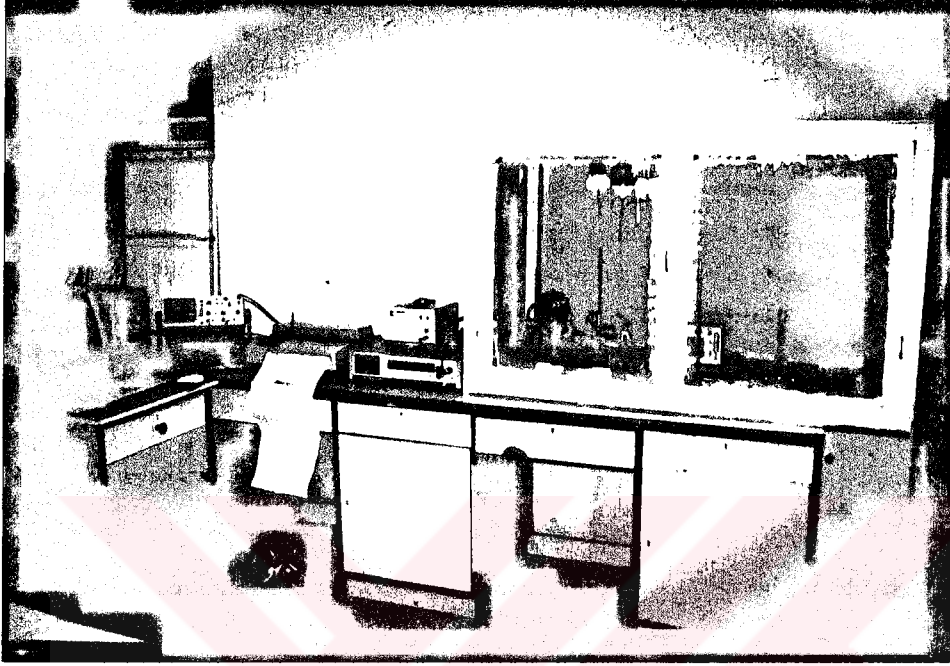
1, 2.1, 4.2, 8.4 mM Prokain ve 1, 2.1, 4.2 mM Lidokain çözeltileri ringer çözeltileri içerisinde hazırlandı.

Bütün çözeltilerin pH'ları NaOH ve HCl kullanılarak 7.4'e ayarlandı.

3.2. Blok Diyagramı



Şekil 9. Sukroz-gap tekniğinin şematik blok diyagramı.



Resim 1. Sukroz-gap tekniğinin toplu görüntüsü.

3.3. Ölçüm ve Kayıtlamada Kullanılan Cihazlar

Stimülatör ve Stimulus İzolasyon Birimi

Siniri uyarmak için Grass S48 stimülatörü ve Grass SIU5 stimulus izolasyon birimi kullanıldı.

Mikroelektrot Amplifikatörü

Grass P16 mikroelektrot D.C amplifikatörü kullanıldı. Amplifikatörün A.C çıkışından BAP'leri, D.C çıkışından BDP'leri ölçüldü.

Storage Osiloskop

Hitachi VC-6523 Digital Storage Osiloskobu kullanıldı. Kayıt ve gözlem, stimülatörün trig out'undan gelen bir puls ile tetiklendi (triggering).

Pen Recorder

Harvard universal osilograf kullanıldı.

Bilgisayar ve Printer

Leo Pentium-75, 8 MB RAM, 850 MB hard diskli bir PC kullanıldı.

Sinyal Analiz Programı

Digital storage osiloskopa kayıtlanmış BAP'ları bilgisayara aktarmak ve bunlarla ilgili parametreleri belirlemek için Biyofiziksel Sinyal Analiz Programı (BİSİP) adında ve Biyofizik Anabilim Dalı'nda geliştirilen bir program kullanıldı.

Perfüzyon Pompası

Cole-parmer peristaltik pompası kullanıldı.

Faraday Kafesi

İstenmeyen elektriksel sinyallerin BAP ve BDPleri ile birlikte amplifiye edilip kayıtlanmasını önlemek için mikroeletrot amplifikatörü, sukroz-gap aparatı, SIU ve çözeltiler G:140, Y:91, E:70 cm boyutlarında ve topraklanmış tel örgülü bir kafes içine alındı.

Uyarma Elektrotları

Ag-AgCl elektrotları kullanıldı.

3.4. Kayıt Elektrotları

Kararlı uzun-sürekli deneylerde yüksek kalitede Ag/AgCl elektrotların yapılması ve kullanılması gerekmektedir⁽²⁵⁾.

Elektrotların yapımı için aşağıdaki araç-gereçlere ihtiyaç vardır:

1. Elektrot camı

Atölye olanaklarıyla yapılabilir, fakat boyun (shank) uzunluğu kısaltılmış pasteur pipetleride uygundur. Pipetin ucuna güvenli bir şekilde uydurmak için, bağlantı soketinde değişiklikler yapmak gerekmektedir.

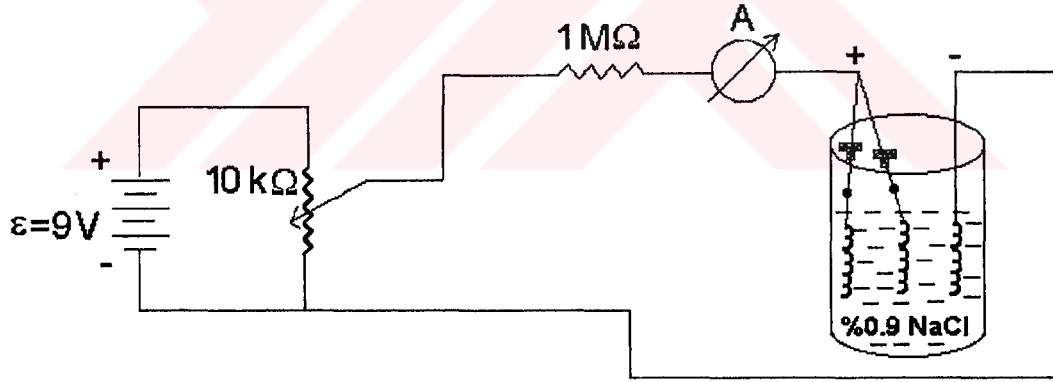
2. Gümüş tel

Kullanımdan önce aseton içinde temizlenmiş (yağlarından arındırılmış) üç adet 4 cm uzunluğunda ve 0.25 mm çapında %99.9 saflıkta gümüş tel.

3. 200 ml fizyolojik tuz çözeltisi (%0.9 NaCl)

4. DC güç kaynağı (klorlama kutusu)

Gümüş teli klor iyonlarıyla kaplamak için $< 2 \mu A$ akım gerekmektedir. 9 V'luk bir pil ve 10 k Ω 'luk bir potansiyometre kullanılarak yapılmış basit bir sabit akım kaynağı önerilmektedir. Çıkışa konacak 1 M Ω 'luk direnç 1 $\mu A/Volt$ 'luk bir akım oluşturacaktır. Çıkış akımının büyüklüğünü gözlemek için devreye bir ampermetre bağlanabilir (Şekil 10). Kullanılan gümüş telin saflık derecesine ve AgCl tabakasının kalınlığına göre akım 50 μA 'e kadar yükseltilebilir.



Şekil 10. Klorla kaplama devresi.

5. Çok ince toz (pudra) haline getirilmiş agar (5 gram)

6. Bunsen bek'i
7. 5 ml'lik şırınga ve kalın uçlu i.v. kanül
8. Lehim
9. Yapıştırma reçinesi (veya silikon) (hızlı katılaşılan özellikte olmalı)
10. Siyah boya veya yalıtma bandı
11. İki adet 1 mm'lik elektrik soketi
12. En az 4 cm uzunluğunda ve 2 mm çapında (cam veya metal) çubuk.

Elektrotlarının Yapımı: 1 cm'lik kıvrılmamış kısım bırakarak, her gümüş teli (toplam 3 adet) 2 mm'lik çubuk etrafına sarın. İki (gümüş) spirali (coil) 1 mm'lik elektrik soketlerine lehimleyin ve kıvrılmış kısımları aseton içinde temizleyin (yağlarından arındırın). Üç spirali 100 ml'lik kabın kenarına monte edin ve lehimli yerlerin 5 mm aşağısına kadar tuz çözeltisi ile doldurun. Lehimli kısmı tuz çözeltisi ile temas ettirmeyin.

DC güç kaynağının negatif terminalini, ucuna soket lehimlenmiş spirale bağlayın, diğer iki spirali birleştirin ve bunları pozitif terminale bağlayın. Güç kaynağını açın (power on) ve 20 dakika süresince 1 μ A'lık akım geçecek şekilde ayarlayın, polariteyi 10 dakika tersine çevirin ve tekrar polariteyi 20 dakika süresince normale çevirin. Elektrot olarak kullanılacak spirallerin rengi klorla kaplandıkça açık griden kahverengiye dönüşecektir. Elektrotları güç kaynağından ayırın ve daha sonraki işleme kadar (birbirlerine bağlı şekilde) tuz çözeltisi içinde bırakın.

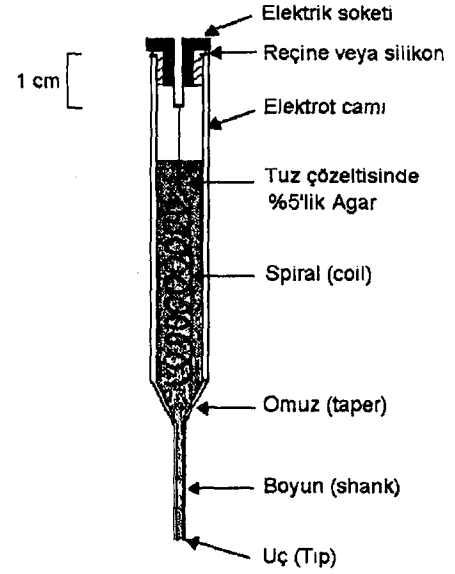
100 ml'lik tuz kabını kaynar su içine yerleştirin ve agarı çözün. Bu dolaylı yöntem agarın aşırı ısınmasını engelleyecek ve elektrotları doldurmak için daha çok zaman kazandıracaktır. Şırınga ve plastik kanülü kullanarak, kayıt elektrot camını açık ucundan 2 cm aşağısına kadar doldurun, elektrot spirallerini hemen içine daldırın ve soketleri yuvalarına yapıştırma reçinesi (veya silikon) ile sabitleyin (Şekil 11). Spiralin klorlanmamış kısmının agar/tuz karışımı ile temas etmemesine dikkat edin.

Gümüş/gümüş klorür elektrotlar ışığa duyarlıdır; elektrotların siyah boya ile boyanması veya yalıtkan band ile sarılması önerilmektedir.

Elektrotlar en iyi şekilde tuz çözeltisi içinde buz dolabında saklanırlar ve

kullanılmadıkları zaman uçları kısa devre yapılır (birleştirilir).

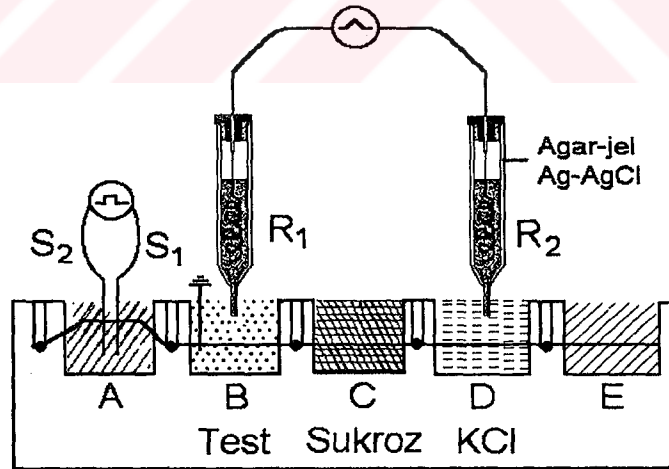
Yukarda anlatılan biçimde yapılmış ve saklanmış elektrotlar günlük kullanımlarda bozulmadan haftalarca kullanılabilir. Çok iyi hazırlanmış "eşit bir çift" elektrot arasında < 1 mV'luk potansiyel farkı, < 0.1 mV/hr'lık kayma olması ve < 10 k Ω 'luk bir empedansın bulunması beklenmektedir.



Şekil 11. Ag-AgCl kayıt elektrodu.

3.5. Sukroz-Gap Aparatı

Pleksiglass kullanılarak yapılan sukroz-gap aparatı 5 bölümden oluşmaktadır. Sinirin geçmesi için yatay kanallar, vazelenin pompalanması içinde dikey kanallar açılmıştır. A bölümünde siniri uyarmak için kullanılan bir çift Ag-AgCl elektrot (S_1 , S_2) ve sinirin kurumasını önlemek için madeni yağ ile doldurulmuştur. B bölümüne ringer



Şekil 12. Sukroz Gap Aparatı.

3.6.1. Sukroz-Gap Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları

Sukroz-Gap Tekniğinin Avantajları

1. Tek bir lif yerine, etrafındaki bağ dokuları temizlenmiş bir sinir veya kas lifi demeti kullanılabilir.
2. Özel bir beceriye gerek yoktur, düzenek mikroeletrot tekniğine göre basittir.
3. Potansiyel değişimleri kolaylıkla kayıtlanabilir, ilaç veya iyonların zar veya aksiyon potansiyeline etkilerinin zamanla değişimi nicel olarak karşılaştırılabilir.

Sukroz-Gap Tekniğinin Dezavantajları

Hücre içi kayıt tekniğiyle tek lifte gerçek değerler ölçülebilirken, Sukroz-gap tekniğiyle sinir demetinde ölçülen potansiyellerin gerçek değerlerinden daha küçük olmasının nedenleri:

- 1) Kısa-devre çarpanı,
- 2) Kavşak potansiyelleri,
- 3) Sukroz bölgesinin hiperpolarize olmasıdır.
- 4) Çok uzun süreli kayıtlar için uygun değildir.

3.6.2. Kısa Devre Çarpanı

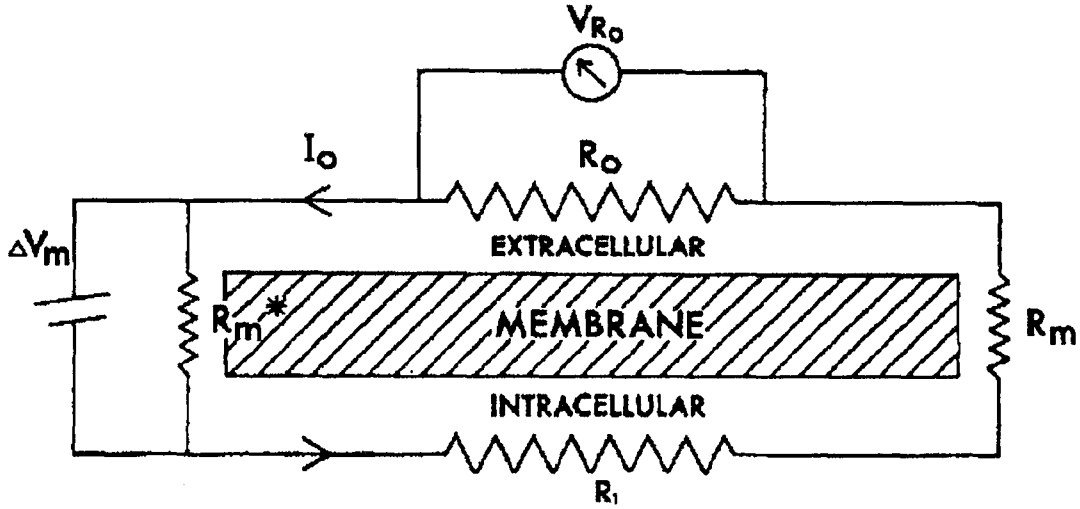
İletken özlü (core) biyolojik dokuların zar ve aksiyon potansiyellerinin gerçek değerleri, yalnız zarın depolarize veya yaralanmış kısmı ile normal kısmı arasındaki akım akışı, dış ortamın boyuna direnci artırılarak dış elektrotlarla ölçülebilir.

Farklı konsantrasyonlu sıvıların birleştiği arakesitte oluşan kavşak potansiyelleri ihmal edilirse, eşdeğer devre Şek.13'te görüldüğü gibi olur, iç (core) ve dış ortam arasındaki akım akışı dış elektrotlarla ölçülen zar potansiyelinin gerçek değerini

$$k = R_e / (R_e + R_i)$$

kısa devre çarpanı kadar düşürür, burada R_e ve R_i sırasıyla dış ve iç ortamların birim uzunluk başına boyca dirençlerini göstermektedir (Şekil 13). R_e 'in artması oranında kısa-devre çarpanı birime yaklaşmaktadır^(20,21,22).

$$I = \Delta V_m / (R_1 + R_o)$$



Şekil 13. Kavşak potansiyelleri ve sukroz bölgesindeki hiperpolarizasyon ihmal edilirse, dış elektrotlarla ölçülen potansiyel farkı (V_e), kısa devre çarpanına $[(R_e)/(R_e + R_i)]$ bağlı olur⁽²⁶⁾.

3.6.3. Kavşak Potansiyeli

İlaç etki mekanizması incelenirken, çoğunlukla iyon değiştirme deneyleri yapılır. Bu deneyler çözeltideki bir iyonun, eşit valanslı fakat farklı zar geçirgenliğine sahip bir iyonla değiştirilmesini içermektedir. Eşdeğer valanslı iyonlar çoğunlukla sulu çözeltilerde aynı hızda hareket etmezler ve mobilitedeki bu fark, elektrotça üretilen bir DC potansiyel kaynağı olabilir.

Kavşak potansiyellerini yok etmek çok zordur; bununla birlikte kayıt elektrotlarının ikisine de aynı anda değiştirilmiş Krebs çözeltisi koyarak veya preperat olmadan (preperat yerine pamuk sütür koyarak) kavşak potansiyelini ölçerek ve daha sonra da oluşan potansiyeli verilerden çıkararak ilaç indükli yanıtı veya zar potansiyeline (iyon) değiştirmenin etkisi bulunabilir^(2,20,22).

3.7. Sinirin Hazırlanması ve Yerleştirilmesi

Kılıfı yırtılan sinir demeti ringer içerisinde 6-8°C de yaklaşık bir gün bekletildikten sonra çalışmaya başlamadan önce çıkarıldı ve oda sıcaklığına gelmesi bekledi. Daha sonra iyonsuz izotonik izotonik sukroz çözeltisinde yaklaşık 20 dakika bekletildi ve ucundaki ipe takılan klavuz yardımıyla sukroz-gap aparatına uygun şekilde yerleştirildi.

3.8. Sinirin Uyarılma Modları

Maksimal uyarma

BAP genliğinin değişmediği durumda siniri uyaran elektriksel pulsun genliğine (şiddetine) maksimal uyaran (puls) ve bu olaya maksimal uyarma denir.

Supramaksimal Uyarma

Maksimal uyarı % 5-10 arttırılarak sinirin uyarılmasıdır.

Tonik Uyarma

Maksimal uyarı şiddetinin 1,5-2 kat artırılmasıyla sinirin çok seyrek (yaklaşık tek pulsla) uyarılmasıdır.

Fazik Uyarma

Tonik uyardıktan sonra sinirin farklı frekanslı ve belirli süreli ardaşık pulslarla uyarılmasıdır.

3.9. Uyarma Protokolü, Kayıt ve Gözlem

Tek uyarımlarında, sinir demeti supramaksimal olarak 50 μ s süreli kare pulslarla uyarıldı. Bir saatlik dengeleme periyodundan sonra, aparatın D bölümündeki ringer çözeltisi izotonik KCl ile değiştirildi ve 40-50 dakikalık dengelenme periyodundan sonra monofazik BAP ve BDP ler kayıtlanmaya başlandı.

Kontrol tonik cevaplarda sinir demeti tonik olarak 50 μ s süreli kare pulslarla uyarıldı, kontrol fazik uyarımlarda ise, sinir önce 10 Hz lik pulslarla 500 ms süresince

ardışık olarak uyarıldı, 5 dak. beklendi, tek pulsle geriye geldiği kontrol edildi, sonra 40 Hz lik pulslarla 500 ms süresince ardışık olarak tekrar uyarılarak fazik cevaplar kayıtları^(3,7).

Kontrol kayıtları alındıktan sonra test bölümüne ilaç konarak 35 dakika beklendi ve yukardaki protokole göre yeniden tonik ve fazik uyarımlar yapılarak cevaplar kayıtları.

Bölmelerdeki çözeltiler 2-3 ml/dak hızla perfüze edildi. Çalışmalar 22-24 °C oda sıcaklığında yapıldı ve çözeltilerin pH'ları NaOH ve HCl kullanılarak 7.4 te ayarlandı.

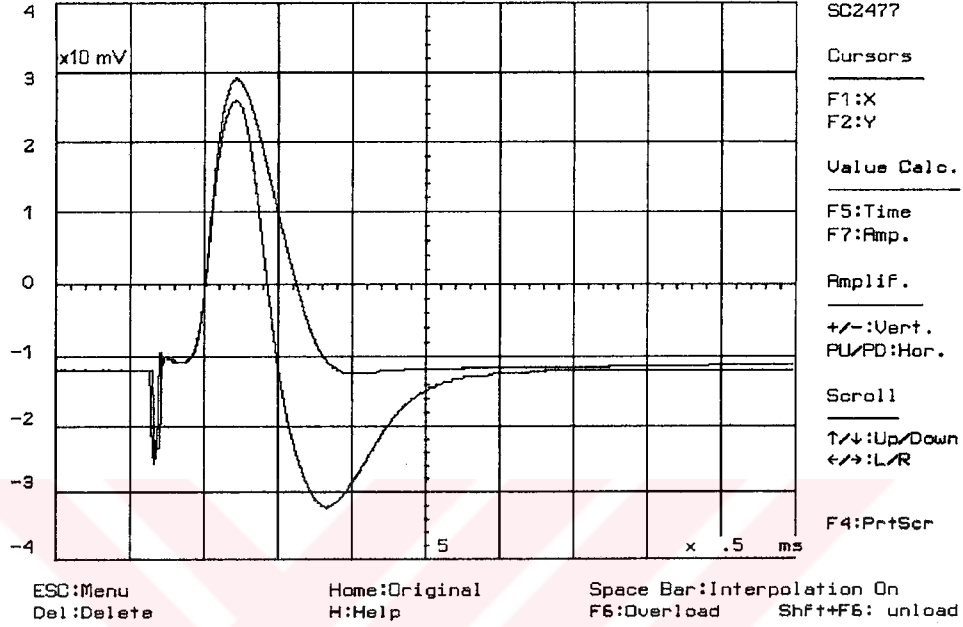
İstatistiksel değerlendirmede bağımlı student-t testi kullanıldı.

3.10. Bifazik ve Monofazik Aksiyon Potansiyelleri

Sukroz-gapta kayıtlanan bileşik aksiyon potansiyelinin (BAP) bifazik yapısı, diferansiyel amplifikatör girişlerinin (+ ve -) polarize olmasının bir sonucudur ve her bir aksonal birimin oluşturduğu aksiyon potansiyel şekillerinin gerçek bir yansımasını göstermemektedir. Hücre dışından kayıtlanan aksiyon potansiyelleri (Şek.14), en iyi şekilde, uyarma noktasından itibaren sinir boyunca hızlıca akan bir yüzey negatiflik dalgası olarak tanımlanmaktadır (aksiyon potansiyeli sırasında pozitif yüklü sodyum iyonlarının hücre içine akmasıyla, dış bölge negatif yüklü bir anyon tabakası olarak kalır). Bu negatiflik dalgası R_1 kayıt elektroduna (amplifikatörün anodal terminaline) ulaşınca, amplifikatörde bir pozitif çıktı ve giriş kutupları arasındaki fark güçlendirilince osiloskop ekranında yukarı doğru bir sapma oluşur.

Katodal kayıt elektroduna (R_2) ulaşan, yüzey dalgası amplifikatörün polaritesini tersine çevirdikçe zıt bir etki görülür ve osiloskobun izi aşağıya doğru sapar. Kayıt elektrotları arasındaki uzaklıkta BAP'nin genlik ve biçimini etkilemektedir. Herbir birimin iletim hızı, BAP'nin tepesinde ölçülen ortalama hız etrafında normal dağılıma uygun bir şekilde dağılmamaktadır, bu nedenle kayıtlanan ortalama hızdan hem daha yavaş hem de daha hızlı ileten aksonlar bulunmaktadır. Bu durumda, kayıt elektrotları arasındaki uzaklık minimal yapılıncaya, yavaş iletilen aksiyon potansiyelleri R_1 'i terketmeden, hızlı ileten aksonların aksiyon potansiyelleri ikinci kayıt elektroduna (R_2) ulaşırlar. bu, BAP'nin tepe ve düşme fazında parçalanmayı doğurur. Şekil 14 te görüldüğü gibi, BAP'nin genliği düşer, ortalama iletim hızı artar (latans küçülür) diferansiyel

amplifikatör tarafından tersine çevrilmiş dalga osiloskop izinde aşağıya doğru bir sapma oluşturur. Kısa kayıt uzaklıkları ve bifazik etkileşmelerle birlikte ortaya çıkan problemleri minimize etmek için, lokal anestezi veya izotonik potasyum klorür uygulamak veya kayıt elektrotları arasındaki siniri ezmek işlemlerinden birisi yapılarak, BAP'nin ikinci kayıt



Şekil 14. Hücre dışından kayıtlanan aksiyon potansiyelleri.

elektroduna (R_2) ulaşması engellenir ve bu şekilde aksiyon potansiyelleri normalde monopolar biçime çevrilirler (Şek.15).

Görüldüğü gibi aksiyon potansiyeli monofazik biçime döndükten sonra, yalnız tepe artıp, negatiflik azalmaz, aynı zamanda BAP'nin tepesinde sağa doğru kaymaktadır. iletim hızındaki bu açık düşüş, bifazik koşullarda yapılan diferansiyel kaydın özünde bulunan bir artifaktır. Bunun nedeni: kayıt elektrotları arasındaki uzaklığın, iletim sırasında BAP tarafından sinir üzerinde işgal edilen aktif uzunluktan, başka bir deyişle BAP'nin yayıldığı uzunluktan küçük olmasıdır.

Bifazik BAP'ni monofazik BAP şekline dönüştürmek için, genellikle ikinci kayıt elektrodunun bulunduğu bölüme izotonik KCl konmaktadır (Şek.15)⁽²⁵⁾.

3.11. Bileşik Dinlenim Potansiyelleri

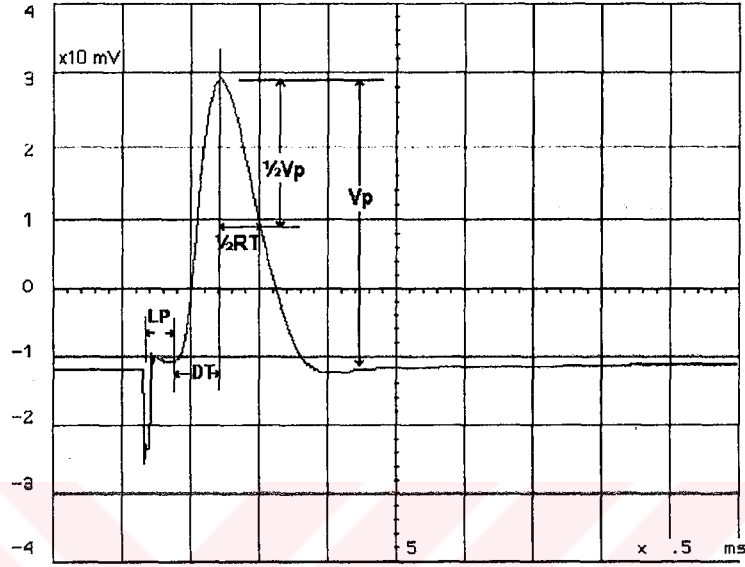
Sukroz-gap yöntemiyle kurbağa siyatik sinir demetinin Bileşik Dinlenim Potansiyeli (BDP) ölçülebilir. Bunun için, I. bölümden Ringer çözeltisi, II. bölümden (ortadan) izotonik sukroz çözeltisi ve III. bölümden de (test çözelti bölgesi) izotonik KCl çözeltisi akıtılmaktadır. I ve III. bölgelere yerleştirilen Ag-AgCl elektrotlarla potansiyel farkı ölçülmektedir. Test bölgesine ringer çözeltisi konduğu zaman iki taraf arasındaki potansiyel farkı $V = 0$ olmakta, test çözelti bölgesine izotonik KCl çözeltisi konunca bu bölge Ringere göre 50-70 mV negatif olmaktadır. İzotonik KCl çözeltisi zarı (0) değerine depolarize etmektedir. Bu nedenle KCl çözeltisi varken I ve III bölgeleri arasında bileşik dinlenim zar potansiyeli (BDP) kadar (-60 mV dolayında) bir potansiyel farkı oluşmaktadır⁽³²⁾.

3.12. Osiloskoba ve Bilgisayara Kayıt

Sinir demetinin uyarılmasıyla meydana gelen BAP'leri ve BDP leri digital storage osiloskobun birinci ve ikinci kanalında kayıtlıdır. BDP leri aynı anda pen recorder'e de çizdirildi. BAP'leri ise osiloskopta kayıtlandıktan sonra bilgisayara aktarıldı.

3.13. Analiz

Bilgisayara aktarılan BAP'leri, Bilgisayar Sinyal Analiz Programı (BİSİP) ile analiz edildi. BİSİP ile, BAP'nin genlik, latans, depolarizasyon zamanı ve yarı repolarizasyon zamanı parametreleri ölçüldü (Şekil 15).



Şekil 15. Monofazik aksiyon potansiyeli ve aksiyon potansiyeli parametreleri.

4. BULGULAR

Sukroz-gap yönteminde DC ve AC potansiyel farklarına perfüzyon ve asimetrinin etkileri Tablo II ve Şekil 16 da gösterilmektedir. Perfüzyonun etkisini belirlemek için, perfüzyon yapılmadan önce, B ve D bölümleri arasındaki potansiyel farkı mikroelettrot amplifikatörünün DC ayarıyla sıfıra getirildi. Sonra B, C veya D bölümlerinden yalnız birisi perfüze edildi ve bu koşullarda B ve D bölümleri arasında oluşan V_{BD} potansiyel farkı ve daha sonra B, C ve D nin üçü birlikte perfüze edildi ve oluşan V_{BD} potansiyel farkı kayıtları ve B+C+D olarak gösterildi. Şekil 16 dan perfüzyonun sıvı arakesitlerinde oluşan potansiyel farklarını değiştirdiğı ve simetriyi bozduğı görölmektedir.

Sukroz-gap bölümünün iki tarafındaki uzaysal asimetri E bölümüne makine yağı koymayarak ta oluşturuldu. Bu asimetrinin DC potansiyel farkında çok küçük (1-2 mV) bir değişme yaptığı gözlemlendi.

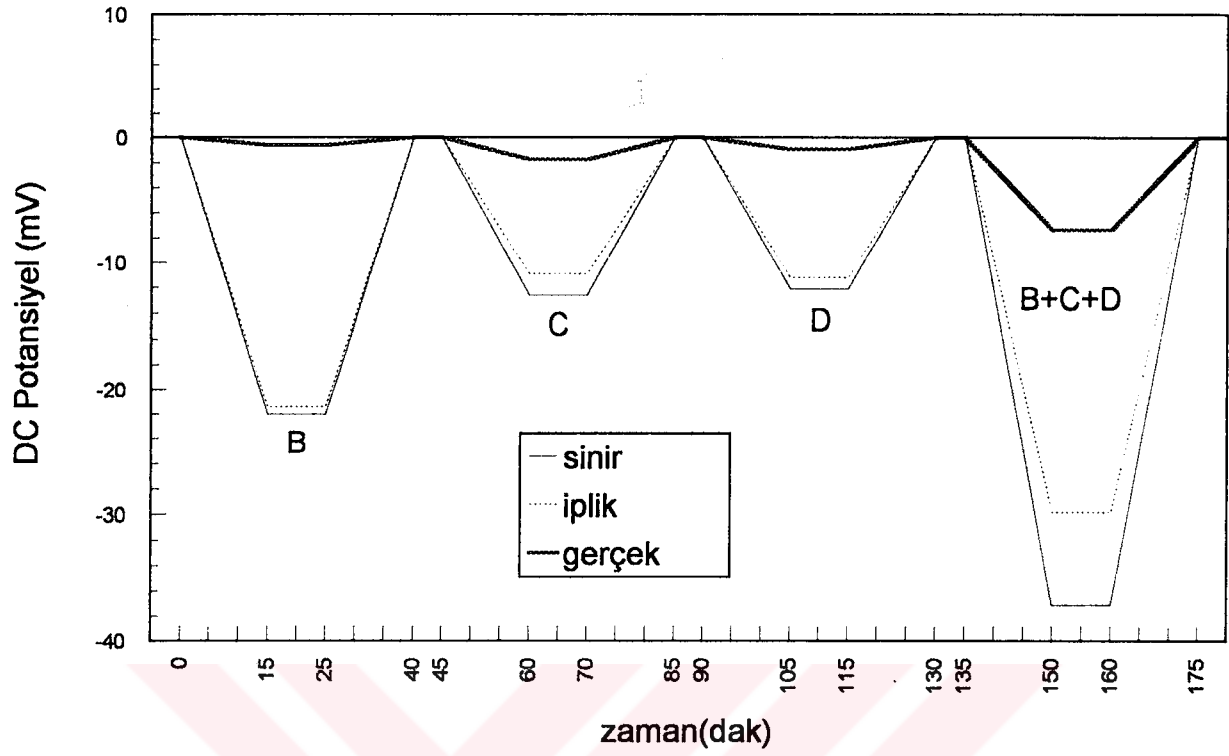
DC potansiyel farkının ne kadarının sinirden ve ne kadarının da elektrotların polarizasyonundan ve kavşak potansiyellerinden kaynaklandığını belirlemek için, sinir yerine pamuk ipliğı koyarak aynı deneyler tekrarlandı. Bu kayıtlar Şekil 16 da iplik olarak gösterildi. Sinir ve iplikli koşullarda kayıtlanan potansiyel değişimleri arasındaki farktan, perfüzyonun sinir zarında oluşturduğu gerçek etki belirlendi.

Sinir deneyleri 20 ve iplik deneyleri ise 6 preperatta yapıldı. İplik yerine işlev yapmayan (iletmeyen) sinir demetleri (6 adet) kullanıldı ve perfüzyon nedeniyle oluşan DC kaymalarının ipliktekilerle yaklaşık aynı olduğı görüldü.

Tablo II. Sinir, iplik ve gerçek DC potansiyelleri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

DC Potansiyel farkları (mV)					
	Perfüzyon yok	Perfüyon var			
		B	C	D	B+C+D
Sinir (n=20)	0	-22 $\pm$ 1.4	-12.6 $\pm$ 1.2	-12.1 $\pm$ 1.2	-37.1 $\pm$ 1.3
İplik (n=12)	0	-21.4 $\pm$ 1.2	-10.6 $\pm$ 0.7	-11.1 $\pm$ 0.9	-29.8 $\pm$ 1.9
Gerçek	0	-0.6	-2.0	-1.0	-7.3

Perfüzyonun DC potansiyel değişimlerine etkileri.



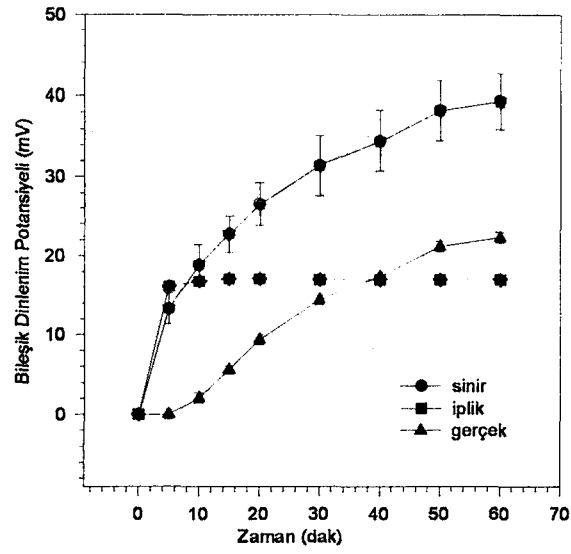
Şekil 16. Sinir ve iplikte ölçülen DC potansiyel değişimleri ve bunların farkının alınmasıyla bulunan gerçek DC potansiyeller.

Perfüzyon ile bölümlerdeki iyon konsantrasyonları ve bölümler arasındaki kavşak potansiyelleri değiştiğinden, doğal olarak ölçülecek dinlenim zar potansiyeli de değişecektir. Perfüzyonlu ve perfüzyonsuz koşullarda ölçülen dinlenim zar potansiyelinin zaman içindeki değişimleri Tablo III, Şekil 17 ve Şekil 18 de gösterilmektedir.

Tablo III. Sukroz-gap aparatının D bölümüne izotonik KCl çözeltisinin konmasıyla ölçülen BDP'ler. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

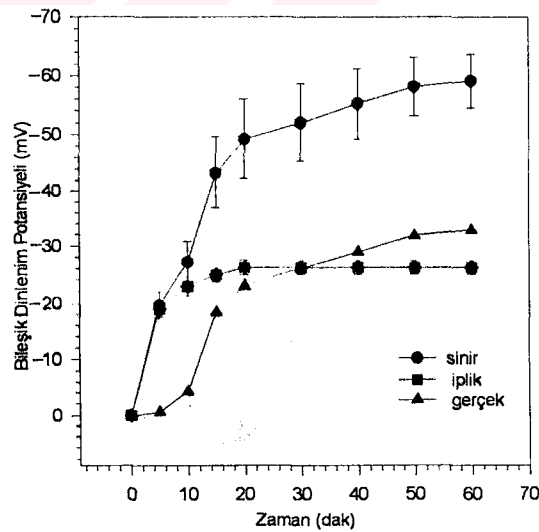
	BDP (mV)	
	Perfüzyon yok	Perfüzyon var
Sinir (n=12)	-39.3 $\pm$ 3.1	-59.1 $\pm$ 4.6
İplik (n=6)	-17 $\pm$ 0.6	-26.2 $\pm$ 1.2
Gerçek	-22.3	-32.9

BDP (perfusyonun yapılmadığı şartlarda)



Şekil 17. D bölümüne isotonik KCl koyduktan sonra BDP -22.3 mV olarak ölçüldü.

BDP (perfüzyon yapıldığı şartlarda)

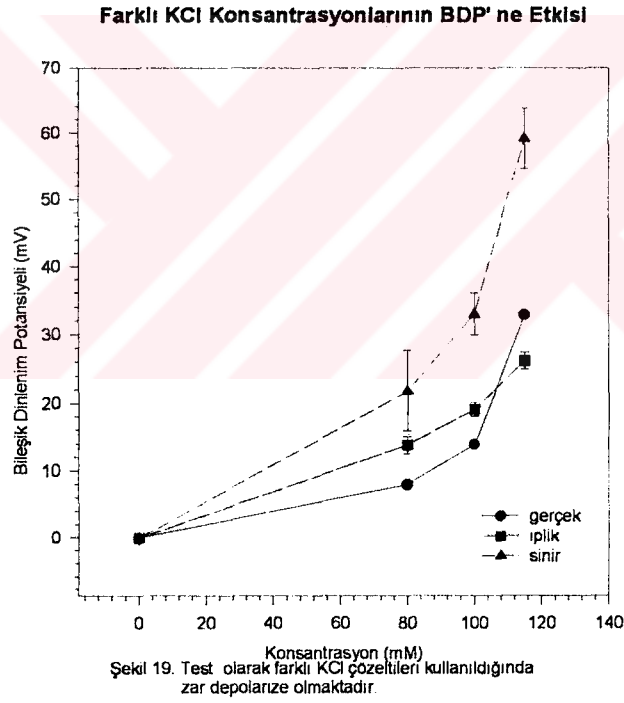


Şekil 18. D bölümüne isotonik KCl koyduktan 60 dak. sonra gerçek BDP -32.9 mV olarak ölçüldü. -32.9 mV BDP nin kontrol değeri olarak kabul edildi.

Ekstrasellüler KCl konsantrasyonu ile dinlenim zar potansiyelinin değişimi Tablo IV ve Şekil 19 da gösterilmektedir.

Tablo IV. Farklı KCl konsantrasyonlarının, bileşik dinlenim potansiyellerine (BDP) etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. ($P < 0.001$)

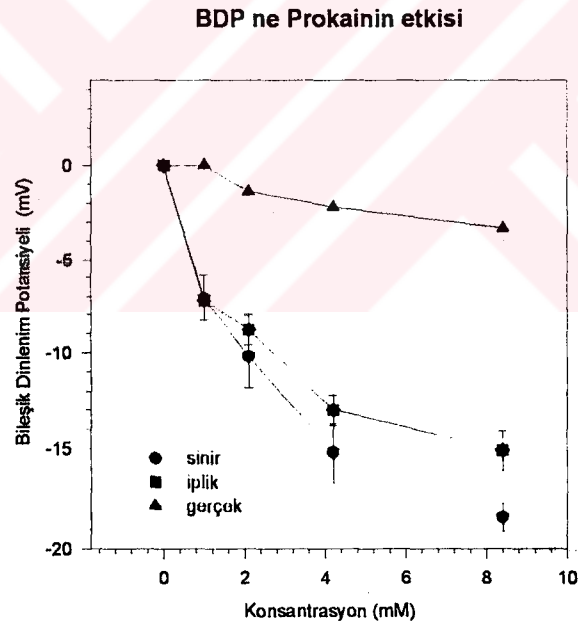
	BDP (mV)		
	80 mM KCl	100 mM KCl	115 mM KCl
Sinir (n=12)	21.8 $\pm$ 5.9	33 $\pm$ 3	59.1 $\pm$ 4.6
İplik (n=8)	13.8 $\pm$ 1.3	19.1 $\pm$ 1.4	26.2 $\pm$ 1.2
Gerçek	8.0	13.9	32.9



Prokain ve Lidokainin BDPne etkileri Tablo V, Şekil 20 ve Şekil 21 de gösterilmiştir.

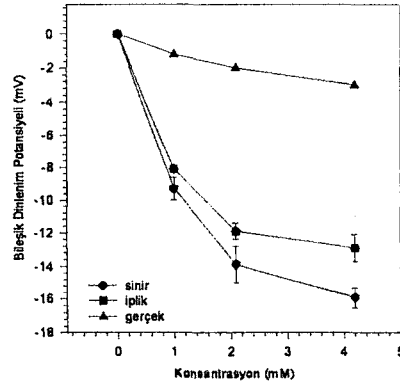
Tablo V. Prokain ve lidokain konsantrasyonunun BDP'ne etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

	BDP (mv)						
	Prokain (mM) (n=24)				Lidokain (mM) (n=18)		
	1	2.1	4.2	8.4	1	2.1	4.2
Sinir	-7.1 $\pm$ 1.2	-10.2 $\pm$ 1.6	-15.2 $\pm$ 1.5	-18.4 $\pm$ 0.7	-9.3 $\pm$ 0.7	-13.9 $\pm$ 1.1	-15.9 $\pm$ 0.6
İplik	-7.2 $\pm$ 0.3	-8.8 $\pm$ 0.8	-13 $\pm$ 0.8	-15.1 $\pm$ 1	-8.1 $\pm$ 0.1	-11.9 $\pm$ 0.5	-12.9 $\pm$ 0.8
Gerçek	-0.1	-1.4	-2.2	-3.3	-1.2	-2.0	-3.0



Şekil 20. Farklı prokain konsantrasyonları BDP ni çok az değiştirmektedir.

BDP ne lidokainin etkisi



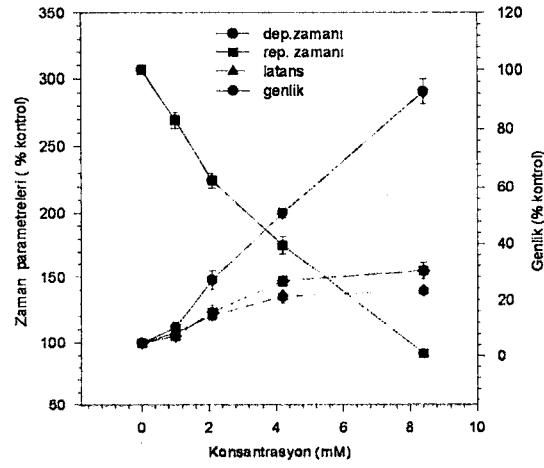
Şekil 21. BDP, lidokain konsantrasyonlarına bağlı olarak çok az değişmektedir.

Prokain ve lidokainin BAP parametrelerine etkisi Tablo VI, Şekil 22 ve Şekil 23 te gösterilmiştir.

Tablo VI. BAP parametrelerine prokain ve lidokain konsantrasyonlarının etkisi (V= Genlik, L= Latans, T_{DE}= Depolarizasyon zamanı, ½T_{RE}= Yarı repolarizasyon zamanı). Değerler % ortalama ±SD olarak verilmiştir. (*P>0.05, diğerleri P<0.001)

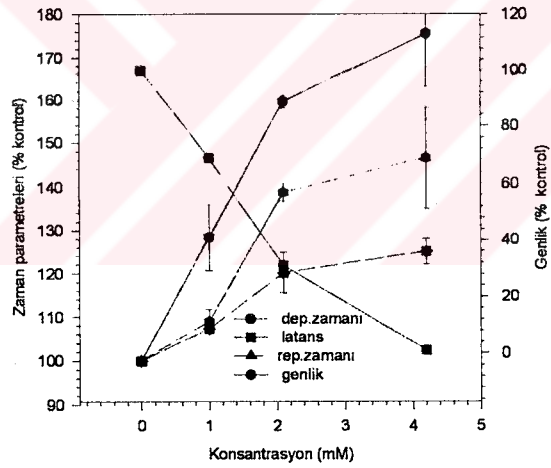
Konsant. (mM)	Prokain (n=24)				Lidokain (n=18)			
	V	L	T _{DE}	½T _{RE}	V	L	T _{DE}	½T _{RE}
kontrol	100	100	100	100	100	100	100	100
1	83.0± 2.8	107.7± 1.2 *	111.7± 4.2	105.1± 1.9	68.8± 1.5	107.7± 0.5 *	128.4± 7.7	109.0± 2.7
2.1	62.3± 2.6	121.0± 3.4 *	147.7± 7.4	123.6± 5.7	30.8± 1.6	120.2± 4.6 *	159.7± 1.4	138.9± 2.1
4.2	39.5± 3.1	135.4± 5.1 *	200.0± 3.8	146.9± 3.8 *	1.0± 0.04	125.1± 3.0 *	175.6± 12.6	146.6± 11.6 *
8.4	1.1± 0.05	139.6± 1.3	290± 9.1	154.8± 6.6				

BAP parametrelerine prokainin etkisi

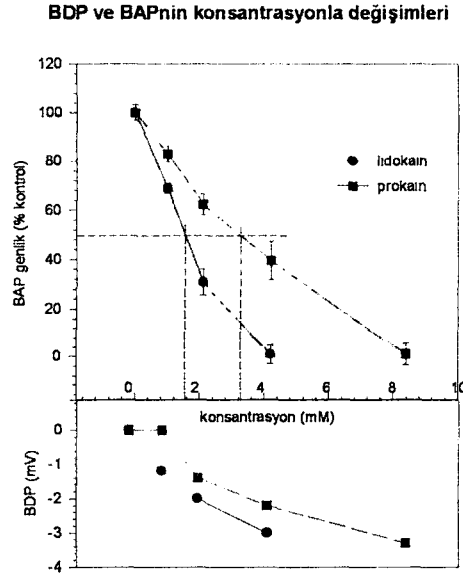


Şekil 22. Prokain konsantrasyonu ile BAP parametrelerinin değişimleri

BAP parametrelerine lidokainin etkisi



Şekil 23. Lidokain konsantrasyonu ile BAP parametrelerinin değişimleri



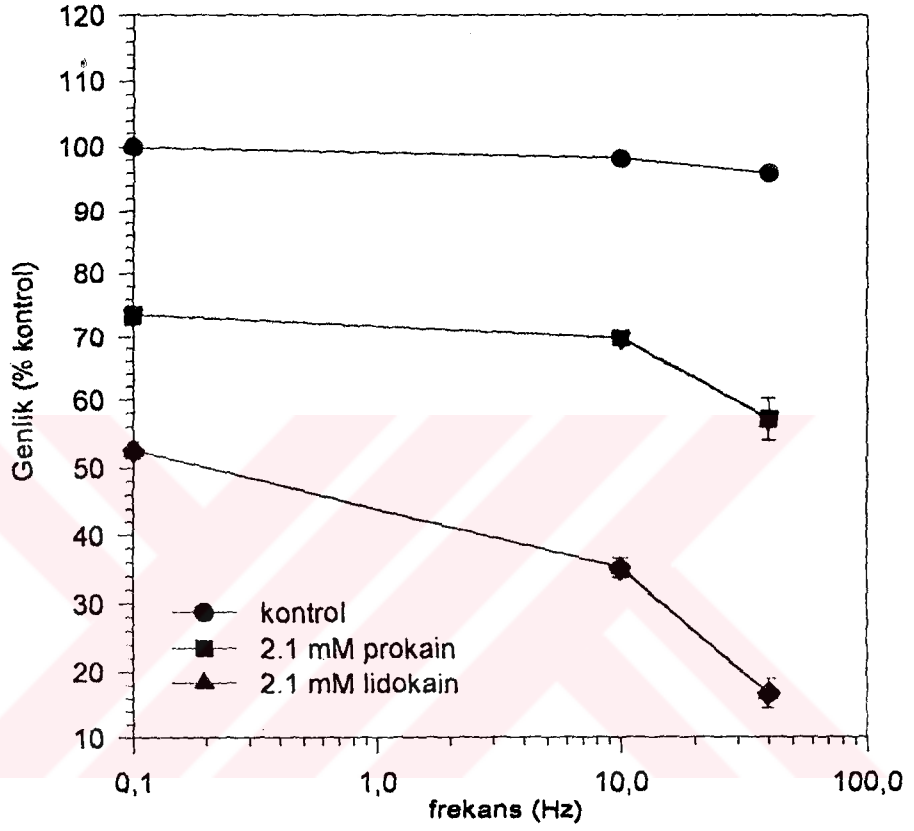
Şekil 24. BAP genliğine ve BDPne prokain ve Lidokainin konsantrasyona bağlı etkileri.

Siyatik sinir demetlerinin tonik (0 Hz) ve fazik (10 Hz ve 40 Hz) uyarımlarında 2.1 mM prokain ve lidokain konsantrasyonlarının BAP genliği üzerine frekansa bağlı etki Tablo VII ve Şekil 25 te gösterilmiştir.

Tablo VII. 0.10 ve 40 Hz frekanslarda BAP genliğinin 2.1 mM prokain ve lidokain konsantrasyonlarında değişimi. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. (* $P>0.05$, diğerleri $P<0.001$)

konsant (mM)	0 Hz (n=10)		10 Hz (n=10)		40 Hz (n=10)	
	Genlik (mV)	Blokaj (%)	Genlik (mV)	Blokaj (%)	Genlik (mV)	Blokaj (%)
kontrol	60.7 $\pm$ 3.2*	0	59.5 $\pm$ 2.7*	1.7 $\pm$ 0.2	58.4 $\pm$ 2.6*	3.9 $\pm$ 1.1
2.1 Prokain	44.3 $\pm$ 5	26.4 $\pm$ 1.4	31 $\pm$ 5.8	30 $\pm$ 1.2	25 $\pm$ 6.6	43 $\pm$ 3.2
2.1 Lidokain	31.3 $\pm$ 5	47.3 $\pm$ 1.2	21.3 $\pm$ 4.6	64.9 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 2.4	84.3 $\pm$ 2.2

Frekansa bağı olarak genliğin değişmesi



şekil 25. Tonik ve frekansa bağı olarak BAP nin genliği azalmaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sukroz-gap aparatında, bölümlerdeki farklı iyonik kompozisyonlu çözeltiler arasında oluşan kavşak potansiyelleri, sukroz bölgesindeki sinirin hiperpolarize olması, elektrotların özdeş olmamaları, farklı iyonik çözeltilerde elektrotların elektrot potansiyellerinin farklı olmaları ve sukroz bölgesinin her iki tarafının özdeş olmaması (asimetri) nedenleriyle B ve D bölümleri arasında bir DC potansiyel farkı (V_{BD}) oluşmaktadır^(2,20,21,22). Bu potansiyel farkı bölümlerdeki çözeltilerin perfüze edilmesiyle de değişmektedir. Örneğin perfüzyonsuz durumda yaklaşık 0 mV iken, çözeltiler 2-3 ml/dk hızda perfüze ettirilmeye başlanınca -7,3 mV'a düşmektedir (Tablo II, Şekil 12).

Gözlenen DC potansiyel değişimlerine ve BDP'ne elektrot potansiyeli, perfüzyon, asimetri ve yukarıda belirtilen diğer bileşenlerinin katkılarını yok etmek için, sinir demeti ile aynı koşullarda tutulan pamuk ipliğinde de ölçüm alındı ve aradaki farktan gerçek potansiyel değişimleri belirlendi⁽²⁵⁾.

Aparatın D bölümüne izotonik KCl çözeltisi konduktan sonra, perfüzyonlu ve perfüzyonsuz şartlarda BDP leri ölçüldü. Perfüzyonlu durumda sinirde $V_s = -59.1$ mV olarak ölçülen potansiyelden, yukarıda belirtilen etkilerden meydana gelen $V_i = -26.2$ mV luk potansiyel çıkarıldığı zaman, gerçek BDP, $V_g = -32.9$ mV olmaktadır. Sinirlerde dinlenim zar potansiyelinin mikroelettrotla ölçülen değeri ise -70 mV'tur⁽²⁹⁾. Perfüzyonsuz şartlarda ise $V_g = -22.3$ olarak ölçüldü (Tablo III ve Şekil 13, 14).

Sukroz-gap yöntemiyle 54.6 mV genlikli BAP ölçülebilmektedir. 0.78 değerindeki kısa-devre çarpanı ile gerçek değer $54.6/0.78 = 70$ mV olmaktadır. Bu değere yaklaşık 6 mV'luk düzeltme değerinin eklenmesiyle 76 mV bulunur. Bu değer 100 mV dolayında olan gerçek değerden daha küçüktür. Bunun nedeni muhtemelen kısa-devre çarpanının $100-6 = 94 \rightarrow 54.6/94 = 0.58$ gibi oldukça küçük olmasıdır. Lf sayısı azaltıldıkça ve izolasyon daha iyi yapıldıkça kısa-devre çarpanı, birime doğru yaklaşacaktır^(2,20,21,22).

Bileşik sinir aksiyon potansiyeli ve bileşik dinlenim potansiyeline ait kontrol değerleri $V = 54.6 \pm 6.3$ mV, $T_L = 0.280 \pm 0.1$ ms, $T_{DE} = 0.408 \pm 0.5$ ms, $\frac{1}{2}T_{RE} = 0.416 \pm 0.5$ ms ve BDP = -32.9 mV olarak ölçüldü.

Lokal anestezikler sinir zarındaki sodyum kanallarını bloke etmektedir. Tek sinir lifi ile yapılan voltaj-klamp çalışmalarında, sinir zarının iç bölgesinde sodyum kanalları ile anestezik moleküllerin birbirlerini direkt olarak etkiledikleri ve lokal anestezik moleküllerin, sinir impuls oluşumuna yol açan sodyum iyonlarının zardan geçişlerini engelleyerek sinir iletimini bloke ettikleri belirlenmiştir. İskelet kası ile yapılan çalışmalarda ise lokal anesteziklerin iletimi bloke eden konsantrasyonlarda zarı depolarize etmediği görülmüştür. Lokal anestezikler yüksek konsantrasyonlar hariç, dinlenim potansiyelini etkilemezler^(3,24,33,34).

Tek stimulus uyarımlarında, prokain ve lidokainin, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak BAP'ın genliğine (V), depolarizasyon zamanına (T_{De}), yarı-repolarizasyon zamanına ($\frac{1}{2}T_{Re}$) ve latans'a (T_L) olan etkileri Tablo VI ve Şekil 18,19,20 de gösterilmiştir.

Prokain, BAP genliğini 8.4 mM konsantrasyonda bloke ederken, lidokain 4.2 mM konsantrasyonda bloke etmektedir. Prokain ve lidokainin yüksek konsantrasyonlarda, BDP ni çok az etkilediği bulundu (Tablo V ve Şekil 16,17,20). Çalışmamızda kullandığımız lokal anesteziklerden prokain ve lidokain doza bağlı olarak BAP'ın genliğini azaltması, zar sodyum iletkenliğinin düşmesi sonucunda olmaktadır. BAP genliğiyle birlikte depolarizasyon süresinin ve latans'ın uzaması sodyum kanallarının bir kısmının kapalı olduğunu ve kanal kapılarının açılma-kapanma kinetiklerinin yavaşladığını göstermektedir. $\frac{1}{2}T_{Re}$ süresinin uzaması ise potasyum kanallarının da prokain ve lidokainden etkilendiğini ve kanal kapılarının açılma-kapanma sürelerinin uzadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu anestezikler sodyum inaktivasyon kapısının kapanma hızını yavaşlatmış ve BAP'ın toplam süresini uzatmıştır.

Tablo 6 ve Tablo 7'de supramaksimal ve tonik uyarılarda blokajların aynı olmadığı görülmektedir. Örneğin 2,1 mM prokainin supramaksimal ve tonik uyarılarda oluşturduğu blokaj sırasıyla % 37.7 ve % 26.4'tür. Aynı uyarıların 2.1 mM Lidokain konsantrasyonunda oluşturduğu blokajlar ise sırasıyla % 69.2 ve % 47.3'tür. Bu sonuçlar a) Prokain ve lidokainin sinirlerde uyarılma eşiğini yükselttiğini ve b) Lidokainin prokainden daha güçlü bir lokal anestezik olduğunu göstermektedir.

Şekil 22 ve Şekil 23'ten prokain ve lidokainin EC_{50} dozları sırasıyla 3.5 ve 1.5

mM bulunur. Bu sonuç, lidokainin prokainden yaklaşık 2.3 kat daha güçlü bir lokal anesteziği olduğunu göstermektedir.

Lokal anesteziğlerin, kısmi blok yapan konsantrasyonlarda aksiyon potansiyeli genliğı veya içe yönelik sodyum akımında yaptığı düşmenin maksimumu, stimulasyon frekansı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Kullanıma bağılı olarak lokal anesteziğlerin meydana getirdiğı blokaj değışebilmektedir: Örneğın lokal anesteziğlerin kısmi blok yapan konsantrasyonları sinirde düşük frekanslı stimuluslarda iletimi bloke etmediğı halde, yüksek frekanslı stimuluslarda iletimi bloke edebilmektedir. Yüksek frekans, sodyum kanallarının yüksek affinitede aktif ve inaktif durumda kalmasının toplam süresini artırır ve böylece ilaç moleküllerinin daha fazlasının etki yerine bağılı kalmasını sağlar. Stimulasyon kesilince moleküller, etki yeri olan sodyum kanallarından uzaklaşır^(3,5,7,8,10,30,31,33).

Tonik olarak sinir demeti uyarıldığında, tonik blokaj (0 Hz), 2.1 mM prokain konsantrasyonunda % 26.4 iken, 2.1 mM lidokain konsantrasyonunda % 47.3 olarak bulundu. Sinir demeti 10 Hz frekanslı pulslarla fazık olarak uyarılırken, 2.1 mM prokain konsantrasyonu tonik blokajı % 30'a, 2.1 mM lidokain konsantrasyonu ise % 64.9'a yükseltmektedir. Sinir demeti 40 Hz frekanslı pulslarla fazık olarak uyarılırken, 2.1 mM prokain konsantrasyonu tonik blokajı % 43.2'ye, 2.1 mM lidokain konsantrasyonu ise % 84.3'e yükseltmektedir (Tablo VII ve Şekil 21).

Test çözeltisi olarak kullanılan lokal anesteziğlerden prokain ve lidokainin tonik uyarana göre frekansa bağılı uyarmalarda BAP'ın genliğini daha fazla düşürmesinin nedeni; frekansa bağılı stimulusların Na kanallarının aktif ve inaktif durumda kalma süresini artırması ve bunun sonucunda etki yerine daha fazla ilaç molekülünün bağılı kalmış olmasıdır^(3,7,8,31,33,34).

Sonuç olarak, sukroz-gap tekniğı ile BDP ve BAPlerinin zamana bağılı değışiklikleri ölçülebilmekte ve farklı konsantrasyonlu çözeltilerin blokaj etkileri karşılaştırılabilmektedir. Sukroz-gap tekniğı ile tekrarlanabilir, düşük parazitli, diğerk ekstrasellüler kayıtlardan daha büyük genlikli potansiyeller kayıtlanabilmektedir.

Prokain ve Lidokain BAP iletimini bloke etmekte, fakat dinlenim potansiyelini çok az etkilemektedir. Lokal anesteziğlerin blokaj etkileri uyarı frekansıyla değışmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bainton CR, Strichartz GR: Concentration dependence of lidocaine-inducer irreversible conduction loss in frog nerve. **Anesthesiology** 1994, 81:657-667.
2. Blaustein MP, and Goldman D.E.: Origin of axon membrane hyperpolarization under sucrose-gap. **Biophysical J.** 1966, 6:453-469.
3. Bokesch PM, Post,C, and Strichartz G: Structure-activity relationship of lidocaine homologs producing tonic and frequency-dependent impulse blockade in nerve. **The J Pharmacol Exp Ther.** 1986, 237:773-781.
4. Butterworth JF, Lief PA, Strichartz GR: The pH-dependent local anesthetic activity of diethyl aminoethanol, a procaine metabolite. **Anesthesiology** 68:501-506 1988.
5. Chernoff DM: Kinetic analysis of phasic inhibition of neuronal sodium currents by lidocaine and bupivacaine. **Biophysical J.** 1990, 58:53-68.
6. Chernoff DM and Strichartz GR: Kinetics of local anesthetic inhibition of neuronal sodium currents. **Biophysical J.** 1990, 58:69-81.
7. Courtney KR, Kendig JJ, Coher EN: Frequency-dependent conduction block:The role of nerve impulse pattern in local anesthetic potency. **Anesthesiology** 1978, 48:111-117.
8. Courtney KR. Mechanism of frequency-dependent inhibition of sodium currents in frog myelinated nerve by the lidocaine derivative GEA 968. **J Pharmacol Exp Ther.** 1978, 195:225-235.
9. Catterall, W.A.: Structure and Function of Voltage Sensitive Ion Channels. **Science** 1988, 242:50.
10. Covino, B.G.: Systemic Toxicity of Local Anesthetic Agents. **Anesth Analg** 1978, 57:387.
11. Çelebi G: Biyofizik. Ege Üniv.Tıp Fak. Biyofizik ABD. 1993.
12. Diamond BI, Havdala HS,Sabelli HC, Differential membrane efferent of general and local anesthetics. **Anesthesiology** 1975, 43(6):651-660.
13. Dipalma JR and Digregoria GJ.: Basic Pharmacology in Medicine. Third edition, 1990.

14. Drachman D, Strichartz G.: Potassium channel blockers potentiate impulse inhibition by local anesthetics. **Anesthesiology** 1991, 75:1051-1061.
15. Franz D.N and Perry R.S.: Mechanisms for differential block among single myelinated and non myelinated axons by procaine. **J Physiol** 1974, 236:193-210.
16. Ganong W.F.: Tıbbi Fizyoloji 16. Baskı, 1995.
17. Guyton A.C: Tıbbi Fizyoloji. 1. Baskı, 1986.
18. Hille B.: Ionic channels of excitable membranes. 1984.
19. Inoue, F. and Frank GB: Action of procaine on frog skeletal muscle. **J.Pharm.Exp.Ther.** 1961, 136:190-196.
20. Jirounek. P, Jones GJ, Burckhardt CW, Straub RW.: The correction factors for sucrose-gap measurements and their practical applications. **Biophysical J.** 1981, 33:107-120.
21. Jirounek .P and Straub RW.: The potential distribution and short-circuiting factor in the sucrose-gap. **Biophysical J.** 1971, 11:1-110.
22. Julian F.J., Moore J and Goldman D.E.: Membrane Potentials of the lobster Giant axon obtained by use of the sucrose-gap technique. **J Gen Physiology** 1962, 45:1195-1216.
23. Katz Bernard: Sinir Kas ve Sinaps. 1966
24. Kayaalp S.O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2.Cilt, 7.Baskı, 1995, s:1718-1737.
25. Marsh, S : Extracellular recording from rat sympathetic ganglia and whole nerve bundles. *Methods in Experimental Physiology and pharmacology.* **Biol Measur Tech** 1989, 6:12-16.
26. Narahashi T.: Ion channels. Vol.3, 1992.
27. Parçin AS., Cantürk M., Obuz V.: Ankara Farmakoloji Notları. 2.Baskı, 1992.
28. Pehlivan F.: Biyofizik. A.Ü.Tıp Fakültesi, Ankara, 1989.
29. Rando T.A Wang GK, and Strichartz GR: The interaction between the activator agents batrachotoxin and Veratridine and the gating processes of neuronal sodium channels. **Molecular Pharmacology** 1986, 29:467-477.

30. Saito H, Akutaigawa T, Kitahata LM, Staqq D, Collins JG, Scurlock JE: Interactions of lidocaine and calcium in blocking the compound action potential of frog sciatic nerve. **Anesthesiology** 1984, 60:205-208.
31. Son SL, Wang GK, Concus A, Crill E, Strichartz G : Stereoselective inhibition of neuronal sodium channels by local anesthetics. **Anesthesiology** 1992,77:324-35.
32. Stampfli R.: A new wethod for measuring potentials with external electrodes. **Experientia** 1954, 10:508-509.
33. Starmer CF, Grant AO and Straus HC.: Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local ansthetics. **Biophysical J.** 1984, 46:15-27.
34. Strichartz G: Molecular mechanisms of nerve block by local anesthetics. **Anesthesiology** 1976, 45:421-441.
35. Strichartz GR: The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. **J General Physiol** 1973, 66:37-57.
36. Strobel GE and Bianchi P.: The effects of pH gradients on the action of procaine and lidocaine in intact and desheated sciatic nerves. **J Pharmacol Exp Ther** 1970, 172(1):1-17.
37. Wildsmith JAW, Gissen AJ, Gregus J, Covino BG: Differential nerve blocking activity of amino-ester local anesthetics. **Br J Anaesth.** 1985, 57:612-620.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Adana'da doğdum. İlk öğrenimimi Baklalı Köyü İlkokulu, orta öğrenimimi Cumhuriyet Ortaokulu ve lise öğrenimimi Adana Karşıyaka Lisesi'nde tamamladım. 1989 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nü kazandım. Aynı yerden 1993 yılında mezun oldum. 1994 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Aynı yılda Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nın açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak lisansüstü eğitime başladım. Halen Ç.Ü. Tıp Fak. Biyofizik Anabilim Dalında çalışmaktayım. Evliyim ve bir çocuk sahibiyim.

