

NORADRENALİN'İN FARE COCHLEAR ÇEKİRDEĞİNDEKİ STELLATE HÜCRELERİNİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ramazan Bal¹ @

Effects of Noradrenalin on the Activity of Stellate cells in Mouse Cochlear Nucleus

Özet: Bu çalışmada, noradrenalinin cochlear çekirdekdeki stellate hücrelerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Fare cochlear çekirdeğinde yer alan stellate hücrelerinden tüm hücre patch clamp tekniği ile hücre içi kayıtları in vitro koşullarda alındı. Stellate sinir hücrelerinin dinlenme zar potansiyeli -61.3 ± 3.3 mV (n= 18) ve zar direnci 210 ± 21 M Ω (n=18) olarak ölçüldü. Perfüzyon solüsyonu içerisinde uygulanan noradrenalinin (100 μ M), dinlenme zar potansiyelini 26.1 ± 4.1 mV (n=5) değerinde depolarize ettiği gözlemlendi. Bazı hücrelerde dinlenme zar potansiyeli daha da depolarize olarak hücrenin tamamen sessiz kalmasına neden oldu. Ramp voltaj protokolü kullanarak yapılan çalışmalarda, noradrenalinin potasyum akımını azalttığı bulundu. Sonuç olarak, noradrenalinin sinir hücrelerinin potasyum akımlarını azalttığı ve dolayısıyla hücrelerin kendiliğinden oluşan aktivitelerinin artmasına neden olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Noradrenalin, cochlear çekirdek, modülasyon, hücre içi kayıt

Summary: In this study, it was aimed to assess the effects of noradrenalin on the stellate neuron. Intracellular recordings were performed from stellate neurons of mice cochlear nucleus in vitro using the whole cell patch clamp technique. The resting potential of stellate neurons was -61.3 ± 3.3 millivolt (mV)-(n= 18) and input resistance was 210 ± 21 megaOhm (M Ω) (n=18). Noradrenalin (100 mikro mol (μ M)) applied in perfusion solution depolarized the resting potential by 26.1 ± 4.1 mV (n=5). In some cells, noradrenalin caused the resting potential to shift further in depolarized potentials, resulting in being spontaneously silent. The study of voltage clamp using ramp voltage protocol indicated that potassium current decreased. In conclusion, noradrenalin increases the spontaneously occurring activity, decreasing the potassium current amplitude.

Key Words: Noradrenalin, cochlear nucleus, modulation, intracellular recording

Giriş

Memelilerde iç kulaktan işitme sistemiyle ilgili bilgilerin vardığı ilk hücreler, cochlear çekirdeğindeki sinir hücrelerdir. Beyne giden 8. sinir lifleri, cochlear çekirdekte morfolojik ve biyofiziksel olarak birbirinden farklı hücrelerle sinaps (kavşak) yaparlar. Böylece sesin frekans ve şiddeti gibi değişik niteliklerinin işlenmesine olanak sağlanır (Irvine, 1986). İmmunohistokimyasal araştırmalarla, cochlear çekirdeğin bir çok kısmında çok yoğun bir şekilde noradrenerjik uyarımların bulunduğu tespit edilmiştir (Klepper and Herbert, 1991; Kossl ve ark., 1988). Lezyon deneyleriyle, anterograde ve retrograde boyama metodlarıyla yapılan çalışmalarda, locus coeruleus sinir hücrelerinin bu uyarımların esas kaynağı olduğu belirlenmiştir (Klepper and Herbert, 1991; Kromer and Moore, 1980; Fritschy and Grzanna, 1990). Cochlear çekirdeğin yoğun şekilde noradrenerjik uyarımlara maruz kalmasına karşın ses bilgisinin işlenmesindeki fizyolojik rolü tam olarak bilinmemektedir (Oertel ve Fujino, 2001). Hücre dışı kayıt tekniği ile yapılan çalışmalarda, noradrenalinin kedi ve yarasaların cochlear

çekirdek hücrelerinin aktiviteleri üzerine baskılayıcı etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Kossl and Vater, 1989). Ancak daha sonra sıçanlarda yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (Ebert, 1996). Ebert (1996) iyontoforik olarak noradrenalin uygulaması sırasında ve uyguladıktan kısa süre sonra cochlear çekirdek hücrelerinin aktivitesini baskıladığı ve belirli bir süre sonra ise uzun süren bir uyarıcı etkinin geliştiğini bildirmiştir.

Stellate sinir hücresi cochlear çekirdeğin anteroventral kısmında bushy sinir hücreleriyle birlikte karışık şekilde bulunurlar (Oertel ve ark., 2001; Oertel ve ark., 1990; Oertel, 1983). Stellate sinir hücresinin, değişik yönlerde uzanan çok sayıda dendritleri bulunur ve aksonlarının uzandığı anatomik yapılara bakılarak D ve T-stellate hücre tipi belirlenmiştir (Ferragoma ve ark., 1998). Biyofiziksel olarak bu hücreler fazla komplike olmayıp konduktansları, dinlenme zar potansiyelinde yok denecek kadar azdır. Konduktans değerleri, depolarize ve hiperpolarize zar potansiyellerinde de octopus ve bushy gibi diğer hücre tiplerine kıyasla çok azdır (Bal ve Oertel, 2000; Manis ve Marx, 1991). Zar konduktanslarının az olması zar dirençlerinin fazla olması

demektir. Bunun biyofiziksel olarak sonucu, küçük miktardaki akımlarla çok sayıda aksiyon potansiyeli (AP) uyarılmasıdır (Manis, 1990). Ayrıca dinlenim potansiyeline yakın potansiyelerde faaliyet gösteren iyon kanallarının sayılarındaki küçük değişiklikler dinlenim zar potansiyelinin değişmesine neden olurlar. Böylece hücrenin uyarılabilirlik seviyesini değiştirirler. Bu nedenle noradrenalin gibi nörotransmitterlerin oluşturduğu modulasyon sinir hücresinin fonksiyonu açısından önemlidir (Oertel ve Fujino, 2001).

Bu çalışmada noradrenalinin, cochlear çekirdekte bulunan sinir hücreleri üzerindeki nörokimyasal etkilerinin elektrofizyolojik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu makalede sunulan çalışmalar, University of Wisconsin-Madison, The Medical School, Department of Neurophysiology (Amerika)'da yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan teçhizatlar, Finkel ve Gage (1985), Finkel (1985) ve Auerbach ve Sachs (1985) tarafından ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Tüm kimyasal maddeler Sigma'dan temin edildi (Noradrenalin, A-0937; tetraethyleammoniumion chloride, T-2265; 4-aminopyridine, A-0152; K-gluconate, P-1847; MgCl₂, M-2670; tris2-phosphocreatinin, P-1937; HEPES, H-4034; EGTA, E-8145; Na₂-ATP, A-9062; tris-GTP, G-8877; NaCl, S7653; KCl, P9333; KH₂PO₄, P5379; CaCl₂, C5080; MgSO₄, M7506; ve glukoz, G7528).

Cochlear çekirdek kesitlerin hazırlanması: Çalışmada beş adet ICR cinsi fare (18-21 günlük) kullanıldı. Hayvanlar dekapite edildikten sonra başları, 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.4 mM CaCl₂, 1.3 mM MgSO₄, 3 mM HEPES ve 10 mM glukoz (%95 O₂ ve %5 CO₂ ile doyurulan) içeren 31 °C'deki yapay beyin sıvısı (aCSF) içerisine konuldu. Sinirler gerilmeden kemiksel yapılardan uzaklaştırılan beyin, colliculus inferiore seviyesinde transversal olarak kesildi (Bal, 1998; Bal ve Oertel, 2000). Ön yüzeyi teflon bir blok üzerine Cyanoacrylate ile yapıştırılarak cochlear çekirdek vibrotom ile 175 µm kalınlıkta kesildi. Kesitler bir saklama kabına konarak 95% O₂ ve 5% CO₂ içeren gazla sürekli olarak oksijenlendi (Oertel, 1983).

Hücrelerin görüntülenmesi ve elektriksel kayıt: Kayıt odasına alınan kesitler, dakikada akış hızı 7 ml ve 33 °C'deki aCSF içeren solüsyon içerisine alınarak inverted mikroskop (Zeiss, X63 suya girebilen lens kullanılarak) ile incelendi. (Oertel, 1983). Tüm hücre patch clamp kayıt tekniği, 200A amplifier'nin (Axon instruments) hızlı akım clamp'ı ve voltaj clamp'ı ayarlarında yapıldı (Bal ve Oertel, 2000). Patch mikroelektrodları, dış çapları 1 mm ve iç çapları 0.58 mm olup, iç yüzeyinde bir flaman olan borosilikat kapillardan

(World Precision Instruments, Sarasota, FL., USA) yatay puller kullanılarak deneyden kısa süre önce hazırlandı (Golding ve ark, 1999). Mikroelektrodun uç direnci, içeriği 108 mM K-gluconate, 4.5 mM MgCl₂, 14 mM tris2-phosphocreatinin, 9 mM HEPES, 9 mM EGTA, 4 mM Na₂-ATP ve 0.3 mM tris-GTP (pH'ı 7.4) olan pipet solüsyonu ile doldurulduğunda 5-8 MW olarak ölçüldü. Oluşan kapasitansı azaltmak için elektrodlar uçlarına kadar Sylgard ile kaplandı. Noradrenalin, aynı hücrelerde değişik yoğunluklarda direk olarak perfüzyon solüsyonu içerisine konarak sinir hücrelerine uygulandı (Wang ve Robertson, 1997).

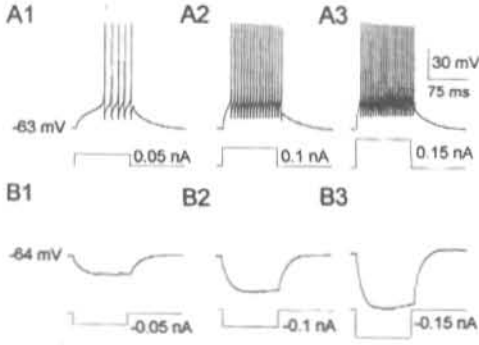
Verilerin kaydedilmesi: Hedef hücre seçildikten sonra hücre içi kayıt almak için, mikroelektroda negatif emme basıncı uygulayarak tüm hücre patch clamp (whole cell patch clamp) konfigürasyonu elde edildi. Tüm hücre patch clamp kayıtları, Auerbach ve Sachs'a (1985) göre yapılmıştır. Analog veriler, 5-10 KHz'de filtre edildikten sonra pClamp (versiyon 8, Axon instruments) ile idare edilen Digidata 1320 dönüştürücü ile 10-40 KHz frekanslarda dijital sisteme dönüştürülerek bilgisayarda kaydedildi (Finkel, 1985). Elde edilen veriler aynı zamanda kayıt kağıtlarına (chart paper) yazdırıldı. Pipet solüsyonu ile aCSF arasında meydana gelen 12 mV değerindeki junction potansiyelinden dolayı, voltaj kayıtlarında aynı miktarda bir düzeltme yapıldı (Auerbach ve Sachs, 1985). Pozitif değerlikli iyonların, hücre dışına çıkması ile oluşan iyon akımları, daima pozitif değerlikli (+) olarak (Şekil 3 A) ve hücre içine girmesiyle oluşan akımlar ise negatif değerlikli olarak gösterilir (Şekil 3 B) (Finkel ve Gage, 1985).

Morfolojik olarak stellate sinir hücrelerinin geniş bir dendritik dallanmaya sahip olması, hücrelerin uzunluk sabitelerinin (λ) büyük olmasına neden olmaktadır. Bu ise sinir hücrelerinin soma'sından uzak bölgelerdeki dendritlerde voltaj kontrolünün imkansız olmasıyla neticelenir (space clamp). Dinlenim zar potansiyelinden 30 mV'dan daha depolarize voltajlarda space clamp sorunu (Rall ve Segev, 1985), deneylerin güvenilirliğini azalttığından dolayı voltaj kayıtları alınmadı.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar, Student's t testi ile değerlendirildi.

Bulgular

Stellate sinir hücrelerinin zar özellikleri: Bu makalede yer alan sonuçlar, 18 stellate sinir hücresinden tüm hücre patch clamp tekniği ile alınan akım ve voltaj clamp kayıtlarından oluşmuştur. Stellate sinir hücrelerinin dinlenim zar potansiyeli -61.3 ± 3.3 mV (n=18) olarak ölçüldü. Akım-voltaj ilişkisini gösteren eğrinin eğiminden (slope) ölçülen zar direnci, 210 ± 21 MW (n=18) olarak belirlendi. Stellate sinir hücrelerinin çoğunluğu spontan olarak aksiyon potansiyeli ateşledi (11/18). Hücre içi kaydı alınan tüm hücreler katot akım-



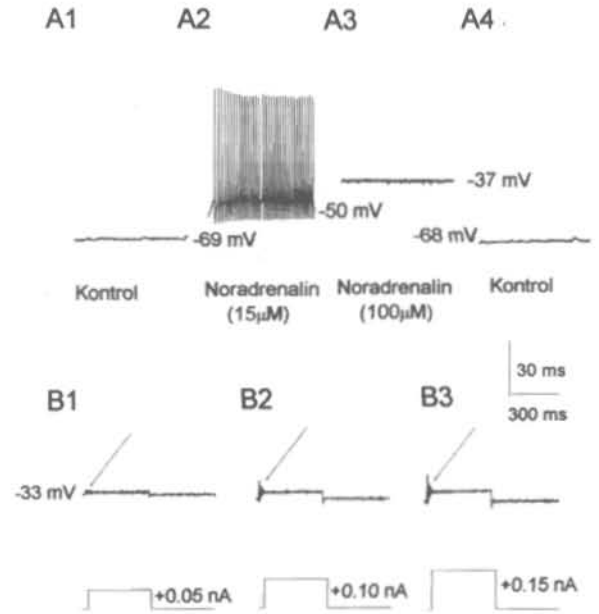
Şekil 1. Stellate sinir hücrelerinin, akım enjeksiyonlarına yanıt olarak oluşan normal elektrofizyolojik yanıtları. Hücreye uygulanan akımlar, voltaj kayıtlarının altında gösterilmiştir. Enjekte edilen depolarize akımlar +0.05 (A1), +0.1 (A2) ve +0.15 nA (A3) ve hiperpolarize akımlar -0.05 (B1), -0.1 (B2) ve -0.15 nA (B3)'dir. Kalibrasyon için verilen uzunlamasına (vertical) çubuk 30 milivolt değerini göstermekte, enine (horizontal) çubuk ise 75 milisaniye süreyi göstermektedir. A1, A2 ve A3 için geçerli olan -63 mV ise hücrenin dinlenme potansiyel değerini göstermektedir. A1 için verilen 0.05 nA (nA nanoAmper); A2 için verilen 0.1 nA ve A3 için verilen 0.15 nA değerleri hücreye uygulanan akım miktarlarını göstermektedir.

larına birden fazla AP ile yanıt verdi (Şekil 1, A1, A2 ve A3). Akım miktarının artırılmasıyla ateşlenen AP sayısı doğru orantılı olarak arttı. Anot akımları ise zar potansiyelinin hiperpolarize olmasıyla sonuçlandı (Şekil 1, B1, B2 ve B3).

Noradrenalinin spontan aktivite üzerine etkisi: Hücre içi kaydı alınan 18 stellate sinir hücresinden sadece 7 tanesi noradrenalin uygulamasına yanıt vermedi. Diğer hücrelerde ise noradrenalin içeren perfüzyon solüsyonunun verilmeye başlanmasıyla birlikte kademeli olarak dinlenme zar potansiyeli depolarize olmaya başladı. Noradrenalin'in (100 μ M) etkisinin iki veya üç dakika içerisinde maksimum seviyeye ulaşmasıyla birlikte dinlenme zar potansiyelinin 26.1 \pm 4.1 mV (n=5) kadar depolarize olduğu gözlemlendi ve depolarizasyonun miktarı noradrenalinin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği belirlendi. Dinlenme zar potansiyelindeki depolarizasyonun miktarı istatistik olarak önemli bulundu (P < 0.001, n=5). Dinlenme zar potansiyelinin depolarize voltajlara kaymasıyla birlikte sinir hücrelerinde spontan olarak ateşlenen AP sayısının belirgin olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 2, A1-A2). Geriye kalan 6 sinir hücresinde olduğu gibi eğer depolarizasyon miktarı 30 mV veya daha fazla ise sinir hücrelerinde meydana gelen AP ateşlenmesinin durduğu gözlemlendi (Şekil 2, A3). Noradrenalin'in hücre ortamından uzaklaştırılmasıyla hücre kontrol durumunda sahip olduğu aktivite seviyesine ulaştı. Katot akımları

ile sinir hücreleri uyarıldığında 5 hücreden üçünde aksiyon potansiyeli oluşmadı. Ancak uyarının başında kısa boylu osilasyonlar gözlemlendi (Şekil 2, B1, B2 ve B3). Dinlenme zar potansiyeli anot akımlarla normal dinlenme potansiyeline yakın değerlere hiperpolarize edildikten sonra katot akımları verildiğinde kontrol koşullarındaki aksiyon potansiyeli değerinin oluştuğu belirlendi.

Noradrenalinin iyon kanalları üzerine etkileri: Dinlenme zar potansiyelinde, voltaj clamp tekniği ile yapılan kayıtlarda, herhangi bir akımın aktivasyonuna rastlanılmadı. Depolarize potansiyellerde ise hücre içine doğru giden bir akım gözlemlendi. Tetrodotoksin (TTX) tarafından durdurulduğundan dolayı bu akımın sodyum akımı olduğu anlaşıldı. Daha sonra ise hücre dışına



Şekil 2. Noradrenalinin, stellate sinir hücrelerinde kendiliğinden ve uyarılarak oluşan aktiviteleri üzerine etkisi. A: Hücre, kontrol şartlarda kendiliğinden AP oluşturmazken (A1), noradrenalin (15 mikromol, μ M) uygulamasından sonra çok sayıda kendiliğinden AP oluşturdu (A2). Noradrenalin konsantrasyonunun artırılmasıyla (100 μ M) dinlenme zar potansiyeli -37 mV oldu ve kendiliğinden oluşan aksiyon potansiyeli görülmüdü (A3). Noradrenalin, perfüzyon ile ortamdan uzaklaştırıldığında dinlenme zar potansiyeli tekrar normale döndü. B: Noradrenalin uygulandıktan sonra 0.05 (B1), 0.1 (B2) ve 0.15 nA (B3) büyüklüğündeki katot akımlarla sinir hücresi uyarılmasına karşın yanıt olarak aksiyon potansiyeli oluşmadı ancak uyarının başında voltaj dalgalandı. Şekil A1-A4'de verilen -69, -50 mV, -37 mV ve -68 mV ve Şekil B1'de verilen -33 mV, şekilde belirtilen şartlarda sinir hücresinin dinlenme potansiyelini göstermektedir. Kalibrasyon için verilen değerler (30 mV ve 300 ms) hem A hemde B için geçerlidir. Şeklin alt kısmında verilen 0.05, 0.10 ve 0.15 nA değerleri hem Şekil A ve hem de Şekil B'de verilen voltaj kayıtlarının oluşumu için hücrelere uygulanan akım miktarlarını göstermektedir.

doğru giden potasyum akımı gözlemlendi. Dışarı doğru giden akım ise potasyum kanal blokerleri (tetraethyleammonium ion ve 4-aminopyridine) tarafından durdurulması ise bu akımın potasyum akımı olduğunu göstermektedir. Sodyum akımının aktivasyon ve inaktivasyon kinetiği, sistemin hızını aşacak kadar hızlı olduğundan (0.5 mill saniyede aktivasyon ve inaktivasyon tamamlanır) ve sinir hücresinin morfolojisinden dolayı hücrenin dendrit ve aksonunun çoğu kısımlarının voltajı kontrol edilemediğinden sodyum akımınının kayıtları alınamadı. Hücre dışına doğru akan potasyum akımlarının kayıtları dinlenme zar potansiyeline yakın voltajlarda yapıldı. Potasyum akımı, -45 mV'luk basamak voltajında aktive olmaya başladı ve daha depolarize voltajlarda aktivasyonun belirgin olarak arttığı gözlemlendi. Potasyum akımı, tetraethyleammonium (TEA) (20 mM) tarafından tamamen baskılandı ve bu nedenle de gecikmiş düzeltici potasyum akımı (delayed rectifier current, K_{DR}) olarak tanımlandı. Bu akımın büyüklüğü, -35 mV basamak potansiyelinde $+2.4 \pm 0.4$ nA (nanoAmper) ($n=5$) olarak ölçüldü. Hiperpolarize voltajlarda, çok az miktarlarda karışık katyon akımının (inward rectifier mixed-cation current, I_h) varlığı belirlendi (-100 mV basamak potansiyelinde akım büyüklüğü -0.15 nA).

Noradrenalinin hangi akımı ne derece modüle ettiğini belirlemek için ramp voltaj clamp protokolü uygulandı (Finkel ve Gage, 1985). Diğer ifade ile zar potansiyeli -120 mV değerden -25 mV değere 25 saniyede tedricen değiştirildi. Bu nedenle hücre dinlenme zar potansiyelinden -120 mV değerine anlık olarak değiştirildi ve daha sonra 28 saniye içerisinde kademeli olarak zar voltajı -20 mV'a kaydırıldı. Bu şekildeki voltaj protokolü ile zar potansiyeli zaman geçtikçe depolarize olacak ve voltaj kapılı zar kanalları olan K_{DR} ve I_h 'i aktive edecektir. Bu kanalların aktivasyonu değişik voltajlarda birbirinden farklı ve değişik derecelerde olacaktır. Böylece hiperpolarize voltajlarda daha çok I_h ve depolarize voltajlarda ise daha çok K_{DR} aktive olacaktır. Noradrenalin uygulanmasından önce (Şekil 3, C1) ve sonra (Şekil 3, C2) bu ramp voltaj protokolü uygulandı ve noradrenalin uygulamasından sonra elde edilen akım örneğinden çıkartılarak farkı bulundu (Şekil 3, C3). Bu fark akımı, ilk 23 saniyelik sürede sıfır değerine yakındı ve sadece -35 mV ve daha depolarize voltajlara karşılık gelen 23-28 saniyelik akım kayıtlarının sıfır çizgisinin üzerinde pozitif değerlikli olduğu gözlemlendi. Bu, noradrenalin uygulamasının potasyum akımını azaltığına işaret eder.

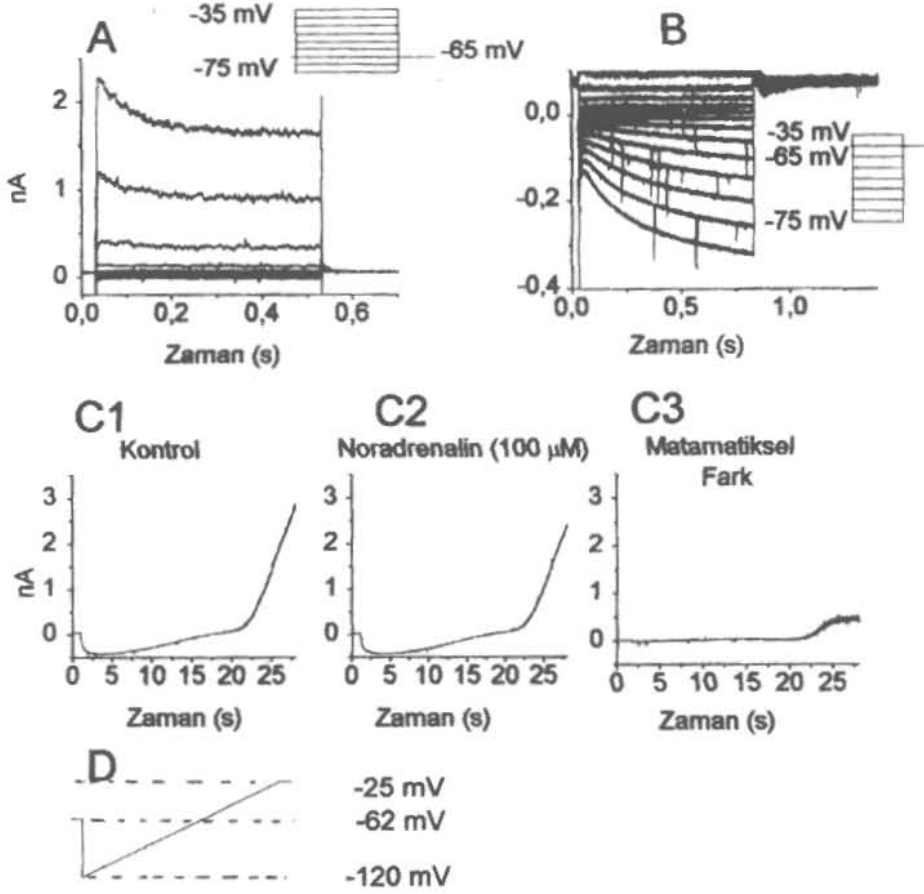
Tartışma

Noradrenalin dinlenme zar potansiyelini depolarize eder. Cochlear çekirdekte bulunan stellate

sinir hücrelerinin in vitro koşullarda normal fizyolojik özellikleri ilk defa Oertel (1983) ve daha sonra Manis ve Marx (1991), Golding ve ark. (1995; 1999) ve Gardner ve ark. (1999) tarafından kaydedilmiştir. Bu çalışmada belirlenen dinlenme potansiyeli ve zar direnci (-61.3 ± 3.3 mV ve 210 ± 21 M Ω ($n=18$)) yukardaki araştırmacılar tarafından bildirilen değerlerle örtüşmektedir. Oertel ve Fujino'nun (2001) yaptıkları çalışmada stellate sinir hücrelerinin D ve T olmak üzere iki tipinin olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada noradrenalinin doza bağlı olarak 18 stellate sinir hücresinden 11 hücrede dinlenme zar potansiyelini depolarize ettiği ve (Şekil 2, A1, A2 ve A3) yedi hücrede ise noradrenaline karşı hiç bir değişiklik gözlenememesi sonucu sinir hücrelerinde meydana gelen bu farklılığın yukarıdaki araştırmacıların iki farklı hücre tipi bulgularını doğrulamaktadır. Yapılan çalışmada düşük dozlarda (15 μ M) kendiliğinden oluşan AP sayısının belirgin şekilde arttığı ve yüksek dozlarda ise (100 μ M) zar potansiyeli aşırı depolarize olduğundan kendiliğinden AP oluşmadığı gibi sinir hücresi akım enjeksiyon uyarılarına da AP ateşlemesiyle yanıt vermedi. Noradrenalinin, beyin sapındaki trapezoid cisimde bulunan sinir hücrelerinde de benzer şekilde spontan aktiviteyi artırdığı rapor edilmiştir (Wang ve Robertson, 1997). Bu çalışmada ise yukardaki araştırmalardaki bulgulardan farklı olarak, stellate sinir hücresinin yüksek noradrenalin konsantrasyonlarında (100 μ M) uyarılara cevap verememesi ve kendiliğinden AP oluşturamaması, dinlenme zar potansiyelinin -30 mV gibi aşırı depolarize değerlere ulaşmasına bağlanabilir. Zar potansiyelinin -30 mV değere kayması halinde ise sodyum kanalları önce aktivasyona ve daha sonra da inaktivasyona uğrar ve bundan dolayı AP oluşmaz. Ayrıca potasyum akımları da bu kadar depolarize potansiyellerde aktif olacağı için oluşabilecek sodyum akımları potasyum akımları tarafından etkisiz bırakılacaktır.

İyon akımlarının belirlenmesi; Yapılan çalışmada stellate sinir hücrelerinin K_{DR} ve karışık katyon akımlarına sahip olduğu belirlendi. Bu iki akımın varlığı, Oertel ve Fujino, (2001) ve Manis ve Marx (1991) tarafından da bildirilmiştir. Stellate sinir hücrelerinin bulunduğu bölgede, K_{DR} kanallarının alt ünitelerine karşı immunohistokimyasal olarak yoğun boyanma belirlenmiştir ve bu akımın stellate sinir hücrelerinin yüksek frekansta AP ateşlemelerine olanak sağladığı rapor edilmiştir (Perney ve Kaczmarek, 1997; Gan ve Kaczmarek, 1998).

Noradrenalin potasyum akımını azaltır: Bu çalışmada, Manis ve Marx (1991) tarafından bildirilmeyen I_h akımı da tanımlanmıştır (Şekil 3, A ve B). Ayrıca ramp voltaj protokolüyle yapılan voltaj clamp deneylerinde, noradrenalinin I_h akımını etkilemediği sa-



Şekil 3. Stellate sinir hücresinin voltaj clamp'ında elde edilen akım kayıtları. A: Küçük şekilde uygulanan voltaj protokolü görülmektedir. Voltaj protokolü, -75 ile -35 mV arasında beşer milivolt basamaklar halinde sinir hücresinin potansiyeli değiştirildi. Bu voltaj değişikliklerine yanıt olarak sinir hücresi zarından büyük şekilde gösterildiği gibi akım K_{DR} akımının kaydı yapıldı. B: Küçük şekilde uygulanan voltaj protokolü görülmektedir. Voltaj protokolü, -35 ile -75 mV arasında beşer milivolt basamaklar halinde sinir hücresinin potansiyeli değiştirildi. Bu voltaj değişikliklerine yanıt olarak sinir hücresi zarından büyük şekilde gösterildiği gibi akım I_h akımının kaydı yapıldı. C: Sinir hücresi -120 mV değerden -25 mV değerine 25 saniye sürede tedricen değiştirilerek ramp voltaj protokolü uygulandı. Bu ramp voltaj protokolü şeklin alt kısmında verilmiştir. Bu şekilde uygulanan voltaj değişikliğine yanıt olarak kaydedilen akımlar belirtilen şartlarda gösterilmektedir. Noradrenalin (100 μ M) uygulanmasından önceki kayıt (C1), noradrenalin uygulamasından sonra elde edilen akımdan (C2) farkı Şekil C3'te gösterilmektedir.

dece K_{DR} 'i azalttığı belirlendi (Şekil 3, C1, C2 ve C3). Bu K_{DR} akımının azalması dinlenme potansiyelinin depolarize olmasına neden oldu. Potasyum akımının azalması halinde dinlenme potansiyelinin depolarize potansiyellere kaymasına neden olur (Bal ve Oertel, 2000). Çünkü I_h akımın denge potansiyeli -40 mV'dan daha az negatif potansiyellerde olup (Bal ve Oertel, 2000; Banks ve ark., 1993; Chen, 1997; Fu ve ark., 1997) K_{DR} akımının azalması halinde hücre daha fazla I_h akımının etkisi altında kalır ve dinlenme zar potansiyelinin depolarize voltajlara kaymasını sağlar.

Fonksiyonel önemi: Memelilerin işitme sistemi ile ilgili yapılarında noradrenerjik uyarımların varlığı bilinmekle birlikte fonksiyonel rolleri bilinmemektedir

(Oertel ve Fujino, 2001). Bu çalışmada noradrenalinin K_{DR} potasyum akımı aracılığıyla, cochlear çekirdekdeki stellate sinir hücrelerinin modülasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur. Medial olivocochlear sinir hücrelerinin (MOC) cochlea ve cochlear çekirdek sinir hücrelerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğu bildirilmektedir (Guinan, 1996). Özellikle MOC hücrelerinin cochlea üzerine oluşturduğu bu baskılayıcı etkinin kulağa zararlı olabilecek düzeyde yüksek seslerden korumak ve gürültülü bir ortamda işitmeyi sağlamaya yönelik olduğu düşünülmektedir (Reiter ve Liberman, 1995). Diğer taraftan noradrenalinin, MOC sinir hücrelerinin oluşturduğu baskılayıcı etkiyi dengelemek için potasyum akımlarını baskılayarak (Bal ve ark., 2001; Bal, 1998) ateşlenen aksiyon potansiyelini artırmak suretiyle üst

beyin yapılarına ses kaynağı hakkında doğru bilgi ulaştırılmış olur (Oertel and Fujino, 2001).

Kaynaklar

- Auerbach A, Sachs F. (1985). High resolution patch-clamp techniques. In "Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes". Ed., T.G Smith, H. Lecar, S.J Redman, P.W Gage. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Bal R, Janahmadi M, Green GG, Sanders DJ. (2001). Two kinds of transient outward currents, I(A) and I(Adepol), in F76 and D1 soma membranes of the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *J Membr Biol.*,179,71-8.
- Bal R, Oertel D. (2000). Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I(h)) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol.*,84,806-17.
- Bal R. (1998). Potassium currents in identified *Helix aspersa* neurones and in rat inferior colliculus neurones. Thesis, University of Newcastle.
- Banks MI, Pearce RA, Smith PH. (1993). Hyperpolarization-activated cation current (Ih) in neurons of the MNTB. *J Neurophysiol.*,70,1420-1432.
- Chen C. (1997). Hyperpolarization-activated current (Ih) in primary auditory neurons. *Hearing Research.*,110,179-190.
- Ebert U. (1996). Noradrenalin enhances the activity of cochlear nucleus neurons in the rat. *Eur J Neurosci.*,8,1306-14.
- Ferragamo MJ, Golding NL, Oertel D. (1998). Synaptic inputs to stellate cells in the ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol.*,79,51-63.
- Fritschy JM, Grzanna R. (1990). Distribution of locus coeruleus axons within the rat brainstem. *J Comp Neurol.*,293,616-31.
- Fu XW, Brezden BL, Wu SH. (1997). Hyperpolarization-activated inward current in neurons of the rat's DNLL in vitro. *J Neurophysiol.*,78,2235-2245.
- Finkel A.S. (1985). Useful circuits for voltage clamping with microelectrodes. In "Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes". Ed., T.G Smith, H. Lecar, S.J Redman, P.W Gage. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Finkel A.S, Gage P.W. (1985). Conventional voltage clamping. In "Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes". Ed., T.G Smith, H. Lecar, S.J Redman, P.W Gage. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Gan L, Kaczmarek LK. (1998). When, where, and how much? Expression of the Kv3.1 potassium channel in high-frequency firing neurons. *J Neurobiol.*,37,69-79.
- Gardner SM, Trussell LO, Oertel D. (1999). Time course and permeation of synaptic AMPA receptors in cochlear nucleus neurons correlate with input. *J Neurosci.*,19,8721-9.
- Golding NL, Ferragamo M, Oertel D. (1999). Role of intrinsic conductances underlying transient responses of octopus cells of the CN. *J Neurosci.*,19,2897-2905.
- Golding NL, Robertson D, Oertel D. (1995). Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J Neurosci.*,15,3138-3153.
- Guinan JJ. (1996). Physiology of olivocochlear efferents. In: Dallos P, et al, *The cochlea*. New York: Springer.,435-502.
- Irvine DR. (1986). *Anonymous The Auditory Brainstem*. Berlin: Springer-Verlag.
- Klepper A, Herbert H. (1991). Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Brain-Res.*,557,190-201.
- Kossl M, Vater M, Schweizer H. (1988). Distribution of catecholamine fibers in the cochlear nucleus of horseshoe bats and mustache bats. *J Comp Neurol.*,269,523-534.
- Kossl M, Vater M. (1989). Noradrenaline enhances temporal auditory contrast and neuronal timing precision in the CN of the mustached bat. *J Neurosci.*,9,4169-4178.
- Kromer LF, Moore RY. (1980). Norepinephrine innervation of the cochlear nuclei by locus coeruleus neurons in the rat. *Anat Embryol.*,158,227-244.
- Manis PB, Marx SO. (1991). Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J Neurosci.*,11,2865-2880.
- Manis PB. (1990). Membrane properties and discharge characteristics of guinea pig dorsal cochlear nucleus neurons studied in vitro. *J Neurosci.*,10,2338-2351.
- Oertel D, Bal R, Gardner SM, Smith PH, Joris PX. (2001). Detection of synchrony in the activity of auditory nerve fibers by octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *PNAS.*,97,11773-9.
- Oertel D, Fujino K. (2001). Role of biophysical specialization in cholinergic modulation in neurons of the ventral cochlear nuclei. *Audiol Neurootol.*, 6(4),161-6.
- Oertel D, Wu SH, Garb MW, Dizack C. (1990). Morphology and physiology of cells in slice preparations of the PVCN of mice. *J Comp Neurol.*,295,136-154.
- Oertel D. (1983). Synaptic responses and electrical properties of cells in brain slices of the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J Neurosci.*,3,2043-2053.
- Perney TM, Kaczmarek LK. (1997). Localization of a high threshold potassium channel in the rat cochlear nucleus. *J Comp Neurol.*,386,178-202.
- Rall W, Segev I. (1985). Space clamp problems when voltage clamping branched neurons with intracellular microelectrodes. In "Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes". Ed., T.G Smith, H. Lecar, S.J Redman, P.W Gage. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.
- Reiter ER, Liberman MC. (1995). Efferent-mediated protection from acoustic overexposure: relation to slow effects of olivocochlear stimulation. *J Neurophysiol.*,73,506-514.
- Wang X, Robertson D. (1997). Two types of actions of norepinephrine on identified auditory efferent neurons in rat brain stem slices. *J Neurophysiol.*,78,1800-1810.