

Zajterhelés hatása a külső szőrsejt kalcium homeosztázisára és sejtfalmerevségére

Szűcs Attila dr., Batta Tamás dr., Szappanos Henrietta dr.¹, Tóth Andrea dr.,
Szigeti Gyula dr.¹, Panyi György dr.², Csernoch László dr.¹, Sziklai István dr.

ÖSSZEFOGLALÁS: A belső fül sejtjei közül a külső szőrsejtek (KSZ) a legérzékenyebbek a külső behatásokra, így a zajterhelésre is.

A tanulmány célja a közepes intenzitású „fehér” zaj (50 Hz–20 kHz, 80 dB SPL, 14 nap) hatásának vizsgálata a sejtek intracelluláris kalcium koncentrációjára, a külső szőrsejtek membránjában elhelyezkedő purinerg receptorok expresszójára, és ezen sejtek sejtfalmerevségére.

A zajkezelt állatok sejtjeiben a nyugalmi kalcium koncentráció megemelkedett a nem kezelt állatok sejtjeihez képest, és az emelkedés eltérő volt a cochlea bazális (219 ± 29 nM), és az apikális sejtjei (181 ± 24 nM) között. 180 μ M ATP sejtekhez adásakor a sejtek intracelluláris kalcium szintje 60 ± 22 nM-lal emelkedett az apikális, és 44 ± 10 nM-lal a bazális sejtekben. A P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X7} and P_{2Y1} , P_{2Y4} receptor altípusok expressziója csökkent, míg a P_{2Y2} altípusé nem változott. A megnövekedett intracelluláris kalcium koncentráció változáshoz hasonlóan a külső szőrsejtek sejtfalmerevsége is nőtt.

A zajterhelés hatására megnövekedett intracelluláris kalcium koncentráció és a kalcium-függő szabályozó mechanizmusokban ennek következtében létrejövő változások, befolyásolják a külső szőrsejt sejtfalmerevségét, és ezen keresztül a cochlea erősítő mechanizmusát.

KULCSSZAVAK: cochlea, külső szőrsejt, zaj, kalcium, purinerg receptor, ATP

SUMMARY: Among the cells of the inner ear, the outer hair cells (OHCs) are the most important targets of noise-induced effects, being the most sensitive cell types.

The aim of this study was to examine the effects of „white” noise (50 Hz–20 kHz, 80 dB SPL, 14 days) on the intracellular calcium levels, on the expression pattern of purinoceptors in the membrane of the OHCs of the guinea pig, and to measure the stiffness changes of the lateral membrane of these cells.

In noise-exposed animals, the resting intracellular calcium concentration increased, as compared to the non-treated animals and was slightly higher in the cells of the basal (219 ± 29 nM) than in the apical turns (181 ± 24 nM) of the cochlea. After the application of 180 μ M ATP, the intracellular calcium level rose by 60 ± 22 nM in cells from the apical, and by 44 ± 10 nM in cells from the basal turns, significantly less than in non-treated animals. The expression of the P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X7} and P_{2Y1} , P_{2Y4} receptor subtypes was suppressed, while the expression of the P_{2Y2} subtype did not decrease in both of the two preparations. In parallel with the elevation in intracellular calcium concentration the stiffness of the lateral wall of the OHCs was increased.

Noise-induced changes in the intracellular calcium homeostasis and subsequently in the calcium dependent regulatory mechanisms may modify the OHC lateral wall stiffness and may lead to the reduction of the efficacy of the cochlear amplifier.

KEYWORDS: OHC, noise, calcium, purinerg receptors, ATP, stiffness

Bevezetés

A zaj hatása

A környezeti ártalmak, mint például a zaj, káros hatással van a belső fül sejtjeire. Tartós zajbehatás a receptorsejtek károsítása révén idegi típusú hallás-

Közlésre érkezett: 2009.12.12.

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar, Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika
Cím: 4032, Debrecen, Nagyerdei krt. 98
Telefon: +(36-52) 414 763
E-mail: aszucs10@hotmail.com

csökkenést okoz (5, 10, 14, 24.). Ezt főként morfológiai és funkcionális/audiológiai vizsgálatokkal igazolták (5). Tartós zajkezelés főként a külső szőrsejtek pusztulásához (20) és ezen sejtek funkciókiesése révén a DPOAE (disztorziós kombinációs hangmíngészió) csökkenéshez vezet (5). A külső szőrsejtek (KSZ) a hangrezgések erősítése révén kiemelkedő fontosságúak a hallás percepciójában, számuk mintegy 22 000, a bazális csavarulatok területén négy, az apikális csavarulatokban 3 sorban helyezkednek el a cochleában. Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereoóliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumi. Ezen folyamatok végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk elvesztéséhez és a sejtek pusztulásához

vezetnek (4, 22). Felvetették azt is, hogy ezen károsító mechanizmusok hátterében a reaktív oxigén gyökök keletkezése (16), a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen a Ca^{2+} szint változása áll. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés sejtformerevség változást hoz létre a külső szőrsejt oldalfalán (2, 3). Az intracelluláris Ca^{2+} szintet a cochlea fő effereus neurotranszmitterei, mint pl. az acetilkolin és a GABA, valamint az újabb kutatások alapján kótranszmitterként szerepet játszó ATP is befolyásolni képesek (15). A zaj expozíció hatására megváltozhat számos neurotranszmitter és neuromodulátor hatása. Mint arról beszámoltak, 10-11 napig tartó folyamatos, 24 órán át tartó, 65 dB-es zajkezelés hatására megváltozik az ATP hatására kialakuló kation áram (6). Ezen kísérletekben különbséget találtak a zajkezelés után a rövid és hosszú típusú KSZ-ek között.

Kísérleteink során a zaj expozíció hatását vizsgáltuk a külső szőrsejtek purinerg receptorainak eloszlására, sejt felszíni expressziójára és a sejtek nyugalmi Ca^{2+} szintjére, az ATP adásakor kialakult Ca^{2+} transziensekre és a sejtek sejtformerevségére.

Eszközök és módszerek

Zajterhelés

14 napig tartó, napi 24 órán keresztül adott 80 dB intenzitású zajterhelést végeztünk. A zaj minden frekvenciát egyaránt tartalmazott 50 Hz és 20 kHz tartomány között (un. „fehér zaj”). A ketrecen belül a zaj intenzitás különbség maximum 2 dB volt.

Külső szőrsejt izolálás

Kísérleteinket pigmentált tengerimalacokon (150-300g) végeztük. Nembutallal történő túllátás után a tengerimalacokat dekapitáltuk. A temporális csontot – mely tartalmazta a bullát – eltávolítottuk. A bullát csontcsípővel felnyitottuk, a cochlea körüli csontrészeket eltávolítottuk. A cochleat Hank extracelluláris oldatba helyeztük. A Hank oldat tartalma mM-ban: 142 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl_2 és 1 MgCl_2 (Sigma, St. Louis, Mo). Az oldat pH-ját 7,4-re, míg ozmolaritását 320 mOsm-ra állítottuk be. A Corti szerv preparálását és a sejtek emésztését ezen oldatban végeztük el. A preparálás után a sejteket IV-es típusú collagenáz oldatban emésztettük (5 perc, 1 mg/ml; Sigma). Azon külső szőrsejteket használtuk kísérleteink során, melyek megfeleltek Zajic és Schacht (30) által felállított kritériumoknak. Ezek a 1: cilindrikus sejtalak, 2: a sejtek ne legyenek megduzzadva, 3: a sejt mag a sejt bázisához közel helyezkedjen el, 4: a sejtalkotók ne mutassanak Brown-féle mozgást.

Kísérleteinkhez két preparátumot készítettünk.

Az első preparátumhoz a cochlea apikális két csavarulatán elhelyezkedő, míg a második preparátumhoz a bazális csavarulaton levő sejteket használtuk fel.

Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció méréshez Ca^{2+} szenzitív fluoreszcens festéket, a fura-2 acetoximetil észterét (Fura-2 AM, Molecular probes, Eugene, OR, USA) használtuk. A sejteket 5 μM Fura-2 AM jelenlétében 20 percig inkubáltuk. A festékkel feltöltődött sejteket tartalmazó tárgylemezt egy invertált mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Japan) tárgyasztalára helyeztük. A sejtekbe juttatott festék megfelelő, 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését DeltaScan™ kettős monochromátor berendezés (Photon Technology International, USA) biztosította. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en, interferenciaszűrő közbeiktatásával, egy fotoelektron sokszorozó (PMT) segítségével, 10 Hz mintavételi gyakorisággal detektáltuk. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásait, mint a fluoreszcenciahányadosból (R) számítható közvetlen Ca^{2+} -koncentráció változásokat tüntettük fel.

$$[\text{Ca}^{2+}] = \text{KD} \cdot \beta \cdot (\text{R} - \text{R}_{\min}) / (\text{R}_{\max} - \text{R}),$$

ahol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, KD a disszociációs állandó, $\text{R} = \text{F}_{340} / \text{F}_{380}$, R_{\min} és R_{\max} a minimális és maximális fluoreszcencia-hányados. A számításokhoz in vivo kalibrációs adatokat használtunk fel, ahol $\text{KD} = 76 \text{ nM}$, $\text{R}_{\min} = 0,42$, $\text{R}_{\max} = 8,6$, $\beta = 15,3$. A háttérfluoreszcenciát a fedőlemez sejtmentes helyein mértük, amit a program levont a mért fluoreszcencia értékekből.

A vizsgált anyagokat perfúziós rendszer segítségével juttattuk a sejtek közvetlen közelébe. A méréseket normál Hank oldatban végeztük.

Immunitokémia és immunhisztokémia

A kipreparált külső szőrsejtek kalcium- és magnéziummentes (CMF) foszfát pufferrel (PBS) (136,75 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , 300 mOsm, pH: 7,2) történő lemosása után ötperces acetonos fixálás következett, majd PBS-ben hígított 0,1%-os Triton-X-100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt 10 percen keresztül. Ezt követően PBS-ben történt háromszori mosás után 30 perces blokkolás történt 1%-os szarvasmarha szérumban albuminnal (BSA). A következő lépésben a kimutatandó fehérjének megfelelő, 1%-os BSA oldatban hígított elsődleges antitesttel egy órán át szobahőn, majd három PBS-ben történt mosást követően a fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos antitesttel szintén egy órán keresztül sötétben, szobahőn inkubáltuk a sejteket. Végül háromszori PBS-es mosás után a

magokat 4'-6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) vagy propidium-jodiddal tettük láthatóvá. Kettős festések esetén a kétféle primer antitestet egyszerre tettük a sejtekre, csakúgy, mint a kétféle szekunder antitestet. Ezen kísérletekben az alkalmazott négyféle antitest mindegyike más-más állatból származott. Az általunk használt másodlagos antitestek mindegyike 1:1 arányban jelöli a primer antitesteket. A negatív kontrollok készítésekor kihagytuk az elsődleges antitesteket és csak a másodlagos antitesteket adtuk a sejtekhez.

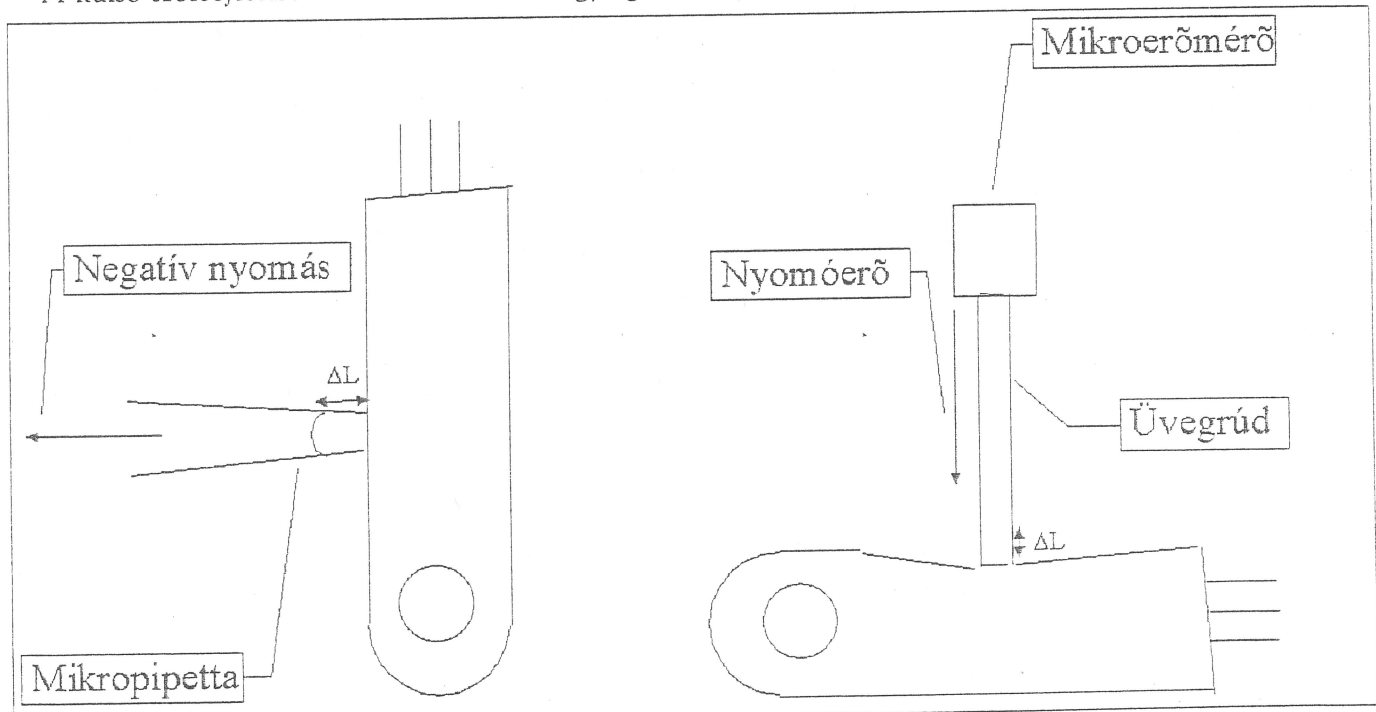
A megfestett sejtek vizsgálatát vagy Zeiss LSM 510 META konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal, vagy Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. A fotókat a SPOT RT digitális kamerával a SPOT Advanced v. 3.5 szoftver felhasználásával készítettük. Az összehasonlításra szánt felvételek minden esetben azonos kamerabeállítások mellett és expozíciós idővel készültek. Utóerősítés csak a vizsgálatok bizonyos aspektusainak kiemelésé céljából történt (például a sejtek morfológiájának jobb láthatósága érdekében), minden esetben legfeljebb az egész kép intenzitásának és élességének homogén javításával.

Az oldalfal merevségének vizsgálata

A külső szőrsejtekben mikromechanikai egységek

(21) teremtik meg az oldalfal merevségét szabályozó rendszer működésének alapját. Ezzel egy presztin-független sejtfaalmerevség szabályozó rendszer teheti lehetővé az aktív energia visszacsatolásának lehetőségét (1, 8, 9).

Az oldalfal merevségét az Oghalai és mtsai (19) által korábban leírt, aspirációs mikrodeformációs technika adaptált változatával vizsgáltuk (1. ábra). Az ehhez szükséges mikropipettákat $2,8 \mu\text{m}$ -s belső átmérővel Clark EC 15 TF üvegkapillárisból készítettük 5 lépcsős formálási programmal (Flaming/Brown Model P-87). Az extracelluláris oldattal feltöltött pipettákat a megfelelő, szabályozható negatív nyomás biztosítására egy vízoszlopos manométerhez csatlakoztattuk. A vizsgálatokhoz $4\text{--}10 \text{ H}_2\text{O cm}$ ($0,39\text{--}0,98 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$) közötti negatív nyomástartományt választottunk, mely tartományban az oldalfal három rétegű struktúrája a szakirodalom szerint is intakt maradt. A méréseket külső oldattal töltött folyadék-kamrában végeztük, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, oly módon, hogy a külső szőrsejt oldalfalához illesztett pipettára kapcsolt negatív nyomás hatására a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet fáziskontraszt képeit CCD kamera segítségével PC-hez csatolt külső digitalizáló kártyán keresztül rögzítettük. A rögzített képek digitális tisztítása, zajmentesítése



1. ábra. A külső szőrsejtek falmerevségének vizsgálata

A külső szőrsejtek merevség vizsgálata mikrodeformációs technikákkal lehetséges, melyek során a külső szőrsejtek mechanikai hatásra adott alakváltozását vizsgálják (19, 28). Az így kialakult alakváltozás mértékéből meghatározható a sejt hosszanti- (28) ill. oldalfal merevsége (19). A mikrodeformációs technikák két csoportba sorolhatók, aszerint, hogy a külső szőrsejtek deformációját milyen módszerrel érik el. Vizsgálhatjuk a sejt nyomóerő hatására kialakuló alakváltozását, ennek mértékéből határozzuk meg a sejt merevségét. A másik mikrodeformációs technika a sejtfaal húzóerővel szembeni deformálódását méri, mely során a sejt oldalfalára mikropipettán keresztül ismert negatív nyomást csatolunk (17, 19). Ebben az esetben a sejtfaal merevségét a sejtfaal pipettába való behúzódásának mértékéből határozhatjuk meg. A mikrodeformáció meghatározására mindkét technika a külső szőrsejtekről készült felvételek vizuális elemzését használja

után a jobb láthatóság elérésére pszeudokolor átalakítást végeztünk (lásd fent), mely után 18 képpont/ μm képfelbontás alakult ki. A sejfalrészlet behúzódásának mértékét az alábbi módon határoztuk meg. A mikropipetta szájadékának vetületére fektetett vonal szolgált viszonyítási vonalként. Az ezzel párhuzamos, az oldalfalrészlet görbületének érintőjébe fektetett második vonal és a viszonyítási vonal közötti távolságot tekintettük a pipettába betüremkedő oldalfalrészlet hosszának, melyből a merevségi mutatót (S_p -stiffness parameter) az alábbi összefüggést használva határoztuk meg:

$$S_p = -\Delta P \cdot r^2 \cdot \pi / \Delta L$$

ahol ΔP ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$) a pipettán keresztül applikált negatív nyomás; r (μm) a mikropipetta belső átmérője; ΔL (μm) a pipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza.

Az alkalmazott negatív nyomás (ΔP) hatására kialakuló oldalfal behúzódás (ΔL) mértékének jellemzésére 30 másodperces, 4–10 H_2O cm-s negatív nyomáspulzusokat alkalmaztunk a mikropipettán keresztül az oldalfalra 30 másodperces megszakításokkal. A pipettába történő oldalfal behúzódást (ΔL) a negatív nyomáspulzus végén határoztuk meg.

Eredmények

A zajkezelt tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek

Kísérleteink során 14 napig tartó, napi 24 órán keresztül adott 80 dB zaj expozíció hatását vizsgáltuk tengerimalac ($n=30$) izolált külső szőrsejt nyugalmi Ca^{2+} szintjére, ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésre, illetve sejt membránjában

elhelyezkedő purinerg receptorok expresziójára és eloszlására. Kezeletlen állatokban a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a külső szőrsejtben 133 ± 12 nM volt ($n=14$). 180 μM ATP alkalmazása után (30s) a sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 266 ± 65 nM-re emelkedett 5.9 ± 1.0 s latenciával. Zajkezelés után a sejtek egy csoportja degeneratív jeleket mutatott, sérülékenyebb volt a külső hatásokra, illetve ATP adásakor nem jött létre a sejtben Ca^{2+} szint emelkedés. Méréseinket azon sejteken végeztük, melyek megfeleltek az ép sejt morfológiai kritériumainak, mint például a cilindrikus sejtalak, ép sztereocílium, a sejtmag a sejt bazális területén helyezkedett el. Ezen sejtekben a nyugalmi Ca^{2+} szint magasabbnak adódott a kontroll sejtekhez képest (1. táblázat). Különbséget találtunk az apikális és a bazális sejtek között (2. ábra). Zaj expozíció után a cochlea apikális csavarulatain elhelyezkedő sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 181 ± 24 nM ($n=11$), míg a bazális csavarulat sejtjei között 219 ± 29 nM ($n=8$) volt (1. táblázat). A 180 μM ATP (30 s) adása után kialakuló Ca^{2+} szint emelkedés az apikális sejtekben 60 ± 22 nM volt 8.4 ± 2.2 s latenciával ($n=11$), míg a bazális sejtekben 44 ± 10 nM volt 9.9 ± 2.2 s latenciával ($n=8$), (1. táblázat).

A zajkezelt tengerimalacok belső füléből izolált külső szőrsejt purinerg receptor mintázata

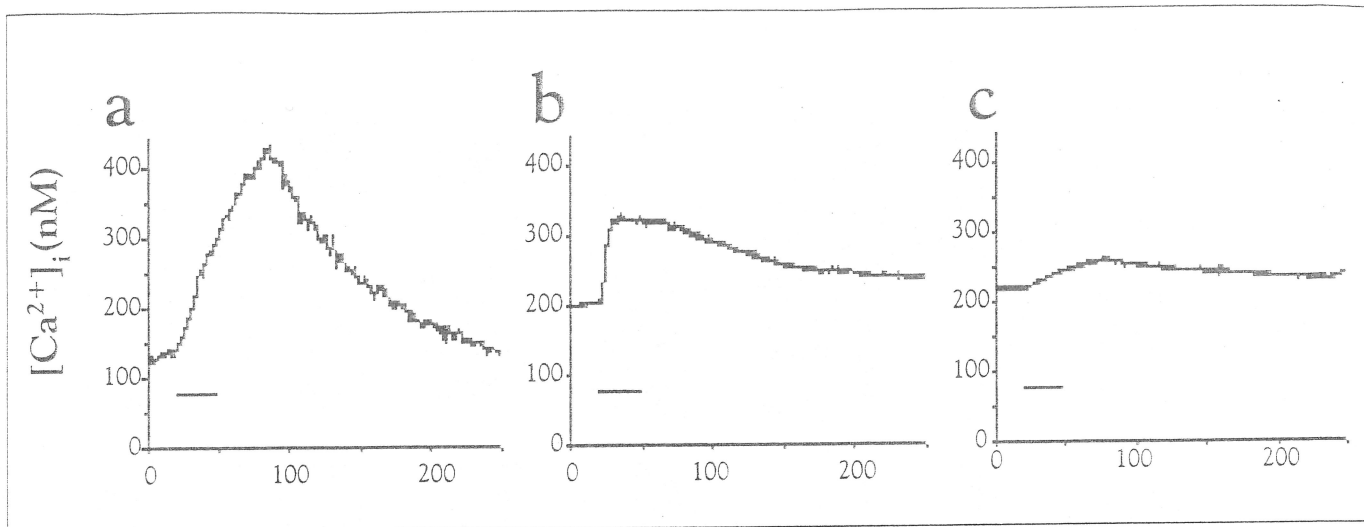
Az ATP adagolásra adott alacsonyabb Ca^{2+} válasz felvetette annak a lehetőségét, hogy a sejt membránjában elhelyezkedő purinerg receptorok kisebb mértékben expresszálódnak zajkezelés után. Ezen receptor altípusok közül a P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X7} and P_{2Y1} , P_{2Y4} receptorok intenzitása az immunfestés során

1. táblázat

Zaj expozíció után kialakult nyugalmi intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szint és ATP hatására kialakuló Ca^{2+} válasz külső szőrsejtben.

	kontroll $n=14$	zaj expozíció	
		apikális $n=11$	bazális $n=8$
nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)	133 ± 12	$181 \pm 24^*$	$219 \pm 29^*$
amplitúdó (nM)	266 ± 65	$60 \pm 22^*$	$44 \pm 10^*$
latencia (s)	5.9 ± 1.0	8.4 ± 2.2	9.9 ± 1.1

Kezeletlen állatokban a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a külső szőrsejtben 133 ± 12 nM volt ($n=14$). 180 μM ATP alkalmazása után (30s) a sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 266 ± 65 nM-re emelkedett 5.9 ± 1.0 s latenciával. Zaj expozíció után a cochlea apikális csavarulatain elhelyezkedő sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 181 ± 24 nM ($n=11$), míg a bazális csavarulat sejtjei között 219 ± 29 nM ($n=8$) volt (1. táblázat). A 180 μM ATP (30 s) adása után kialakuló Ca^{2+} szint emelkedés az apikális sejtekben 60 ± 22 nM volt 8.4 ± 2.2 s latenciával ($n=11$), míg a bazális sejtekben 44 ± 10 nM volt 9.9 ± 2.2 s latenciával ($n=8$).



2. ábra. Zaj expozíció hatása az ATP által kiváltott Ca^{2+} tranziensekre

(a) A nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a vizsgált külső szőrsejtben 133 nM-nak adódott. 180 μM ATP alkalmazása után (30 s) a sejt nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 300 nM-al emelkedett. Zaj expozíció után a cochlea apikális csavarulatain elhelyezkedő sejt nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 203 nM, míg a bazális csavarulat sejtjei között 219 nM volt. (b) A 180 μM ATP (30 s) adása után kialakuló Ca^{2+} szint emelkedés az apikális sejtben 127 nM ($l=60 \mu\text{m}$), míg (c) a bazális sejtben ($l=40 \mu\text{m}$) 44 nM volt. A vízszintes vonalak az ATP alkalmazásának időzítését és hosszát mutatják.

csökkent, míg a P_{2Y_2} altípus intenzitása nem változott. A korábban megfigyelt egyenlőtlen sejt felszíni purinerg receptor eloszlás a zajkezelés után eltűnt, a receptorok eloszlása homogén volt. Nem találtunk különbséget a receptorok mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitásában sem a sejt apikális és bazális területei között (3. ábra).

A zajterhelés hatása a cochlea különböző területeiről származó külső szőrsejtek oldalfalának merevségére

Batta és mtsai (2, 3) korábbi tanulmányaikban elemezték a mechanikai hatás által kiváltott membránmerevség választ, mely a KSZ belső vékező rendszerének része. Ezen mechanizmus növeli a KSZ falmerevségét, mely védekező szerepet játszik tartós zajterhelés esetén (2, 3).

A második táblázatban összegeztük a membránfeszülési paramétereket (Sp) a zajjal kezelt és a kontroll állatok esetén. Külön csoportként vizsgáltuk a cochleoapikális és a cochleobazális sejteket.

Kísérleteink során a KSZ-ek falfeszülése növekedett, de nem találtunk különbséget az Sp értékben a cochleoapikális és a cochleobazális sejtek között.

Megbeszélés

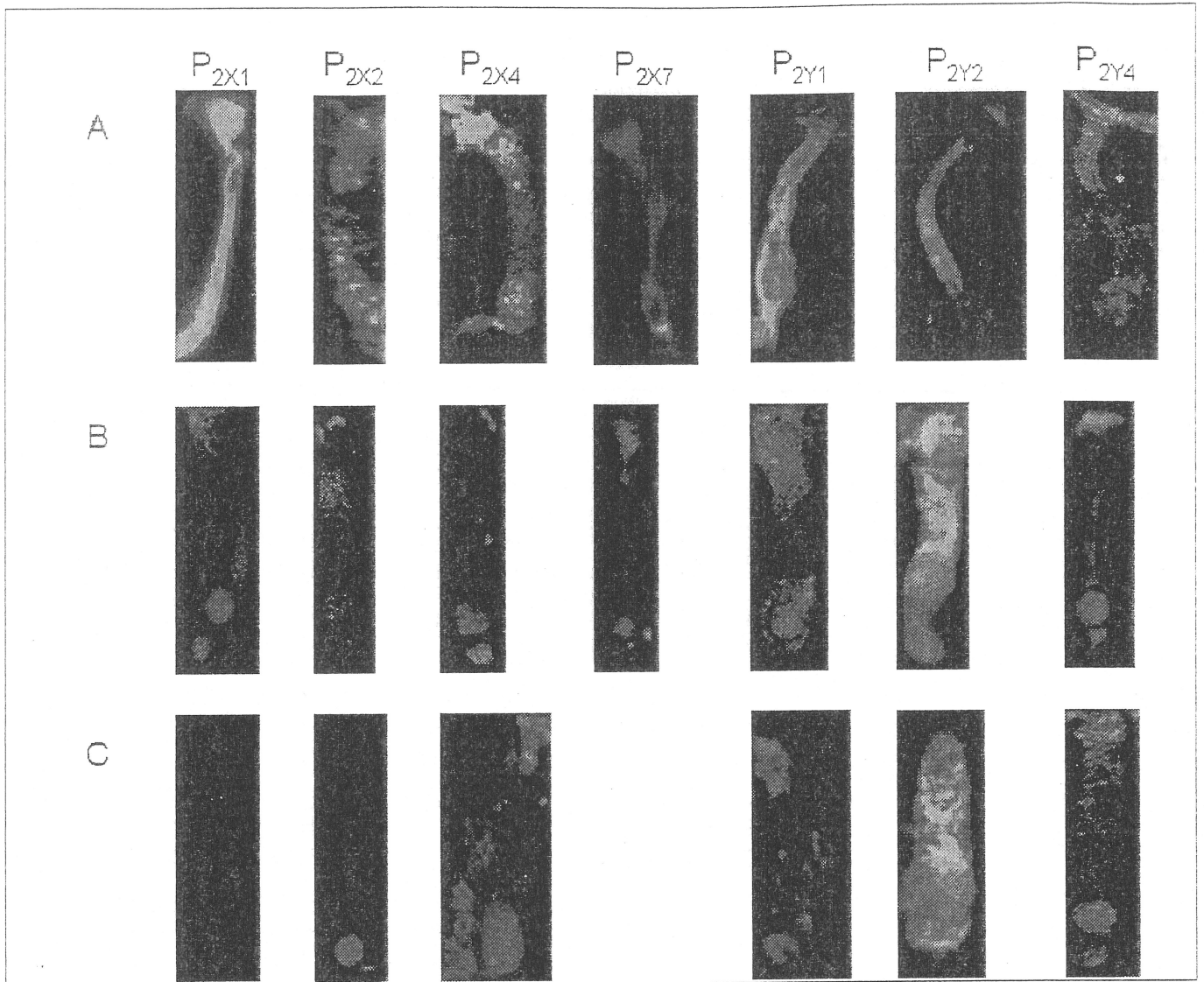
Tartós zajkezelés a receptorsejtek károsítása révén idegi típusú halláscsökkenést okoz (5, 10, 14, 24). Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereocíliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumai. Ezen folyamatok végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk el-

vesztéséhez és a sejtek pusztulásához vezetnek (4, 22). Felvetették azt, hogy ezen károsító mechanizmusok hátterében a reaktív oxigén gyökök mennyiségének változása (16), a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen a Ca^{2+} szint változása áll (11).

A zajterhelés állatkísérletes vizsgálatainak eredményei ellentmondásosak. A korábbi tanulmányokban alkalmazott közepes intenzitású (1 kHz, 81 dB SPL, 24 napig) zajkezelés a tengerimalacokban nem okozott károsodást a Corti szervben és nem vezetett a külső szőrsejtek pusztulásához az alkalmazott morfológiai és funkcionális/audiológiai vizsgálatok alapján (5). Ezzel ellentétesek Skellett és mtsai. megfigyelései (23), akik már alacsony intenzitású zaj hatására (65 dB SPL, 10–11 napig) is leírtak változást a belső fül működésében (23).

Kísérleteink során tartós, közepes intenzitású zajkezelés hatását (80 dB SPL, 14 napig) vizsgáltuk a külső szőrsejt Ca^{2+} homeosztázisának változására. A zajterhelés hatására a külső szőrsejtek nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szintje megemelkedett. Ez a megfigyelésünk megegyezett Fridberger és mtsai által közölttekkel, bár ők az elváltozást nagy intenzitású (130 dB SPL) zaj esetén észlelték (11).

A korábbi morfológiai és funkcionális megfigyelések arra utalnak, hogy a cochlea bazális kanyarulatán elhelyezkedő sejtek érzékenyebbek zajterhelésre (18, 20). A zajjal kezelt állatok külső szőrsejtjeinek nyugalmi Ca^{2+} szintje a cochleában elfoglalt helytől függően eltérő mértékben növekedett, a bazális csavarulaton elhelyezkedő sejtekben nagyobb (219 nM) volt a nyugalmi Ca^{2+} szint, mint az apikális csavaru-



3. ábra. Zaj expozíció hatása a purinerg receptor expresszióra

A purinerg receptorok expressziója zajterhelés előtt (A), és után az apikális (B) és a bazális (C) csavarulatokon. Zaj expozíció után a P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X7} , P_{2Y1} és P_{2Y4} receptor altípusok expressziója csökkent a külső szőrsejtekben, míg a P_{2Y2} receptor altípusé nem változott. A kezelés után a receptorok eloszlása a sejtmembránban egyenletes volt. A receptor eloszlásban nem találtunk különbséget az apikális és a bazális csavarulaton elhelyezkedő sejtek között.

lat sejtjeiben (181 nM). Ez a magasabb nyugalmi Ca^{2+} szint okozhatja a cochlea bazális 20%-ában jelentősebb mértékben megfigyelhető KSZ morfológiai változást és szövetpusztulást (20).

A zajterhelés képes megváltoztatni a KSZ-ek különböző neurotranszmitterekre adott válaszát is. Chen és mtsai (7) patch-clamp kísérleteik során mértek ilyen változást ATP sejtekhez adásakor. Kísérleteinkben 180 μ M ATP hatására (30 s) a zajkezelt állatok Ca^{2+} tranziensei jelentősen megváltoztak a kontrollhoz képest. A zajkezelt állatokban kisebb és hosszabb latenciájú volt az ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés (1. táblázat). Ezen mérések során szintén találtunk eltérést a cochlea bazális és apikális csavarulatáról származó sejtek között. Az apikális csavarulathoz tartozó sejtekben a Ca^{2+} szint 60 nM-lal, míg a bazális sejtekben 44 nM-lal emelkedett 180 μ M ATP alkalmazását követően.

A kontroll csoportban a válasz mértéke 266 nM volt, mely eltérés szignifikánsnak adódott.

A folyamatos KSZ stimuláció, és az ennek következtében kialakuló magasabb nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint a sejt felszíni purinerg receptorok expresszióját feltételezésünk szerint csökkenti, és ez állhat a kísérleteink során megfigyelt kisebb amplitúdójú és hosszabb latenciával kialakuló ATP-re adott Ca^{2+} válasz háttérében.

Purinerg receptor altípusok ellen termeltetett poliklonális antitesteket használva csökkent intenzitást találtunk P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X7} és P_{2Y1} , P_{2Y4} altípusok esetén. A P_{2Y2} altípus intenzitása nem változott a kontroll csoporthoz képest (2. ábra). Technikai nehézségek miatt nem tudtunk kimutatni eltérést az apikális és a bazális sejtek között ebben a tekintetben.

Megfigyeléseinkkel ellentétben Wang és mtsai (29) a P_{2X2} receptor altípus fokozott expresszióját írták le

A zaj expozíció hatása a sejtfal merevség (Sp) paramétereinek változására

Kezelés	apikális KSZ	bazális KSZ
kontroll (n=10)	1.27±0.11	1.28±0.11
zaj expozíció (n=10)	1.49±0.14	1.51±0.24

Kísérleteinkben a KSZ-ek falfeszülése növekedett, de nem találtunk különbséget az Sp értékben a cochleoapikális és a cochleobazális sejtek között.

nagy intenzitású zaj (90-120 dB, 6 óráig) alkalmazása esetén. Kísérleteinkben valószínűleg a rövid ideig tartó ingerlés miatt nem érvényesült a megemelt nyugalmi Ca^{2+} szint membrán receptorokra kifejtett hosszútávú csökkentő hatása.

A nyugalmi Ca^{2+} szint emelkedése a KSZ membrán sejtfal merevségének csökkenését feltételezi (3, 8, 12). A csökkent sejtfal merevség sérülékenyebbé teszi a KSZ-et a mechanikai hatásokra. A nemrégiben leírt regulációs falmereségi válasz nemcsak kompenzálni képes az emelkedett Ca^{2+} szint hatására csökkenő sejtfal merevséget, hanem a nyugalmi szint felé képes növelni azt (3). Ezzel a regulációs mechanizmussal magyarázható a kísérleteinkben mért nagyobb KSZ sejtfal merevség (2. táblázat). A folyamat lényege a KSZ sejtmembrán alatti citoskeletális hálózat Ca^{2+} -függő, stretch indukálta szabályozása, mely a sejtfal merevséget növeli (3). Tartós, intenzív zajterhelés nagyobb amplitúdóval rezegteti meg a baziláris membránt. Ezen folyamatos mechanikai hatás kivédésére szolgál a megnövekedett sejtfalmereség. A megnövekedett sejtfalmereség másik lehetséges magyarázata a sejtmembrán és a szubkortikális citoskeletális hálózat metabolikus hatásokra kialakuló változása (2, 3, 13, 25–27).

A regulációs merevség szabályozásban a kiváltó tényezőt az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} szint növekedése jelenti. A nyugalmi Ca^{2+} szint tartós emelkedése következtében a kialakuló Ca^{2+} szignálok kisebb amplitúdójúak. Ezen mechanizmus következtében lehetséges az, hogy nem találtunk eltérést a sejtfal merevségben az apikális és a bazális sejtek között.

Összefoglalásképp a zajterhelés hatására kialakuló változás az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} homeosztázisban és az ennek következtében kialakuló Ca^{2+} függő regulációs mechanizmusban a sejtfal merevség megváltozásához vezet. A KSZ mikromechanikai tulajdonságainak megváltozása hatására csökken a cochlea erősítő mechanizmusának hatékonysága.

Munkánk a DE OEC Mecenatura Grant 15/2005, az OTKA T 049151, K 63743 valamint az ETT 250/2003 támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

1. Adachi M., Sugawara M., Iwasa K.H.: Effect of turgor pressure on outer hair cell motility. *J. Acoust. Soc. Am.* 108, 2299-2306, 2000.
2. Batta J.T., Panyi G., Gáspár R., Sziklai I.: Active and passive behaviour in the regulation of stiffness of the lateral wall in outer hair cells of the guinea-pig. *Pflug. Arch.* 447, 328-336, 2003.
3. Batta J.T., Panyi G., Szűcs A., Sziklai I.: Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3364-3370, 2004.
4. Berridge M.J.: The biology and medicine of calcium signalling. *Mol. Cell Endocrinol.* 98, 119-124, 1994.
5. Canlon B., Fransson A.: Morphological and functional preservation of the outer hair cells from noise trauma by sound conditioning. *Hear. Res.* 84, 112-124, 1995.
6. Chen C., Nenov A., Norris C.H., Bobbin R.P.: ATP modulation of L-type calcium channel currents in guinea pig outer hair cells. *Hear. Res.* 86, 25-33, 1995a.
7. Chen C., Nenov A., Bobbin R.P.: Noise exposure alters the response of outer hair cells to ATP. *Hear. Res.* 88, 215-221, 1995b.
8. Dallos P., He D.Z.Z., Lin X., Sziklai I., Mehta S., Evans B.N.: Acetylcholine, outer hair cell electromotility and cochlear amplifier. *J. Neurosci.* 17, 2212-2226, 1997.
9. Dallos P., He D.Z.Z.: Two models of outer hair cell stiffness and motility. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 283-91, 2000.
10. Decory L., Hiel H., Aran J.M.: In vivo noise exposure alters the in vitro motility and viability of outer hair cells. *Hear. Res.* 52, 81-88, 1991.
11. Fridberger A., Flock Å., Ulfendahl M., Flock B.: Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 7127-7132, 1998.
12. Frolenkov G.I., Mammano F., Kachar B.: Regulation of outer hair cell cytoskeletal stiffness by intracellular Ca^{2+} : underlying mechanism and implications for cochlear mechanics. *Cell Calcium* 33, 185-95, 2003.
13. He D.Z.Z., Zheng J., Dallos P.: Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J. Neurosci.* 23, 9089-9096, 2003.
14. Henderson D., Spongr V., Subramaniam M., Campo P.: Anatomical effects of impact noise. *Hear. Res.* 76, 101-117, 1994.
15. Housley G.D., Greenwood D., Ashmore J.F.: Localisation of cholinergic and purinergic receptors on outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 249, 265-273, 1992.
16. Kopke R., Bielefeld E., Liu J., Zheng J., Jackson R., Henderson D., Coleman J.K.: Prevention of impulse noise induced hearing loss with antioxidants. *Acta Otolaryngol.* 125, 235-43, 2005.
17. Lue A.J., Brownell W.E.: Salicylate induced changes in outer hair cell lateral wall stiffness. *Hear. Res.* 135, 163-8, 1999.
18. Noramann A.S., Bohne B.A., Harding G.W.: Histopathologi-