

Klodronat Periferik Sinirlerde Yaralanma Sonrası Rejenerasyon Sürecini Hızlandırır mı?

Does The Clodronate Accelerate Regeneration Process After Peripheral Nerve Injury?

İbrahim Kahraman¹, Mustafa Güven², Recep Dokuyucu³, Fatih Sefil³, İsmail Günay²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Hatay

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Adana

³Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Hatay

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada seçici olarak sistemik ve yerleşik makrofaj popülasyonunu baskılayan bir ajan olan lipozom ile kaplanmış Klodronatın (LEC: Liposome Encapsulated Clodronate) periferik sinir hasarı sonrası dejenerasyon-rejenerasyon sürecine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Deneylerimizde 8 haftalık wistar türü erkek sıçanlar rastgele olarak 5 gruba ayrıldı. A grubu kontrol grubu olarak seçildi. B4 ve B8 grupları ezilme grubu olup sağ siyatik sinirleri hasarlandı. C4 ve C8 grupları ise ezilme + LEC uygulanan gruplar olarak seçildi. Hasarlanma sonrası C gruplarına 5. 10. ve 15. günlerde intravenöz LEC uygulandı. Hasarlanmayı takiben 4 ve 8 hafta sonra B ve C gruplarının siyatik sinirlerinden önce EMG kaydı alındı sonra sinirler disekte edildi. Bu demetlerden, 4-Aminopiridin (4-Ap) uygulaması öncesi ve sonrasında bir in-vitro elektrofizyolojik yöntem olan Sukroz-gap tekniği ile Bileşik Sinir Aksiyon Potansiyelleri (BSAP) kayıtları alındı.

Bulgular: B ve C gruplarında iletim hızları ile BSAP genliği, yükselme süresi (DT), yarı düşme süresi ($\frac{1}{2}$ FT) ve latans parametreleri üzerine LEC'in anlamlı bir etkisi görülmedi ($p>0.05$). Ancak 4-Ap uygulandıktan sonra oluşan bir fenomen olan gecikmiş depolarizasyon (del-dep) genliği üzerinde LEC'in anlamlı etkisi görüldü ($p<0.05$).

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular ışığında LEC'in yaralanma sonrası ortaya çıkan Wallerian dejenerasyon sürecini kısalttığı ve rejeneratif bir etki olarak miyelinizasyonu hızlandırdığını söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Periferik Sinir Hasarı, Makrofaj, Klodronate, Sukroz-gap, Aksiyon Potansiyeli

ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed of the effects of LEC (LEC; Liposome Encapsulated Clodronate) an agent, to selectively deplete or reduce resident and systemic macrophages population during the degeneration-regeneration cycle after peripheral nerve injury.

Materials-Methods: In our experiments, eight weeks old male wistar rats randomly divided into 5 groups as control (Group A), crush (Group B4 and B8) and crush+received LEC treatment (Groups C4 and C8) (n=40). Nerve crush injury model was performed on right sciatic nerve of the animals except the control group. Immediately after injury, LEC was intravenously injected after the days of post-operation 5, 10 and 15th (Group C). After 4-8 weeks following the injury, before EMG measurement was recorded than sciatic nerve dissected from Group B and C. Before and after 4-Aminopyridine (4-Ap) administration, the Compound Action Potential (CAP) were recorded with modified sucrose-gap system which is an in-vitro electrophysiological method from these branches

Results: Our data show that LEC administration on damaged nerve did not significantly change CAP's parameters which are CV (CV; Conduction Velocity), amplitude of CAP, depolarization time (DT), latency and half width of CAP ($p>0.05$). However, LEC significantly changed the amplitude of delayed depolarization (del-dep) when occurring after administration of 4- Ap ($p<0.05$).

Conclusion: The data obtained from this study, LEC may be reduce process of WD (Wallerian Degeneration) and accelerate functional recovery effect on remyelination after peripheral nerve injury.

Key words: Peripheral Nerve Injury, Macrophage, Clodronate, Sucrose-gap, Action Potential

Gönderme tarihi / Received: 22.01.2015 Kabul tarihi / Accepted: 13.03.2015

İletişim: Yrd. Doç. Dr. İbrahim Kahraman, Mustafa Kemal Üni. Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Hatay E-posta: ik.kahraman@gmail.com

GİRİŞ

Periferik Sinir Sistemindeki (PSS) sinir hasarları ciddi sağlık sorunlarından biri olmakla beraber hasarlanma sonrası kayda değer rejeneratif kapasite gösterirler. PSS’de sinirlerin hasara uğraması ya da yapının bozulması “periferik nöropati” olarak isimlendirilen olguların ortaya çıkmasına neden olur ve kaçınılmaz olarak aksonun distal kısmında wallerian dejenerasyon (Anterograd dejenerasyon) görülür (1-3). Yaralanma sonrası (sinir ezilmesi-crush, diyabet, bası-travma vb.) hasar görmüş sinir demeti ile yerleşik makrofajlar ve kan yoluyla gelen sistemik makrofajlar arasında aktif iletişim meydana gelir. Makrofajlar ve schwann hücreleri dejenere olan aksonları ve miyelin tabakasını 1-2 hafta içerisinde fagosite ederek ortadan kaldırırlar (4). Makrofajların nöropatilerin oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hem travma hem de hastalığa bağlı olarak ortaya çıkan nöropatiler makrofaj aktivitesi ile ilişkilidir.

Çalışmamızda makrofajlara özgü baskılayıcı bir ajan olan lipozom ile kaplanmış Klodronate’in (LEC: Liposome Encapsulated Clodronate) periferik sinir hasarı sonrası rejenerasyon sürecine etkisinin araştırılması amaçlandı. LEC periferik makrofajların sayısını azaltırken diğer hücreleri etkilememektedir (5).

Daha önce yapılan çalışmalar da LEC’in makrofajları spesifik olarak baskılaması sonucu rejenerasyonun yavaşladığı belirtilmiştir. Ancak çalışmamızda biz tam tersini göstermeye çalıştık. Sistemik olarak hasar bölgesine infiltre olan makrofajlar hasar görmüş sinir liflerini ortadan kaldırmanın yanı sıra halen sağlam olan aksonlara ait miyelin kılıfı da ortadan kaldırmaktadır. Bu çalışmadaki hipotezimiz

spesifik bir ajan kullanarak makrofajları baskılamak ve henüz hasarlanmamış yolakları koruyarak yeni oluşacak akson filizciklerinin bu yollardan ilerlemesini sağlayarak dejenerasyon sürecini dolayısıyla rejenerasyonu öne almaktır (6).

Duyusal sinir liflerinde yapılan çalışmalarda farmakolojik ve kinetik olarak birbirinden farklı olan en az 3 tip Na^+ kanal akımları (hızlı ve yavaş) gösterilmiştir (7-10). 4-Ap hızlı kinetikli voltaj-kapılı K^+ kanallarını spesifik bloklamak için kullanılmaktadır ve 4-Ap etkisinde bırakılan bazı sinirlerde aksiyon potansiyelini (AP) takiben bazı depolarizasyonlar ortaya çıkmaktadır. Daha sonraki çalışmalarda gecikmiş depolarizasyonların nedeninin yavaş kinetikli Na^+ kanallarından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Buna gecikmiş depolarizasyon (delayed depolarisation, del-dep) adı verilmiştir (11-13).

Kinetik olarak hızlı olan 4-Ap duyarlı K^+ kanalları internodal (juxtrapanodal) dağılım gösterirler. Deneysel olarak demiyelinize veya rejenerasyonunu tam olarak henüz tamamlamamış aksonlar üzerine 4-Ap ile yapılan deneyler; 4-Ap’nin AP’nin süresi üzerine etkisinin miyelin tabakanın tekrar oluşmasından sonraki etkisinden çok daha büyük olduğunu göstermiştir (14). Bu bulgu 4-Ap duyarlı ve hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarının internodal lokalizasyon gösterdiği veya miyelin kılıf tarafından örtüldüğünün önemli bir kanıtı sayılmıştır. Özetle söylemek gerekirse, miyelin tabaka oluştuğunda 4-Ap’ye olan duyarlılık azalmaktadır bu da miyelinizasyonun geliştiğinin bir göstergesidir.

Günümüz imkânları ile rejenerasyonun başarısının değerlendirilmesinde, reienervasyonun ölçülmesi ve fonksiyonların

geriye dönmesine göre karar verilir. Morfolojik ve fonksiyonel olarak rejenerasyonun başarısı rejenere-reinnerve olan aksonun sayısı, çapı ve miyelinizasyonun derecesine bağlıdır. Her ne kadar başarılı bir dejenerasyon-rejenerasyon sürecinden sonra distal hedef organla tekrar bağlantı sağlanabilmiş olsa da rejenere olmuş miyelinli sinirler uzun süre anormal özelliklerini devam ettirirler. Başarılı bir reinnervasyondan sonra akson tekrar normal kalınlığına yaklaşır; fakat büyük sinir liflerindeki miyelin kılıfları akson çaplarına göre rölatif olarak ince kalır ve yeni oluşan internodal aralıklar kısadır (15-19).

GEREÇ ve YÖNTEM

Deneylerimizde kullandığımız hayvanlar için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurul onayı (2008-6 No:27) alındı ve hayvanlarla ilgili tüm işlemlerde "Guide for the Care and Use of Animals" kurallarına uyuldu. Sıçanlar standart kafeslerde serbestçe beslendi, gece-gündüz ritmi, ortam 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılarak sağlandı ve ortam sıcaklığı 20-22 °C, rölatif nemi % 40-60 olacak şekilde tutuldu.

1. Deney hayvanı ve kullanılan preparat

Deneylerde 8 haftalıktan büyük Wistar türü erkek ratların siyatik sinir demetleri kullanıldı. Sıçanlar rastgele 5 gruba ayrıldı. A grubu kontrol grubu olarak seçildi. B4 ve B8 grupları ezilme grubu olup, sağ bacak siyatik sinirlerinde forseps ile ezilerek hasar oluşturuldu. C4 ve C8 grupları ise ezilme + LEC uygulanan gruplar olarak seçildi.

2. Deneysel ezilme (crush) modeli

Sıçanlar, intraperitoneal olarak ketamin (80 mg/kg), xylazine (2,5 mg/kg) verilerek anestezi

edildikten sonra, siyatik sinir orta uyluk düzeyinde yaklaşık 1 cm'lik bir kesi ile ortaya çıkarıldı ve siyatik sinir, standart bir forseps kullanılarak 30 saniye süre ile sıkılarak ezildi. Daha sonra, kesi 4,0 ipek sütur kullanılarak kapatıldı. Cerrahi girişim sonrası sıçanlar 4. ve 8. hafta için iyileşmeye bırakıldı.

3. İntravenöz LEC uygulaması

LEC; 10 ml/kg (0,1 mL/10 g) olacak şekilde intravenöz olarak kuyruk veninden sinir hasarını takiben 5. 10. ve 15. günlerde enjekte edildi.

4. Kullanılan Ajanlar ve Çözeltiler

Deneylerde LEC in etkisini daha iyi gözlemlemek için hızlı tip gecikmiş doğrultucu K⁺ kanal blokörü olan 4-Ap kullanıldı, 2 mm 'lük konsantrasyonu, modifiye krebs içerisinde çözüldü ve deneylerde sinire 30 dakika uygulandı.

Kullanılan Krebs, KCl, sukroz çözeltileri deiyonize ve bidistile su ile hazırlandı ve bütün çözeltiler %95 O₂ + %5 CO₂ gaz karışımı ile gazlandırıldı. Tüm deneyler oda sıcaklığında (20-25 °C) yürütüldü.

5. İn-vitro elektrofizyolojik kayıt yöntemi-Sukroz-gap

Deneylerde, bileşik sinir aksiyon potansiyellerinin (BSAP) ölçümünde bir in-vitro elektrofizyolojik teknik olan sukroz-gap tekniği ve sistemi kullanıldı (20). Bu sistem preperatın konulduğu sukroz-gap kutusu, perfüzyon sistemi, agar köprülü Ag/AgCl elektrotlar, yüksek giriş empedanslı amplifikatör, stimülatör, stimulus izolasyon ünitesi, stimülatör programmer ve osiloskoptan oluşmaktadır (**Şekil 1**). Sinirler, 0,05 ms süreli supramaksimal elektriksel pulslar ile uyarılarak BSAP'lar kayıtları. BSAP'ların bilgisayara

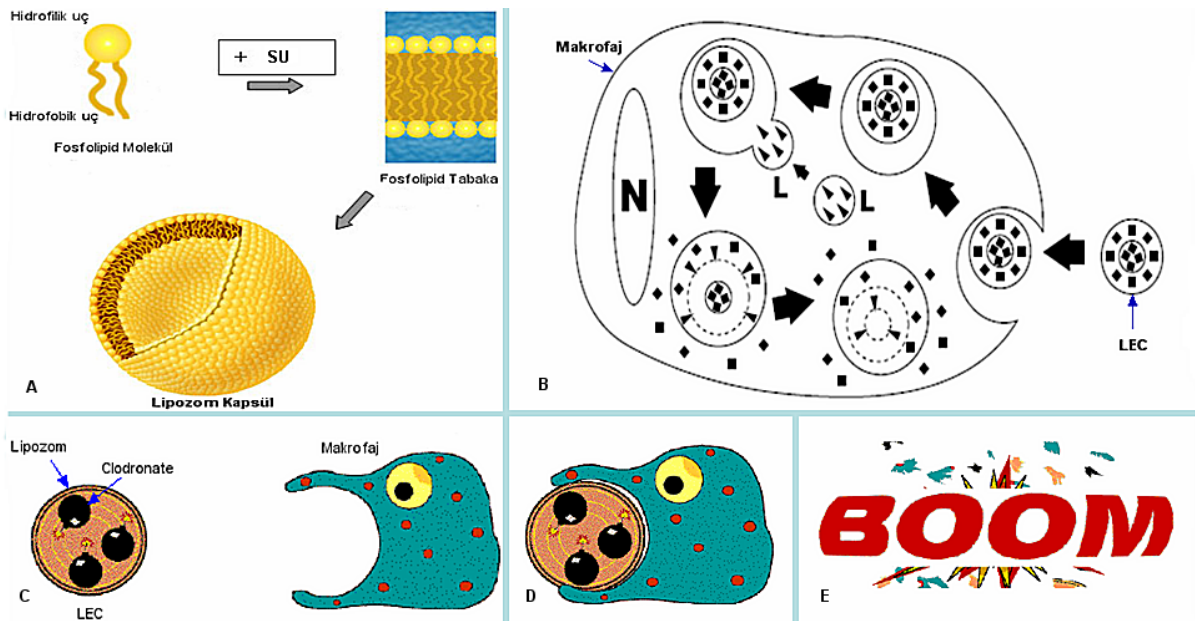
aktarılmasında Biopac MP150 data acquisition sistemi, kayıtların ölçülmesinde ise Acknowledge 3.8.2 yazılımı kullanıldı.

6. LEC ve Spesifik Makrofaj Baskılanması

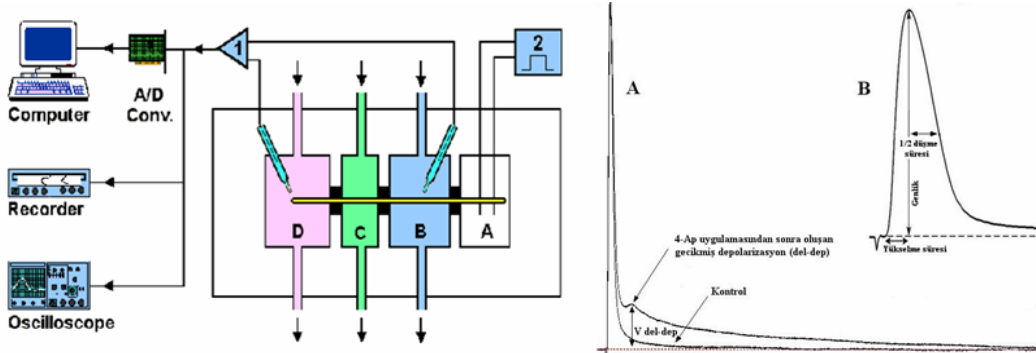
Makrofaj baskılanması klodronate'in lipozomla hücre içine taşınmasının bir sonucudur (Şekil 2).

- Lipozom doğası gereği fagosite edilmeye müsaittir
- Makrofaj tarafından alındıktan sonra, lipozomun fosfolipid tabakası lizozomal fosfolipaz enzimi ile haraplanır.

- Klodronate bu yolla hücre içine salınır ve tekrar hücre dışına çıkamaz ve belli bir intrasellüler seviyeden sonra baskılama yapar.
- Klodronate ölü makrofajlardan ve lipozomlardan çok az sızabilir bu sızanlar tekrar non-fagositik hücre içine giremez ve dolaşımında da çok kalmazlar (yarı ömrü = 10-15 dakika)



Şekil 1. A) Lipozomun oluşumu. B,C,D) Klodronate'in lipozom kapsüle hapsedilmesi ve E) makrofaj tarafından fagosite edilmesi sonucu hücre apoptozisi. LEC'in etki mekanizması. Çizimler <http://www.clodronateliposomes.org/> adresinden alıntıdır.



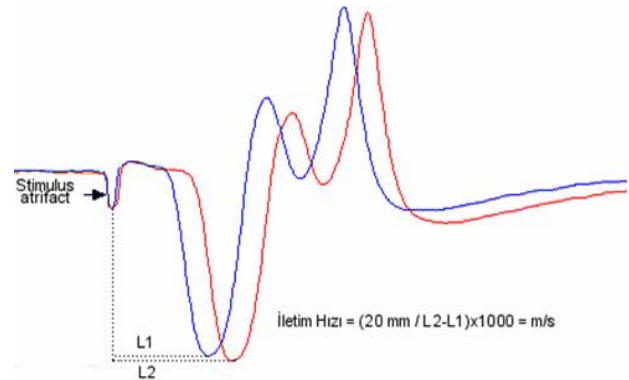
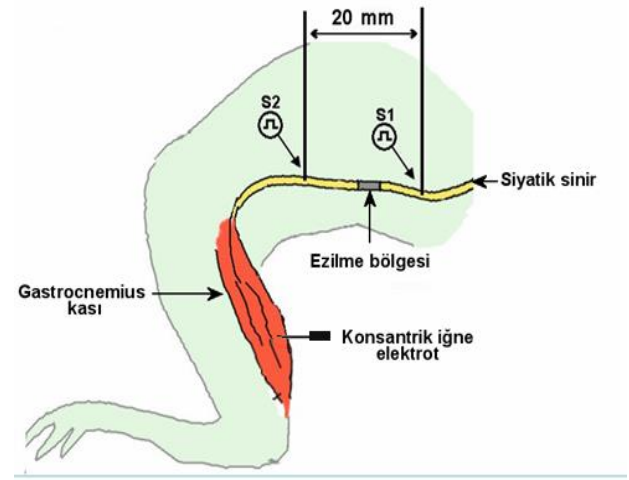
Şekil 2. Sukroz-gap sistemi. Siyatik sinir, sukroz-gap aparatının A,B,C ve D havuzcuklarından geçecek şekilde yerleştirilmektedir.

7. İletim Hızı Ölçümleri

Motor iletim hızını ölçmek için sıçanlar servikal dislokasyonla öldürüldü, hızlı bir şekilde siyatik sinirleri açığa çıkarıldı ve arasında 20 mm lik mesafe bulunan iki uyarı elektrot çifti siyatik sinire yerleştirildi (**Şekil 3**). Biopac MP150-EMG amplifikatör modülü ile gastrocnemius kasına daldırılmış konsantrik iğne elektrot ile kayıtlanan kas aksiyon potansiyelleri bilgisayara aktarıldı ve elektrotlar arası mesafenin latans farkına bölünmesinden iletim hızı hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel hesaplamalar SPSS (vers.10) paket programı kullanılarak yapıldı. Çoklu grup karşılaştırmalarında ve anlamlılık düzeylerinin belirlenmesinde One-Way Anova testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak yazıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi (21).



Şekil 3. İletim hızı ölçüm modeli

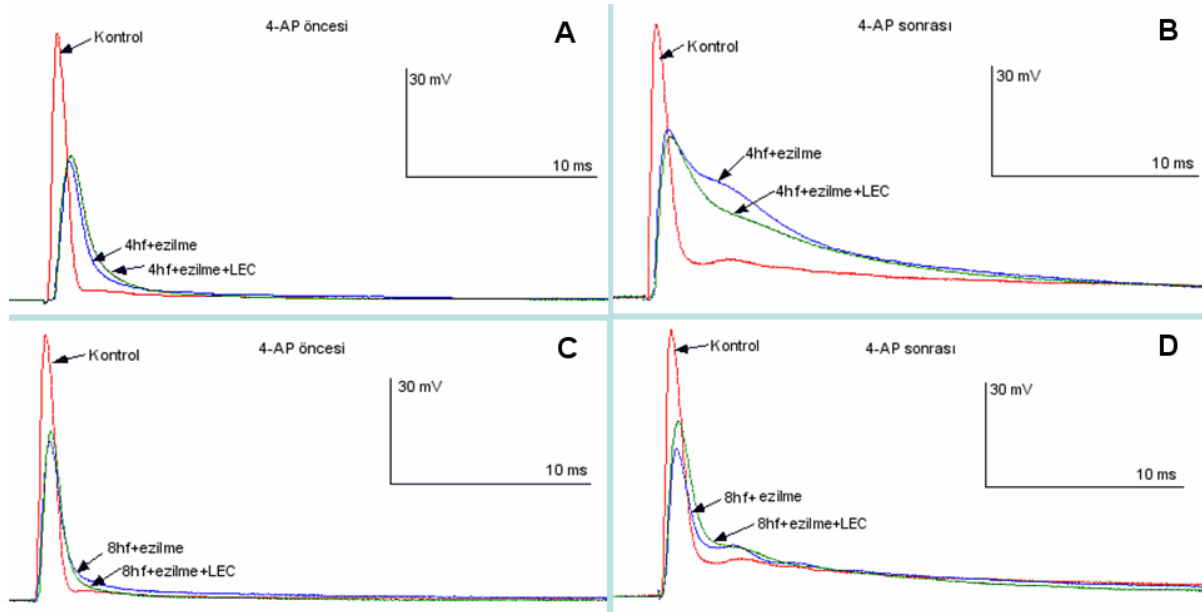
BULGULAR

1-BSAP Bulguları

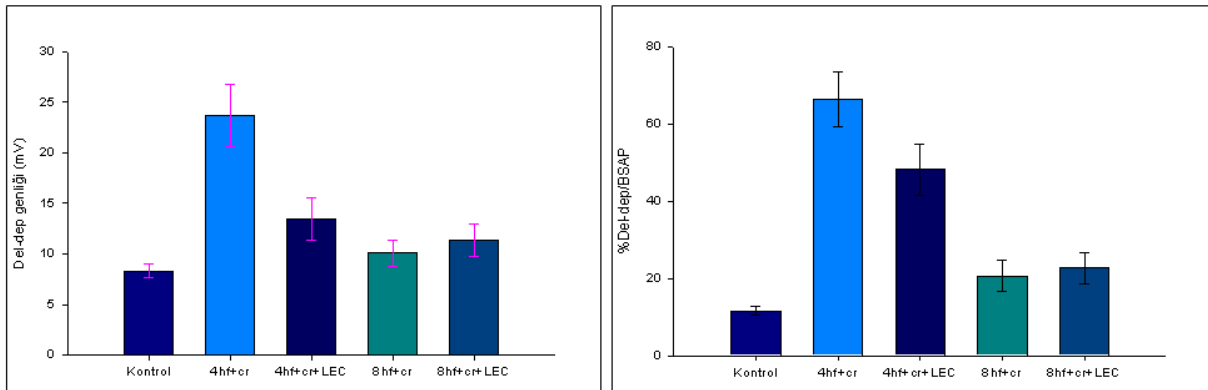
B ve C gruplarında BSAP genliği, yükselme süresi (DT), yarı düşme süresi ($\frac{1}{2}$ FT) ve latans parametreleri üzerine LEC'in anlamlı bir etkisi

görülmedi ($p>0,05$). Aynı şekilde kas aksiyon potansiyelleri aracılığı ile ölçülen motor sinir iletim hızına da bir etkisi gözlenmedi. LEC'in anlamlı etkisi; 4-Ap uygulandıktan sonra oluşan bir fenomen olan gecikmiş depolarizasyon (del-dep) genliği ve bu genliğin BSAP genliğine oranı üzerinde görüldü: LEC uygulanmış C4 grubunda, del-dep potansiyeli ve bunun BSAP'a oranı, LEC uygulanmamış C4 grubunun aynı

parametrelerine göre anlamlı düzeyde düşmektedir (**Şekil 4A-B ve Şekil 5**). Kontrol grubunda del-dep genliği ve BSAP'a oranı sırası ile $8,3 \pm 0,7$; $\%11,6 \pm 1,1$, B grubunda $23,7 \pm 3,1$ ve $\%66,4 \pm 7,2$, C grubunda ise $13,4 \pm 2,1$ ve $\%48,2 \pm 6,7$ idi ($p<0,05$). 8. haftada gruplar arasında küçük farklar olmasına rağmen bunlar istatistiksel olarak anlamsızdı (**Şekil 4C-D**)



Şekil 4. A) 4-Ap öncesi 4. haftaya ait tonik BSAP kayıtları. **B)** 4-Ap uygulaması sonrasında kayıtlanan 4. haftaya ait BSAP ve del-dep genlikleri. LEC'in del-dep genliği üzerine etkisi açıkça görülmektedir. **C)** 4-Ap öncesi 8. haftaya ait tonik BSAP kayıtları. **D)** 4-Ap uygulaması sonrasında kayıtlanan BSAP ve del-dep genlikleri (8. hafta).



Şekil 5. Gruplara ait gecikmiş depolarizasyon genlikleri ve bu genliklerin BSAP oranının bar grafikle gösterilmesi.

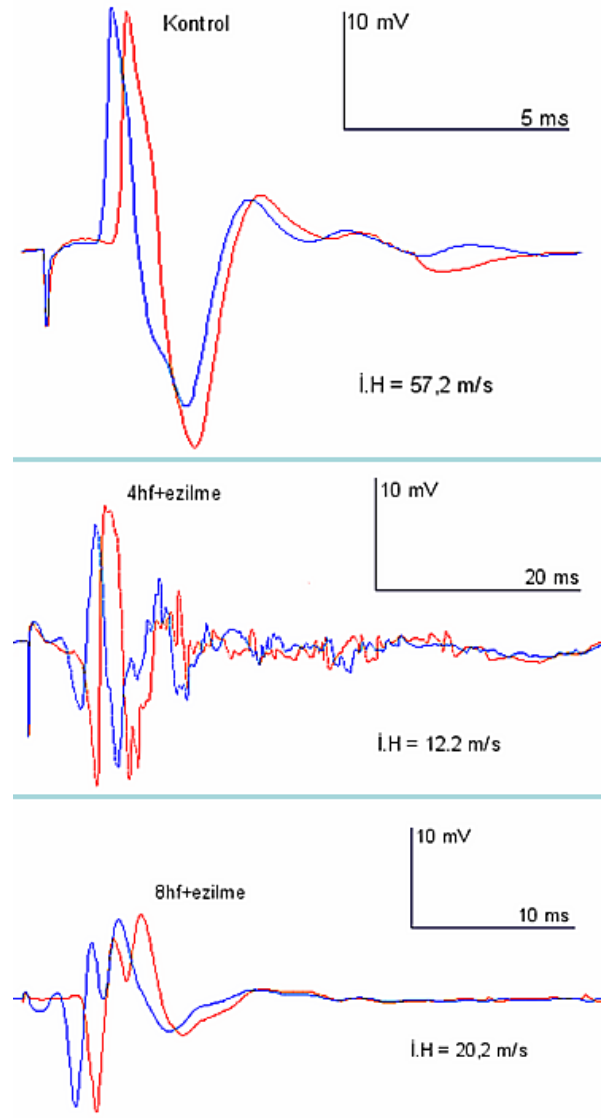
2-EMG Kayıtları

LEC uygulamasının 4. ve 8. haftalarında EMG kayıtlarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 6).

TARTIŞMA

Bilindiği üzere 4-Ap uygulaması hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarını spesifik olarak bloklamaktadır. Daha önce yapmış olduğumuz deneylerde ve literatürde in-vitro yapılan çalışmalarda 4-Ap'nin kutanöz lif içeren sinir demetlerinde ve bunların dorsal kök aksonlarında aksiyon potansiyeli sonrası hump (hörgüç) denen bir gecikmiş depolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (7-11). Gecikmiş depolarizasyon, depolarizasyon sonrası potansiyellerden farklı olup, hızlı K^+ kanallarının 4-Ap ile bloklanması sonrasında yavaş kinetik gösteren Na^+ kanallarının üzerindeki maskenin kalkması ile ortaya çıkmaktadır (7,8-9).

4-Ap ile yapılan çalışmalarda siyatik sinirden kayıtlanan BSAP parametreleri üzerine 4-Ap'nin miyelinizasyon öncesi etkisinin, miyelin tabakanın tekrar oluşmasından sonraki etkisinden daha büyük olduğu ortaya konmuştur ve bu bulgular 4-Ap duyarlı K^+ kanallarının internodal bölgede yoğunlaştığının bir kanıtı sayılmıştır. Hasar sonrası miyelinizasyonun tamamlanmasının ardından sinir 4-Ap'ye daha az duyarlı hale gelir.



Şekil 6. 4 ve 8 haftalık ezilme gruplarında iletim hızı düştü ve ortaya polifazik EMG kayıtları.

Bu miyelinizasyonla hızlı K^+ kanallarının, miyelin kılıf ile kaplanan internodal bölgeye toplandığının (lokalize olduğunun) bir işaretidir. Bu yüzden gecikmiş depolarizasyon genliği ve bunun BSAP genliğine oranı miyelinizasyonla ilgili bilgi vermektedir bir başka ifade ile bu oran rejenerasyonun gelişmesi ile küçülmektedir (10-14-19).

4-Ap uygulaması ile ortaya çıkan gecikmiş depolarizasyonun genliğinin ve bu değer BAP genliğine oranının LEC grubunda diğer gruplara göre daha düşük çıkması; LEC uygulamasının miyelin

yapının oluşumunu hızlandırdığını ya da makrofaj baskılaması sonucu sağlam yolakların korunduğunu gösterebilir. Başka bir deyişle; 4-Ap spesifik olarak blokladığı hızlı kinetik gösteren K^+ kanalları miyelin tabakası tarafından örtülü durumdadır. Miyelin yapıda wallerian dejenerasyona bağlı meydana gelebilecek herhangi bir hasarlanma veya bozukluk 4-Ap'nin etkisini doğal olarak arttıracaktır. Bu durumda çok daha fazla hızlı K^+ kanalı 4-Ap tarafından blokaja uğrayacak ve yavaş Na^+ akımlarına bağlı gecikmiş depolarizasyon daha belirgin ve yüksek genlikte karşımıza çıkacaktır. Ancak LEC'e maruz bırakılan grupta tam aksi bir durum görülmektedir.

Literatürde periferik nöropati sonrası makrofajların rollerini belirlemek için yapılan çalışmalarda; makrofajların hasar sonrası miyelin tabakasının ortadan kaldırılmasında görev aldığı gösterilmiştir (3-6). Makrofajlar sistemik LEC uygulaması ile baskılandığında miyelin yıkımı durdurulabilir veya

yavaşlatılabilir. Böylece dejeneratif süreç engellenebilir veya oldukça yavaşlatılabilir ve rejeneratif süreç biraz daha öne çekilebilir veya hızlanabilir.

4. hafta ezilme+LEC grubunda, ilaç uygulaması yapılmayan ezilme grubuna göre gecikmiş depolarizasyon genliğini ve bu genliğin BSAP'a oranının düşmesi ilgi çekici bir bulgudur. Elde ettiğimiz bulgular ışığında LEC'in yaralanma sonrası ortaya çıkan Wallerian dejenerasyon sürecini kısalttığı ve rejeneratif bir etki olarak da miyelinizasyonu hızlandırdığı söylenebilir. Ancak bu bulguların daha spesifik başka yöntemler ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalınca yürütülen 106S220 no'lu (SBAG-3468) Tubitak Projesiyle desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*, 25: 101-121, 1996
2. Garbaya B, Heapeç A.M, Sargueila F, Cassagnea C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61: 267-304, 2000.
3. Bruck W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Path*, 7: 741-752, 1997
4. Perry VH, Brown MC. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *Bioassays*, 14: 401-406, 1992
5. Van Rooijen N, van Kesteren-Hendriks. "In vivo" depletion of macrophages by liposome-mediated "suicide". *Methods Enzymol*. 2003;373:3-16.
6. Van Rooijen N., Sanders A., Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications, *J. Immunol. Methods*, 174, 83-93, (1994).
7. Mustafa GÜVEN, İbrahim KAHRAMAN, Filiz KOÇ, Hacer BOZDEMİR, Yakup SARICA, İsmail GÜNAY. The Effects of Oxcarbazepine on 4-Aminopyridine-Induced Afterpotentials on Isolated Rat Sural Nerves. *Journal of Neurological Sciences [Turk]* 2010;27:(2): 139-149.
8. Guven M, Kahraman I, Güneş Y, Gunay I.: Effect of Tramadol on peripheral nerves: An in-vitro electrophysiological study on the sural and tibial nerves of the rat. *Journal of Medical Science (Türkiye Klinikleri)*. 2011;31(1).
9. Waxman SG, Ritchie JM: Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol* 1993;33:121-136.
10. Rizzo MA, Kocsis JD, Waxman SG. Slow sodium conductances of dorsal root ganglion neurons: intraneuronal homogeneity and interneuronal heterogeneity. *J Neurophysiol*. 1994 Dec;72(6):2796-815.
11. Honmou, O., Utschneider, D.A., Rizzo, M.A., Bowe, C.M., Waxman, S.G., Kocsis, J.D.,. Delayed depolarization and slow sodium currents in cutaneous afferents. *J. Neurophysiol*. 1994;71:1627–1637.
12. Nonaka T, Honmou O, Sakai J, Hashi K, Kocsis JD. Excitability changes of dorsal root axons following nerve injury: implications for injury-induced changes in axonal Na⁺ channels. *Brain Research*. 2000;859:280-285.
13. Kocsis JD and Waxman SG. Ionic channel organization of normal and regenerating mammalian axons. *Progress in Brain Research*. Vol. 71. 1987.
14. Black, J.A., Kocsis, J.D., Waxman, S.G., 1990. Ion channel organization of the myelinated fiber. *Trends Neurosci*. 133, 48 – 54.
15. Marco Mumenthaler, Manfred Stöhr, Hermann Müller-Vahl. Nobel Tıp Yayınları, Çeviri. Periferik Sinir Lezyonları ve Radiküler Sendromlar. 2005: 1-95.
16. Bilimsel ve Teknik Yayınları Vakfı. Periferik Nöropati. 1995: 17-36.
17. Gordon TR, Kocsis JD and Waxman SG. TEA-sensitive Potassium channels and inward rectification in regenerated rat sciatic nerve. *Muscle and nerve*, 1991; 14: 640-646.
18. Eng DL, Gordon TR, Kocsis JD and Waxman SG. Current clamp analysis of time-dependent rectification in rat optic nerve. *J. Physiol*, 1990; 421: 185-202
19. J. P. Ballantyne and M. J. Campbell. Electrophysiological study after surgical repair of sectioned human peripheral nerves. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1973, 36, 797-805
20. Stampfli R.: A new method for measuring potentials with external electrodes. *Experienta*, 1954;10:508-509.