

Ventral ve Dorsal Kök Aksonları Üzerine 4-Aminopiridin'in Farklı Etkileri The Different Effects of 4-Aminopyridine on Ventral and Dorsal Root Axons

İbrahim Kahraman*, Mustafa Güven**, Fatih Sefil**, Recep Dokuyucu***, İsmail Günay**

* *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Hatay*

** *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Adana*

*** *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Hatay*

ÖZET

Amaç: Motor ve Duysal sinir lifleri bir potasyum kanal blokörü olan 4-Aminopiridine karşı (4-AP) farklı yanıt verebilirler. Bu çalışmadaki amacımız sıçan ventral ve dorsal arka kök aksonlarının elektrofizyolojik özelliklerini 4-AP ve Birleşik Sinir Aksiyon Potansiyelleri (BSAP) aracılığı ile araştırmaktır.

Materyal-Method: Wistar türü erkek sıçanlar ether anestezisi altında karotoid arter kesisi ile hızlı bir şekilde sakrifiye edildi. Lumbar (L-4) ventral ve dorsal kök aksonları laminektomi yöntemi ile hızlıca çıkarılıp 95% O₂+5% CO₂ ile gazlandırılan soğuk Krebs içine alındı. 4-AP etkisini değerlendirmek için BSAP kayıtları modifiye sukroz-gap aparatı ile in vitro olarak ölçüldü. Tüm deneyler 20-22 °C yürütüldü.

Bulgular: Ventral köklerden kayıtlanan BSAP toplam süresi 4-AP uygulaması ile uzadı ve dinlenme değerine dönmesi gecikti. Dorsal köklerde ise toplam BSAP süresi ventral köklere göre en az iki kat daha fazla uzadı. Ayrıca dorsal köklerde 4-AP sonrası dinlenme değerine dönerken belirgin bir hump (hörgüç) gözlemlendi. Bu fenomen ventral köklerde görülmedi. Ventral ve dorsal köklerden kayıtlanan BSAP latansları sırasıyla 256 ± 24 ve 508 ± 69 µs, iletim hızı ise 20,4 ± 2,4 ve 10,8 ± 1,4 m/s olarak ölçüldü.

Sonuç: Bu çalışmada sıçan motor ve duysal aksonları üzerine 4-AP'nin çok farklı etkilere sahip olduğunu gösterdik. Motor ve duysal sinir lifleri üzerine 4-AP'nin farklı etkileri, bu sinirlerde bulunan miyelinli-miyelinsiz akson oranlarının ve akson çaplarının farklı olmalarından kaynaklanabilir. İlave olarak ventral ve dorsal kök aksonlarında nod veya paranodda bulunan potasyum-sodyum kanal farklılığından kaynaklanabilir.

Anahtar kelimeler: Ventral-Dorsal Kök, Aksiyon Potansiyeli, 4-Aminopiridin, Sukroz-gap

Geliş tarihi / Received: 05.11.2014

Kabul tarihi / Accepted: 22.12.2014

ABSTRACT

Aim: Rat motor and sensory nerve fibers may responses differently to the potassium channel-blocking agent, 4-aminopyridine (4-AP). In this study we examined the electrophysiological properties of rat ventral and dorsal root axons with 4-AP and compound action potentials (CAP's).

Materials-Methods: Male Wistar rats were sacrificed by rapid carotid exsanguinations' under ether anesthesia. Lumbar (L-4) ventral and dorsal roots were excised with laminectomy and immediately placed in a modified chilly Krebs solution saturated with 95% O₂, and 5% CO₂. To evaluate effect of 4-AP on the roots, CAP's were recorded in a modified sucrose gap chamber in vitro. All experiments were performed at 20-22 °C.

Results: The total duration of CAP obtained from the ventral root was prolonged by 4-AP and the return to baseline was delayed. The duration of CAP of the dorsal root more broadened than ventral roots at least two fold. The CAP of the dorsal roots developed a distinct hump when return to baseline. This phenomenon was not observed in ventral roots. The latency of ventral and dorsal root were 256 ± 24 and 508 ± 69 µs, conduction velocity 20.4 ± 2.4 and 10.8 ± 1.4 m/s, respectively.

Conclusion: In this study we showed that 4-AP has entirely different effects on rat motor and sensory axons. The differential effect of 4-AP on motor and sensory fibers may be due to differences in ratio of myelinated-unmyelinated axons and its diameters. In addition there may be differences node or paranode's potassium-sodium channels diversity in ventral and dorsal roots.

Key words: Ventral-Dorsal Root, Action Potential, 4-Aminopyridine, Sucrose-gap

İletişim adresi: İbrahim Kahraman, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Hatay

E-posta: ik.kahraman@gmail.com

GİRİŞ

Periferik sinirler miyelinizasyon, lif çaplarına göre çeşitlilik göstermekte, motor yada duysal işlevleri olabilmekte ve işlevleri gereği farklı elektrofizyolojik özellikler taşımaktadır.

Ayrıca aksonlarda aksiyon potansiyeli oluşumuna katılan voltaj kapılı K^+ ve Na^+ kanallarının yüzey dağılımları ve kinetikleri farklı alt tipleri de aksonun elektrofizyolojik özelliklerini belirlemektedir (1-5).

Bilindiği üzere sıçan siyatik siniri Lumbar 4-6 spinal segmentlerinden dal alıp toplamda ~27 bin bireysel aksondan meydana gelmiştir. Bu aksonların % 6'sı myelinli motor aksonlardan (ventral kökten), sırasıyla % 23 ve % 48'i miyelinli-miyelinsiz duysal aksonlardan (dorsal kökten) ve % 23'ü de myelinsiz sempatik aksonlardan (sempatik ganglionlardan) oluşmuştur (6).

Daha önceki çalışmalarımızda 4-Aminopiridin (4-AP) siyatik sinir ve siyatik sinirin distal dalları olan tibial (% 49 motor) ve sural (% 97 duysal) sinirler üzerindeki etkileri araştırılmış fakat lumbal seviyede dal aldığı ventral (motor) ve dorsal (duysal) aksonlar açısından incelenmemiştir (7,8).

Dorsal kök ve kutanöz duysal sinir liflerinde yapılan çalışmalarda farmakolojik ve kinetik olarak birbirinden farklı olan en az 3 tip Na^+ kanal akımları (hızlı ve yavaş) gösterilmiştir (9-11). 4-AP hızlı kinetikli voltaj-kapılı K^+ kanallarını spesifik bloklamak için kullanılmaktadır ve 4-AP etkisinde bırakılan bazı sinirlerde aksiyon potansiyelini takiben bazı depolarizasyonlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 1B). Daha sonraki çalışmalarda gecikmiş depolarizasyonların nedeninin yavaş kinetikli Na^+ kanallarından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Buna gecikmiş depolarizasyon (delayed depolarisation, del-dep) adı verilmiştir (11-15). Bu durum ilk defa sural sinirde miyelinli kutanöz afferent nöronların gövde ve aksonlarında belirlenmiştir, ancak ventral köklerde, motor aksonlarda ve kas afferent liflerinde gecikmiş depolarizasyonlar görülmemektedir.

Literatürde 4-AP'in periferik sinirlerdeki BSAP üzerine etkisi; sinir demetinin motor veya duysal (sensör) akson içeriğine göre çok farklı olabilmektedir (14-19). Önceki çalışmalarımızı tamamlayıcı nitelikteki bu deneysel araştırmada, 4-AP kullanarak ventral ve dorsal kök aksonlarındaki BSAP özellikleri araştırıldı

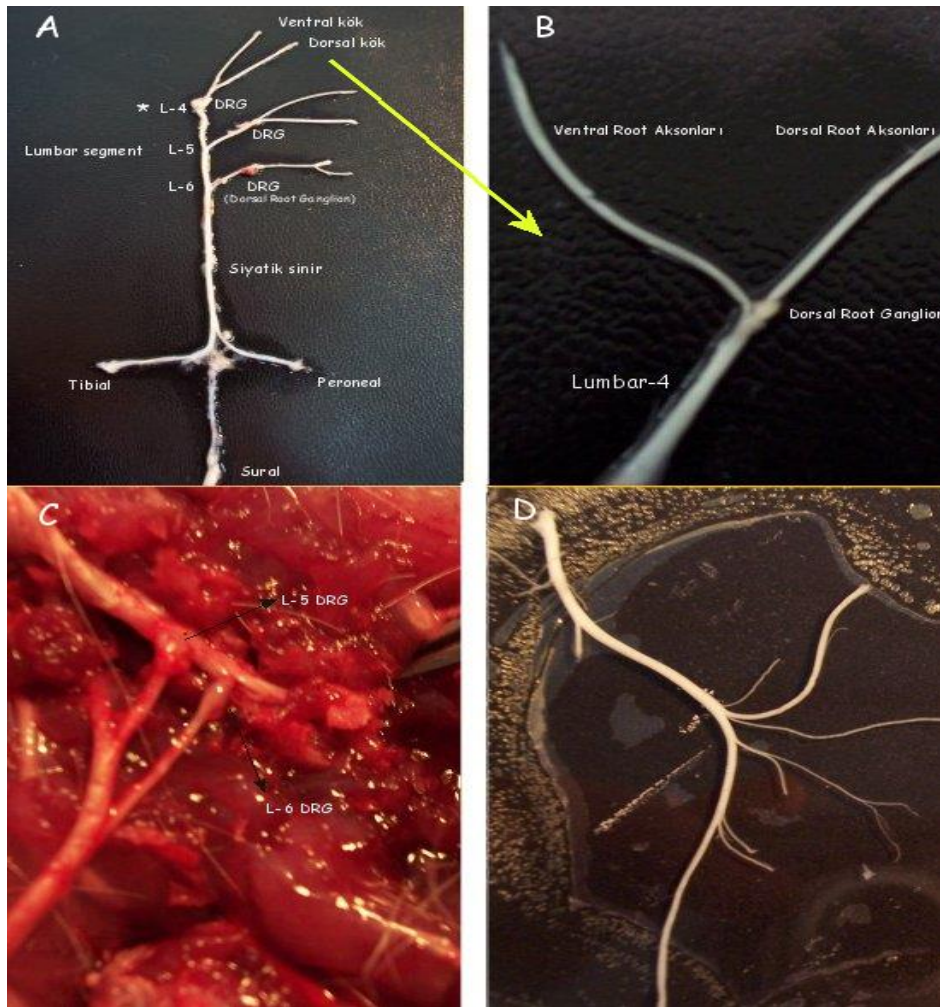
GEREÇ VE YÖNTEM

Deneilerimizde kullandığımız hayvanlar için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurul onayı (2008-6 No:27) alındı ve hayvanlarla ilgili tüm işlemlerde "Guide for the Care and Use

of Animals" kurallarına uyuldu. Sıçanlar standart kafeslerde serbestçe beslendi, gece-gündüz ritmi, ortam 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılarak sağlandı ve ortam sıcaklığı 20-22 °C, rölatif nemi % 40-60 olacak şekilde tutuldu.

Sinir Preparatı

Çalışmalarımızda Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından (TIBDAM) üretilen ve ağırlıkları 210-240 gram arasında olan 15 adet Wistar-Albino türü erkek sıçanlar iki gruba ayrılarak dorsal (Grup-I) ve ventral (Grup-II) kök akson demetleri kullanıldı (n=15). Sıçanlar eter anestezisi altında karotoid arter kesisi ile hızlı bir şekilde sakrifiye edildi. Lumbar (L-4) ventral ve dorsal kök aksonları lumbar laminektomi yöntemi ile hızlıca çıkarılıp 95% O₂+5% CO₂ ile gazlandırılan soğuk Krebs içinde dış kılıfları de-sheated (kılıfsızlaştırma) edildi. (Resim 1 A-D).



Resim 1. Ventral ve Dorsal sinir preparatının lumbar laminoktemi yöntemi ile çıkarılması. A) Siyatik sinirin proksimal ve distal dalları. B) L-4'ün dorsal ve ventral kökleri. C) Lumbar laminektomi ile kök çiftinin çıkarılması. D) Siyatik sinirin distal dalları.

İlaçlar ve Çözeltiler

Deneylerde kullanılan çözeltiler (mM olarak): *Krebs*; 124,0 NaCl, 3,0 KCl, 1,3 NaH₂PO₄, 2,0 MgCl₂, 2,0 CaCl₂, 26,0 NaHCO₃ ve 10,0 dekstroz. *KCl çözeltisi*; 120,0 KCl, 7,0 NaCl, 1,3 NaH₂PO₄, 2,0 MgCl₂, 26,0 NaHCO₃ ve 10,0 dekstroz. *İzotonik sukroz*; 320 mM sukroz. Çözeltilerin hazırlanmasında deiyonize-bidistile su kullanıldı ve gerektiğinde çözeltiler pH 7,4 olacak şekilde ayarlandı. 4-AP'in 2 mM'lık konsantrasyonu, modifiye krebs içerisinde çözüldü ve deneylerde sinire 30 dakikalık sürede uygulandı.

Elektrofizyolojik kayıtlar ve deney protokolü

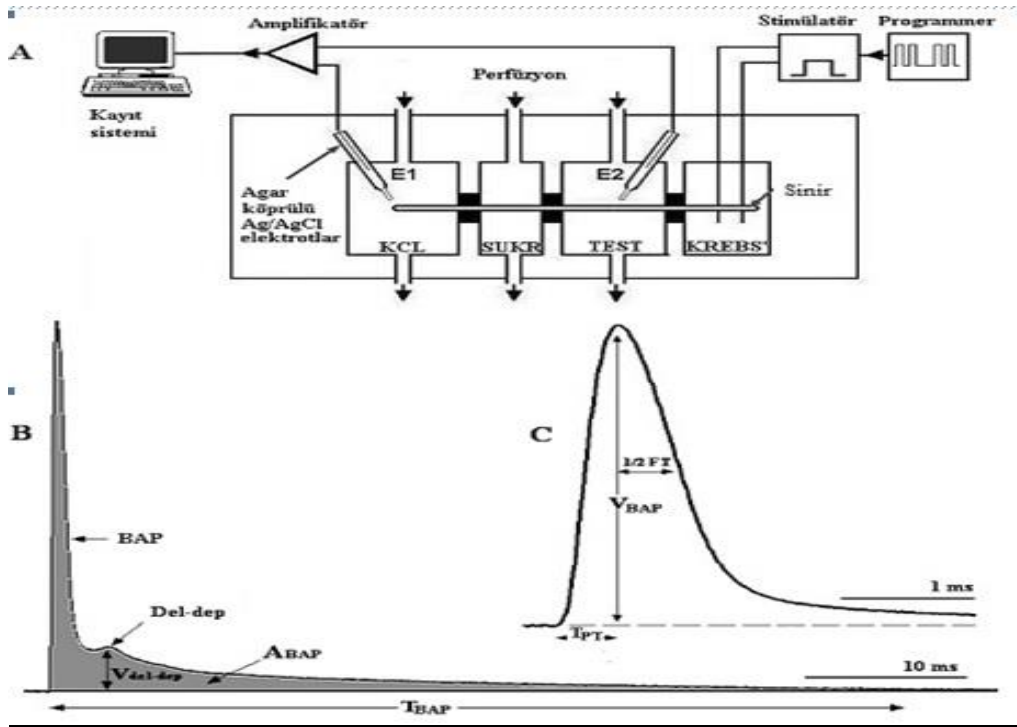
Sukroz-gap tekniğinin kullanıldığı deneylerde, BSAP ölçüldü. Sinir lifleri, 0.05 ms süreli supramaksimal elektriksel pulslar ile uyarıldı. Tonik uyarılar dakikada 1 uyarı (1 uyarı/dak.) olacak şekilde ayarlandı. 30 dakikalık ilaç uygulaması öncesinde kontrol kayıtları sonrasında ise 4-AP yanıtları tonik olarak kayıtları. BSAP' lerinin bilgisayara aktarılmasında MP150 data acquisition sistemi, kayıtların ölçülmesinde ise Acqnowledge 3.8.1 yazılımı kullanıldı.

Sukroz-Gap Sistemi

Deneylerde, BSAP ölçümünde bir in-vitro elektrofizyolojik teknik olan sukroz-gap tekniği ve sistemi kullanıldı (20). Bu sistem preparatın konulduğu sukroz-gap kutusu, perfüzyon sistemi, agar köprülü Ag/AgCl elektrotlar, yüksek giriş empedanslı amplifikatör (DAM 80 WPI), stimülatör (Grass S-48), stimulus izolasyon ünitesi (SIU5), stimülatör programlayıcısı, osiloskop (Kikusui 5529U) ve analog-dijital dönüştürücü kart takılı bilgisayardan oluşturuldu (Şekil 1 A). Sukroz-gap kutusunda, perfüzyon yapılabilen dört havuzcuk bulunmaktadır. Uyarı havuzcuğunda normal Krebs içinde bir çift platin uyarı elektrodu, test havuzcuğunda krebs veya test çözeltisi, sukroz havuzcuğunda izotonik sukroz ve KCl havuzcuğunda ise izotonik KCl bulunmaktadır. Çözeltiler dakikada 1-2 ml hızla perfüze edildiler. Sinir demeti, sukroz-gap aparatının tüm havuzcuklarından geçecek şekilde yerleştirildikten sonra havuzcuklar vazelin-silikon karışımı ile birbirinden izole edilmektedir. Test ve KCl havuzcukları arasındaki potansiyel farkı bu havuzcuklara daldırılmış agar-jel köprülü Ag/AgCl elektrotlarla ölçülmektedir.

İstatistiksel Analiz

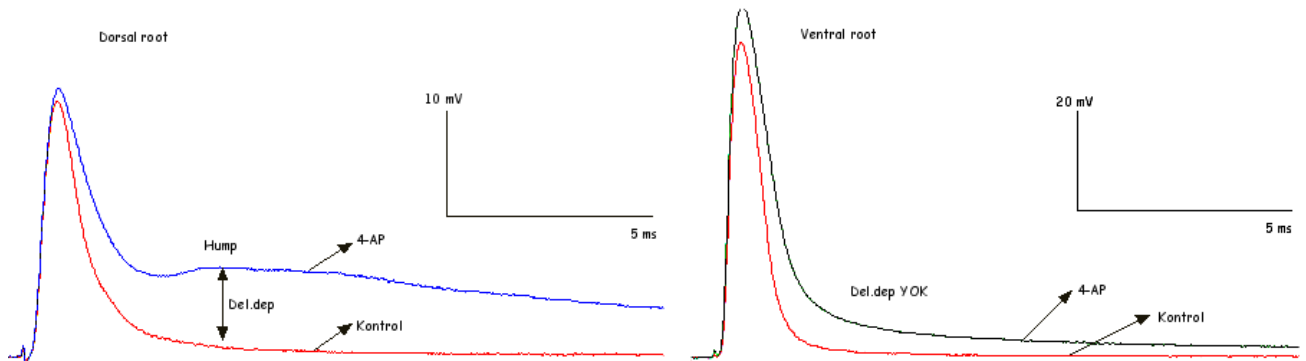
İstatistiksel hesaplamalar SPSS (vers.10) paket programı kullanılarak yapıldı. Bütün veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılıklar, One-way Anova testi ile belirlendi. Önemlilik düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi (21).



Şekil 1. A) Sukroz-gap sisteminin şematik görünümü. B) 4-Aminopiridin etkisinde kalan sinirinde oluşan gecikmiş depolarizasyonun (Del-dep, Hump, Hörgüç) C) Tipik bir sukroz-gap sistemi ile ölçülen Aksiyon Potansiyeli ve ölçülen parametreleri.

BULGULAR

Ventral köklerden kayıtlanan BSAP toplam süresi 4-AP uygulaması ile uzadı ve dinlenme değerine dönmesi gecikti. Dorsal köklerde ise toplam BSAP süresi ventral köklere göre en az iki kat daha fazla uzadı. Ayrıca dorsal köklerde 4-AP sonrası dinlenme değerine dönerken belirgin bir gecikmiş depolarizasyon gözlemlendi (Şekil 2). Gecikmiş depolarizasyonun genliği (6.0 ± 0.7 mV) BSAP genlik ortalamasınının ($12,3 \pm 2,4$) yaklaşık %50 sine kadar oluştuğu görüldü. Bu fenomen ventral köklerde görülmedi. Ventral ve dorsal köklerden kayıtlanan BSAP latansları sırasıyla 256 ± 24 ve 508 ± 69 μ s (Şekil 3, 4) olarak ölçüldü. Tablo 1'den de anlaşılacağı üzere diğer BSAP parametreleri arasındaki farklar oldukça açıktır.

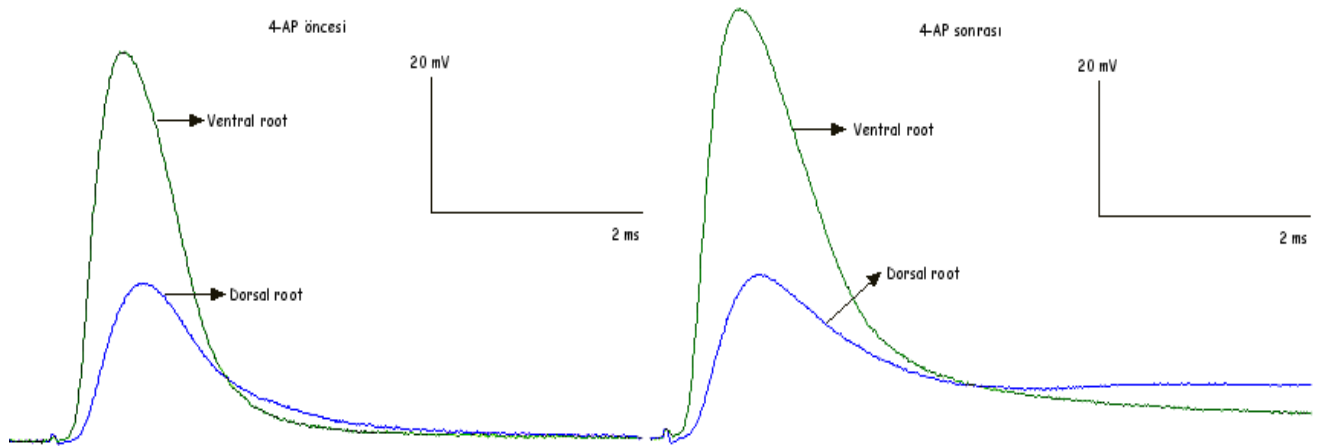


Şekil 2. 2 mM'lık 4-AP'in Dorsal ve Ventral kök aksonları üzerine farklı etkileri. (4-AP: 4-Aminopiridin). Dorsal köklerde 4-AP sonrası dinlenme değerine dönerken belirgin bir gecikmiş depolarizasyon gözlemlendi. Bu fenomen ventral köklerde görülmedi.

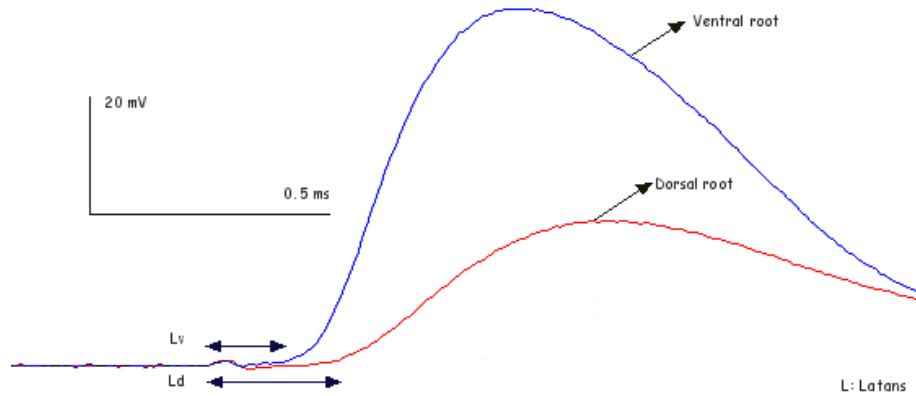
Tablo 1. Ventral ve Dorsal akson demetlerine ait BSAP parametreleri verilmektedir. Değerler ortalama \pm SEM olarak verildi. Akson demetlerine ait tüm BSAP parametrelerindeki değişimler $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.*

Gruplar n=15	BSAP (mV)	YS (ms)	½FT (ms)	Latans (ms)	Del-dep (mV)
G-II (ventral)	26,2 \pm 3,1*	680 \pm 65	582 \pm 46	256 \pm 24	<u>Yok</u>
G-I (dorsal)	12,3 \pm 2,4*	1144 \pm 64	901 \pm 71	508 \pm 69	6,0 \pm 0,7

½FT; Yarı Düşme süresi (½Falling Time), YS; Yükselme süresi



Şekil 3. 2 mM'lık 4-AP öncesi ve sonrasında BSAP'ların süre ve latanslarında meydana gelen değişimler. 4-AP: 4-Aminopiridin, BSAP: Birleşik Sinir Aksiyon Potansiyelleri.



Şekil 4. Dorsal ve ventral köklere ait BSAP'ların latanslarındaki belirgin farklılık. Dorsal kökün ventrale göre en az %50 daha yavaş iletim hızına sahip olduğu latanslarından anlaşılmaktadır. BSAP: Birleşik Sinir Aksiyon Potansiyelleri.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, sukroz gap yöntemi ve K^+ kanal blokerleri kullanılarak motor ve duysal akson demetlerinin K^+ kanal blokerleri ile ortaya çıkarılabilen farklılıkları gösterilmeye çalışılmıştır. 4-AP toksik bir ajan olup myelinli aksonlarda hızlı kinetik gösteren K^+ kanallarını spesifik olarak bloklamaktadır (7-10). Yapmış olduğumuz deneylerde ve literatürde in vitro yapılan çalışmalarda 4-AP'in kutanöz ve dorsal kök aksonlarında aksiyon potansiyeli sonrası hump denen bir gecikmiş depolarizasyona neden olmaktadır (11-13). Gecikmiş depolarizasyon, depolarizasyon sonrası potansiyellerden farklı olup hızlı K^+ kanallarının 4-AP ile bloklanması ile yavaş kinetik gösteren Na^+ kanallarının üzerindeki maskenin kalkması ile ortaya çıkmaktadır (14,15).

Her iki gruba da 4-AP uygulanmış olup dorsal kök aksonlarında yukarıda bahsedilen bir gecikmiş depolarizasyon genliği görülmüştür fakat bu fenomen ventral köklerde görülmemiştir (Tablo 1). Başka bir deyişle dorsal kök akson zarlarında yavaş kinetik gösteren Na^+ kanal yoğunluğunun başat olmasıdır. Ventral kök akson zarlarında ise aksine hızlı kinetik gösteren Na^+ kanal yoğunluğu başattır. Elde ettiğimiz bu veriler literatür ve daha önceki çalışmalarımızla uyumludur (7,8,9,14-19).

Bu çalışmada sıçan motor ve duysal aksonları üzerine 4-AP'nin çok farklı etkilere sahip olduğunu gösterdik. Motor (ventral) ve duysal (dorsal) sinir lifleri üzerine 4-AP'nin farklı etkileri, bu sinirlerde bulunan miyelinli-miyelinsiz akson oranlarının ve akson çaplarının farklı olmalarından kaynaklanabilir.

Elde ettiğimiz bulgulardan da görüldüğü gibi (Tablo 1) BSAP parametreleri olan genlik, yükselme süresi (YS), Yarı Düşme süresi ($\frac{1}{2}FT$) ve latansın ventral aksonlarda dorsal aksonlara göre yaklaşık iki kat daha hızlı olduğu görülmektedir. Bu durum dorsal kök aksonlarının ventrale göre daha yavaş iletim hızına sahip olduğunu göstermektedir. Bilindiği üzere sinirlerdeki iletim hızı aksonun myelizasyonuna, aksonun çapına ve akson zarındaki Na^+ kanal yoğunluğu ile yakından ilişkilidir. Ek olarak ventral ve dorsal kök aksonlarında nodal veya paranodal bölgelerde bulunan potasyum-sodyum kanal farklılığından kaynaklanabilir (16-19). Her iki sinir demetinin içerdiği toplam lif sayısı göz önüne alındığında ventral kök aksonlarının kalın-miyelinli-motor, dorsal kök aksonlarının ise ince-miyelinli/siz-duysal olduğunu söylemek mümkündür.

Bu çalışma siyatik sinir demetleri üzerindeki daha önceki çalışmalarımızın devamı niteliğinde olup aynı zamanda da gelecekte yapılması planlanan çalışmalara bilgi birikimi sağlama amacını taşımaktadır. Ayrıca motor ve duysal aksonların elektrofizyolojik özelliklerini daha iyi anlamak açısından yararlı bir çalışma olarak değerlendirilebilir.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan veriler, Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiş olan TF2008D2 kodlu projenin ön çalışmalarından elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Guyton and Hall. Medical Physiology, 9. ed. 1996: 57-72, 565-580.
2. William F. Ganong. Tıbbi Fizyoloji, 17.baskı, I.cilt, 1996: 61-75.
3. Junquiera LC, Carneiro J. Basic Histology: Text and atlas. 10. ed, New York, Lange Mc Graw Hill, 2003.
4. Ross MH, Pawlina W. Histology: A text and atlas. Baltimore, Philadelphia, 5. ed, Lipincott Williams&Wilkins, 2006.
5. Steven S. Scherer. Myelination: some receptors required. The Journal of Cell Biology, 2002;156(1):13–15.
6. H. Schmalbruch. Fiber Composition of the Rat Sciatic Nerve. The Anatomical Record 1986;215:71-81.
7. Mustafa GÜVEN, İbrahim KAHRAMAN, Filiz KOÇ, Hacer BOZDEMİR, Yakup SARICA, İsmail GÜNAY. The Effects of Oxcarbazepine on 4-Aminopyridine-Induced Afterpotentials on Isolated Rat Sural Nerves. Journal of Neurological Sciences [Turk] 2010;27:(2): 139-149.
8. Guven M, Kahraman I, Güneş Y, Gunay I.: Effect of Tramadol on peripheral nerves: An in-vitro electrophysiological study on the sural and tibial nerves of the rat. Journal of Medical Science (Türkiye Klinikleri). 2011;31(1).
9. Waxman SG, Ritche JM: Molecular dissection of the myelinated axon. Ann Neurol 1993;33:121-136.
10. Rizzo MA, Kocsis JD, Waxman SG. Slow sodium conductances of dorsal root ganglion neurons: intraneuronal homogeneity and interneuronal heterogeneity. J Neurophysiol. 1994 Dec;72(6):2796-815.
11. Honmou, O., Utschneider, D.A., Rizzo, M.A., Bowe, C.M., Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Delayed depolarization and slow sodium currents in cutaneous afferents. J. Neurophysiol. 1994;71:1627–1637.
12. Nonaka T, Honmou O, Sakai J, Hashi K, Kocsis JD. Excitability changes of dorsal root axons following nerve injury: implications for injury-induced changes in axonal Na⁺ channels. Brain Research. 2000;859:280-285.

13. Kocsis JD and Waxman SG. Ionic channel organization of normal and regenerating mammalian axons. *Progress in Brain Research*. Vol. 71. 1987.
14. Mert T, Güneş Y, Güven M, Gunay I and Göçmen C. Differential effects of lidocaine and tramadol on modified nerve impulse by 4-aminophyridine in rat. *Pharmacology*, 2003;69(2): 68-73.
15. Kocsis JD and Waxman SG. Membrane Organization and Myelin Remodelling in regenerating Axons. *Advances in Neurology*, Vol 47: Functional Recovery in Neurological Disease. 1988.
16. Sakai J, Honmou O, Kocsis JD, Hashi K. The delayed depolarization in rat cutaneous afferent axons is reduced following nerve transection and ligation, but not crush: implications for injury-induced axonal Na⁺ channel reorganization. *Muscle and Nerve* 1998;21(8):1040-7
17. Hildebrand C, Kocsis JD, Berglund S, Waxman SG. Myelin sheath remodelling in regenerated rat sciatic nerve. *Brain Research*. 1985;358:163-170.
18. Hildebrand C, Bowe CM, Remahl IN. Myelination and myelin sheath remodelling in normal and pathological PNS nerve fibers. *Progress in Neurobiology*. 1994; 43:85-141.
19. Fehlings MG, Nashmi R. Changes in pharmacological sensitivity of the spinal cord to potassium channel blockers following acute spinal cord injury. *Brain Research*. 1996;736:135-145.
20. Stampfli R.: A new method for measuring potentials with external electrodes. *Experienta*, 1954;10:508-509.
21. Beth Dawson, Robert G. Trapp. *Basic & Clinical Biostatistics*. April 15, 2001.