



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOHLEAR ÇEKİRDEKTE BULUNAN YILDIZ VE ÇALI
NÖRONLARINDA ASİTE DUYARLI İYON KANALLARININ
(ASIC) İNCELENMESİ

Ziya ÇAKIR
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ramazan BAL

Gaziantep
2018



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOHLEAR ÇEKİRDEKTE BULUNAN YILDIZ VE ÇALI
NÖRONLARINDA ASİTE DUYARLI İYON KANALLARININ
(ASIC) İNCELENMESİ

Ziya ÇAKIR
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ramazan BAL

Gaziantep
2018

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

KOHLER ÇEKİRDEKTE BULUNAN YILDIZ VE ÇALI
NÖRONLARINDA ASİTE DUYARLI İYON KANALLARININ
(ASIC) İNCELENMESİ

ZİYA ÇAKIR

Tez Savunma Tarihi: 11.07.2018
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 tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan BAL
Tez Danışmanı

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

Tez Jürisi
Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK
Prof. Dr. Ramazan BAL
Dr. Öğr. Üyesi Davut Sinan KAPLAN
Dr. Öğr. Üyesi Burçin ALTINBAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Caner YILDIRIM

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.

11.07.2018

Ziya ÇAKIR



TEŞEKKÜR

Doktora yaptığım süre boyunca engin tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, her bilim insanına örnek olabilecek, bilimsel çalışma disiplini yaşayarak gösteren ve bana çalışmalarımda ufuk açan değerli hocam **Prof. Dr. Ramazan BAL'a**,

Doktora eğitimim boyunca rehberliğini ve desteğini esirgemeyen, engin bilgilerinden faydalandığım hocam **Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK'e**,

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden, bilimsel birikimlerinden faydalandığım hocam **Dr. Öğr. Üyesi Davut Sinan KAPLAN'a**,

Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışmalarımızın yapılmasını sağlayan Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapan hocam **Doç.Dr. Ebru ÖNALAN** ve çalışma ekibine,

Bu tez çalışmasının yapılmasında katkılarından dolayı kardeşim **Dr. Öğr. Üyesi Caner YILDIRIM'a**, yazılması sırasında yardım ve katkılarından dolayı bölüm arkadaşlarım; abim **Mehmet GÖL** ve kardeşim **Beytullah ÖZKAYA'ya**,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü sıkıntımıza katlanan **Deney Hayvanları Araştırma Birimi** çalışanlarına,

Beni bugünlere getiren, yıllardır verdikleri emek ve yaptıkları fedakârlıklardan dolayı borçlarını asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme; ayrıca tüm bu çalışmalar boyunca beni her koşulda fedakârca destekleyen sevgili eşim **Gülây**, canım çocuklarım **Erol Berkay** ve **Beren ÇAKIR'a** sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF. DT.17.46 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Kohlear çekirdek.....	3
2.1.1. Kohlear çekirdek anatomisi.....	3
2.1.1.1 Ventral kohlear çekirdek.....	4
2.1.1.1.1 Anteroventral kohlear çekirdek.....	5
2.1.1.1.2 Posteroventral kohlear çekirdek.....	6
2.1.1.2. Ventral kohlear çekirdekde bulunan hücre tipleri.....	6
2.1.1.2.1. Yıldız hücrelerinin karakteristik özellikleri.....	6
2.1.1.2.2. Çalı hücrelerinin karakteristik özellikleri	7
2.1.1.2.3. Ahtapot hücrelerinin karakteristik özellikleri	8
2.1.1.3 Ventral kohlear çekirdeğe gelen sinyaller	8
2.1.1.2. Dorsal kohlear çekirdek.....	9
2.1.2. Kohlear çekirdek fizyolojisi.....	10
2.1.3. Kohlear çekirdeğin tonotopik organizasyonu	10
2.1.4. Kohlear çekirdekde karakterize edilen iyon kanalları	11
2.2. Asit Duyarlı İyon Kanalları	14
2.2.1. Giriş.....	14
2.2.2. Asit duyarlı iyon kanalı 1.....	16
2.2.3. Asit duyarlı iyon kanalı 2.....	18
2.2.4. Asit duyarlı iyon kanalı 3.....	19

2.2.5. Asit duyarlı iyon kanalı 4.....	19
2.2.6. Asit duyarlı iyon kanallarının farmakolojisi	19
2.2.6.1. Hayvan kaynaklı peptid toksinler	20
2.2.6.2. Nöropeptidler	20
2.2.6.3. Organik bileşikler	21
2.2.6.4. İki ve üç değerlikli katyonlar	21
2.2.7. İşitme sisteminde asit duyarlı iyon kanalları.....	22
3. Gereç ve Yöntem	23
3.1. Giriş	23
3.1.1. Yama kenetleme (Patch clamp) tekniği.....	23
3.1.2. Yama kenetleme (Patch clamp) düzeneği	24
3.2. Araştırma Protokolü.....	26
3.2.1. Real time-polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları	26
3.2.2. Yama kenetleme çalışmaları	28
3.2.2.1. Kohlear çekirdek dokusu kesitlerinin hazırlanması.....	28
3.2.2.2. Kohlear çekirdek dokusundan yama kenetleme kayıtlarının alınması	29
3.2.2.3. Kohlear çekirdek dokusundaki hücrelerin tanımlanması.....	29
3.3. Hızlı perfüzyon sistemi	30
3.4. Solüsyonlar	31
3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	33
4. Bulgular	34
4.1. Real time-polimeraz zincir reaksiyon sonuçları	34
4.2. Yama kenetleme (patch clamp) bulguları.....	35
4.2.1. Voltaj kenetleme bulguları	35
4.2.1.1 Yıldız tipi nöronlarda düşük hücre dışı pH ile aktiflenen ASIC akımları.....	36
4.2.1.1.1 Farkı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi	36
4.2.1.1.2. Amilorid'in yıldız nöronlarındaki ASIC akımı üzerine etkisi	37
4.2.1.1.3. Yıldız nöronlarındaki ASIC'lerin sodyum iyonuna geçirgenliği.....	39
4.2.1.1.4. Kalsiyum iyonunun yıldız nöronlarındaki ASIC'ler üzerine etkisi.....	40
4.2.1.1.5. Yıldız nöronlarındaki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti	41
4.2.1.1.6. Yıldız nöronlarındaki ASIC alt tiplerinin belirlenmesi.....	42
4.2.1.2. Çalı tipi nöronlarda düşük hücre dışı pH ile aktive edilen ASIC akımları	45
4.2.1.2.1. Farkı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi	45

4.2.1.2.2. Amilorid'in çalı nöronlarındaki ASIC akımı üzerine etkisi	46
4.2.1.2.3. Çalı nöronlarındaki ASIC'lerin sodyum iyonuna geçirgenliği	48
4.2.1.2.4. Kalsiyum iyonunun çalı nöronlarındaki ASIC'ler üzerine etkisi	49
4.2.1.2.5. Çalı nöronlarındaki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti	50
4.2.1.2.6. Çalı nöronlarındaki ASIC alt tiplerinin belirlenmesi	51
4.2.2. Akım Kenetleme Çalışmaları	54
4.2.2.1. Yıldız nöronlarına düşük hücre dışı pH'ın etkisi	55
4.2.2.2. Çalı nöronlarına düşük hücre dışı pH'ın etkisi	56
5. Tartışma ve Sonuç	58
5.1. ASIC genlerinin mRNA düzeyinde ifadesi	58
5.2. Yama kenetleme tekniği ile ASIC'lerin karakterizasyonu	59
5.3. ASIC'lerin amilorid duyarlılığı	60
5.4. ASIC'lerden büyük oranda Na ⁺ iyonu geçer	60
5.5. ASIC akımları duyarsızlaşmaktadır	61
5.6. ASIC alt tipleri	61
5.7. Akım kenetleme deneylerinde meydana gelen depolarizasyon	63
5.8. Kohlear çekirdekteki asit kaynaklı akımlara ASIC'ler aracılık etmektedir	64
5.9. ASIC'ler değişik fizyolojik mekanizmalarda rol oynamaktadır	64
5.10. ASIC'lerin kohlear çekirdekte olası işlevsel rolleri	65
5.11. Sonuç ve öneriler	66
6. Kaynaklar	68

SİMGE VE KISALTMALAR

ASIC	Asit duyarlı iyon kanalları (Acid sensitive ion channels)
DEG/ENaC	Degenerin/epithelial sodium channel
KÇ	Koklear çekirdek
VKÇ	Ventral koklear çekirdek
DKÇ	Dorsal koklear çekirdek
AVÇN	Anteroventral koklear çekirdek
PVÇN	Posteroventral koklear çekirdek
MSS	Merkezi sinir sistemi
PSS	Periferik sinir sistemi
PcTx1	Psalmopoeus cambridgei Toxin 1
GABA	Gamma-aminobutirik asit
AMPA	a-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionik asit
NMDA	N metil-D-Aspartat
Na ⁺	Sodyum
Ca ²⁺	Kalsiyum
Pb ²⁺	Kurşun
Zn ²⁺	Çinko
Mg ²⁺	Magnezyum
yBOS	Yapay beyin omurilik sıvısı
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MES	2- [N-morpholino ethanesulfonic acid]
S.H.	Standart hata
mV	Milivolt
sn	Saniye
mM	Milimol
pA	Pikoamper

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. İşitsel bilginin kohleadan daha yüksek işitsel merkezlere taşınması	3
Şekil 2.2. Kohlear çekirdekte bulunan hücrelerin görünümü	4
Şekil 2.3. Kohlear çekirdeğin anatomik yapısı	5
Şekil 2.4. Kohlear çekirdeğin tonotopik organizasyonu	11
Şekil 2.5. ASIC alt birimlerinin şematik gösterimi	15
Şekil 2.6. Kurbağa oosit hücrelerinde ASIC alt birimlerinin oluşturduğu akımlar	16
Şekil 2.7. ASIC1a'nın Ca^{2+} geçirgenliği	17
Şekil 2.8. ASIC alt tiplerinin merkezi ve periferik sinir sistemindeki ifadesi	18
Şekil 3.1. Yama kenetleme (patch-clamp) sisteminin genel görünümü	26
Şekil 3.2. Hızlı perfüzyon sistemi	31
Şekil 4.1. RT-PZR ile ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 kanal genlerinin mRNA düzeyleri	35
Şekil 4.2. Düşük hücre dışı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi	37
Şekil 4.3. Amiloridin yıldız hücrelerinde oluşan ASIC akımları üzerine etkisi	38
Şekil 4.4. Amilorid'in yıldız hücrelerindeki ASIC akımı üzerine inhibisyon etkisi	39
Şekil 4.5. Yıldız hücrelerinde oluşan ASIC akımlarının Na^{+} iyonuna bağımlılığı	40
Şekil 4.6. Yıldız nöronlarındaki asitle aktiflenen akımlara hücre dışı Ca^{2+} 'un etkisi	41
Şekil 4.7. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti	42
Şekil 4.8. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarının Pb^{2+} ve Zn^{2+} ile modülasyonu	43
Şekil 4.9. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarına Pb^{2+} ve Zn^{2+} 'in etkisi	44
Şekil 4.10. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarına sodyum salisilat'ın etkisi	45
Şekil 4.11. Düşük hücre dışı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi	46
Şekil 4.12. Amiloridin çalı hücrelerinde oluşan ASIC akımları üzerine etkisi	47
Şekil 4.13. Amilorid'in çalı hücrelerindeki ASIC akımı üzerine inhibisyon etkisi	48
Şekil 4.14. Çalı hücrelerinde oluşan ASIC akımlarının Na^{+} iyonuna bağımlılığı	49
Şekil 4.15. Çalı nöronlarındaki asitle aktiflenen akımlara hücre dışı Ca^{2+} 'un etkisi	50
Şekil 4.16. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti	51
Şekil 4.17. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının Pb^{2+} ve Zn^{2+} ile modülasyonu	52
Şekil 4.18. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarına Pb^{2+} ve Zn^{2+} 'in etkisi	53
Şekil 4.19. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarına sodyum salisilat'ın etkisi	54
Şekil 4.20. Yıldız hücrelerinde asit ile indüklenen depolarizasyon	56
Şekil 4.21. Çalı hücrelerinde asit ile indüklenen depolarizasyon	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. RT-PZR’ da kullanılan primerler.....	27
Tablo 3.2. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler.....	27
Tablo 3.3. Uygulanan RT-PZR programı	28



ÖZET

KOHLER ÇEKİRDEKTE BULUNAN YILDIZ VE ÇALI NÖRONLARINDA ASİTE DUYARLI İYON KANALLARININ (ASIC) İNCELENMESİ

Ziya ÇAKIR

Doktora Tezi, Fizyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ramazan BAL
2018, 100 sayfa

Asit duyarlı iyon kanalları (ASIC); proton kapılı, voltajdan bağımsız, merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunan hidrojen iyonuna duyarlı iyon kanallarıdır. Bu tez çalışmasında ASIC'lerin kohlear çekirdek nöronlarının uyarılabilirliğini etkileyerek, işitme sinyallerinin işlenmesinde önemli rol alacağı hipotezinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada albino BALB/c ırkı fareler kullanılarak, kohlear çekirdek dokusunda Real time-polimeraz zincir reaksiyon tekniğiyle ASIC gen ekspresyonları mRNA düzeyinde ve kohlear çekirdekteki yıldız ve çalı hücrelerinin ASIC akımları yama kenetleme (patch clamp) tekniği ile karakterize edildi.

Real-time PZR analizi ile 16 günlük, 75 günlük ve 2 yaşındaki fare kohlear çekirdek dokularında ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 genlerinin ifadesi gösterildi. Voltaj kenetleme çalışmalarında kohlear çekirdek nöronlarına, asidik solüsyon uygulanmasıyla içe doğru (inward) akımlar oluştu. Kaydedilen ASIC akımlarının yarı aktivasyon pH değeri (pH₅₀) yıldız hücreleri için 5,84, çalı hücreleri için 5,81 olarak bulundu. ASIC blokeri amilorid bu akımları doza bağımlı olarak inhibe etti. Amiloridin yarı maksimum inhibisyon değeri (IC₅₀) yıldız hücrelerinde 32,5± 0,4 µM (n=30), çalı hücrelerinde ise 32,1 ± 0,2 µM (n=12) olarak bulundu. Sodyum içermeyen solüsyonda düşük pH ile indüklenen ASIC akımı büyük oranda azaldı (%87,5, p<0.05) (n=13), bu da kaydedilen ASIC akımlarının esas olarak Na⁺ iyonu tarafından taşındığını göstermektedir. Asit uygulamasıyla oluşan ASIC akımının hücre dışı Ca²⁺ ve Pb²⁺ (10 µM) tarafından inhibe edilmesi, bu hücrelerde ASIC1a altbiriminin varlığına işaret etmektedir. Zn²⁺ (300 µM)'nun ekstraselüler olarak uygulanması sonucu ASIC akımları %20 (n=13) oranında artmıştır. Bu da fonksiyonel ASIC2a alt birimini içeren homomerik kanalların varlığına işaret etmektedir. Sodyum salisilat (1 mM) ASIC akımlarını istatistiki olarak anlamlı düzeyde etkilemedi (p>0.05 n= 13). Bu da ASIC3 kanallarının bulunmadığını göstermektedir. Akım kenetleme çalışmalarında ise asidik solüsyon uygulanmasının kohlear çekirdek yıldız ve çalı nöronlarında depolarizasyona neden olduğu belirlendi.

Sonuç olarak elde edilen veriler kohlear çekirdek hücrelerindeki ASIC akımının ASIC1a ve ASIC2a kanalları tarafından taşındığını göstermektedir. ASIC kanallarının merkezi işitsel sistemdeki nöronların uyarılabilirliklerini etkilediğini ve dolayısıyla bunların işitsel bilgiyi işlemede rolünün olabileceğini ve /veya patolojik süreçlerde olası rolü bulunacağına işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Asite duyarlı iyon kanalları (ASIC), Elektrofizyoloji, Yama kenetleme tekniği, Kohlear çekirdek, İşitme yolağı

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ACID SENSING ION CHANNELS (ASIC) OF STELLATE AND BUSHY NEURONS IN THE COCHLEAR NUCLEUS

Ziya ÇAKIR

Ph. D. Thesis, Department of Physiology

Supervisor: Prof. Dr. Ramazan BAL

2018, 100 pages

Acid sensing ion channels (ASICs) are voltage-independent and proton-gated channels commonly found in the both central and peripheral nervous systems. In this study, it was aimed to test the hypothesis that whether ASICs could have important roles in processing of auditory signals by affecting excitability of cells in the cochlear nucleus.

In this study, ASIC gene expressions in the cochlear nuclei of albino BALB/mice were determined in terms of mRNA levels by using real time polymerase chain reaction and ASIC currents in stellate and bushy cells were characterized by using patch clamp technique.

ASIC1, ASIC2 and ASIC3 gene expressions were detected in 16 day-old, 75 day-old and 2 year-old mice. In the voltage-clamp experiments, inward currents were recorded upon application of acidic solution to the cochlear nucleus cells, whose half-maximum activation pH values (pH₅₀) were 5,84 and 5,81 for stellate and bushy cells respectively. Amiloride, which is ASICs blockers, inhibited the acid induced-currents in a dose-dependent manner. Half-maximal inhibition concentration (IC₅₀) of amiloride was $32,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (n=30) for stellates and $32,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (n=12) for bushy cells. ASIC current was significantly depressed (%87,5, $p < 0.05$) (n=13) in sodium free solution, which indicates that the ASIC current is primarily carried by Na⁺. Inhibition of the ASIC currents by extracellular Ca²⁺ and Pb²⁺ (10 μM) was a significant evidence for the existence of homomeric ASIC1a subunits. ASIC currents were increased by 20 % upon extracellular application of Zn²⁺ (300 μM) ($p < 0.05$, n=13), which indicates the presence of functional homomeric ASIC2a subunits. Sodium salicylate (1 mM) did not significantly affect the amplitudes of ASIC currents ($p > 0.05$ n= 13), which indicates that there are no ASIC3 channels. In current-clamp experiments, application of acidic extracellular solution resulted in depolarization of stellate and bushy cells of the cochlear nucleus.

The results shows that the ASIC currents in the cochlear nucleus cells is carried by the ASIC1a and ASIC2a channels. ASIC channels affects excitability of the stellate and bushy cells and therefore they likely to have a role in processing of auditory information and / or pathological processes in the central auditory system.

Keywords: Acid sensing ion channels (ASIC), Electrophysiology, Patch-clamp technique, Cochlear nucleus, Auditory pathway.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asit duyarlı iyon kanalları (ASIC), proton kapılı voltajdan bağımsız degenerin/epitel sodyum kanalı (DEG/ENaC) süper ailesinin bir alt grubu olan asite duyarlı iyon kanallarıdır. Hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunurlar. ASIC1a (1), ASIC1b (2), ASIC2a (3), ASIC2b (4), ASIC3 (5) ve ASIC4 (6) olmak üzere bilinen 6 ASIC alt grubu vardır.

Kohlear çekirdek, merkezi sinir sisteminde işitme sinyallerinin oluştuğu ve işlendiği ilk yer olması nedeniyle önemlidir. Kohlear çekirdekte bulunan nöronların sahip olduğu iyon kanal tiplerinin, sinyal oluşumuna ne şekilde katkıda bulundukları birçok fizyolojik süreç ve patolojik durumla ilişkili olduğu için önem arz eder. Burada yer alan nöronlardan yıldız tipi (stellate), ahtapot tipi (octopus) ve çalı tipi (bushy) hücrelerde bazı iyon kanallarının farmakolojik ve biyofiziksel özellikleri ve bu kanalların sinyal oluşumuna nasıl katkıda bulundukları tanımlanmıştır (7, 8). Fakat ASIC kanallarının bu nöronlarda bulunup bulunmadıkları, işitsel sinyallerin oluşumunda, işlenmesinde ve iletilmesinde fizyolojik olarak nasıl bir fonksiyon üstlendiklerine dair hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Oysaki beynin diğer bölgelerinde hem immunohistokimyasal hem de elektrofizyolojik teknikler kullanılarak, ASIC'lerin farmakolojik ve biyofiziksel karakterizasyonu yapılmış ve nasıl bir fonksiyon üstlendikleri ortaya konulmuştur. Literatür taramalarında merkezi işitme bölgesinde ASIC kanal proteinleri rapor edilmiştir (9).

Kohlear spiral ganglion nöronlarında (kohlear afferent nöronlarında) yapılan çalışmada ASIC'lerin ifade edildiği ve uyarılabilirliğe etkisi gösterilmiştir (10). ASIC3 olmayan farelerde yapılan bir çalışmada, yaşla birlikte ilerleyici işitme kaybı olduğu gösterilmiştir. Yine ASIC3'e bağlı işitme kaybı oluşturulan farelerde işitme eksikliğinin, yavru çağrılarına yanıt verme, annelik davranışlarına etkisi ve yetiştirilen yavruların ergenlik dönemindeki sosyal gelişimi incelenmiştir (11). ASIC3 ağırlıklı olarak duyu nöronlarında yüksek düzeyde ifade edilir, merkezi nöronlarda ise ifadelerinin düşük düzeyde olduğu rapor edilmiştir (12). Bu yapılan çalışmalarda kohlear çekirdeğin duyu nöronlarındaki ASIC'lerin varlığı gösterilmiştir, bizim çalışmamızda kohlear çekirdeğin merkezi işitme nöronlarında ASIC kanallarının bulunup bulunmadığı, bulunduğu saptanması halinde bunların elektrofizyolojik, biyofiziksel ve farmakolojik özellikleri tanımlanacaktır.

Bu çalışmada ASIC'lerin mRNA düzeyinde kohlear çekirdek dokusunda ifade edilip edilmedikleri Real-Time PZR yöntemi ile araştırılmış ve kohlear çekirdekte yer alan yıldız ve

çalı nöronlarında ASIC'lerin elektrofizyolojik özelliklerinin tanımlanmasında yama kenetleme tekniği kullanılmıştır. Bu çalışma ile ASIC kanallarının kohlear çekirdek nöronlarında ilk defa çalışılıyor olması nedeniyle çalışmamızın özgün olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde bu kanalların işitsel sinyallerin işlenmesinde görev aldıklarına inanılmaktadır.

Çalışmamızda kohlear çekirdekte karakterize edilmiş olan yıldız ve çalı tipi nöronlarında, ASIC akımlarının biyofiziksel ve farmakolojik özellikleri karakterize edilmiş olup elektrofizyolojik çalışmalar ile işitsel sinyallerin işlenmesinde görev alan bu nöronların uyarılabilirliğini nasıl etkilediği akım ve voltaj kenetleme deneyleri ile ilk defa ortaya konulmuştur.

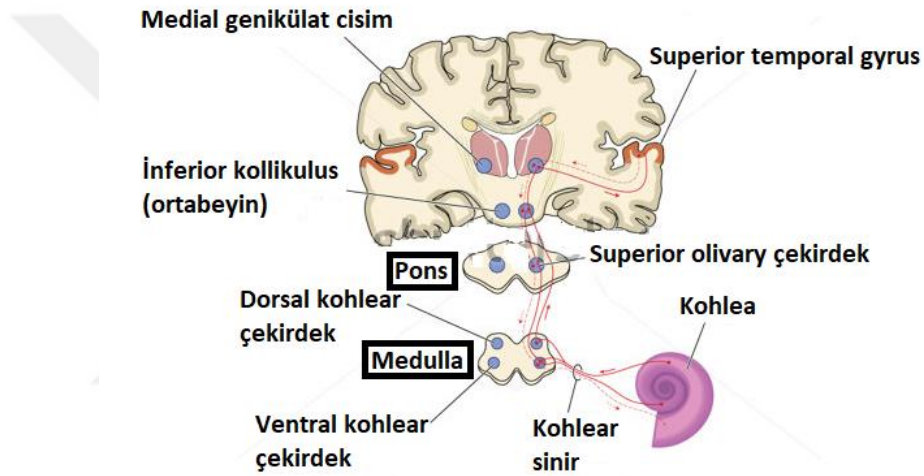
Sonuç olarak ASIC1a ve ASIC2a mRNA'sının merkezi işitme bölgesinde bulunduğu gösterilmiştir (9), ancak fonksiyonel ASIC'lerin varlığı kohlear çekirdekde incelenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada 14-17 günlük postnatal yaştaki fare beyinlerinden alınan kohlear çekirdek kesitlerinde elektrofizyolojik yama kenetleme (patch clamp) yaklaşımı kullanılarak yıldız tipi ve çalı tipi hücrelerde ASIC akımlarının varlığı araştırılmış ve bu kanalların biyofiziksel ve farmakolojik özellikleri ile bu nöronların uyarılabilirliğini nasıl etkilediği ilk kez ortaya konularak literatüre kazandırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kohlear çekirdek

2.1.1. Kohlear çekirdek anatomisi

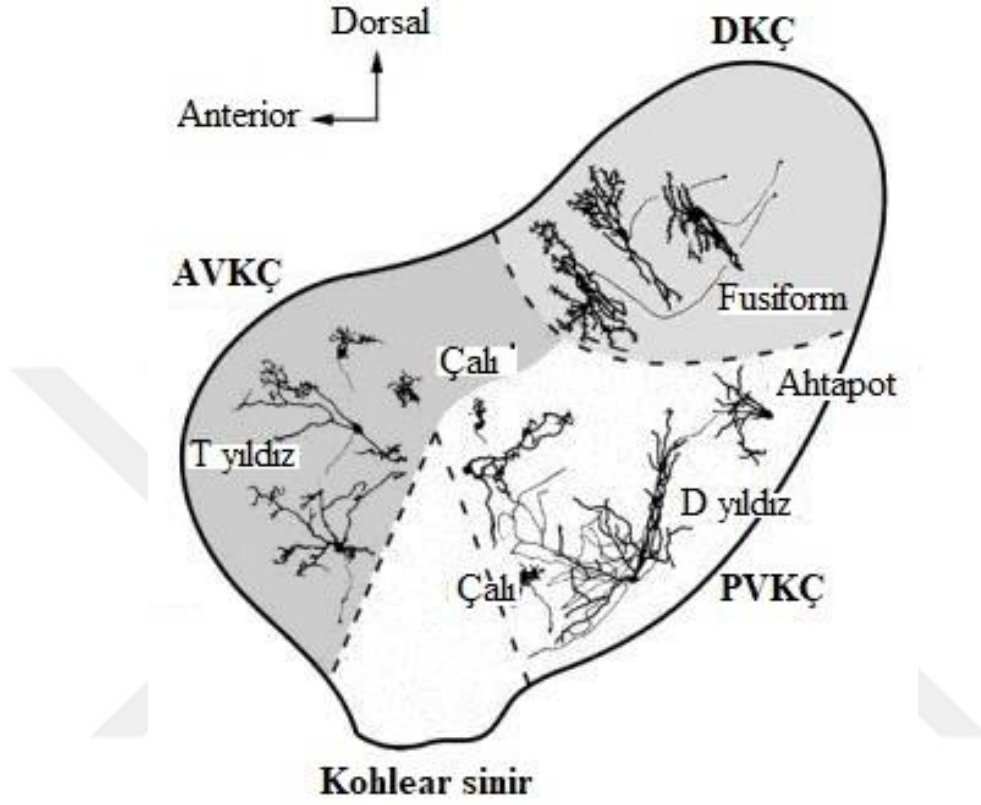
Kohlear çekirdek, pons ile medulla oblongata arasındaki sınırdan, bilateral olarak yerleşim gösterir (7). Kohlear çekirdek; kohleadan gelen ses hakkındaki bilgiyi daha üst işitsel merkezlere taşıyan ve tüm işitsel sinir liflerinin son bulduğu merkezi işitsel sistemin ilk çekirdeğidir. İşitsel bilgi, daha yüksek işitsel merkezlere kohlear çekirdek nöronlarının aksonları tarafından iletilir. Ayrıca kohlear çekirdek, korteks ve işitsel beyin sapı çekirdeklerinden gelen inisi projeksiyonlar da (olivokohlear efferent sistemi) alır (Şekil 2.1) (13, 14).



Şekil 2.1. İşitsel bilginin kohlear sinir aracılığıyla kohleadan daha yüksek işitsel merkezlere taşınması (15).

Memeli kohlear çekirdeği, magnoselüler çekirdek ve mikronöronal kabuk kısımlarından oluşmaktadır. Magnoselüler çekirdek, esas olarak Tip I spiral ganglion nöronlarının aksonları tarafından uyarılır (16). Mikronöronal kabuk ise ventral kohlear çekirdeğin medyal, dorsal ve lateral yüzeyinin üzerinde yer alır (17). Mikronöronal kabuk, çok sayıda granüllü hücre içerdiği için granüllü hücre alanı olarak da adlandırılır (18). Bu alan miyelinli işitsel sinir liflerinden girdi almaz bunun yerine miyelinsiz Tip II liflerinden girdi alır (19). Kohlear çekirdek anatomik olarak, anteroventral kohlear çekirdek (AVKÇ) ve posteroventral kohlear çekirdek (PVKÇ) olmak üzere ikiye bölünen bir ventral kohlear çekirdekten (VKÇ) ve dorsal kohlear çekirdekten (DKÇ) oluşur. Kohlear çekirdek dokusunda yapılan çalışmalarda farklı biyofiziksel ve morfolojik özellikler gösteren ahtapot, yıldız ve çalı olmak üzere üç hücre tipi rapor edilmiştir

(20). Ahtapot tipi hücre, posteroventral kohlear çekirdeğin dorsal ve kaudal'inde yer alır. Yıldız tipi ve çalı tipi nöronlar ise kohlear çekirdeğin ventral bölümünde bulunmaktadır (7). İki tip (T ve D) yıldız hücresi tanımlanmıştır (Şekil 2.2) (14).



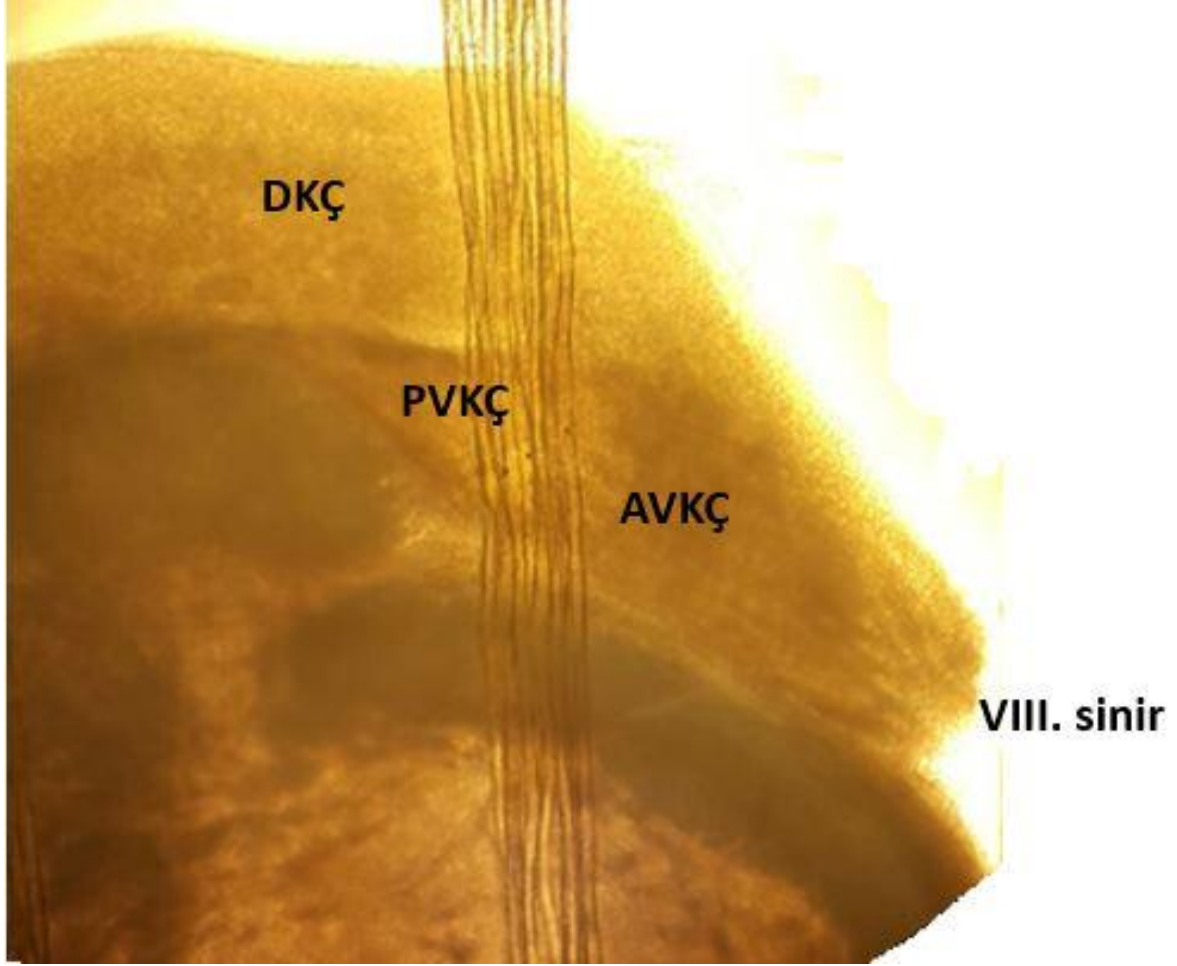
Şekil 2.2. Kohlear çekirdekte bulunan hücrelerin görünümü (14).

Kohlear çekirdekte bulunan hücrelerin biyofiziksel özellikleri fare (21), sıçan (22), gerbil (23), kobay (24) ve kedilerde (14) başarılı bir şekilde karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmalarda kohlear çekirdekte bulunan hücrelerin farklı biyofiziksel özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin; çalı tipi ve ahtapot tipi nöronlarına, depolarize edici bir akım verildiğinde sadece bir aksiyon potansiyeli olduğu rapor edilmiştir. Yıldız tipi nöronlarının ise eşik değeri aşacak bir depolarize akıma cevap olarak çok sayıda aksiyon potansiyeli oluşturdıkları gösterilmiştir (7).

2.1.1.1 Ventral kohlear çekirdek

Ventral kohlear çekirdek (VKÇ), IV. ventrikülün lateral uzantısından vestibülkohlear sinirin beyin sapına girdiği kısma kadar uzanmaktadır. Ventral kohlear çekirdek, lateralde uzanan anteroventral kohlear çekirdek (AVKÇ) ve medialden kaudale doğru yer alan posteroventral

koklear çekirdek (PVKÇ) şeklinde iki alt çekirdeğe ayrılır (Şekil 2.3) (25). Ventral kohlear çekirdek, kulaktan beyne işitsel bilgilerin taşınmasında ilk merkez olarak görev yapar. Bu çekirdekte yıldız, globüler çalı, küresel çalı ve ahtapot olmak üzere dört hücre tipi tespit edilmiştir (14). Birbirinden farklı biyofiziksel ve elektrofizyolojik özellikler gösteren bu hücreler farklı bölgelerde bulunmaktadır.



Şekil 2.3. Kohlear çekirdeğin anatomik yapısı.

2.1.1.1.1. Anteroventral kohlear çekirdek

Anteroventral kohlear çekirdek, işitsel sinir lifinin çıkan dalı ile uyarılır. Burada bulunan hücrelerin, iki kulaktan gelen seslerin şiddetinin karşılaştırılmasıyla ses kaynağının yerinin belirlenmesinde görev aldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (26, 27). Anteroventral kohlear çekirdeğin bu işlevinde özellikle küresel ve globüler çalı hücrelerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (28). Küresel ve globüler çalı hücrelerinin, özelleşmiş sinapslar yaptıkları ve işitsel sinirden doğrudan inputlar aldığı rapor edilmiştir. Küresel çalı hücreleri 1-4 arasında değişen sayıda işitsel sinir lifinden input alırlar. Küresel çalı hücrelerinin *Held End*

Bulbus adında özel sinapslar yaptıkları tespit edilmiştir (29). Globüler çalı hücreleri ise 4-40 arasında değişen sayıda işitsel sinir lifinden input alırlar. Globüler çalı hücrelerinin *Calyx of Held* olarak adlandırılan ve hücre gövdesinin büyük bir kısmını sararak büyük sinapslar yaptıkları gösterilmiştir (30).

2.1.1.1.2. Posteroventral kohlear çekirdek

İşitsel sinir lifinin inen dalı ile uyarılan posteroventral kohlear çekirdek, sesin zamanlamasını ve spektral analizini gerçekleştirir. Elektrofizyolojik çalışmalarda posteroventral kohlear çekirdekte ahtapot ve T yıldız hücrelerinin bulunduğu gösterilmiştir. Ahtapot hücresinin yoğun olarak bulunduğu ve T yıldız hücresinin ise az sayıda bulunduğu rapor edilmiştir (31, 32). Ahtapot hücreleri çok fazla sayıda (> 60) işitsel sinir lifi ile sinaptik bağlantı kurduğu için çok kısa bir sürede eksitatorik post sinaptik potansiyellerin (EPSP) sumasyonu ile uyarılırlar (33, 34). Bundan dolayı ahtapot hücreleri posteroventral kohlear çekirdeğin işlev görmesinde önemli rol oynarlar. Bunun aksine, her bir T yıldız hücresi sadece birkaç (5 ya da 6) işitsel sinir lifinden girdi alır. Bununla birlikte, bu hücrelerin tüm uyarımı işitsel sinir liflerinden kaynaklanmaz. Ahtapot hücreleri diğer ahtapot hücrelerinden uyarıcı girdi alırken, T yıldız hücreleri de diğer T yıldız hücrelerinden eksitatorik girdiler alırlar (35).

2.1.1.2. Ventral kohlear çekirdekde bulunan hücre tipleri

Ventral kohlear çekirdekte yapılan çalışmalarda yıldız, çalı ve ahtapot olmak üzere üç farklı hücre tipi karakterize edilmiştir. Bu hücre tipleri birbirinden farklı elektrofizyolojik, morfolojik ve biyofiziksel özellik gösterirler. Ahtapot tipi hücreler posteroventral kohlear çekirdeğin dorsal ve kaudalinde –V- şeklinde bir alanda sınırları açık bir şekilde belli olan bir bölgede bulunurken, yıldız ve çalı tipi hücreleri ise kohlear çekirdeğin ventral bölümünde yer alırlar (7, 14, 20).

2.1.1.2.1. Yıldız hücrelerinin karakteristik özellikleri

Yıldız hücreleri morfolojik olarak yıldıza benzedikleri için bu isimle adlandırılırlar. Ventral kohlear çekirdekte yaygın olarak bulunurlar. Bu hücrelerin farklı ebatları ve şekilleri vardır; yıldız hücrelerinin bir kısmı oval bazıları ise dairesel şekillidir. Bu gruptaki hücrelerin, genellikle 3-4 primer dendriti bulunur. Yıldız hücrelerinin projeksiyon desenlerine (akson uzantıları, dentritik yapıları gibi) bakılarak iki tip yıldız hücresi (T yıldız ve D yıldız) rapor edilmiştir. Aksonları intermediate akustik strianın Dorsaline projekte olanlar **D-yıldız**, Trapezoid cisme projekte olanlar **T-yıldız** hücresi olarak tanımlanmıştır (14, 20). Bu hücelere

depolarize edici bir akım verildiğinde, tonik olarak düzenli bir şekilde ateşleme yaparlar ve çok sayıda aksiyon potansiyeli oluştururlar (8, 21). T yıldız ve D yıldız hücrelerinin dentritik yapıları, akson uzantıları ve biyofiziksel özellikleri birbirinden farklıdır. Kohlear çekirdekte az sayıda sonlanmaları olan, T-yıldız hücreleri kompakt dendritlere sahiptir. Kohlear çekirdekdeki sonlanmaları oldukça geniş olan D-yıldız hücrelerinin ise, pürüzsüz, uzun, konik ve seyrek dallanmaları olan yaygın dendritleri bulunur. T-yıldız hücrelerinin aksonları inferior kollikulusa projekte olurken, D-yıldız hücrelerinin aksonları ise genellikle ipsilateral ve kontralateral kohlear çekirdeğe projekte olurlar (36, 37).

2.1.1.2.2. Çalı hücrelerinin karakteristik özellikleri

Çalı hücreleri, ahtapot hücre alanı ve granüler hücre tabakası haricinde ventral kohlear çekirdeğin her yerinde bulunur. Bu nöronlar genellikle 200 µm'den kısa, daireselden ovale doğru değişen hücre gövdelerine sahiptirler. Çalı hücreleri çok az sayıda dentritik dallanmalar yapar ve sinaptik inputları somaları üzerine yerleşiktir (30). Hücre gövdesinde basit bir primer dendrit gözlenebilir ve daha sonra bu primer dendrit iki, üç veya dört sekonder dendrite dallanır (28). Çalı hücrelerinde nadiren iki primer dendrit de bulunabilir. Bu hücreler kendine ait primer ve sekonder dallara sahip oldukları için İngilizcede “bushy” türkçede “çalı” olarak isimlendirilirler. Çalı hücrelerinde gövdenin herhangi bir kısmından çıkan aksonun başlangıç segmentinin yönelimi daima trapezoid cisimciğe doğrudur. Nissl boyamada çalı hücrelerinin hem ince siyah hem de açık kahverengi granüllerle dolu olduğu görülür (38). Çalı hücreleri, superior oliver kompleksi ile lateral lemniskusun ventral çekirdeğine projekte olurlar. Bu hücrelerin sesin tınısı, zamanlaması ve yoğunluğu hakkında bilgi taşıdıkları gösterilmiştir (39). Çalı hücreleri histolojik boyamalarda farklılıklar gösterdiğinden dolayı; küçük küresel çalı, büyük küresel çalı ve globüler çalı hücreleri olmak üzere üç alt tipe ayrılmıştır (14, 20, 40). Bu üç alt tipin kohlear çekirdekte lokalizasyonu farklıdır. Küçük küresel çalı hücreleri hakkında çok az bilgi ve çalışma bulunur. Bu hücrelerin çoğunlukla süperior oliver komplekse projekte oldukları bilinmektedir (40). Büyük küresel çalı hücrelerinin anteroventral kohlear çekirdeğin rostralinde bulunduğu ve genellikle düşük frekanslı sesleri kodladığı gösterilmiştir. Büyük küresel çalı hücreleri, medyal süperior oliver çekirdeğinin medyaline ve lateraline projekte olurlar (41). Globüler çalı hücrelerinin ise genellikle işitsel sinir kökünün yakınında bulunduğu ve yüksek frekanslı sesleri kodladığı tespit edilmiştir (39). Globüler çalı hücrelerinin trapezoid cismin medyal çekirdeğine *Held kaliksi (Calyx of Held)* denilen devasa bir sinaps ile projekte olduğu gösterilmiştir (42, 43). Çalı hücreleri genellikle işitsel sinirden eksitatorik input

alırlar. Ayrıca dendritler üzerine kaynağı belli olmayan inhibitör giriş sinyalleri aldıkları tespit edilmiştir (30).

2.1.1.2.3. Ahtapot hücrelerinin karakteristik özellikleri

Ahtapot hücrelerinin dendritleri hücre gövdesinin bir tarafında bulunması nedeniyle ahtapota benzetilerek bu isim verilmiştir. Ahtapot hücresi, uzun tek bir aksona ve hücre gövdesinin rostral yanından çıkan büyük 3-5 adet kısa dentrite sahiptir (14). Bu dendritler yaklaşık 50-70 µm'lik bir uzunluğa sahiptir. Oluşan primer dendritler genellikle daha kısa olan sekonder dendritlere, bunlar da tersiyer dendritlere dallanır (25). Bu hücreler Nissl metodu ile boyandığında sitoplazmanın her tarafına dağılmış çok ince ve soluk granüllere sahip olduğu görülür. Ahtapot hücreleri soma ve dendritleri üzerinde bulunan sinapslar aracılığıyla çok sayıda işitsel sinir lifinden input alırlar. Ahtapot hücreleri posteroventral kohlear çekirdeğin dorsal ve kaudal kısımlarında –V- şeklinde bir alanda sınırları belli olan bir bölgede bulunurlar (44). Bu bölgede özellikle insanlarda sadece ahtapot sinir hücresinin bulunduğu gözlenmiştir (7, 14, 20). Fare kohlear çekirdeğinin bu bölgesinde yaklaşık olarak 200 adet ahtapot hücresi bulunduğu bildirilmiştir (45). Ahtapot hücreleri tipik görünüşleri, yerleşimleri ve yönelimleri nedeniyle kohlear çekirdeğin en kolay ayırt edilebilen hücre tiplerinden birisidir. Bu hücreler uzun ve düz primer dendritleri ile karakterize edilirler (14).

Yapılan çalışmalarda ahtapot hücrelerinin işitsel sinir liflerinde oluşan eş zamanlı ateşlemenin olduğu anı belirlediği gösterilmiştir. Ayrıca işitsel bilgiyi beynin daha üst çekirdeklerine ilettiği rapor edilmiştir (46, 47). Ahtapot hücrelerinin dendritleri ile işitsel sinir lifi demetlerinin kesişim göstermesi, bu hücrelerin çok sayıda sinir lifinden input almasına neden olmaktadır (20, 45). Yapılan çalışmalarda ahtapot hücrelerinin input dirençlerinin çok düşük olduğu rapor edilmiştir. Ahtapot hücrelerinin input dirençlerinin düşük olması (yani hücre zarı üzerinde birim alanda bulunan iyon kanalı sayısının fazla olması), sinaptik akımlara karşı hızlı ve kısa süreli cevap vermelerini sağlar (48, 49).

2.1.1.3 Ventral kohlear çekirdeğe gelen sinyaller

Ventral kohlear çekirdek hücreleri, işitsel sinir lifleri ve granül hücrelerinin yosunsu terminallerinin aksonlarından uyarıcı özellikte sinyaller alır. İşitsel sinir lifleri kohleadan aldığı işitsel bilgiyi işitme sisteminin ilk çekirdeği olan kohlear çekirdeğe getirirken, granül hücrelerin yosunsu terminalleri ise işitsel çekirdeklerden, vestibüler çekirdeklerden ve somatosensoriyel sistemden aldığı inputları kohlear çekirdeğe getirmektedir (24). Bunun yanında kohlear çekirdek beyin sapının diğer çekirdeklerinden de uyarıcı ve inhibe edici

özellikte olan efferent inputlar alır (50). T-yıldız hücrelerinin glutamaterjik uyarılmada rol oynadıkları bilinmektedir (51, 52). Glisinerjik özellikte olan D-yıldız hücreleri ise inhibitör bir etki göstermektedir (53, 54). Glutamaterjik işitsel afferent sinirler, ventral kohlear çekirdeğin uyarılmasında önemli role sahiptirler. Ayrıca ventral kohlear çekirdek, trapezoid cisimciğin ventral çekirdeğinden (medyal olivokohlear efferent sinir liflerinin ve ventral kohlear çekirdeğe projekte olan sinir liflerinin oluşturduğu) kolinerjik lifler de almaktadır (55). Yapılan çalışmalarda kohlear çekirdek hücrelerinin işitsel sinir lifleriyle sinaps yaptığı gösterilmiştir (50). Anteroventral kohlear çekirdekte bulunan globüler çalı hücreleri ve küresel çalı hücrelerinin işitsel sinir lifinden input aldığı belirlenmiştir (30, 56). Kedilerde yapılan çalışmada yıldız tipi nöronlarına (T ve D yıldız) işitsel sinir lifinden gelen sinaptik terminallerin farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. T-yıldız nöronlarının hücre gövdeleri üzerinde bulunan az sayıdaki sinaptik terminallerin yaklaşık olarak 10:1'inin işitsel sinir liflerinden geldiği gösterilmiştir. Fakat D-yıldız nöronlarının hücre gövdeleri üzerinde bulunan çok sayıdaki sinaptik terminallerin yaklaşık olarak yarısının işitsel sinir liflerinden geldiği rapor edilmiştir (57).

Glutamatın işitsel sinir liflerinde yüksek seviyede bulunması, işitsel sistemin nörotransmitter maddesinin glutamat olduğunun bir göstergesidir. Yapılan çalışmada ventral kohlear çekirdek hücrelerinin glutamat reseptörü olan AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazol-propionik asit) reseptörleri ile uyarıldığı gösterilmiştir (58). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada işitsel sinirin uyarılmasıyla verilen yanıt NMDA (N-methyl-D-aspartate) reseptörlerinin önemli derecede katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (59).

2.1.1.2. Dorsal kohlear çekirdek

Dorsal kohlear çekirdek, dördüncü ventrikülün tabanında Luschka foramen'in rostral sınırından ventrale doğru uzanarak ventral kohlear çekirdeği sarar (60). Dorsal kohlear çekirdeğin sınırları ışık mikroskobu ile ventral kohlear çekirdekten rahatlıkla ayırt edilebilir. Dorsal kohlear çekirdek bazı çalışmalarda tabaka sayısına göre incelenmiştir. Bu çekirdeğin tabakalar şeklinde bir nöronal düzenleme gösterdiği rapor edilmiştir (18, 61). Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda ise tabaka sayısına göre değil katmanlara ayrılarak incelenmiştir. Dorsal kohlear çekirdek, morfolojik olarak üç katmana ayrılır (62, 63). En dışındaki katmana moleküler hücre katmanı da denir. Bu katmanda az sayıda internöronlar ve kohlear çekirdeğin en küçük hücreleri olan küçük granül hücrelerinin aksonları bulunur (64). Granül hücreleri çok az sayıda inputlara sahiptir fakat buradaki hücreler karakteristik özelliklerinden dolayı sürekli aktif durumda bulunurlar. Böylelikle buradaki hücrelerin spontan olarak aksiyon potansiyeli ürettikleri

gösterilmiştir (65). İkinci katmana piramidal hücre katmanı da denir. Bu katmanda çok sayıda piramidal hücre ve inhibitörük internöronlar (cartwheel hücreleri) da bulunur (66). Dorsal kohlear çekirdeğin en iç katmanına derin katman da denir. Bu katmanda işitsel sinir lifleri ve dev (giant) hücrelerin bulunduğu gösterilmiştir. Dorsal kohlear çekirdekte yedi farklı nöron tipi tanımlanmıştır. Bunlardan dev ve fusiform hücreleri buradaki esas nöron grubunu oluşturur. Carthwheel, golgi, yıldız, tuberkulo-ventral ve granüler hücreleri ise ara nöronları oluşturur (61, 67). Dorsal kohlear çekirdekte iki büyük afferent sistem bulunur. Bunlar işitsel sinir lifleri ve granül hücrelerinin aksonlarıdır (68).

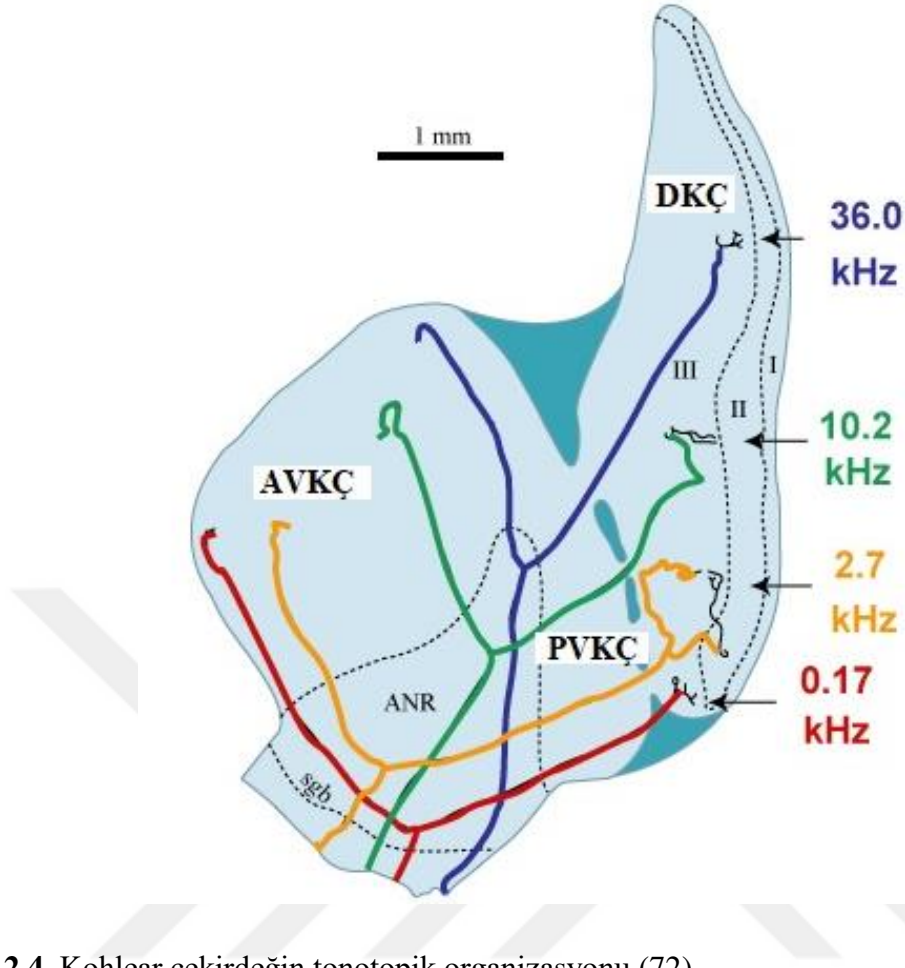
2.1.2. Kohlear çekirdek fizyolojisi

Kohlear çekirdek, işitme sisteminin ilk durak yeri olarak bilinen, kohleadan gelen tüm işitme sinyallerini alan, işitsel bilgilerin işlendiği ve bu bilgilerin daha üst merkezlere iletilmesini sağlayan hücrelerin bulunduğu beyin sapındaki tek çekirdektir (69). Kohlear çekirdekte yer alan nöronların sahip olduğu iyon kanal tipleri, birçok fizyolojik süreç ve patolojik durumla ilişkili olduğu için önemlidir. Kohlear çekirdekte bulunan yıldız tipi, ahtapot tipi ve çalı tipi nöronlarda bazı iyon kanallarının farmakolojik ve biyofiziksel özellikleri ve bu kanalların sinyal oluşumuna nasıl katkıda bulundukları tanımlanmıştır (7, 8).

Kohlear çekirdek nöronları, alınan ses bilgilerini işitsel çekirdeklere ilettiğinden dolayı işitme ile ilgili birçok fizyolojik çalışma bu çekirdekte yapılmıştır (70). Kohlear çekirdekte bulunan farklı tipteki hücrelerin sesin temel özelliklerinin (tını, frekans, zamanlama ve şiddetin kodlanması gibi) belirlenmesinde görev aldığı daha önceki yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Kohlear çekirdeğin, sesin tanınmasında ve ses kaynağının uzaysal konumunun belirlenmesinde görev aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (71).

2.1.3. Kohlear çekirdeğin tonotopik organizasyonu

İşitme sistemindeki tonotopik organizasyonun anlamı, farklı frekanslardaki sesler farklı noktaların titreşmesine ve farklı nöron gruplarının uyarılmasına yol açar. Kohleadan kortekse kadar giden tüm işitme yolu boyunca sinir liflerinin uzamsal bir organizasyonu söz konusudur. İşitme yolu ve kortekste reseptif alanlardan yapılan kayıtlar, belirli ses frekanslarının belirli nöronları aktive ettiğini göstermiştir (72). Diğer işitme çekirdeklerinde olduğu gibi kohlear çekirdeğin bölümleri de uyarıldıkları işitsel sinir liflerinin karakteristik frekanslarına göre tonotopik organizasyon gösterirler (Şekil 2.4) (33).



Şekil 2.4. Kohlear çekirdeğin tonotopik organizasyonu (72).

2.1.4. Kohlear çekirdekte karakterize edilen iyon kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanalları: Bu kanallar fizyolojik olarak birçok yerde görev alırlar. Bu kanalların birçok hücrede aksiyon potansiyelinin başlamasına öncülük ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (73). 1950 yılında Hodgkin ve Huxley, voltaj kenetleme tekniğini kullanarak sodyum akımlarının aksiyon potansiyelini başlattığını tespit etmişlerdir (74). Sodyum kanalları 270 kDa ağırlığında büyük bir α alt birimi ve 30-40 kDa ağırlığında küçük β alt biriminden meydana gelmektedir (75, 76). Alfa alt birimi, voltaj duyarlı bu kanalların primer olarak yapısal özelliklerini belirler. β alt birimi ise kanalın aktivasyon ve inaktivasyon gibi özelliklerini düzenler (77). Migren, epilepsi, nöropatik ağrı ve nörodejeneratif hastalıklar gibi sinirsel uyarılabilirlikte bozukluk içeren birçok nörolojik hastalıkta voltaj-kapılı sodyum kanallarının rol oynadığını işaret eden birçok kanıt vardır (78).

Fare dorsal kohlear çekirdek piramidal nöronlarında tetrodotoksine duyarlı Na^+ iletkenliği gösterilmiştir (79). Yine dorsal kohlear çekirdek piramidal hücrelerinde tetrodotoksine duyarlı sodyum akımları tarafından oluşan eşik altı salınımlar gösterilmiştir (80).

Voltaj kapılı kalsiyum kanalları: Birçok farklı hücre tipinde bulunan voltaja duyarlı kalsiyum (Ca^{2+}) kanalları zar depolarizasyonunda aktifleşir. Kalsiyum kanallarının açılmasıyla elektrokimyasal gradyanta göre hücre dışından hücre içine doğru kalsiyum iyonları geçer. Kalsiyum kanalları gen ekspresyonun düzenlenmesinde ve hücre zarı uyarılabilirliği gibi birçok fizyolojik olayda görev alırlar. Voltaja duyarlı kalsiyum kanallarından hücreye giren kalsiyum iyonu birçok farklı hücresel olayı başlatacak ikincil haberci olarak da görev yapar (81). İlk olarak kalsiyum akımları kardiyak miyositlerden kaydedilmiştir (82). Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları yapısal olarak geniş bir $\alpha 1$ ana alt birimi ve yanında yardımcı $\alpha 2$, β , γ ve δ alt birimlerinden oluşur. Bu kanallar $\alpha 1$ alt biriminin farklılığına göre farklı Ca^{2+} kanal tiplerine tanımlanmıştır. Kalsiyum kanalları yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre Cav1, Cav2 ve Cav3 kanal ailesi olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bu gruplar T-tipi, L-tipi, P-tipi, N-tipi, Q-tipi ve R-tipi olmak üzere çok sayıda çeşitlilik gösterir (83). T tipi akımlardan Cav3.1, Cav3.2, ve Cav3.3 ailesi sorumludur (81). L tipi kalsiyum kanalları, Cav1 kanal ailesi olarak da bilinir. L tipi akımlardan Cav1.1, Cav1.2 ve Cav1.3 ailesi sorumludur. Bu kanalların dihidropiridin agonist ve antagonistlerine karşı yüksek derecede afinite gösterdiği rapor edilmiştir (84). Q ve P tipi kalsiyum kanalları, Cav2.2 kanalları tarafından kodlanır ve bu kanal akımları ω -agatoksin tarafından bloklanır. N tipi kalsiyum akımlarından Cav2.1 ve Cav1.4 kanalları sorumludur ve bu akımlar sırasıyla ω -konotoksin ve dihidropiridin tarafından inhibe edilir. R tipi kalsiyum akımlarından ise Cav2.3 ailesi sorumludur ve bu akımların tarantula toksini (SNX-482) tarafından bloklandığı rapor edilmiştir (85). Aynı zamanda bu kanallar düşük veya yüksek voltajla aktive olan kanallar olarak da sınıflandırılırlar. T tipi kalsiyum kanalları düşük voltajla aktive olan kanalları olup, P/Q, N, L ve R tipi kalsiyum kanalları yüksek voltajla aktive olan kanallardır (86).

Fare kohlear çekirdek ahtapot hücrelerinde voltaj ile aktive edilmiş kalsiyum akımları rapor edilmiştir (87). Kuş kohlear çekirdeklerinde yapılan çalışmada voltajla aktiflenen kalsiyum kanallarının glutamaterjik inhibisyonu gösterilmiştir (88).

Voltaj kapılı potasyum kanalları: Voltaj kapılı potasyum kanalları pek çok alt tipi bulunan ve voltaja duyarlı olan iyon kanallarıdır. Potasyum kanalları, hücre zarının iç tarafı pozitif yüklendiği zaman açılır. Voltaj kapılı potasyum kanalları, aksiyon potansiyeli sırasında

depolarize olmuş hücreyi dinlenme durumuna döndürmede çok önemli rol oynar (89). Voltaj kapılı potasyum kanalları, kanal açılınca oluşan iyon akımının yönüne bakılarak, iki gruba ayrılır. İyon akımının yönü, hücre içinden hücre dışına doğru ise böyle kanallara dışarıya doğru (outward) akımlara sahip potasyum kanalları denir. İyon akımının yönü hücre dışından hücre içine doğru ise böyle kanallara içeriye doğru (inward) akımlara sahip potasyum kanalları denir. Klasik potasyum akımları ilk olarak Huxley ve Hodgkin tarafından voltaja bağımlı outward olarak tanımlanmıştır. Outward akımlara sahip potasyum kanalları, hücre zarının depolarizasyonu ile aktive olur. Bu kanalların açılmasıyla potasyum iyon konsantrasyonu nedeniyle potasyum iyonları hücre dışına çıkar. Bundan dolayı outward potasyum kanalları, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazında görev alır. İnward akımlara sahip potasyum kanalları ise hücre istirahat potansiyelindeyken aktive olurlar. Voltaj kapılı potasyum kanallarının biyofiziksel, fonksiyonel ve farmakolojik özelliklerine göre 12 farklı alt sınıfı vardır (Kv1.x-Kv12.x). Ayrıca bu kanallar aralarında heteromultimerik kanallar oluşturarak çok fazla sayıda farklı alt birimler oluşturabilirler (90).

Memeli kohlear çekirdek ahtapot hücrelerindeki yapılan çalışmada potasyum akımları gösterilmiştir (7). ATP duyarlı potasyum kanalları ile farelerin ventral kohlear çekirdeklerindeki yıldız hücrelerinin uyarılabilirliğinin düzenlendiği gösterilmiştir (91).

Hiperpolarizasyonla aktive olan katyon kanalları: Bu kanallar, zarın hiperpolarize olması ile aktive olurlar (92). Hiperpolarizasyonla aktive olan katyon kanallarının birçok hücrede dinlenme potansiyeline katkıda bulunduğu gösterilmiştir (93, 94). Bu kanalların dört altbirimi (HCN1-4) homomer veya heteromer şeklinde bulunabilir. Bu alt tiplerinin aktivasyon kinetikleri farklılıklar gösterir. Örneğin HCN1 alt birimleri en hızlı kanal aktivasyon kinetiğine sahiptir ve birçok işitsel nöronun zarlarında yüksek seviyede bulunur (95). Hiperpolarizasyonla aktive olan katyon kanallarının; ventral kohlear çekirdek nöronlarında (93), lateral lemniskus ve inferior kollikulusta (96) karakterizasyonu gösterilmiştir.

Hiperpolarizasyonla aktive olan akımların memeli ventral kohlear çekirdek yıldız hücrelerinde uyarılabilirliği düzenlediği rapor edilmiştir (97). Memeli kohlear çekirdek ahtapot hücrelerinde hiperpolarizasyonla aktive olan karışık katyon akımı gösterilmiştir (93). Hiperpolarizasyonla aktive olan katyon kanallarının, kohlear çekirdek piramidal hücrelerinin intrinsik aktivitesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (98).

Kohlear çekirdek hücrelerinde bazı iyon kanallarının farmakolojik ve biyofiziksel özellikleri ve bu kanalların sinyal oluşumuna nasıl katkıda bulundukları tanımlanmıştır Fakat ASIC

kanallarının bu hücrelerde bulunup bulunmadıkları ve işitsel sinyallerin oluşumunda fizyolojik olarak nasıl bir fonksiyon üstlendikleri gösterilmemiştir. Çalışmamızda kohlear çekirdek nöronlarında ASIC kanallarının elektrofizyolojik, biyofiziksel ve farmakolojik özellikleri tanımlanmıştır.

2.2. Asite Duyarlı İyon Kanalları

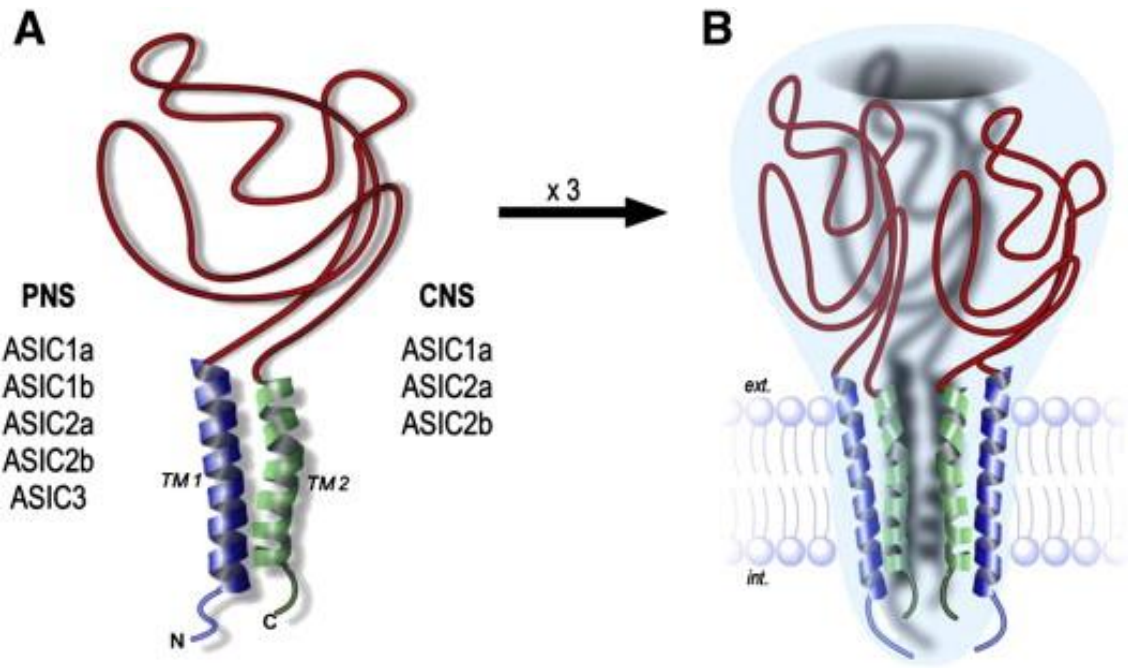
2.2.1. Giriş

Asite duyarlı iyon kanalları, ilk olarak voltaj klamp tekniği kullanılarak Krishtal ve Pidoplichko tarafından 1980 yılında sıçan duyu nöronlarında keşfedildi (99). Krishtal ve Pidoplichko asitle uyarılmış bu akımların, daha önce tanımlanmamış bir iyon kanalı aracılığıyla oluştuğunu savundu ve asitle uyarılan Ca^{2+} kanalları olabileceğini düşündü. Daha sonra Lazdunski ve arkadaşları bu kanalların amiloride duyarlı ve Na^+ iyonuna geçirgen olduğunu göstererek asite duyarlı iyon kanallarını ilk defa tanımlamışlardır (1). 2007 yılında ise tavukta ASIC1a'nın kristal yapısının tanımlandığı çalışmada, ASIC'lerin trimer yani üç farklı alt birimden oluştuğunu göstermişlerdir (100). Voltaja duyarlı olmayan bu proton kapılı degenerin/epithelial sodium channel (DEG/ENaC) süper ailesinin bir alt grubu olan asite duyarlı iyon kanallarının, hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir (101, 102). Daha sonraki çalışmalarda ise bu kanalların temel özellikleri belirlenmiştir. Bu kanallar genel olarak pH'nın azalmasıyla açılırlar (99), Na^+ 'yı geçirirler (103) ve amilorid tarafından bloklanırlar (104). Normal hücrelerde hücre dışı pH = 7.3-7.4 arasındadır (105). ASIC'ler, hücre dışı pH'nın normal fizyolojik değerinin (yaklaşık olarak pH=7.4) altına düşmesiyle hızlı bir şekilde aktiflenir ve duyarsızlaşırlar (106). ASIC alt birimlerinin; pH'ya karşı duyarlılıkları, aktivasyon kinetikleri ve duyarsızlaşma hızları birbirinden farklıdır (107).

ASIC üyeleri "X-NaC" şeklinde isimlendirilir. "X" kısaltması proteinlerin temel bir özelliğiyle (DEG, degenerin protein) ilgili olduğu anlamına gelirken, "C" kısaltması 'kanal' anlamına gelir. Örneğin; epitel Na^+ kanalı (ENaC), FMRF amide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) kapılı Na^+ kanalı (FaNaC), Drosophila gonadlarda bulunan Na^+ kanalı (dGNaC), insan bağırsağındaki Na^+ kanalı (hINaC) ve beyin, karaciğer ve bağırsaklarda bulunan Na^+ kanalı (BLINaC) olarak isimlendirilir (101).

Kemirgenlerde 4 farklı gen tarafından kodlanan en az 6 ASIC alt birimi tespit edilmiştir. ASIC1a (1), ASIC1b (2), ASIC2a (3), ASIC2b (4), ASIC3 (5) ve ASIC4 (6) olmak üzere bilinen

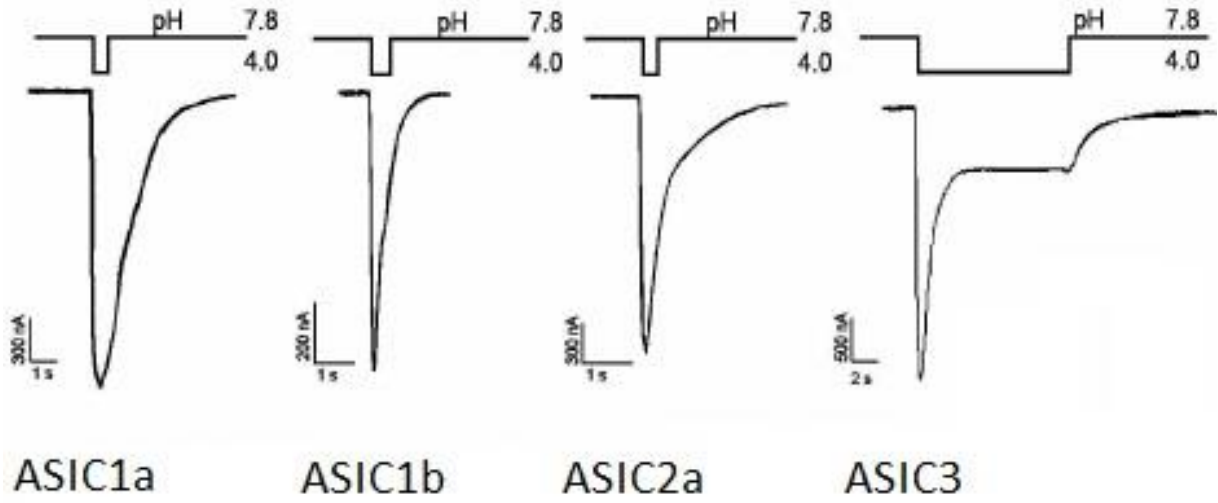
6 ASIC alt grubu vardır. ASIC alt tipleri homomer veya heteromer şeklinde bulunabilirler. Ancak ASIC2b ve ASIC4 alttipleri homomer şeklinde fonksiyonel değildirler, diğer ASIC alttipleri ile heteromer oluşturarak işlev görürler. Bütün ASIC alt birimleri, büyük bir ekstraselüler loop ve kısa intraselüler N- ve C- terminali gibi iki hidrofobik transmembran bölgeden (TM1 ve TM2) oluşur. ASIC'lerin tipik yapısı ve hücre zarındaki yerleşimi Şekil 2.5 de gösterilmiştir (108).



Şekil 2.5. A. ASIC alt birimlerinin şematik gösterimi **B.** ASIC kanalının trimerik yapısı (108).

ASIC'lerin memeli beyninin çoğu bölgesinde ve tüm duyu gangliyonlarında bulunduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte ASIC kanallarının nöronlarda bulunduğu fakat glia hücrelerinde bulunmadığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda ASIC1a, ASIC2a ve ASIC2b genlerinin merkezi sinir sisteminde, ASIC1b ve ASIC3 genlerinin ise periferik sinir sisteminde daha fazla ifade edildiği gösterilmiştir (109). ASIC alt tipleri farklı elektrofizyolojik ve farmakolojik özellik gösterirler (4, 106). Bütün ASIC'ler sadece Na^+ iyonu geçirirken, ASIC1a ise sodyum ile birlikte kalsiyum iyonu da geçirir (5). Çinko (Zn^{2+}) homomerik ve heteromerik ASIC2a akımlarını güçlendirirken, diğer ASIC akımlarını zayıflatır (110). Psalmotoxin1 spesifik ASIC1a inhibitörüdür (111). Kurşun (Pb^{2+}), ASIC1a akımlarını inhibe ederken diğer ASIC'leri

inhibe etmez (112). Salisik asit, sadece ASIC3 alt birimini bloklar (113). ASIC alt birimlerinin oluşturduğu iyon akımlarının kinetik özellikleri birbirinden farklıdır (Şekil 2.6) (114).



Şekil 2.6. Kurbağa (*Xenopus laevis*) oosit hücrelerinde ifade edilen ASIC alt birimlerinin oluşturduğu akımlar (114).

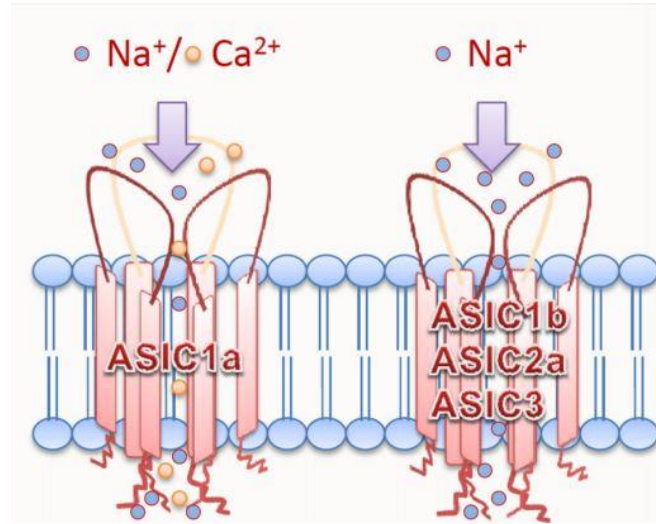
Yapılan çalışmalarda asite duyarlı iyon kanallarının; nosisepsiyon (115), dokunma (116), tat ve koku iletimi (117), long term potensiasyon (LTP), sinaptik iletim, hafıza/öğrenme (118), duyu iletimi ve retinal bütünlük (119) gibi birçok fizyolojik ve ağrı (120), iskemiye bağlı beyin hasarı (121), felç (inme) ve epilepsi (9) gibi birçok patolojik olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir.

İşitsel sistemde, kohlea içindeki tüy hücrelerinde (122, 123), spiral gangliyon nöronlarında (124), vestibüler organlarda (125) ve inferior kollikulus nöronlarında (126) ASIC'lerin varlığı gösterilmiştir. ASIC2a alt biriminin farelerde gürültüye yatkınlıkla alakalı olduğu (124) ve ASIC2 yokluğunun işitmeyi bozmadığı (127) tespit edilmiştir. ASIC3 genini ifade etmeyen farelerde yapılan çalışmada ise, ASIC3 alt birimi olmayan farelerde işitme kaybının olduğu tespit edilmiştir (122).

2.2.2. Asite duyarlı iyon kanalı 1

Asite duyarlı iyon kanalı 1 (ASIC1), memeli merkezi sinir sisteminde en fazla bulunan ve hidrojen afinitesi en yüksek olan ASIC alt tipidir (1). ASIC1 alt biriminin ASIC1a ve ASIC1b olmak üzere iki farklı varyantı bulunur. ASIC1a ve ASIC1b homomer şeklinde bulunabildiği gibi diğer ASIC alt tipleri ile heteromer de oluşturabilirler (128). ASIC1a'nın, merkezi sinir sisteminde öğrenme/hafıza, korku durumu, sinaptik plastisite, acı duyusunun algılanması ve retinal fizyolojide önemli rol oynadığı gösterilmiştir (101). ASIC1b'nin ise dorsal kök

gangliyonlarında yaygın olarak bulunduğu ve duyu transdüksiyonda rol oynadığı düşünülmektedir (129). Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda ASIC1a'nın birçok yönden ASIC1b'den farklı özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. ASIC1a'nın proteinlerinin yaklaşık 1/3'ün (yaklaşık 172 aminoasit) amino asit dizileri ASIC1b'den önemli ölçüde farklıdır (129). ASIC1a geni hem merkezi sinir sisteminde hem de periferel duyu nöronlarında ifade edilirken, ASIC1b geni ise sadece periferel duyu nöronlarında ifade edilmiştir (Şekil 2.8) (5). ASIC1a akımının aktivasyon eşiği yaklaşık olarak pH 7,0 iken ASIC1b'nin yaklaşık pH 6,5'dir. Homomerik ASIC1a kanallarının %50'sinin aktive olduğu (pH₅₀) değeri yaklaşık olarak 6,4 iken (128, 130), ASIC1b'nin pH₅₀ değeri yaklaşık olarak 5,9'dur (128). ASIC1a kanalları yavaş bir şekilde duyarsızlaşır, yani desensitize olur (t = 3,5 s) ve yavaş olarak duyarsızlaşmadan kurtulur (t = 13 s). ASIC1b kanalları ise daha hızlı bir şekilde duyarsızlaşır (t = 1,7 s) ve duyarsızlaşmadan kurtulur (t = 5,9 s) (131). ASIC alt birimleri arasında ASIC1a kanallarının Ca²⁺'ya geçirgen olan tek alt birim olduğu düşünülmekteydi (Şekil 2.7) (1, 129). Ancak son zamanlarda insanlarda yapılan çalışmalarda ASIC1b kanallarının da Ca²⁺ geçirgenliğine sahip olduğu gösterilmiştir (132). Psalmopoeus cambridgei Toxin 1 (PcTx1), ASIC1a'nın spesifik inhibitörüdür (101). ASIC'lerin nöronlardaki tam konfigürasyonu belirsiz olmasına rağmen beyin nöronlarındaki ASIC'lerin başlıca komponentleri homomerik ASIC1a ve heteromerik ASIC1a/2a kanallarıdır (133, 134).

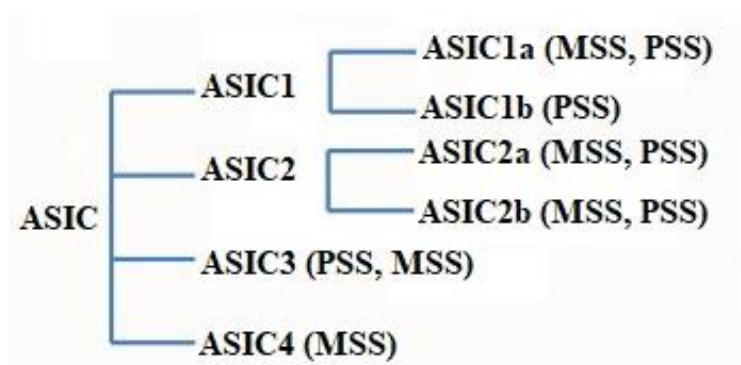


Şekil 2.7. ASIC1a'nın Ca²⁺ geçirgenliği (135)

2.2.3. Asite duyarlı iyon kanalı 2

Asite duyarlı iyon kanalı 2 (ASIC2)'nin memeli dejenerin “mammalian degenerin (MDEG)” ve beyin Na⁺ kanalı 1 “brain Na⁺ channel 1 (BNC1)” gibi farklı isimleri de vardır. ASIC2a ve ASIC2b olmak üzere iki tane ASIC2 varyantı tanımlanmıştır. ASIC2a ve ASIC2b beyin, dorsal kök gangliyonları ve ekşi tat reseptörleri gibi dokularda bulunurlar. ASIC'ler den ilk olarak ASIC2a tanımlanmıştır (136). ASIC2a'nın, baroreseptör duyarlılığı ve retina bütünlüğünün onarımı için gerekli olduğu gösterilmiştir (119). ASIC2a'nın büyük olasılıkla nöronlarda mekanik hasarda rol oynadığı düşünülmektedir (137). ASIC2a kanallarının aktivasyonu için daha büyük bir pH düşüşü gerekmektedir. Homomerik ASIC2a kanalları yarı-maksimal aktivasyon (pH₅₀) değeri yaklaşık olarak pH 4.35'dir (138). Bu kanallar yavaş duyarsızlaşır (t = 2.8 s) ve hızlı duyarsızlaşmadan kurtulur (t = 0.6 s) (130). ASIC2a kanal genlerinin periferik sinir sisteminde ve merkezi sinir sisteminde ifade edildiği gösterilmiştir (Şekil 2.8). Fakat merkezi sinir sistemi nöronlarında daha fazla ifade edildiği rapor edilmiştir (136). ASIC2a kanalları hem homomer şeklinde hem de heteromer şeklinde fonksiyonel olarak bulunabilirler. Örneğin ASIC2a alt birimleri ASIC1a ile birleşerek beyinde heteromerik kanallar oluştururlar (139).

ASIC2b kanal genleri hem duyu hem de merkezi nöronlarda ifade edilirler (Şekil 2.8). ASIC2a kanallarının aksine homomerik ASIC2b alt birimleri tek başlarına fonksiyonel kanallar oluşturmazlar. Ancak ASIC alt birimleriyle birleşerek heteromültimerik kanallar oluşturabilirler (106). Örneğin ASIC2b, ASIC1a ile birleşerek asidoz kaynaklı nöronal hasarlanmalara katkıda bulunan fonksiyonel kanallar oluştururlar. Ayrıca ASIC2b diğer ASIC'lerle birleşerek heteromerik kanalları düzenler ve proton tutmaya yardımcı olur (140).



Şekil 2.8. ASIC alt tiplerinin merkezi (MSS) ve periferik (PSS) sinir sistemindeki ifadesi (135).

2.2.4. Asite duyarlı iyon kanalı 3

Asite duyarlı iyon kanalı 3 (ASIC3) hem periferik sinir sisteminde hem de merkezi sinir sisteminde ifadesi gösterilmiştir. Fakat periferik sinir sistemi (duyu) nöronlarında daha fazla ifade edildiği rapor edilmiştir (141, 142). ASIC3'ün periferik sinir sisteminde hidrojene olan affinitesinin yüksek olduğu ve yüksek asidik pH'ya ($\text{pH} 0,5 = 6,5-6,7$) duyarlı olduğu gösterilmiştir. ASIC3 kanalları hızlı bir şekilde duyarsızlaşır ($t = 0,32 \text{ s}$) ve duyarsızlıktan (desensitizasyondan) kurtulurlar ($t = 0,58 \text{ s}$) (131). Homomerik ASIC3 kanalları protona son derece duyarlı olmalarından dolayı ekstraselüler pH düşüşüne hızlı bir şekilde cevap verebilirler (143). ASIC3 kanalları, duyu nöronlarında hem homomerik hem de heteromerik kanallar olarak fonksiyon gösterirler (144, 145). ASIC3 alt birimlerinin ağrının algılanmasında, inflamasyon ve iskemi gibi birçok fizyolojik ve / veya patolojik süreçler sırasında önemli rol oynadığı yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir (146). Örneğin ASIC3 kanallarının kalp duyu nöronlarında bulunduğu ve miyokardiyal iskemiye cevap verebildiği gösterilmiştir (147). Ayrıca iskemi ve duyu nöronlardaki inflamatuvar ağrı sırasında ASIC3'ün bir sensör olarak görev yapmakta olduğu da rapor edilmiştir (148).

2.2.5. Asite duyarlı iyon kanalı 4

Asite duyarlı iyon kanalı 4 (ASIC4), çok yakın bir zamanda tanımlanmıştır (6, 149). ASIC4 spinal kord ASIC (SPASIC) olarak da isimlendirilir. Akopian ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ASIC4 mRNA ekspresyonunun beynin bazı bölümlerinde ve yetişkin sıçan dorsal kök gangliyonunda olduğunu göstermişlerdir (6). ASIC2b kanallarında olduğu gibi ASIC4 kanalları da homomerik kanallar olarak fonksiyon görmezler (149). ASIC4 kanalları genellikle ASIC3 ve ASIC1 kanallarıyla heteromer oluşturarak işlev görürler. ASIC4, ASIC alt birimleri arasında en az çalışılan kanal olduğu için fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (150).

2.2.6. Asite duyarlı iyon kanallarının farmakolojisi

Asite duyarlı iyon kanalları çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda uyarının transdüksiyonuna yardımcı olurlar (151). ASIC inhibitörleri, non-spesifik moleküller olarak doğal peptit toksinleri olan hayvan zehirlerinden izole edilirler (152). ASIC'lerin modülasyonunda bazı hayvan zehirlerinden elde edilen pepsin toksinler, nöropeptitler, organik bileşikler ve iki/üç değerlikli katyonların bazıları görev alırlar.

2.2.6.1. Hayvan kaynaklı peptid toksinler

Güney amerika tarantulasından (*Psalmopoeus cambridgei* örümceği) ve deniz anemonu mantarından (sea anemone *Anthopleura elegantissima*) ASIC'leri inhibe eden peptid toksinler izole edilmiştir. *Psalmopoeus cambridgei* örümceğinden *Psalmopoeus cambridgei* Toxin 1 (PcTx1) (153) ve deniz anemonu mantarından ise *Anthopleura elegantissima* Toxin 2 (APETx2) izole edilmiştir (154). Bu toksinler özellikle ASIC1 ve ASIC3 kanallarını inhibe etmektedirler. PcTx1, 40 amino asit içeren ve homomerik ASIC1a kanalını spesifik olarak bloke eden bir peptittir. Bu peptit, kemirgenlere intratekal (i.t) veya intraserebroventriküler (i.c.v) olarak enjekte edildiğinde kuvvetli ağrı kesici özelliği gösterir. APETx2 ise 42 amino asit içerir, homomerik ASIC3 ve ASIC3 içeren heteromerik kanalları inhibe eder. APETx2, periferik olarak uygulandığında analjezik etki gösterir. PcTx1'in ASIC1a üzerine etki mekanizması iyi bir şekilde tanımlanmıştır fakat APETx2'nin ASIC3 üzerine bağlanma bölgeleri ve inhibisyon mekanizması henüz tam olarak tanımlanmamıştır (108).

2.2.6.2. Nöropeptidler

ASIC'ler omurgasızlardaki FMRF (Phe-Met-Arg-Phe) amid kapılı Na⁺ kanallarıyla (FaNaC) aynı kanal ailesine aittir. ASIC kanalları FMRF amid kanalları ile yapısal benzerlikler göstermektedir. Bundan dolayı FMRF amid kanallarının ASIC'lerin agonistleri olabileceği düşünülmektedir (4). Yapılan çalışmada FMRF amid'in ASIC'leri doğrudan aktiveleştirmedeği fakat ASIC3 ve ASIC1a kanallarının akımlarını güçlendirdiği gösterilmiştir (155). FMRF amid'in ASIC3 kanalları üzerine doğrudan etki ederek pik akımını arttırdığı rapor edilmiştir (151). Nöropeptit FF (FLFQPQRFamide) ve nöropeptit SF (SLAAPQRFamide) çoğunlukla memelilerin merkezi sinir sisteminde ve özellikle de omurilikte ifade edilirken, FMRF amid ise omurgasızlarda bulunur. Bu nöropeptitler hakkında çok az bilgi vardır (155). Nöropeptit FF'nin dorsal kök gangliyonu nöronlarında da bulunduğu tespit edilmiştir (156). İnflamasyon durumunda nöropeptit FF ve ASIC alt birimlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmüştür. Bundan dolayı ASIC'lerin, inflamasyon durumunda nosiseptör uyarılabilirliğini düzenlemede önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (157).

2.2.6.3. Organik bileşikler

ASIC'lerin tanımlanan ilk blokeri olan amilorid, potasyum koruyucu bir diüretiktir (136). Amilorid seçici olmayan bir ASIC inhibitörüdür ve bilinen tüm ASIC alt tipilerini bloklar (158, 159). Konsantrasyon aralığı IC_{50} ; 5 ve 100 μM arasında değişir. Amilorid'in türevleri ise benamil ve 5 - (N-Etil-N-izopropil) amilorid (EIPA)'dır. Bunlar zayıf, seçici ve geri dönüşümlü ASIC blokörleridir (158). ASIC'lerin bilinen diğer organik bileşik inhibitörü ise A-317567 bileşiğidir. Bu bileşiğin konsantrasyon aralığı IC_{50} , 2 ve 30 μM arasında değişir. Ayrıca A-317567 molekülünün bir parçası olan amidin; ASIC3 akımının inhibe edilmesinde önemli rol oynar (160). Son zamanlarda, 4-anti-protozoal diarilamidin'in (4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), diminazene, hydroxystilbamidine (HSB) ve pentamidin) hipokampal nöronlarda ASIC akımlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (161). Ayrıca non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAIDs), ASIC3 ve ASIC1a kanallarının aktivitesini inhibe ederler. ASIC3 akımını aspirin, salisilik asit (sodyum salisilat) ve diklofenak inhibe ederken, ASIC1a'yı flurbiprofen ve ibuprofen bloke eder (113).

2.2.6.4. İki ve üç değerlikli katyonlar

ASIC'ler kurşun (Pb^{2+}), bakır (Cu^{2+}), nikel (Ni^{2+}), kadmiyum (Cd^{2+}), gadolinyum (Gd^{3+}) ve kalsiyum (Ca^{2+}) gibi çeşitli iyonlar tarafından inhibe edilirler. Kurşun'un spesifik olarak ASIC1 kanallarının akımlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (112). Sıçan hipotalamik kültür nöronlarında Cu^{2+} 'nın ASIC akımlarını doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (162). Hipokampus CA1 nöronlarında ve CHO hücrelerinde ASIC akımlarının Ni^{2+} ve Cd^{2+} tarafından doza bağımlı olarak inhibe edildiği bulunmuştur (163). Hem Ni^{2+} hem de Cd^{2+} voltajdan bağımsız, hızlı ve geri dönüşümlü olarak etki gösterirler. Nikel ASIC alt birimlerinden sadece homomerik ASIC1a ve heteromerik ASIC1a / 2a kanallarını hızlı bir şekilde inhibe eder. Kadmiyum'un ise homomerik ASIC2a ve ASIC3 kanallarını ve heteromerik ASIC1a / 2a, 1a / 3 ve 2a / 3 kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (163). Gadolinyum'un ASIC3 içeren homomerik ve heteromerik kanalları inhibe ettiği bilinmektedir (10). Hücre dışında Ca^{2+} seviyesinin artmasıyla homomerik ASIC1a ve ASIC2a kanallarının iletkenliğinin azaldığı gösterilmiştir (164). Ayrıca iki değerlikli katyonlardan çinko (Zn^{2+})'nin ASIC'lerin modülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (162, 165). Zn^{2+} ASIC'ler üzerinde iki etkiye sahiptir; mikromolar konsantrasyonda akımları güçleştirici etki gösterirken, nanomolar konsantrasyonda inhibe edici özelliği vardır. Nanomolar konsantrasyonda inhibitör etkisi homomerik ASIC1a ve heteromerik ASIC1a/2a kanalları üzerinedir (166). Mikromolar

konsantrasyonda Zn^{2+} 'nin homomerik ve heteromerik ASIC2a içeren kanalların asit aktivasyonunu güçlendirdiği gösterilmiştir (110). Ayrıca yüksek konsantrasyonlu Zn^{2+} 'nin, ASIC3 akımlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (167).

2.2.7. İşitme sisteminde asite duyarlı iyon kanalları

İşitme sisteminde ASIC'ler ile yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Örneğin ASIC2'nin spiral gangliyon nöronlarının çoğunda bulunduğu, ancak erişkin kohleadaki korti organında olmadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. ASIC2'nin spiral gangliyon nöronlarında asit ile oluşturulan yanıtlara sürekli olarak katkıda bulunduğu ve gürültüye bağlı geçici işitme eşiği kaymasına neden olduğu rapor edilmiştir (124). Fare kohleasında yapılan çalışmada ASIC3'ün transkripsiyonu tespit edilmiştir (168). İn situ hibridizasyon ile korti organında ve spiral gangliyon nöronlarında yapılan çalışmalarda ASIC3 ekspresyonunun yeri belirlenmiştir (122). Spiral gangliyon hücrelerinde, korti organının duyuusal sinirlerinde ve korti organının hücrelerinde ASIC3'ün bulunması, memeli kohleasının mekanotransdüksiyonunda ASIC3'ün rolünün olduğunu düşündürmektedir. Kohleadaki ASIC1 geninin ifade edilip edilmediği bilinmemektedir.

Vestibüler sistemde yapılan çalışmada Mercado ve arkadaşları (2006), vestibüler afferent nöronlarının asetil salisilik aside duyarlı ASIC benzeri akımlar ifade ettiklerini gösterdiler (125). ASIC'lerden de sadece ASIC3 içeren kanal asetil salisilik aside duyarlı olduğu için vestibüler afferent nöronlarında ASIC3 alt tipinin bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca, vestibüler gangliyon nöronlarında ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 ve ASIC4 kanallarının bulunduğu gösterilmiştir (169).

Birbirinden bağımsız yapılan iki çalışmada, ASIC2 geni bulunmayan farelerin işitebildiği ve işitme eşiğinin normal farelere benzer olduğu gösterilmiştir (124, 127). Diğer taraftan yine ASIC2 geni olmayan farelerin, genetiği değiştirilmemiş normal farelere göre gürültüye bağlı geçici eşik kaymalarına karşı daha dirençli olduğu görülmüş. Bu da farelerin gürültüye duyarlılığında ASIC2'nin rol oynadığını düşündürmektedir. ASIC3 geni olmayan farelerde yapılan çalışmada ise, 16 haftadan daha yaşlılarda yaşa bağlı işitme kaybının olduğu tespit edilmiştir (122). Yine başka bir çalışmada ASIC3 geni bulunmayan farelerde belli yüksek frekanslı ses uyarılarına karşı tepki vermedikleri, dolayısıyla yüksek frekanslarda işitme kaybı görüldüğü rapor edilmiştir. Bundan dolayı ASIC3'ün kohleanın mekanik iletiminde doğrudan rol oynayabileceği önerilmiştir (11).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Giriş

Çalışmada ASIC kanallarının kohlear çekirdek dokusunda varlığının tespitinde Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR) ve yama kenetleme (patch clamp) tekniklerinden yararlanılmıştır.

3.1.1. Yama kenetleme (Patch clamp) tekniği

20. yüzyılın başlarında hücre uyarılabilirliği ve iyon kanallarına ait ilk çalışmalar yapılmıştır. Bu konularda ilk olarak 1937 yılında Andrew Fielding Huxley ve Alan Lloyd Hodgkin çalışmalar yapmıştır. Mürekkep balığının dev aksonunda yaptıkları çalışmada 1939 yılında hücre içi elektrotlar kullanarak ilk defa aksiyon potansiyelini kaydetmişler (170). Hodgkin ve grubu voltage clamp adını verdikleri bu teknikle hücre zarı akımlarını ölçmüşler. Daha sonra ise Neher ve Sakmann yama kenetleme (patch clamp) adını verdikleri tekniği kullanarak tek bir iyon kanalından geçen iyon akımını kayıt etmeyi başarmışlar. Bu çalışmalarından dolayı kendilerine 1991 yılı Nobel ödülü verilmiştir (171).

Yama kenetleme tekniği, hücre zarındaki kanalların iyon akımlarını incelemek için yaygın olarak kullanılan bir elektrofizyolojik tekniktir. Yama kenetleme tekniği, pipet içerisindeki elektrot vasıtası ile hücrelerdeki voltaj değişikliklerini ölçme esasına dayalıdır. Bu teknik iyon kanallarının biyofiziksel, fizyolojik ve farmakolojik özelliklerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Yama kenetleme tekniği ilk keşfedildiğinde küçük bir hücre zarı parçasının voltajının kontrol edilmesinde kullanılmıştır. Şimdi ise zar üzerinde mikropipet yardımıyla hem voltaj kenetlemede hem de akım kenetlemede kullanılmaktadır.

Bu tekniğin genel olarak uygulama alanları; akım kenetleme (current clamp) ve voltaj kenetleme (voltage clamp) olmak üzere ikiye ayrılır. Akım kenetleme çalışmalarında, hücreye büyüklüğü bilinen bir akım verilerek, hücrenin akıma karşı göstermiş olduğu voltaj yanıt ölçülür. Uygulanan bu akımlar, fizyolojik şartlarda hücreleri uyarıcı ya da inhibe edici karakterde olan sinaptik akımlara benzetilebilir. Bundan dolayı hücrelerin sinaptik aktivitelerinden kaynaklanan EPSP ya da İPSP durumlarını değerlendirmek için akım kenetleme çalışmaları yapılır. Voltaj kenetlemede ise hücre zarının voltajı kontrol edilmek suretiyle, iyon kanallarından geçen akım miktarı ölçülür. İyon kanallarının sahip olduğu aktivasyon, inaktivasyon ve deaktivasyon kinetikleri voltaj kenetleme çalışmalarıyla belirlenir (172).

Yama kenetleme tekniğinin; hücreye-yapışık (“on-cell” ya da “cell-attached”), tüm-hücre kaydı (“whole cell”), içi-dışarda (“inside-out”) ve dışı-dışarda (“outside-out”) olmak üzere 4 farklı kayıt konfigürasyonu bulunur. Her bir konfigürasyonun kendine özgü uygulama alanı olduğundan dolayı, hangi konfigürasyonun kullanılacağı, çalışılan iyon kanalının tipine ve çalışmanın amacına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda hücrede bulunan tüm iyon kanallarının oluşturduğu akımın özelliklerinin ölçülmesi hedeflendiği için tüm-hücre kayıt konfigürasyonu kullanıldı. Eğer tek bir ASIC kanalının özellikleri çalışılacak olsaydı dışı-dışarda veya içi dışarda konfigürasyonları kullanılacaktı. Pipet hücreye yapışık (cell-attached) konfigürasyon oluşturulduktan sonra, pipet içinde mühürlenmiş hücre zarı parçası negatif bir basınç ile yırtılarak tüm-hücre kayıt konfigürasyonuna geçilir. Negatif basınç ile zar bütünlüğü bozulunca pipet solusyonu ile hücre içindeki sitoplazma karışmış olur. Pipet solusyonu ile sitoplazma sıvısı arasında iyonların konsantrasyonları farklıdır. Bundan dolayı kavşak (“junction”) potansiyeli oluşur. Kavşak potansiyeli, deneylerde yapılan voltaj değerlerine kavşak potansiyeli olarak -12 mV eklenmiştir.

3.1.2. Yama kenetleme (Patch clamp) düzeneği

Antivibratif masa: Yama kenetleme deneylerinde çevredeki insan ve araçların hareketleri, pipetin titreşim göstermesine neden olur. Pipetin titremesi ise hücrenin hasarlanmasına neden olarak hücrenin kaybedilmesine yol açar. Bundan dolayı zemindeki titreşimlerin pipete yansımaya engel olmak için antivibratif masa kullanılmaktadır. Antivibratif masalarda; masanın üst tablası ayaklarından bağımsız olarak nitrojen gazı veya hava basıncı vasıtasıyla havada tutularak deney sırasında zeminde oluşan titreşimler masa üzerindeki cihazlara yansımaları önlenir (Şekil 3.1).

İnverted mikroskop: Yama kenetleme deneylerinde hücrelerin görüntülenmesi ve hücre zarı ile mikropipet ucunun yama kenetleme durumunun oluşturulması için inverted mikroskop kullanılır. İnverted mikroskop, kayıt sırasında pipet ile hücrenin pozisyonunun gözlemlenmesi ve kaliteli bir gigaseal oluşması için gereklidir. Yama kenetleme deneylerinde objektifleri su altında çalışabilen bu mikroskoplar kullanılmalıdır (Şekil 3.1).

Makro ve mikro manipülatörler: Mikropipet ucunun hücre yüzeyine hassas bir şekilde yaklaştırılarak gigaseal oluşturulması amacıyla kullanılır. Pipet ucu, hücre ile aynı seviyeye inene ve her ikisi aynı odak noktasında görülene kadar makro manipülatörler kullanılır. Daha sonra ise ince hareketler için mikromanipülatörler kullanılır (Şekil 3.1).

Bilgisayar: Bilgisayar deney süresince kayıtların görüntülenmesi, kontrolü, elde edilen verilerin depolanması ve analizi için kullanılır (Şekil 3.1).

A/D konverter: Hücreden alınan analog biyolojik sinyallerin dijital sinyallere dönüştürülmesi için A/D konverter kullanılır (Şekil 3.1).

Ampifikatör (yükseletç): Ampifikatör gigaseal oluşturduktan sonra hücreden kaynaklanan çok küçük elektriksel sinyallerin yükseltilerek bilgisayara aktarılması için kullanılır (Şekil 3.1).

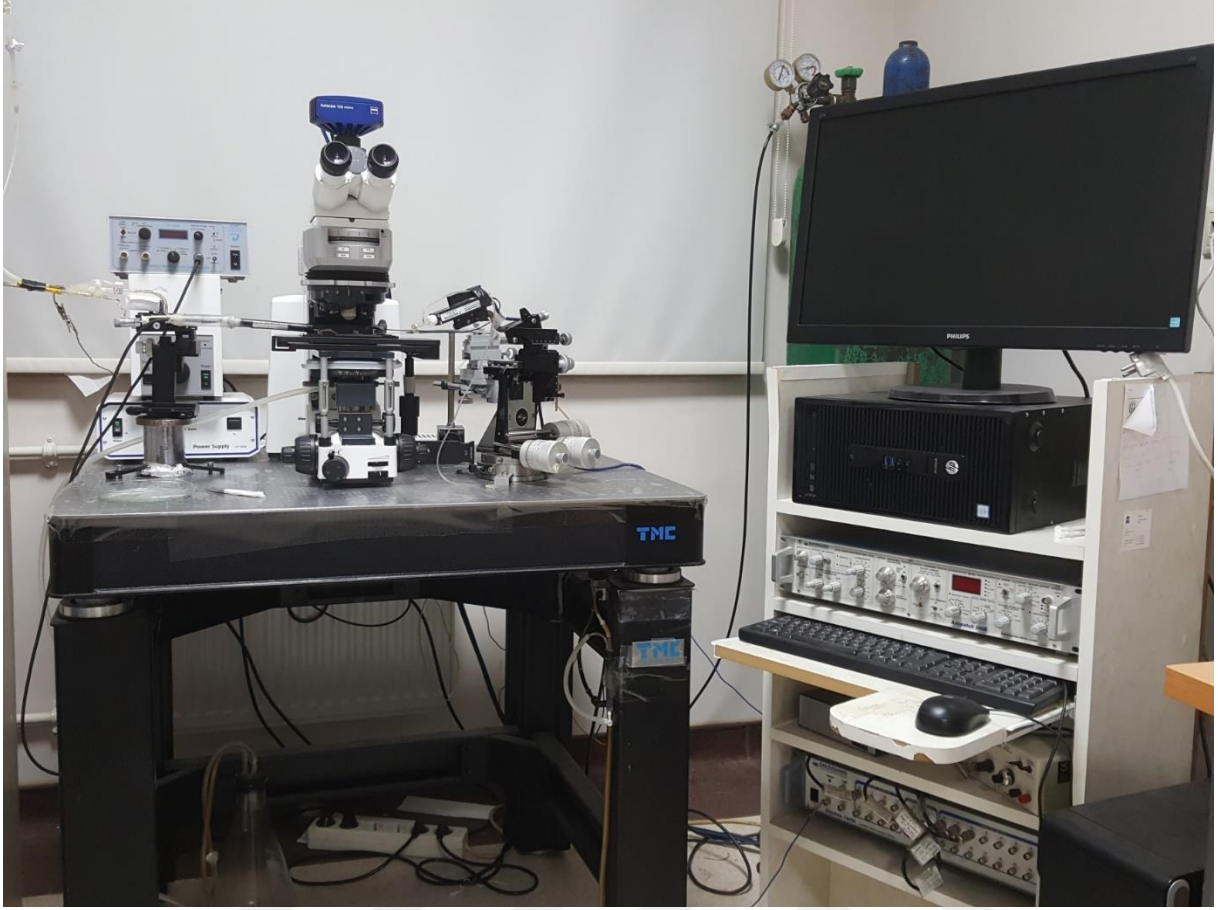
Pipet puller: Hücre içi kayıt almak için kullanılacak mikropipetlerin yapımında pipet puller kullanılır. Pipet puller cihazı, bir kapiller tüpe ortasından ısı verilirken uç kısımlarından eşit güç ve aynı zamanlama ile zıt yönlerde çekilmesi prensibi ile çalışmaktadır. Mikropipetler pipet puller cihazı kullanılarak borasilikat malzemeden yapılmış boyları 100 mm, dış çapı 1.2 mm ve iç çapı 0.68 mm olan cam tüplerden elde edilir.

Diseksiyon mikroskobu: Dokudan kesitlerinin sağlıklı bir şekilde alınması için diseksiyon mikroskobu kullanılır.

Vibratom: Dokudan kesitler elde etmek için vibratom kullanılır. Vibratom ile yapılacak çalışmaya göre istenilen kalınlıkta kesitler alınabilir. Bu çalışmada 150 mikrometre (μm) kalınlıkta kesitler kullanıldı.

Perfüzyon sistemi: Kayıt odacığı içerisindeki hücrelerin iyon dengesini sağlamak için perfüzyon sistemi kullanılır. Solüsyonlar kayıt odacığına, boru ve vanalardan oluşan perfüzyon sistemiyle uygulanır.

Oksijen tüpü ve taşları: Oksijen tüpü ve taşları ise hücrelerin oksijen ihtiyacı için perfüzyon sistemi ile birlikte kullanılır.



Şekil 3.1. Yama kenetleme (patch-clamp) sisteminin genel görünümü (antivibratif masa, mikroskop, yama kenetleme ampflikatörü, bilgisayar, mikro ve makro manipulatörler)

3.2. Araştırma Protokolü

Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden etik kurul onayı alınarak çalışmalara başlanmıştır (protokol no:5 ve TF. DT.17.46 numaralı proje). Çalışma kapsamında ASIC mRNA'larının kohlear çekirdek dokusunda ifade edilip edilmedikleri Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR) ile bu kanalın biyofiziksel karakterizasyonu ise yama kenetleme (patch clamp) tekniği kullanılarak yapılmıştır.

3.2.1. Real time-polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları

Real time-polimeraz zincir reaksiyonu çalışmalarında albino BALB/c ırkı 16 günlük, 75 günlük ve 2 yaşındaki fareler kullanılmıştır. Fareler dislokasyon yapıldıktan sonra stereo mikroskop altında kohlear çekirdek dokuları çıkarıldı ve daha sonra RT-PZR çalışmalarının yapılması için Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na uygun şartlarda gönderildi. Kohlear çekirdek dokularından PureLink™ RNA Mini Kiti kullanılarak

RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, elde edilen RNA örneklerinden 10 µl kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edildi. Daha sonra gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), ACCN1, ACCN2 ve ACCN3 genlerinin belirlenmesi için Tablo 3.1'de verilen primerler kullanılmıştır. RT-PZR analizleri sonucunda gen ifade düzeylerinin hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır.

Tablo 3.1. RT-PZR' da kullanılan primerler

TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250µl	
Primer	Katalog Numarası
GAPDH	Mm99999915-91
Accn1 (ASIC1 geni)	Mm00475691-ml
Accn2 (ASIC2 geni)	Mm01305997-ml
Accn3 (ASIC3 geni)	Mm00805460-ml

Real Time-PZR üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. RT-PZR plate hazırlanırken cDNA örneklerinden her bir kuyucuğa 2 µl örnek konuldu. Buz üzerinde her bir örnek için 5 µl TaqMan Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara koyularak vortekslendi (Tablo 3.2). Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine 8 µl hazırlanan karışımdan eklenerek plate'in üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatılmıştır. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla Mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 3.2. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşikler	Hacim(µl) X Örnek Sayısı
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H2O	2.5
Toplam	10

Genlerin ifade seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C'de 2

dakika, 95°C’de 10 dakika X 40 siklus, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Uygulanan RT-PZR programı

RT-PZR X 40 döngü				
	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zaman	2 dk	10 dk	15 dk	1 dk

3.2.2. Yama kenetleme çalışmaları

Yama kenetleme çalışmalarında albino BALB/c ırkı 14-17 günlük yaşta fareler kullanılmıştır. Bu yaştaki farelerin kullanılmasının nedeni; işitme yolağındaki nöronlar gelişimlerini büyük oranda tamamlamış olmalarıdır. Bu yaştan daha genç hayvanlarda yolaklar tam olarak gelişmediği, iyon kanalları ve hücreler gelişimlerini tamamlamadığı için elde edilen veriler yetişkin hayvanlardaki durumu yansıtmayacaktır. 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 (173).

3.2.2.1. Kohlear çekirdek dokusu kesitlerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan hayvanların kafası anestezi altında kesildi (dekapite edildi). Hayvanın başı sürekli oksijenlenen normal yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) içerisine alındı ve beyin sapından çıkan kraniyal sinirleri gerdirmeden diseksiyon yapıldı. Kafatası alındıktan sonra yaklaşık olarak 60° açıyla inferior kollikulus-superior kollikulus seviyesinden kesilerek beyin sapı çıkarıldı. İnferior kollikulus aşağıya gelecek şekilde, beyin sapının bulunduğu kısım teflon blok üzerine yapıştırıldı. Bu yapıştırma işlemi için cyanoacrylate (japon) bir yapıştırıcı kullanıldı. Daha sonra ise bu teflon blok vibratomdaki yerine yerleştirilerek, titreşimli vibratom ile 150 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. Bu işlemler sürekli oksijenlenen normal yBOS sıvısında yapıldı. Sürekli oksijenlenmekte olan normal yBOS solüsyonunda yaklaşık olarak 15-30 dakika inkübe edilen kesitler, intrasellüler kayıt almak üzere 0,3 ml solüsyon hacmine sahip kayıt odacığına alındı. Son olarak kayıt odacığı mikroskopa yerleştirildi ve yama kenetleme tekniği kullanılarak kohlear çekirdek dokusundaki hücrelerden kayıt alındı. Perfüze edilen yBOS solüsyonun sıcaklığı termoregülatörle 33 °C ‘de sabit tutuldu (87).

3.2.2.2. Kohlear çekirdek dokusundan yama kenetleme kayıtlarının alınması

Yama kenetleme kayıtları, yama kenetleme mikropipetleri kullanılarak alınmıştır. Yama kenetleme mikropipetleri 1,2 mm dış çapa sahip olan borosilikat cam pipetler kullanılarak üretilmiştir. Bu pipetlerin üretiminde Brown-Flaming P-97 model Sutter puller cihazı kullanıldı. Bu pipetlerden uç dirençleri 4-7 M Ω olanları deneylerde kullanıldı. Kayıt odacığına alınan kohlear çekirdek kesitlerindeki hücrelerden, önce hücreye-yapışık konfigürasyon elde edildi. Yani gigaseal direnci (>1 gigaohm) oluşturuldu. Gigaseal oluştuktan sonra insülin enjektörü vasıtasıyla mikropipet içerisine zayıf negatif basınç uygulanarak pipetin ucundaki zar kısmı yırtılarak tüm hücre kayıt konfigürasyonuna geçildi. Tüm kayıtlar, tüm hücre kayıt konfigürasyonunda alındı. Axopatch 200B model yama kenetleme amplifikatörü kullanılarak akım ve voltaj kenetleme deneylerinde veriler elde edildi. Analog kayıtlar 5-10 kHz bandında filtrelendi. Daha 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) ve verilerin analizi için Clampfit paket programları kullanıldı. Ayrıca şekillerin çizimi OriginLab pro 2016 versiyon 9,3 paket programı ile yapıldı.

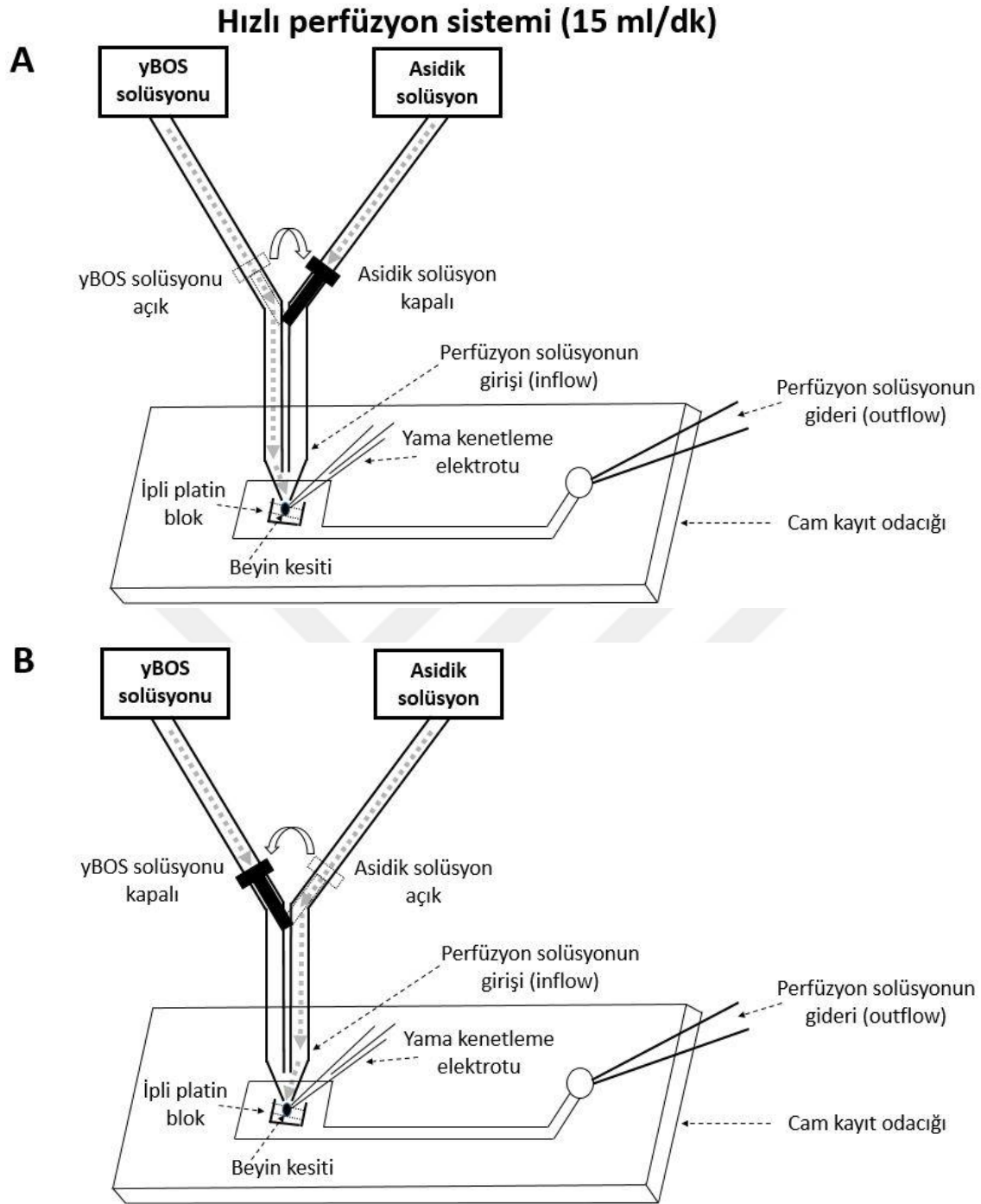
3.2.2.3. Kohlear çekirdek dokusundaki hücrelerin tanımlanması

Kohlear çekirdek hücrelerinin tanımlanması; lokalize oldukları bölgelere ve akım enjeksiyonlarına verdiği voltaj yanıtlarına göre yapılmıştır. Ventral kohlear çekirdekte biyofiziksel özellikleri farklı olan üç hücre tipi bulunmaktadır (7, 93). Bu hücrelerden ahtapot tipi sinir hücreleri, posterioventral kohlear çekirdeğin dorsal ve kaudal'inde bulunurlar. Yıldız tipi ve çalı tipi sinir hücreleri ise ventral kohlear çekirdeğin anterior bölümünde bulunurlar (7, 8). In vitro çalışmalardan elde edilen kayıtlarda çalı tipi ve ahtapot tipi hücrelerinin, eşik değeri aşacak depolarize edici akımlara yanıt olarak sadece bir aksiyon potansiyeli oluşturdukları gösterilmiştir (7). Diğer taraftan yıldız tipi hücreler ise çok sayıda aksiyon potansiyeli oluştururlar (13, 174). Çalışmamızda düşük pH'lı yBOS uygulaması, kohlear çekirdek hücrelerinden yıldız ve çalı hücrelerinde ASIC akımlarının oluşmasına neden olmuştur. Fakat ahtapot hücrelerinde ise tipik ASIC akımı elde edilememiştir. Asite duyarlı iyon kanallarından kaynaklanan akımların kaydedilmesi için hızlı perfüzyon sistemine ihtiyaç olduğu rapor edilmiştir (175). Ahtapot hücreleri, kohlear çekirdek içinde miyelinli liflerin yoğun olarak geçtiği bölgede yer alması nedeni ile perfüzyon solüsyonunun hızlı bir şekilde hücrelerin bulunduğu derinliklere giremediği ve ASIC kanallarının hızla duyarsızlaşmasına neden olduğu

düşünülmektedir. Bu nedenle ahtapot hücrelerinden tipik ASIC akımları elde edilemediği için bu hücreler çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.3. Hızlı perfüzyon sistemi

ASIC kanalları hızlı bir şekilde aktiflendiği ve duyarsızlaştığı için yapılan çalışmalarda hızlı perfüzyon sistemi kullanılmıştır (1, 126). Bundan dolayı bu çalışmada da hızlı perfüzyon sistemi kullanıldı (Şekil 3.2). Perfüzyon sistemi ile sürekli 15 ml/dakika hızda oksijenlenmiş yBOS perfüze edilmiştir. Ayrıca perfüzyon solüsyonunun girişi kesit üzerindeki kayıt alınan hücre üzerine hizalandı. Düşük pH'lı yBOS kayıt alınan hücreye 10 saniye süre ile uygulandı. Asite duyarlı iyon kanalları hızlı duyarsızlaşan kanallar oldukları için, ASIC akımlarının aktivasyonunu tekrar indüklemek için en az 6 dakika süre beklenmiştir. Asidik solüsyon uyguladıktan sonra, 6 dakikanın altındaki tekrar asidik solüsyon uygulamalarında akım oluşmamıştır.



Şekil 3.2. Hızlı perfüzyon sistemi. **A:** yBOS solüsyonu açık, asidik solüsyon kapalı. **B:** asidik solüsyon açık, yBOS solüsyonu kapalı.

3.4. Solüsyonlar

Çalışmada pipet solüsyonu, perfüzyon solüsyonu, Na^+ olmayan solüsyon, Ca^{2+} olmayan solüsyon ve farklı pH değerlerine sahip (pH = 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,0) asidik solüsyonlar kullanıldı.

Pipet solüsyonu: İyonik kompozisyonu açısından hücre içi sıvıya benzerlik gösterir. 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) şeklindedir. Solüsyonun pH'sı potasyum hidroksit (KOH) kullanılarak 7,40 olacak şekilde hazırlanmıştır (176). Kohlear çekirdek hücrelerinden uzun süre istikrarlı kayıtlar alınabilmesi için, pipet solüsyonuna ATP, GTP ve fosfokreatinin eklendi (177). Pipet solüsyonu stok solüsyon şeklinde hazırlanarak -40°C de muhafaza edildi ve her deney öncesi çıkarılarak kullanıldı.

Perfüzyon solüsyonu: Hücrelerin tespitinde 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-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Merck), 10 mM glukoz (Sigma aldrich) olacak şekilde hazırlanmıştır. Beyin kesitlerinin alınmasından en az 45 dk öncesinden ve deney süresince bu solüsyon sürekli karbojen gazıyla (95 % O₂ + 5% CO₂) oksijenlendirildi. Solüsyonun pH'sı 7,35-7,40 olacak şekilde 1 M'luk sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak ayarlandı (7, 48).

Na⁺ içermeyen solüsyon: Na⁺ içermeyen solüsyonu kanalların Na⁺ geçirgenliğinin belirlenmesi için kullanıldı. Na⁺ içermeyen solüsyon, normal yBOS solüsyondaki 138 mM sodyum klorür (NaCl) (Merck) yerine 150 mM kolin klorid (C₅H₁₄CINO) (Fluka) kullanılarak hazırlanmıştır.

Ca²⁺ içermeyen solüsyon: ASIC kanalları üzerine Ca²⁺ iyonunun etkisinin belirlenmesi için Ca²⁺ içermeyen solüsyon kullanıldı. Ca²⁺ içermeyen solüsyon, normal yBOS solüsyondaki 2,4 mM kalsiyum klorür (CaCl₂) (Fluka) yerine 6 mM Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma) kullanılarak hazırlanmıştır.

Asidik solüsyonlar: Asite duyarlı iyon kanallarının varlığını belirlemek için perfüzyon solüsyonunun pH'sı 7,40'dan daha düşük pH'lara (pH = 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,0) indirilerek asidik solüsyonlar oluşturulmuştur. Perfüzyon solüsyonlarında kullanılan HEPES'in yerine asidik solüsyonlarda 2- [N-morpholino ethanesulfonic acid] (MES) (Sigma aldrich) aynı derişimde kullanılmıştır. ASIC akımlarını belirlemek için asidik solüsyonlarına ASIC kanal blokeri olan amilorid (0,01, 0,1, 1, 10 ve 100 mM) ve ASIC alt tiplerini belirlemek için kurşun (10 µM), çinko (300 µM) ve sodyum salisilat (1 mM) eklenmiştir (126).

Kullanılan kimyasal ajanlardan amilorid perfüzyon solüsyonu içerisindeki oranı 1/1000'i geçmeyecek şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde ve diğer tüm kimyasal maddeler yBOS

solüsyonu içerisinde çözdürüldü. Solüsyonların ozmolaritesi 295-310 mOZM arasında tutuldu. Solüsyonlar kayıt odacığına, boru ve vanalardan oluşan hızlı perfüzyon sistemiyle uygulandı.

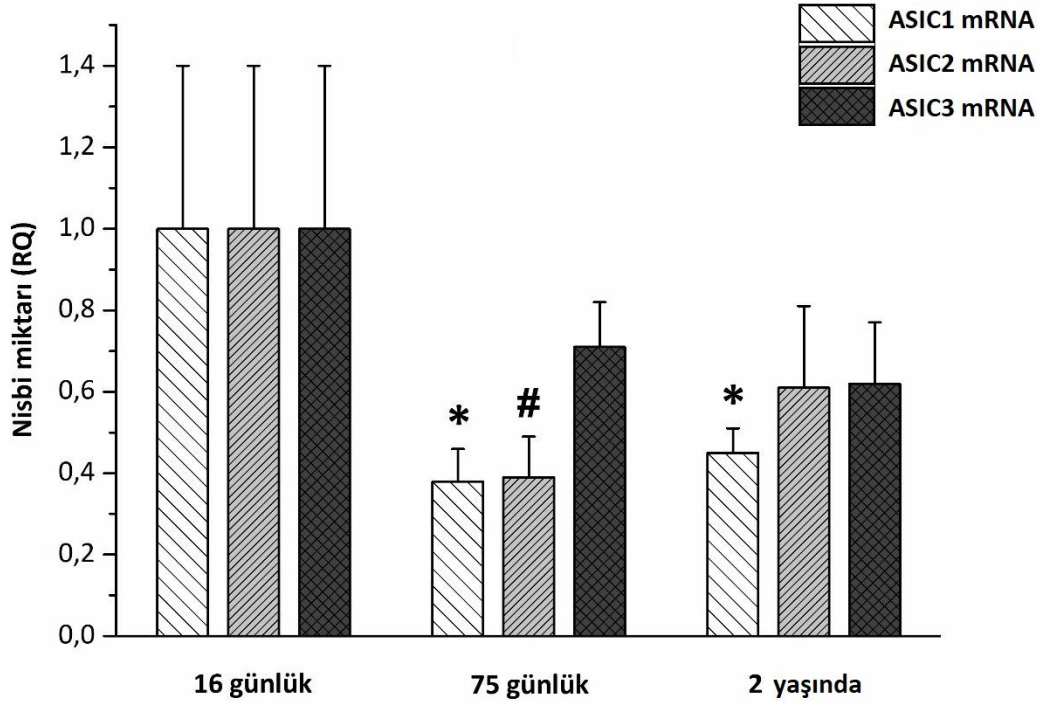
3.5. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında istatistiksel değerlendirme; Statistical Package for Social Science (SPSS) Versiyon 23,0 (SPSS inc, Chicago, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Yama kenetleme çalışmalarında asidik solüsyon uygulanmadan önce alınan kayıtlar ve asidik solüsyon uygulanması sırasında alınan kayıtlar arasında bir fark olup olmadığı incelendi. Asidik solüsyon sırasında oluşan farkın belirlenmesinde Student's t testi kullanıldı. RT-PZR çalışmalarında da gruplar arasındaki gen ifade düzeyleri arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Student's t testi kullanıldı. Sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler grup ortalaması $\pm$ standart hata (S.H.) şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Real time-polimeraz zincir reaksiyon sonuçları

Real time-polimeraz zincir reaksiyon (RT-PZR) analizi sonuçlarına göre 16 günlük, 75 günlük ve 2 yaşındaki albino BALB/c ırkı farelerin kohlear çekirdek dokularında ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 iyon kanalı alt tiplerinin gen ekspresyonları mRNA düzeyinde tespit edilmiştir (Şekil 4.1). 16 günlük fareler kontrol olarak kullanılarak 75 günlük ve 2 yaşındaki farelerin ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 gen ifade düzeyleri yaşa göre karşılaştırıldı. Fare kohlear çekirdek dokusundaki ASIC1 geni mRNA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla 75 günlük ve 2 yaş gruplarında yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı tespit edildi. 75 günlük ve 2 yaş gruplarının gen ifade düzeylerindeki azalma, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.1). ASIC2 geni mRNA düzeylerinde kontrol grubuna göre 75 günlük ve 2 yaş gruplarında azalmanın olduğu bulunmuştur. 75 günlük gruptaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.1). Ancak 2 yaş grubunda meydana gelen azalmanın, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). ASIC3 geninin mRNA düzeyleri ise 75 gün ve 2 yaş gruplarında kontrol grubuna kıyasla bir azalmanın meydana geldiği fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. RT-PZR analizi ile fare kohlear çekirdek dokusunda ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 iyon kanalı genlerinin mRNA düzeyleri. * $p < 0,05$ 16 günlük ASIC1 geni ile karşılaştırıldığında. # $p < 0,05$ 16 günlük ASIC2 geni ile karşılaştırıldığında.

4.2. Yama kenetleme (patch clamp) bulguları

4.2.1. Voltaj kenetleme bulguları

Voltaj kenetleme, genelde voltajla aktive edilmiş akımları kaydetmek için yaygın olarak kullanılan yama kenetleme protokolüdür. Voltajla aktive edilmiş akımları kaydetmek için aynı sürelerle sahip değişen amplitütlerde voltaj adımlar uygulanır. Voltaj adımlar, genellikle hücrede voltajla aktive olan çoğu iyon kanalının kapalı olduğu istirahat zar potansiyeline yakın bir değer olan tutma potansiyelinden (holding potential) başlar. Fakat ASIC kanalları voltaja duyarsız olduğu için çalışmalarımızda kanallar voltajla değil, düşük hücre dışı pH'ya sahip solüsyon ile aktive edilmiştir. Yıldız hücreleri (istirahat potansiyeline yakın bir değerde) -62 mV tutma potansiyelinde, çalı hücreleri ise -52 mV tutma potansiyelinde tutularak asidik solüsyonlar uygulandı ve voltaj kenetleme kayıtları alındı.

Hücre dışından hücre içine pozitif iyon girişiyle ya da hücre içinden hücre dışına negatif iyon çıkışıyla oluşan akıma “içeriye doğru akım (inward akım)” denir. İçeriye doğru akımlar genellikle sodyum ve kalsiyum gibi iyonların geçişiyle oluşur. Hücre dışından hücre içine negatif iyon girişi ya da hücre içinden hücre dışına pozitif iyon çıkışı dışarıya doğru akım (outward akım) olarak adlandırılır. Dışarıya doğru akımlar ise genellikle potasyum iyonlarının

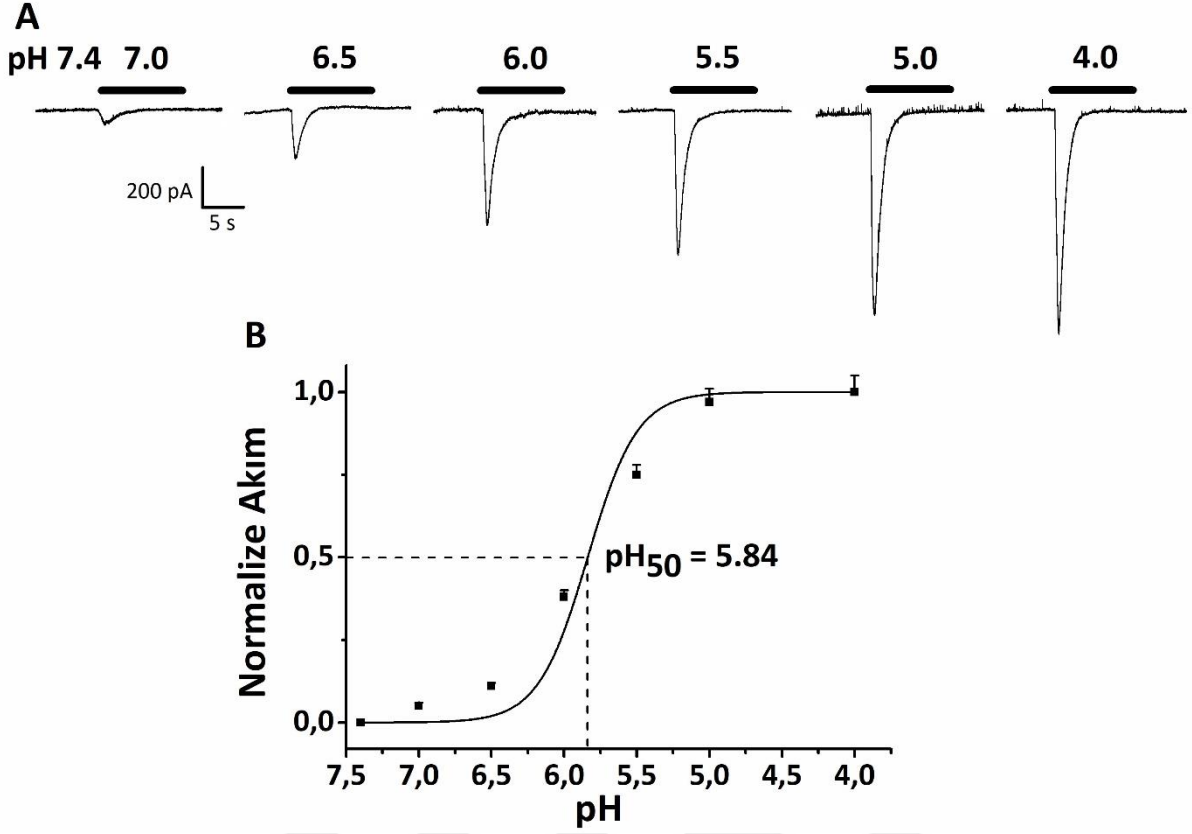
hücreyi terk etmesi neticesinde meydana gelir. Voltaj kenetleme çalışmalarımızda içeriye doğru akımlar kaydedilmiştir.

Voltaj kenetleme kayıtlarında 14-17 günlük fare kohlear çekirdeklerinden alınan kesitlerdeki 121 yıldız ve 61 çalı hücrelerine düşük hücre dışı pH'ya sahip solüsyonlar uygulandı. Düşük hücre dışı pH'nın hücrelerde oluşturduğu etki incelendi.

4.2.1.1 Yıldız tipi nöronlarda düşük hücre dışı pH ile aktiflenen ASIC akımları

4.2.1.1.1 Farkı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi

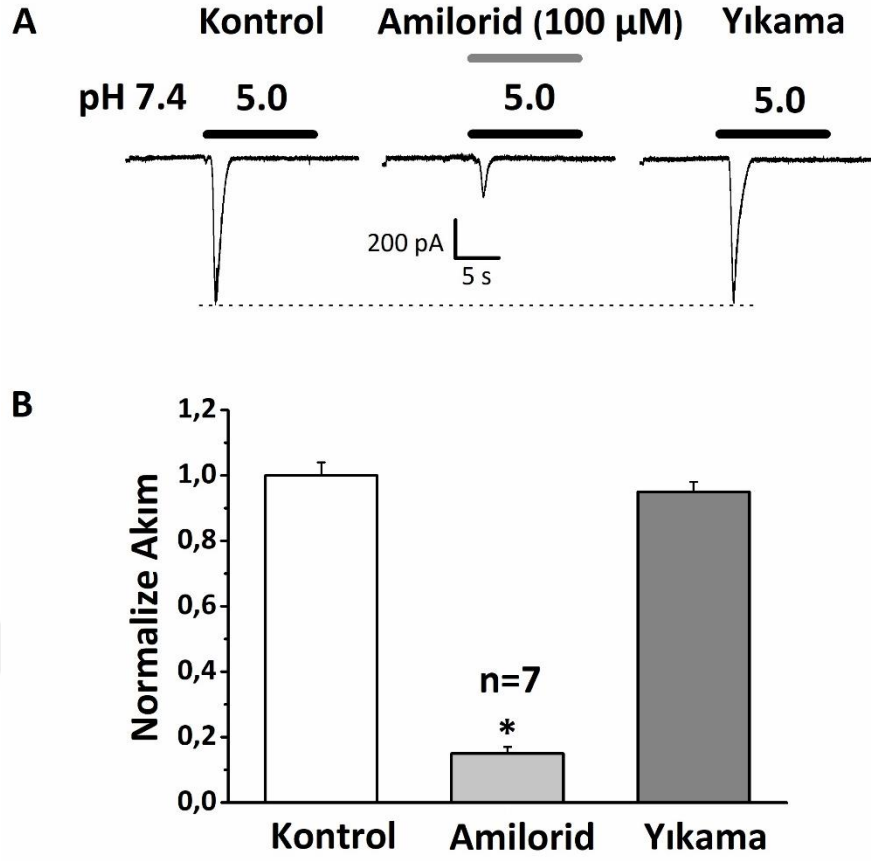
Kohlear çekirdeğin yıldız tipi nöronlarında asit kaynaklı akımları araştırmak için, hücre dışı çözeltideki pH düşüşüne bu nöronların tepkileri tüm hücre yama-kenetleme tekniği kullanılarak kaydedildi. Mevcut deneylerde, yıldız hücrelerinin ortalama istirahat zar potansiyeli $-63,7 \pm 0,71$ mV ($n = 42$) olarak bulunmuştur. Bundan dolayı yıldız hücreleri -62 mV tutma potansiyelinde (holding potansiyel) tutularak kayıtlar alındı. Asidik solüsyon, nöronların çoğunu içe doğru akımlar oluşturarak uyardı. Asitle indüklenen akımların genlikleri, pH'ya karşı yüksek duyarlılık gösterdi (Şekil 4.2A). pH'sı 7,4 ile 4 arasında değişen asidik solüsyonlar uygulandı. Değişik asidik solüsyonlarda oluşan akımların tepe değerleri ile elde edilen pH değerlerinin arasındaki ilişki grafiksel olarak gösterildi. Bu ilişki, sigmoidal Bolzman fonksiyonu ile fit yapıldı. Bu analizden elde edilen yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH_{50}), yani ASIC kanallarından geçen toplam akımın %50'sinin geçebilmesi için gerekli pH değeri, $5,84 \pm 0,08$ olarak bulunmuştur. Ayrıca eğim faktörü (Hill slope faktör, n_H) değeri de 0,17 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2B).



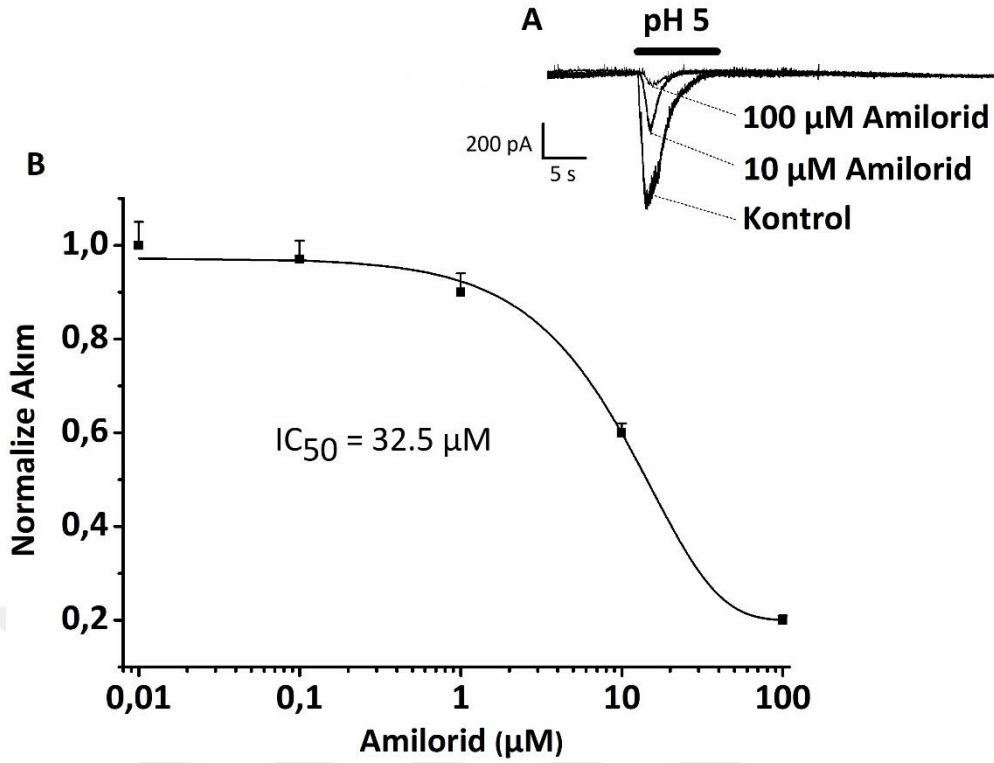
Şekil 4.2. Düşük hücre dışı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi. **A:** Yıldız hücrelerinde pH'sı 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 ve 4,0 olan perfüzyon solüsyonu yBOS ile aktiflenen içe doğru akımlar. **B:** Yıldız hücrelerindeki ASIC'lerin kararlı durum aktivasyon eğrisi.

4.2.1.1.2. Amilorid'in yıldız nöronlarındaki ASIC akımı üzerine etkisi

Yıldız hücrelerinde düşük hücre dışı pH ile oluşan içe doğru akımların, ASIC'den mi kaynaklandığını belirlemek için ASIC blokörü olan amilorid uygulandı. pH 5 de oluşan akımları 100 μ M amilorid $71,4 \pm 3,4$ oranında azaltmıştır (Şekil 4.3A). Amiloridin inhibisyon etkisi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$ $n = 7$) (Şekil 4.3B). Amilorid'in bu inhibisyon etkisini doza bağımlı olarak gerçekleştirdiği ve yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonunun (IC_{50}) $32,5 \pm 0,4$ μ M ve eğim faktörü (slope, n_H) 4,95 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4B $n = 30$).



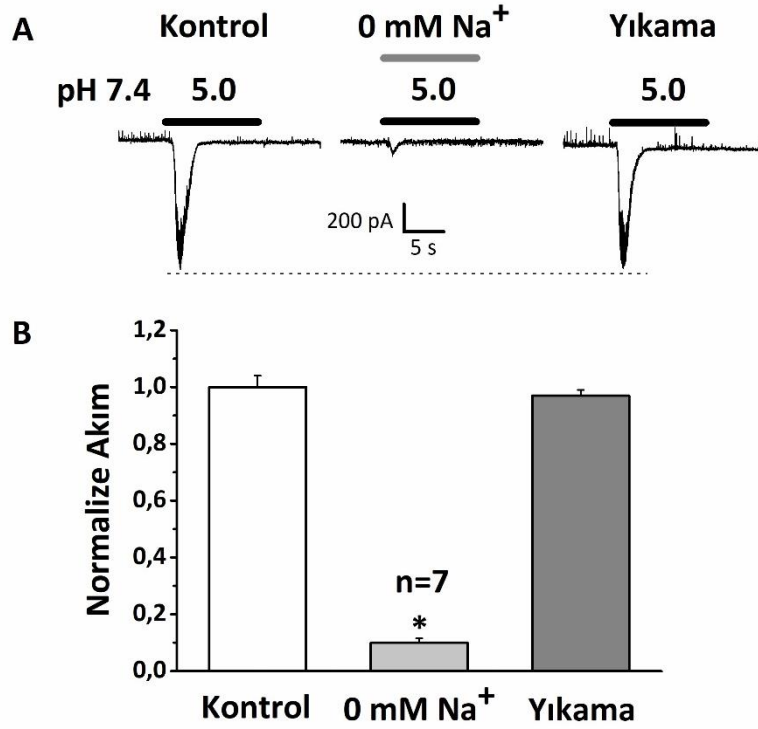
Şekil 4.3. Amiloridin yıldız hücrelerinde oluşan ASIC akımları üzerine etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna amilorid (100 μ M) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azalmıştır. Amilorid solüsyondan çıkarıldığında ise ASIC akımının genliği kontrol düzeyine dönmüştür. **B:** yBOS solüsyonuna amilorid (100 μ M) uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir. * $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.4. Amilorid'in yıldız hücrelerindeki ASIC akımı üzerine doza bağımlı inhibisyon etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna amilorid 10 μM konsantrasyonda uygulandığında ASIC akımının genliği azalmıştır. Aynı solüsyona amilorid 100 μM konsantrasyonda uygulandığında ise ASIC akımının genliği daha da azalmıştır. **B:** pH'ı 5 olan yBOS solüsyonu ile indüklenen ASIC akımları 0,01, 0,1, 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda amilorid uygulanmasıyla doza bağımlı olarak inhibe edildi. İstatistiksel veriler sigmoidal Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldı yarı maksimum inhibisyon konsantrasyon (IC_{50}) değeri) $32,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ($n=30$) ve eğim faktörü (n_H) 4,95 olarak hesaplanmıştır.

4.2.1.1.3. Yıldız nöronlarındaki ASIC'lerin sodyum iyonuna geçirgenliği

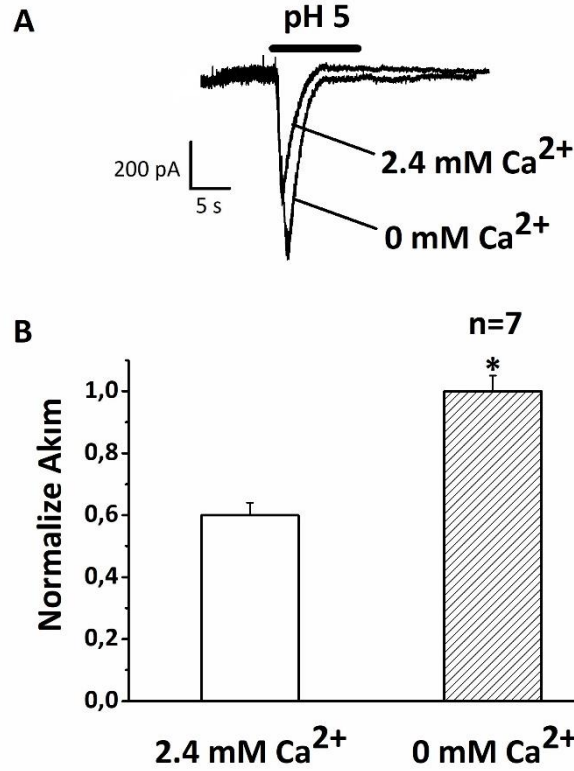
Düşük hücre dışı pH ile aktiflenen bu kanalların sodyum geçirgenliği yBOS solüsyonundan sodyum klorür çıkarılarak test edilmiştir. Sodyum klorür bulunan normal yBOS solüsyonunda pH'yı 7,4 den 5,0'e düşürüldüğünde $800 \pm 250 \text{ pA}$ ($n=7$) içe doğru akım oluşurken, sodyum olmayan (0 mM Na^+) solüsyonda ortalama olarak $100 \pm 50 \text{ pA}$ ($n=7$) akım oluşmuştur. Tekrar sodyum klorür bulunan normal yBOS solüsyonunda pH 5'de kayıt alındığında, akımın genliği normal değerlerine dönmüştür. Bu veriler; yıldız hücrelerinde asit kaynaklı oluşan akımın, esas olarak sodyum iyonu tarafından taşındığını göstermiştir (Şekil 4.5A). Sodyum klorür bulunmayan (0 mM Na^+) solüsyonda oluşan içe doğru akımlardaki azalma, kontrole (sodyum bulunan) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($87,5 \pm 6,2$, $p<0.05$) (Şekil 4.5B).



Şekil 4.5. Yıldız hücrelerinde düşük hücre dışı pH ile oluşan ASIC akımlarının Na⁺ iyonuna bağımlılığı. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonundan sodyum klorür çıkarılarak (0 mM Na⁺) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azalmıştır (% 87.5 ± 6.2, n= 7). Tekrar pH'sı 5 olan yBOS solüsyonu uygulandığında ise ASIC akımının genliği kontrol düzeyine dönmüştür. **B:** yBOS solüsyonu ve 0 mM Na⁺ solüsyonu uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir. * p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

4.2.1.1.4. Kalsiyum iyonunun yıldız nöronlarındaki ASIC'ler üzerine etkisi

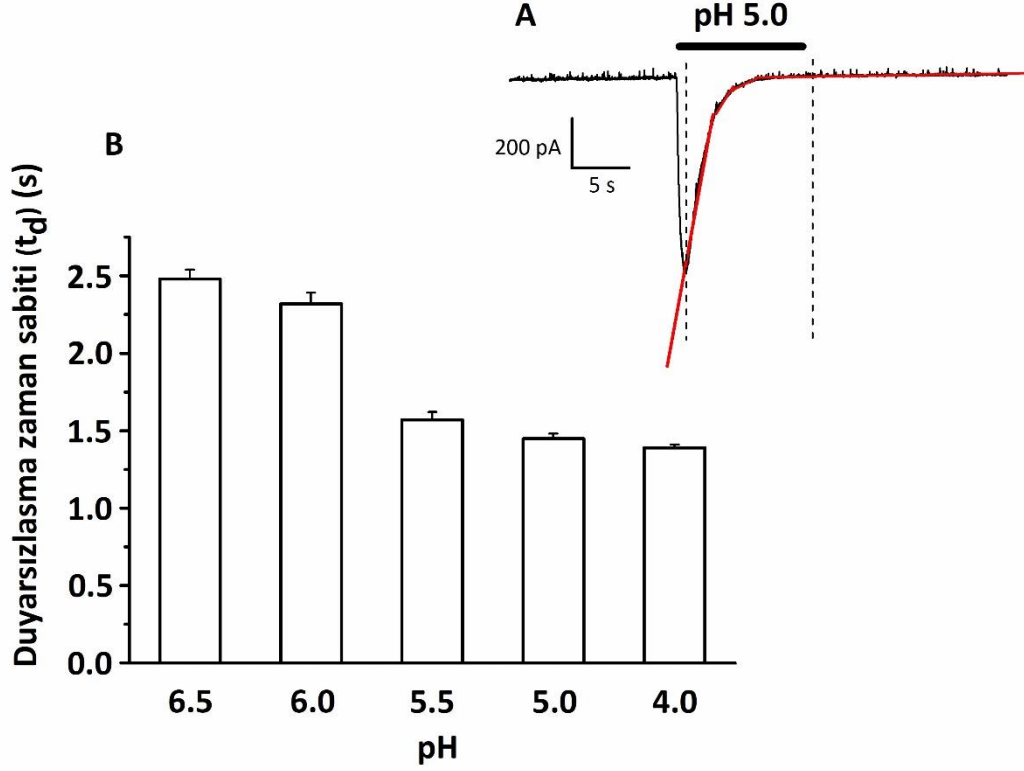
Asite duyarlı iyon kanallarına hücre dışı kalsiyumun etkisini belirlemek için 2,4 mM kalsiyum klorür bulunan normal yBOS ve kalsiyum klorür bulunmayan (0 mM Ca²⁺) solüsyonlar kullanıldı. Normal yBOS solüsyonunda pH'yı 7,4 den 5,0'e düşürdüğümüzde 500±100 pA (n= 7) içe doğru akım oluşurken, kalsiyum klorür bulunmayan (0 mM Ca²⁺) solüsyonda ortalama 700±200 pA (n= 7) akım oluştu. Bu veriler hücre dışı kalsiyum miktarının azalmasının, yıldız hücrelerindeki asit kaynaklı akımları artırdığını gösterdi (Şekil 4.6A). Hücre dışı kalsiyum bulunmayan solüsyonda (0 mM Ca²⁺) oluşan ASIC akımlarındaki artma, 2,4 mM kalsiyum bulunan solüsyona göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 4.6B).



Şekil 4.6. Yıldız nöronlarındaki asitle aktiflenen akımlara hücre dışı Ca^{2+} 'un etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonundan kalsiyum klorür çıkarılarak (0 mM Ca^{2+}) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde artmıştır. **B:** yBOS solüsyonundan kalsiyum klorür çıkarıldığında normalize ASIC akımları bar grafiği ile gösterilmiştir. * $p < 0.05$ 2.4 mM Ca^{2+} grubu ile karşılaştırıldığında.

4.2.1.1.5. Yıldız nöronlarındaki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti

Duyarsızlaşma zaman sabiti (decay time constant), akım genliğinin %37'sine düşünceye kadar geçen süre olarak değerlendirilir (Şekil 4.7A). Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti değerleri: pH 4 de $1,39 \pm 0,02$ s, pH 5 de $1,45 \pm 0,03$ s, pH 5,5 de $1,57 \pm 0,05$ s, pH 6 de $2,32 \pm 0,07$ s ve pH 6,5 de $2,48 \pm 0,06$ s olarak bulunmuştur ($n = 42$). Hücre dışı pH düştükçe yıldız hücrelerinin duyarsızlaşma zaman sabiti azalmıştır. Yani pH azaldıkça kanal daha çabuk duyarsızlaşmaktadır (Şekil 4.7B).



Şekil 4.7. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti. **A:** duyarsızlaşma zaman sabitinin değeri, ASIC akımının tepe değerinden (1. kesik çizgi) sıfır değerine ininceye kadarki (2. kesik çizgi) akım trasesi (siyah düz) üstsel fonksiyon (kırmızı renkte düz çizgi ile gösterilmiştir) ile uyarlanması yapılarak elde edilmiştir. **B:** ASIC akımlarının farklı pH konsantrasyonlarındaki zaman sabiti değerleri bar grafiği ile gösterilmiştir.

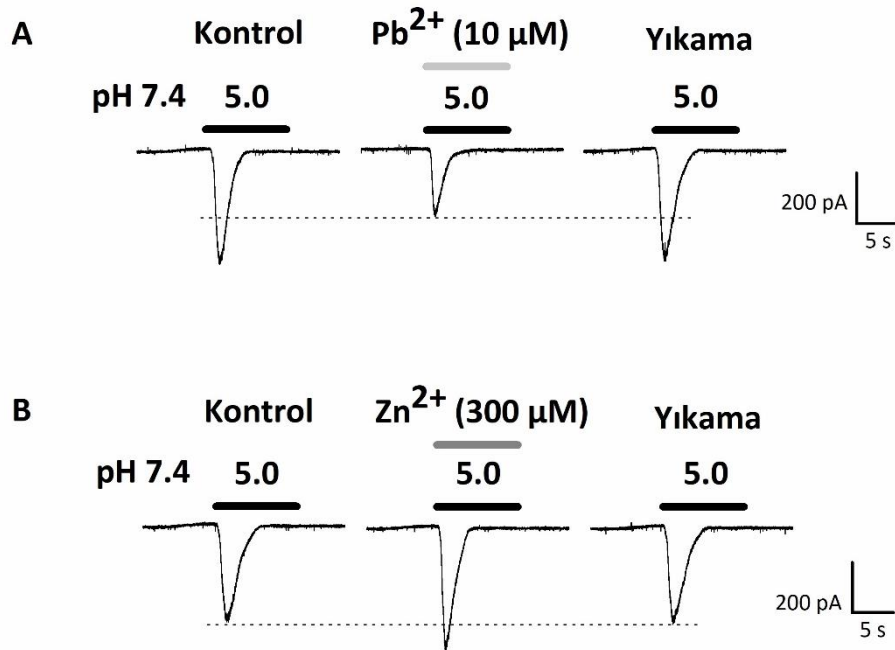
4.2.1.1.6. Yıldız nöronlarındaki ASIC alt tiplerinin belirlenmesi

Kohlear çekirdekteki yıldız hücrelerinde hangi ASIC alt tiplerinin ifade edildiği daha önce çalışılmamıştır. Bu nedenle bazı alt tiplerine özgü ASIC modülatörleri kullanılarak, yıldız hücrelerinde bulunan ASIC alt tipleri belirlenmiştir. Hücre dışı Ca^{2+} 'nın, ASIC aracılı akımlar üzerinde inhibitör etkilere sahip olduğu daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hücre dışı Ca^{2+} ile ASIC1a ve ASIC3 homomerik kanallarının yüksek oranda ve ASIC1b, ASIC2a homomerik ve ASIC1a + ASIC2a heteromerik kanalları düşük düzeylerde inhibe ettiği daha önce belirtilmiştir (1, 164). Mevcut çalışmada da hücre dışı Ca^{2+} konsantrasyonu azaldıkça, pH'sı 5,0 olan yBOS ile aktiflenen ASIC akımının genliği artmıştır. Bu bulgular, kohlear çekirdek nöronlarındaki yıldız hücrelerinde homomerik ASIC1a ve ASIC3 olabileceğini düşündürmektedir. Bundan dolayı homomerik ASIC1a kanallarının varlığını göstermek için spesifik blokörü olan kurşun (Pb^{2+}) 10 μM konsantrasyonunda kullanılmıştır. Mikromolar

konsantrasyonda kurşunun seçici olarak ASIC1 altbirimini içeren ASIC'leri inhibe ettiği bildirilmiştir (112).

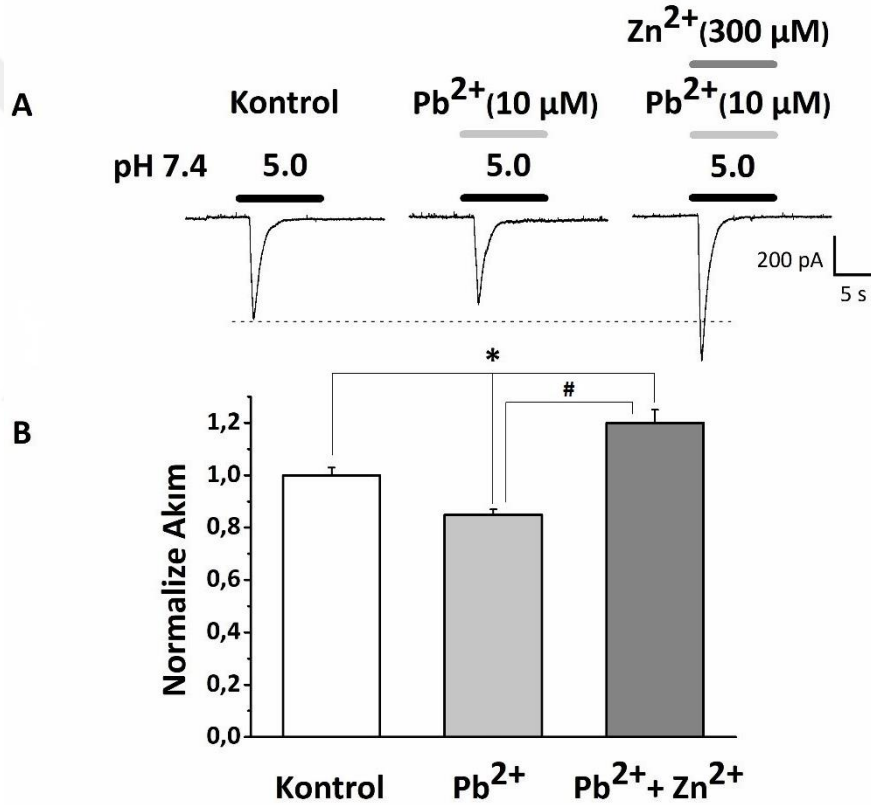
Kontrol solüsyonunda pH 5,0 da ortalama olarak 600 ± 100 pA ($n = 7$) içe doğru akım oluşmuştur. $10 \mu\text{M}$ Pb^{2+} uygulandığında ASIC akımının genliği 500 ± 70 pA'ya ($n = 7$) düşmüştür. Kurşun pH 5,0 da aktiflenen akımları kontrole göre $\%16,6 \pm 6,3$ oranında azalttı. Bu azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$, $n = 7$). Bu veriler, yıldız hücrelerinde ASIC1a'nın bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.8A).

Önceki yapılan çalışmada, çinko (Zn^{2+})'nin asidik solüsyon ile birlikte uygulanmasının, ASIC2a içeren kanal aracılı akımların genliğini seçici olarak arttırdığı gösterilmiştir (110). Bundan dolayı ASIC2a alt tipinin varlığını belirlemek için, ASIC2a akımlarını güçlendiren çinko (Zn^{2+}) $300 \mu\text{M}$ konsantrasyonda kullanılmıştır. Kontrol solüsyonunda pH 5'te 600 ± 120 pA ($n = 7$) içe doğru akım oluşmuştur. Zn^{2+} ($300 \mu\text{M}$) uygulandığında ise ASIC akımının genliği 720 ± 150 pA'ya ($n = 7$) artmıştır. Zn^{2+} ($300 \mu\text{M}$) varlığında pH 5 te oluşan akımın genliği kontrole göre önemli oranda arttı ($\%20,0 \pm 6,3$ %; $n = 7$). Bu akımın genliğindeki artış, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, $n = 7$) (Şekil 4.8B).



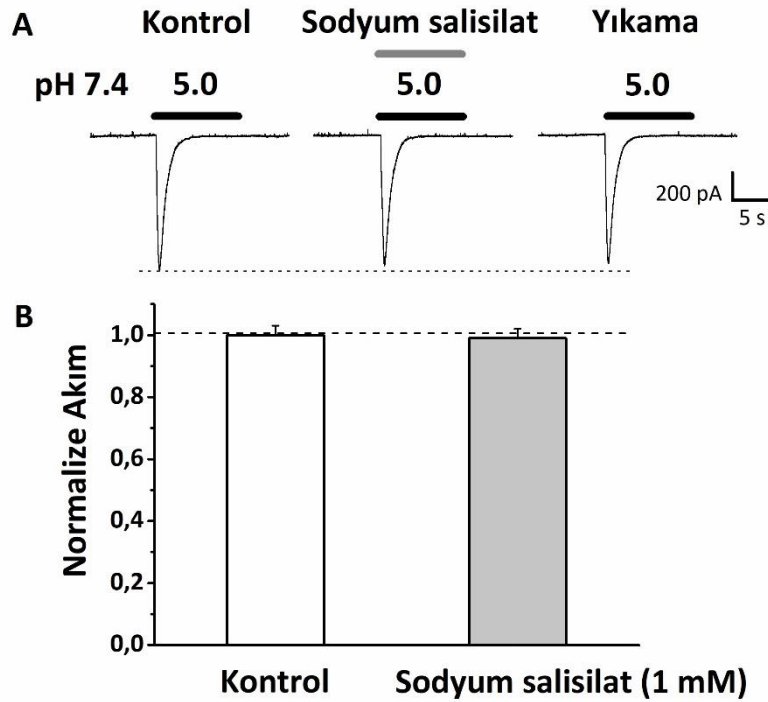
Şekil 4.8. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarının hücre dışı Pb^{2+} ve Zn^{2+} ile modülasyonu. **A:** pH 5 olan yBOS solüsyonuna Pb^{2+} (10 μM) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azaldı. Tekrar pH'sı 5,0 olan yBOS solüsyonu uygulandığında ASIC akımının genliği artmıştır. **B:** pH 5,0 olan yBOS solüsyonuna Zn^{2+} (300 μM) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli oranda artmıştır. Tekrar pH'sı 5 olan yBOS solüsyonu uygulandığında ASIC akımının genliği kontrol düzeylerine dönmüştür.

Fakat Zn^{2+} 'in yüksek konsantrasyonda ASIC2a akımlarını güçlendirirken, düşük konsantrasyonda ASIC1a akımlarını azalttığı bildirilmiştir (110). Bundan dolayı ASIC2a'nın varlığını doğrulamak için, Zn^{2+} spesifik ASIC1a blokörü olan Pb^{2+} ile birlikte uygulandı. Kontrol solüsyonunda pH 5 de ortalama olarak 500 ± 110 pA ($n=7$) içe doğru akım oluşmuştur. Pb^{2+} ($10 \mu M$) uygulandığında 420 ± 85 pA ($n=7$) içe doğru akım kaydedilmiştir. Pb^{2+} ($10 \mu M$) ile birlikte Zn^{2+} ($300 \mu M$) uygulandığında ise ASIC akımının genliği 650 ± 150 pA ($n=7$) olarak ölçülmüştür. Pb^{2+} ($10 \mu M$) ve Zn^{2+} ($300 \mu M$) varlığında pH 5 de oluşan akımın genliği kontrole göre $30,1 \pm 4,2$ oranında artmıştır. Bu artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.9B). Bu veriler, yıldız hücrelerinde ASIC2a'nın bulunduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.9A).



Şekil 4.9. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarına Pb^{2+} ve Zn^{2+} 'in birlikte uygulanmasının etkisi. **A:** pH'ı 5 olan yBOS solüsyonuna Pb^{2+} ($10 \mu M$) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azaldı. Pb^{2+} ($10 \mu M$) ve Zn^{2+} ($300 \mu M$) birlikte uygulandığında ise ASIC akımının genliği, kontrol düzeyinden de daha büyük seviyelere ulaşmıştır. **B:** yBOS solüsyonuna Pb^{2+} ($10 \mu M$) ve Pb^{2+} ($10 \mu M$) + Zn^{2+} ($300 \mu M$) uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir. * $p<0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. # $p<0.05$ Pb^{2+} grubu ile karşılaştırıldığında.

Asetilsalisilik asit veya sodyum salisilat'ın, ASIC3 alt biriminin spesifik blokörü olduğu gösterilmiştir (113). Voilley ve arkadaşları (2001) yaptıkları bu çalışmada, 1 mM salisilik asit'in, ASIC3 homomerik kanal aracılı akımları tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir. Kohlear çekirdek nöronlarındaki yıldız hücrelerinde ASIC3 alt tipinin varlığını belirlemek için spesifik blokörü olan sodyum salisilat 1 mM konsantrasyonda kullandı. Kontrol solüsyonunda pH 5 de ortalama olarak 800 ± 150 pA ($n = 7$) içe doğru akım oluşmuştur. Sodyum salisilat (1 mM) uygulaması, ASIC akım genliğini değiştirmemiştir ($p > 0,05$; $n = 7$) (Şekil 4.10A ve 4.10B). Bu veriler yıldız hücrelerinde ASIC3'ün bulunmadığına işaret etmektedir.



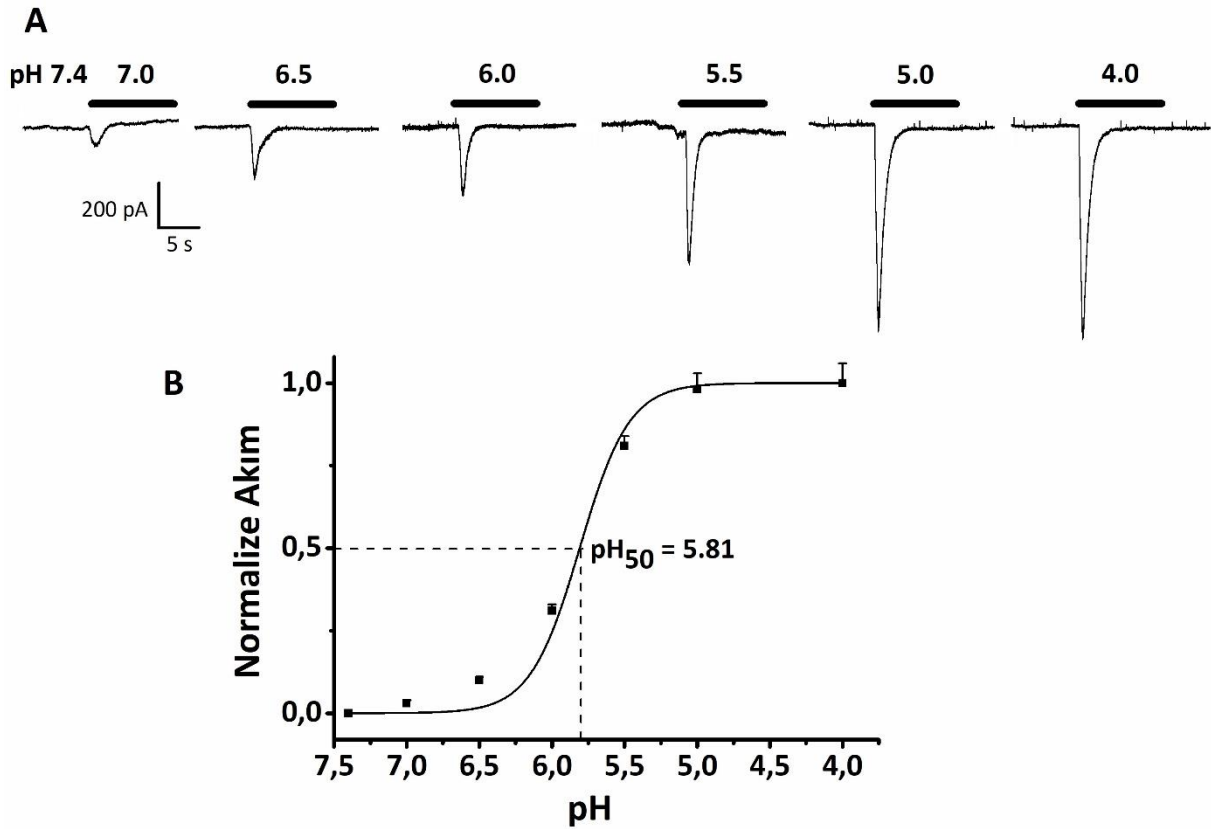
Şekil 4.10. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarına sodyum salisilat'ın etkisi. **A:** pH'ı 5 olan yBOS solüsyonuna sodyum salisilat (1 mM) uygulandığında ASIC akımının genliğinde önemli bir değişiklik olmadı. **B:** yBOS solüsyonuna sodyum salisilat (1 mM) uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir.

4.2.1.2. Çalı tipi nöronlarda düşük hücre dışı pH ile aktiflenen ASIC akımları

4.2.1.2.1. Farkı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi

Kohlear çekirdeğin çalı tipi hücrelerinde asit kaynaklı akımlar, yıldız tipi hücrelerde olduğu gibi tüm-hücre yama kenetleme konfigürasyonu kullanılarak kaydedildi. Mevcut deneylerde çalı hücrelerinin ortalama istirahat zar potansiyeli $-55,2 \pm 0,36$ mV ($n = 15$) olarak

bulunmuştur. Çalı hücreleri – 52 mV tutma potansiyelinde (holding potansiyel) tutularak kayıtlar alınmıştır. Asidik solüsyon, yıldız hücrelerinde olduğu gibi çalı hücrelerinde de içe doğru akımlar oluşturmıştır. Asitle indüklenen akımların genlikleri, pH'ya karşı yüksek duyarlılık gösterdi (Şekil 4.11A). pH'sı 7,4 ile 4 arasında değişen asidik solüsyonların uygulanmasıyla oluşan ASIC akımların tepe değerleri ile elde edilen pH değerlerinin arasındaki ilişki sigmoidal Boltzman fonksiyonu ile fit yapılarak grafiksel olarak gösterildi. Bu analizden elde edilen yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH_{50}) $5,81 \pm 0,06$ olarak ve eğim faktörü değeri (n_H) 0,17 olarak bulunmuştur (Şekil 4.11B).

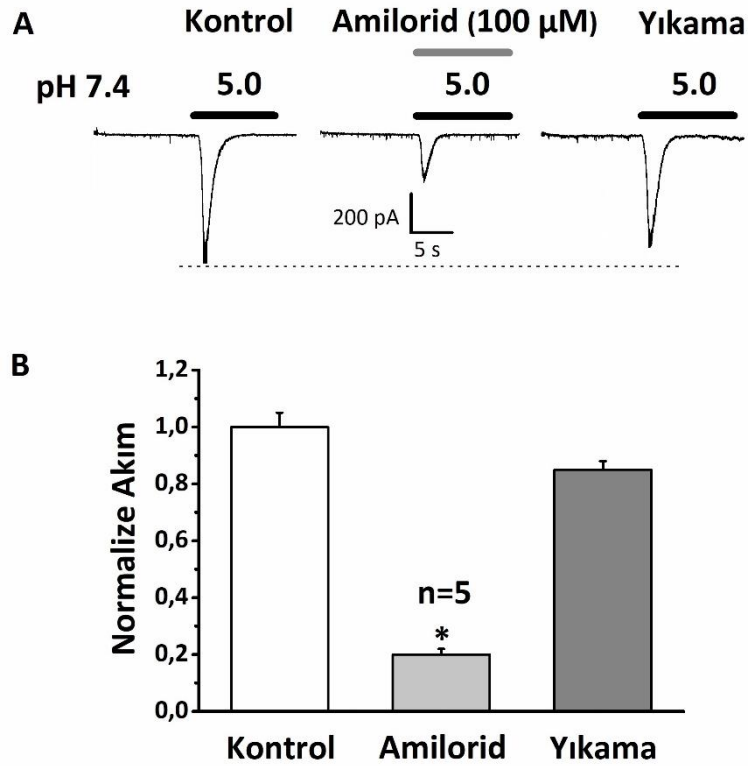


Şekil 4.11. Düşük hücre dışı pH değerlerinin ASIC akımları üzerine etkisi. **A:** Çalı hücrelerine pH'ı 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 ve 4,0 olan asidik solüsyonlar uygulandığında içe doğru ASIC akımları oluşmuştur. **B:** Çalı hücrelerindeki ASIC'lerin kararlı durum aktivasyon eğrisi.

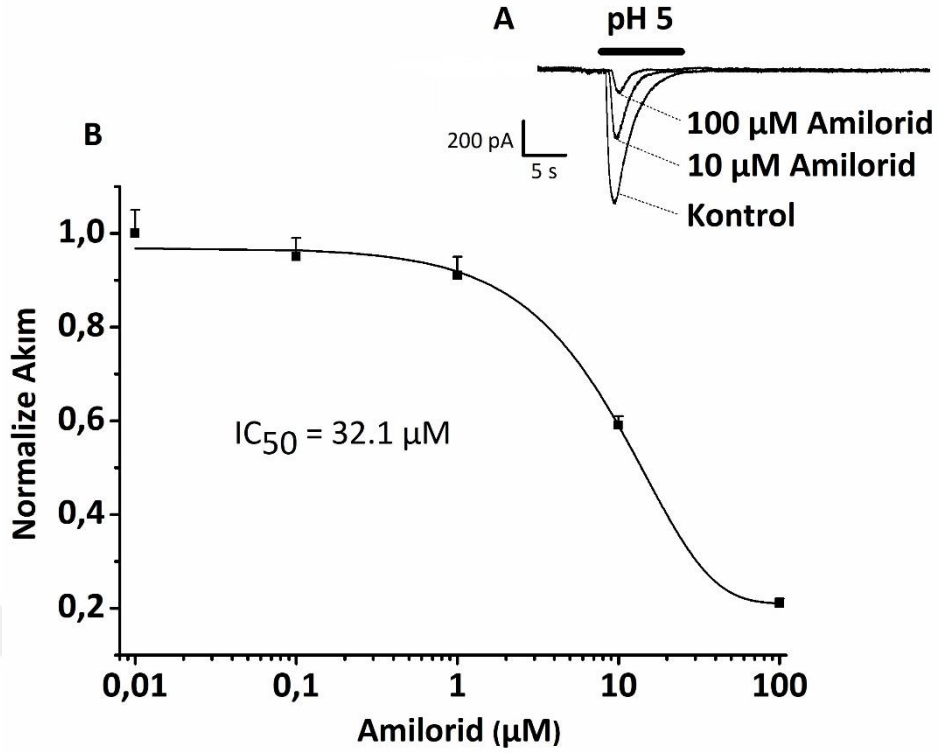
4.2.1.2.2. Amilorid'in çalı nöronlarındaki ASIC akımı üzerine etkisi

Çalı hücrelerinde düşük hücre dışı pH ile oluşan içe doğru akımlara ASIC blokörü olan amilorid uygulanmıştır. pH 5,0 da oluşan amilorid akımları ($100 \mu M$) $\%83,3 \pm 5,8$ ($n=5$) oranında azalttı (Şekil 4.12A). Amiloridin bu inhibisyon etkisi, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4.12B). Amiloridin inhibisyon etkisini doza bağımlı olarak

gerçekleştirdiği ve yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) $32,1 \pm 0,2 \mu M$ ($n=12$) ve eğim faktörü (n_H) 4,95 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



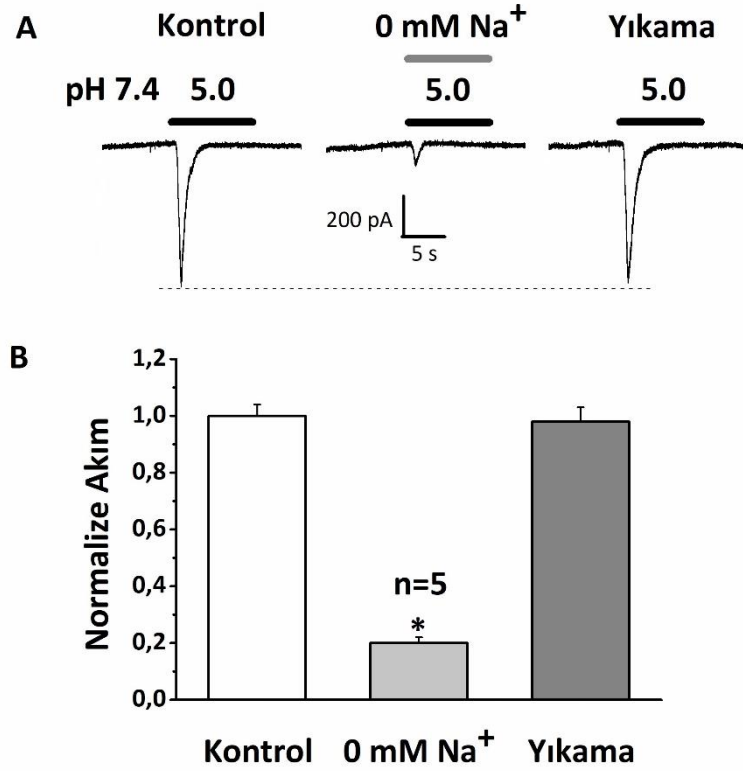
Şekil 4.12. Amiloridin çalı hücrelerinde oluşan ASIC akımları üzerine etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna amilorid (100 μM) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azalmıştır. Amilorid solüsyondan çıkarıldığında ise ASIC akımının genliği kontrol düzeyine dönmüştür. **B:** yBOS solüsyonuna amilorid (100 μM) uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir. * $p<0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.13. Amilorid'in çalı hücrelerindeki ASIC akımı üzerine doza bağımlı inhibisyon etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna amilorid 10 μM konsantrasyonda uygulandığında ASIC akımının genliği azalmıştır. Aynı solüsyona amilorid 100 μM konsantrasyonda uygulandığında ise ASIC akımının genliği daha da azalmıştır. **B:** pH'ı 5 olan yBOS solüsyonu ile indüklenen ASIC akımları 0,01, 0,1, 1, 10 ve 100 μM konsantrasyonlarda amilorid uygulanmasıyla doza bağımlı olarak inhibe edildi. İstatistiksel veriler, sigmoidal Boltzman fonksiyonu ile fit yapıldı yarı maksimum inhibisyon konsantrasyon (IC₅₀) değeri 32,1 ± 0,2 μM (n=12) ve eğim faktörü (n_H) 4,95 olarak hesaplanmıştır.

4.2.1.2.3. Çalı nöronlarındaki ASIC'lerin sodyum iyonuna geçirgenliği

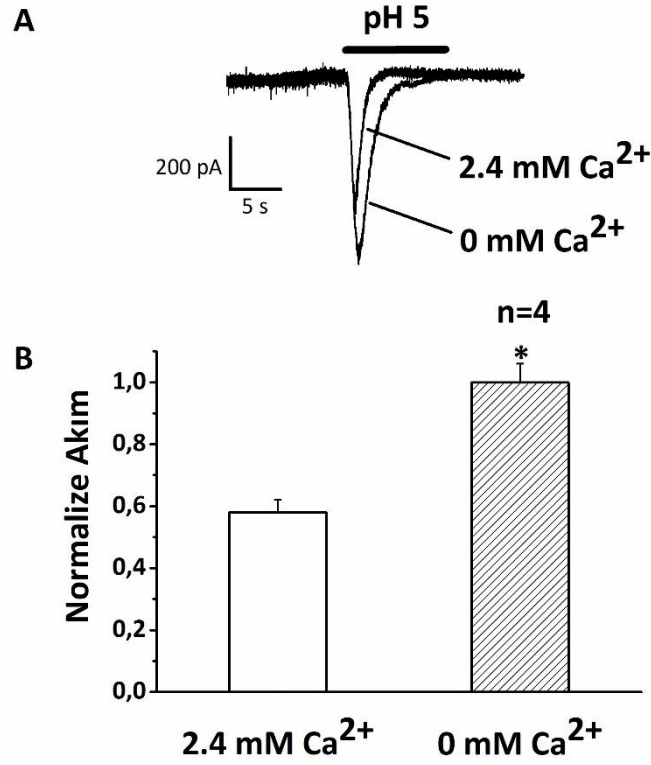
Yıldız hücrelerinde olduğu gibi çalı hücrelerinde de ASIC'lerin sodyuma geçirgenliği, yBOS solüsyonundan sodyum klorür çıkarılarak belirlendi. Sodyum klorür bulunan normal yBOS solüsyonunun pH'sı 7,4'den 5,0'e düşürüldüğünde 700 ± 150 pA (n= 5) içe doğru akım oluşurken, sodyum olmayan (0 mM Na⁺) solüsyonda 100 ± 50 pA (n= 5) içe doğru akım oluşmuştur. Tekrar sodyum klorür bulunan normal yBOS solüsyonunda pH 5'de kayıt alındığında ASIC akımının genliği normal değerlerine dönmüştür (Şekil 4.14A). Sodyum klorür bulunmayan (0 mM Na⁺) solüsyonda oluşan içe doğru akımlardaki azalma, kontrole (sodyum bulunan) göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 4.14B). Mevcut veriler, çalı hücrelerindeki asit kaynaklı oluşan akımın esas olarak sodyum iyonu tarafından taşındığını göstermiştir.



Şekil 4.14. Çalı hücrelerinde düşük hücre dışı pH ile oluşan ASIC akımlarının Na⁺ iyonuna bağımlılığı. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonundan sodyum klorür çıkarılarak (0 mM Na⁺) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azalmıştır. Tekrar pH'sı 5 olan yBOS solüsyonu uygulandığında ise ASIC akımının genliği kontrol düzeyine dönmüştür. **B:** yBOS solüsyonu ve 0 mM Na⁺ solüsyonu uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir. * p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

4.2.1.2.4. Kalsiyum iyonunun çalı nöronlarındaki ASIC'ler üzerine etkisi

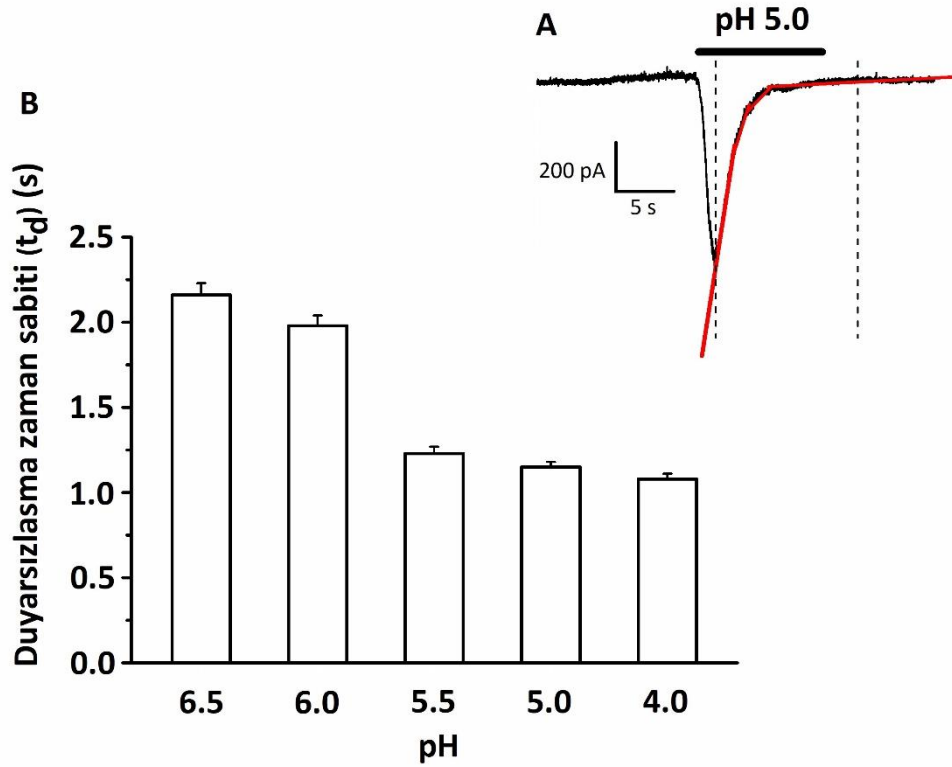
Çalı hücrelerinde asite duyarlı iyon kanallarına hücre dışı kalsiyumun etkisi, 2,4 mM kalsiyum klorür bulunan normal yBOS ve kalsiyum klorür bulunmayan (0 mM Ca²⁺) solüsyonlar kullanılarak belirlendi. Normal yBOS solüsyonunda, pH 7,4'den 5,0'e düşürüldüğünde 400±50 pA (n= 4) içe doğru akım oluştu, 0 mM Ca²⁺ solüsyonunda ise 650±100 pA (n= 4) akım oluştu (Şekil 4.15A). Hücre dışı kalsiyum bulunmayan solüsyonda (0 mM Ca²⁺) oluşan ASIC akımlarındaki artma, 2,4 mM kalsiyum bulunan solüsyona göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 4.15B). Verilerimiz, hücre dışı kalsiyum miktarının azalmasının, çalı hücrelerindeki asit kaynaklı akımları artırdığını gösterdi.



Şekil 4.15. Çalı nöronlarındaki asitle aktiflenen akımlara hücre dışı Ca^{2+} 'un etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonundan kalsiyum klorür çıkarılarak (0 mM Ca^{2+}) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde artmıştır. **B:** yBOS solüsyonundan kalsiyum klorür çıkarıldığında normalize ASIC akımları bar grafiği ile gösterilmiştir. * $p < 0.05$ 2,4 mM Ca^{2+} grubu ile karşılaştırıldığında.

4.2.1.2.5. Çalı nöronlarındaki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti

Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti değerleri: pH 4 de $1,08 \pm 0,03$ s, pH 5 de $1,15 \pm 0,03$ s, pH 5,5 de $1,23 \pm 0,04$ s, pH 6 de $1,98 \pm 0,06$ s ve pH 6,5 de $2,16 \pm 0,07$ s olarak bulunmuştur ($n = 15$). Hücre dışı pH düştükçe, çalı hücrelerinin duyarsızlaşma zaman sabiti azalmıştır (Şekil 4.16B).



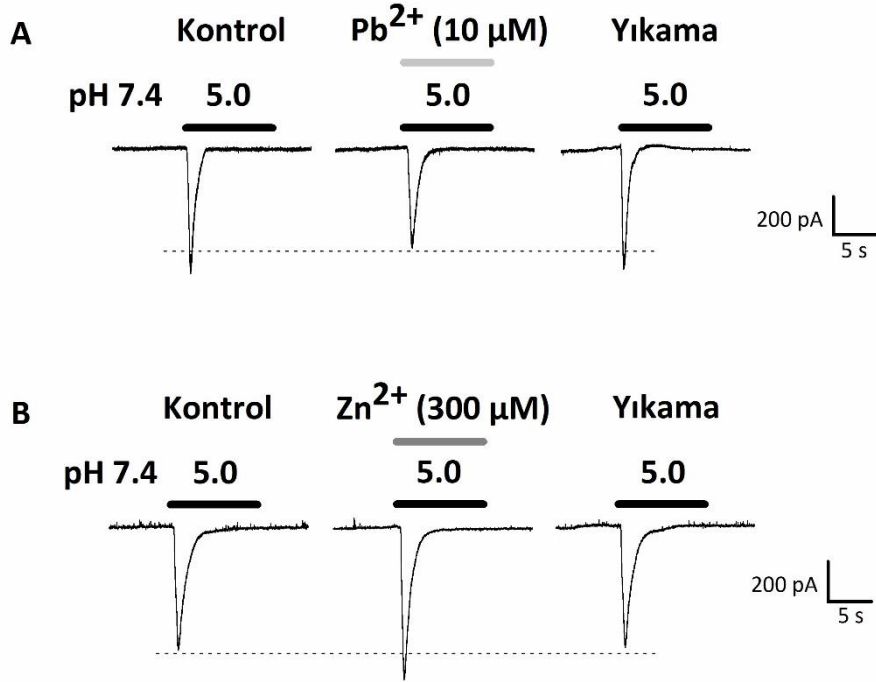
Şekil 4.16. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti. **A:** Duyarsızlaşma zaman sabitinin değeri, ASIC akımının tepe değerinden (1. kesik çizgi) sıfır değerine ininceye kadarki (2. kesik çizgi) akım trasesi (siyah düz) üstsel fonksiyon (kırmızı renkte düz çizgi ile gösterilmiştir) ile uyarlanması yapılarak elde edilmiştir. **B:** ASIC akımlarının farklı pH konsantrasyonlardaki zaman sabiti değerleri bar grafiği ile gösterilmiştir.

4.2.1.2.6. Çalı nöronlarındaki ASIC alt tiplerinin belirlenmesi

Çalı hücrelerindeki ASIC alt tipleri de yıldız hücrelerinde kullanılan ASIC modülatörleri ile belirlenmiştir. ASIC1a alt tipinin varlığını göstermek için spesifik blokörü olan Pb^{2+} 10 μM konsantrasyonda kullanılmıştır. pH'sı 5 olan yBOS solüsyonunda 500 ± 80 pA ($n=5$) içe doğru akım oluştu. 10 μM Pb^{2+} uygulandığında ise ASIC akımının genliği 420 ± 50 pA'ya ($n=5$) düşmüştür. Tekrar pH'sı 5 olan yBOS solüsyonu uygulandığında, ASIC akımının genliği kontrol düzeylerine dönmüştür. Kurşun pH 5'te aktiflenen akımları kontrole göre $84,0 \pm 6,1$ oranında azalttı. Bu azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bu veriler, çalı hücrelerinde ASIC1a'nın bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.17A).

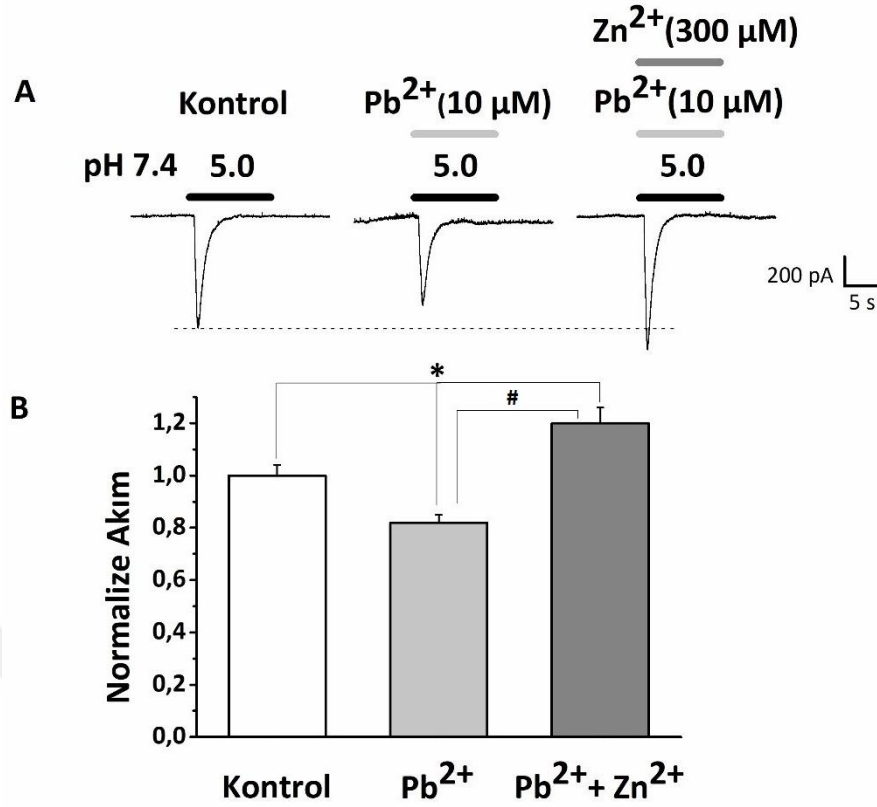
ASIC2a alt tipinin varlığını belirlemek için, ASIC2a akımlarını güçlendiren çinko (Zn^{2+}) 300 μM konsantrasyonda kullanıldı. Kontrol solüsyonunda pH 5'de 550 ± 120 pA ($n=5$) içe doğru akım oluşmuştur. Zn^{2+} (300 μM) uygulandığında ise ASIC akımının genliği 675 ± 85 pA'ya ($n=5$) çıkmıştır. Tekrar pH'sı 5 olan kontrol solüsyonu uygulandığında, ASIC akımının genliği (550 ± 110 pA, $n=5$) kontrol düzeylerine azalmıştır. Zn^{2+} (300 μM) varlığında, pH 5 de oluşan

akımın genliği kontrole göre önemli oranda arttı ($22,7 \pm 6,2$ n = 5). Bu akımın genliğindeki artış kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.17B).



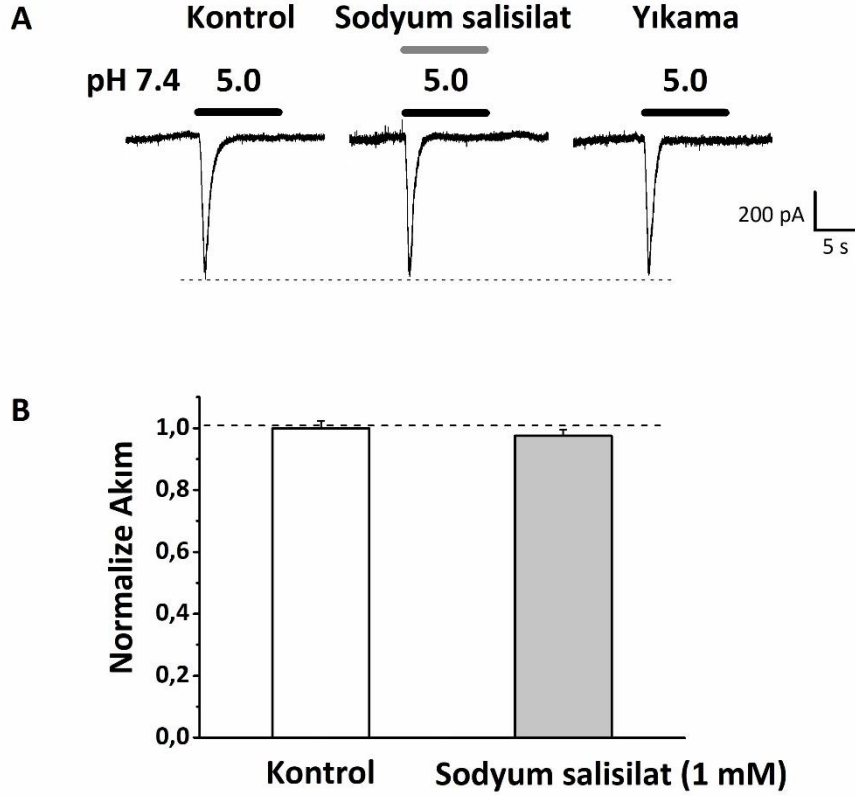
Şekil 4.17. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının hücre dışı Pb^{2+} ve Zn^{2+} ile modülasyonu. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna Pb^{2+} (10 μM) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azaldı. Tekrar pH'sı 5 olan yBOS solüsyonu uygulandığında ASIC akımının genliği kontrol düzeylerine dönmüştür. **B:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna Zn^{2+} (300 μM) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli oranda artmıştır. Tekrar pH'sı 5 olan yBOS solüsyonu uygulandığında ASIC akımının genliği kontrol düzeylerine düşmüştür.

Çinko'nun yüksek konsantrasyonda ASIC2a akımlarını güçlendirdiği, düşük konsantrasyonda ASIC1a akımlarını azalttığı bilindiğinden (110) dolayı ASIC2a'nın varlığını doğrulamak için, Zn^{2+} spesifik ASIC1a blokeri olan Pb^{2+} ile birlikte uygulandı. Kontrol solüsyonunda pH 5'de 600 ± 125 pA (n = 5) içe doğru akım oluşurken Pb^{2+} (10 μM) uygulandığında 500 ± 110 pA (n = 5) içe doğru akım oluşmuştur. Pb^{2+} (10 μM) ile birlikte Zn^{2+} (300 μM) uygulandığında ise ASIC akımının genliği 700 ± 145 pA (n = 5) olarak ölçülmüştür. Pb^{2+} (10 μM) ve Zn^{2+} (300 μM) varlığında pH 5 de oluşan akımın genliği kontrole göre $16,6 \pm 3,8$ oranında artmıştır. Verilerdeki artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). (Şekil 4.18B). Bu bulgular, çalı hücrelerinde ASIC2a'nın bulunduğunu göstermektedir (Şekil 4.18A).



Şekil 4.18. Çalı hücrelerinde ASIC akımlarına Pb^{2+} ve Zn^{2+} 'in birlikte uygulanmasının etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna Pb^{2+} (10 μM) uygulandığında ASIC akımının genliği önemli düzeyde azaldı. Pb^{2+} (10 μM) ve Zn^{2+} (300 μM) birlikte uygulandığında ise ASIC akımının genliği kontrol düzeyinden de daha büyük seviyelere ulaşmıştır. **B:** yBOS solüsyonuna Pb^{2+} (10 μM) ve Pb^{2+} (10 μM) + Zn^{2+} (300 μM) uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir. * $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında. # $p < 0.05$ Pb^{2+} grubu ile karşılaştırıldığında.

ASIC3 alt tipinin varlığını belirlemek için spesifik blokeri olan sodyum salisilat 1 mM konsantrasyonda kullanılmıştır. Kontrol solüsyonunda pH 5'de 700 ± 130 pA ($n = 5$) içe doğru akım oluşmuştur. Yıldız hücrelerinde olduğu gibi çalı hücrelerinde de sodyum salisilat (1 mM) uygulaması ASIC akım genliğini değiştirmedir ($p > 0.05$; $n = 5$) (Şekil 4.19A ve 4.19B). Mevcut veriler, çalı hücrelerinde ASIC3'ün bulunmadığını göstermektedir.



Şekil 4.19. Çalı hücrelerindeki ASIC akımlarına sodyum salisilat'ın etkisi. **A:** pH'sı 5 olan yBOS solüsyonuna sodyum salisilat (1 mM) uygulandığında ASIC akımının genliğinde önemli bir değişiklik olmadı. **B:** yBOS solüsyonuna sodyum salisilat (1 mM) uygulandığında normalize ASIC akımı bar grafiği ile gösterilmiştir ($p > 0,05$; $n = 5$).

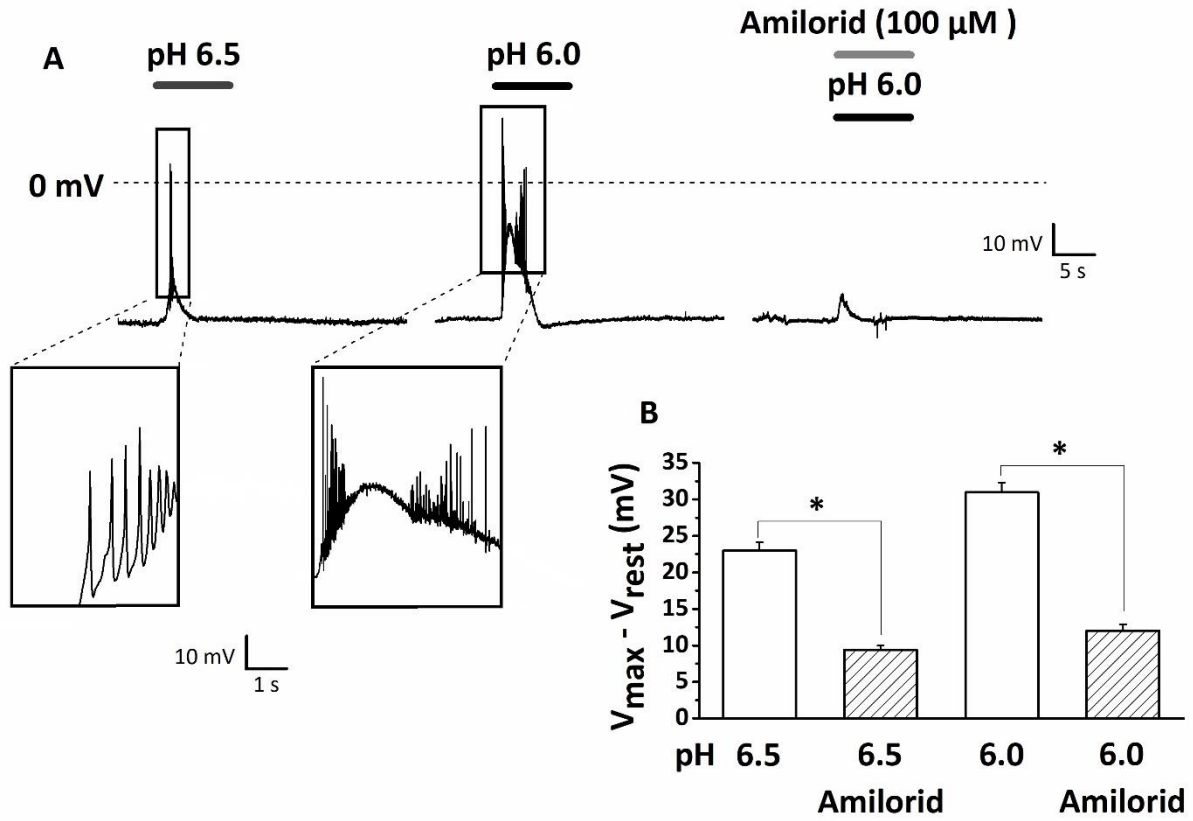
4.2.2. Akım Kenetleme Çalışmaları

Akım kenetleme çalışmalarında, zarı uyarmak için hücreye belirli bir sürede belirli bir akım enjekte edilir ve zarın akım enjeksiyonuna karşı vermiş olduğu voltaj cevabı ölçülür. Hücre depolarize edici bir akım ile uyarıldığında, istirahat zar potansiyeli daha pozitif değerlere doğru gidecek ve uyarılma eşiğine ulaştığında verilen akıma cevap olarak aksiyon potansiyeli oluşacaktır. Eğer hücreye hiperpolarize edici bir akım verilirse, hücre istirahat membran potansiyelinden daha negatif değerlere doğru uzaklaşacak ve uyarılması zorlaşacaktır.

Asite duyarlı iyon kanalları, düşük hücre dışı pH ile aktive olan kanallardır. Bundan dolayı akım kenetleme çalışmalarında 14-17 günlük fare kohlear çekirdeklerinden alınan kesitlerdeki 14 yıldız ve 10 çalı hücrelerine pH'sı 6,5 ve 6,0 olan yBOS ile perfüze edildiğinde göstermiş olduğu voltaj yanıtlar kaydedildi.

4.2.2.1. Yıldız nöronlarına düşük hücre dışı pH'nın etkisi

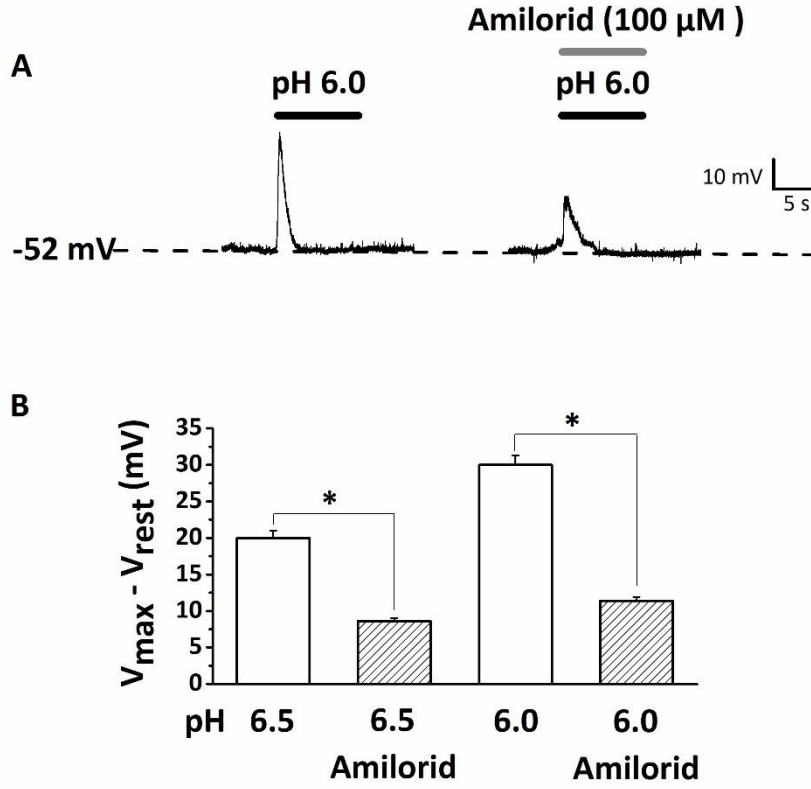
Yıldız hücrelerindeki ASIC'lerin fizyolojik fonksiyonlarını belirlemek ve nöronal uyarılabilirlikleri üzerine etkilerini incelemek için akım kenetleme kayıtları alındı. Kontrol solüsyonunun pH'sı 7,4'den pH 6,5'e düşürüldüğünde hücreler ortalama olarak 23 mV'luk bir depolarizasyona ($\Delta V = 23,7 \pm 3,4$ mV, $n = 7$) ve patlamalı aksiyon potansiyeli oluşmasına neden oldu (Şekil 4.20A). Kontrol solüsyonunun pH'sı 7,4'den pH 6,0'a düşürüldüğünde ise hücreler daha fazla depolarizasyon ($\Delta V = 31,03 \pm 5,2$ mV, $n = 7$) ve patlamalı aksiyon potansiyeli göstermişlerdir (Şekil 4.20A). Yıldız hücrelerine uygulanan hücre dışı pH azaldıkça, oluşan depolarizasyon artmıştır. ASIC blokörü olan amilorid (100 μ M) oluşan depolarizasyonu azalttı ve aksiyon potansiyeli oluşumunu inhibe etti. 100 μ M konsantrasyonda amilorid varlığında pH'sı 6,5 olan yBOS solüsyonundaki depolarizasyon miktarı $8,90 \pm 0,9$ mV olarak gerçekleşti. pH'sı 6,0 olan yBOS solüsyonundaki depolarizasyon miktarı ise $12,18 \pm 1,3$ mV olarak ölçülmüştür. Amiloridin bu inhibisyon etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$ Şekil 4.20B).



Şekil 4.20. Yıldız hücrelerinde asit ile indüklenen depolarizasyon ve patlamalı aksiyon potansiyeli. **A:** pH'sı 6,5 ve 6,0 olan yBOS solüsyonuna maruz bırakıldığında hücre zar potansiyelinde depolarizasyonuna ve patlamalı aksiyon potansiyeli oluşumuna neden oldu. Amilorid (100 µM) pH 6,0'da oluşan depolarizasyonu ve aksiyon potansiyelini inhibe etmiştir. **B:** pH 6,5 ve 6,0'da oluşan depolarizasyonun amilorid tarafından inhibe edilmesi bar grafiği ile gösterilmiştir ($V_{max} - V_{rest}$: maksimum membran depolarizasyonunun ortalaması). * $p < 0.05$ amilorid uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında.

4.2.2.2. Çalı nöronlarına düşük hücre dışı pH'ın etkisi

Çalı hücrelerinde yBOS solüsyonunun pH'sı 7,4'den pH 6,5'e düşürüldüğünde ortalama olarak 20 mV'luk depolarizasyon meydana gelmiştir ($\Delta V = 20,3 \pm 2,1$ mV, $n = 5$). Çalı hücreleri, yıldız hücreleri gibi patlamalı aksiyon potansiyeli oluşturmaz. Kontrol solüsyonunun pH'sı 7,4'den pH 6,0'a düşürüldüğünde ise hücreler daha fazla depolarize oldular ($\Delta V = 30,26 \pm 3,8$ mV, $n = 5$, Şekil 4.21A). Çalı hücrelerinde de uygulanan hücre dışı pH azaldıkça, oluşan depolarizasyon artmıştır. ASIC blokörü olan amilorid, oluşan depolarizasyon miktarını azaltmıştır. 100 µM konsantrasyonda amilorid varlığında pH'sı 6,5 olan yBOS solüsyonundaki depolarizasyon miktarı $8,6 \pm 1,2$ mV ($n = 5$) olarak ölçülürken, pH'sı 6,0 olan yBOS solüsyonundaki depolarizasyon miktarı ise $11,4 \pm 1,7$ mV ($n = 5$) olarak ölçülmüştür. Amiloridin bu inhibisyon etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$ Şekil 4.21B).



Şekil 4.21. Çalı hücrelerinde asit ile indüklenen depolarizasyon. **A:** pH'sı 6,0 olan yBOS solüsyonu uygulandığında hücre zar potansiyeli depolarize oldu. ASIC kanal blokeri amilorid (100 μ M) varlığında oluşan depolarizasyon miktarı azalmıştır. **B:** pH 6,0'da oluşan depolarizasyonun amilorid tarafından inhibe edilmesi bar grafiği ile gösterilmiştir ($V_{max} - V_{rest}$: ortalama maksimal membran depolarizasyonu). * $p < 0.05$ amilorid uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Asite duyarlı iyon kanalları (ASIC), hücre dışı ortamın asitleşmesiyle aktive olan voltaja duyarlı olmayan sodyum kanallarıdır. ASIC'ler, işitsel sistem de dâhil olmak üzere merkezi ve periferik sinir sistemlerinde yaygın olarak ifade edilirler. Yapılan bu çalışmada ASIC genlerinin kohlear çekirdekte ifade edilip edilmedikleri real-time PZR yöntemiyle, hücre dışı asit değişimlerinin kohlear çekirdek nöronlarının uyarılabilirlikleri üzerine etkileri ise yama kenetleme tekniği kullanılarak ilk defa gösterilmiştir.

5.1. ASIC genlerinin mRNA düzeyinde ifadesi

Real-time PZR analizi ile 16 günlük, 75 günlük ve 2 yaşındaki fare kohlear çekirdek dokularında ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 genlerinin ifadesi gösterilmiştir (Şekil 4.1). Mevcut çalışmanın real-time PZR verileri ile tutarlı olarak daha önce merkezi sinir sisteminde yapılan çalışmalarda ASIC genlerinin ifadesi gösterilmiştir. Chen ve arkadaşları (2009) fare suprakiazmatik çekirdek nöronlarında yaptıkları çalışmada ASIC1a, 2a, 2b ve 3 alt tiplerinin ifade edildiği gösterilmiştir (178). Drew ve arkadaşları (2004) fare beyinde ASIC3 mRNA'sının bulunduğunu bildirmişlerdir (179). Hipokampal internöronlarda RT-PZR analizi ile ASIC1a ve ASIC2 alt birimlerinin ifadesi gösterilmiştir (180). Du ve arkadaşları (2014) RT-PZR analizi ile fare anterior hipofiz dokusunda tüm ASIC alt tiplerinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (181). Ayrıca fare supraoptik çekirdek nöronlarında RT-PZR ile yapılan çalışmada bu nöronların ASIC1a ve ASIC2a'yı ifade ettiği, ancak ASIC1b, 2b, 3 ve 4 alt birimlerini bulundurmadığı ortaya konmuştur (182).

Mevcut çalışmada ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 genlerinin en fazla 16 günlük farelerde ifade edildiği tespit edildi. 16 günlük farelere göre 75 günlük ve 2 yaşındaki farelerde ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 genlerinin yarı yarıya azaldığı bulunmuştur. Bu bulguları doğrular nitelikte Li ve arkadaşları (2010) fare kortikal nöronlarında RT-PZR analizi ile yaptıkları çalışmada ASIC2/ASIC1 genlerinin mRNA oranının yaşa bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. ASIC2/ASIC1 genlerinin mRNA oranının 1 günlük, 7 günlük ve 14 günlük farelerde yaşla birlikte arttığını ve en fazla 14 günlük farelerde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca 28 günlük farelerde 14 günlük farelere göre azaldığını belirlemişlerdir (183). Yaşla birlikte ASIC'lerin azalıyor olması, bu kanalların yaşlandıkça daha az tepki verdiğini düşündürmektedir.

Kohlear çekirdek dokusunda ASIC3 gen ifadesinin varlığı, RT-PZR analiz sonuçlarıyla tespit edilmiştir. Fakat kohlear çekirdek yıldız ve çalı nöronlarında ASIC3 alt tipinin varlığı yama kenetleme kayıtlarında farmakolojik olarak gösterilememiştir. Mevcut bulgu iki ihtimali

düşündürmektedir. Birinci olarak kohlear çekirdek dokusunda ifade edilen ASIC3 geni, nöronal hücre kaynaklı olmayıp, glia ve endotel hücre kaynaklı olabilir. RT-PZR analiz çalışmaları kohlear çekirdek dokusunda, yama kenetleme çalışmaları ise kohlear çekirdek nöronlarında yapıldığı için, ASIC3 alt tipi nöronlarda ifade edilmiyorsa yıldız ve çalı nöronlarında tespit edilememesi doğaldır. İkinci olarak kohlear çekirdekte ASIC3 alt tipinin gen düzeyinde ifade edilip fakat protein (kanal) düzeyinde ifade edilmeme olasılığıdır.

5.2. Yama kenetleme tekniği ile ASIC'lerin karakterizasyonu

Bu çalışmada asite duyarlı iyon kanallarının, kohlear çekirdek nöronlarının uyarılabilirliğini etkileyerek, işitme sinyallerinin işlenmesinde önemli rol alacağı hipotezi yama kenetleme tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Hücre dışı olarak uygulanan asidik solüsyonun kohlear çekirdek kesitlerindeki yıldız ve çalı nöronlarına etkileri incelenmiştir. Voltaj kenetleme çalışmalarında düşük hücre dışı pH ile içe doğru akımların oluştuğu belirlendi (Şekil 4.2A ve Şekil 4.11A). Akım kenetleme çalışmalarında ise düşük hücre dışı pH'nın kohlear çekirdek nöronlarına doğrudan uyarıcı etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4.20A ve Şekil 4.21A). Ayrıca ASIC blokörü olan amiloridin kohlear çekirdek nöronlarındaki ASIC akımları üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha sonra kohlear çekirdekteki ASIC kanallarının Na^+ iyonuna geçirgenliği, Ca^{2+} iyonunun ASIC kanalları üzerine etkisi ve kohlear çekirdekteki ASIC alt tipleri farmakolojik olarak tanımlanmıştır.

Günümüzde işitme sistemindeki ASIC'lerle ilgili yapılmış yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar ASIC'lerin işitme sisteminin periferinde ifade ve işlevine odaklanılmıştır. Fare spiral ganglion hücresinde, ASIC3 ve ASIC1b' nin ifade edildiği gösterilmiştir (122, 123). ASIC2 kanallarının spiral gangliyonda ifade edildiği gösterilmiş ve bu işitsel bölgede önemli rolünün olduğu tespit edilmiştir (124). Ayrıca, sıçan vestibüler gangliyon nöronlarında ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 ve ASIC4 kanallarının, sinir liflerinde ise ASIC1a ve ASIC2a alt tiplerinin ifade edildiği bulunmuştur (125).

Literatürde merkezi işitme sistemindeki ASIC'ler üzerine yapılan çok az fonksiyonel çalışma bulunmaktadır. Zhang ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada inferior kollikulus nöronlarında fonksiyonel ASIC1a ve ASIC2a alt tiplerinin varlığını göstermişlerdir (126). Bu çalışmanın bulguları da inferior kollikulus nöronlarında olduğu gibi merkezi işitsel çekirdeği olan kohlear çekirdek nöronlarında da asite duyarlı iyon kanallarının olabileceğini düşündürmektedir. Voltaj kenetleme çalışmalarında düşük hücre dışı pH ile kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücreleri uyarıldığında, belli bir zaman sonra duyarsızlaşan içe doğru akımlar

oluştı (Şekil 4.2 n = 42, Şekil 4.11 n= 15). pH 7'nin altına düşünce, ASIC kanalları aktiflenmeye başladı. Yıldız hücreleri için yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH₅₀) 5,84 ± 0,08, eğim faktörü değeri 0,17 olarak (Şekil 4.2B), çalı hücreleri için ise yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH₅₀) 5,81 ± 0,06 olarak bulunmuştur (Şekil 4.11B). İnferior kollikulus nöronlarında yapılan çalışmada yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH₅₀) 5,92 ve eğim faktörü değeri 0,92 olarak bulunmuştur (126). Toyoaki ve arkadaşlarının supraoptik çekirdeklerde yaptıkları çalışmada, yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH₅₀) 5,71 ve eğim faktörü değeri 0,99 olarak bulunmuştur (182). Yapılan başka bir çalışmada ise yarı maksimum aktivasyon pH değeri (pH₅₀) 5,81 ve eğim faktörü değeri 1,01 olarak bulunmuştur (162). Çalışmanın yarı maksimum aktivasyon pH değeri daha önce başka bölgelerde yapılan sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Fakat eğim faktörü değeri diğer çalışmalara oranla düşük bulunmuştur. Eğim faktörünün düşük olması; asit duyarlılığının, belli bir noktadan sonra birden arttığını gösterir. Bu da yıldız ve çalı tipi hücrelerin asidik pH'ya daha duyarlı olduğu anlamına gelir.

5.3. ASIC'lerin amilorid duyarlılığı

Kohlear çekirdek yıldız (IC₅₀ = 32,5 ± 0,8 µM) ve çalı (IC₅₀ = 32,1 ± 0,2 µM) hücrelerinde oluşan akımlar amilorid duyarlıydı (Şekil 4.3 ve Şekil 4.12). ASIC'ler için yaygın olarak kullanılan ve ASIC blokörü amiloridin hem yıldız hem de çalı hücrelerinde oluşan akımları doza bağımlı olarak inhibe etmesi, her iki hücre tipinde de fonksiyonel ASIC'lerin varlığına işaret etmektedir (Şekil 4.4 ve 4.13). Bu çalışma merkezi işitme sistemindeki fonksiyonel ASIC'lerin varlığını gösteren ilk rapordur. Mevcut çalışmadaki amiloridin inhibisyon etkisi Waldman ve arkadaşlarının (1997) daha önce yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla tutarlıdır (1, 5, 136). Fare kohlear çekirdek nöronlarında asite duyarlı iyon kanallarının farmakolojik özellikleri, diğer bazı MSS çekirdeklerinde rapor edilen ASIC'lerin özellikleri ile paralellik göstermektedir (126, 127, 184). Sonuçlar kohlear çekirdekte ASIC'lerin işlevsel bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

5.4. ASIC'lerden büyük oranda Na⁺ iyonu geçer

Mevcut çalışmada yıldız ve çalı hücrelerinde yBOS'dan sodyum iyonunun çıkarılmasıyla (0 mM Na⁺) ASIC akım genliğinin yaklaşık olarak % 84 oranında azalması (Şekil 4.5 ve Şekil 4.14), ASIC akımının büyük oranda Na⁺ iyonuna bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmayı doğrular nitelikte Krishtal ve arkadaşları (1981) yaptıkları çalışmada asite duyarlı iyon kanallarından kaynaklanan akımın oluşmasında esas sorumlu iyonun Na⁺ olduğunu bildirmişlerdir (104). Literatür taramasında ASIC1a hariç diğer tüm ASIC alt birimlerinin

(ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 ve ASIC4) sadece Na^+ iyonuna geçirgen olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan ASIC1a alt birimi yüksek oranda Na^+ iyonuna, düşük oranda ise Ca^{2+} iyonuna geçirgendir (5). Na^+ iyonunun yBOS'dan çıkarılmasıyla ASIC akımının azalmasına karşın tamamen inhibe olmaması Na^+ 'un yanısıra Ca^{2+} iyonununda ASIC akımının oluşmasına katkıda bulunduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmada Ca^{2+} iyonuna geçirgen olan ASIC1a alt tipinin bulunduğuna yönelik PZR ve elektrofizyolojik deliller bulunmaktadır. Fare kohlear çekirdek dokusundaki PZR sonuçları, ASIC1 alt tipinin mRNA düzeyinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca elektrofizyolojik çalışmalarda spesifik ASIC1 inhibitörü olan Pb^{2+} (10 μM) (112) uygulandığında yıldız ve çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının genliği önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.8A, Şekil 4.17A). Yine ASIC akımlarının yBOS'tan kalsiyum iyonunun tamamen çıkartılması (0 mM Ca^{2+}) ile ASIC akımının arttığı belirlendi. Bu durumun homomerik ASIC1a kanallarının farmakolojik bir özelliği olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (194, 195, 219).

5.5. ASIC akımları duyarsızlaşmaktadır

Kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücrelerinde hücre dışı asidik solüsyon ile indüklenen ASIC'ler kısa süre sonra duyarsızlaşmışlardır. Yıldız hücrelerindeki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti değerleri: pH 4 de 1,39 s, pH 6 de 2,32 s ve pH 6,5 de 2,48 s olarak bulundu (Şekil 4.7). Çalı hücrelerinde ise: pH 4 de 1,08 s, pH 6 de 1,98 s ve pH 6,5 de 2,16 s olarak bulunmuştur (Şekil 4.16). Hem yıldız hem de çalı hücrelerinde hücre dışı pH düştükçe ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti azalmıştır. Li ve arkadaşları (2014) fare olfaktör bulb M/T nöronlarındaki ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti değerlerini: pH 4,5 de 0,57 s, pH 6,5 de 1,32 s olarak göstermişlerdir (185). 14 günlük fare kortikal nöronlarında yapılan çalışmada ise ASIC akımlarının duyarsızlaşma zaman sabiti değeri pH 6,0 da 1,07 s olarak bulunmuştur (183). Mevcut çalışmanın duyarsızlaşma zaman sabiti değerleri daha önce başka bölgelerde yapılan sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

5.6. ASIC alt tipleri

Çalışmada elde edilen PZR ve elektrofizyolojik yama kenetleme bulguları kohlear çekirdek hücrelerindeki ASIC akımlarının, ASIC3 alt tipi tarafından değil de, ASIC1a ve ASIC2a alt tipleri tarafından taşındığını düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, ASIC1a akımlarının yüksek hücre dışı Ca^{2+} iyonu ile azaldığı gösterilmiştir (186, 187). Yukarıda da belirtildiği gibi yüksek hücre dışı Ca^{2+} ile akımın azalması, ASIC1a ve ASIC3 homomerik kanallarının farmakolojik bir özelliğidir (164, 165, 188). Çalışmamızda da hücre dışı kalsiyumun yBOS'tan çıkarılması (0 mM Ca^{2+}), yapılan çalışmalarla tutarlı olarak, ASIC

akımlarını arttırmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.15). Ayrıca Wang ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada seçici ASIC1 kanal blokörü olan kurşun ile ASIC1a akımlarının azaldığını rapor etmişlerdir (112). Bu çalışma ile tutarlı olarak Pb^{2+} (10 μM) uygulandığında, yıldız ve çalı hücrelerindeki ASIC akımlarının genliği azalmıştır (Şekil 4.8A ve 4.17A). yBOS solüsyonundan Ca^{2+} iyonunun çıkarılması ile ASIC akımlarının genliğinin artması ve yBOS solüsyonuna kurşun eklenmesiyle ASIC akımlarının genliğinin azalması daha önceki yapılan çalışmalarla tutarlıdır. Bu sonuçlar da kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücrelerinde işlevsel ASIC1a alt tipinin varlığını desteklemektedir.

Baron ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada çinkonun yüksek konsantrasyonda (300 μM) ASIC2a içeren kanallar tarafından taşınan akımları önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir (110). Bu yapılan çalışma ile paralel olarak mevcut çalışmada da Zn^{2+} (300 μM) ASIC akımlarının genliğini artırmıştır (Şekil 4.8B, Şekil 4.17B). Buna ek olarak, ASIC1a homomerik kanalının kurşun tarafından bloke edilmesinden sonra, çinko ASIC akımlarının genliğini daha belirgin şekilde artırmıştır (Şekil 4.9 ve Şekil 4.18). Kohlear çekirdek hücrelerinde oluşan asit kaynaklı akımın (ASIC akımının) Zn^{2+} (300 μM) varlığında artması fonksiyonel ASIC2a kanallarının burada varlığını desteklemektedir. Kohlear çekirdek nöronlarında ASIC1a ve ASIC2a alt tiplerinin bulunması daha önceki yapılan çalışmaları desteklemektedir.

Fonksiyonel asite duyarlı iyon kanallarının (ASIC2b ve ASIC4 hariç) heteromer oluşturulabildiği daha önce yapılan çalışmalar ile rapor edilmiştir. Örneğin, ASIC2a ve ASIC3'ün dorsal kök gangliyon nöronlarında heteromer bir kanal oluşturabildiği gösterilmiştir (189). Aynı zamanda Benson ve arkadaşları (2002) ASIC1a ve ASIC2a alt birimlerinin, asitle uyarılmış akımlar oluşturmak için heteromer olarak işlevsel kanallar oluşturabildiğini rapor etmişlerdir (130). Mevcut çalışmanın verileri Baron ve arkadaşlarının (2001) inferior kollikulus nöronlarında ve Zhang ve arkadaşlarının (2008) kurbağa oositlerinde ifade edilen ASIC1a + ASIC2a heteromerik kanalları için elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir (110, 126). Homomerik ASIC1a ve heteromerik ASIC1a-ASIC2a kanalları, merkezi sinir sistemi nöronlarında ASIC'lerin en yaygın bulunan alt tipleri olduğu rapor edilmiştir (133, 190). Benzer şekilde kohlear çekirdek yıldız ve çalı nöronlarında ASIC1a ve ASIC2a'nın homomer veya heteromer şeklinde işlev gördüğü düşünülmektedir.

Önceki yapılan çalışmalarda, MSS nöronlarında ASIC3 alt tipinin varlığını gösteren elektrofizyolojik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fonksiyonel ASIC3 alt tipinin özellikle periferik sinir sisteminde varlığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (122, 125). Mevcut

çalışmamızda ise merkezi işitme sisteminde fonksiyonel ASIC3 kanallarının bulunmadığını destekleyen kanıtlar mevcuttur. Spesifik ASIC3 kanal blokörü olan sodyum salisilatın (113), kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücrelerindeki asit kaynaklı akımlar üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu bulgumuz kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücrelerinde ASIC3 kanalının bulunmadığına işaret eder (Şekil 4.10 ve Şekil 4.19).

Çalışmanın voltaj kenetleme sonuçları; kohlear çekirdek nöronlarında asit kaynaklı akıma, ASIC3 alt tipinin değil de ASIC1a ve ASIC2a içeren kanalların aracılık ettiğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, hipokampal alanlarda ve inferior kollikulusta yapılan çalışmaların bulguları ile tutarlılık göstermektedir (9, 126).

5.7. Akım kenetleme deneylerinde meydana gelen depolarizasyon

Akım kenetleme deneylerinde kohlear çekirdek yıldız hücrelerinin asit yBOS'a maruz bırakılması, depolarizasyon ve patlamalı aksiyon potansiyellerinin oluşmasına neden olmuştur (Şekil 4.20). Amilorid, oluşan depolarizasyonu ve patlamalı aksiyon potansiyellerini inhibe etmiştir. Fakat çalı hücrelerinde asit uygulaması, sadece depolarizasyon oluşmasına yol açmıştır (Şekil 4.21). Asite duyarlı iyon kanallarının aktiflenince hücrede depolarizasyona neden olduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada asit ile indüklenen hücrelerin depolarize olduğu ve patlamalı aksiyon potansiyeli oluşturduğu gösterilmiştir (126, 178, 191). Çalı hücrelerinde olduğu gibi fare hipotalamik kültür nöronları da düşük hücre dışı pH ile uyarıldığında sadece depolarizasyon meydana gelmiştir (162).

Yukarıda da izah edildiği gibi ASIC'lerin Na^+ iyonlarına geçirgenliğinin yüksek olmasından dolayı hücreye pozitif yüklü Na^+ iyonlarının girmesi ve sonuçta hücrenin depolarizasyonuna yol açması beklenen bir durumdur. Uyarılabilirliğin artması nedeniyle spontan olarak patlamalı aksiyon potansiyellerinin de oluşması anlaşılır bir durumdur. Hem yıldız hem de çalı hücrelerindeki depolarizasyonun ASIC blokörü olan amilorid tarafından büyük oranda inhibisyonu, asit uygulamasıyla indüklenen ASIC'lerin aktivasyonlarına bağlı olduğunu göstermektedir.

Akım kenetleme sonuçlarına göre kohlear çekirdek nöronlarındaki ASIC'lerin aktivasyonunun hücrenin depolarizasyonuna ve aksiyon potansiyeli oluşumunu tetikleyebileceği ve böylelikle ASIC'lerin kohlear çekirdekteki nöronların ses bilgisinin işlenmesine katılabileceği düşünülmektedir. ASIC'lerin merkezi işitsel sistemindeki fizyolojik ve patolojik süreçlerde işlevsel rollerini keşfetmek için kohlear çekirdek nöronlarındaki fonksiyonel karakterizasyonu önemlidir.

5.8. Kohlear çekirdekteki asit kaynaklı akımlara ASIC'ler aracılık etmektedir

ASIC'ler üzerinde yapılan çalışmalarla ilgili olarak önemli bir endişe şudur; kurşun ve çinko gibi kullanılan modülatörlerin ASIC'ler için spesifik olmamasıdır. Bu nedenle ASIC'ler dışındaki kanalların/reseptörlerin kohlear çekirdek hücrelerindeki ASIC benzeri akımlara karışma ihtimalini dışlayamayız. Bununla birlikte, kohlear çekirdek hücrelerinde asit kaynaklı akımların esas olarak ASIC'ler tarafından aracılık edildiğine 3 nedenden dolayı düşünülmektedir. Birincisi, yapılan çalışmalarda düşük hücre dışı pH'nın birçok kanalı/reseptörü modüle edebildiği gösterilmiştir (192, 193). Yine başka çalışmalarda ASIC (5) ve vaniloid reseptörleri (194) gibi sadece birkaç kanal/reseptörün, MSS'de hücre dışı asidifikasyon ile direkt olarak aktive edilebileceği gösterilmiştir. Amilorid ASIC'ler için spesifik olmayan bir engelleyici olmasına rağmen, ASIC'ler ve vaniloid reseptörleri arasında, vaniloid reseptör aracılı akımları değil ASIC akımlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (195). Bu literatürler ile tutarlı olarak mevcut çalışmamızda da düşük hücre dışı pH içe doğru akımların oluşmasına neden oldu ve amilorid oluşan akımları doza bağımlı olarak inhibe etti. İkincisi, daha önceki yapılan çalışmalarda, fonksiyonel ASIC'leri bulunmayan genetiği değiştirilmiş farelerin hipokampal (118), kortikal (121, 184) ve spinal (120) nöronlarında asit kaynaklı akımların çoğunun inhibe olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, merkezi sinir sisteminde ASIC'lerin asit uyarılarına karşı oluşan yanıtlara aracılık eden başlıca kanallar olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalarla paralel olarak mevcut çalışmada da amiloride duyarlı akımlar oluşmuştur. Üçüncü olarak, kohlear çekirdek hücrelerindeki asit kaynaklı akımların elektrofizyolojik özellikleri ASIC aracılı akımlara benzerlik göstermektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde kohlear çekirdek hücrelerindeki asitle indüklenen akımlar muhtemelen kohlear çekirdekteki işlevsel ASIC'ler tarafından oluşturulmaktadır.

5.9. ASIC'ler değişik fizyolojik mekanizmalarda rol oynamaktadır

Asit maruziyetiyle aktive olan ASIC'lerin değişik fizyolojik mekanizmalarda ve patofizyolojik olaylarda rolü olduğu yönünde raporlar bulunmaktadır. Değişik hücresel yapılarda lokal pH düşüşlerinin, ASIC'leri aktive edebilecek kadar önemli olmakla birlikte, dokulardaki pH'nın homeostatik mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği düşünülmektedir (192). Örneğin, sinaptik veziküller genelde asidiktir ve pH'sı 5,7'dir (196). Hipokampal nöronlarda yapılan çalışmalarda yoğun sinaptik aktivite gösteren sinapslarda vezikül serbest bırakıldıktan sonra sinaptik yarıktaki hücre dışı pH'nın geçici olarak 6'nın altına düştüğü gösterilmiştir (197, 198). Yine, retinal koni reseptörlerinde yapılan çalışmada ASIC'lerin sinaptik iletimi

etkileyebileceği gösterilmiştir (193). Kohleadaki birçok hücrel stresin (örneğin iskemi ve iltihaplanma) lokal asidozu indükleyebileceği düşünülmektedir. Nedeni pek anlaşılamasa da iltihaplanma veya iskemi sonuçlarının ani işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir (126). Bu bağlamda, mekanik olmayan nedenler ile oluşan bazı işitme kayıplarının altında belki de ASIC'lerin yatabileceği olasıdır.

Ayrıca ASIC'lerin zararlı uyarılara karşı bir algılayıcı görevi görebildikleri ve bazı patolojik olgularda önemli bir rolünün bulunabileceği düşünülmektedir. Hücreler arası asidozun ASIC'leri etkileyerek aktive ettiği ve ASIC'lerin de epileptik nöbetler ve iskemi ile ilişkili olarak aşırı uyarıcı aktiviteleri tetiklediği gösterilmiştir. Bu nedenle ASIC'lerin bu hastalıkların patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir (199).

5.10. ASIC'lerin kohlear çekirdekte olası işlevsel rolleri

Farelerin işitme duyarlılığında ASIC2 kanallarının rol oynadığını tanımlayan birkaç çalışma bulunmaktadır (124, 127). Roza ve arkadaşları 2004 yılında ASIC2 geni bulunmayan genetiği değiştirilmiş farelerde yaptıkları çalışmada, ASIC2 kanallarının bulunmamasının işitmeyi bozmadığını göstermişlerdir (127). Peng ve arkadaşları ise ASIC2 geni bulunmamasının işitmeyi bozmadığını ancak ASIC2 geni varken gürültüde işitme eşiğinin daha az kaydığını gösterdiler (124). Yani ASIC2'nin normal işitme yeteneğinden ziyade gürültüye duyarlılıkta rol oynadığı düşünülmektedirler. Böylelikle ASIC2'nin işitme eşiğinin ayarlanmasında bir kontrol mekanizması olarak görev yapabileceğini önerilmektedir. Hildebrand ve arkadaşları yaptığı çalışmada ASIC3 olmayan farelerde yaşla birlikte ilerleyici işitme kaybının bulunduğunu göstermişlerdir (122).

Yapılan çalışmalarda iskemi ve epilepsi gibi patolojik durumlarda asidozun gelişmesine bağlı olarak beyin hasarının geliştiği gösterilmiştir (200, 201). Daha önceki yapılan çalışmalarda, iskemi sırasında oluşan nöronal hasardan büyük oranda ASIC'lerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (121, 202). Muhtemelen iskemi koşullarında asidozla aktive olan ASIC'ler nöronal uyarımı arttırmak suretiyle nöronal aşırı uyarılmaya neden olur ve beyin iskemisini takip eden patolojik sürece katkı sunar. Bu çalışmalarda gösterildiği gibi kohlear çekirdekte de iskemik koşullar altında ASIC'lerin rolünün olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ASIC1a ve ASIC2a'nın, kohlear çekirdek nöronlarında iskemi gibi patolojik değişiklikleri algılayan membran sensörleri olarak çalıştığı düşünülebilir.

Son zamanlarda, ASIC2'nin ışık kaynaklı retinal dejenerasyona karşı koruyucu rolünün olduğu bildirilmiştir (119). Wei-Li Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ASIC3 yokluğuna bağlı

işitme kaybının bir sonucu olarak yavrularına yetersiz tepki veren anneler ve yavruların sosyal gelişmesinde eksikliklerin ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu çalışmada farelerde ASIC3'e bağlı işitme kaybının, yavru çağrılarına yanıt vermemesi ve annelik davranışları üzerine olumsuz etkisinin olduğu rapor edilmiştir (11). Yapılan çalışmalarda mevcut kanıtlar tam olarak desteklememekle birlikte, ASIC'lerin işitme yolağında özellikle iç kulakta mekanotransdüksiyon için gerekli olduğu düşünülmektedir (124, 127, 179). Çalışmamızdan elde edilen bulgular, ASIC'lerin merkezi işitme yolağın bir çekirdeği olan kohlear çekirdekte, işitsel bilgilerin işlenmesi sürecine dâhil olabileceğini düşündürmektedir.

5.11. Sonuç ve öneriler

Bu çalışmada RT-PZR metodu ile 16 günlük, 75 günlük ve 2 yaşındaki fare kohlear çekirdek dokusunda ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 alt tiplerinin gen ifade düzeyleri analiz edildi. Ayrıca 14-17 günlük fare kohlear çekirdek dilimlerindeki yıldız ve çalı nöronlarında ASIC kanallarının elektrofizyolojik ve biyofiziksel karakterizasyonu yapılmıştır. Her iki hücre grubu voltaj ve akım kenetleme metodlarıyla, farklı pH'larda asidik solüsyon uygulanarak incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda kontrol gruplarına göre asidik solüsyon kullanılan test gruplarındaki bazı parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücrelerinden elde edilen veriler, daha önce beynin başka bölgelerinde asite duyarlı iyon kanalı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak elde edilen bu veriler neticesinde ASIC kanallarının kohlear çekirdek nöronlarında voltaj kenetleme çalışmalarıyla: yıldız ve çalı hücrelerinde asidik solüsyon ile içe doğru hızlı bir şekilde aktiflenip/duyarsızlaşan ASIC akımlarının oluşması ve bu akımların spesifik olmayan ASIC blokörü olan amilorid tarafından inhibe edilmesi neticesinde (1) bu hücrelerde ASIC kanallarının varlığı, (2) yıldız ve çalı hücrelerinde sodyum klorür olan yBOS solüsyonunda akımın oluşması fakat sodyum klorür olmayan solüsyonda akımın oluşmaması, asit duyarlı iyon kanallarından kaynaklanan akımın oluşmasında esas sorumlu iyonun Na^+ olduğu ve kohlear çekirdek nöronlarındaki bu asit kaynaklı akımın esas olarak Na^+ tarafından taşındığı, (3) her iki hücredeki ASIC akımlarının ASIC1a ve ASIC2a kanalları tarafından taşındığı ve (4) yıldız/çalı hücrelerinde düşük hücre dışı Ca^{2+} 'un, ASIC akımlarını artırdığı gösterilmiştir.

Ayrıca akım kenetleme çalışmaları ile: (1) kohlear çekirdek yıldız hücrelerinde asidik solüsyonun membran potansiyelini depolarize ettiği ve patlamalı aksiyon potansiyeli oluşturduğu, (2) çalı hücrelerinde ise sadece membran potansiyelini depolarize ettiği ve (3) her

iki hücrede de amilorid'in oluşan depolarizasyonu blokladığı rapor edilmiştir. Kohlear çekirdek yıldız ve çalı hücrelerinde, asidik solüsyonun membranın depolarizasyonunu indükleyebilir ve nöronlarda aksiyon potansiyellerini tetikleyebilir olması ASIC'lerin kohlear çekirdekte önemli bir fizyolojik fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak RT-PZR tekniği kullanılarak kohlear çekirdek dokusunda ASIC1, ASIC2 ve ASIC3 gen ifadesinin bulunduğu ve yama kenetleme (patch-clamp) tekniği kullanılarak kohlear çekirdek yıldız ve çalı nöronlarında ASIC kanal akımları ilk defa gösterilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde; ASIC kanallarının kohlear çekirdekteki bu nöronların uyarılabilirliğini etkileyerek, işitme sinyallerinin işlenmesinde önemli rol alacağı sonucuna varılmıştır. Tüm bu veriler ışığında her ne kadar ASIC kanallarının kohlear çekirdek dokusunda gen (mRNA) düzeyinde ve kohlear çekirdek nöronlarında elektrofizyolojik olarak tespit edildiğini söylemek mümkün olsa da; kanalın protein düzeyinde varlığını göstermek üzere immunohistokimyasal çalışmalardan yararlanılması gerekmektedir. Ayrıca kanalın bilinen 3 alt tipi (ASIC1b, ASIC2b ve ASIC4) daha bulunmaktadır. Bu alt tiplerinin spesifik modülatörleri olmadığı için burada bulunup bulunmadıkları incelenememiştir. Bundan dolayı bu alt tiplerinin kohlear çekirdekte ifade edilme dereceleri ve total ASIC akımlarına ne oranda katkıda bulunduklarının açığa çıkarılması için ileri teknikler ile desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*. 1997;386(6621):173-177.
2. Chen CC, England S, Akopian AN, Wood JN. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(17):10240-10245.
3. Price MP, Snyder PM, Welsh MJ. Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(14):7879-7882.
4. Lingueglia E, de Weille JR, Bassilana F, Heurteaux C, Sakai H, Waldmann R, et al. A modulatory subunit of acid sensing ion channels in brain and dorsal root ganglion cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(47):29778-29783.
5. Waldmann R, Bassilana F, de Weille J, Champigny G, Heurteaux C, Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(34):20975-20978.
6. Akopian AN, Chen CC, Ding Y, Cesare P, Wood JN. A new member of the acid-sensing ion channel family. *Neuroreport*. 2000;11(10):2217-2222.
7. Bal R, Oertel D. Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Journal of neurophysiology*. 2001;86(5):2299-2311.
8. Oertel D, Wright S, Cao XJ, Ferragamo M, Bal R. The multiple functions of T stellate/multipolar/chopper cells in the ventral cochlear nucleus. *Hearing research*. 2011;276(1-2):61-69.
9. Biagini G, Babinski K, Avoli M, Marcinkiewicz M, Seguela P. Regional and subunit-specific downregulation of acid-sensing ion channels in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurobiology of disease*. 2001;8(1):45-58.
10. Gonzalez-Garrido A, Vega R, Mercado F, Lopez IA, Soto E. Acid-Sensing Ion Channels Expression, Identity and Role in the Excitability of the Cochlear Afferent Neurons. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:483.
11. Wu WL, Wang CH, Huang EY, Chen CC. Asic3(-/-) female mice with hearing deficit affects social development of pups. *PloS one*. 2009;4(8):e6508.
12. Hruska-Hageman AM, Benson CJ, Leonard AS, Price MP, Welsh MJ. PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H⁺-gated current. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(45):46962-46968.

13. Bal R, Baydas G. Electrophysiological properties of octopus neurons of the cat cochlear nucleus: an in vitro study. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* : JARO. 2009;10(2):281-293.
14. Osen KK. Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *The Journal of comparative neurology*. 1969;136(4):453-484.
15. <https://www.shutterstock.com/image-vector/auditory-nerve-pathways-cochlea-ear-primary>.
16. Hackney CM, Osen KK, Kolston J. Anatomy of the cochlear nuclear complex of guinea pig. *Anatomy and embryology*. 1990;182(2):123-149.
17. Hurd LB, Hutson KA, Morest DK. Cochlear nerve projections to the small cell shell of the cochlear nucleus: the neuroanatomy of extremely thin sensory axons. *Synapse*. 1999;33(2):83-117.
18. Mugnaini E, Osen KK, Dahl AL, Friedrich VL, Jr., Korte G. Fine structure of granule cells and related interneurons (termed Golgi cells) in the cochlear nuclear complex of cat, rat and mouse. *Journal of neurocytology*. 1980;9(4):537-570.
19. Brown MC, Berglund AM, Kiang NY, Ryugo DK. Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *The Journal of comparative neurology*. 1988;278(4):581-590.
20. Brawer JR, Morest DK, Kane EC. The neuronal architecture of the cochlear nucleus of the cat. *The Journal of comparative neurology*. 1974;155(3):251-300.
21. Oertel D, Wu SH. Morphology and physiology of cells in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *The Journal of comparative neurology*. 1989;283(2):228-247.
22. Doucet JR, Ryugo DK. Projections from the ventral cochlear nucleus to the dorsal cochlear nucleus in rats. *The Journal of comparative neurology*. 1997;385(2):245-264.
23. Hancock KE, Voigt HF. Intracellularly labeled fusiform cells in dorsal cochlear nucleus of the gerbil. II. Comparison of physiology and anatomy. *Journal of neurophysiology*. 2002;87(5):2520-2530.
24. Burian M, Gstoettner W. Projection of primary vestibular afferent fibres to the cochlear nucleus in the guinea pig. *Neuroscience letters*. 1988;84(1):13-17.
25. Webster DB, Trune DR. Cochlear nuclear complex of mice. *The American journal of anatomy*. 1982;163(2):103-130.
26. Cao XJ, Shatadal S, Oertel D. Voltage-sensitive conductances of bushy cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol*. 2007;97(6):3961-3975.

27. 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. *J Neurophysiol.* 2014;112(12):3173-3188.
28. Wang YX, Wenthold RJ, Ottersen OP, Petralia RS. Endbulb synapses in the anteroventral cochlear nucleus express a specific subset of AMPA-type glutamate receptor subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1998;18(3):1148-1160.
29. 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.
30. Ostapoff EM, Morest DK. Synaptic Organization of Globular Bushy Cells in the Ventral Cochlear Nucleus of the Cat - a Quantitative Study. *J Comp Neurol.* 1991;314(3):598-613.
31. Adams JC. Projections from octopus cells of the posteroventral cochlear nucleus to the ventral nucleus of the lateral lemniscus in cat and human. *Audit Neurosci.* 1997;3(4):335-350.
32. Cao XJ, McGinley MJ, Oertel D. Connections and synaptic function in the posteroventral cochlear nucleus of deaf jerker mice. *J Comp Neurol.* 2008;510(3):297-308.
33. PICKLES JO. Auditory System; *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 129 (3rd series); Editors; G.G. Celesia and G. Hickok; The Human Auditory System. 2015.
34. Young EDO, D. Cochlear nucleus In: Shepherd, G.M., (Ed.), *The synaptic organization of the brain.* 2004:125-163.
35. Oertel D, Wu SH, Garb MW, Dizack C. Morphology and physiology of cells in slice preparations of the posteroventral cochlear nucleus of mice. *The Journal of comparative neurology.* 1990;295(1):136-154.
36. Wu SH, Oertel D. Intracellular Injection with Horseradish-Peroxidase of Physiologically Characterized Stellate and Bushy Cells in Slices of Mouse Anteroventral Cochlear Nucleus. *J Neurosci.* 1984;4(6):1577-1588.
37. Rodrigues ARA, Oertel D. Hyperpolarization- activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol.* 2006;95(1):76-87.
38. Tolbert LP, Morest DK. The neuronal architecture of the anteroventral cochlear nucleus of the cat in the region of the cochlear nerve root: Golgi and Nissl methods. *Neuroscience.* 1982;7(12):3013-3030.

39. Schofield BR, Cant NB. Organization of the Superior Olivary Complex in the Guinea-Pig .1. Cytoarchitecture, Cytochrome-Oxidase Histochemistry, and Dendritic Morphology. *J Comp Neurol*. 1991;314(4):645-670.
40. Cant NB, Casseday JH. Projections from the Anteroventral Cochlear Nucleus to the Lateral and Medial Superior Olivary Nuclei. *J Comp Neurol*. 1986;247(4):457-476.
41. 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. *J Comp Neurol*. 1993;331(2):245-260.
42. Liberman MC. Central Projections of Auditory-Nerve Fibers of Differing Spontaneous Rate .1. Anteroventral Cochlear Nucleus. *J Comp Neurol*. 1991;313(2):240-258.
43. Liberman MC. Central Projections of Auditory-Nerve Fibers of Differing Spontaneous Rate .2. Posteroventral and Dorsal Cochlear Nuclei. *J Comp Neurol*. 1993;327(1):17-36.
44. Campos ML, de Cabo C, Wisden W, Juiz JM, Merlo D. Expression of GABA(A) receptor subunits in rat brainstem auditory pathways: cochlear nuclei, superior olivary complex and nucleus of the lateral lemniscus. *Neuroscience*. 2001;102(3):625-638.
45. Willott JF, Bross LS. Morphology of the Octopus Cell Area of the Cochlear Nucleus in Young and Aging C57bl/6j and Cba/J Mice. *J Comp Neurol*. 1990;300(1):61-81.
46. Rhode WS, Smith PH. Encoding Timing and Intensity in the Ventral Cochlear Nucleus of the Cat. *J Neurophysiol*. 1986;56(2):261-286.
47. Rhode WS, Smith PH, Oertel D. Physiological-Response Properties of Cells Labeled Intracellularly with Horseradish-Peroxidase in Cat Dorsal Cochlear Nucleus. *J Comp Neurol*. 1983;213(4):426-447.
48. Bal R, Oertel D. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol*. 2000;84(2):806-817.
49. 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. *P Natl Acad Sci USA*. 2000;97(22):11773-11779.
50. 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.
51. Ferragamo MJ, Golding NL, Oertel D. Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol*. 1998;79(1):51-63.
52. 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.

53. Golding NL, Oertel D. Physiological identification of the targets of cartwheel cells in the dorsal cochlear nucleus. *J Neurophysiol.* 1997;78(1):248-260.
54. Wickesberg RE, Oertel D. Delayed, Frequency-Specific Inhibition in the Cochlear Nuclei of Mice - a Mechanism for Monaural Echo Suppression. *J Neurosci.* 1990;10(6):1762-1768.
55. Fujino K, Oertel D. Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J Neurosci.* 2001;21(18):7372-7383.
56. 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):3053-3067.
57. Alibardi L. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of neurons in the rat ventral cochlear nucleus projecting to the inferior colliculus. *Ann Anat.* 1998;180(5):415-426.
58. 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. *Eur J Neurosci.* 1996;8(1):79-91.
59. Wickesberg RE, Oertel D. Auditory-Nerve Neurotransmitter Acts on a Kainate Receptor - Evidence from Intracellular-Recordings in Brain-Slices from Mice. *Brain Res.* 1989;486(1):39-48.
60. Quester R, Schroder R. Topographic anatomy of the cochlear nuclear region at the floor of the fourth ventricle in humans. *Journal of neurosurgery.* 1999;91(3):466-476.
61. Alibardi L. Characterization of tuberculo-ventral neurons in the dorsal cochlear nucleus of the guinea pig. *Journal of submicroscopic cytology and pathology.* 1999;31(2):295-300.
62. Fujino K, Oertel D. Bidirectional synaptic plasticity in the cerebellum-like mammalian dorsal cochlear nucleus. *P Natl Acad Sci USA.* 2003;100(1):265-270.
63. Zhang S, Oertel D. Cartwheel and Superficial Stellate Cells of the Dorsal Cochlear Nucleus of Mice - Intracellular-Recordings in Slices. *J Neurophysiol.* 1993;69(5):1384-1397.
64. Oertel D, Wu SH. Morphology and Physiology of Cells in Slice Preparations of the Dorsal Cochlear Nucleus of Mice. *J Comp Neurol.* 1989;283(2):228-247.
65. Mugnaini E, Warr WB, Osen KK. Distribution and Light Microscopic Features of Granule Cells in the Cochlear Nuclei of Cat, Rat, and Mouse. *J Comp Neurol.* 1980;191(4):581-606.

66. Wouterlood FG, Mugnaini E. Cartwheel Neurons of the Dorsal Cochlear Nucleus - a Golgi-Electron Microscopic Study in Rat. *J Comp Neurol*. 1984;227(1):136-157.
67. Spatz WB. Differences between guinea pig and rat in the dorsal cochlear nucleus: Expression of calcium-binding proteins by cartwheel and Purkinje-like cells. *Hearing research*. 1997;107(1-2):136-146.
68. Rees A, Palmer AR. *Oxford Handbook of Auditory Science: The Auditory Brain*. 2012.
69. Fitzakerley JL, Schaefer KL, Kitko RA, Manis PB. Properties of cochlear nucleus neurons in primary culture. *Hearing research*. 1997;114(1-2):148-168.
70. Ostapoff EM, Morest DK, Parham K. Spatial organization of the reciprocal connections between the cat dorsal and anteroventral cochlear nuclei. *Hearing research*. 1999;130(1-2):75-93.
71. Oertel D. The role of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:497-519.
72. Saenz M, Langers DR. Tonotopic mapping of human auditory cortex. *Hearing research*. 2014;307:42-52.
73. Hartshorne RP, Keller BU, Talvenheimo JA, Catterall WA, Montal M. Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(1):240-244.
74. Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*. 1952;116(4):449-472.
75. Hartshorne RP, Catterall WA. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(7):4620-4624.
76. Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, Catterall WA. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(23):13888-13891.
77. Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology*. 2012;590(11):2577-2589.
78. Mantegazza M, Curia G, Biagini G, Ragsdale DS, Avoli M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*. 2010;9(4):413-424.
79. Hirsch JA, Oertel D. Intrinsic properties of neurones in the dorsal cochlear nucleus of mice, in vitro. *The Journal of physiology*. 1988;396:535-548.

80. Manis PB, Molitor SC, Wu H. Subthreshold oscillations generated by TTX-sensitive sodium currents in dorsal cochlear nucleus pyramidal cells. *Experimental brain research*. 2003;153(4):443-451.
81. Catterall WA. Voltage-Gated Calcium Channels. *Csh Perspect Biol*. 2011;3(8).
82. Reuter H. Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annual review of physiology*. 1979;41:413-424.
83. Aldley DJ SP. Ion channels; Molecules in action. Cambridge University Press, Birinci baskı, Avustralya 1996. p. 59-100 p.
84. Randall A, Tsien RW. Pharmacological Dissection of Multiple Types of Ca²⁺ Channel Currents in Rat Cerebellar Granule Neurons. *J Neurosci*. 1995;15(4):2995-3012.
85. 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_v2.3) calcium channels. *Biophys J*. 2001;81(1):79-88.
86. Zamponi GW, Snutch TP. Advances in voltage-gated calcium channel structure, function and physiology. *Bba-Biomembranes*. 2013;1828(7):1521-.
87. Bal R, Oertel D. Voltage-activated calcium currents in octopus cells of the mouse cochlear nucleus. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 2007;8(4):509-521.
88. Lachica EA, Rubsamen R, Zirpel L, Rubel EW. Glutamatergic inhibition of voltage-operated calcium channels in the avian cochlear nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(3 Pt 1):1724-1734.
89. Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological reviews*. 1999;79(4):1317-1372.
90. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*. 2005;57(4):473-508.
91. Bal R, Ozturk G, Etem EO, Him A, Cengiz N, Kuloglu T, et al. Modulation of Excitability of Stellate Neurons in the Ventral Cochlear Nucleus of Mice by ATP-Sensitive Potassium Channels. *The Journal of membrane biology*. 2018;251(1):163-178.
92. Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biological chemistry*. 1999;380(7-8):975-980.
93. 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):806-817.

94. Banks MI, Pearce RA, Smith PH. Hyperpolarization-activated cation current (I_h) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *Journal of neurophysiology*. 1993;70(4):1420-1432.
95. Ison JR, Allen PD, Oertel D. Deleting the HCN1 Subunit of Hyperpolarization-Activated Ion Channels in Mice Impairs Acoustic Startle Reflexes, Gap Detection, and Spatial Localization. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 2017;18(3):427-440.
96. Koch U, Braun M, Kapfer C, Grothe B. Distribution of HCN1 and HCN2 in rat auditory brainstem nuclei. *The European journal of neuroscience*. 2004;20(1):79-91.
97. Rodrigues AR, Oertel D. Hyperpolarization-activated currents regulate excitability in stellate cells of the mammalian ventral cochlear nucleus. *Journal of neurophysiology*. 2006;95(1):76-87.
98. Pal B, Por A, Szucs G, Kovacs I, Rusznak Z. HCN channels contribute to the intrinsic activity of cochlear pyramidal cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003;60(10):2189-2199.
99. Krishtal OA, Pidoplichko VI. A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience*. 1980;5(12):2325-2327.
100. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*. 2007;449(7160):316-323.
101. Grunder S, Chen X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2010;2(2):73-94.
102. Waldmann R, Lazdunski M. H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels. *Current opinion in neurobiology*. 1998;8(3):418-24.
103. Krishtal OA, Pidoplichko VI. Receptor for protons in the membrane of sensory neurons. *Brain research*. 1981;214(1):150-154.
104. Krishtal OA, Pidoplichko VI. A "receptor" for protons in small neurons of trigeminal ganglia: possible role in nociception. *Neuroscience letters*. 1981;24(3):243-246.
105. Calorini L, Peppicelli S, Bianchini F. Extracellular acidity as favouring factor of tumor progression and metastatic dissemination. *Experimental oncology*. 2012;34(2):79-84.
106. Hesselager M, Timmermann DB, Ahring PK. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(12):11006-11015.

107. Korkushko AO, Kryshchal OA. [Blocking of proton-activated sodium permeability of the membranes of trigeminal ganglion neurons in the rat by organic cations]. *Neirofiziolgiia = Neurophysiology*. 1984;16(4):557-561.
108. Deval E, Gasull X, Noel J, Salinas M, Baron A, Diochot S, et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;128(3):549-558.
109. Chu XP, Papasian CJ, Wang JQ, Xiong ZG. Modulation of acid-sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. 2011;3(4):288-309.
110. Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M. Zn^{2+} and H^{+} are coactivators of acid-sensing ion channels. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(38):35361-35367.
111. Salinas M, Rash LD, Baron A, Lambeau G, Escoubas P, Lazdunski M. The receptor site of the spider toxin PcTx1 on the proton-gated cation channel ASIC1a. *The Journal of physiology*. 2006;570(Pt 2):339-354.
112. Wang W, Duan B, Xu H, Xu L, Xu TL. Calcium-permeable acid-sensing ion channel is a molecular target of the neurotoxic metal ion lead. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(5):2497-2505.
113. Voilley N, de Weille J, Mamet J, Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(20):8026-8033.
114. Osmakov DI, Andreev YA, Kozlov SA. Acid-sensing ion channels and their modulators. *Biochemistry Biokhimiia*. 2014;79(13):1528-1545.
115. Chen CC, Zimmer A, Sun WH, Hall J, Brownstein MJ, Zimmer A. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(13):8992-8997.
116. Price MP, McIlwrath SL, Xie J, Cheng C, Qiao J, Tarr DE, et al. The DRASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron*. 2001;32(6):1071-1083.
117. Lin W, Ogura T, Kinnamon SC. Acid-activated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *Journal of neurophysiology*. 2002;88(1):133-141.

118. Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, et al. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron*. 2002;34(3):463-477.
119. Ettaiche M, Guy N, Hofman P, Lazdunski M, Waldmann R. Acid-sensing ion channel 2 is important for retinal function and protects against light-induced retinal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(5):1005-1012.
120. Duan B, Wu LJ, Yu YQ, Ding Y, Jing L, Xu L, et al. Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(41):11139-11148.
121. Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell*. 2004;118(6):687-698.
122. Hildebrand MS, de Silva MG, Klockars T, Rose E, Price M, Smith RJ, et al. Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hearing research*. 2004;190(1-2):149-160.
123. Ugawa S, Inagaki A, Yamamura H, Ueda T, Ishida Y, Kajita K, et al. Acid-sensing ion channel-1b in the stereocilia of mammalian cochlear hair cells. *Neuroreport*. 2006;17(12):1235-1239.
124. Peng BG, Ahmad S, Chen S, Chen P, Price MP, Lin X. Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked excitatory responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(45):10167-10175.
125. Mercado F, Lopez IA, Acuna D, Vega R, Soto E. Acid-sensing ionic channels in the rat vestibular endorgans and ganglia. *Journal of neurophysiology*. 2006;96(3):1615-1624.
126. Zhang M, Gong N, Lu YG, Jia NL, Xu TL, Chen L. Functional characterization of acid-sensing ion channels in cultured neurons of rat inferior colliculus. *Neuroscience*. 2008;154(2):461-472.
127. Roza C, Puel JL, Kress M, Baron A, Diochot S, Lazdunski M, et al. Knockout of the ASIC2 channel in mice does not impair cutaneous mechanosensation, visceral mechanonociception and hearing. *The Journal of physiology*. 2004;558(Pt 2):659-669.
128. Babini E, Paukert M, Geisler HS, Grunder S. Alternative splicing and interaction with di- and polyvalent cations control the dynamic range of acid-sensing ion channel 1 (ASIC1). *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(44):41597-41603.

129. Bassler EL, Ngo-Anh TJ, Geisler HS, Ruppertsberg JP, Grunder S. Molecular and functional characterization of acid-sensing ion channel (ASIC) 1b. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(36):33782-33787.
130. Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, et al. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(4):2338-2343.
131. Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, McCleskey EW. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(2):711-716.
132. Hoagland EN, Sherwood TW, Lee KG, Walker CJ, Askwith CC. Identification of a calcium permeable human acid-sensing ion channel 1 transcript variant. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(53):41852-41862.
133. Askwith CC, Wemmie JA, Price MP, Rokhlina T, Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H⁺-activated currents in hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(18):18296-18305.
134. Jiang Q, Li MH, Papasian CJ, Branigan D, Xiong ZG, Wang JQ, et al. Characterization of acid-sensing ion channels in medium spiny neurons of mouse striatum. *Neuroscience*. 2009;162(1):55-66.
135. Leng T, Shi Y, Xiong ZG, Sun D. Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: new therapeutic targets for stroke? *Progress in neurobiology*. 2014;115:189-209.
136. Waldmann R, Champigny G, Voilley N, Lauritzen I, Lazdunski M. The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(18):10433-10436.
137. Price MP, Lewin GR, McIlwrath SL, Cheng C, Xie J, Heppenstall PA, et al. The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation. *Nature*. 2000;407(6807):1007-1011.
138. Champigny G, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M. Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(25):15418-15422.

139. Chu XP, Close N, Saugstad JA, Xiong ZG. ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(20):5329-5339.
140. Sherwood TW, Lee KG, Gormley MG, Askwith CC. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(26):9723-9734.
141. Lin YW, Min MY, Lin CC, Chen WN, Wu WL, Yu HM, et al. Identification and characterization of a subset of mouse sensory neurons that express acid-sensing ion channel 3. *Neuroscience*. 2008;151(2):544-557.
142. Wu LJ, Duan B, Mei YD, Gao J, Chen JG, Zhuo M, et al. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(42):43716-43724.
143. Salinas M, Lazdunski M, Lingueglia E. Structural elements for the generation of sustained currents by the acid pain sensor ASIC3. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(46):31851-31859.
144. Deval E, Salinas M, Baron A, Lingueglia E, Lazdunski M. ASIC2b-dependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(19):19531-19539.
145. Hattori T, Chen J, Harding AM, Price MP, Lu Y, Abboud FM, et al. ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons. *Circulation research*. 2009;105(3):279-286.
146. Sluka KA, Radhakrishnan R, Benson CJ, Eshcol JO, Price MP, Babinski K, et al. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain*. 2007;129(1-2):102-112.
147. Benson CJ, Eckert SP, McCleskey EW. Acid-evoked currents in cardiac sensory neurons: A possible mediator of myocardial ischemic sensation. *Circulation research*. 1999;84(8):921-928.
148. Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(24):17325-17329.
149. Grunder S, Geissler HS, Bassler EL, Ruppersberg JP. A new member of acid-sensing ion channels from pituitary gland. *Neuroreport*. 2000;11(8):1607-1611.

150. Donier E, Rugiero F, Jacob C, Wood JN. Regulation of ASIC activity by ASIC4--new insights into ASIC channel function revealed by a yeast two-hybrid assay. *The European journal of neuroscience*. 2008;28(1):74-86.
151. Askwith CC, Benson CJ, Welsh MJ, Snyder PM. DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(11):6459-6463.
152. Diochot S, Salinas M, Baron A, Escoubas P, Lazdunski M. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;49(2):271-284.
153. Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, et al. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25116-25121.
154. Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, et al. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *The EMBO journal*. 2004;23(7):1516-1525.
155. Deval E, Baron A, Lingueglia E, Mazarguil H, Zajac JM, Lazdunski M. Effects of neuropeptide SF and related peptides on acid sensing ion channel 3 and sensory neuron excitability. *Neuropharmacology*. 2003;44(5):662-671.
156. Allard M, Rousselot P, Lombard MC, Theodosis DT. Evidence for neuropeptide FF (FLFQRFamide) in rat dorsal root ganglia. *Peptides*. 1999;20(3):327-333.
157. Deval E, Noel J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, et al. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *The EMBO journal*. 2008;27(22):3047-3055.
158. Frelin C, Barbry P, Vigne P, Chassande O, Cragoe EJ, Jr., Lazdunski M. Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na⁺ transport via the Na⁺ channel, the Na⁺/H⁺ antiport and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochimie*. 1988;70(9):1285-1290.
159. Kleyman TR, Cragoe EJ, Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *The Journal of membrane biology*. 1988;105(1):1-21.
160. Kuduk SD, Chang RK, Wai JM, Di Marco CN, Cofre V, DiPardo RM, et al. Amidine derived inhibitors of acid-sensing ion channel-3 (ASIC3). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2009;19(15):4059-4063.
161. Chen X, Qiu L, Li M, Durnagel S, Orser BA, Xiong ZG, et al. Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology*. 2010;58(7):1045-1053.
162. Wang W, Yu Y, Xu TL. Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*. 2007;145(2):631-641.

163. Staruschenko A, Dorofeeva NA, Bolshakov KV, Stockand JD. Subunit-dependent cadmium and nickel inhibition of acid-sensing ion channels. *Developmental neurobiology*. 2007;67(1):97-107.
164. de Weille J, Bassilana F. Dependence of the acid-sensitive ion channel, ASIC1a, on extracellular Ca(2+) ions. *Brain research*. 2001;900(2):277-281.
165. Paukert M, Babini E, Pusch M, Grunder S. Identification of the Ca²⁺ blocking site of acid-sensing ion channel (ASIC) 1: implications for channel gating. *The Journal of general physiology*. 2004;124(4):383-394.
166. Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, et al. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(40):8678-8689.
167. Poirot O, Berta T, Decosterd I, Kellenberger S. Distinct ASIC currents are expressed in rat putative nociceptors and are modulated by nerve injury. *The Journal of physiology*. 2006;576(Pt 1):215-234.
168. Maubaret C, Delettre C, Sola S, Hamel CP. Identification of preferentially expressed mRNAs in retina and cochlea. *DNA and cell biology*. 2002;21(11):781-791.
169. Vega R, Rodriguez U, Soto E. Acid-sensing ionic-channel functional expression in the vestibular endorgans. *Neuroscience letters*. 2009;463(3):199-202.
170. Hodgkin AL. Evidence for electrical transmission in nerve: Part II. *The Journal of physiology*. 1937;90(2):211-232.
171. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology*. 1984;46:455-472.
172. Molleman A. Patch Clamping An introductory guide to patch clamp electrophysiology. 2003.
173. Wu SH, Oertel D. Maturation of Synapses and Electrical-Properties of Cells in the Cochlear Nuclei. *Hearing Res*. 1987;30(1):99-110.
174. Oertel D, Wright S, Cao XJ, Ferragamo M, Bal R. The multiple functions of T stellate/multipolar/chopper cells in the ventral cochlear nucleus. *Hearing research*. 2011;276(1-2):61-69.
175. Murase K, Ryu PD, Randic M. Excitatory and inhibitory amino acids and peptide-induced responses in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. *Neuroscience letters*. 1989;103(1):56-63.

176. Forscher P, Oxford GS. Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *The Journal of general physiology*. 1985;85(5):743-763.
177. Golding NL, Ferragamo MJ, Oertel D. Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J Neurosci*. 1999;19(8):2897-2905.
178. Chen CH, Hsu YT, Chen CC, Huang RC. Acid-sensing ion channels in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. *The Journal of physiology*. 2009;587(Pt 8):1727-1737.
179. Drew LJ, Rohrer DK, Price MP, Blaver KE, Cockayne DA, Cesare P, et al. Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *The Journal of physiology*. 2004;556(Pt 3):691-710.
180. Weng JY, Lin YC, Lien CC. Cell type-specific expression of acid-sensing ion channels in hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(19):6548-6558.
181. Du J, Reznikov LR, Welsh MJ. Expression and activity of acid-sensing ion channels in the mouse anterior pituitary. *PloS one*. 2014;9(12):e115310.
182. Ohbuchi T, Sato K, Suzuki H, Okada Y, Dayanithi G, Murphy D, et al. Acid-sensing ion channels in rat hypothalamic vasopressin neurons of the supraoptic nucleus. *The Journal of physiology*. 2010;588(Pt 12):2147-2162.
183. Li M, Kratzer E, Inoue K, Simon RP, Xiong ZG. Developmental change in the electrophysiological and pharmacological properties of acid-sensing ion channels in CNS neurons. *The Journal of physiology*. 2010;588(Pt 20):3883-3900.
184. Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, Jr., Welsh MJ. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(13):5496-5502.
185. Li MH, Liu SQ, Inoue K, Lan J, Simon RP, Xiong ZG. Acid-sensing ion channels in mouse olfactory bulb M/T neurons. *The Journal of general physiology*. 2014;143(6):719-31.
186. Chu XP, Miesch J, Johnson M, Root L, Zhu XM, Chen D, et al. Proton-gated channels in PC12 cells. *Journal of neurophysiology*. 2002;87(5):2555-2561.
187. Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(17):6752-6757.

188. Immke DC, McCleskey EW. Protons open acid-sensing ion channels by catalyzing relief of Ca^{2+} blockade. *Neuron*. 2003;37(1):75-84.
189. Bevan S, Yeats J. Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *The Journal of physiology*. 1991;433:145-161.
190. Baron A, Waldmann R, Lazdunski M. ASIC-like, proton-activated currents in rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology*. 2002;539(Pt 2):485-494.
191. Vukicevic M, Kellenberger S. Modulatory effects of acid-sensing ion channels on action potential generation in hippocampal neurons. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(3):C682-690.
192. Chesler M, Kaila K. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends in neurosciences*. 1992;15(10):396-402.
193. DeVries SH. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca^{2+} current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron*. 2001;32(6):1107-1117.
194. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21(3):531-543.
195. Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(8):1185-1190.
196. Yuste R, Miller RB, Holthoff K, Zhang S, Miesenbock G. Synapto-pHluorins: chimeras between pH-sensitive mutants of green fluorescent protein and synaptic vesicle membrane proteins as reporters of neurotransmitter release. *Methods in enzymology*. 2000;327:522-546.
197. Krishtal OA, Osipchuk YV, Shelest TN, Smirnoff SV. Rapid extracellular pH transients related to synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain research*. 1987;436(2):352-356.
198. Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 1998;394(6689):192-5.
199. Varming T. Proton-gated ion channels in cultured mouse cortical neurons. *Neuropharmacology*. 1999;38(12):1875-1881.
200. Nedergaard M, Kraig RP, Tanabe J, Pulsinelli WA. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *The American journal of physiology*. 1991;260(3 Pt 2):R581-588.

201. Siesjo BK. Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochemical pathology*. 1988;9:31-88.
202. Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhang GY, Xu L, et al. Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron*. 2005;48(4):635-646.





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)
03.05.2017	5	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ Application Information	Araştırmanın Başlığı Research Title	Fare kohlear çekirdek nöronlarında asit duyarlı iyon kanallarının (ASIC) elektrofizyolojik olarak incelenmesi
	Başvuru Tarihi Application Date	25.04.2017
	Protokol no Protocol no	26

KARAR BİLGİLERİ Decision	Karar No: 2017/10 Decision No: 2017/10
	☒ Kabul (Accepted) ☐ Red (Not Accepted)
	Prof. Dr. Ramazan BAL'ın yürütücüsü olduğu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, başvurunun "uygun" olduğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Yürütücü Coordinator	Prof. Dr. Ramazan BAL Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı
-------------------------	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	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 Karşı (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	H	KATILMADI
Tekniker Ahmet Özkul (Üye)	Serbest, Dernek Üyesi	H	E	

E: Evet, H: Hayır

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı	Ziya ÇAKIR
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas/Şarkışla, 1987
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Tokat.
E-posta	cakirziya@yahoo.com

Eğitim ve Akademik Durumu

İlk ve Ortaokul	Samankaya Köyü Şehit Süleyman Solak İ.Ö.O, 2002
Lise	Bursa Atatürk Anadolu Lisesi, 2005
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı, 2010
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 2014
Doktora	Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, 2018

İş Tecrübesi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. Arş. Gör. 2013-....