

*BAZ megyei Kórház Fül-Orr-Gége Osztály, Miskolc (főorvos: Szakács Gábor dr.)

**Debreceni Egyetem, OEC, Élettani Intézet, Debrecen (igazgató: Kovács László dr. egyetemi tanár)

***Kenézy Gyula Kórház Rendelőintézet, Patológia Osztály, Debrecen (főorvos: Kovács Ilona dr.)

****Debreceni Egyetem, OEC, Fül-Orr-Gége Klinika, Debrecen (klinikaigazgató: Sziklai István dr. egyetemi tanár)

Tengerimalacból izolált I. típusú ganglion spirale neuron depolarizációja által aktivált K^+ áramok jellemzése

Szabó Zsolt*, Harasztosi Csaba**, Kovács Ilona***, Szűcs Géza**,
Rusznák, Zoltán**, Sziklai István****

ÖSSZEFOGLALÁS: A szerzők munkacsoportja az előző években a hallás központi idegrendszeri apparátusának első elemét, a nucleus cochlearis tanulmányozta. Tekintettel arra, hogy az ebben a magban található neuronokat a nervus acusticus rostjai kötik össze a belső fül receptor-sejtjeivel, logikusnak tűnt annak vizsgálata, hogy a ganglion spiraleban található neuronok milyen elektrofiziológiai sajátosságokkal bírnak.

Kísérleteiket 3–5 hónapos tengerimalacokon végezték. Az állatokat altatás után dekapitálták. A koponya megnyitása és az agy eltávolítása után a cochleát feltárták, melyben láthatóvá vált a modiolus. A lágy szövetek lefejtését követően a modiolust kipattintották, majd finom csipesz segítségével több helyen összeroppantották. Az így nyert szövetdarabkákat 0,3 mg/l kollagenáz és 0,12 mg/l pronáz tartalmú oldatban 31°C-on 10 percig emésztették, majd az enzimhatást 1 g/l koncentrációjú triszipin-inhibitor alkalmazásával állítottuk le. A sejtek szeparálása igen óvatos mechanikai triturálással történt. A sejteket üveg fedőlemezre ülepítették, majd kitapadásuk után a sejtek egy részét a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjának alkalmazásával vizsgálták.

Megállapították, hogy a sejtek nyugalmi átlagos membránpotenciálja -62 mV, átlagos sejtkapacitás 9 pF. Folyamatosan fenntartott, küszöb feletti depolarizáló négyszögimpulzus hatására a sejtekről egyetlen akciós potenciál volt elvezethető az impulzus kezdetén. A részletesebben vizsgált I. típusú sejtek depolarizáló négyszögimpulzusok hatására egy lassan aktiválódó, kifelé irányuló áramot produkáltak, ami mind 1 mM tetra-etil-ammónium, mind 100 microM 4-amino-piridin és 200 nM dendrotoxin alkalmazásával gátolható volt. A sejtek hiperpolarizációra egy lassú aktivációt mutató, befelé irányuló áramkomponenssel reagáltak, mely 1mM cezium és 1mM bárium-kloriddal gátolható és a hatás revertálható.

KULCSSZAVAK: akciós potenciál, 4 aminopiridin, dendrotoxin-I, ganglion spirale, ionáram, patch-clamp

SUMMARY: Enzymatically isolated type I spiral ganglion neurones of the guinea pig have been investigated in the present study. The identity of the cells was confirmed by using anti-neurone-specific-enolase 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 neurones fired a single action potential at the beginning of the stimulation.

It was confirmed in this study that type I spiral ganglion cells possess a hyperpolarization-activated non-specific 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 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 mM 4-aminopyridine. A DTX-I-sensitive current was responsible for some 30 % of the total outward current (at 0 mV), which showed rapid activation at membrane potentials positive to -50 mV and demonstrated very little inactivation. However, inhibition of the highly 4-AP- or DTX-I-sensitive component did not alter the rapidly inactivating nature of the firing pattern of the cells.

KEYWORDS: action potential, 4-aminopyridine, dendrotoxin-I, patch-clamp, ionic currents spiral ganglion

Bevezetés

A ganglion spirale cochleae-ben kétféle neuron található. Az itt fellelhető idegsejtek mintegy 95%-át alkotó I. típusú ganglion spirale neuronok nyúlványai a belső szőrsejteket kötik össze a nucleus coch-

Közlésre érkezett: 2003. 02. 25.

BAZ megyei Kórház Fül-Orr-Gége Osztály
3529 Miskolc, Szentpéteri kapu 72-76.

Tel./Fax: (46) 432-948

E-mail: szabobod@enternet.hu

learisszal (Patuzzi és Robertson, 1988), míg a II. típusba tartozó sejtek valószínűleg a külső szőrsejtek sensoros beidegzését biztosítják (Spoendlin, 1969). A kétféle neuronféleség nemcsak funkcióiban, hanem méretében és morfológiájában is lényegesen különbözik. Az I. típusú neuronok nagyobbak és myelinborítással rendelkeznek, míg a II. típusú ganglion spirale sejtek kisebbek és rajtuk velőshüvelyt kimutatni nem lehet.

Az I. típusú ganglion spirale neuronok legnagyobb része (bár nem mindegyike) igen gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-mintázatot produkált, azaz huzamosabb időn át alkalmazott depolarizáló stimulusok során a sejtek csupán néhány akciós potenciált tüzeltek az ingerlőimpulzus kezdetén (Mo és Davis, 1997). A jellegzetes tüzelési mintázat háttérben álló ionáramokat elsősorban egérben, csirkében és tengerimalacban tanulmányozták, és ezen vizsgálatok rámutattak a különböző feszültségvezérelt Na^+ - K^+ - és Ca^{2+} -csatornák jelentőségére az ismert membrán-sajátosságok kialakításában. Ezen tanulmányok azt mutatták, hogy az I. típusú ganglion spirale neuronok sejt felszíni membránjában található ioncsatornák összetétele számottevő hasonlóságot mutat a központi hallórendszer másodlagos (madarakban a nucleus magnocellularis fősejtjei, emlősökben a nucleus cochlearis bushy-neuronjai) és harmadlagos érzőneuronjaiban (a nucleus corporis trapezoidi medialis területének fősejtjei) leírtakhoz. Ennek alapján talán nem véletlen, hogy a másodlagos és harmadlagos sensoros neuronok eseteiben demonstrált aktivitási mintázat (azaz a fenntartott depolarizáció során jelentkező igen gyorsan adaptálódó tüzelés; Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák et al, 2000) ugyancsak jelentős hasonlóságot mutat az I. típusú ganglion spirale neuronokon tapasztaltakhoz.

A fenti megfigyelések alapján érdekesnek tűnt annak vizsgálata, hogy az I. típusú ganglion spirale neuronok gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-tüzelésének háttérben vajon ugyanazon ionáramok állnak-e, mint a fentebb említett struktúrákban tapasztalható. Hasonlóan a bushy-sejtekhez és a nucleus corporis trapezoidi fősejtjeihez vajon az elsődleges sensoros neuronok is rendelkeznek-e 4-aminopiridin- (4-AP), valamint dendrotoxin- (DTX-I) érzékeny K^+ -áram komponenssel. E tényeknek kiemelkedő jelentőségük van a másodlagos és harmadlagos sensoros struktúrák gyors adaptációjának biztosításában (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák et al, 2000).

Irodalmi adatok alapján az is ismert volt, hogy a hiperpolarizáció-aktivált nem-specifikus kationáram

(I_h) jelenlétét már kimutatták több, a hallásban szerepet játszó neuronon (Golding et al, 1999; Bal és Oertel, 2000; Banks et al., 1993; Owens et al., 1999; Cuttle et al., 2001), köztük egér I. típusú ganglion spirale sejtjein is. Tekintettel arra, hogy a h -áram jelenlétét ugyancsak leírták tengerimalac ganglion spiralejéből mechanikailag izolált neuronokon, meg kívántuk azt is vizsgálni, hogy az általunk alkalmazott enzimatis sejtizolálást követően is megfigyelhető-e ezen áram aktivációja.

Eszközök, módszerek

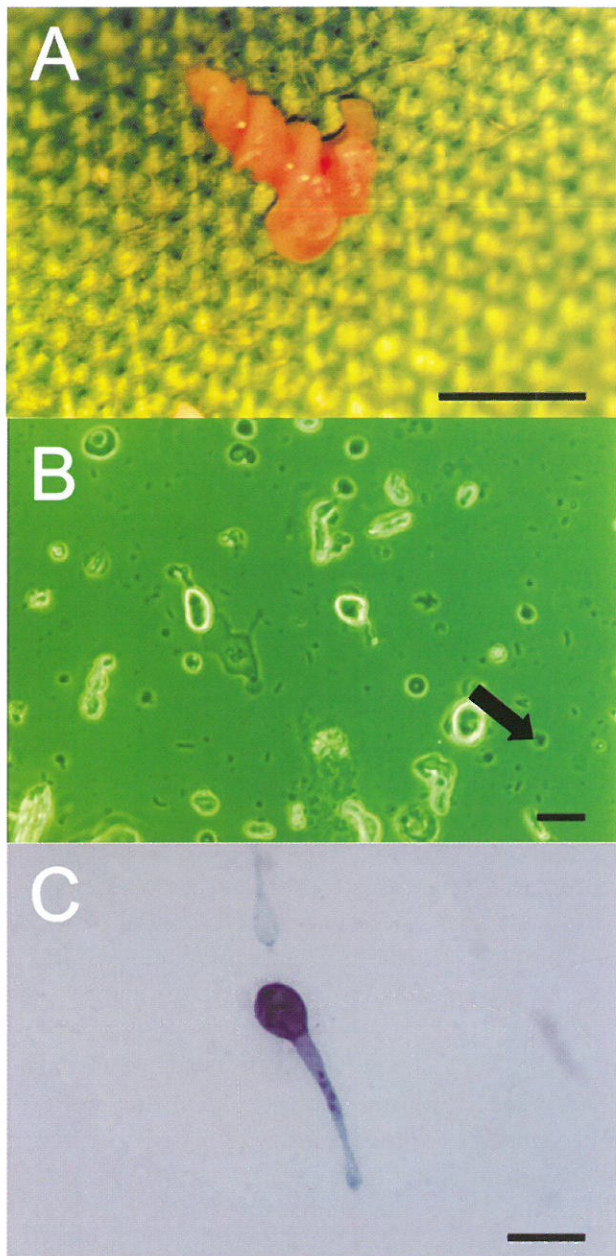
Ganglion spirale neuronok izolálása

Kísérleteinkhez 250–300 grammos 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 decapitáltuk. A preparálás további lépéseit túlhűtött, Na^+ -mentes, mesterséges cerebrospinalis oldatban (aCSF, az összetételét lásd később) végeztük. A ganglion spirale feltárása érdekében először eltávolítottuk az os temporálét, majd a bullát megnyitva láthatóvá vált a csontos cochlea. A csontos cochlea külső felszínét borító csontlemezt felpattintva előtűnt a ganglion spirale neuronjait tartalmazó modiolus (1/A. ábra).

A modiolus izolálását követően azt néhány apróbb darabra törtük, majd az így nyert szövetdarabkákat enzimkezelésnek vetettük alá. Az emésztés 31°C -on, 95% O_2 /5% CO_2 gázkeverékkel folyamatosan buborékolatott aCSF-ben (cerebro-spinalis fluidum) 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 tripszininhibitor (I-S; Sigma) 2–3 percen át történő alkalmazásával állítottuk le. A neuronok végső izolálására igen óvatos mechanikai triturálással került sor, majd a sejteket fedőlemezre ülepítettük. A kísérletek egy részében a sejtek ülepítése poly-D-lisinnel előkezelte fedőlemezre történt, amitől a sejtek erősebb letapadását reméltük. A mintegy 30 perc hosszú ülepítési periódust követően a fedőlemezhez immár erősen tapadó neuronokat HEPES-sel (N-2-hydroxyetil-piperazin-N-2-etaszulfonicacid) pufferelt aCSF-el mostuk át a szövettörmelék és az elpusztult sejtek eltávolításának céljából.

Az alkalmazott oldatok

Az aCSF összetétele a következő volt (mM-ban): NaCl 125; KCl 2,5; glükóz 10; NaH_2PO_4 1,25; NaHCO_3 26; CaCl_2 2; MgCl_2 1; mioinozitol 3; asz-



1. ábra: I. típusú ganglion spirale neuronok izolálása tengerimalac os temporalejából. Az ábra A részén az os temporaléból kipreparált modiolus látható. Az ábra B része az izolált I. típusú ganglion spirale neuronok fáziskontraszt-mikroszkópos képét demonstrálja. Jól megfigyelhető a sejtek éles kontúrja, és az azok kettőtörő sajátossága. A myelinhüvely maradványa ugyancsak megfigyelhető. A C ábra egy ganglion spirale neuron neuron specifikus enoláz immunreakcióját mutatja (A háttérfestés metilzölddel történt.) Kalibráció: az A paneleken 5 mm, míg a B és C paneleken 10 μ m.

korbinsav 0,5; Na-piruvát 2. Az oldat Na^+ -mentes változatában a NaCl-ot szacharózzal (250 mM) helyettesítettük. A HEPES-pufferelt aCSF összetétele (mM-ban): NaCl 135; KCl 3; glükóz 10; HEPES 10;

szacharóz 45; CaCl_2 2; MgCl_2 1. A fenti oldatok pH-ja 7,2 volt; azok ozmolaritását folyamatosan ellenőriztük (Automatic Osmometer; Knauer, Germany) és szükség esetén szacharóz hozzáadásával tartottuk 330 mosm/l értéken. Valamennyi vegyszert a Sigma (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltuk.

A pipettaoldat összetétele az alábbi volt (mM-ban): KCl, 130; HEPES, 10; MgCl_2 , 1; EGTA, 5; Na-GTP, 0,5; $\text{K}_2\text{-ATP}$, 2; az oldat pH-ja 7,3, míg ozmolaritása 335 mosm/l volt.

A mérések során az extracelluláris oldatot (HEPES-pufferelt aCSF) folyamatosan cseréltük, míg a különböző gátlószereket egy gyors oldatcserét lehetővé tevő mikroperfúziós rendszer segítségével alkalmaztuk, amely a kívánt szereket közvetlenül a sejtek környezetébe juttatta.

Az elektrofiziológiai mérések

Méréseink során a *patch-clamp* technika egész-sejtes konfigurációját alkalmaztuk. A mikroelektrodákat vékony falú boroszilikát üvegcsövekből készítettük (Clark Electromedical Instruments, Reading, UK), és ezen 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-, valamint áram-clamp konfigurációját egyaránt alkalmaztuk (Hamill et al. 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 sejt-kapacitás kompenzálása elektronikusan történt. A jelen dolgozatban bemutatott adatok az egyes eredmények átlagait, és azok standard deviációját tükrözik.

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 között értékeken, 10 mV-os lépésenként), majd az előimpulzus alatt aktiválódó áram utóáram-komponensének nagyságát vizsgáltuk a -60 mV-os tesztimpulzus alatt. Az így kapott utóáram-amplitúdót a legnagyobb értékre (azaz a -140 mV-os előimpulzus után mérhetőre) állítottuk, és az így kapott értékeket az alkalmazott előimpulzus függvényében ábrázoltuk. Az így nyert pontsor egy szigmoid görbét eredményezett, amit a Boltzmann-eloszlás függvényével illesztettünk, a következő egyenlet felhasználásával:

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

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.

Az adatok analízise során a szignifikanciát kétmintás t -próbával ellenőriztük. A különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a $p < 0,05$ feltétel teljesült.

Immuncitokémia

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

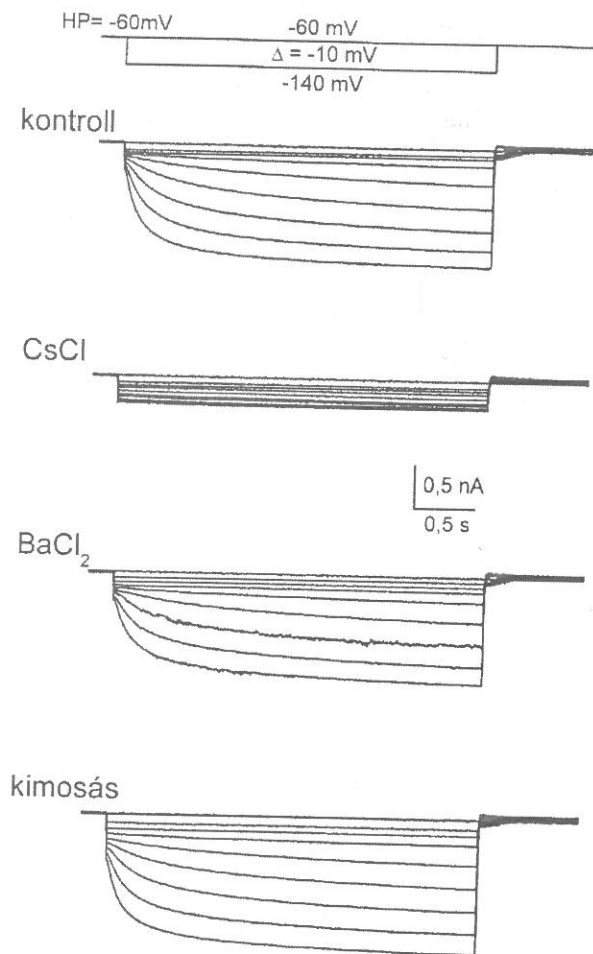
A sejtizolálást és a neuronok letapadását követően 4°C -os, 4% koncentrációjú acetone 10 percen át történő alkalmazásával fixáltuk a sejteket, majd az endogén peroxidáz-aktivitás gátlására került sor 0,5% töménységű H_2O_2 metanolos oldatában (30 perc, szobahő). A fenti lépéseket a neuronok desztillált vizes öblítése követte. Az antigének feltárását 0,01 M-os PBS-citrátpuffer ($\text{pH} = 6,0$) jelenlétében, kuktában végeztük (2 perc). Ezt követően a sejteket PBS-ben ($\text{pH} = 7,5$) 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 vizualizáltuk. A sejtek ismételt mosását (3 x 5 perc, PBS) a sejtmagok háttérfestése követte (metilzöld, VECTOR), majd a sejteket dehidráltuk, végül beágyaztuk.

Eredmények

A sejtizolálás után mind az I., mind a II. típusú ganglion spirale neuronok megfigyelhetőek voltak a tárgylemezen. Annak érdekében, hogy a kísérleteinket teljes bizonyossággal az I. típusú sejteken hajtsuk végre, méréseinkhez bi- vagy unipolaris megjelenésű, legalább $10\ \mu\text{m}$ átmérőjű neuronokat kerestünk (Moore et al., 1996). Az ezen feltételek szerint kiválasztott sejtek rendszerint rendelkeztek a valóshüvelyük maradványaival is (1/B. ábra). Amint az az ábrán látható, a vizsgálatra kiválasztott neuronok éles kontúrral és tiszta citoplazmával rendelkeztek, és többnyire a nyúlványaik is azonosíthatók voltak. Bár a fent említett, igen szigorú kritériumok alkalmazása sem zárta ki, hogy esetleg II. típusú neuronokat is vizsgálhattunk a jelen munka keretein belül, a II. típusú ganglion spirale neuronok ritka előfordulása és az igen következetesen alkalmazott sejtválasztási szempontok biztosították, hogy a jelen munkához csak I. típusú ganglion spirale neuronokról származó adatokat használjunk fel. Említést érdemel, hogy a mindösszesen 51 sejt közül, amelyeket a jelen tanulmányban vizsgáltunk, csupán hetet értékeltünk „lehetséges” vagy „valószínű” II. típusú neuronként, és az ezekről nyert mérési eredményeket az adatkiértékelés során nem vettük figyelembe.

Az elektrofiziológiai méréseket megelőzően immuncitokémiai festéseket végeztünk annak igazolására, hogy az általunk izolált és tanulmányozott sejtek valóban neuronok. Az 1. ábra C része NSE specifikus immunreakciót mutat. Fontos megjegyezni, hogy az erőteljes immunpozitivitást mutató sejtek nagyfokú hasonlóságot mutattak a fáziskontraszt-mikroszkópos kép alapján I. típusú ganglion spirale sejtekként azonosított neuronokkal. A kérdéses sejtek gömb alakú, vagy kissé elnyújtott sejttesttel rendelkeztek, és általában a nyúlványaik is megtartottak voltak (1/C. ábra).

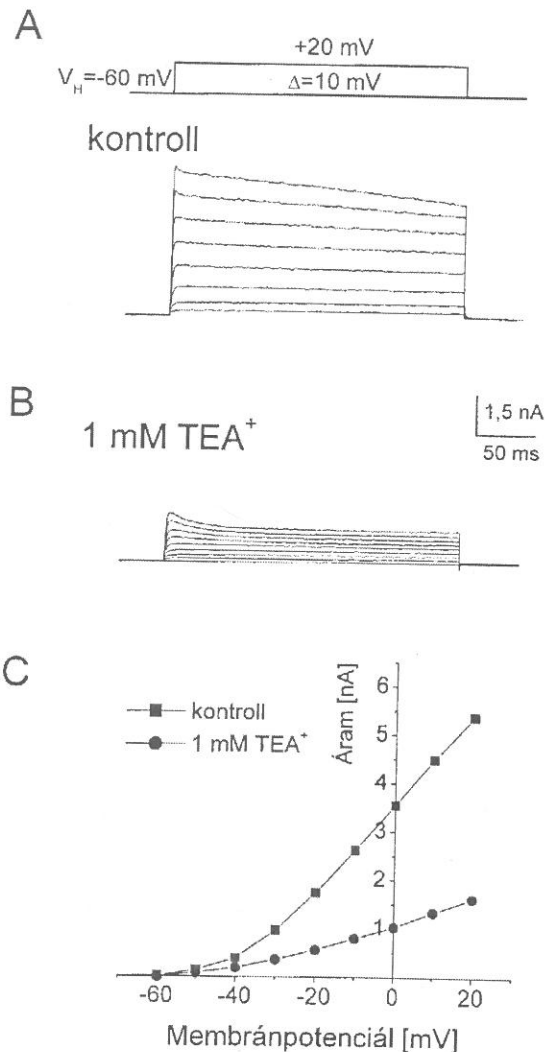
A kísérleteink során tanulmányozott sejtek alapvető egyedi elektrofiziológiai jellemzői gyakorlatilag megegyeztek, igazolván, hogy az általunk vizsgált sejtek mindegyike az I. típusba tartozó ganglion spirale neuron volt. A jelen munkában tanulmányozott valamennyi sejtet alapul véve az átlagos sejtkapacitás $9 \pm 2\ \text{pF}$ ($n = 51$) volt, míg az átlagos nyugalmi membránpotenciál értéke $-62 \pm 9\ \text{mV}$ -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 procedura megfelelő voltát jelzi. Figyelembe véve a ganglion spirale neuronok előbb meg-



2. ábra: I. típusú ganglion spirale sejtek hiperpolarizáció-aktivált árama. Ezen kísérletekben 3 s hosszúságú hiperpolarizáló stimulusokat alkalmaztunk -60 mV-os fenntartópotenciálról. Az impulzusprotokoll során -10 mV-os lépcsőkben maximálisan -140 mV-ig hiperpolarizáltuk a sejteket. Hasonló impulzusprotokollt alkalmaztunk 1 mM CsCl, 1 mM BaCl₂ jelenlétében és végül ismét a kontroll oldatban.

határozott nyugalmi membránpotenciálját, a kísérletek során általában -60 mV-os tartópotenciált alkalmaztunk.

A 2. ábra az I. típusú ganglion spirale neuronok hiperpolarizáció hatására aktiválódó ionáramát mutatja. A vizsgált sejt hiperpolarizáló impulzus hatására egy lassan aktiválódó, befelé irányuló áramot produkált, amely a 3 s hosszú stimulus alatt észrevehető inaktivációt nem mutatott. Ezen áram igen lassú aktivációja alapján, valamint azt a tényt is figyelembe véve, miszerint egér (Mo and Davis, 1997b) és tengerimalac ganglion spirale (Chen, 1997) sejtjein is bizonyították egy hiperpolarizáció hatására aktiválódó kevert kationkonduktancia jelenlétét arra következtethettünk, hogy az itt bemutatott áram ugyancsak megfelel a h-áramnak.



3. ábra: TEA⁺ hatása tengerimalac ganglion spirale neuronok depolarizáció-aktivált ionáramaira. Kísérleteinkben 200 ms hosszúságú depolarizáló négyszögimpulzusokat alkalmaztunk -60 mV-os tartópotenciálról, 10 mV-os lépcsőkben, $+20$ mV maximális depolarizációig (A). A B ábrán látható áramok 1 mM TEA⁺ alkalmazását követően kerültek rögzítésre. Az ábra C része a kontroll (telt négyzet) és a TEA⁺-ra érzéketlen (telt kör) áramok áram-feszültség összefüggéseit mutatja be.

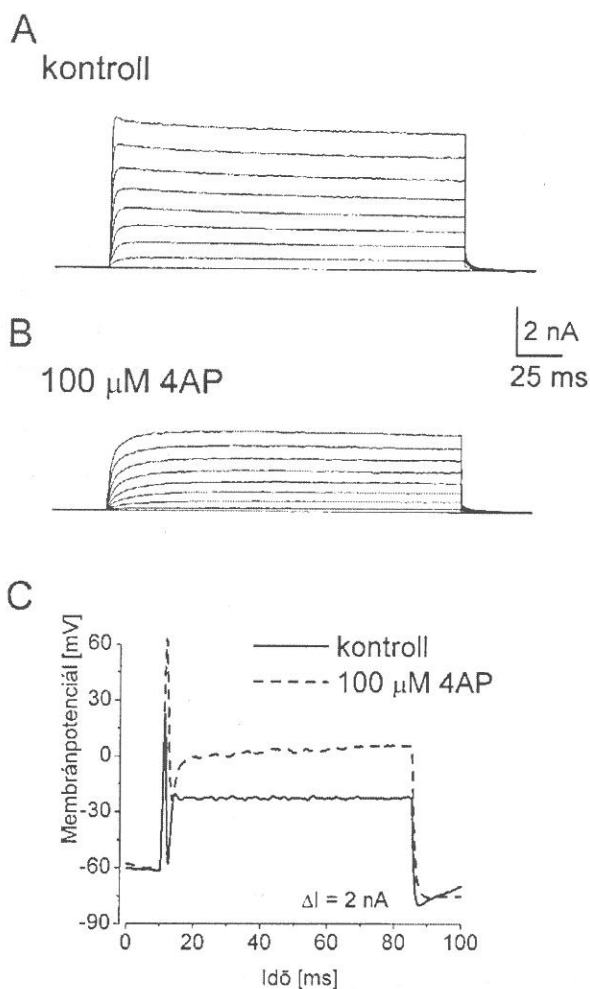
A 2. ábra demonstrálja az I. típusú ganglion spirale neuronoknak az 1 mM CsCl és 1 mM BaCl₂ jelenlétében kiváltott válaszait is. Megfigyelhető, hogy a hiperpolarizáció által aktivált áram Cs⁺ alkalmazásával igen hatékonyan gátolható, míg a Ba²⁺ ennél lényegesen kisebb hatást fejtett ki ugyanarra az áramkomponensre. A szerek hatása kontroll oldatban teljesen revertálhatónak bizonyult. Valamennyi vizsgált sejtet figyelembe véve 1 mM CsCl jelenlétében az áram $97 \pm 1\%$ -a; ugyanakkor BaCl₂ alkalmazása során annak csak $24 \pm 8\%$ -a bizonyult gátolhatónak.

A -60 mV-os fenntartópotenciálról alkalmazott, 200 ms hosszú depolarizáló négyszögimpulzusok alkalmazása során a 3. ábra A részén feltüntetett áramot regisztrálhattuk. A bemutatott és az ahhoz hasonló regisztrátumok alapján megállapíthattuk, hogy a vizsgált sejtek többféle depolarizáció által aktivált K^+ -árammal is rendelkeztek. Ezek legjelentősebbike egy inaktivációt nem mutató áram volt, melynek aktivációja -40 mV-on vagy annál erőteljesebb depolarizáció esetén volt tapasztalható. Ezen fenntartott áramkomponens mellett egy másik, inaktíváló áram is megjelent, azonban kontroll körülmények között ez a komponens nem tűnt jelentősnek, és aktiválódása csak igen erőteljes depolarizáció alkalmazása esetén (+10 – +20 mV) volt nyilvánvaló. A különböző kifelé irányuló áramkomponensek különválasztása érdekében többféle K^+ -csatorna gátlószert is alkalmaztunk. A kísérletek első fázisában TEA⁺-át (tetra-etil-ammonium) használtunk, ami igen erőteljesen gátolta a kialakuló K^+ -áram jelentős részét (3/B. ábra). (Az egyes gátlószerek alkalmazása során megfigyelt hatások kvantitatív összehasonlítása az I. táblázatban található.) Figyelembe véve ezen komponens TEA⁺ iránti érzékenységét, valamint kinetikai tulajdonságait úgy tűnik, hogy a TEA⁺-érzékeny áramkomponens megjelenése döntően a késői típusú (delayed rectifier) K^+ -csatornák aktiválódásának tulajdonítható.

Az, hogy a TEA⁺ alkalmazására nem érzékeny áramkomponens valamivel gyorsabb inaktivációs tulajdonsággal bírt arra utalt, hogy az általunk vizsgált neuronok egy kifelé irányuló, tranziens jellegű K^+ -áramkomponenssel is rendelkeztek. Különösen érdekesnek tűnt az a megfigyelés, hogy a TEA⁺-rezisztens

komponens egy jelentékenynek mondható nem-inaktíváló frakciót (3/B. ábra), míg a TEA⁺-érzékeny áram egy prominens inaktíváló frakciót tartalmazott, bár ez utóbbi inaktívációja lassúbb volt, mint a TEA⁺-rezisztens komponens esetében tapasztalt inaktívációs sebesség. A 3/C. ábra az áram-feszültség karakterisztikáját mutat TEA és kontroll körülmények között.

A következő lépésben a 4-aminopiridin (4-AP) K^+ -áramokra kifejtett hatását is megvizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a már korábbiakban bemutatott impulzusprotokollokat alkalmaztuk. Megállapított-



4. ábra: 100 μ M 4-AP hatása a tengerimalac ganglion spirale neuronok depolarizáció-aktivált ionáramaira.

Kísérleteinkben 200 ms hosszúságú depolarizáló négyszögimpulzusokat alkalmaztunk -60 mV-os fenntartópotenciálról, 10 mV-os lépcsőkben, +20 mV maximális depolarizációig kontroll körülmények között (A) és 4-AP jelenlétében (B). A C panel demonstrálja 100 μ M 4-AP hatását az I. típusú ganglion spirale neuronok tüzelési mintázatára. Az ábrán feltüntetett esetben 70 ms hosszúságú 2 nA amplitúdójú árammaggal váltottunk ki akciós potenciált. A folyamatos vonal jelzi a kontroll, míg a szaggatott a 100 μ M 4-AP jelenlétében kiváltott válaszokat.

1. táblázat
A 0 mV-on meghatározott gátlás hatásossága $\pm$ SD [%]

Nyugalmi potenciál -60 mV				
Gátlószer	Csúcsáram	25 ms*	100 ms**	n
4AP				
2 μ M	73 $\pm$ 7	74 $\pm$ 7	72 $\pm$ 9	4
100 μ M	56 $\pm$ 13	56 $\pm$ 15	50 $\pm$ 10	7
30 μ M	27 $\pm$ 5	22 $\pm$ 7	19 $\pm$ 8	3
TEA				
10 μ M	81 $\pm$ 1	83 $\pm$ 1	84 $\pm$ 2	2
1 μ M	67 $\pm$ 8	75 $\pm$ 13	77 $\pm$ 13	6
DTX				
200 μ M	30 $\pm$ 9	30 $\pm$ 10	28 $\pm$ 10	4

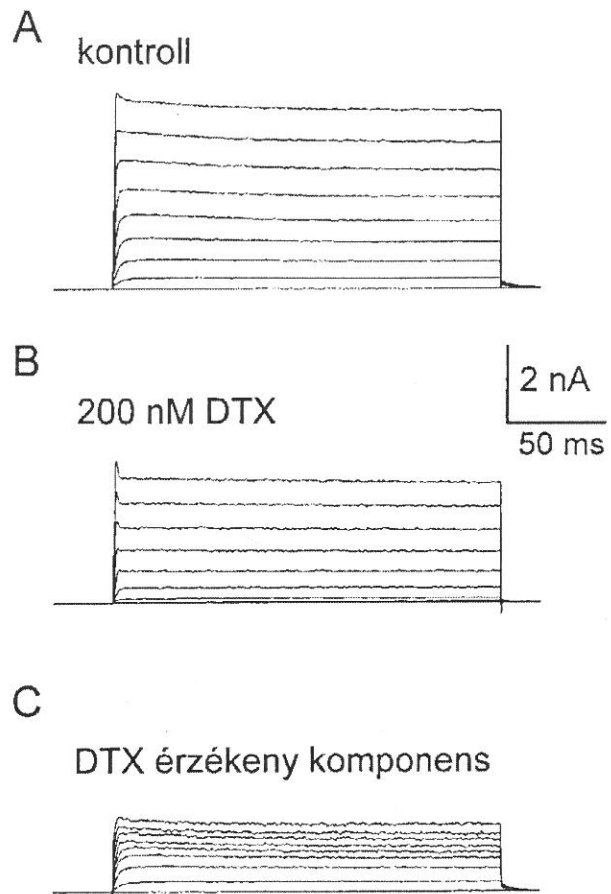
*: A hatást a depolarizáció kezdete után 25 ms-mal határoztuk meg

**: A hatást a depolarizáció kezdete után 100 ms-mal határoztuk meg

tuk, hogy 100 μM 4-AP jelenlétében mind a gyorsan, mind a lassan inaktíváló áramkomponens eltűnt, és pusztán egy lassan aktiválódó, ugyanakkor inaktivációt nem mutató áramféleség volt megfigyelhető (4/B. ábra). A kísérletek alapján szembetűnő volt, hogy a depolarizáció hatására aktiválódó K^+ -áramok érzékenyek 100 μM 4-AP alkalmazására (a gátlás mértéke $56 \pm 13\%$ volt; $n = 7$). Ezen igen nagymértékű 4-AP-érzékenységet mutató áram -50 mV-on és annál erőteljesebb depolarizáció alkalmazása esetén aktiválódott.

A 4-AP-érzékeny áramkomponens I. típusú ganglion spirale neuronok tüzelési mintázatát kialakító szerepének vizsgálata céljából a sejteket 70 ms hosszúságú, ingerküszöböt meghaladó amplitúdójú depolarizáló áramingerrel stimuláltuk (4/C. ábra). Kontroll körülmények között a neuron csupán egyetlen akciós potenciállal válaszolt az impulzus kezdetén, és ez a viselekedés 100 μM 4-AP jelenlétében sem változott, azaz a vizsgált sejtek esetében még a gátlószer jelenlétében sem figyelhattunk meg többszörös tüzelést ($n = 6$; 4/C. ábra). Az akciós potenciálok főbb jellegzetességei módosultak 4-AP jelenlétében. A legjelentősebb változások között megfigyelhattuk a megnövekedett csúcsamplitúdót, a lelassult repolarizációt, továbbá az akciós potenciál platója is alacsonyabb membránpotenciálon jelent meg. Ezen módosulások összhangban állnak azzal, hogy 100 μM 4-AP jelenlétében a repolarizációs erő jelentős hányada gátolt. Megfigyelhető volt még, hogy a gátlószer jelenlétében a sejtek nyugalmi membránpotenciálja pozitívabbá vált, ami arra utal, hogy a 4-AP érzékeny K^+ -áram szereppel bírhat az I. típusú ganglion spirale neuronok nyugalmi membránpotenciáljának kialakításában is.

A fentiekben részletezett, nagy 4-AP-érzékenységet mutató áram jelenléte azt sugallta, hogy az I. típusú ganglion spirale neuronok esetleg rendelkezhetnek egy dendrotoxinérzékeny (DTX) áramkomponenssel is. Ennek meghatározása céljából DTX-t alkalmaztunk az extracelluláris oldatban, amint azt az 5/A. és 5/B. ábra demonstrálja. Megfigyelhattuk, hogy a tengerimalac I. típusú ganglion spirale neuronjai valóban rendelkeztek egy DTX-érzékeny K^+ -áramféleséggel. A DTX-érzékeny áram kb. -50 mV-on aktiválódott, és viszonylag enyhe depolarizáció alkalmazása során jelentős volt a teljes áramhoz való hozzájárulása; ugyanakkor 0 mV-on a DTX-érzékeny komponens a kialakuló teljes K^+ -áramnak mintegy 30%-áért volt felelős. Megállapíthattuk továbbá, hogy a DTX-érzékeny áram csupán csekély mértékű inaktivációt mutatott (5/C. ábra). A fentiekben túlmenően vizsgáltuk még a DTX hatását az I. típusú



5. ábra: DTX hatása a tengerimalac ganglion spirale neuronok depolarizáció-aktivált ionáramaira. Kísérleteinkben 200 ms hosszúságú depolarizáló négyszögimpulzusokat alkalmaztunk -60 mV-os fenntartópotenciálról, 10 mV-os lépcsőkben, +20 mV maximális depolarizációig kontroll körülmények között (A), valamint 200 nM DTX jelenlétében (B). Az ábra C része a DTX-érzékeny komponenst mutatja, amit úgy kaptunk, hogy a kontroll körülmények között rögzített áramjelekből kivontuk a DTX jelenlétében kapott áramgörbéket.

ganglion spirale neuronok tüzelési mintázatára, és megállapíthattuk, hogy DTX alkalmazása sem változtatta meg ezen sejtek igen gyorsan adaptálódó tüzelési sajátosságait ($n = 4$).

Megbeszélés

Munkánk során tengerimalac ganglion spiraleból származó I. típusú neuronok membránsajátságait vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy ezen ganglionban két sejtípus is található, céljaink elérése érdekében 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 μm -t

(Moore et al., 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 sejtnak imponáló neuron fenntartott depolarizációra repetitív tüzeléssel válaszolt. Ezzel szemben tengerimalacban nem találtunk erre utaló bizonyítékot, mivel egyetlen általunk vizsgált 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 vizsgáltakhoz hasonlítottak. Ezen túlmenően a kiváltott akciós potenciálok legfontosabb sajátosságai, valamint a TEA⁺ alkalmazásának a depolarizáció-aktivált K⁺-áramokra kifejtett hatása ugyancsak igen hasonlatos volt a fenti tanulmányban leírtakhoz, ami nem csupán a megfelelő sejtselektációs procedura adekvát voltát igazolta, hanem azt is bizonyította, hogy a sejtizolálás során alkalmazott enzimkezelés a vizsgált neuronok alapvető membránsajátságait nem befolyásolta számottevően.

A jelen dolgozat egyik legfontosabb eredménye az a megállapítás, amely szerint nagyfokú hasonlóság fedezhető fel az I. típusú ganglion spirale neuronok és a hallópálya felépítésében résztvevő további idegsejtek (elsősorban a bushy-sejtek és a nucleus corporis trapezoidei fősejtjei) K⁺-árammintázata között. Valamennyi itt felsorolt neuron rendelkezik egy inaktivációt nem, ám TEA⁺-érzékenységet demonstráló áramkomponenssel, membránjukban expresszálódik továbbá egy nagy 4-AP-érzékenységet mutató, depolarizáció-aktivált K⁺-csatorna, és úgy tűnik továbbá, hogy mindannyian bírnak egy DTX-érzékeny árammal is. Ez arra utal, hogy ezen sejtek általános membránsajátságaiért és különösképpen a gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-mintázat megjelenéséért hasonló ioncsatorna-mintázat lehet felelős.

A jelentős hasonlóságok mellett azonban néhány számottevőnek mondható különbséget is hangsúlyozni érdemes. Annak ellenére, hogy a DTX-érzékeny áramkomponens valamennyi fent említett neuronban 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 az egyébként gyorsan adaptálódó tüzelést egy lényegesen lassabban adaptálódó mintázattá változtatta (Brew és Forsythe, 1995; Rathouz és Trussel, 1998; Rusznák et al., 2000), ugyanakkor hasonló behatás (azaz a DTX-érzékeny ionáram gátlá-

sa) 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 a központi hallórendszerben található egyéb neuronok eseteiben.

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 a megjelenő áram mindkét esetben kevert kationcsatornák aktivációjának volt köszönhető, így ezt a komponenszt a szerzők h-áramként azonosították. A jelen dolgozatban demonstrált hiperpolarizáció-aktivált áram alapvető paraméterei gyakorlatilag megegyeztek a Chen (1997) által korábban leírtakkal, amiből arra következtethetünk, hogy a sejtizolálásra használt enzimkezelés nem befolyásolta jelentősen az I. típusú ganglion spirale neuronok általános membránsajátságait.

Ismeretes, hogy a hallórendszer több egyéb sejt típusa is rendelkezik h-árammal (Golding et al., 1999; Bal és Oertel, 2000; Banks et al., 1993; Owens et al., 1999; Cuttle et al., 2001). Számos igen szerteágazó sejt funkció rendelhető ezen áramkomponenshez, egyebek között befolyásolhatja a nyugalmi membránpotenciál értékét (Maccaferri et al., 1993), megakadályozhatja egyes neuronok hosszantartó gátlását (Luo és Perkel, 1999), és 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 egyes neuronok membránsajátságainak módosulásaihoz, ahogyan azt ganglion spirale neuronokon (Mo és Davis, 1997), bushy-sejteken (Cuttle et al., 2001) valamint a nucleus corporis trapezoidei fősejtjein (Banks et al., 1993) már megmutatták.

A tengerimalac I. típusú ganglion spirale neuronjain kimutatott áramok lehetséges funkciói

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 kecsegtető, és kiválóan magyarázná az I. típusú ganglion spirale neuronok sejttestét borító myelinburok jelenlétét. A feltételezés értelmében a sejttesten igen nagy den-

zításban található K^+ -csatornák biztosítanak a sejt gyors repolarizációját, ami lehetővé teszi, hogy a sejt nagy frekvenciájú tüzelésre legyen képes. Valószínű, hogy a nem inaktiválódó K^+ -áram lenne elsősorban felelős ezen gyors repolarizáció kialakításáért (6. ábra).

A DTX-érzékeny komponensről ugyanakkor megmutatták, hogy kiemelkedően fontos szereppel bír számos más sejttípus esetén a gyorsan adaptálódó akcióspotenciál-mintázat kialakításában, ám ehhez az áramhoz nem lehetett hasonló funkciót rendelni az I. típusú ganglion spirale sejtek esetében. Ennek ellenére DTX és/vagy alacsony koncentrációjú 4-AP jelenlétében a nyugalmi membránpotenciál pozitívvá vált, ami arra utal, hogy ezen csatornák részben aktiváltak a nyugalmi membránpotenciál környékén, így hozzájárulhatnak a ganglion spirale neuronok nyugalmi membránpotenciáljának a kialakításához.

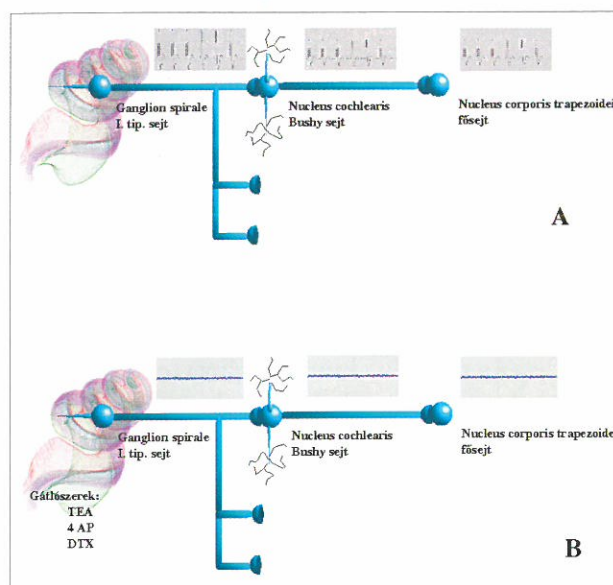
A tranziens áram szerepe továbbra is tisztázatlan marad. Az általunk vizsgált neuronokban nem játszottak jelentős szerepet azok tüzelési sajátosságainak kialakításában. Érdekes azonban azt is figyelembe venni, hogy a tranziens áram hozzájárulása a teljes K^+ -áramhoz eltérő lehet a ganglion spirale neuronok sejtesttjén és a szinaptikus végződéseiben. Ahogyan azt Sheppard és munkatársai (1992) felvetették ez az áramkomponens nagyobb jelentőséggel bírhat a ganglion spirale neuronok szinaptikus végződéseiben, ahol módosíthatja a szinaptikus transzmisszió hatékonyságát a szőrsejtek és a ganglion spirale végződések között, mivel a tranziens K^+ -áram aktiválódása megszüntetheti a szinaptikus transzmisszió által indukált depolarizációt a ganglion spirale terminalisokban. A sejtestt és az axonterminális ioncsatornamintázataiban tapasztalható különbségekről már történt beszámoló a nucleus cochlearis bushy-neuronjai esetében, amely sejteken az axonvégződés mérete lehetővé tette a közvetlen elektrofiziológiai méréseket. Ezen két helyen eltéréseket sikerült megmutatni a Ca^{2+} - valamint a h-csatornák eloszlásában és sajátosságaiban egyaránt (Doughty et al., 1998; Cuttle et al., 2001).

Köszönetnyilvánítás

A 6. ábra elkészítésében nyújtott segítségét köszönöm kollegámnak, Dr. Batta József Tamásnak.

Irodalomjegyzék

1. Bal, R. and Oertel, D.: Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I_h) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol*, **84**, 806–817, 2000.
2. Bal, T. and McCormick, D.A.: Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-



6. ábra: Tengerimalac ganglion spirale sejtjeiről és a centrálisabban fekvő magvakról elvezetett tüzelési mintázatok depolarizáció és gátlószerek alkalmazása során.

Az ábra A része sematikusan demonstrálja depolarizáció során, a ganglion spirale I. típusú sejtjein kialakult tüzelési mintázatot és ennek hatására a centrálisabban fekvő sejtekről elvezethető akcióspotenciál sorozatot.

Az ábra B részében láthatjuk gátlószerek (TEA, 4-AP, DTX) hatását a tüzelési mintázat alakulására, mely során megállapítható, hogy az ioncsatorna blokkolók a tüzelési aktivitást megszüntetik a ganglion spirale sejtjein, így a centrálisabban fekvő struktúrákról sem vezethető el akcióspotenciál.

activated cation current I_h . *J Neurophysiol*, **77**, 3145–3156, 1997.

3. Banks, M.I., Pearce, R.A. and 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.
4. Brew, H.M. and 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.
5. Chen, C. Hyperpolarization-activated current (I_h) in primary auditory neurons. *Hearing Res*, **110**, 179–190, 1997.
6. Cuttle, M.F., Rusznák, Z., Wong, A.Y.C., Owens, S. and 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.
7. Doughty, J.M., Barnes-Davies, M., Rusznák, Z., Harasztosi, Cs. and Forsythe, I.D.: Contrasting Ca^{2+} channel subtypes at the cell bodies and synaptic terminals of rat anteroventral cochlear bushy neurones. *J Physiol (Lond)*, **512**, 365–376, 1998.
8. Garcia-Diaz, J. F. Development of a fast transient potassium current in chick cochlear ganglion neurons. *Hear Res*, **135**, 124–134, 1999.

9. Golding, N.L., Ferragamo, M.J. and Oertel, D.: Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J Neurosci*, **19**, 2897–2905, 1999.
10. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, A., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85–100, 1981.
11. Jiménez, C., Giraldez, F., Represa, J., García-Díaz, J. F.: Calcium currents in dissociated cochlear neurons from the chick embryo and their modification by neurotrophin-3. *Neurosci*, **77**, 673–682, 1997.
12. Luo, M. and Perkel, D.J. A GABAergic, strongly inhibitory projection to a thalamic nucleus in the zebra finch song system. *J Neurosci*, **19**, 6700–6711, 1999.
13. Lin, X., Chen, S. and Tse, D.: Effects of quinine on the excitability and voltage-dependent currents of isolated spiral ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol*, **79**, 2503–2512, 1998.
14. Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A. and DiFrancesco, D.: Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol*, **69**, 2129–2136, 1993.
15. McCormick, D.A. and 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.
16. Mo, Z.-L., Davis, R.L.: Endogenous firing patterns of murine spiral ganglion neurons. *J Neurophysiol*, **77**, 1294–1305, 1997.
17. Mo, Z.-L., and Davis, R.L. Heterogeneous voltage dependence of inward rectifier currents in spiral ganglion neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 3019–3027, 1997.
18. 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.
19. 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. *British Neuroscience Association Abstracts*, **15**, P110, 1999.
20. Patuzzi, R., Robertson, D.: Tuning in the mammalian cochlea. *Physiol Rev*, **68**, 1009–1082, 1988.
21. Rathouz, M., Trussell, L.: Characterization of outward currents in neurons of the avian nucleus magnocellularis. *J Neurophysiol*, **80**, 2824–2835, 1998.
22. 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 (Lond)*, **526P**, 55, 2000.
23. 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.
24. 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.
25. Spoendlin, H.: Neural anatomy of the inner ear. In: *Physiology of the ear* (Jahn, A, Santos-Sacchi, J., eds.), Raven Press, New York, 201–219, 1988.
26. 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.
27. Yamaguchi, K., Ohmori, H.: Suppression of the slow K^+ currents by cholinergic agonists in cultured chick cochlear ganglion neurones. *J Physiol (Lond)*, **464**, 213–228, 1993.
28. 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.

ZUSAMMENFASSUNG: Unser Team untersuchte in den vergangenen Jahren das erste Komponent des Hörapparates im ZNS, den Nucleus cochlearis. Angesichts dessen, daß die in diesem Kern befindlichen Neuronen die Fasern des Nervus acusticus mit den Rezeptorzellen des Innenohres verbinden, erscheint es logisch, nun zu untersuchen, welche elektrophysiologischen Eigenschaften die Neurone im Ganglion spirale haben. Die Experimente wurden an 3–5 Monate alten Meerschweinchen durchgeführt. Die Tiere wurden in Narkose dekapitiert. Nach Öffnung des Schädels und Entfernung des Gehirns wurde die Kochlea freigelegt und der Modiolus sichtbar gemacht. Die weichen Gewebe wurden abgetragen, der Modiolus herausgenommen und an mehreren Stellen mit einer feinen Pinzette zertrümmert. Das so gewonnene Gewebe wurde 10 Minuten lang bei 31°C in einer Lösung von 0,3 mg/l Kollagenase und 0,12 mg/l Pronase getaucht, und danach die Enzymwirkung mit einem Trypsininhibitor der Konzentration 1 g/l gestoppt. Die Separation der Zellen geschah mithilfe sehr vorsichtiger mechanischer Trituration. Nach der Übertragung auf Objektträger und dem Anhaften der Zellen wurde ein Teil von ihnen mit der Ganzzellen-Konfiguration der patch-clamp-Technik untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß das mittlere Ruhe-Membranpotential der Zellen 62 mV und die mittlere Zellenkapazität 9 pF betragen. Auf Wirkung eines langfristig, überschwellig depolarisierenden Rechteckimpulses feuerten die Zellen ein einziges Aktionspotential zu Beginn des Impulses ab. Die genauer untersuchten Zellen des I-Typs produzierten auf Wirkung der depolarisierenden Rechteckimpulse eine Art von langsam aktivierendem, nach außen gerichtetem Strom, der bei Anwendung sowohl von 1 mM Tetraethylammonium als auch von 100 μ M 4-Aminopyridin und 200 nM Dextrotoxin gehemmt werden konnte. Auf Hyperpolarisation reagierten die Zellen mit einer langsam aktivierenden, nach innen gerichteten Stromkomponente, die mit 1 mM Cäsium und 1 mM Bariumchlorid gehemmt werden konnte. Die Wirkung ist reversibel.

SCHLÜSSELWÖRTER: Aktionspotential, 4-Aminopyridin, Dextrotoxin-I, Ganglion spirale, patch-clamp