

Az ATP hatása a külső szőrsejtek kalcium homeosztázisára

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

ÖSSZEFOGLALÁS: Az emlősök a külső szőrsejtek (KSZ) aktív működése következtében képesek a hangok minél szélesebb spektrumának percepciójára. A KSZ-ek főként efferens beidegzéssel rendelkeznek, melyek neurotranszmitterei a GABA és az acetilkolin. Mindkét neurotranszmitter egyaránt a sejtek Ca^{2+} homeosztázisának megváltoztatása révén fejti ki hatását. A külső szőrsejtek intracelluláris Ca^{2+} szintjét kotranszmitterként az ATP is befolyásolni képes.

Kísérleteinkben megmértük az izolált külső szőrsejtek nyugalmi kalcium koncentrációját, 180 μM ATP sejtekhez adásakor létrejövő intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést, immunhisztokémiai módszerrel kimutattuk a sejtek membránjában elhelyezkedő purinerg receptorok hét altípusát. 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 jelölődést a $\text{P}_{2\text{X}7}$ altípus esetén. Az ATP-re adott válaszokban két különböző típusú választ tudtunk elkülöníteni, melyek közül az egyik gyors és ismételhető volt, míg a másik lassabban alakult ki, és ATP ismételt adásakor nem lehetett kiváltani.

Az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázist befolyásoló neurotranszmitterek (GABA, acetilkolin) mellett kotranszmitterként jelentős szerepet játszhat az ATP, mely ezen mechanizmus révén járulhat hozzá a cochleáris erősítő mechanizmushoz.

KULCSSZAVAK: külső szőrsejt, kalcium, cochlea, ATP

SUMMARY: Mammals are capable of perceiving all frequencies due to an active mechanism in the outer hair cells (OHCs). The main efferent neurotransmitters at the OHCs are acetylcholine (ACh) and GABA. ACh can change the electromotile activity of OHCs via an increase in the intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Similarly, ATP as a co-transmitter can increase the intracellular calcium level.

Here we report the expression pattern of several purinoreceptor subtypes on outer hair cells together with the effects of purinergic agonists on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of these cells. We found intensive labeling with $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}2}$ and $\text{P}_{2\text{Y}4}$, but only weak labeling was detected with $\text{P}_{2\text{X}7}$. Two kinetically distinct responses to ATP could be characterized, a fast and repeatable and a slow which was not.

Beside the two main efferent neurotransmitters (ACh and GABA), which can change the intracellular calcium homeostasis of the outer hair cells, ATP can play an important role as a co-transmitter in the inner ear. Via this mechanism ATP may contribute to the amplifier mechanism of the cochlea.

KEYWORDS: outer hair cell, calcium, cochlea, ATP

Bevezetés

A Corti szerv fontos sejtes elemei a szőrsejtek, melyek funkciójuk alapján két típusba sorolhatók. A belső szőrsejtek (BSZ) a hallás tulajdonképpeni receptor sejtjei, egy sorban helyezkednek el a cochleában, számuk mintegy 3000. A külső szőrsejtek (KSZ) a hangrezgések erősítése révén kiemelkedő fontosságúak a hallás percepciójában, számuk mintegy 22 000. A bazális csavarulatok területén négy, az apikális csavarulatokban három sorban helyezkednek el.

Közlésre érkezett: 2009.03.29.

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar, Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinika
Cím: 4032, Debrecen, Nagyterdei krt. 98.

Telefon: (52)414-763

E-mail: aszucs10@hotmail.com

Emberben a külső szőrsejtek mérete mind apikobazálisan, mind a sejtsorok között különböző.

A cochlea efferens beidegzésében jelentős szerepet játszó neurotranszmitterek, a GABA és az acetilkolin egyaránt a sejtek Ca^{2+} homeosztázisának megváltoztatása révén fejtik ki hatásukat. A GABA és az acetilkolin egyaránt Ca^{2+} beáramlást eredményeznek a sejtmembránon (8), mely egyrészt Ca^{2+} függő K^+ csatornák megnyílását eredményezi, így hiperpolarizálja a sejtmembránt (6, 1), másrészt a szubszinaptikus ciszternális rendszerből Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulást (CICR) eredményez (19). Újabb kutatások szerint a külső szőrsejtek intracelluláris Ca^{2+} szintjét kotranszmitterként az ATP is befolyásolni képes (16). A jelátvitelben szerepet játszó számos purinerg receptor volt detektálható a belső fül sejtes elemein, így a külső szőrsejteken és Deiters sejteken is (14).

A purinerg receptorok két nagy csoportja a P_1 -purinerg receptorok vagy adenosin-receptorok (altípusok: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 ; 7), illetve a P_2 -purinerg receptorok, melyek különféle purin és pirimidin nukleotidokkal (ATP, ADP, UTP stb.) aktiválhatók. A P_2 receptoroknak két csoportját különböztetjük meg: az ionotrop P_{2X} és a metabotrop P_{2Y} receptorokat (3).

Az ionotrop P_{2X} receptoroknak hét típusát ismerjük (15). Az emlősökben eddig nyolcféle P_{2Y} receptort klónoztak (P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} , P_{2Y6} , P_{2Y11} , P_{2Y12} , P_{2Y13} , P_{2Y14} ; 3).

Eszközök és módszerek

Külső szőrsejt izolálás

Kísérleteinket pigmentált tengerimalacokon (150–300 g) végeztük. Nembutallal történő túlaltatás után a tengerimalacokat dekapitáltuk. A temporális csontot – mely tartalmazta a bullát – eltávolítottuk. A bullát csontcsípővel felnyitottuk, a cochlea körüli csontrészeket eltávolítottuk. A cochleat *Hank* extracellularis 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* (22) által felállított kritériumoknak. Ezek az 1: cilindrikus sejthalak, 2: a sejtek ne legyenek megduzzadva, 3: a sejtmag a sejt bázisához közel helyezkedjen el, 4: a sejtalkotók ne mutassanak Brown-féle mozgást.

Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció méréshez Ca^{2+} szenzitív fluoreszcens festéket, a fura-2 acetoximetil észterét (Fura-2 AM, Molecular probes, Eugene, OR, USA) használtuk. A sejteket 5 μM Fura-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.

Immuncitokémia és immunhisztokémia

A kipreparált külső szőrsejtek kalcium- és magnéziummentes (CMF) PBS-sel történő lemosása után ötperces acetonos fixálás következett, majd foszfát pufferben (PBS) hígított 0,1%-os Triton-X-100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt 10 percen keresztül. PBS-ben történt háromszori mosás után 30 perces blokkolás történt 1%-os BSA-val. Ezt követően 1%-os bovine szérum albumin (BSA) oldatban hígított nyúlban termelt elsődleges antitesttel, majd három PBS-ben történt mosást követően a fluoreszcens festékkel konjugált kecskében termelt anti nyúl másodlagos antitesttel inkubáltuk a sejteket. Végül háromszori PBS-es mosás után a magokat 4'-6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI), vagy propidium-jodiddal tettük láthatóvá. Az elsődleges antitestek a megfelelő purino receptorokhoz specifikusan kötődnek, majd az ezekhez kapcsolt másodlagos antitestekkel konjugált fluoreszcens festék jelezte a sejteken a receptorok jelenlétét. A megfestett sejtek vizsgálatát vagy Zeiss LSM 510 META konfokális LASER pásztázó mikroszkóppal, vagy Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. 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.

Eredmények

A külső szőrsejtekben 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 $\pm$ SD), a válasz kialakulásához szükséges idő pedig $5,9 \pm 1,0$ s volt (1. ábra, 1. táblázat). Ezekben a sejtekben miután az intracelluláris Ca^{2+} szint visszatért a nyugalmi értékre, az ATP válasz ismételt 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 (2. 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.

A kapott eredmények alapján több receptor altí-

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

	gyors válasz n=14	lassú válasz n=15
nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)	$132,7 \pm 12,3$	$111,5 \pm 8,1$
amplitúdó (nM)	$185,5 \pm 35,7$	$74,1 \pm 9,6$
latencia(s)	$5,9 \pm 1$	$12,3 \pm 1,9$
ismételhetőség	+	-

A külső szőrsejtekben mért nyugalmi citoszolikus Ca^{2+} koncentráció 120 ± 4 nM-nak adódott (átlag $\pm$ SE, $n=35$). 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. Ezekben a sejtekben miután az intracelluláris Ca^{2+} szint visszatért a nyugalmi értékre, az ATP válasz ismételt 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. Az ATP hatására megemelkedett Ca^{2+} szint nem tért vissza a nyugalmi értékre és az ATP-re adott válasz sem volt megismételhető.

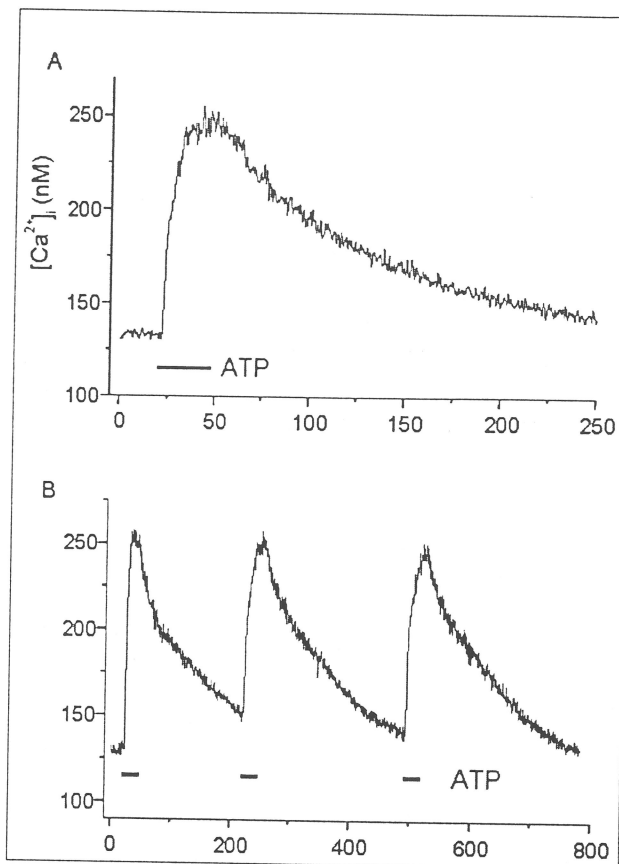
pus jelenléte volt feltételezhető a KSZ-ek sejtmembránjában. Ennek igazolására 180 μM UTP-t (P_{2y} agonista) adtunk a sejtekhez, minek hatására az átlagos Ca^{2+} szint-emelkedés 48 ± 11 nM volt ($n=5$). Az UTP-re kialakult válasz nagysága kisebb volt, mint ATP adásakor, és azon sejtek közül, melyek reagáltak ATP adására 58%-uk nem reagált UTP adására (3. ábra). Suramin, mely P_{2X} receptor antagonist, nagymértékben blokkolta az ATP-vel létrehozott Ca^{2+} szint-emelkedést (26 ± 10 nM, $n=9$) (3. ábra).

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 (4. 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 (4. ábra).

Megbeszélés

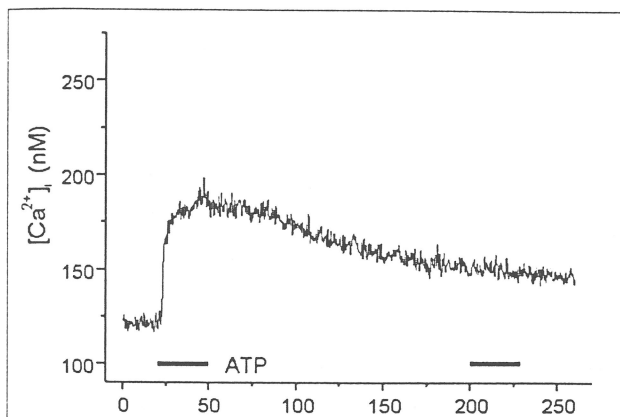
A külső szőrsejtek elektromotilitásuk révén fontos



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

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

szerpet játszanak a cochleáris erősítő mechanizmusban (5). Sziklai és mtsai (17) megfigyelése alapján az ACh, mely a külső szőrsejt fő efferens neurotransmittere, a sejt intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának növekedését okozza. A megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint a szubszinaptikus ciszternális rendszerből Ca^{2+} indukált Ca^{2+} felszabadulást hoz létre, mely a sejtmembrán és a citoskeletális hálózat proteinjeinek foszforilációja révén befolyásolja a sejtek sejtfal merevségét (5) és elektromotilitását (18). Az ATP, 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 $13,0 \pm 2,4$ nM koncentrációban található az endolymphában, valamint $10,5 \pm 3,9$ nM koncentrációban a perilymphában

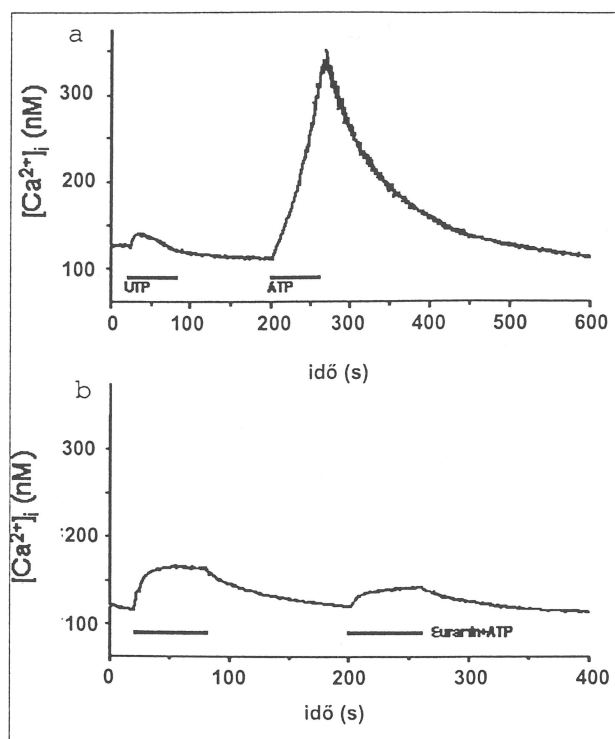


2. ábra: Extracelluláris ATP által kiváltott lassú Ca^{2+} tranziensek.

180 μM ATP adásával kiváltott, lassan kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés a külső szőrsejtben ($l=60\text{ }\mu\text{m}$). 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

(11). A két folyadéktér között ebben a tekintetben nincs szignifikáns különbség. Fontos megemlíteni, hogy a P_2 receptorok a transzmitter felszabadulás helyén találhatóak, így lényegesen nagyobb koncentrációt érzékelnek, mint ami a folyadékterekben mérhető. Hypoxia hatására megváltozik ezen folyadékterek ATP koncentrációja, valamint az endolympha ATP koncentrációjában létrejövő változás megváltoztatja az endocochleáris potenciált és cochleáris mikrofon potenciált (12). A belső fülben ATP tartalmú vezikulákat találtak a stria vasculáris marginális sejtjeiben és zajterhelésre az ATP endolymphaba történő aktív szekrécióját figyelték meg (20, 13). Wilkstrom és mtsai (21) 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, és mivel a válasz sejtcsoportonként eltérő volt, feltételezzük, hogy ez a hatás eltérő receptor-mintázaton keresztül jön létre. Ennek bizonyítására megvizsgáltuk a purinerg neurotranszmisszióban szerepet játszó sejtmembrán-receptorok expresszióját.

Korábbi tanulmányok a belső fülben kimutatott több P_2 receptor közül csak a $\text{P}_{2\text{X}2}$ és $\text{P}_{2\text{X}7}$ altípusokat detektáltak a KSZ-ek membránjában (2, 8). Az említett szerzők azonban a receptorok eloszlását a sejtmembránban még nem vizsgálták meg. Mammano és mtsai (10) az ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést először a sejt apikális területén észlelték, amit a sejt bazális területén egy lassabban



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

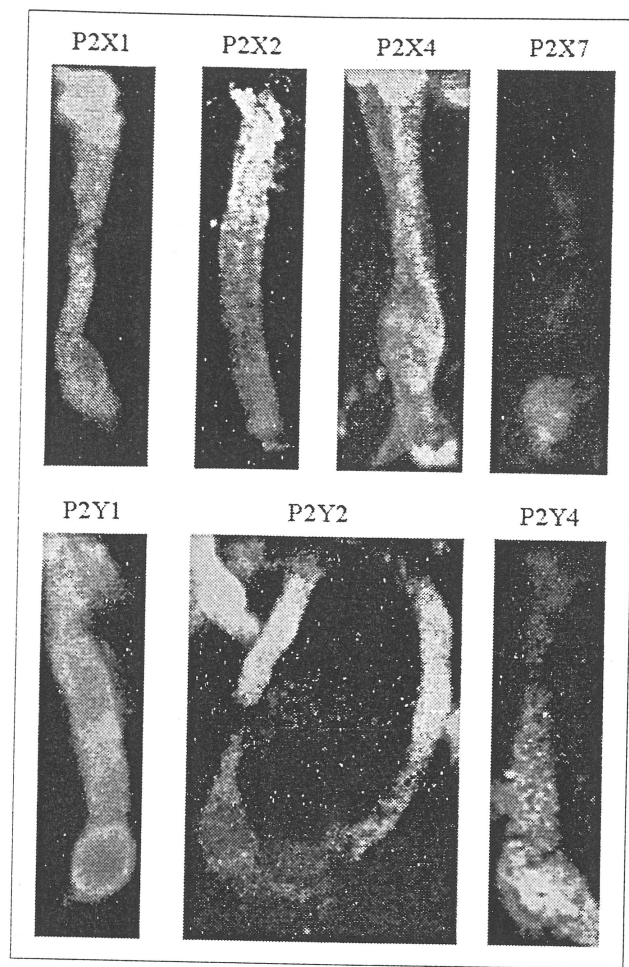
(a) 180 μM UTP adása után kialakult Ca^{2+} tranziens. A külső szőrsejtben ($l=60\text{ }\mu\text{m}$) először 60 másodpercig 180 μM UTP-t, majd 120 s után 180 μM ATP-t adtunk. A 180 μM UTP-re kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés 20 nM-nak, 180 μM ATP adás hatására 240 nM-nak adódott. 180 μM ATP adására reagáló sejtek 58%-a nem reagált 180 μM UTP-re.

(b) Suraminnal részlegesen gátolni lehetett az ATP-re kialakuló Ca^{2+} tranziens

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 $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}2}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ altípusok, míg kisfokú jelölődést a $\text{P}_{2\text{X}7}$ altípus esetén. A sejt felszíni megoszlása a $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}1}$ altípusoknak homogén volt. 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 a sejtek bazális területein voltak kimutathatók (4. 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 (1. ábra). Ez főként a $\text{P}_{2\text{X}1}$ receptor altípusra jellemző. A $\text{P}_{2\text{X}}$ receptorok közül ezen altípus a leginkább érzékeny ATP-re, hisz a fél-hatásos dózis, (EC_{50}) ezen receptorok esetén 1 μM -nak adódott (9).



4. 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} a sejt bazális területén expresszáldott.

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 (2. 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.

Ezekon felül az UTP hatására kialakuló Ca^{2+} válasz, a pozitív receptor festési eredményekkel együtt egy metabotrop szignalizációra, P_{2Y} receptor altípus szerepére utal. Néhány sejt esetén, mely reagált ATP-re, nem jött létre Ca^{2+} válasz UTP adásakor (3.

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.

Az ATP, mint kotranszmitter, befolyásolja a külső szőrsejtek kalcium homeosztázisát, így hatással lehet a külső szőrsejt két efferens neurotranszmitterének sejtekre kifejtett hatására, ezen keresztül a sejtek elektromotilitására, és a cochleáris erősítő mechanizmusra.

Köszönetnyilvánítás

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

Irodalom

1. Blanchet C., Erosteigni C., Sugawara M., Dulon D.: 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, 2000.
2. Brändle U., Zenner H.P., Ruppersberg J.P.: Gene expression of P_{2X} -receptors in the developing inner ear of the rat. *Neuroscience Letters*, 273, 105-108, 1999.
3. Burnstock G., Kennedy C.: Is there a basis for distinguishing two types of P_2 -purinoceptor? *Gen Pharmacol*, 16, 433-40, 1985.
4. Burnstock G.: Purinergic signaling-an overview. *Novartis Found Symp*, 276, 26-48; discussion 48-57, 275-81, 2006.
5. Dallos P., He D.Z.Z., Lin X., Sziklai I., Mehta S., Evans B.N.: Acetylcholine, outer hair cell electromotility and cochlear amplifier. *J Neurosci*, 17, 2212-2226, 1997.
6. Dulon D., Blanchet C., Laffon E.: Photo-released intracellular Ca^{2+} evokes reversible mechanical responses in supporting cells of the Guinea-pig organ of corti. *Biochem Biophys Res Comm*, 201, 1263-1269, 1994.
7. Fredholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J.: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53, 527-52, 2001.
8. Housley G.D., Greenwood D., Ashmore J.F.: Localisation of cholinergic and purinergic receptors on outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *Proc R Soc Lond B*, 249, 265-273, 1992.
9. Khakh B.S., Burnstock G., Kennedy C., King B.F., North R.A., Séquella P., Voigt M., Humphrey P.P.A.: International Union of Pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P_{2X} receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*, 53, 107-118, 2001.
10. Mammano F., Frolenkov G.I., Lagostena L., Belyansteva I.A., Kurc M., Dodane V., Colavita A., Kachar B.: 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, 1999.
11. Muñoz D.J.B., Thome P.R., Housley G.D., Billett T.E.: Adenosine 5'-triphosphate (ATP) concentrations in the endolymph and perilymph of the guinea-pig cochlea. *Hear Res*, 90, 119-125, 1995a.
12. Muñoz D.J.B., Thome P.R., Housley G.D., Billett T.E., Bat-

- tersby J.M.: Extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) in the endolymphatic compartment influences cochlear function. *Hear Res*, 90, 106-118, 1995b.
13. Muñoz D.J., Kendrick I.S., Rassam M., Thorne P.R.: 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, 2001.
 14. Nikolic P., Housley G.D., Thorne P.R.: Expression of the P_{2X7} receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the developing and adult rat cochlea. *Audiol Neuro-Otol*, 8, 28-37, 2003.
 15. North R.A.: Molecular physiology of P_{2X} receptors. *Physiol Rev*, 82, 1013-1067, 2002.
 16. Skellet R.A., Chen C., Fallon M., Nenov A.P., Bobbin R.P.: Pharmacological evidence that endogenous ATP modulates cochlear mechanics. *Hear Res*, 111, 42-54, 1997.
 17. Sziklai I., He D.Z.Z., Dallos P.: Effect of acetylcholine and GABA on the transfer function of electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res*, 95, 87-99, 1996.
 18. Sziklai I., Szőnyi M., Dallos P.: Phosphorylation mediates the influence of acetylcholine upon outer hair cell electromotility. *Acta Otolaryngol*, 121, 153-156, 2001.
 19. Sziklai I.: 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, 2004.
 20. White P.N., Thorne P.R., Housley G.D., Mockett B., Billett T.E., Burnstock G.: 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, 1995.
 21. Wilkstrom M.A., Lawoko G., Heilbronn E.: Cholinergic modulation of extracellular ATP-induced cytoplasmic calcium concentrations in cochlear outer hair cells. *J Physiol Paris*, 92, 345-349, 1998.
 22. Zajic G., Schacht J.: Comparison of isolated outer hair cells from five mammalian species. *Hear Res*, 26, 249-256, 1987.

ZUSAMMENFASSUNG: Das Corti'sche Organ im Innenohr ist das Rezeptororgan des Hörens. Seine wichtigsten Sinneszellen sind die äußeren Haarzellen, die über die Verstärkung der Tonwellen an der kochlearen Mikromechanik teilnehmen. Die Innervation der äußeren Haarzellen ist hauptsächlich efferent, ihre Neurotransmitter sind GABA und Acetylcholin, die beide in gleicher Weise ihre Wirkung durch die Veränderung der Ca^{2+} -Homeostase entfalten (8,19). Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel kann durch ATP beeinflusst werden (16). In unseren Versuchen mit isolierten äußeren Haarzellen haben wir die Kalziumkonzentration in Ruhe, nach Gabe von $180 \mu M$ ATP zu den Zellen die ansteigende Ca^{2+} -Konzentration, gemessen und mit immunhistochemischem Verfahren die in den Zellmembranen befindlichen sieben Untertypen von purinergen Rezeptoren nachgewiesen. Neben den Neurotransmittern GABA und Acetylcholin spielt ATP eine bedeutende Rolle als Kotremitter, denn durch diesen Mechanismus kann es zum kochlearen Verstärkungsmechanismus beitragen.

SCHLÜSSELWÖRTER: äußere Haarzellen, Kalzium, Cochlea, ATP