Emlős cochleaból izolált külső szőrsejtek oldalfalának merevségszabályozása és a cochleáris adaptáció

dr. Batta József Tamás

2004. december 12.

DEOEC Fül-orr-gége és fej-nyak sebészeti Klinika,
Debrecen
Témavezető: prof. dr. Sziklai István

egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Emlős cochleaból izolált külső szőrsejtek oldalfalának merevségszabályozása és a cochleáris adaptáció

dr. Batta József Tamás

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Általános Orvostudományi Kar

Fül-orr-gége és Fej-nyak sebészeti Klinika

Témavezető: prof. dr. Sziklai István

2004

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés **5**

1.1. A külső szőrsejtek felépítése, működése 5
1.2. A sejtfalmerevség és szerepe 9
1.3. A külső szőrsejtek efferens beidegzése 10
1.4. A mikrodeformációs technika 11
1.5. Célkitűzések 12

2 Anyagok és módszerek **14**

2.1. Sejtelőkészítés 14
2.2. A külső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata és a mikrodeformáció mérése . 14
2.2.1. Az alkalmazott technikai eszközök 15
2.2.2. Az alkalmazott programok és a képanalizáló eljárás 15
2.2.3. A képanalizáló eljárás tesztelése 17
2.2.4. Az oldalfal merevségének vizsgálata 18
2.3. Farmakológiai vizsgálatok 19
2.4. Adatfeldolgozás, statisztikai analízis 20

3 Eredmények **21**

3.1. A képanalizáló és pszeudokolor eljárás hatékonysága 21
3.2. A külső szőrsejtek oldalfal merevségének jellemzése a különböző sejtrégiókban 24
3.3. A cochlea különböző régióiból izolált külső szőrsejtek oldalfal-merevsége . 25
3.4. Az oldalfal merevség húzóerővel szembeni időfüggő karakterisztikája . . 26
3.5. A külső szőrsejtek oldalfalának húzóerőre adott passzív válaszát leíró modell 30
3.6. A külső szőrsejtek oldalfalának húzóerőre adott aktív viselkedésének modellezése 31

3.7. A szalicilát és a Gd^{3+} hatása a külső szőrsejt oldalfalának aktív és passzív viselkedésére 32
3.8. Az ACh és GABA hatása a cochlea különböző helyeiről izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségére 33
3.9. Az ACh és a GABA hatása az oldalfal merevségének aktív és passzív időfüggő változásaira 34
3.10. ACh és GABA hatása a külső szőrsejtek oldalfalának mikrodeformációja által kiváltott lassú sejtrövidülés karakterisztikájára 37
3.11. Az ACh és a GABA hatásának változása külső Ca^{2+} megvonás mellett . 37

4 Megbeszélés **40**

5 Összefoglalás **56**

6 Köszönetnyilvánítás **60**

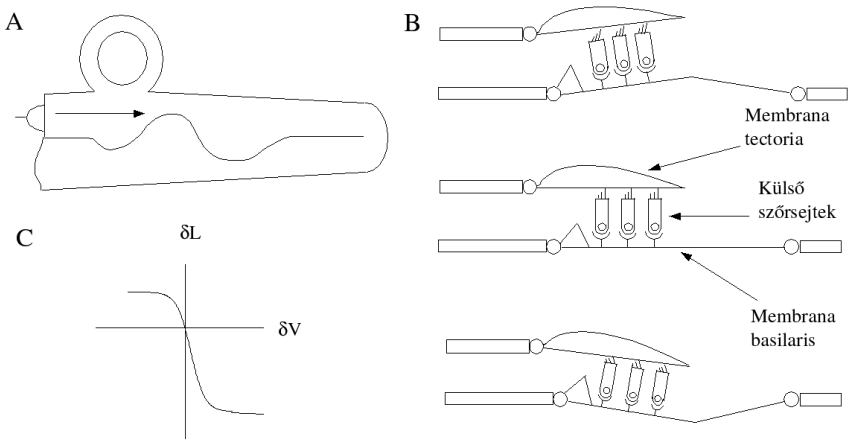
7 A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke **61**

1 Bevezetés

Az emlős cochlea széles frekvencia-tartományban képes mind az igen alacsony, mind a kifejezetten magas intenzitású hangok érzékelésére. A cochlea sajátos felépítése következtében egy összetett mechanikai rendszert alkot, mely passzív mechanikai sajátságai önmagukban is alkalmassá teszik a hang frekvencia-specifikus érzékelésére. A longitudinális hangrezgések által kialakított hallócsontláncolati mozgások a perilymphán keresztül mozgásba hozzák a membrana basilaris-Corti-szerv-membrana tectoria által alkotott cochleáris hangfelfogó rendszert, mely eredményeként az alaphártyán transzverzális haladóhullámok jönnek létre. Ezen haladóhullámok amplitudómaximuma azok frekvenciaspecifikus helyén alakul ki a cochleán belül (1.A ábra). A cochlea ilyen formán létrejövő passzív működése, melynek modelljét Békéssy dolgozta ki 1960-ban, azonban nem elegendő a hangérzékelés tényleges frekvenciafelbontásának és intenzitásszélességének eléréséhez. A cochlea speciális, mechanikailag aktív sejtjei, az un. külső szőrsejtek (OHC) a cochleát egy pontosan szabályozott, aktív hangérzékelő rendszerré alakítják, mely így képessé válik élettani feladatának a betöltésére (1.B,C ábra) (Lim és Kalinec, 1998).

1.1. A külső szőrsejtek felépítése, működése

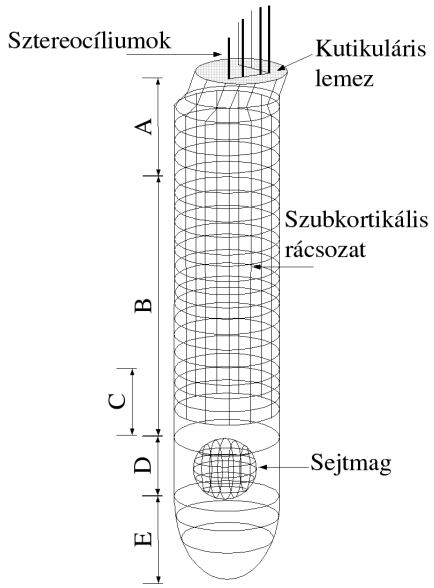
A külső szőrsejtek jellegzetes, hengeres alakú, excentrikus magvú sejtek, melyek az emberi cochleaban 3-4 sorban helyezkednek el a külső pillérsejtek és a Hensen-sejtek közötti térben, szinaptikus pólusukkal a Deiters sejtekre támaszkodva, ciliáris pólusukkal a membrana tectoriahoz illeszkedve. A külső szőrsejtek oldalfalának sajátos három rétegű felépítése van, mely a sejtmembránból, a hozzá un. pillér fehérjékkel kapcsolódó kortikális rácsozatból és az ehhez szorosan kötődő ciszternális rendszerből áll. A ciszternális rendszer a sejtcsúcs és mag között elhelyezkedő sejtalkotó, mely a mag alatti régióban az un. szubszinaptikus ciszternális rendszerben folytatódik. A kortikális rácsozat a



1. ábra
A: A hanghullámok longitudinális nyomáshullámai a hallócsontláncon keresztül áttevődnek a perilymphára, mozgásba hozva a cochleáris hangfelfogó rendszert. A kialakuló transzverzális haladóhullámok amplitudómaximuma azok frekvenciaspecifikus helyén alakul ki a cochleán belül. B: A membrana basilaris és a membrana tectoria egymáshoz képest történő elmozdulása nyíró erőt hoz létre, mely a külső szőrsejtek sztereociliumainak elmozdulását okozza. A stereocíliumok elmozdulása ioncsatornák aktivációját és deaktivációját eredményezi, mely következtében membránpotenciálváltozás jön létre (receptorpotenciál). C: A membránpotenciálváltozás (δV) sejthosszváltozást (δL) okoz, mely hyperpolarizációra aktív megnyúlást, depolarizációra aktív rövidülést jelent.

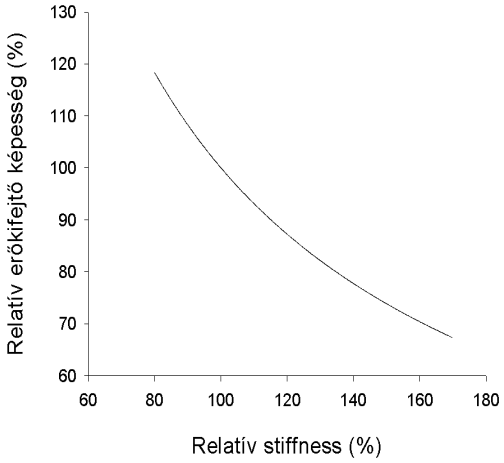
citoszkeletális rendszer részét képező, spektrin szálakkal összekötött, párhuzamos lefutású aktin szálakból felépülő váz, mely biztosítja a külső szőrsejtek hengeres alakjának megtartását és a sejt mechanikai stabilitását (Arima és mtsai. 1991; Forge 1991; Holley és mtsai. 1992; Lim és Kalinec 1998) (2. ábra). A felszín alatti rácsozat pillérfehérjéi közötti ívesen feszülő plazmamembrán, a kapcsolódó aktin és spektrin filamentumok speciális szerkezeti egységeket alkotnak, melyek az oldalfal elektronmikroszkópos képén finom egyenetlenség, ráncoltság formájában jelennek meg (Forge, 1991; Raphael és mtsai. 2000). Ezek a mikromechanikai egységek felépítésükből adódóan egyrészt képesek a rugalmas energia tárolására ill. pufferelésére, másrészt képesek a membránpotenciál változását követő alakváltozásra is (un. membrane bending model, Raphael et al. 2000). A külső szőrsejtek mechanikailag aktív sejtek, melyek un. gyors és lassú mozgásra képesek a sejt hossztengelyének megfelelően. A lassú szőrsejtmozgás különböző ingerekkel kiváltható, 20-60 másodperces idő intervallumba eső sejtkontrakció (Schacht és mtsai. 1995), mely feltételezett élettani szerepe a cochlea védelmében és az adaptációban lehet (Zenner 1986; Dallos 1992; Dulon és Schacht 1992; Friedberger és mtsai. 1998; Lim és Kalinec 1998). A lassú szőrsejtmozgás molekuláris alapjai még nem tisztázottak, de a korábban említett mikromechanikai egységek feltehetően fontos szerpet játszanak benne (Batta és mtsai. 2003).

A gyors szőrsejtmozgás ATP és calcium független, a sejtmembrán feszültségváltozásait követő sejthosszváltozás, mely elég gyors ahhoz, hogy követni tudja a hanghullámok által létrehozott alaphártya kitéréseket. A gyors szőrsejtmozgást (elektromotilitás) a sejtmembránban található, sűrűn elhelyezkedő speciális molekulamotor, az un. presztin alakváltozása hozza létre (Zheng és mtsai 2000). Ez a transzmembrán fehérje egy módosult anion cserélő molekula (Oliver és mtsai 2001), mely a membránpotenciál változására konformációváltozással reagál, s így a presztin molekulák membránpotenciál változás által szinkronizált kumulatív alakváltozása sejthosszváltozásban jelenik meg (Ashmore 1987; Kalinec és mtsai. 1992; Wada és mtsai. 2001; Dallos és Fakler 2002; Zheng és mtsai. 2002). A molekulamotor alakváltozásának sejtszintű mozgássá alakítását a citoszkeleton és a sejtmembrán által alkotott funkcionális „erőkifejtő egységek” un. mikrodoménok biztosítják (Lim és Kalinec 1998; Zhang és Kalinec 2002). A gyors szőrsejtmozgást a szőrsejtek sztereociliumainak elhajlása nyomán kialakuló membránpotenciál változás vezérli, mely a hanghullámok alaphártyán kialakított kitérésével arányos (Lim és Kalinec 1998). Ez az un. elektromechanikus transzdukció, mely a külső szőrsejtek membránpotenciálja, mint „nullpont” körül, a váltóáramú receptorpotenciál által kiváltott rövidülési és megnyúlási válaszoknak felel meg, oly módon, hogy hiperpolarizációra aktív megnyúlás,



2. ábra A külső szőrsejtek felépítése.
A külső szőrsejtek hengeres, excentrikus magvú sejtek, melyek csúcsi részén V alakban sztereocíliumok helyezkednek el. A sejt mechanikai stabilitását egy speciális citoszkeletális rendszer, a szubcortikális rácsozat biztosítja. A sejten az alábbi régiók különíthetők el: A: szubkutikuláris, B: sejtközépi, C: mag fölötti D: sejtmagi, E:szinaptikus régió.

depolarizációra aktív rövidülés jön létre (Santos-Sacchi 1993). Így a külső szőrsejtek feszültségfüggő sejtmozgását a hangrezgések által létrehozott alaphártya kitérések vezérlik, mely élettani szerepe a membrana basilarisra történő megfelelő ütemben való aktív mechanikai energia-visszacsatolás (Oghalai és mtsai., 1998; Dallos és He 2000; Li és mtsai., 2002) (1. ábra). A hanghullám által létrehozott alaphártya kitérések fázisával egyező ütemben röténő mechanikai energiavisszacsatolás az alaphártya rezgések amplitudómaximumát kiemelve biztosítja a hallásküszöb környéki hangérzékelést (cochleáris erősítő, Ashmore 1987), míg az amplitudó maximum környezetében ellenkező fázisban történő mechanikai energiavisszacsatolás révén kialakult aktív hullámhossz csökkentés („széli vágás") lehetővé teszi a cochlea finom frekvencia felbontását. Így a külső szőrsejtek a cochleáris mechaika aktív sejtjeiként biztosítják az emlős hallószerv nagyfokú szenzitivitását és nagy felbontású frekvenciahangolását (Zenner 1986; Dallos 1992; Dulon és Schacht 1992; Gummer és mtsai 2002).



3. ábra A sejtfalmerevség változása megváltoztatja a motor molekulák erőátviteli hatékonyságát. A sejtfalmerevség növekedése az elektromotilitás amplitúdójának és erőkifejtő képességének csökkenését, a sejtfalmerevség csökkenése pedig annak fokozódását eredményezi. (Dallos és munkatársai (2000) által alkotott modell alapján számított teoretikus görbe.)

1.2. A sejtfalmerevség és szerepe

A külső szőrsejtek oldalfalának ultrastruktúrálódása nyomán létrejövő sajátos, már említett mikromechanikai egységek (Raphael et al. 2000, membrane bending model) megteremtik egy, a motor molekuláktól független, az oldalfal merevségét szabályozó rendszer működésének szerkezeti alapját. A sejtfal merevségének megváltozásával megváltozik a motorfehérjék erőátviteli hatékonysága is, mivel a motor fehérjék a sejtfal által közvetített mechanikai ellenállással szemben dolgoznak (Dallos és He, 2000)[1] (3. ábra). Ily módon egy presztin-független sejtfalmerevség szabályozó rendszer lehetővé tenné a külső szőrsejtek membrana basilarisra történő, aktív energia visszacsatolásának önszabályozását (Dallos és mtsai., 1997; Adachi és mtsai., 2000; Dallos és He, 2000).

A külső szőrsejtek merevségi viszonyait többen vizsgálták különböző mikrodeformációs technikákkal (Hallworth, 1995; Tolomeo és mtsai., 1996; Chan és Ulfendahl 1997; Sit és mtsai., 1997; Oghalai és mtsai., 1998; Ulfendhal és mtsai., 1998; Wada és mtsai., 2001). Ezek közül néhány kísérlet az oldalfal merevségének vizsgálatára született (Tolomeo és mtsai., 1996; Ulfendahl és mtsai., 1998 Oghalai és mtsai. 1998; Wada és mtasi., 2001), különböző sejtrégiókban történő részletes összehasonlító merevségvizsgálat azonban ed-

[1] elektromechanikus „kuplung”

dig még nem készült. Korábbi irodalmi adatok arra utalnak, hogy a külső szőrsejtek oldalfala mind húzó, mind nyomó erő hatására egyszerű rugalmas alakváltozással reagál (Oghalai és mtsai., 1998 Ulfendahl és mtsai., 1998), jóllehet ezek a közlemények csupán az adott erőbehatásra létrejött maximális alakváltozás mértékét vizsgálták, [2]dinamikus mikrodeformációs vizsgálatok nem történtek. Az oldalfal komplex felépítése azonban komplex mechanikai viselkedést feltételez, ezért fontos az oldalfal húzóerővel szembeni viselkedésének időfüggő (dinamikus) karakterizálása, mely lehetővé teszi egy esetleges aktív viselkedési komponens feltárását. Egy ilyen, motor fehérje független aktivitás megléte ugyanis a Corti-szerv dinamikus intrinsic adaptációs mechanizmusát bizonyítaná, melynek lehetőségét Fridberger és mtsai (1998) korábban felvetették.

1.3. A külső szőrsejtek efferens beidegzése

A külső szőrsejtek efferens rostjaikat a kontralaterális oliva superiorból kapják, a rostok a sejttesteken az un. szinaptikus regióban végződnek (2. ábra). Általánosan elfogatott, hogy a cochlea efferens beidegzése a cochleáris adaptáció és a tartós zaj elleni védelem fontos eleme (Zenner 1986; Dallos 1992; Dulon és Schacht 1992; Lim és Kalinec 1998). Ennek megfelelően az efferens rostok ingerlésének hatására csökken az otoacusticus emisszió nagysága (Siegel és Kim 1982; Puel 1995). A külső szőrsejteken egyaránt végződnek olyan efferens neuronok melyek neurotranszmitter anyaga az ACh és olyanok, melyeké a GABA. A külső szőrsejteken található ACh receptor a nikotinerg receptorcsalába tartozó és un. $\alpha 9/\alpha 10$ ACh receptor, míg a γ-amino-vajsav receptor az un. $GABA_A$ receptor (Klinke 1986; Plinkert és mtsai 1993; Rothlin és mtsai 1999; Vetter és mtsai 1999). A cochleán belül ezek a receptorok tonotopikus elrendeződést mutatnak: az ACh receptorok a cochlea bazális kanyarulatában helyezkednek el a legnagyobb számban, a cochlea csúcsa felé számuk folyamatosan csökken, míg a GABA receptorok száma a cochlea csúcsi kanyarulatában mutatja a legnagyobb sűrűséget, folyamatosan csökkenve a cochlea bázisa felé (Spoendlin, 1967; Stopp és Comis, 1978; Eybalin és mtsai., 1988; Fex és mtsai., 1986, Liberman és mtsai., 1990; Plinkert és mtsai 1993; Plinkert, 1995; Raphael és Altschuler 2003).

Az ACh megkötődése az $\alpha 9/\alpha 10$ ACh receptoron gyors Ca^{2+} beáramlást eredményez (Housley és Ashmore 1991). A beáramló Ca^{2+} egyrészt Ca^{2+}-függő K^+csatornák megnyílását eredményezi, mely következménye a K^+kiáramlás hatására kialakuló hiperpolarizáció lesz (Dulon és mtsai 1998; Blanchet és mtsai 2000), másrészt a szubszinaptikus

[2]un. statikus merevség vizsgálat

ciszternális rendszerből Ca^{2+}-indukált Ca^{2+} felszabadulást idéz elő (Shridhar és mtsai 1997; Sziklai 2004). Az így létrejött Ca^{2+}felszabadulás különböző foszforilációs folyamatokat indít el, mely a citoszkeletális elemek foszforilációjához vezet (Szőnyi és mtsai 1999; Sziklai 2004), mely képes lehet megváltoztatni a külső szőrsejtek mechanikai sajátságait. Dallos és mtsai (1997) a cochlea bazális kanyarulataiból izolált szőrsejteket vizsgálva azt találták, hogy ACh hatására a sejtek axiális merevsége jelentősen csökkent miközben a gyors sejtmozgás amplitúdója jelentősen növekedett. Az ACh által létrehozott változások strichninnel és Ca^{2+} megvonással felfüggeszthetők voltak. Az ACh cochleobazális sejtek elektromotilitására és tengely irányú merevségére gyakorolt hatásának vizsgálata során nyert eredmények arra utalnak, hogy Ca^{2+}függő foszforilációs folyamatok fontos szerepet játszhatnak a külső szőrsejtek merevségszabályozásában (Dallos és mtsai 1997; Kalinec és mtsai., 2000; Sziklai és mtsai., 2001). Az ACh álatal létrehozott hiperpolarizációhoz hasonló dózisfüggő reverzibilis membránpotenciál változás GABA esetén is megfigyelhető (Gitter és Zenner 1991), ugyanakkor semmilyen vizsgálat nem történt a GABA sejtmerevségre gyakorolt hatását tekintve, ennek megfelelően összehasonlító irodalmi adatok sem állnak rendelkezésre a két jelátvivő sejtmerevségre gyakorolt hatásáról. Mivel a külső szőrsejtek működési hatékonysága a sejt merevségi tulajdonságaitól függ (3. ábra), az oldalfalmerevség szabályozásának vizsgálata közelebb vihet az elektromechanikus transzdukció szabályozásának és a cochleáris erősítő automatikus beállító mechanizmusainak megértéséhez. Ezért tartjuk szükségesnek az ACh és a GABA sejtfalmerevségre gyakorolt hatásának cochleobazális és cochleoapikális localizációból izolált sejteken történő összehasonlító vizsgálatát.

1.4. A mikrodeformációs technika

A külső szőrsejtek merevségvizsgálata un. mikrodeformációs technikákkal lehetséges, melyek során a külső szőrsejtek valamely mechanikai hatásra adott alakváltozását vizsgálják (Oghalai és mtsai. 1998; Ulfendahl és mtsai. 1998; Lue és Brownel 1999). Az így kialakult alakváltozás mértékéből meghatározható a sejt hosszanti (Ulfendahl és mtsai. 1998) ill. oldalfal merevsége (Oghalai és mtsai. 1998; részletesen lásd 16.o.). A mikrodeformációs technikák két csoportba sorolhatók, aszerint, hogy a külső szőrsejtek deformációját milyen módszerrel érik el. Ennek megfelelően vizsgálhatjuk a sejt nyomó erőre kialakult alakváltozását, mely során egy speciális mikro-erőmérőhöz kapcsolt üvegrúddal a sejtre gyakorolt nyomóerő által létrehozott alakváltozás mértékéből határozzuk meg a sejt merevségét. Ez a technika alkalmas a sejtek hosszanti és keresztirányú

merevségének meghatározására is, a tényleges oldalfalmerevség mérésére azonban csak nagyon kis kitérések mellett alkalmas (Ulfendahl és mtsai 1998). A másik mikrodeformációs technika a sejtfal húzóerővel szembeni deformálódását méri, mely során a sejt oldalfalára mikropipettán keresztül ismert negatív nyomást csatolunk (Oghalai és mtsai 1998; Lue és Brownel 1999). Ebben az esetben a sejtfal merevségét a sejtfal pipettába való behúzódásának mértékéből határozhatjuk meg. Ezzel a technikával közvetlen módon csak az oldalfal merevségét tudjuk mérni, de a keresztirányú és hosszanti merevség közötti összefüggés alapján (Ulfendahl és mtsai 1998) a hosszanti merevség számolható. A mikrodeformáció meghatározására mindkét technika a külső szőrsejtekről készült felvételek vizuális elemzését használja. Megfelelően pontos mérések csak megfelelő nagyítás és megfelelő feloldóképesség mellett lehetségesek. Ugyanakkor a sejtekről készített natív képeken a sejthatár nem különül el elég élesen a háttértől, ami a mérési eredmények nagy szórását és magas mérési hibát eredményez (Lue és Brownel 1999). Külön nehézséget jelent, hogy az üvegpipettába behúzott sejtfalrészlet kontrasztja tovább romlik a pipetta falán történő fényszóródás miatt. A sejtmembrán fluorescens jelölése jól elkülöníthető sejthatárt eredményez, de használata technikailag igen nehéz (Oghalai és mtsai. 1998). A mikropipettán keresztül alkalmazott szívóerő által létrehozott mikrodeformációt vizsgáló eljárás legnagyobb előnye az, hogy alkalmas kis oldalfal szakaszok (patch-ek) elkülönített vizsgálatára.

1.5. Célkitűzések

1. A szakirodalomban korábban már leírt, a mikropipettán alkalmazott szívóerő által létrehozott mikrodeformáció mérésén alapuló oldalfalmerevség meghatározó módszer mérési pontosságának javítása egy digitális képfeldolgozó eljárás kidolgozásával, mely lehetővé teszi a sejthatár megfelelő identifikálását a mikroszkópos felvételeken.

2. A külső szőrsejtek oldalfalmerevségének összehasonlító vizsgálata a cochlea bazális és csúcsi kanyarulataiból elkülönítve izolált sejteken.

3. A cochlea bazális és csúcsi kanyarulataiból elkülönítve izolált külső szőrsejteken kis léptékű sejtfalmerevség térképezés elvégzése a sejt hossztengelye mentén, valamint ennek összehasonlító vizsgálata a különböző cochleáris lokalizációjú sejteken.

4. A külső szőrsejtek oldalfalmerevségének dinamikus időfüggő vizsgálata, időkarakterisztikájának felvétele, az oldalfal mechanikai behatásra adott válaszának jellem-

zése.

5. Az efferens neurotranszmitterek hatásának összehasonlító vizsgálata a sejtfalmerevségre.

6. Az efferens neurotranszmitterek hatásának vizsgálata a sejtfalmerevség időkarakterisztikájára.

2 Anyagok és módszerek

2.1. Sejtelőkészítés

A kísérletekhez pigmentált, fiatal, ép Preyer-reflexű, pentobarbitállal túlaltatott tengeri malacokat használtunk. A Corti-szerv kivétele után szobahőmérsékleten kollagenázemésztést alkalmaztunk (IV tipus, Sigma, 1 mg/ml), mely után a külső szőrsejtek finom mechanikai behatással leválaszthatóvá váltak. A külső szőrsejteket a cochlea csúcsáról és alapjáról elkülönítve izoláltuk, mely eredményeként cochleobazális és cochleoapikális lokalizációból származó sejtpopulációkat kaptunk, 28,5 $\pm 5\mu$m ill. 75$\pm 3\mu$m átlagos sejthosszal (n=87). A vizsgálatokhoz szabályos, hengeres alakú, nem granulált citoplazmájú sejteket választottunk melyek sejtmagja bazális helyzetű volt. Extracelluláris oldatnak a szabványos Hank féle külső oldalot használtuk, mely összetétele (mM-ban): 136,75 NaCl, 5,36 KCl, 0,34 Na_2HPO_4, 0,44 KH_2PO_4, 0,81 $MgSO_4$, 1,26 $CaCl_2$, 5,56 glükóz, 4,17 $NaHCO_3$, 10 HEPES (pH 7,4, 300 mOsm/l). A kalciummentes külső oldatot a Hank oldat összetételének felhasználásával készítettük, azzal a különbséggel, hogy a kalciumot ekvimoláris magnéziummal helyettesítettük és az oldatot kiegészítettük 5mM EGTA-val.

2.2. A külső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata és a mikrodeformáció mérése

A méréseket külső oldattal töltött folyadékkamrában (200 μl) végeztük, inverz, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, 400x nagyítás mellet. A sejtek fáziskontraszt képeit digitálisan rögzítettük. A rögzített képek digitális tisztítása, zajmentesítése után a jobb láthatóság elérésére pszeudokolor átalakítást végeztünk: a különböző optikai sűrűségű sejtpartikulumok különböző szürkeárnyalatos képpontként való leképezése után a szürkeárnyalatos képpontokat meghatározott algoritmus szerint megfelelő -nem valósághű- színnel jelölve

pszeudokolor képet nyertünk.

2.2.1. Az alkalmazott technikai eszközök

A sejtek Nikon TMS-F mikroszkóppal nyert fáziskontraszt képeinek digitális rögzítése Sony DXC-107P CCD-kamera segítségével IBM kompatibilis PC-hez csatolt külső digitalizáló kártyán keresztül (Pinnacle Systems, Inc. USA, California) történt, 24 bit-es színmélységet használva. (Az ehhez a folyamathoz használható számítógép minimum követelménye: 200MHz Pentium II MMX processzor, 32MB RAM, 4MB video RAM, 2GB IDE HDD.) Az adatelemzéshez használt számítógép 1.8 GHz Pentium IV processzort, 256 MB RAM-ot, NVIDIA GeForce-2 videokártyát és 20GB IDE HDD-t tartalmazott.

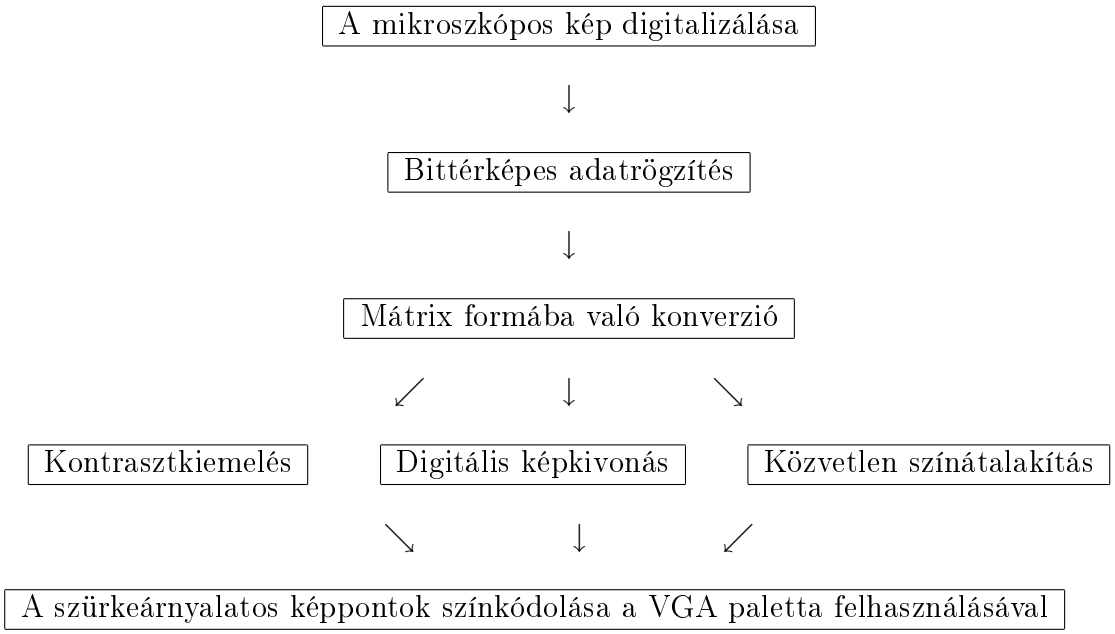
2.2.2. Az alkalmazott programok és a képanalizáló eljárás

A képdigitalizáláshoz a Pinnacle digitalizáló kártya saját szoftverét használtuk (Studio PCTV 1.00.2). A képfeldolgozáshoz és a pszeudokolor eljáráshoz saját fejlesztésű szoftvereket használtunk, melyek Turbo Pascal programnyelven íródtak. A képfeldolgozás első lépése az eredeti szürkeárnyalatos képek olvasása és egyedi fájlformátumba való konverziója. Ezt követi a képek különböző algoritmusok szerint való színkódolása.

A közvetlen színátalakítási eljárás során az algoritmus a képpontok szürkeárnyalatos skálán lévő kódjához közvetlenül hozzárendeli az ennek megfelelő VGA színkódot, ily módon közvetlenül összekapcsolja a szürkeárnyalatos kódrendszert a VGA színskálával. Ennek az egyszerű algoritmusnak programkörnyezetbe való beültetése könnyen megoldható, hátránya, hogy az egyes szürkeárnyalatokhoz rendelt színt csak a VGA színskála standard felosztása határozza meg, így nem minden esetben különülnek el megfelelően az egymáshoz közel eső szürketónusú határvonalak.

A kis tónuskülönbségek kiemelésére alkalmas a képkivonásos eljárás, mely során az eredménykép két különböző kísérleti helyzetről digitalizált kép identikus pontjainak kivonásával jön létre, amit az eredménykép színkódolása követ. Ennek az eljárásnak az eredményeként a különböző kísérleti állapotok közötti különbségek kiemelhetők, ill. megjeleníthetők. Az eljárás speciális formája a háttérkivonásos módszer, mely során információt nem, csupán „vizuális zajt" tartalmazó háttérfelvétel képpontonkénti kivonása történik az információt tartalmazó képből. Az így végzett optikai zajmentesítést követően történik a színkódolás.

Az árnyalatkiemeléses eljárással tovább javítható a kontúrkimelés. Az eljárás módot



4. ábra A digitális képfeldolgozás folyamata

A mikroszkóp képét a hozzá kapcsolt CCD kamera szabványos videojellé alakítja, mely egy speciális digitalizáló eszköz segítségével digitális formába hozható. Az így digitalizált képet bittérképes (bmp) formában tárolni lehet. A fájlban tárolt képpont információk olvasása, mátrix formába rendezése után alkalmassá válik számítógépes feldolgozásra, különböző algoritmusok szerint. Az individuálisan kiválasztott és testreszabott algoritmus által átalakított képpont információkhoz a standard VGA paletta szineit hozzárendelve pszeudokolor képeket nyerünk.

ad egy árnyalat tartomány előre meghatározott, a környezetből jól kiemelkedő színkóddal való ellátására ill. az adott árnyalattartomány színkiegyenlítésére. Szűkebb tartományt választva, lehetőség nyílik az azonos, vagy közel azonos optikai sűrűségű sejtpartikulumok környezetükből vagy a háttérből való kiemelésére.

Az eljárások egyedileg megválasztott kombinációjával optimális kontúrkiemelés és megfelelő láthatóság érhető el. Az eljárások kiválasztása individuálisan történt, a programparaméterek közvetlen beállításával. Az egyedi fejlesztésű programokat a Red Hat 8.0 linux-disztribúció xdosemu futtatási környezetében használtuk. (A Turbo Pascal nyelven írt programok legnagyobb előnye a platformfüggetlenség, mivel pascal fordítók egyaránt elérhetőek DOS, Windows, MacOS, Linux, Unix, SunOS, OS2 operációs rendszerek alatt.)

2.2.3. A képanalizáló eljárás tesztelése

A képanalizáló eljárás tesztelésére és kalibrálására a Farkas és Sziklai (2003) által leírt, mikroáramlás által kiváltott lassú szőrsejtkontrakció detektálását használtuk.

A sejtkontrakció kiváltására kalibrált, kézzel vezérelt gravitációs mikroáramlásos rendszert használtunk, mely kiküszöböli az elektromechanikus pumpával működő rendszerek indítási lökéshulláma által keltett nem kívánatos hatásokat.

A perfúziós pipettákat Clark EC 15TF üvegkapillárisból készítettük, 75±6 μm belső átmérővel. A pipettát polietilén cső segítségével műanyag csapon keresztül egy 2 cm^3 űrtartalmú nyitott műanyag tartályhoz csatoltuk, mely folyadékszintjét a mérésekhez használt, ismert térfogatú medence folyadékszintjére egyenlítettük ki, úgy, hogy a perfúziós pipettában sem kifelé, sem befelé irányuló áramlás ne legyen. Az egyensúlyi folyadékszint beállítása a duplex folyadékkamra második medencéjében történt, az áramlás láthatóvátételéhez fenol-vörös indikátort használtunk.

Az áramlási rendszer kalibrálásakor a folyadék rezervoir-ba ismert térfogatú folyadékot (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 μl) adagoltunk és megmértük a folyadékkamrában lévő folyadék térfogatát az áramlás megindulását követő 1., 2., 3., 4. és 5. perc végén (7. ábra).

A sejtkontrakció kiváltásához használt pipetta a sejtektől 50μm távolságra került elhelyezére, úgy, hogy szájadékának alsó széle a folyadékkamra aljához támaszkodjék, a sejttest közepére merőlegesen mutatva. A mikroperfúziós rendszer kalibrációs görbéinek felhasználásával (7. ábra) beállított különböző áramlási sebességek mellett megmértük a sejtek nyugalmi, majd 1 perc áramoltatás utáni hosszát a natív fáziskontraszt ill. pszeudokolor eljárással nyert képeken kontroll körülmények között és Gd^{3+}jelenlétében,

majd az így nyert eredményeket összevetettük.

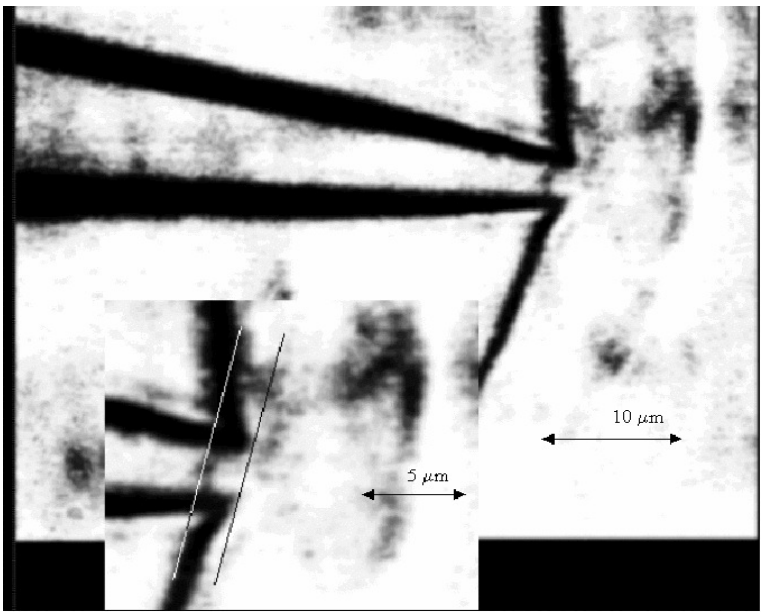
2.2.4. Az oldalfal merevségének vizsgálata

Az oldalfal merevségét az Oghalai és mtsa-i (1998) által korábban leírt, aspirációs mikrodeformációs technika adaptált változatával vizsgáltuk. Az ehhez szükséges mikropipettákat 2,8 μm-s belső átmérővel Clark EC 15 TF üvegkapillárisból készítettük 5 lépcsős formálási programmal (Flaming/Brown Model P-87). Az extracelluláris oldattal feltöltött pipettákat a megfelelő, szabályozható negatív nyomás biztosítására egy vízoszlopos manométerhez csatlakoztattuk. Megelőző bemérő kísérletek után a vizsgálatokhoz 4-10 H_2O cm (0,39 nN/μm^2 -0,98 nN/μm^2) közötti negatív nyomástartományt választottunk, mely tartományban az oldalfal három rétegű struktúrája a szakirodalom szerint is intakt maradt (Oghalai és mtsai 1998). A méréseket külső oldattal töltött folyadékkamrában végeztük, fáziskontraszt mikroszkóp alatt, oly módon, hogy a külső szőrsejt oldalfalához illesztett pipettára kapcsolt negatív nyomás hatására a mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet fáziskontraszt képeit CCD kamera segítségével PC-hez csatolt külső digitalizáló kártyán keresztül rögzítettük. A rögzített képek digitális tisztítása, zajmentesítése után a jobb láthatóság elérésére pszeudokolor átalakítást végeztünk (lésd fent), mely után 18 képpont/μm képfelbontás alakult ki. A sejtfalrészlet behúzódásának mértékét az 5. ábrán látható módon határoztuk meg: az 1 számú vonal, melyet a mikropipetta szájadékának vetületére fektettünk, szolgált a viszonyítási pontnak. Az ezzel párhuzamos, az oldalfalrészlet görbületére merőlegesen fektetett 2 számú vonal és a viszonyítási vonal közötti távolságot tekintettük a pipettába betüremkedő oldalfalrészlet hosszának, melyből a merevségi mutatót (S_p-stiffness parameter) az alábbi összefüggést használva határoztuk meg:

$$S_p = -\Delta P \cdot r^2 \cdot \pi \cdot \Delta L \qquad (1)$$

ahol ΔP (nN/μm2) a pipettán keresztül applikált negatív nyomás; r (μm) a mikropipetta belső átmérője; ΔL (μm) a pipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza (Oghalai és mtsai. 1998; Batta és mtsai. 2003).

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



5. ábra A mikropipettába behúzódott oldalfal részletről készült kép (400×) optikai zajszűrés és kontúrdetektálás után.
Az oldalfalbehúzódás mértékét a pipettavégre és a behúzódott oldalfal-részlet görbületére illeszett, párhuzamos egyenesek közötti távolság adja meg.

meg (Oghalai és mtsai. 1998). Az oldalfal behúzódás karakterisztikájának jellemzésére állandó, 6 H_2O cm-es negatív nyomást alkalmaztunk 2 perces időintervallumban, az oldalfal behúzódást 10 másodperces gyakorisággal határoztuk meg.

A vizsgálatokhoz a külső szőrsejteket hossztengelyük mentén az alábbi régiókra osztottuk: infrakutikuláris vagy apikális régió, sejtközépi régió (az infrakutikuláris régiótól a sejtmag felső vonaláig), -mely magában foglalja a közvetlenül a sejtmag fölött elhelyezkedő szupranukleáris régiót-, valamint az infranukleáris régió, a sejtmag alsó élétől a szinaptikus pólusig terjedően (2. ábra). Ezeket a régiókat ugyanazon sejten, ugyanazt a pipettát használva vizsgáltuk.

2.3. Farmakológiai vizsgálatok

Az oldalfalmerevség szabályozásának vizsgálatához a presztinműködést gátló nátriumszalicilátot és az ismert aspecifikus kationcsatorna blokkoló $GdCl_3$-ot (Sigma) használtuk. Mindkét anyagot 5mM-os töménységben (ph 7,4, 300mOsm/l) az extracelluláris oldatban alkalmaztuk, úgy, hogy a külső szőrsejteket 10 percen keresztül tettük ki a hatásuknak (Chan és Ulfendahl 1999). Az efferens jelátvivők oldalfalmerevségre gyako-

rolt hatásának vizsgálatához ACh-t és GABA-t, ill. ezek specifikus gátlószereit (strichnin és bicuculin) használtuk, mindegyik anyagot 50 μM koncentrációban, 4 percen keresztül. A bicuculint oldékonysági tulajdonságai miatt első lépésben DMSO-ban oldottuk, majd ebből az 1mM-os törzsoldatból továbbhígítás során kaptuk a felhasznált oldatot. A DMSO végkoncentrációja a külső oldatban kevesebb mint 0,1% volt, mely a megelőző bemérő kísérletek során nem befolyásolta kimutatható mértékben az oldalfal viselkedését. Az oldalfal merevségét állandó, 6 H_2O cm-es negatív nyomással vizsgáltuk 2 perces időintervallumban a behatás előtt és 2 perces időintervallumban a behatási idő végén. Egy sejtet csak egy tesztoldattal vizsgáltunk.

2.4. Adatfeldolgozás, statisztikai analízis

A kísérleti adatokra illesztett modellgörbéket és modell paramétereket a Gnuplot nevű, programozható illesztőprogram segítségével nyertük, a statisztikai számításokat a SalStat ill. SigmaStat nevű statisztikai programmal végeztük. A Gnuplot és a SalStat program GNU GPL liszenc alatt áll. Annak ellenörzésére, hogy a különböző állatokból nyert sejtek azonos módon viselkednek-e, a merevségi mutatót (1. egyenlet) és a feszesség beállító sejtválaszt (regulatory stiffness response, lásd később) jellemző modell paramétereket meghatároztuk (5. egynelet) 5 különböző állatból izolált, összesen 27 sejten és ANOVA variancia analízisnek vetettük alá, mely alapján a különböző állatokból nyert sejtek viselkedése gyakorlatilag nem különbözik ($p>0,5$), így a különböző állatokból izolált sejteken végzett mérések egymással összevethetők. A statisztikai szempontból független csoportok statisztikai vizsgálata kétmintés t-próbával, a különböző kezelések hatásának statisztikai vizsgálata ANOVA és Dunnett szerinti kontrollcsoporthoz történő többszörös viszonyítási eljárással történt (szignifikanciaszint $p=0,05$). Az ACh és GABA jelenlétében a modell paraméterekben észlelt változások százalékban (%) kerültek megadásra a jobb áttekinthetőség érdekében. Az 5. egyenlet felhasználásával egyenként kerültek illesztésre a kísérletben résztvevő sejtek mérési eredményei, (vizsgálati csoportonként 10 sejt) az így számolt modell paraméterek átlagából került meghatározásra a százalékos változás: $[(\text{átlag-átlag}_{\text{kontroll}})/\text{átlag}_{\text{kontroll}})\times 100]$. A megadott szórásokat a Gauss féle hibaterjedési függvény felhasználásával határoztuk meg. Hasonlóképpen jártunk el a feszülés indukálta lassú sejtösszehúzódás esetében is.

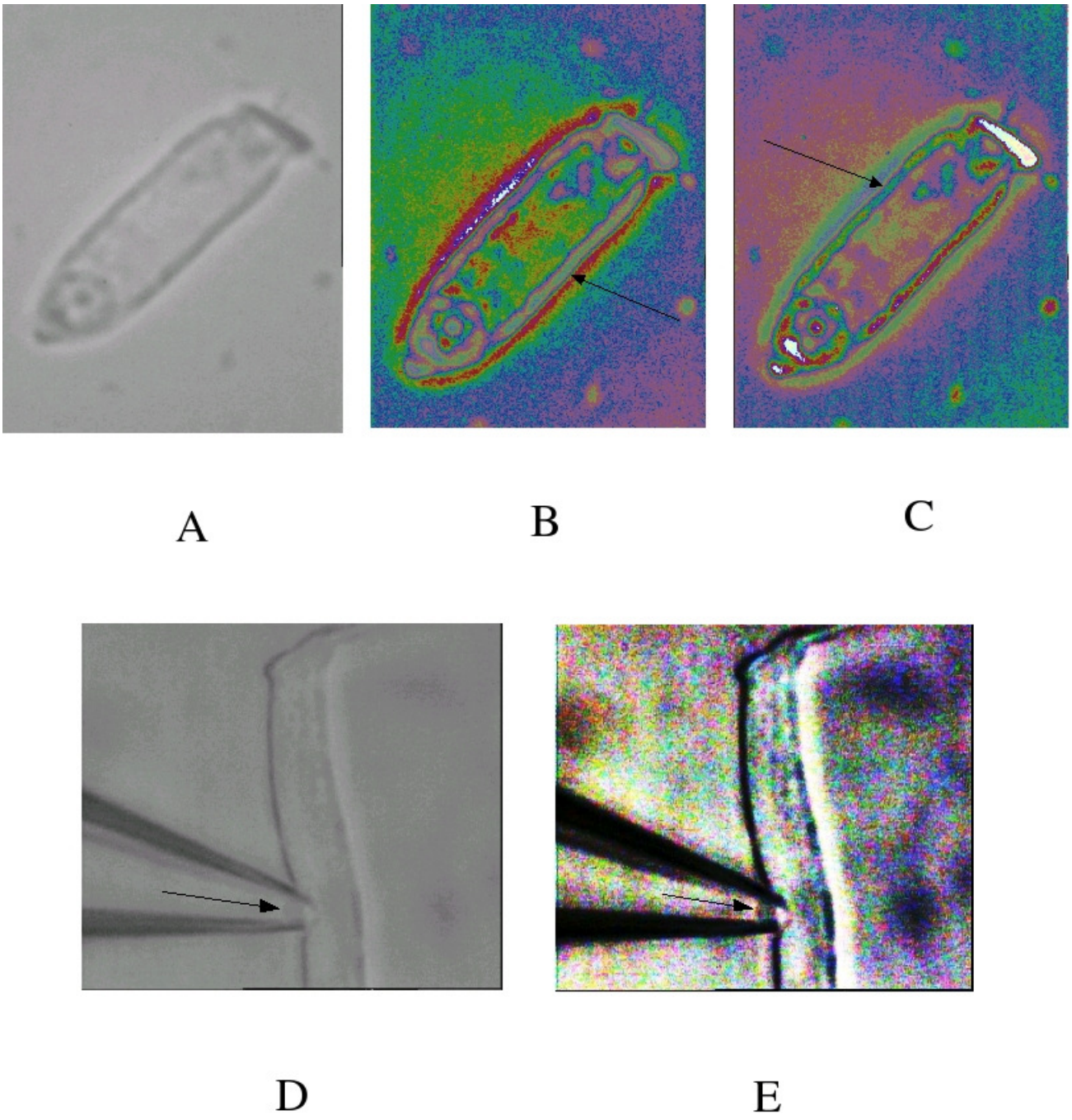
3 Eredmények

3.1. A képanalizáló és pszeudokolor eljárás hatékonysága

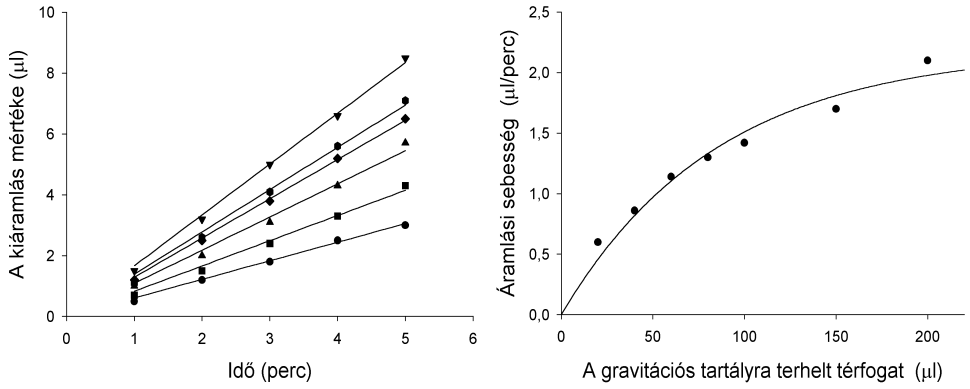
Az optikai rendszer magas kontrasztot adó, ismert méretű próbatesten végzett kalibrálása során 18 képpont/μm felbontás adódott, ami azt jelenti, hogy az elemzésre kerülő képeken 1 képpont 0,055 μm távolságnak felel meg. A pszeudokolor eljárás lehetővé teszi, hogy az élő sejtek gyenge kontrasztot adó sejthatárai pontosan elkülöníthetőek legyenek (6. ábra A-C). A mikropipettába behúzódott oldalfalrészlet határai a pipetta anyagának optikai aktivitása következtében lényegesen halványabban, elmosódottan ábrázolódnak a fáziskontraszt képeken. A pszeudokolor eljárás alkalmazása után a behúzódott oldalfalrészlet határai is jól azonosíthatóvá válnak (6. ábra D, E).

Az eljárás alkalmazhazóságát mikroáramlás által kiváltott lassú szőrsejtkontrakció detektálásával ellenőriztük (Farkas és Sziklai 2003), melyhez első lépésben a mikroperfúziós rendszer kalibrációja történt. Ennek során azt találtuk, hogy a mikroperfúziós rendszer a 0-5 perces időintervallumban lineáris kiáramlást, ill. időben állandó áramlási sebességet biztosít, függetlenül a gravitációs tartályra terhelt folyadéktérfoggattól (7. ábra A). Az áramlási sebesség és a gravitációs tartályra terhelt folyadékmennyiség exponenciális összefüggésben áll (7. ábra B). A kalibrációs görbék felhasználásával 0,6-2,1 μl/perc áramlási sebességi tartományban jól kontrollálható, alacsony áramlású mikroperfúziós rendszer jön létre.

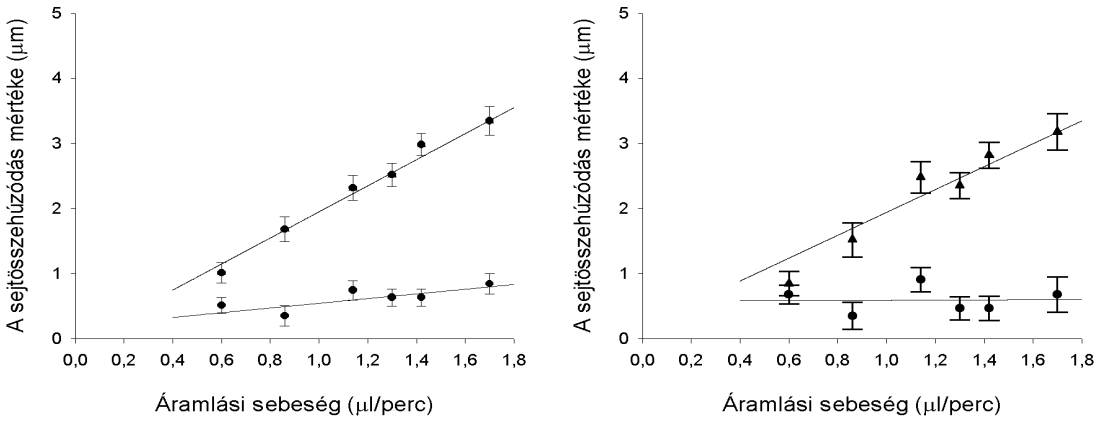
A mikroáramlás által kiváltott reverzibilis lassú szőrsejtkontrakció pszeudokolor képelemzési eljárással való detektálása során a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően lineáris összefüggést találtunk az áramlási sebesség és a sejtösszehúzódás között (Farkas és Sziklai 2003). A natív fáziskontraszt képeken végzett mérésekhez képest a pszeudokolor képelemzéssel nyert eredmények szórása jelentősen alacsonyabb ($\sim$20%), az eljárás nem növelte meg jelentősen a feldolgozáshoz szükséges időt. A nem-szelektív kat-



6. ábra A külső szőrsejtekről készült natív fáziskontraszt képeken a sejthatár elmosódottan ábrázolódik (A, D), mely nagymértékben nehezíti a sejt alakváltozásainak étékelését. A megfelelő pszeudokolor eljárás után a sejthatár (nyilak) egy jól elkülöníthető színes vonalként jelenik meg (B, C, E).



7. ábra A mikroperfúziós rendszer kalibrációs görbéi.
Kiindulási helyzetben a gravitációs tartály folyadékszintje úgy került beállításra, hogy a mikroperfúziós pipettán keresztül sem ki- sem beáramlás nem történik. Ezt követően a tartályba ismert térfogatú folyadékmennyiséget adagoltunk, majd megmértük a mérőkamra térfogatváltozását egy perces időközönként. Így a gravitációs tartály kiindulási térfogatával beállíthatjuk az áramlási sebességet (B), mely a vizsgálathoz szükséges időintervalumban állandó marad (A). A: a gravitációs tartályba adagolt különböző (20-40-60-80-100-150μl) térfogatú folyadék mellett a mikropipettán keresztül való kiáramlás (μl) (kitöltött kör: 20, kitöltött négyzet: 40 kitöltött egyenes állású háromszög 60, kitöltött rombusz 80, kitöltött hatszög 100, kitöltött fordított állású háromszög 150μl) B: a gravitációs tartályba adagolt különböző folyadékmennyiségek (20-40-60-80-100-150-200 μl) mellett a mikropipetta szájadékánál kialakuló áramlási sebesség. (A szórásértékekeket a jobb áttekinthetőség kedvéért nem ábrázoltuk)



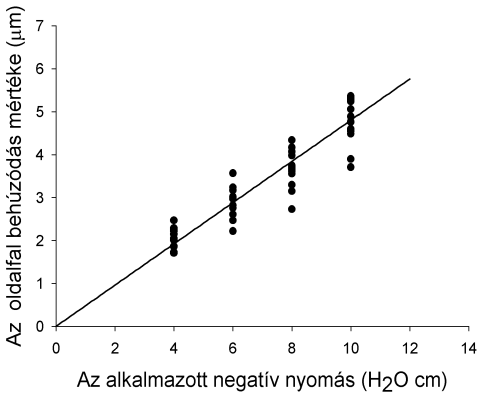
A B

8. ábra A pszeudokolor eljárás növeli az áramlás keltette sejtösszehúzódás detektálásának hatásfokát. A külső szőrsejtek hosszát az áramlás függvényében ábrázolva pszeudokolor képelemzéssel (A) és hagyományos eljárással (B). A folytonos vonallal húzott egyeneseket lineáris regresszióval nyertük. A Gd^{3+}kezelés jelentősen csökkenti az áramlásfüggő sejtösszehúzódást (alsó egyenesek) a kontrollhoz képest (felső egyenesek).

ion csatorna blokkoló Gd^{3+} (5 mM) alkalmazása jelentősen a csökkentette a mikroáramlás indukálta sejtkontrakciót (8. ábra), függetlenül attól, hogy natív fáziskontraszt, vagy pszeudokolor eljárással átalakított képek elemzésével végeztük a méréseket. Az átalakított képeken végzett mérések azt mutatják, hogy a Gd^{3+} jelenlétében a mikroáramlás indukálta sejtkontrakció lineáris karakterisztikája megmarad, csak az illeszthető egyenes meredeksége változott a kontroll körülmények között észlelhető 1,98-ról 0,51-re (regressziós koefficiens $r_{kontroll}$=0,98; $r_{Gd^{3+}}$=0,65) (8A. ábra). Ezzel szemben a natív képek elemzésével nyert adatok viszont nem mutatnak statisztikailag kimutatható összefüggést. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy a pszeudokolor eljárás amellett, hogy hatékonyan csökkenti a mikrodeformáció vizsgálatának mérési hibáját, lehetővé teszi nagyon kicsi változások megfelelő detektálását is.

3.2. A külső szőrsejtek oldalfal merevségének jellemzése a különböző sejtrégiókban

A negatív nyomáspulzus végén meghatározott pipettába történő oldalfal behúzódást (ΔL) ábrázolva az alkalmazott negatív nyomás függvényében -más szerzőkhöz hasonlóan



9. ábra Az oldalfal behúzódás mértéke az alkalmazott negatív nyomás függvényében cochleoapicalis sejtek sejtközépi régiójában mérve. A különálló szimbólumok különböző külső szőrsejtek oldalfalbehúzódását jelöli, a folyamatos vonal a mérések átlagára illesztett egyenes (r=0,91; y=0,46; n=10).

(Oghalai és mtsai. 1998; Ulfendahl és mtsai. 1998)- jól illeszkedő lineáris összefüggést találtunk (r=0,91; p<0,001) a negatív nyomás mértéke és az ennek hatására kialakuló sejtfalbehúzódás között (ΔL-ΔP), függetlenül a sejtrégiótól (9. ábra). A különböző sejtrégiókban végzett mérések során azt találtuk, hogy az oldalfal merevsége (S_p) 1,83±0,13 nN/μm és 1,14±0,16 nN/μm, (átlag±SD) (1. táblázat) közötti tartományban változik az apikális és szinaptikus pólus között. Az oldalfal merevsége az infrakutikuláris régióban a legnagyobb, a sejtközépi régióban csökken és az infranukleáris régióban a legkisebb (1. táblázat, 10. ábra).

3.3. A cochlea különböző régióiból izolált külső szőrsejtek oldalfal-merevsége

A külső szőrsejtek oldalfala merevségének feltérképezése során a 6 H_2O cm-s negatív nyomás mellett kialakult oldalfalbehúzódást vizsgáltuk. A 10. ábra cochleoapikális és cochleobasális sejtek ily módon felvett oldalfalbehúzhatósági térképét mutatja a ciliáris pólustól számított első 25 μm-en. A cochleoapikális sejtek esetében az oldalfal-behúzódás az első ∼12 μm-n közel állandó, majd folyamatos emelkedést követően ismét állandó végig a sejtközépi régióban a sejtmagig, végül a mag alatti szinaptikus régióban ismét megnövekszik (a ciliáris pólustól számított 25 μm-es szakaszon túli, a mag felé eső és a szinaptikus régió adatait nem ábrázoltuk) (10. A ábra).

A sejtmagnak megfelelő oldalfalszakasz merevségi mutatóját nem tudtuk meghatározni

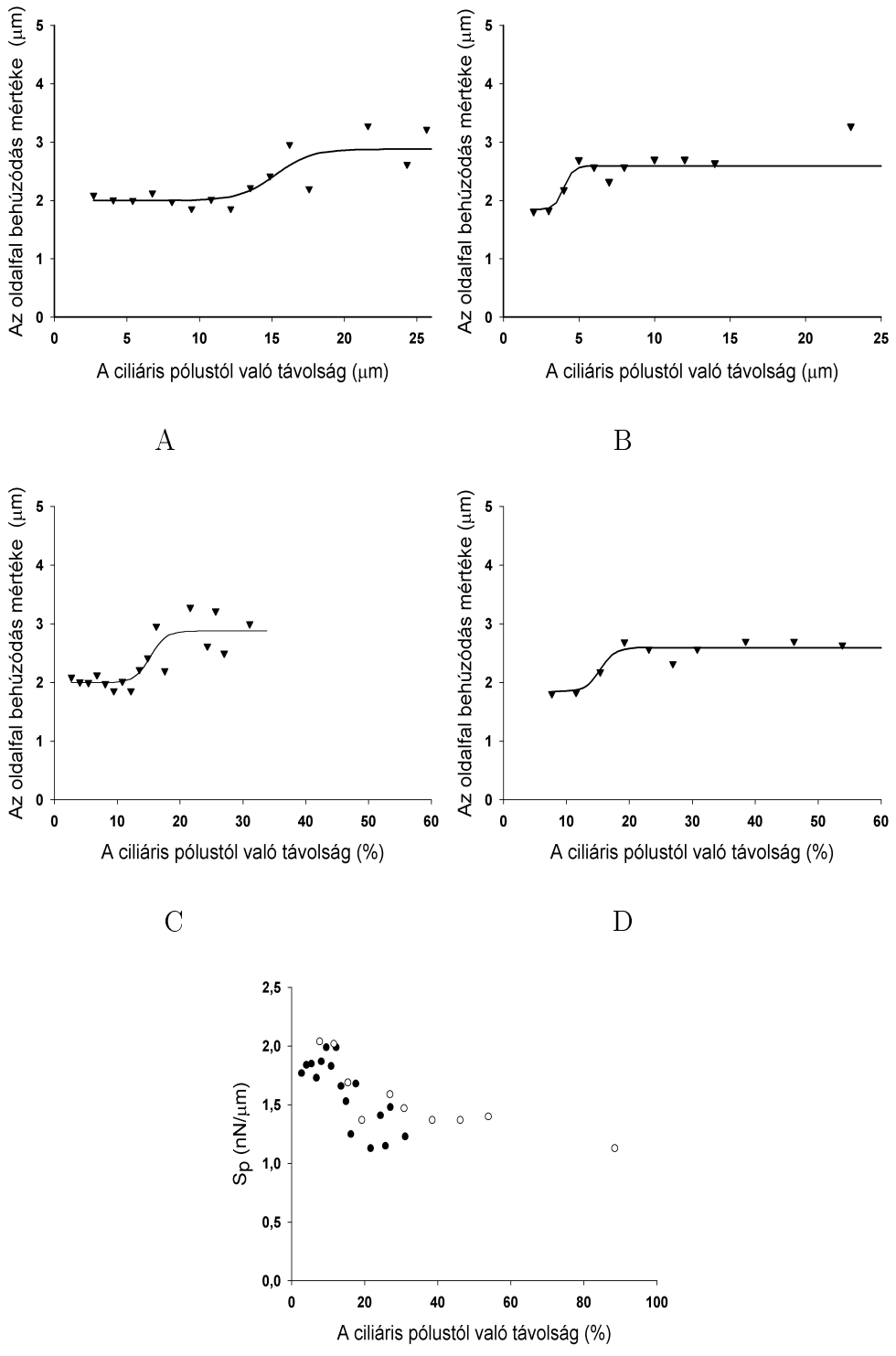
Sejtrégió	Merevségi mutató (nN/μm)
Infrakutikuláris	1,83±0,13*
Sejtközépi	1,35±0,23
Szupranukleáris	1,28±0,16
Infranukleáris	1,14±0,16§

1. táblázat Cochleoapikális külső szőrsejtek merevségi mutatója a különböző sejtrégiókban (átlag±SD, n=10). *p<0,05 a többi lokalizációhoz képest, § p<0,05 a sejtközépi lokalizációhoz képest.

az általunk alkalmazott módszerrel, mivel ezen terület fokozott merevsége miatt a kialakuló oldalfalbehúzódás túl kicsi ahhoz, hogy az a képelemzések során megfelelően azonosítható legyen. A 6 H_2O cm-s negatív nyomás mellett kialakult oldalfalbehúzódás állandónak bizonyult a szinaptikus régió teljes területén (nem ábrázolt adatok), a számított merevségi mutató ebben a régióban volt a legkisebb a vizsgált régiók közül (1. táblázat). A szívóerő hatására kialakuló oldalfal behúzódás hasonló hosszanti elrendeződést mutat mind a cochleoapikális mind a cochleobazális régióból izolált sejtek esetében (10. B ábra), beleértve a nem ábrázolt részeket is, azzal a különbséggel, hogy a rövidebb cochleobazális sejtek esetében az azonos merevségű szakaszok hossza is arányosan rövidebb. Mindez jól érzékelhető a 10. C és D ábrán, ahol az oldalfal behúzódás a ciliáris pólustól számított, a sejthossz %-ában megadott pozició függvényében került ábrázolásra. Ez az ábrázolásmód lehetővé teszi az eltérő hosszúságú sejtek oldalfalmerevségének lokalizáció függő, összehasonlító viszgálatát. Ennek megfelelően a 10. E ábrán az oldalfal behúzódás mértékéből számított oldalfal merevség látható a ciliáris pólustól számított relatív távolság függvényében, mely mutatja, hogy a cochleobazális és cochleoapikális helyzetű külső szőrsejtek oldalfalának identikus pozicióiban mérhető merevségi együtthatók jó egyezést mutatnak.

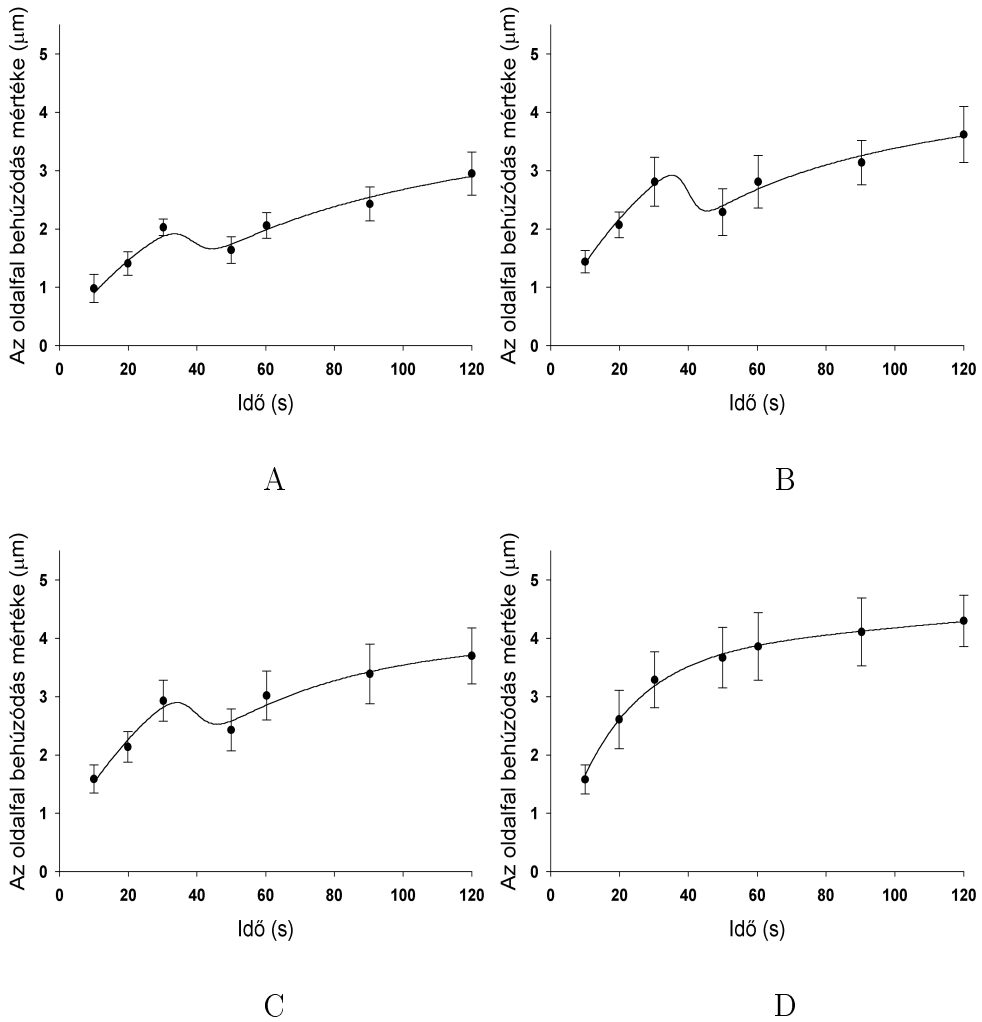
3.4. Az oldalfal merevség húzóerővel szembeni időfüggő karakterisztikája

Az oldalfal behúzódás időfüggvénye (ΔL-ΔT) a szupranukleáris régiókban azonos karakterisztikát mutat, a különböző oldalfal merevségű pozíciókban a görbék között csak kvantitatív eltérés észlelhető (11. ábra A-C). Ugyanakkor a szinaptikus régióban felvett ΔL-ΔT görbe kvalitatív különbséget mutat a szupranukleáris régiók görbéihez képest (11. ábra D). A szinaptikus régióban a ΔL-ΔT görbe egy egyszerű exponenciális függvénnyel leírható, míg a szupranukleáris régiókból nyert görbék tartalmaznak egy szigmoid kom-

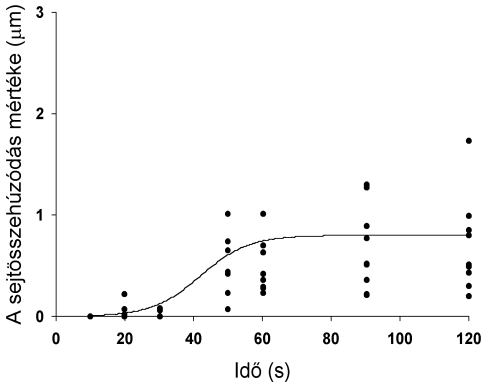


10. ábra Különböző cochlearis régiókból nyert külső szőrsejtek olalfalmerevségének változása a sejt hossztengelye mentén.

Az A és C cochleoapikális, a B és D cochleobazális sejtek oldalfalának helyfüggő behúzódását mutatja. Az E a merevségi mutató (S_p) változását mutatja a sejt hossztengelye mentén a ciliáris pólustól a teljes sejthossz %-ában mért távolság függvényében (üres körök: cochleoapikális sejtek, kitöltött körök: cochleobazális sejtek). Az identikus oldalfalrégiók merevsége között nincs szignifikáns különbség.



11. ábra Az oldalfalbehúzódás (ΔL) időfüggése (ΔT) a külső szőrsejtek különböző sejtrégióiban vizsgálva.
(n=10, sejthossz: 72-80 μm). A-D panel a ΔL-ΔT összefüggést mutatják a sejtek apikális (A), sejtközépi (B), sejtmag fölötti (C) és sejtmag alatti régióiban (D). A folyamatos vonalak a 4. számú egyenlettel (A-C) és a 3. számú egyenlettel (D) végzett matematikai illesztések eredményei. Az illesztett görbék korrelációs együtthatói (r): 0,98 (A); 0,98 (B), 0,97 (C), 0,99 (D).

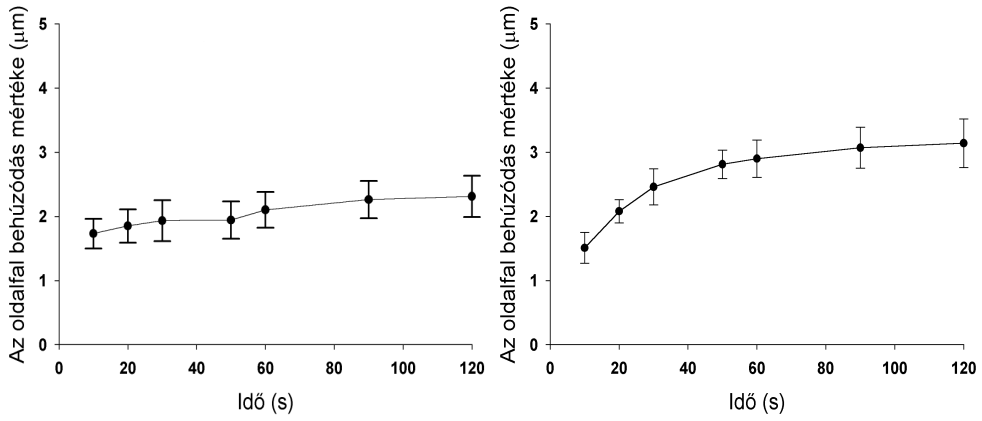


12. ábra A sejtközépi régióban alkalmazott konstans negatív nyomás (6 H_2Ocm) hatására kialakult sejtösszehúzódás időfüggése (n=10, sejthossz: 26±5 μm).

ponenst a negatív nyomás applikálása utáni 30 és 60 másodperc közötti időintervallumban (feszesség beállító sejtválasz-regulatory stiffness response). A negatív nyomás oldalfalra való applikálása ezen kívül indukál egy, a szigmoid komponens megjelenésével szimultán zajló, Boltzmann függvénnyel jól leírható lassú szőrsejtmozgást is, melynek legnagyobb sebessége ∼0,03 μms^{-1} (12. ábra). Mindkét jelenségre igaz, hogy nem mutatható ki szignifikáns kapcsolat az intenzitásuk és a sejthossz között.

A lassú sejtválasz kalcium mentes külső oldatban való inkubálás során eltűnik (n=10), miközben a nyugalmi oldalfal merevség (1,35 nN/μm) szignifikánsan megemelkedik (1,99 nN/μm) ($p<0,003$). Ugyanakkor a ΔL-ΔT görbén megfigyelhető egy jelzett töréspont az 50 másodperces mérési pontnak megfelelően, mely a normális kalciumtartalmú közegben észlelhető aktív oldalfal-válasz megjelenési pontja (13. ábra A). Az infranukleáris régióban a ΔL-ΔT görbe kalcium elvonás mellett is megtartja az eredeti viselkedését. (13. ábra B és 11 ábra D).

Mivel a kalcium mentes külső oldatban a kalciumot magnéziummal helyettesítettük, kontroll kísérleteket végeztünk a Mg^{2+}oldalfalmerevségre gyakorolt hatását tekintve, mely során azt találtuk, hogy a külső oldat Mg^{2+}koncentrációjának változtatása nem okozott kimutatható változást a külső szőrsejtek oldalfalának merevségében. A merevségi mutató 1,35±0,23 nN/μm volt a normál külső oldatban (0,81 mM Mg^{2+}) és 1,27±0,2 nN/μm volt a 2mM koncentrációjú Mg^{2+}-t tartalmazó oldatban (n=10).



A B

13. ábra A sejtfalbehúzódás időfüggése Ca^{2+}-mentes közegben.
A: sejtközépi régió, B: sejtmag alatti régió (n=10). Az oldalfalbehúzódás mértékét konstans 6 H_2O cm-es negatív nyomás mellett, cochleoapikális sejteken mértük (n=10) a sejtközépi (A) és a szinaptikus (B) régióban.

3.5. A külső szőrsejtek oldalfalának húzóerőre adott passzív válaszát leíró modell

A szívóerő hatására mikropipettába behúzódó oldalfalrészlet hosszának időfüggése (L_t, 11. ábra) az alábbi modell segítségével írható le: A kortikális rácsozat két pillérfehérjéje közé eső plazmamembrán és a hozzá kapcsoló citoszkeletális elemek speciális rugalmas egységeket alkotnak (Raphael et al. 2000), mely rugalmas egységnek két állapota van, egy nyugalmi és egy, az adott erőbehatásra kialakuló megnyúlási állapota. A két állapot közötti átalakulás egyirányú, elsőrendű kinetikát követ. Amennyiben a negatív nyomás oldalfalra való applikálása előtt (t=0) a rugalmas egységek nyugalmi állapotban vannak, a pipettába behúzódott oldalfalrészlet hosszának változása az idő függvényében (L_t) :

$$L_t = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) \qquad (2)$$

ahol a az oldalfal maximális megnyújthatósága [a rugalmas egységek számának (N_0) és az adott negatív nyomásértékhez tartozó egyensúlyi hosszának (l) szorzata], b a rugalmas egységek megnyúlási sebességi állandója és e az un. természetes szám.

Figyelembe véve, hogy az oldalfal a pipetta szájadékához nem tapad tökéletesen, számolnunk kell azzal, hogy a szívó erő hatására az oldalfal nagyon lassan becsúszhat a pipettába (sliding), magával vonva a felszín alatti ciszternális rendszert és a citoszol egy részét. Igy a pipettába behúzódó oldalfal részlet hosszának időfüggése csak passzív

mechanikai választ feltételezve:

$$L_t^* = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) + m \cdot t + k \qquad (3)$$

ahol m: az un. csuszamlási tényező (sliding modulus), k: viszkozitási együttható , t: az idő, a, e, b, mint fent.

A 11D ábrán látható illesztett görbe a 3. egyenlet felhasználásával készült. A kísérleti adatok ezen modellel való matematikai illesztésével meghatározható a csuszamlási tényező mely átlagosan 0,00022μm/s, ami a vizsgált 120 másodperces időintervallumban az oldalfal 0,026μm-es becsúszását eredményezi a mikropipettába 6 H_2Ocm negatív nyomás mellett.

3.6. A külső szőrsejtek oldalfalának húzóerőre adott aktív viselkedésének modellezése

A kortikáis rácsozat két pillérfehérjéje közé eső plazmamembrán és a hozzá kapcsoló citoszkeletális elemek alkotta egységek nemcsak rugalmas egysegekként, hanem elemi motoros egységekként is képesek működni (elaszto-motoros egység, Raphael és mtsai. 2000). Ennek megfelelően a ΔL-ΔT görbén megjelenő szigmoid komponenst a pipettába beszívott oldalfal elaszto-motoros egységeinek aktív összehúzódásaként modelleztük. A modellünk azon a feltevésen alapul, hogy a pipettába való beszívás következtében a sejtfalban kialakult mikrodeformáció által létrehozott fizikai feszülés (σ) un. feszülés-kapuzott (stretch-gated) ioncsatornákat aktivál, és a következményes Ca^{2+}beáramlás vezet az elaszto-motoros egységek összehúzódásához.

Az oldalfal feszülésének időfüggése [σ(t)], mely szabályozhatja a feszülés kapuzott csatornák aktivitását, az alábbiak szerint írható le:

$$\sigma(\mathrm{t}) = \frac{F_f}{A} = \frac{F_h - M \cdot \frac{[a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) + m \cdot t + k]}{t^2}}{A} \qquad (4)$$

ahol F_f a feszülést létrehozó feszítő erő, F_h a negatív nyomás által közvetített húzóerő, M a behúzott oldalfal részlet tehetlenségi momentuma, A pedig a behúzott oldalfal részlet felülete.

Tekintve a húzóerő (F_h) és az behúzott oldalfal részlet hosszának nagyságát ($\sim$3x10^{-9}N ill. $\sim$2x10^{-6}m) a feszülés időfüggése egy alacsony emelkedésű exponenciális görbével írható le, mely jól közelíthető egy egyenessel a mikropipetta-aspirácó 0-120 másodperces

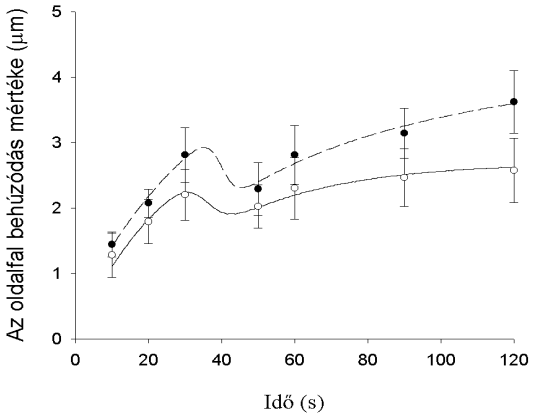
időtartama alatt. Figyelembe véve a fizikai feszülés időfüggését, és az ioncsatornák igen rövid aktiválódási idejét, az aktiválódott elaszto-motoros egységek számának időfüggését egy Boltzman függvénnyel írhatjuk le. Ennek megfelelően a szupranukleáris régiók ΔL-ΔT görbéi az alábbiak szerint írható le:

$$L_c^*(t)=a\cdot(1-e^{-b\cdot t})-\frac{c}{1+e^{-\frac{t-t_0}{d}}}+m\cdot t+k \qquad (5)$$

ahol c: a behúzott oldalfal-szegmens maximális aktív retrakciója; d: az oldalfal-szegmens retrakciójának sebességi állandója; t_0: a folyamat féléletideje. A kísérleti adatok 5. egyenlettel való illesztésével nyert görbék a 11. és 14. ábrán láthatók. Az illesztésből nyert oldalfal viselkedést jellemző mutatók különböző kísérleti körülmények között a 2. táblázatban láthatók.

3.7. A szalicilát és a Gd^{3+} hatása a külső szőrsejt oldalfalának aktív és passzív viselkedésére

A szalicilát közismerten gátolja a külső szőrsejtek presztinhez kötött (gyors) motilitását (Kakehata és Santos-Sacci 1996; Zheng és mtsai 2002). Annak ellenörzésére, hogy az oldalfal fent leírt aktív válasza független-e a presztin működésétől összehasonlítottuk az oldalfal húzóerővel szembeni időfüggő karakterisztikáját (ΔL/Δt görbék) kontroll körülmények és szalicilát jelenlétében. Ennek során azt találtuk, hogy szalicilát jelenlétében (5mM n=10) sem a ΔL/Δt görbék aktív, sem a ΔL/Δt görbék passzív karakterisztikája nem változott meg szignifikánsan. Kationcsatornák oldafalmerevség szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatára egy nem specifikus kation csatorna blokkoló anyagot, Gd^{3+}-t (5mM, n=10) adtunk az inkubáló oldathoz (Chan és Ulfendahl 1999). Miközben a Gd^{3+} gátolta a negatív nyomás kiváltotta sejtrövidülést (a maximális sejtösszehúzódás mértéke 0,85±0,23-ról 0,5±0,18-re változott; n=10) látható, hogy Gd^{3+} hatására többrétű változás jött létre a ΔL/Δt görbén is. A legfontosabb változás az aktív merevség szabályozás jelentős csökkenése, melyet a 30-60 másodperc közötti szigmoid görbekomponens (lásd fent) „elsimulása" jelez. Az oldalfal passzív viselkese is megváltozott, ami a görbe y-tengely mentén való lefelé tolódásában nyilvánul meg. A korábban részletezett matematikai modellünk lehetőséget ad arra, hogy egyrészt különválasszuk a Gd^{3+}hatását az aktív és a passzív oldalfalviselkedésre, másrészt meghatározzuk ill. elemezzük ezeket a változásokat. Az így meghatározott, oldalfalviselkedésre vonatkozó mutatók mindegyike szignifikánsan különbözik a kontroll körülmények között meghatározott mutatóktól. A



14. ábra A Gd^{3+}befolyásolja a pipettába behúzott oldalfalszegmens hosszának időfüggését.
A méréseket a sejtközépi régióban, 6 H_2O cm negatív nyomás applikálása mellett végeztük, cochleoapikális sejteken (n=10), kontroll körülmények között (kitöltött körök), és 5mM $GdCl_3$ jelenlétében (üres körök). A folytonos és szaggatott vonallal rajzolt görbék a mérési adatok 5. egyenlettel történt matematikai illesztése nyomán jöttek létre (korrelációs koefficiens r= 0,98). Az illesztett görbék modellparaméterei a 2. táblázatban láthatók.

mutatók változásának iránya megegyezik a mutatók Ca^{2+} megvonás hatására kialakult változásának irányával, a Gd^{3+}hatása azonban elmarad a Ca^{2+} megvonás hatásától.

3.8. Az ACh és GABA hatása a cochlea különböző helyeiről izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségére

A 3. táblázatban kerültek összesítésre a cochlea alapjáról és bázisáról izolált külső szőrsejteken mért merevségi mutató értékei különböző kísérleti körülmények között. Kontroll körülmények között nincs szignifikáns különbség a cochleobázisról és a cochleacsúcsról izolált sejtek oldalfalmerevsége között (kétmintés t-próba, p=0,7). Az ACh (50μM) és GABA (50μM) oldalfalmerevségre gyakorolt hatása függ a külső szőrsejtek cochleán belüli elhelyezkedésétől. Az oldalfal merevsége szignifikánsan lecsökkent amikor ACh-t adtunk a cochlea bázisáról izolált sejtekhez, ugyanakkor a GABA hatástalan volt ugyanezen sejtcsoporton (ANOVA és Dunnett eljárás $p<0,05$; 3. táblázat). Hasonló statisztikai összehasonlítást végezve a cochlea csúcsáról nyert sejtek esetében látható, hogy a GABA szignifikánsan csökkentette a sejtfalmerevséget, míg az ACh

Modell paraméter	Kontroll	Gd^{3+}	Ca^{2+}hiányos közeg
a (μm)	4,09±0,72	2,32±0,4	1,18±0,25
d (μm)/s	0,03±0,002	0,03±0,003	0,02±0,002
c (μm)	1,04±0,2	0,48±0,12	0,24±0,05
k	0,35±0,07	0,81±0,16	1,52±0,35

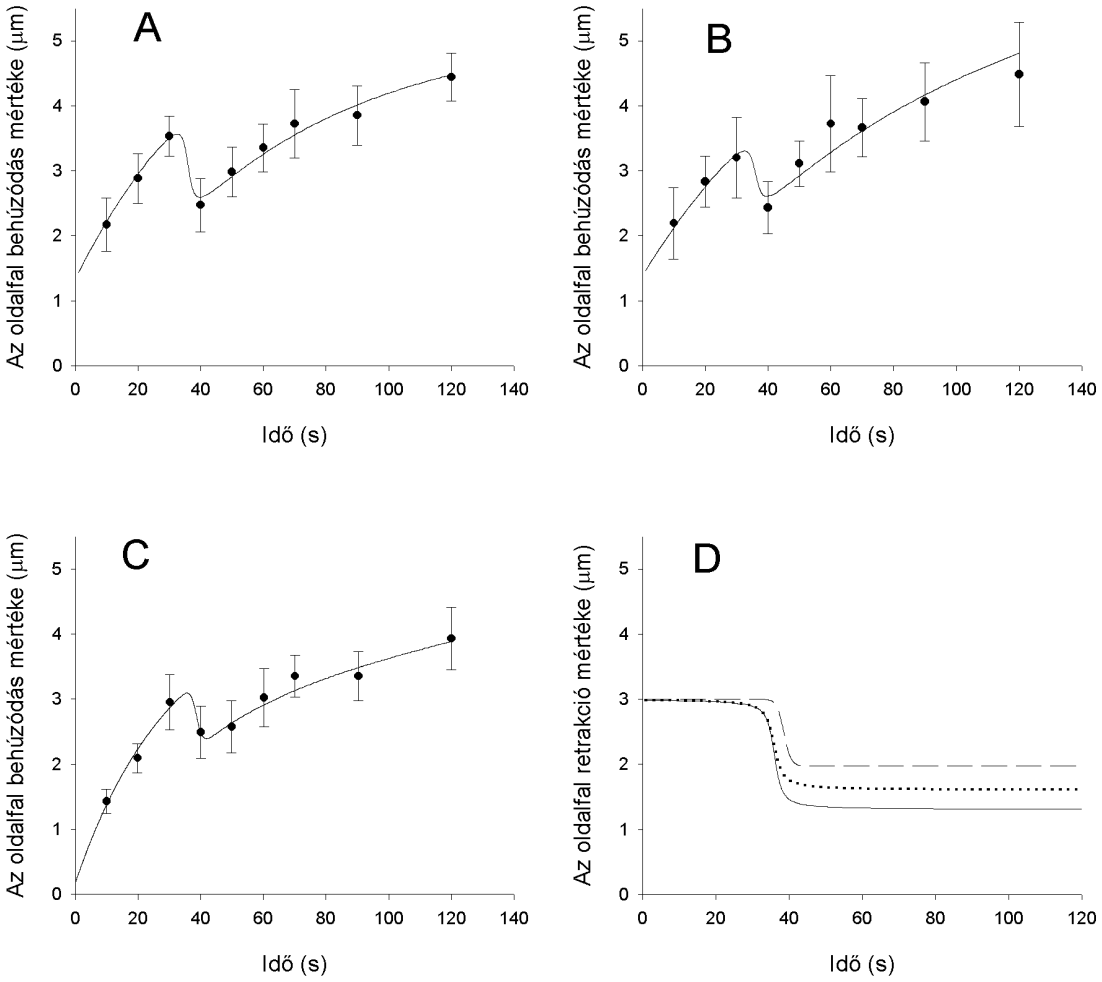
2. Táblázat Különböző kísérleti körülmények között nyert adatokra illesztett modell görbékből nyert mutatók.
A számítások alapjául szolgáló mérések a sejtek sejtközépi régiójában történtek kontroll körülmények között (lásd 11B ábra), 5 mM $GdCl_3$ jelenlétében (lásd 14. ábra) és Ca^{2+}hiányos közegben (lásd 13A ábra) történtek (±SD, n=10). Ahol *a:* az oldalfal maximális megnyújthatósága *d:* az oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandója; *c:* a behúzott oldalfal szegmens maximális aktív retrakciója; *k:* viskozitási együttható

hatása statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak 3. táblázat). Az ACh cochleobazális sejteken észlelt oldalfalmerevségre gyakorolt hatása és a GABA cochleoapikális sejteken észlelt oldalfalmerevségre gyakorolt hatása között nem észlelhető szignifikáns különbség (Dunnett eljárás, p>0,05). Nem volt szignifikáns oldalfalmerevség változás amikor 50μM szrtichnint, a külső szőrsejteken található α9 ACh receptor specifikus gátlószerét adtunk az ACh mellé cochleobazális sejtek esetén vagy amikor 50μM bikukullint, az ismert $GABA_A$receptor blokkolót használtunk a GABA mellett cochleoapikális sejtek esetén (Dunnett eljárás, p>0,05; 3. táblázat)

3.9. Az ACh és a GABA hatása az oldalfal merevségének aktív és passzív időfüggő változásaira

A külső szőrsejtek oldalfalmerevségének mikropipettán keresztül ható húzóerő hatása alatt kialakult változás a mikropipettába behúzódott oldalfal szegmens hosszának időfüggésével jellemezhető (ΔL-ΔT; 1. egyenlet). A mikropipettába behúzódó oldalfalszegmens ΔL-ΔT függvényén látható jellegzetes, a 30 és 60 másodperc közötti időintervallumban megjelenő változás, a feszesség beállító sejtválasz megemeli az oldalfal merevségét (Batta et al. 2003; 11. ábra A-C; 15. ábra A-C). Az ACh és GABA ΔL-ΔT függvényre gyakorolt hatása szoros összefüggést mutat a külső szőrsejtek cochleáris helyzetével (15. ábra, 3. táblázat).

Az ACh és GABA oldalfalmerevség szabályozásra gyakorolt hatása a ΔL-ΔT függ-



15. ábra A mikropipettába behúzott oldalfalszegmens hosszának (ΔL) időfüggése (ΔT) ACh és GABA jelenlétében.

A méréseket a sejtközép régióban végeztük, cochleobazális sejteken ACh (50μM; A), cochleoapikális sejteken GABA (50μM; B) jelenlétében és kontroll (cochleobazális) sejteken (n=10). (Megelőző bemérő kísérletek során azt találtuk, hogy a cochleobazális és cochleoapikális sejtek által adott sejtválasz azonos.) Az alkalmazott negatív nyomás 6 H_2O cm volt, a szórásoszlopok a standard deviációt jelentik. A folytonos vonallal rajzolt görbéket az 5. egyenlettel végzett matematikai illesztéssel nyertük. Az aktív oldalfalmerevség szabályozás időkarakterisztikájának (feszesség beállító sejtválasz; D) változását ACh és GABA jelenlétében az 5. egyenlet matematikai illesztésével nyert modellparaméterek felhasználásával jellemeztük. A szaggatott vonallal rajzolt görbe kontroll körülmények között lévő sejtek, a pontozott vonallal rajzolt görbe GABA jelenlétében vizsgált cochleoapikális sejtek, a folytonos vonallal rajzolt görbe ACh jelenlétében cochleobazális sejtek teoretikus feszesség beállító sejtválaszt mutatja.

Kezelés	Cochleoapikális ksz.	Cochleobazális ksz.
Kontroll	1,3±0,07	1,27±0,08
ACh (50μM)	1,27±0,12	1,03±0,11*
GABA (50μM)	1,1±0,09*	1,33±0,12
ACh+sztichnin (50μM)	1,3±0,2	1,29±0,13
GABA+bicucullin (50μM)	1,33±0,15	1,27±0,16
Kontroll Ca^{2+}megvonás mellett	1,91±0,15	1,85±0,14
ACh+Ca^{2+}megvonás	1,87±0,18	1,31±0,16*
GABA+Ca^{2+}megvonás	1,3±0,15*	1,9±0,24
ACh+sztichnin+Ca^{2+}megvonás	1,89±0,2	1,86±0,17
GABA+bicucullin+Ca^{2+}megvonás	1,88±0,2	1,86±0,17

3. Táblázat Cochleoapikális és cochleobazális lokalizációjú külső szőrsejtek oldalfalmerevsége.
A merevségi mutató (S_p) a sejtközépi régióban került meghatározásra, a mikropipettába behúzódott oldalfalszegmens hosszából az 1. egyenlet felhasználásával (átlag±SD, n=10 minden csoportban). Az ACh és a GABA 50μM koncentrációban került alkalmazásra. A csillagok a statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölik (ANOVA, Dunnet eljárás $p<0,05$).

vényt leíró modell felhasználásával (5. egyenlet) nyert modell paraméterek elemzésével lehetséges. A modell paraméterek meghatározása a mérési pontok modell függvénnyel való sejtenkénti illesztése utáni átlagolással történt, 10 sejtet használva minden csoportban. Az ACh hatására az oldalfal maximális megnyújthatósága (a) 50±12%-al (n=10), a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens maximális aktív retrakciója (c) 85,5±17%-al (n=10) míg a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandója (d) 59,3±20%-al (n=10) megnőtt, miközben az ACh szignifikánsan csökkentette az oldalfal merevségét (18,9%-al, lásd 3. táblázat) a cochlea bazális kanyarulatából izolált sejteken (átlagos sejthossz 31±5 μm). A GABA, hasonlóan az ACh-hoz fokozta az oldalfal maximális megnyújthatóságát (a) (33±13%, n=10), a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens maximális aktív retrakcióját (c) (47,6±12%, n=10), valamint a mikropipettába behúzott oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandóját (d) (24,5±16%, n=10) míg az oldalfal merevséget csökkentette 15,4%-al (lásd 3. táblázat), a cochlea csúcsi kanyarulatából izolált külső szőrsejteken (átlagos sejthossz 76±4μm). A c és d paraméterek változásait szemlélteti a 15D. ábra, ahol a mérési pontokból az 5. egyenlettel való illesztéssel nyert aktív merevségnövekedési választ leíró görbék kerültek ábrázolásra. A 15 A-D. ábrán látható, hogy a mikropipettán keresztül alkalmazott negatív nyomás hatására kialakult feszesség beállító sejtválaszok nagysága megváltozik ACh és GABA jelenlétében. Mind az ACh, mind a GABA oldalfalmerevség szabályozásra gyakorolt hatása felfüggeszthetők specifikus gátlószereikkel, sztrichninnel és bicu-

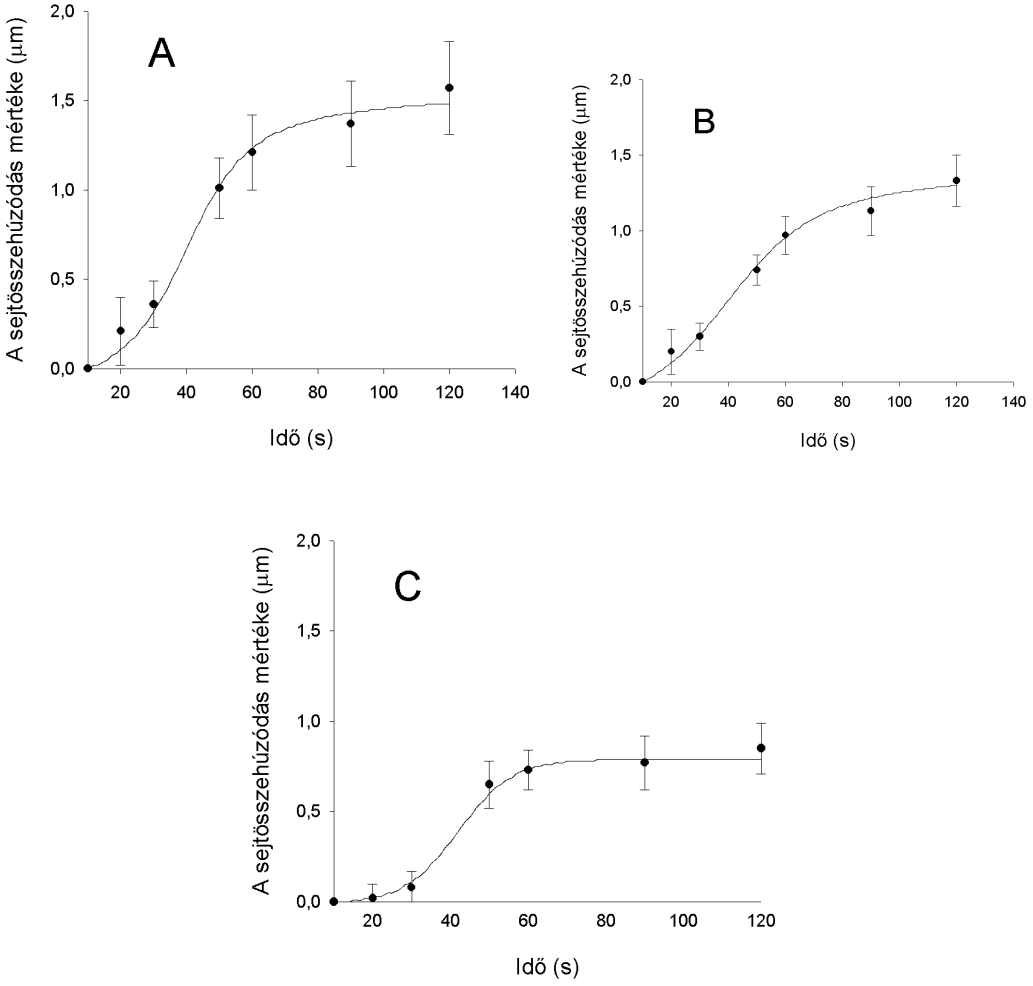
cullinnal.

3.10. ACh és GABA hatása a külső szőrsejtek oldalfalának mikrodeformációja által kiváltott lassú sejtrövidülés karakterisztikájára

A külső szőrsejtek oldalfalára mikropipettán keresztül adott negatív nyomás által létrehozott mikrodeformáció lassú szőrsejt rövidülést hoz létre (lásd fent). A 16. ábra a mikrodeformáció keltette sejtrövidülést mutatja az idő függvényében a cochlea bázisáról izolált külső szőrsejteken ACh jelenlétében (16A), a cochlea csúcsáról izolált sejteken GABA jelenlétében (16B) valamint a cochlea bázisáról nyert sejteken kontroll körülmények között (16C). Kontroll körülmények között nincs kimutatható különbség a cochleoapikális és cochleobazális sejtek mikrodeformáció hatására adott sejtrövidülési válasza között 6 H_2O cm negatív nyomás alkalmazása mellett. A mikrodeformáció keltette sejtrövidülés a cochlea bázisáról izolált sejtek esetében 87,7±19%-al nőtt ACh jelenlétében, míg GABA jelenletében 64,6±18%-os növekedés (n=10) volt látható a cochlea csúcsáról izolált sejtek esetén (az ACh és a GABA önmagában nem okozott sejtrövidülést). A sejtösszehúzódás sebességi állandója nem változott GABA hatására, szemben az ACh hatására kialakult 42,8±12%-os sebességi állandó növekedéssel (n=10), (16. ábra).

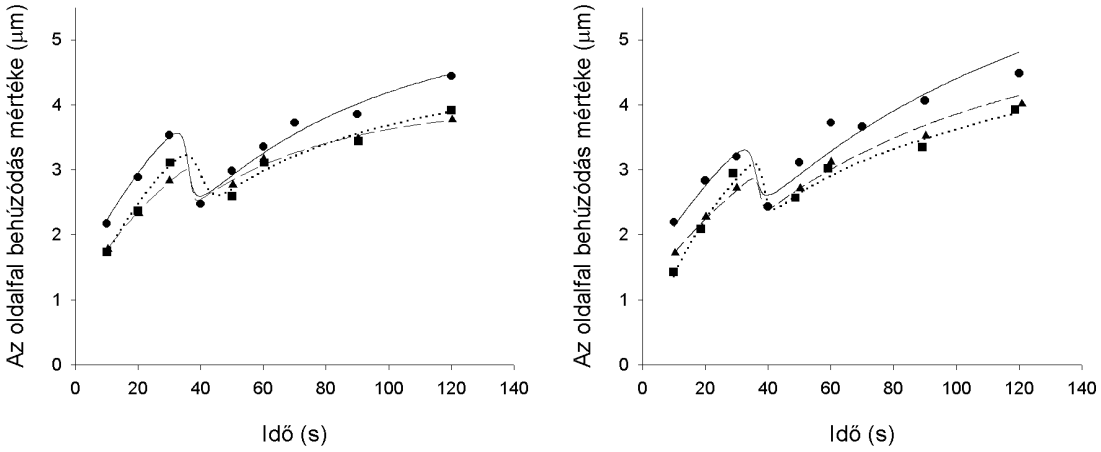
3.11. Az ACh és a GABA hatásának változása külső Ca^{2+} megvonás mellett

Mint korábban láthattuk, a külső Ca^{2+} megvonás jelentősen növelte a külső szőrsejtek oldalfalának merevségét (3. táblázat), emellett drasztikusan csökkent a feszesség beállító sejtválasz (13. ábra). Mivel Ca^{2+} tartalmú kontroll közegben mind az ACh mind a GABA hatása a feszsesség beállító sejtválasz fokozása volt, megvizsgáltuk, hogy az extracelluláris Ca^{2+}megvonása milyen hatással van a jelenségre. A 17. ábra görbéin látható, hogy ACh és GABA jelenléte mellett Ca^{2+} mentes környezetben a feszesség beállító sejtválasz megtartott, mindazonáltal a folyamat nagysága jelentősen csökkent a Ca^{2+} tartalmú kontroll közegben észlelhetőhöz képest (17. ábra). A mikropipettába behúzott oldalfal-szegmens maximális aktív retrakciója (c paraméter, lásd 5. egyenlet) ACh ill. GABA jelenlétében Ca^{2+} mentes környezetben 52,2±17%-os ill. 53,1±17%-



16.ábra Az ACh és GABA hatása a mikropipettán keresztül alkalmazott szívóerő által kiváltott lassú sejtösszehúzódásra.

A cochleobazális külső szőrsejteket 50 μM ACh-al (A), a cochleoapikális sejteket 50 μM GABA-val kezeltük, kontrollként cochleobazális sejteket használtunk (C; n=10). (Megelőző bemérő kísérletek során azt találtuk, hogy a cochleobazális és cochleoapikális sejtek által mutatott sejtrövidülési válasz azonos.) A szórásoszlopok a standard deviációt jelzik, a pontokra húzott görbéket Boltzmann függvény matematikai illesztésével nyertük.



17. ábra A Ca^{2+}megvonás hatása a ΔL-ΔT görbékre ACh és GABA jelenlétében.
A a ΔL-ΔT görbék felvételéhez a méréseket a sejtközépi régióban végeztük, állandó, 6 H_2O cm-es negatív nyomást applikálva a sejtek oldalfalára. A cochleobazális sejteket 50 μM ACh jelenlétében (A), a cochleoapikális sejteket 50 μM GABA jelenlétében vizsgáltuk (B) Ca^{2+} jelenlétében (kitöltött körök) és Ca^{2+} megvonás mellett (kitöltött háromszögek). A kitöltött négyzetek Ca^{2+} jelenlétében ACh ill. GABA jelenléte nélkül felvett ΔL-ΔT görbéket jelölik (n=10 minden vizsgálati csoportban). A pontokra húzott görbék az 5. egyenlettel történt matematikai illesztés eredményeiként jöttek létre. A szórásokat az ábra áttekinthetősége érdekében nem ábrázoltuk (a Ca^{2+} jelenlétében végzett mérések szórásai a 15. ábrán láthatók, a Ca^{2+} megvonás mellett végzett kísérletek során a szórások gyakorlatilag nem változtak).

os csökkenést mutatott a normál Ca^{2+} tartalmú környezetben kapott értékekhez képest (n=10).

4 Megbeszélés

A külső szőrsejtek oldalfalának összetett felépítése speciális mechanikai tulajdonságok megjelenését eredményezi és lehetővé teszi, hogy mechanikai szabályozás alatt tartsa a külső szőrsejt aktivitást (Arima és mtsai., 1991). Mivel a motor fehérjék a sejtfal által közvetített mechanikai ellenállással szemben dolgoznak (Dallos és He 2000), az oldalfal merevség általunk leírt regulációja képes szabályozni a külső szőrsejtek elektromotilitását. Ebben felthetően a szubkortikális rácsozat játssza a legfontosabb szerepet, mely a plazmamembrán citoplazmatikus felszínéhez és a citoplazma felszin alatti ciszternális rendszeréhez szorosan kötődő, körkörös keresztkötésekkel összefogott hosszanti párhuzamos aktin szálakból felépülő szerkezetéből adódóan speciális mikrodoméneket alkot (Forge, 1991; Holley és mtsai., 1992). Ezen mikrodomének speciális szerkezete teszi lehetővé a sejtmembránban elhelyezkedő, egymástól függetlenül aktiválódó elemi, feszültség függő motor fehérjék alakváltozásának kumulációját és átalakítását hosszirányú sejtmozgássá (Kalinec és mtsai., 1992; Lim és Kalinec, 1998). Az így felépült citoszkeletális rendszer rugalmas előfeszített állapotot tart fenn, mely a sejtek nyugalmi mechanikai ellenállását adja.

A külső szőrsejtek oldalfalának mikropipettán kersztül alkalmazott negatív nyomásra adott megnyúlás-erő válasza az oldalfal szerkezetének megfelelően rugalmas alakváltozásként jellemezhető (9. ábra), függetlenül attól, hogy melyik sejtrégióban vizsgáljuk.[1] Mindazonáltal az oldalfal merevsége a sejt hossztengelye mentén változó (10. ábra, 1. táblázat). A kísérletek során mind a cochlea alapjáról, mind a csúcsáról izolált külső szőrsejtek esetében hasonló, a sejt alapjától a sejt csúcsa felé irányuló oldalfalmerevség gradiens volt észlelhető (10C ábra). Így merevségazonos régiók alakulnak ki, melyeknek a sejt hosszához viszonyított relatív helyzete azonos a sejttest mentén (10C ábra). Ennek megfelelően a különböző hosszúságú sejtek megfelelő pozíciójú oldalfalszegmenseinek

[1] statikus vizsgálattal, mely során az adott erőbehatásra kialakult maximális megnyúlást mérjük, a húzóerő applikálását követő, egy adott pillanatban

azonos Young modulusa lesz, és ezek az azonos rugalmassági tulajdonsággal rendelkező oldalfalszegmensek a sejtek azonos hányadát teszik ki mind a cochlea alapjáról izolált igen rövid, mind a cochlea csúcsáról izolált igan hosszú sejtek esetében is (10. ábra). Mivel a sejthossz a cochlea csúcsa felé haladva növekszik, az merevségazonos sejtfalszegmensek abszolút hosszai is növekednek a sejthosszváltozással együtt. Így a hosszabb (cochleoapikális) külső szőrsejtek arányosan hosszabb merevségazonos hengerszeletekből épülnek fel, mint a rövidebb (cochleobasalis) külső szőrsejtek, miközben a megfelelő hengerszeletek Young modulusa azonos, vagyis a különböző cochleáris lokalizációban elhelyezkedő külső szőrsejtek sejthosszának különbözősége nem jár a sejt mechanikai struktúrájának torzulásával. Az Euler féle rúdelmélet, mely szerint egy rugalmas hengerrúd tengely szerinti merevsége és a hossza fordítottan arányos, magyarázatot ad arra, hogy hogyan teszi lehetővé a külső szőrsejtek fent leírt felépítése a korábbi vizsgálatok során (Hallworth 1995; Ulfendahl és mtsai 1998) észlelt hosszabb külső szőrsejtekhez tartozó kissebb, ill. rövidebb sejtekhez tartozó nagyobb (kumulatív) axiális merevség kialakulását. [2]

A sejtfalmerevség vizsgálatához használt, mikropipettán keresztül alkalmazott negatív nyomással végzett mikrodeformációs vizsgálat során azonban a külső szőrsejtek oldalfalának aktív viselkedése figyelhető meg, melyhez szorosan kötődik egy ezzel a jelenséggel szinkron lezajló lassú sejtrövidülés (11. és 12. ábra). Az alkalmazott negatív nyomás következtében létrejött aktív sejtválasz kiváltója feltehetően az oldalfal megnyúlása, mely hasonló hatással lehet, mint egy hossztengely irányú excesszív sejtmegnyúlás, ami kialakulhat egy erős akusztikus behatás nyomán megjelenő intenzív alaphártya kilengés kapcsán is. Ez, a mikrodeformációs kísérletek során megjelenő aktív sejtrövidülés és az oldalfal aktív viselkedése nem magyarázható a külső szőrsejteken korábban leírt egyszerű, un. mechanoelektromos jelenséggel, mely során a sejtfal megnyúlása hyperpolarizációt, összenyomása pedig depolarizációt okoz (Spector, 2000). Mivel a külső szőrsejtek membránpotenciáljának megváltozása sejthosszváltozásként jelenik meg (Raphael és mtsai. 2000) és a mikropipettába behúzódott oldalfal megnyúlása hiperpolarizációt okoz, ennek következménye a motilis egységek mechanicai relaxációja lenne, ami a sejt megnyúlását kellene, hogy okozza, az oldalfal aktív retrakciója nélkül. A presztinhez, mint motorfehérjéhez kötött membránpotenicál függő sejthosszváltozást elsődelegesen a hang által rezgésbe hozott membrana basilaris kitérései ill. a kitérés frekvenciája vezérli (Dallos és He 2000; Fakler 2002), de szükségszerű, hogy tisztázzuk ennek a

[2] A sejteket alkotó identikus, azonos Young modulusú hengerszeletek hossza a hosszabb sejtek esetében megnő, így axiális merevségük kissebb lesz, ennek megfelelően az összegződésükből kialakult tengelyirányú sejt merevség is lecsökken a rövidebb sejtekhez képest.

folyamatnak a mikropipettán keresztüli aspiráció által létrehozott mikrodeformáció keltette sejtválaszban betöltött szerepét. A presztinhez kötött sejtválasz szalicilát szenzitív folyamat (Kakehata és Santos-Sacci 1996; Zheng és mtsai 2002), ellenben a mikrodeformáció indukálta lassú sejtrövidülés és oldalfalmerevség fokozódás Gd^{3+} szenzitivitást mutatott és nem mutatott szalicilát szenzitivitást (14. ábra). Ugyanakkor a presztin-mediált sejtrövidülés mikro- ill. milliszekundumos időtartományba eső folyamat, míg az általunk leírt sejtválasz 30-60 másodperces időtartományba esik. Emellett a mikrodeformációhoz kötött sejtválasz Ca^{2+}függő, szemben a presztin Ca^{2+}független működésével. Ezek alapján egyértelműen kizárhatjuk a presztinhez kötött sejtválasz szerepét a folyamatban.

A mechanizmus, mely magyarázhatja az eredményeinket, az un. membrán görbület változási modellel egyeztethető össze (membran bending model, Raphael et al., 2000) melyben a kortikális rácsozat két pillérfehérjéje között ívelő sejtmembrán és közöttük feszülő aktin filamentumok alkotják az elemi motoros és rugalmas egységeket, s ahol a membrándepolarizáció sejtösszehúzódást, a hyperpolarizáció megnyúlást okoz.

Mint tudjuk, a külső szőrsejtek membránjában vannak olyan nem-szelektív kation csatornák, melyek képesek depolarizációt létrehozni következményes lassú szőrsejtösszehúzódással (Dulon és mtsai 1990; Iwasa és mtsai. 1991; Schacht és mtsai. 1995; Chan és Ulfendahl 1999). Kísérleti elrendezésünkben az oldalfal feszülése hasonló csatornák megnyílását idézheti elő. Ezt támasztja alá, hogy a lanthanoida csoportba tartozó gadolinium, mely közismerten gátolja a feszülés-aktivált csatornákat (Schumann és mtsai., 1994; Beedle és mtsai. 2002), gátolta a mikropipettán alkalmazott negatív nyomás által kiváltott lassú szőrsejtmozgást és az oldalfal aktív viselkedését (14. ábra). Takahashi és Santos-Sacchi. (2001) mikromechanikai stressz indukált, lanthanoidákkal részlegesen gátolható ionáramokat írt le külső szőrsejtben. Ezek az áramok a sejtközépi régióban a legnagyobbak, a sejt két pólusa felé pedig csökkennek, mely jól illeszkedik azon megfigyelésünkhöz, miszerint a ΔL-ΔT görbéken látható aktív komponens a sejtközépi régióban nagyobb, mint a sejtpólusok környékén (11. ábra), és a gadolinium kezelés csökkenti az aktivitást, de nem oltja ki teljesen azt (14. ábra).

További magyarázat lehet az általunk leírt jelenségre a sejtmembrán vagy a kortikális rácsozat fehérjéinek kalcium függő metabolikus módosulása (foszforiláció-defoszforiláció), mely képes megváltoztatni a sejtfal merevségét (Sziklai és Dallos, 1997; Szőnyi és mtsai., 1999; Sziklai és mtsai., 2001). Minamino és mtsai. (1998) a külső szőrsejtek elektromos térerővel indukált tetanizálása után megjelenő lassú mozgását vizsgálva azt találták, hogy a sejtösszehúzódás 20-30 másodperccel a stimuláció után jelentkezett és

ezt követően 1-2 percig tartott, hasonlóan a mikropipettán keresztül történő negatív nyomás alkalmazását követően kialakult válaszhoz (12. ábra). A Ca^{2+}-calmodulin-CAM kináz útvonal blokkolása, a lassú mozgás gátlását eredményezte, hasonlóan az általunk kalcium megvonás után észlelt sejtaktvitás csökkenéshez (13. ábra). Mindez egy Ca^{2+}-calmodulin-CAM kináz függő sejtösszehúzódási mechanizmus jelenlétére utal. Kísérleteink azt mutatják, hogy mind a kalcium megvonás, mind a Gd^{3+} extracelluláris jelenléte által létrehozott szelektív kationcsatorna gátlás jelentős oldalfal-merevség növekedést okoz. Így mindamellett, hogy feltételezünk egy Ca^{2+}-függő sejtösszehúzódási mechanizmust nem szabad megfeledkeznünk arról, hogy az oldalfal merevségének fokozódása is jelentősen hozzájárulhat a sejtválasz csökkenéshez ezekben az esetekben. Az oldalfal merevségének Ca^{2+}-függéséért felelős folyamat még nem tisztázott, de felmerül egy Ca^{2+}-calmodulin-protein foszfatáz útvonal szerepe a szabályozásban (Batta és mtsai nem közölt adatok).

Munkánk során sikerült modellezni a külső szőrsejtek oldalfalának mikropipettán keresztül közvetített negatív nyomásra adott válaszát, mely egy passzív és egy aktív komponest tárt fel. A kísérleti adatok azt mutatják, hogy a pipettába behúzódó sejtfalrészlet hosszának időfüggvénye exponenciális összefüggést követ (11. D ábra), mely az oldalfalat alkotó struktúrelemek által létrehozott két állapotú rugalmas egység eloszlásfüggvényével modellezhető. Ennek megfelelően elmondhatjuk, hogy a külső szőrsejtek oldalfalának rugalmas alakváltozásai nem írhatók le a korábban használt egyszerű rugalmas alakváltozásként, a sejtfal komplex felépítése egyben annak komplex mechanikai viselkedését is jelenti. A fenti két állapotú modell kiterjeszthető a sejtek szupranukleáris régióiban észlelt aktív sejtfal válaszára is (11. A-C ábra), mindazonáltal még nem tekinthetjük ismertnek a kontraktilis egységek strukturális alapjait. A kísérleti eredményeknek a modellre való jó illeszkedése azonban előre vetíti ilyen, feszülés-receptor modulált egységek meglétét. A külső szőrsejtek szinaptikus régiójában a sejtszerkezeti különbségek miatt nincsenek a sejtmag fölötti sejtrégiókban (2. ábra) megtalálható mikromechanikai egységekhez hasonló struktúrák (Arima és mtsai. 1991; Forge 1991; Holley és mtsai. 1992; Lim és Kalinec 1998), mindazonáltal a sejtfal passzív viselkedése mind a mag fölötti, mind a szinaptikus régióban hasonló. Elgondolásunk szerint a külső szőrsejtek plazmamebránjában megtalálható alkotók (koleszterin, fehérjék) nem csak merevebbé teszik azt (Forge 1991; Li és mtsai 2002), hanem képesek kvázi-elasztikus egységeket létrehozni, melyek kialakításában a szubszinaptikus ciszternális rendszer is részt vesz. Ezek a kvázi-elasztikus egységek lehetnek felelősek a szinaptikus régió oldalfalának az említett, összetett modellel leírható viselkedéséért.

Összegezve, a külső szőrsejtek oldalfalának merevsége aktív szabályozás alatt áll, mely szoros kapcsolatban van a sejtfal-feszülés indukálta lassú sejtmozgással. Ez a folyamat megváltoztatva a külső szőrsejtek oldalfalmerevségét és sejhosszát, olyan szabályozási lehetőséget biztosít, mely a szőrsejtek mechanikai sajátságainak a megváltoztatásával képes szabályozni mind az elektromotilitást mind az elektromotilitás effektivitását a membrana basillárisra történő energiavisszacsatolásban. A szabályozó folyamatban Ca^{2+}és feszülés kapuzott ioncsatornák szerepét sikerült bizonyítani, mely mögött Ca^{2+}-dependens foszforilációs-defoszforilációs útvonalak állhatnak, ami előre vetíti ennek az elektromitilitás-független intrinzik szabályozó rendszernek az efferens neurotranszmitterek általi szabályozhatóságát (Szőnyi et al., 1999; Sziklai et al., 2001).

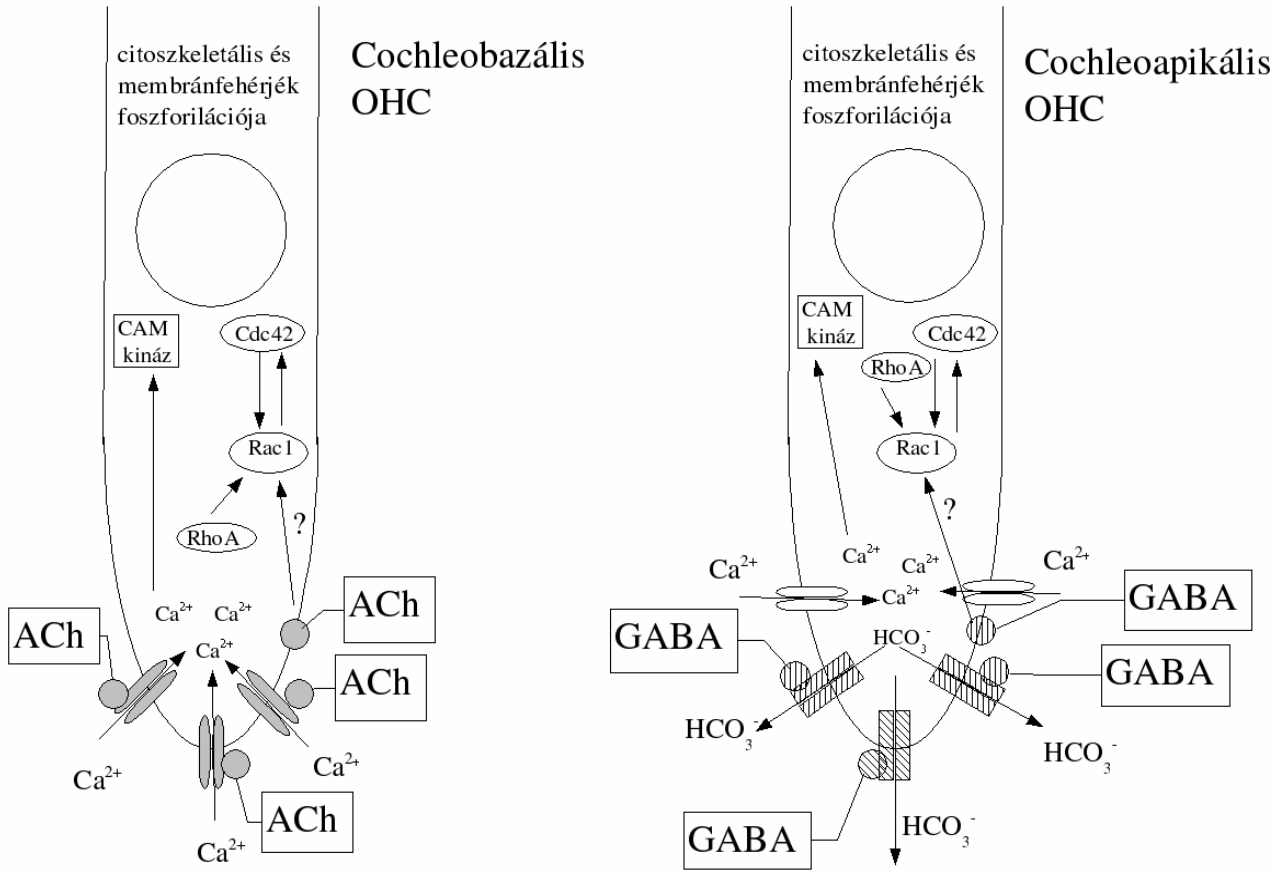
A külső szőrsejtek efferens beidegzése szabályozza a cochleáris erősítés hatékonyságát, fontos részét képezve a az emlős cochlea adaptációjának és a tartós zaj elleni védelmének (Zenner 1986; Dallos 1992; Dulon és Schacht 1992; Lim és Kalinec 1998). Az efferens idegvégződésekből felszabaduló ACh és GABA receptorai tonotopikus eloszlást mutatnak a cochleán belül (Spoendlin, 1967; Stopp és Comis, 1978; Eybalin és mtsai., 1988; Fex és mtsai., 1986, Liberman és mtsai., 1990; Plinkert, 1995; Raphael és Altschuler 2003). Ezzel összhangban a cochlea csúcsi kanyarulatból izolált sejtkhez kötődő GABA és a cochlea bazális kanyarulatából izolált sejtekhez kötődő ACh hatást észleltünk az oldalfalmerevségben és annak szabályozásában. Mindkét neurotranszmitter jellegzetes hatása az oldalfal merevségének csökkentése és a feszesség beállító sejtválasz serkentése, valamint a mikrodeformáció keltette lassú sejtrövidülés fokozása volt.

Dallos és mtsai (1997) felvetették, hogy a külső szőrsejtek elektromotilitásának ACh hatására bekövetkező amplitudó növekedése a külső szőrsejtek tengelyirányú merevségcsökkenésének következtében jön létre. Hasonló összefüggés merül fel a külső szőrsejtek oldalfalmerevsége, a feszesség beállító sejtválasz és mikrodeformáció keltette lassú sejtrövidülés között: az efferens neurotranszmitter-mediált oldalfalmerevség csökkenés (3. táblázat) fokozza az aktív sejtválaszokat (feszülés beállító sejtválasz és mikrodeformáció keltette lassú sejtrövidülés) (16. és 17. ábra).

Az ACh sejtmerevségre és elektromotilitásra gyakorolt hatásának kialakításában a kalcium másodlagos hírvivőként betöltött szerepe már korábban is ismert volt (Dallos és mtsai. 1997; He és mtsai. 2003). Az ACh nagy áteresztőképességű kationszelektív csatornákat (un. α_9/α_{10} ACh-receptor) nyit a külső szőrsejtek szinaptikus régiójában (Housley és Ashmore 1991; Doi és Ohmori 1993; He és mtsai. 2001) (16. ábra). Az így kialakult Ca^{2+}-influx a szubszinaptikus ill. a felszin alatti ciszternális rendszerből (ryadonin receptor és inositol triszfoszfát vezérelt csatornák) másodlagos

Ca^{2+}felszabadulást hoz létre (Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabdulás). Az így kialakult Ca^{2+} jel nyomán Ca^{2+}-kalmodulin függő protein kináz (CaMKII, CaMKIV), protein kináz C, cGMP ill. cAMP függő protein kináz útvonalak aktiválódnak, mely eredményeként a citoszkeleton ill. a presztin foszforilációjához vezet (Ueda és mtsai 1996; Minamino és mtsai 1998; Szőnyi és mtsai 1999; He és mtsai 2003; Sziklai 2004). Ezt bizonyítja a külső Ca^{2+}koncentráció és az oldalfalmerevség valamint a feszesség beállító sejtválasz közötti szoros kapcsolat is (17. ábra, 3. táblázat).

A GABA vonatkozásában bicuculline szenzitív GABA-mediált Ca^{2+}-szignalizációt írtak le Purkinje sejtken (Eilers és mtsai. 2001), ahol a GABA receptorokhoz kötődő feszültségfüggő Ca^{2+}csatornák megnyílása vezet a Ca^{2+}-jel kialakításához. A feszültségfüggő ioncsatornák megnyílásához szükséges membránpotenciál változás ebben az esetben a GABA receptor csatornán történő HCO_3^-kiáramlás következtében jön létre. Hasonló folyamat eredményeként jöhet létre az általunk észlelt GABA hatás a cochleoapikális külső szőrsejteken (18. ábra): egy GABA-mediált Ca^{2+}-influx azonos folyamatokat hozhat létre a cochleoapikális sejtekben, mint egy ACh-mediált Ca^{2+}-influx a cochleobasális sejtekben. Ez magyarázhatja a különböző lokalizációjú sejtekhez kapcsolódó ACh és GABA hatás egyezőségét. Mindazonáltal különbségek is láthatók a két neurotranszmitter hatása között: az ACh hatása erősebb a cochleobasalis lokalizációjú sejteken mint a GABA hatása a cochleoapikális sejteken minden vizsgált paraméter tekintetében, és a GABA eltérő módon befolyásolja az oldalfal merevségfüggő viselkedését (az oldalfal maximális megnyújthatósága, az oldalfal szegmens retrakciójának sebességi állandója) és a kapcsolódó lassú sejtrövidülést mint az ACh. A Purkinje sejteken leírt mechanizmushoz hasonló folyamat ezeket a különbségeket is segíthet megmagyarázni (Eilers és mtsai. 2001). Az ACh receptorokhoz kötődő jelátvivő hatására közvetlen módon alakul ki Ca^{2+}-influx, míg a GABA esetében ez indirekt módon, a receptorhoz kötődő jelátvivő hatására létrejövő membránpotenciál változás által szabályozott módon alakul ki. Ennek eredményeként a GABA-mediált Ca^{2+}-influx ill. Ca^{2+}-szignalizáció nagysága elmarad az ACh-mediálthoz képest. Ugyanakkor Kalinec és munkatársai (2000) a külső szőrsejtek motilitásának (gyors és lassú motilitás) ACh által való szabályozásában GTP-ázok szerepét írták le. Az ACh receptor aktiválódása eddig pontosan nem ismert módon különböző GTP-áz útvonlakat (Rho, Cdc42, Rac1) aktivál, mely lehetőséget teremt alternatív ill. párhuzamos szabályozási folyamatok elindulására is. Ezt látszik erősíteni az ACh és a GABA külső Ca^{2+}megvonása mellett észlelt effektivitása. Mint korábban láttuk, a külső szőrsejtek Ca^{2+}-mentes környezetben való tartása az oldalfal merevségének jelentős emelkedését eredményezte (46%), mely mellett az aktív feszesség beállító sejtvá-



18. ábra Az ACh és a GABA hatására külső szőrsejteken létrejövő Ca^{2+} szignalizáció.
Az ACh nagy áteresztőképességű kation-szelektív csatornákat (α_9/α_{10} ACh-receptor) nyit a külső szőrsejtek szinaptikus régiójában, míg a GABA esetében feltehetően a HCO_3^- eflux következtében aktiválódó feszültségfüggő Ca^{2+}csatornák megnyílása vezet a Ca^{2+}-jel kialakításához. Az ACh receptor aktiválódása Rho GTP-áz útvonal aktiválódását idézi elő; hasonló folyamat a GABA esetében is feltételezhető.

lasz lényegében eltünt. A cochlea bazális kanyarulatából izolált, Ca^{2+}-mentes környezetbe helyezett külső szőrsejtek ACh jelenlétében kissebb mértékű oldalfalmerevség növekedéssel reagáltak, mely mellett a feszesség beállító sejtválasz megtartott maradt, jóllehet kisebb amplitúdóval. Hasonló eredmény adódott a cochlea csúcsáról izolált sejtek esetében, GABA jelenléte mellett (17. ábra, 3. táblázat).

Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésének ill. alternatív szignalizációs útvonalak aktivációjának egyik lehetséges következménye a citoszkeletális fehérjék és a presztin foszforilációja (Minamino és mtsai 1997; He és mtsai 2003; Sziklai 2004). Ezt erősíti meg a mérési adatokból kalkulált viszkozitási együttható emelkedése is Ca^{2+}-mentes környezetben ill. Gd^{3+}jelenlétében (2. táblázat), valamint az is, hogy nincs szignifikáns különbség az ACh és GABA passzív merevségi mutatókra gyakorolt hatásában.

Az eddigi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az efferens beidegzés magas intenzitású hanghatással szembeni védőhatása és a cochlea adaptációjának segítése nem a sejtfalmerevség közvetlen szabályozása útján, hanem indirekt úton, a mikrodeformáció hatására létrejövő sejtfalfeszülés (stretch) által keltett sejtösszehúzódás és oldalfalmerevség fokozódás felerősítése útján valósul meg. Egy erős hanghatás következtében a membrana basilarison nagyobb amplitúdójú kilengések alakulnak ki, melyek nagyobb fizikai feszülést (stretch) hoznak létre a külső szőrsejtek oldalfalában, lassú -kvázi statikus- sejtrövidülést eredményezve. Az efferens neurotranszmitterek jelenlétében kialakult csökkent oldalfalmerevség (3. táblázat) és a külső szőrsejtek következményes motilis képesség fokozódása képes potenciálni az oldalfalfeszülés indukálta sejtrövidülést, mint ahogy a 16. ábrán látható. A sejtrövidülés fokozza az oldalfal merevségét és az így létrejött sejthossz és sejtfalmerevség változás mértéke elegendő lehet, hogy megváltoztassa a cochlea mikromechanikai tulajdonságait és ellensúlyozza a magas intenzitású hanghatás nyomán a Corti szervben kialakuló disztorziót.

Összegzésként elmondhajtuk, hogy az efferens neurotranszmitterek fokozzák a külső szőrsejtek mechanikai behatásra adott válaszkészségét, mely egy erőteljes, presztin-független sejtrövidülésben nyilvánul meg, fokozva a sejt merevségét. Ezek a változások elegendőek lehetnek arra, hogy megváltoztassák a Corti szerv mechanikai tulajdonságait, csillapítva ezzel a membrana basilaris kitéréseit, így védve ezzel a cochleát a magas intenzitású hanghatások ellen. Mindez jól illeszkedik Friedberger és mtsai (1998) által tengerimalacon leírt jelenséghez, miszerint zajhatásra dinamikus Corti-szerv kontrakció alkult ki, melyet a külső szőrsejtek intracelluláris Ca^{2+}koncentrációjának emelkedése kísért.

Az eredményeink lehetőséget nyitnak arra, hogy pontosabban megértsük a külső szőrsejtek membrana basilarisra történő energiavisszacsatolásának szabályozását, a belsőfül

adaptációs, automatikus hangerő szábályozó és protektív folyamatait.

Irodalomjegyzék

[1] Adachi M, Sugawara M, Iwasa KH (2000) Effect of turgor pressure on outer hair cell motility. J Acoust Soc Am 108:2299-2306

[2] Arima T, Kuraoka A, Toriya R, Shibata Y,Uemura T (1991) Quick-freeze, deep-etch visualization of the 'cytosceletal spring' of cochlear outer hair cells. Cell Tissue Res 263:91-97

[3] Ashmore JF, (1987) A fast motile response in guinea pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. J Physiol 388:23-347

[4] Batta JT, Panyi Gy, Gáspár R, Sziklai I (2003) An active and passive behavior in the regulation of stiffness of the lateral wall in outer hair cells of the guinea pig. Eur J. Physiol 424:328-336

[5] Beedle AM, Hamid J, Zamponi GW (2002) Inhibition of transiently expressed low- and high-voltage activated calcium channels by trivalent metal cations. J Membr Biol 187:225-238

[6] Blanchet C, Erostegui C, Sugasawa M, Dulon D (1996) Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. J Neurosci 16:2574-2584

[7] Chan E, Ulfendahl M (1997) Relationship between stiffness, internal cell pressure and shape of outer hair cells isolated from the guinea pig hearing organ. Acta Physiol Scand 161:553-539

[8] Chan E, Ulfendahl M (1999) Mechanically evoked shortening of outer hair cells isolated from the guinea pig organ of Corti. Hear Res 128:166-174

[9] Dallos P, (1992) The active cochlea. Eur J Neurosci 12:4585

[10] Dallos P, Fakler B (2002) Prestin, a new type of motor protein. Nat Rev Mol Cell Biol 2:104-111

[11] Dallos P, He DZZ (2000) Two models of outer hair cell stiffness and motility. J Assoc Res Otolaryngol 01:283-291

[12] Dallos P, He DZZ, Lin X, Sziklai I, Mehta S, Evans BN (1997) Acetylcholine, outer hair cell electromotility and the cochlear amplifier. J Neurosci 17:2212-2226

[13] Doi T, Ohmori H (1993) Acetylcholine increases intracellular Ca^{2+}concentration and hyperpolarizes the guinea pig outer hair cell. Hear Res 67:179-188

[14] Dulon D, Zajic G, Schacht (1990) Increasing intracellurar free calcium induces circumferential contractions in isolated cochlear outer hair cells. J Neurosci 10:1388-1397

[15] Dulon D, Schacht J (1992) Motility of cochlear outer hair cells. Am J Otol 13:108-112

[16] Dulon D, Luo L, Zhang C, Ryan AF (1998) Expression of small conductance calcium-activated potassium channels (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. Eur J Neurosci 10:1388-1397

[17] Ehrenstein D, Iwasa KH (1996) Viscoelastic relaxation in the membrane of the auditory outer hair cell. Biophys J 71:1087-1094

[18] Eilers J, Plant TD, Marandi N, Konnerth A (2001) GABA-mediated Ca2+ signaling in developing rat cerebellar Purkinje neurones. J Physiol 536:429-437

[19] Eybalin M, Parnaud C, Geffard M, Pujol R (1988) Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti Neuroscience 24:29-38

[20] Farkas Zs and Sziklai I (2003) Potassium-induced slow motility is partially calcium-dependent in isolated outer hair cells Act Otolaryngol 123:160-163

[21] Fex J, Altschuler AR, Kachar B, Wenthold JR, Zempel MJ (1986) GABA visualized by immunocytochemistry in the guinea pig cochlea in axons and endings of efferent neurons. Brain Res 366:106-117

[22] Forge A (1991) Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. Cell Tissue Res 265:473-483

[23] Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, Flock B (1998) Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+}concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ Neurobiol 95:7127-7132

[24] Gitter AH, Zenner HP (1992) γ-Aminobutiryric acid receptor activation of outer hair cells in the guinea pig cochlea. Arch Otorhinolaryngol 249:62-65

[25] Gummer AW, Meyer J, Frank G, Scherer MP, Preyer S (2002) Mechanical transduction in outer hair cells. Audiol Neurootol 7:13-16

[26] Hallworth R (1995) Passive compliance and active force generation in the guinea pig outer hair cell. J Neurophysiol 74:2319-2328

[27] He DZZ, Zheng J, Dallos P (2001) Development of acetylcholine receptors in cultured outer hair cell. Hear Res 162:113-125

[28] He DZZ, Jia S, Dallos P (2003) Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. J Neurosci 23:9089-9096

[29] Holley MC, Ashmore JF (1990) Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. J Cell Sci 96:283-291

[30] Holley MC, Kalinec F, Kachar B (1992) Structure of the cortical cytoskeleton in mammalian outer hair cell. J Cell Sci 102:569-580

[31] Housley GD, Ashmore JF (1991) Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. Proc R Soc Lond B 244:161-167

[32] Iwasa KH, Li M, Jia M, Kachar B (1991) Stretch sensitivity of the lateral wall of the auditory outer hair cell from the guinea pig. Neurosci Let 133:171-174

[33] Kakehata S, Santos-Sacchi J (1996) Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge. J Neurosci 16:4881-4889

[34] Kalinec F, Holley MC, Iwasa KH, Lim DJ, Kachar B (1992) The membrane-based force generation mechanism in auditory sensor cells. Proc Natl Acad Sci USA 89:8671-8675

[35] Kalinec F, Zhang M, Urrutia R, Kalinec G (2000) Rho GTPases mediate the regulation of cochlear outer hair cell motility by acetylcholine. J Biol Chemist 275:28000-28005

[36] Kalinec F, Zhang M, Urrutia R, Kalinec G (2000) Rho GTPases mediate the regulation of cochlear outer hair cell motility by acetylcholine. J Biol Chem 275: 28000-28005

[37] Klinke R (1986) Neurotransmission in the inner ear. Hear Res 22:235-243

[38] Li Z, Anvar B, Takashima M, Brecht P, Torres JH, Brownell WE (2002) Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers. Biophys J 82:1386-1395

[39] Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. J Comp Neurol 301:443-460

[40] Lim DJ, Kalinec F (1998) Cell and molecular basis of hearing. Kidney Int 65:104-113

[41] Lue AJ, Brownel WE (1999) Salicylate induced changes in outer hair vell lateral wall stiffness. Hear Res 135:163-168

[42] Minamino M, Hara M, Ohnishi S, Irie T, Yamashita T, Minato A, Inagaki C (1998) Effects of protein kinase and phosphatase inhibitors on slow shortening of guinea pig cochlear outer hair cells. Brain Res 781:275-283

[43] Morimoto NR, Raphael M, Nygren A, Brownell WE (2002) Excess plasma membrane and effects of ionic amphipaths on the mechanics of the outer hair cell lateral wall. Am J Physiol 282:C1076-1086

[44] Oghalai JS, Patel AA, Nakagawa T, Brownell WE (1998) Fluorescence-imaged microdeformation of the outer hair cell lateral wall. J Neurosci 18:48-58

[45] Oliver D, He DZ, Klocker N, Ludwig J, Schulte U, Waldegger S, Ruppersberg JP, Dallos P, Fakler B (2001) Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein Science 292:2340-2343

[46] Plinkert PK, Gitter AH, Möhler H, Zenner HP (1993) Structure, pharmacology and function of $GABA_A$receptors in cochlear outer hair cells. eur Arch totrhinolaryngol 250:351-357

[47] Plinkert PK (1995) Physiologie und pathophysiologie des Corti-Organs. Eur Arch of ORL Suppl I:54-102

[48] Puel JL (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. Prog Neurobiol 47:449-476

[49] Raphael RM, Popel AS, Brownell WE (2000) A membrane bending model of outer hair cell electromotility. Biophys J 78: 2844-2862

[50] Raphael Y and Altschuler AR (2003) Structure and innervation of the cochlea. Brain Res Bull 60:397-422

[51] Rothlin CV, Katz E, Verbitsky M, Elgoyhen AB (1999) The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine and type 3 serotonin receptors. Mol Pharmacol 55:248-254

[52] Takahashi S, Santos-Sacchi J (2001) Non-uniform mapping of stress-induced, motility-related charge movement in the outer hair cell plasma membrane. Eur J Physiol 441:506-513

[53] Santos-Sacchi J (1993) Harmonics of outer hair cell motility Biophys J 65:2217-2227

[54] Schacht J, Fessenden JD, Zajic G (1995) Slow motility of outer hair cells. In: Flock A, Ottoson D and Ulfendhal M, (ed) Active Hearing. Elsevier/USA, New York, pp 209-220

[55] Schumann S, Greger R, Leipziger J (1994) Flufenamate and Gd^{3+} inhibit stimulated Ca^{2+} influx in the epithelial cell line CFPAC-1 Pflüg Arch 428:583-589

[56] Shridrar TS, Brown MC, Sewel WF (1997) Unique postsynaptic signaling at the hair cell efferent synapse permits calcium to evoke changes on two time scales. J Neurosci 17:428-437

[57] Siegel JH and Kim DO (1982) Efferent neural control of cochlear mechanics. Olivo-cochlear bundle timulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. Hear Res 6:171-182

[58] Sit PS, Spector AA, Lue AJ, Popel AS, Brownel WE (1997) Micropipette aspiration on the outer hair cell lateral wall. Biophis J 72:2812-2819

[59] Spector AA, Brownell WE, Popel AS (1998) Analysis of the micropipette experiment with the anisotropic hair cell wall. J Acoust Soc Am 103:1001-1006

[60] Spector AA (2000) On the mechanoelectrical coupling in the cochlear outer hair cell. J Acoust Soc Am 107:1435-1441

[61] Spoendlin H (1967) The innervation ot the organ of Corti. J Laryngol Otol 81: 717-738

[62] Stopp PE and Comis SD (1978) Afferent and efferent innervation of the guinea-pig cochlea: a light microscopic and histochemical study. Neuroscience 3:1197-1206

[63] Sziklai I and Dallos P (1993) Acetylcholine controls the gain of the voltage-to-movement converter in isolated outer hair cells. Act Otolaryngol 113: 326-329.

[64] Sziklai I, He DZ, Dallos P (1996) Effect of acetylcholine and GABA on the transfer funtion of electromotlity in isolated outer hair cells. Hear Res 95:87-99

[65] Sziklai I, Dallos P (1997) Hyposmotic swelling induces magnitude and gain change in the electromotile performance of isolated outer hair cells. Acta Otolaryngol 117:222-225

[66] Sziklai I, Szőnyi M, Dallos P (2001) Phosphorylation mediates the influence of acetylcholine upon outer hair cell electromotility. Acta Otolaryngol 121:153-156

[67] Sziklai I (2004) The significance of the calcium signal in the outer hair cells and its possible role in tinnitus of cochlear origin. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol in press

[68] Szőnyi M, Csermely P, Sziklai I (1999) Acetylcholine-induced phosphorylation in isolated outer hair cells. Acta Otolaryngol 119:185-188

[69] Tolomeo JA, Steele CR, Holley MC (1996) Mechanical properties of the lateral cortex of mammalian auditory outer hair cells. Biophys J 71:421-429

[70] Ueda N, Ikeda K, Oshima T, Adachi M, Furukawa M, Takasaka T (1996) Subcellular distribution of protein kinase C in the living outer hair cell of the guinea pig cochlea. Hear Res 94:24-30

[71] Ulfendahl M., Chan E, McConnaughey WB, Prost-Domasky S, Elson EL (1998) Axial and transverse stiffness measures of cochlear outer hair cell suggest a common mechanical basis. Eur J Physiol 436:9-15

[72] Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barharin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of $\alpha 9$ nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. Neuron 23:93-103

[73] Wada H, Usukura H, Takeuchi S, Sugawara M, Kakehata S, Ikeda K (2001) Distribution of protein motors along the lateral wall of the outer hair cell. Hear Res 162:10-18

[74] Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. Nature 405:149-155

[75] Zheng J, Madison LD, Oliver D, Fakler B, Dallos P (2002) Prestin, the motor protein of outer hair cells. Audiol Neurootol 1:9-12

[76] Zhang M, Kalinec F (2002) Structural microdomains in the lateral plasma membrane of cochlear outer hair cells JARO 3:289-301

[77] Zenner HP, (1986) Motile responses on outer hair cells. Hear Reas 22:83-90

5 Összefoglalás

A külső szőrsejtek gyors és lassú sejthosszváltozása kulcsfontosságú a hangérzékelés folyamatában és mint a cochleáris erősítés alapját képező jelenség, intenzív kutatás alatt áll. A cochleáris erősítés szabályozásában a külső szőrsejtek oldalfalának merevsége feltehetően fontos szerepet játszik, ezért kidolgoztunk egy pszeudokolor elven alapuló eljárást a külső szőrsejtek mechanikai válaszának detektálására. A külső szőrsejtek oldalfalának mikropipetta aspirációs technikával való vizsgálata azt mutatja, hogy az oldalfalmerevség nem lineáris csökkenést mutat sejtek csúcsától az alapjuk felé. Ez a jelenség nem függ a sejtek cochleán belül elfoglalt helyzetétől. A sejtek szinaptikus régiójában a mikropipettába behúzott oldalfalszegmens hosszának időfüggése exponenciális függvénnyel írható le, míg a mag fölötti sejtrégióban ez a függvény tartalmaz egy szigmoid lefutást mutató aktív komponenst 30-60 másodperc között (feszesség beállító sejtválasz). Ca^{2+}megvonás mellett az oldalfal merevsége szignifikánsan növekszik miközben az aktív komponens nagysága a detektálhatóság határáig csökken. A jelenség matematikai modellezése rámutat, hogy az oldalfalmerevség szabályozásában a fő szerepet a citoszkeleton valamint a citoszkeletális és membránfehérjék calcium függő foszforilálása ill. defoszforilálása játssza. Az acetilkolin (ACh) és a γ-amino-vajsav (GABA), a külső szőrsejtek efferens idegvégződéseinek fő jelátvivői számos úton képesek szabályozni a cochleáris erősítő hatékonyságát. Az oldalfal merevségének már említett, fizikai feszülés indukált változása (feszesség beállító sejtválasz) és a fizikai feszülés indukálta lassú sejtrövidülés feltehetően fontos része ennek a szabályozó rendszernek. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az ACh a cochlea alapjáról izolált sejteken szignifikánsan csökkenti az oldalfal merevségét, miközben fokozza a feszesség beállító sejtválasz és fizikai feszülés indukálta sejtrövidülést. Hasonló sejtválaszt mutatnak a cochlea csúcsáról nyert külső szőrsejtek GABA jelenlétében. Az ACh hatás felfüggeszthető sztrichinnel a külső szőrsejteken expresszlódó ACh receptorok specifikus gátlószerével, míg a GABA hatása a specifikus $GABA_A$receptor blokkoló bikukulinnal függeszthető fel. A Ca^{2+}megvonás

hatására csökkenő ACh és GABA hatás a Ca^{2+}szerepét bizonyítja a folyamatban. Az eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az efferens beidegzés cochleára gyakorolt védő hatása és az adaptációs folyamat támogatása a külső szőrsejtek mikromechanikai sajátságainak megváltoztatása útján jön létre. Ezek a mikromechanikai változások nem a sejtmerevség direkt szabályozása útján alakulnak ki, hanem indirekt módon, a fizikai feszülés indukálta sejtrövidülés és a feszesség beállító sejtválasz felerősítése útján, melyben a Ca^{2+}fontos szerepet játszik.

Summary

Slow and fast shape changes of the outer hair cells are key variables in the processing of the auditory signal at the periphery. As these shape changes represent the effector arm of the cochlear amplifier these are intensively examined experimentally. The stiffness of the OHCs' lateral wall presumably has an important role in the regulation of the cochlear amplifier. Here we report a pseudocolor image analysis method, which increases the accuracy of the determination of slow mechanical responses of isolated OHCs. OHC lateral wall stiffness measured by micropipette aspiration technique shows a nonlinear gradient decreasing from the ciliary pole to the base irrespective of the cochleoapical or cohleobasal origin of the cells. In the synaptic region of the OHCs the length of the aspirated lateral wall segment has an exponential relation to time whereas it containes an active sigmoid component between 30-60 seconds in the supranuclear regions (regulatory stiffness response). A significant increase of lateral wall stiffness in calcium free medium is observed, however, the complex behaviour of the lateral wall is still probably be preserved altough the active component becomes negligible. The role of the cortical cytoskeleton in the regulation of stiffness seems reasonable by the model presented here. The mechanism may incende by a calcium dependent metabolic modification of cytoskeletal proteins or membrane proteins. Acetylcholine (ACh) and γ-amino-butyric acid (GABA), the main neurotransmitters of the efferent innervation of the outer hair cells, are assumed to regulate the efficacy of the cochlear amplifier through a variety of mechanisms. The described stretch-induced changes of the lateral wall stiffness (regulatory stiffness response) and the stretch-induced slow cell motility of OHCs may be important regulatory mechanisms in this process. We found that ACh in cochleobasal OHCs significantly reduces the stiffness of the lateral wall whereas increases the regulatory stiffness response and stretch-induced slow cell motility. Qualitatively similar cellular responses were evoked by GABA in cochleoapical OHCs. The effects of ACh could be inhibited by strychnine, the specific inhibitor of the ACh receptors expressed in

OHCs whereas the effects of GABA could be blocked by bicuculline, a specific $GABA_A$ receptor antagonist. In the absence of extracellular Ca^{2+} the effects of ACh and GABA on the regulatory stiffness response were reduced indicating the involvement Ca^{2+} in the control of this process. Based on our results we suggest that efferent innervation protects the organ of Corti against high sound intensities and support adaptation by modification of the micromechanical properties of OHCs. This could be regulated by ACh and GABA indirectly, via the potentiation of stretch induced cell shortening in a Ca^{2+}-dependent manner, rather than by a direct stiffness regulation-related mechanism.

6 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, prof. dr. Sziklai István egyetemi tanárnak, ezen dolgozat létrejöttéhez nyújtott segítségéért, iránymutatásaiért és emberi támogatásáért.

Külön köszönettel tartozok dr. Panyi Györgynek a munkám során adott önzetlen gyakorlati segítségéért és útmutatásaiért.

Köszönet illeti továbbá azokat az embereket, akik személyes segítségnyújtásukkal járultak hozzá ahhoz, hogy ezt a munkát elkészíthessem.

7 A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

Közlemények

1. Batta J.T., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Active and passive behaviour in the regulation of stiffness of the lateral wall in outer hair cells of the guinea pig. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. 447:328-336, 2003. [IF.:2]

2. Batta J.T., Panyi Gy., Szűcs A., Sziklai I. Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. Eur. J. Neurosci. in press 2004. [IF.:3,8]

3. Batta J.T., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Tengerimalac cochleaból izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségének aktív szabályozása, mint a cochlearis erősítő része. Fül-,Orr-,Gégegyógyászat 50:133-141, 2004.

Idézhető kivonatok

1. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Control of the lateral wall stiffness by efferent neurotransmitters in the OHCs. Acta Oto-Rhyno-Laryng. Belg. 56:287b, 2002.

2. Farkas Zs., Batta J.T., Sziklai I. Extracellular potassium concentration-related lateral wall stiffness in outer hair cells. Acta Oto-Rhyno-Laryng. Belg. 56:305a, 2002.

3. Batta J.T., Panyi Gy., Szűcs A., Sziklai I. Regulatory stiffness response of the OHC lateral wall is regulated by acetylcholine and GABA. Otorhinolaryngol. Hung. 50:195b, 2004.

4. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair celss of the guinea-pig. Otorhinolaryngol. Hung. 50:199a, 2004.

Előadások, poszterek

1. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Comparison of membrane stiffness in cochleoapical and cochleobasal outer hair cells of the guinea pig. Inner Ear Biology Workshop, Róma. 1-4 09. 2001.

2. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Control of the lateral wall stiffness by efferent neurotransmitters in the OHCs. Inner Ear Biology Workshop, Liege, 08-10 09.2002.

3. Farkas Zs., Batta J.T., Sziklai I. Extracellular potassium concentration-related lateral wall stiffness in outer hair cells. Inner Ear Biology Workshop, Liege, 08-10 09.2002.

4. Batta J.T., Panyi Gy., Sziklai I. Influence of efferent neurotransmitters upon slow and fast motility in isolated OHCs. Assotiation for Research in Otolaryngology, Florida, USA, 2004.

5. Batta J.T., Panyi Gy., Gáspár R., Sziklai I. Emlős cochleából izolált külső szőrsejtek oldalfal-merevségének szabályozása és ennek szerepe a cochleáris erősítő rendszerben. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesületének Kongresszusa, Sopron, 26-29 05.2004.

6. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Lassú sejthosszváltozás, oldalfalmerevség és elektromotilitás tengerimalac izolált külső szőrsejteken. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekció Vándorgyűlése, Debrecen, 1-3 09.2004.

7. Batta J.T., Panyi Gy., Szűcs A., Sziklai I. Regulatory stiffness response of the OHC lateral wall is regulated by acetylcholine and GABA. Inner Ear Biology Workshop, Debrecen, 5-7 09.2004.

8. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Correlation between slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair celss of the guinea-pig. Inner Ear Biology Workshop, Debrecen, 5-7 09.2004.

További közlemények, melyek összefüggenek a tézisekkel

1. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Electromotile performance of isolated outer hair cellss during slow motile shortening. Acta Otolaryng. in press 2005. [IF.: 0,8]

2. Borkó R., Batta J.T., Sziklai I. Slow motility, fast motility and lateral wall stiffness in the outer hair cells of the guinea pig. Hear. Res. under publication 2005. [IF.:1,5]