

175564

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**KORTİKOSTEROİDLERİN
NÖROMÜSKÜLER AŞIRIMA ETKİLERİ
VE OLASI ETKİ MEKANİZMALARI**

FARMAKOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Dr. TURGAY DALKARA

ANKARA - 1981

T.C.
HACETTEPE UNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

KORTİKOSTEROİDLERİN
NÖROMÜSKÜLER AŞIRIMA ETKİLERİ
VE OLASI ETKİ MEKANİZMALARI

FARMAKOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Dr. TURGAY DALKARA

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ: DOÇ. Dr. E. RÜŞTÜ ONUR

ANKARA-1981

Mikroelektrot kayıt yöntemini bana öğreten ve bu çalışmanın yapılabilmesi için gerekli olanakları sağlayan, sürekli desteğini gördüğüm Doç. Dr. E. Rüştü Onur'a, değerli eleştirileri için Prof. Dr. S. Oğuz Kayaalp'e, gösterdikleri yakın ilgiden dolayı Prof. Dr. Attila Hıncal'a ve Dr. Yılmaz Çapan'a, çalışmamızda kullanılan ilaçları sağlayan Deva İlaç Sanayii A.Ş.'ne ve ve Dr. Ümran Uzbek'e teşekkürü bir borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

Bölüm I. GİRİŞ	1
Bölüm II. GENEL BİLGİLER	4
1. Nöromusküler Aşırım	4
2. Kortikosteroidlerin Nöromusküler Aşırıma Etkileri	11
Bölüm III. ARAÇ , GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
1. Frenik Sinir-Diyafragma Preparatının Hazırlanması	16
2. Mikroelektrot Kayıt Düzeni ve İntrasellüler Kayıt İşlemleri	17
3. Ekstrasellüler Kayıt İşlemleri	21
4. Deksametazon Sodyum Fosfatlı Ringer Çözeltisinin Hazırlanması	22
5. Son Plak Potansiyellerinin Kuantal Yapısının ve Diğer Verilerin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	22
Bölüm IV. BULGULAR	24
Bölüm V. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
Bölüm VI. ÖZET	41
Bölüm VII. KAYNAKLAR	42

GİRİŞ

Prednizolon ve diğer glukokortikoidler, myastenia gravis tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Genellikle, antikolinesteraz ilaçlarla yeterli iyileşme sağlanamayan hastalarda tedaviye eklenen bu ilaçlar, hastaların % 85'inde kas kuvvetinde düzelmeye yol açmaktadır (Drachman, 1978). Bu düzelme, tedavinin ilk 24 saati içinde başlayabileceği gibi, bazı hastalarda ikinci haftadan sonra ortaya çıkmaktadır. Bir grup hastada ise, tedavinin ilk 10 günü içinde kas kuvvetinde kötüleşme görülmekte, bu dönemi izleyerek iyileşme başlamaktadır (Warmolts ve Engel, 1972; Seybold ve Drachman, 1974; Mann ve diğ., 1976; Rowland, 1980). Başlangıçtaki bu olumsuz etki, bazen solunum felcine ve hastanın ölümüne yol açabilmektedir. Bu nedenle, ACTH'ın myastenia gravis tedavisinde başarıyla kullanılabileceği ilk kez 1951 yılında bildirilmiş olmasına rağmen (Torda ve Wolff, 1951), ACTH ve glukokortikoidlerin myastenia graviste kullanımı 1960'lara kadar kontrendike olarak kabul edilmiştir (Grob ve Harvey, 1952; Patten ve diğ., 1974).

Kas kuvvetindeki bu kötüleşmenin nedeni bilinmemektedir. Genellikle, glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma direkt ve olumsuz etkileriyle açıklanmaya çalışılmıştır: Patten ve diğ. (1974), Dengler ve diğ. (1979) ve Hall (1980), sıçan ve kedi sinir-kas preparatlarında yaptıkları çalışmalara dayanarak, glukokortikoidlerin, antikolinesteraz ilaçların nöromusküler aşırımı düzeltici etkisini önleyerek, kas kuvvetinde azalmaya neden ola-

bileceğini öne sürmüşlerdir. Triamsinolonun, sıçanlarda ilk günlerde kas membranında depolarizasyona yol açtığını bildiren Groosie ve Albuquerque (1978) ise, benzer bir mekanizmanın myastenik hastalarda glukokortikoid tedavisinin başlangıcında görülen kötüleşmeden sorumlu olabileceğini düşünmüşlerdir.

Glukokortikoidlerle myastenia graviste sağlanan iyileşmenin mekanizması da bilinmemektedir. Myastenia gravisin otoimmün bir hastalık olması nedeniyle, bu ilaçların immünosupresyonla etkili oldukları görüşü yaygın olarak benimsenmiştir (Engel ve Warmolts, 1971; Rowland, 1980).

Diğer taraftan, bazı hastalarda ilk 24 saat içinde kas kuvvetinde düzelme görülmesi; gün aşırı ilaç alan hastalarda, kas kuvvetinin, ilaç alınmayan günlerde, ilaç alınan günlere oranla daha düşük bulunması; timektomi sırasında yüksek doz prednizolon verilmesinin, postoperatif solunum kapasitesini artırması (Bolooki ve Schwantzman, 1978) gibi akut etkiler ve glukokortikoidlerle sağlanan iyileşmenin zaman profilinin diğer immünosüpresif yöntemlerle sağlanan iyileşmenin zaman profiline benzememesi (Matell ve diğ., 1976), glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma direkt, fasilitatör bir etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma direkt etkileri, çeşitli gruplar tarafından araştırılmış ve çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Riker ve diğ. (1975), Wolters ve Leeuwın (1976), Groosie ve Albuquerque (1978), glukokortikoidlerin presinaptik bir etkiyle asetilkolin salıverilmesini artırarak nöromusküler aşırımı kolaylaştırıcı bir etkileri olduğunu öne sürmüşlerdir. Buna karşılık,

Wilson ve diğ.(1974), prednizolonun presinaptik fasilitatör etkisine ek olarak postsinaptik blok yapıcı bir etkisi olduğunu; Kim ve diğ. (1979) ise, glukokortikoidlerin, yüksek dozda, nöromusküler blokaj yapabileceğini bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi, glukokortikoidlerle myastenia graviste sağlanan iyileşme, bu ilaçların immünosüpresif etkileriyle açıklanamayan özellikler göstermekte, buna karşılık glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma direkt etkilerini inceleyen araştırmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda, glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma direkt etkilerinin ve etki mekanizmalarının intrasellüler ve ekstrasellüler kayıt yöntemleri ile hücresel düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde yer alan in vitro çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda, suda iyi çözünen bir glukokortikoid türeği olan deksametazon sodyum fosfat kullanılması tercih edilmiştir.

GENEL BİLGİLER

1. NÖROMÜSKÜLER AŞIRIM

Nöromusküler kavşak morfolojisi ve nöromusküler aşırım fizyolojisi çeşitli makalelerde ve klasik kitaplarda ayrıntılı olarak anlatılmıştır (Del Castillo ve Katz, 1956; Katz, 1966; Hubbard, 1970 ve 1973; Hubbard ve Quastell, 1973; Krnjevic, 1974; Bowden ve Duchon, 1976; Barret ve Magleby, 1976; Ginsborg ve Jenkinson, 1976).

1.1. Nöromusküler Kavşak

Nöromusküler kavşak, motor sinir hücresi ile çizgili kas hücresi arasında impuls aşırımını sağlayan özelleşmiş bir sinaptıdır. Bu yapı:

a- Presinaptik bölgede, Schwann hücresi ve motor sinir sonlanmasından,

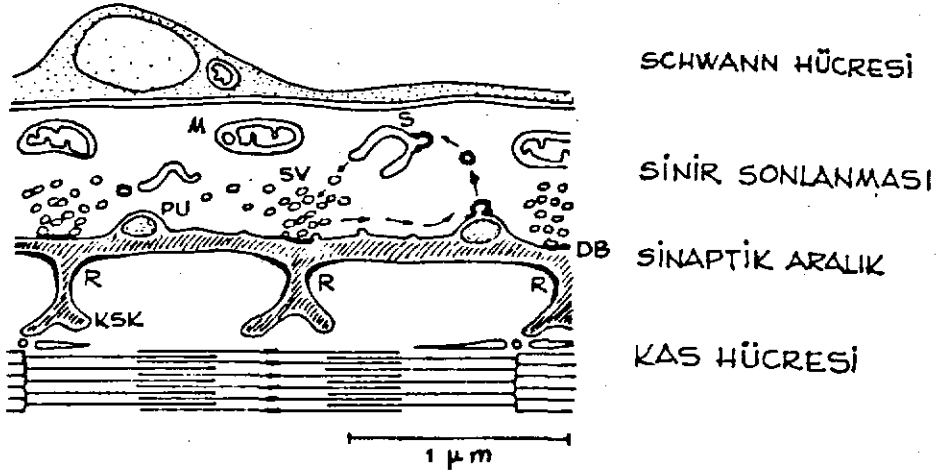
b- Postsinaptik bölgede, postsinaptik membran, bu bölgedeki sarkoplazma, nükleuslar ve sitoplazmik organellerden oluşmuştur. Bu bölgeye "motor son plak" da denmektedir.

Presinaptik ve postsinaptik bölgeleri birbirinden 40-50 nm genişliğindeki sinaptik aralık ayırmaktadır.

Motor son plaklar, genellikle kas hücrelerinin ortalarında yer alırlar. Aksonlar bu bölgelere yaklaşırken dallanmalar gösterirler (terminal arborizasyon). Bir motor nöron, akson dallanmaları aracılığıyla 13-1700 kas hücresini sinirlendirir. Motor nöron ve innerve ettiği kas hücrelerinin oluşturduğu bu fonksiyonel

birime "motor unite" denmektedir.

Motor sinir uçlarında, bol miktarda, içleri asetilkolin (ACh) ile dolu ve 50 nm çapında veziküller bulunur. Veziküller, presinaptik zar üzerinde transvers olarak uzanan "dens band"lar çevresinde kümelenme gösterirler. İmpuls aşırımı sırasında, vezikül membranları, bu bölgelerde presinaptik zara kaynarak (füzyon) içlerindeki ACh'i sinaptik aralığa dökerler. Veziküller, daha sonra, Schwann hücrelerinin parmaklı uzantılarının bulunduğu bölgede presinaptik zarın invajinasyonu ile rejenere edilirler. Bu işlemi, veziküllerin membranöz sisternalarda ACh ile doldurulması izler (Şekil 1). ACh ise, asetil-CoA ile kolinden sentez edilir. Bu reaksiyonu, kolin-O-asetil transferaz enzimi katalize eder. Bu işleyiş için gerekli enerji ve asetil-CoA, sinir uçlarında yoğun



Şekil 1. Nöromusküler kavşak. M: Mitokondri, S: Sisterna, SV: Sinaptik vezikül, PU: Schwann hücresi parmaklı uzantısı, DB: Dens band, R: Reseptörler, KSK: Kavşak sonrası kıvrımları. (Biology of Cholinergic Function, ed. Goldberg, A.M., Hanin, I., Raven Press, New York, 1976) dan alınmıştır.

bir şekilde bulunan mitokondrilerden sağlanır. Mitokondriler, ayrıca sinaptik aşırım sırasında Ca^{++} iyonunun dağılım ve tutulmasında rol oynarlar.

Postsinaptik membran çok sayıda kıvrımlar gösterir. ACh reseptörleri, kıvrımların, presinaptik "dens band"ların karşısında yer alan tepe bölgeleri üzerinde yoğun olarak bulunurlar (8500-12000 reseptör/ μm^2) (Barrett ve Magleby, 1976) (Şekil 1). Bu düzenlenme, ACh'in reseptörlerle etkileşmesi olasılığını artırır. Salıverilen ACh, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hızla asetil-CoA ve koline hidroliz edilir. Bir kısım ACh ise, dolaşıma difüze olur. Sinaptik aralıkta serbest hale geçen kolinin büyük bir kısmı, sinir sonlanmasına geri alınarak (re-uptake) tekrar ACh sentezinde kullanılır.

1.2. Nöromusküler Aşırım

Nöromusküler kavşakta impuls aşırımı sırasında şu olaylar meydana gelmektedir: Motor sinir aksiyon potansiyelinin presinaptik zar boyunca yayılmasıyla depolarize olan presinaptik zarın, Ca^{++} 'a geçirgenliği artar. Sinir sonlanmasına giren Ca^{++} , ACh salıverilmesine yol açar. Salıverilen ACh'in postsinaptik zardaki ACh reseptörleri ile etkileşmesi, postsinaptik zarın Na^+ ve K^+ iyonlarına geçirgenliğini artırır. Bu da, elektrokimyasal gradientlerine bağlı olarak, Na^+ iyonlarının kas hücresi içine, K^+ iyonlarının ise, kas hücresi içinden ekstrasellüler sıvıya doğru hareketine yol açar. İyonların bu hareketi, postsinaptik membranın önce depolarize, ve daha sonra repolarize olmasına yol açar ki, oluşan 2-3 msan devam süreli bu potansiyele,

son plak potansiyeli (SPP) denmektedir. SPP'i, postsinaptik zarı bir eşik değere (-50 mV dolaylarında) kadar depolarize edebilecek büyüklükte ise aksiyon potansiyeli oluşur. Aksiyon potansiyeli, SPP'lerinin aksine motor son plağa lokalize kalmaz; kas hücresi membranı boyunca yayılarak kas kontraksiyonuna yol açar.

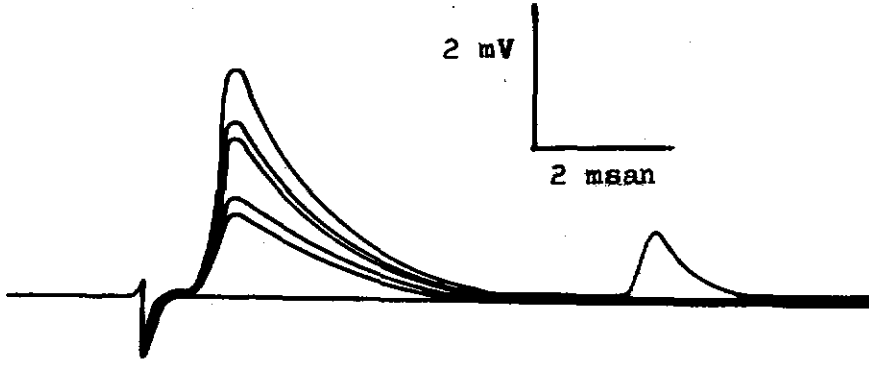
1.3. Nöromusküler Aşırımın Güvenlik Sınırları

Fizyolojik koşullarda, bir sinir impulsu ile 10^6 molekül ACh salıverilir. Bu miktardaki ACh'in yol açtığı depolarizasyon, aksiyon potansiyeli oluşabilmesi için gerekenin 4-5 katıdır. Dolayısıyla, ACh salıverilmesinde önemli bir eksilme olmadığı sürece, nöromusküler aşırım bundan etkilenmez. Diğer taraftan, aksiyon potansiyeli oluşumu sırasında, ACh ile etkileşen reseptör sayısı, kavşakta bulunan tüm reseptörlerin küçük bir kısmıdır. Reseptör sayısında % 25 oranında bir azalma olmadan, postsinaptik zarın ACh'e cevabında bir değişme gözlenmez (Albuquerque ve diğ., 1974). Aksiyon potansiyeli oluşabilmesi için gerekenden çok ACh salıverilmesi ve postsinaptik zarın reseptörden zengin yapısı, nöromusküler kavşağın güvenlik sınırlarınının (safety margin) geniş olmasını sağlar. Bu nedenle, bu güvenli yapı, evrim sürecinin genişçe bir bölümünde, belirgin bir değişikliğe uğramadan korunmuştur (örneğin, ACh reseptörünün antijenik özelliğini veren determinant molekül grubu -ki reseptör fonksiyonu için çok önemlidir- sıçandan insana kadar tüm memelilerde aynıdır) (Lindstrom, 1978).

1.4. Asetilkolin Salıverilmesinin Kuvantal Yapısı

1952 Yılında Fatt ve Katz, kurbağa nöromusküler kavşağında, impuls aşırımı dışında da gözlenen, 1 mV'dan küçük potansiyeller

saptadılar. Kendiliğinden (spontan) ve rastgele (random) olarak oluşan, 2-3 msan süreli ve yaklaşık 1/san frekansındaki bu potansiyellere, elektriksel ve farmakolojik özelliklerinin SPP'lerininine benzemesi nedeniyle minyatür son plak potansiyelleri (MSPP) denmektedir. Yüksek Mg^{++} ve/veya düşük Ca^{++} 'lu Ringer çözeltileri, ACh salıverilmesini azaltarak SPP'lerinin eşik altı kalmasına yol açar. Böylece sinirin uyarılması sonucu, kas aksiyon potansiyeli ve kas kontraksiyonu oluşamaz. Bu tür besleyici çözeltiler kullanılarak yapılan çalışmalar, bir hücreden supramaksimal uyarıyla elde edilen her SPP'inin amplitüdünün aynı olmadığını, bu potansiyellerin, ortalama MSPP'leri amplitüdünün 0, 1, 2, 3, 4 ... gibi değişik katları şeklinde flüktüasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 2).



Şekil 2. ACh salıverilmesinin kuvantal yapısı. Sağda bir minyatür son plak potansiyeli (MSPP), solda ise, sinirin arka arkaya 6 kez uyarılmasıyla elde edilen son plak potansiyelleri (SPP) görülüyor. SPP'leri, MSPP'lerinin 0, 1, 1, 2, 2 ve 3 katı büyüklüktedir.

Bu gözlem, ACh'nin sinir sonlanmasından paketler (kuvantumlar) halinde salıverildiğini ve MSPP'lerinin bir ACh kuvantumu tarafından oluşturulan birim potansiyeller olduğu hipotezinin kurulmasına yol

açmıştır. Bugün, ACh kuvantumlarının, presinaptik veziküller olduğu düşünülmektedir (Heuser ve Reese, 1973 ve 1974).

ACh salıverilmesinin bu olasılıklı (probabilistik) yapısı, binomial dağılım veya onun bir türevi olan Poisson dağılımı istatistiği kullanılarak incelenmiştir (Del Castillo ve Katz, 1954; Martin, 1955; Boyd ve Martin, 1956; Liley, 1956; Katz ve Miledi, 1965; Martin, 1966; Christensen ve Martin, 1970; Bennet ve diğ., 1975). Bu teoremler, hemen salıverilmeye hazır "n" tane kuvantum olduğunu ve bunların her birinin salıverilme olasılığının "p" olduğunu postüle eder. Bu durumda, SPP'lerinin "ortalama kuvantum sayısı", $m = n.p$ olacaktır. p Değeri 0.1'den küçükse, SPP'lerinin salıverilmesi Poisson dağılımına, 0.1-0.2'den büyükse binomial dağılıma uygunluk göstermektedir (Barrett ve Magleby, 1976). Mg^{++} ile bloke edilmiş memeli sinir-kas preparatlarında, p değeri, genellikle 0.1'den küçük olup SPP'lerinin amplitüdlерinin dağılımı Poisson istatistiğine uymaktadır. Nöromusküler kavşağın çeşitli fizyolojik, farmakolojik ve patolojik durumlarındaki elektrofizyolojik özellikleri, bu parametreler aracılığıyla incelenebilmektedir.

1.5. Tekrarlayan Uyarmanın Transmitter Salıverilmesine Etkileri

Motor sinirin uyarılmasıyla oluşan sinir aksiyon potansiyelinin sinir uçlarına yayılması, yalnızca transmitter salıverilmesine yol açmakla kalmaz, aynı zamanda oluşturduğu daha uzun süreli değişikliklerle sinir uçlarının takibeden uyarılmaya cevabını da etkiler. Tekrarlayan uyarma (repetitif stimülas-

yon) sırasında ya da kısa zaman aralıklı ikiz uyarılarla (twin pulse) incelenebilen bu şartlayıcı etkilerin başlıcaları: fasilitasyon, depresyon ve potansiyalizasyondur. Bunların dışında intermediyer fasilitator süreç ve mobilizasyon gibi yeterince tanımlanmamış fenomenler de vardır. Bu kavramlar çeşitli derlemelerde incelenmiştir (Hubbard, 1973; Krnjevic, 1974; Barret ve Magleby, 1976).

a. Fasilitasyon, tekrarlayan uyarmanın başında görülen SPP'lerinin amplitüdündeki kısa süreli (1 saniyeden az) artışa denmektedir. Fasilitasyon, şartlayıcı uyarandan hemen sonra maksimal değerdedir ve bunu izleyerek üslü (eksponensiyel) bir zaman profili (time-course) ile söner. Fasilitasyonun, sinir uçlarında biriken Ca^{++} ya da Ca^{++} -reseptör kompleksinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Katz ve Miledi, 1968; Balnave ve Gage, 1974).

Tekrarlayan uyarma sırasında fasilitasyonu inceleyebilmek için onu depresyon ve potansiyalizasyondan ayırmak gerekmektedir. Bu, kuvantum sayısını küçülterek (depresyonu azaltır) ve kısa süreli tekrarlayan uyarma ya da ikiz uyarılar kullanılarak (potansiyalizasyonu azaltır) başarılabilir.

b. Tekrarlayan uyarma sırasında SPP'lerinin amplitüdünde görülen azalmaya depresyon denmektedir. Fasilitasyon nedeniyle, şartlayıcı uyarandan ancak 200 msan sonra görülebilir. Bununla beraber, depresyonun da fasilitasyon gibi uyarmadan hemen sonra maksimal olduğu kabul edilmektedir. Depresyon, muhtemelen preterminal kuvantum depolarının tüketilmesi ve/veya aktif salıverilme noktalarının inaktivasyonunu simgelemektedir. Bennet ve Florin (1974), depresyonun n'yi azalttığını, p'yi etkilemediğini göstermişlerdir.

Depresyon, fasilitasyon ve potansiyalizasyonun aksine SPP'lerinin kuvantum sayısına bağılıdır. Kuvantum sayısı ne kadar fazlaysa, depresyon o kadar fazla olacaktır. Uyarmanın frekans ve devam süresinin artması da depresyonu artırır.

c. Potansiyalizasyon, tetanik uyarma sırasında ve sonrasında SPP'lerinin amplitüdünde görülen artışa denmektedir. Potansiyalizasyon, fasilitasyon ve depresyona oranla daha yavaş gelişen ve daha uzun süren bir olaydır. Tetanik uyarmanın frekansı ve devam süresi arttıkça potansiyalizasyon da artar. Tetanik potansiyalizasyonun ve posttetanik potansiyalizasyonun erken devresinin görülmesi genellikle depresyon tarafından engellenmektedir.

Potansiyalizasyonun, presinaptik Ca^{++} birikimine bağlı olduğu düşünülmektedir (Gage ve Hubbard, 1966). Potansiyalizasyonun p'yi artırdığı, n'yi etkilemediği gösterilmiştir. (Rosenthal, 1969).

II. GLUKOKORTİKÖİDLERİN NÖROMÜSKÜLER AŞIRIMA ETKİLERİ

Glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma direkt etkilerini inceleyen ilk çalışmalar, Torda ve Wolff'a aittir. Bu araştırmacılar, myastenia gravisli hastalarda ulnar sinirin, 30 san süreyle 10 Hz frekansında uyarılmasıyla, hipotenar kasdan kaydedilen aksiyon potansiyellerinde görülen progresif amplitüd kaybının, ACTH tedavisinden sonra düzeldiğini saptadılar (Torda ve Wolff, 1951). Aynı araştırmacılar, hipofizektomi yapılmış sıçanlarda beyin ACh miktarının azaldığını ve siyatik sinirin uyarılmasıyla (30 san süreyle, 30 Hz frekansında) gastrocnemius kasından kaydedilen aksiyon potansiyellerinin amplitüdülerinin giderek düştüğünü, bu değişmelerin ACTH verilmesiyle düzeldiğini gösterdiler (Torda ve

Wolff, 1950). Adrenalektomi yapılmış sıçanlarda yapılan benzeri çalışmada da, aynı bozukluklar görülmüş ve kortizon verilmesiyle bu bozuklukların düzeldiği bildirilmiştir (Torda ve Wolff, 1952).

Daha sonraki yıllarda, myastenia gravis tedavisinde ACTH ve kortikosteroid kullanımından vazgeçilmesine paralel olarak, bu ilaçların nöromusküler aşırıma direkt etkileri üzerine çalışmalar popüleritesini kaybetmiştir. Bu dönemde daha çok, steroidlerin, kas hücresinin su ve tuz dengesi üzerine etkileri (Klein ve diğ., 1962) ve myopati oluşturma mekanizmaları araştırılmıştır (Perkoff ve diğ., 1959; Faludi ve diğ., 1966).

1970'ten sonra, glukokortikoidlerin myastenia gravis tedavisinde kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte, bu ilaçların nöromusküler aşırıma direkt etkileri tekrar araştırma konusu olmuştur. İlk çalışmalarda, steroidlerin nöromusküler aşırıma direkt etkileri olmadığı öne sürüldü: Prabhu ve Oester (1971), kortizon verilen sıçanlarda yaptıkları elektromiyografi çalışmalarında, kontrol sıçanlara göre bir farklılık saptamadılar. Namba (1972), myastenia gravisli hastalarda yaptığı elektromiyografik çalışmada, intraarteriyel olarak verilen ACTH (40-100 i.ü.) ve hidrokortizonun (100-185 mg) nöromusküler aşırıma etkisi olmadığını ve intraarteriyel olarak uygulanan ACh'e verilen cevabı değiştirmediğini gösterdi. Aynı çalışmada, sıçanlarda femoral artere verilen ACTH (1.25-10 i.ü.) ve hidrokortizonun (1.25-10 mg), gastrocnemius kasından kaydedilen aksiyon potansiyelleri üzerine etkisiz olduğu da bildirilmiştir.

Bu çalışmaları, glukokortikoidlerin nöromusküler aşırıma etkilerini

bildiren araştırmalar izledi. Patten ve diğ. (1974), sıçan sıyatik sinir-tibialis anterior kası preparatında in vivo olarak yaptıkları çalışmada, hidrokortizonun (5-275 mg/kg), indirekt tuviler üzerine etkili olmamakla birlikte, antikolinesterazlar tarafından oluşturulan tuvi potansiyalizasyonunu ortadan kaldırdığını gosterdiler. Bu araştırmacılar, antikolinesterazlarla glukokortikoidler arasındaki olumsuz etkileşmenin myastenia gravisli hastalarda, steroid tedavisinin başlangıcında gürülen kütüleşmeden sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu bulgular, Dengler ve diğ. (1979) tarafından da desteklenmiştir. Dengler ve arkadaşları, sıçanda, sıyatik sinir-triceps surae kası preparatında, in vivo yaptıkları çalışmalarda, prednizolonun (150 mg/kg) nöromüsküler aşırıma direkt bir etkisi olmadığını, fakat antikolinesterazlar tarafından oluşturulan tuvi potansiyalizasyonunu önlediğini; frenik sinir-diyafraqma preparatında yaptıkları in vitro çalışmada da, sodyum prednizolon hemisüksinatın, neostigmin tarafından oluşturulan "stimulus-bound repetitive firing"i azalttığını göstermişler ve bu in vitro sonuçların in vivo bulguları kısmen açıklayabileceğini öne sürmüşlerdir.

Wilson ve diğ. (1974), sıçan frenik sinir-diyafraqma preparatında, intraselüler mikroelektrot kayıt yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, prednizolonun MSPP'lerinin frekansını artırdığını ve MSPP'lerinin amplitüdünü azalttığını gosterdiler. Bu sonuçları, Dudel ve diğ. (1979) farede, Kim ve diğ. (1979), sıçanda doğruladılar. Bu çalışmalarda, prednizolon, çizgili kas istirahat membran potansiyelleri üzerinde etkisiz bulunmuştur. Bu

bulgulara dayanılarak, prednizolonun, presinaptik bir etkiyle ACh salıverilmesini artırdığı ve postsinaptik bir etkiyle ACh duyarlılığını azalttığı öne sürülmüştür. Kim ve diğ.(1979), ayrıca, prednizolonun SPP'lerinin ve aksiyon potansiyellerinin amplitüdünü azalttığını, SPP'lerinin yükselme ve yarıya inme (half-decay) zamanı ile, aksiyon potansiyellerinin devam süresini uzattığını saptadılar.

Arts ve Oosterhuis (1975), döner çubuk deneylerinde, farelere önceden prednizolon sodyum fosfat enjekte edilmesiyle d-tübokürarin ve hemikolinium-3 (HC-3) tarafından oluşturulan nöromüsküler bloğun önlenemediğini gösterdiler. Hofmann (1977) ise, prednizolonun (0.1 mM), dekürarizan bir etki göstermediğini öne sürmüştür. Bu negatif in vitro sonuca karşın, Hall (1980), kedi gastrocnemius-plantaris sinir-kas preparatında yaptığı in vivo çalışmada, önceden triamsinolon verilmiş kedilerde d-tübokürarinin nöromüsküler blok yapıcı potansiyelinin azaldığını bildirdi.

Wolters ve Leeuwin (1975), glukokortikoidlerin sıçan ve farelerde, HC-3'ün letal dozunu yükselttiğini saptadılar. Aynı araştırmacılar, sıçan frenik sinir-diyafagma preparatında HC-3 tarafından oluşturulan presinaptik bloğun prednizolon, hidrokortizon ve deksametazon tarafından önlenemediğini gösterdiler (Wolters ve Leeuwin, 1976). Bu araştırmacılar, aynı bulguları, sıçan siyatik sinir-tibialis anterior preparatında yaptıkları in vivo çalışmalarda da elde ettiler (Leeuwin ve diğ., 1977).

Riker ve diğ. (1975), 7-14 gün glukokortikoid verilmiş kedilerde, soleus kas - sinir preparatında, in vivo yaptıkları kayıt-

larda, posttetanik potansiyalizasyon ve "stimulus-bound repetition"ın artmış olduğunu göstererek, kortikosteroidlerin antımyastenik ve konvülsiyon eşliğini düşürücü (Woodbury, 1952) etkilerinin, bu ilaçların presinaptik fasilitatör etkilerine bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar, tek ve yüksek doz (30-90 mg/kg) intravenöz metilprednizolonun, depresör bir etkiyi izleyerek aynı fasilitatör etkiyi gösterdiğini de saptadılar (Baker ve diğ., 1977).

Groosie ve Albuquerque (1978), 4 gün süreyle, 20 mg/kg triamsinolon asetonit verilen sıçanların extensor digitorum longus kasında yaptıkları çalışmalarda, 24 saat sonunda, kas istirahat membran potansiyelinin ve aksiyon potansiyelinin amplitüdü ile "overshoot"unun düşük olduğunu, aksiyon potansiyelinin yükselme hızının azaldığını; bu bulguların 4. gün sonunda düzeldiğini saptadılar. 4. Günde incelenen sıçanlarda, tetanus gerilimi ve MSPP'lerinin frekansının artmış olduğunu buldular. Bu preparatların, SPP'lerinin kuvantum sayısında değişiklik olmamakla beraber, yüksek Mg^{++} ile bloke olmaları için kontrollere oranla daha uzun zaman gerektiğini saptadılar.

ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Frenik Sinir-Diyafragma Preparatının Hazırlanması

Preparatlar, 28-32 g ağırlığında, her iki cinsden albino farelerden hazırlandı. Hafif eter anestezisi altındaki farelerin boyun damarları kesilerek kanatıldıktan sonra, diyafragma kası, yapıştığı kostalar ve sol frenik sinir ile birlikte çıkarıldı. % 95 O₂ - % 5 CO₂ karışımı ile gazlandırılmış Ringer çözeltisi ile dolu bir petri kabı içerisine konulan diyafragmanın sol yarısından, ortasında frenik sinirin yer aldığı dikdörtgen şeklinde bir preparat hazırlandı. Preparat, parafin kaplı pleksiglas bir plakanın ortasındaki mercek üzerine yerleştirip, çelik iğnelerle tutturulduktan sonra elektrofizyolojik kayıtların yapılacağı organ banyosuna taşındı. Burada, frenik sinir bir çift stimülasyon elektrodu üzerine yerleştirildikten sonra parafin ile örtüldü.

Organ banyosu, deney süresince, % 95 O₂ - % 5 CO₂ ile gazlandırılmış Ringer çözeltisi ile 2 ml/dak hızında perfüze edildi.

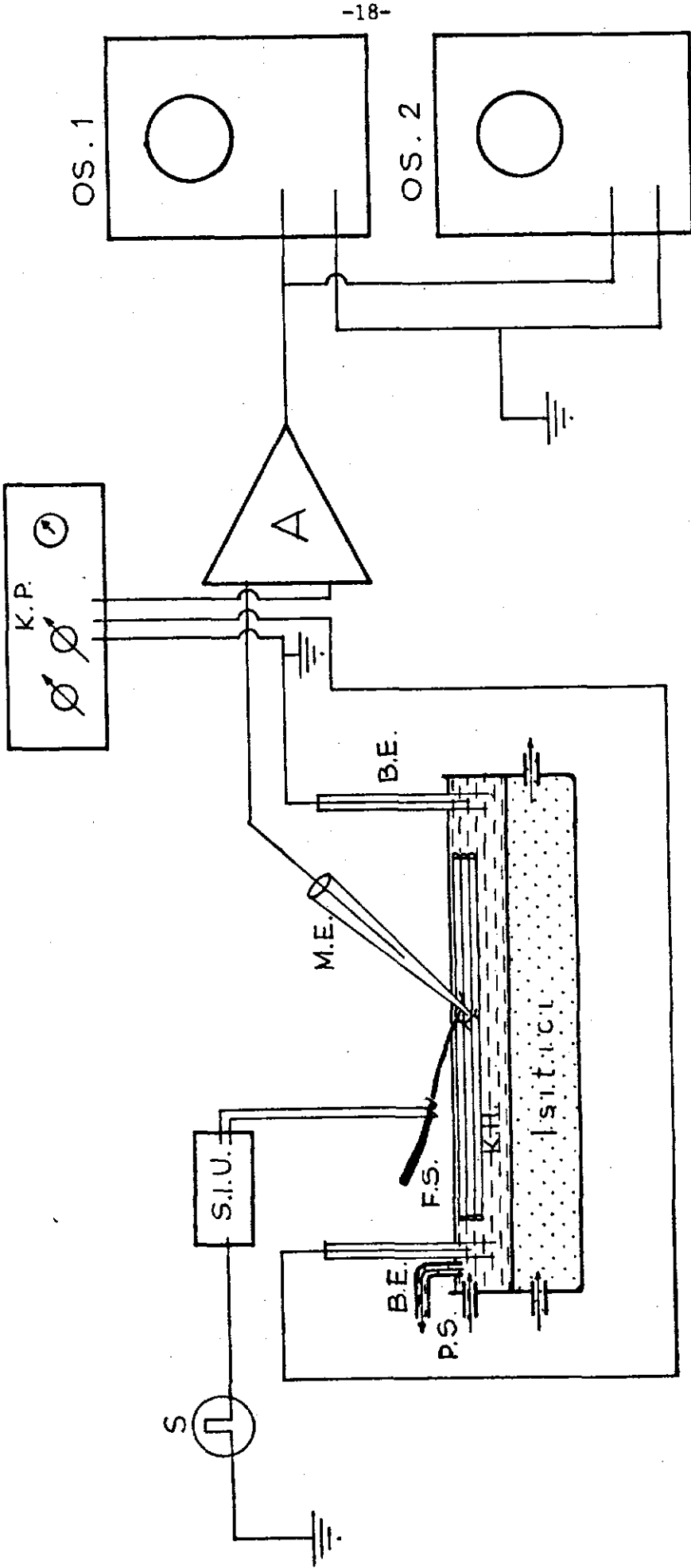
Hazırlık işlemleri, MSPP'lerinin ve aksiyon potansiyellerinin kaydı sırasında kullanılan Ringer çözeltisinin bileşimi aşağıdadır:

NaCl	135 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	2 mM
NaHCO ₃	15 mM
Na ₂ HPO ₄	1 mM
Glukoz ...	11 mM

2. Mikroelektrot Kayıt Düzeni ve İntrasellüler Kayıt İşlemleri

Çalışmamızda uç çapı 0.5 μm 'den küçük ve uç direnci 5-30 megaohm olan cam elektrotlar kullanılmıştır. Mikroelektrotların içi 3 M KCl çözeltisi ile doldurulmuştur. Bu çözelti içine sokulan AgCl kaplı gümüş tel elektrot, DC preamplifikatörün (Grass Model P 16) girişlerinden birine bağlanır. Preamplifikatörün diğer girişine de banyo çözeltisi içine sabit olarak yerleştirilmiş banyo elektrodu bağlanır. Bir diğer banyo elektrodu da, organ banyosunu topraklamak için kullanılır. Banyo elektrotları, içinde AgCl kaplı gümüş tel bulunan, kalsiyumsuz ve glukozsuz Ringer çözeltisi içinde % 2'lik agar eritilerek doldurulmuş, 4 mm iç çapında cam borulardır. Preamplifikatörün iki ucu arasında, devre elemanlarına ait bazı potansiyeller vardır (örneğin, banyodaki çözelti ile mikroelektrodun içindeki 3 M KCl çözeltisi arasında oluşan potansiyel farkı gibi). Bu potansiyel farkları, mikroelektrot hücreye saplanmadan önce sıfırlanır. Preamplifikatörden büyütülerek çıkan sinyaller, önce sinyal dağıtım tablosuna, oradan osiloskoplara dağıtılır (Şekil 3).

Mikroelektrot, stereomikroskop yardımıyla ve mikromanüplator kullanılarak, son plakların bulunduğu tahmin edilen bölgede, kas hücresine saplanır. Hücre içine girildiği, osiloskop I'de (Tektronix 565) ani bir negatif potansiyel kaydedilmesiyle anlaşılır ve mikroelektrodun itilmesi durdurulur. Bu potansiyel, ekstrasellüler sıvı (banyo elektrodu) ile intrasellüler sıvı (mikroelektrot) arasındaki potansiyel farkı, yani istirahat membran potansiyelidir (İMP). Osiloskop I, daha önceden, 10 mV = 1 cm olacak



Şekil 3. Mikroelektrot kayıt düzeni elektronik devre şeması. S; stimilatör, SIU; stimulus izolasyon ünitesi, BE: banyo elektrodu, PS: perfüzyon sistemi, FS: frenik sinir, KH: kas hücreleri, ME: mikroelektrot, KP: kademeli potansiyometre, A: preamplifikatör, OS: osiloskop.

şekilde kalibre edilmiştir. Böylece, İMP'leri ölçülerek not edilir.

Bunu izleyerek, banyo elektrotları ve preamplifikatör girişi arasına konmuş kademeli potansiyometre aracılığıyla bu potansiyel farkı nötralize edilir. Kademeli potansiyometre, aynı zamanda, gönderdiği 1 ve 10 mV'luk sinyaller aracılığıyla osiloskopların kalibrasyonunda da kullanılmaktadır.

Osiloskop I'deki sıfırlamadan sonra, MSPP'leri osiloskop II (Tektronix 502 A)'nin ekranında izlenebilir. Oda sıcaklığında, MSPP'lerin yükselme zamanının 1.5 msan'den az olması, mikroelektrodun ucunun son plak bölgesinde olduğunu gösterir. Yükselme zamanı 1.5 msan'den ne kadar fazla ise, son plaktan o kadar uzaklaşmış demektir. Bu durumda, elektrot kas hücresi içinden çıkarılarak son plak bölgesine girilmeye çalışılır.

Son plak bölgesinden kaydedilen MSPP'leri, refleksör ve kamera aracılığıyla 35 mm'lik siyah-beyaz negatif film üzerine çekilir. Her son plaktan, 60 san süreyle MSPP'leri oblik olarak kaydedilmiştir. Filmler banyo edildikten sonra, MSPP'leri agrandizör aracılığıyla milimetrik kağıt üzerine düşürülerek amplitüdlere ölçülmüştür.

İndirekt kas aksiyon potansiyelleri, mikroelektrot hücreye son plak bölgelerine uzak bir bölgede (2-3 mm) saplandıktan sonra sinirin supramaksimal olarak uyarılmasıyla osiloskop II'den izlenir ve film üzerine kaydedilir. Sinyal dağıtım tablosundan alınan aksiyon potansiyeli sinyali, bir elektronik diferansiyatör devre üzerinden geçirilerek, osiloskop II'de aksiyon potansiyeli ile birlikte izlenir. Böylece aksiyon potansiyeli ve birinci dereceden

türevi (dV/dt) kaydedilir. dV/dt, aksiyon potansiyelinin yükselme hızının bir göstergesidir.

Çalışmamızda, her preparattan, ilaç verilmeden önce ve ilaçla 1 saat perfüzyondan sonra, en az beşer hücreden MSPP'leri kaydedilmiştir. Kayıt süresince 10 mV'dan daha fazla depolarize olan lifler değerlendirme dışı tutulmuştur.

Preparatların 15 mM Mg⁺⁺ ve 1.5-2 mM Ca⁺⁺'lu Ringer çözeltisi ile perfüzyonu, sinir stimülasyonu ile kas aksiyon potansiyellerinin oluşmasını engelliyerek SPP'lerinin incelenmesini mümkün kılar.

Bu amaçla kullanılan Ringer çözeltisinin bileşimi aşağıdadır:

NaCl	120 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	15 mM
CaCl ₂	... 1.5-2	mM
NaHCO ₃	15 mM
Na ₂ HPO ₄	... 1	mM
Glukoz	...	11 mM

SPP'lerinin kaydı sırasında, frenik sinir, bir stimülatör, stimulus izolasyon ünitesi ve stimülasyon elektrodu aracılığıyla 0.75 Hz frekansında, supramaksimal voltajla (7-12 V) uyarılır. SPP'lerinin yükselme zamanınının 1.5 msan'den az olması, mikroelektrodun son plak bölgesinde olduğunu gösterir. Daha yavaş yükselen SPP'lerinin izlendiği bölgelerden, mikroelektrot çıkarılır. SPP'leri de, MSPP'leri gibi osiloskop II'de izlenir ve negatif film üzerine kaydedilir. Filmler banyo edildikten sonra, agrandizör aracılığıyla SPP'lerinin amplitüdüleri, yükselme zamanları ve yarıya inme (half-decay) zamanları ölçülmüştür.

Bu çalışmada, ilaçtan önce ve ilaçla 1 saat perfüzyondan sonra en az 5 hücre incelenmiş ve her hücreden 200-250 SPP'i kaydedilmiştir.

Deney süresince banyo sıcaklığı $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'da tutulmuştur.

3. Ekstrasellüler Kayıt İşlemleri

Ekstrasellüler kayıtlar, preparatlar yüksek Mg^{++} (15 mM), ve düşük Ca^{++} (1.5-2 mM)'lu Ringer çözeltileri ile bloke edildikten sonra yapılmıştır. Bu amaçla, içine AgCl kaplı gümüş tel konmuş, 1 mm iç çapında, polietilen bir boru ekstrasellüler kayıt elektrodu olarak kullanılmıştır. Bu elektrot, banyo ortamındaki Ringer çözeltisiyle doldurulduktan sonra, mikromanüplatör aracılığıyla, son plakların bulunduğu bölgede kas hücreleri üzerine yerleştirilir (elektrodun kas hücrelerine dokunmadan mümkün olduğu kadar yakınlaştırılmasına çalışılır). Banyo elektrodu ve ekstrasellüler kayıt elektrodu, bir AC preamplifikatörün (Grass PS 511) yüksek empedanslı probunun girişlerine bağlanır. Preamplifikatörden çıkan sinyaller osiloskop II'de izlenir ve film üzerine kaydedilir.

Bu yöntemle kaydedilen ekstrasellüler SPP'leri çok sayıda son plaktan elde edilen kompoze potansiyellerdir. Fasilitasyon, depresyon ve potansiyalizasyonun incelenmesinde bu yöntemle elde edilen sonuçlar, intrasellüler kayıt yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlara uygunluk göstermekte ve çok sayıda son plak bölgesinin aktivitesini kısa sürede değerlendirme olanağı sağlamaktadır (Magleby, 1973).

Bu presinaptik fenomenleri incelemek amacıyla frenik sinir 0.2 Hz frekansında uyarılarak kontrol SPP'leri kaydedilmiş, 20 sa-

niye süreyle, 20 Hz frekansındaki tetanik uyarımı izleyerek tekrar 0.2 Hz'lik uyarma frekansına dönülmüş ve posttetanik potansiyalizasyon kaybolana dek SPP'leri izlenmiştir. Kontrol kayıtlardan sonra elektrodun yeri değiştirilmeden ilaçlı çözelti ile perfüzyona geçilmiş, bir saat sonra kayıtlar tekrarlanmıştır.

4. Deksametazon Sodyum Fosfatlı Ringer Çözeltisinin Hazırlanması

Deksametazon sodyum fosfatın Ringer içindeki çözeltileri hazırlanmak istendiğinde, çözeltinin bulandığı görülmüştür. Bulanıklığın deksametazon sodyum fosfatın, Ringer çözeltisi içindeki Ca^{++} ve Mg^{++} iyonları ile etkileşmesine bağlı olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, Ringer çözeltisine deksametazon sodyum fosfata eşit ağırlıkta kreatinin eklenmiş ve daha sonra ilaç bu çözelti içinde eritilmiştir. Kreatinin ile hazırlanan çözeltilerde yukarıda sözü edilen etkileşme gözlenmemiştir.

Bu çalışmada kullanılan deksametazon sodyum fosfat ve kreatinin Deva İlaç Firması-İstanbul tarafından sağlanmıştır.

5. Son Plak Potansiyellerinin Kuantal Yapısının ve Diğer Verilerin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

SPP'lerinin kuvantum sayısının (m) hesaplanması için, aşağıdaki formüller kullanılmıştır (Del Castillo ve Katz, 1954; Martin, 1955; Boyd ve Martin, 1956; Katz, 1962 ve 1966):

$$m = \frac{1}{CV^2} = \left(\frac{\bar{x}}{SD} \right)^2 \quad (I)$$

$$m = \ln \frac{N}{N_0} \quad (II)$$

$$q = \frac{\bar{x}}{m} \quad (III)$$

Bu formüllerde; CV: SPP'lerinin varyasyon katsayısı

\bar{x} : SPP'lerinin ortalama amplitüdü

q: SPP'lerinin ortalama kuvantum büyüklüğü

SD: SPP'lerin standart sapması

N : Diziyi oluşturan stimulus sayısı

N_0 : Dizi içinde oluşmayan SPP'lerinin sayıdır.

Her hücre için m değeri, yukarıdaki (I) ve (II) nolu formüllerle ayrı ayrı hesaplanmış, iki değer arasındaki fark % 15'den fazla ise, o hücre değerlendirme dışı bırakılmıştır. $x \geq 5$, $m \geq 5$ olduğunda, bu değerler "non-linear sumasyon" göz önüne alınarak, Martin (1955) tarafından tanımlandığı şekilde düzeltilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$CV' = CV \left(1 - \frac{v}{V_0} \right)^{-1} \quad (IV)$$

$$\frac{v'}{V_0 - v'} = \frac{v}{V_0 - v} \quad (V)$$

Bu formüllerde; CV::SPP'lerinin varyasyon katsayısı

CV':CV'nin düzeltilmiş değeri

v::SPP'i amplitüdü

v':SPP'i amplitüdünün düzeltilmiş değeri

V_0 :İMP - ACh denge potansiyeli (15 mV) dir.

Deneylerden elde edilen sayısal değerler, metin içinde, ortalama \pm standart hata (SH) olarak gösterilmiş, ortalamalar arası farkın önem kontrolünde Student'in "t" testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızın başlangıcında, preparatların, kreatinin (5.2-52 mg/100 ml) ile iki saat perfüzyonunun incelenen elektrofizyolojik parametreler üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı saptandı.

Deneylerde, kontrol kayıtlar yapıldıktan sonra, deksametazon sodyum fosfat içeren Ringer çözeltisi ile perfüzyona geçildi ve ilaç etkisi 2 saat süreyle incelendi.

1. Minyatür Son Plak Potansiyelleri

Preparatların, deksametazon sodyum fosfat ile perfüzyonunun, MSPP'lerinin frekansını, doza bağımlı bir şekilde artırdığı saptandı. Bu etki, 35-40'ıncı dakikalarda başlayarak, bir saat içinde kararlı bir düzeye erişti. Frekans artışı, 0.1 mM deksametazon sodyum fosfat için % 42 \pm 11; 0.5 mM için % 52 \pm 4; 1 mM için % 72 \pm 9 idi (Tablo 1) (Şekil 4 ve 5). Aynı konsantrasyonlarda deksametazon sodyum fosfatın, MSPP'lerinin amplitüdünü etkilemediği görüldü (Tablo 1)(Şekil 5).

2. Son Plak Potansiyelleri

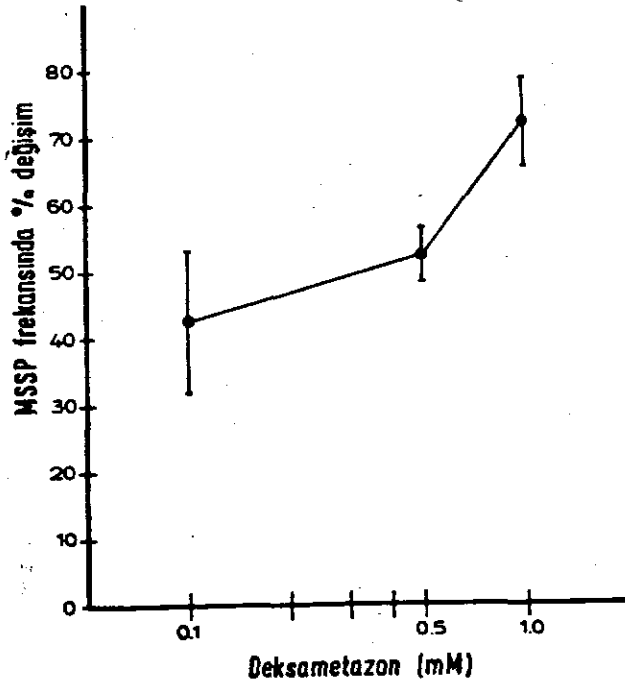
İlacın SPP'leri üzerine etkilerini incelemek amacıyla, preparatlar yüksek Mg^{++} 'lu (15 mM) ve düşük Ca^{++} 'lu (1.5 mM) Ringer çözeltisi ile bloke edildi. Preparatın bu çözelti ile ortalama 15 dakika perfüzyonu, kas kontraksiyonlarının ortadan kalkması için yeterli oldu. Ancak SPP'lerinin kuvantum sayılarının bu ortamda kararlı bir düzeye erişmeleri için bir saat beklenildi. Kontrol SPP'lerinin kaydından sonra, deksametazon sodyum fosfat ile per-

Tablo 1: Deksetazon sodyum fosfatın minyatür son plak potansiyellerinin (MSPP) amplitüd ve frekansına etkisi

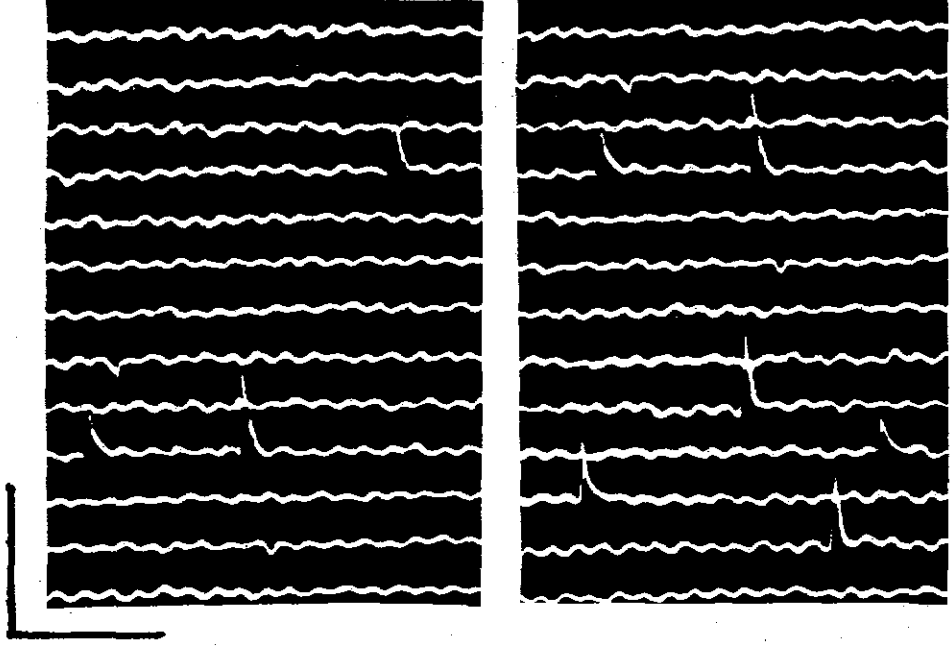
Deksetazon konsantrasyonu	Ortalama MSPP amplitüdü \pm SH (mV)	Ortalama MSPP frekansı \pm SH (san^{-1})	N
Kontrol	1.82 \pm 0.13	0.41 \pm 0.05	6, 30
0.1 mM	1.92 \pm 0.13	0.59 \pm 0.04*	2, 11
0.5 mM	1.86 \pm 0.14	0.62 \pm 0.05**	2, 12
1.0 mM	1.92 \pm 0.16	0.70 \pm 0.05**	2, 13

SH: Standart hata; N: İncelenen kas, hücre sayısı

* : $P < 0.01$



Şekil 4. Deksetazon sodyum fosfatın minyatür son plak potansiyelleri (MSPP) frekansına etkisi: Deksetazon sodyum fosfat konsantrasyonu yatay eksen, logaritmik skalada gösterilmiştir. Düşey eksen, ilaç sonrası MSPP'lerinin frekansında görülen % artışı göstermektedir.



Şekil 5. Deksametazon sodyum fosfatın minyatür son plak potansiyellerine (MSPP) etkisi: Solda bir kontrol hücreden intrasellüler olarak kaydedilen MSPP'leri, sağda 0.5 mM deksametazon sodyum fosfatla 1 saat perfüzyondan sonra incelenen bir hücreden kaydedilen MSPP'leri görülüyor. Yatay kalibrasyon çizgisi 100 msan, düşey kalibrasyon çizgisi 2 mV'tur.

füzyona geçildi ve ilaç etkisi 2 saat süreyle incelendi.

Deksametazon sodyum fosfatın, doza bağımlı bir şekilde SPP'lerinin ortalama amplitüdlerini ve kuvantum sayılarını artırdığı saptandı. Bu etki de, ilacın MSPP'lerinin frekansı üzerindeki etkisine benzer şekilde, 35-40'inci dakikalar dolayında başlayarak 60'inci dakikadan sonra kararlı bir düzeye ulaştı.

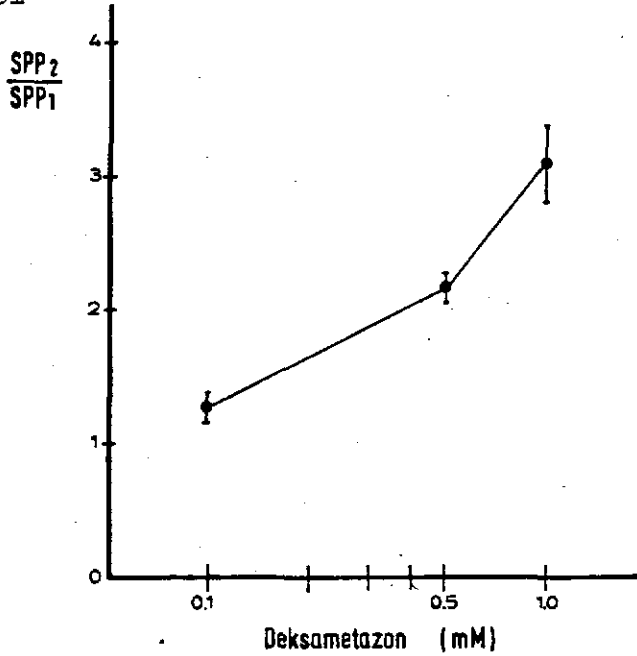
İlaçtan sonra kaydedilen SPP'lerinin ortalama amplitüdünün, kontrol SPP'lerinin amplitüdüne oranları; 0.1 mM için 1.27 ± 0.09 ; 0.5 mM için 2.16 ± 0.14 ; 1 mM için 3.11 ± 0.11 olarak bulundu (Tablo II) (Şekil 6; 8). Bu deneylerde, deksametazonla perfüzyondan sonra kaydedilen SPP'lerinin kuvantum sayısının, kontrol kuvantum

Tablo 2. Deksametazon sodyum fosfatın son plak potansiyellerinin (SPP) amplitüd ve kuvantum sayısına etkisi

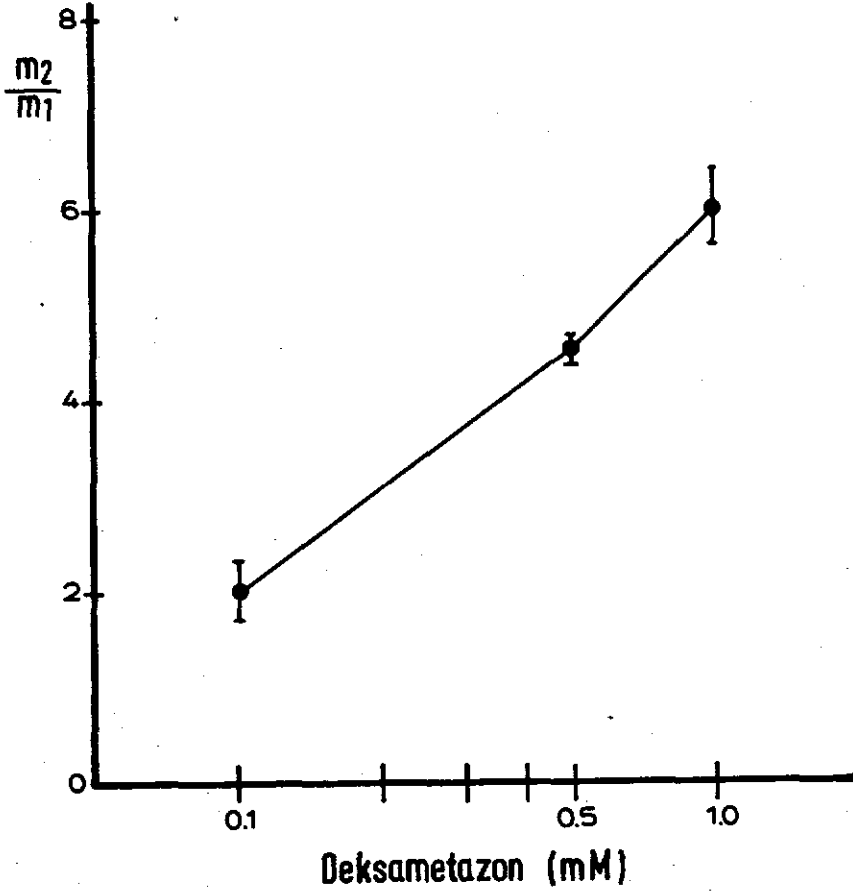
Deksametazon konsantrasyonu	Ortalama SPP amplitüdü \pm SH (mV)	Ortalama SPP kuvantum sayısı	N
Kontrol	1.58 \pm 0.11	1.98 \pm 0.21	3, 15
0.1 mM	2.01 \pm 0.17*	3.95 \pm 0.52*	3, 19
Kontrol	0.89 \pm 0.10	1.43 \pm 0.13	2, 10
0.5 mM	1.88 \pm 0.20*	6.52 \pm 0.85*	2, 10
Kontrol	1.15 \pm 0.05	1.81 \pm 0.09	2, 10
1.0 mM	3.61 \pm 0.49*	10.78 \pm 0.85*	2, 10

SH: Standart hata; N: İncelenen kas, hücre sayısı

* : P < 0.01



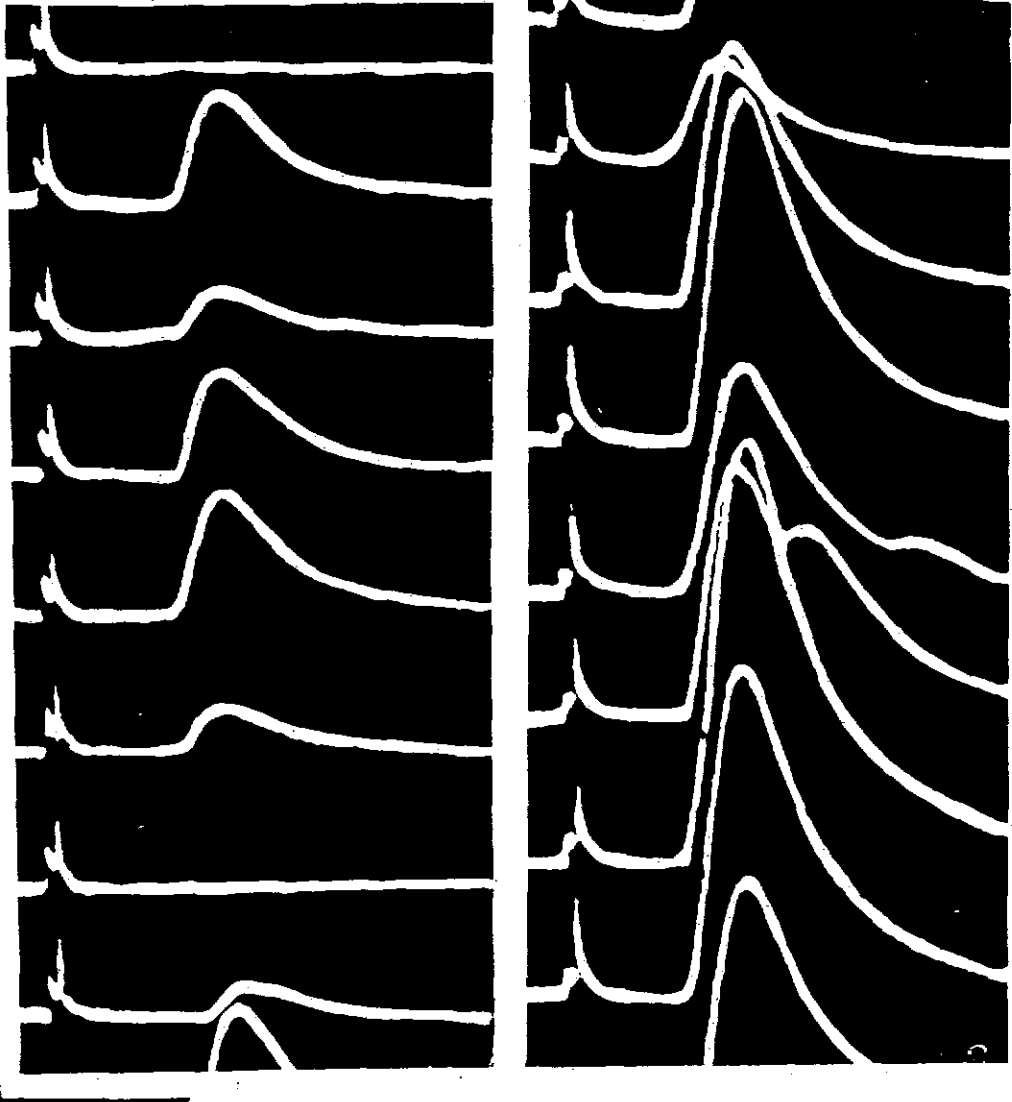
Şekil 6. Deksametazon sodyum fosfatın son plak potansiyelleri (SPP) amplitüdüne etkisi: Deksametazon sodyum fosfat konsantrasyonu yatay ekseninde, logaritmik skalada gösterilmiştir. Düşey ekseninde, deksametazon sonrası SPP'lerinin ortalama amplitüdünün (SPP_2), kontrol SPP'lerinin ortalama amplitüdüne (SPP_1) oranı gösterilmiştir.



Şekil 7. Deksametazon sodyum fosfatın son plak potansiyelleri (SPP) kuvantum sayısına etkisi: Deksametazon sodyum fosfat konsantrasyonu yatay ekseninde, logaritmik skalada gösterilmiştir. Düşey ekseninde, deksametazon sonrası SPP'lerinin ortalama kuvantum sayısının (m_2), kontrol SPP'lerinin ortalama kuvantum sayısına (m_1) oranı gösterilmiştir.

sayısına oranları, sırasıyla, 1.98 ± 0.37 ; 4.54 ± 0.19 ve 5.99 ± 0.39 olarak saptandı (Tablo 2) (Şekil 7).

Aynı verilerin analizi ile elde edilen kuvantum büyüklükleri, 0.1 mM deksametazon sodyum fosfat için 0.50 ± 0.04 ; 0.5 mM için 0.22 ± 0.02 ; 1.0 mM için 0.17 ± 0.01 mV olarak saptandı. Bu değerler her üç konsantrasyon için, ilaçla perfüzyondan önce elde edilen ortalama kuvantum büyüklüklerinden (sırasıyla 0.79 ± 0.05 ; 0.47 ± 0.04 ve 0.32 ± 0.02 mV) anlamlı derecede düşük bulundu ($P < 0.01$).



Şekil 8. Deksametazon sodyum fosfatın son plak potansiyellerine (SPP) etkisi: Solda, 15 mM Mg^{++} , 1.5 mM Ca^{++} 'lu ortamda bir kontrol hücreden intrasellüler olarak kaydedilen SPP'leri, sağda, 0.5 mM deksametazon sodyum fosfatla 1 saat perfüzyondan sonra incelenen bir hücreden kaydedilen SPP'leri görülmektedir. Yatay kalibrasyon çizgisi 5.0 msan, düşey kalibrasyon çizgisi 2.5 mV'tur.

Çalışmamızda, deksametazon sodyum fosfatın, SPP'lerinin zaman profili üzerine etkileri de incelendi. Değerlendirilen 150 kontrol SPP'nin ortalama yükselme zamanı 1.18 ± 0.02 msan, ortalama yarıya inme süresi ise, 1.81 ± 0.05 msan olarak bulundu. 1 mM Dek-

sametazon sodyum fosfat ile bir saat perfüzyon, bu parametreleri anlamlı olarak değiştirmedir. İlaç sonrası incelenen 163 SPP'nin yükselme zamanı 1.20 ± 0.03 msan, yarıya inme süresi ise 1.85 ± 0.03 msan idi.

3. Kas Aksiyon Potansiyelleri ve İstirahat Membran Potansiyelleri

Frenik sinirin, supramaksimal olarak uyarılmasıyla oluşan kas aksiyon potansiyelleri, kas hücrelerinin son plağa 3 mm kadar uzaklıktaki bölgelerinden kaydedildi. 1 mM Deksametazon sodyum fosfatindirekt aksiyon potansiyellerinin amplitüdlerinde % 10, "overshoot"larında % 38 ve yükselme hızlarında ise % 36'lık bir artışa neden oldu; aksiyon potansiyellerinin zaman profilini ise etkilemedi (Tablo 3) (Şekil 9).

Kullanılan her üç konsantrasyonda da deksametazon sodyum fosfatın, kas istirahat membran potansiyelleri üzerine bir etkisi olmadığı saptandı (Tablo 4).

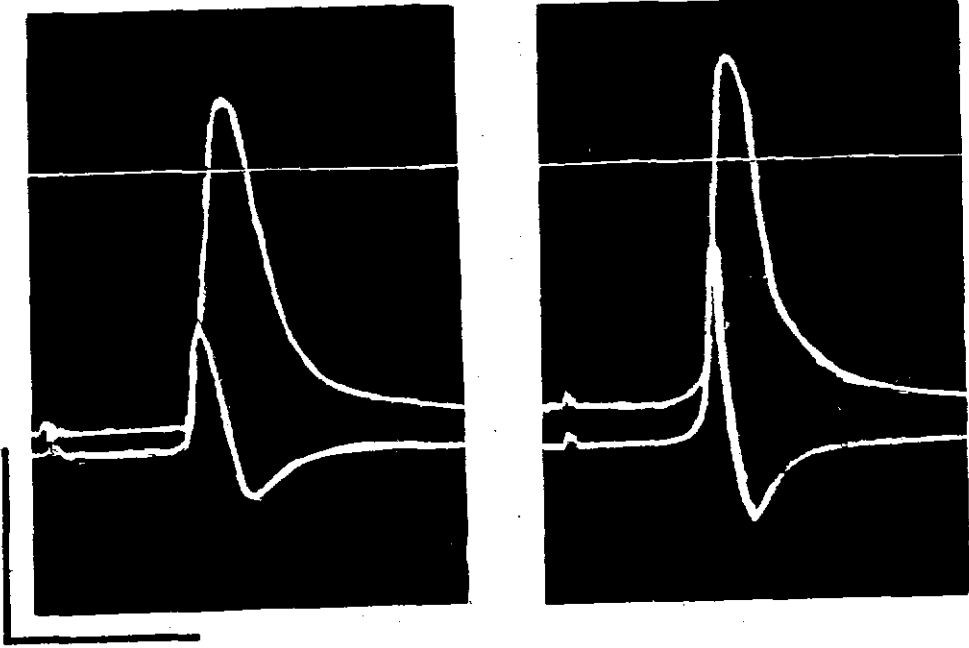
Tablo 3. Deksametazon sodyum fosfatınindirekt kas aksiyon potansiyellerine (AP) etkisi

	APA (mV)	OS (mV)	YZ (san)	Yİ (san)	dV/dt(V/san)	N
Kontrol	92.6 ± 0.1	18.8 ± 0.6	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.03	418.7 ± 13.9	2, 17
1 mM DF	$101.5 \pm 0.1^*$	$25.9 \pm 0.6^*$	0.73 ± 0.08	0.52 ± 0.01	$586.0 \pm 21.9^*$	2, 19

Değerler, ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir.

APA: AP amplitüdü, OS: AP "overshoot"u, YZ: AP yükselme zamanı, Yİ: AP yarıya inme zamanı, dV/dt: AP:yükselme hızı, N: incelenen kas, hücre sayısı, DF: deksametazon sodyum fosfat.

*: $P < 0.01$

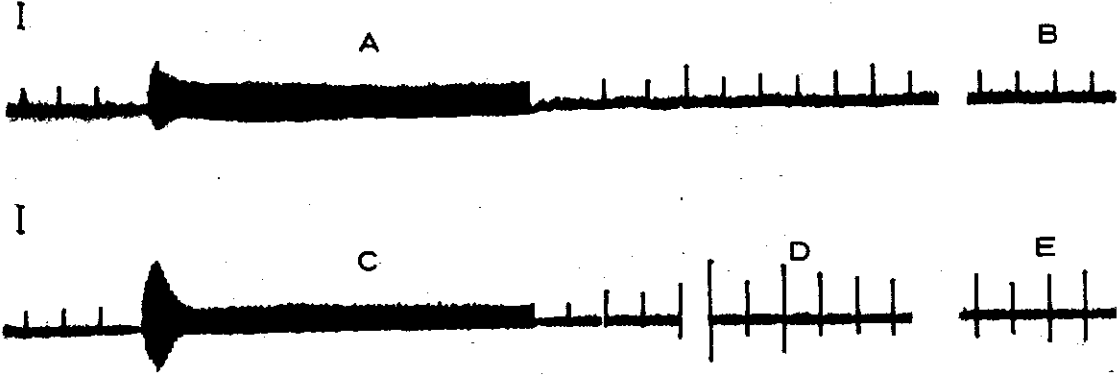


Şekil 9. Deksametazon sodyum fosfatın indirekt kas aksiyon potansiyellerine (AP) etkisi: Solda bir kontrol hücreden kaydedilen AP'i ve birinci dereceden türevi, sağda 1 mM deksametazon sodyum fosfatla 1 saat perfüzyondan sonra incelenen bir hücreden kaydedilen AP'i ve birinci dereceden türevi görülüyor. Horizontal çizgi 0 potansiyeli göstermektedir. Yatay kalibrasyon çizgisi 5 msan, düşey kalibrasyon çizgisi 50 mV ve 625 V/san'dir.

Tablo 4. Deksametazon sodyum fosfatın kas istirahat membran potansiyeline (İMP) etkisi

	Kontrol	Deksametazon konsantrasyonu(mM)		
		0.1	0.5	1.0
Ortalama				
İMP \pm SH (mV)	75.1 \pm 0.3	74.3 \pm 0.6	75.2 \pm 0.6	74.7 \pm 0.7
N	13, 262	5, 82	4, 83	4, 89

SH: Standart hata, N: İncelenen kas, hücre sayısı.



Şekil 10. Deksametazon sodyum fosfatın fasilitasyon, depresyon ve potansiyalizasyon üzerine etkileri: 15 mM Mg^{++} ve 2 mM Ca^{++} 'lu ortamda yapılan deneyde son plak potansiyelleri ekstrasellüler olarak kaydedilmiştir. Uyarma frekansı tetanus sırasında 20 Hz, tetanus öncesi ve sonrası 0.2 Hz'dir. Tetanik uyarma 20 san sürmüştür. Üstteki paneller kontrol kayıtlara, alttaki paneller ise, 1 mM deksametazon sodyum fosfat ile bir saat perfüzyondan sonra yapılan kayıtlara aittir. B paneli, tetanustan 3 dakika sonra, D paneli tetanustan 1/2 dakika sonra, E paneli tetanustan 15 dakika sonra kaydedilmiştir. Düşey kalibrasyon çizgisi üst panelde 100 μV 'u, alt panelde 250 μV 'u göstermektedir.

4. Fasilitasyon, Depresyon ve Potansiyalizasyon Fenomenleri

Çalışmamızın bu bölümünde, ekstrasellüler kayıt yöntemi kullanılarak nöromusküler aşırıdaki fasilitasyon, depresyon ve potansiyalizasyon fenomenleri üzerine deksametazon sodyum fosfatın etkileri incelendi. Bu amaçla her üç fenomenin de aynı preparatta, birlikte izlenmesine olanak veren deney koşulları araştırıldı. 15 mM Mg^{++} ve 2 mM Ca^{++} ile bloke edilmiş preparatlarda, 20 Hz frekansında 20 san süren tetanik uyarımın, bu amaca uygun olduğu saptandı ve 6 diyafragma bu koşullarda incelendi.

Şekil 10'da bu koşullardaki bir deneye ait kayıtlar görülmektedir. İlaç uygulanışından önce (Şekil 10-A), tetanik cevabın hemen başında SPP'lerinin amplitüdünün tetanik cevap öncesine göre $\% 100 \pm 4$ oranında arttığı saptanmıştır. Bu artış, esas olarak fasiliteasyon fenomeninin bir göstergesidir. Bu deneylerde, fasiliteasyon ortalama 1.6 ± 0.04 san süreyle gözlenebilmiştir. Tetanus süresince, SPP'lerinin amplitüdü, kontrol SPP'lerinin amplitüdünden fazla olmuştur. Bu fazlalık, potansiyalizasyona bağlıdır. Amplitüd artışının başlangıçtaki büyüklükte sürdürülememesine ve potansiyalizasyonun ancak kısmen gözlenebilmesine, tetanik uyarım süresince bu fenomenlere eşlik eden depresyon neden olmuştur. Tetanik uyarımın bitişinden 15 ± 1.3 san sonra depresyonun etkisini yitirdiği ve posttetanik potansiyalizasyonun belirginleştiği görülmüştür. Bu deney koşullarında, posttetanik potansiyalizasyonun 3-4 dakika kadar sürdüğü saptanmıştır.

1 mM Deksametazon sodyum fosfatla 1 saatlik perfüzyondan sonra tekrarlanan kayıtlarda, tetanik uyarımın başlangıcında SPP'lerinin amplitüdünün, kontrollere göre $\% 200 \pm 9$ oranında arttığı ve bu fasiliteasyonun 2 ± 0.06 san sürdüğü görülmüştür (Şekil 10-C). İzoelektrik çizginin altındaki defleksiyonlar kompoze kas aksiyon potansiyellerinin negatif komponentine aittir. Bu sırada preparatlar, mikroskop altında incelendiğinde kas kontraksiyonlarının oluştuğu gözlenmiştir. İlaçsız koşullarda da bazı liflerde tetanik uyarımın başlangıcında aksiyon potansiyellerinin oluştuğu saptanmakla birlikte, aksiyon potansiyeli oluşturan liflerin sayısı, deksametazon sodyum fosfattan sonrakine oranla çok daha

azdır. SPP'lerinin amplitüdündeki bu artış, giderek kaybolmuş ve tetanus öncesi kaydedilen SPP'lerine oranla daha düşük amplitüdü SPP'leri kaydedilmiştir. Bu durum depresyonun daha belirgin olduğunu göstermektedir. Tetanusun bitimini izleyerek 20 ± 2.0 san içinde depresyon kaybolmuş ve posttetanik potansiyalizasyon belirgin hale gelmiştir. Bu dönemde kaydedilen potansiyeller, aksiyon potansiyelleri ile karışmaktadır. Bu potansiyalizasyonun 20 ± 0.9 dakika sürdüğü saptanmıştır.

15 mM Mg^{++} ve 1.5 mM Ca^{++} 'lu ortamda yapılan iki deneyde, 1 mM deksametazon sodyum fosfattan sonra, 2 mM Ca^{++} 'lu ortamda kaydedilenlere oranla daha az depresyon oluştuğu ve potansiyalizasyonun tetanus sırasında da görülebilir hale geldiği saptanmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Glukokortikoidlerin nöromüsküler aşırım üzerine direkt etkilerine ilişkin çalışmalarda, çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. İn vivo olarak yapılan araştırmaların sonuçlarına göre glukokortikoidlerin fasilitatör etkileri vardır. Riker ve arkadaşları, 7-14 gün süreyle glukokortikoid verilmesinin kedilerde, motor sinir uçlarında "repetitive firing" ve posttetanik potansiyalizasyonu artırdığını göstermişlerdir (1975). Ayrıca, çeşitli glukokortikoidlerin sıçan ve farelerde, hemikolinyum-3 (Wolters ve Leeuwın, 1975) ve kürar (Arts ve Oestherius, 1976) toksisitesini önledikleri saptanmıştır. İn vitro çalışmalarda ise, MSPP'lerinin frekansında artma dışında fasilitatör bir etki saptanmamıştır (Wilson ve diğ., 1974; Dudel ve diğ., 1979; Kim ve diğ., 1979). Buna karşılık, MSPP'lerinin, SPP'lerinin ve AP'lerinin amplitüdlerinde ayrıca AP'lerinin "overshoot"unda azalma gibi depresör etkiler bildirilmiştir (Kim ve diğ., 1979). Groosie ve Albuquerque (1978), sıçanlara 4 gün süreyle triamsinolon asetonit enjeksiyonundan sonra yaptıkları in vitro çalışmalarda, extensor digitorum longus kasında tetanus geriliminin ve MSPP'lerinin frekansının arttığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, bu preparatların yüksek Mg^{++} 'lu ortamda bloke olmaları için daha uzun süre gerektiğini belirtmişler ve glukokortikoidlerin antimyastenik özelliklerini, nöromüsküler aşırım üzerine direkt, fasilitatör etkileriyle açıklamışlardır.

Banyo ortamına glukokortikoid konarak yapılan in vitro deneylerde, bu ilaçların in vivo uygulanmasıyla saptanan fasilitatör etkilerinin gözlenmemesi, kullanılan steroid türevlerinin fi-

zikokimyasal özelliklerine bağlı olabilir. Şöyle ki: Wilson ve diğ. (1974), Kim ve diğ. (1979), deneylerinde suda iyi çözünmeyen baz prednizolonu kullanmışlardır. Her iki çalışmada da, ilacın suda-ki çözünürlüğünü artırmak için kullanılan etil alkolün deney sonuçlarına etkilemesi beklenebilir (Gage, 1965). Dudel ve diğ., (1979), fare diyafragma kasında yaptıkları çalışmada, suda iyi çözünmeyen bir steroid türevi olan prednizolon asetatı; Hofmann (1977) ise, hem suda çözünürlüğü az olan, hem de ancak metabolize olduktan sonra aktif hale geçebilen metilprednizolon sodyum süksinatı kullanmışlardır.

Bu nedenle, çalışmamızda, deksametazonun suda iyi çözünen bir türevi olan disodyum-21-fosfat tuzu kullanılmıştır. Suda kolay çözünmesine karşın ilaç, Ringer çözeltisi içine konduğunda, Ca^{++} ve Mg^{++} ile presipite olmuştur. Bu problem, Ringer çözeltisine deksametazon sodyum fosfattan önce, steroide eşit miktarda kreatinin eklenmesiyle çözümlenmiştir.

Kreatininin, kullanılan konsantrasyonlarda, nöromusküler aşırımla ilgili incelenen parametreler üzerine bir etkisi olmadığı, saptanmış ve kreatinin içeren ilaç çözeltisi ile gözlenen biyolojik etkilerin deksametazona ait olduğu kabul edilmiştir.

Sonuçlarımıza göre, deksametazon sodyum fosfat, spontan miyotoni saliverilmesini doza bağımlı olarak artırmakta, MSPP'lerinin amplitüdünü ise etkilememektedir. MSPP'lerinin frekansında saptadığımız bu artış, Kim ve diğ. (1979)'nin, 1 mM prednizolon baz için bildirdikleri artışa (% 400) oranla 5.5 kez daha düşüktür. Bu farklılık, sözü geçen çalışmada kullanılan etil alkolden kay-

naklanabileceği gibi, hayvan türüne (sıçan) ve ortam sıcaklığına (25°C) da bağlı olabilir. MSPP'lerinin frekansındaki bu artış, ilacın presinaptik fasilitatör bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Katz, 1962).

MSPP'lerinin amplitüdlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmaması, postsinaptik duyarlılığın deksametazondan etkilenmediğini düşündürmektedir. Wilson ve diğ. (1974), Dudel ve diğ. (1979) ve Kim ve diğ. (1979)'nin bildirdikleri, prednizolon uygulanmasıyla MSPP'lerinin amplitüdünde görülen azalma, ilacın besleyici çözelti içindeki Ca^{++} ile olası fizikokimyasal etkileşmesine bağlı olabilir.

Deksametazon sodyum fosfat, SPP'lerinin amplitüd ve kuvantum sayılarında doza bağımlı olarak artmaya neden olmuştur. Bu bulgular ve MSPP'lerin frekansındaki artış, ilacın, presinaptik mekanizmaları etkileyerek spontan ve uyarılmış mediyatör salıverilmesini artırdığını ortaya koymaktadır. Groosie ve Albuquerque (1978)'in triamsinolon verilmiş sıçanlardan hazırlanan preparatların yüksek Mg^{++} lu Ringer çözeltisi ile daha güç bloke edildiklerine ilişkin gözlemleri bu bulguların yardımıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda, SPP'lerinin kuvantum büyüklüğünün artan steroid konsantrasyonlarına bağımlı olarak küçüldüğü saptanmıştır. Kuvantum büyüklüğünün azalması, postsinaptik duyarlılıktaki azalma ile açıklanamaz; çünkü, MSPP'lerinin amplitüdlerinde belirgin bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu etki, deney koşullarımızda, presinaptik veziküller içindeki ACh miktarının azaltılmasına bağlanamayacak kadar kısa sürede oluşmuştur. SPP'lerinin ortalama amplitüd ve kuvantum sayılarındaki artışın aynı oranda oluşmaması, ACh

saliverilmesinin, deksametazon etkisiyle, muhtemelen p değerinin artmasına bağlı olarak Poisson istatistiğine uygunluğunu kaybetmesinin bir sonucudur. Bu durumda, kuvantum büyüklüklerinde görülen azalma, matematiksel bir artefakt olarak kabul edilmiştir.

Deksametazon sodyum fosfat, kas istirahat membran potansiyellerini ve SPP'lerinin zaman profilini etkilememiştir. 1 mM Deksametazon sodyum fosfat ile bir saatlik perfüzyon, indirekt kas aksiyon potansiyellerinin amplitüd, "overshoot" ve yükselme hızında belirgin bir artmaya neden olmuş, ancak aksiyon potansiyellerinin zaman profilinde bir değişiklik oluşturmamıştır. AP'lerinin yükselme hızındaki artış, AP'in oluşumu sırasındaki Na^{++} kondüktansındaki (g_{Na^+}) artışın bir göstergesidir (Hodgkin ve Huxley, 1952). Aksiyon potansiyelinin amplitüd ve "overshoot"unun artması, ilacın nöromüsküler aşırıım üzerindeki fasilitatör etkilerini açıklayabilir.

Deksametazonun, presinaptik aksiyon potansiyellerini de benzer şekilde etkilemesi olasıdır. Bu durumda, sinir uçları, sinir aksiyon potansiyeli tarafından daha fazla depolarize edilecek ve sinir uçlarına giren Ca^{++} miktarı artacaktır (Katz ve Miledi, 1968). Saliverilen mediyatör miktarı, sinir uçlarına giren Ca^{++} miktarının dik (steep) bir fonksiyonudur. Dolayısıyla, sinir uçlarına giren Ca^{++} miktarındaki küçük artışlar, ACh saliverilmesinde önemli miktarda artmaya yol açacaktır (Jenkinson, 1957).

Çalışmamızda, deksametazonun, tekrarlayan uyarma sırasında gözlenen presinaptik fenomenler üzerine etkisi, ekstrasellüler ka-

yıt yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Bulgularımız, 1 mM deksametazon sodyum fosfatın fasilitasyon ve potansiyalizasyonu önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Deksametazonun, aksiyon potansiyeli ile birlikte sinir uçlarına giren Ca^{++} miktarını artırdığı, böylelikle tetanik uyarım sırasında presinaptik terminalde ilaçsız duruma oranla daha fazla Ca^{++} birikimine neden olduğu düşünülmüştür. Bu durum, ilaç etkisi ile daha fazla fasilitasyon ve potansiyalizasyon oluşmasını açıklamaktadır.

Fasilitasyon ve potansiyalizasyonun p değerini artırdığı bilinmektedir (Rosenthal, 1969). Deksametazonun, bu iki fenomeni de belirgin biçimde artırması, bu ilacın ACh salıverilme probabilitesini (p) artırdığının bir kanıtı olarak kabul edilmiştir. p Değerinin artması, intrasellüler olarak kaydettiğimiz SPP'lerinin amplitüdlerindeki flüktüasyonun azalmasını ve kuvantal salıverilme olayının, Poisson dağılımına uygunluğunun bozulmasını da açıklamaktadır.

2 mM Ca^{++} 'lu ortamda yapılan deneylerde deksametazon sodyum fosfattan sonra depresyonun belirginleşmesi, deksametazonun SPP'lerinin kuvantum sayısını artırmasına bağlanmıştır. Nitekim, daha düşük kuvantum sayılı SPP'lerinin olduğu 1.5 mM Ca^{++} 'lu ortamda tekrarlanan benzer deneylerde, aynı konsantrasyonda deksametazonun depresyonu artırmaması, bu görüşümüzü desteklemiştir. Presinaptik fenomenlerin incelenmesinden elde edilen veriler bir arada değerlendirildiğinde, deksametazon sodyum fosfatın salıverilmeye hazır kuvantumların ve/veya aktif salıverilme noktalarının sayısını (n) etkilemediği, salıverilme olasılığını (p) ise, artırdığı söylenebilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda, deksametazonun presinaptik bir etkiyle ACh salıverilmesini artırdığı saptanmıştır. Bu etkiden, muhtemelen, presinaptik aksiyon potansiyellerinin amplitüdünün artmasına bağlı olarak sinir uçlarına daha fazla Ca^{++} girmesinin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Bulgularımız, deksametazon sodyum fosfatın, istirahat halindeki Na^+ kondüktansını etkilemeden aksiyon potansiyeli oluşumu sırasında aktive olan Na^+ kondüktansını artırdığını göstermektedir.

Glukokortikoidlerin, lipofilik özellikleri nedeniyle hücre membranına yerleşerek, hidrofilik gruplarının membranın sulu bölgelerine yönelmesi ile membran içinde yapısal düzenlenmelere (structural alignment) yol açtığı bildirilmiştir (Willner, 1961). Glukokortikoidlerin sinir ve kas membranlarında oluşturacağı yapısal düzenlenme sonucu membran iyon permeabilitesinin değişmesi, bu ilaçların nöromusküler aşırımdaki fasilitatör ve anti-myastenik etkilerini açıklayabilir.

ÖZET

Prednizolon ve diğer glukokortikoidler, myastenia gravis tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Otoimmün bir etyoloji düşünülen myastenia graviste, glukokortikoidlerin kas kuvvetini düzeltici etkisi, immünosüpresif özelliklerine bağlanmıştır. Bununla beraber, kortikosteroidlerin nöromusküler aşırıma direkt, fasilitatör etkileri olabileceğini düşündüren bulgular da vardır. Bu ilaçların, nöromusküler aşırıma etkilerini inceleyen araştırmalarda ise, çelişkili sonuçlar bildirilmiştir.

Çalışmamızda, deksametazon sodyum fosfatın nöromusküler aşırıma etkileri, intrasellüler ve ekstrasellüler kayıt yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlarımız, deksametazon sodyum fosfatın, minyatür son plak potansiyellerinin frekansını, son plak potansiyellerinin amplitüd ve kuvantum sayısını, doza bağımlı bir şekilde artırdığını göstermiştir. Deksametazon sodyum fosfat, kas istirahat membran potansiyelini değiştirmemiş, indirekt kas aksiyon potansiyellerinin amplitüd, "overshoot" ve yükselme hızını artırmıştır. Deksametazon sodyum fosfatın, presinaptik fenomenlerden fasilitasyon ve potansiyalizasyonu artırdığı, depresyonu etkilemediği saptanmıştır.

Bu bulgular, deksametazon sodyum fosfatın, kas hücresi membranında, aksiyon potansiyeli oluşumu sırasında Na^+ kondüktansını artırdığını göstermektedir. Aynı mekanizma, sinir aksiyon potansiyeli için de geçerli olabilir. Deksametazonun, bu etki ile, sinir uçlarının aksiyon potansiyeli ile depolarizasyonu sırasında, sinir uçlarına daha fazla Ca^{++} girmesine ve dolayısıyla daha fazla asetilkolin salıverilmesine neden olarak nöromusküler aşırıma fasilite edebileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Albuquerque EX, Barnard EA, Porter CW, Warnick JE; The density of acetylcholine receptors and their sensitivity in the postsynaptic membrane of muscle endplates. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 2818-2822, 1974.
2. Arts WF, Oosterhuis HJ; Effect of prednisolone on neuromuscular blocking in mice in vivo. *Neurology* 25: 1088-1090, 1975.
3. Baker T, Riker WF, Hall ED; Effects of a single methylprednisolone dose on a facilitatory response of mammalian motor nerve. *Arch. Neurol.* 34: 349-355, 1977.
4. Balnave RJ, Gage PW; On facilitation of transmitter release at the toad neuromuscular junction. *J. Physiol.* 239: 657-675, 1974.
5. Barrett EF, Magleby KL; Physiology of cholinergic transmission. *Biology of cholinergic function'da* (ed. Goldberg AM, Hanin I) Raven Press, New York, 1976.
6. Bennett MR, Florin T; A statistical analysis of the release of acetylcholine at newly formed synapses in striated muscle. *J. Physiol.* 238: 93-107, 1974.
7. Bennett MR, Florin T, Hall R; The effect of calcium ions on the binomial statistic parameters which control acetylcholine release at synapses in striated muscle. *J. Physiol.* 247: 429-466, 1975.
8. Bolooki H, Schwartzman RJ; High-dose steroids for perioperative management of patients with myasthenia gravis undergoing thymectomy. *J. Thor. c. Cardiovasc. Surg.* 75: 754-757, 1978.
9. Bowden REM, Duchon LW; The anatomy and pathology of the neuromuscular junction. *Neuromuscular junction'da* (ed. Zaimis E) Springer-

- Verlag, Berlin Heidelberg, 1976.
10. Boyd IA, Martin AR; The end-plate potential in mammalian muscle. *J. Physiol.* 132: 74-91, 1956.
 11. Christensen BN, Martin AR; Estimates of probability of transmitter release at the mammalian neuromuscular junction. *J. Physiol.* 210: 933-945, 1970.
 12. Del Castillo J, Katz B; Quantal components of the endplate potential. *J. Physiol.* 124: 560-573, 1954.
 13. Del Castillo J, Katz B; Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Progr. Biophys. G*: 121-170, 1956.
 14. Dengler R, Rüdell JR, Warelas J, Birnberger KL; Corticosteroids and neuromuscular transmission: electrophysiological investigation of the effects of prednisolone on normal and anticholinesterase-treated neuromuscular junctions. *Pflügers Arch.* 380: 145-151, 1979.
 15. Drachman DB; Myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.* 298: 136-142 ve 186-193, 1978.
 16. Dudel J, Birnberger KL, Toyka KV, Schlegel C, Besinger U; Effects of myasthenic immunoglobulins and of prednisolone on spontaneous miniature end-plate potentials in mouse diaphragms. *Experimental Neurology* 66: 365-380, 1979.
 17. Engel WK, Warmolts JR; Myasthenia gravis: A new hypothesis of the pathogenesis and a new form of treatment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 183: 72-87, 1971.
 18. Faludi G, Gotlieb J, Meyers J; Factors influencing the development of steroid-induced myopathies. *Ann NY Acad Sci.* 138: 61-72, 1966.

19. Fatt P, Katz B; Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 117: 109-128, 1952.
20. Gage PW; The effect of methyl, ethyl and n-propyl alcohol on neuromuscular transmission in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150: 236-243, 1965.
21. Gage PW, Hubbard JI; An investigation of the post-tetanic potentiation of end-plate potentials at a mammalian neuromuscular junction. *J. Physiol.* 184:353-375, 1966.
22. Ginsborg BL, Jenkinson DH; Transmission of impulses from nerve to muscle. *Neuromuscular Junction'da* (ed. Zaimis E) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1976.
23. Grob D, Harvey AM; Effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone administration in patients with myasthenia gravis. *Johns Hopkins Med. J.* 91: 124-136, 1952.
24. Groosie J, Albuquerque EX; Extensor muscle responses to triamcinolone. *Experimental Neurology* 58: 435-445, 1978.
25. Hall ED; Glucocorticoid modification of the responsiveness of a fast (type 2) neuromuscular system to edrophonium and d-tubocurarine. *Experimental Neurology* 69: 349-358, 1980.
26. Heuser JE, Reese TS; Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57: 315- 344, 1973.
27. Heuser JE, Reese TS; Morphology of synaptic vesicle discharge and reformation at the frog neuromuscular junction. *Synaptic Transmission and Neuronal Interaction'da* (ed. Bennett MVL) Raven Press, New York, 1974.

28. Hodgkin AL, Huxley AF; Movement of sodium and potassium ions . during nervous activity. Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 17: 43-52, 1952.
29. Hofmann WW; Antimyasthenic action of corticosteroids. Arch. Neurol. 34: 356-360, 1977.
30. Hubbard JI; Mechanism of transmitter release. Progr. Biophys. Biol. 21: 33-124, 1970.
31. Hubbard JI; Microphysiology of vertebrate neuromuscular transmission. Physiol. Rev. 53: 674-723, 1973.
32. Hubbard JI, Quastel DMJ; Micropharmacology of vertebrate neuromuscular transmission. Ann. Rev. Pharmacol. 13: 199-216, 1973.
33. Jenkinson DH; The nature of the antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. J. Physiol. 138: 434-444, 1957.
34. Katz B; The Croonian Lecture: the transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action. Proc. Roy. Soc., Ser. B. 155: 455-477, 1962.
35. Katz B; Nerve, muscle and synapse. Mc Graw-Hill Co., New York, 1966.
36. Katz B, Miledi R; The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction. J. Physiol. 181: 656-670, 1965.
37. Katz B, Miledi R; The role of calcium in neuromuscular facilitation. J. Physiol. 195: 481-492, 1968.
38. Kim YI, Goldner MM, Sanders DB; Short-term effects of prednisolone on neuromuscular transmission in normal rats and those

- with experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Neuro. Sci.* 41: 223-234, 1979.
39. Klein R, Ganelin R, Zelkowitz P; Effect of quinidine, ouabain, and corticosteroids on muscle sodium, potassium, and water content. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110: 280-285, 1962.
40. Krnjevic K; Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54: 418-540, 1974.
41. Leeuwijn RS, Wolters ECMJ; Effect of corticosteroids on sciatic nerve-tibialis anterior muscle of rats treated with hemicholinium-3. *Neurology* 27: 171-177, 1977.
42. Liley AW; The quantal components of the mammalian end-plate potential. *J. Physiol.* 133: 571-587, 1956.
43. Lindstrom J; How the autoimmune response to acetylcholine receptor impairs neuromuscular transmission in myasthenia gravis and its animal model. *Fed. Proc.* 37: 2828-2830, 1978.
44. Magleby KL; The effect of repetitive stimulation on facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* 234: 327-352, 1973.
45. Mann JD, Johns TR, Campa JF; Long-term administration of corticosteroids in myasthenia gravis. *Neurology* 26: 729-740, 1976.
46. Martin AR; A further study of the statistical composition of the end plate potential. *J. Physiol.* 130: 114-122, 1955.
47. Martin AR; Quantal nature of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 46: 51-66, 1966.
48. Matell G, Bergstrom K, Franksson C; Effects of some immunosuppressive procedures on myasthenia gravis. *Ann NY Acad. Sci.* 274: 659-676, 1976.

49. Namba T; Corticotropin therapy in patients with myasthenia gravis. Arch. Neurol. 26: 144-150, 1972.
50. Patten BM, Katharine L, Oliver BS, Engel WK; Adverse interaction between steroid hormones and anticholinesterase drugs. Neurology 24: 442-449, 1974.
51. Perkoff GT, Silber T, Tyler FH; Myopathy due to the administration of therapeutic amounts of 17-hydroxycorticosteroids. Amer. J. Med. 26: 891-898, 1959.
52. Prabhu VG, Oester YT; Electromyographic studies of rat given cortisone. Arch. Neurol. 24: 253-258, 1971.
53. Riker WF, Baker T, Michico Okamoto; Glucocorticoids and mammalian motor nerve excitability. Arc. Neurol. 32: 688-694, 1975.
54. Rosenthal J; Post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. J. Physiol. 203: 121-133, 1969.
55. Rowland L; Controversies about the treatment of myasthenia gravis. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 43: 644-659, 1980.
56. Seybold ME, Drachman DB; Gradually increasing doses of prednisone in myasthenia gravis. N. Engl. J. Med. 290: 81-84, 1974.
57. Torda C, Wolff H; Effects of hypophysectomy and ACTH on neuromuscular function and acetylcholine synthesis. Am. J. Physiol. 161: 534-539, 1950.
58. Torda C, Wolff H; Effects of administration of the adrenocorticotrophic hormone on patients with myasthenia gravis. Arch. Neurol. Psychiat. 66: 163-170, 1951.
59. Torda C, Wolff H; Effect of pituitary hormones, cortisone and adrenalectomy on some aspects of neuromuscular function and acetylcholine synthesis. J. Am. Physiol. 169: 140-149, 1952.

60. Warmolts JR, Engel WK; Benefit from alternate day prednisone, in myasthenia gravis. *New. Engl. J. Med.* 286: 17-20, 1972.
61. Willner EN; Steroids and cell surfaces. *Biol. Rev.* 36: 368-398, 1961.
62. Wilson RW, Ward MD, Johns TR; Corticosteroids: A direct effect at the neuromuscular junction. *Neurology* 24: 1091-1095, 1974.
63. Wolters ECMJ, Leeuwijn RS; Antagonism of corticosteroids against the lethal effects of hemicholinium-3 in rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.* 33: 145-151, 1975.
64. Wolters ECMJ, Leeuwijn RS; Effect of corticosteroids on the phrenic nerve-diaphragm preparation treated with hemicholinium. *Neurology* 26: 574-578, 1976.
65. Woodbury D; Effect of adrenocortical steroids and ACTH on electroshock threshold. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 105: 27-36, 1952.