

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A hallás finom szabályozása:
lassú motilis válasz és elektromotilitás
a külső szőrsejtekben

Dr. Borkó Rezső

DEBRECENI EGYETEM
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika

Debrecen, 2007

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A HALLÁS FINOM SZABÁLYOZÁSA:
LASSÚ MOTILIS VÁLASZ ÉS ELEKTROMOTILITÁS
A KÜLSŐ SZŐRSEJTEKBEN

Dr. Borkó Rezső

Témavezető: Prof. Dr. Sziklai István

Programvezető: Prof. Dr. Berta András

DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA

JÁSZ-NAGYKUN-SZOLNOK MEGYEI HETÉNYI GÉZA KÓRHÁZ-
RENDELŐINTÉZET
FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS SZÁJSEBÉSZETI OSZTÁLY

DEBRECEN, 2007

Bevezetés

Az emlős cochlea egy különlegesen érzékeny hidromechanikai frekvencia analizátor, melynek feladata az időben változó hangok intenzitásának és frekvencia tartományának valós idejű érzékelése és feldolgozása akciós potenciál tevékenységgé a hallóidegben. Mind a nagyon alacsony, mind a kifejezetten nagy intenzitású hangok érzékelésére igen széles frekvencia-tartományban alkalmas, továbbá bizonyos speciesekben (ceték, denevér) képes ~10 μ sec időintervallummal egymást követő (100 000 Hz-es) hangingereket egymástól megkülönböztetni. Összetett mechanikai rendszert képez sajátos felépítésének köszönhetően. Passzív mechanikai sajátosságai is bizonyos mértékig alkalmassá teszik a hangok frekvencia analízisére, a Békésy által leírt haladóhullám révén. A hang által létrehozott hallócsont-láncolati mozgások, áttevődve a perilympa folyadékterére, mozgásba hozzák a cochleaban a membrana basilaris – Corti-szerv – membrana tectoria egységet (cochlearis hangfelfogó rendszert), melynek következtében a basilaris membránon haladóhullámok jönnek létre. Ma már tudjuk, hogy a Békésy által leírt haladóhullám a „passzív” (élettelen) cochleara jellemző, csak nagy inger erősség váltja ki, frekvencia felbontása pedig meglehetősen durva. Mindez azonban nem elégséges a cochlearis hangérzékelés tényleges dinamika tartományának és frekvencia hangolásának eléréséhez. Az „aktív” cochleaban a membrana basilaris hullámmozgása ugyan a haladóhullámhoz hasonló megjelenésű, de mind mennyiségileg, mind minőségileg különbözik attól: hangolása élesebb és egyértelműen nonlinearis. A cochlea mindezen tulajdonságait egyedi felépítésű, mechanikailag aktív sejtjeinek, a külső szőrsejtek működésének köszönheti. A külső szőrsejtek a cochleat egy finoman szabályozott, aktív hangnyomás érzékelő rendszerré teszik.

Az emlős hallóhám és mikromechanikai tulajdonságai

A csontos cochlean belül elhelyezkedő, háromszög keresztmetszetű hártás labirintus három üregrendszerre osztja a csontos csatornát: a csontos és hártás labirintus között elhelyezkedő scala vestibulira és scala tympanira, valamint a hártás labirintuson belül lévő ductus cochlearisra. A ductus cochlearist a Reissner-membrán határolja a scala vestibuli felé, lateralis falát a stria vascularis képezi, míg a scala tympanitól a membrana basilaris választja el. Mindhárom csatorna folyadékkal van kitöltve: a ductus cochlearist endolympha, míg a scala vestibulit és tympanit részben plazma ultrafiltrátum, részben liquor cerebrospinalis eredetű perilympa tölti ki.

A perilympha meghatározó kationja a Na^+ ($\text{Na}^+ \sim 154 \text{ mM}$; $\text{K}^+ \sim 3 \text{ mM}$), míg az endolympha elsődleges kationja a K^+ ($\text{K}^+ \sim 161 \text{ mM}$; $\text{Na}^+ \sim 1 \text{ mM}$; $\text{Ca}^{2+} \sim 30 \mu\text{M}$). A stria vascularis a cochlea lateralis falán lévő háromrétegű hám. Aktív ion-transzport révén termeli az endolymphát, ennek eredményeként töltése pozitív, +80 és +100mV közötti, a perilymphához képest. A hártás labirintust alkotó membránok közül a membrana basilarisnak van kitüntetett szerepe a hallás szempontjából, mivel ennek a mechanikai tulajdonságai határozzák meg a rajta létrejövő passzív haladóhullámok karakterisztikáját. A Reissner membránnal ellentétben, a membrana basilaris ionokkal szemben permeábilis.

A spirális lefutású Corti-szerv (a hallóvégekészülék) egy sejt-mátrix, mely a membrana basilaris ductus cochlearis felé eső felszínén fekszik. A Corti-szerv receptorsejtjei az ún. szőrsejtek, melyek két típusát különböztetjük meg a cochleaban: a külső és belső szőrsejteket. A Corti-alagút kétoldalán, a külső pillérsejtek és a Hensen-sejtek közötti térben, szinaptikus pólusukkal a Deiters-sejtekre támaszkodva, ciliaris pólusukkal a membrana tectoriaaba illeszkedve, 3-4 sorban helyezkednek el a külső szőrsejtek. A belső pillérsejtek mellett, a támasztósejtekkel körülvéve, egy sort képeznek a belső szőrsejtek. Megközelítően 3500 belső szőrsejt egységet tartalmaz a cochlea, bázisától a csúcsáig. Mivel a membrana basilaris ionok számára szabadon átjárható, ezért maga a Corti-szerv végső soron a scala tympanit kitöltő perilymphában mintegy „fürdik”.

A Corti-szerv cytoarchitectúráját a támasztó sejtek sajátos elrendeződése és felépítése határozza meg. A Deiters-sejteken elhelyezkedő külső szőrsejtek laterális membránja közvetlenül érintkezik a Corti-alagutat kitöltő perilymphával. A szőrsejtek cuticularis felszíne a pillérsejtek tetejével, a Deiters-sejtek és egyéb támasztósejtek apikális membránjával az endolymphaticus tér felé *zonula occludens-szel* záró lemezt, hálószerű rácsozatot (lamina reticularis) képez. A sejtmentes, kollagén tartalmú membrana tectoria és a lamina reticularis közti tér pedig szabadon közlekedik a ductus cochlearist kitöltő endolymphával. A lamina reticularis és a szőrsejtek apikális felszíne, a sztereociliumokkal együtt endolymphában inkubálódik.

A külső szőrsejtek szerkezete

A külső és belső szőrsejtek különböző alakúak. Közös bennük, hogy apikális membránjukból aktin filamentumokból álló, plasma membránnal borított, bázistól a csúcs felé haladva csökkenő számú és elvékonyodó, egyenes vonalban (belső szőrsejtek) illetve „W”-, „V”- ill. „U”-alakban (külső szőrsejtek) csoportot képező sejtnyúlványok, ún. sztereociliumok nyúlnak ki. Ezek hossza kívülről befelé rövidül. A sztereociliumok között kereszt-kötések

találhatók, melyek az egész csokornak nagyfokú merevséget biztosítanak, lehetővé téve ezáltal, hogy a leghosszabb sztereocilium elmozdulása esetén az egész csokor, mint egy egység, együtt mozogjon. A leghosszabb sztereociliumok a membrana tectoria alsó felszínéhez kapcsolódnak. Szintén van összeköttetés az egyazon szőrsejten lévő sztereociliumok sorai között is. A rövidebb sztereociliumok csúcsától a hosszabbak oldalához rögzülnek ezek az ún. csúcsi kötések („*tip-links*”), melyek végződése a rövidebb sztereociliumon a tulajdonképpeni mechano-szenzitív transzdukciós csatornák.

Mivel a sztereociliumok morfológiailag kapcsolódnak a membrana tectoriahoz, ezért a membrana tectoria scala tympani irányú elmozdulása hatására egyszerre hajlanak el a külső szőrsejtek sztereociliumai a stria vascularis irányába. A sztereocilium-csokor elhajlása a leghosszabb sztereocilium irányába a csúcsi összeköttetések megfeszülését okozza, amely kiváltó ingere a transzdukciós csatornák megnyílásának. Az elmozdulással szinkron a sztereociliumok csúcsán lévő kation csatornák megnyílnak és a magas K^+ tartalmú endolymphából K^+ áramlik a sejt belsejébe, depolarizációt okozva a sejtmembránon.

A külső szőrsejtek oldalfala különleges, három hosszanti koncentrikus hengert képező rétegből áll, vastagsága ~100 nm. Külső rétege a plasma membrán, melynek összetétele az oldalfal és az apikális pólus területén különbözik. Az oldalfal plasma membránja többek között módosult anion cserélőt, cukor transzportert és a külső szőrsejtek elektromotilitásának alapját képező fehérjét, ún. prestint tartalmaz.

Az oldalfal belső rétege a hártás falú felszín alatti ciszterna, melynek membránjai az apikális pólusnál a canalicularis reticulum membránjaiban folytatódnak. A felszín alatti ciszterna szerkezete az endoplasmaticus reticulumhoz hasonlít. A szőrsejtben lévő mitochondriumok többsége a felszín alatti ciszterna mellett található és folytonosság látszik a mitochondriumok külső membránja és a felszín alatti ciszterna membránjai között.

A két réteg között van az ún. kortikális rácsozat. Felépítésében két olyan citoszkeletális fehérje (F-aktin és spektrin) szerepel, melyek a cuticularis lemezben is megtalálhatók. Az F-aktin és spektrin cuticularis lemezbeli merőleges elrendeződése az oldalfal teljes hosszában a kortikális rácsozatban folytatódik. Az egymástól ~40 nm-re lévő körkörös lefutású F-aktin filamentumok között keresztben hosszanti lefutású spektrin filamentumok feszülnek. A plasma membránt sugárirányú radiális pillérek pányva-szerűen rögzítik a párhuzamosan futó F-aktin kötegekhez és a szomszédos felszín alatti ciszternákhoz. A párhuzamos F-aktin filamentumok által határolt speciális szerkezetű egységek olyan „mikrodoménok”, melyek felépítésüknek köszönhetően képesek egyrészt a membránpotenciál változás hatására alakjukat megváltoztatni, másrészt rugalmas energiát tárolni.

A külső szőrsejtek működése

Az emlős külső szőrsejtek mechanikailag aktív, „senzo-motoros” sejtek, melyek a Cortiszerv hangingerre adott válaszána karakterisztikáját szabályozzák és felelősek a küszöb körüli erősségű hangok cochlearis erősítéséért. A hallásküszöb körüli hangerősségnél a haladó hullám a külső szőrsejt révén aktívan erősítve hozza létre a belső szőrsejt receptor áramának kiváltásához szükséges inger erősséget. Ez az ún. „cochlearis erősítő” működés. A jelenség nonlinearis és jelentőségét a küszöb feletti, 50 dB erősségű hangok esetében már elveszíti.

A külső szőrsejtek kétféle motoros aktivitása ismert ebben a folyamatban, a sejt hossz tengelyének megfelelően: a lassú (másodpercek-percek alatt végbemenő) motilis sejtválasz (rövidülés-elernyedés) és a gyors vagy elektromotilitás (μsec , ill. msec alatt lejátszódó).

A belső szőrsejtek szinte kizárólag afferens, a külső szőrsejtek pedig döntően efferens beidegzésűek. A belső szőrsejtek ellátó afferens idegrostok az I. típusú bipoláris ganglion spirale sejtektől származó myelin hüvellyel borított rostok. 20 idegrost elágazás nélkül fut a legközelebbi belső szőrsejthez, centrális axonjuk az ipsilateralis nucleus cochlearisban szinaptizál. A külső szőrsejtek afferens beidegzését a II. típusú pszeudo-unipoláris ganglion spirale sejtek adják, de ellentétben az I. típusú rostokkal, ezek kilépésük után elágaznak. A cochlea bázisán ~10, míg a csúcán ~50 külső szőrsejtet látnak el. Centrális axonjuk szintén az ipsilateralis nucleus cochlearisban végződik.

A belső szőrsejtek efferenciációja az ipsilateralis oliva superior laterális magcsoportjából érkezik és a belső szőrsejtekhez futó afferens idegrostok dendritjén végződik. A külső szőrsejtek efferens beidegzése szintén az ipsilateralis oliva superiorból, de annak mediális magcsoportjából származik és magukon a sejttesteken, az ún. szinaptikus régióban végződik. A külső szőrsejteken végződő efferens neuronok neurotransmitter anyaga az ACh és a GABA. Az ACh receptorok döntően a cochlea bázisán, míg a GABA receptorok főleg a csúcán találhatóak, a cochlea ellentétes vége felé haladva mindkét típusú receptor száma lecsökken.

A cholinerg neurotransmisszió befelé irányuló Ca^{2+} -áramlást eredményez, ami Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} -felszabadulást hoz létre. A Ca^{2+} -szignál különböző citoszkeletális elemek foszforilációs folyamatait is elindítja, mely a külső szőrsejtek mechanikai tulajdonságait képes megváltoztatni. GABA esetén is megfigyelhető az ACh hatására kialakuló hiperpolarizációhoz hasonló dóziszfüggő reverzibilis membránpotenciál változás. A citoszkeletális fehérjék foszforilációja megváltoztatja a sejtfa merevségi állapotát és ezen keresztül a külső szőrsejt aktív energia visszacsatoló képességét, vagyis a cochlearis erősítő működést.

A mechanikailag aktív külső szőrsejtek lassú motilitása 20-60 másodperces idő intervallumban kialakuló sejtrövidülés. A külső szőrsejtek lassú motilis alakváltozásának eredményeként bekövetkező rövidülés kiváltható mechanikai (folyadék áramlás), kémiai (K^+) hatással, depolarizációval, elektromos térerővel, ozmotikus hatással, vagy az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelésével.

A lassú motilis sejtválasz ATP jelenlétét igénylő, Ca^{2+} -jel indukálta foszforilációs ill. defoszforilációs útvonalak aktiválódásának az eredménye, mely a citoskeletális elemek (beleértve az aktint és a spektrint is) foszforilációja v. defoszforilációja útján hozza létre a mozgást. A lassú motilis sejtválasz feltételezett élettani szerepe a cochlea védelmében és a cochlearis adaptációban lehet. Pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert.

Az elektromotilitás a szinuszoid hanghullám okozta AC receptor áram keltette sejtmembrán feszültség változásokat valós időben követő sejthossz változás (rövidülés-megnyúlás), mely frekvencia követő, és fázisában is kapcsolt (5000 Hz-ig). A transzdukciós áram (mechano-elektrikus transzdukció) a nyugalmi membrán potenciál frekvencia követő oszcillálása révén gyors elektro-kinetikus sejtalakváltozást idéz elő, amely a nyugalmi sejthosszhoz képest nanométeres nagyságrendű rövidülés és megnyúlás (depolarizációra aktív rövidülés, hiperpolarizációra aktív megnyúlás jön létre). Ez a frekvencia követő külső szőrsejt hosszváltozás az elektromotilitás.

A külső szőrsejtek hang hatására létrejövő membrana basilaris kitérések által vezérelt, feszültségfüggő sejtmozgásának fiziológiai szerepe az, hogy a membrana basilarisra megfelelő fázisú aktív energia-visszacsatolást valósít meg. A hanghullám keltette membrana basilaris rezgések amplitudó maximumának helyén a membrana basilaris kitérések fázisával megegyező ütemű mechanikai energia-visszacsatolás jön létre, mely megnöveli és jelentősen kiemeli a membrana basilaris kitérések amplitudó maximumát, ezáltal biztosítja a küszöb körüli hangok érzékelését. Az amplitudó maximum mindkét oldalán létrehozott eltérő fázisú mechanikai energia-visszacsatolás hatására a membrana basilaris kitérése jelentősen csökken (un. „széli vágás”), ezáltal biztosítva a cochlea rendkívül érzékeny frekvencia felbontó képességét.

Küszöb körüli erősségű hangoknál a gyors (elektro-) motilitás képezi a cochlearis erősítés alapját. A külső szőrsejtek gyors, a hanginger frekvenciáját követő, ciklusos rövidülését és megnyúlását, a sejtmembránban sűrűn elhelyezkedő ($\sim 2500/\mu m^2$), feszültség függő konformáció változásra képes, prestin-nek nevezett, módosult anion cserélő fehérje molekula idézi elő.

A prestin 744 aminosavból álló polipeptid lánc, melynek 12 domén-je a sejtmembránban helyezkedik el. Elektromos impulzus hatására intracellulárisan klorid-iont köt meg és azt az extracelluláris tér irányába szállítja, de nem transzportálja oda (inkomplett transzporter). A membránpotenciál változásra, azzal szinkron, az anion vándorlása a fehérjén belül konformáció változást idéz elő. Az egyidejűleg bekövetkező alakváltozások összegződnek és a sejt hosszának megváltozását okozzák. A prestin molekula konformáció változása kizárólag feszültség vezérelt, intracelluláris energiahordozótól (ATP) független folyamat. A konformáció változások sejtszinten összeadódó és sejt alakváltozást okozó mértéke azonban a citoskeleton állapotától függ, mellyel szemben a prestin molekulák erő kifejtése működik.

A prestin alapú elektromotilitás összerendezésének, sejtmozgássá alakításának alapját a „mikrodoménokba” rendeződő plasma membrán és citoskeleton által alkotott funkcionális egységek alkotják. Ezek az alkotóelemek és aktuális állapotuk határozzák meg a külső szőrsejtek merevségét. A prestin molekulák a sejt merevsége ellen fejtenek ki erőt. A plasma membránban lévő prestin konformáció változásának következtében kialakuló elektromotilis amplitudó nagysága a sejtfa merevség fokának függvénye. Ez a citoskeleton geometriájától függ és metabolikus szabályozási folyamatok határozzák meg (pl. foszforiláció).

A külső szőrsejtek motilis működése különböző útvonalakon végbemenő anyagcsere folyamatok szabályozása alatt áll. Ebben kitüntetett szerepe van a külső szőrsejtekben különösen magas szinten szabályozott Ca^{2+} -szignalizációs utaknak. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kialakításában szerepe van az efferens neuro-transzmisszióknak (ACh), a cGMP-nek és a Rho-kinázoknak (Rac1, RhoA, Cdc42) is.

Egyedül az otoakusztikus emisszió, mint ma már klinikailag alkalmazott audiológiai mérési módszer, bizonyítja az emlős cochlea mechanikai aktivitását. A külső szőrsejtek elektromotilitása során fellépő sejtösszehúzódás/-megnyúlás ugyanis vibrációt okoz a belsőfül folyadékterében, mely a középfül hangvezető rendszerén keresztül áttevődik a külső hallójáratot kitöltő levegőbe és az így keletkezett emisszió mikrofonnal regisztrálható.

A külső szőrsejtek oldalfalának sajátos felépítése, a korábban már említett speciális szerkezeti egységek, különleges mechanikai tulajdonságok megjelenését eredményezik, megteremtik egy, a motor molekulától (prestín) független, az oldalfal merevségét befolyásoló rendszer működésének szerkezeti alapját és lehetővé teszik, hogy mechanikai szabályozás alatt tartsa a külső szőrsejtek cochlearis erősítő működését.

A sejtfa merevségének megváltozásával módosul a motor fehérjék erőátviteli hatékonysága. Mivel a motor fehérjék a sejtfa által közvetített mechanikai ellenállással szemben dolgoznak, az oldalfal merevség szabályozása képes befolyásolni a külső szőrsejtek

elektromotilitását. Ebben feltehetően a plasma membrán citoplasmatiskus felszínéhez és a felszín alatti cisternalis rendszerhez szorosan kötődő subcorticalis rácsozat alkotóelemeiből felépülő microdoménok játsszák a legfontosabb szerepet. A sejtmembránban lévő ezen egységek sajátos szerkezete teremti meg annak a lehetőségét, hogy az egymástól függetlenül aktiválódó elemi, feszültség függő motor fehérjék alakváltozása összegződhessen és hosszirányú sejtmozgássá alakulhasson át. A fenti felépítésű citoszketalis rendszer teszi lehetővé a rugalmas előfeszített állapot fenntartását, mely a szőrsejtek nyugalmi, mechanikai ellenállását biztosítja és cilindrikus alakját fenntartja. A külső szőrsejtek motoros aktivitásának hatékonysága és ezáltal a cochlearis erősítés mértéke tehát a külső szőrsejtek hosszanti és körkörös irányú merevségével, ill. az egész sejt merevségét elsősorban befolyásoló oldalfal merevséggel áll szoros összefüggésben.

A lassú motilis sejtválasz megváltoztatja a Corti szerv geometriáját, ill. a cochlea mikromechanikai sajátságait, ami az erősítési folyamat hatékonyságának módosulásához vezet. Túl erős hangok esetén feltehetően ez védi a Corti-szervet a károsodástól. A reverzibilis lassú motilis sejtválasz és következményes oldalfal merevség változás sejtszintű mechanizmusának alapjai még kevésbé ismertek. Mindeddig nincs kísérletes bizonyíték a lassú motilis sejtválasz mértéke, az oldalfal merevsége és a gyors motilis válasz nagysága között.

Célkitűzések

1. Emlős cochleából származó izolált külső szőrsejtek mechanikai (túlzott hangerő modellezése) és kémiai (K^+ intoxikáció: Menière-betegség) hatásra bekövetkező lassú motilis válaszánaak összehasonlító vizsgálata.
2. A külső szőrsejt lassú motilitás sejtoldalfal merevségre gyakorolt hatásának vizsgálata.
3. A külső szőrsejtek lassú motilis válasza során bekövetkező sejtössz változás hatásának vizsgálata az elektromotilis válasz karakterisztikájára.
4. A foszforiláció szerepének vizsgálata a külső szőrsejtek oldalfal merevség szabályozásában.
5. Összefüggés vizsgálata a külső szőrsejtek mechanikai és kémiai hatásra bekövetkező reverzibilis lassú motilis válasz mértéke, az oldalfal merevsége és az elektromotilis válasz nagysága között.

Anyagok és módszerek

Sejtelőkészítés

A kísérletekhez 3-5 hetes, pigmentált, ép Preyer-reflexű, i.p. penthobarbitallal túllaltatott tengeri malacokat használtunk. Decapitálás és a bulla ossea eltávolítása után mikroszkóp alatt, folyadékfürdőben a Corti-szerv kanyarulatait eltávolítottuk. Kollagenáz-emésztést (IV. típus, 1 mg/ml, Sigma) alkalmaztunk, szobahőmérsékleten. A Corti-szerv darabjait 400 µl Hank oldatot tartalmazó kísérleti kamrába helyeztük, majd ezt követően a külső szőrsejtek finom mechanikai behatással leválaszthatóvá, izolálhatóvá váltak. A sejtek 74 ± 4 µm átlagos sejthosszal (n = 92) rendelkeztek, inkubáló oldatnak Hank oldatot használtuk (mM-ban): 136,75 NaCl, 5,36 KCl, 0,44 KH₂PO₄, 0,34 Na₂HPO₄, 1,26 CaCl₂, 0,81 MgSO₄, 5,56 glükóz, 4,17 NaHCO₃, 10 HEPES (300 mOsm/l, pH 7,4).

A sejtek életképességére felvilágosítást nyújtó élettani válaszok, de általában a következő kritériumok alapján tekintettünk egy sejtet vizsgálatra alkalmasnak:

- 1.) a sejtmag normális pozíciója (basalis);
- 2.) feszes, elongált sejtalak (jó turgor);
- 3.) fénymikroszkóposan intakt sztereocilium csokor;
- 4.) citoplazmatikus Brown-mozgás hiánya.

A sejtek általában 2 óra hosszat képesek tartani ezeket a feltételeket.

A külső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata, a kétféle motilis tevékenység és az oldalfal merevség mérése

A méréseket Hank oldattal töltött, az izolált külső szőrsejteket tartalmazó kísérleti kamrában (400 µl) végeztük, Zeiss Axiovert 100 inverz, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, 400x nagyítást alkalmazva. A teljes mérőrendszer egy vibráció-izolált asztalra volt erősítve (Newport VH 3660W-OPT) és Faraday ketreccel volt körülvéve. A sejtek motilis válaszait oszcilloszkópon rögzítettük, a rögzített képeket digitalizáltuk. Az oldalfal merevség méréséhez a sejtek fáziskontraszt képeit digitálisan rögzítettük, majd a jobb láthatóság elérése érdekében pszeudokolor átalakítást végeztünk.

Az alkalmazott technikai eszközök és programok

Az izolált külső szőrsejtek lassú és elektromotilitásának méréséhez mikrokamrában rögzített sejt ciliáris pólusának nagyított képét egy keskeny résen keresztül PIN-10D fotodiódára vetítettük és az elmozdulás által keltett fotoáram változást erősítés, szűrés után Tectronix TDS 220 oszcilloszkóppal rögzítettük. Az oszcilloszkópon rögzített fotoáram válaszok PC-n történő digitalizálásához a Tectronix saját szoftverét használtuk (WaveStar for Oscilloscopes, 2.6. verzió). A fotodióda detektor és erősítő együttes un „cut-off” (törési pont) felülvágó frekvenciája 1 kHz, csökkenése 6 dB / oktáv.

A lassú motilis sejtválasz előidézésére a Farkas és Sziklai (2003) által leírt mikro-áramlási módszert alkalmaztuk.

A sejtek elektromotilitásához az ingerlő feszültséget számítógép vezérelt elektromos négyszög impulzus sorozatokkal keltettük (IBM AT clone). A négyszög impulzusok, egymást követően ellenkező polaritásúak voltak (hyperpolarizáló és depolarizáló) és 7 impulzus párból álltak.

A külső szőrsejtek oldalfal merevségét aspirációs mikrodeformációs technikával vizsgáltuk. A sejtek mikroszkóppal nagyított, fáziskontraszt képeit Sony DXC-107P videokamerán keresztül PC-hez csatolt külső digitalizáló kártya (Pinnacle Systems, INC. USA, California) segítségével rögzítettük, majd digitális tisztítás, zajmentesítés után egyedi fejlesztésű programokkal pszeudokolor átalakítást végeztünk.

A digitalizáláshoz és adatelemzéshez használt számítógép 2,6 GHz Intel Celeron processzort, 256 MB RAM-ot, ATI Mobility Radeon 9600 videokártyát és 30GB IDE HDD-t tartalmazott.

A külső szőrsejt lassú motilis válaszának mérése

Az izolált külső szőrsejteket tartalmazó, Hank oldattal töltött kísérleti kamrát mikroszkóp állványra helyeztük. A vizsgálandó külső szőrsejtet a szinaptikus pólusánál fogva $\sim 9 \mu\text{m}$ belső átmérőjű üveg mikrokapillárisba szívtuk úgy, hogy a sejtmag még éppen a kapillárison belül helyezkedett el (a sejthossz kb. 10%-a, mintegy $6\text{-}8 \mu\text{m}$). A mérésekhez használt mikrokapillárisokat Clark EC 15 TF üveg kapillárisból készítettük, 2 lépcsős formálási programmal. Hőkezeléssel lesimítottuk és úgy képeztük ki a hegyét, hogy csak a legvégének a belső átmérője egyezzen meg a szőrsejtek külső átmérőjével, belseje hirtelen kiszélesedjen. A beszívott sejt ezáltal csak vékony keresztmetszeten, mégis mechanikailag stabilan rögzült a

mikrokapillárisban, ugyanakkor mind a kapillárison belüli, mind azon kívüli része szabadon mozoghatott.

A külső szőrsejtek motilis válaszána (rövidülés, megnyúlás) mérése a következéppen történt: a mikrokapillárisban rögzített sejt ciliáris pólusának nagyított képét egy keskeny, téglalap alakú résen keresztül PIN-10D fotodiódára vetítettük és az elmozdulás által keltett fotoáram változást mértük. A sejt hosszirányú kis mozgásai (nm nagyságrend) a rés elsötétített részét megváltoztatták és így modulálták a fotodiódából származó fotoáramot. A sejt képe a mikrokamrába való beszívás és a mérési folyamatok alatt monitorra volt vetítve, a sejt pozícióját a résben szintén monitorizáltuk (2 videokamerás sejt monitorizálás).

A hosszváltozás során bekövetkező fotoáram választ minden mérés előtt manuálisan működtethető léptetőmotorral forgatott optikai eszközzel kalibráltuk (1,8° lépés, mely a számítás alapján ~200 nm elmozdulásnak felelt meg), erősítés, szűrés után a fotoáram változásokat oszcilloszkóppal rögzítettük. A fotoáram válaszokat PC-n digitalizáltuk.

A külső szőrsejtek mikrokapillárison kívül eső részének motilis válaszait mértük. A lassú motilis sejtválasz előidézésére a Farkas és Sziklai (2003) által leírt mikro-áramlási módszert alkalmaztuk. A perfúziós pipettákat Clark EC 15TF üveg-kapillárisból készítettük 2 lépcsős formálási programmal, ~50 μm belső átmérővel. A pipettát műanyag cső segítségével polietilén csapon keresztül egy 2 cm^3 térfogatú nyitott műanyag tartályhoz csatoltuk, melynek folyadékszintjét a mérésekhez használt 400 μl térfogatú kísérleti kamra folyadékszintjére egyenlítettük ki úgy, hogy a perfúziós pipettában sem befelé, sem kifelé irányuló áramlás ne legyen. Az egyensúlyi folyadékszint beállítása a duplatartályos kísérleti kamra második medencéjében történt. A perfúziós pipetta szájadéka a sejtől ~150 μm -re helyezkedett el, szájadékának alsó széle a folyadékkamra aljához támaszkodott, a sejt hossz tengelyével párhuzamosan, annak mintegy folytatásaként.

A lassú motilis sejtválaszt 0,6 μl /perc sebességgel áramló extracelluláris folyadékkal (Hank oldat) ($n = 9$) (mechanikai ingerlés), vagy 12,5 mM KCl oldattal ($n = 9$) (mechanikai + kémiai ingerlés) váltottuk ki. Az előzetes vizsgálatokból kiderült, hogy a motilis válasz mértéke egyenesen arányos a perfúzió gyorsaságával. Azért választottuk ezt az áramlási sebességet, mert az előzetes vizsgálatok során az általa kiváltott lassú motilis sejtválasz mértéke (< 1,5 μm) a fiziológiai tartományon belül maradt. Mindkét folyadék áramoltatása 90 másodpercig tartott, a nem szelektív serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6 $\mu\text{M/l}$) és jelenléte nélkül ($n = 9$, minden kísérletnél). A külső szőrsejtek okadainsavval való kezeléséhez 30 perces inkubációt alkalmaztunk, a kísérletek megkezdése előtt. A lassú motilis sejtválaszt 225 másodpercen keresztül folyamatosan rögzítettük.

A kísérlet indítását követően 45 másodperccel kezdődött a folyadék áramlása, ami 90 másodpercig tartott. Ezt áramlás nélküli 90 másodperces nyugalmi (megnyúlási) periódus követte.

A külső szőrsejt elektromotilitás mérése

Az izolált külső szőrsejtek elektromotilitását az elektromos négyszög impulzusokkal keltett ingerlő feszültségre adott motilis válaszok mérésével végeztük. Az elektromotilis válaszok nagyságát a mechanikai (külső oldat áramlás) és kémiai ingerlés (12,5 mM KCl oldat perfúzió) hatásra, a nem szelektív serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6 μ M/l) és jelenléte nélkül ($n = 9$, minden kísérletnél) bekövetkező lassú motilis sejtválasz (rövidülés) és visszatérési periódus (megnyúlás) során egyaránt mértük. Minden kísérlet során az áramlás megkezdése előtt (20 s), a perfúzió okozta lassú motilis sejtválasz (rövidülés) alatt (60-120 s) és a visszatérési fázisban (megnyúlás) (150-170 s), az alábbi időpontokban történtek a mérések: 20, 60, 80, 120, 150 és 170 másodperc.

Az izolált külső szőrsejteket tartalmazó, extracelluláris oldattal töltött kísérleti kamrát mikroszkóp állványra helyeztük, majd elkezdtük a lassú motilis sejtválasz mérésénél alkalmazott kísérleti protokollt. Az elektromotilitás mérését, a lassú motilitási folyamat közben, a fentebb megadott időpontokban végeztük. Az ingerlő feszültséget ± 35 mV-tól ± 240 mV-ig, 7 lépésben egyenletesen emelkedő, váltakozó polaritású, számítógép vezérelt elektromos négyszög impulzusokkal keltettük, az egyes impulzusok időtartama 24 msec, két impulzus közti szünet 60 msec.

A transzcelluláris elektromos ingerlés a pipettán belüli, valamint a pipettán kívüli inkubáló oldat között létesült. Az ingerlő feszültséget egy áram-feszültség konverter biztosította, hullámformáját, szinkronizálását és intenzitását számítógép kontrollálta.

A külső szőrsejtek mikrokapillárison kívül eső részének motilis válaszait mértük. Minden stimulus sorozat indítása előtt elvégeztük a fotoáram válasz már korábban ismertetett kalibrálását.

A külső szőrsejtek, elektromotilitásuk révén, a kulcselemei a cochlearis erősítőnek. Funkciójukat, érzékenységüket és motoros teljesítő képességüket hűen mutatják elektromotilis tulajdonságaik. Ezért az elektromotilis válaszok nagyságának változásából a cochlearis erősítés mértékére lehet következtetni: 1.) a motilis válasz nagyságának csökkenése megfeleltethető in vivo percepció nagyothallásnak, vagy protektív automatizmusnak; 2.) a motilis válasz nagyságának növekedése a hallás küszöbérzékenységének fiziológias finom beállításáért felelős mechanizmus részét képezheti.

A külső szőrsejt oldalfal merevség vizsgálata

Az oldalfal merevségét aspirációs mikrodeformációs technikával vizsgáltuk. Ezzel az eljárással a sejtfa hízóerővel szembeni deformálódását mérjük. A sejt oldalfalára mikropipettán keresztül ismert (az oldalfal három rétegű struktúrájának intaktságát megtartó 4-10 H₂O cm közötti) negatív nyomást alkalmaztunk. A sejtfa merevségét a sejtfa pipettába való behúzódnak mértékéből állapítjuk meg. A mikrodeformáció meghatározását a külső szőrsejtekről készült felvételek vizuális elemzése teszi lehetővé. Megfelelően pontos mérésekhez kellő nagyítás, megfelelő felbontás és a háttértől jól elkülönülő kontrasztos sejtfa szükséges.

A külső szőrsejtek oldalfal merevségét a lassú motilis sejtfa (rövidülés) és visszatérési periódus (megnyúlás) során vizsgáltuk, melyet mechanikai (külső oldat áramlás) és kémiai (12,5 mM KCl oldat perfúzió) hatással váltottunk ki. Nem szelektív serin/threonin proteín foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6 µM/l) (n = 5, minden kísérletnél) is elvégeztük a kísérleteket.

Az aspirációs üvegpipetta Clarc EC 15 TF üvegapillárisból készült, 5 lépcsős programmal. Belső átmérője 2,8 ±0,2 µm volt. A mikropipettát Hank oldattal töltöttük fel. A megfelelő negatív nyomás beállításához a pipettát egy vékony műanyag csővel folyadékoszlopos manométerhez csatlakoztattuk és 6 H₂O cm-s negatív nyomás mellett mértük az oldalfal behúzódnak. A méréseket 400 µl fízológias extracelluláris folyadékot tartalmazó műanyag kísérleti kamrában, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, 400x-os nagyítást alkalmazva végeztük. A mechanikai és kémiai hatásra bekövetkező lassú motilis sejtfa meghatározott időpontjaiban a külső szőrsejtek oldalfalához illesztett mikropipettára kapcsolt negatív nyomás következtében a pipettába 30 másodperc alatt behúzódnak oldalfal részlet hosszúságát mértük. A külső szőrsejtek mikroszkóppal nagyított, fáziskontraszt képeit CCD videokamerán keresztül PC-hez csatolt külső digitalizáló kártya segítségével rögzítettük, majd digitális tisztítás, zajmentesítés után pszeudokolor átalakítással tettük jobban láthatóvá.

A pszeudokolor átalakításhoz egyedi fejlesztésű, Turbo Pascal programnyelven írt programokat használtunk. A mikroszkópos kép digitalizálása után a különböző optikai sűrűségű sejtfa partikulumok különböző szürkeárnyalatos képpontként ábrázolódnak. Az így digitalizált képek bittérképes (bmp) képpont információi mátrix formába való rendezése után alkalmassá váltak különböző algoritmusok szerinti számítógépes feldolgozásra. A kiválasztott algoritmusok által átalakított képpont információkhoz a standard VGA színskála színeit hozzárendelve, valamint kontrasztkiemelést és digitális képkivonást is alkalmazva nyertük a

pszeudokolor képeket. Az így nyert kontrasztos képeken 18 képpont / μm képfelbontást jött létre. Ezt követően az oldalfal merevségi mutatóját (S_p) az alábbi összefüggés alapján határoztuk meg:

$$S_p = \frac{-\Delta P \cdot r^2 \cdot \pi}{\Delta L} \quad (1)$$

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.

Matematikai módszerek, statisztikai analízis

A külső szőrsejtek oldalfal merevségének számításához a korábban sokak által használt un. kupolamodell helyett az Euler modellt használtuk. A kupolamodell azon alapszik, hogy a sejtfal a mikropipettán keresztül alkalmazott szívóerő hatására a pipetta szájadékának megfelelő átmérőjű kupolát formálva türemkedik be. Ez a modell a kis alakváltozással járó esetekben tökéletes leírást ad az alakváltozásra, azonban vizsgálataink során a külső szőrsejtek oldalfala alakváltozásának mértéke indokoltá tette az ettől a modelltől való eltérést. Méréseink során a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza a kupolaképződés nagyságát lényegesen meghaladta ($\sim 10x$), ennek megfelelően az oldalfal behúzódás mértékének meghatározása során olyan mérési eljárást alkalmaztunk, mely alkalmas volt a kupolaképződés jelenségének korrigálására. Mivel a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet az alkalmazott negatív nyomásérték mellett a mikrodeformáción kívül más változást nem szenved (pl.: az oldalfal alkotóelemeinek szétválása vagy vakuolum képződés), az alakváltozás alapján meghatározható merevségi mutató a teljes, mikropipettába behúzódó sejtrészlet kumulatív, átlagos merevségi mutatója lesz. Ennek megfelelően a mikropipettában létrejövő alakváltozás jó közelítéssel modellezhető egy homogén, hengeres rúd rugalmas alakváltozásaként (1. egyenlet).

A külső szőrsejtek merevségfüggő elektromotilitás változásának leírásához egy módosított találatelméleti modellt alkalmaztunk. Ennek során feltételeztük, hogy a külső szőrsejtek elektromotilitása két részből tevődik össze: egy oldalfal merevség által szabályozott és egy, az oldalfal merevség szabályozása alatt nem álló részből. Az oldalfal merevség szabályozó hatása az elektromotilitásra modellünkben úgy valósul meg, hogy az oldalfal merevség fokozódása az elektromotilis egységek elsőrendű kinetika szerinti egyirányú, látszólagos inaktivációját hozza létre. A látszólagos inaktiváció modellünkben nem az elektromotilis

egységek struktúrális destrukciójából eredő funkciókiesést, hanem az oldalfal merevség fokozódás által létrehozott funkcionális inaktiválódást jelenti (2. egyenlet).

A kísérletek során észlelt eltérések szignifikancia vizsgálata a Student-féle kétmintás t-próbával történt. A megadott szórás értékek SD-t jelentenek.

Eredmények

A külső szőrsejtek mechanikai és kémiai ingerlésre bekövetkező lassú motilis válasza

A külső szőrsejtek lassú motilis válaszát mind mechanikai, mind kémiai ingerléssel egyaránt vizsgáltuk. Mechanikai ingerlés hatására (extracelluláris folyadék alacsony, 0,6 μ l/perc sebességű áramoltatása a kísérleti kamrába) jól mérhető, reverzibilis, lassú motilis sejtválasz (rövidülés) lépett fel. A sejtrövidülés a maximumát \sim 75 másodperccel az áramlás megkezdését követően érte el (774 ± 87 nm) ($n = 9$), további sejtösszehúzódást nem észleltünk. Az áramlás felfüggesztése után a sejtek megnyúltak, hosszuk megközelítően visszatért a kiindulási értékre.

Kémiai ingerlés során (12,5 mM KCl oldat azonos sebességű áramoltatására) gyorsabb lefolyású és nagyobb mértékű, közel kétszer akkora lassú motilis sejtválasz alakult ki (1465 ± 159 nm) ($n = 9$), mint mechanikai ingerlés hatására. A maximális lassú motilis sejtválasz ebben az esetben is \sim 75 másodperccel az áramlás megkezdését követően alakult ki, mely a folyadékáramlás befejezéséig már nem fokozódott. Az áramlás felfüggesztése után a sejtösszeg megközelítően visszatért a kiindulási értékre.

A külső szőrsejtek nem specifikus serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsavban történő 30 perces előinkubációját követően sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerléssel nem volt kiváltható lassú motilis sejtválasz. A nyugalmi sejtösszeg az áramlás során végig változatlan maradt.

A külső szőrsejtek oldalfal merevségének változása a lassú motilis válasz során

A külső szőrsejtek oldalfal merevségét a lassú motilis sejtválasz különböző szakaszaiban, a fent ismertetett időpontokban mértük. Az oldalfal merevség nyugalmi értéke $1,25 \pm 0,03$ nN/ μ m volt. Extracelluláris folyadék perfúziójával kiváltott mechanikai ingerlés kisebb oldalfal merevség fokozódást eredményezett ($1,39 \pm 0,03$ nN/ μ m), mint a 12,5 mM KCl oldat

áramoltatása ($1,52 \pm 0,03$ nN/ μ m). Mindkét ingerlés során, az áramlás felfüggesztése után 35 másodperccel (a kísérlet 170. másodpercében), az oldalfal merevség gyakorlatilag visszatért a kiindulási értékre. Úgy tűnik, hogy az oldalfal merevség fokozódásának mértéke a lassú motilis sejtválasz nagyságával arányos és független a motilis sejtválaszt kiváltó ingerlés – mechanikai vagy kémiai – módjától. Okadainsavval történt 30 perces előinkubációt követően az oldalfal merevség kiindulási értéke jelentősen emelkedett anélkül, hogy a sejt hossza megváltozott volna ($1,52 \pm 0,04$ nN/ μ m). Sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerlés nem fokozta tovább az oldalfal merevséget.

A külső szőrsejtek lassú motilis válaszáinak hatása az elektromotilitásra

Az elektromotilis aktivitás nagyságának mérése a lassú motilis sejtválasz különböző stádiumaiban, szintén a korábban már ismertetett meghatározott időpontokban történt. Függetlenül a lassú motilis sejtválaszt kiváltó ingerlés formájától - mechanikai vagy mechanikai + kémiai - az elektromotilis válasz nagysága kizárólag a lassú motilis sejtválasz okozta oldalfal merevség változástól függ. Minél kifejezettebb a lassú motilis sejtválasz hatására fellépő oldalfal merevség fokozódás, annál kisebb az elektromotilis válasz nagysága, mind az alacsony (± 35 mV), mind a maximális (± 240 mV) ingerlő feszültség esetén. Az elektromotilis válasz nagysága és a külső szőrsejtek hossza közötti összefüggés független attól, hogy a sejt a rövidülés vagy a visszatérés (megnyúlás) fázisában van-e. Az alacsony és maximális ingerlő feszültségre kapott elektromotilis válaszok karakterisztikája hasonló.

Okadainsav hatása a külső szőrsejtek motilis működésére, oldalfal merevségére

A nem specifikus serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerléssel nem váltható ki lassú motilis sejtválasz. Az okadainsavval történt előkezelést követően, az ingerlések megkezdése előtt, az oldalfal merevség fokozódását és az elektromotilitás nagyságának csökkenését észleltük. Az okadainsav felfüggeszti a mechanikai vagy kémiai ingerlés hatására a külső szőrsejtek lassú motilitásában, oldalfal merevségében és elektromotilitásában bekövetkező változásokat.

Megbeszélés

Küszöb körüli erősségű hangok érzékelésében kulcsszerepet játszik a külső szőrsejtek által létrehozott elektromotilis energia-visszacsatolási mechanizmus, az un. cochlearis erősítés, amely az emlős fül sajátja. Kísérleteinkben a külső szőrsejtekre jellemző három, egymással összefüggő sejtválaszt vizsgáltunk, hogy jobban megértsük azokat a hatásokat és mechanizmusokat, melyek a cochlearis erősítés (külső szőrsejt elektromotilitás) hatékonyságát szabályozzák fiziológias és patológias körülmények között. Az izolált külső szőrsejtek motoros aktivitásával összefüggő jellemző válaszoknak a következők bizonyultak: (i) kiváltható lassú motilis sejt rövidülés, (ii) ezzel arányos oldalfal merevség fokozódás (iii) és következményes elektromotilis válasz nagyság csökkenés.

Lassú motilis sejt válasz mechanikai és kémiai hatással is kiváltható. Az emlős cochleából származó külső szőrsejtekben ez a sejt rövidülés elérheti az $1,5 \mu\text{m}$ -t (a sejthossz $\sim 2\%$ -a). Ez jelentős módosulást okozhat a Corti-szerv geometriájában, mely megváltoztatja a hangingerre adott mikromechanikai válaszkészségét. A $0,6 \mu\text{l/perc}$ (10 nl/s) mértékű extracelluláris oldat áramlása hasonló ahhoz, mint amekkora nyomáskülönbség változás a haladó hullám révén a membrana basilarison kialakul. Ez a perfúzió $5 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ sebességű áramlást okoz a perfúziós pipettával szemben lévő sejt felszínen és $2,8 \pm 0,22 \mu\text{m/s}$ sebességűt a sejt ellentétes oldalán (az áramlási sebesség mérése az áramlásban tovasodró apró részecskék mikroszkóp alatti követésével történt). A Bernoulli törvényt alapul véve:

$$\Delta P = \frac{1}{2} \rho (v_1^2 - v_2^2),$$

ahol ΔP az a nyomás, ami a perfúziós pipettával szemben lévő sejt felszínen fellép, ρ a sűrűség, v_1 és v_2 a sejt két ellentétes pólusán mért folyadék áramlási sebesség. Kísérletünkben a sejt felszínen kialakuló nyomás (ΔP) $8,4 \times 10^{-9} \text{ N/m}^2$ volt. Ez az érték hasonló nagyságrendű, mint amekkora nyomáskülönbség egyetlen külső szőrsejt átmérőjének távolságán a haladó hullám révén kialakul ($\Delta P = 2,46 \times 10^{-9} \text{ N/m}^2$).

Enyhe mechanikai ingerlésre a külső szőrsejtek lassú motilis válasza valószínűleg a feszülés-aktivált („stretch-gated”) receptorok megnyílásától és a sztereocilium-csokor mozgásától jön létre. A sejt izolálási technika során a preparátumunkban feltehetően szabaddá válik a sztereocilium-csokor tektoriális vége és károsodnak a csúcsi összeköttetések („tip-links”), vagyis a transzdukciós csatornák. Az izolált külső szőrsejtek szabadon álló sztereociliumain a perfúzió okozta mechanikai ingerlés hatására kialakuló mozgás mechano-szenzitív csatornákat nyit meg és kation-beáramlás jön létre. Mind a lateralis plasma

membránban lévő feszülés-aktivált receptorok, mind a sztereociliumok mechano-receptorai Ca^{2+} -áteresztők. Az intracelluláris kalcium koncentráció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedése foszforilációs és defoszforilációs jelpályákat aktivál. A fentiek következtében a kortikális citoszkeleton aktin-spektrin rácsrendszerben létrejövő változások vezethetnek a külső szőrsejtek összehúzódásához.

A mechanikai ingerlésre bekövetkező lassú motilis sejtválasz mértéke tovább emelkedett a perfúziós oldat K^+ koncentrációjának 12,5 mM-ra történt növelésekor. Mind a mechanikai, mind a kémiai ingerlésre fellépő lassú motilis sejtválasz megakadályozható a külső szőrsejtek okadainsavval történt előkezelésével. A mechanikai ingerlés okozta lassú motilis sejtválasz nagyságát megduplázó K^+ hatása csak részben magyarázható az intracelluláris Ca^{2+} emelkedésével, ugyanis kalcium-mentes külső oldatban is képesek a sejtek lassú összehúzódásra. Ezek a bizonyítékok kétféle mechanizmust valószínűsítenek a lassú motilis sejtválasz kialakulásában. Az egyik kalcium-függő, a másik, amely protein foszfatáz-gátlóval megakadályozható, foszforiláció/defoszforiláció-függő.

A külső szőrsejtekben kiváltott reverzibilis lassú motilis válasz az oldalfal merevség fokozódását eredményezi. A kísérleteink során mért 1,25 nN/ μm oldalfal merevség érték nagyságrendje megegyezik más kutatók által mért értékekkel (0,8 és 3,3 nN/ μm). Az oldalfal merevség fokozódása független az ingerlés (mechanikai vagy kémiai) módjától. Minél kifejezettebb a lassú motilis sejtválasz, annál jobban fokozódik az oldalfal merevsége. Megközelítően kétszer akkora lassú motilis sejtválaszt okoz a mechanikai + kémiai ingerlés, mint a mechanikai ingerlés önmagában. Ezzel egyidejűleg az oldalfal merevség fokozódása lineáris. A K^+ -indukálta (mechanikai + kémiai ingerlés) oldalfal merevség fokozódás kétszer akkora, mint a perfúzió (mechanikai ingerlés) által kiváltott oldalfal merevség fokozódás.

Az elektromotilis válasz nagysága inverz összefüggésben van az oldalfal merevség fokozódásával. Tekintve, hogy a külső szőrsejt feszültség osztóként működik, az elektromos impulzus nagyságát és az extrúziós faktort¹ ($q = 0,9$) figyelembe véve az ingerlő potenciál a négyszög impulzus 1/10-e. A legkisebb inger ($\pm 35\text{mV}$) esetén ez 3,5 mV, amely a küszöb körüli erősségű hangok által kiváltott receptor potenciál nagyságához közel álló érték. A maximálisan alkalmazott $\pm 240\text{mV}$ négyszög impulzus erősség (24 mV a sejt-membránon) már az elektromotilis válasz-nagyság szaturációs tartományba eső mértékének felel meg. Ezek az értékek a receptor áram keltette membrán feszültség változás fiziológiai tartományában vannak.

¹ Kifejezi, hogy a külső szőrsejt mekkora szegmense van behúzva a mikrokamrába: $q=0.9$ azt jelenti, hogy a sejtnek 10%-a van a mikrokamrán belül.

Az oldalfal merevség emelkedése következtében a prestin molekulák konformáció változása ellen ható mechanikai terhelés megnövekszik, ezáltal az elektromotilis válasz nagysága csökken. Mivel nem találtunk különbséget a mechanikai vagy mechanikai + kémiai ingerlés hatására kialakuló oldalfal merevség fokozódás okozta elektromotilis válasz nagyságának csökkenését ábrázoló görbék karakterisztikája között, ezért feltételezhető, hogy a külső szőrsejtek rövidüléséért felelős molekuláris mechanizmusok alapját vagy egymás mellett működő, vagy egymás hatását fokozó (egyik mechanikai, másik kémiai ingerlésre bekövetkező) folyamatsor képezi. A küszöb erősségű hangot reprezentáló legalacsonyabb (± 35 mV) ingerlő feszültségnél, egy meghatározott mértékű (a sejthossz $\sim 1\%$ -a) sejtrövidülés és oldalfal merevség fokozódás ($\sim 10\%$ -os) után, az elektromotilitás nagyságának csökkenése nem folytatódik tovább, telítődést mutat, ami már mechanikai ingerlésre is kialakul. Az elektromotilis válasz és ezáltal a cochlearis erősítés nagysága, a lassú motilis sejtválasz mértékével arányos oldalfal merevségtől függ. Ez a szabályozási mechanizmus befolyásolni tudja a cochlearis erősítés mértékét az energia visszacsatolás megfelelően alacsony szintre történő csökkentésével, ami kb. $1/3$ -a a kontroll érték nagyságának. Az elektromotilitás nagyságának egyik szabályozó tényezője, a sejtfa merevségének változása. Ha a külső szőrsejtek falának merevsége egy bizonyos szintre nő, akkor nem tud kialakulni a prestin molekulák feszültség-függő konformáció változásának sejtszintű összegződése, ill. jelen mérés technikával nem is detektálhatóan kicsiny. A sejtfa merevség-függő elektromotilitás csökkenés egy módosított találat elméleti modellel írható le. A lassú motilis sejtválasz a külső szőrsejt hossz tengelye mentén meglévő sejtfa merevség különbségek miatt különböző merevség változásokat hoz létre a különböző sejt szegmenseknek megfelelően. A prestin molekulák folyamatos „kvázi inaktiválódása” ennek a lassú motilis sejtválasz nyomán kialakuló inhomogén merevség fokozódásnak a következménye. A „kvázi inaktiválódás” nem azt jelenti, hogy a prestin molekulák ténylegesen inaktiválódnak, csak nagyobb mechanikai terhelés ellen dolgoznak, ill. az is lehet, hogy a prestin működik, csak a sejtszintű összehangolás nem jön létre.

A modell a következő:

$$y = y_0 + a \cdot e^{-bx} - c \cdot x \quad (2)$$

ahol y az elektromotilitás nagysága, y_0 az elektromotilitás nem szabályozott nagysága, a az elektromotilitás szabályozott, alap nagysága, b a kvázi inaktiválódási együttható, c az elektromotilitás merevség-függő állandója, x a külső szőrsejtek oldalfal merevsége, e pedig a természetes szám.

Lassú motilis sejtválasz nélkül is kialakulhat az oldalfal merevség fokozódása, ami az elektromotilis válasz nagyságának csökkenését okozza, hasonlóan a lassú motilis sejtválasz által kiváltott sejtfa merevség fokozódáshoz. Ez a jelenség volt megfigyelhető a külső szőrsejtek okadainsavval történt előkezelését követően.

Az okadainsav, az alkalmazott koncentrációban (0,6 $\mu\text{M/l}$), mind a serin/threonin protein foszfatáz 1 (PP1), mind a serin/threonin protein foszfatáz 2A (PP2A) működését gátolja. A tyrosin foszforilált fehérjékre kifejtett foszfatáz-gátló hatása azonban elhanyagolható. Ebből következően úgy tűnik, hogy a serin/threonin foszforilált fehérjék játsszák a főszerepet a külső szőrsejtek lassú motilis válaszát előidéző folyamatokban.

Kalcium-függő foszforiláció tételezhető fel az acetilcholin (ACh) hatására fellépő elektromotilis válasz nagyságának emelkedését kiváltó folyamatban. Míg a lassú motilis sejtválasz oldalfal merevség fokozódással jár, addig az ACh oldalfal merevség csökkenést okoz. Az általunk észlelt jelenség, miszerint az okadainsav blokkolja a lassú motilis sejtválasz folyamatát, fokozza az oldalfal merevségét és ennek következtében csökkenti az elektromotilitás nagyságát, bizonyos fehérjék foszforilációs fokának növelése révén, látszólag ellentétben áll azzal, hogy az ACh oldalfal merevség csökkenést okoz és áttételesen - Ca^{2+} jelpályák aktiválódása révén - esetleg ugyanazon citoskeletális fehérjemolekulák foszforilációjával.

Egy elképzelhető magyarázat a foszforiláció által indukált oldalfal merevség fokozódására vagy csökkenésére, hogy feltételezhetően léteznek különböző jelpályákon végbemenő protein kináz és foszfatáz aktiválási regulációs folyamatok. Az okadainsav, a fenti koncentrációban, nem blokkolja a PP1 révén a RhoA defoszforilációját. A foszforilált RhoA nem gátolja a Rac-1 működését, ami következésképpen csökkenti az elektromotilis válasz nagyságát, sejtrövidülést okoz és valószínűleg fokozza az oldalfal-merevséget. Az ilyenkor mért elektromotilitás-csökkenés mintegy 40% körüli, ami nagyon hasonló ahhoz az értékhez, amit okadainsavval történt előkezelés után mértünk. Ezzel ellentétben, ACh hatására az összehúzódott sejt visszanyeri eredeti hosszát, csökken az oldalfal merevsége és nő az elektromotilis válasz nagysága. A protein foszforiláció képes meghatározni a kortikális citoskeletonban lévő aktin-spektrin rácsozat rövidülésének mértékét, ami egy adott arányú oldalfal merevség növekedés/csökkenés kialakulását eredményezi. Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy meghatározott citoskeletális proteinek foszforilációja oldalfal merevség csökkenést okoz sejtrövidülés nélkül, ezzel ellentétben a Rac-1 útján aktivált Rho-kinázok (foszforiláció) hatására oldalfal merevség fokozódás jön létre.

Meglehetősen magas a külső szőrsejtek mechanikus ingerekkel szembeni érzékenysége, ami fontos lokális visszacsatolási szabályozásra utal, mind a hangérzékelésben, mind a Corti-szerv hangártalommal szembeni védelmében. Ez az érzékenység teszi lehetővé, hogy mechanikai (pl. túlzott hangerő) és kémiai (K^+ -intoxikáció; pl. Menière-betegség) ingerlésre, a tónusos sejthossz változás révén, mikromechanikai változások lépjenek fel a Corti-szervben. Az ingerlésre fellépő lassú motilis sejtválasz, fokozva az oldalfal merevséget, kevésbé hatékony elektromotilis energia-visszacsatolást eredményez a membrana basilarisra, aminek következtében csökken a perifériás hangerősítés mértéke. Túl erős hangok esetén feltehetően a fenti folyamatok védik a Corti-szervet a károsodástól.

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Electromotile performance of isolated outer hair cells during slow motile shortening. *Acta Otolaryngol* 125(5), 547-551, 2005. [IF.: 0,79]
2. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Slow motility, electromotility and lateral wall stiffness in the isolated outer hair cells. *Hear Res* 207(1-2), 68-75, 2005. [IF.: 1,67]
3. Sziklai I., Borkó R., Batta J.T. Potassium induced slow and fast motility changes in isolated outer hair cells of the guinea pig. *Proceedings of the 5th International Symposium, Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders* 162-164, 2005.
4. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. A lassú motilitás okozta oldalfal merevség fokozódás hatása az elektromotilitásra izolált külső szőrsejtekből. *Fül-Orr-Gégegyógyászat* 52(2), 94-103, 2006.

Idézhető kivonatok

1. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea-pig. *Otolaryngol. Hung.* 50, 199a, 2004.

Előadások, poszterek

1. Sziklai I., Borkó R., Electromotile performance of isolated outer hair cells in different stages of slow motile shortening. *Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, Salvador, Bahia, Brazil.* 22-25. 08. 2004.
2. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Lassú sejthosszváltozás, oldalfal merevség és elektromotilitás tengerimalac izolált külső szőrsejtekből. *Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése.* Debrecen, 1-3. 09. 2004.
3. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea-pig. *Inner Ear Biology Workshop.* Debrecen, 05-07. 09. 2004.

4. Sziklai I., Borkó R., Batta J.T. Potassium induced slow and fast motility changes in isolated outer hair cells of the guinea pig. 5th International Symposium, Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders. Los Angeles, California, USA, 02-05. 04. 2005.
5. Sziklai I, Borkó R, Batta TJ. Influence of slow motility on the electromotility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the cochlea. 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics of Audition and Vision. Shanghai, Kína, 2006. nov. 5-7. Book of Abstracts, p. 89.

Publikációs lista

Egyéb közlemények

1. Simon É., Emri E., Borkó R. Retropharyngealis abscessus 15 hónapos kisdobban. *Gyermekgyógyászat* 49(5), 490-494, 1998.
2. Borkó R., Szűcs S. A gége saccularis cystáiról egy eset kapcsán. *Fül-Orr-Gégegyógyászat* 46(1), 58-61, 2000.
3. Borkó R., Szűcs S. Angeborene Kehlkopfzysten. *HNO* 48(11), 843-845, 2000. [IF.: 0,72]
4. Sziklai I., Szilvássy J., Borkó R., Tóth Á. Az objektív hallásvizsgálat új módszerei. Debrecen, 22-27. *Az állategészségtan és az agrároktatás.* 2004.

Egyéb előadások, poszterek

1. Borkó R., Jakab T. Retrotonsillaris folyamatok diagnosticus problémái 4 eset kapcsán. *Magyar Fül- Orr- Gégeorvosok Egyesülete XXXI., 50. éves Jubileumi Kongresszusa.* Debrecen, 28-31. 08. 1983.
2. Borkó R., Balogh K. Csecsemőkori parotis-táji haemangioma eseteinkről. *Magyar Fül- Orr- Gégeorvosok Egyesülete Tudományos Ülése.* Szeged, 05-06. 04. 1984.
3. Borkó R., Károlyi P. Ornithosis lymphadenitis nyaki manifestációval. *Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Tudományos Ülése.* Szeged, 05-06. 04. 1984.
4. Borkó R., Szűcs S. Veleszületett gégecystákról egy eset kapcsán. *Gyermek-fül-orr-gégészeti Kongresszus.* Dobogókő, 11-13. 05. 1995.
5. Borkó R., Pálkási Sz., Kiss B. Tuberculosis az orrgaratban. *Magyar Fül- Orr- Gégeorvosok Egyesületének jubileumi, 36. Nemzeti Kongresszusa.* Hévíz, 24-28. 10. 2000.
6. Subicz I., Borkó R., Nagy E., Jakab T. A Hetényi Géza Megyei Kórház Fül-Orr-Gége és Szájsebészeti Osztályán végzett acut fülműtétek 1996-1999. *Magyar Fül- Orr- Gégeorvosok Egyesületének jubileumi, 36. Nemzeti Kongresszusa.* Hévíz, 24-28. 10. 2000.
7. Subicz I., Borkó R. Primer orrüregi melanoma malignum ritka esete. *Magyar Fül- Orr- Gégeorvosok Egyesületének, 39. Kongresszusa.* Debrecen, 06-09. 09. 2006.