

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés

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

Dr. Borkó Rezső

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

Debrecen, 2007

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

*Dr. Borkó Rezső*

**Témavezető: Prof. Dr. Sziklai István**

**Programvezető: Prof. Dr. Berta András**

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

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

DEBRECEN, 2007

# Tartalomjegyzék

<b>1 Bevezetés</b>	<b>5</b>
1.1. Az emlős hallóhám és mikromechanikai tulajdonságai . . . . .	6
1.1.1. A külső szőrsejtek szerkezete . . . . .	8
1.1.2. A külső szőrsejtek működése . . . . .	12
1.2. Célkitűzések . . . . .	19
<b>2 Anyagok és módszerek</b>	<b>20</b>
2.1. Sejtelőkészítés . . . . .	20
2.2. A külső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata, a kétféle motilis tevékenység és az oldalfal merevség mérése. . . . .	21
2.2.1. Az alkalmazott technikai eszközök és programok . . . . .	22
2.2.2. A külső szőrsejt lassú motilis válaszána k mérése . . . . .	25
2.2.3. A külső szőrsejt elektromotilitás mérése . . . . .	27
2.2.4. A külső szőrsejt oldalfal merevség vizsgálata . . . . .	28
2.3. Matematikai módszerek, statisztikai analízis . . . . .	31
<b>3 Eredmények</b>	<b>33</b>
3.1. A külső szőrsejtek mechanikai és kémiai ingerlésre bekövetkező lassú motilis válasza . . . . .	33
3.2. A külső szőrsejtek oldalfal merevségének változása a lassú motilis válasz során . . . . .	36
3.3. A külső szőrsejtek lassú motilis válaszána k hatása az elektromotilitásra . .	38
3.4. Okadainsav hatása a külső szőrsejtek motilis működésére, oldalfal merevségére . . . . .	43
<b>4 Megbeszélés</b>	<b>44</b>

## *1. Tartalomjegyzék*

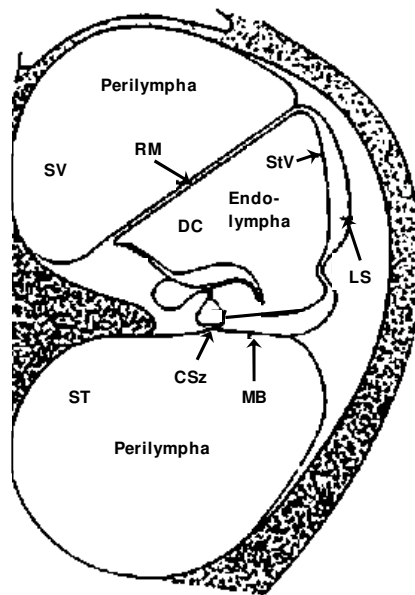
<b>5 Irodalomjegyzék</b>	<b>51</b>
<b>6 Összefoglalás</b>	<b>60</b>
<b>7 Köszönetnyilvánítás</b>	<b>64</b>
<b>8 A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke</b>	<b>65</b>
8.1. Közlemények . . . . .	65
8.2. Idézhető kivonatok . . . . .	65
8.3. Előadások, poszterek . . . . .	66
8.4. Egyéb közlemények . . . . .	66
<b>9 Függelék</b>	<b>68</b>

# 1 Bevezetés

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

## 1.1. Az emlős hallóhám és mikromechanikai tulajdonságai

A csontos cochlean belül elhelyezkedő, háromszög keresztmetszetű hártvány labirintus három üregrendszerre osztja a csontos csatornát: a csontos és hártvány labirintus között elhelyezkedő scala vestibulira és scala tympanira, valamint a hártvány labirintuson belül lévő ductus cochlearisra. A ductus cochlearist a Reissner-membrán határolja a scala vestibuli felé, lateralis falát a stria vascularis képezi, míg a scala tympanitól a membrana basilaris választja el (1. ábra). Mindhárom csatorna folyadékkal van kitöltve: a ductus cochlearist endolympha, míg a scala vestibulit és tympanit részben plazma ultrafiltrátum, részben liquor cerebrospinalis eredetű perilympa tölti ki (Sterkers és mtsai., 1988).



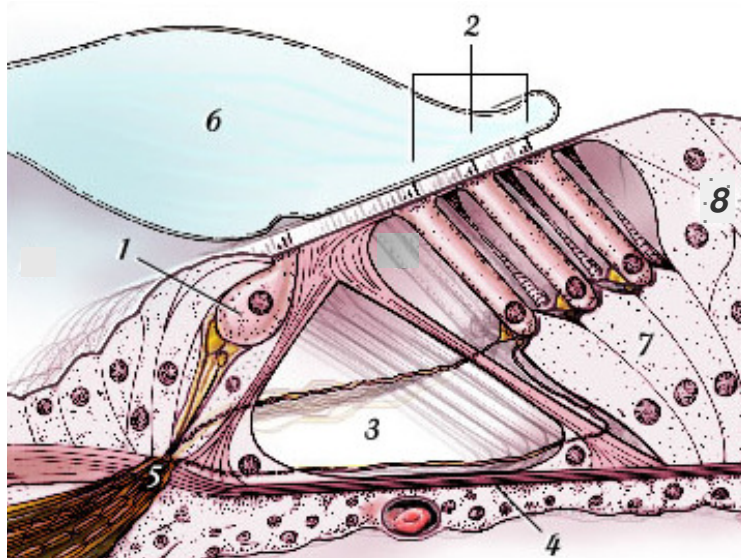
1. ábra A cochlea egy csavarulatának sémás keresztmetszete, a folyadékterekkel. (CSz: Corti-szerv; DC: ductus cochlearis; LS: lamina spiralis; MB: membrana basilaris; RM: Reissner membrán; ST: scala tympani; StV: stria vascularis; SV: scala vestibuli;

A perilympa meghatározó kationja a  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$  ~154 mM;  $\text{K}^+$  ~3 mM), míg az endolympha elsődleges kationja a  $\text{K}^+$  ( $\text{K}^+$  ~161 mM;  $\text{Na}^+$  ~1 mM;  $\text{Ca}^{2+}$  ~30  $\mu\text{M}$ ). A stria

## 1. Bevezetés

vascularis a cochlea lateralis falán lévő háromrétegű hám. Aktív ion-transzport révén termeli az endolymphát, ennek eredményeként töltése pozitív, +80 és +100mV közötti, a perilymphához képest. A hártás labirintust alkotó membránok közül a membrana basilarisnak van kitüntetett szerepe a hallás szempontjából, mivel ennek a mechanikai tulajdonságai határozzák meg a rajta létrejövő passzív haladóhullámok karakterisztikáját. A Reissner membránnal ellentétben, a membrana basilaris ionokkal szemben permeábilis.

A spirális lefutású Corti-szerv (a hallóvégkészülék) egy sejt-mátrix, mely a membrana basilaris ductus cochlearis felé eső felszínén fekszik (2. ábra). A Corti-szerv receptorsejtjei az ún. szőrsejtek, melyek két típusát különböztetjük meg a cochleában: a külső és belső szőrsejteket. A Corti-alagút kétoldalán, a külső pillérsejtek és a Hensen-sejtek közötti térben, szinaptikus pólusukkal a Deiters-sejtekre támaszkodva, ciliaris pólusukkal a membrana tectoriaaba illeszkedve, 3-4 sorban helyezkednek el a külső szőrsejtek. A belső pillérsejtek mellet, a támasztósejtekkel körülvéve, egy sort képeznek a belső szőrsejtek. Megközelítően 3500 belső szőrsejt egységet tartalmaz a cochlea, bázisától a csúcsáig.



2.ábra A Corti-szerv. (1) belső szőrsejt; (2) külső szőrsejtek; (3) külső és belső pillérsejtek által határolt Corti-alagút; (4) membrana basilaris; (5) a szőrsejtek beidegzését ellátó afferens és efferens idegrostok; (6) membrana tectoria; (7) Deiters sejtek; (8) Hensen sejtek.

## 1. Bevezetés

Mivel a membrana basilaris ionok számára szabadon átjárható, ezért maga a Corti-szerv végső soron a scala tympanit kitöltő perilymphában mintegy „fürdik”.

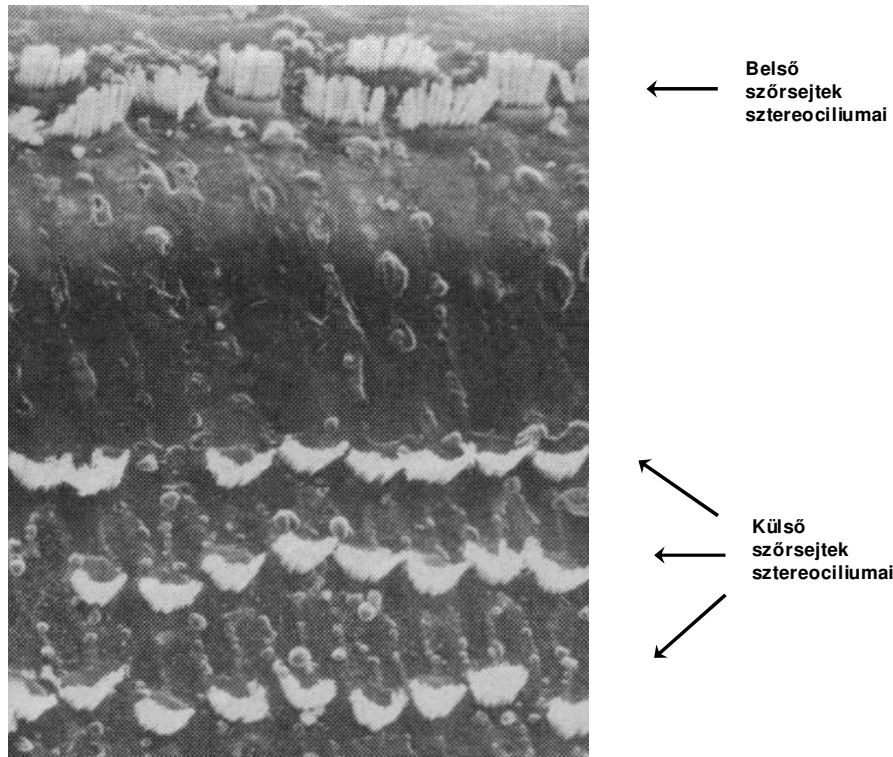
A Corti-szerv cytoarchitectúráját a támasztó sejtek sajátos elrendeződése és felépítése határozza meg. A Deiters-sejteken elhelyezkedő külső szőrsejtek laterális membránja közvetlenül érintkezik a Corti-alagutat kitöltő perilymphával. A szőrsejtek cuticularis felszíne a pillérsejtek tetejével, a Deiters-sejtek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

### 1.1.1. A külső szőrsejtek szerkezete

A külső és belső szőrsejtek különböző alakúak. Közös bennük, hogy apikális membránjukból aktin filamentumokból álló, plasma membránnal borított, bázistól a csúcs felé haladva csökkenő számú és elvékonyodó, egyenes vonalban (belső szőrsejtek) illetve „W”-, „V”- ill. „U”-alakban (külső szőrsejtek) csoportot képező sejtnyúlványok, ún. sztereociliumok nyúlnak ki. Ezek hossza kívülről befelé rövidül (3. *ábra*). A sztereociliumok között kereszt-kötések találhatóak, melyek az egész csokornak nagyfokú merevséget biztosítanak, lehetővé téve ezáltal, hogy a leghosszabb sztereocilium elmozdulása esetén az egész csokor, mint egy egység, együtt mozogjon. A leghosszabb sztereociliumok a membrana tectoria alsó felszínéhez kapcsolódnak (*Lim, 1986*). Szintén van összeköttetés az egyazon szőrsejten lévő sztereociliumok sorai között is. A rövidebb sztereociliumok csúcsától a hosszabbak oldalához rögzülnek ezek az ún. csúcsi kötések („*tip-links*”) (*Pickles, 1984*), melyek végződése a rövidebb sztereociliumon a tulajdonképpeni mechano-szenzitív transzdukciós csatornák (4. *ábra*).

Mivel a sztereociliumok morfológiailag kapcsolódnak a membrana tectoriahoz, ezért a membrana tectoria scala tympani irányú elmozdulása hatására egyszerre hajlanak el a külső szőrsejtek sztereociliumai a stria vascularis irányába. A sztereocilium-csokor

## 1. Bevezetés

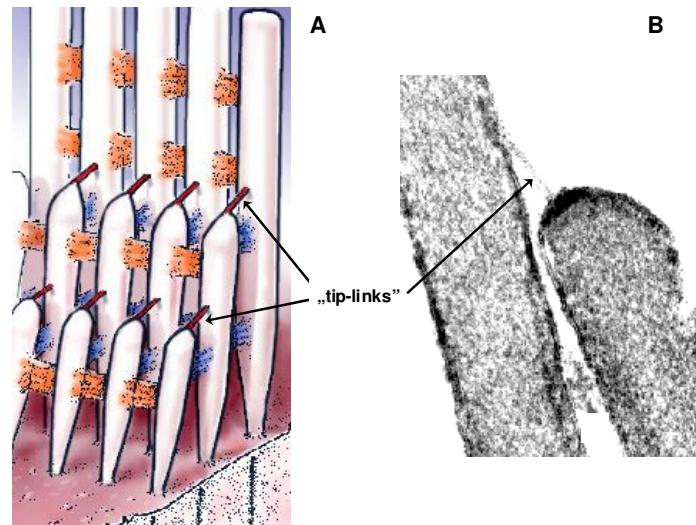


3. ábra A Corti-szerv felszínének scanning elektronmikroszkópos képe. A belső és külső szőrsejtek apikális végét különböző alakban rendeződő, kívülről befelé rövidülő sztereociliumok csoportjai borítják (Wright, 1983).

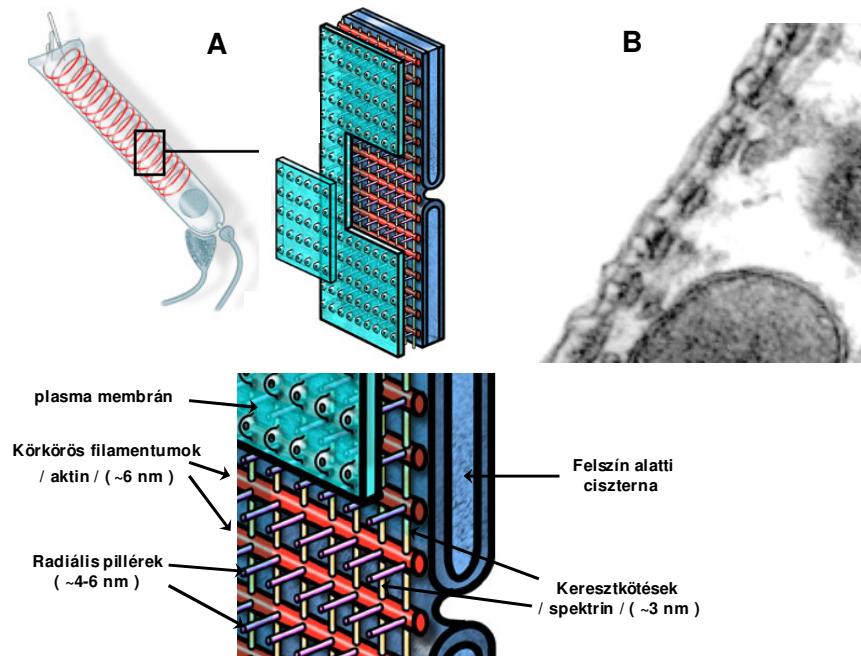
elhajlása a leghosszabb sztereocilium irányába a csúcsi összeköttetések megfeszülését okozza, amely kiváltó ingere a transzdukciós csatornák megnyílásának (Hudspeth és Corey, 1977; Hudspeth, 1989; Kachar és mtsai., 2000). Az elmozdulással szinkron a sztereociliumok csúcsán lévő kation csatornák megnyílnak és a magas  $K^+$  tartalmú endolymphából  $K^+$  áramlik a sejt belsejébe, depolarizációt okozva a sejtmembránon.

A külső szőrsejtek oldalfala különleges, három hosszanti koncentrikus henger képező rétegből áll, vastagsága  $\sim 100$  nm (5. ábra). Külső rétege a plasma membrán, melynek összetétele az oldalfal és az apikális pólus területén különbözik. Az oldalfal plasma membránja többek között módosult anion cserélőt (Kalinec és mtsai., 1997), cukor transzportert (Belyantseva és mtsai., 2000) és a külső szőrsejtek elektromotilitásának alapját képező fehérjét, ún. prestint (Zheng és mtsai., 2000) tartalmaz.

## 1. Bevezetés



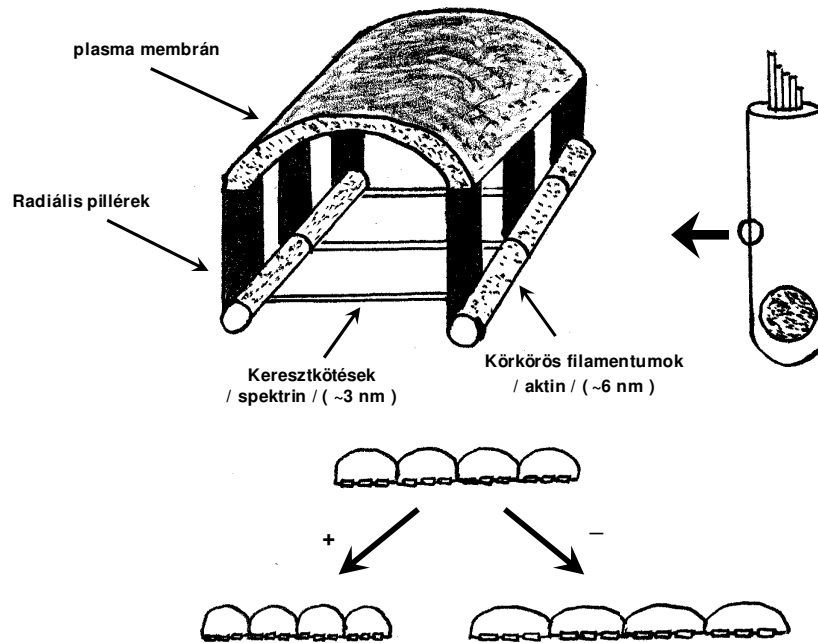
4. ábra A belülről kifelé növekvő hosszúságban, három sorban rendeződött sztereociliumok ábráján (A) és transzmissziós elektronmikroszkópos képén (B) a nyilak mutatják a rövidebb sztereociliumok csúcsa és a hosszabb sztereociliumok oldala között meglévő összeköttetéseket, a mechano-elektirikus transzdukciós csatornákat („tip-links”). A sztereociliumok oldalirányú keresztkötésekkel is rögzülnek egymáshoz.



5. ábra A külső szőrsejtek oldalfalának rajza (A) és elektronmikroszkópos képe (B): plasma membrán, radiális pillér fehérjék, kortikális rácsozat és ciszternális rendszer. A kortikális rácsozat párhuzamos lefutású, ~6 nm átmérőjű aktin szálaból és az ezeket keresztkötésekkel egymáshoz rögzítő, ~3 nm átmérőjű spektrin szálaból felépülő váz, mely a külső szőrsejtek mechanikai stabilitását, valamint a sejt hengeres alakjának megtartását biztosítja (Forge, 1991; Holley és mtsai., 1992; Lim és Kalinec, 1998).

## 1. Bevezetés

Az oldalfal belső rétege a hártvás falú felszín alatti ciszterna, melynek membránjai az apikális pólusnál a canalicularis reticulum membránjaiban folytatódnak (*Spicer és mtsai., 1998*). A felszín alatti ciszterna szerkezete az endoplasmaticus reticulumhoz hasonlít. A szőrsejtben lévő mitochondriumok többsége a felszín alatti ciszterna mellett található és folytonosság látszik a mitochondriumok külső membránja és a felszín alatti ciszterna membránjai között (*Forge és mtsai., 1993*).



6. ábra A külső szőrsejtek oldalfalában a felszín alatti rácsozat radiális pillérei közötti ívben feszülő plasma membrán, a körkörös aktin és keresztben feszülő spektrin filamentumok által alkotott szerkezeti egység rajza. Ezek a szőrsejt oldalfalának elektronmikroszkópos képén finom egyenetlenség, ráncoltság formájában jelennek meg. Depolarizáció (+) a plasma membrán görbületi sugarának csökkenéséhez és ezáltal a sejt rövidüléséhez, míg hiperpolarizáció a görbületi sugár megnövekedése révén a sejt megnyúlásához vezet (*Raphael és mtsai., 2000*).

A két réteg között van az ún. kortikális rácsozat. Felépítésében két olyan citoskeletális fehérje (F-aktin és spektrin) szerepel, melyek a cuticularis lemezen is megtalálhatók. Az F-aktin és spektrin cuticularis lemezbeli merőleges elrendeződése az oldalfal teljes hosszában a kortikális rácsozatban folytatódik. Az egymástól ~40 nm-re lévő körkörös lefutású F-aktin filamentumok között keresztben hosszanti lefutású

## 1. Bevezetés

spektrin filamentumok feszülnek. A plasma membránt sugárirányú radiális pillérek pányva-szerűen rögzítik a párhuzamosan futó F-aktin kötegekhez és a szomszédos felszín alatti ciszternákhoz. A párhuzamos F-aktin filamentumok által határolt speciális szerkezetű egységek olyan „mikrodoménok” (*Holley és mtsai., 1992*), melyek felépítésüknek köszönhetően képesek egyrészt a membránpotenciál változás hatására alakjukat megváltoztatni, másrészt rugalmas energiát tárolni (6. ábra) (*Raphael és mtsai., 2000*).

### 1.1.2. A külső szőrsejtek működése

Az emlős külső szőrsejtek mechanikailag aktív, „senzo-motoros” sejtek, melyek a Corti-szerv hangingerre adott válaszában karakterisztikáját szabályozzák és felelősek a küszöb körüli erősségű hangok cochlearis erősítéséért (*Dallos., 1992*). A hallásküszöb körüli hangerősségnél a haladó hullám a külső szőrsejt révén aktívan erősítve hozza létre a belső szőrsejt receptor áramának kiváltásához szükséges inger erősséget. Ez az ún. „cochlearis erősítő” működés (*Davis, 1983*). A jelenség nonlinearis és jelentőségét a küszöb feletti, 50 dB erősségű hangok esetében már elveszíti (*Ruggero és mtsai., 2000*).

A külső szőrsejtek kétféle motoros aktivitása ismert ebben a folyamatban, a sejt hossztengelyének megfelelően: a lassú (másodpercek-percek alatt végbemenő) motilis sejtválasz (rövidülés-elernyedés) (*Zenner, 1986*) és a gyors vagy elektromotilitás ( $\mu\text{sec}$ , ill. msec alatt lejátszódó) (*Brownell és mtsai., 1985; Zenner és mtsai., 1985; Ashmore, 1987*).

A belső szőrsejtek szinte kizárólag afferens, a külső szőrsejtek pedig döntően efferens beidegzésűek (*Spoendlin, 1970*). A belső szőrsejteket ellátó afferens idegrostok az I. típusú bipoláris ganglion spirale sejtektől származó myelin hüvellyel borított rostok. 20 idegrost elágazás nélkül fut a legközelebbi belső szőrsejthez, centrális axonjuk az ipsilateralis nucleus cochlearisban szinaptizál. A külső szőrsejtek afferens beidegzését a II. típusú pseudo-unipoláris ganglion spirale sejtek adják, de ellentétben az I. típusú rostokkal, ezek kilépésük után elágaznak. A cochlea bázisán ~10, míg a csúcán ~50 külső szőrsejtet látnak el. Centrális axonjuk szintén az ipsilateralis nucleus cochlearisban végződik.

## 1. Bevezetés

A belső szőrsejtek efferenciája az ipszilateralis oliva superior laterális magcsoportjából érkezik és a belső szőrsejtekhez futó afferens idegrostok dendritjén végződik. A külső szőrsejtek efferens beidegzése szintén az ipszilateralis oliva superiorból, de annak mediális magcsoportjából származik és magukon a sejttesteken, az un. szinaptikus régióban végződik. A külső szőrsejteken végződő efferens neuronok neurotransmitter anyaga az ACh és a GABA. Az ACh receptorok döntően a cochlea bázisán, míg a GABA receptorok főleg a csúcán találhatók, a cochlea ellentétes vége felé haladva mindkét típusú receptor száma lecsökken (*Spoendlin, 1967; Plinkert és mtsai., 1993; Raphael és Altschuler, 2003*).

A cholinerg neurotranszmisszió befelé irányuló  $Ca^{2+}$  -áramlást eredményez, ami  $Ca^{2+}$  -indukálta  $Ca^{2+}$  -felszabadulást hoz létre (*Housley és Ashmore, 1991*). A  $Ca^{2+}$  -szignál különböző citoskeletális elemek foszforilációs folyamatait is elindítja (*Szönyi és mtsai., 1999; Sziklai, 2004*), mely a külső szőrsejtek mechanikai tulajdonságait képes megváltoztatni (*Dallos és mtsai., 1997*). GABA esetén is megfigyelhető az ACh hatására kialakuló hiperpolarizációhoz hasonló dóziszfüggő reverzibilis membránpotenciál változás (*Gitter és Zenner, 1992*). A citoskeletális fehérjék foszforilációja megváltoztatja a sejtfal merevségi állapotát és ezen keresztül a külső szőrsejt aktív energia visszacsatoló képességét, vagyis a cochlearis erősítő működést (*Dallos és mtsai., 1997; Dallos és He, 2000; Batta és mtsai., 2003*).

A mechanikailag aktív külső szőrsejtek lassú motilitása 20-60 másodperces idő intervallumban kialakuló sejtrövidülés (*Zenner, 1986; Dulon és mtsai., 1988, 1990; Schacht és mtsai., 1995*). A külső szőrsejtek lassú motilis alakváltozásának eredményeként bekövetkező rövidülés kiváltható mechanikai (folyadék áramlás), kémiai ( $K^+$ ) hatással, depolarizációval, elektromos térerővel, ozmotikus hatással, vagy az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint emelésével (*Dulon és mtsai., 1988; Dulon és Schacht, 1992; Minamino és mtsai., 1997; Batta és mtsai., 2003; Farkas és Sziklai, 2003*).

A lassú motilis sejtválasz ATP jelenlétét igénylő,  $Ca^{2+}$ -jel indukálta foszforilációs ill. defoszforilációs útvonalak aktiválódásának az eredménye, mely a citoskeletális elemek (beleértve az aktint és a spektrint is) foszforilációja v. defoszforilációja útján

## 1. Bevezetés

hozza létre a mozgást (Zenner és mtsai., 1985; Slepecky, 1989; Zenner, 1986, 1988; Dulon és mtsai., 1988; Batta és mtsai, 2003). A lassú motilis sejtválasz feltételezett élettani szerepe a cochlea védelmében és a cochlearis adaptációban lehet (Zenner, 1986; Dallos, 1992; Lim és Kalinec, 1998). Pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert.

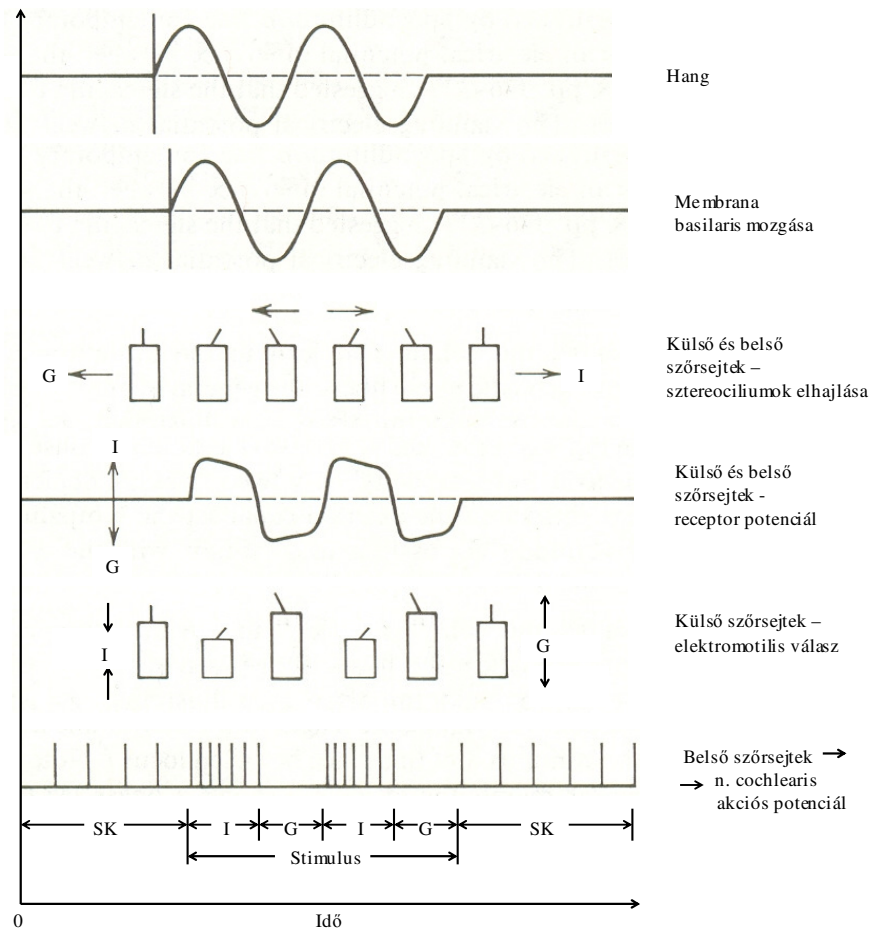
Az elektromotilitás a szinuszoid hanghullám okozta AC receptor áram keltette sejtmembrán feszültség változásokat valós időben követő sejthossz változás (rövidülés-megnyúlás), mely frekvencia követő (7. ábra), és fázisában is kapcsolt (5000 Hz-ig). A transzdukciós áram (mechano-elektrikus transzdukció) a nyugalmi membrán potenciál frekvencia követő oszcillálása révén gyors elektro-kinetikus sejtalakváltozást idéz elő, amely a nyugalmi sejthosszhoz képest nanométeres nagyságrendű rövidülés és megnyúlás (depolarizációra aktív rövidülés, hiperpolarizációra aktív megnyúlás jön létre) (Hudspeth és Corey, 1977; Weiss, 1982; Brownell és mtsai., 1985; Kachar és mtsai., 1986; Ashmore, 1987; Ashmore, 1990). Ez a frekvencia követő külső szőrsejt hosszváltozás az elektromotilitás.

A külső szőrsejtek hang hatására létrejövő membrana basilaris kitérések által vezérelt, feszültségfüggő sejtmozgásának fiziológiai szerepe az, hogy a membrana basilarisra megfelelő fázisú aktív energia-visszacsatolást valósít meg. A hanghullám keltette membrana basilaris rezgések amplitudó maximumának helyén a membrana basilaris kitérések fázisával megegyező ütemű mechanikai energia-visszacsatolás jön létre, mely megnöveli és jelentősen kiemeli a membrana basilaris kitérések amplitudó maximumát, ezáltal biztosítja a küszöb körüli hangok érzékelését (Ashmore, 1987). Az amplitudó maximum mindkét oldalán létrehozott eltérő fázisú mechanikai energia-visszacsatolás hatására a membrana basilaris kitérése jelentősen csökken (un. „széli vágás”), ezáltal biztosítva a cochlea rendkívül érzékeny frekvencia felbontó képességét (8. ábra).

Küszöb körüli erősségű hangoknál a gyors (elektro-) motilitás képezi a cochlearis erősítés alapját. A külső szőrsejtek gyors, a hanginger frekvenciáját követő, ciklusos rövidülését és megnyúlását, a sejtmembránban sűrűn elhelyezkedő ( $\sim 2500/\mu\text{m}^2$ ) (Kalinec és mtsai., 1992), feszültség függő konformáció változásra képes, prestin-nek

## 1. Bevezetés

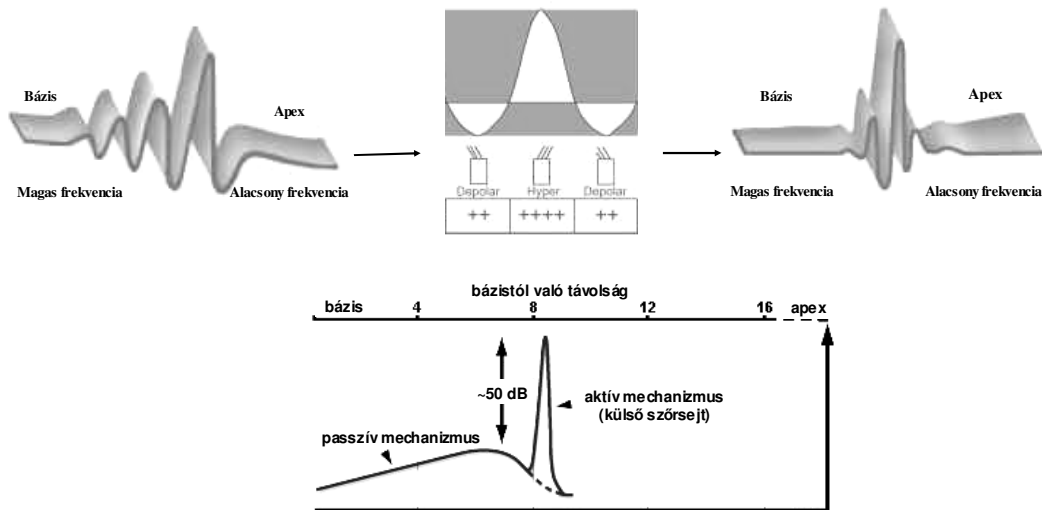
nevezett, módosult anion cserélő fehérje molekula idézi elő (Zheng és mtsai., 2000; Oliver és mtsai., 2001; Dallos és Fakler, 2002).



7. ábra A szinuszoid hang a membrana basilaris frekvencia specifikus helyén szinuszoid elmozdulást hoz létre, melynek hatására a szőrsejtek sztereociliumai elhajlanak. A hosszabb sztereociliumok irányába (jobbra) történő elhajlás ingerlő (I), míg az ellenkező irányba (balra) való elhajlás gátló (G) hatású. Ingerlésre a szőrsejtek receptor potenciálja emelkedik (depolarizáció), gátlásra pedig csökken (hiperpolarizáció). Receptor potenciál változásra a külső szőrsejtek elektromotilitással válaszolnak, míg a belső szőrsejtekben neurotranszmitterek szabadulnak fel, idegi kisüléseket okozva. (SK = spontán idegi kisülés).

A prestin 744 aminosavból álló polipeptid lánc, melynek 12 domén-je a sejtmembránban helyezkedik el (Zheng és mtsai., 2001). Elektromos impulzus hatására intracellulárisan klorid-iont köt meg és azt az extracelluláris tér irányába szállítja, de nem transzportálja oda (inkomplett transzporter) (9. ábra).

## 1. Bevezetés



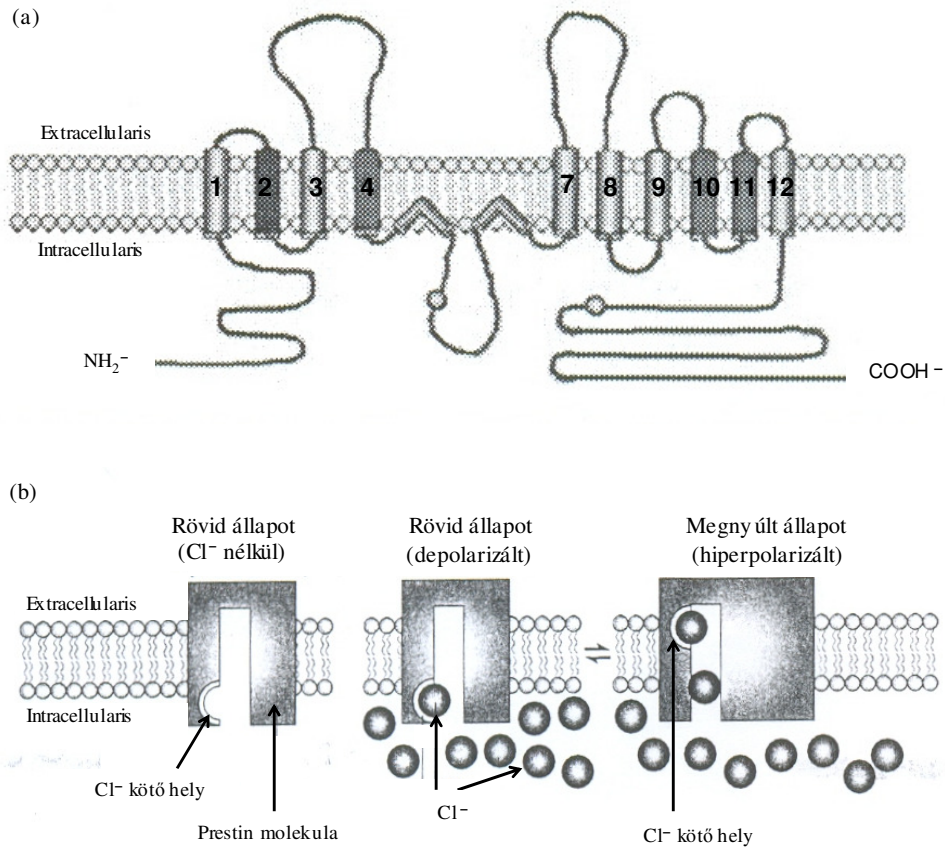
8. ábra A külső szőrsejtek a haladó hullám burkoló görbéjének amplitúdó maximumánál fokozzák a membrana basilaris kitérések nagyságát, így biztosítva a küszöb körüli hangok érzékelését, míg az amplitúdó maximum mindkét oldalán létrehozott eltérő fázisú mechanikai energia-visszacsatolással csökkenti a membrana basilaris kitérését, ezáltal biztosítva a cochlea küszöb érzékenységét és frekvencia felbontó képességét.

A membránpotenciál változásra, azzal szinkron, az anion vándorlása a fehérjén belül konformáció változást idéz elő. Az egyidejűleg bekövetkező alakváltozások összegződnek és a sejt hosszának megváltozását okozzák. A prestin molekula konformáció változása kizárólag feszültség vezérelt, intracelluláris energiahordozótól (ATP) független folyamat. A konformáció változások sejtszinten összeadódnak és sejt alakváltozást okozó mértéke azonban a citoszkeleton állapotától függ (Ashmore, 1987; Holley és Ashmore, 1988), mellyel szemben a prestin molekulák erő kifejtése működik.

A prestin alapú elektromotilitás összerendezésének, sejtmozgássá alakításának alapját a „mikrodoménokba” rendeződő plasma membrán és citoszkeleton által alkotott funkcionális egységek alkotják (Lim és Kalinec, 1998; Zhang és Kalinec, 2002). Ezek az alkotóelemek és aktuális állapotuk határozzák meg a külső szőrsejtek merevségét. A prestin molekulák a sejt merevsége ellen fejtenek ki erőt. A plasma membránban lévő prestin konformáció változásának következtében kialakuló elektromotilis amplitúdó nagysága a sejt merevség fokának függvénye. Ez a citoszkeleton geometriájától függ és metabolikus szabályozási folyamatok határozzák meg (pl. foszforiláció).

## 1. Bevezetés

A külső szőrsejtek motilis működése különböző útvonalakon végbemenő anyagcsere folyamatok szabályozása alatt áll. Ebben kitüntetett szerepe van a külső szőrsejtekben különösen magas szinten szabályozott  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizációs utaknak (Dulon és mtsai., 1990; Shridhar és mtsai., 1997; Dulon és mtsai., 1998; Sziklai, 2004).



9. ábra (a) A prestin másodlagos szerkezeti felépítése. A sejtmembránba ágyazódva ~12 extra- és intracelluláris hurkot képez, a két vége ( $\text{NH}_2^-$  és  $\text{COOH}^-$ ) intracellulárisan található. (b) Sematikus modell a prestin működéséről. Elektromos inger hatására a prestin klorid-ionszorongást mozgat a sejtmembránban, tényleges transzport funkció nélkül. Attól függően, hogy a  $\text{Cl}^-$  az intracelluláris (depolarizáció), vagy extracelluláris (hiperpolarizáció) kötőhelyre rögzül, a prestin molekula a rövid, vagy megnyúlt állapotba kerül (Dallos és Fakler, 2002).

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció kialakításában szerepe van az efferens neurotranszmisszióknak (ACh) (Housley és Ashmore, 1991; Doi és Ohmori, 1993; Sziklai és Dallos, 1993; Sziklai és mtsai., 1996; Dallos és mtsai., 1997; Szőnyi és mtsai., 1999),

## 1. Bevezetés

a cGMP-nek (Szőnyi és mtsai., 1999) és a Rho-kinázoknak (Rac1, RhoA, Cdc42) is (Kimura és mtsai., 1998; Inada és mtsai., 1999; Kalinec és mtsai., 2000; Zhang és mtsai., 2003).

Egyedül az otoakusztikus emisszió, mint ma már klinikailag alkalmazott audiológiai mérési módszer, bizonyítja az emlős cochlea mechanikai aktivitását (Kemp, 1978). A külső szőrsejtek elektromotilitása során fellépő sejtösszehúzódás/-megnyúlás ugyanis vibrációt okoz a belsőfül folyadékterében, mely a középfül hangvezető rendszerén keresztül áttevődik a külső hallójáratot kitöltő levegőbe és az így keletkezett emisszió mikrofonnal regisztrálható.

A külső szőrsejtek oldalfalának sajátos felépítése, a korábban már említett speciális szerkezeti egységek (Raphael és mtsai., 2000), különleges mechanikai tulajdonságok megjelenését eredményezik, megteremtik egy, a motor molekulától (prestin) független, az oldalfal merevségét befolyásoló rendszer működésének szerkezeti alapját és lehetővé teszik, hogy mechanikai szabályozás alatt tartsa a külső szőrsejtek cochlearis erősítő működését (Arima és mtsai., 1991).

A sejtfal merevségének megváltozásával módosul a motor fehérjék erőátviteli hatékonysága. Mivel a motor fehérjék a sejtfal által közvetített mechanikai ellenállással szemben dolgoznak (Dallos és He, 2000), az oldalfal merevség szabályozása (Batta és mtsai., 2003; Batta és mtsai., 2004) képes befolyásolni a külső szőrsejtek elektromotilitását. Ebben feltehetően a plasma membrán citoplasmatikus felszínéhez és a felszín alatti cisternalis rendszerhez szorosan kötődő subcorticalis rácsozat alkotóelemeiből felépülő microdoménok játsszák a legfontosabb szerepet. A sejtmembránban lévő ezen egységek sajátos szerkezete teremti meg annak a lehetőségét, hogy az egymástól függetlenül aktiválódó elemi, feszültség függő motor fehérjék alakváltozása összegződhessen és hosszirányú sejtmozgássá alakulhasson át (Kalinec és mtsai., 1992; Lim és Kalinec, 1998). A fenti felépítésű citoskeletalis rendszer teszi lehetővé a rugalmas előfeszített állapot fenntartását, mely a szőrsejtek nyugalmi, mechanikai ellenállását biztosítja és cilindrikus alakját fenntartja. A külső szőrsejtek motoros aktivitásának hatékonysága és ezáltal a cochlearis erősítés mértéke tehát a

## 1. Bevezetés

külső szőrsejtek hosszanti és körkörös irányú merevségével, ill. az egész sejt merevségét elsősorban befolyásoló oldalfal merevséggel áll szoros összefüggésben (Tolomeo és Steele, 1995; Dallos és mtsai., 1997; Dallos és He, 2000; He és mtsai., 2003; Batta és mtsai., 2003).

A lassú motilis sejtválasz megváltoztatja a Corti szerv geometriáját, ill. a cochlea mikromechanikai sajátságait (Dallos, 2003), ami az erősítési folyamat hatékonyságának módosulásához vezet (Holley és Ashmore, 1990; Holley és mtsai., 1992). Túl erős hangok esetén feltehetően ez védi a Corti-szervet a károsodástól (Zenner, 1986). A reverzibilis lassú motilis sejtválasz és következményes oldalfal merevség változás sejtszintű mechanizmusának alapjai még kevéssé ismertek. Mindeddig nincs kísérletes bizonyíték a lassú motilis sejtválasz mértéke, az oldalfal merevsége és a gyors motilis válasz nagysága között.

## 1.2. Célkitűzések

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

## 2 Anyagok és módszerek

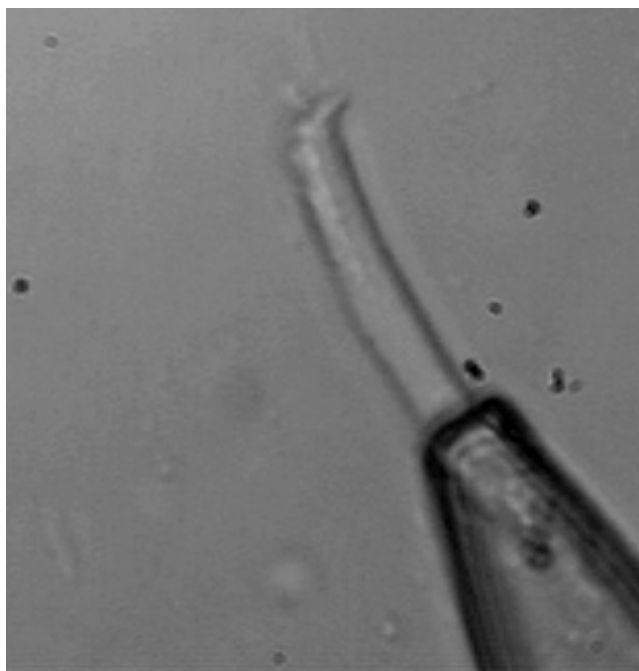
### 2.1. Sejtelőkészítés

A kísérletekhez 3-5 hetes, pigmentált, ép Preyer-reflexú, i.p. penthobarbitallal túllaltatott tengeri malacokat használtunk. Decapitálás és a bulla ossea eltávolítása után mikroszkóp alatt, folyadékfürdőben a Corti-szerv kanyarulatait eltávolítottuk. Kollagenáz-emésztést (IV. típus, 1 mg/ml, Sigma) alkalmaztunk, szobahőmérsékleten. A Corti-szerv darabjait 400 µl Hank oldatot tartalmazó kísérleti kamrába helyeztük, majd ezt követően a külső szőrsejtek finom mechanikai behatással leválaszthatóvá, izolálhatóvá váltak. A sejtek  $74 \pm 4$  µm átlagos sejthosszal (n = 92) rendelkeztek, inkubáló oldatnak Hank oldatot használtuk (mM-ban): 136,75 NaCl, 5,36 KCl, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,34 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,26 CaCl<sub>2</sub>, 0,81 MgSO<sub>4</sub>, 5,56 glükóz, 4,17 NaHCO<sub>3</sub>, 10 HEPES (300 mOsm/l, pH 7,4).

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

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

A sejtek általában 2 óra hosszat képesek tartani ezeket a feltételeket (10. ábra).



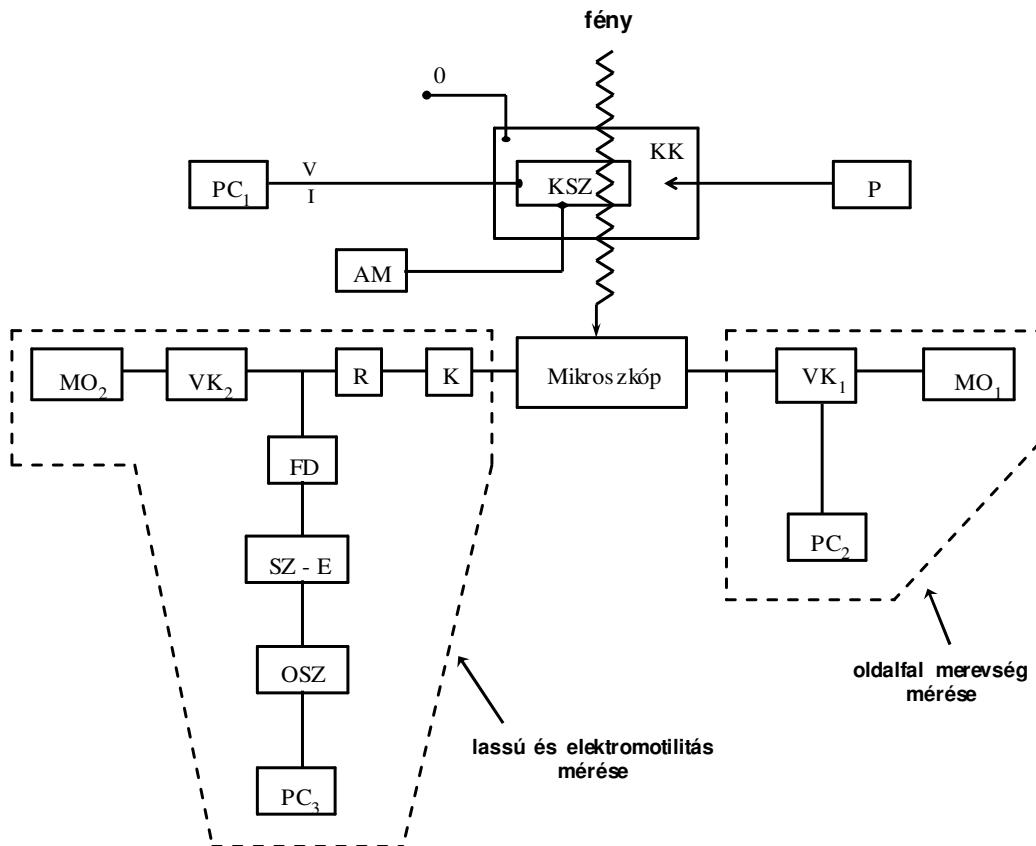
10. ábra Egy, a mérésekhez használt, vizsgálatra alkalmas kritériumokkal rendelkező külső szőrsejt fénymikroszkópos képe (200x).

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

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

### 2.2.1. Az alkalmazott technikai eszközök és programok

A kísérleteknél alkalmazott technikai eszközök blokk sémáját a 11. ábra mutatja. Az izolált külső szőrsejtek lassú és elektromotilitásának méréséhez mikrokamrában rögzített sejt ciliáris pólusának nagyított képét egy keskeny résen keresztül PIN-10D fotodiódára vetítettük és az elmozdulás által keltett fotoáram változást erősítés, szűrés



11. ábra A külső szőrsejtek oldalfal merevségének méréséhez, lassú és elektromotilitásuk vizsgálatához alkalmazott berendezések blokk sémája. KK: kísérleti kamra; KSZ: külső szőrsejt; P: perfúziós rendszer a lassú motilis válasz kiváltásához; PC<sub>1</sub>: számítógép vezérelt áram (I) – feszültség (V) konverter biztosította elektromos négyzög impulzusok az elektromotilitás kiváltásához; AM: aspirációs mikrodeformációs rendszer az oldalfal merevség méréséhez; K: léptetőmotoros optikai kalibráció; R: keskeny, téglalap alakú rés; VK: CCD-kamera; MO: monitor; PC<sub>2</sub>: oldalfal merevség mérésénél nyert fáziskontraszt képek digitális rögzítéséhez használt számítógép; FD: fotodióda; SZ-E: szűrő-erősítő berendezés; OSZ: oszcilloszkóp; PC<sub>3</sub>: lassú és elektromotilitás keltette fotoáram válaszok oszcilloszkópon rögzített képeinek digitalizálásához használt számítógép.

## 2. Anyagok és módszerek

után Tectronix TDS 220 oszcilloszkóppal rögzítettük. Az oszcilloszkópon rögzített fotoáram válaszok PC-n történő digitalizálásához a Tectronix saját szoftverét használtuk (WaveStar for Oscilloscopes, 2.6. verzió). A fotodióda detektor és erősítő együttes ún „cut-off” (törési pont) felülvágó frekvenciája 1 kHz, csökkenése 6 dB / oktáv.

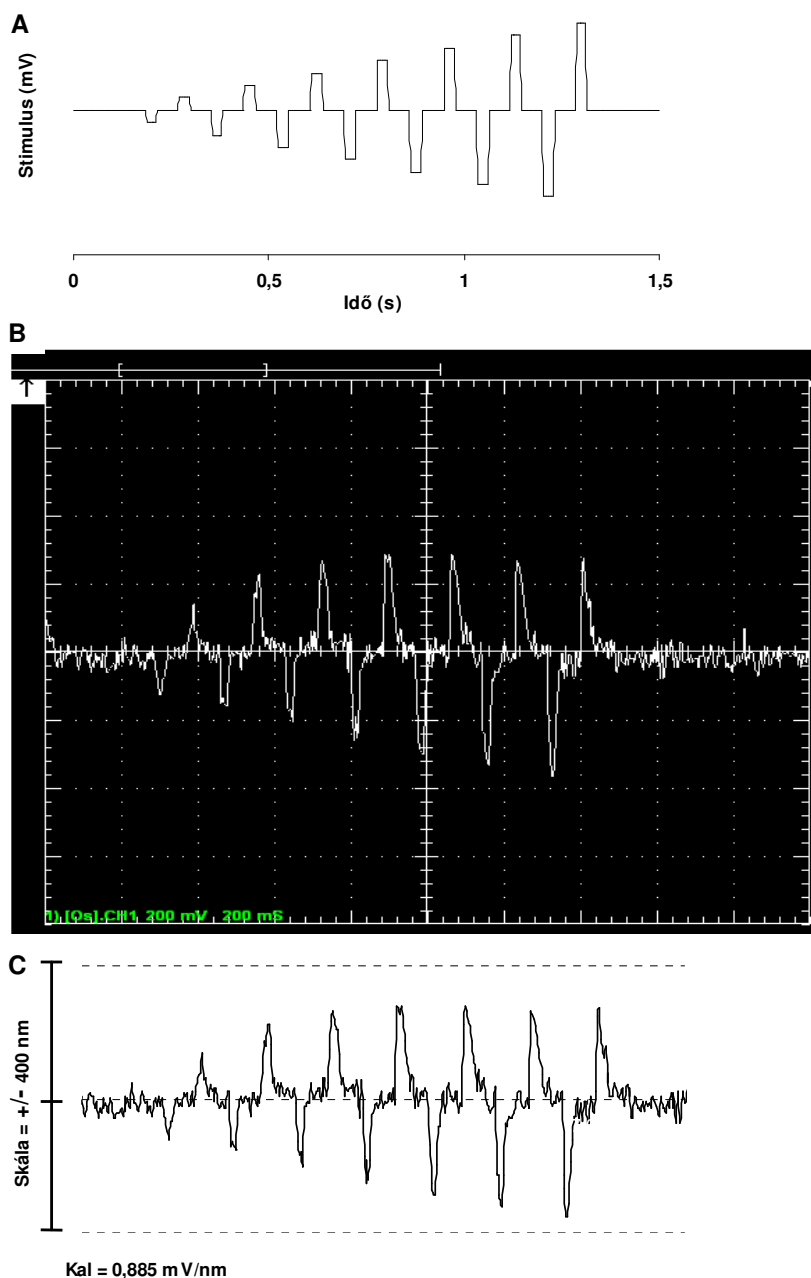
A lassú motilis sejtválasz előidézésére a Farkas és Sziklai (2003) által leírt mikroáramlási módszert alkalmaztuk (lásd 2.2.2.).

A sejtek elektromotilitásához az ingerlő feszültséget számítógép vezérelt elektromos négyszög impulzus sorozatokkal keltettük (IBM AT clone) (Evans és mtsai., 1990; Sziklai és mtsai., 1996). A négyszög impulzusok, egymást követően ellenkező polaritásúak voltak (hyperpolarizáló és depolarizáló) és 7 impulzus párból álltak (12.a ábra).

A külső szőrsejtek oldalfal merevségét aspirációs mikrodeformációs technikával vizsgáltuk (Oghalai és mtsai., 1998; Batta és mtsai., 2003). A sejtek mikroszkóppal nagyított, fáziskontraszt képeit Sony DXC-107P videokamerán keresztül PC-hez csatolt külső digitalizáló kártya (Pinnacle Systems, INC. USA, California) segítségével rögzítettük, majd digitális tisztítás, zajmentesítés után egyedi fejlesztésű programokkal (Batta) pszeudokolor átalakítást végeztünk.

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

## 2. Anyagok és módszerek



12. ábra (A) a külső szőrsejtek elektromotilitásának kiváltásához alkalmazott négyzetű impulzus stimulusok. A hiperpolarizáló (pozitív) és depolarizáló (negatív) feszültség ingerek 7 lépésben,  $\pm 35$  mV-től  $\pm 240$  mV-ig, 35 mV lépésekben, váltakozó polaritással emelkednek. A négyzetű impulzusok időtartama 0,024 s, két impulzus közti szünet 0,06 s; (B) a stimulus által egy külső szőrsejten ( $L = 76 \mu\text{m}$ ) kiváltott típusos elektromotilis sejt válasz okozta fotoáram változás (mV-ban mért) oszcilloszkópon rögzített, digitalizált görbéje; (C) a  $\pm 400$  nm-es skála mutatja az elektromotilis válasz nagyságának kalibrált, nm-ben kifejezett, számítógéppel szerkesztett görbéjét. Kal: a forgatómotoros optikai rendszer minden sejt stimuláció előtt felvett, számított hitelesítési értéke (segítségével határozható meg nm-ben a mV-ban mért elmozdulás tényleges értéke).

## 2. Anyagok és módszerek

Az ingerlő impulzus sorozat megtervezésekor figyelembe vettük, hogy élettani körülmények között a szőrsejtek receptor potenciálja 1mV – 30 mV depolarizációs tartományba esik. Figyelemmel arra, hogy a kísérleteink során a szőrsejt 1/10 része volt a mikrokamrán belül és a mikrokamra feszültség osztóként működik, ezért az ingerlő potenciál a négyszög impulzus 1/10-e. Tehát a legkisebb inger ( $\pm 35\text{mV}$ ) esetén 3,5 mV, amely a küszöb körüli erősségű hangok által kiváltott receptor potenciál nagyságához közel álló érték. A maximálisan alkalmazott  $\pm 240\text{mV}$  négyszög impulzus erősség effektíve 24 mV a sejtmembránon, amely már az elektromotilis válasznagyság szaturációs tartományba eső mértékének felel meg. A depolarizációs és hyperpolarizációs ingerekre adott szaturálódó elektromotilis válasznagyság módot ad a sejt állapotának becslésére: a motilis válasz kontrakciós asszimetriája a sejtmembrán jó állapotára utal.

### 2.2.2. A külső szőrsejt lassú motilis válaszáinak mérése

Az izolált külső szőrsejteket tartalmazó, Hank oldattal töltött kísérleti kamrát mikroszkóp állványra helyeztük. A vizsgálandó külső szőrsejtet a szinaptikus pólusánál fogva  $\sim 9\ \mu\text{m}$  belső átmérőjű üveg mikrokapillárisba szívtuk (*Sziklai és mtsai., 1996*) úgy, hogy a sejt mag még éppen a kapillárison belül helyezkedett el (a sejt hossz kb. 10%-a, mintegy 6-8  $\mu\text{m}$ ) (*10. ábra*). A mérésekhez használt mikrokapillárisokat Clark EC 15 TF üveg kapillárisból készítettük, 2 lépcsős formálási programmal. Hőkezeléssel lesimítottuk és úgy képeztük ki a hegyét, hogy csak a legvégének a belső átmérője egyezzen meg a szőrsejt külső átmérőjével, belseje hirtelen kiszélesedjen. A beszívott sejt ezáltal csak vékony keresztmetszeten, mégis mechanikailag stabilan rögzült a mikrokapillárisban, ugyanakkor mind a kapillárison belüli, mind azon kívüli része szabadon mozoghatott (*Sziklai és mtsai., 1996*).

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

A hosszváltozás során bekövetkező fotoáram választ minden mérés előtt manuálisan működtethető léptetőmotorral forgatott optikai eszközzel kalibráltuk (1,8° lépés, mely a

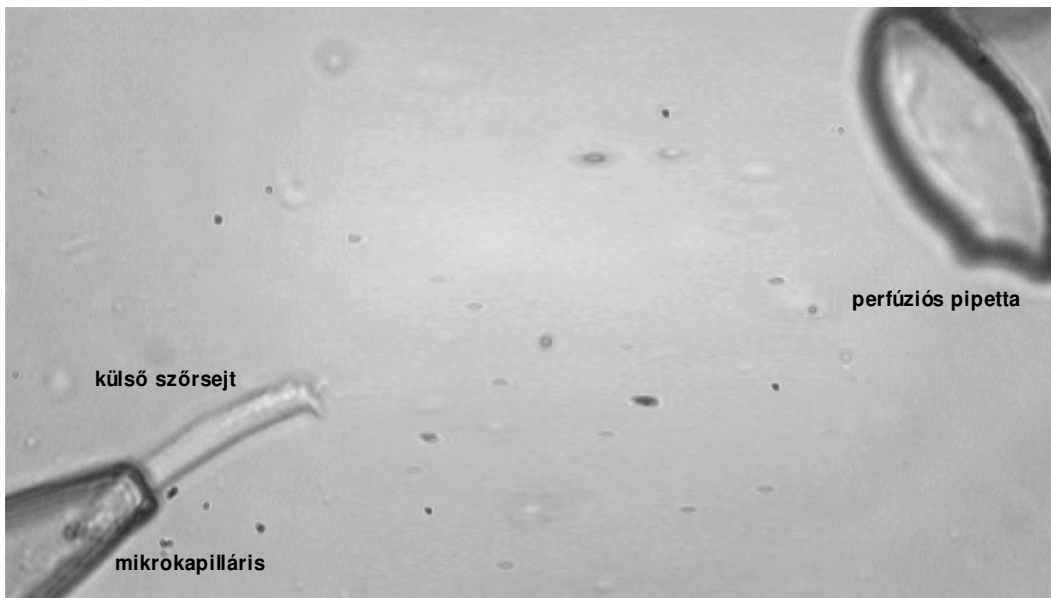
## 2. Anyagok és módszerek

számítás alapján ~200 nm elmozdulásnak felelt meg) (Clark és mtsai., 1990), erősítés, szűrés után a fotoáram változásokat oszcilloszkóppal rögzítettük. A fotoáram válaszokat PC-n digitalizáltuk.

A külső szőrsejtek mikrokapillárison kívül eső részének motilis válaszait mértük. A lassú motilis sejtválasz előidézésére a Farkas és Sziklai (2003) által leírt mikro-áramlási módszert alkalmaztuk. A perfúziós pipettákat Clark EC 15TF üveg-kapillárisból készítettük 2 lépcsős formálási programmal, ~50  $\mu\text{m}$  belső átmérővel. A pipettát műanyag cső segítségével polietilén csapon keresztül egy 2  $\text{cm}^3$  térfogatú nyitott műanyag tartályhoz csatoltuk, melynek folyadékszintjét a mérésekhez használt 400  $\mu\text{l}$  térfogatú kísérleti kamra folyadékszintjére egyenlítettük ki úgy, hogy a perfúziós pipettában sem befelé, sem kifelé irányuló áramlás ne legyen. Az egyensúlyi folyadékszint beállítása a duplatartályos kísérleti kamra második medencéjében történt. A perfúziós pipetta szájadéka a sejttől ~150  $\mu\text{m}$ -re helyezkedett el, szájadékának alsó széle a folyadék kamra aljához támaszkodott, a sejt hossz tengelyével párhuzamosan, annak mintegy folytatásaként (13. ábra).

A lassú motilis sejtválaszt 0,6  $\mu\text{l}/\text{perc}$  sebességgel áramló extracelluláris folyadékkal (Hank oldat) ( $n = 9$ ) (mechanikai ingerlés), vagy 12,5 mM KCl oldattal ( $n = 9$ ) (mechanikai + kémiai ingerlés) váltottuk ki. Az előzetes vizsgálatokból kiderült, hogy a motilis válasz mértéke egyenesen arányos a perfúzió gyorsaságával. Azért választottuk ezt az áramlási sebességet, mert az előzetes vizsgálatok során az általa kiváltott lassú motilis sejtválasz mértéke ( $< 1,5 \mu\text{m}$ ) a fiziológiai tartományon belül maradt. Mindkét folyadék áramoltatása 90 másodpercig tartott, a nem szelektív serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6  $\mu\text{M}/\text{l}$ ) és jelenléte nélkül ( $n = 9$ , minden kísérletnél). A külső szőrsejtek okadainsavval való kezeléséhez 30 perces inkubációt alkalmaztunk, a kísérletek megkezdése előtt (Amberg és mtsai., 2001; Fernandez és mtsai., 2002; Kohler és Blatt, 2002). A lassú motilis sejtválaszt 225 másodpercen keresztül folyamatosan rögzítettük. A kísérlet indítását követően 45 másodperccel kezdődött a folyadék áramlása, ami 90 másodpercig tartott. Ezt áramlás nélküli 90 másodperces nyugalmi (megnyúlási) periódus követte (14. ábra).

## 2. Anyagok és módszerek



13. ábra A vizsgálandó külső szőrsejtet szinaptikus pólusa felől vékony üveg mikrokapillárisba szívtuk. A lassú motilis sejtválasz kiváltása, a mechanikai hatást szimuláló, 0,6  $\mu$ l/perc sebességű folyadék (norm. Hank) áramlással és 12,5 mM KCl tartalmú oldat (kémiai hatás) áramlásával történt. A perfúziós pipetta átmérője  $\sim$  50  $\mu$ m, távolsága a sejtől  $\sim$ 150  $\mu$ m.

### 2.2.3. A külső szőrsejt elektromotilitás mérése

Az izolált külső szőrsejtek elektromotilitását az elektromos négyszög impulzusokkal keltett ingerlő feszültségre adott motilis válaszok mérésével végeztük (Evans és mtsai., 1990; Sziklai és mtsai., 1996). Az elektromotilis válaszok nagyságát a mechanikai (külső oldat áramlás) és kémiai ingerlés (12,5 mM KCl oldat perfúzió) hatásra, a nem szelektív serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6  $\mu$ M/l) és jelenléte nélkül ( $n = 9$ , minden kísérletnél) bekövetkező lassú motilis sejtválasz (rövidülés) és visszatérési periódus (megnyúlás) során egyaránt mértük. Minden kísérlet során az áramlás megkezdése előtt (20 s), a perfúzió okozta lassú motilis sejtválasz (rövidülés) alatt (60-120 s) és a visszatérési fázisban (megnyúlás) (150-170 s), az alábbi időpontokban történtek a mérések: 20, 60, 80, 120, 150 és 170 másodperc (14. ábra).

## 2. Anyagok és módszerek

Az izolált külső szőrsejteket tartalmazó, extracellularis oldattal töltött kísérleti kamrát mikroszkóp állványra helyeztük, majd elkezdtük a lassú motilis sejtválasz mérésénél alkalmazott kísérleti protokollt. Az elektromotilitás mérését, a lassú motilitási folyamat közben, a fentebb megadott időpontokban végeztük. Az ingerlő feszültséget  $\pm 35$  mV-tól  $\pm 240$  mV-ig, 7 lépésben egyenletesen emelkedő, váltakozó polaritású, számítógép vezérelt elektromos négyszög impulzusokkal keltettük (*Evans és mtsai., 1990*), az egyes impulzusok időtartama 24 msec, két impulzus közti szünet 60 msec.

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

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

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

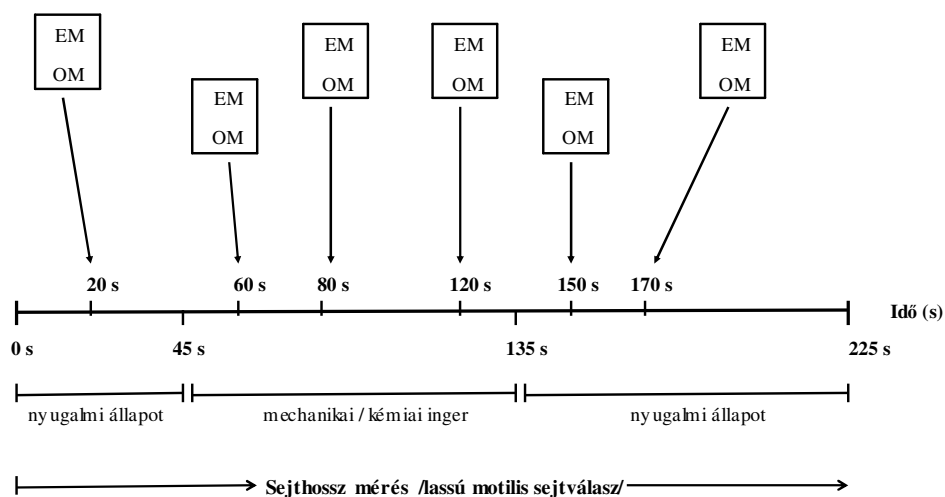
### 2.2.4. A külső szőrsejt oldalfal merevség vizsgálata

Az oldalfal merevségét aspirációs mikrodeformációs technikával vizsgáltuk (*Oghalai és mtsai., 1998; Batta és mtsai., 2003*). Ezzel az eljárással a sejtfal húzóerővel szembeni deformálódását mérjük. A sejt oldalfalára mikropipettán keresztül ismert (az oldalfal három rétegű struktúrájának intaktságát megtartó 4-10 H<sub>2</sub>O cm közötti) negatív nyomást alkalmaztunk. A sejtfal merevségét a sejtfal pipettába való behúzódásának

## 2. Anyagok és módszerek

mértékéből állapítjuk meg. A mikrodeformáció meghatározását a külső szőrsejtekről készült felvételek vizuális elemzése teszi lehetővé. Megfelelően pontos mérésekhez kellő nagyítás, megfelelő felbontás és a háttértől jól elkülönülő kontrasztos sejthatár szükséges.

A külső szőrsejtek oldalfal merevségét a lassú motilis sejtválasz (rövidülés) és visszatérési periódus (megnyúlás) során vizsgáltuk, melyet mechanikai (külső oldat áramlás) és kémiai (12,5 mM KCl oldat perfúzió) hatással váltottunk ki. Nem szelektív serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6  $\mu$ M/l) ( $n = 5$ , minden kísérletnél) is elvégeztük a kísérleteket (14. ábra).



14.ábra A kísérleti protokoll grafikus ábrázolása. A lassú motilis sejtválasz mérésekor a külső szőrsejtek hosszváltozását 225 másodpercig folyamatosan rögzítettük. A kísérlet indítása 45 másodperces nyugalmi állapottal kezdődött, ezt követte a 0,6 $\mu$ l/perc sebességgel áramló extracelluláris oldattal (mechanikai) vagy 12,5 mM KCl oldattal (kémiai) 90 másodpercig történő ingerlés a nem szelektív serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében (0,6  $\mu$ M/l) és jelenléte nélkül, végül 90 másodperces áramlás mentes nyugalmi állapot következett. Az elektromotilitás (EM) és az oldalfal merevség (OM) mérése az áramlás megkezdése előtt (20 s), a mechanikai és kémiai ingerlés alatt (60, 80, 120 s) és az áramlás mentes periódus során (150, 170 s) a megadott időpontokban történt, minden kísérlet során.

## 2. Anyagok és módszerek

Az aspirációs üvegpipetta Clarc EC 15 TF üvegapillárisból készült, 5 lépcsős programmal. Belső átmérője  $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$  volt. A mikropipettát Hank oldattal töltöttük fel. A megfelelő negatív nyomás beállításához a pipettát egy vékony műanyag csővel folyadékoszlopos manométerhez csatlakoztattuk és  $6 \text{ H}_2\text{O cm-s}$  negatív nyomás mellett mértük az oldalfal behúzódtát. A méréseket  $400 \mu\text{l}$  fiziológiás extracelluláris folyadékot tartalmazó műanyag kísérleti kamrában, fáziskontraszt mikroszkóp alatt,  $400\times$ -os nagyítást alkalmazva végeztük. A mechanikai és kémiai hatásra bekövetkező lassú motilis sejtválasz meghatározott időpontjaiban a külső szőrsejtek oldalfalához illesztett mikropipettára kapcsolt negatív nyomás következtében a pipettába 30 másodperc alatt behúzódtó oldalfal részlet hosszúságát mértük. A külső szőrsejtek mikroszkóppal nagyított, fáziskontraszt képeit CCD videokamerán keresztül PC-hez csatolt külső digitalizáló kártya segítségével rögzítettük, majd digitális tisztítás, zajmentesítés után pszeudokolor átalakítással tettük jobban láthatóvá (15. ábra).



15. ábra Az oldalfal merevség mérése aspirációs mikrodeformációs módszerrel. A CCD videokamerával rögzített kép digitális tisztítás, zajmentesítés, pszeudokolor átalakítás után. A mikropipettán belüli nyíl a negatív nyomásra behúzódtó oldalfal-részletre mutat (képfelbontás:  $18 \text{ képpont} / \mu\text{m}$ ).

## 2. Anyagok és módszerek

A pszeudokolor átalakításhoz egyedi fejlesztésű, Turbo Pascal programnyelven írt programokat használtunk (Batta). A mikroszkópos kép digitalizálása után a különböző optikai sűrűségű sejtpartikulumok különböző szürkeárnyalatos képpontként ábrázolódtak. Az így digitalizált képek bittérképes (bmp) képpont információi mátrix formába való rendezése után alkalmassá váltak különböző algoritmusok szerinti számítógépes feldolgozásra. A kiválasztott algoritmusok által átalakított képpont információkhoz a standard VGA színskála színeit hozzárendelve, valamint kontrasztkiemelést és digitális képkivonást is alkalmazva nyertük a pszeudokolor képeket. Az így nyert kontrasztos képeken 18 képpont /  $\mu\text{m}$  képfelbontást jött létre. Ezt követően az oldalfal merevségi mutatóját ( $S_p$ ) az alábbi összefüggés alapján határoztuk meg:

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

ahol  $\Delta P$  ( $\text{nN} / \mu\text{m}^2$ ) a pipettán keresztül applikált negatív nyomás,  $r$  ( $\mu\text{m}$ ) a mikropipetta belső átmérője,  $\Delta L$  ( $\mu\text{m}$ ) a pipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza (Oghalai és mtsai., 1998; Batta és mtsai., 2003).

### 2.3. Matematikai módszerek, statisztikai analízis

A külső szőrsejtek oldalfal merevségének számításához a korábban sokak által használt un. kupolamodell helyett az Euler modellt használtuk. A kupolamodell azon alapszik, hogy a sejtfal a mikropipettán keresztül alkalmazott szívóerő hatására a pipetta szájadékának megfelelő átmérőjű kupolát formálva türemkedik be. Ez a modell a kis alakváltozással járó esetekben tökéletes leírást ad az alakváltozásra, azonban vizsgálataink során a külső szőrsejtek oldalfala alakváltozásának mértéke indokoltta tette az ettől a modelltől való eltérést. Méréseink során a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza a kupolaképződés nagyságát lényegesen meghaladta ( $\sim 10x$ ), ennek megfelelően az oldalfal behúzódás mértékének meghatározása során olyan mérési

## 2. Anyagok és módszerek

eljárást alkalmaztunk, mely alkalmas volt a kupolaképződés jelenségének korrigálására (Batta és mtsai., 2003). Mivel a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet az alkalmazott negatív nyomásérték mellett a mikrodeformáción kívül más változást nem szenved (pl.: az oldalfal alkotóelemeinek szétválása vagy vakuolum képződés; Oghalai és mtsai., 1998; Batta és mtsai., 2003), az alakváltozás alapján meghatározható merevségi mutató a teljes, mikropipettába behúzódó sejtrészlet kumulatív, átlagos merevségi mutatója lesz. Ennek megfelelően a mikropipettában létrejövő alakváltozás jó közelítéssel modellezhető egy homogén, hengeres rúd rugalmas alakváltozásaként (1. egyenlet).

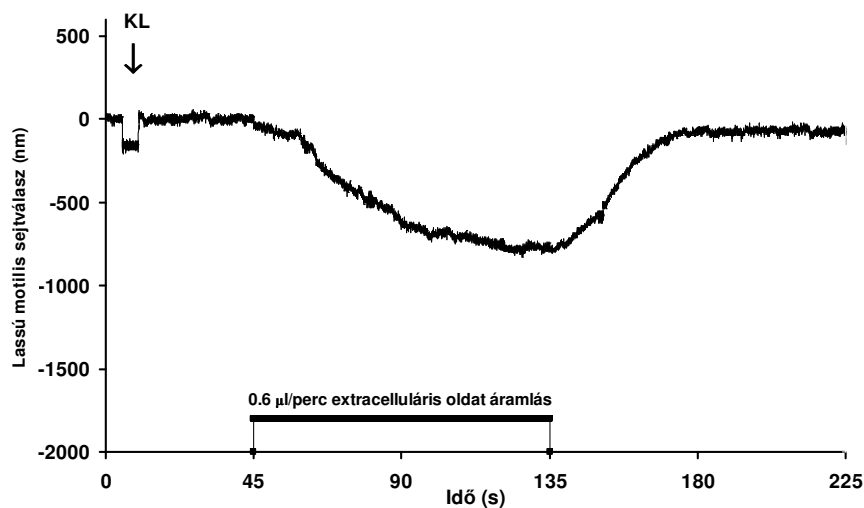
A külső szőrsejtek merevségfüggő elektromotilitás változásának leírásához egy módosított találatelméleti modellt alkalmaztunk. Ennek során feltételeztük, hogy a külső szőrsejtek elektromotilitása két részből tevődik össze: egy oldalfal merevség által szabályozott és egy, az oldalfal merevség szabályozása alatt nem álló részből. Az oldalfal merevség szabályozó hatása az elektromotilitásra modellünkben úgy valósul meg, hogy az oldalfal merevség fokozódása az elektromotilis egységek elsőrendű kinetika szerinti egyirányú, látszólagos inaktivációját hozza létre. A látszólagos inaktiváció modellünkben nem az elektromotilis egységek struktúrális destrukciójából eredő funkciókiesést, hanem az oldalfal merevség fokozódás által létrehozott funkcionális inaktiválódást jelenti (2. egyenlet).

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

## 3 Eredmények

### 3.1. A külső szőrsejtek mechanikai és kémiai ingerlésre bekövetkező lassú motilis válasza

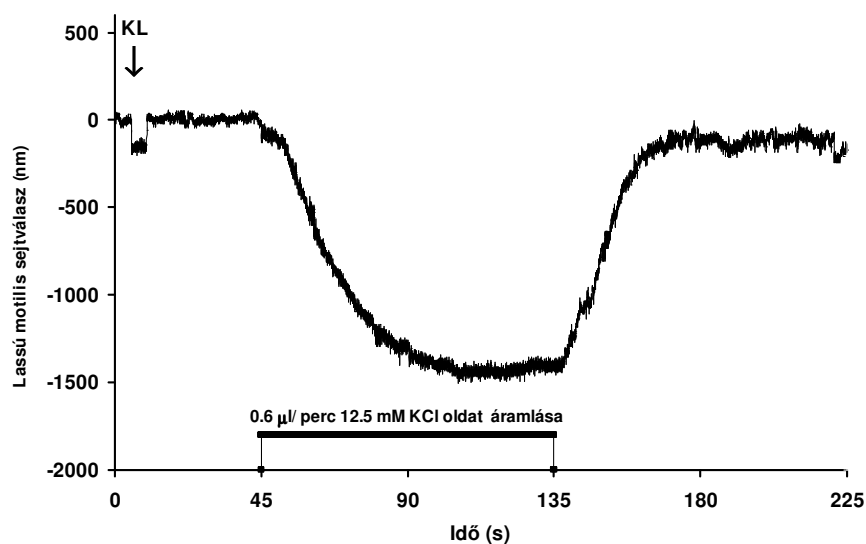
A külső szőrsejtek lassú motilis válaszát mind mechanikai, mind kémiai ingerléssel egyaránt vizsgáltuk. Mechanikai ingerlés hatására (extracelluláris folyadék alacsony, 0,6  $\mu\text{l}/\text{perc}$  sebességű áramoltatása a kísérleti kamrába) jól mérhető, reverzibilis, lassú motilis sejtválasz (rövidülés) lépett fel. A sejt rövidülés a maximumát  $\sim 75$  másodperccel az áramlás megkezdését követően érte el ( $774 \pm 87$  nm) ( $n = 9$ ), további sejtösszehúzódást nem észleltünk. Az áramlás felfüggesztése után a sejtek megnyúltak, hosszuk megközelítően visszatért a kiindulási értékre (16. és 19. ábra; I. táblázat).



16 ábra Extracelluláris folyadék (Hank oldat) áramoltatása során egy külső szőrsejt ( $L = 76 \mu\text{m}$ ) lassú motilis válaszána grafikus regisztrátuma. A vastag vonal jelöli az áramlás időtartamát. A kalibrációs lépés (KL) 200 nm.

### 3. Eredmények

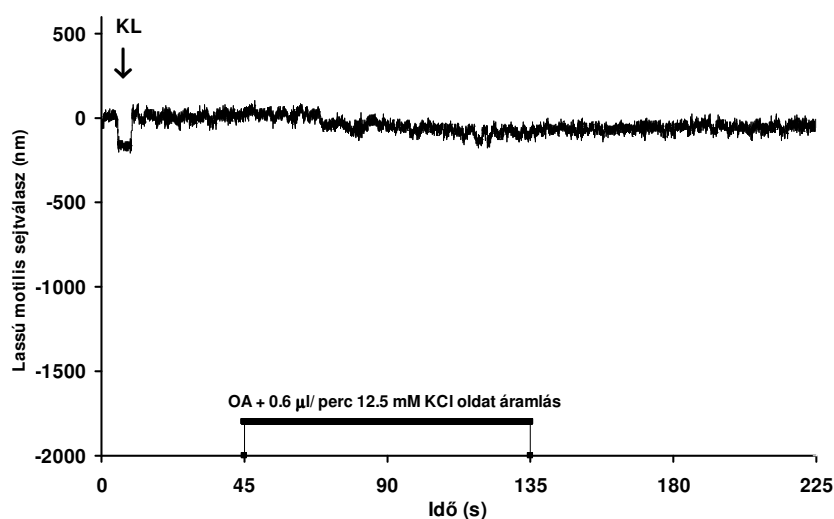
Kémiai ingerlés során (12,5 mM KCl oldat azonos sebességű áramoltatására) gyorsabb lefolyású és nagyobb mértékű, közel kétszer akkora lassú motilis sejtválasz alakult ki ( $1465 \pm 159$  nm) ( $n = 9$ ), mint mechanikai ingerlés hatására. A maximális lassú motilis sejtválasz ebben az esetben is ~75 másodperccel az áramlás megkezdését követően alakult ki, mely a folyadékáramlás befejezéséig már nem fokozódott. Az áramlás felfüggesztése után a sejthossz megközelítően visszatért a kiindulási értékre (17. és 19. ábra; I. táblázat).



17. ábra 12,5 mM KCl oldat 0,6 µl/perc sebességű áramoltatás hatása ( $L = 72$  µm) egy külső szőrsejtre. A lassú motilis sejtválasz dinamikája gyorsabb, mértéke közel 2x-e a mechanikai ingerlés során fellépő sejtválasznak. A vastag vonal jelöli az áramlás időtartamát. A kalibrációs lépés (KL) 200 nm.

A külső szőrsejtek nem specifikus serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsavban történő 30 perces előinkubációját követően sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerléssel nem volt kiváltható lassú motilis sejtválasz. A nyugalmi sejthossz az áramlás során végig változatlan maradt (18. és 19. ábra; I. táblázat).

### 3. Eredmények



18. ábra Okadainsav (OA) 30 perces előinkubációját követően, 0,6 µl/perc sebességű 12,5 mM KCl oldat áramoltatása során rögzített lassú motilis sejtválasz regisztrátuma ( $L = 75 \mu\text{m}$ ). A szőrsejt nyugalmi hossza az áramlás alatt nem változott. A vastag vonal jelöli az áramlás időtartamát. A kalibrációs lépés (KL) 200 nm.

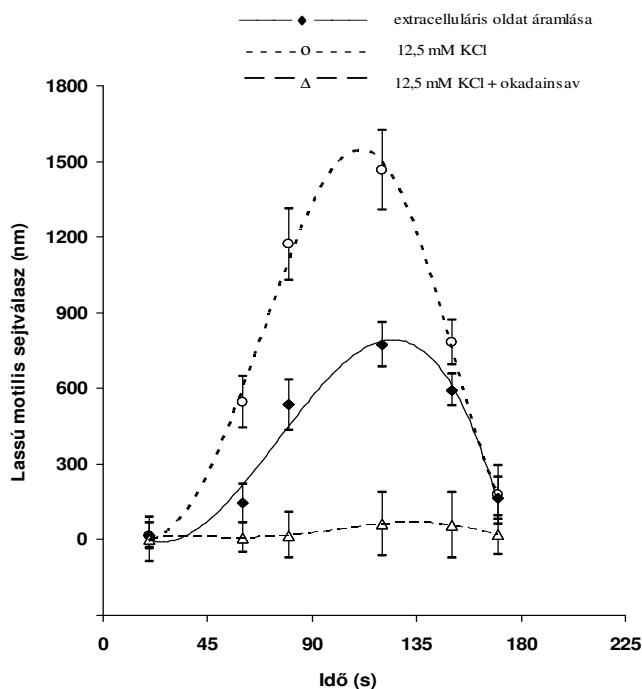
#### I. táblázat

Lassú motilis sejtválasz (nm) ( $n=9$ , minden kísérletben) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Idő (s)	M	$\text{K}^+$	OA+M	OA+ $\text{K}^+$
20	$-16 \pm 51$	$-18 \pm 47$	$10 \pm 97$	$-4 \pm 88$
60	$-144 \pm 76$	$-547 \pm 103$	$14 \pm 124$	$-8 \pm 59$
80	$-534 \pm 98$	$-1172 \pm 141$	$-17 \pm 42$	$-17 \pm 91$
120	$-774 \pm 87$	$-1465 \pm 159$	$-47 \pm 85$	$-61 \pm 126$
150	$-594 \pm 64$	$-781 \pm 89$	$-77 \pm 58$	$-57 \pm 131$
170	$-165 \pm 83$	$-177 \pm 116$	$-25 \pm 117$	$-19 \pm 78$

A külső szőrsejtek lassú motilis sejtválasza, az idő függvényében, a sejtek mechanikai (M), mechanikai + kémiai ( $\text{K}^+$ ), okadainsav + mechanikai (OA+M) és okadainsav és mechanikai + kémiai (OA+ $\text{K}^+$ ) ingerlés hatására. A lassú motilis sejtválasz folyamatosan rögzítésre került a 225 másodperces protokoll időtartama alatt. A folyadékáramlás 45 másodperccel a kísérlet megkezdése után indult és 90 másodpercig tartott. Az ezt követő áramlás nélküli 90 másodperc képviseli a relaxációs (megnyúlási) fázist. A lassú motilis sejtválasz alábbi időpontokban mért értékeit mutatja a táblázat: a folyadékáramlás megkezdése előtt (20 s), a lassú motilis sejtválasz (rövidülés) alatt (60, 80, 120 s) és a nyugalmi periódus (megnyúlás) során (150, 170 s), minden kísérletnél azonos időpontban.

### 3. Eredmények



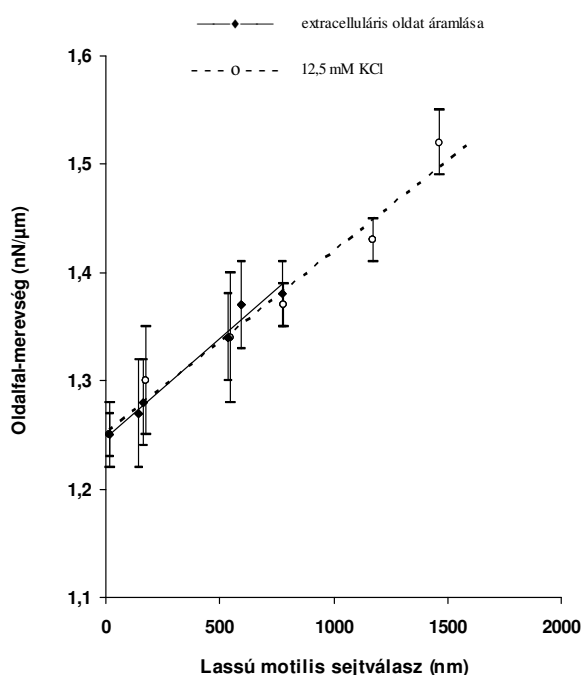
19. ábra Külső szőrsejtek lassú motilis sejtválaszának átlaggörbéi extracelluláris folyadék (n = 9), 12,5 mM KCl (n = 9) és okadinsav + 12,5 mM KCl oldat (n = 9) perfúziójának hatására (átlag  $\pm$  SD). Megközelítően kétszer akkora lassú motilis sejtválaszt okoz a mechanikai + kémiai ingerlés, mint a mechanikai ingerlés önmagában. Okadinsav jelenlétében sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerlésre nem váltható ki lassú motilis sejtválasz (  $\bar{x} \pm SD$  ).

### 3.2. A külső szőrsejtek oldalfal merevségének változása a lassú motilis válasz során

A külső szőrsejtek oldalfal merevségét a lassú motilis sejtválasz különböző szakaszaiban, a fent ismertetett időpontokban mértük (II. táblázat). Az oldalfal merevség nyugalmi értéke  $1,25 \pm 0,03$  nN/ $\mu$ m volt. Extracelluláris folyadék perfúziójával kiváltott mechanikai ingerlés kisebb oldalfal merevség fokozódást eredményezett ( $1,39 \pm 0,03$  nN/ $\mu$ m), mint a 12,5 mM KCl oldat áramoltatása ( $1,52 \pm 0,03$  nN/ $\mu$ m). Mindkét ingerlés során, az áramlás felfüggesztése után 35 másodperccel

### 3. Eredmények

(a kísérlet 170. másodpercében), az oldalfal merevség gyakorlatilag visszatért a kiindulási értékre. Úgy tűnik, hogy az oldalfal merevség fokozódásának mértéke a lassú motilis sejtválasz nagyságával arányos és független a motilis sejtválaszt kiváltó ingerlés – mechanikai vagy kémiai – módjától (20. ábra). Okadainsavval történt 30 perces előinkubációt követően az oldalfal merevség kiindulási értéke jelentősen emelkedett anélkül, hogy a sejt hossza megváltozott volna. Sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerlés nem fokozta tovább az oldalfal merevséget.



20. ábra Összefüggés a külső szőrsejtek oldalfal-merevsége és a mechanikai (extracelluláris folyadék áramlása), valamint a mechanikai + kémiai (12,5 mM KCl oldat áramlása) ingerlésre bekövetkező lassú motilis válasza között. Az I. táblázat a meghatározott időpontokban mért sejthosszakot, a II. táblázat ugyanezen időpontokban mért oldalfal merevség értékeket mutatja. Az oldalfal merevség fokozódása lineárisan nő a lassú motilis sejtválasz függvényében ( $\bar{x} \pm SD$ ).

### 3. Eredmények

#### II. táblázat

Oldalfal-merevség változás (nN/ $\mu\text{m}$ ) (n=5, minden kísérletben) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

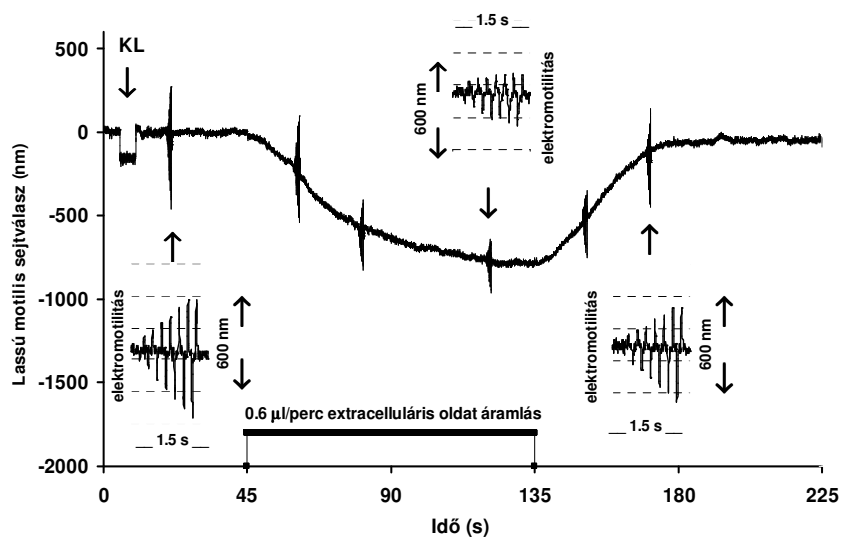
Idő (s)	M	K <sup>+</sup>	OA+M	OA+K <sup>+</sup>
20	1.25 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.02	1.5 $\pm$ 0.02
60	1.27 $\pm$ 0.05	1.34 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.02	1.52 $\pm$ 0.04
80	1.34 $\pm$ 0.04	1.43 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.06	1.49 $\pm$ 0.05
120	1.39 $\pm$ 0.03	1.52 $\pm$ 0.03	1.49 $\pm$ 0.02	1.52 $\pm$ 0.03
150	1.37 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.02	1.51 $\pm$ 0.07	1.48 $\pm$ 0.06
170	1.28 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.03

Az oldalfal-merevség változása a mechanikai (M), a mechanikai + kémiai (K<sup>+</sup>), az okadainsav + mechanikai (OA+M) és az okadainsav és mechanikai + kémiai (OA+K<sup>+</sup>) ingerlés hatására bekövetkező lassú motilis sejtválasz során. Az idő másodpercekben mutatja a kísérlet megkezdése óta eltelt időt. A folyadékáramlás 45 másodperccel a kísérletek megkezdése után indult és 90 másodpercig tartott. Extracelluláris folyadék áramlásával kiváltott mechanikai hatás folyamatosan emelte az oldalfal merevséget, de kisebb mértékben, mint a 12,5 mM KCl oldat áramlása. Az áramlás felfüggesztése után 35 másodperccel (a kísérletek 170. másodpercében) az oldalfal merevsége, mindkét ingerlés során, megközelítőleg visszatért a kiindulási értékre. Az okadainsav, 30 perces előinkubációt követően, (folyadékáramlás nélkül) fokozta az oldalfal merevség nyugalmi értékét anélkül, hogy a sejtössz változott volna. Okadainsav előinkubáció után sem mechanikai, sem kémiai ingerlés nem okozott további változást az oldalfal merevség nagyságában.

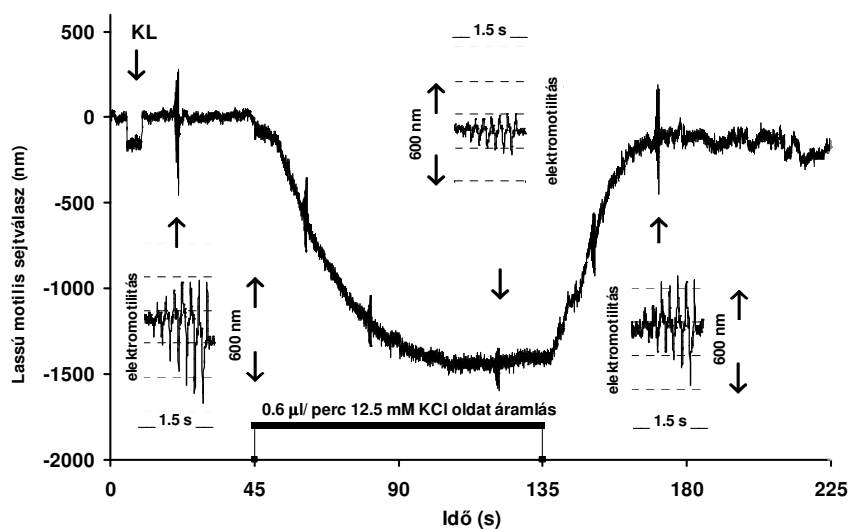
### 3.3. A külső szőrsejtek lassú motilis válaszának hatása az elektromotilitásra

Az elektromotilis aktivitás nagyságának mérése a lassú motilis sejtválasz különböző stádiumaiban, szintén a korábban már ismertetett meghatározott időpontokban történt (21-24. ábra; III. és IV. táblázat). Függetlenül a lassú motilis sejtválaszt kiváltó ingerlés formájától - mechanikai vagy mechanikai + kémiai - az elektromotilis válasz nagysága kizárólag a lassú motilis sejtválasz okozta oldalfal merevség változástól függ (25. ábra). Minél kifejezettebb a lassú motilis sejtválasz hatására fellépő oldalfal merevség fokozódás, annál kisebb az elektromotilis válasz nagysága, mind az alacsony ( $\pm 35$  mV), mind a maximális ( $\pm 240$  mV) ingerlő feszültség esetén. Az elektromotilis válasz nagysága és a külső szőrsejtek hossza közötti összefüggés független attól, hogy a sejt a rövidülés, vagy a visszatérés (megnyúlás) fázisában van-e (III. és IV. táblázat). Az alacsony és maximális ingerlő feszültségre kapott elektromotilis válaszok karakterisztikája hasonló (24. ábra).

### 3. Eredmények

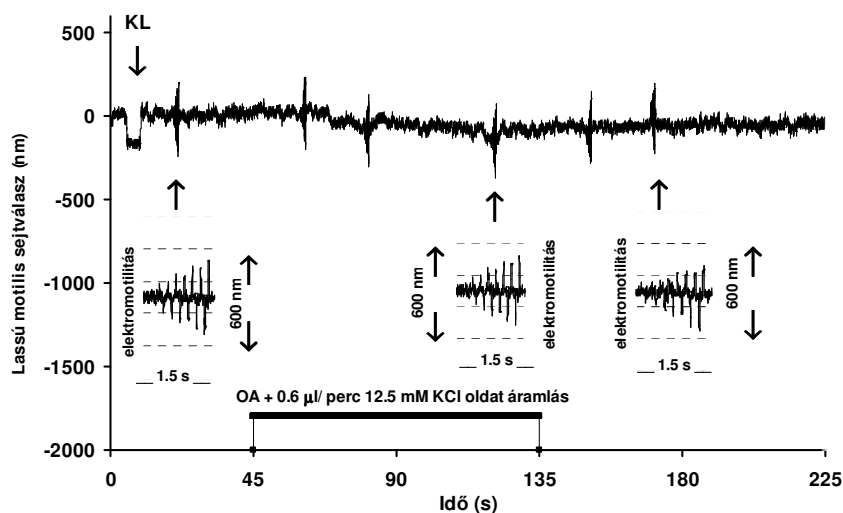


21. ábra Extracelluláris folyadék (Hank oldat) áramoltatása során fellépő külső szőrsejt ( $L = 76 \mu\text{m}$ ) lassú motilis válasz és ehhez kapcsolódóan az elektromotilis válaszok. A megadott időpontokban történt az elektromotilis válaszok rögzítése. Az inzett képek a lassú motilis sejtválasz különböző stádiumaiban mért elektromotilis válaszok nagyságát ábrázolják és a lassú motilis sejtválasz görbéjén látható elektromotilitás csúcsok szélesebb időskálán való ábrázolását mutatják. A kalibrációs lépés (KL) 200 nm.



22. ábra Külső szőrsejten ( $L = 72 \mu\text{m}$ ) 12,5 mM KCl oldat áramlása során bekövetkező lassú és elektromotilis válasz regisztrátuma. Az elektromotilis válaszok rögzítése a megadott időpontokban történt. Az inzett képek a lassú motilis sejtválasz különböző stádiumaiban mért elektromotilis válaszok nagyságát ábrázolják. A kalibrációs lépés (KL) 200 nm.

### 3. Eredmények



23. ábra Egy külső szőrsejt ( $L = 75 \mu\text{m}$ ) 12,5 mM KCl oldat áramoltatása során nyert motilitás görbéje, okadainsav 30 perces előinkubációját követően. Az inzert képek a lassú motilis sejt válasz különböző stádiumaiban, adott időpontokban rögzített elektromotilis válaszok nagyságát ábrázolják nagyobb időablakban. A kalibrációs lépés (KL) 200 nm.

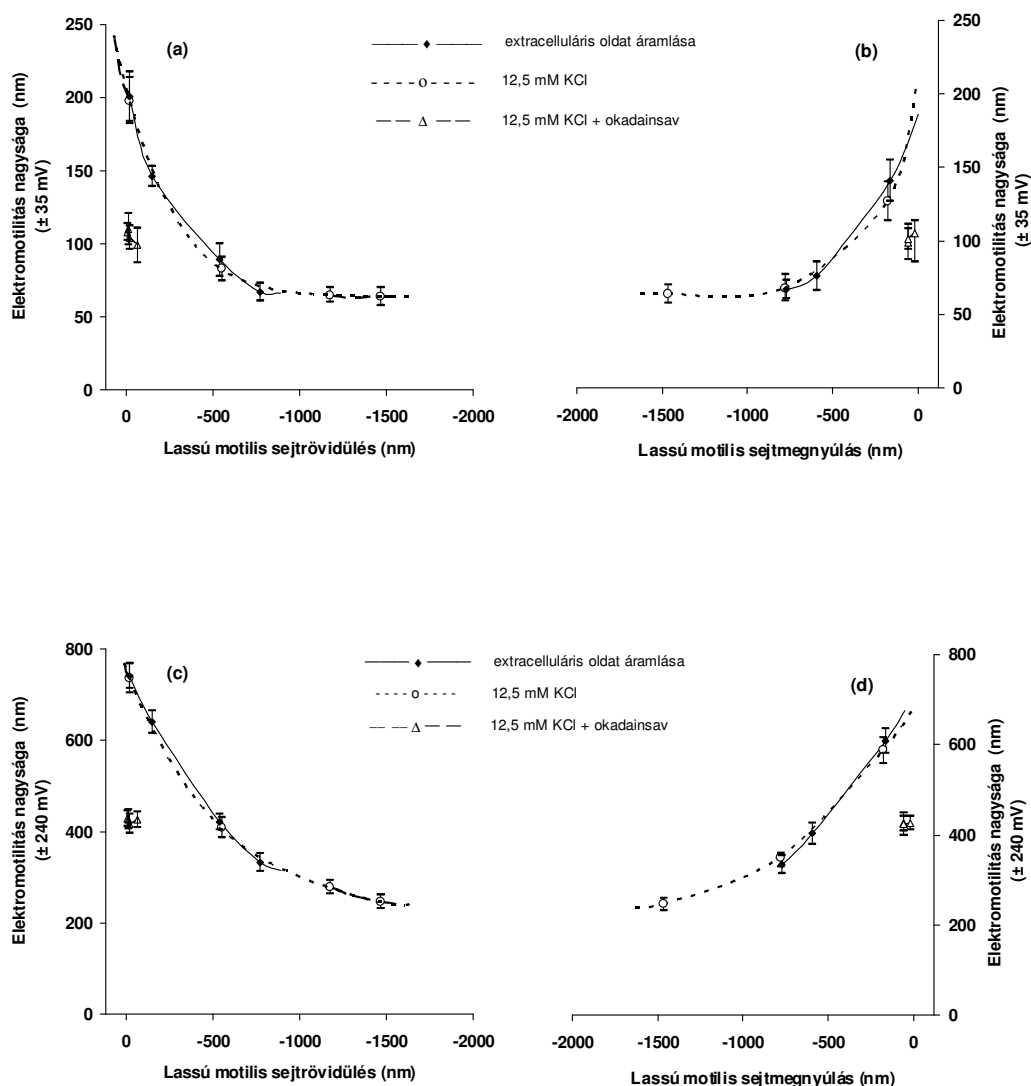
#### III. táblázat

Külső szőrsejtek elektromotilis válasz nagysága (csúcstól csúcsig) (nm),  $\pm 35 \text{ mV}$  négyzetög inger hatására ( $n=9$ , minden kísérletben) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )

Idő (s)	M	$\text{K}^+$	OA+M	OA+ $\text{K}^+$
20	$201 \pm 17$	$198 \pm 16$	$106 \pm 9$	$108 \pm 6$
60	$146 \pm 7$	$83 \pm 8$	$111 \pm 8$	$110 \pm 11$
80	$89 \pm 11$	$65 \pm 5$	$101 \pm 10$	$104 \pm 8$
120	$67 \pm 6$	$64 \pm 6$	$105 \pm 9$	$99 \pm 12$
150	$76 \pm 10$	$68 \pm 9$	$103 \pm 11$	$101 \pm 7$
170	$141 \pm 14$	$127 \pm 13$	$107 \pm 7$	$105 \pm 9$

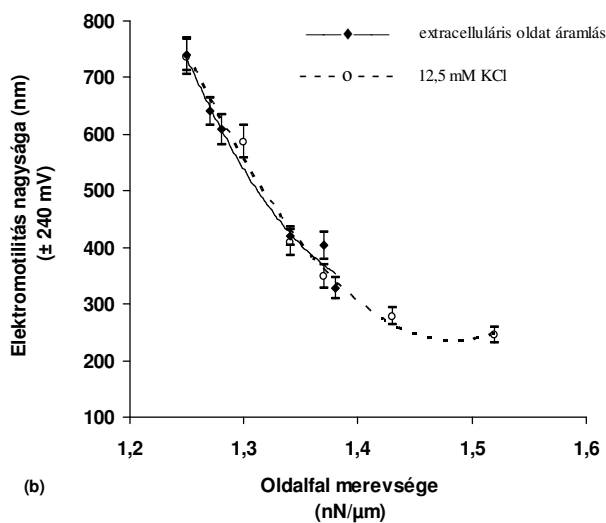
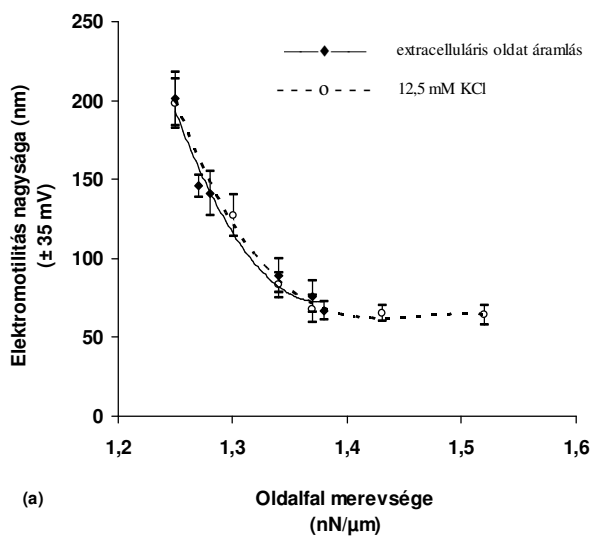
Az elektromotilitás nagyságának változása alacsony ( $\pm 35 \text{ mV}$ ) ingerlő feszültségnél, az idő függvényében, a külső szőrsejtek mechanikai (M), mechanikai + kémiai ( $\text{K}^+$ ), okadainsav + mechanikai (OA+M) és okadainsav és mechanikai + kémiai (OA+ $\text{K}^+$ ) ingerlés hatására bekövetkező lassú motilis válasza során. A lassú motilis sejt válasz rögzítésre került a 225 másodperces protokoll időtartama alatt. A folyadékáramlás 45 másodperccel a kísérlet megkezdése után indult és 90 másodpercig tartott. Az ezt követő áramlás nélküli 90 másodperc képviseli a visszatérési (megnyúlási) fázist. Az elektromotilitás mérése a folyadékáramlás megkezdése előtt (20 s), a lassú motilis sejt válasz alatt (60, 80, 120 s) és a nyugalmi periódus (megnyúlás) során (150, 170 s), minden kísérletnél azonos időpontban történt. Az alacsony feszültség ingerre adott válasz nagysága a sejt hossz  $\sim 1\%$ -kal való rövidülésénél telítődést mutat.

### 3. Eredmények



24. ábra Külső szőrsejtek elektromotilis válaszai extacelluláris folyadék (n = 9), 12,5 mM KCl (n = 9) és okadainsav + 12,5 mM KCl oldat (n = 9) áramlásának hatására kialakuló lassú motilis sejtválasz különböző stádiumaiban ( $\bar{x} \pm SD$ ). A sejtrövidülés folyamán az elektromotilis válaszok nagysága a  $\pm 35$  mV (a) és  $\pm 240$  mV (c) ingerlő feszültségre egyaránt csökken és a megnyúlás során csaknem visszatér a nyugalmi állapotban mért értékre (b; d). Egy aktuális sejthossz változásnál meghatározott nagyságú elektromotilis válasz mérhető, függetlenül attól, hogy extracelluláris, vagy emelt kálium tartalmú oldattal történt az ingerlés és attól is függetlenül, hogy a sejt a rövidülés (a; c), vagy a megnyúlás (b; d) fázisában van. Okadainsav gátolja a lassú motilis sejtválaszt, ennek megfelelően sem extracelluláris, sem emelt kálium tartalmú oldat áramlásakor nem változik az elektromotilitás nagysága.

### 3. Eredmények



25. ábra Összefüggés a külső szörsejt mechanikai (extracelluláris folyadék áramlása), valamint mechanikai + kémiai (12,5 mM KCl oldat áramlása) ingerlésére bekövetkező lassú motilis sejtválasz során, meghatározott időpontokban mért oldalfal merevsége és a  $\pm 35$  mV (a), valamint a  $\pm 240$  mV (b) ingerlő feszültségre adott elektromotilis válaszáinak nagysága között. Minél kifejezettebb a lassú motilis sejtválasz hatására fellépő oldalfal merevség emelkedés, annál kisebb az elektromotilis válasz nagysága, mind az alacsony ( $\pm 35$  mV), mind a maximális ( $\pm 240$  mV) ingerlő feszültség esetén (a kiindulási érték  $\sim 1/3$ -ára csökken; alacsony ingerlő feszültség esetén hamarabb szaturálódik), függetlenül az ingerlés formájától (mechanikai vagy mechanikai + kémiai) ( $\bar{x} \pm SD$ ).

### 3. Eredmények

#### IV. táblázat

Külső szőrsejtek elektromotilis válasz nagysága (csúcstól csúcsig) (nm),  $\pm 240$  mV négyszög inger hatására (n=9, minden kísérletben) ( $\bar{x} \pm SD$ )

Idő (s)	M	K <sup>+</sup>	OA+M	OA+K <sup>+</sup>
20	741 $\pm$ 28	736 $\pm$ 31	426 $\pm$ 15	428 $\pm$ 18
60	640 $\pm$ 25	409 $\pm$ 23	415 $\pm$ 27	426 $\pm$ 21
80	420 $\pm$ 17	278 $\pm$ 15	421 $\pm$ 13	417 $\pm$ 20
120	328 $\pm$ 19	246 $\pm$ 14	420 $\pm$ 19	425 $\pm$ 17
150	403 $\pm$ 24	349 $\pm$ 21	416 $\pm$ 23	424 $\pm$ 24
170	608 $\pm$ 27	587 $\pm$ 29	427 $\pm$ 25	426 $\pm$ 16

Az izolált külső szőrsejtek elektromotilitása  $\pm 240$  mV ingerlő feszültségnél, extracelluláris folyadék (M), vagy 12,5 mM KCl oldat (K<sup>+</sup>) áramlása következtében okadainsav jelenléte nélkül, illetve jelenlétében (OA+M; OA+K<sup>+</sup>) fellépő lassú motilis válasz során. A kísérleti protokoll leírása a III. táblázatban van.

#### 3.4. Okadainsav hatása a külső szőrsejtek motilis működésére, oldalfal merevségére

A nem specifikus serin/threonin protein foszfatáz-gátló okadainsav jelenlétében sem mechanikai, sem mechanikai + kémiai ingerléssel nem váltható ki lassú motilis sejtválasz. Az okadainsavval történt előkezelést követően, az ingerlések megkezdése előtt, az oldalfal merevség fokozódását (II. táblázat) és az elektromotilitás nagyságának csökkenését észleltük (III. és IV. táblázat). Az okadainsav felfüggeszti a mechanikai vagy kémiai ingerlés hatására a külső szőrsejtek lassú motilitásában (18. és 19. ábra), oldalfal merevségében (II. táblázat) és elektromotilitásában (23. és 24. ábra) bekövetkező változásokat.

## 4 Megbeszélés

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

Lassú motilis sejtválasz mechanikai és kémiai hatással is kiváltható. Az emlős cochleából származó külső szőrsejtekben ez a sejtrövidülés elérheti az  $1,5 \mu\text{m}$ -t (a sejt hossz  $\sim 2\%$ -a). Ez jelentős módosulást okozhat a Corti-szerv geometriájában, mely megváltoztatja a hangingerre adott mikromechanikai válaszkészségét. A  $0,6 \mu\text{l/perc}$  ( $10 \text{ nl/s}$ ) mértékű extracelluláris oldat áramlása hasonló ahhoz, mint amekkora nyomáskülönbség változás a haladó hullám (Békésy, 1960) révén a membrana basilarison kialakul (Gummer, 2003). Ez a perfúzió  $5 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$  sebességű áramlást okoz a perfúziós pipettával szemben lévő sejt felszínen és  $2,8 \pm 0,22 \mu\text{m/s}$  sebességűt a sejt ellentétes oldalán (az áramlási sebesség mérése az áramlásban tovasodródnó apró részecskék mikroszkóp alatti követésével történt). A Bernoulli törvényt alapul véve:

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

ahol  $\Delta P$  az a nyomás, ami a perfúziós pipettával szemben lévő sejt felszínen fellép,  $\rho$  a sűrűség,  $v_1$  és  $v_2$  a sejt két ellentétes pólusán mért folyadék áramlási sebesség.

#### 4. Megbeszélés

Kísérletünkben a sejt felszínen kialakuló nyomás ( $\Delta P$ )  $8,4 \times 10^{-9}$  N/m<sup>2</sup> volt. Ez az érték hasonló nagyságrendű, mint amekkora nyomáskülönbség egyetlen külső szőrsejt átmérőjének távolságán a haladó hullám révén kialakul ( $\Delta P = 2,46 \times 10^{-9}$  N/m<sup>2</sup>) (Gummer, 2003; Zwislocki, 2002).

Enyhe mechanikai ingerlésre a külső szőrsejtek lassú motilis válasza valószínűleg a feszülés-aktivált („strech-gated”) receptorok megnyílásától (Ding és mtsai., 1991) és a sztereocilium-csokor mozgásától jön létre. A sejt izolálási technika során a preparátumunkban feltehetően szabaddá válik a sztereocilium-csokor tektoriális vége és károsodnak a csúcsi összeköttetések („tip-links”), vagyis a transzdukciós csatornák. Az izolált külső szőrsejtek szabadon álló sztereociliumain a perfúzió okozta mechanikai ingerlés hatására kialakuló mozgás mechano-szenzitív csatornákat nyit meg és kation-beáramlás jön létre (Meyer és mtsai., 1998). Mind a lateralis plasma membránban lévő feszülés-aktivált receptorok, mind a sztereociliumok mechano-receptorai Ca<sup>2+</sup>-áteresztők (Fettiplace és mtsai., 2001; Sziklai, 2004). Az intracelluláris kalcium koncentráció [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedése foszforilációs és defoszforilációs jelpályákat aktivál (Sziklai és mtsai., 2001). A fentiek következtében a kortikális citoskeleton aktin-spektrin rácsrendszerben létrejövő változások vezethetnek a külső szőrsejtek összehúzóódásához.

A mechanikai ingerlésre bekövetkező lassú motilis sejt válasz mértéke tovább emelkedett a perfúziós oldat K<sup>+</sup> koncentrációjának 12,5 mM-ra történt növelésekor (17. és 19. ábra; I. táblázat). Mind a mechanikai, mind a kémiai ingerlésre fellépő lassú motilis sejt válasz megakadályozható a külső szőrsejtek okadainsavval történt előkezelésével. A mechanikai ingerlés okozta lassú motilis sejt válasz nagyságát megduplázó K<sup>+</sup> hatása csak részben magyarázható az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> emelkedésével, ugyanis kalciummentes külső oldatban is képesek a sejtek lassú összehúzóódásra (Farkas és Sziklai, 2003). Ezek a bizonyítékok kétféle mechanizmust valószínűsítenek a lassú motilis sejt válasz kialakulásában. Az egyik kalcium-függő, a másik, amely protein foszfatázgátlóval megakadályozható, foszforiláció/defoszforiláció-függő.

A külső szőrsejtekben kiváltott reverzibilis lassú motilis válasz az oldalfal merevség

#### 4. Megbeszélés

fokozódását eredményezi. A kísérleteink során mért  $1,25 \text{ nN}/\mu\text{m}$  oldalfal merevség érték nagyságrendje megegyezik más kutatók által mért értékekkel ( $0,8$  és  $3,3 \text{ nN}/\mu\text{m}$ ) (Oghalai és mtsai., 1998; Ulfendahl és mtsai., 1998). Az oldalfal merevség fokozódása független az ingerlés (mechanikai vagy kémiai) módjától (20. ábra). Minél kifejezettebb a lassú motilis sejtválasz, annál jobban fokozódik az oldalfal merevsége. Megközelítően kétszer akkora lassú motilis sejtválaszt okoz a mechanikai + kémiai ingerlés, mint a mechanikai ingerlés önmagában. Ezzel egyidejűleg az oldalfal merevség fokozódása lineáris. A  $\text{K}^+$ -indukálta (mechanikai + kémiai ingerlés) oldalfal merevség fokozódás kétszer akkora, mint a perfúzió (mechanikai ingerlés) által kiváltott oldalfal merevség fokozódás (20. ábra).

Az elektromotilis válasz nagysága inverz összefüggésben van az oldalfal merevség fokozódásával (Dallos és He, 2000). Tekintve, hogy a külső szőrsejt feszültség osztóként működik, az elektromos impulzus nagyságát és az extruziós faktort<sup>1</sup> ( $q = 0,9$ ) figyelembe véve az ingerlő potenciál a négyzet impulzus  $1/10$ -e. A legkisebb inger ( $\pm 35 \text{ mV}$ ) esetén ez  $3,5 \text{ mV}$ , amely a küszöb körüli erősségű hangok által kiváltott receptor potenciál nagyságához közel álló érték. A maximálisan alkalmazott  $\pm 240 \text{ mV}$  négyzet impulzus erősség ( $24 \text{ mV}$  a sejt-membránon) már az elektromotilis válasz-nagyság szaturációs tartományba eső mértékének felel meg. Ezek az értékek a receptor áram keltette membrán feszültség változás fiziológiai tartományában vannak.

Az oldalfal merevség emelkedése következtében a prestin molekulák konformáció változása ellen ható mechanikai terhelés megnövekszik, ezáltal az elektromotilis válasz nagysága csökken. Mivel nem találtunk különbséget a mechanikai, vagy mechanikai + kémiai ingerlés hatására kialakuló oldalfal merevség fokozódás okozta elektromotilis válasz nagyságának csökkenését ábrázoló görbék karakterisztikája között, ezért feltételezhető, hogy a külső szőrsejtek rövidüléséért felelős molekuláris mechanizmusok alapját vagy egymás mellett működő, vagy egymás hatását fokozó (egyik mechanikai, másik kémiai ingerlésre bekövetkező) folyamatsor képezi. A küszöb erősségű hangot reprezentáló legalacsonyabb ( $\pm 35 \text{ mV}$ ) ingerlő feszültségnél, egy meghatározott mértékű

---

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

#### 4. Megbeszélés

(a sejthossz ~1%-a) sejtrövidülés és oldalfal merevség fokozódás (~10%-os) után, az elektromotilitás nagyságának csökkenése nem folytatódik tovább, telítődést mutat, ami már mechanikai ingerlésre is kialakul (24(a). és 25(a). ábra). Az elektromotilis válasz és ezáltal a cochlearis erősítés nagysága, a lassú motilis sejtválasz mértékével arányos oldalfal merevségtől függ. Ez a szabályozási mechanizmus befolyásolni tudja a cochlearis erősítés mértékét az energia visszacsatolás megfelelően alacsony szintre történő csökkentésével, ami kb. 1/3-a a kontroll érték nagyságának (III. táblázat). Az elektromotilitás nagyságának egyik szabályozó tényezője (Dallos és He, 2000) a sejtfa merevségének változása. Ha a külső szőrsejtek falának merevsége egy bizonyos szintre nő, akkor nem tud kialakulni a prestin molekulák feszültség-függő konformáció változásának sejtszintű összegződése, ill. jelen mérés technikával nem is detektálhatóan kicsiny (25. ábra). A sejtfa merevség-függő elektromotilitás csökkenés egy módosított találat elméleti modellel írható le. A lassú motilis sejtválasz a külső szőrsejt hossz tengelye mentén meglévő sejtfa merevség különbségek miatt különböző merevség változásokat hoz létre a különböző sejt szegmenseknek megfelelően. A prestin molekulák folyamatos „kvázi inaktiválódása” ennek a lassú motilis sejtválasz nyomán kialakuló inhomogén merevség fokozódásnak a következménye. A „kvázi inaktiválódás” nem azt jelenti, hogy a prestin molekulák ténylegesen inaktiválódnak, csak nagyobb mechanikai terhelés ellen dolgoznak, ill. az is lehet, hogy a prestin működik, csak a sejtszintű összehangolás nem jön létre.

A modell a következő:

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

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

Lassú motilis sejtválasz nélkül is kialakulhat az oldalfal merevség fokozódása (II. táblázat), ami az elektromotilis válasz nagyságának csökkenését okozza, hasonlóan a lassú motilis sejtválasz által kiváltott sejtfa merevség fokozódáshoz. Ez a jelenség

#### 4. Megbeszélés

volt megfigyelhető a külső szőrsejtek okadainsavval történt előkezelését követően (23. és 24. ábra) (Zhang és mtsai., 2003).

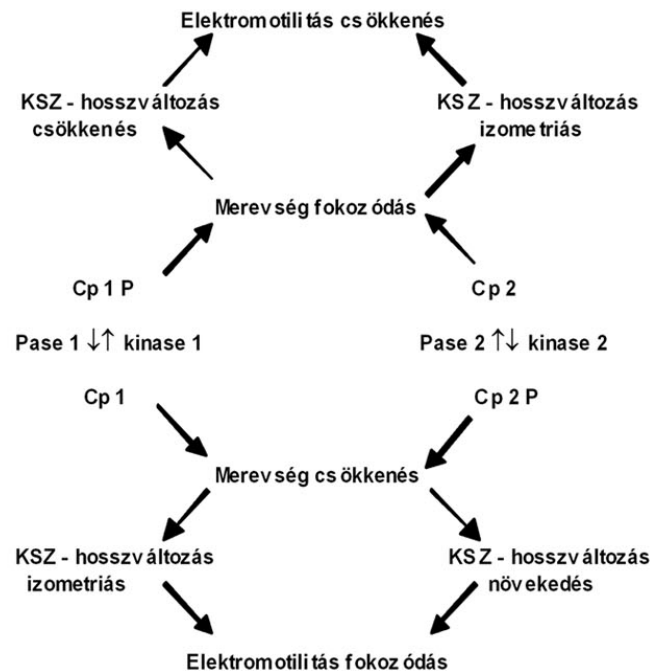
Az okadainsav, az alkalmazott koncentrációban (0,6  $\mu\text{M/l}$ ), mind a serin/threonin protein foszfatáz 1 (PP1), mind a serin/threonin protein foszfatáz 2A (PP2A) működését gátolja (Davare és mtsai., 2000). A tyrosin foszforilált fehérjékre kifejtett foszfatáz-gátló hatása azonban elhanyagolható (Inada és mtsai., 1999). Ebből következően úgy tűnik, hogy a serin/threonin foszforilált fehérjék játsszák a főszerepet a külső szőrsejtek lassú motilis válaszát előidéző folyamatokban.

Kalcium-függő foszforiláció tételezhető fel az acetilcholin (ACh) hatására fellépő elektromotilis válasz nagyságának emelkedését kiváltó folyamatban (Sziklai és mtsai., 1996; Sziklai és mtsai., 2001; Batta és mtsai., 2004). Míg a lassú motilis sejtválasz oldalfal merevség fokozódással jár, addig az ACh oldalfal merevség csökkenést okoz (Dallos és mtsai., 1997; Batta és mtsai., 2004). Az általunk észlelt jelenség, miszerint az okadainsav blokkolja a lassú motilis sejtválasz folyamatát, fokozza az oldalfal merevségét és ennek következtében csökkenti az elektromotilitás nagyságát, bizonyos fehérjék foszforilációs fokának növelése révén, látszólag ellentétben áll azzal, hogy az ACh oldalfal merevség csökkenést okoz és áttételesen -  $\text{Ca}^{2+}$  jelpályák aktiválódása révén - esetleg ugyanazon citoskeletális fehérjemolekulák foszforilációjával.

Egy elképzelhető magyarázat a foszforiláció által indukált oldalfal merevség fokozódására vagy csökkenésére, hogy feltételezhetően léteznek különböző jelpályákon végbemenő protein kináz és foszfatáz aktiválási regulációs folyamatok (26. ábra). Az okadainsav, a fenti koncentrációban, nem blokkolja a PP1 révén a RhoA defoszforilációját (Inada és mtsai., 1999). A foszforilált RhoA nem gátolja a Rac-1 működését (Zhang és mtsai., 2003), ami következésképpen csökkenti az elektromotilis válasz nagyságát, sejtrövidülést okoz (Zhang és mtsai., 2003) és valószínűleg fokozza az oldalfal-merevséget. Az ilyenkor mért elektromotilitás-csökkenés mintegy 40% körüli (Zhang és mtsai., 2003), ami nagyon hasonló ahhoz az értékhez, amit okadainsavval történt előkezelés után mértünk (III. és IV. táblázat). Ezzel ellentétben, ACh hatására az összehúzódtott sejt visszanyeri eredeti hosszát, csökken az oldalfal me-

#### 4. Megbeszélés

revsége és nő az elektromotilis válasz nagysága. A protein foszforiláció képes meghatározni a kortikális citoskeletonban lévő aktin-spektrin rácsozat rövidülésének mértékét, ami egy adott arányú oldalfal merevség növekedés/csökkenés kialakulását eredményezi.



26. ábra A külső szőrsejtek (KSZ) motilis működésében meghatározó szerepet játszó citoskeletális fehérjék különböző útvonalakon végbemenő foszforilációs/defoszforilációs folyamatainak egyszerűsített modellje. CP1 és CP2 citoskeletális fehérjék, CP1 P és CP2 P ezen fehérjék foszforilált formái. Kinase 1, 2 és Pase 1, 2 foszforiláz és foszfatáz enzimek. Számptalan protein kináz és foszfatáz metabolikus úton szabályozza egymás és a különböző citoskeletális fehérjék működését. A sejt aktuális állapotát, motilis működését a különböző citoskeletális fehérjék eltérő útvonalakon történő foszforilációs folyamatai határozzák meg, melyben nagyszámú kináz (Ser/Thr kináz: PKA, PKG, CAMK II, Rho kinázok, stb.) és foszfatáz (Ser/Thr foszforprotein foszfatáz: PP1, PP2A, PP2B, stb.) játszik meghatározó szerepet. A külső szőrsejtek oldalfal-merevségének fokozódásával vagy csökkenésével összefüggő elektromotilis válasz nagyságának mérséklődését vagy emelkedését a citoskeletális fehérjék aktuális foszforilációs/defoszforilációs állapotának eltérő mértékű megváltozása hozza létre. Néhány lehetséges különböző útvonal: (1) A külső szőrsejtek rövidülése nélkül fokozódik az oldalfal merevsége, amikor azon citoskeletális proteinek foszforilációja következik be, melyek nem okoznak olyan módosulást a citoskeleton geometriájában, ami hosszváltozást eredményezne, mivel az oldalfal merevség fokozódása a citoskeletonban lévő keresztirányú kötégek („crosslinks”) merevebbé válásától jön létre. Az elektromotilitás nagysága csökken, a lassú motilitás blokkolódik (pl. okadainsav). (2) Más fehérjék foszforilációja a citoskeleton „ellazulását” eredményezhetik, következményes oldalfal-merevség csökkenéssel és az elektromotilitás nagyságának emelkedésével (pl. ACh). (3) Néhány más fehérje foszforilált állapota a külső szőrsejtek rövidülése révén az oldalfal-merevség emelkedését, ezáltal az elektromotilitás nagyságának csökkenését hozza létre (pl. folyadék áramlása).

#### 4. Megbeszélés

Ez összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy meghatározott citoskeletális proteinek foszforilációja oldalfal merevség csökkenést okoz sejtrövidülés nélkül, ezzel ellentétben a Rac-1 útján aktivált Rho-kinázok (foszforiláció) hatására oldalfal merevség fokozódás jön létre (26. ábra).

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

## 5 Irodalomjegyzék

1. Amberg G.C., Koh S.D., Perrino B.A., Hatton W.J., Sanders K.M. Regulation of A-type potassium channels in murine colonic myocytes by phosphatase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, 2020-2028, 2001.
2. Arima T., Kuraoka A., Toriya R., Shibata Y., Uemura T. Quick-freeze, deepetch visualization of the 'cytoskeletal spring' of cochlear outer hair cells. *Cell tissue Res* 263, 91-97, 1991.
3. Ashmore J.F. A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cochlear basis of the cochlear amplifier. *J Physiol* 388, 323-347, 1987.
4. Ashmore J.F. Forward and reverse transduction in the mammalian cochlea. *Neurosci Res* 12, S39-S50, 1990.
5. Batta T.J., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. 2003. Active and passive behavior in the regulation of stiffness of the lateral wall in outer hair cells of the guinea-pig. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 447, 328-336, 2003.
6. Batta T.J., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. *Eur J Neurosci* 20, 3364-70, 2004.
7. Belyantseva I.A., Adler H.J., Curi R. Frolenkov G.I., Kachar B. Expression and Localization of Prestin and the Sugar transporter GLUT-5 during Development of Electromotility in Cochlear Outer Hair Cells. *J Neurosci* 20, RC116, 2000.

## 5. Irodalomjegyzék

8. Békésy G. Experiments in Hearing. McGraw-Hill, New York pp 745, 1960.
9. Brownell W.E., Bader C.R., Bertrand D., de Ribaupierre Y. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227, 194-196, 1985.
10. Clark A.B., Hallworth R., Evans B.N. Calibration of photodiode measurements of cell motion by a transmission optical lever method. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 415, 490-493, 1990.
11. Dallos P. The active cochlea. *J Neurosci* 12, 4575-4585, 1992.
12. Dallos P. Organ of Corti kinematics. *J Assoc Res Otolaryngol* 4, 416-421, 2003.
13. Dallos P., He D.Z.Z. Two models of outer hair cell stiffness and motility. *J Assoc Res Otolaryngol* 1, 283-291, 2000.
14. Dallos P., Fakler B. „Prestin, a new type of motor protein”. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 104-111, 2002.
15. Dallos P., He D.Z.Z., Lin X.I., Sziklai I., Mechta S., Evans B.N. Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J Neurosci* 17, 2212-2226, 1997.
16. Davare M.A., Horne M.C., Hell J.W. Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Ca<sub>v</sub>1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275, 39710-39717, 2000.
17. Davis H. An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* 9, 79-90, 1983.
18. Ding J.P., Salvi R.J., Sachs F. Stretch-activated ion channels in guinea pig outer hair cells. *Hear Res* 56, 19-28, 1991.
19. Doi T., Ohmori H. Acetylcholine increases intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and hyperpolarizes the guinea pig outer hair cell. *Hear res* 67, 179-188, 1993.

## 5. Irodalomjegyzék

20. Dulon D., Schacht J. Motility of cochlear outer hair cells. *Am J Otol* 13, 108-112, 1992.
21. Dulon D., Aran J.M., Schacht J. Potassium-depolarization induces motility in isolated outer hair cells by an osmotic mechanism. *Hear Res* 32, 123-129, 1988.
22. Dulon D., Zajic G., Schacht J. Increasing intracellular free calcium induces circumferential contractions in isolated cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 10, 1388-1397, 1990.
23. Dulon D., Luo L., Zhang C., Ryan A.F. Expression of small conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 10, 1388-1397, 1998.
24. Evans B.N., Hallworth R., Dallos P. Outer hair cell electromotility: the sensitivity and vulnerability of the DC component. *Hear Res* 52, 288-304, 1991.
25. Farkas Zs., Sziklai I. Potassium-induced slow motility is partially calcium-dependent in isolated outer hair cells. *Acta Otolaryngol* 123, 160-163, 2003.
26. Fernandez J.J., Candenias M.L., Souto M.L., Trujillo M.M., Norte M. Ocadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem* 9, 229-262, 2002.
27. Fettiplace R., Ricci A.J., Hackney C.M. Clues to the cochlear amplifier from the turtle ear. *Trends Neurosci* 24, 169-175, 2001.
28. Forge A. Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res* 265, 473-483, 1991.
29. Forge A., Zajic G., Li L., Nevill G., Schacht J. Structural variability of the sub-surface cisternae in intact, isolated outer hair cells shown by fluorescent labelling of intracellular membranes and freeze-fracture. *Hear Res* 64, 175-183, 1993.

## 5. Irodalomjegyzék

30. Gitter A.H., Zenner H.P.  $\gamma$ -Aminobutyric acid receptor activation of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *Arch Otorhinolaryngol* 249, 62-65, 1992.
31. Gummer AW (ed). *Biophysics of the cochlea*. p. 587 World Scientific 2003.
32. He D.Z.Z., Jia Sh., Dallos P. Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 23, 9089-9096, 2003.
33. Holley M.C., Ashmore J.F. On the mechanism of a high-frequency force generation in outer hair cell isolated from guinea pig cochlea. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232, 413-429, 1988.
34. Holley M.C., Ashmore J.F. Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *J Cell Sci* 96, 283-291, 1990.
35. Holley M.C., Kalinec F., Kachar B. Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cells. *J Cell Sci* 102, 569-580, 1992.
36. Housley G.D., Ashmore J.F. Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *Proc R Soc Lond B* 244, 161-167, 1991.
37. Hudspeth A.J., Corey D.P. Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 2407-2411, 1977.
38. Hudspeth A.J. How the ear's works work. *Nature* 341, 397-404, 1989.
39. Inada H., Togashi H., Nakamura Y., Kaibuchi K., Nagata K., Inagaki M. Balance between activities of rho kinase and type 1 protein phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics of desmin/vimentin filaments. *J Biol Chem* 274, 34932-34939, 1999.
40. Kachar B., Brownell W.E., Altschuler R., Fex J. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322, 365-368, 1986.

## 5. Irodalomjegyzék

41. Kachar B., Parakkal M., Kurz M., Zhao Y., Gillespie P.G. High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13336-13341, 2000.
42. Kalinec F., Holley M.C., Iwasa K.H., Lim D.J., Kachar B. The membrane-based force generation mechanism in auditory sensor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8671-8675, 1992.
43. Kalinec F., Kalinec G., Negrini C., Kachar B. Immunolocalization of anion exchanger 2alpha in auditory sensory hair cells. *Hear Res* 110, 141-146, 1997.
44. Kalinec F., Zhang M., Urrutia R., Kalinec G. Rho GTPases mediate the regulation of cochlear outer hair cell motility by Acetylcholine. *J Biol Chem* 275, 28000-28005, 2000.
45. Kemp D.T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64, 1386-91, 1978.
46. Kimura K., Fukata Y., Matsuoka Y., Bennett V., Matsuura Y., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K. Regulation of the association of adducin with actin filaments by rho-associated kinase (rho-kinase) and myosin phosphatase. *J Biol Chem* 273, 5542-5548, 1998.
47. Kohler B., Blatt M.R. Protein phosphorylation activates the guard cell  $Ca^{2+}$  channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant J* 32, 185-194, 2002.
48. Lim D.J. Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res* 22, 117-46, 1986.
49. Lim D.J., Kalinec F. Cell and molecular basis of hearing. *Kidney Int* 65, 104-113, 1998.
50. Meyer J., Furness D.N., Zenner H.P., Hackney C.M., Gummer A.W. Evidence for opening of hair-cell transducer channels after tip-link loss. *J Neurosci* 18, 6748-6756, 1998.

## 5. Irodalomjegyzék

51. Minamino M., Hara M., Ohnishi S., Irie T., Yamashita T., Minato A., Inagaki C. Effects of protein kinase and phosphatase inhibitors on slow shortening of guinea pig cochlear outer hair cells. *Brain Res* 781, 275-283, 1997.
52. Oghalai J.S., Patel A.A., Nakagawa T., Brownell W.A. Fluorescence-imaged microdeformation of outer hair cell lateral wall. *J Neurosci* 18, 48-58, 1998.
53. Oliver D., He D.Z., Klocker N., Ludwig J., Schulte U., Waldegger S., Ruppertsberger J.P., Dallos P., Fakler B. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science* 292, 2340-2343, 2001.
54. Pickles J.O., Comis S.D., Osborne M.P. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res* 15, 103-112, 1984.
55. Plinkert P.K., Gitter A.H., Möhler H., Zenner H.P. Structure, pharmacology and function of GABA<sub>A</sub> receptors in cochlear outer hair cells. *Arch Otorhinolaryngol* 250, 351-357, 1993.
56. Raphael Y., Altschuler A.R. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 60, 397-422, 2003.
57. Raphael R.M., Popel A.S., Brownell W.E. A membrane bending model of outer hair cell electromotility. *Biophys J* 78, 2844-2862, 2000.
58. Ruggero M.A., Narayan S.S., Temchin A.N., Recio A. Mechanical bases of frequency tuning and neural excitation at the base of the cochlea: comparison of basilar-membrane vibrations and auditory-nerve-fiber responses in chinchilla. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11744-11750, 2000.
59. Schacht J., Fessenden J.D., Zajic G. Slow motility of outer hair cells. In: Flock A., Ottoson D., Ulfendhal M. (ed) *Active Hearing*. Elsevier / USA, New York, pp 209-220, 1995.

## 5. Irodalomjegyzék

60. Shridhar T.S., Brown M.C., Sewel W.F. Unique postsynaptic signaling at the hair cell efferent synapse permits calcium to evoke changes on two time scales. *J Neurosci* 17, 428-437, 1997.
61. Slepecky N.B. Cytoplasmic actin and cochlear outer hair cell motility. *Cell Tissue Res* 257, 69-75, 1989.
62. Spicer S.S., Thomopoulos G.N., Schulte B.A. Cytologic evidence for mechanisms of  $K^+$  transport and genesis of Hensen bodies and subsurface cisternae in outer hair cells. *Anat Rec* 251, 97-113, 1998.
63. Spoendlin H. The innervation of the organ of Corti. *J Laryngol Otol* 81, 717-738, 1967.
64. Spoendlin H. Structural basis of peripheral frequency analysis. In: *Frequency analysis and periodicity detection in hearing.* (Plomp R., Smoorenburg G.F. eds) pp. 2-36, Leiden: Sijthoff, 1970.
65. Sterkers O., Ferrary E., Amiel C. Production of inner ear fluids. *Physiol Rev* 68, 1083-1128, 1988.
66. 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.
67. Sziklai I., Dallos P. Acetylcholine controls the gain of the voltage-to-movement converter in isolated outer hair cells. *Acta Otolaryngol* 113, 326-329, 1993.
68. 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.
69. Sziklai I., Szőnyi M., Dallos P. Phosphorylation mediates the influence of acetylcholine upon outer hair cell electromotility. *Acta Otolaryngol* 121, 153-156, 2001.

## 5. Irodalomjegyzék

70. Szónyi M., Csermely P., Sziklai I. Acetylcholine-induced phosphorylation in isolated outer hair cells. *Acta Otolaryngol* 119, 185-188, 1999.
71. Szónyi M., He D.Z.Z., Ribári O., Sziklai I., Dallos P. Cyclic GMP and outer hair cell electromotility. *Hear Res* 137, 29-42, 1999.
72. Tolomeo J.A., Steele C.R. Orthotropic piezoelectric properties of the cochlear outer hair cell wall. *J Acoust Soc Am* 97, 3006-3011, 1995.
73. Ulfendahl M., Chan E., McConnaughey B., Prost-Domasky S., Elson E.L. Axial and transverse stiffness measures of cochlear hair cells suggest a common mechanical basis. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 436, 9-15, 1998.
74. Weiss T.F. Bidirectional transduction in vertebrate hair cells: a mechanism for coupling mechanical and electrical processes. *Hear Res* 7, 353-360, 1982.
75. Wright A. Scanning electron microscopy of the human organ of Corti. *J R Soc Med* 76, 269–278, 1983.
76. Zenner H.P. Motile responses in outer hair cells. *Hear Res* 22, 83-90, 1986.
77. Zenner H.P. Motility of outer hair cells as an active, actin-mediated process. *Acta Otolaryngol* 105, 39-44, 1988.
78. Zenner H.P., Zimmermann U., Schmitt U. Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear Res* 18, 127-133, 1985.
79. Zhang M., Kalinec F. Structural microdomains in the lateral plasma membrane of cochlear outer hair cells *JARO* 3, 289-301, 2002.
80. Zhang M., Kalinec G.M., Urrutia R., Billadeau D.D. ROCK-dependent and ROCK-independent control of cochlear outer hair cell electromotility. *J Biol Chem* 278, 35644-35650, 2003.
81. Zheng J., Shen W., He D.Z.Z., Long K.B., Madison L.D., Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405, 149-155, 2000.

### *5. Irodalomjegyzék*

82. Zheng J., Long K.B., Shen W., Madison L.D., Dallos P. Prestin topology: localization of protein epitopes in relation to the plasma membrane. *Neuroreport* 12, 1929-1935, 2001.
83. Zwislocki J.J. Auditory sound transmission. Lawrence Erlbaum Ass Publishers Mahwah New Jersey. pp. 212-220, 2002.

## 6 Összefoglalás

A külső szőrsejtek motoros működésének (lassú- és gyors-, vagy elektromotilitás) az emlősök éles hallása szempontjából meghatározó a jelentősége. Míg az elektromotilitásról tudjuk, hogy szinusz ciklusról szinusz ciklusra erősíti a küszöb körüli erősségű hangokat, addig a lassú motilis sejtválasz jellegzetességei és a cochlearis erősítésben játszott szerepe kevésbé ismert. A tézisekben leírt kísérletek arra keresnek választ, hogy az elektromotilitás és a lassú motilis válasz sejtszinten hogyan integrálódik és milyen hatással van egymásra.

Izolált külső szőrsejtek lassú motilis válaszát ( $n = 36$ )  $0,6 \mu\text{l}/\text{min}$  sebességgel, 90 másodpercig áramló, extracelluláris folyadékkal (mechanikai hatás) és  $12,5 \text{ mM}$  KCl oldattal (mechanikai és kémiai hatás) váltottuk ki, a szerin/threonin protein foszfatázgátló okadainsav jelenlétében ( $n = 9-9$ ) és jelenléte nélkül ( $n = 9-9$ ). Az áramlás okozta lassú motilis sejtválasz során az elektromotilis válaszokat,  $\pm 35 \text{ mV}$ -tól  $\pm 240 \text{ mV}$ -ig, 7 lépésben egyenletesen emelkedő elektromos feszültség négyszög impulzusokkal keltettük ( $n = 36$ ). Az oldalfal merevségét aspirációs mikro-deformációs technikával vizsgáltuk ( $n = 5-5$ ).

Reverzibilis sejtrövidülést okozott az extracelluláris folyadék és az emelt kálium tartalmú oldat áramlása (KCl szignifikánsan nagyobb), miközben az oldalfal merevsége szignifikánsan fokozódott, ugyanakkor az elektromotilis válasz nagysága csökkent. Az okadainsav blokkolta a lassú motilis sejtválaszt, fokozta az oldalfal merevségét, csökkentette az elektromotilis válasz nagyságát és ezen értékek mindkét ingerlés során változatlanok maradtak.

## 6. Összefoglalás

A külső szőrsejt mechanikai hatásra lassú motilis sejtrövidüléssel és egyidejű oldalfal merevség fokozódással válaszolt. A jelenséget valószínűleg a citoskeletális fehérjék metabolikus módosítását irányító kalcium- és foszforiláció-függő folyamatok működtetik. A következményes elektromotilis válasz nagyság csökkenés egy lassú motilis sejttösszehúzódás által vezérelt (cochlearis erősítőt szabályozó) mechanizmust valószínűsít, ami védi a belsőfület túl erős ingerek esetén a károsodástól. Megfigyeléseink fiziológiai jelentősége, hogy mechanikai (túlzott hangerő) és kémiai ( $K^+$ -intoxikáció: Menière-betegség) ingerlésre a Corti-szerv képes lehet olyan mikromechanikai változásokkal reagálni (sejtrövidülés), amelyek a perifériás hangérzékelés folyamatát és érzékenységét szabályozzák.

# Summary

Motor activity of the outer hair cells (slow-, and fast motility or electromotility) is a significant mechanism which determines the sharp frequency selectivity and low threshold in mammals. Electromotility provides with amplification on a cycle-by-cycle basis. The exact role of slow motility in the peripheral processing, however, is much less known. The Thesis aims to examine the integration of slow and fast motility in cellular level and their influence on each other.

Slow motile length changes of isolated outer hair cells (OHCs) (n = 36) were induced by perfusion of saline (flow rate: 0,6  $\mu$ l/min) as a mechanical challenge or by perfusion of 12,5 mM KCl solution for 90 s as a chemical and mechanical challenge with and without ocadaic acid (OA), a serine/threonine protein phosphatase inhibitor (n = 9, in each experiment). Electromotility was evoked by square pulses from  $\pm 35$ mV to  $\pm 240$ mV at different stages of cell shortening (n = 36). Stiffness of the lateral wall was measured by the micropipette aspiration technique (n = 5, in each experiment).

Both forms of stimulation (saline and 12,5 mM KCl solution) caused a reversible shortening (KCl evoked greater). Slow shortening increased lateral wall stiffness, simultaneously, electromotility magnitude decreased. Ocadaic acid blocked slow shortening, increased lateral wall stiffness, and decreased the magnitude of electromotility. Applied stimulations of ocadaic acid treated OHCs do not further change stiffness or electromotility.

Isolated OHCs respond with slow shortening and consecutive cell stiffness increase to mechanical insult. This phenomenon seems operating with calcium-, and phosphorylation-dependent modifications of the cytoskeletal proteins. The subsequent

## *6. Összefoglalás*

electromotility gain decrease suggests a slow OHC shortening driven regulation of the cochlear amplifier with simultaneous safety control of the auditory periphery against overstimulation. Physiological relevance of these observations are, that a mechanically (loud sound) or chemically ( $K^+$  intoxication, e.g. Ménière's disease) stimulated organ of Corti is capable of changing its micromechanical response properties.

## 7 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani egyetemi évfolyamtársamnak, barátomnak, témavezetőmnek, prof. dr. Sziklai István egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget, támogatást, iránymutatást adott ezen dolgozat létrejöttét megalapozó tudományos kísérletek végzéséhez.

Köszönet illeti szerzőtársamat, dr. Batta József Tamást a munkám során nyújtott segítségéért, dr. Farkas Zsoltot, a gyakorlati tanácsaiért, útmutatásaiért, továbbá Számel Mária laborasszisztenst, nélkülözhetetlen, tevékeny közreműködéséért.

Köszönettel tartozom PhD. Molnár Józsefnek és Novák Dezsőnek (ATOMKI) az elektromotilitás méréséhez használt berendezések elkészítésében nyújtott önzetlen segítségükért.

Köszönet illeti a Hetényi Géza Kórház vezetőit, munkatársaimat, továbbá mindazokat, akik támogatásukkal hozzájárultak munkám végzéséhez.

Külön köszönöm szüleimnek, családomnak a kitartó biztatást, erkölcsi támogatást, azt a „háttérrel”, ami lehetővé tette számomra, hogy ezt a munkát elkészíthessem.

## 8 A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

### 8.1. Közlemények

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

### 8.2. Idézhető kivonatok

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

### 8.3. Előadások, poszterek

1. Sziklai I., Borkó R., Electromotile performance of isolated outer hair cells in different stages of slow motile shortening. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, Salvador, Bahia, Brazil. 22-25. 08. 2004.
2. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Lassú sejt-hosszváltozás, oldalfalmerevség és elektromotilitás tengerimalac izolált külső szőrsejtékben. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése. Debrecen, 1-3. 09. 2004.
3. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea-pig. Inner Ear Biology Workshop. Debrecen, 05-07. 09. 2004.
4. Sziklai I., Borkó R., Batta J.T. Potassium induced slow and fast motility changes in isolated outer hair cells of the guinea pig. 5<sup>th</sup> International Symposium, Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders. Los Angeles, California, USA, 02-05. 04. 2005.
5. Sziklai I., Borkó R., Batta TJ. Influence of slow motility on the electromotility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the cochlea. 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics of Audition and Vision. Shanghai, Kína, 2006. nov. 5-7. Book of Abstracts, p. 89.

### 8.4. Egyéb közlemények

1. Simon É., Emri E., Borkó R. Retropharyngealis abscessus 15 hónapos kisdobban. *Gyermekegyógyászat* 49(5), 490-494, 1998.
2. Borkó R., Szűcs S. A gége saccularis cystáiról egy eset kapcsán. *Fül-Orr-Gégegyógyászat* 46(1), 58-61, 2000.

8. *A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke*

3. Borkó R., Szűcs S. Angeborene Kehlkopfzysten. HNO 48(11), 843-845, 2000. [IF.: 0,72]
4. Sziklai I., Szilvássy J., Borkó R., Tóth Á. Az objektív hallásvizsgálat új módszerei. Debrecen, 22-27. Az állategészségtan és az agrároktatás. 2004.

## 9. Függelék

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