

A tengerimalac-cochleából, lateralis olivocochlearis efferentatio hatására történő dopamin felszabadulás glutamát excitotoxicitását gátló hatása és modulációs lehetőségei

Dóczi Keresztesi Zoltán¹, Lendvai Balázs², Brassai Attila¹

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszertani Tanszék, ²Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest

Posibilități de modulare asupra eliberării de dopamină induse de eferențele olivocochleare laterale la nivelul cochleei de cobai

În studiul nostru am urmărit eliberarea dopaminei la nivelul cochleei de cobai, cu ajutorul unui cromatograf de mare precizie, folosind tehnica de superfuzie in-vitro, în camere de microperfuzie continuă. După prepararea cochleei (evidențindu-se organul Corti), țesuturile au fost introduse în camera microvolumetrică, aplicându-se o perfuzie constantă cu soluție apropiată de perilymfa fiziologică, după care s-a măsurat eliberarea de dopamină sub acțiunea unor stimuli electrici sau chimici. În condiții de ischemie și de deprivare de glucoză, precum și în caz de acidoză am constatat o creștere semnificativă a eliberării de dopamină. Același rezultat l-am obținut și sub acțiunea stimulului chimic, ceea ce dovedește funcția neurotransmițătoare a dopaminei între fasciculi olivocochleari laterali și fibrele aferente de tip I. Totodată aduce dovezi semnificative funcției protectoare a dopaminei împotriva deteriorării nervilor acustici sub acțiunea traumei acustice, ischemiei și acidozei.

Modulatory possibilities of dopamine release induced by lateral olivocochlear efferents in guinea-pig cochlea

In this study, we examined the release of dopamine from guinea-pig cochlea, with a liquid scintillation counter, using in vitro superfusion technique in microvolume chambers. After dissecting of the cochlea from the bulla tympani (revealing the organ of Corti), tissues were introduced in microvolume chambers and superfused with thermoregulated and 100% O₂ saturated perilymph-like solution. The labelled [7,8-³H] dopamine release was determined under electrical and chemical stimulation. Ischaemia, glucose deprivation and acidosis caused a significant increase of dopamine release. The results were the same under chemical stimulation, providing evidence of transmitter role of dopamine between lateral olivocochlear bundles and type I afferent fibres. It provides also evidence of protective role of dopamine against acoustic nerve damage caused by acoustic trauma, ischaemia or acidosis.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (1): 46-50

www.emeogysz.ro

Köztudott, hogy a felső oliváris magvakból két efferens pálya megy a cochleához: a lateralis olivo-cochlearis köteg (LOC), amely 50-60%-át képezi az össz-efferenciának és a medio-cochlearis axonok, amelyek az ellenoldali cochlea külső szőrsejtjeihez irányulnak [1, 14].

A LOC köteg axonjai az azonos oldali cochleához irányulnak és axodentritikus szinapszt képeznek az I-típusú ganglionsejtek dentritjeivel a belső szőrsejtek (BSZ) alatt [2, 13, 14], (1. ábra) [21].

Ezen szinapszisokban a következő anyagoknak tulajdonítottak neurotransmitter és neuromodulátor szerepet: acetilkolin, GABA, dopamin, enkefalinok, dinorfinok, calcitonin-típusú peptid, szerotonin [5, 6, 9].

A jelen kísérletben a dopaminerg neurotransmissziót vizsgáltam a tengerimalac-cochleában. A dopamint már kimutatták patkány cochleából, HPLC (precíziós folyadékromatográfia) és elektrokémiai módszerek segítségével [11]. A tirozin-hidroxiláz jelenléte és a dopamin-β-hidroxiláz hiánya a LOC efferensekben [3, 6], arra utal, hogy a lateralis efferens beidegzés dopaminerg. Mindemellett nincs közvetlen neurokémiai bizonyíték a dopamin neurotransmitter szerepéről az olivocochlearis efferens rostokban. Ezért vált célkitűzéssé a dopamin felszabadulás vizsgálata a laterális efferens rostokból.

A dopaminnek hallásban kifejtett szerepe még nem tisztázott. Feltételezik, hogy posztzinaptikus gátló hatást fejt ki az elsődleges hallóideg és a BSZ-k közötti glutaminerg szinapszisokra [4, 5, 8, 10, 15, 16], (2. ábra) [20]. Továbbá a dopaminnek valószínűleg védő hatása van a hallóideg terminális dentritjeire nézve, a trauma valamint ischaemia által kiváltott glutamát excitotoxicitással szemben [3, 8, 18].

A dopamin felszabadulás modulációs lehetőségeiről még

nincsenek adatok. A pozitív moduláció lehetőséget nyújthat a különböző halláskárosodások kezelésére.

Kísérleti módszerek

A 250-350 grammos hím tengerimalacokat lefejeztem, majd a sziklacsontot rögtön feltárva sztereomikroszkóp alatt óvatosan eltávolítottam a cochlea csontos tokját és a stria vascularist. Ez a preparátum tartalmazta az efferens rostokat a ganglion spirale-ban lévő nucleussal együtt.

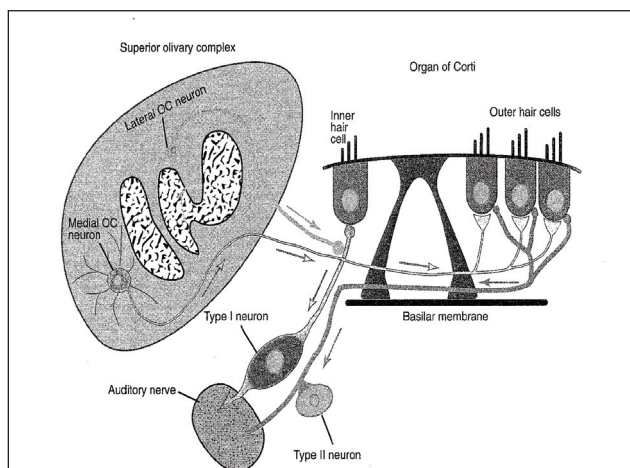
A preparátumot perilymfa-szerű oldatba helyeztem (szőrsejt oldat), amelyet Ikeda és trs.[12] írtak le: (mM) NaCl 150, KCl 3,5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 2,75 és Tris-OH 2,25, a pH 7,4-re, valamint az osmolaritás 300 mosm/l-re beállítva, HCl és D-glukóz hozzáadásával. A folyadékon folyamatosan 100%-os O₂-t áramoltattam át és állandó 37 °C-on tartottam.

Az izolált cochleát 30 percig, 37 °C-on 1 ml szőrsejt oldatban inkubáltam, amely 10 μl, 0, 2 μM-os koncentrációjú triciált [7, 8-³H] dopamint tartalmazott, folyamatos O₂-áramoltatás mellett.

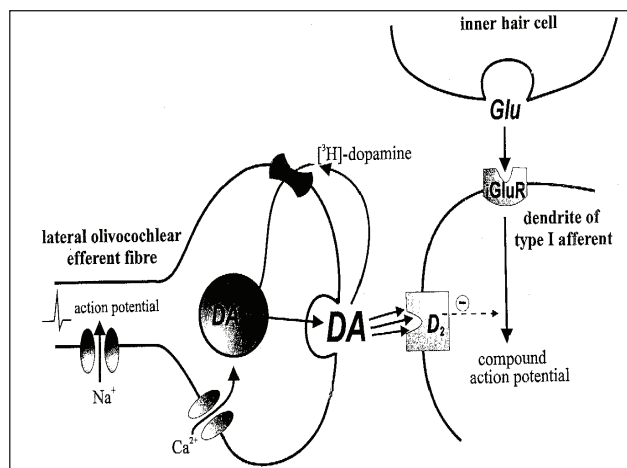
Ezután mindkét cochleát áthelyeztem egy-egy plexid mikrovolumenű perfúziós kamrába (100 μl-es belső térfogat), ahol 60 percig áramoltattam át 3 ml/perc sebességgel, állandó 37 °C-os hőmérsékleten. Az átfolyó folyadékot felfogtam, 3 perces frekvenciával, tehát egy frakció 9 ml-t tartalmazott.

A szöveteket 60 V, 2 Hz, 0, 5 ms tartamú impulzusokkal stimuláltam 3 percig, a mikrokamrába alul és felül elhelyezett platina elektródokkal, a 3-ik és a 13-ik frakciók egész ideje alatt (S₁, S₂).

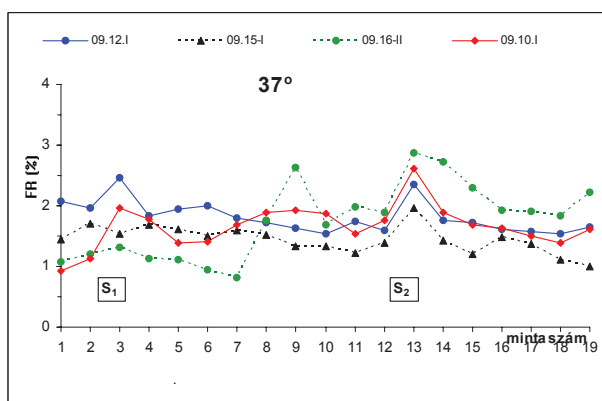




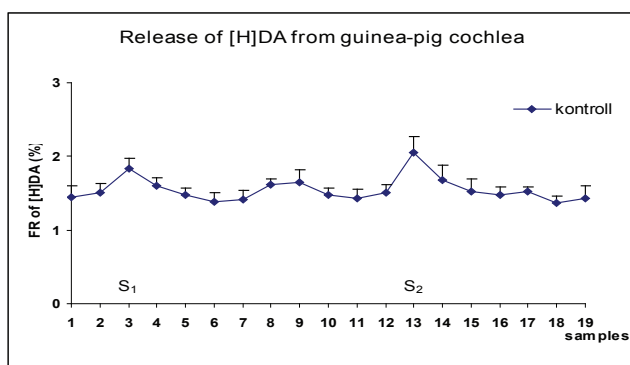
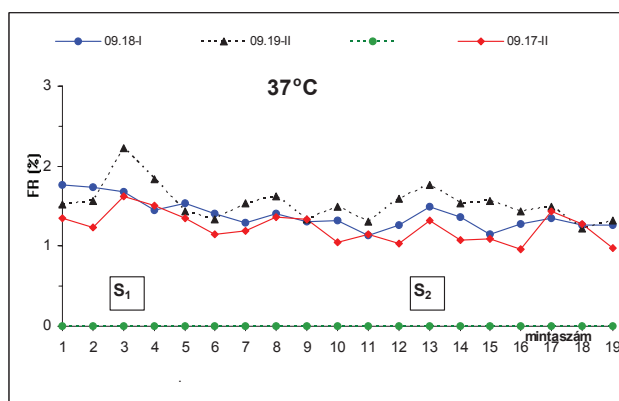
1. ábra. A Corti-féle szerv beidegzése: afferens és efferens neuronjai [21]



2. ábra. Szinaptikus kapcsolatok a cochlea szintjén: dopamin felszabadulás a LOC axon-végződéseken, valamint a D2 receptorok gátló hatása a glutamáterg ingerületátvitelre az afferens dendriték szintjén [20]



3. ábra. G+O₂ jelenlétében



4. ábra. Végső összeg: G+O₂

A 8-ik frakciótól kezdve alkalmaztam a Glukóz-O₂ deprivációt, valamint az acidózist (szacharóz tartalmú szörsejt oldat, amelyen 95% O₂-t és 5% CO₂-t tartalmazó carbogen gázt, valamint a N₂-gázt buborékolttam át).

A radioaktivitás méréséhez 500 µl folyadékot használtam az egyes frakciókból, amelyhez 2 ml szcintillációs koktélt adagoltam. A mérés Packard TR 1900 típusú folyadék-szcintillációs számláló készülékkel történt, Bq/g -ban kifejezve.

A kísérlet végén a szöveteket eltávolítottam a perfúzi-

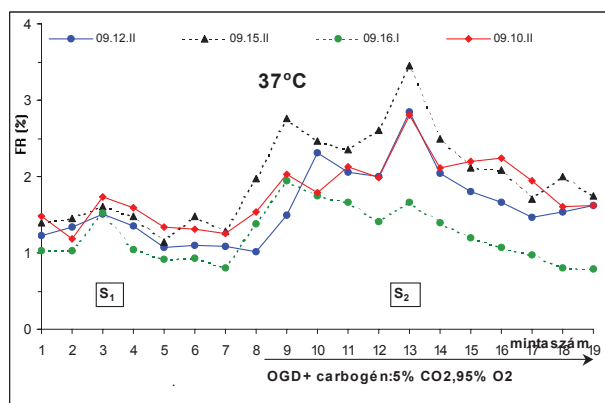
ós kamrából és a tömegük lemerése után 500 µl 10%-os triklórecetsavba helyeztem, majd 24 órás állás után lemer-tem a radioaktivitásukat.

Az eredményeket excel táblázatokban összegeztem, gra-fikonok segítségével ábrázoltam, majd e program szerint statisztikailag értékeltem. Az egyes frakciók Bq/g-ban mért radioaktivitását arányaiban vizsgáltam a szövetek súlya valamint radioaktivitásuk függvényében.

Mérési eredmények

A dopamin felszabadulás glukóz és oxigén jelenlétében kiugrást mutatott a 3. illetve a 13. frakció során, elektro-mos ingerlés hatására. (3. és 4. ábrák). A 2 ingerlés között a dopamin felszabadulás állandó volt.

A 8. frakciótól kezdtem el alkalmazni a glukóz illetve oxigén deprivációt. A dopamin felszabadulás jelentősen megnőtt, már a 8. frakció szintjén. Az elektromos ingerlés hatására pedig változatlanul megmaradt a dopamin fel-szabadulás a 3. illetve a 13. frakciók szintjén, a 13. frakci-ónál pedig hozzáadódott a glukóz-oxigén depriváció által kiváltott dopamin felszabadulás értékeihez. A 8. frakciótól

5. ábra. G-O₂ depriváció+acidózis

kezdődően a szörsejt oldatban enyhe acidotikus értéket mértünk. Ez szintén hozzájárult a dopamin felszabadulás növekedéséhez (5. és 6. ábrák).

Következtetések

Az elektromos ingerlés hatására jelentős, peak-szerű dopamin felszabadulás-növekedés volt észlelhető a 3-ik illetve a 13-ik frakciók esetében, glukóz-oxigén jelenlétében illetve anélkül egyaránt.

A glukóz-hiány valamint acidózis hatására (a 8-ik frakciótól kezdődően) jelentős dopamin felszabadulás-növekedés volt észlelhető.

A dopamin felszabadulás növekedése erős neuronkárosító ingerek hatására, illetve oxigén-glukóz depriváció valamint acidózis jelenlétében arra enged következtetni, hogy a dopamin neuroprotektív szerepet fejt ki a szörsejtek szintjén, ugyanakkor közvetlen neurokémiai bizonyíték a dopamin neurotransmitter szerepéről az olivocochleáris efferens rostokban [4, 7, 17, 18].

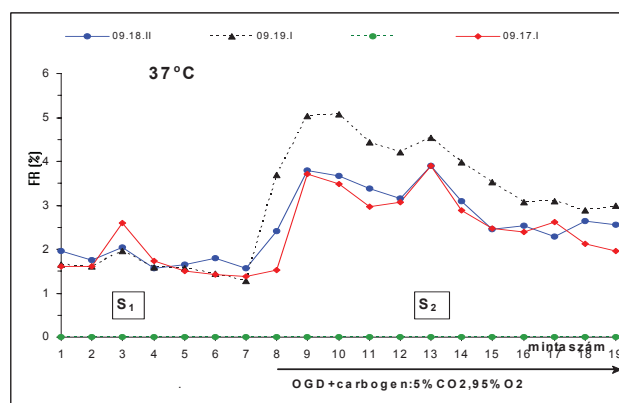
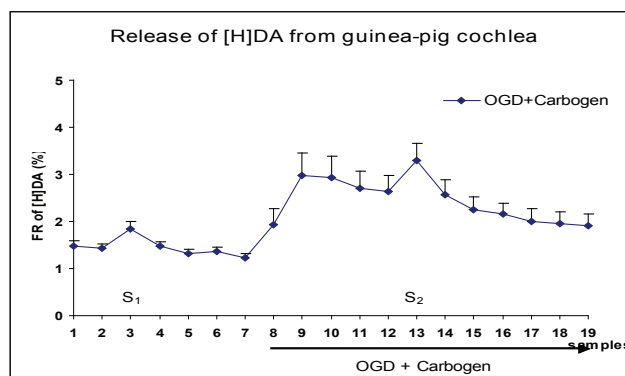
A továbbiakban szükségessé válik azon lehetőségek vizsgálata, hogy egyes dopamin-agonista gyógyszerek miképpen képesek megvédeni a hallószervet az őt érő külső károsító tényezőktől, mint például az erős zajok, acidózis, oxigénhiány.

Köszönetnyilvánítás

A jelen dolgozat a MTA Domus Hungarica ösztöndíjbizottsága és a KOKI támogatásával jött létre. Külön köszönet Vizi E. Szilveszter professzor úrnak.

Irodalom

1. Aschoff A., Ostwald J. - *Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats and guinea pigs*, J. comp. Neurol., 1987, 264:56-72.
2. Bodian D., Gucer G. - *Denervation study of synapses of organ of Corti of Old World monkeys*, J. comp. Neurol., 1980, 192:785-796.

6. ábra. Végső összeg:G-O₂-depriváció+acidózis6. ábra. Végső összeg:G-O₂-depriváció+acidózis

3. d'Aldin C., Eybalin M., Puel J.L. et al. - *Synaptic connections and putative functions of the dopaminergic innervation of the guinea pig cochlea*, Eur. Arch. Otorhinolar., 1995, 252:270-274.
4. d'Aldin C., Puel J.L., Leducq R. et al. - *Effects of dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea*, Hearing Res., 1995, 90:202-211.
5. Eybalin M. - *Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea*, Physiol. Rev., 1993, 73:309-373.
6. Eybalin M., Charachon G., Renard N. - *Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine*, Neuroscience, 1993, 54:133-142.
7. Gáborján A., Lendvai B., Baranyi M. et al. - *Modulation of neurotransmitter release from the efferent innervation of the cochlea*, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac., 1997, 356S1: R21.
8. Gil-Loyzaga P.E. - *Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine*, Acta otolar., Stockh., 1995, 115:222-226.
9. Gil-Loyzaga P., Bartolomé M. V., Vicente Torres M. A. - *Serotonergic innervation of the organ of Corti of the cat cochlea*, NeuroReport, 1997, 8:3519-3522.
10. Gil-Loyzaga P., Fernandez-Mateos P., Vicente Torres M. A. et al. - *Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism*, Brain Res., 1993, 623:177-180.
11. Gil-Loyzaga P. and Parés-Herbuté N. - *HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats*, Devl Brain Res., 1989, 48:157-160.

12. Ikeda K., Saito Y., Nishiyama A. et al. - *Effects of pH on intracellular calcium levels in isolated cochlear outer hair cells of guinea pigs*, Am. J. Physiol., 1991, 261:C231-C236.
13. Liberman M. C. - *Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electron microscopic study serial sections*, Hearing Res., 1980, 3:189-204.
14. Liberman M. C., Dodds L. W., Pierce S. - *Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy*, J. comp. Neurol., 1990, 301:443-460.
15. Oestreicher E., Arnold W., Ehrenberger K. et al. - *Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs*, Hearing Res., 1997, 107:46-52.
16. Ohmori H. - *Afferent and efferent synaptic transmission in hair cells*, News Physiol. Sci., 1996, 11:161-166.
17. Puel J.L., d'Aldin C. G., Saffiedine S., Eybalin M. et al. - *Excitotoxicity and plasticity of IHC-auditory nerve contributes to both temporary and permanent threshold shift*, In: *Scientific Basis of Noise-induced Hearing Loss* (eds Axelsson A., Hamernik R. P. and Salvi R. J.): Thieme Medical, New York, 1996, pp. 36-42.
18. Pujol R., Puel J.L., d'Aldin C. G. et al. - *Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea*. Acta Otol., Stockh., 1993, 113:330-334.
19. Puel J. L. - *Chemical synaptic transmission in the cochlea*. Prog. Neurobiol., 1995, 47:792-817.
20. Gáborján A., Lendvai B., Vizi E. S. - *Neurochemical evidence of dopamine release by lateral olivocochlear efferents and its presynaptic modulation in guinea-pig cochlea*. Neuroscience, 1999, 90, No. 1:131-138
21. Warr W. B., Guinan J. J. Jr., White. J. S. - *Organization of the efferent fibres: The lateral and medial olivocochlear systems*, In: Altschuler R. A., Hoffman D. W., Bobbin R. P. (eds.): *Neurobiology of hearing*, Raven Press, New York, 1986, 333-348.