

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A purinerg jelátvitel és a Deiters sejtek szerepe a belső fülben



Dr. Szűcs Attila

Témavezetők: Prof. Dr. Sziklai István és Dr. Panyi György

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FÜL-, ORR-, GÉGÉSZETI ÉS FEJ-, NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, ÉS
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2007

1. Bevezetés	1
1.1. Az emlősök hallásának elemi folyamatai	1
1.2. A belső fül szerkezete és funkciója	2
1.2.1. A külső szőrsejtek	2
1.2.2. A Deiters sejtek	4
1.3. A purinerg receptorok	6
1.3.1. A purinerg receptorok szerepe	9
1.4. A K^+ csatornák	10
1.4.1. A K^+ csatornák szerepe a hallás folyamatában	10
1.5. A zaj hatása	12
2. Célok és a kitűzésüket indokló előzmények	14
3. Eszközök és módszerek	16
3.1. Külső szőrsejt és Deiters sejt izolálás	16
3.2. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés	17
3.3. A Ca^{2+} fluxus számítása	18
3.4. Immuncitokémia és immunhisztokémia	18
3.5. Zajterhelés	19
3.6. Az oldalfal merevségének vizsgálata	19
3.7. Ionáramok mérése	21
3.8. A patch-clamp vizsgálatok során alkalmazott oldatok	22
3.9. Az adatok kiértékelése	23
4. Eredmények	24
4.1. Az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikája és farmakológiai vizsgálata a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben	24
4.1.1. A tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek	24
4.1.2. A tengerimalacok belső fül külső szőrsejtjei purinerg receptor mintázata	28
4.2. A zajterhelés hatása a purinerg receptorok expressziójára, valamint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikájára a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.	28
4.2.1. A zajkezelt tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek	28
4.2.2. A zajkezelt tengerimalacok belső fül külső szőrsejtjei purinerg receptor mintázata	32
4.2.3. A zajkezelés hatása a belső fül külső szőrsejtjei falfeszülésére	32
4.3. A K^+ áramok vizsgálata a tengerimalacok belső fülének Deiters sejtjeiben	33
4.3.1. A K^+ áramok elkülönítése a különböző inaktivációs kinetika alapján	35
4.3.2. Az áramkomponensek farmakológiai szeparálása	40
4.3.3. A K^+ áramok expressziója morfológiailag különböző Deiters sejtekben	42
5. Megbeszélés	45
5.1. Az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikája és farmakológiai vizsgálata a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben	45
5.2. A zajterhelés hatása a purinerg receptorok expressziójára, valamint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikájára a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.	47
5.3. A K^+ áramok vizsgálata a tengerimalacok belső fülének Deiters sejtjeiben	50
6. Összefoglalás - Summary	56
7. Köszönetnyilvánítás	58
8. Felhasznált irodalom	59
9. A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke	66
10. Tárgyszavak jegyzéke	70

A gyakran előforduló rövidítések jegyzéke:

ADA	adenozin-deamináz
ADP	adenozin difoszfát
AMP	adenozin monofoszfát
ATP	adenozin trifoszfát
BSA	bovin szérum albumin
$[Ca^{2+}]_i$	citoszolikus szabad Ca^{2+} koncentráció
ChTx	charybdotoxin
CICR	Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulás
dB	decibel
DPOAE	disztorziós kombinációs hangemisszió
GABA	gamma-amino-vajsav
IP ₃	inozitol trifoszfát
KCC4	K^+ - Cl^- ko-transzporter
KCNQ4	gap junction csatornák
KSZ	külső szőrsejt
MgTx	Margatoxin
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NANC	non-kolinerg idegeket
PI1Tx	Pandius Imperátor toxin
PLC	foszfolipáz C
PMT	fotoelektron sokszorozó
SE	átlagérték közepes hibája
Sp	sejtfal merevség
SPL	sound pressure level, hangnyomás szint
TEA	tetraetil ammónium
UTP	uracil trifoszfát

1. Bevezetés

1.1. Az emlősök hallásának elemi folyamatai

Az ember érzékszervei révén ismeri meg a külvilágot. Ezek segítségével tartja a kapcsolatot környezetével és alkalmazkodik hozzá. A hallórendszer olyan komplex érzékszerv, mely az akusztikus ingereket elektromos ingerekké alakítja át, és ezeket az elektromos jeleket érzetté dolgozza fel. A tágabb értelemben vett halló- (és egyensúlyozó) szerv magában foglalja a hallás- (és egyensúlyozás) perifériás felfogó végkészülékeit (receptorait), az idegpályákat és a központi idegrendszeri magvakat.

A gerincesekben, beleértve az embert is a hallásérzékelést jelentősen befolyásolják a belső fülben található mechanoreceptorokat tartalmazó külső szőrsejtek és a velük szoros kapcsolatban álló Deiters sejtek. A hanginger hatására a membrana basilaris és membrana tectoria egymáshoz viszonyított relatív elmozdulása a szőrsejt sztereocíliumának elhajlását indukálja, mely ioncsatornákat nyit meg, vagy ellenkező irányú elmozdulás esetén, ezeket a csatornákat bezárja (Corey és Hudspeth, 1979). A kutikuláris lemezben található mechanoszenzitív csatornák kinyílása esetén Ca^{2+} és K^{+} ionok áramlanak a sejtbe, ezzel a sejt depolarizációját hozzák létre. A csatornák zárása következtében hyperpolarizáció alakul ki. A sejtek depolarizációjának hatására feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} csatornák aktiválódnak, melyeken keresztül Ca^{2+} áramlik be a sejt további depolarizációját okozva. A külső szőrsejtek depolarizációja a hosszanti tengelyük mentén történő rövidülést, hiperpolarizációja elongációt okoz. Az intracellulárisan felhalmozott káliumionok feszültségfüggő K^{+} csatornákon és Ca^{2+} függő K^{+} csatornákon keresztül jut az extracelluláris térbe (Ashmore és Meech, 1986). A külső szőrsejtek aktív hosszváltozása a hanginger frekvenciájának ütemében következik be, ami fokozza a baziláris membrán mozgását azáltal, hogy mindig azonos fázisban energiát kölcsönöz neki. Ez a felerősített rezgés már elegendő ahhoz, hogy a belső

szőrsejtek is ingerületbe jöjjenek. A belső szőrsejtek receptor potenciálja az afferens neuronokban akciós potenciálokat generál. A külső szőrsejtek ezen erősítő mechanizmus csak kb. 40 dB-ig működik. Minden olyan esetben, amikor a külső zajok tartósan érik ezt a rendszert, a külső szőrsejtek ezen funkciója károsodik, később a sejt elpusztul, és ennek következtében idegi típusú halláskárosodás alakul ki.

1.2. A belső fül szerkezete és funkciója

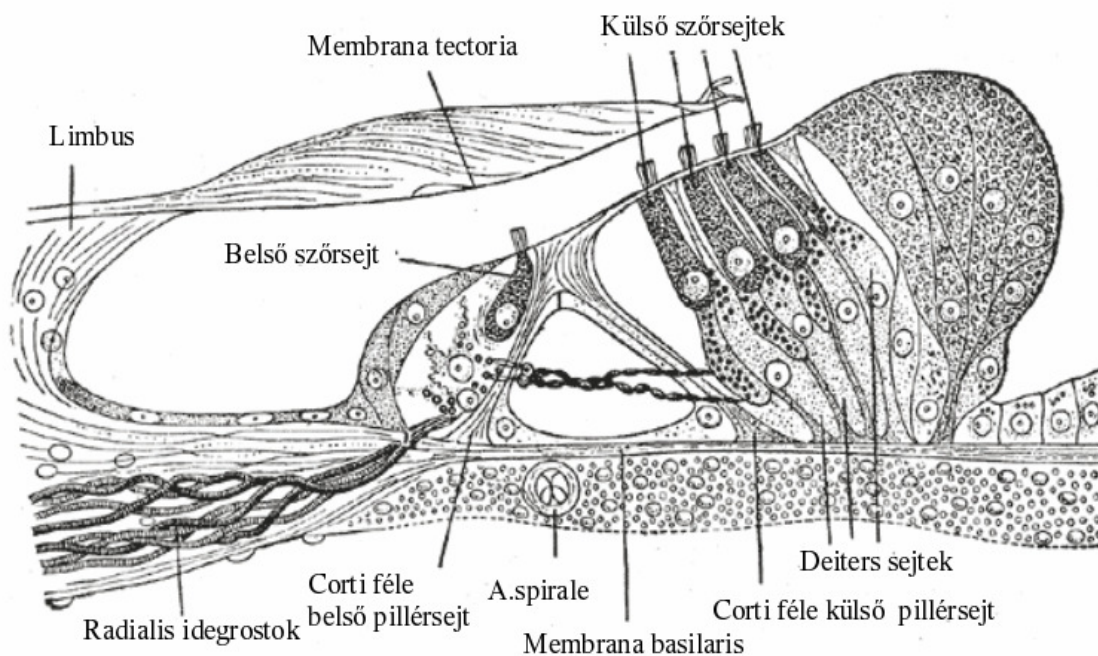
A hallás és egyensúlyozás szerve összetett, kettős érzékszerv, ami a halántékcsontról külső felületén és a sziklacsontról helyezkedik el. A hallás szerve három részből áll: külső, középső és belső fülből. A belső fül a sziklacsontról pars petrosájában elhelyezkedő csontos labirintusban foglal helyet, mely a csigát (cochlea) tartalmazza.

A csiga (cochlea) a tengelye körül spirálisan csavarodó, a vége felé elvékonyodó cső. A csiga tengelyét a modiolus képezi, mely széles alappal a bázison ered. A cochlea csontos tokján belül helyezkedik el a hárttyás csiga. A csiga tartalmazza a Corti-féle szervet, mely a hallás tulajdonképpeni receptor szerve.

A Corti szervén belül találhatók az érzékszervek. A Corti alagútját befelé a belső, ettől laterálisan a külső szőrsejtek (1. ábra). A belső szőrsejtek egy sorban helyezkednek el a cochlea teljes hosszában, számuk összesen kb. 3000. A külső szőrsejtek hármassorokba rendezettek, számuk kb. 22000. A külső szőrsejteket a Deiters-féle támasztósejtek határolják, amelyeket kívülről magas hengerhám, ún. Hensen-féle hámsejtek, majd az alacsonyabb Claudius-féle köbhámsejtek határolnak (1. ábra).

1.2.1. A külső szőrsejtek

A szőrsejteknek funkciójuk alapján két típusukat különböztetjük meg. A belső szőrsejtek egy sort alkotnak a cochleában, számuk mintegy 3000. A belső szőrsejtek a hallás



1. ábra A belső fül szerkezete.

A Corti alagúttól befelé a belső, ettől laterálisan a külső szőrsejtek helyezkednek el. A külső szőrsejteket a Deiters-féle támasztósejtek határolják, amelyeket kívülről magas hengerhám, ún. Hensen-féle hámsejtek, majd az alacsonyabb Claudius-féle köbhámsejtek határolnak.

tulajdonképpen receptor sejtjei, a sejtek receptor potenciálja az afferens neuronokban akciós potenciálokat generál. A külső szőrsejtek (KSZ) a hangrezgések erősítése révén kiemelkedő fontosságúak a hallás percepciójában, számuk mintegy 22000, a bazális csavarulatok területén négy, az apikális csavarulatokban 3 sorban helyezkednek el a cochleaban. A külső szőrsejteket a Deiters támasztósejtek veszik körül, mégpedig úgy, hogy a külső szőrsejt a Deiters sejt sejttestén helyezkedik el, a Deiters sejt nyúlványa pedig körülveszi a külső szőrsejtet, és a nyúlvány csúcsa a külső szőrsejt kutikuláris lemezéhez kapcsolódik (1. ábra). A külső szőrsejtek mérete mind apikobazálisan, mind a sejt sorok között különböző, így a Deiters sejtek nyúlványának és sejttestjének a mérete is különböző. Tekintettel arra, hogy a cochlea különböző területein más-más frekvenciájú hangok percepciója történik,

feltételezhető az, hogy ezen sejteknél megfigyelhető morfológiai különbségek funkcionális eltérésekben is megnyilvánulnak.

A cochlea efferens beidegzésében jelentős különbségeket fedeztek fel az utóbbi években, az apikális csavarulatokban GABA-erg, a bazális csavarulatokban kolinerg beidegzés volt kimutatható. Általánosan elfogadott, hogy a cochlea efferens beidegzése a cochleáris adaptáció és a tartós zaj elleni védelem fontos eleme (Dallos és mtsai, 1997). Az acetilkolin és a GABA egyaránt Ca^{2+} beáramlást eredményez a sejtmembránon (Housley és Ashmore 1992), mely egyrészt Ca^{2+} függő K^{+} csatornák megnyílását eredményezi, mely hiperpolarizálja a sejtmembránt (Dulon és mtsai., 1998; Blanchet és mtsai., 2000), másrészt a szubszinaptikus ciszternális rendszerből Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulást (CICR) eredményez (Sziklai 2004). Újabb kutatások szerint a külső szőrsejtek intracelluláris Ca^{2+} szintjét kotranszmitterként befolyásolni képes az ATP (Skellet, 1997). A jelátvitelben szerepet játszó számos purinerg receptor volt detektálható a belső fül sejtes elemein, így a külső szőrsejteken és Deiters sejteken is (Nikolic, 2003; Parker, 1998; Brändle, 1999).

1.2.2. A Deiters sejtek

A támasztósejtek közül a Deiters sejtek szoros kapcsolatban állnak a külső szőrsejttel, ahhoz mind az apikális, mind a bazális pólusán csatlakoznak, úgynevezett „mikromechanikai” egységet alkotnak (Laffon, 1996). Feltételezések szerint a külső szőrsejtek erősítő mechanizmusát segítik. A cochleában a külső szőrsejthez hasonlóan a bazális területtől az apikális területig három sorban helyezkednek el. Sejttestből és úgynevezett falangeális nyúlványból állnak. A sejttest „vállán” ül a külső szőrsejt a bazális pólusával (1. ábra). A sejttestből kiinduló falangeális nyúlvány ívben a külső szőrsejt apikális pólusához fut. Az első sejtsor falangeális nyúlványa a második sor KSZ sejtek apikális pólusait, a második sejtsor a harmadik KSZ sor sejtjeit választja el, a harmadik sejtsor

nyúlványa a harmadik KSZ sort zárja le kívülről a többi támasztósejt felé. A Deiters sejtek testének és falangeális nyúlványának mérete függ a sejtek cochleában elfoglalt helyétől (Pujol, 1992). Kis méretű külső szőrsejthez nagy sejtestű és rövid nyúlványú, míg hosszú típusú külső szőrsejthez vékony sejtestű és hosszú nyúlványú Deiters sejt kapcsolódik. A falangeális nyúlvány a végén kiszélesedik, úgynevezett falangeális fejecsben végződik (Laffon, 1996). A Deiters sejtek mérete mind apiko-bazálisan, mind a sorok között belülről kifelé nő. Ezen felül a különböző méretű sejtek mitokondrium és mikrotubulus számában is találtak eltérést. Ezen különbségek hozzájárulhatnak a sejtek eltérő működéséhez a cochleában (Slepecky, 1996).

Immunhisztokémiai eljárásokkal Burgess és mtsai (1997) idegvégződéseket mutattak ki tengerimalacban a Deiters és Hensen sejt körül. Ezen idegvégzódések nagyobb számban fordultak elő az apikális sejtek körül és számuk a bazális területek felé haladva csökkent. Fechner és mtsai (2001) ezekről az idegvégzódésekről kimutatták, hogy II-es típusú afferens rostok. Más különbségek is fellelhetők a Deiters sejtek között. A bazális csavarulat sejtjeiben pl. aktint és vimentint sem sikerült kimutatni szemben az apikális sejtekkel (Nakazawa, 1995). Ezen korábbi tanulmányok csak morfológiai eltéréseket tudtak kimutatni a sejtek között, funkcionális eltéréseket nem sikerült detektálni. A Deiters sejtek szerepe a cochlearis aktív működésben még nem tisztázott. Egyes tanulmányok szerint ezen sejtek hozzájárulhatnak a cochlearis mikromechanikához (Bohnke, 1998). A falangeális nyúlvány merevségének a megváltozása befolyásolhatja a külső szőrsejtek aktív hosszváltozását, így járulhat hozzá a sejt a Corti szerv működéséhez (Laffon, 1996). Különböző neurotranszmitterek, mint az ATP, képesek a falangeális nyúlvány merevségét megváltoztatni. Bobbin (2001) és mtsai megfigyelése szerint 100 μM ATP sejtekhez adásakor a sejtek falangeális nyúlványának a mozgását lehetett megfigyelni, míg normál külső oldat adásakor ez nem jött létre. Más kísérletekben Ca^{2+} adásakor figyeltek meg hasonló jelenséget (Dulon,

1994). A Ca^{2+} és az ATP hatására kialakuló válasz háttérében hasonló mechanizmusok állhatnak (Dulon, 1993).

1.3. Purinerg receptorok

Az adenzinvegyületek az evolúció során négy fontos feladat betöltésére „szakosodtak” az élő szervezetben: az ATP makroerg kötése révén energiaraktárként funkcionál, az adenin a nukleinsavak felépítésében is nélkülözhetetlen, és az adenzinvegyületek jelátviteli molekulákként, valamint koenzimként [nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) és a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP^+)] is fontos szerepet játszanak. Az extracelluláris adenzinvegyületek hatásairól először 1929-ben Drury és Szent-Györgyi Albert számolt be (Drury és Szent-Györgyi, 1929), majd három évtizeddel később, 1959-ben Holton vetette fel, hogy az ATP neurotranszmitter lehet, miután nyúlban szenzoros idegek stimulációját követően ATP-felszabadulást mutatott ki (Holton, 1959). Az 1960-as években utaltak először arra, hogy a gastrointestinalis és urogenitalis rendszereket ellátó idegek között olyan non-adrenerg, non-kolinerg (NANC) idegeket is találunk, melyeknek neurotranszmittere az ATP (Burnstock és mtsai., 1970). A további vizsgálatok során igazolódott, hogy az ATP kotranszmitter szerepe sokrétű. Kimutatták szimpatikus, paraszimpatikus idegvégződésben, a neuromuszkuláris junkcióban és egyéb idegvégződésekben is. Az ATP vagy kotranszmitterként exocitózissal, vagy sejtlezio során jut az extracelluláris térbe. Ott vagy receptorhoz való kötődés előtt, vagy az után ectoATPáz bontja ADP-n, majd AMP-n keresztül adenzinra. Ezek a vegyületek is hathatnak különféle receptorokra. Az adenzin vagy inozinra bomlik le az adenzin-deamináz (ADA) enzim működése révén, vagy egy transzporter segítségével visszavételre kerül az idegvégkészülékbe, ahol újra ATP-be épül be.

A purin- és pirimidinvegyületek hatásaikat sejtfelszíni receptorokra hatva fejtik ki. A purinerg receptorok két nagy csoportja a P₁-purinerg receptorok vagy adenosin-receptorok (altípusok: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃; Fredholm és mtsai., 2001), melyek adenilát-ciklázsal kapcsolatosak és kompetitív antagonistáik a metilxantinok, illetve a P₂-purinerg receptorok, melyek különféle purin és pirimidin nukleotidokkal (ATP, ADP, UTP stb.) aktiválhatók. A P₂ receptoroknak két csoportját különböztetjük meg: az ionotrop P_{2X} és a metabotrop P_{2Y} receptorokat (Burnstock és Kennedy, 1985).

A P_{2X} receptorok a P_{2X1-7} alegységek homo- vagy heteromultimerizációjával jönnek létre (North, 2002), a homomer ionotrop P_{2X} receptoroknak így tehát hét típusát ismerjük. Az alegységek 384-595 aminosavból állnak, melyek két transzmembrán domaint, intracelluláris C- és N-terminálist és egy nagy extracelluláris hurkot képeznek. Az ioncsatorna képzésében 3-6 alegység vesz részt. Amikor az extracelluláris oldal megfelelő helyéhez ATP kötődik, kationcsatorna nyílik meg, mely a citoszolikus szabad Ca²⁺ koncentrációt ([Ca²⁺]_i) részben közvetlenül a külső térből növeli meg, részben a belépő Ca²⁺ ionok Ca²⁺ indukálta Ca²⁺ felszabadulást (CICR) indukálnak. Emellett a P_{2X} receptorok nyitása depolarizálja a sejtet, ami, ha a sejt rendelkezik a megfelelő feszültségfüggő ioncsatornákkal, további Ca²⁺-belépés és (belső raktárból történő) -felszabadulás forrása. Jelentősen különböző sajátosságai és jelátviteli módja miatt a P_{2X7} receptort kezdetben külön alcsoportba sorolták és P_{2Z} névvel illették, ám ez az elnevezés ma már nem használatos.

A P_{2Y} receptorok 7 transzmembrán doménnel rendelkező, 308-377 aminosav hosszúságú, G-proteinhez kapcsolt metabotrop receptorok (Ralevic és Burnstock, 1998). Az emlősökben eddig nyolcféle P_{2Y} receptort klónoztak (P_{2Y1}, P_{2Y2}, P_{2Y4}, P_{2Y6}, P_{2Y11}, P_{2Y12}, P_{2Y13}, P_{2Y14}; Burnstock, 2006). Ezek közül a trombocytákon korán felismert jelentős szerepük miatt a P_{2Y1} és a P_{2Y12} receptort P_{2T} receptor néven (továbbá ADP-vel való aktiválhatóságuk miatt mint P_{2Y_{ADP}} receptorokat; Hechler és mtsai., 2005), míg az UTP-vel

való aktiválhatóság miatt a P_{2Y2} és P_{2Y4} receptorokat együttesen P_{2U} receptorként is szokták említeni. A P_{2Y} receptorok legkorábban megismert négy típusa (P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} , P_{2Y6}) G_q -proteinen keresztül a foszfolipáz C-t (PLC) aktiválja és így inozitol trifoszfát (IP_3) felszabadítás révén hozza létre a citoplazma $[Ca^{2+}]$ -jának növekedését, az újabban megismert négy altípus esetében pedig az adenil-cikláz aktiválása G_s -protein (P_{2Y11} ; Ralevic és Burnstock, 1998) vagy gátlása G_i -protein (P_{2Y12} ; Hollopeter és mtsai., 2001; P_{2Y13} , P_{2Y14} ; Marteau és mtsai., 2003) közvetítésével is szerepel a jeltovábbítás mechanizmusaként. A P_{2Y} receptorok között egyre elfogadottabb külön csoportként kezelni a „pirimidinoceptorok”-at, melyek affinitása az uracilszármazékok iránt nagyobb, mint az adeninszármazékok iránt. Az ide tartozó négy receptor az UTP-vel hatékonyan aktiválható P_{2Y2} és P_{2Y4} , a nagy UDP-affinitású P_{2Y6} , valamint az UDP-glükózra érzékeny P_{2Y14} (Brunschweiler és Muller, 2006).

Az ionotrop purinerg receptorok megnyílása egyrészt membrádepolarizáció kiváltásával közvetve, másrészt Ca^{2+} -permeabilitása miatt közvetlenül is képes megemelni a $[Ca^{2+}]_i$ -t. A P_{2X} receptorok Na^+ -ra vonatkoztatott relatív Ca^{2+} -permeabilitása (P_{Ca}/P_{Na}) a receptor típusától, a sejtípustól és a fajtól függően 1 és 10 között mozog, , átlagosan 2-4, de extrém esetekben ennél jóval nagyobb is lehet (pl. patkány peritoneális makrofágok P_{2X7} receptorainál 71-es értéket mértek) (Egan és mtsai., 2006). Mindazonáltal a receptoraktivációt követő ion beáramlásnak csak mintegy 5-10%-a Ca^{2+} -áram (Egan és mtsai., 2006), nyilvánvalóan az ionok elektrokémiai gradienseinek és abszolút koncentrációinak különbözősége miatt. Érdekes megfigyelés, hogy a kationszelektívnek tartott P_{2X} receptorok egyike, a P_{2X5} receptor Cl^- ionra is permeabilis (Thomas és Hume, 1990). A humán receptor esetében $P_{Cl}/P_{Na}=0,52$, és ezért az igen nagy permeabilitásért a pórus közelében elhelyezkedő 52-es lizin aminocsoportjának pozitív töltését gondolják felelősnek (Bo és mtsai., 2003).

A P_2 purinerg receptorok (a P_{2X7} receptor kivételével) az agonista ismételt vagy tartós adagolására egyre kisebb inward áramot és/vagy $[Ca^{2+}]_i$ -növekedést hoznak létre, azaz deszenzitizálódnak. Ez egyrészt a receptor internalizációjával és degradációjával, másrészt foszforilációs állapotának megváltozásával és funkcionális inaktivációjával, harmadrészt pedig (a P_{2Y} receptorok esetében) a PIP_2 készletes kimerülésével és a belső Ca^{2+} -raktárak kiürülésével magyarázható. Deszenzitizációjuk alapján a purinerg receptorok négy csoportba oszthatók. Az *első csoportba* a metabotrop P_{2Y} receptorok tartoznak, melyek igen lassan deszenzitizálódnak, az agonistának ehhez 10 percre kell folyamatosan jelen lenni. A *második csoport* a lassan deszenzitizálódó ionotrop purinerg receptorok csoportja, melyek közé a P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X5} és a P_{2X6} receptor tartozik. Az agonista 60 s-ig tartó adagolása során a rajuk átfolyó áram fokozatosan 0-ra, vagy közel 0-ra csökken le. A *harmadik csoportba* a gyorsan deszenzitizálódó P_{2X1} és P_{2X3} receptorok tartoznak, melyek teljes deszenzitizálódása kevesebb, mint 1 s alatt teljessé válik, az áram csökkenésének időállandója mintegy 300 ms. Végül a *negyedik csoportot* a P_{2X7} receptor alkotja, mely deszenzitizációt nem mutat, sőt, a receptor azonosítás egyik megbízható jelének tartják, hogy ismételt agonista adagolásokra a receptoron keresztül folyó áram nagysága akár igen jelentős mértékben (többszörösére) növekedhet, azaz a receptor szenzitizálódik (North, 2002; Ralevic és Burnstock, 1998).

1.3.1. A purinerg receptorok szerepe

A purinerg receptorok az élő szövetekben, sejtekben igen elterjedtek, részt vesznek az egészséges és a kóros sejt működésben. A legtöbb esetben egy sejten egynél több purinerg receptor-típus is megtalálható, azonban az egyes altípusok közötti kölcsönhatás jellege és jelentősége, illetve a purinerg receptor-mintázat megváltozásának szerepe a sejt életében egyelőre nem pontosan ismert.

A P_2 receptorok által közvetített celluláris hatások rövid és hosszú távúak lehetnek. A *gyors hatások* közé az ATP legkorábban felismert kotranszmitter és neuromodulátor funkciói mellett a neuroendocrin és exocrin szekréció széles körű szabályozásában, a már fentebb említett thrombocytaaggregációban, a nociceptív ingerek mechanoelektromos transzdukciójában betöltött szerep, valamint az endothel sejtek által mediáltan vascularis vazodilatációt kiváltó képesség sorolható. A *lassú (trofikus) purinerg hatások*, még szerteágazóbbak. A receptorok sejtproliferációban, differenciációban és apoptózisban betöltött szerepe révén az extracelluláris purin- és pirimidinnukleotidok a bőr és a parenchymás szervek sejtjeinek normál turnoverében, a központi idegrendszer, a gasztrointesztinális rendszer és a vizeletelválasztó rendszer működésében, a malignus daganatok kialakulásában, a gyulladások létrejöttében és fennmaradásában, a sebgyógyulásban és a csontreszorpcióban töltenek be fontos funkciót, továbbá részesei az atherosclerosisnak, az immunsejtek működését befolyásolva pedig immunmodulátorok (Friel, 1988; Edwards és mtsai., 1992; Evans és mtsai., 1992; Abbracchio és mtsai., 1993; Burnstock, 1993).

1.4. A K^+ csatornák

1.4.1. A K^+ csatornák szerepe a hallás folyamatában

A hátyás labyrinthus háromszög keresztmetszetű csatornája, a ductus cochlearis, K^+ -ban gazdag (140-160 mM/l), Na^+ -ban szegény (2-6 mM/l) endolymphat tartalmaz. Ezt a K^+ -ban gazdag endolymphát a stria vascularis termeli. A szőrsejtek kutikuláris lemeze, a pillérsejtek és a Deiters sejtek phalangeális nyúlványának felszínei zonula occludensszel kapcsolódnak egymáshoz, így egy résmentes lemezt alkotnak (lamina reticularis). Az endolymphatér és a perilymphatér közötti határ a lamina reticularis, így a külső szőrsejtek

kutikuláris lemezéből kiemelkedő sztereocíliumok a magas K^+ tartalmú endolymphatérbe nyúlnak, míg sejtestük az alacsony K^+ koncentrációjú perilymphatérben (Na^+ 130-150 mM/l, K^+ 4-5mM/l) helyezkedik el. A hanginger hatására létrejövő m. basilaris és m. tectoria egymáshoz viszonyított relatív elmozdulása sztereocílium elhajlást indukál. A sztereocílium elmozdulása mechanoszenzitív csatornákat nyit meg. A sztereocíliumok elhajlásakor megnyíló csatornákról kimutatták, hogy ionszelektivitásuk alacsony, így aktiválódásuk esetén nemcsak K^+ , hanem Ca^{2+} is áramlik a sejtekbe (Corey és Hudspeth, 1979; Hudspeth, 1986; Pickles és Corey, 1992), bár ennek mértéke az endolympha minimális Ca^{2+} tartalma miatt csekély. A mechanikai inger hatására az ionok mozgása az endolympha és a szőrsejtek között fennálló elektromos grádiens mentén történik. Ezt az elektromos grádiens a sejtek nyugalmi membránpotenciálja (-70mV), valamint a pozitív endocochleáris potenciál (80 mV) alakítja ki. A csatornák kinyílása esetén a beáramló K^+ és Ca^{2+} ionok depolarizálják a sejtet, csatorna záródás esetén pedig hyperpolarizáció jön létre. Tehát a m. basilaris kitérése felfelé a sejt depolarizációját, lefelé pedig hyperpolarizációját okozza. Depolarizáció hatására feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák aktiválódnak, amelyeken keresztül Ca^{2+} áramlik be további depolarizációt és intracelluláris Ca^{2+} növekedést okozva (Hudspeth, 1986; Nakagawa és mtsai., 1991). Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedés hatására a sejt bazolaterális membránján Ca^{2+} szenzitív K^+ csatornák nyílnak meg amelyeken K^+ kiáramlás indul meg (Ashmore és Meech, 1986; Hudspeth, 1986; Nakagawa és mtsai., 1991). Emellett megnyílnak a membrán feszültségfüggő K^+ csatornái is (Nakagawa és mtsai., 1994). A legújabb kutatások szerint ezek KCNQ4 csatornák (Boettger és mtsai., 2002). A K^+ a korábban említett csatornákon történő kiáramlása helyreállítja a KSZ-ek nyugalmi membránpotenciálját. A sejtben felhalmozódott Ca^{2+} egyrészt intracelluláris raktárakba áramlik, másrészt Ca^{2+} pumpák segítségével eliminálódik a sejtől (Nakagawa és mtsai., 1994). A Deiters sejtek feltételezett szerepe a belső fülben a K^+ recirkuláció regulációjának biztosítása (Boettger és

mtsai., 2002). A perilymphába jutott K^+ ion bejutását a Deiters sejtbe egy K^+-Cl^- kotranszporter, a Kcc4 szabályozza. A Deiters sejtekbe jutott K^+ diffúzió útján jut a hozzá gap junction összeköttetéseken keresztül kapcsolódó epithelialis sejtekbe (Boettger és mtsai., 2002). Ezen sejtekből a stria vascularison keresztül jut ismételtén a K^+ az endolymphába.

1.5. A zaj hatása

A környezeti ártalmak, mint például a zaj káros hatással van a belső fül sejtjeire. Tartós zajkezelés a receptorsejtek károsítása révén idegi típusú halláscsökkenést okoz (Décori és mtsai., 1991; Subramaniam és mtsai., 1994; Henderson és mtsai., 1994; Canlon és mtsai., 1995). Ezt főként morfológiai és funkcionális/audológiai vizsgálatokkal igazolták (Canlon és mtsai., 1995). Tartós zajkezelés főként a külső szőrsejtek pusztulásához (Ou és mtsai., 2000) és ezen sejtek funkciókiesése révén DPOAE (disztorziós kombinációs hangemisszió) csökkenéshez vezet (Canlon és mtsai., 1995). Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereocíliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumai. Ezen folyamatok végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk elvesztéséhez és a sejtek pusztulásához vezetnek (Saunders és mtsai., 1985; Berridge és mtsai., 1994). Felvetették azt, hogy ezen károsító mechanizmusok hátterében a reaktív oxigén gyökök változása (Kopke és mtsai., 2005), a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen a Ca^{2+} szint változása áll. Az intracellularis Ca^{2+} szint emelkedés sejtfalmerevség változást hoz létre a külső szőrsejt oldalfalán (Batta és mtsai., 2003; Batta és mtsai., 2004). Az intracelluláris Ca^{2+} szintet a cochlea fő efferens neurotranszmitterei, mint pl. az acetilkolin és a GABA, valamint az újabb kutatások alapján kotranszmitterként szerepet játszó ATP is befolyásolni képesek (Housley és Ashmore 1992). A zaj expozíció hatására megváltozhat számos neurotranszmitter és neuromodulátor hatása. Például 10-11 napig tartó folyamatos, 24 órán át tartó 65 dB-es zajkezelés hatására megváltozik az ATP hatására

kialakuló kation áram (Chen és mtsai., 1995a). Ezen kísérletekben különbséget találtak a zajkezelés után a rövid és hosszú típusú KSZ-ek között.

2. Célok és a kitűzésüket indokló előzmények

1. *Az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek morfológiai, farmakológiai vizsgálata a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.* Az irodalomból ismert, hogy az ATP adagolása depolarizáló kationáramot idéz elő a tengeri malacok belső füléből izolált külső szőrsejteken (Housley és mtsai., 1992). Azt is tudjuk, hogy ez az áram nagymértékben gátolható purinerg receptor antagonistákkal, suraminnal és cibacron-kékkel (Skellet és mtsai., 1997). ATP adagolás hatására a Ca^{2+} -áramok igen érdekesen változnak meg. Nagy koncentrációban (100 μM) alkalmazott ATP csökkenti a Ca^{2+} -áramok amplitúdóját 0 mV-on, de fokozza +10 mV-on, mindemellett a sejtek kis hányadában teljesen hatástalan (Chen és mtsai., 1995). Ez a heterogén kép utalhat funkcionális diverzitásra, ezáltal a purinerg receptor altípusok expressziójának sejt-sejt közötti különbségeire is. Mockett és mtsai 1995-ben farmakológiai úton kimutatták, hogy a Corti szervben, mind a $\text{P}_{2\text{X}}$, mind pedig a $\text{P}_{2\text{Y}}$ receptorok kimutathatóak. A purinerg receptor ellenes antitestek széleskörű megjelenése lehetővé tette ezen receptorok immunfluoreszcens jelölését, ezáltal az altípusok expressziójának és a sejtfelszíni lokalizációjának a vizsgálatát. Ezáltal kimutathatóvá vált a különböző altípusok közötti különbség mind a membránon belüli elhelyezkedés, mind pedig az expresszió tekintetében. Azonban annak a megfigyelésnek a részletes vizsgálata, miszerint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek is jelentős különbségeket mutatnak az izolált külső szőrsejtekben, egyenlőre még várat magára. Éppen ezért elsődleges **célunk a Ca^{2+} -tranziensek inhomogenitásának hátterében lévő, valószínűleg különböző, P_2 receptormintázatok farmakológiai vizsgálata volt.**
2. *A zajterhelés hatása a purinerg receptorok expressziójára, valamint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek morfológiájára a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.* Ismert, hogy a tartós zajterhelés megváltoztatja a belső fül receptorainak érzékenységét. A nagyfokú zajterhelés hallásvesztéshez vezet, aminek hátterében a belső

fül sejtjeinek sérülése, illetve pusztulása áll. Ebben a folyamatban leginkább a külső szőrsejtek érintettek, amelyekben morfológiai elváltozások, úgymint a sztereocilumok sérülése, a mitokondriumok struktúrájának megváltozása, valamint a sejt volumen jelentős növekedése egyaránt kimutatható (Saunders és mtsai., 1985; Décory és mtsai., 1991; Subramaniam és mtsai., 1994; Henderson és mtsai., 1994; Canlon és mtsai., 1995). Kimutatták, hogy a jelentős és tartós (250 Hz, 125 dB) zajnak kitett állatokban megváltozik a külső szőrsejtek életképessége és motilitása, aminek hátterében a sejtmembrán Ca^{2+} permeabilitásának növekedése és a következményes intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés áll (Fridberger és mtsai., 1998). Feltételezések szerint a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint hatására a sejtmembrán purinerg receptorok expressziója csökken, így csökken az ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés mértéke (Maynard és mtsai., 1992). Néhány év óta azt is tudjuk, hogy a megnövekedett Ca^{2+} szint a sejtfal rugalmasságának csökkenéséhez, ezáltal a Corti szerv adaptációjának megváltozásához vezet. Mindezen folyamatok kiegészülnek a zaj hatására kialakuló neurotranszmisszióban bekövetkező változásokkal is, ami az ATP-hez kötött jelátviteli útvonalakat is érinti (Chen és mtsai., 1995b). Munkánkban megvizsgáltuk **a tartósan zajterhelésnek kitett állatok külső szőrsejtjeinek Ca^{2+} homeosztázisában és a purinerg receptor mintázatában kialakuló elváltozásokat.**

3. *A K^+ áramok vizsgálata a tengerimalacok belső fülének Deiters sejtjeiben.* A külső szőrsejtek szerepe a cochleáris erősítő mechanizmusban részletesen tanulmányozott, ismert folyamat. Feltételezések szerint a külső szőrsejtekhez szorosan kapcsolódó Deiters sejtek is fontos szerepet játszhatnak ebben az erősítő folyamatban, bár a pontos feladatuk jelenleg ismeretlen. A Deiters sejtekben az ATP adagolás hatására kialakuló Ca^{2+} tranziensekből több purinerg receptor altípus jelenlétét valószínűsítették (Chen és mtsai., 1998). Fontos az, hogy a P_{2X} receptorokon beáramló Ca^{2+} mennyiségét egyrészt az

extracelluláris és intracelluláris tér Ca^{2+} koncentráció különbsége, valamint az aktuális membránpotenciál nagysága határozza meg. Ez utóbbi függ a sejtmembrán káliumcsatornáinak aktivitásától. Mindezek miatt **célunk a Deiters sejteken mérhető K^+ áram karakterizálása volt, valamint annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés a különböző cochleáris lokalizációjú Deiters sejtek morfológiája és K^+ áram összetétele között.**

3. Eszközök és módszerek

3.1. Külső szőrsejt és Deiters sejt izolálás

Kísérleteinket pigmentált tengerimalacokon (150-300 g) 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 cochleát 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 (1987) által felállított kritériumoknak. Ezek a 1: cilindrikus sejthalak, 2: ne legyenek a sejtek megduzzadva, 3: a sejtmag a sejt bázisához közel helyezkedik el, 4: a sejtalkotók nem mutatnak Brown-féle mozgást. A Deiters sejtek kiválasztásánál szintén a sejt és a sejtnyúlvány alakja, valamint a sejtmag elhelyezkedése játszott szerepet. A mérések során különálló és összekapcsolódott külső szőrsejteket és Deiters sejteket is felhasználtunk.

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

3.2. 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 $5\mu\text{M}$ Fura-2AM 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 DeltaScanTM kettős monochromátor berendezése (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 (Grynkiewicz és mtsai., 1985).

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

ahol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, K_D a disszociációs állandó, $R = F_{340}/F_{380}$, $R_{\min}$ és $R_{\max}$ a minimális és maximális fluoreszcencia-hányados. A számításokhoz in vivo kalibrációs adatokat használtunk fel, ahol $K_D = 76 \text{ nM}$, $R_{\min} = 0,42$, $R_{\max} = 8,6$, $\beta = 15,3$. A háttérfluoreszcenciát a fedőlemezek 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.

3.3. A Ca^{2+} fluxus számítása

A sejt intracellularis terébe belépő Ca^{2+} ionok származhatnak egyrészt az extracellularis térből, másrészt a belső raktárakból. Az intracelluláris térbe jutó Ca^{2+} ionokat a Ca^{2+} pumpák és a Ca^{2+} kötő fehérjék távolítják el. A megemelkedett intracellularis Ca^{2+} koncentrációt Ca^{2+} érzékeny fluoreszcens festék segítségével közvetlenül mérni tudjuk. Az anyagmegmaradás törvénye értelmében a belépő és az eltávolított Ca^{2+} mennyisége közötti különbség arányos a mért intracellularis Ca^{2+} koncentráció változással. A Ca^{2+} kötő fehérjék koncentrációját, és Ca^{2+} kötő képességét korábban már megmérték (Schuhmeier és mtsai., 2003) így azt ismertnek tételeztük fel. A Ca^{2+} pumpa transzportsebességét a depolarizációval kiváltott Ca^{2+} tranziensek leszálló szárából, matematikai modell segítségével határoztuk meg.

3.4 Immuncitokémia és immunhisztokémia

A kipreparált külső szőrsejtek kalcium- és magnéziummentes (CMF) PBS-sel (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 BSA-val. 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 festékekkel konjugált másodlagos antitesttel szintén egy órán keresztül sötétben, szobahőn inkubáltuk a sejteket. Végül háromszori PBS-es mosás után a magokat DAPI-val (Vectashield Mounting Medium with 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 a Zeiss LSM 510 META konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal, vagy a 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 kiemelése céljából történt (például a sejtek morfológiájának jobb láthatósága érdekében), minden esetben legfeljebb az egész kép intenzitásának és élességének homogén javításával.

3.5 Zajterhelés

14 napig tartó, napi 24 órán keresztül adott 80 dB intenzitású zajterhelést végeztünk. A zaj minden frekvenciát egyaránt tartalmazott 50 Hz és 35 kHz tartomány között. A ketrecen belül a zaj intenzitás különbség maximum 2 dB volt.

3.6. Az oldalfal merevségének vizsgálata

A külső szőrsejtekben mikromechanikai egységek (Raphael és mtsai, 2000) teremtik meg az oldalfal merevségét szabályozó rendszer működésének alapját. Ezzel egy presztin független sejtfal merevség szabályozó rendszer lehetővé tenné az aktív energia visszacsatolásának lehetőségét (Dallos és mtsai., 1997; Adachi és mtsai., 2000; Dallos és He, 2000).

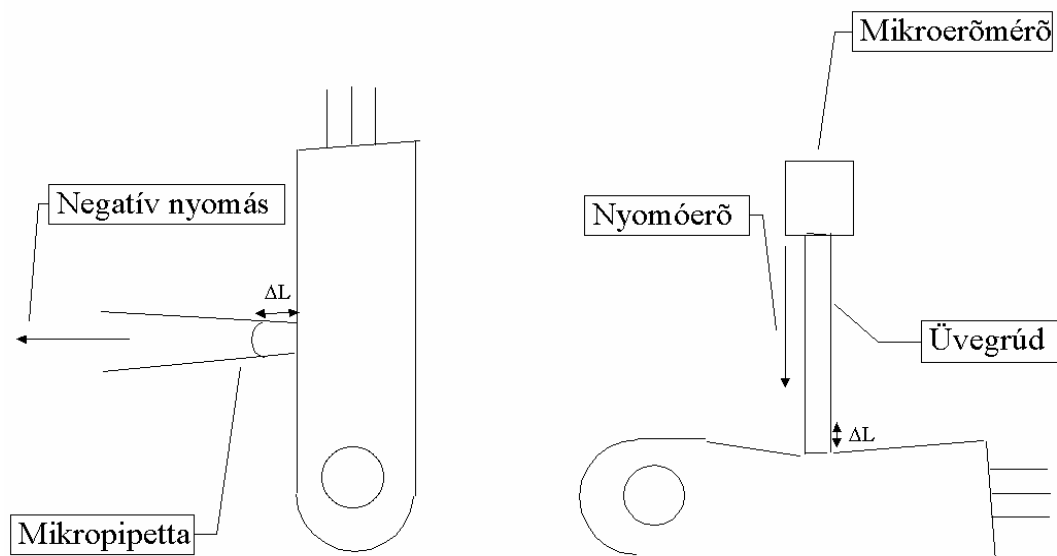
Az oldalfal merevségét az Oghalai és mtsai (1998) által korábban leírt, aspirációs mikrodeformációs technika adaptált változatával vizsgáltuk (2. ábra). Az ehhez szükséges mikropipettákat 2,8 μm -s belső átmérővel Clark EC 15 TF üvegapillárisból készítettük 5 lépcsős formálási programmal (Flaming/Brown Model P-87). Az extracelluláris oldattal

feltöltött pipettákat a megfelelő, szabályozható negatív nyomás biztosítására egy vízoszlopos manométerhez csatlakoztattuk. A vizsgálatokhoz 4-10 H₂O cm (0,39 nN/μm² -0,98 nN/μm²) közötti negatív nyomástartományt választottunk, mely tartományban az oldalfal három rétegű struktúrája a szakirodalom szerint is intakt maradt. A méréseket külső oldattal töltött folyadékkamrában 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 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 (Sp-stiffness parameter) az alábbi összefüggést használva határoztuk meg:

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

ahol ΔP (nN/μm²) 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 H₂O 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.

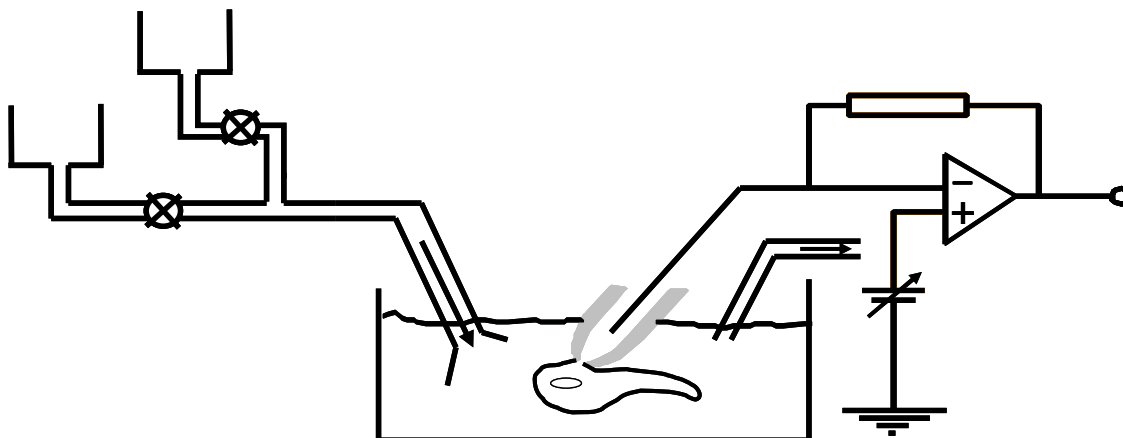


2. ábra A külső szőrsejtek falmerevségének vizsgálata

A külső szőrsejtek merevség vizsgálata mikrodeformációs technikákkal lehetséges, melyek során a külső szőrsejtek mechanikai hatásra adott alakváltozását vizsgálják (Oghalai és mtsai., 1998; Ulfendahl és mtsai., 1998). Az így kialakult alakváltozás mértékéből meghatározható a sejt hosszanti- (Ulfendahl, 1998) ill. oldalfal merevsége (Oghalai és mtsai., 1998). 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 sejtfal húzóerővel szembeni deformálódását méri, mely során a sejt oldalfalára mikropipettán keresztül ismert negatív nyomást csatolunk (Oghalai és mtsai., 1998; Lue és Brownel 1999). Ebben az esetben a sejtfal merevségét a sejtfal pipettába való behúzódásának mértékéből határozhatjuk meg. A mikrodeformáció meghatározására mindkét technika a külső szőrsejtekről készült felvételek vizuális elemzését használja

3.7. Ionáramok mérése

Méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük (3. ábra). A mérések a teljes-sejt konfiguráció elérése után 5-10 perc múlva kezdődtek. A kísérleteket minden esetben szobahőmérsékleten (22-24 °C) végeztük. A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark) üvegapillárisokból készítettük, majd hő alkalmazásával políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 4-6 MΩ volt. Méréseinkhez Axopatch 200 és 200A patch-clamp



3. ábra Teljes sejt patch-clamp vázlata

Méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük. A mérések a teljes-sejt konfiguráció elérése után 5-10 perc múlva kezdődtek. A kísérleteket minden esetben szobahőmérsékleten (22-24 °C) végeztük. A mérőkádba helyezett sejt teljes membránján átfolyó ionáramokat mérjük állandó feszültség mellett (voltage-clamp, feszültség-zár). Az oldatok cseréjéhez gravitáció hajtott perfúziós rendszert használtunk, a felesleges folyadékot folyamatosan elszívtuk.

erősítőket használtunk feszültség-zár üzemmódban. Az ingerlő feszültségimpulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Labmaster TL-1 illetve Digidata 1200 illesztőegységen keresztül a pCLAMP programcsomag segítségével (6.0 és 8.0 verziók). Nagy áramamplitúdó illetve soros ellenállás esetén soros ellenállás kompenzációt (40-50%) alkalmaztunk. Az áramgörbéket 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztük. A mintavételezés frekvenciája a szűrők sávközépfrekvenciájának legalább kétszerese volt, a Nyquist teória értelmében.

3.8. A patch-clamp vizsgálatok során alkalmazott oldatok

Az extracelluláris oldat összetétele (mM-ban): 142 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂ és 1 MgCl₂ (Sigma, St. Louis, Mo). Az oldat pH-ját 7.4-re, míg ozmolaritását 320 mOsm-ra állítottuk be.

A különböző tetratetil-ammonium-Cl (TEA) oldatokat úgy készítettük, hogy a NaCl-ot azonos koncentrációban TEA-val helyettesítettük. A magas K⁺ koncentrációjú külső oldatban a NaCl-ot KCl-dal helyettesítettük.

Az ATP-t közvetlenül a külső oldatban oldottuk fel. A peptid típusú K^+ csatorna blokkoló szerekkel - Margatoxin, Charybdotoxin, Pandius Imperátor toxin, (MgTx, ChTx, PIIITx) - történő mérések esetén az extracelluláris oldat tartalmazott még 0,1 mg/ml BSA-t is, hogy csökkentsük a toxin műanyag felületekhez történő adszorpcióját.

Az egyes csatornagátló szereket a következő módon adtuk a sejtekhez: a külső oldat folyamatos perfúziójával cseréltük a sejtet érő oldat összetételét. A folyadékáramlást a gravitáció hajtotta, az irányítást manuálisan csapokkal illetve elektromágneses szelepekkel végeztük. A folyadéktöbbletet folyamatos szívással távolítottuk el (3. ábra).

3.9. Az adatok kiértékelése

A mérések során nyert áramgörbéket a kiértékelés kezdetén szoftveresen korrigáltuk ohmikus szivárgási áramra, amennyiben ennek nagysága nem volt elhanyagolható. A görbéket digitálisan szűrőztük három pontos boxcar módszerrel. A mért pontokhoz az egyes függvények illesztését a Marquardt-Levenberg algoritmus segítségével végeztük. Az illesztéseket a mért és számított adatpontok közötti különbségek négyzetének összegével jellemeztük. A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását önkontrollos illetve kétmintás t-próbával végeztük el, $p = 0,05$ szignifikanciaszint mellett. A mérési adatoknál az átlagértéket és annak közepes hibáját (SE) adtam meg.

4. Eredmények

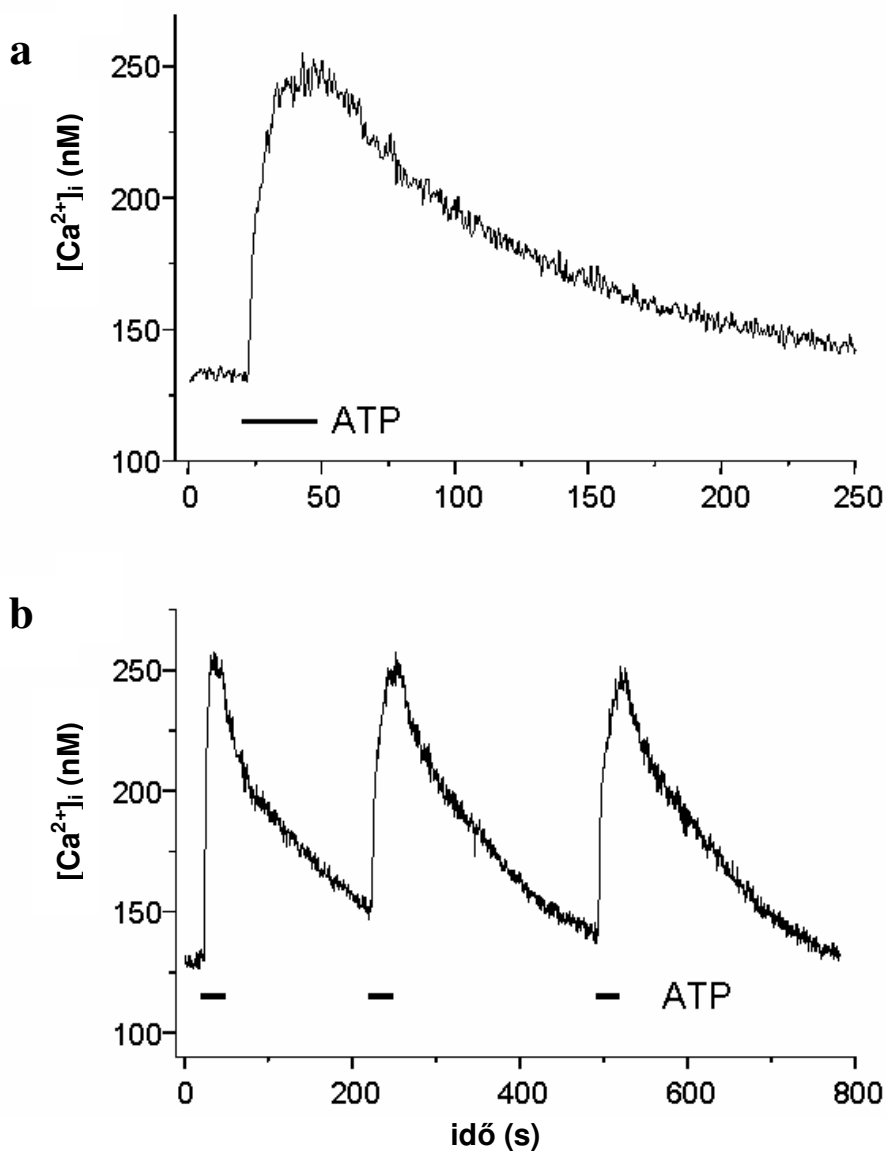
4.1. Az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikája és farmakológiai vizsgálata a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben

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

A külső szőrsejtben mért nyugalmi citoszolikus Ca^{2+} koncentráció 120 ± 4 nM-nak adódott (átlag $\pm$ SE, n=35). Míg a nyugalmi Ca^{2+} koncentráció tekintetében a külső szőrsejtek homogén csoportot alkottak, addig 180 μM ATP-vel létrehozott Ca^{2+} tranziensek alapján a külső szőrsejteket két csoportba sorolhattuk (1. táblázat). A sejtek egyik csoportjában (n=14) az ATP adagolás hatására kialakult intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés 186 ± 36 nM (átlag $\pm$ SE), a válasz kialakulásához szükséges idő pedig $5,9 \pm 1,0$ s volt (4. ábra, 1. táblázat). Ezekben a sejtekben miután az intracelluláris Ca^{2+} szint visszatért a nyugalmi értékre, az ATP válasz ismételhető volt. A sejtek másik csoportja esetén (n=15) a Ca^{2+} szint emelkedés 74 ± 10 nM, míg a válasz kialakulásához szükséges idő $12,3 \pm 1,9$ s-nak adódott (5. ábra, 1. táblázat). Az ATP hatására megemelkedett Ca^{2+} szint nem tért vissza a nyugalmi értékre és az ATP-re adott válasz sem volt megismételhető.

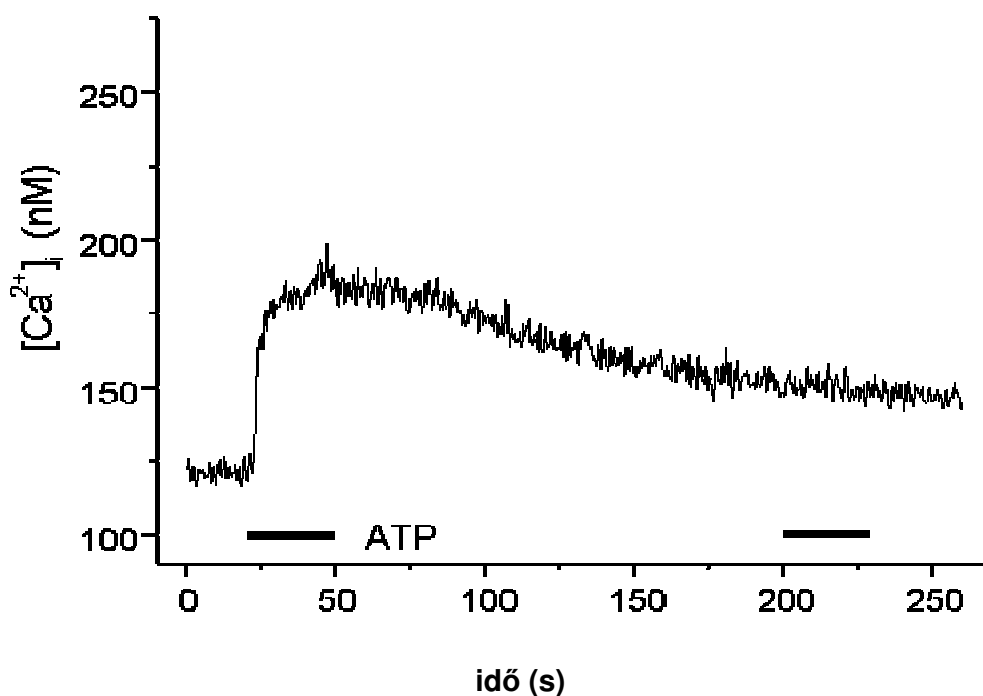
	gyors válasz n=14	lassú válasz n=15
nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)	132.7 ± 12.3	111.5 ± 8.1
amplitúdó (nM)	185.5 ± 35.7	74.1 ± 9.6
latencia(s)	5.9 ± 1	12.3 ± 1.9
ismételhetőség	+	-

1. táblázat: 180 μM ATP hatására kialakuló Ca^{2+} válasz a külső szőrsejtben



4. ábra Extracelluláris ATP által kiváltott gyors Ca^{2+} tranziensek

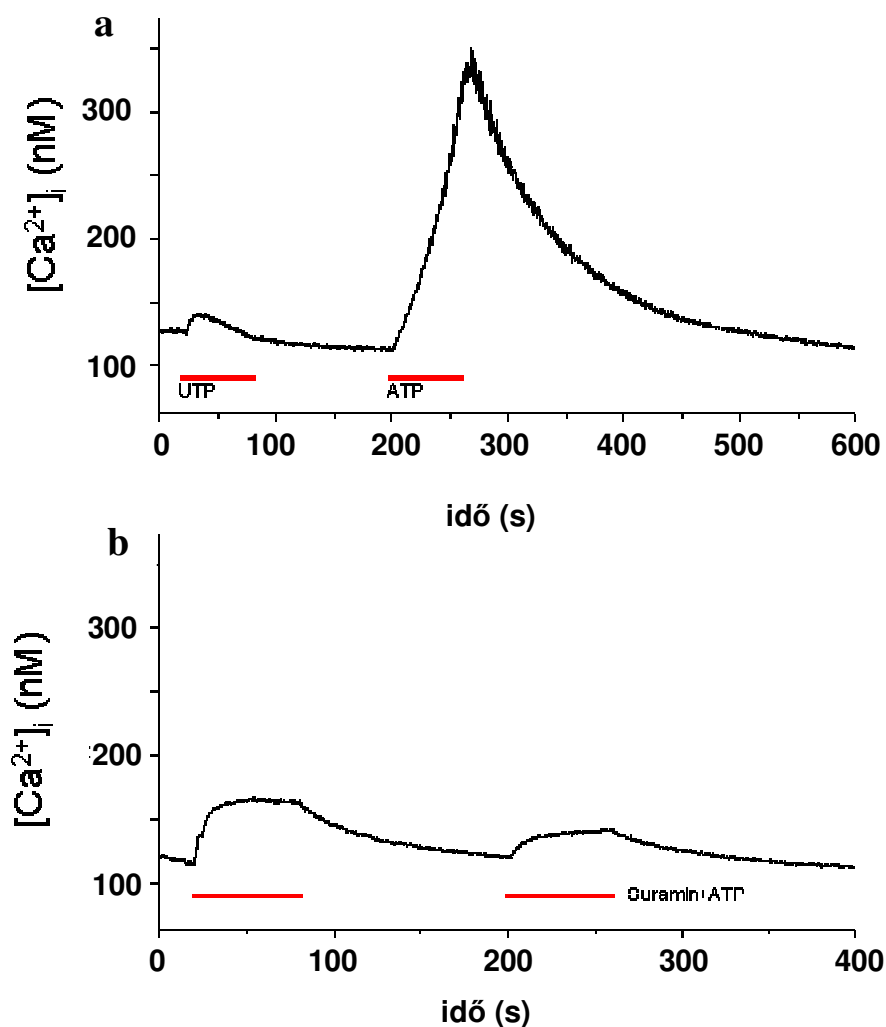
(a) 180 μ M ATP 30 másodpercig történő alkalmazásával kiváltott, gyorsan kialakuló Ca^{2+} tranziens izolált külső szőrsejten ($l=60 \mu$ m). Az ATP adása után gyors intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést mértünk, mely rövid latencia idő után alakult ki. (b) 180 μ M ATP ismételt adása után kialakuló Ca^{2+} válasz. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés ATP adása után ismételten kialakult, majd visszatért a nyugalmi szintre, és újból kiváltható volt.



5. ábra Extracelluláris ATP által kiváltott lassú Ca^{2+} tranziensek

180 μ M ATP adásával kiváltott, lassan kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés a külső szőrsejtben ($l=60 \mu$ m). A sejt Ca^{2+} szint emelkedése kisebb mértékű volt, nagyobb latencia idő után alakult ki és nem tért vissza a nyugalmi értékre. ATP ismételt adása után nem lehetett kiváltani a Ca^{2+} választ.

A kapott eredmények alapján több receptor altípus jelenléte volt feltételezhető a KSZ sejtmembránjában. Ennek igazolására 180 μ M UTP-t (P_{2y} agonista) adtunk a sejtekhez, minek hatására az átlagos Ca^{2+} szint emelkedés 48 ± 11 nM volt ($n=5$). Az UTP-re kialakult válasz nagysága kisebb volt, mint ATP adásakor, és azon sejtek közül, melyek reagáltak ATP adására 58 %-uk nem reagált UTP adására (6. ábra). Suramin, mely P_{2X} receptor antagonist, nagymértékben blokkolta az ATP-vel létrehozott Ca^{2+} szint emelkedést (26 ± 10 nM, $n=9$; 6. ábra).



6. ábra Extracelluláris UTP és ATP által kiváltott Ca^{2+} tranziensek és gátolhatóságuk

(a) 180 μ M UTP adása után kialakult Ca^{2+} tranziens. A külső szőrsejthez ($l=60 \mu$ m) először 60 másodpercig 180 μ M UTP-t, majd 120 mp után 180 μ M ATP adtunk. A 180 μ M UTP-re kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés 20 nM-nak, 180 μ M ATP adás hatására 240 nM-nak adódott. 180 μ M ATP adására reagáló sejtek 58%-a nem reagált 180 μ M UTP-re. (b) Suraminnal részlegesen gátolni lehetett az ATP-re kialakuló Ca^{2+} tranziens.

4.1.2. A tengerimalacok külső szőrsejtjeinek purinerg receptor mintázata

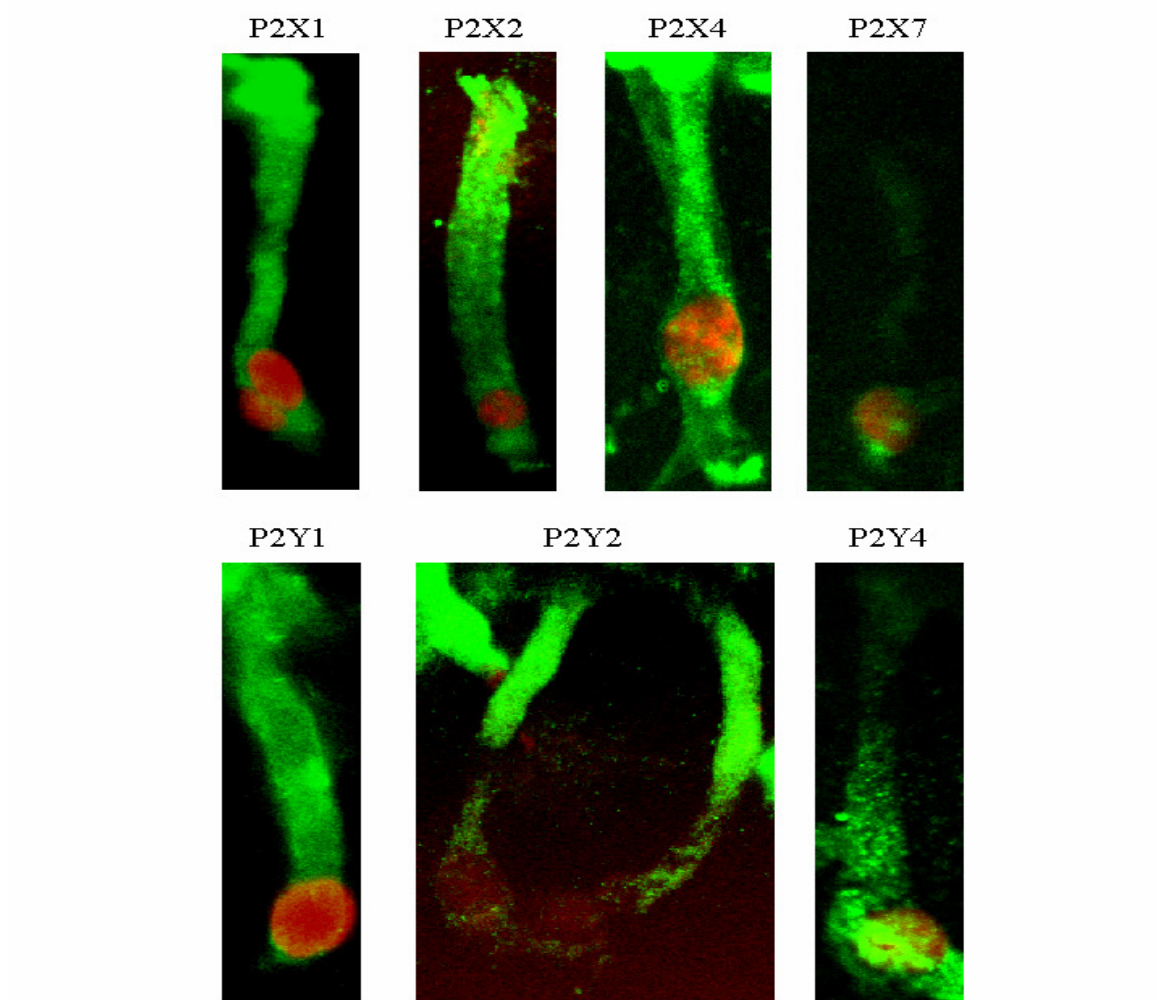
A receptor altípusok közül intenzív festődést találtunk a P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} esetén (7. ábra). A P_{2X7} receptor altípus esetén a festődés gyenge volt. A sejtmembránban egyenletes receptor eloszlást találtunk a P_{2X1} , P_{2X4} , P_{2Y1} esetén, míg P_{2X7} és a P_{2Y4} főként a bazális póluson, a P_{2X2} és a P_{2Y2} pedig főként az apikális harmadban, közel a kutikuláris lemezhez fordult leginkább elő (7. ábra). Az eredményink alapján készített, a purinerg receptorok eloszlását mutató rajz a 8. ábrán látható.

4.2. A zajterhelés hatása a purinerg receptorok expressziójára, valamint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikájára a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.

További kísérleteink során a zaj expozíció hatását vizsgáltuk ezen sejtek purinerg receptor eloszlására, sejtfelszíni expressziójára és a sejtek nyugalmi Ca^{2+} szintjére, valamint az ATP adásakor kialakult Ca^{2+} tranziensekre.

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

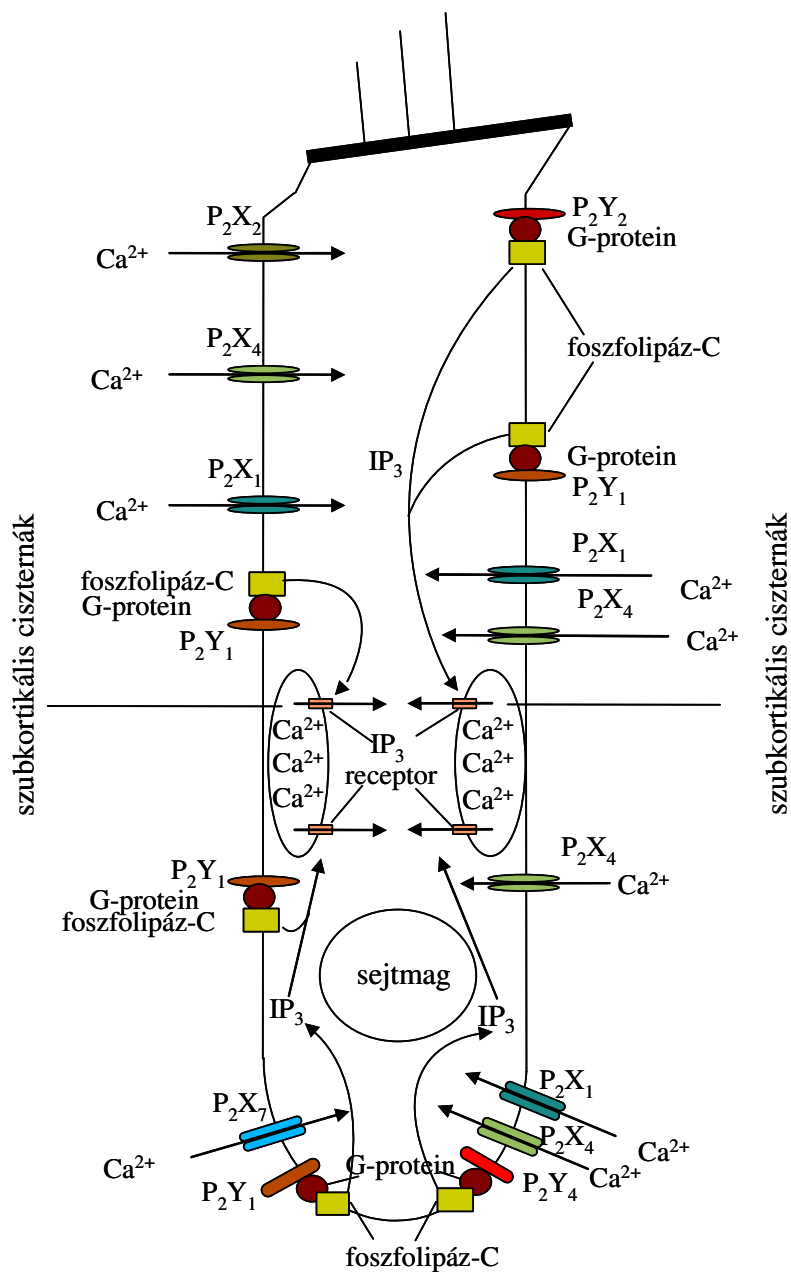
Kísérleteink során 14 napig tartó, napi 24 órán keresztül adott 80 dB zaj expozíció hatását vizsgáltuk tengerimalac ($n=30$) izolált külső szőrsejtek nyugalmi Ca^{2+} szintjére, ATP hatására kialakuló intracellularis Ca^{2+} szint emelkedésre, illetve sejt membránjában elhelyezkedő purinerg receptorok expressziójára és eloszlására. Kezeletlen állatokban a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a külső szőrsejtekben 133 ± 12 nM volt ($n=14$). 180 μ M 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



7. ábra A purinerg receptor altípusok expressziója a külső szőrsejtek felszínén.

Az ábrán a P_2 receptor altípusok megjelenése és eloszlása látható a sejtmembránban. Intenzív jelölődés volt megfigyelhető P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2Y1} , P_{2Y2} , és P_{2Y4} esetén, míg a jelölődés gyenge volt a P_{2X7} esetén. A receptorok eloszlása a membránban nem volt minden típusnál egyenletes. Homogénnek találtuk a megoszlást a P_{2X1} , P_{2X4} , és P_{2Y1} esetén. A P_{2X2} , és a P_{2Y2} főként a sejt apikális területén, míg a P_{2X7} , és a P_{2Y4} sejt bazális területén expresszáldott.

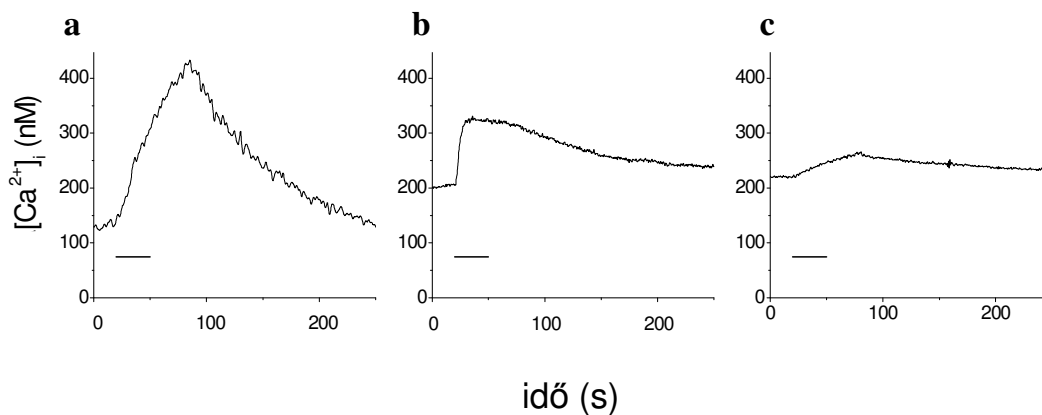
Ca^{2+} szint emelkedés. Méréseinket azon sejteken végeztük, melyek megfeleltek az ép sejt morfológiai kritériumainak, mint például a cilindrikus sejthalak, ép sztereocílium, a sejtmag a sejt bazális területén helyezkedett el. Ezen sejtekben a nyugalmi Ca^{2+} szint magasabbnak adódott a kontroll sejtekhez képest (2. táblázat). Különbséget találtunk az apikális és a bazális sejtek között (9. ábra). Zaj expozíció után a cochlea apikális csavarulatain elhelyezkedő sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 181 ± 24 nM ($n=11$), míg a bazális csavarulat sejtjei



8. ábra A purinerg receptor altípusok expressziója a külső szőrsejtek felszínén az immunfluoreszcens vizsgálatok alapján.

A külső szőrsejt membránjában egyenletes receptor eloszlást találtunk a P₂X₁, P₂X₄, P₂Y₁ esetén, míg P₂X₇ és a P₂Y₄ főként a bazális póluson, a P₂X₂ és a P₂Y₂ pedig főként az apikális harmadban, közel a kutikuláris lemezhez fordult leginkább elő.

között 219±29 nM (n=8) volt (2. táblázat). A 180 μM ATP (30 s) adása után kialakuló Ca²⁺ 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. táblázat).



9. 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 μ M 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 μ M ATP (30 s) adása után kialakuló Ca^{2+} szint emelkedés az apikális sejtben 127 nM ($l=60 \mu$ m), míg (c) a bazális sejtben ($l=40 \mu$ m) 44 nM volt. A vízszintes vonalak az ATP alkalmazásának időzítését és hosszát mutatják.

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

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

4.2.2. A zajkezelt tengerimalacok belső füléből izolált külső szőrsejtek 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 $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{X}7}$ and $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ receptorok intenzitása az immunfestés során csökkent, míg a $\text{P}_{2\text{Y}2}$ altípus intenzitása nem változott. A korábban megfigyelt egyenlőtlen sejtfelszíni purinerg receptor eloszlás a zajkezelés után eltűnt, a receptorok eloszlása homogén volt. Nem találtunk különbséget a receptorok mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitásban sem a sejt apikális és bazális területei között (10. ábra).

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

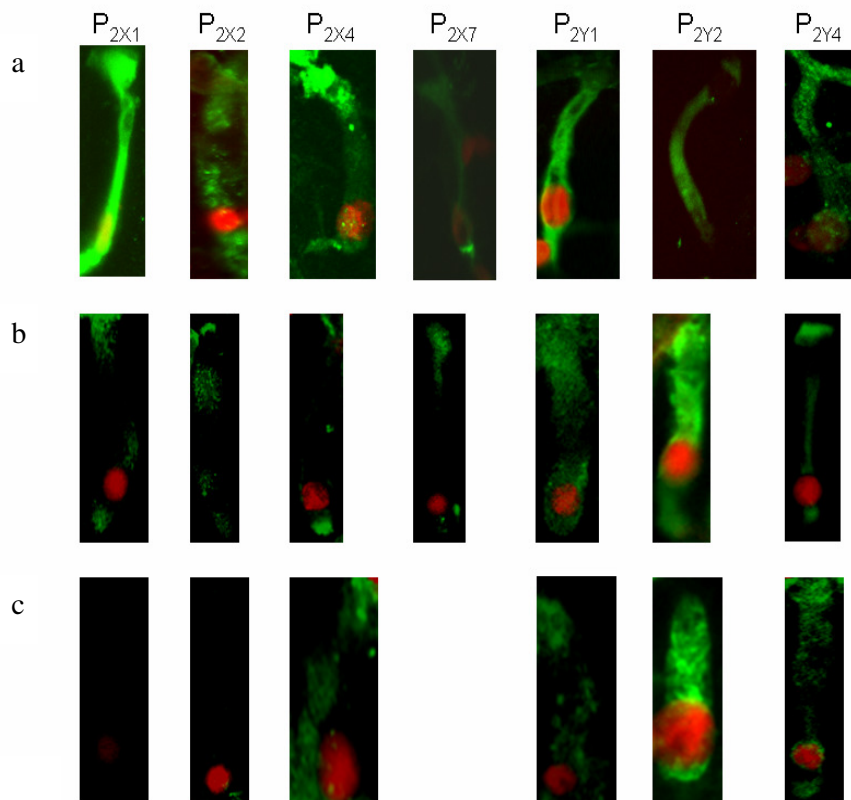
Batta és mtsai (2003; 2004) korábbi tanulmányaikban elemezték a mechanikai hatás által kiváltott membránmerevség választ, mely a KSZ belső vékező rendszerének része. Ezen mechanizmus növeli a KSZ falmerevségét, mely védekező szerepet játszik tartós zajterhelés esetén (Batta és mtsai., 2003; 2004).

A harmadik 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.

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

3. táblázat: A zaj expozíció hatása a sejt fal merevség (Sp) paramétereinek változására



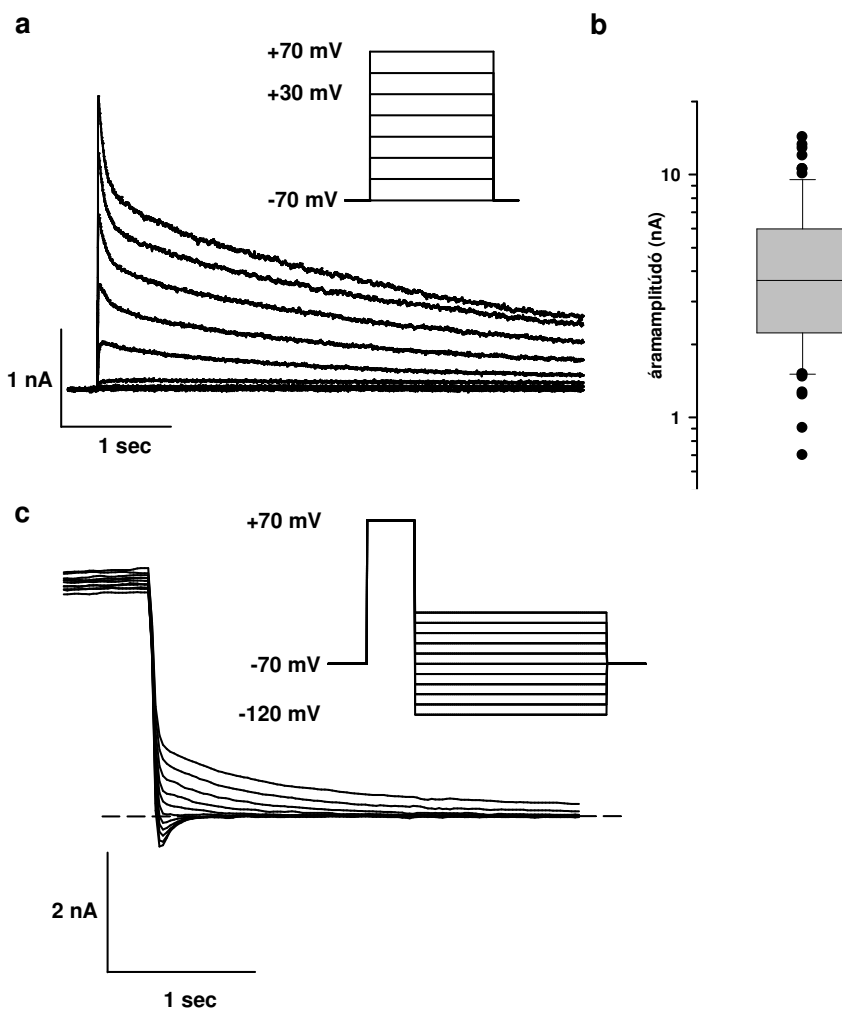
10. ábra Zaj expozíció hatása a purinerg receptor expresszióra

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.

4.3. A K^+ áramok karakterisztikájának vizsgálata a tengerimalacok belső fülének

Deiters sejtjeiben

A 11.a. ábrán egy Deiters sejten teljes sejt konfigurációban mért áramgörbe látható. A sejt membránpotenciálját -70 mV-os tartófeszültségről $+70$ mV-ig 10 mV-os lépésenként különböző tesztpotenciálokra módosítottuk. Az egyes depolarizáló impulzusok között 60 másodperc telt el. -30 mV-nál pozitívabb tesztfeszültségek esetén kifelé irányuló áram aktiválódott, melynek aktivációs kinetikája gyorsabbá vált, és az áram amplitúdója



11. ábra Deiters sejtek feszültségfüggő, kifelé irányuló káliumáramai.

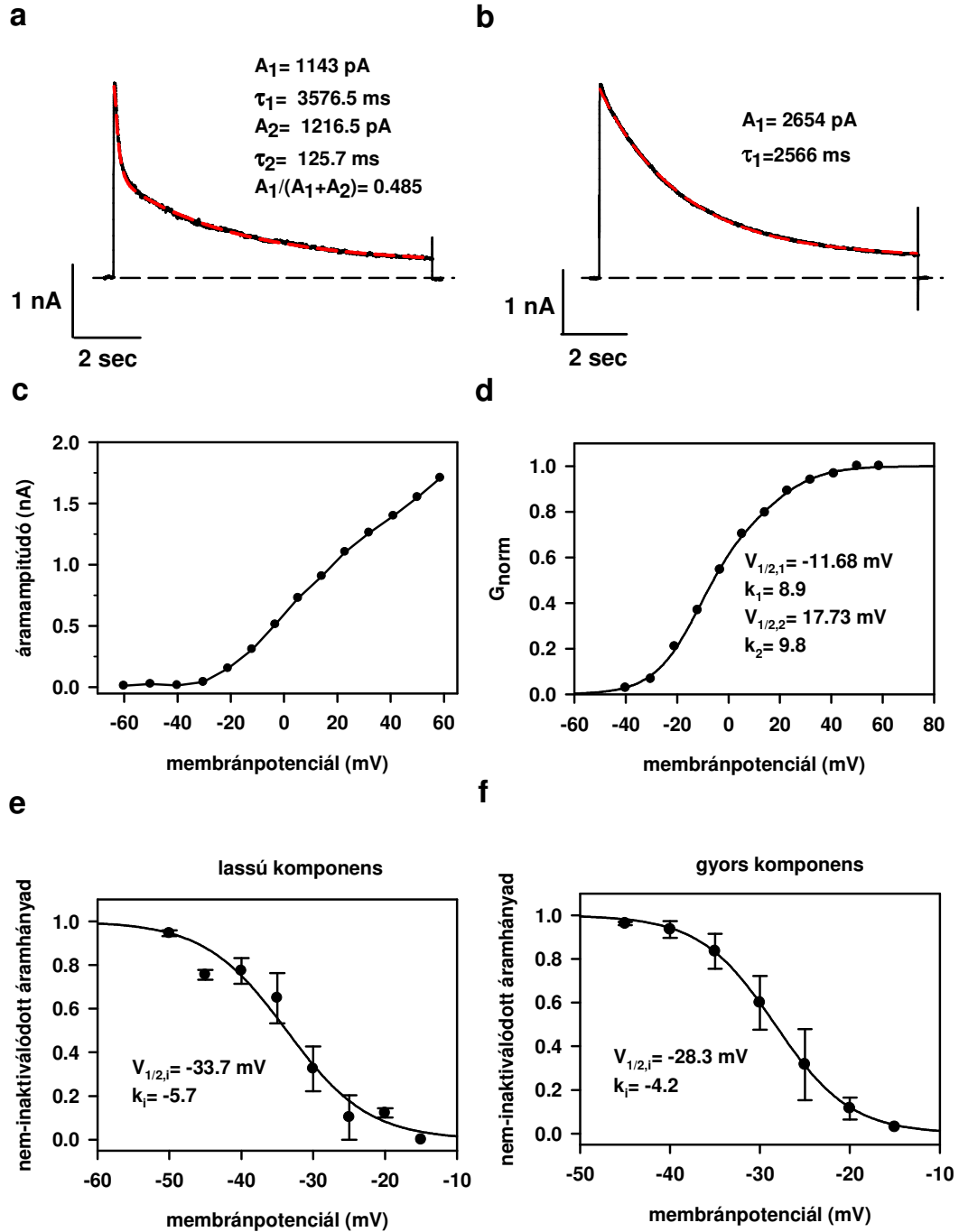
(a) Deiters sejteken mért ionáramok. A sejtet -70 mV-os tartófeszültségről -70 mV-tól $+70$ mV-ig 10 mV-os lépésenként különböző tesztpotenciálokra depolarizáltuk, az egyes depolarizáló impulzusok között 60 másodperc telt el. Az ábrán az áttekinthetőség kedvéért csak minden második áramgörbét tüntettük fel. Az áramgörbék leszálló szára az áram inaktivációját reprezentálja. Az inaktiváció jól láthatóan kétfázisú, egy gyors és egy lassan inaktiválódó komponens látható (az ábrán az áramgörbe kezdeti 5 másodperces szakaszát tüntettük fel a gyorsan inaktiválódó komponens kiemelése érdekében). (b) A $+50$ mV-os tesztimpulzusok során mért áramamplitúdók az egyes sejtek esetén nagy variabilitást mutatnak, a csúcsáramok mediánja 2626.7 pA. A dobozok alsó és felső határai a 25 és a 75 percentilist, a hibajelek a 10 és a 90 percentilist, a pontok pedig a kiugró értékeket jelentik. (c) Egy Deiters sejt „farokáramai”. A sejtet -70 mV-os tartófeszültségről 50 ms időtartamra $+70$ mV-ra depolarizáltuk, majd -120 mV és -20 mV tartományban 10 mV-onként különböző feszültségekre léptünk. Az egymást követő $+70$ mV-os depolarizáló impulzusok között 30 másodperc telt el. Ezen sejt esetében a megfordítási potenciál -73.8 mV.

fokozatosan növekedett egyre pozitívabb depolarizáció esetén. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az áramok kialakulásáért feszültségfüggő ioncsatornák felelősek. Az áram egyensúlyi potenciáljának meghatározására „farokáram” méréseket végeztünk. A sejteket -70 mV-on tartottuk és 30 másodpercenként 50 ms időtartamig + 70 mV-ra depolarizáltuk (11. ábra c panele). Ez után különböző teszt feszültségekre léptünk vissza -120 mV-tól -20 mV-ig 10 mV-os lépésekben. Az áram egyensúlyi potenciáljára $-69,3 \pm 2,4$ mV ($n=5$) adódott, ami jó egyezést mutat a K^+ ionokra a Nernst egyenlet és az intra-, és extracelluláris oldatok összetétele alapján számított értékkel (-83,5mV). A számított és a mért értékek közötti eltérést a szivárgási áram és az oldatsere kapcsán jelentkező diffúziós potenciál okozhatja. Ezen adatok alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgált áram káliumra szelektív. Összesen 77 Deiters sejt kálium áramát vizsgáltuk meg, melyek +50 mV-os tesztimpulzusok során mért amplitúdói sejtről sejtre igen jelentős variabilitást mutattak (11.b ábra) A csúcsáramok mediánja 3,66 nA volt, de megfigyeltünk 0,7 és 13,2 nA szélső értékeket is.

4.3.1. A K^+ áramok elkülönítése a különböző inaktivációs kinetika alapján Deiters sejtekben

Hosszan tartó depolarizáció esetén az ionáram csökkenése figyelhető meg, ami a csatornák inaktivációjára utal. A 11.a ábrán látható, hogy az ionáram csökkenése igen lassú, és 0 mV-nál pozitívabb teszt feszültségek esetén kétfázisú; tartalmaz egy gyorsabb és egy lassabb komponenst. Nenov és mtsai (1998) korábban beszámoltak arról, hogy a Deiters sejteken mért áramért több K^+ szelektív csatorna aktivációja felelős.

A 12.a ábra egy Deiters sejten regisztrált áramgörbét mutatja +50 mV teszt feszültség alkalmazása során. Az áramcsökkenés lassú és gyors komponst rendre a τ_1 és τ_2 inaktivációs időállandókkal jellemeztük. Az inaktivációs időállandók meghatározásához az áramgörbék csökkenő tartományát egy, két exponenciális tag összegeként előállított függvénnyel



12. ábra Deiters sejtek káliumáramainak biofizikai karakterizálása

A vonatkozó ábramagyarázatot ld. a következő oldalon.

12. ábra Deiters sejtek káliumáramainak biofizikai karakterizálása

(a és b) Két különböző Deiters sejten teljes sejt konfigurációban mért káliumáramok. A sejtet -70 mV-os tartófeszültségről 10 másodperc időtartamra +50 mV-ra depolarizáltuk. Az egymást követő tesztimpulzusok között 60 másodperc telt el. Az a panelen bemutatott áramgörbe leszálló szára két exponenciális tagot tartalmazó, míg a b panelen látható áramgörbe egy exponenciális tagot tartalmazó függvény (részleteket lásd a szövegben) segítségével illeszthető. A szaggatott vonalak a legjobban illeszkedő függvényeket mutatják. (c) Deiters sejteken mért áram-feszültség (I-V) görbék. A teljes-sejt áramokat 100 ms hosszú depolarizáló impulzusok alatt mértük. A sejtet -70 mV-ról -70 és +50 mV között 10 mV-os lépésekben különböző feszültségekre depolarizáltuk, és áramamplitúdókat a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. (d) A c panelen bemutatott I-V görbéből számolt vezetőképesség-feszültség (G-V) görbe. A vezetőképességet a mért csúcsáramokból a következő képlet segítségével számoltuk: $G_K = I_K / (E_m - E_K)$, ahol G_K a teljes-sejt K^+ -specifikus vezetőképessége, I_K az áramamplitúdó, E_m az aktuális membránpotenciál, E_K a K^+ áram megfordítási potenciája. A G_K értékeket a legnagyobb értékre normalizáltuk, és az így kapott G_{norm} értékeket a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. A G-V görbéket két Boltzmann-függvény súlyozott összegével illesztettük. Az alkalmazott súlyfaktorok a gyorsan és lassan inaktiválódó komponensek relatív arányának felelnek meg, amelyeket a +50 mV-on mért inaktivációs kinetika illesztése során nyertünk. A G-V görbék illesztése során kapott eredmények az ábrán láthatók. (e és f) A gyorsan és lassan inaktiválódó áramkomponensek egyensúlyi inaktivációjának feszültségfüggése. Az adatpontokat egykomponensű Boltzmann-függvény segítségével illesztettük, melynek eredménye az ábrán látható. Az adott membránpotenciálon nem-inaktiválódott áramkomponens kiszámításának módszerét lásd a szövegben.

illesztettük $I = A_1 \times (e^{-t/\tau_1}) + A_2 \times (e^{-t/\tau_2}) + C$, ahol A_1 és A_2 rendre a lassú és a gyors komponensek amplitúdói, C pedig a nem inaktiválódó áramkomponens.

Az inaktivációs időállandók sejtről sejtre kis szórást mutattak, τ_1 és τ_2 értékei 2735 ± 90 ms ($n=77$), és 160 ± 14 ms ($n=72$) voltak. Ezzel szemben a lassú komponens relatív súlya nagy szórást mutatott. Az $A_1 / (A_1 + A_2)$ értéke 0,4 és 0,9 között mozgott. Öt sejt esetén egy komponensű inaktivációs kinetikát figyeltünk meg (12.b ábra). Ezekben a sejtekben az áramgörbe csökkenő része egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel jól illeszthető volt. Az így meghatározott inaktivációs időállandó ($\tau=3008 \pm 188$ ms) hasonló volt a kétfázisú inaktivációs kinetikát mutató sejtek lassú inaktivációs időállandójához.

A nagy depolarizációs feszültségek esetén tapasztalt kétfázisú inaktivációs kinetika arra utalt, hogy a két áramkomponens steady-state aktivációjának feszültségfüggése valószínűleg különböző, ezért ezt a feltevést részletesen megvizsgáltuk. A K^+ áram

áramamplitúdó-feszültség függvényét (I-V) a következő protokollal határoztuk meg: -70 mV-os tartó feszültségről 100 ms hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk -120 mV-tól +100 mV-ig terjedő tartományban 10 mV-os lépésekben és meghatároztuk a csúcsáramok értékeit (12.c ábra). A csúcsáramok értékeiből minden tesztfeszültségnél meghatároztuk a teljes sejt konduktanciát a következő egyenlet alapján: $G_K = I_K / (E_m - E_K)$, ahol G_K a teljes sejt K^+ konduktancia, I_K áramamplitúdó, E_m az alkalmazott tesztfeszültség, E_K pedig a K^+ egyensúlyi potenciálja. Ez után a G_K értékeket normáltuk az adott sejten mért maximális G_K értékre, hogy megkaphassuk a G_{norm} értékeket, melyeket az alkalmazott tesztfeszültség függvényében ábrázoltunk. Egy ily módon elkészített G-V függvényt mutat be a 12.d ábra. Az ábrán látható, hogy a két áramkomponens feszültségfüggő kapuzásának várt szétválása nem egyértelmű.

A két áramkomponensre külön-külön vonatkozó steady-state aktivációjának feszültségfüggését jellemző értékek meghatározásához a G-V függvényeket két Boltzmann függvény összegével illesztettük kényszerfeltétel mellett. A kényszerfeltétel a két áramkomponens relatív súlya volt, melyet a +50 mV-on regisztrált áramgörbék inaktivációs kinetikájának analíziséből határoztunk meg. A G-V függvények illesztéséhez használt

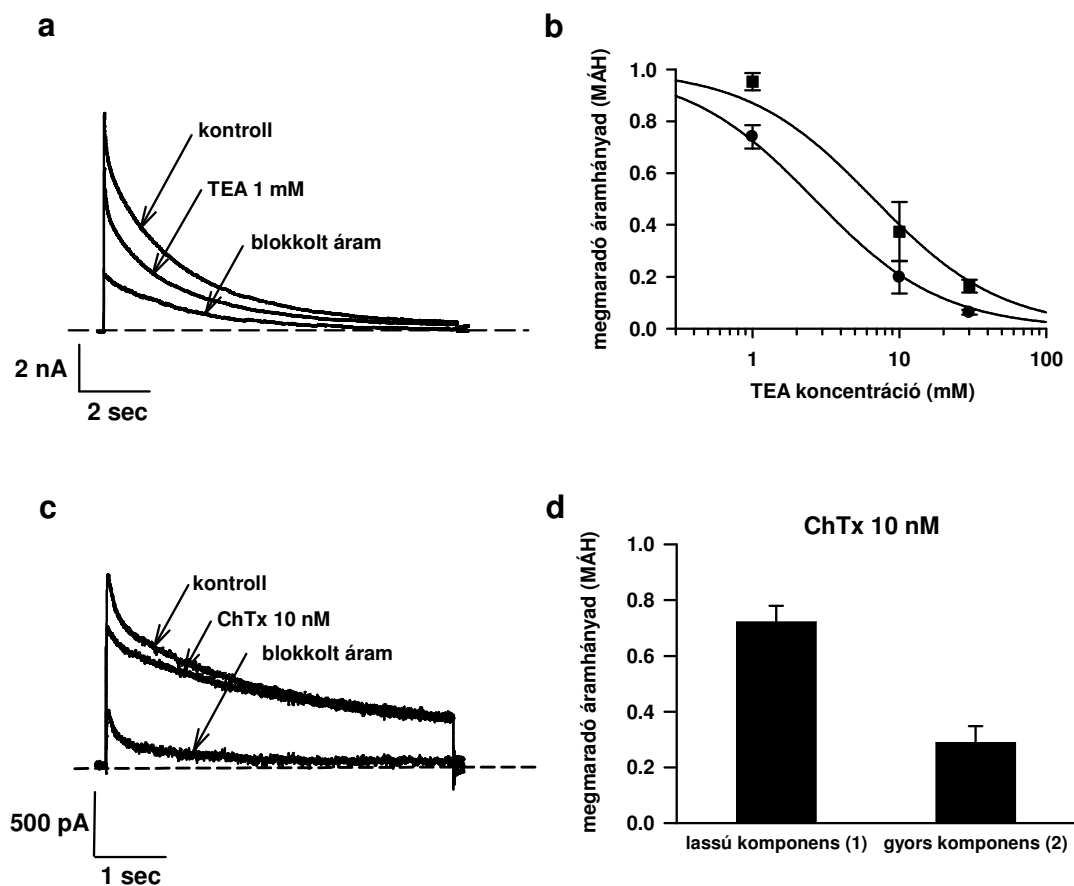
$$\text{függvény az alábbi volt: } G_{norm} = \frac{A_1 / (A_1 + A_2)}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2,1}}{k_1}}} + \frac{A_2 / (A_1 + A_2)}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2,2}}{k_2}}},$$

ahol $V_{1/2,1}$ és k_1 a lassú komponens G-V függvényének középpontja és meredeksége, míg a kettes index ugyanezen paramétereket jelenti a gyors komponensre nézve. A kapott értékek $V_{1/2,1} = -1.42 \pm 2.68$ mV, $k_1 = 11.93 \pm 1.15$ mV, $V_{1/2,2} = 12.48 \pm 3.85$ mV, $k_2 = 15.2 \pm 3.6$ (n=12) voltak, melyek a G-V függvények ~14 mV-os szétválását mutatták. A $V_{1/2}$ és k értékeket úgy is meghatároztuk, hogy az áramgörbék leszálló szárát illesztettük két exponenciális tag összegével és meghatároztuk a komponensek amplitúdóit (A_1 és A_2) különböző tesztfeszültségek esetén. Az A_1 és A_2 ismeretében az áramkomponensekre külön-külön, a

fentebb ismertetett eljárással I-V és G-V összefüggéseket készítettünk. A G-V összefüggések egy tagot tartalmazó Boltzmann függvényvel történő illesztése a következő eredményeket adta: $V_{1/2,1} = -3.38 \pm 2.84$ mV, $k_1 = 12.24 \pm 1.81$ mV és $V_{1/2,2} = 9.1 \pm 1.06$ mV, $k_1 = 9.68 \pm 2.73$ (n=3). Ezek az értékek nagyon hasonlóak a kényszerfeltétel mellett, két Boltzmann függvény összegével történő illesztéskor kapott értékekhez, ami az eredmények megbízhatóságát jelzi. Szintén az áramgörbék inaktivációs kinetikájának illesztéséből meghatározott amplitúdókat (A_1 , A_2) használtuk fel a két áramkomponens steady-state inaktivációjának feszültségfüggését leíró függvények elkészítéséhez. A tartó feszültséget -70 mV-nak választottuk, és két +70 mV amplitúdójú 10 s hosszú depolarizáló impulzust alkalmaztunk, melyek között a tartó feszültséget 150 s időtartamra -65 mV és 0 mV közötti értékekre állítottuk be 5 mV-os lépésekben. Az áramgörbék inaktivációs kinetikáját két exponenciális tag összegét tartalmazó függvényvel illesztettük, és a -70 mV-os tartófeszültség és a pozitívabb tartófeszültség (h) esetén meghatározott áramkomponensek arányát kiszámoltuk. Tehát az $A_{1,h}/A_{1,-70}$ és a $A_{2,h}/A_{2,-70}$ arányok a nem inaktiválódott csatornák arányát jelentik a lassú illetve a gyors áramkomponensre h tartó feszültség esetén. Mivel ez a feszültség protokoll nagyon hosszú időtartamú, átlagosan 3-4 adatpontot tudunk meghatározni egy-egy sejten, ezért a különböző sejtekre kapott adatokat átlagoltuk az egyes teszt-feszültségekre. Így elkészíthettük a steady-state inaktiváció feszültségfüggését leíró függvényt külön-külön a lassan és a gyorsan inaktiválódó áramkomponensekre (12.e,f ábra). A görbéket Boltzmann függvényvel illesztettük és az alábbi értékeket kaptuk: $V_{1/2,i,1} = -33.7$ mV, $k_{i,1} = -5.7$ mV, $V_{1/2,i,2} = -28.3$ mV, $k_{i,2} = -4.2$ mV, melyek a steady-state inaktiváció feszültség függésének kismértékű, kb. 5 mV-os különbségét mutatják. Ezek az eredmények a steady-state aktiváció feszültségfüggésére kapott eredményekkel együtt arra utalnak, hogy a két áramkomponens feszültségfüggő kapuzása nagyon hasonló.

4.3.2. Az áramkomponensek farmakológiai szeparálása

Bár az áramok inaktivációs kinetikájának analízise már két K^+ csatorna jelenlétét mutatta Deiters sejtekben, kísérletet tettünk ennek bizonyítására farmakológiai módszerekkel, K^+ csatorna gátló szerek alkalmazásával. Várakozásunk az volt, hogy egy gátlószer alkalmazása, mely különböző hatékonysággal gátolja a két csatornatípust, az áramamplitúdó csökkenését és a teljes sejt áram inaktivációs kinetikájának változását kell hogy eredményezze. Megvizsgáltuk egy nem peptid gátlószer, a TEA és peptid gátlószerek (Margatoxin, Charybdotoxin, Pandius Imperator skorpió toxin) hatását a két áramkomponens amplitúdójára és az áram lecsengésének kinetikájára. Ezekben a kísérletekben a sejteket -70 mV-os tartó feszültségről +50 mV-ra depolarizáltuk 10 s időtartamra. Az áramgörbék lecsengő szakaszát két exponenciális tag összegét tartalmazó függvénnyel illesztettük és meghatároztuk a megmaradó áramhányadot a két komponensre a $M\acute{A}H(A_1)=A_1/A_{1,0}$ and $M\acute{A}H(A_2)=A_2/A_{2,0}$ képletek alapján, ahol A_x and $A_{x,0}$ rendre a megfelelő komponensek áramamplitúdói a gátlószer jelenlétében illetve kontroll körülmények között. A 13.a ábrán kontroll körülmények között és 1 mM TEA jelenlétében mért áramgörbék láthatók, valamint a blokkolt áram, melyet a kontroll görbe és a TEA jelenlétében mért görbe különbségeként határoztunk meg. Az ábrán jól látható, hogy a gátolt áram főként a lassan inaktiválódó komponensre tartalmazza ($\tau=2430$ ms), amit jól lehetett illeszteni egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel. A teljes áramra nézve a megmaradó áramhányad 1 mM TEA jelenlétében $0,81 \pm 0,03$ ($n=3$) -nak adódott. A megmaradó hányad a lassú komponensre $M\acute{A}H(A_1)=0,74 \pm 0,05$, ($n=3$), míg a gyors komponensre $M\acute{A}H(A_2)=0,95 \pm 0,03$ ($n=3$) volt. Magasabb TEA koncentrációk esetén mindkét komponens jelentős gátlását lehetett kimutatni. A dózis-hatás görbék a 13.b ábrán láthatóak. A lassú illetve gyors komponensre meghatározott disszociációs állandók rendre 2,63 mM és 6,70 mM-nak adódtak.



13. ábra Deiters sejtek káliumáramainak farmakológiai karakterizálása.

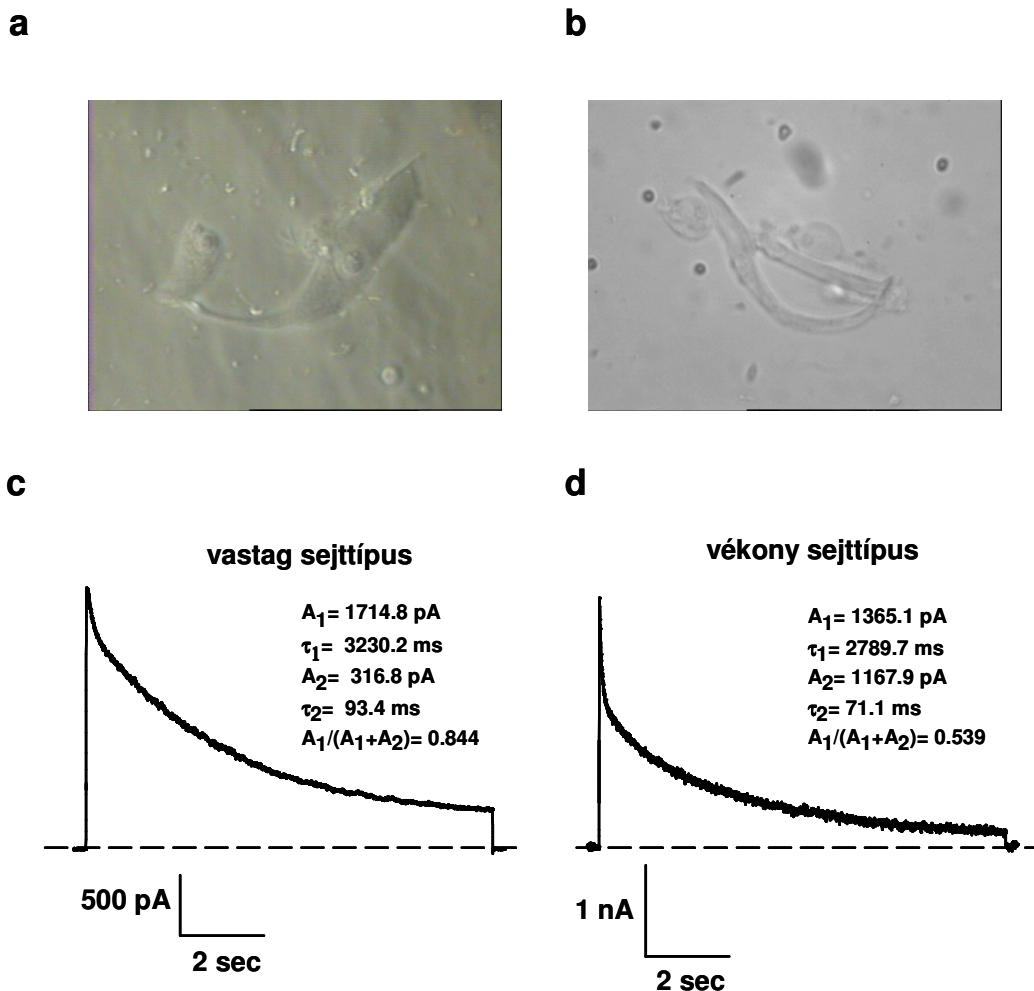
Az ionáramokat teljes sejt konfigurációban mértük, a sejtet -70 mV-os tartófeszültségről 10 másodperc időtartamra +70 mV-ra depolarizáltuk. Az egymást követő teszimpulzusokat 60 másodpercenként alkalmaztuk. Az áramgörbéket két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illesztettük, a megmaradó áramhányadot (MÁH) a következő képlettel számoltuk: $MÁH(A_1) = A_1/A_{1,0}$ és $MÁH(A_2) = A_2/A_{2,0}$, ahol A_x és $A_{x,0}$ rendre a toxin jelenlétében és kontroll körülmények között mért áramamplitúdókat jelentik. (a) Kontroll körülmények között és 1 mM TEA jelenlétében mért káliumáramok. A harmadik áramgörbe (blokkolt áram) a kontroll körülmények között és az 1 mM TEA jelenlétében mért áramgörbe különbségét mutatja. (b) A TEA dózis-hatás görbéje a lassan (körök) és a gyorsan (négyzetek) inaktiválódó áramkomponensek esetén. Az adatpontokat 3 paraméteres Hill-egyenlettel illesztettük (részleteket lásd a szövegben). A K_d érték 2.63 mM a lassan és 6.7 mM a gyorsan inaktiválódó komponens esetén. (c) Kontroll körülmények között és 10 nM ChTx jelenlétében mért káliumáramok. A harmadik áramgörbe (blokkolt áram) a kontroll körülmények között és a 10 nM ChTx jelenlétében mért áramgörbe különbségét mutatja. (d) A 10 nM ChTx jelenlétében mért megmaradó áramhányad az egyes áramkomponensek esetén. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) mutatják.

Margatoxin (MgTx) és Pandius Imperator skorpió toxin (Pi1) csaknem egyenlő mértékben gátolta, míg a Charybdotoxin (ChTx) különböző hatékonysággal gátolta a két áramkomponenst. A 13. c ábrán látható, hogy 10 nM ChTx alkalmazása jelentős mértékben lecsökkentette az áram gyors komponensét. A blokkolt áramkomponenst úgy kaptuk meg, hogy a kontroll görbéből kivontuk a 10 nM ChTx jelenlétében regisztrált görbét. A megmaradó áramhányad 10 nM ChTx jelenlétében a lassú kompoens esetén $0,72 \pm 0,06$ míg a gyors komponens esetén $0,29 \pm 0,06$ volt ($n=5$; 13.d ábra).

4.3.3. A K^+ áramok karakterisztikája morfológiailag különböző Deiters sejtekben

A sejt izolálása során különálló és külső szőrsejthez (KSZ) kapcsolódó Deiters sejteket kaptunk. Az +50 mV-os depolarizáció során mért áramamplitúdók lényegesen magasabbak voltak a külső szőrsejtekhez kapcsolódó Deiters sejtek esetén, mint a különálló sejteknél (az átlagos csúcsáramok $5,4 \pm 0,5$ nA ($n=40$) illetve $3,5 \pm 0,4$ nA ($n=37$) voltak; $p=0,0068$). Mivel gap junction összeköttetések kapcsolhatják össze a Deiters és a külső szőrsejteket, lehetséges, hogy a mért teljes sejt áramok a két sejt áramának összegét jelentik. Ebben az esetben a KSZ-hez kapcsolt Deiters sejt membránjának kapacitása magasabb lenne, mint az izolált Deiters sejté. A kísérletesen meghatározott Deiters sejt kapacitás $35,91 \pm 2,02$ pF ($n=29$) volt KSZ-hez kapcsolt, és $35,25 \pm 2,35$ pF ($n=25$) volt izolált Deiters sejtek esetén, amely értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól ($p=0,83$).

Morfológiai különbségeket sikerült kimutatni a preparált Deiters sejtek között. Azon sejtek, amelyek rövidebb KSZ-hez kapcsolódtak nagyobb sejttesttel és rövidebb falangeális nyúlvánnyal rendelkeztek, míg azok, amelyek hosszabb KSZ-hez kapcsolódtak vékonyabb sejttestük és hosszabb falangeális nyúlványuk volt. Az előzőket vastag, az utóbbiakat vékony típusú sejteknek neveztük el (14. ábra a és b). Ezen morfológiai tulajdonságok alapján a sejteket két morfológiai típusba soroltuk. Tekintettel arra, hogy a KSZ-ek mérete



14. ábra A Deiters sejtek morfológiája és a káliumcsatorna-expresszió közötti összefüggés. (a és b) Különböző morfológiai típusú Deiters sejtek. Az a panel egy rövid nyúlvánnyal rendelkező vastag sejtet mutat, míg a b panelen egy hosszú nyúlvánnyal rendelkező vékony sejt látható. (c és d) A vastag (c) és vékony (d) sejtípusra jellemző teljes-sejt áramok. A sejteket -70 mV-os tartófeszültségről 10 másodperc időtartamra +50 mV-ra depolarizáltuk. Az egymást követő teszimpulzusok között 60 másodperc telt el. Az áramgörbék leszálló szárát két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel illesztve a kapott eredményeket az ábrán láthatjuk. A lassan inaktiválódó komponens súlyfaktora 0.844 a vastag, míg 0.539 a vékony sejt esetén.

apikobazálisan és a sorok között is eltérő, az ezekhez kapcsolódó különböző morfológiájú Deiters sejtek elhelyezkedése is eltérő a cochleában.

A vastag típusú sejtekre +70 mV-on meghatározott csúcsáramok $3,7 \pm 0,5 \text{ nA}$ ($n=29$), míg a vékony típusú sejtekre $5,2 \pm 0,6$ ($n=36$) nA-nak adódtak. Nem találtunk különbséget a két sejtípus membrán kapacitásában [vékony típusú sejtek: $37,36 \pm 2,64 \text{ pF}$ ($n=19$); vastag

típusú sejtek: 33.13 ± 2.11 (n=25), $p=0.136$], de a sejtkapacitásra normált áramamplitúdók statisztikailag különböztek egymástól. Az áramsűrűség szignifikánsan magasabb volt a vékony sejttestű Deiters sejtekben [188.11 ± 23.14 pA/pF (n=19)], mint a vastag típusú sejtekben [114.23 ± 17.23 pA/pF (n=25)] ($p=0.012$). A 10 s-ig tartó +50 mV-os depolarizáló impulzusok alatt mért áramgörbék alakja is eltérő volt a két morfológiai típus között (14. ábra c és d). Az inaktiváció sebessége kisebb volt a vastag sejtek esetében, ami azonban nem tükröződött az inaktivációs időállandókban. Az inaktivációs időállandók a következők voltak: $\tau_1 = 2718 \pm 117$ ms (n=27), $\tau_2 = 190 \pm 28$ ms (n=25) a vastag típusú sejt esetén, és $\tau_1 = 2669 \pm 120$ ms (n=36), $\tau_2 = 136 \pm 17$ ms (n=35) a vékony típusú sejteknél. Nem találtuk szignifikánsnak a különbséget sem τ_1 értékek ($p=0.78$), sem a τ_2 értékek ($p=0.09$) esetén. A vastag sejttessel rendelkező sejteknek a vékony sejteknél lassabb inaktivációs kinetikája a lassú komponens nagyobb súlyarányának volt köszönhető. A lassú komponens súlyaránya [$A_1/(A_1 + A_2)$] 0.736 ± 0.033 volt a vastag sejteknél (n=27) és 0.522 ± 0.023 a vékony sejteknél (n=36). Ezzel megegyezően a két áramkomponens sejtkapacitásra normált áramamplitúdója azt mutatta, hogy a lassú komponens esetén ez megegyezett a két sejtípus esetén [vékony: 85.65 ± 11.98 pA/pF (n=19); vastag: 69.88 ± 10.05 pA/pF (n=23), $p=0.316$], míg a gyors komponens esetén szignifikáns különbséget találtunk a vastag és vékony sejtek között. [vékony: 74.61 ± 10.07 pA/pF (n=19); vastag: 25.83 ± 6.20 pA/pF (n=23) ($p=0.0002$)].

5. Megbeszélés

5.1. Az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikája és farmakológiai vizsgálata a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben

A külső szőrsejtek elektromotilitásuk révén fontos szerepet játszanak a cochleáris erősítő mechanizmusban (Dallos és mtsai., 1997). Sziklai és mtsai (1996) megfigyelése alapján az ACh, mely a külső szőrsejt fő efferens neurotranszmittere, a sejt intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedését okozza. A megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint a szubszinaptikus ciszternális rendszerből Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulást hoz létre, mely a sejtmembrán és a citoskeletális hálózat proteinjeinek foszforilációja révén befolyásolja a sejtek sejtfal merevségét (Dallos és mtsai., 1997) és elektromotilitását (Sziklai és mtsai., 2001). Az ATP, mely a purinerg receptorokon keresztül növeli az intracelluláris Ca^{2+} szintet, szintén befolyásolhatja a külső szőrsejt elektromotilitását, és ezen keresztül a cochleáris erősítő mechanizmust. Az ATP 13.0 ± 2.4 nM koncentrációban található az endolymphában, valamint 10.5 ± 3.9 nM koncentrációban a perilymphában (Munoz és mtsai., 1995a). A két folyadékter között ebben a tekintetben nincs szignifikáns különbség. Hypoxia hatására megváltozik ezen folyadékok ATP koncentrációja, valamint az endolympha ATP koncentrációjában létrejövő változás megváltoztatja az endocochleáris potenciált és cochleáris mikrofón potenciált (Munoz és mtsai., 1995b). A belső fülben ATP tartalmú vezikulákat találtak a stria vasculáris marginális sejtjeiben és zajterhelésre az ATP endolymphába történő aktív szekrécióját figyelték meg (White és mtsai., 1995; Munoz és mtsai., 2001). Wilkstrom és mtsai (1998) az ACh és az ATP együttes hatását vizsgálták a KSZ-ek intracelluláris Ca^{2+} szintjére. Mivel feltételezhető, hogy az ATP, mint neurotranszmitter, szerepet játszik a cochleáris erősítő mechanizmusban, ezért megvizsgáltuk az ATP adagolásakor kialakuló intracelluláris Ca^{2+} választ, valamint a purinerg neurotransmisszióban szerepet játszó sejtmembrán receptorok expresszióját.

Korábbi tanulmányok a belső fülben kimutatott több P_2 receptor közül csak a P_{2X2} , és P_{2X7} altípusokat detektálták a KSZ membránjában (Brändle és mtsai., 1999; Nikolic és mtsai., 2003). Az említett szerzők azonban a receptorok eloszlását a sejtmembránban még nem vizsgálták meg. Mammano és mtsai (1999) az ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést először a sejt apikális területén észlelték, amit a sejt bazális területén egy lassabban kialakuló emelkedés követett. Ez a megfigyelés több receptor altípus jelenlétét feltételezi a külső szőrsejtben.

Kísérleteinkben a sejtek purinerg receptor expressziójának vizsgálata során intenzív jelölődést találtunk a P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} altípusok, míg kismértékű jelölődést a P_{2X7} altípus esetén. A sejtfelszíni megoszlása a P_{2X1} , P_{2X4} , P_{2Y1} , altípusoknak homogén volt. A P_{2X2} , és a P_{2Y2} receptor altípusok főként a sejtek apikális területein, a P_{2X7} , és P_{2Y4} altípusok a sejtek bazális területein voltak kimutathatók (7. ábra).

Az ATP-re kialakult Ca^{2+} válasz vizsgálata során kapott eredményeink alapján is több receptor együttes működése feltételezhető. 180 μM ATP alkalmazásakor (30 s) a sejtek egyik csoportjában egy gyorsan kialakuló nagy amplitúdójú Ca^{2+} válasz volt detektálható (4. ábra). Ez főként a P_{2X1} receptor altípusra jellemző. A P_{2X} receptorok közül ezen altípus a leginkább szenzitív ATP-re (EC_{50} 1 μM esetén; Khakh és mtsai., 2001).

A sejtek egy másik csoportja esetén a válasz lassabban alakult ki és kisebb volt, mindezek mellett a sejten belüli Ca^{2+} szint nem tért vissza a nyugalmi értékre (5. ábra). Ez a válasz típus jellemző a P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2X7} receptor altípusokra, amelyeknek EC_{50} értéke ATP-re 10-100 μM . A P_{2X7} receptor aktivációja során a sejtek nyugalmi Ca^{2+} szintje nem tér vissza a nyugalmi értékre és a sejt pusztulásához is vezethet.

Ezeket felül az UTP hatására kialakuló Ca^{2+} válasz a pozitív receptor festési eredményekkel együtt egy metabotrop szignalizációra, P_{2Y} receptor altípus szerepére utalnak. Néhány sejt esetén, mely reagált ATP-re, nem jött létre Ca^{2+} válasz UTP adásakor (6. ábra).

A sejtek másik csoportja mind UTP-re, mind ATP-re reagált. Ebben a tekintetben is különbséget lehetett leírni a KSZ-ek között, melyek szerepe még nem tisztázott.

5.2. A zajterhelés hatása a purinerg receptorok expressziójára, valamint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek karakterisztikájára a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.

Tartós zajkezelés a receptorsejtek károsítása révén idegi típusú halláscsökkenést okoz (Décori és mtsai., 1991; Subramaniam és mtsai., 1994; Henderson és mtsai., 1994; Canlon és mtsai., 1995). Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereocíliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumai. Ezen folyamatok végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk elvesztéséhez és a sejtek pusztulásához vezetnek (Saunders és mtsai., 1985; Berridge és mtsai., 1994). Felvetették azt, hogy ezen károsító mechanizmusok hátterében a reaktív oxigén gyökök változása (Kopke és mtsai., 2005), a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen a Ca^{2+} szint változása áll (Fridberger és mtsai., 1998).

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 (Canlon és mtsai., 1995). Ezzel ellentétesek Skellett és mtsai. Megfigyelései (1996), akik már alacsony intenzitású zaj hatására (65 dB SPL, 10-11 napig) is leírtak változást a belső fül működésében (Skellet és mtsai., 1996).

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 közöltekkel, bár ők az elváltozást nagy intenzitású (130 dB SPL) zaj esetén észlelték (Fridberger és mtsai., 1998).

A korábbi morfológiai és funkcionális megfigyelések arra utalnak, hogy a cochlea bazális kanyarulatán elhelyezkedő sejtek érzékenyebbek zajterhelésre (Nordmann és mtsai., 2000; Ou és mtsai., 2000). A zajjal kezelt állatok külső szőrsetjeinek 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 csavarulat sejtjeiben (181 nM). Ez a magasabb nyugalmi Ca^{2+} szint okozhatja a cochlea bazális 20%-ában jelentősebb mértékben megfigyelhető KSZ morfológiai változást és szövetpusztulást (Ou és mtsai., 2000).

A zajterhelés képes megváltoztani a KSZ-ek különböző neurotranszmitterekre adott válaszát is. Chen és mtsai (1995b) patch-clamp kísérleteik során mértek ilyen változást ATP sejtekhez adásakor. Kísérleteinkben 180 μM 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 (2. 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-al, míg a bazális sejtekben 44 nM-al emelkedett 180 μM 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 sejtfelszíni 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 hátterében.

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 (10. ábra). Technikai nehézségek miatt nem tudtunk kimutatni eltérést az apikális és a bazális sejtek között ebben a tekintetben.

Megfigyeléseinkkel ellentétben Wang és mtsai (2003) a P_{2X2} receptor altípus fokozott expresszióját írták le nagy intenzitású zaj (90-120 dB, 6 óráig) alkalmazása esetén. Kísérleteikben valószínűleg a rövid ideig tartó ingerlés miatt nem érvényesült a megemelkedett nyugalmi Ca^{2+} szint membrán receptorokra kifejtett hosszútávú csökkentő hatása.

A nyugalmi Ca^{2+} szint emelkedése a KSZ membrán sejtfal merevségének csökkenését feltételezi (Dallos és mtsai., 1997; Frolenkov és mtsai., 2003; Batta és mtsai., 2004). A csökkent sejtfal merevség sérülékenyebbé teszi a KSZ-et a mechanikai hatásokra. A nemrégiben leírt regulációs falmerevségi válasz nemcsak kompenzálni képes az emelkedett Ca^{2+} szint hatására csökkenő sejtfal merevséget, hanem a nyugalmi szint felé képes növelni azt (Batta és mtsai., 2004). Ezzel a regulációs mechanizmussal magyarázható a kísérleteinkben mért nagyobb KSZ sejtfal merevség (3. táblázat). A folyamat lényege a KSZ sejtmembrán alatti citoskeletális hálózat Ca^{2+} -függő stretch indukálta szabályozása, mely a sejtfal merevséget növeli (Batta és mtsai., 2004). Tartós, intenzív zajterhelés nagyobb amplitúdóval rezegteti meg a baziláris membránt. Ezen folyamatos mechanikai hatás kivédésére szolgál a megnövekedett sejtfalmerevség. A megnövekedett sejtfalmerevség másik lehetséges magyarázata a sejtmembrán és a szubkortikális citoskeletális hálózat metabolikus hatásokra kialakuló változása (Sziklai és Dallos, 1997; Szőnyi és mtsai., 1999; Sziklai és mtsai., 2001; He és mtsai 2003; Batta és mtsai., 2003, 2004).

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.

5.3. A K^+ áramok vizsgálata a tengerimalacok belső fülének Deiters sejteiben

A Deiters sejtek szerepe a cochleáris mikromechanikában és a belső fül elektrolit homeosztázisában még nem tisztázott. Célunk a kifelé irányuló feszültségfüggő K^+ áram karakterizálása, valamint a sejtek morfológiája és áramkarakterisztikája közötti esetleges kapcsolat vizsgálata. Nenov és mtsai feltételezése szerint a Deiters sejteken mért K^+ áram két komponensű (Nenov és mtsai., 1998).

A sejt 10 másodpercig tartó depolarizációja során kialakuló kifelé irányuló áram inaktivációja két fázisú volt. Ez a két fázisú inaktiváció két feszültségfüggő, eltérő inaktivációs kinetikával rendelkező K^+ csatorna meglétét feltételezi. A másik lehetőség szerint egy csatorna felelős az áram kialakulásáért, ennek több állapotú inaktivációja bifázisos inaktivációs kinetikát hoz létre, mely számos feszültségfüggő K^+ csatornára jellemző (Somodi, 2004). Az elektrofiziológiai eredmények két különböző csatorna meglétére utalnak az alábbiak szerint:

- Öt sejt inaktivációs kinetikája monofázisú volt, az inaktivációs időállandó megegyezett a többi sejten mért bifázisú inaktiváció lassú komponensének inaktivációs időállandójával (12.b ábra). A gyors áramkomponens hiánya egy K^+ csatorna jelenlétét bizonyítja ezen sejteken.

- ChTx és TEA eltérő mértékben blokkolta a gyors és a lassú komponens. 10 nM ChTx sejtekhez adásakor a blokkolt áramban főként a gyorsan inaktiválódó komponens volt jelen, míg 1 mM TEA esetén a blokkolt áram főként a lassan inaktiválódó komponens tartalmazta (13. ábra).

- A gyorsan inaktiválódó áramkomponens nagy depolarizációknál vált jelentőssé, ami arra utalt, hogy az áram kialakulásáért felelős két csatorna populáció feszültség függő kapuzását jellemző paraméterek különbözőek lehetnek (11. ábra).

-A G-V függvények két Boltzmann függvénnyel történő, kényszerfeltételeket is figyelembe vevő illesztése során a két komponensre eltérő $V_{1/2}$ értéket kaptunk. A $V_{1/2}$ értéke a gyorsabban aktiválódó komponensnek a pozitívabb potenciálok felé tolódott el ~14 mV-al (12.d ábra). Hasonló eltolódást lehetett megfigyelni a $V_{1/2}$ értékben amikor az egyes áramkomponensek (A_1 és A_2) amplitúdóiból meghatározott steady-state aktiváció feszültségfüggését elemeztük. Az áramkomponensek amplitúdóit a két fázisú inaktivációt mutató áramgörbe leszálló szárának két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel történő illesztéséből nyertük. Ezeken túl a steady-state inaktiváció feszültség függése is különböző volt a két áramkomponens esetén (12.e,f ábra), a gyorsan inaktiválódó áramkomponens $V_{1/2,i}$ értéke 5 mV-al a pozitívabb potenciálok felé tolódott el.

A tanulmányunkban talált $V_{1/2}$ és $V_{1/2,i}$ értékek különböznek a Nenov és mtsai által leírtaktól (Nenov és mtsai.,1998). Az értékek különbözősége származhat abból a tényből, hogy a jelen tanulmányban minden egyes Deiters sejt esetén külön-külön figyelembe vettük a két K^+ áramkomponens expressziójának relatív arányát. Az átlag $V_{1/2}$ értékeket a két áramkomponens relatív aránya alapján számoltuk ki, melyeket kifejezett depolarizációkor mért áram inaktivációs kinetikájának analízise során nyertünk.

Az elektrofiziológiai és a farmakológiai eredmények nem tették lehetővé a K^+ áramot létrehozó csatornák pontos molekuláris karakterizálását. Nimodipin és 4-aminopiridin hatása

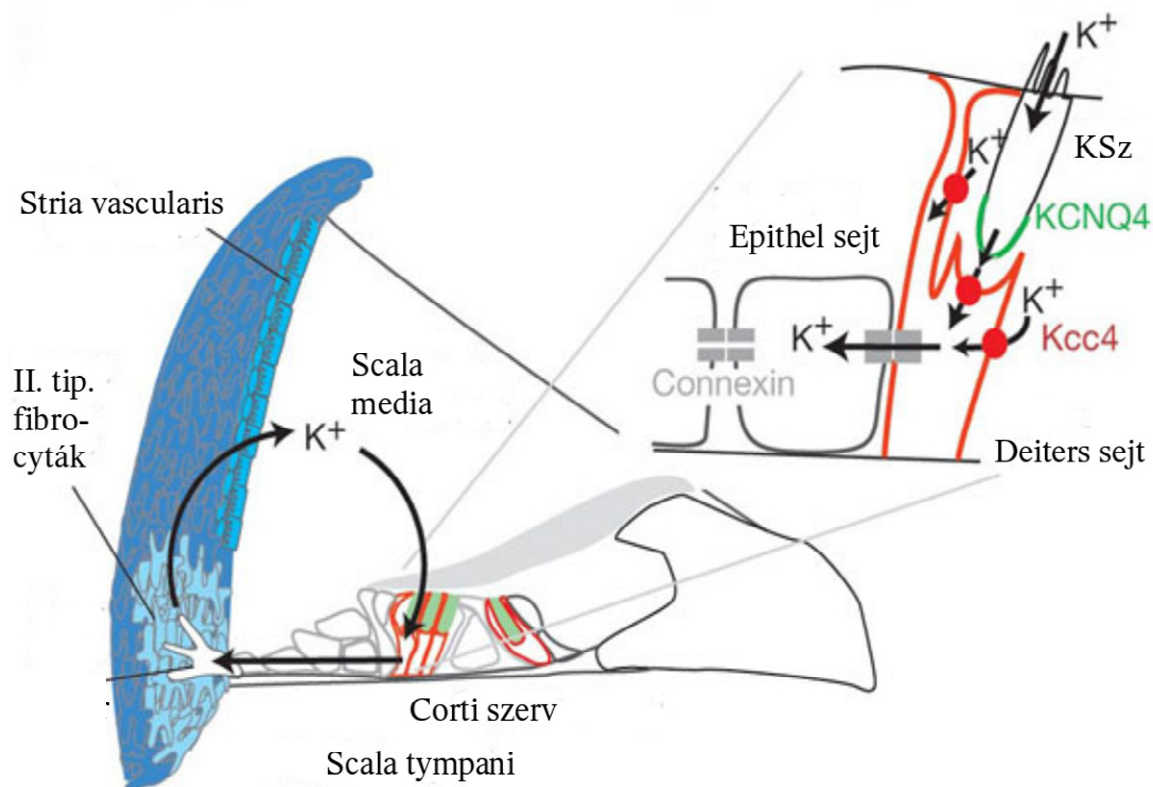
alapján Nenov és mtsai (1998) azt feltételezték, hogy az egyik kifelé kapuzó feszültségfüggő K^+ csatorna valószínűleg Kv1.5 típusú. A mi farmakológiai eredményeink ezt nem igazolják (13. ábra). A Kv1.5 típusú csatorna típusra jellemző áram lassú inaktivációs kinetikával rendelkezik és TEA-ra és ChTx-re is érzékeny. A ChTx szenzitivitás, a TEA esetén számolt K_d érték (6.7 mM) valamint az inaktivációs kinetika alapján ($\tau \sim 160$ ms) a gyorsan inaktiválódó áramkomponens létrehozó csatorna tartozhat a Kv 1.3 típusba (Somodi és mtsai., 2004; Grissmer és mtsai., 1994). Más ChTx szenzitív csatornát ki lehetett zárni a lehetőségek közül, mert vagy más a TEA érzékenysége (Kv1.2) és/vagy más kapuzási mechanizmusa van (BK csatorna). Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a paraméterek, melyek meghatározzák a gyors komponens feszültség függő kapuzását a Kv1.3-ra jellemző irodalmi adatokhoz képest a pozitívabb potenciálok felé tolódott el (Varga és mtsai., 2001). β alegység expressziója a sejten hatással lehet a $V_{1/2}$ és $V_{1/2,i}$ értékre a Kv1.3 csatorna típusnál (Vicente és mtsai., 2005), mely magyarázhatja a kapott eltéréseket. A lassan inaktiváló áramkomponensért felelős csatorna molekuláris azonosítása még a további kísérletek feladata.

A vizsgált Deiters sejtek nem képeztek homogén populációt. A sejtek egyik csoportja különálló volt, a másik csoport külső szörsejthez kapcsolódott. A két csoporthoz tartozó sejtek áram amplitúdói között különbséget találtunk. A kapott eredményeknek két lehetséges magyarázata van. Az első magyarázat szerint a kapcsolt sejtek esetén mind a két sejt (Deiters sejt és külső szörsejt) áramát együtt mértük. Ez a lehetőség az alapján zárható ki, hogy a kísérletesen meghatározott sejt kapacitás azonos volt a különálló és a kapcsolt sejtekre. A KSZ-hez kapcsolt sejteken tehát vagy nagyobb K^+ csatorna sűrűség, vagy az egyedi csatornák vezetőképességének növekedése okozza a nagyobb áramamplitúdót. A Deiters sejtek a KSZ-el szoros kapcsolatban állnak a belső fülben, a sejtek között intercelluláris

jelátvitel révén (pl glutamát) (Kataoka és mtsai., 1996) növekedhet a K^+ konduktancia. Ez a feltevés további kísérletes igazolást igényel.

Korábbi tanulmányok szerint a Deiters sejtek morfológiája és a sejt alakja függ a sejtekhez kapcsolt KSZ méretétől és ezen keresztül a Corti szervben elfoglalt helyétől (Laffon és mtsai., 1996; Nakazawa és mtsai., 1995; Spicer és mtsai., 1994). A Deiters sejtek mérete apiko-bazálisan és a sorok között is eltér egymástól (Slepecky és mtsai., 1996). A tanulmányunkban a sejteket két csoportra osztottuk: vastag sejtestű Deiters sejtek, melyek rövid KSZ-hez kapcsolódnak és vékony típusú sejtek, melyek hosszú KSZ-hez kapcsolódnak. Az áram mérési adatok alapján a vékony és a vastag típusú sejtek felszínén ugyanazok a K^+ csatornák találhatók. A két csoport között nem volt különbség a mért két fázisú áramgörbe inaktivációs időállandói között (14. ábra), ugyanakkor a vékony sejteken nagyobb áramamplitúdót mértünk, mely a gyorsan inaktiválódó áramkomponens nagyobb abszolút expressziójának következménye. Ennek megfelelően az áramkomponensek aránya eltérő volt a két morfológiai csoport között, ennek funcionális jelentőségét azonban még nem ismerjük.

Más tanulmányokban is találtak eltéréseket a különböző helyzetű Deiters sejtek fehérje expressziója között. Nakazawa és mtsai (1995) az ugróegér cochlea bazális kanyarulatáról nyert Deiters sejtekben nem tudtak kimutatni aktint és vimentint. Mások a glutamát/aszpartát transzporter vizsgálata során a tengerimalac apikális csavarulatain elhelyezkedő sejtekben nagyobb expressziót találtak, mint a bazális sejtekben (Furness és mtsai., 2002). Más szerkezetbeli különbségekben, mint például a mikrotubulusok és mitokondriumok számában is találtak eltéréseket (Spicer és mtsai., 1994). Korábban számos tanulmányban felvetették a Deiters sejtek szerepét a cochlearis mikromechanikában. A sejtek afferens innervációval rendelkeznek (Burgess és mtsai., 1997; Fechner és mtsai., 2001), feszültségfüggő K^+ áram mérhető a membránjukon (Nenov és mtsai., 1998), és aktív mozgás figyelhető meg a sejtek nyúlványán (Bobbin és mtsai., 2001).



15. ábra A K^+ recirkuláció mechanizmusa

Az ábrán szereplő rövidítések a következők: Kcc4: K^+ - Cl^- kotranszporter, KCNQ4: gap junction csatornák.. Az egyéb részleteket illetően lásd a szöveget.

Az esetleges kapcsolat a sejteken mért K^+ áram és a cochlearis mikromechanika között még további kísérleteket igényel. A tanulmányunkban vizsgált feszültség kapuzott K^+ csatornák szerepe főként a depolarizáló hatások, például P_{2X} csatorna aktivációja (Bobbin és mtsai., 2001) során kialakuló membránpotenciál változás helyreállításában van. A támasztósejtek és ezek közül a Deiters sejtek egyik legfontosabb szerepe a belső fül K^+ recirkuláció szabályozásában van (15. ábra). Mechanikai stimuláció (hang) hatására a KSZ-ből K^+ áramlik ki, mely ion a K^+ - Cl^- kotranszporter KCC4 segítségével bekerül a Deiters sejtbe (Bohnke és mtsai., 1998). Ezen csatornákat kódoló GJB2 gén 35 delG pontmutációja idegi típusú halláscsökkenést okoz (Tóth és mtsai., 2003). A gap junction csatornák feszültségfüggő kapuzása Deiters és más támasztó sejtekben asszimmetrikus K^+ fluxusokat hozhat létre (Zhao és mtsai., 2000). Ezen membránpotenciál függő mechanizmust a tanulmányunkban

vizsgált különböző morfológiájú Deiters sejteken mért különböző K^+ konduktanciák eltérő mértékben befolyásolhatják.

6. Összefoglalás

A belső fül hagyományosan ismert neurotranszmitterei mellett komoly szerepe lehet a purinerg jelátvitelnek is a cochleáris adaptáció Ca^{2+} -függő folyamataiban. A disszertációban összefoglalt kísérletek egy része a külső szőrsejtek purinerg receptorainak expressziója és a receptor stimulációt követő Ca^{2+} jel közötti összefüggést, valamint ezen tényezők zajterhelés hatására történő változását vizsgálta. ATP hatására a külső szőrsejtek egy részében gyors és ismételhető míg más sejteken lassú és deszenzitizálódó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést mértünk. Az ATP-re reagáló sejtek egy részében nem alakult ki $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés UTP sejtekhez adásakor. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a létrejött $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés több P_2 receptor altípus működésének a következménye. Immuncitokémiai módszerrel intenzív jelölődést találtunk a $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}2}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ altípusok, míg kisfokú jelölést a $\text{P}_{2\text{X}7}$ altípus esetén. A $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}1}$, altípusoknak sejt felszíni megoszlása homogén volt, míg a $\text{P}_{2\text{X}2}$, és a $\text{P}_{2\text{Y}2}$ receptor altípusok főként a sejtek apikális területein, a $\text{P}_{2\text{X}7}$, és $\text{P}_{2\text{Y}4}$ altípusok pedig a sejtek bazális területein voltak kimutathatók. Tartós zajterhelés hatására a külső szőrsejtjeinek nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ja mind a bazális mind pedig az apikális csavarulat sejtjeiben a kontrollhoz képest emelkedett, a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedése kifejezettebb volt a bazális csavarulat zajterhelésre érzékenyebb sejtjeiben. A zajkezelt állatokból izolált külső szőrsejtjeiben kisebb és hosszabb latenciájú volt az ATP hatására kialakuló $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés, a Ca^{2+} tranziensek amplitúdó csökkenése a bazális csavarulathoz izolált sejtjeiben volt jelentősebb. A zajkezelés csökkentette a $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{X}7}$ és $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ purinerg receptor altípusok expresszióját, míg a $\text{P}_{2\text{Y}2}$ altípus expressziós szintje nem változott a kontroll csoporthoz képest. A purinerg jelátvitel módosulása szerepet játszhat a zajterhelés hatására kialakuló külső szőrsejt funkció károsodásban mely idegi típusú halláscsökkenéshez vezet.

A Deiters sejtek anatómiai elhelyezkedésükből adódóan mikromechanikai egységet alkotnak a külső szőrsejtekkel. A Deiters sejtek membránpotenciál-függő folyamatai a sejtmembrán K^+ csatornáinak aktivitásától függenek. A disszertáció második része a Deiters sejtek K^+ csatornáinak biofizikai és farmakológiai jellemzésével, valamint a K^+ csatornák Deiters sejt morfológia-függő expressziójával kapcsolatos eredményeket mutatja be. Teljes-sejt áramok kétfázisú inaktivációs kinetikája valamint az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültség-függésének analízise alapján megállapítottuk, hogy két különböző K^+ csatorna populáció fejeződik ki a Deiters sejtek citoplazma membránjában, amit a csatornák különböző gátlószer érzékenysége alapján is igazoltunk. Farmakológiai és elektrofiziológiai vizsgálatok alapján a gyorsan inaktiválódó áramkomponenst létrehozó csatorna feltehetőleg a $\text{Kv} 1.3$ típusba tartozik. A teljes sejt áramok kinetikai analízise alapján megállapítottuk hogy a vékony és a vastag típusú Deiters sejtek felszínén ugyanazok a K^+ csatornák eltérő arányban találhatók, vékony típusú sejteken a gyorsan inaktiválódó áramkomponens jelentőssé válik, ami a teljes sejt áramamplitúdók növekedéséhez is vezet. A különböző elhelyezkedésű és morfológiájú Deiters sejtek K^+ csatorna expressziós mintázata különböző mértékben befolyásolhatja a belső fül mikromechanikai tulajdonságait, valamint e sejtek részvételét a K^+ recirkulációban.

Summary

Besides conventional neurotransmitters purinergic signal transduction may play a significant role in the Ca^{2+} -dependent cochlear adaptation processes. The first part of the dissertation examines the expression of purinergic receptors in outer hair cells (OHCs) of guinea pig and the relationship between receptor expression and the characteristics of the Ca^{2+} signal along with the characterization of changes in the above mentioned parameters upon noise exposure. We found that extracellular ATP triggers a fast and non-desensitizing rise in the cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in some cells whereas other cells display slow and desensitizing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response to ATP exposure. Some cells responding to ATP did not show a characteristic rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ upon exposure to UTP. Based on these data we hypothesized that the rise in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is mediated by the activation of multiple P_2 receptor types. Immunocytochemical staining of OHCs showed marked signal upon labeling with fluorescence-conjugated antibodies against $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}2}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ receptors whereas only a weak signal was detected with the antibody directed to the $\text{P}_{2\text{X}7}$ receptor. The distribution of the receptor subtypes along the outer hair cell was also different. Whereas the distribution of $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$ and $\text{P}_{2\text{Y}1}$ receptors was homogenous, the $\text{P}_{2\text{X}7}$ and $\text{P}_{2\text{Y}4}$ receptors could only be observed weakly at the basal pole whereas the $\text{P}_{2\text{X}2}$ and $\text{P}_{2\text{Y}2}$ localized mostly at the apical part of the OHCs, close to the cuticular plate. Moderate chronic noise exposure of the animals (80 dB, 14 days) resulted in elevated resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in OHCs isolated from both the basal and the apical turns of the cochlea. The rise in the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was more prominent in OHCs isolated from the basal turns where OHCs are more susceptible to noise-induced damage. The ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients had smaller amplitude and longer duration in OHCs isolated from noise-exposed animals with a more prominent decrease in the amplitude of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in OHCs isolated from the basal turns. Noise exposure also decreased the expression of $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{X}7}$ és $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ purinoceptor subtypes whereas that of the $\text{P}_{2\text{Y}2}$ subtype did not change as compared to the control. The alterations in the purinergic signal transduction pathways described in this study may contribute to the noise exposure-induced changes in the function of outer hair cells which leads to sensoryneural hearing loss.

Due to their anatomical location Deiters cells and OHCs constitute a micromechanical unit of the inner ear. Membrane-potential driven processes of Deiters are determined by the activity of K^+ channels located in the cytoplasm membrane. The second part of the dissertation addresses the biophysical and pharmacological characterization of the voltage-gated K^+ channels of Deiters cells along with the cell-shape dependent expression of the K^+ channels. Based on the biphasic inactivation kinetics and the analysis of the voltage-dependence of steady-state activation and inactivation of the whole cell currents we concluded that two different K^+ channels types are expressed in Deiters cells. This conclusion was justified by pharmacological separation of the currents using TEA and charybdotoxin. Based on the pharmacological and biophysical properties, $\text{Kv}1.3$ channels may be responsible for the more rapidly inactivating current component. The kinetic analysis of whole-cell currents showed that morphologically different Deiters cells (corpulent and lanky cells) express the same K^+ channel types although cells having lanky cell body express more channels with faster inactivation kinetics, which also leads to larger overall peak currents in these cells. The difference in the K^+ channel expression of Deiters cells of different cochlear locations and morphology might allow differential regulation of the micromechanical properties of the inner ear as well as the contribution of these cells to K^+ recirculation.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet mondani a Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinika vezetőjének, Prof. Dr. Sziklai Istvánnak, aki mindvégig támogatott disszertációm elkészítésében.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet, valamint a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet vezetőjének, hogy munkám elkészítéséhez minden szakmai és tárgyi feltételt biztosítottak.

A patch-clamp mérésekhez Dr. Panyi György és munkacsoportja, Dr. Somodi Sándor és Dr. Varga Zoltán, az ATP hatásmechanizmus mérésekhez Prof. Dr. Csernoch László és munkacsoportja, Dr. Szappanos Henrietta és Dr. Szigeti Gyula nyújtott elengedhetetlen segítséget.

Köszönöm Dr. Batta József Tamásnak a külső szőrsejt oldalfal merevség mérések elvégzését.

Köszönet illeti Tóthné Őri Rózát, Nagy Ceciliát és Számel Marikát a mérések előkészítésében nyújtott segítségért.

8. Felhasznált irodalom

- Abbracchio MP, Cattabeni F, Fredholm BB, Williams M (1993). Purinoceptor nomenclature: A status report. *Drug Devel. Res.* **28**, 207-213.
- Adachi M, Sugawara M, Iwasa KH (2000). Effect of turgor pressure on outer hair cell motility. *J. Acoust. Soc. Am.* **108**, 2299-2306.
- Ashmore JF, Meech RW (1986). Ionic basis of membrane potential in outer hair cells of guinea pig cochlea. *Nature* **322**, 368-71.
- Batta JT, Panyi G, Gáspár R, Sziklai I (2003). 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.
- Batta JT, Panyi G, Szűcs A, Sziklai I (2004). 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.
- Berridge MJ (1994). The biology and medicine of calcium signalling. *Mol. Cell Endocrinol.* **98**, 119-124.
- Blanchet C, Erosteigni C, Sugawara M, Dulon D (2000). Gentamycin blocks Ach-evoked K^+ current in guinea-pig outer hair cells by impairing Ca^{2+} entry at the cholinergic receptor. *J. Physiol.* **3**, 641-54.
- Bo X, Jiang LH, Wilson HL, Kim M, Burnstock G, Surprenant A, North RA (2003). Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1407-16.
- Bobbin RP (2001). ATP-induced movement of the stalks of isolated cochlear Deiters' cells. *Neuroreport* **12**, 2923-2926.
- Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ (2002). Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature* **416**, 874-878.
- Bohnke F, Arnold W (1998). Nonlinear mechanics of the organ of Corti caused by deiters cells. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering* **45**, 1227-1233.
- Brändle U, Zenner HP, Ruppersberg JP (1999). Gene Expression of P2X-receptors in the developing inner ear of the rat. *Neuroscience Letters* **273**, 105-108.
- Brunschweiler A, Muller CE (2006). P2 receptors activated by uracil nucleotides – an update. *Curr. Med. Chem.* **13**, 289-312.
- Burgess BJ, Adams JC, Nadol JB (1997). Morphologic evidence for innervation of Deiters' and Hensen's cells in the guinea pig. *Hearing Research* **108**, 74-82.

- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* **40**, 668-688.
- Burnstock G, Kennedy C (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* **16**, 433-40.
- Burnstock G (1993). Hypoxia, Endothelium and Purines. *Drug Devel. Res.* **28**, 301-305.
- Burnstock G (2006). Purinergic signaling-an overview. *Novartis Found Symp.* **276**, 26-48; discussion 48-57, 275-81.
- Canlon B, Fransson A (1995). Morphological and functional preservation of the outer hair cells from noise trauma by sound conditioning. *Hear. Res.* **84**, 112-124.
- Chen C, Nenov A, Norris CH, Bobbin RP (1995a). ATP modulation of L-type calcium channel currents in guinea pig outer hair cells. *Hear. Res.* **86**, 25-33.
- Chen C, Nenov A, Bobbin RP (1995b). Noise exposure alters the response of outer hair cells to ATP. *Hear. Res.* **88**, 215-221.
- Chen C, Bobbin RP (1998). P₂X receptors in cochlear Deiters' cells. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 337-44.
- Corey DP, Hudseth AJ (1979). Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature* **281**, 675-77.
- Dallos P, He DZZ, Lin X, Sziklai I, Mehta S, Evans BN (1997). Acetylcholine, outer hair cell electromotility and cochlear amplifier. *J. Neurosci.* **17**, 2212-2226.
- Dallos P, He DZZ, (2000). Two models of outer hair cell stiffness and motility. *J Assoc. Res. Otolaryngol.* **1**, 283-91.
- Decory L, Hiel H, Aran JM (1991). In vivo noise exposure alters the in vitro motility and viability of outer hair cells. *Hear. Res.* **52**, 81-88.
- Drury AN, Szentgyörgyi A (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* **68**, 213-37.
- Dulon D, Moataz R, Mollard P (1993). Characterization of Ca²⁺ Signals Generated by Extracellular Nucleotides in Supporting Cells of the Organ of Corti. *Cell Calcium* **14**, 245-254.
- Dulon D, Blanchet C, Laffon E (1994). Photo-Released Intracellular Ca²⁺ Evokes Reversible Mechanical Responses in Supporting Cells of the Guinea-Pig Organ of Corti. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**, 1263-1269.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D (1992). ATP receptor mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* **359**, 144-147.

- Egan TM, Samways DS, Li Z (2006). Biophysics of P2X receptors. *Pflügers. Arch.* **452**, 501-12.
- Evans RJ, Derkach V, Surprenant A (1992). ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* **357**, 503-505.
- Fechner FP, Nadol JB JR, Burgess BJ, Brown MC (2001). Innervation of supporting cells in the apical turns of the guinea pig cochlea is from type II afferent fibers. *J Comp Neurol* **429**, 289-298.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527-52.
- Fridberger A, Flock Å, Ulfendahl M, Flock B (1998). Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7127-7132.
- Friel DD (1988). An ATP sensitive conductance in single smooth muscle cells from the rat vas deferens. *J. Physiol. (Lond.)* **401**, 361-380.
- Frolenkov GI, Mammano F, Kachar B (2003). Regulation of outer hair cell cytoskeletal stiffness by intracellular Ca^{2+} : underlying mechanism and implications for cochlear mechanics. *Cell Calcium* **33**, 185-95.
- Furness DN, Hulme JA, Lawton DM, Hackney CM (2002). Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *Jaro* **3**, 234-247.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-50.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Kamilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994). Pharmacological Characterization of 5 Cloned Voltage-Gated K^{+} Channels, Types $\text{Kv}1.1$, $\text{Kv}1.2$, $\text{Kv}1.3$, $\text{Kv}1.5$, and $\text{Kv}3.1$, Stably Expressed in Mammalian-Cell Lines. *Molecular Pharmacology* **45**, 1227-1234.
- He DZZ, Zheng J, Dallos P (2003). Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J. Neurosci.* **23**, 9089-9096.
- Hechler B, Cattaneo M, Gachet C (2005). The P2 receptors in platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* **31**, 150-61.
- Henderson D, Spongr V, Subramaniam M, Campo P (1994). Anatomical effects of impact noise. *Hear. Res.* **76**, 101-117.

- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**(6817), 202-7.
- Holton P (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* **145**, 494-504.
- Housley GD, Greenwood D, Ashmore JF (1992). Localisation of cholinergic and purinergic receptors on outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **249**, 265-273.
- Hudspeth AJ (1986). The ionic channels of a vertebrate hair cell. *Hear. Res.* **22**, 21-7.
- Kataoka Y, Ohmori H (1996). Of known neurotransmitters, glutamate is the most likely to be released from chick cochlear hair cells. *Journal of Neurophysiology* **76**, 1870-1879.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séquéla P, Voigt M, Humphrey PPA (2001). International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits. *Pharmacol. Rev.* **53**, 107-118.
- Kopke R, Bielefeld E, Liu J, Zheng J, Jackson R, Henderson D, Coleman JK (2005). Prevention of impulse noise induced hearing loss with antioxidants. *Acta Otolaryngol.* **125**, 235-43.
- Laffon E, Angelini E (1996). On the Deiters cell contribution to the micromechanics of the organ of Corti. *Hear Res* **99**, 106-9.
- Lue AJ, Brownell WE (1999). Salicylate induced changes in outer hair cell lateral wall stiffness. *Hear. Res* **135**, 163-8.
- Mammano F, Frolenkov GI, Lagostena L, Belyansteva IA, Kurc M, Dodane V, Colavita A, Kachar B (1999). ATP-induced Ca^{2+} release in cochlear hair cells: Localisation of an inositol triphosphate-gated Ca^{2+} store to the base of the sensory hair bundle. *J. Neurosci.* **19**, 6918-6929.
- Marteau F, Le Poul E, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS (2003). Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol. Pharmacol.* **64**, 104-12.
- Maynard KI, Loesch A, Burnstock, G. (1992). Changes in purinergic responses of the rabbit isolated central ear artery after chronic electrical stimulation in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 833-836.
- Mockett BG, Bo X, Housley GD, Thorne PR, Burnstock G. (1995). Autoradiographic labelling of P2 purinoceptors in the guinea-pig cochlea. *Hear. Res.* **84**, 177-193.

- Muñoz DJB, Thorne PR, Housley GD, Billett TE (1995a). Adenosine 5'-triphosphate (ATP) concentrations in the endolymph and perilymph of the guinea-pig cochlea. *Hear. Res.* **90**, 119-125.
- Muñoz DJB, Thorne PR, Housley GD, Billett TE, Battersby JM (1995b). Extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) in the endolymphatic compartment influences cochlear function. *Hear. Res.* **90**, 106-118.
- Muñoz DJ, Kendrick IS, Rassam M, Thorne PR (2001). Vesicular storage of adenosine triphosphate in the guinea-pig cochlear lateral wall and concentrations of ATP in the endolymph during sound exposure and hypoxia. *Acta Otolaryngol.* **121**, 10-15.
- Nakagawa T, Kakehata S, Akaike N, Komune S, Takasaka T, Uemura T (1991). Calcium channel in isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Neurosci Lett.* **125**, 81-4.
- Nakagawa T, Kakehata S, Akaike N, Komune S, Takasaka T, Uemura T (1994). Voltage-dependent channels in dissociated outer hair cells of the guinea pig. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **251**, 57-60.
- Nakazawa K, Schulte BA, Spicer SS (1995). The Rosette Complex in Gerbil Deiters Cells Contains Gamma-Actin. *Hearing Research* **89**, 121-129.
- Nenov AP, Chen C, Bobbin RP (1998). Outward rectifying potassium currents are the dominant voltage activated currents present in Deiters' cells. *Hearing Research* **123**, 168-182.
- Nikolic P, Housley GD, Thorne PR (2003). Expression of the P2X7 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the developing and adult rat cochlea. *Audiol. Neuro-Otol.* **8**, 28-37.
- Nordmann AS, Böhne BA, Harding GW (2000). Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hear. Res.* **139**, 13-30.
- North RA (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013-1067.
- Oghalai JS, Patel AA, Nakagawa T, Brownell WE (1998). Fluorescence-imaged microdeformation of the outer hair cell lateral wall. *J. Neurosci.* **18**, 48-58.
- Ou HC, Böhne BA, Harding GW. (2000). Noise damage in the C57BL/CBA mouse cochlea. *Hear. Res.* **145**, 111-122.
- Pickles JO, Corey DP (1992). Mechano-electrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* **15**, 254-9.
- Pujol R, Lenoir M, Ladrich S, Tribillac F, Rebillard G (1992). Correlation between the length of outer hair cells and the frequency coding of the cochlea. In: Cazals Y, Demany L, Horner K (eds) *Advances in Biosciences*. pp 45-51.

- Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-92.
- Raphael RM, Popel AS, Brownell WE (2000). A membrane bending model of outer hair cell electromotility. *Biophys. J.* **78**, 2844-62.
- Saunders JC, Dear SP, Schneider ME (1985). The anatomical consequences of acoustic injury: a review and tutorial. *J. Acoust. Soc. Am.* **78**, 833-860.
- Schuhmeier RP, Dietze B, Ursu D, Lehmann-Horn F, Melzer W (2003). Voltage-activated calcium signals in myotubes loaded with high concentrations of EGTA. *Biophys. J.* **84**, 1065-78.
- Skellet RA, Crist JR, Fallon M, Bobbin RP (1996). Chronic low-level noise exposure alters distortion product otoacoustic emissions. *Hear. Res.* **98**, 68-76.
- Skellet RA, Chen C, Fallon M, Nenov AP, Bobbin RP (1997). Pharmacological evidence that endogenous ATP modulates cochlear mechanics. *Hear. Res.* **111**, 42-54.
- Slepecky NB (1996). Supporting cells with filaments. In: Dallos P, Popper AN, Fay R.R. (eds) *The Cochlea*. Springer-Verlag, pp 65-70.
- Somodi S, Varga Z, Hajdu P, Starkus JG, Levy DI, Gaspar R, Panyi G (2004). pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation: role of His399. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **287**, 1067-1076.
- Spicer SS, Schulte BA (1994). Differences Along the Place-Frequency Map in the Structure of Supporting Cells in the Gerbil Cochlea. *Hearing Research* **79**, 161-177.
- Subramaniam M, Salvi RJ, Spongr VP, Henderson D. Powers NL (1994). Changes in distortion product otoacoustic emissions and outer hair cells following interrupted noise exposure. *Hear. Res.* **74**, 204-216.
- Sziklai I, He DZZ, Dallos P (1996). Effect of acetylcholine and GABA on the transfer function of electromotility in isolated outer hair cells. *Hearing Research* **95**, 87-99.
- Sziklai I, Dallos P (1997). Hyposmotic swelling induces magnitude and gain change in the electromotile performance of isolated outer hair cells. *Acta Otolaryngol.* **117**, 222-225.
- Sziklai I, Szőnyi M, Dallos P (2001). Phosphorylation mediates the influence of acetylcholine upon outer hair cell electromotility. *Acta Otolaryngol.* **121**, 153-156.
- Sziklai I (2004). The significance of the calcium signal in the outer hair cells and its possible role in tinnitus of cochlear origin. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **261**, 517-525.
- Szőnyi M, He DZ, Ribari O, Sziklai I, Dallos P (1999). Cyclic GMP and outer hair cell electromotility. *Hear. Res.* **137**, 29-42.

- Thomas SA, Hume RI (1990). Permeation of both cations and anions through a single class of ATP-activated ion channels in developing chick skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **95**, 569-90.
- Tóth T, Kupka S, Sziklai I, Blin N, Zenner HP, Pfister M (2003). Phenotype of patients showing hearing impairment based on the 35delG mutation in the connexin 26 gene. *HNO* **51**, 400-4.
- Ulfendahl M, Chan E, McConnaughey WB, Prost-Domasky S, Elson L (1998). Axial and transverse stiffness measures of cochlear outer hair cells suggest a common mechanical basis. *Pflügers. Arch.* **436**, 9-15.
- Varga Z, Panyi G, Peter M Jr, Pieri C, Csecsei G, Damjanovich S, Gaspar R Jr (2001). Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3. *Biophys. J.* **80**, 1280-1297.
- Vicente R, Escalada A, Soler C, Grande M, Celada A, Tamkun MM, Solsona C, Felipe A (2005). Pattern of Kv beta subunit expression in macrophages depends upon proliferation and the mode of activation. *J Immunol.* **174**, 4736-4744.
- Wang JC-C, Raybould NP, Luo, L, Ryan, AF, Cannel MB, Thorne PR, Housley GD (2003). Noise induces up-regulation of P2X2 receptor subunit of ATP-gated ion channels in the rat cochlea. *NeuroReport.* **17**, 817-823.
- White PN, Thorne PR, Housley GD, Mockett B, Billett TE, Burnstock G (1995). Quinacrine staining of marginal cells in the stria vascularis of the guinea-pig cochlea: a possible source of extracellular ATP. *Hear. Res.* **90**, 97-105.
- Wilkstrom MA, Lawoko G, Heilbronn E (1998). Cholinergic modulation of extracellular ATP-induced cytoplasmic calcium concentrations in cochlear outer hair cells. *J. Physiol. Paris* **92**, 345-349.
- Zajic G, Schacht J (1987). Comparison of isolated outer hair cells from five mammalian species. *Hear. Res.* **26**, 249-256.
- Zhao HB (2000). Directional rectification of gap junctional voltage gating between deiters cells in the inner ear of guinea pig. *Neurosci. Lett.* **296**, 105-8.

9. A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1, Szűcs A., Szappanos H., Tóth A., Farkas Zs., Panyi G., Csernoch L., Sziklai I. 2004. Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hear. Res.* 196, 2-7. (IF:1,578)

2, Szűcs A., Somodi S., Batta T., Tóth A., Szigeti G., Csernoch L., Panyi G., Sziklai I. 2006. Differential expression of potassium currents in Deiters cells of the guinea pig cochlea. *Pflügers Arch.* 452(3):332-41. (IF:3,56)

3, Szűcs A., Szappanos H., Batta T., Tóth A., Szigeti G., Panyi G., Csernoch L., Sziklai I. 2006. Changes in purinoceptor distribution and intracellular calcium levels following noise exposure in the outer hair cells of the guinea pig. *J Membr. Biol.* 213(3) 135-41. (IF:2,369)

Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek és előadások:

1, Szűcs A., Z.Z. He., Dallos P., Sziklai I. Measurement of caffeine induced potassium currents in guinea pig outer hair cell. Workshop on Inner Ear Biology, 1999, Uppsala, Svédország.

2, Szűcs A., Z.Z. He., Dallos P., Sziklai I. A koffein indukálta ionáramok mérése tengerimalac izolált külső szőrsejteken. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 36. Nemzeti Kongresszusa 2000, Hévíz.

3, Szűcs A., Farkas Zs., Csernoch L., Szappanos H., Tóth A., Sziklai I. A tengerimalac külső szőrsejt purinerg beidegzése. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 37. Nemzeti Kongresszusa, 2002, Siófok.

4, Szűcs A., Szappanos H., Tóth A., Farkas Zs., Panyi G., Csernoch L., Sziklai I. Different expression of P2X receptor subtypes in the OHCs of the guinea pig. Workshop on Inner Ear Biology, 2003, Granada, Spanyolország.

5, Szűcs A., Somodi S., Batta T., Tóth A., Csernoch L., Panyi G., Sziklai I. Characterization of potassium currents and morphology of guinea pig Deiters cells. Inner Ear Biology Workshop, 2004, Debrecen.

6, Szűcs A., Somodi S., Batta T., Tóth A., Csernoch L., Panyi G., Sziklai I. Tengerimalac Deiters sejtek kálium áramainak karakterizálása. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 38. Nemzeti Kongresszusa, 2004, Sopron.

7, Szűcs A., Szappanos H., Batta T., Tóth A., Csernoch L., Panyi Gy., Sziklai I. Changes in purinoceptor distribution and intracellular calcium levels following moderate noise exposure in the outer hair cells of the guinea pig. Workshop on Inner Ear Biology, 2005, Tuebingen, Németország.

8, Szűcs A., Szappanos H., Batta T., Tóth A., Szigeti Gyula., Panyi Gy., Csernoch L., Sziklai I. ATP hatása a tengerimalac Deiters sejt intracellularis calcium szintjére. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 39. Nemzeti Kongresszusa, 2006, Debrecen.

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

1, Sziklai I., Szűcs A. 1998. A gége-, és garatrák epidemiológiája, korai felismerése és funkciómegtartó sebészeti terápiája. Házi orvos Továbbképző Szemle 3, 210-211.

2, Szűcs A., Tóth A., Kollár J., Szöllősi Z., Sziklai I. 2002. Izolált invertált papilloma a sinus sphenoidalisban. Fül-Orr-gégegyógyászat 1, 43-45.

3, Tóth A., Galuska L., Kovács J., **Szűcs A.**, Kollár J., Sziklai I. 2002. A különböző képkeltő eljárások szerepe a fej-nyak tájéki vascularis malformációk preoperatív diagnosztikájában. Fül-Orr-gégegyógyászat 2,64-68.

4, Batta J.T., Panyi G., **Szűcs A.**, Sziklai I. 2004. 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. (IF:3,82)

5, Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Pucsok K., Mikó I., Sziklai I. 2005. Intrinsic laryngeal muscle reinnervation with nerve-muscle pedicle. Otolaryngol. Head Neck Surg. 132(5):701-6. (IF:1,3)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó poszterek és előadások:

1, Jókay I., **Szűcs A.** Nyílt technikával végzett orrplasztika. Észak Kelet Magyarországi Regionális Szakcsoport Ülés, 2000, Debrecen.

2, Tóth L., **Szűcs A.**, Szanyi A., Galuska L., Sziklai I. Mesopharynx daganatok lymphoscintigraphias vizsgálata. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 36. Nemzeti Kongresszusa 2000, Hévíz.

3, Tóth L., **Szűcs A.**, Szanyi A., Galuska L., Sziklai I. A lymphoscintigraphia szerepe a mesopharynx tumorok regionalis nyirokcsomó metasztázisainak diagnosztikájában. Fiatal Onkológusok Fóruma, 2001, Pécs.

4, Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Furka I., Mikó I., Sziklai I. Gége reinnerváció ideg-izom lebennyel. Fül-, Orr-,Gége-Klinika Éves Ülés, 2001, Debrecen.

5, Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Furka I., Mikó I., Sziklai I. Gége reinnerváció állatkísérletes modellen. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 37. Nemzeti Kongresszusa, 2002, Siófok.

- 6,** Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Pucsok K., Mikó I., Sziklai I. Laryngeal reinnervation in animal experiments. 37th Congress of the European Society for Surgical Research, 2002, Szeged.
- 7,** Tóth L., **Szűcs A.**, Sziklai I., Galuska L. The role of lymphoscintigraphy in diagnosis of metastasis by head and neck tumors. 5th European Congress of Oto-Rhino Laryngology, Head and Neck Surgery, 2004, Rodos.
- 8,** Batta T., Panyi G., **Szűcs A.**, Sziklai I. Regulatory stiffness response of the OHC laterall wall is regulated by Acetylcholine and GABA. Inner Ear Biology Workshop, 2004, Debrecen.
- 9,** Batta T., Panyi G., **Szűcs A.**, Sziklai I. ATP a candidate co-regulator of cochlear micromechanical porperties. Workshop on Inner Ear Biology, 2005, Tuebingen, Németország.
- 10,** Batta T., **Szűcs A.**, Osikóczy O., Sziklai I. TNF- α hatása tengerimalacból izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségére. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 39. Nemzeti Kongresszusa, 2006, Debrecen.

10. Tárgyszavak jegyzéke

Belső fül, Deiters sejt, külső szőrsejt, káliumcsatorna, zajkezelés, halláscsökkenés, purinerg receptor, calcium, ATP.

Inner ear, Deiters cell, outer hair cell, potassium channel, noise therapy, hearing loss, purinerg receptor, calcium, ATP.