

***Helix aspersa* Sağ Pariyetal Gangliyon Nöronlarının Elektrofizyolojik Özellikleri**

Dr. Erdal AĞAR, Arş.Gör. Mehmet BOŞNAK,

Dr. Mustafa AYYILDIZ, Arş.Gör. Şerif DEMİR,

Dr. Faruk BAĞIRICI, Dr. Cafer MARANGOZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı SAMSUN

✓ Nöronların elektrofizyolojik özelliklerinin tanımlanması ve bu özelliklerin altında yatan iyonik mekanizmanın araştırılması giderek önem kazanmaktadır. *Helix aspersa*'nın subözofagial gangliyonu, içerisinde ringer solusyonu bulunan organ banyosuna tespit edilerek sağ pariyetal gangliyon nöronlarından *in vitro* şartlarda akım kısıpacı (current clamp) metodu kullanılarak hücre içi kayıtlar alındı.

Sağ pariyetal bölgenin medyal kısmında bulunan ve aynı elektrofizyolojik özelliklere sahip 4 hücreden süresi (duration) 5.1 ± 1.8 msn olan, büyük amplitüde sahip (80-100 mV) aksiyon potansiyelleri kaydedildi. Bu aksiyon potansiyellerinde overshoot (aşma) görülürken, undershoot (sonraki hiperpolarizasyon) yok denecek kadar küçüktü. Bu hücrelerde istirahat membran potansiyeli -52.8 ± 7.5 mV'du. Akım ile voltaj arasında doğrusal bir ilişki gözlemlendi. Aksiyon potansiyeli (AP) düzenli (regular) ve frekansı da 1.5 Hz'di. Sağ pariyetal gangliyonun lateral kısmında bulunan ikinci tip nöronlardan alınan kayıtlarda ise AP'nin iki ayrı frekans ve farklı biyofiziksel özelliklere sahip olduğu tespit edildi. Birinci dönemde frekans 3.5 Hz, ikinci dönemde ise bu değer 0.5 Hz'den daha azdı. Birinci dönemde hücrenin istirahat membran potansiyeli -38mV, AP amplitüdü ise 40 mV'du. İkinci dönemde hücre hiperpolarize olarak istirahat membran potansiyeli -65 mV'a düştü, AP amplitüdü ise 80-100 mV'a yükseldi. Birinci dönemde düzenli olan AP'leri ikinci dönemde düzensiz hale geldi. Bu durum, hücrenin başka bir nörondan spontan olarak ya eksitator veya inhibitör uyarın aldığı delili sayılabilir. Spontan olarak aktif olan bu hücrede kararlı durum (steady state) oluşmadığından akım-voltaj (I-V) ilişkisi tespit edilemedi.

Anahtar Kelimeler: *Helix aspersa*, aksiyon potansiyeli, hücre içi kayıt, akım kısıpacı, sağ pariyetal gangliyon.

✓ It becomes so important to understand the ionic mechanisms and intrinsic electrical properties of neurones. In this study, suboesophageal ganglia of *Helix aspersa* was just submerged in the organ bath with ringer solution and intracellular recordings were made from the right parietal ganglia neurones by using current clamp technique *in vitro*.

Action potentials (APs) were recorded from four cells having same electrophysiological properties and placed in the medial part of right parietal ganglia. The duration and amplitude were 5.1 ± 1.8 ms and 80-100 mV respectively. All action potentials overshooted and had a small hyperpolarization after AP (undershoot). Resting membrane potential of these cells was -52.8 ± 7.5 mV. The current-voltage (I-V) relationship was linear and the cell fired regularly with a frequency of 1.5 Hz. The APs of second type of neurones, placed in the lateral part of right parietal ganglia had different biophysical properties with two frequencies. In the first term, the frequency was 3.5 Hz and the resting membrane potential was -38 mV. The AP amplitude was 40mV. In the second term, the frequency was less than 0.5 Hz. The cell was hyperpolarized up to -65 mV and the amplitude of AP was increased up to 80-100 mV. The AP firing was regular in the first term and it became irregular in the second term. This may account for the evidence that the cell receive either excitatory or inhibitory signals spontaneously. The I-V relationship could not be determined due to the unsteady state in these cells.

Key words: *Helix aspersa*, action potential, intracellular recording, current clamp, right parietal ganglia

Nöron membranlarının elektrofizyolojik özelliklerinin araştırılması son yıllarda

gelişen kayıt metodlarıyla büyük bir hız kazanmıştır. Bu nöronların elektrofizyolo-

jik özelliklerinin altında yatan iyonik mekanizmanın tesbit edilmesi bilgisayarda nöron modellerinin hızla gelişmesini sağlamaktadır.

Helix aspersa'nın subözofagial ganglionunda bulunan bazı nöronlar elektrofizyolojik ve histolojik metodlar kullanılarak tanımlanmıştır⁽¹⁻³⁾. Bu çalışmalarda, hücrelerin histolojik özellikleri iyi çalışıldığı halde elektrofizyolojik özellikleri detaylı çalışılmamıştır. Büyük ve gözle görülebilen nöronların aşağıda belirtilen elektrofizyolojik özellikleri tesbit edilmiştir. Taylor, *Helix aspersa* subözofagial ganglionlarında bulunan büyük nöronların akım özelliklerini patch metodu kullanarak inceledi ve A tipi K⁺ akımının olduğunu tespit etti⁽⁴⁾. Meech yaptığı çalışmalarında Ca⁺² iyonunun aksiyon potansiyeli oluşumunu etkilediğini ileri sürdü⁽³⁾ Akaike ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda *Helix* nöronlarının Ca⁺² akımı içerdiği ve bu akımın ekstraselüler sıvıda Ni⁺², La⁺³, Cd⁺² ve Co⁺² kullanılarak bloklanabileceği bildirilmiştir⁽⁵⁾. Ayrıca Kerkut ve arkadaşları pariyetal siniri uyararak pariyetal ganglion nöronlarından kayıtlar almışlardır⁽⁶⁾. Alınan kayıtlarda inhibitör ve eksitator bazı nöronlar tanımlanmış ve bu nöronların elektrofizyolojik özelliklerinin birbirinden fazlaca farklı olmadıkları belirtilmiştir. Ancak, işaretleme yöntemi kullanılarak yapılan histolojik çalışmalarda çok daha fazla sayıda hücre tipi ve bunların morfolojik özellikleri tanımlanmıştır⁽⁶⁾.

Bu büyük nöronlarla bağlantı kurması muhtemel olan ara veya küçük temel nöronlar elektrofizyolojik olarak çalışılmamıştır. Bu nöronların elektrofizyolojik özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla bu çalışma yapılmış ve elektrofizyolojik bakımdan birbirinden farklı olan nöronlar

ayrı tip olarak tanımlanmıştır. Nöronların elektro fizyolojik özelliklerine göre tanımlanması elektrofizyolojide oldukça sık kullanılan metodlardan biridir^(1,7,8).

MATERYAL VE METOD

Yapılan çalışmada deney hayvanı olarak *Helix aspersa* (Kara Salyangozu) kullanıldı. Salyangoz kabuğundan çıkarılıp tespit edildikten sonra baş kısmından geriye doğru ince makasla diseksiyon yapılarak subözofagial ganglion açığa çıkarıldı. Nöronlar zedelenmeden ganglionla birlikte çıkarılarak önceden hazırlanan ringer solüsyonu (80 mM NaCl, 4 mM KCl, 10mM CaCl₂. H₂O. 5 mM MgCl₂ 6H₂O, pH 7.8) içerisinde 30 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda subözofagial ganglion, içerisinde 3 ml ringer solüsyonu bulunan organ banyosuna nakledildi^(6,9). Ganglionun dış ve iç membranı mikroskop altında açıldı.

Tüm deneylerde *Helix aspersa*'nın subözofagial ganglionundaki sağ pariyetal bölgenin medyal (4 adet) ve lateral (2 adet) kısmında bulunan 2 ayrı tip, toplam 6 hücreden, akım kısıpacı (current clamp) metoduyla, intraselüler kayıtlar alındı (Axoclamp-2B)^(7,10). Kayıt için, içleri 4mM KCl ile doldurulan filamentli cam mikroelektrodlar kullanıldı. Mikroelektrodların rezistansı 20-80 MΩ arasındaydı.

Hücre içerisine depolarize ve hiperpolarize edici akımlar verilerek I-V ilişkisi tespit edildi.

BULGULAR

Alınan kayıtlardan, uzun süreli olmayan ve çok küçük potansiyeller (dikensi potansiyeller) hücre zedelenmesi ve/veya dendrit potansiyeli olabileceği için sonuçlara dahil edilmedi. Uzun süreli alınan kayıtlarda sağ pariyetal ganglionun

farklı yerlerinde bulunan nöronların elektrofizyolojik özellikleri tespit edildi.

Sağ pariyetal gangliyonun medyal kısmında bulunan ve aynı elektrofizyolojik özelliklere sahip 4 hücreden, süresi (duration) 5.1 ± 1.8 msn olan büyük amplitüde sahip (80–100mV) aksiyon potansiyelleri kaydedildi (Şekil 1A). Spontan olarak aktif olan bu hücrelerin aksiyon potansiyelleri overshoot yapmaktaydı (Şekil 1B). Bu hücrelerde istirahat membran potansiyeli ortalama -52.8 ± 7.5 mV'du (ortalama \pm standart sapma). Aksiyon potansiyelinden sonra oluşan hiperpolarizasyon (undershoot) yok denecek kadar küçüktü ve tek bir faz içermekteydi. Hücre içerisine verilen pozitif akım hücrenin daha fazla AP oluşturmasına neden olmaktadır. Akım ile voltaj arasında anlamlı bir doğrusal ($r=0.97$ $df=4$) ilişki gözlemlendi (Şekil 2). AP'leri, düzenli (regular) ve frekansı da 1.5 Hz'di (Şekil 1B).

Sağ pariyetal gangliyonun lateral kısmında bulunan nöronların deşarj biçimi, medyalde bulunanlardakinden tamamen farklıydı. Bu hücrelerde iki ayrı dönemde oluşan iki farklı deşarj şekli vardı (Şekil 3). Birinci dönemde hücrenin AP'lerinin frekansı 3.5 Hz, ikinci dönemde ise bu değer 0.5 Hz'den daha azdı. Birinci dönemde hücrenin istirahat membran potansiyeli -38 mV, AP amplitüdü ise 40 mV'du. İkinci dönemde hücre hiperpolarize olarak istirahat membran potansiyeli -65 mV'a düşmekte, AP amplitüdü ise 80–100 mV'a yükselmekteydi. Birinci dönemde düzenli olan AP'leri ikinci dönemde düzensiz hale gelmekteydi. Her iki dönemde de hücreler spontan aktivite göstermekteydi. Bu durum, hücrenin başka bir nöronun spontan olarak ya eksitator veya inhibitör uyarana aldığı delili sayılabilir. Spontan olarak aktif olan bu hücrelerde kararlı

durum oluşmadığından I–V ilişkisi tespit edilemedi.

TARTIŞMA

Mevcut literatürler ışığında elde edilen bulgular tartışıldı. Kerkut ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sağ pariyetal bölgedeki 6. ve 7. hücrelerin süresinin (duration) 5 msn olduğu tespit edilmiştir⁽¹⁾. Bu çalışmada AP süresi olarak bulunan 5.1 ± 1.8 msn süre yazarların bulgularıyla paralellik arz etmektedir. Kerkut ve arkadaşları hücrelerin istirahat membran potansiyelini -58 mV olarak bulmuşlardı⁽¹⁾. Bu değer bizim çalışmalarımızda -52.8 ± 7.5 mV'du. Bu yakın değer bize *Helix aspersa* nöronlarının birbirine yakın istirahat membran potansiyeline sahip olduğu konusunda ipucu vermektedir. Kerkut ve arkadaşlarının yaptıkları deneylerde ise bu hücrelerden kaydedilen AP'lerinin amplitüdü 55 mV olarak bulunmuştur⁽¹⁾. Yapılan bu çalışmada ise amplitüd 80–100 mV olarak bulundu. Her iki araştırma bulguları arasında, AP amplitüdü bakımından yaklaşık iki kat kadar fark vardır. Bu farklılık nöronların membranında bulunan iyon kanal tipi ve sayısının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak aynı nöronların bu kadar geniş varyasyon gösterip göstermeyeceği gelecek çalışmaların araştırma konusudur. Her nedense şimdiye kadar yapılan çalışmalarda mikroskop altında rahatça gözlenebilen bu nöronların I–V ilişkisi tespit edilmemiştir. İlk defa bu çalışmada I–V ilişkisinin doğrusal olduğu tespit edildi. Nöronların tanımlanmasında I–V ilişkisi önemli bir elektrofizyolojik özellik olarak kullanılmaktadır^(10,11) Nöronların bu elektrofizyolojik özelliklerinin hangi iyonik mekanizma ile oluştuğu ise ayrı bir araştırma konusudur. Bu hücrelerin aksiyon potansiyelleri

A.

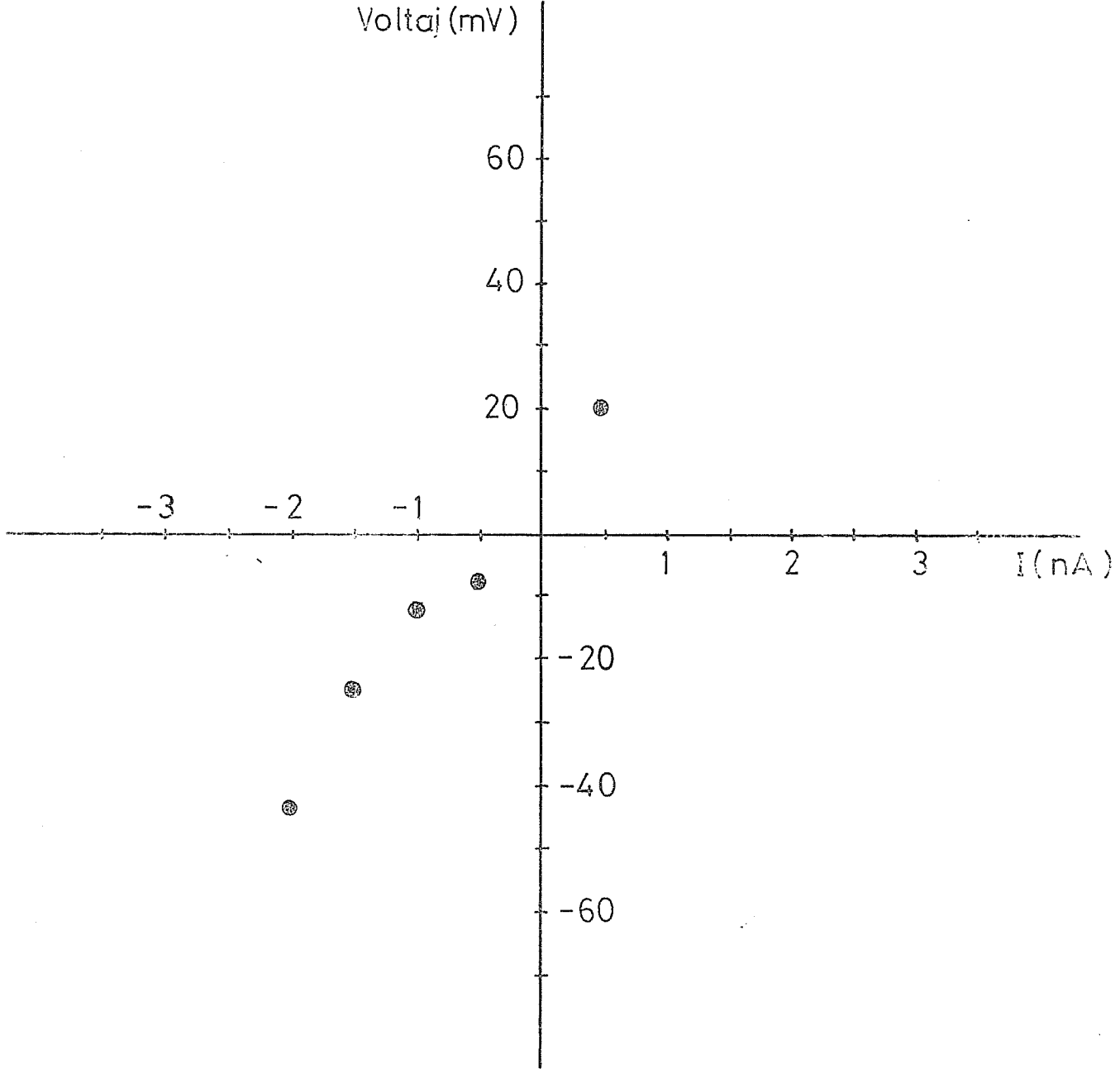


B.

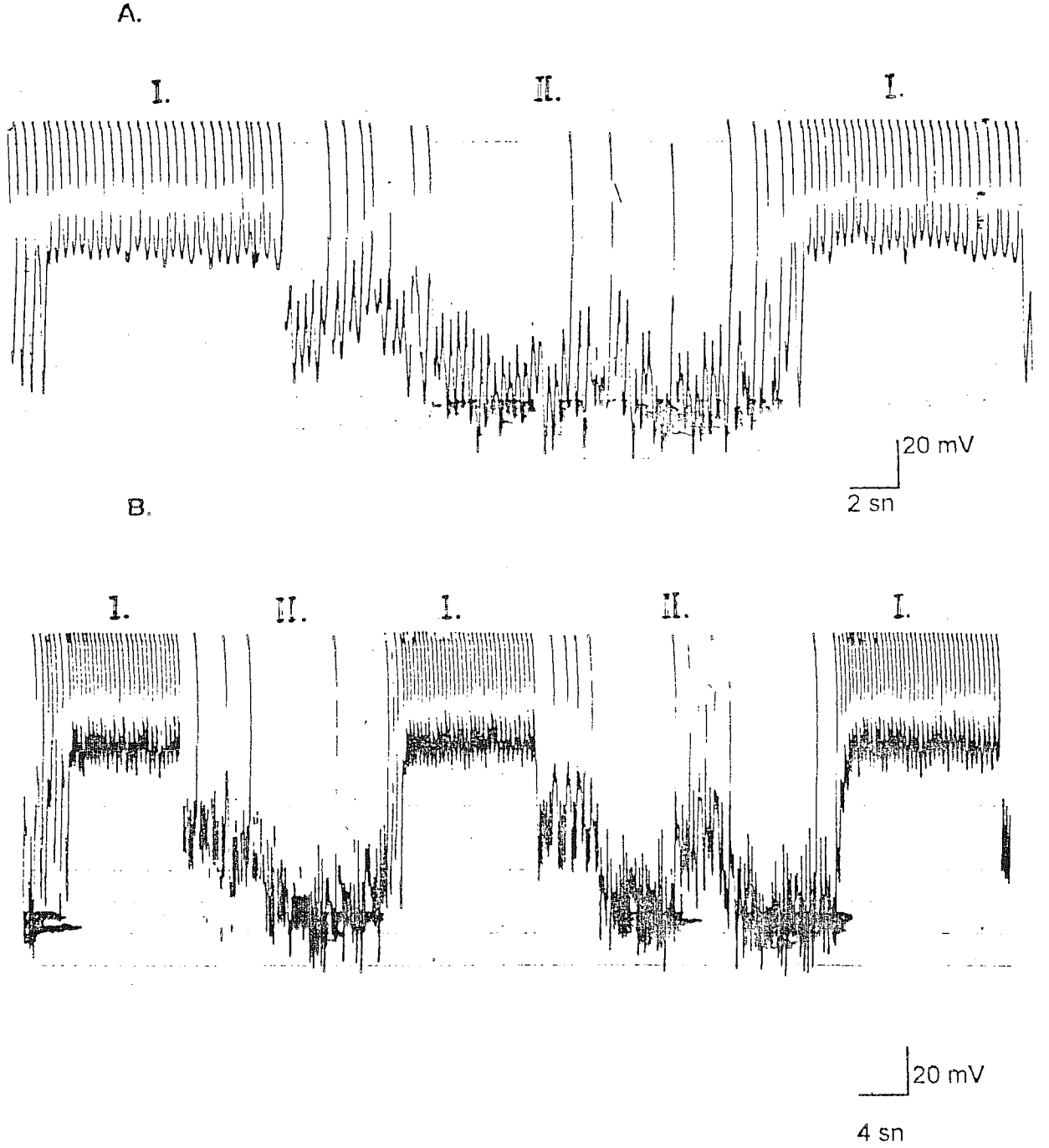


Şekil: 1. Medialdeki hücrelerden alınan spontan aktiviteler.

- A. 25 msn'de; 5.1 ± 1.8 msn duration'a ve 80-100mV'luk amplitüde sahip aksiyon potansiyeli.
- B. 2 sn'de; düzenli (regular) aksiyon potansiyelleri gösteren örnek bir kayıt.



Şekil:2. Sağ pariyetal gangliyonun medial kısmında bulunan ve aynı elektrofizyolojik özelliklere sahip hücrelerin doğrusal (linear) akım-voltaj ilişkileri ($r=0.97$, $df=4$). (I; akım, V; Voltaj)



Şekil:3. Sağ pariyetal gangliyonun lateral kısmındaki ikinci tip nöronlardan alınan; iki ayrı frekans ve farklı biyofiziksel özelliklere sahip potansiyellerin kayıtları.

A. 5mm/sn'de alınan iki farklı tip frekansa sahip potansiyeller.

B. 2.5mm/sn'de alınan iki farklı tip frekansa sahip potansiyeller.

Birinci dönemde (I.) frekansın 3.5 Hz, istirahat membran potansiyelinin -38 mV ve AP amplitüdünün 40 mV olduğu; ikinci dönemde (II.) frekansın 0.5 Hz'den daha aza indiği, hiperpolarizasyon sonucu istirahat membran potansiyelinin -65 mV'a düştüğü ve AP amplitüdünün ise 80-100 mV'a yükseldiği görülmektedir.

düzenli (regular) ve frekansı ise 1.5 Hz'di. Düzenli AP oluşturmanın A tipi K⁺ iyon kanalları tarafından kontrol edildiği bilinmektedir^(8,12) Muhtemelen bu hücrelerde de A tipi K⁺ iyon kanalları bulunmaktadır.

Sağ pariyetal gangliyonun lateral kısmında bulunan ikinci tip nöronların elektrofizyolojik özelliklerine benzer özellik gösteren nöronlara literatürde rastlanmadı. Bu nöronlardan alınan kayıtlarda AP'nin iki ayrı frekans ve farklı biyofiziksel özellikleri tespit edildi. Birinci dönemde frekansı 3.5 Hz, ikinci dönemde ise bu değer 0.5 Hz'den daha azdı. Birinci dönemde hücrenin istirahat membran potansiyeli -38 mV, AP amplitüdü ise 40 mV'du. İkinci dönemde hücre hiperpolarize olarak istirahat membran potansiyeli -65mV'a düşmekte, AP amplitüdü ise 80-100 mV'a yükselmekteydi. Birinci dönemde düzenli olan AP'leri ikinci dönemde düzensiz hale gelmekteydi. Bu durum, hücrenin başka bir nörondan spontan olarak ya eksitator veya inhibitör uyaran aldığı delili sayılabilir. Eğer hücrenin kararlı durumu -65 mV olarak kabul edilirse, hücre spontan eksitator uyaran alıyor demektir. Kesin olarak hangi tipte uyaran aldığı belirlenmesi ve bunun fonksiyonel önemini ne olduğu sinaptik blokerler kullanılarak araştırılabilir.

Helix aspersa'nın beyni olarak kabul edilen gangliyonlarda bulunan nöronların farklı elektrofizyolojik özelliklere sahip olduğu bu çalışmayla da anlaşılmıştır. Oysa, Kerkut ve arkadaşları, alınan kayıtlarda inhibitör ve eksitator bazı nöronları tanımlamış ve bu nöronların elektrofizyolojik özelliklerinin birbirinden fazlaca farklı olmadıklarını belirtmişlerdir⁽⁶⁾. Sunulan çalışmada kayıt alınan nöronlar arasındaki elektrofizyolojik farklılık hiç şüphesiz ki çeşitli iyonik mekanizmalarla kont-

rol edilmekte ve nörona farklı görev yapma şansını vermektedir. Bu iyonik mekanizmanın ne olduğu ve nörona nasıl bir görev yüklediği gelecek çalışmalarda araştırılacaktır.

Geliş Tarihi: 25.04.1996

Yayına Kabul Tarihi: 20.06.1996

KAYNAKLAR

1. Walker RJ, Lambert JDC, Wooldruff, GN and Kerkut GA. Action potential shape and frequency as criteria for neuron identification in the snail *Helix aspersa*. *Comp. Gen. Pharmac.*, 1970; 1:409-425.
2. Kerkut GA and Walker RJ. The pulmonate nervous system. In *The Biology of the Pulmonates.* London, Academic Press, In: Futter V (Ed.) 1974.
3. Meech RW. The sensitivity of *Helix aspersa* neurones to injected calcium ions. *J. Physiol.*, 1974; 237:259-227.
4. Taylor PS. Selectivity and patch measurements of A-current channels in *Helix aspersa* neurones. *J. Physiol.*, 1987; 388:437-447.
5. Akaike N, Lee K&Brown AM. The calcium current of helix neuron. *The Journal of General Physiology*, 1978; 71:509-531.
6. Kerkut GA, French MC and Walker RJ. The location of axonal pathways of identifiable neurones of *Helix aspersa* using the dye procion yellow M-4R. *Comp. Biochem. Pyhsiol.*, 1970; 32:681-690.
7. Oertel D&Wu SH. Morphology and physiology of cells in slice preparations of dorsal cochlear nucleus of mice. *The*

- Journal of Comparative Neurology, 1989; 283:228-274.
8. AĞar E. PhD. Thesis, Newcastle upon Tyne University, U.K., 1992.
 9. Kerkut GA&Meech RW. The effect of ions on the membrane potentials of snail neurone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1967; 20:411-430.
 10. AĞar E, Green GGR&Sandres DJ. Intracellular recordings from cochlear nucleus neurones of the mouse. *British Journal Audiology*. 1992; 26:201.
 11. Oertel D. Synaptic responses and electrical properties of cells in brain slices of the mouse anteroventral cochlear nucleus. *Journal of Neuroscience*, 1983; 3:2043-2053.
 12. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Second edition, Sunderland, Sinauer Assoc. Inc. Press, 1992.