

**Tengerimalacból izolált I. típusú ganglion spirale neuronok
elektrofiziológiai jellemzése**

Dr. Szabó Zsolt

**Témavezetők: Prof. Dr. Sziklai István
Dr. Rusznák Zoltán**

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2. oldal
1. Bevezetés, célkitűzések	
1.1. A hallópályák felépítése	3. oldal
1.2. A szőrsejtek funkciója, működésük szabályozása (afferens és efferens kapcsolataik)	4. oldal
1.3. Az ingerlékeny membránok sajátosságait meghatározó legfontosabb ionáramok rövid áttekintése	5. oldal
1.4. A ganglion spirale neuronok funkcionális jellemzése	9. oldal
1.5. A ganglion spirale neuronok elektrofiziológiai tulajdonságainak jelentősége a cochlearis implantáció tervezésében	12. oldal
1.6. Célkitűzések	13. oldal
2. Módszerek	
2.1. Kísérleti állatok, a preparálás főbb lépései	14. oldal
2.2. Az alkalmazott oldatok	14. oldal
2.3. Elektrofiziológiai mérések	15. oldal
2.4. Immuncitokémia	16. oldal
3. Eredmények	
3.1. A ganglion spirale preparálása, a neuronok izolálása, az I. és II. típusú ganglionsejtek azonosítása	17. oldal
3.1.1. A preparálás lépései	17. oldal
3.1.2. A ganglion spirale neuronok izolálása az elektrofiziológiai mérésekhez	19. oldal
3.1.3. Immuncitokémiai azonosítás	21. oldal
3.1.4. Az I. típusú ganglion spirale neuronok elektrofiziológiai jellemzői	23. oldal
3.2. Hiperpolarizáció hatására aktiválódó áram elemzése I. típusú ganglion spirale neuronokon	23. oldal
3.3. Depolarizáció hatására aktiválódó áramok jellemzése és farmakológiai szeparálása I. típusú ganglion spirale neuronokon	27. oldal
4. Megbeszélés	
4.1. Ganglion spirale neuronok izolálása	33. oldal
4.2. Az I. típusú ganglion spirale neuronok ionáramai	35. oldal
4.3. Az eredmények gyakorlati jelentősége	38. oldal
A tézisekben előforduló hivatkozások jegyzéke	40. oldal
Összefoglalás	45. oldal
Köszönetnyilvánítás	47. oldal
A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke	49. oldal

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A hallópálya felépítése

A hallórendszer az idegrendszer azon része, amely a nyomáshullámok formájában érkező hangingereket elektromos jelekké, majd ezeket az elektromos impulzusokat hangéretté alakítja. A hallórendszer egyik legfontosabb perifériás eleme a belsőfül részét képező csiga (cochlea), benne a Corti-féle szervvel és az elsődleges érzőneuronokkal. Az emlős fülre jellemző az éles frekvenciakódolás, alacsony ingerküszöb és széles frekvenciatartomány, mely a speciálisan kialakult Corti-féle szervnek, illetve bizonyos reguláló mechanizmusoknak tulajdonítható. A ma elfogadott elképzelés szerint a hanghullámokat a középfül felerősíti és továbbítja a belsőfül folyadéktartóira, ahol a kialakuló hullámok a membrana basilaris egy adott, a hanginger frekvenciája által meghatározott területén lévő receptorsejteket hoznak ingerületbe. A receptorsejtek ingerületi állapota olyan membránpotenciál-változás (depolarizáció), amely szinaptikus kapcsolat révén akciós potenciálokat generál a receptorsejteket beidegző afferens idegrostokban. E rostok a ganglion spirale neuronjainak perifériás nyúlványai.

A csiga járata a modiolus körül tekeredik, utóbbi tartalmazza a ganglion spirale sejtszomsorait és az azokból kilépő idegrostkötegeket. A ganglionáris idegsejtek centrális nyúlványaiból (axonjaiból) szedődik össze a hallóideg (nervus cochlearis). A hallóideg a nucleus cochlearis ventralis magasságában lép be a nyúltvelőbe, ahol elágazódik, majd a rostok a nucleus cochlearis dorsalisba és a nucleus cochlearis ventralisba tartanak. A cochlearis magcsoport idegsejtjei a hallópálya másodlagos érzőneuronjai, a belőlük induló axonok részben azonos oldalon, részben kereszteződés után az ellenoldalon haladnak a harmadlagos érzőneuronokat tartalmazó területekhez (corpus trapezoideum, oliva superior), majd (itt nem részletezett további állomásokon keresztül) a hallókéreghez. Fontos hangsúlyozni, hogy a hallási ingerület fenti útvonalon való terjedése során mindvégig megőrzi a cochleában kialakult tonotópiás rendeződést. A hallókéreg működése szükséges a komplex hangingerek analizálásához és hangélménnyé alakításához. A rendelkezésre álló adatok szerint a fenti séma alapján véve valamennyi emlősfaj esetében azonos, beleértve az embert is (Fay és munkatársai, 1994). Különbségek természetesen kimutathatók, elég csak arra a tényre utalni, hogy nagy eltérések vannak az egyes fajok között az érzékelhető hangfrekvencia

tekintetében. Ezzel együtt az állatkísérletekben (elsősorban rágcsálókban, denevéreken és macskán) kapott adatok jól alkalmazhatók más specierekre is. Megemlítendő továbbá, hogy a halláskutatók gyakran alkalmaznak különféle madárfajokat vizsgálataikban. A madarakban a másodlagos érzőneuronok helye a nucleus magnocellularis (amely elsősorban az emlős nucleus cochlearis ventralis analógja). A harmadlagos érzőneuronok leggyakrabban tanulmányozott lokalizációja a nucleus lateralis vagy emlősök esetén a nucleus corporis trapezoidi (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák és munkatársai, 2000).

A hanginger ingerületi folyamattá történő kódolásának két döntő lépése a receptorsejtek, valamint a ganglion spirale neuronok aktiválódása. Jelen értekezés témája az utóbbi jelenség, ezért a továbbiakban az erre és az ezt megelőző lépésre vonatkozó ismereteket tekintem át.

1.2. A szőrsejtek funkciója, működésük szabályozása (afferens és efferens kapcsolataik)

Az emlősök hallórendszere 16 (elefánt) és 123000 Hz (kékbálna) közötti tartományban képes a hanginger dekódolására. Ez a tevékenység egy specializálódott receptorsejt-féleség, a szőrsejtek működéséhez kötött. Kétféle szőrsejtet különböztetünk meg; egy döntően szenzoros jellegű belső, valamint egy elsősorban hangoló és erősítő funkciójú külső szőrsejt populációt.

Spoendlin 1969-ben kidolgozott modellje írta le a külső és belső szőrsejtek beidegzési mintázatát és működését emlősökben, többek között emberben is. A humán cochleában kb. 3500 belső szőrsejthez mintegy 20000 sensoros beidegzést biztosító (afferens) idegrost fut. A belső szőrsejtekhez kapcsolódó idegrostok a ganglion spirale I. típusú sejtjeitől származnak, erre a kapcsolatra tehát a divergencia jellemző. A belső szőrsejtek ingerküszöbét meghaladó stimulust követően az intracellularis Ca^{2+} -koncentráció növekedése ($[Ca^{2+}]_i$) a szőrsejt basalis részén található szinaptikus vesiculumok exocitosisát váltja ki (Hudspeth, 1985). A felszabaduló glutamát a szenzoros idegvégződésben létrehozza az akciós potenciált. A külső szőrsejtekben az ingerületi folyamat következményeként egy rövidülés – megnyúlás válasz tűnik kiemelkedő jelentőségűnek, amely valószínűleg módosítja a membrana basilaris és membrana tectoria mechanikai impedanciáját, ennél fogva a hanginger hatására bekövetkező egymáshoz képesti elmozdulásukat, ami végsősoron a belső szőrsejtek

érzékenységet módosítja (Dallos és munkatársai, 1982). A jelenség kialakulása során a külső szőrsejtek egy meghatározott populációja (kb. 150-300 szőrsejt), amely egy adott frekvenciájú hangingerre megnyúlik és megrövidül, a membrana basilaris adott, jól körülírt (mintegy 1,2 μm széles) szakaszát nagy amplitúdójú kitérésre kényszeríti (Ashmore, 2002). A külső szőrsejtek által jelentősen felerősített membrana basilaris rezgések ezáltal fokozzák az ugyanazon lokalizációjú belső szőrsejtek inger bevitelének mértékét, ami lehetővé teszi az emlős cochleára jellegzetes, igen éles frekvenciadiszkriminációt és alacsony küszöbérzékenységet. Mindamellet a külső szőrsejtek is rendelkeznek szenzoros funkcióval, a kb. 20000 receptorsejtnek mintegy 1000 ganglion spirale neuronnal van kapcsolata, azaz egyetlen afferens idegrost kb. 20 külső szőrsejttől kap információt (konvergencia; Spoendlin és Schrott, 1989). A külső szőrsejtekhez kapcsolódó, afferens ganglion spirale neuronokat II. típusú sejtként ismeri az irodalom.

A szőrsejtek és a centrális idegrendszeri területek kapcsolatában az afferens pályával ellenirányban haladó, azaz efferens pályarendszer is ismeretes, az ún. olivocochlearis nyáláb, amely az ellenoldali oliva superior magjából indul ki (Gitter és Preyer, 1991). A nyálábon belül két rész különíthető el; a medialis pálya nagy része keresztezett és a külső szőrsejtek efferenciáját biztosítja, ezzel szemben a lateralis rendszer kis része keresztezett, és a belső szőrsejtek beidegzéséért felelős. Jelen ismereteink szerint tehát a belső szőrsejtek döntően afferens, a külső szőrsejtek pedig dominánsan efferens beidegzést kapnak.

1.3. Az ingerlékeny membránok sajátosságait meghatározó legfontosabb ionáramok rövid áttekintése

Az ingerlékeny sejtek közös sajátossága, hogy elegendően erős, az ingerküszöbüket meghaladó stimulusok hatására membránpotenciáljuk jellegzetes módon és átmenetileg megváltozik. Ezen, akciós potenciálnak nevezett jelenség során a membrán előbb depolarizálódik, a membránpotenciál rövidebb időre elérheti vagy meghaladhatja a 0 mV-ot, majd visszatér a nyugalmi membránpotenciál értékére (repolarizáció). Hodgkin és Huxley ma már korszakalkotónak tekintett munkája óta ismert (Hodgkin és Huxley, 1952), hogy az akciós potenciálok kialakulásának hátterében leggyakrabban a sejtmembrán Na^+ - és K^+ -vezetőképességének átmeneti megváltozása áll, amit a sejt felszíni membránban

elhelyezkedő transzmembrán fehérjestruktúrák, az ún. ioncsatornák aktivitása biztosít.

Az ioncsatornák vezető (konduktív) vagy nem vezető (nem-konduktív) állapotban lehetnek, amelyek között az átmenetet a csatornafehérje konformációjának megváltozása biztosítja (kapuzás). A kapuzó mechanizmus aktiválását előidézheti a membránpotenciál változása (feszültségvezérelt ioncsatornák), valamilyen kémiai anyag bekötődése vagy leválása a csatornamolekuláról (ligandvezérelt ioncsatornák), esetleg a membrán mechanikai feszítettségének módosulása (mechanoszenzitív ioncsatornák). Az ingerlékeny sejtek akciós potenciáljának kialakításában a feszültségvezérelt ioncsatornák bírnak kiemelkedő jelentőséggel. Függetlenül attól, hogy az egyes ioncsatornák mely ionokra mutatnak kiemelt permeabilitást, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} - és Cl^- -csatornák különböztethetők meg.

A molekuláris biológiai vizsgálatok eredményei megmutatták, hogy valamennyi kationcsatorna struktúrája igen hasonlatos. Ezek a molekulák tetramer szerkezetűek, amelyek vagy kovalensen (Na^+ - és Ca^{2+} -csatornák) vagy nem-kovalens kötással (K^+ -csatornák) kapcsolódnak egymáshoz. Az egyes alegységek 6 transzmembrán doménnal rendelkeznek, amelyek közül kiemelkedő jelentősége van a negyediknek (S4); ugyanis jelen tudásunk szerint ez a rész az ioncsatornák feszültségérzékelő eleme. Különösen fontosnak tűnik még az S5 és az S6 domén közötti, a membránba kívülről mélyen behatoló, de azt át nem érő hurok (M5), ami az ioncsatorna pórusának kialakításában vesz részt. Az egyes kationcsatornák szerkezeti hasonlósága, valamint az aminosav sorrendjükben tapasztalható részleges azonosság felveti annak lehetőségét, hogy valamennyi ismert kationcsatorna egyetlen őscsatornából származtatható.

A fenti, specifikus (szelektív) kationcsatornák mellett ismertek még az ún. nem-specifikus kationcsatornák, melyek nem differenciálnak a Na^+ és K^+ között, sőt esetenként még a Ca^{2+} -permeabilitásuk is jelentős lehet. Kiemelkedően fontos tagja ezen csatornaféleségnek a nodus sinuatrialis spontán ingerképzésében elengedhetetlenül fontos hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationcsatorna, melynek neuronokon is fellelhető változata h-csatorna néven ismeretes.

Az egyes feszültségvezérelt ioncsatornák különböző feladatot látnak el az ingerlékeny sejtek működésében. Míg a Na^+ -csatornák leggyakrabban az akciós potenciálok depolarizációs fázisának kialakításáért felelősek, így gyakorlatilag csak a membránpotenciált megváltoztató, ún. elektrogén funkciójuk van, addig a Ca^{2+} -csatornák esetében a helyzet sokkal változatosabb.

A sejtfelszíni Ca^{2+} -csatornák megnyílása után az extracelluláris Ca-ionok a citoplazmába áramlanak, ami részben depolarizálja a membránt (elektrogén hatás), részben megnöveli az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, ami számos Ca^{2+} -függő folyamat (motilitás, exocytosis, kapuzás, enzimaktivitás, stb.) módosulását vonja maga után (regulatórikus funkció). A Ca^{2+} -csatornák ezen igen szerteágazó funkcionális jelentőségének ismeretében nem teljesen meglepő, hogy a Ca^{2+} -csatornák számos altípusa különböztethető meg. Ezen struktúrák egy része már csekély mértékű depolarizáció hatására is aktiválódik (low-voltage-activated [LVA] Ca^{2+} -csatornák), míg más típusok aktiválása erőteljesebb depolarizációt igényel (high-voltage-activated [HVA] Ca^{2+} -csatornák). Míg az LVA csoport csak az ún. T-típusú Ca^{2+} -csatornát tartalmazza, addig a HVA Ca^{2+} -csatornák sorába tartoznak az N-, P-, Q-, L- és R-csatornák, melyek lokalizációjukban, elektrofiziológiai sajátosságaikban, gátlószer-érzékenységükben és funkcióikban egyaránt különböznek egymástól (lásd pl. Brevi és munkatársai, 2001).

Szemben a Na^+ - és Ca^{2+} -csatornákkal, amelyek aktiválódása szükségképpen a sejtmembrán depolarizációjával, azaz (legalábbis átmenetileg) a membrán ingerlékenységének fokozódásával jár, a K^+ -csatornák megnyílása a pillanatnyi membránpotenciált a nyugalminál negatívabb értékek felé mozdítja, azaz (a membrán „előéletétől” függően) hiper- vagy repolarizálja azt, esetleg nem engedi a depolarizáció kialakulását. Mindezek alapján megállapítható, hogy a K^+ -csatornák aktiválódása (bizonyos ritka kivételektől eltekintve) a sejtmembrán ingerlékenységének csökkenését okozza. A K^+ -csatornákat célzó intenzív kutatások rámutattak, hogy egy különlegesen változatos csatornacsaládról van szó (Pongs és munkatársai, 1999).

A K^+ -csatornákon folyó áramok legrégebben ismert fajtája az ún. késői típusú (delayed rectifier) K^+ áram (I_K), amit elsőként Hodgkin és Huxley (1952) azonosítottak klasszikus, a tintahal óriásaxonját érintő kísérleteikben. Ez a csatornaféleség a nyugalmi membránpotenciál értékén zárt állapotban van, majd az akciós potenciál depolarizációs fázisa során aktiválódik, így létrehozva az akciós potenciál leszálló szárát. Az I_K elengedhetetlen a gyors repolarizáció, és így a rövid akciós potenciálok kialakításában, ezáltal kiemelkedő jelentőségű a nagy frekvenciájú akcióspotenciálsorozatok tüzelésének képességében. Farmakológiai vizsgálatok igazolták, hogy tetra-etil-ammónium (TEA^+) alkalmazásával ezen áramféleség jól, bár nem teljesen specifikusan gátolható (Stanfield, 1983; Apkon és Nerbonne, 1991). Bár a késői típusú K^+ -áram elengedhetetlen az akciós potenciálok utáni gyors repolarizációs fázis kialakításáért, lassú deaktivációja miatt ez az áramféleség önmagában nem tenné

lehetővé a hű frekvenciakódolást. Jelen tudásunk szerint a frekvenciakódolás képessége az ún. tranziens K^+ -áram (I_A) jelenlététől és aktivációjától függ. Mivel ezen csatornák túlnyomó többsége a nyugalmi membránpotenciál értékén inaktivált állapotban van, az aktiváció csak egy, a depolarizációt megelőző hiperpolarizációs fázist követő depolarizáció után következhet be. A tranziens K^+ -áram klasszikusnak mondható ám nem különösebben specifikus gátlószere a 4-aminopiridin (Ito és Maeno, 1986).

A feszültségvezérelt K^+ -csatornák különleges családját képezik az ún. alacsonyküszöbű (low-threshold) K^+ -csatornák, melyek már a nyugalmi membránpotenciálról történő 5-10 mV-os depolarizáció hatására is aktiválódnak, inaktivációjuk pedig lassú és részleges. Specifikus kutatások rámutattak, hogy csak meghatározott K^+ -csatorna-alegységek ($Kv1.1$, 1.2 és 1.6) képesek olyan homo- vagy heterotetramer struktúrákat létrehozni, amelyek a fenti jellegzetességekkel rendelkeznek (Browne és munkatársai, 1994, Zhou és munkatársai, 2001). A csatornák által létrehozott áram alapvető jelentőségűnek tűnik egyes neuronális struktúrák esetében az időben precíz jeltovábbítás kialakításához. Ismeretes, hogy az ún. kapcsolóneuronok (pl. a nucleus cochlearis ventralis bushy-sejtjei vagy a nucleus corporis trapezoidi fősejtjei) képesek az őket elérő nagyfrekvenciájú akcióspotenciál-sorozat időben hű reprodukciójára, azaz az 1:1 arányú akcióspotenciál-csatolásra. Abban az esetben viszont, ha az alacsonyküszöbű K^+ -csatornák specifikus gátlószereát alkalmazták (Dendrotoxin-I [DTX-I]), az említett neuronok „tévesztettek”, azaz a nagyfrekvenciás jeltovábbítás során nem voltak képesek a szigorú 1:1 arányú csatolásra (Brew és Forsythe, 1995).

Az ingerlékeny sejtek membránsajátságait meghatározó K^+ -csatornák közül (a részletek tárgyalása nélkül) említésre érdemes még a Ca^{2+} -érzékeny K^+ -áram, az ATP-érzékeny K^+ -áram és az acetilkolin- (illetve muszkarin-) érzékeny M-áram. Szemben az eddig említett áramfélésekkel, melyek legtöbbször depolarizációt igényelt aktivációjához, léteznek olyan csatornatípusok is, melyek aktiválását a sejtmembrán hiperpolarizációja váltja ki. 1949. óta ismert, hogy bizonyos sejtek hiperpolarizáció hatására a membránkonduktancia növekedésével reagálnak (Katz, 1949). A jelenség, amelyet elsőként harántcsíkolt izomrostokban írtak le, ma a “klasszikus” befelé egyenirányítás (inward rectification) nevet viseli, és a sejtmembrán befelé egyenirányító K^+ -csatornáinak jelenlétéhez és aktiválódásához köthető. Ezzel szemben, bizonyos szövetek egy ettől különböző, de ugyancsak hiperpolarizáció hatására aktiválódó áramféléssel bírnak, amit gyakran (elsősorban neuronokon) h-áram névvel illetnek, és amit elsőként fotoreceptorokban (Attwell és Wilson, 1980) és a szívben demonstráltak

(Brown és munkatársai, 1980; DiFrancesco, 1993). Szemben az inward rectifier csatornákkal, a h-áram kialakulásáért felelős ioncsatornák mind K^+ -ra, mind Na^+ -ra permeábilisak, így aktiválódásuk egy kevert kationáram kialakulását okozza, ami végső soron a sejtmembrán depolarizációját okozza (mivel a csatorna hiperpolarizáció hatására létrejövő aktiválódása kevert kationáram kialakulásához, így végsősoron a membrán depolarizációjához vezet, gyakorta említik ezt az áramot “csalafinta” áram [funny current] néven).

A h-áram jelenlétét több fontos funkcióval hozták már összefüggésbe. A h-áram hozzájárulhat a nyugalmi membránpotenciál pillanatnyi értékének kialakításához (Maccaferri és munkatársai, 1993), növelheti a sejtmembrán időkonstansát (gyorsabbá, reaktívabbá téve azt), valamint megakadályozhatja az ezen csatornákat expresszázó sejtfeleségek hosszantartó gátlását (Luo és Perkel, 1999). A h-áram egy különösen fontos (és talán legismertebb) funkciója, hogy az őket expresszázó sejtek gyakorta (bár nem mindig) spontán aktivitással rendelkeznek (Bal és McCormick, 1997; McCormick és Pape, 1990).

1.4. A ganglion spirale neuronok funkcionális jellemzése

A ganglion spirale alkotó neuronok morfológiai és funkcionális sajátosságaik alapján két fő típusba oszthatók. A sejtek túlnyomó többségét alkotó (> 95 %) I. típusú neuronok kissé elnyújtott sejttestjének átmérője $12\ \mu\text{m}$ -nél nagyobb, a sejttest és a nyúlványok vaskos velőshüvellyel rendelkeznek. Az I. típusú neuronoknál lényegesen ritkábban előforduló II. típusú ganglion spirale sejtek kisebbek ($< 12\ \mu\text{m}$), sejttestjük alakja inkább kerekded, myelinborításuk nincs. Jelen ismereteink szerint az I. típusú sejtek a belső, míg a II. típusú ganglion spirale neuronok a külső szőrsejtek afferens beidegzéséért felelősek.

Valószínűleg a II. típusú neuronok igen kis száma okolható azért, hogy a rendelkezésre álló funkcionális adatok szinte kizárólag az I. típusú sejtről származnak. Elektrofiziológiai mérések alapján ismert, hogy a legtöbb I. típusú ganglion spirale neuron gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-mintázatot produkál, azaz a sejtek a folyamatosan fenntartott depolarizáló stimulus hatására csupán néhány akciós potenciált tüzelnek, jellemzően a stimulus kezdetén (Mo és Davis, 1997). Az is bebizonyosodott, hogy a vizsgált, morfológiailag I. típusúként klasszifikálható sejtek kb. 15 %-a a fentitől eltérő, lassan adaptálódó választ produkált

(Mo és Davis, 1997), ami felvetette annak lehetőségét, hogy (legalábbis funkcionálisan) az addig egységesnek hitt sejtpopuláció esetleg további altípusokra osztható.

Annak érdekében, hogy az I. típusú sejtek aktivitási mintázatát meghatározó ionáramok leírásra kerüljenek, a laboratóriumok túlnyomó többsége egérből, patkányból, tengerimalacból vagy csirkéből izolált neuronokat alkalmaz a kutatásokhoz. Mivel az elektrofiziológiai vizsgálatok gyakorlatilag mindegyike I. típusú ganglion spirale neuronokon történt, a jelen értekezés további részében a „ganglion spirale neuron” terminus minden esetben az I. típusú sejtekre vonatkozik.

Az első konkrét elektrofiziológiai adatok tengerimalacból izolált ganglion spirale neuronokról származnak (Santos-Sacchi, 1993). A sejtek -67 mV-os nyugalmi membránpotenciállal rendelkeztek, kapacitásuk kb. 10 pF volt. A mérések megmutatták, hogy ezek a neuronok spontán akciós potenciálok tüzelésére nem képesek, Na⁺-áramaik (valószínűleg az enzimbehatás és az azt követő mechanikai agitáció következményeként) gyakorta hiányoztak. Az ionáramok leírását célzó kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy ezen sejtek rendelkeznek egy lassan aktiválódó, inaktivációt nem mutató K⁺-árammal, ami mind TEA-, mind Gd-ion alkalmazásával gátolható volt. Ugyancsak tengerimalac neuronokat vizsgáltak Harada és munkatársai (1994) és megállapították, hogy extracelluláris glutamát alkalmazásával [Ca²⁺]_i-változások (Ca²⁺-tranziensek) voltak kiválthatók, amennyiben a sejtek a nyúlványrendszerük egy részét az izolálás során megőrizték. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a ganglion spirale sejtek rendelkeznek ionotróp glutamát receptorokkal, amelyek elsősorban a sejtek nyúlványain helyezkednek el. Hasonló megállapításra jutottak Shimozono és munkatársai (1995), azzal a kiegészítéssel, hogy az enzimatisz izolálás végeztével a tengerimalac ganglion spirale neuronok felszínén elsősorban a nem-NMDA típusú (AMPA) glutamát receptorok voltak megfigyelhetők. Említett szerzők felvetették annak lehetőségét, hogy az NMDA-receptorok fiziológiás körülmények között jelen lehetnek, csak áldozatául estek az enzimkezelésnek. Cho és munkatársai (1997) extracellulárisan alkalmazott ATP segítségével váltott ki Ca²⁺-tranzienseket, ami valamelyik purinerg receptorféleség jelenlétére utalt. Ezen felvetéssel tökéletes összhangban Housley és munkatársai (1999) igazolták P_{2X2} receptorok jelenlétét a ganglion spiraleban, ami azt jelzi, hogy az ATP esetleg ganglion spirale neuronok egyik neurotranszmittere lehet.

Más rácsálókon (elsősorban egereken és patkányokon) végzett kísérletek rámutattak, hogy a Santos-Sacchi által leírt K⁺-áram egy része egy olyan késői típusú

K^+ -csatorna aktivációjának következménye, ami -40 mV-nál pozitívabb membránpotenciálon aktiválódott (Moore és munkatársai, 1996). A szerzők azt is megállapították, hogy a ganglion spirale neuronokon megfigyelhető K^+ -áramokat még igen magas koncentrációjú (25 mmol/l) TEA^+ jelenlétében sem sikerült teljesen gátolni, ami más, a késő K^+ -áramtól eltérő sajátosságú K^+ -áramok jelenlétére utalt. A fenti konduktanciák jelenléte mellett Mo és Davis (1997) h-áram aktiválódásáról is beszámolt szövettanészeti fenntartott, egérből izolált ganglion spirale neuronokat vizsgálva.

Az eddigiekben részletezett, emlősökön szerzett ismeretekhez képest bővebb ismeretanyaggal rendelkezünk csirke ganglion spirale neuronok működéséről. Igen érdekes eredményekről számoltak be Sheppard és munkatársai (1992) csirkeembriókból izolált neuronokon végzett munkájuk alapján. Megállapították, hogy a depolarizáló impulzusokkal kiváltható K^+ -áramok egy része egy gyorsan aktiválódó és ugyancsak gyorsan inaktiválódó áramnak felelt meg, ami számottevő 4-aminopiridin-érzékenységet mutatott, azaz főbb jellegzetességeiben megfelelt az A-típusú áramnak. Megkülönböztettek ezen túlmenően egy lassan, valamint egy egyáltalán nem inaktiválódó komponenset, melyek közül az előbbi sem TEA^+ , sem 4-aminopiridin jelenlétében nem volt gátolható, míg az utóbbi mutatott némi érzékenységet a TEA^+ alkalmazására. Valverde és munkatársai (1992) az inaktiválódó komponensek vizsgálata során megállapították, hogy a lassan inaktiválódó áram jelenléte már a 6. embrionális nap után kimutatható, míg a gyorsabbik (azaz A-áramnak imponáló) áramért felelős ioncsatornák expressziója az egyedfejlődés egy későbbi szakaszában, kb. a 17. embrionális napon vált megfigyelhetővé. Hasonló eredményekről számolt be Garcia-Diaz is (1999). Történetek vizsgálatok csirke ganglion spirale neuronok Ca^{2+} -áramainak jellemzésére is, melynek keretében Jimenez és munkatársai (1997) N- és T-típusú áramok jelenlétét igazolták.

A gyakorlati fül-orr-gégészet szempontjából is igen izgalmas megállapítást tettek Lin és munkatársai (1998), amikor leírták, hogy kinin hatékonyan gátolta a ganglion spirale neuronok késői típusú K^+ -áramát. A gátlás erőssége a depolarizáció (azaz a célcatornák aktiválódása) mértékének növekedésével fokozódott (használatfüggő vagy „use-dependent” gátlás). Könnyedén belátható, hogy a K^+ -konduktancia csökkenése miatt a ganglion spirale neuronok ingerlékenysége fokozódik, ami (legalábbis részben) magyarázhatja a kininszármazékok tinnitust okozó hatását.

1.5. A ganglion spirale neuronok elektrofiziológiai tulajdonságainak jelentősége a cochlearis implantáció tervezésében

A különböző károsító hatások, noxák miatt létrejövő teljes hallásképtelenség rehabilitációja évtizedek óta nagy kihívást jelent a fülsebészettel foglalkozó kutatók és gyakorló szakemberek számára, a megoldást a cochlearis implantáció jelentette. A műtéti eljárás és az implantátum technikai fejlődéséről Niparko a cochlearis implantációról szóló könyvében 2000-ben számolt be. A technika alkalmazásának bevezetésekor a műtétet követően beszédértésről még nem lehetett ugyan beszámolni, de a beteg a beszéd ritmusát felismerte, és néhány egyszerű szót el is tudott különíteni. 1963-ban Zöllner és Keidel demonstrálta, hogy a belfülbe helyezett elektródák hallásélményt produkálnak 4-5 évvel a behelyezést követően is. A kezdeti próbálkozások eredményeihez képest ma lényegesen többet várunk a cochlearis implantáción átesett betegek rehabilitációja során; célunk, hogy a műtétet követően az addig sükettségben szenvedő beteg megfelelő gyakorlás és tanulás után kommunikálni tudjon, és megértse a mindennapi beszédet.

A cochlearis implantátum működésének alapelve, hogy elektromos árammal stimulálva a ganglion sejtet, a hallópályában és a hallókéregben hallásélmény keletkezik. Az eszköz a külvilág felől érkező hangot elektromos jelekké alakítja, és azokat a ganglion sejtekre továbbítja. A technika lehetővé teszi, hogy a középfül hangvezető apparátusának, valamint a belfül receptorsejtjeinek kiiktatásával teremtsünk kapcsolatot a külvilág és a központi idegrendszeri hallórendszer között.

A gyakorlati tapasztalatok szerint az implantátum olyan, surditásban szenvedő betegeknél működik a legjobban, akiknél a működőképes perifériás neuronok száma még elég ahhoz, hogy az elektromos impulzusokat a hallóközpontok irányába tudják szállítani. Korábban felmerült annak gondolata is, hogy teljes szőrsejtpusztulás esetén esetleg retrográd degeneráció következik be a ganglion spirale idegsejtékben. Ezt a felvetést azonban cáfolták Hinojosa és Marion kutatásai (1983). A szerzők beszámolója alapján úgy tűnik, hogy még súlyos receptorsejt-pusztulás esetén is ép funkciójú marad a ganglion spirale neuronok nagy része. A belfület, illetve a külső- és belfő szőrsejtet érintő, surditáshoz vezető különböző betegségek eseteiben ezért általában a siker reményében végezhető el a cochlearis implantátum beültetése. A cochlearis implantátum annál tökéletesebben tudja ellátni feladatát, minél jobban megközelíti az általa produkált elektromos jel a szőrsejt – ganglion spirale útvonalon fiziológiás

körülmények között kialakuló ingerületi mintázatot. Ehhez ismerni kell a szőrsejtek és ganglion spirale neuronok ingerületképző és –vezető tevékenységének törvényszerűségeit. A fentiekből következően a jelen munka reményeink szerint hozzájárulhat ahhoz, hogy a cochlearis implantációra váró betegeknek a lehető legjobb minőségű hallásélményt biztosíthassuk.

1.6. Célkitűzések

1. Az irodalomban részben fellelhető megközelítésekben kiindulva egy olyan műtéti eljárás és sejtizolálási módszer kidolgozása, amely lehetővé teszi elektrofiziológiai mérések céljára felhasználható neuronok nyerését tengerimalac ganglion spiralejéből.

2. Az izolált ganglion spirale neuronok immuncitokémia azonosítása, az I. és II. típusú ganglion sejtek elkülönítésére alkalmazható morfológiai sajátosságok megállapítása.

3. Hiperpolarizáció hatására aktiválódó ionáramok elvezetése I. típusú ganglion spirale neuronokról, az áramok azonosítása, kinetikai és farmakológiai jellemzése.

4. Depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -áramok elemzése I. típusú ganglion spirale neuronokon, az egyes áramkomponensek elválasztása farmakológiai és elektrofiziológiai módszerekkel.

5. Az I. típusú ganglion spirale neuronok felszíni membránján elektromos ingerlés következtében kialakuló tüzelési mintázat tanulmányozása, továbbá annak vizsgálata, hogy miként módosul ez a mintázat az egyes ionáram-komponensek gátlását követően.

2. MÓDSZEREK

2.1. Kísérleti állatok, a preparálás főbb lépései

Kísérleteinkhez 250-300 g tömegű tengerimalacokat használtunk (hímeket és nőstényeket egyaránt; a DE OEC Állatetikai Bizottságának engedélyével). A vizsgálatra szánt állatot először pentobarbitállal elaltattuk (35 mg/kg i.p.), majd dekapitáltuk. A preparálás további lépéseit túlhűtött, Na⁺-mentes, mesterséges cerebrospinális oldatban (aCSF, az összetételét lásd később) végeztük. A ganglion spirale feltárása érdekében először eltávolítottuk az os temporalet, majd kipreparáltuk a csontos cochleat és a modiolust. A modiolus széttörése után vált lehetővé a ganglion spirale darabjainak eltávolítása és a neuronok izolálása. Tekintettel arra, hogy a módszereket részben magunk dolgoztuk ki, illetve a rendelkezésre álló leírásokat adaptáltuk saját céljainkra, a műtéti beavatkozás és a sejtizolálás részletei az „Eredmények” című fejezetben kerülnek ismertetésre.

2.2. Az alkalmazott oldatok

Az aCSF összetétele a következő volt (mmol/l-ben): NaCl 125; KCl 2,5; glükóz 10; NaH₂PO₄ 1,25; NaHCO₃ 26; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; mioinozitol 3; aszkorbinsav 0,5; Na-piruvát 2. Az oldat Na⁺-mentes változatában a NaCl–ot szacharózzal (250 mmol/l) helyettesítettük. A HEPES-pufferelt aCSF összetétele (mmol/l-ben): NaCl 135; KCl 3; glükóz 10; HEPES 10; szacharóz 45; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1. A fenti oldatok pH-ja 7,2 volt; ozmolaritásukat folyamatosan ellenőriztük (Automatic Osmometer; Knauer, Germany) és szükség esetén szacharóz hozzáadásával tartottuk 330 mosm/l értéken. A legtöbb alkalmazott vegyszert a Sigma (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltuk, a kivételeket a megfelelő helyen jelöljük.

A pipettaoldat összetétele az alábbi volt (mmol/l-ben): KCl 130; HEPES 10; MgCl₂ 1; EGTA 5; Na-GTP 0,5; K₂-ATP 2; az oldat pH-ja 7,3; ozmolaritása pedig 335 mosm/l volt. A mérések során a különböző gátlószereket egy gyors oldatcserét lehetővé tevő mikroperfúziós rendszer segítségével alkalmaztuk, a kívánt szereket közvetlenül a sejtek környezetébe juttatva.

2.3. Elektrofiziológiai mérések

Méréseink során a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját alkalmaztuk. A mikroelektrodákat vékony falú boroszilikát üvegcsövekből készítettük (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK), az elektrodák ellenállása (a fentiekben részletezett összetételű pipettaoldattal töltve) 1-2,5 M Ω volt. Az átlagosan 4 M Ω -os soros ellenállást 60-80 %-ban kompenzáltuk. Kísérleteink során a patch-clamp technika feszültség- és áram-clamp konfigurációját egyaránt alkalmaztuk (Hamill és munkatársai, 1981). Adatainkat Axopatch 200A patch-clamp-erősítő, valamint TL-1 AD/DA-konverter segítségével rögzítettük 5 kHz-es mintavételezési frekvencia mellett. A mintavételezés és az analízis során a pClamp 6.0 programcsomagot használtuk. A sejtkapacitás kompenzálása elektronikusan történt.

A hiperpolarizáció-aktivált áram steady-state aktivációjának vizsgálatához kettős impulzusprotokollt használtunk -60 mV-os tartópotenciálról. A vizsgálatok során a sejtet először 500 ms hosszú, változó mértékű hiperpolarizációnak vetettük alá (-70 és -140 mV közötti értékeken, 10 mV-os lépésenként), majd az előimpulzus alatt aktiválódó áram utóáram-komponensének nagyságát vizsgáltuk a -60 mV-os teszimpulzus alatt. Az így kapott utóáram-amplitúdót a legnagyobb értékre (azaz a -140 mV-os előimpulzus után mérhetőre) normáltuk, és az így nyert értékeket az alkalmazott előimpulzus amplitudójának függvényében ábrázoltuk. Az így kapott pontsor egy szigmoid görbét eredményezett, amit a Boltzmann-eloszlás függvényével illesztettünk, az alábbi egyenlet felhasználásával:

$$I / I_{\max} = \left\{ 1 + \exp \left[\frac{E_{50} - E}{s} \right] \right\}^{-1}, \quad (1)$$

ahol I az E feszültségű előimpulzus alkalmazása után megjelenő utóáram amplitúdója, I_{\max} a legnagyobb utóáram-amplitúdó, E_{50} az a membránpotenciál, ahol a vizsgált ioncsatornák fele van aktivált állapotban, míg az s a csatornaaktiváció feszültségfüggését jellemző meredekségi faktor.

A jelen értekezésben bemutatott adatok az egyes eredmények átlagait, és azok standard deviációját tükrözik. Az adatok analízise során a szignifikanciát kétmintás t -próbával ellenőriztük. A különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ feltétel teljesült.

2.4. Immuncitokémia

A neuronspecifikus immunfestést egérben termelt, neuron-specifikus enoláz (NSE) ellenes ellenanyaggal, míg a myelinre specifikus jelölést patkányban termelt anti-S100 antitest alkalmazásával biztosítottuk (mindkét ellenanyagot a DAKO-tól [Dánia] szereztük be).

A sejtizolálást és a neuronok letapadását követően 4 °C-os, 4 % koncentrációjú aceton 10 percen át történő alkalmazásával fixáltuk a sejteket, majd az endogén peroxidáz-aktivitás gátlására került sor 0,5 % töménységű H₂O₂ metanolos oldatában (30 perc, szobahő). A fenti lépéseket a neuronok desztillált vizes öblítése követte. Az antigének feltárását 0,01 mol/-es PBS-citrátpuffer (pH = 6,0) jelenlétében, kuktában végeztük (2 perc). Ezt követően a sejteket PBS-ben (pH = 7,5) mostuk (5 perc), majd azokat az elsődleges antitestekkel inkubáltuk (szobahő, 30 perc). Az ellenanyagokat 1:100 (anti-NSE) és 1:400 (anti-S100) hígításban alkalmaztuk. Az inkubációs periódus végén a sejteket mostuk (3 x 5 perc, PBS), majd kecskéből izolált, biotinilált anti-egér és anti-patkány másodlagos ellenanyagok alkalmazására került sor (1:100). Az újbóli mosás (PBS, 3 x 5 perc) után a sejteket peroxidázzal-konjugált streptavidin oldatban (1:600, 30 perc, szobahő; DAKO) inkubáltuk, majd az immunreakciót SK 4600 VIP/PP (VIP substrate for peroxidase, VECTOR, USA) alkalmazásával tettük láthatóvá. A sejtek ismételt mosását (3 x 5 perc, PBS) a sejtmagok háttérfestése követte (metilzöld, VECTOR), majd a sejteket dehidráltuk, végül beágyasztuk.

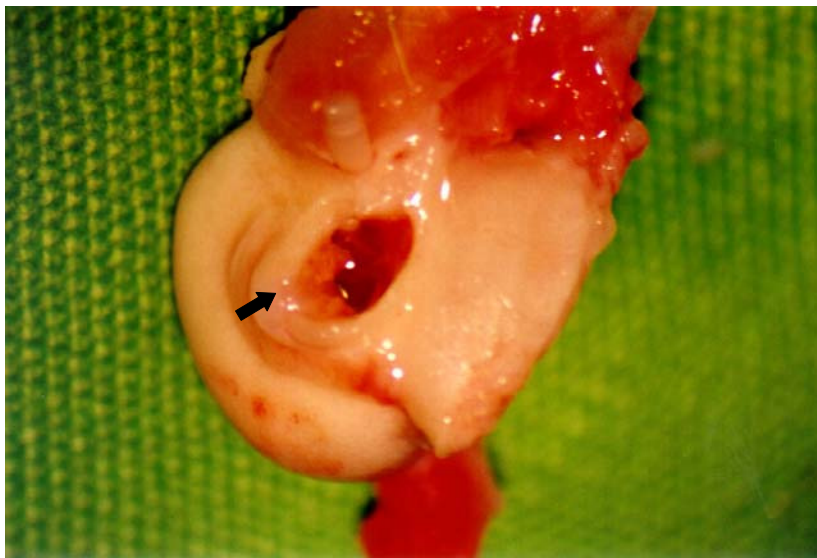
3. EREDMÉNYEK

3.1. *A ganglion spirale preparálása, a neuronok izolálása, az I. és II. típusú ganglionsejtek azonosítása*

3.1.1. A preparálás lépései

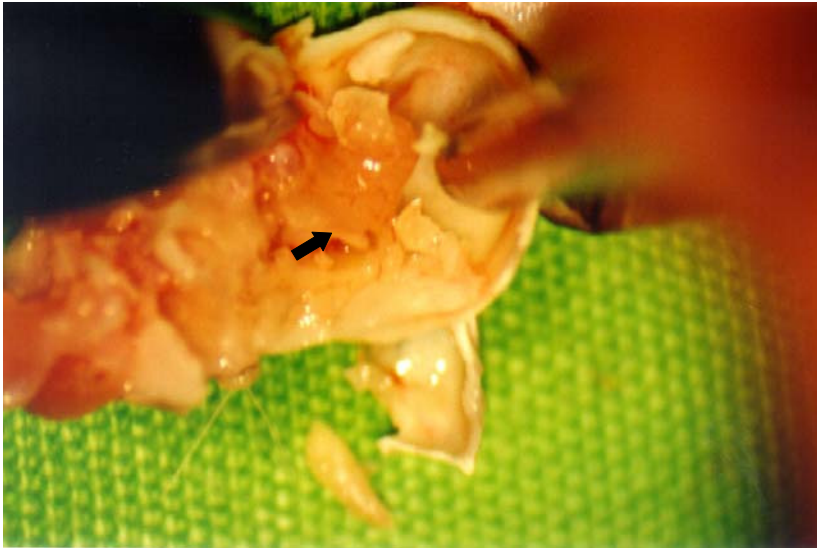
Formatted: Bullets and Numbering

A műtéti eljárás Módszerek fejezetben említett főbb lépéseit a jelen fejezet ábrái mutatják be. A dekapitálást követően kipreparáltuk és izoláltuk az 1. ábrán látható os temporalet. A halántékcsonst külső felszínét vízszintes síkban metszve előtűnt a csontos cochlea (2. ábra). Ezt követően finom olló segítségével mikroszkóp alatt eltávolítottuk a cochleat borító csontlemezt, mely alatt fokozatosan láthatóvá vált a csiga csontos tengelye, a modiolus (3. ábra). A modiolust, csigavonalát követve és környezetét eltávolítva, basalis részénél kipattintottuk, majd róla a szövetmaradványokat eltávolítottuk. A 4. ábra az izolált és letisztított modiolust demonstrálja.



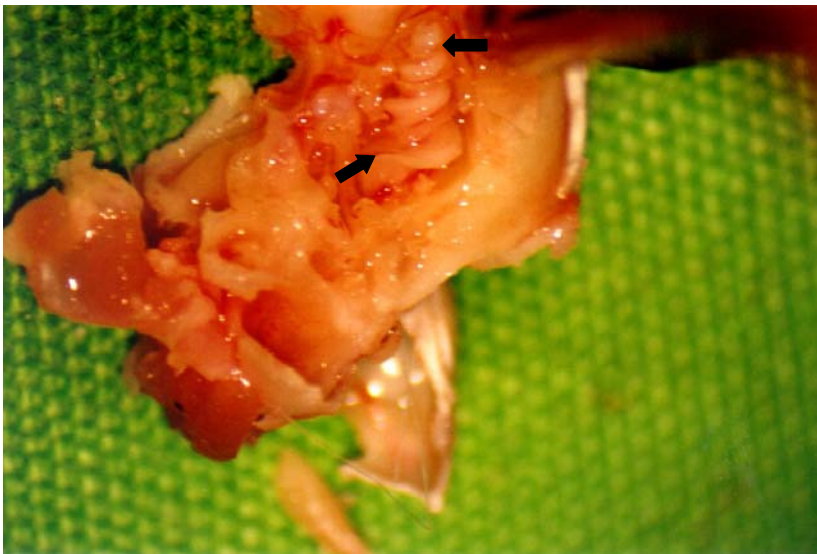
1. ábra

A tengerimalacból eltávolított halántékcsonst. A nyíl a külső hallójárat csontos bemenetét jelzi.



2. ábra

A feltárt halántékcsonthban, a cochlea csontos falának megkezdett eltávolítása (nyíl).



3. ábra

A csontos cochlea tengelyét képező modiolus (nyilak, bázis és csúcs), még a halántékcsonthban, kiemelés előtt.



4.ábra

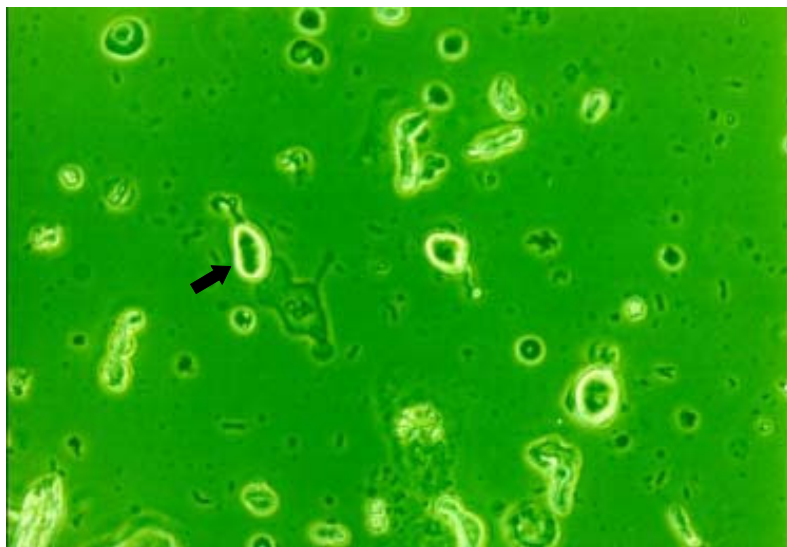
A teljesen eltávolított és letisztított modiolus.

3.1.2. A ganglion spirale neuronok izolálása az elektrofiziológiai mérésekhez

Formatted: Bullets and Numbering

A modiolus izolálását követően azt néhány apróbb darabra törtük, majd a darabkákból eltávolított, a ganglion spiraleet is tartalmazó szövetdarabkákat enzimkezelésnek vetettük alá. Az emésztés 31°C-on, 95% O₂/5% CO₂ gázkeverékkel folyamatosan buborékoltatott aCSF-ben történt, 3 mg/100 ml kollagenáz és 12 mg/100 ml pronáz jelenlétében. A mintegy 15-20 perces emésztési periódust követően az enzimhatást 1 mg/ml koncentrációban alkalmazott tripszin-inhibitor (Sigma, I-S) 2-3 percen át történő alkalmazásával állítottuk le. A neuronok végső disszociálására igen óvatos mechanikai triturálással került sor, majd a sejteket fedőlemezre ülepítettük. A kísérletek egy részében a sejtek ülepítése poli-D-lizinnel előkezelt fedőlemezre történt, ami elősegítette a sejtek erősebb letapadását. A mintegy 30 perc hosszú ülepítési periódust követően a fedőlemezhez immár erősen kitapadt neuronokat HEPES-sel (N-2-hydroxyetil-piperazin-N-2-etansulfunicacid) pufferelt aCSF-el mostuk át a szövettörmelék és az elpusztult sejtek eltávolításának céljából.

A sejtizolálás leírt módszerét követően természetesen mind az I., mind a II. típusú ganglion spirale neuronok jelen voltak a tárgylemezen. Annak érdekében, hogy kísérleteinket teljes bizonyossággal az I. típusú sejteken hajtsuk végre, méréseinkhez bi- vagy unipolaris megjelenésű, legalább 10 μm átmérőjű neuronokat kerestünk (Moore és munkatársai, 1996). Az ezen feltételek szerint kiválasztott sejtek rendszerint tartalmazták a velőshüvelyük maradványait is (5. ábra). Amint az az 5. ábrán látható, a vizsgálatra kiválasztott neuronok éles kontúrral, tiszta citoplazmával rendelkeztek, és többnyire a nyúlványaik (vagy legalább azok eredési pontjai) is azonosíthatók voltak. Bár a fent említett kritériumok következetes alkalmazása sem zárta ki, hogy esetleg II. típusú neuronokat is vizsgálhattunk a jelen munka keretein belül, a II. típusú ganglion spirale neuronok ritka előfordulása miatt ennek valószínűsége nagyon kicsi. Említést érdemel, hogy a mindösszesen 51 sejt közül, amelyeket a jelen kísérletek során vizsgáltunk, csupán hetet értékeltünk „lehetséges” vagy „valószínű” II. típusú neuronként, és az ezekről nyert mérési eredményeket az adatok kiértékelése során nem vettük figyelembe.



5. ábra

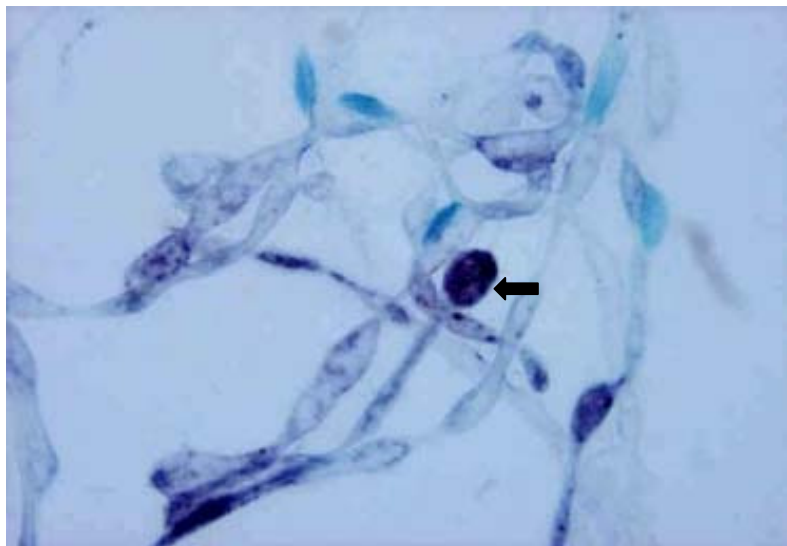
Tengerimalacból enzimatikusan izolált I. típusú ganglion spirale neuronok (nyíl) fázis-kontraszt mikroszkópos képe. Megfigyelhető a sejtek éles kontúrja, tiszta citoplazmája, valamint a neuronokat borító myelinburok.

3.1.3. Immuncitokémiai azonosítás

Formatted: Bullets and Numbering

Az előző fejezetben felsorolt érvek alapján gyakorlatilag bizonyosak lehettünk abban, hogy az izolálás után kapott ganglionáris neuronokat azonosítani tudjuk, azonban immuncitokémiai jelöléseket is végeztünk az idegsejtek jelenlétének kétséget kizáró bizonyítása érdekében.

A jelölések során az idegsejtek identifikálására NSE specifikus immunreakciót alkalmaztunk (6.és 7. ábra). Fontos kiemelni, hogy az erőteljes immunpozitivitást mutató sejtek nagyfokú hasonlóságot mutattak a fáziskontraszt mikroszkópos kép alapján I. típusú ganglion spirale sejtekként azonosított neuronokkal. Az I. típusú ganglion spirale neuronokra jellemző myelinburok meglétét anti-S100 ellenanyag alkalmazásával igazoltuk (8. ábra).



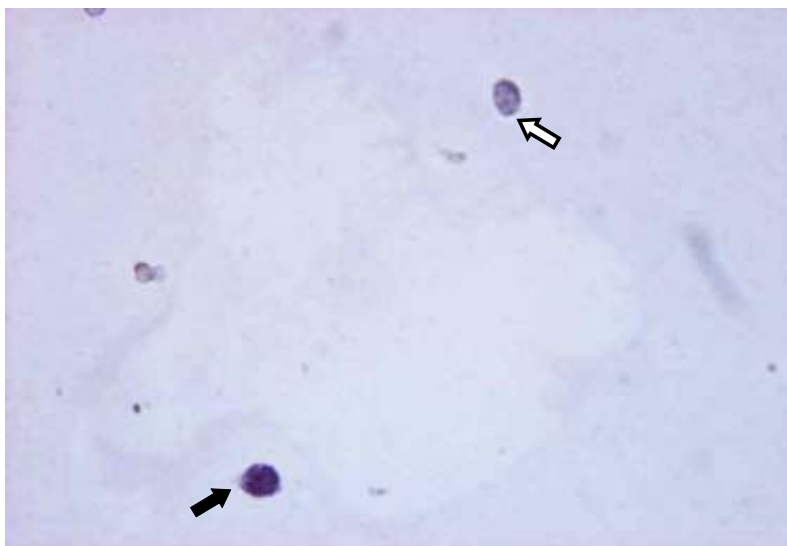
6. ábra

A tengerimalac ganglion spiraleből izolált sejtek egyike, amelyet anti-NSE festéssel kezeltünk. A háttérfestés metilénzölddel történt. Az immunreaktív neuron I. típusú ganglion spirale neuron.



7. ábra

Anti-NSE pozitív sejt nagyobb nagyítással, ez esetben a neuron nyúlványa is jól megfigyelhető.



8. ábra

A tengerimalac ganglion spirale neuronjából izolált anti-S100-pozitív (↘) és anti-S100-negatív (↗) sejtek. Az anti-S100- pozitivitás jelzi a myelinburok jelenlétét, ami körbeveszi a neuront. A másik sejt nem mutat immun-pozitivitást, ami arra utal, hogy a sejttestet myelinburok nem veszi körül.

3.1.4. Az I. típusú ganglion spirale neuronok elektrofiziológiai jellemzői

A kísérleteink során tanulmányozott sejtek alapvető elektrofiziológiai sajátosságai azonosak voltak, tovább valószínűsítve, hogy az általunk vizsgált sejtek mindegyike az I. típusba tartozó ganglion spirale neuron volt. A mérések tanúsága szerint az átlagos sejtkapacitás 9 ± 2 pF ($n = 51$) volt, míg a nyugalmi membránpotenciál értéke -62 ± 9 mV-nak adódott ($n = 19$).

Érdemes megemlíteni, hogy Santos-Sacchi (1993) valamint Chen (1997) tengerimalac I. típusú ganglion spirale neuronokról közölt adatai a fentiekkel gyakorlatilag megegyeztek, ami ugyancsak a sejt kiválasztási procedúra megfelelő voltát jelzi. Figyelembe véve a ganglion spirale neuronok így meghatározott nyugalmi membránpotenciálját, a kísérletek során általában -60 mV-os tartópotenciált alkalmaztunk.

3.2. Hiperpolarizáció hatására aktiválódó áram elemzése I. típusú ganglion spirale neuronokon

Az I. típusú ganglion spirale neuronok aktivitási mintázatát kialakító ionáramok közül a jelen értekezés keretében a membrán nyugalmi sajátosságait illetve az akciós potenciálokat követő repolarizációt döntően meghatározó komponenseket tanulmányoztuk.

Először azt a kérdést tettük fel, hogy kimutatható-e ezeken az idegsejteken a membrán hiperpolarizációja során aktiválódó áram (9. ábra). A 9. ábra A paneljének legfelső része demonstrálja az alapvető megfigyelést; a vizsgált sejtet -60 mV-os fenntartott membránpotenciálról 3 s időtartamú lépcsőkben hiperpolarizálva (-70 - -140 mV), megfigyelhető volt egy lassan aktiválódó, befelé irányuló (inward), 3 s hosszú stimuláció során inaktivációt egyáltalán nem mutató áram. Aktivációja először -90 mV-nál volt észrevehető, nagysága a hiperpolarizáció mértékét fokozva egyre nőtt, egyidejűleg a kialakulás sebessége is fokozódott.

Az aktiválódó komponens nagyságát úgy határoztuk meg, hogy a 3 s-os feszültséglépcső végénél mérhető „maradó” (steady-state) áramamplitudóból kivontuk a hiperpolarizáló lépcső elején megfigyelhető azonnali (instantaneous) áramnagyságot. Az így számított különbségeket a hiperpolarizáló impulzusok alatti membránpotenciálok függvényében feltüntetve kaptuk a 9B. ábrán található áram-feszültség összefüggéseket.

A fent jellemzett áram igen lassú aktivációja és egyéb jellegzetességei alapján megfelelt a hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationáramnak (h-áram), melyet korábban egér (Mo és Davis, 1997) valamint tengerimalac (Chen, 1997) ganglion spirale sejtjein is leírtak. A h-áram jelleg további bizonyítékként kísérleteket végeztünk az általunk talált áram blokkolhatóságának megállapítása érdekében.

A 9A. ábra felülről második panelje 1 mmol/l CsCl hatását demonstrálja, megfigyelhető, hogy ebben a koncentrációban a Cs⁺ gyakorlatilag teljesen megakadályozta a hiperpolarizáció hatására aktiválódó inward áram kialakulását. Az igen hatékony blokkoló hatással szemben 1 mmol/l BaCl₂ jelenlétében az áram csökkenése ugyanazon neuronon lényegesen kisebb mértékű volt. Az ábrarész legalsó panelje azt demonstrálja, hogy kontroll oldatban mind a Cs⁺ mind a Ba²⁺ hatása teljesen revertálható volt.

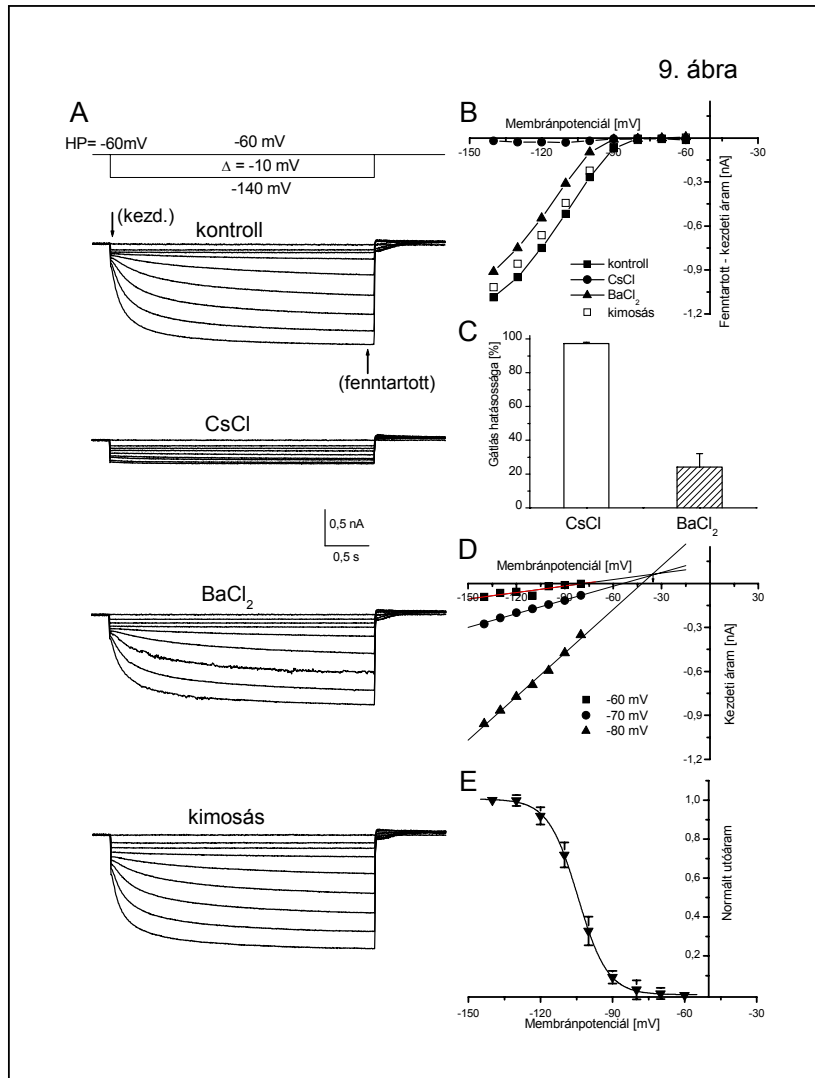
A 9B. ábra áram-feszültség összefüggései az A ábrarészen bemutatott áramgörbék alapján kerültek számításra; a 9C. ábrarész pedig a Cs⁺ és a Ba²⁺ hatására vonatkozó valamennyi kísérlet eredményét foglalja össze. Ennek értelmében 1 mmol/l CsCl jelenlétében a hiperpolarizáció hatására aktiválódó áramnak 97 ± 1 %-a gátlódott ($n = 5$), 1 mmol/l BaCl₂ alkalmazása során viszont a gátlás mértéke jóval kisebb, 24 ± 8 % volt. Az igen kifejezett Cs⁺ érzékenység és a Ba²⁺ jóval kisebb hatásossága összhangban van a tanulmányozott áramkomponens h-áram jellegével.

A h-áramként történő azonosítás melletti további (és döntő) érv az áram megfordulási membránpotenciáljának (reverzálpotenciáljának) az értéke. Mivel a h-áram egy kevert kationáram, reverzálpotenciálja -50 és -20 mV között várható. A 9. ábra D része mutatja be az ebből a célból végzett kísérletek egyikét.

Tekintettel arra, hogy a feltételezett megfordulási potenciál olyan feszültségtartományba esik, ahol depolarizáció hatására aktiválódó áramok megjelenése szükségképpen bekövetkezik, lehetetlenné téve így a reverzálpotenciál klasszikus módon történő meghatározását, a kísérletek során azt az ismert tényt használtuk ki, hogy a h-csatornák egy része már a nyugalmi membránpotenciál értékén is nyitott állapotban van. Erre utalt az a megfigyelésünk is, miszerint a hiperpolarizáló lépcsők kezdetén egy azonnali befelé irányuló áram figyelhető meg.

A h-áram reverzálpotenciáljának meghatározása során a neuronok membránpotenciálját három különböző értéken tartva alkalmaztuk a hiperpolarizáló impulzusokat, majd megmértük a megjelenő inward áramok azonnali komponensének amplitúdóját. Ezen értékeket a hiperpolarizáló lépcsők alatti membránpotenciál függvényében ábrázolva lineáris áram-feszültség összefüggéseket kaptunk, amelyek metszéspontja a reverzálpotenciál értékét adta. Az általunk vizsgált, hiperpolarizációra aktiválódó áramkomponens megfordulási potenciálja ilyen körülmények között -34 ± 7 mV-nak adódott ($n = 4$). Ez a megállapításunk teljes összhangban volt a ganglion spirale neuronokon hiperpolarizáció hatására aktiválódó áram h-áramként való azonosításával.

A h-áram sajátosságai közül meghatároztuk a steady-state aktiváció membránpotenciál függését is (az eljárás leírását lásd a Módszerek fejezetben). A 9E ábrán bemutatott összesített eredmények szerint az 50 %-os aktiváció -104 ± 1 mV-nál következett be, a membránpotenciál függés meredekségét leíró faktor értéke pedig 6 ± 1 mV-nak adódott ($n = 7$).



9. ábra

A tengerimalacból izolált I. típusú ganglion spirale neuronok hiperpolarizáció-aktivált áramának jellemzése. (A) A sejt válasza hiperpolarizáló stimulus alkalmazására. Ebben a kísérletben 3 s hosszú hiperpolarizáló lépcsőket alkalmaztunk, -60 mV-os tartópotenciálról, -140 mV-os maximális hiperpolarizációig, 10 mV-os lépésekben. A teljes protokollt megismételtük 1 mmol/l CsCl illetve 1 mmol/l BaCl₂ jelenlétében, végül ismét kontroll körülmények között. (B) A hiperpolarizáció által aktivált áram áram-feszültség összefüggése kontroll körülmények között (■), 1 mmol/l CsCl jelenlétében (●), 1 mmol/l BaCl₂ jelenlétében (▲) és kimosás után (□). Az áram amplitúdóját úgy határoztuk meg, hogy levontuk az azonnali áramot a steady-state áramból. (C) Az 1 mmol/l CsCl és 1 mmol/l BaCl₂ blokkoló hatásának összefoglalása. Az oszlopokat úgy kaptuk meg, hogy meghatároztuk a drogérzékeny komponens amplitúdóját és ezt a teljes hiperpolarizáció aktivált áramra normalizáltuk. (D) A hiperpolarizáció aktivált áram reverzál potenciáljának meghatározása. A protokoll alatt hiperpolarizációs stimulus alkalmaztunk -80 és -140 mV között, 10 mV-os lépésekben három különböző tartópotenciálról (-60, -70, -80 mV-ról) és az azonnali áram-feszültség összefüggését mértük. Az egyedi feszültség-áram összefüggések metszéspontja megadja az áram megfordulási potenciálját (jelen esetben -35 mV). (E) A hiperpolarizáció aktivált áram steady-state aktivációs paraméterei. Ezekben a kísérletekben hiperpolarizáció stimulusokat alkalmaztunk -60 mV-os tartó potenciáltól 10 mV-os lépésekben. Minden hiperpolarizációs stimulus után meghatároztuk az utóáram amplitúdóját és az egyes értékeket azon utóáram amplitúdójára normalizáltuk, amelyet a -140 mV-os előhiperpolarizáció után mértünk. A normalizált áram értékeit az előimpulzus feszültségének függvényében ábrázoltuk, majd azokat a Boltzmann függvénnyel illesztettük.

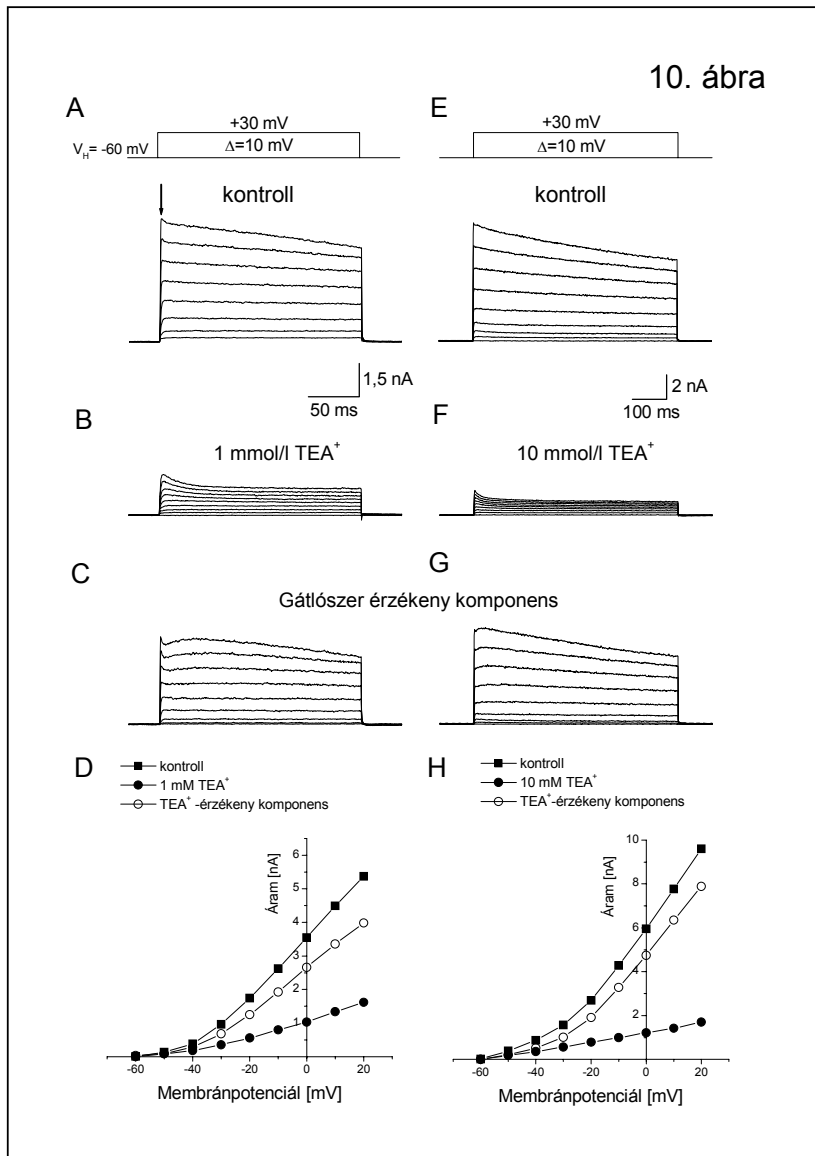
3.3. Depolarizáció hatására aktiválódó áramok jellemzése és farmakológiai szeparálása I. típusú ganglion spirale neuronokon

A -60 mV-os tartópotenciálról alkalmazott, 200 ms hosszú depolarizáló négyszögimpulzusok hatására az I. típusú ganglion spirale neuronokon kifelé irányuló (outward) áramok alakultak ki. Figyelembe véve az alkalmazott oldatok összetételét, ezen áramok K^+ -áramokként voltak azonosíthatóak. A 10. ábra A és E panelje mutat be olyan áramcsaládokat, amelyeket a neuronok -50 és +30 mV közötti membránpotenciáltartományba történt depolarizálásával váltottunk ki (az ábra D és H panelje az ezen áramokból illetve az ábrán bemutatott többi áramcsaládból számított áram-feszültség összefüggéseket tünteti fel). A bemutatott (és a hasonló módon nyert valamennyi más) regisztrátum alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált sejtek depolarizáció hatására aktiválódó áramai több, különböző csatornaféleség aktiválódásának következményeként jöttek létre. Megállapíthatjuk, hogy az áramnak volt egy inaktivációt nem mutató, fenntartott komponense, melynek aktivációja -40 mV-on vagy ennél kifejezettebb depolarizációk esetén volt tapasztalható. Erősebb depolarizáció hatására a fenntartott áramkomponens mellett megjelent egy másik, inaktiválódó (tranziens) áramféleség is, melynek jelenléte csak a +10 - +20 mV-os membránpotenciál sávban volt igazán nyilvánvaló.

A különböző kifelé irányuló K^+ -áram komponensek szétválasztásának klasszikus módszere a különféle csatornagátló szerek alkalmazása. Kísérleteinkben először TEA^+ -át használtunk 1 és 10 mmol/l-es koncentrációban. Amint az a 10. ábra B és F paneljein látható, a TEA^+ mindkét dózisban igen erőteljesen gátolta a kifelé irányuló K^+ -áramot. A hasonló módon elvégzett kísérletek kvantitatív kiértékelésével kapott eredményeket az I. táblázatban tüntettük fel (együtt a többi gátlószerezrel végzett, később bemutatásra kerülő kísérletek analízisének adataival).

A TEA^+ -érzékeny áramkomponens sajátosságainak szemléltetése érdekében képeztük a kontroll és a TEA^+ kezelés után megmaradó áramok különbségeit és azokat a 10. ábra C és G részén ábráztuk. A TEA^+ -érzékeny áram kinetikai tulajdonságait értékelve megállapíthatjuk, hogy ennek a komponensnek a megjelenése döntően a késői típusú K^+ -csatornák aktiválódásának volt tulajdonítható. A TEA^+ -érzékeny és TEA^+ -rezisztens áramok összehasonlítása azonban azt is nyilvánvalóvá tette, hogy a nem gátolható áram egy jelentékenynek mondható nem-inaktiválódó frakciót, míg a TEA^+ -érzékeny áram számottevő inaktiválódó komponenset tartalmazott, bár ez utóbbi

inaktivációja lassabb volt, mint a TEA^+ -rezisztens komponens esetében tapasztalt inaktivációs sebesség. Ez a tény felvetette annak valószínűségét, hogy az I. típusú ganglion spirale neuronokon jelen lehetnek tranziens kifelé irányuló K^+ -áramok is.

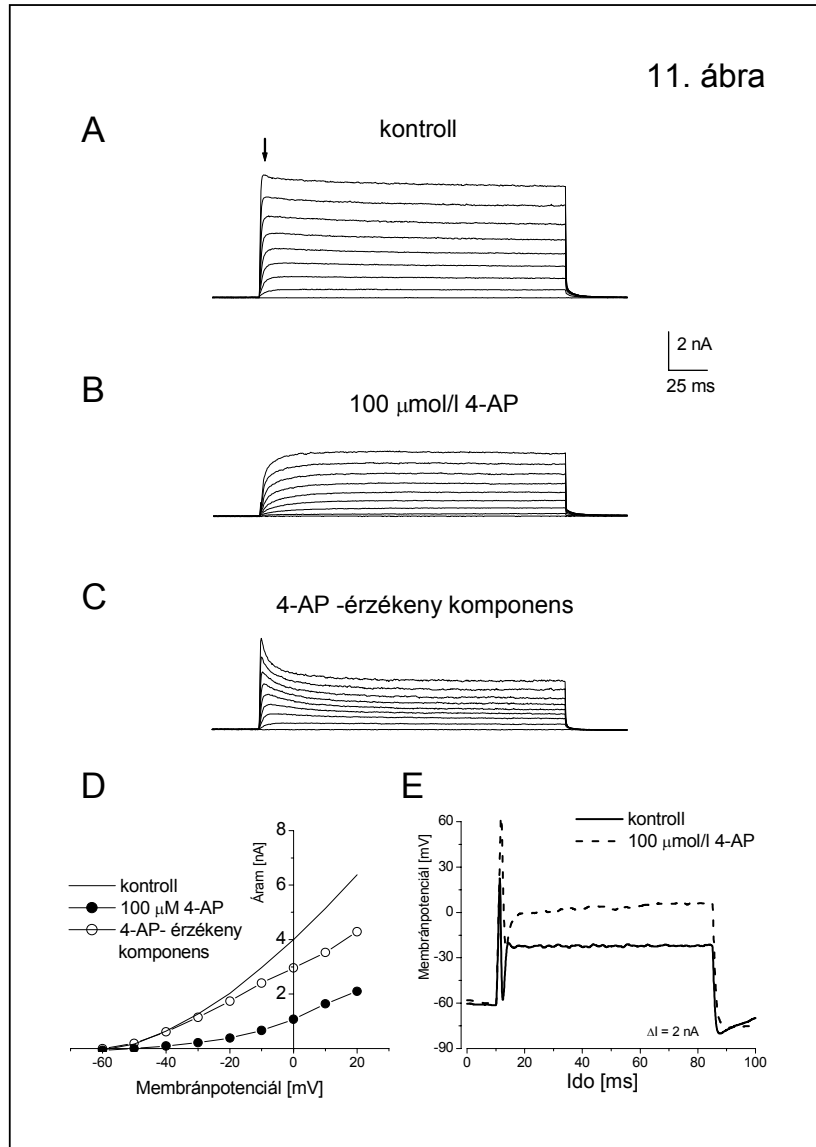


10. ábra

A TEA^+ hatása a depolarizáció aktivált áramra az I. típusú ganglion spirale neuronokban. Ezekben a kísérletekben 200 ms hosszú depolarizáló feszültséglépcsőket alkalmaztunk -60 mV -os nyugalmi potenciálról $+20 \text{ mV}$ -os maximális depolarizációig, 10 mV -os lépésekben. (A és B) Két különböző sejt ugyanazon impulzusprotokollra kapott áramai 1 mmol/l és 10 mmol/l TEA^+ jelenlétében. (C és G) A TEA^+ szenzitív áram komponensek. Ezeket a görbéket úgy kaptuk meg, hogy a TEA^+ jelenlétében rögzített áramgörbéket kivontuk a kontroll görbékéből. (D és H) A kontroll (■), TEA^+ -rezisztens (●) és TEA^+ -érzékeny (○) áramok áram-feszültség összefüggése.

A tranziens áramkomponens tanulmányozása céljából a következő lépésben különböző 4-aminopiridin (4-AP) koncentrációk kifelé irányuló K^+ -áramokra kifejtett hatásait vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a korábbiakban bemutatott impulzus-protokollokat alkalmaztuk; a kapott eredmények egy részét a 11. ábra szemlélteti. Megállapítottuk, hogy 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-AP jelenlétében mind a gyorsan, mind a lassan inaktiválódó áramkomponens eltűnt, és pusztán egy lassan aktiválódó, ugyanakkor inaktivációt nem mutató áramféleség volt megfigyelhető (11B. ábra). A kísérletek alapján szembetűnő volt, hogy a depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -áramnak jelentős része volt érzékeny relatíve alacsony (100 $\mu\text{mol/l}$) 4-AP koncentráció alkalmazására is (11C. ábra), a gátlás mértéke $56 \pm 13\%$ -nak adódott ($n = 7$; I. táblázat). A bemutatott áramcsaládokból szerkesztett áram-feszültség összefüggések tanúsága szerint ezen nagymértékű 4-AP-érzékenységet mutató áramkomponens -50 mV -nál és annál erőteljesebb depolarizációk alkalmazása esetén aktiválódott (11D. ábra).

A 4-AP-érzékeny áramkomponens I. típusú ganglion spirale neuronok tüzelési mintázatát meghatározó szerepének vizsgálata céljából áram-clamp körülmények között mértük a sejtek ingerlésre adott válaszát, valamint ennek esetleges módosulását 4-AP hatására. A neuronokat 70 ms hosszúságú, ingerküszöböt meghaladó amplitúdójú depolarizáló áramingerrel stimuláltuk (11E. ábra). Kontroll körülmények között a neuron csupán egyetlen akciós potenciállal válaszolt az impulzus kezdetén, és ez a viselkedés 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-AP jelenlétében sem változott, azaz a vizsgált sejtek esetében a gátlószer jelenlétében sem figyelhettük meg több akcióspotenciál-tüzelését ($n = 6$). A kialakult akciós potenciál egyes paraméterei ugyanakkor jellegzetesen módosultak 4-AP jelenlétében. A legjelentősebb változások között megfigyelhető volt a megnövekedett csúcsamplitúdó, a lelassult repolarizáció, továbbá az a tény, hogy az akciós potenciált követő plató pozitívabb membránpotenciálon alakult ki. Ezen módosulások összhangban álltak azzal a megállapítással, hogy 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-AP jelenlétében a repolarizációs erő (azaz a repolarizációért felelős K^+ -csatornák) jelentős hányada gátolt volt. Megfigyelhető volt továbbá az is, hogy a gátlószer jelenlétében a sejtek nyugalmi membránpotenciálja $5,9 \pm 1,8\text{ mV}$ -tal kisebb volt ($n = 5$), arra utalva, hogy a 4-AP érzékeny K^+ -áram szereppel bírhat az I. típusú ganglion spirale neuronok nyugalmi membránpotenciáljának kialakításában is.



11. ábra

A 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-AP hatása a ganglion spirale neuronok depolarizációra aktiválódó áramaira. 200 ms hosszú depolarizáló feszültséglépcsőket alkalmaztunk -60 mV -os tartó potenciálról $+20 \text{ mV}$ -os maximális depolarizációig, 10 mV -os lépésekben (A). (B) Ugyanannak a sejtnek a válaszreakciója ugyanezen feszültségprotokollra 4-AP jelenlétében. (C) 4-AP szenzitív áramkomponens. Az analízis során 4-AP jelenlétében rögzített áramgörbét kivontuk a kontroll körülmények között mért áramgörbékből. (D) A kontroll (■), a 4-AP rezisztens (●) és 4-AP szenzitív (○) komponensek áram-feszültség összefüggései. A nyíl jelzi az azonnali áramamplitúdó meghatározásának időbeliségét. (E) 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-AP hatása a ganglion spirale neuronok akcióspotenciál-tüzelési mintázatára. Az itt bemutatott esetben 70 ms depolarizáló stimulust alkalmaztunk (2 nA), és a membránpotenciál változásait rögzítettük. A folyamatos vonal jelzi a neuronok membránpotenciál-változását kontroll körülmények között; szaggatott vonal jelzi a 100 $\mu\text{mol/l}$ 4-AP hatását.

I. táblázat

Különböző csatornagátlószer hatása az I. típusú ganglion spirale neuronok kifelé irányuló áramaira.

Gátlószer	Nyugalmi membránpotenciál –60 mV			
	Csúcsáram	25 ms*	100 ms**	n
4AP				
2 mmol/l	73±7	74±7	72±9	4
100 µmol/l	56±13	56±15	50±10	7
30 µmol/l	27±5	22±7	19±8	3
TEA				
10 mmol/l	81±1	83±1	84±2	2
1 mmol/l	67±8	75±13	77±13	6
DTX				
200 nmol/l	30±9	30±10	28±10	4

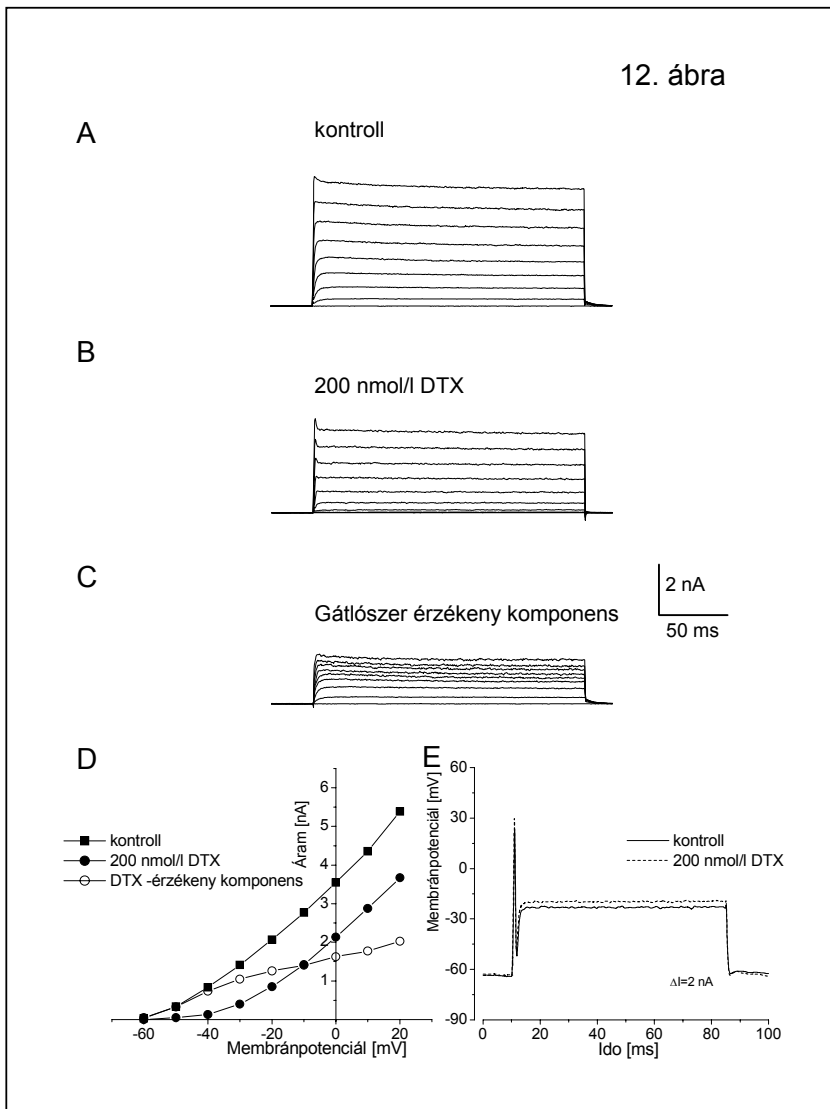
A gátlás hatásosságát %-ban (\pm SD) fejeztük ki. A feltüntetett értékek azt jelzik, hogy az alkalmazott gátlószer hatására mennyivel csökkent az áram nagysága.

*: A depolarizáló impulzus kezdete után 25 ms-mal meghatározott értékek

** : A depolarizáló impulzus kezdete után 100 ms-mal meghatározott értékek

Az I. táblázatban szereplő adatok jelzik, hogy a 4-AP hatása koncentrációfüggő. Különösen figyelemre méltó az a tény, hogy a gátlószer már 30 µmol/l-es koncentrációban is jelentékenyen csökkentette a kifelé irányuló áramok nagyságát. Ennek a nagy 4-AP-érzékenységet mutató áramnak a jelenléte azt sugallta, hogy az I. típusú ganglion spirale neuronok esetleg rendelkezhetnek egy dendrotoxin-érzékeny (DTX) áramkomponenssel is. A lehetőség vizsgálatára 200 nmol/l DTX-t alkalmaztunk az extracelluláris oldatban, az eredményeket a 12. ábra demonstrálja. Az ábrán megfigyelhető, hogy a tengerimalac I. típusú ganglion spirale neuronjai valóban rendelkeztek egy DTX-érzékeny K^+ -áramféleséggel (12A-D. ábra). A DTX-érzékeny áram kb. -50 mV-on aktiválódott, azaz már viszonylag kismértékű depolarizáció alkalmazása során is jelentős volt a teljes áramhoz való hozzájárulása (0 mV-on a DTX-érzékeny komponens a kialakuló teljes kifelé irányuló K^+ -áramnak mintegy 30 %-áért volt felelős). Megállapítottuk továbbá, hogy a DTX-érzékeny áram csupán csekély mértékű inaktivációt mutatott (12C. ábra). A fentiekén túlmenően vizsgáltuk a DTX hatását az I. típusú ganglion spirale neuronok tüzelési mintázatára, és

megállapítottuk, hogy DTX alkalmazása sem változtatta meg ezen sejtek igen gyorsan adaptálódó tüzelési sajátosságait (n = 4; 12E. ábra).



12. ábra

DTX-I hatása I. típusú ganglion spirale neuronok depolarizáció-aktivált K^+ -áramaira. Ezekben a kísérletekben 200 ms hosszú depolarizációs feszültséglépcsőket alkalmaztunk -60 mV-os tartópotenciáltól $+20$ mV-os maximális depolarizációig, 10 mV-os lépésekben. Az ábra A része mutatja a kontroll körülmények között mért áramgörbéket, a B rész a 200 nmol/l DTX-I alkalmazása után kapott értékeket. (C) DTX-I érzékeny áram komponens. Utóbbi áramfrakciót úgy számítottuk, hogy a DTX-I jelenlétében rögzített áramokat kivontuk a kontroll körülmények között mért görbékből. (D) Áram feszültség összefüggések kontroll (■) körülmények között, DTX-I rezisztens (●) és DTX-I szenzitív (○) áram esetében ugyanazon a sejten. (E) 200 nmol/l DTX-I hatása I. típusú ganglion spirale sejt akcióspotenciál-tüzelési mintázatára. Ebben az esetben 70 ms hosszú depolarizáló áramstimulust alkalmaztunk 2 nA amplitúdóval és a membránpotenciál változását rögzítettük. A folyamatos vonal jelzi a neuron membránpotenciál-változását kontroll oldatban, a szaggatott vonal a gátlószer alkalmazása során mutatja a membránpotenciál változását.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. *A ganglion spirale neuronok izolálása*

A kísérletek kezdetekor az egyik első feladat a ganglion spirale neuronok izolálására alkalmas módszer megtalálása volt. A közlemények számos speciesen végzett munkáról számoltak be (különféle rágcsálók, macska, denevér, madarak, stb.) és jóllehet az alapvető eljárások egyformának tűntek, nem mindig lehetett eldönteni, hogy a kisebb eltérések feltétlenül szükséges lépéseket tükröztek-e vagy csak a kutatók nem részletezett megfontolásaiából következtek. Közös vonása volt az általunk fellelt publikációknak az is, hogy a szerzők elsősorban az általuk kapott adatok bemutatására koncentráltak és csak kevésbé a preparátum előállításának részleteire (Moore és munkatársai, 1996). Végezetül az is egyértelművé vált számunkra, hogy az alkalmazott kísérleti megközelítések követelményei nem azonosak és lévén az elektrofiziológiai jellegű publikációk száma aránylag kicsi, az irodalmi közlések alapján nem tudtuk egyértelműen meghatározni a patch-clamp technikai céljaira megfelelő izolált tengerimalac ganglion spirale neuronok előállításának optimális módját.

A metodika kidolgozása során sikerült elérnünk azt, hogy nagy biztonsággal tudjunk ionáram mérések céljára alkalmas neuronokat nyerni. Az általunk kidolgozott és optimálisnak ítélt módszernek a korábbi technikákkal összevetve néhány jellegzetessége említést érdemel. A sejtizolálási módszerek esetében a legnagyobb kihívás és egyben az egyik leggyakoribb kritikai célpont annak bizonyítása, hogy a kapott sejtek membránja megőrzi fiziológiás szerkezetét és működését. A fő problémát az enzimkezelés jelenti, több laboratórium egyszerűen elkerüli alkalmazásukat és a mechanikai disszociálást részesíti előnyben (Santos-Sacchi, 1993; Mo és Davis, 1997; Ruel és munkatársai, 1999; Sun és Salvi, 2001). Mások alkalmaznak enzimeket vagy enzimkombinációkat (pl. Kaneda és munkatársai, 1988; Cho és munkatársai, 1997; Hansen és munkatársai, 2001), ugyanakkor meglehetősen nagyfokú variabilitás figyelhető meg a kiválasztott enzim(ek) természetét illetően (papain, kollagenázok, tripszin, stb.). Sejtizolálási módszerünk kialakításának kezdetén megpróbáltuk az enzimmentes izolálást, azonban a kapott neuronok száma alacsony volt és az épek látszólag sem voltak alkalmasak patch-clamp mérések végzésére.

Jelen kísérleteink során a kollagenáz-pronáz kombinációt találtuk a legmegfelelőbbnek, mivel ez a kezelés elősegítette a myelinhüvely eltávolítást is (ennek jelenléte a patch-clamp konfiguráció kialakítását lehetetlenné teszi). Enzimemésztés esetében természetesen mindig fennáll a veszélye annak, hogy a túl hosszú expozíció a sejtmembránt roncsolja. Tapasztalataink szerint a 37 °C-on végrehajtott 15-20 perces kezelés eredményezte a legnagyobb sejthozamot a neuronok károsítása nélkül.

Izolált sejtek szuszpenziójában végrehajtott mérések esetében gyakori probléma a sejtek „mozgékonyága”, azaz az állandó perfúzió miatti helyváltoztatás. Bizonyos esetekben a sejtek kitapadnak a szokásos üveg fedőlemezre, gyakoribb azonban az, hogy a kitapadás érdekében az üvegfelületet be kell vonni valamilyen anyaggal. Az alkalmazott adhezív szer vonatkozásában az irodalom eléggé diverz (Yamaguchi és munkatársai, 1993; Harada és munkatársai, 1994; Mo és Davis, 1997; Moore és munkatársai, 1996; Jimenez és munkatársai, 1997; Malgrangre és munkatársai, 1997; Mouveroux és munkatársai, 2002). Miután a kérdés nem tűnt különösebben meghatározó jellegűnek és a poli-D-lizint alkalmasnak találtuk, nem tettünk kísérletet más bevonószerek kipróbálására.

A tapasztalatok szerint az izolálást követően a sejtek bizonyos „helyreállási” időt igényelnek ahhoz, hogy a későbbiekben megbízható, stabil mérési körülményeket lehessen megteremteni velük. Különböző szerzők más-más formáját alkalmazták ennek az „utókezelésnek”, az alkalmazott időtartam, inkubáló oldat összetétel és inkubációs hőmérséklet tekintetében egyaránt (Elhamady és munkatársai, 1983; Moore és munkatársai, 1996; Malgrange és munkatársai, 1997; Mo és Davis, 1997; Lin és munkatársai, 1998; Lin és Chen, 2000), mégis a leggyakoribbnak a 10% borjúsérumot és antibiotikumokat tartalmazó Dulbecco-módosított Eagle médium (DMEM) felhasználása mondható. Az is megállapítható, hogy a szövettényésztes körülmények között a ganglion spirale neuronok annál jobban túléltek, minél fiatalabb (lehetőleg embrionális) egyedből származtak. Meg kell azonban jegyezni, hogy a tartós és sikeres túlélés mellett a fiatal kísérleti állat alkalmazásának az a kockázata, hogy bennük a hallási funkció még nem alakult ki, ezért az abban szereplő neuronok érettségének foka kérdéses lehet.

Az általunk kifejlesztett és bemutatott eljárást számos kompromisszum eredményének tekintjük, ugyanakkor alkalmasnak arra, hogy céljainknak megfelelő izolált ganglionsejteket szolgáltatson. Ennek legfontosabb bizonyítékai a morfológiai

jelek, a fiziológiai nyugalmi membránpotenciál, akciós potenciálok tüzelésének képessége, a különféle K^+ -áramok aktiválhatósága és a depolarizáció hatására létrejövő citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció növekedés (utóbbi a jelen értekezésben nem közölt adat).

4.2. Az I. típusú ganglion spirale neuronok ionáramai

Az értekezésben bemutatott kísérletes munka keretében tengerimalac ganglion spiraleből származó I. típusú neuronok membránsajátságait vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy ezen ganglionban két sejttípus is megtalálható, céljainkhoz elengedhetetlen volt, hogy azokat minden kétséget kizárólag el tudjuk különíteni. Ennek érdekében kizárólag azon sejteket használtuk fel a jelen vizsgálat keretében, amelyek myelinborítása részben megőrzött volt, és amelyek átmérője elérte a $10\ \mu\text{m}$ -t (Moore és munkatársai., 1996). Említést érdemel, hogy egérben az I. típusú ganglion spirale neuronok nem feltétlenül alkotnak egységes sejtpopulációt (Mo és Davis, 1997), mivel néhány, morfológiai jegyei alapján I. típusú sejtnek imponáló neuron fenntartott depolarizációra repetitív tüzeléssel válaszolt. Jelen kísérletek során tengerimalacban nem tapasztaltunk hasonló heterogenitást, mivel egyetlen általunk vizsgált, I. típusúnak ítélt sejt sem mutatott lassan vagy egyáltalán nem adaptálódó választ.

A sejtkapacitás, a sejtek nyugalmi membránpotenciálja és a spontán aktivitás hiánya tekintetében a jelen munka keretein belül tanulmányozott sejtek leginkább a Santos-Sacchi (1993) által leírtakhoz hasonlítottak. Ezen túlmenően a kiváltott akciós potenciálok legfontosabb sajátosságai, valamint a TEA^+ alkalmazásának a depolarizáció-aktivált K^+ -áramokra kifejtett hatásai ugyancsak igen hasonlatosak voltak a fenti tanulmányban leírtakhoz. Ez a hasonlóság nem csupán az alkalmazott sejtszelekciós kritériumok adekvát voltát igazolta, hanem azt is bizonyította, hogy a sejtizolálás során alkalmazott enzimkezelés a vizsgált neuronok alapvető membránsajátságait nem befolyásolta számottevően.

Az értekezés egyik legfontosabb eredményének azon megállapítás tűnik, mely szerint nagyfokú hasonlóság fedezhető fel az I. típusú ganglion spirale neuronok és néhány, a hallópálya felépítésében résztvevő további idegsejt (elsősorban a nucleus cochlearis ventralis bushy-sejtjei és a nucleus corporis trapezoidi fősejtjei) K^+ -áram mintázata között. Valamennyi itt felsorolt neuron rendelkezik egy inaktivációt nem, de TEA^+ -érzékenységet mutató áramkomponenssel, membránjukban pedig expresszáldók

egy nagy 4-AP-érzékenységet mutató, depolarizáció-aktivált K^+ -csatorna (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák és munkatársai, 2000). Úgy tűnik továbbá, hogy a fenti sejtek egy DTX-érzékeny komponenssel is rendelkeznek. A fenti adatok azt sugallják, hogy ezen neuronok általános membrán-sajátságaiért, és különösképpen a gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-mintázat megjelenéséért hasonló ioncsatorna-mintázat lehet felelős.

A leírt jelentős hasonlóságok mellett azonban a sejtek között néhány számottevőnek mondható különbséget is hangsúlyozni kell. Annak ellenére, hogy a DTX-érzékeny áramkomponens mindhárom említett neuronfélésegekben jelen van, úgy tűnik, hogy az egyes sejtekben betöltött szerepe eltérő. Különösen érdekes, hogy a bushy-sejtekben, a madarak nucleus magnocellularisában található sejtekben, valamint a nucleus corporis trapezoidei fősejtjeiben ezen áramkomponens gátlása a jellegzetes, gyorsan adaptálódó választ egy lényegesen lassabban adaptálódó mintázattá változtatja (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák és munkatársai, 2000). Hasonló beavatkozás (azaz a DTX-érzékeny ionáram gátlása) az I. típusú ganglion spirale sejtekben nem okozott a fentiekhez hasonló jelentős változást a tüzelés mintázatában. Ebből arra következtethetünk, hogy az I. típusú ganglion spirale sejtek DTX-érzékeny áramkomponensének nincs annyira meghatározó jelentősége a gyorsan adaptálódó válasz kialakításában, mint azt a hallópálya másodlagos és harmadlagos szenzoros neuronjai esetében láttuk.

Ugyancsak említésre érdemes, hogy az általunk leírtakkal megegyező hiperpolarizáció-aktivált áram jelenlétéről számoltak be egérből származó és szövettenyészetben fenntartott ganglion spirale neuronokban (Mo és Davis, 1997), valamint tengerimalac mechanikusan (azaz enzimkezelés nélkül) izolált hasonló sejtjeiben (Chen, 1997). Az áram részletes tanulmányozása igazolta, hogy az mindkét esetben kevert kationcsatornák aktivációjának volt köszönhető, így ezt a komponenszt a szerzők h-áramként azonosították. A jelen értekezésben demonstrált hiperpolarizáció-aktivált áram alapvető paraméterei gyakorlatilag megegyeztek a Chen (1997) által korábban leírtakkal, amiből ismét csak arra következtethetünk, hogy a sejtizolálás során használt enzimkezelés nem befolyásolta jelentősen az I. típusú ganglion spirale neuronok általános membrán-sajátságait.

Ismeretes, hogy a hallórendszer több más sejt típusa is rendelkezik h-árammal (Golding és munkatársai, 1999; Bal és Oertel, 2000; Banks és munkatársai, 1993;

Owens és munkatársai, 1999; Cuttle és munkatársai, 2001). Számos, igen szerteágazó sejtfunkció rendelhető ezen áramkomponenshez:

1. befolyásolhatja a nyugalmi membránpotenciál értékét (Maccaferri és munkatársai, 1993),
2. megakadályozhatja egyes neuronok hosszantartó gátlását (Luo és Perkel, 1999)
3. hozzájárulhat bizonyos neurontípusok spontán aktivitásának a kialakításához (Bal és McCormick, 1997; McCormick és Pape, 1990).

Több szerző számolt be arról, hogy a h-áram különböző szignalizációs útvonalak által modulálható, ami hozzájárulhat a neuronok membránsajátságainak módosulásaihoz, ahogyan azt ganglion spirale neuronokon (Mo és Davis, 1997), a nucleus cochlearis bushy-sejtjein (Cuttle és munkatársai, 2001) valamint a nucleus corporis trapezoidei fősejtjein (Banks és munkatársai, 1993) már megmutatták.

Santos-Sacchi (1993) munkájában úgy vélte, hogy a ganglion spirale neuronok szómája tulajdonképpen nem más, mint a nervus cochlearis egy internodalis szegmense. Ez a felvetés valóban igen tetszetős, és kiválóan magyarázná az I. típusú ganglion spirale neuronok sejttestét borító myelinburok funkcionális szerepét. A feltételezés értelmében a sejttesten igen nagy denzitásban található K^+ -csatornák biztosítanák a sejt gyors repolarizációját, ami lehetővé teszi, hogy a neuron nagy frekvenciájú tüzelésre legyen képes. Valószínű, hogy a nem inaktiválódó K^+ -áram lenne elsősorban felelős ezen gyors repolarizáció kialakításáért.

A DTX-érzékeny komponensről megmutatták, hogy számos más sejtípus esetén kiemelkedően fontos szereppel bír a gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-mintázat kialakításában (Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák és munkatársai, 2000), ám ehhez az áramhoz nem lehetett hasonló funkciót rendelni az I. típusú ganglion spirale sejtek esetében. Ugyanakkor DTX és/vagy alacsony koncentrációjú 4-AP jelenlétében a nyugalmi membránpotenciál pozitívabbá vált, ami arra utal, hogy az ezen szerekre érzékeny csatornák részben aktiváltak a nyugalmi membránpotenciál környékén, így hozzájárulhatnak a ganglion spirale neuronok nyugalmi membránpotenciáljának a kialakításához.

A tranziens áramok szerepe továbbra is tisztázatlan marad. Az általunk vizsgált neuronokban nem játszottak jelentős szerepet a tüzelési sajátosságok kialakításában. Érdekes azonban figyelembe venni, hogy a tranziens áram hozzájárulása a teljes K^+ -áramhoz eltérő lehet a ganglion spirale neuronok sejttestjén és szinaptikus végződéseiben. Ahogyan azt Sheppard és munkatársai (1992) felvetették, ez az

áramkomponens nagyobb jelentőséggel bírhat a ganglion spirale neuronok szinaptikus végződéseiben, ahol módosíthatja a szőrsejtek és a perifériás ganglion spirale végzések közötti szinaptikus transzmisszió hatékonyságát. A tranziens K^+ -áram aktiválódása ugyanis átmenetileg megszüntetheti a szinaptikus transzmisszió által indukált depolarizációt a ganglion spirale terminalisokban.

A sejttest és az axonterminális ioncsatorna-mintázatában tapasztalható különbségekről már történt beszámoló a nucleus cochlearis bushy-neuronjai esetében, amely sejteken az axonvégződés mérete lehetővé tette a közvetlen elektrofiziológiai méréseket. Ezeken a neuronokon eltéréseket sikerült kimutatni mind a Ca^{2+} - mind a h-csatornák eloszlásában és sajátosságaiban a sejttest és az axonvégződés között (Doughty és munkatársai, 1998; Cuttle és munkatársai, 2001).

4.3. Az eredmények gyakorlati jelentősége

A cochlearis implantáció során a beültetett elektród körül elektromos mező keletkezik, amely téringerlés formájában ingerületbe hozza a modiolusban lévő ganglion spirale neuronokat. A behelyezett elektród feladata, hogy frekvencia-specifikusan továbbítsa az elektromos jeleket a ganglion spirale neuronoknak, azaz a bázison a magas, míg apicalisan egyre mélyebb frekvenciájú hangok kerüljenek leképezésre.

Alapvetően kétféle ingerlési módozat lehetséges, melyeket CIS és SPEAK stratégia néven említ az irodalom (Kiefer és munkatársai, 2001). A hangmagasság kódolása mindkét esetben úgy történik, hogy a mintavételezés során a cochlearis implantátum a hangok spektrális mintavételezése során különböző amplitúdójú jeleket képez. Minél rövidebb a jelszélesség, és minél nagyobb frekvenciájú a kislülési aktivitás, annál magasabb frekvenciákra specifikus ganglion spirale neuronok jönnek ingerületbe a stimuláció következtében. Fontos kiemelni (és a cochlearis implantátum elektródjának működésének megtervezésekor mindenképpen figyelembe kell venni), hogy az elektród cochleo-basalis része a magas frekvenciára specifikus ganglion spirale neuronokat ingerli szelektíven, míg a cochleo-apicalis része a mély frekvenciájú hangokért felelős ganglion sejteket hozza ingerületbe. Az implantátum behelyezésének szempontjából érdekes, hogy a cochlea két végpontja között elhelyezkedő ganglion spirale neuronok a pozíciójuktól függő köztes frekvenciájú hangingereket kódoló információk továbbításáért felelősek.

A hallórendszer frekvenciadiszkriminációs képességének szempontjából alapvetően fontos, hogy a hallópálya teljes hosszában (azaz a belsőfültől a hallókéregig) igen erőteljes tonotópia figyelhető meg, így fontos lenne olyan cochlearis implantátumok tervezése és használata, amelyek egy meghatározott frekvenciájú hanginger hatására elsősorban az adott hangmagasságnak megfelelő ganglion spirale neuronokat hozzák ingerületbe. Ezen túlmenően a készüléknek olyan kisülési mintázatot kellene létrehoznia a neuronokban, amit azok fiziológias körülmények között produkálnak a hangingerekre válaszul. A jelen értekezés a ganglion spirale neuronok membránsajátságainak és tüzelési mintázatának pontosabb megértését célozza, így - legalábbis reményeink szerint - elősegítheti az eddigieknél hatékonyabban működő cochlearis implantátumok tervezését és gyártását.

A tézisekben előforduló hivatkozások jegyzéke

1. Apkon, M., Nerbonne, J. M. Characterization of two distinct depolarization-activated K^+ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol.*; 97(5):973-1011, 1991.
2. Ashmore, J. Biophysics of the cochlea - biomechanics and ion channelopathies. *Br.Med Bull.*, 63,59-72, 2002.
3. Attwell, D., Wilson, M. Behaviour of rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods. *J. Physiol.* 309: 287-315. 1980.
4. Bal, R., Oertel, D. Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J. Neurophysiol.*, 84, 806-817, 2000.
5. Bal, T., McCormick, D. A. Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_h . *J. Neurophysiol.*, 77, 3145-3156, 1997.
6. Banks, M. I., Pearce, R. A., Smith, P. H. 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. *J. Neurophysiol.*, 70, 1420-1432, 1993.
7. Brevi, S., de Curtis M., Magistretti J. Pharmacological and biophysical characterization of voltage-gated calcium currents in the endopiriform nucleus of the guinea pig. *J Neurophysiol.*;85(5):2076-87, 2001.
8. Brew, H. M., Forsythe, I.D. Two voltage-dependent K^+ conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *J. Neurosci.*, 15, 8011-8022, 1995.
9. Brown, H., DiFrancesco, D., Noble, S. Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.*, 81: 175-204,1980.
10. Browne, D. L., Gancher, S.T., Nutt, J.G., Brunt, E. R. P., Smith, E. A., Kramer, P., Litt, M. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *KCNA1*. *Nature Genetics*, 8, 136-140, 1994.
11. Chen, C. Hyperpolarization-activated current (I_h) in primary auditory neurons. *Hearing Res.*, 110, 179-190, 1997.

12. Cho, J. H., Balasubramanyam, M., Chernaya, G., Gardner, J. P., Aviv, A., Reeves, J.P., Dargis, P.G., Christian, E. P. Oligomycin inhibits store-operated channels by a mechanism independent of its effects on mitochondrial ATP. *Biochem J.* 15,324 (Pt 3):971-80 1997.
13. Cuttle, M. F., Rusznák, Z., Wong, A. Y. C., Owens, S., Forsythe, I. D. Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I_h) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J. Physiol. (Lond.)*, 534, 733-744, 2001.
14. Dallos, P., Santos-Sacchi, J., Flock, A. Intracellular recording from cochlear outer cells. *J Neurophysiol* 41, 365-383, 1982.
15. DiFrancesco, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.*, 55: 455-472, 1993.
16. Doughty, J. M., Barnes-Davies, M., Rusznák, Z., Harasztosi, Cs., Forsythe, I. D. Contrasting Ca^{2+} channel subtypes at the cell bodies and synaptic terminals of rat anterioventral cochlear bushy neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, 512, 365-376, 1998.
17. Elhamady, M. S., Hopwood, D., Milne, G., Ross, P., Bouchier, I. A. Tissue culture of guinea-pig gall-bladder epithelium. *J Pathol*, 140(3):221-35,1983.
18. Fay, R. R., Popper, A. N. Comparative hearing mammals. Springer handbook of auditory research, 1994.
19. Garcia-Diaz, J. F. Development of a fast transient potassium current in chick cochlear ganglion neurons. *Hear. Res.*, 135, 124-134, 1999.
20. Gitter, A. H., Preyer, S. A brief history of hearing research. III. [Microscopic anatomy] *Laryngorhinootologie*, 70(8):417-21,1991.
21. Golding, N. L., Ferragamo, M. J. Oertel, D., Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J. Neurosci.*, 19, 2897-2905, 1999.
22. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100, 1981.
23. Hansen, M.R., Zha, X.M., Bok, J., Green, S.H. Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, contribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in vitro. *J. Neurosci.*, 21, 2256-2267, 2001.

24. Harada, N., Han, D.Y., Komeda, M., Yamashita, T. Glutamate-induced intracellular Ca²⁺ elevation in isolated spiral ganglion cells of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol.*; 114(6):609-12, 1994.
25. Hinojosa, R., Marion, M. Histopathology of profound sensorineural deafness. *Ann N Y Acad Sci.*, 405:459-84,1983.
26. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 449-472,1952
27. Housley, G. D., Kanjhan, R., Raybould, N. P., Greenwood, D., Salih, S. G., Jarlebark, L., Burton, L. D., Setz, V.C., Cannell, M.B., Soeller, C., Christie, D. L., Usami, S., Matsubara, A., Yoshie, H., Ryan, A.F., Thorne, P. R. Expression of the P2X(2) receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the cochlea: implications for sound transduction and auditory neurotransmission. *J Neurosci.* 1;19(19):8377-88 1999.
28. Hudspeth, A. J. The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science* 230 (4727), 745-752, 1985.
29. Ito, I., Maeno, T. Catechol a potent and specific inhibitor of the fast potassium channel in frog primary afferent neurones., *J Physiol. Apr*, 373:115-27,1986.
30. Jiménez, C., Giréldes, F., Represka, J., Garcia-Díaz, J. F. Calcium currents in dissociated cochlear neurons from the chick embryo and their modification by neurotrophin-3. *Neurosci.*, 77, 673-682, 1997.
31. Kaneda, M., Nakamura, H., Akaike, N. Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci Res.*; 5(4):299-315 1988.
32. Katz, B. Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 2: 285-299, 1949.
33. Kiefer, J., Hohl, S., Sturzebecher, E., Pfennigdorff, T., Gostettner, W. Comparison of speech recognition with different speech coding strategies (SPEAK, CIS, and ACE) and their relationship to telemetric measures of compound action potentials in the nucleus CI 24M cochlear implant system. *Audiology*, 40(1),32-42, 2001.
34. Lin, X., Chen, S., Tee, D. Effects of quinine on the excitability and voltage-dependent currents of isolated spiral ganglion neurons in culture. *J. Neurophysiol.*, 79, 2503-2512, 1998.

35. Lin, X., Chen, S. Endogenously generated spontaneous spiking activities recorded from postnatal spiral ganglion neurons in vitro. *Develop. Brain Res.*, 119, 297-305, 2000.
36. Luo, M., Perkel, D.J. A GABAergic, strongly inhibitory projection to a thalamic nucleus in the zebra finch song system. *J. Neurosci.*, 19, 6700-6711, 1999.
37. Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A., DiFrancesco, D. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurophysiol.*, 69, 2129-2136, 1993.
38. Malgrange, B., Rigo, J.M., Lefebvre, P.P., Coucke, P., Goffin, F., Xhaufaire, G., Belachew, S., Van-der-Water, T.R., Moonen, G. Diazepam-insensitive GABAA receptors on postnatal spiral ganglion neurones in culture. *Neuroreport*, 8, 591-596, 1997.
39. McCormick, D. A., Pape, H. C. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, 431, 291-318, 1990.
40. Mo, Z. L., Davis, R. L. Endogenous firing patterns of murine spiral ganglion neurons. *J. Neurophysiol.*, 77, 1294-1305, 1997.
41. Mo, Z. L., Davis, R. L. Heterogeneous voltage dependence of inward rectifier currents in spiral ganglion neurons. *J. Neurophysiol.*, 78, 3019-3027, 1997.
42. Moore, E. J., Hall, D. B., Narahashi, T. Sodium and potassium currents of type I spiral ganglion cells from rat. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 116, 552-560, 1996.
43. Mouveroux, J. M., Lakke, E. A., Marani, E. Intrinsic properties inhibit axonal outgrowth from neonatal rat spinal cord explant. *Arch Physiol Biochem*, 110(3):177-85, 2002.
44. Niparko, J. K. (ed.) *Cochlear implants principles praktices*, Lippincolt, Philadelphia, 2000.
45. Owens, S., Cuttle, M. F., Rusznák, Z., Forsythe, I.D. Pre- and postsynaptic inward rectifier current I_h in consecutive nuclei of the rat auditory brainstem. *Bristish Neuroscience Association Abstracts*, 15, P110, 1999.
46. Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray D., Giese, K.P., Silva, A.J., Storm, J.F. Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann. Acad Sci.*, 868,344-55, 1999.
47. Rathouz, M., Trussell, L. Characterization of outward currents in neurons of the avian nucleus magnocellularis. *J. Neurophysiol.*, 80, 2824-2835, 1998.

48. Ruel, J., Chen, C., Pujol, R., Bobbin, R.P., Puel, J.L. AMPA-preferring glutamate receptors in cochlear physiology of adult guinea-pig, *J. Physiol.* 518, 667-680, 1999.
49. Rusznák, Z., Harasztosi, Cs., Stanfield, P. R., Forsythe, I. D., Szűcs, G. Depolarization-activated K^+ currents determining the firing pattern of bushy neurones in ventral cochlear nucleus of the rat. *J. Physiol.*, 526P, 55, 2000.
50. Santos-Sacchi, J. Voltage-dependent ionic conductances of type I spiral ganglion cells from the guinea pig inner ear. *J. Neurosci.*, 13, 3599-3611, 1993.
51. Sheppard, D. N., Valverde, M. A., Represa, J., Giraldez, F. Transient outward currents in cochlear ganglion neurons of the chick embryo. *Neurosci.*, 51, 631-639, 1992.
52. Shimozone, M., Tono, T., Morimitsu, T., Nakagawa, T., Komune, S. Measurement of intracellular free Ca^{2+} concentration in guinea pig spiral ganglion cells. *Neuroreport.* 15;6(3):421-4 1995.
53. Spoenclin, H. Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta Otolaryngol.*; 67(2):239-54 1969.
54. Spoenclin H., Schrott, A. Analysis of the human auditory nerve. *Hear Res. Dec*; 43(1):25-38, 1989.
55. Stanfield, P. R. Tetraethylammonium ions and the potassium permeability of excitable cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 97: 1-67, 1983.
56. Sun, W., Salvi, R.J. Dopamine modulates sodium currents in cochlear spiral ganglion neurons, *Neuroreport* 12, 803-807, 2001.
57. Valverde, M. A., Sheppard, D. N., Represa, J., Giraldez, F. Development of Na^+ - and K^+ -currents in the cochlear ganglion of the chick embryo. *Neurosci.*, 51, 621-630, 1992.
58. Zhou, X., Baier, C., Hossain, W. A. Goldenson, M., Morest, D. K., Expression of a voltage-dependent potassium channel protein (Kv3.1) in the embryonic development of the auditory system. *J. Neurosci. Res.*, 65, 24-37, 2001.
59. Zöllner, F., Keidel, W. D. Gerovermittlung durch elektrische Erregung des Nervus Acousticus. *Archives für der Ohren, Nasen und Kehlkopfheilkunde*, 181, 216-223, 1963.
60. Yamaguchi, K., Ohmori, H. Suppression of the slow K^+ current by cholinergic agonists in cultured chick cochlear ganglion neurones, *J. Physiol.*, 464, 213-228 1993.

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen értekezésben tengerimalac belsőfűlből, enzimátikus módszerrel izolált I. típusú ganglion spirale neuronok elektrofiziológiai sajátságait vizsgáltuk. A munka első lépéseként kidolgoztunk egy olyan preparatív és sejtizolálási eljárást, aminek segítségével sikerült túlélő, elektrofiziológiai mérésre alkalmas I. típusú ganglion spirale sejteket nyernünk. Az általunk kidolgozott sejtizolálási módszer megfelelő számban biztosított ép membránsajátságokat mutató, elektrofiziológiai és immuncitokémiai vizsgálatokra alkalmas sejteket.

Az izolált I. típusú ganglion spirale neuronok egyértelmű azonosítását neuron-specifikus enoláz (NSE) ellenes immunfestés alkalmazásával végeztük. A sejteket körülvevő myelinburok jelenlétét vagy hiányát az anti-S100 immunpozitivitás vizsgálatával igazoltuk. A sejtek elektrofiziológiai jellemzőit teljes-sejt patch-clamp technika alkalmazásával vizsgáltuk. A sejtek kapacitása 9 ± 2 pF ($n = 51$), nyugalmi membránpotenciáljuk -62 ± 9 mV ($n = 19$) volt. Az ingerküszöböt meghaladó depolarizáló impulzusokra a sejtek egyetlen akciós potenciál tüzelésével válaszoltak, ami jellegzetesen a stimulus kezdetén volt megfigyelhető. Jelen munkában megerősítettük azt a korábbi megfigyelést, miszerint az I. típusú ganglion spirale neuronok sejt felszíni membránjukban expresszálják a hiperpolarizáció hatására aktiválódó nem-specifikus kationáram (I_h) kialakításáért felelős ioncsatornákat. Megállapítottuk, hogy az izoláláshoz alkalmazott enzimek nem módosították a h -áram legfontosabb paramétereit. Megmutattuk továbbá, hogy az I. típusú ganglion spirale neuronok különböző depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -áramokkal rendelkeztek, melyek egyike egy erőteljes depolarizáció hatására aktiválódó, kifelé irányuló K^+ -áram volt, ami érzékenynek mutatkozott 1-10 mmol/l tetraetil-ammónium (TEA^+) alkalmazására. Megfigyelhető volt továbbá egy viszonylag kis amplitúdójú, kifelé irányuló tranziens K^+ -áram, mely TEA^+ alkalmazására kevésbé, míg 100 μ mol/l 4-aminopiridin (4-AP) hatására erőteljesen gátlódott. A fentiekén kívül megmutatható volt egy dendrotoxin-I- (DTX-I-) érzékeny K^+ -áram jelenléte is, ami 0 mV-os membránpotenciálon a teljes kifelé irányuló áram mintegy 30%-áért volt felelős. Ezen áramféleség -50 mV-on vagy annál pozitívabb membránpotenciálokön gyorsan aktiválódott, inaktivációt gyakorlatilag nem mutatott. Megállapítottuk, hogy ezen DTX-I-érzékeny komponens gátlása nem befolyásolta számottevően az I. típusú ganglion spirale neuronok tüzelési sajátságait.

SUMMARY

In the present study the electrophysiological properties of enzymatically isolated type I spiral ganglion neurones obtained from the guinea pig have been examined. In the first step of the project a preparation technique and cell isolation procedure were worked out, which allowed the electrophysiological characterisation of the isolated spiral ganglion cells. The protocol described here provided a sufficient number of healthy spiral ganglion neurones with intact membrane properties which were applicable for electrophysiological and immunocytochemical experiments.

The unambiguous identification of the neurones was achieved by using anti-neuron-specific enolase (anti-NSE) immunostaining. The presence and shredding of the myelin sheath was also documented by employing anti-S100 immunoreaction. The membrane characteristics of the cells were studied by using the whole-cell patch-clamp technique. The whole-cell capacitance of the cells was 9 ± 2 pF ($n = 51$), while the resting membrane potential of the cells was -62 ± 9 mV ($n = 19$). When suprathreshold depolarizing stimuli were applied, the neurons fired a single action potential at the beginning of the stimulation.

It was confirmed in the present study that type I spiral ganglion cells possess a hyperpolarization-activated nonspecific cationic current (I_h). The major characteristics of this current component were unaffected by the enzyme treatment. Type I spiral ganglion cells also expressed various depolarization-activated K^+ current components. A high-threshold outward current was sensitive to 1-10 mM/l tetraethylammonium (TEA^+) application. The ganglion cells also expressed a relatively small, but nevertheless present, transient outward current component which was less sensitive to TEA^+ but could be inhibited by 100 μ mol/l 4-aminopyridine (4-AP). Besides the aforementioned current components, the presence of a DTX-sensitive current could also be demonstrated. This current was responsible for some 30% of the total outward current (at 0 mV), showed rapid activation at membrane potentials positive to -50 mV and demonstrated very little inactivation. Our experiments demonstrated that the inhibition of the DTX-sensitive component did not alter the rapidly inactivating nature of the firing pattern of the type I spiral ganglion neurones.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Sziklai István egyetemi tanárnak, a DE OEC Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika igazgatójának a jelen tézisek elkészítéséhez nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért. Külön köszönöm, hogy útmutatásaival, tanácsaival, tapasztalatával folyamatosan segített a kísérletes munka során és a nyert adatok interpretációja kapcsán felmerülő nehézségek leküzdésében.

Ugyancsak megkülönböztetett köszönettel tartozom Prof. Dr. Kovács László akadémikusnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának, hogy intézetének Idegélettani Laboratóriumában biztosította a kísérletes munkám végzéséhez szükséges szakmai és technikai feltételeket.

Hálás vagyok Dr. Csiba Gábor Főorvos Úrnak, a BAZ Megyei Oktató Kórház Főigazgató Főorvosának, hogy a PhD kurzusok és a kísérletes munka idejére engedélyezte számomra a kórházi távolléteket, megteremtve ezzel a PhD fokozat megszerzésének lehetőségét.

Köszönöm Dr. Rusznák Zoltánnak, társ-témavezetőmnek, valamint Prof. Dr. Szűcs Géza egyetemi tanárnak a kísérletek szakmai irányításában nyújtott segítségét. Különösen hálás vagyok szerzőtársamnak, barátomnak, Dr. Harasztosi Csabának, aki hozzásegített a kísérleti munkámhoz szükséges módszerek elsajátításához. Ugyancsak köszönettel tartozom még Dr. Kovács Ilona szerzőtársamnak az immuncitokémiai festések kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Pál Balázsnak és Dr. Varga Attilánének, hogy közreműködésük nyomán megtanulhattam otthonosan mozogni és dolgozni az Idegélettani Laboratóriumban.

Nagy hálával tartozom osztályvezető főorvosomnak Dr. Szakács Gábor Főorvos Úrnak, hogy osztályunkat érintő szakorvoshiánya ellenére is mindvégig támogatta a PhD fokozat elérése céljából végzett munkámat. Köszönöm továbbá Kollegáimnak, hogy ezen idő alatt elviselték az osztályos munkából való kieséssel járó, személyüket érintő megnövekedett terheket, mely sok esetben szabadságuk távolléteimhez történő igazítását is jelentette. Köszönettel tartozom osztályunk Gyermekek Audiológiai Szakambulanciája koordinátorának, Turi Beátának, a tézisek leírásában nyújtott segítségéért.

Különös hála illeti csodálatos, családcentrikus feleségem és kisfiam akik, távolléteim elviselve mindvégig kitartottak mellettem és munkám során – sok esetben még oly nehéz, bizonytalan periódusokban is – támogatásukról biztosítottak, megteremtve ezzel a nyugodt, harmónikus családi háttérrel, mely meggyőződésem szerint a sikeres munka legfontosabb eleme. Hálás vagyok továbbá Szüleimnek, hogy áldozatos munkájukkal lehetővé tették számomra tanulmányaim befejezését és nagyon köszönöm a sok törődést és gondoskodást családom felé.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Szabó, Zs., Harasztosi, Cs., Sziklai, I., Szűcs, G., Rusznák, Z. Ionic currents determining the membrane characteristics of type I spiral ganglion neurones of the guinea pig. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1887-1895, 2002. [**IF:4,163**]
2. Szabó, Zs., Harasztosi, Cs., Szűcs, G., Sziklai, I., Rusznák, Z. A detailed procedure and dissection guide for the isolation of spiral ganglion cells of the guinea pig for electrophysiological experiments. *Brain Res. Prot.* 10, 139-147 2003. [**IF:1,109**]
3. Szabó Zs., Harasztosi Cs., Kovács I., Szűcs G., Rusznák Z., Sziklai I. Tengerimalacból izolált I. típusú ganglion spirale neuron depolarizációja által aktivál K⁺ áramok jellemzése. *Fül-, Orr-, Gégegyógyászat* 49, 114-123, 2003.

Idézhető kivonatok

1. Szabó, Zs., Harasztosi, Cs., Szűcs, G., Rusznák, Z., Sziklai I. Ionic currents of type I spiral ganglion neurones of the guinea pig. *Acta Oto-Rhyno-Laryng. Belg.*, 56, 286a, 2002.
2. Harasztosi, Cs., Szabó, Zs., Rusznák, Z., Szűcs, G., Sziklai I. An improved procedure for the isolation of spiral ganglion cells of the guinea pig. *Acta Oto-Rhyno-laryng. Belg.*, 56, 287a, 2002.

Előadások és poszterek

1. Szabó Zs., Harasztosi Cs., Szűcs G., Kovács L., Sziklai I., Rusznák Z. Tengerimalac cochleájából izolált ganglion spirale neuronok vizsgálata. MÉT 66. vándorgyűlése, Szeged, 06-08 2001.
2. Szabó Zs., Harasztosi Cs., Szűcs G., Kovács L., Sziklai I., Rusznák Z. Tengerimalac cochleájából izolált ganglion spirale neuronok vizsgálata. Magyar Fül- Orr- Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekciójának Vándorgyűlése, Pécs, 06-08 2001.

3. Szabó Zs., Harasztosi Cs., Szűcs G., Kovács L., Rusznák Z., Sziklai I. Tengerimalacból izolált ganglion spirale neuronok vizsgálata. "25 éves a Gyermekegészségügyi Központ" tudományos ülés, Miskolc, 2001.
4. Harasztosi, Cs., Szabó, Zs., Rusznák, Z., Sziklai, I., Szűcs, G. Membrane properties of type I spiral ganglion neurones of the guinea pig. IBRO International Workshop on Signalling Mechanisms in the Central and Peripheral Nervous System, Debrecen, 24-26 2001.
5. Szabó, Zs., Harasztosi, Cs., Szűcs, G., Rusznák, Z., Sziklai, I. Ionic currents of type I spiral ganglion neurones of the guinea pig. 39th Inner Ear Biology Workshop, Liege, 08-10 09.
6. Harasztosi, Cs., Szabó, Zs., Rusznák, Z., Szűcs, G., Sziklai, I. An improved procedure for the isolation of spiral ganglion cells of the guinea pig. 39th Inner Ear Biology Workshop, Liege, 08-10 09.
7. Szabó, Zs., Harasztosi, Cs., Rusznák, Z., Sziklai, I. Inhibition of potassium currents in spiral ganglion neurons of the guinea pig. Association for Research in Otolaryngology, 25, 601., Florida, USA, 2002.