

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A purinerg jelátvitel és a Deiters sejtek szerepe a belső fülben

Dr. Szűcs Attila



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

A purinerg jelátvitel és a Deiters sejtek szerepe a belső fülben

Dr. Szűcs Attila

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

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

1. Bevezetés

1.1. Az emlősök hallásának élettani folyamatai

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

A gerincesekben, beleértve az embert is a hallásérzékelést jelentősen befolyásolják a belső fülben található mechanoreceptorokat tartalmazó külső szőrsejtek és a velük szoros kapcsolatban álló Deiters sejtek. A hanginger hatására a membrana basilaris és membrana tectoria egymáshoz viszonyított relatív elmozdulása a szőrsejt sztereocíliumának elhajlását indukálja, mely ioncsatornákat nyit meg, vagy ellenkező irányú elmozdulás esetén, ezeket a csatornákat bezárja. A mechanoszenzitív csatornák kinyílása esetén Ca^{2+} és K^{+} ionok áramlanak a sejtbe, ezzel a sejt depolarizációját hozzák létre. A csatornák zárása következtében hyperpolarizáció alakul ki. A sejtek depolarizációjának hatására feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} csatornák aktiválódnak, melyeken keresztül Ca^{2+} áramlik be a sejt további depolarizációját okozva. A külső szőrsejtek depolarizációja a hosszanti tengelyük mentén történő rövidülést, hiperpolarizációja elongációt okoz. Az intracellulárisan felhalmozott káliumionok feszültségfüggő K^{+} csatornákon és Ca^{2+} függő K^{+} csatornákon keresztül jutnak az extracelluláris térbe. Minden olyan esetben, amikor a külső zajok tartósan érik ezt a rendszert, a külső szőrsejtek ezen funkciója károsodik, később a sejt elpusztul, és ennek következtében idegi típusú halláskárosodás alakul ki.

1.2. A belső fül szerkezete és funkciója

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

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

A Corti szervén belül található az érzéksejtek. A Corti alagúttól befelé a belső, ettől laterálisan a külső szőrsejtek. A belső szőrsejtek egy sorban helyezkednek el a cochlea teljes hosszában, míg a külső szőrsejtek hármassorokba rendezettek. A külső szőrsejteket a Deiters-

féle támasztósejtek határolják, amelyeket kívülről magas hengerhám, ún. Hensen-féle hámsejtek, majd az alacsonyabb Claudius-féle köbhámsejtek határolnak.

1.2.1. A külső szőrsejtek

A szőrsejteknek funkciójuk alapján két típusukat különböztetjük meg. A belső szőrsejtek egy sort alkotnak a cochleában, számuk mintegy 3000. A belső szőrsejtek a hallás tulajdonképpeni receptor sejtjei, a sejtek receptor potenciálja az afferens neuronokban akciós potenciálokat generál. A külső szőrsejtek (KSZ) a hangrezgések erősítése révén kiemelkedő fontosságúak a hallás percepciójában, számuk mintegy 22000, a bazális csavarulatok területén négy, az apikális csavarulatokban 3 sorban helyezkednek el a cochleában. A külső szőrsejteket a Deiters támasztósejtek veszik körül. A külső szőrsejtek mérete mind apikobazálisan, mind a sejt sorok között különböző.

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

1.2.2. A Deiters sejtek

A támasztósejtek közül a Deiters sejtek szoros kapcsolatban állnak a külső szőrsejttel, ahhoz mind az apikális, mind a bazális pólusán csatlakoznak, úgynevezett „mikromechanikai egységet” alkotnak. Feltételezések szerint a külső szőrsejtek erősítő mechanizmusát segítik. A cochleában a külső szőrsejthez hasonlóan a bazális területtől az apikális területig három sorban helyezkednek el. Sejttestből és úgynevezett falangeális nyúlványból állnak. A sejttest „vállán” ül a külső szőrsejt a bazális pólusával. A sejttestből kiinduló falangeális nyúlvány ívben a külső szőrsejt apikális pólusához fut. A Deiters sejtek testének és falangeális nyúlványának mérete függ a sejtek cochleában elfoglalt helyétől. Kis méretű külső szőrsejthez nagy sejttestű és rövid nyúlványú, míg hosszú típusú külső szőrsejthez vékony sejttestű és hosszú nyúlványú Deiters sejt kapcsolódik. A falangeális nyúlvány a végén kiszélesedik,

úgynevezett falangeális fejecsből végződik. A Deiters sejtek mérete mind apiko-bazálisan, mind a sorok között belülről kifelé nő. Ezen különbségek kapcsolatban állhatnak a sejtek eltérő működésével a különböző frekvenciájú hangok percepciója során.

A Deiters sejtek szerepe a cochlearis aktív működésben még nem tisztázott. Egyes tanulmányok szerint ezen sejtek hozzájárulhatnak a cochlearis mikromechanikához. A falangeális nyúlvány merevségének a megváltozása befolyásolhatja a Corti szerv erősítő mechanizmusát. Korábbi kísérletek szerint 100 μM ATP, amely számos szervben neurotranszmitter szerepet tölt be, sejtekhez adásakor a falangeális nyúlvány merevségének megváltozását és a nyúlvány mozgását figyelték meg. Más kísérletekben Ca^{2+} sejtekhez adásakor figyeltek meg hasonló jelenséget. A Ca^{2+} és az ATP hatására kialakuló válasz hátterében hasonló mechanizmusok állhatnak.

1.3. Purinerg receptorok

A purin- és pirimidinvegyületek hatásaik egy részét sejt felszíni receptorokon keresztül fejtik ki. A purinerg receptorok két nagy csoportja a P_1 -purinerg receptorok vagy adenosin-receptorok (altípusok: A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$, A_3 , melyek adenosin-ciklázal kapcsolatosak, illetve a P_2 -purinerg receptorok, melyek különféle purin és pirimidin nukleotidokkal (ATP, ADP, UTP stb.) aktiválhatók. A P_2 receptoroknak két csoportját különböztetjük meg: az ionotrop $\text{P}_{2\text{X}}$ és a metabotrop $\text{P}_{2\text{Y}}$ receptorokat).

A $\text{P}_{2\text{X}}$ receptorok a $\text{P}_{2\text{X}1-7}$ alegységek homo- vagy heteromultimerizációjával jönnek létre, a homomer ionotrop $\text{P}_{2\text{X}}$ receptoroknak így tehát hét típusát ismerjük. Amikor az extracelluláris oldal megfelelő helyéhez ATP kötődik, kationcsatorna nyílik meg, mely a citoszolikus szabad Ca^{2+} koncentrációt ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -t) részben közvetlenül a külső térből növeli meg, részben a belépő Ca^{2+} ionok Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulást (CICR) indukálnak. Emellett a $\text{P}_{2\text{X}}$ receptorok nyitása depolarizálja a sejtet, ami, ha a sejt rendelkezik a megfelelő feszültségfüggő ioncsatornákkal, további Ca^{2+} -belépés és belső raktárból történő felszabadulás forrása. A $\text{P}_{2\text{Y}}$ receptorok 7 transzmembrán doménnel rendelkező, 308-377 aminosav hosszúságú, G-proteinhez kapcsolt metabotrop receptorok. Az emlősökben eddig nyolcféle $\text{P}_{2\text{Y}}$ receptort klónoztak ($\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}2}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$, $\text{P}_{2\text{Y}6}$, $\text{P}_{2\text{Y}11}$, $\text{P}_{2\text{Y}12}$, $\text{P}_{2\text{Y}13}$, $\text{P}_{2\text{Y}14}$). UTP-vel való aktiválhatóság miatt a $\text{P}_{2\text{Y}2}$ és $\text{P}_{2\text{Y}4}$ receptorokat együttesen $\text{P}_{2\text{U}}$ receptorként is szokták említeni.

Az ionotrop purinerg receptorok megnyílása egyrészt membránde polarizáció kiváltásával közvetve, másrészt Ca^{2+} -permeabilitása miatt közvetlenül is képes megemelni a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -t. A P_2 purinerg receptorok (a $\text{P}_{2\text{X}7}$ receptor kivételével) az agonista ismételt vagy

tartós adagolására egyre kisebb sejtbe befelé folyó áramot és/vagy $[Ca^{2+}]_i$ -növekedést hoznak létre, azaz deszenzitizálódnak. Ez egyrészt a receptor internalizációjával és degradációjával, másrészt foszforilációs állapotának megváltozásával és funkcionális inaktivációjával, harmadrészt pedig (a P_{2Y} receptorok esetében) a PIP_2 készletes kimerülésével és a belső Ca^{2+} -raktárak kiürülésével magyarázható.

1.3.1. A purinerg receptorok szerepe

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

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

1.4. A K^+ csatornák

1.4.1. A K^+ csatornák szerepe a hallás folyamatában

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

kutikuláris lemezéből kiemelkedő sztereocíliumok a magas K^+ tartalmú endolymphatérbe nyúlnak, míg sejttestük az alacsony K^+ koncentrációjú perilymphatérben (Na^+ 130-150 mM/l, K^+ 4-5mM/l) helyezkedik el. A hanginger hatására létrejövő m. basilaris és m. tectoria egymáshoz viszonyított relatív elmozdulása sztereocílium elhajlást indukál. A sztereocílium elmozdulása mechanoszenzitív csatornákat nyit meg. A mechanikai inger hatására az ionok mozgása az endolympha és a szőrsejtek között fennálló elektromos grádiens mentén történik. Ezt az elektromos grádiens a sejtek nyugalmi membránpotenciálja (-70mV), valamint a pozitív endocochleáris potenciál (80 mV) alakítja ki. A csatornák kinyílása esetén a beáramló K^+ és Ca^{2+} ionok depolarizálják a sejtet, csatorna záródás esetén pedig hyperpolarizáció jön létre. Tehát a m. basilaris kitérése felfelé a sejt depolarizációját, lefelé pedig hyperpolarizációját okozza. Depolarizáció hatására feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák aktiválódnak, amelyeken keresztül Ca^{2+} áramlik be további depolarizációt és intracelluláris Ca^{2+} növekedést okozva. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedés hatására a sejt bazolaterális membránján Ca^{2+} szenzitív K^+ csatornák nyílnak meg amelyeken K^+ kiáramlás indul meg. Emellett megnyílnak a membrán feszültségfüggő K^+ csatornái is, melyek a legújabb kutatások szerint KCNQ4 csatornák. A K^+ a korábban említett csatornákon történő kiáramlása helyreállítja a KSZ-ek nyugalmi membránpotenciálját. A sejtben felhalmozódott Ca^{2+} egyrészt intracelluláris raktárakba áramlik, másrészt Ca^{2+} pumpák segítségével eliminálódik a sejtől. A Deiters sejtek feltételezett szerepe a belső fülben a K^+ recirkuláció regulációjának biztosítása. A perilymphába jutott K^+ ion bejutását a Deiters sejtbe egy K^+-Cl^- ko-transzporter, a Kcc4 szabályozza. A Deiters sejtekbe jutott K^+ diffúzió útján jut a hozzá gap junction összeköttetéseken keresztül kapcsolódó epithelialis sejtekbe. Ezen sejtekből a stria vascularison keresztül jut ismételt a K^+ az endolymphába.

1.5. A zaj hatása

A környezeti ártalmak, mint például a zaj káros hatással van a belső fül sejtjeire. Tartós zajkezelés a receptorsejtek, és főként a külső szőrsejtek károsítása révén idegi típusú halláscsökkenést okoz, melyet audiológiai vizsgálatokkal (disztorziós kombinációs hangemisszió) lehet kimutatni. Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereocíliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumai, melyek végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk elvesztéséhez és a sejtek pusztulásához. Felvetették azt, hogy ezen károsító mechanizmusok hátterében a reaktív oxigén gyökök változása, a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen az intracelluláris Ca^{2+} szint változása áll. Az intracellularis Ca^{2+} szint emelkedés sejtfalmerevség változást hoz létre a külső szőrsejt oldalfalán.

2. Célok és a kitűzésüket indokló előzmények

1. *Az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek morfológiai, farmakológiai vizsgálata a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.* Az irodalomból ismert, hogy az ATP adagolása depolarizáló kationáramot idéz elő a tengeri malacok belső füléből izolált külső szőrsejteken. Azt is tudjuk, hogy ez az áram nagymértékben gátolható purinerg receptor antagonistákkal, suraminnal és cibacron-kékkel. ATP adagolás hatására a Ca^{2+} -áramok igen érdekesen változnak meg. Nagy koncentrációban (100 μ M) alkalmazott ATP csökkenti a Ca^{2+} -áramok amplitúdóját 0 mV-on, de fokozza +10 mV-on, mindemellett a sejtek kis hányadában teljesen hatástalan. Ez a heterogén kép utalhat funkcionális diverzitásra, ezáltal a purinerg receptor altípusok expressziójának sejt-sejt közötti különbségeire is. Mockett és mtsai 1995-ben farmakológiai úton kimutatták, hogy a Corti szervben, mind a P_{2X} , mind pedig a P_{2Y} receptorok kimutathatóak. A purinerg receptor ellenes antitestek széleskörű megjelenése lehetővé tette ezen receptorok immunfluoreszcens jelölését, ezáltal az altípusok expressziójának és a sejtfelszíni lokalizációjának a vizsgálatát. Ezáltal kimutathatóvá vált a különböző altípusok közötti különbség mind a membránon belüli elhelyezkedés, mind pedig az expresszió tekintetében. Azonban annak a megfigyelésnek a részletes vizsgálata, miszerint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek is jelentős különbségeket mutatnak az izolált külső szőrsejtokban, egyenlőre még várat magára. Éppen ezért elsődleges **célunk a Ca^{2+} -tranziensek inhomogenitásának hátterében lévő, valószínűleg különböző, P_2 receptormintázatok farmakológiai vizsgálata volt.**
2. *A zajterhelés hatása a purinerg receptorok expressziójára, valamint az ATP-által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek morfológiájára a tengerimalacok belső fülének külső szőrsejtjeiben.* Ismert, hogy a tartós zajterhelés megváltoztatja a belső fül receptorainak érzékenységét. A nagyfokú zajterhelés hallásvesztéshez vezet, aminek hátterében a belső fül sejtjeinek sérülése, illetve pusztulása áll. Ebben a folyamatban leginkább a külső szőrsejtek érintettek, amelyekben morfológiai elváltozások, úgymint a sztereocilumok sérülése, a mitokondriumok struktúrájának megváltozása, valamint a sejt volumen jelentős növekedése egyaránt kimutatható. Kimutatták, hogy a jelentős és tartós (250 Hz, 125 dB) zajnak kitett állatokban megváltozik a külső szőrsejtek életképessége és motilitása, aminek hátterében a sejtmembrán Ca^{2+} permeabilitásának növekedése és a következményes intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedés áll. Feltételezések szerint a megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint hatására a sejtmembrán purinerg receptorok expressziója

csökken, így csökken az ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés mértéke. Néhány év óta azt is tudjuk, hogy a megnövekedett Ca^{2+} szint a sejtfal rugalmasságának csökkenéséhez, ezáltal a Corti szerv adaptációjának megváltozásához vezet. Mindezen folyamatok kiegészülnek a zaj hatására kialakuló neurotranszmisszióban bekövetkező változásokkal is, ami az ATP-hez kötött jelátviteli útvonalakat is érinti. Munkánkban megvizsgáltuk **a tartósan zajterhelésnek kitett állatok külső szőrsejtjeinek Ca^{2+} homeosztázisában és a purinerg receptor mintázatában kialakuló elváltozásokat.**

3. *A K^+ áramok vizsgálata a tengerimalacok belső fülének Deiters sejtjeiben.* A külső szőrsejtek szerepe a cochleáris erősítő mechanizmusban részletesen tanulmányozott, ismert folyamat. Feltételezések szerint a külső szőrsejtekhez szorosan kapcsolódó Deiters sejtek is fontos szerepet játszhatnak ebben az erősítő folyamatban, bár a pontos feladatuk jelenleg ismeretlen. A Deiters sejtekben az ATP adagolás hatására kialakuló Ca^{2+} tranziensekből több purinerg receptor altípus jelenlétét valószínűsítették. Fontos az, hogy a P_{2X} receptorokon beáramló Ca^{2+} mennyiségét egyrészt az extracelluláris és intracelluláris tér Ca^{2+} koncentráció különbsége, valamint az aktuális membránpotenciál nagysága határozza meg. Ez utóbbi függ a sejtmembrán káliumcsatornáinak aktivitásától. Mindezek miatt **célunk a Deiters sejteken mérhető K^+ áram karakterizálása volt, valamint annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés a különböző cochleáris lokalizációjú Deiters sejtek morfológiája és K^+ áram összetétele között.**

3. Eszközök és módszerek

3.1. Külső szőrsejt és Deiters sejt izolálás

Kísérleteinket pigmentált tengerimalacokból (150-300 g) izolált sejteken végeztük. A sziklacsontból eltávolított cochleat Hank extracellularis oldatba helyeztük. A preparálás után a sejteket IV-es típusú collagenáz oldatban emésztettük (5 perc, 1 mg/ml; Sigma). Kísérleteinkhez két preparátumot készítettünk. Az első preparátumhoz a cochlea apikális két csavarulatán elhelyezkedő, míg a második preparátumhoz a bazális csavarulaton levő sejteket használtuk fel.

3.2. Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés

Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció méréshez Ca^{2+} szenzitív fluoreszcens festéket, a fura-2 acetoximetil észterét (Fura-2 AM, Molecular probes, Eugene, OR, USA) használtuk. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését DeltaScanTM kettős monochromátor berendezése (Photon Technology International, USA) biztosította, a Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en, interferenciaszűrő közbeiktatásával detektáltuk. Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásait a fluoreszcencia-hányadosból (R) számítottuk az alábbiak szerint: $[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$, ahol $[\text{Ca}^{2+}]_i$ az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, K_D a disszociációs állandó, $R = F_{340}/F_{380}$, $R_{\min}$ és $R_{\max}$ a minimális és maximális fluoreszcencia-hányados. A számításokhoz in vivo kalibrációs adatokat használtunk fel, ahol $K_D = 76$ nM, $R_{\min} = 0,42$, $R_{\max} = 8,6$, $\beta = 15,3$. A vizsgált anyagokat perfúziós rendszer segítségével juttattuk a sejtek közvetlen közelébe. A méréseket normál Hank oldatban végeztük.

3.3. A Ca^{2+} fluxus számítása

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

3.4. Immuncitokémia és immunhisztokémia

A kipreparált külső szőrsejtek kalcium- és magnéziummentes (CMF) PBS-sel (136,75 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 300 mosm, pH: 7,2) történő lemosása után ötperces acetonos fixálás következett, majd PBS-ben hígított 0,1%-os Triton-X-100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt 10 percen keresztül. Ezt követően 30 perces blokkolás történt 1%-os BSA-val, majd a megfelelő elsődleges és fluoreszcenciásan konjugált másodlagos antitesttel történő inkubáció következett. A magokat DAPI-val vagy propidium-jodiddal tettük láthatóvá. A megfestett sejtek vizsgálatát vagy a Zeiss LSM 510 META konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal, vagy a Nikon Eclipse E600 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. Az összehasonlításra szánt felvételek minden esetben azonos kamerabeállítások mellett és expozíciós idővel készültek.

3.4. Az oldalfal merevségének vizsgálata

Az oldalfal merevségét a korábban leírt, aspirációs mikrodeformációs technika adaptált változatával vizsgáltuk. Az ehhez szükséges mikropipettákat 2,8 µm-s belső átmérővel készítettük. A vizsgálatokhoz 4-10 H₂O cm (0,39 nN/µm² -0,98 nN/µm²) közötti negatív nyomástartományt a pipetta belsejében: 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 18 képpont/µm képfelbontással. A sejtfal merevségi mutatót (Sp-stiffness parameter) az alábbi összefüggést használva határoztuk meg: $S_p = -\Delta P \cdot r^2 \cdot \pi / \Delta L$ ahol ΔP (nN/µm²) a pipettán keresztül applikált negatív nyomás; r (µm) a mikropipetta belső átmérője; ΔL (µm) a pipettába behúzódó oldalfalrészlet hossza.

3.5. Ionáramok mérése

Méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük. A mérések a teljes-sejt konfiguráció elérése után 5-10 perc múlva kezdődtek. A kísérleteket minden esetben szobahőmérsékleten (22-24 °C) végeztük. A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark) üvegkapillárisokból készítettük, majd hő alkalmazásával políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 4-6 MΩ volt. Méréseinkhez Axopatch 200 és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültség-zár üzemmódban. Az ingerlő feszültségimpulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Labmaster TL-1 illetve Digidata 1200 illesztőegységen keresztül a pCLAMP programcsomag segítségével (6.0 és 8.0 verziók). Nagy áramamplitúdó

illetve soros ellenállás esetén soros ellenállás kompenzációt (40-50%) alkalmaztunk. Az áramgörbékét 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztük. A mintavételezés frekvenciája a szűrők sárvetési sávjának legalább kétszerese volt, a Nyquist téoria értelmében.

3.6. A patch-clamp vizsgálatok során alkalmazott oldatok

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

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

Az ATP-t közvetlenül a külső oldatban oldottuk fel. A peptid típusú K⁺ csatorna blokkoló szerekkel - Margatoxin, Charybdotoxin, Pandius Imperátor toxin, (MgTx, ChTx, PI1Tx) - történő mérések esetén az extracelluláris oldat tartalmazott még 0,1 mg/ml BSA-t is, hogy csökkentsük a toxin műanyag felületekhez történő adszorpcióját.

A külső oldat folyamatos perfúziójával cseréltük a sejtet érő oldat összetételét. A folyadéktöbbletet folyamatos szívással távolítottuk el.

3.7. Az adatok kiértékelése

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

4. Eredmények

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

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

A külső szőrsejtben mért nyugalmi citoszolikus Ca^{2+} koncentráció 120 ± 4 nM-nak adódott (átlag $\pm$ SE, $n=35$). Míg a nyugalmi Ca^{2+} koncentráció tekintetében a külső szőrsejt homogén csoportot alkottak, addig $180 \mu\text{M}$ ATP-vel (30s) létrehozott Ca^{2+} tranziensek alapján a külső szőrsejteket két csoportba sorolhattuk. A sejtek egyik csoportjában ($n=14$) az ATP adagolás hatására kialakult intracellularis Ca^{2+} szint emelkedés 186 ± 36 nM (átlag $\pm$ SE), a válasz kialakulásához szükséges idő pedig $5,9 \pm 1,0$ s volt. Ezekben a sejtekben miután az intracellularis Ca^{2+} szint visszatért a nyugalmi értékre, az ATP válasz ismételt volt. A sejtek másik csoportja esetén ($n=15$) a Ca^{2+} szint emelkedés 74 ± 10 nM, míg a válasz kialakulásához szükséges idő $12,3 \pm 1,9$ s-nak adódott. Ezen sejtekben a megemelkedett Ca^{2+} szint nem tért vissza a nyugalmi értékre és az ATP-re adott válasz sem volt megismételhető.

A kapott eredmények alapján több receptor altípus jelenléte volt feltételezhető a KSZ sejtmembránjában. Ennek igazolására $180 \mu\text{M}$ UTP-t (P_{2y} agonista; 30s) adtunk a sejtekhez, minek hatására az átlagos Ca^{2+} szint emelkedés 48 ± 11 nM volt ($n=5$). Az UTP-re kialakult válasz nagysága kisebb volt, mint ATP adásakor, és azon sejtek közül, melyek reagáltak ATP adására 58 %-uk nem reagált UTP alkalmazásakor. Suramin, mely P_{2x} receptor antagonist, nagymértékben blokkolta az ATP-vel létrehozott Ca^{2+} szint emelkedést (26 ± 10 nM, $n=9$).

4.1.2. A tengerimalacok külső szőrsejtjeinek purinerg receptor mintázata

A receptor altípusok közül intenzív festődést találtunk a P_{2x1} , P_{2x2} , P_{2x4} , P_{2y1} , P_{2y2} , P_{2y4} esetén. A P_{2x7} receptor altípus esetén a festődés gyenge volt. A sejtmembránban egyenletes receptor eloszlást találtunk a P_{2x1} , P_{2x4} , P_{2y1} esetén, míg P_{2x7} és a P_{2y4} főként a bazális póluson, a P_{2x2} és a P_{2y2} pedig főként az apikális harmadban, közel a kutikuláris lemezhez fordult leginkább elő.

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

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

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

Kísérleteink során 14 napig tartó, napi 24 órán keresztül adott 80 dB zaj expozíció hatását vizsgáltuk tengerimalac ($n=30$) izolált külső szőrsejtek nyugalmi Ca^{2+} szintjére, ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésre, illetve sejt membránjában elhelyezkedő purinerg receptorok expresziójára és eloszlására. Kezeletlen állatokban a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} koncentráció a külső szőrsejtben 133 ± 12 nM volt ($n=14$), 180 μM ATP alkalmazása után (30s) a sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 266 ± 65 nM-re emelkedett 5.9 $\pm$ 1.0 s latenciával. Zaj expozíció után a cochlea apikális csavarulatain elhelyezkedő sejtek nyugalmi Ca^{2+} koncentrációja 181 ± 24 nM ($n=11$), míg a bazális csavarulat sejtjeiben a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 219 ± 29 nM ($n=8$) volt. A 180 μM ATP (30 s) adása után kialakuló Ca^{2+} szint emelkedés az apikális sejtekben 60 ± 22 nM volt 8,4 $\pm$ 2,2 s latenciával ($n=11$), míg a bazális sejtekben 44 ± 10 nM volt 9,9 $\pm$ 2,2 s latenciával ($n=8$).

4.2.2. A zajkezelt tengerimalacok belső füléből izolált külső szőrsejtek purinerg receptor mintázata

Az ATP adagolásra adott kisebb Ca^{2+} válasz felvetette annak a lehetőségét, hogy a sejt membránjában elhelyezkedő purinerg receptorok kisebb mértékben expresszálódnak zajkezelés után. Ezen receptor altípusok közül a $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{X}7}$ and $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ receptorok intenzitása az immunfestés során csökkent, míg a $\text{P}_{2\text{Y}2}$ altípus intenzitása nem változott. A korábban megfigyelt egyenlőtlen sejtfelszíni purinerg receptor eloszlás a zajkezelés után eltűnt, a receptorok eloszlása homogén volt. Nem találtunk különbséget a receptorok mennyiségével arányos fluoreszcencia intenzitásban a sejt apikális és bazális területei között.

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

Korábbi tanulmányokban már elemezték a mechanikai hatás által kiváltott membránmerevség választ, mely a KSZ belső vékező rendszerének része. Ezen mechanizmus növeli a KSZ falmerevségét, mely védekező szerepet játszik tartós zajterhelés esetén.

Az 1. táblázatban összegeztük a membránfeszülési paramétereket (Sp) a zajjal kezelt és a kontroll állatok esetén. Külön csoportként vizsgáltuk a cochleoapikális és a cochleobazális sejteket. Kísérleteink során a KSZ-ek falfeszülése növekedett, de nem találtunk különbséget az Sp értékben a cochleoapikális és a cochleobazális sejtek között.

Kezelés	apikális KSZ	bazális KSZ
kontroll (n=10)	1.27±0.11	1.28±0.11
zaj expozíció (n=10)	1.49±0.14	1.51±0.24

1. táblázat: A zaj expozíció hatása a sejtfa merevség (Sp) paramétereinek változására

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

A patch clamp mérések teljes sejt konfigurációban történtek. A sejt membránpotenciálját -70 mV-os tartófeszültségről +70 mV-ig 10 mV-os lépésenként különböző tesztpotenciálokra módosítottuk. Az egyes depolarizáló impulzusok között 60 másodperc telt el. -30 mV-nál pozitívabb tesztfeszültségek esetén kifelé irányuló áram aktiválódott, melynek aktivációs kinetikája gyorsabbá vált, és az áram amplitúdója fokozatosan növekedett egyre pozitívabb depolarizáció esetén. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az áramok kialakulásáért feszültségfüggő ioncsatornák felelősek. Összesen 77 Deiters sejt kálium áramát vizsgáltuk meg, melyek +50 mV-os tesztimpulzusok során mért amplitúdói sejtről sejtre igen jelentős variabilitást mutattak. A csúcsáramok mediánja 3,66 nA volt, de megfigyeltünk 0,7 és 13,2 nA szélső értékeket is.

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

Hosszan tartó depolarizáció esetén az ionáram csökkenése figyelhető meg, ami a csatornák inaktivációjára utal. A mért ionáram csökkenése igen lassú, és 0 mV-nál pozitívabb tesztfeszültségek esetén kétfázisú; tartalmaz egy gyorsabb és egy lassabb komponenset. Az áramcsökkenés lassú és gyors komponensét rendre a τ_1 és τ_2 inaktivációs időállandókkal jellemeztük. Az inaktivációs időállandók meghatározásához az áramgörbék csökkenő tartományát egy, két exponenciális tag összegeként előállított függvénnyel illesztettük $I = A_1 \times (e^{-t/\tau_1}) + A_2 \times (e^{-t/\tau_2}) + C$, ahol A_1 és A_2 rendre a lassú és a gyors komponensek amplitúdói, C pedig a nem inaktiválódó áramkomponens.

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

meghatározott inaktivációs időállandó ($\tau=3008\pm188\text{ms}$) hasonló volt a kétfázisú inaktivációs kinetikát mutató sejtek lassú inaktivációs időállandójához.

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

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

ahol $V_{1/2,1}$ és k_1 a lassú komponens G-V függvényének középpontja és meredeksége, míg a kettes index ugyanezen paramétereket jelenti a gyors komponensre nézve. A kapott értékek $V_{1/2,1} = -1.42 \pm 2.68 \text{ mV}$, $k_1 = 11.93 \pm 1.15 \text{ mV}$, $V_{1/2,2} = 12.48 \pm 3.85 \text{ mV}$, $k_2 = 15.2 \pm 3.6$ ($n=12$) voltak, melyek a G-V függvények ~14 mV-os szétválását mutatták.

Szintén az áramgörbék inaktivációs kinetikájának illesztéséből meghatározott amplitúdókat (A_1 , A_2) használtuk fel a két áramkomponens steady-state inaktivációjának feszültségfüggését leíró függvények elkészítéséhez. A tartó feszültséget -70 mV-nak választottuk, és két +70 mV amplitúdójú 10 s hosszú depolarizáló impulzust alkalmaztunk, melyek között a tartó feszültséget 150 s időtartamra -65 mV és 0 mV közötti értékekre állítottuk be 5 mV-os lépésekben. Az áramgörbék inaktivációs kinetikáját két exponenciális tag összegét tartalmazó függvénnyel illesztettük, és a -70 mV-os tartófeszültség és a pozitívabb tartófeszültség (h) esetén meghatározott áramkomponensek arányát kiszámoltuk. Tehát az $A_{1,h}/A_{1,-70}$ és a $A_{2,h}/A_{2,-70}$ arányok a nem inaktiválódott csatornák arányát jelentik a lassú illetve a gyors áramkomponensre h tartó feszültség esetén. Mivel ez a feszültség protokoll nagyon hosszú időtartamú, átlagosan 3-4 adatpontot tudtunk meghatározni egy-egy sejten, ezért a különböző sejtekre kapott adatokat átlagoltuk az egyes tesztfeszültségekre. Így elkészíthettük a steady-state inaktiváció feszültségfüggését leíró függvényt. A görbéket Boltzmann függvénnyel illesztettük és az alábbi értékeket kaptuk: $V_{1/2,i,1} = -33.7 \text{ mV}$, $k_{i,1} = -5.7 \text{ mV}$, $V_{1/2,i,2} = -28.3 \text{ mV}$, $k_{i,2} = -4.2 \text{ mV}$, melyek a steady-state inaktiváció feszültség függésének kismértékű, kb. 5 mV-os különbségét mutatják. Ezek az eredmények a steady-state aktiváció feszültségfüggésére kapott eredményekkel együtt arra utalnak, hogy a két áramkomponens feszültségfüggő kapuzása nagyon hasonló.

4.3.2. Az áramkomponensek farmakológiai szeparálása

Megvizsgáltuk egy nem peptid gátlószer, a TEA és egy peptid gátlószer, a Charybdotoxin hatását a két áramkomponens amplitúdójára és az áram lecsengésének kinetikájára. Az áramgörbék lecsengő szakaszát két exponenciális tag összegét tartalmazó függvénnyel illesztettük és meghatároztuk a megmaradó áramhányadot a két komponensre a $M\acute{A}H(A_1)=A_1/A_{1,0}$ and $M\acute{A}H(A_2)=A_2/A_{2,0}$ képletek alapján, ahol A_x and $A_{x,0}$ a megfelelő komponensek áramamplitúdói a gátlószer jelenlétében illetve kontroll körülmények között. 1 mM TEA sejtekhez adásakor a gátolt áram főként a lassan inaktíváló komponensre tartalmazza ($\tau=2430$ ms), amit jól lehetett illeszteni egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel. A teljes áramra nézve a megmaradó áramhányad 1 mM TEA jelenlétében $0,81 \pm 0,03$ ($n=3$) –nak adódott. A megmaradó hányad a lassú komponensre $M\acute{A}H(A_1)=0,740 \pm 0,045$, ($n=3$), míg a gyors komponensre $M\acute{A}H(A_2)=0,95 \pm 0,03$ ($n=3$) volt. A lassú illetve gyors komponensre meghatározott disszociációs állandók rendre 2,63 mM és 6,70 mM-nak adódtak.

Charybdotoxin (ChTx) különböző hatékonysággal gátolta a két áramkomponens. 10 nM ChTx alkalmazása jelentős mértékben lecsökkentette az áram gyors komponensét. Az egyes áramkomponensek megmaradó hányada 10 nM ChTx jelenlétében a lassú komponens esetén $0,72 \pm 0,06$ míg a gyors komponens esetén $0,29 \pm 0,06$ volt ($n=5$).

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

Morfológiai különbségeket sikerült kimutatni a preparált Deiters sejtek között. Azon sejtek, amelyek rövidebb KSZ-hez kapcsolódtak nagyobb sejttesttel és rövidebb falangeális nyúlvánnyal rendelkeztek, míg azok, amelyek hosszabb KSZ-hez kapcsolódtak vékonyabb sejttestűk és hosszabb falangeális nyúlványuk volt. Az előzőket vastag, az utóbbiakat vékony típusú sejteknek neveztük el. Ezen morfológiai tulajdonságok alapján a sejteket két morfológiai típusba soroltuk. Tekintettel arra, hogy a KSZ-ek mérete apikobazálisan és a sorok között is eltérő, az ezekhez kapcsolódó különböző morfológiájú Deiters sejtek elhelyezkedése is eltérő a cochleában.

A vastag típusú sejtekre +70 mV-on meghatározott csúcsáramok $3,7 \pm 0,5$ nA ($n=29$), míg a vékony típusú sejtekre $5,2 \pm 0,6$ ($n=36$) nA –nak adódtak. Nem találtunk különbséget a két sejttípus membrán kapacitásában [vékony típusú sejtek: $37,36 \pm 2,64$ pF ($n=19$); vastag típusú sejtek: $33,13 \pm 2,11$ ($n=25$), $p=0,136$], de a sejtkapacitásra normált áramamplitúdók statisztikailag különböztek egymástól. Az áramsűrűség szignifikánsan magasabb volt a vékony sejttestű Deiters sejtekben [$188,11 \pm 23,14$ pA/pF ($n=19$)], mint a vastag típusú

sejtekben [$114,23 \pm 17.23$ pA/pF ($n=25$)] ($p=0.012$). A 10 s-ig tartó +50 mV-os depolarizáló impulzusok alatt mért áramgörbék alakja is eltérő volt a két morfológiai típus között. Az inaktiváció sebessége kisebb volt a vastag sejtek esetében, ami azonban nem tükröződött az inaktivációs időállandókban. Az inaktivációs időállandók a következők voltak: $\tau_1 = 2718 \pm 117$ ms ($n=27$), $\tau_2 = 190 \pm 28$ ms ($n=25$) a vastag típusú sejt esetén, és $\tau_1 = 2669 \pm 120$ ms ($n=36$), $\tau_2 = 136 \pm 17$ ms ($n=35$) a vékony típusú sejteknél. Nem találtuk szignifikánsnak a különbséget sem τ_1 értékek ($p=0,78$), sem a τ_2 értékek ($p=0,09$) esetén. A vastag sejttesttel rendelkező sejteknek a vékony sejtekénél lassabb inaktivációs kinetikája a lassú komponens nagyobb súlyarányának volt köszönhető. A lassú komponens súlyaránya [$A_1/(A_1 + A_2)$] $0,736 \pm 0,033$ volt a vastag sejteknél ($n=27$) és $0,522 \pm 0,023$ a vékony sejteknél ($n=36$). Ezzel megegyezően a két áramkomponens sejtkapacitásra normált áramamplitúdója azt mutatta, hogy a lassú komponens esetén ez megegyezett a két sejt típus esetén [vékony: $85,65 \pm 11,98$ pA/pF ($n=19$); vastag: $69,88 \pm 10,05$ pA/pF ($n=23$), $p=0,316$], míg a gyors komponens esetén szignifikáns különbséget találtunk a vastag és vékony sejtek esetén. [vékony: $74,61 \pm 10,07$ pA/pF ($n=19$); vastag: $25,83 \pm 6,20$ pA/pF ($n=23$) ($p=0,0002$)].

5. Megbeszélés

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

Az ATP, mely a purinerg receptorokon keresztül növeli az intracelluláris Ca^{2+} szintet, befolyásolhatja a külső szőrsejt elektromotilitását, és ezen keresztül a cochleáris erősítő mechanizmust. Az ATP 13.0 ± 2.4 nM koncentrációban található az endolymphában, valamint 10.5 ± 3.9 nM koncentrációban a perilymphában. A belső fülben ATP tartalmú vezikulákat találtak a stria vascularis marginális sejtjeiben és zajterhelésre az ATP endolymphába történő aktív szekrécióját figyelték meg. Mivel feltételezhető, hogy az ATP, mint neurotranszmitter, szerepet játszik a cochleáris erősítő mechanizmusban, ezért megvizsgáltuk a szer adagolásakor kialakuló intracelluláris Ca^{2+} választ, valamint a purinerg neurotranszmisszióban szerepet játszó sejt felszíni receptorok expresszióját.

Korábbi tanulmányok a belső fülben kimutatott több P_2 receptor közül csak a P_{2X2} , és P_{2X7} altípusokat detektálták a KSZ membránjában. Azonban a receptorok eloszlását a sejt felszíni membránban még nem vizsgálták meg. Kísérleteinkben a sejtek purinerg receptor expressziójának vizsgálata során intenzív jelölődést találtunk a P_{2X1} , P_{2X2} , P_{2X4} , P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} altípusok, míg kisfokú jelölődést a P_{2X7} altípus esetén. A sejt felszíni megoszlása a P_{2X1} ,

P_{2X4}, P_{2Y1}, altípusoknak homogén volt. A P_{2X2}, és a P_{2Y2} receptor altípusok főként a sejtek apikális területein, a P_{2X7}, és P_{2Y4} altípusok a sejtek bazális területein voltak kimutathatók.

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

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

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

Tartós zajkezelés a receptorsejtek károsítása révén idegi típusú halláscsökkenést okoz. Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereocíliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumai. Ezen folyamatok végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk elvesztéséhez és a sejtek pusztulásához vezetnek. Felvetették azt, hogy ezen károsító mechanizmusok hátterében a reaktív oxigén gyökök változása, a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen a Ca^{2+} szint változása áll.

Kísérleteink során tartós, közepes intenzitású zajkezelés hatását (80 dB SPL, 14 napig) vizsgáltuk a külső szőrsejt Ca^{2+} homeosztázisának változására. A zajterhelés hatására a külső szőrsejtek nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szintje megemelkedett.

A korábbi morfológiai és funkcionális megfigyelések arra utalnak, hogy a cochlea bazális kanyarulatán elhelyezkedő sejtek érzékenyebbek zajterhelésre, ezért két külön preparátumot készítettünk. A zajjal kezelt állatok külső szőrsejtjeinek nyugalmi Ca^{2+} szintje a cochleában elfoglalt helyüktől függően eltérő mértékben növekedett, a bazális csavarulaton elhelyezkedő sejtekben nagyobb (219 nM) volt a nyugalmi Ca^{2+} szint, mint az apikális csavarulat sejtjeiben (181 nM).

A zajterhelés képes megváltoztani a KSZ-ek különböző neurotranszmitterekre adott válaszát. Kísérleteinkben 180 μM ATP hatására (30s) a zajkezelt állatok Ca^{2+} tranziensei jelentősen megváltoztak a kontrollhoz képest. A zajkezelt állatokban kisebb és hosszabb latenciájú volt az ATP hatására kialakuló intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés. Ezen mérések

során szintén találtunk eltérést a cochlea bazális és apikális csavarulatáról származó sejtek között. Az apikális csavarulathoz tartozó sejtekben a Ca^{2+} szint 60 nM-al, míg a bazális sejtekben 44 nM-al emelkedett 180 μM ATP alkalmazását követően. A kontroll csoportban a válasz mértéke 266 nM volt, mely eltérés szignifikánsnak adódott.

A folyamatos KSZ stimuláció és az ennek következtében kialakuló magasabb nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint a sejtfelszíni purinerg receptorok expresszióját feltételezésünk szerint csökkenti, és ez állhat a kísérleteink során megfigyelt kisebb amplitúdójú és hosszabb latenciával kialakuló ATP-re adott Ca^{2+} válasz hátterében.

Purinerg receptor altípusok ellen termeltetett poliklonális antitesteket használva csökkent intenzitást találtunk $\text{P}_{2\text{X}1}$, $\text{P}_{2\text{X}2}$, $\text{P}_{2\text{X}4}$, $\text{P}_{2\text{X}7}$ és $\text{P}_{2\text{Y}1}$, $\text{P}_{2\text{Y}4}$ altípusok esetén. A $\text{P}_{2\text{Y}2}$ altípus intenzitása nem változott a kontroll csoporthoz képest. A technikai nehézségek miatt nem tudtunk kimutatni eltérést az apikális és a bazális sejtek között ebben a tekintetben.

A nemrégiben leírt regulációs falmerevségi válasz képes növelni a sejtfal merevséget. A folyamat lényege a KSZ sejtmembrán alatti citoskeletális hálózat Ca^{2+} -függő stretch indukálta szabályozása, mely a sejtfal merevséget növeli. A megnövekedett sejtfalmerevség másik lehetséges magyarázata a sejtmembrán és a szubkortikális citoskeletális hálózat metabolikus hatásokra kialakuló változása.

Összefoglalásképp a zajterhelés hatására kialakuló változás az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} homeosztázisban és az ennek következtében kialakuló Ca^{2+} függő regulációs mechanizmusban a sejtfal merevség megváltozásához vezet. A KSZ mikromechanikai tulajdonságainak megváltozása hatására csökken a cochlea erősítő mechanizmusának hatékonysága.

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

A Deiters sejtek szerepe a cochleáris mikromechanikában és a belső fül elektrolit homeosztázisában még nem tisztázott. Célunk a kifelé irányuló feszültségfüggő K^+ áram karakterizálása, valamint a sejtek morfológiája és áramkarakterisztikája közötti esetleges kapcsolat vizsgálata volt.

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

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

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

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

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

Az elektrofiziológiai és a farmakológiai eredmények nem tették lehetővé a sejten mért K^+ áramot létrehozó csatornák pontos molekuláris karakterizálását. A TEA és ChTx érzékenység alapján a korábban feltételezett Kv1.5 csatorna kizárható volt. A ChTx szenzitivitás, a TEA esetén számolt Kd érték (6.7 mM) valamint az inaktivációs kinetika alapján ($\tau \sim 160$ ms) a gyorsan inaktiválódó áramkomponenst létrehozó csatorna tartozhat a Kv1.3 típusba. Más ChTx szenzitív csatornát ki lehetett zárni a lehetőségek közül, mert vagy más a TEA érzékenysége (Kv1.2) és/vagy más kapuzási mechanizmusa van (BK csatorna). A lassan inaktiválódó áramkomponensért felelős csatorna molekuláris azonosítása még a további kísérletek feladata.

Korábbi tanulmányok szerint a Deiters sejtek morfológiája és a sejt alakja függ a sejtekhez kapcsolt KSZ méretétől és ezen keresztül a Corti szervben elfoglalt helyétől. A Deiters sejtek mérete apiko-bazálisan és a sorok között is eltér egymástól. A tanulmányunkban a sejteket két csoportra osztottuk: vastag sejttestű Deiters sejtek, melyek rövid KSZ-hez kapcsolódnak és vékony típusú sejtek, melyek hosszú KSZ-hez kapcsolódnak.

Az áram mérési adatok alapján a vékony és a vastag típusú sejtek felszínén ugyanazok a K^+ csatornák találhatók. A két csoport között nem volt különbség a mért két fázisú áramgörbe inaktivációs időállandói között. A vékony sejteken nagyobb áramamplitúdót mértünk, mely a gyorsan inaktiválódó áramkomponens nagyobb arányával magyarázható. Ezen különbség az áramkomponensek arányában eltérő volt a két morfológiai csoport között, de ennek functionális jelentőségét még nem ismerjük.

Korábban számos tanulmányban felvetették a Deiters sejtek szerepét a cochlearis mikromechanikában. A sejtek afferens innervációval rendelkeznek, feszültségfüggő K^+ áram mérhető a membránjukon, és aktív mozgás figyelhető meg a sejtek nyúlványán.

Az esetleges kapcsolat jellemzése a sejteken mért K^+ áram és a cochlearis mikromechanika között még további kísérleteket igényel. A tanulmányunkban vizsgált feszültség kapuzott K^+ csatornák szerepe főként a depolarizáló hatások, például P_{2X} csatorna aktivációja során kialakult membrán potenciál változás helyreállításában van. A támasztósejtek és ezek közül a Deiters sejtek egyik legfontosabb szerepe a belső fül K^+ recirkuláció szabályozásában van. Mechanikai stimuláció (hang) hatására a KSZ-ből K^+ áramlik ki, mely ion K^+-Cl^- kotranszporter KCC4 segítségével bekerül a Deiters sejtbe. A gap junction csatornák feszültség-függő kapuzása Deiters és más támasztó sejtekben asszimmetrikus K^+ fluxusokat hozhat létre. Ezen membránpotenciál függő mehanizmust a tanulmányunkban vizsgált különböző morfológiájú Deiters sejteken mért különböző K^+ konduktanciák eltérő mértékben befolyásolhatják.

6. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Szűcs A.**, Szappanos H., Tóth A., Farkas Zs., Panyi G., Csernoch L., Sziklai I. 2004. Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hear. Res.* 196, 2-7. (IF:1,578)
2. **Szűcs A.**, Somodi S., Batta T., Tóth A., Szigeti G., Csernoch L., Panyi G., Sziklai I. 2006. Differential expression of potassium currents in Deiters cells of the guinea pig cochlea. *Pflügers Arch.* 452(3):332-41. (IF:3,56)
3. **Szűcs A.**, Szappanos H., Batta T., Tóth A., Szigeti G., Panyi G., Csernoch L., Sziklai I. 2006. Changes in purinoceptor distribution and intracellular calcium levels following noise exposure in the outer hair cells of the guinea pig. *J Membr. Biol.* 213(3) 135-41. (IF:2,369)

Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek és előadások:

1. **Szűcs A.**, ZZ.He., Dallos P., Sziklai I. Measurement of caffeine induced potassium currents in guinea pig outer hair cell. Workshop on Inner Ear Biology, 1999, Uppsala, Svédország.
2. **Szűcs A.**, Z.Z. He, Dallos P., Sziklai I. A koffein indukálta ionáramok mérése tengerimalac izolált külső szőrsejteken. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 36. Nemzeti Kongresszusa 2000, Hévíz.
3. **Szűcs A.**, Farkas Zs., Csernoch L., Szappanos H., Tóth A., Sziklai I. A tengerimalac külső szőrsejt purinerg beidegzése. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 37. Nemzeti Kongresszusa, 2002, Siófok.
4. **Szűcs A.**, Szappanos H., Tóth A., Farkas Zs., Panyi Gy., Csernoch L., Sziklai I. Different expression of P2X receptor subtypes in the OHCs of the guinea pig. Workshop on Inner Ear Biology, 2003, Granada, Spanyolország.
5. **Szűcs A.**, Somodi S., Batta T., Tóth A., Csernoch L., Panyi Gy., Sziklai I. Characterization of potassium currents and morphology of guinea pig Deiters cells. Inner Ear Biology Workshop, 2004, Debrecen.

6. **Szűcs A.**, Somodi S, Batta T., Tóth A., Csernoch L., Panyi Gy., Sziklai I. Tengerimalac Deiters sejtek kálium áramainak karakterizálása. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 38. Nemzeti Kongresszusa, 2004, Sopron.
7. **Szűcs A.**, Szappanos H., Batta T., Tóth A., Csernoch L., Panyi Gy., Sziklai I. Changes in purinoceptor distribution and intracellular calcium levels following moderate noise exposure in the outer hair cells of the guinea pig. Workshop on Inner Ear Biology, 2005, Tuebingen, Németország.
8. **Szűcs A.**, Szappanos H., Batta T., Tóth A., Szigeti Gyula., Panyi Gy., Csernoch L., Sziklai I. ATP hatása a tengerimalac Deiters sejt intracellularis calcium szintjére. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 39. Nemzeti Kongresszusa, 2006, Debrecen.

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

1. Sziklai I., **Szűcs A.** 1998. A gége-, és garatrák epidemiológiája, korai felismerése és funkciómegtartó sebészi terápiája. Házi orvos Továbbképző Szemle 3, 210-211.
2. **Szűcs A.**, Tóth A., Kollár J., Szöllősi Z., Sziklai I. 2002. Izolált invertált papilloma a sinus sphenoidalisban. Fül-Orr-gégegyógyászat 1, 43-45.
3. Tóth A., Galuska L., Kovács J., **Szűcs A.**, Kollár J., Sziklai I. 2002. A különböző képalkotó eljárások szerepe a fej-nyak tájéki vascularis malformációk preoperatív diagnosztikájában. Fül-Orr-gégegyógyászat 2, 64-68.
4. Batta J.T., Panyi G., **Szűcs A.**, Sziklai I. 2004. Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. Eur. J. Neurosci 20, 3364-3370. (IF:3,82)
5. Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Pucsok K., Mikó I., Sziklai I. 2005. Intrinsic laryngeal muscle reinnervation with nerve-muscle pedicle. Otolaryngol. Head Neck Surg. 132(5):701-6. (IF:1,3)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó poszterek és előadások:

1. Jókay I., **Szűcs A.** Nyílt technikával végzett orrplasztika. Észak Kelet Magyarországi Regionális Szakcsoport Ülés, 2000, Debrecen.
2. Tóth L., **Szűcs A.**, Szanyi A., Galuska L., Sziklai I. Mesopharynx daganatok lymphoscintigraphias vizsgálata. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 36. Nemzeti Kongresszusa 2000, Hévíz.

3. Tóth L., **Szűcs A.**, Szanyi A., Galuska L., Sziklai I. A lymphoscintigraphia szerepe a mesopharynx tumorok regionalis nyirokcsomó metasztázisainak diagnosztikájában. Fiatal Onkológusok Fóruma, 2001, Pécs.
4. Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Furka I., Mikó I., Sziklai I. Gége reinnerváció ideg-izom lebennyel. Fül-, Orr-,Gége-Klinika Éves Ülés, 2001, Debrecen.
5. Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Furka I., Mikó I., Sziklai I. Gége reinnerváció állatkísérletes modellen. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 37. Nemzeti Kongresszusa, 2002, Siófok.
6. Tóth A., **Szűcs A.**, Harasztosi Cs., Matesz K., Pucsok K., Mikó I., Sziklai I. Laryngeal reinnervation in animal experiments. 37th Congress of the European Society for Surgical Research, 2002, Szeged.
7. Tóth L., **Szűcs A.**, Sziklai I., Galuska L. The role of lymphoscintigraphy in diagnosis of metastasis by head and neck tumors. 5th European Congress of Oto-Rhino Laryngology, Head and Neck Surgery, 2004, Rodos.
8. Batta T., Panyi Gy., **Szűcs A.**, Sziklai I. Regulatory stiffness response of the OHC laterall wall is regulated by Acetylcholine and GABA.Inner Ear Biology Workshop, 2004, Debrecen.
9. Batta T., Panyi Gy., **Szűcs A.**, Sziklai I. ATP a candidate co-regulator of cochlear micromechanical porperties. Workshop on Inner Ear Biology, 2005, Tuebingen, Németország.
10. Batta T., **Szűcs A.**, Osikóczy O., Sziklai I. TNF- α hatása tengerimalacból izolált külső szőrsejtek oldalfalmerevségére. Magyar Fül-, Orr-, Gégeorvosok Egyesületének 39. Nemzeti Kongresszusa, 2006, Debrecen.

Tudományos mutatók:

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impact faktora: 7,507

Kumulatív impact faktor: 12,627

Független citációk száma: 6