

Parakrin szabályozású védekező mechanizmusok vizsgálata a Corti szervben

Doktori értekezés

Dr. Horváth Tamás

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelles Tibor Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Zsembery Ákos Ph.D., egyetemi docens

Dr. Helfferich Frigyes Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Küstel Marianna, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Hirschberg Andor, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
2.1. A Corti szerv anatómiája és élettana	6
2.2. A szenzorineurális halláskárosodások	9
2.2.1 Presbyacusic	9
2.2.2 Zajártalom	10
2.2.3 Ototoxicitás	11
2.2.4 Genetikai halláscsökkenés	12
2.3. Protektív folyamatok a Corti szervben	13
2.3.1 Az ATP regulációs szerepe a cochlea védekező mechanizmusaiban	13
2.3.2 Az olivocochleáris rendszer és szerepe	16
2.3.2.1 A MOC efferensek protektív szerepe	17
2.3.2.2 A LOC efferensek protektív szerepe és DA felszabadításuk preszinaptikus regulációja	17
3. Célkitűzések	21
4. Módszerek	23
4.1. Felhasznált állatok	23
4.2. Egér hemicochlea Ca ²⁺ imaging	23
4.2.1. Egér hemicochlea preparátum	23
4.2.2. Ca ²⁺ imaging	24
4.2.3. Az alkalmazott vegyületek adásának módja	25
4.2.4. Ca ²⁺ válaszok értékelése, statisztikai analízis	25
4.3. RT-PCR kísérletek	26
4.4. [³ H]DA felszabadulás mérés egér cochleában	27
4.4.1. Izolált egér cochlea preparátum	27
4.4.2. In vitro mikroperfúzió	27
4.4.3. A cochlea preparátum elektromos téringlerése	29
4.4.4. Az alkalmazott vegyületek adásának módja	29
4.4.5. A [³ H]DA felszabadulás kiszámítása, statisztikai analízis	29
4.5. Alkalmazott vegyületek	30
5. Eredmények	31

5.1. Purinerg Ca ²⁺ szignalizáció a Corti szerv támasztósejtjeiben	31
5.1.1. Pillér, Deiters és Hensen sejtek Ca ²⁺ imaging vizsgálatának beállítása halló egerek hemicochlea preparátumában	31
5.1.2. Az ATP reverzibilis, ismételhető, dózisfüggő és deszenzitizációt mutató Ca ²⁺ válaszokat vált ki	31
5.1.3. A Ca ²⁺ tranziensek kiváltásában szerepet játszanak a P2X (extracelluláris Ca ²⁺ függő) és a P2Y (intracelluláris Ca ²⁺ raktár függő) receptorok is	34
5.1.4. P2X és P2Y receptor altípus mRNS-ek is jelen vannak a Corti szervben; a PPADS megmutatta a pillér- vs. Deiters és Hensen sejtek funkcionális purinerg receptor profiljának különbözőségét	35
5.2. Az NMDA receptorok és az NO cochleáris DA felszabadulást befolyásoló hatása	38
5.2.1. A NO fokozza a cochleáris DA felszabadulást, amely nem áll tónusos NO szabályozás alatt	38
5.2.2. Az NMDA fokozza a DA felszabadulást a LOC rostokból, részben NO közvetítésével	38
5.2.3. Az NMDA/NO hatásban a DA visszavétel nem játszik szerepet	42
6. Megbeszélés	44
6.1. Purinerg Ca ²⁺ szignalizáció halló egerek támasztósejtjeiben	44
6.1.1. ATP és Ca ²⁺ jelátvitel a cochleában – a hemicochlea preparátum jelentősége	44
6.1.2. Az ATP kiváltotta Ca ²⁺ válaszok karakterisztikája a támasztósejtjeiben	46
6.1.3. Purinerg Ca ²⁺ szignalizációs különbségek az egyes támasztósejt típusok között	48
6.3. Az NMDA receptorok és az NO szerepe a LOC efferensek DA felszabadulásában – az „ultra-short feedback loop”	51
7. Következtetések	56
8. Összefoglalás	57
9. Summary	58
10. Irodalomjegyzék	59
11. Saját publikációk jegyzéke	79
11.1. A disszertációhoz felhasznált publikációk	79
11.2. A témához kapcsolódó egyéb publikációk	79
11.3. A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk	79
12. Köszönetnyilvánítás	80

1. Rövidítések jegyzéke

AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav

AN – Afferens idegrostok

AP-5 - (2R)-amino-5-phosphonopentanoate

APDC - Aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylát

ATP – Adenozin-trifoszfát

Ca²⁺ - Kalcium

[Ca²⁺]_i – Intracelluláris kalcium koncentráció

cAMP – Cyclic adenosine monophosphate

CCD - Charge-coupled device

cGMP - Cyclic guanosine monophosphate

CICR - Ca²⁺ indukálta Ca²⁺ felszabadulás

CPA - Cyclopiazonic acid

DA – Dopamin

DC – Deiters sejt

DEA NONOate - Diethylamine NONOate

EGTA - Ethylene glycol tetraacetic acid

EN – Efferens idegrostok

Fura-2 AM - Acetoxy-methyl-ester Fura-2

FR - Fractional release (frakcionált felszabadulás)

GABA - Gamma-amino-vaajsav

GJB2 - Gap Junction Beta 2

HC – Hensen sejt

IHC – Belső szőrsejt

IP₃ - Inositol 1,4,5-trisphosphate

K⁺ - Kálium

L-DOPA – 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine

L-NAME - N-nitro-L-arginine methyl ester

LOC – Laterális olivocochleáris (efferens)

LSO - Lateralis oliva superior

MET – Mechano-elektronikus-transzdukció

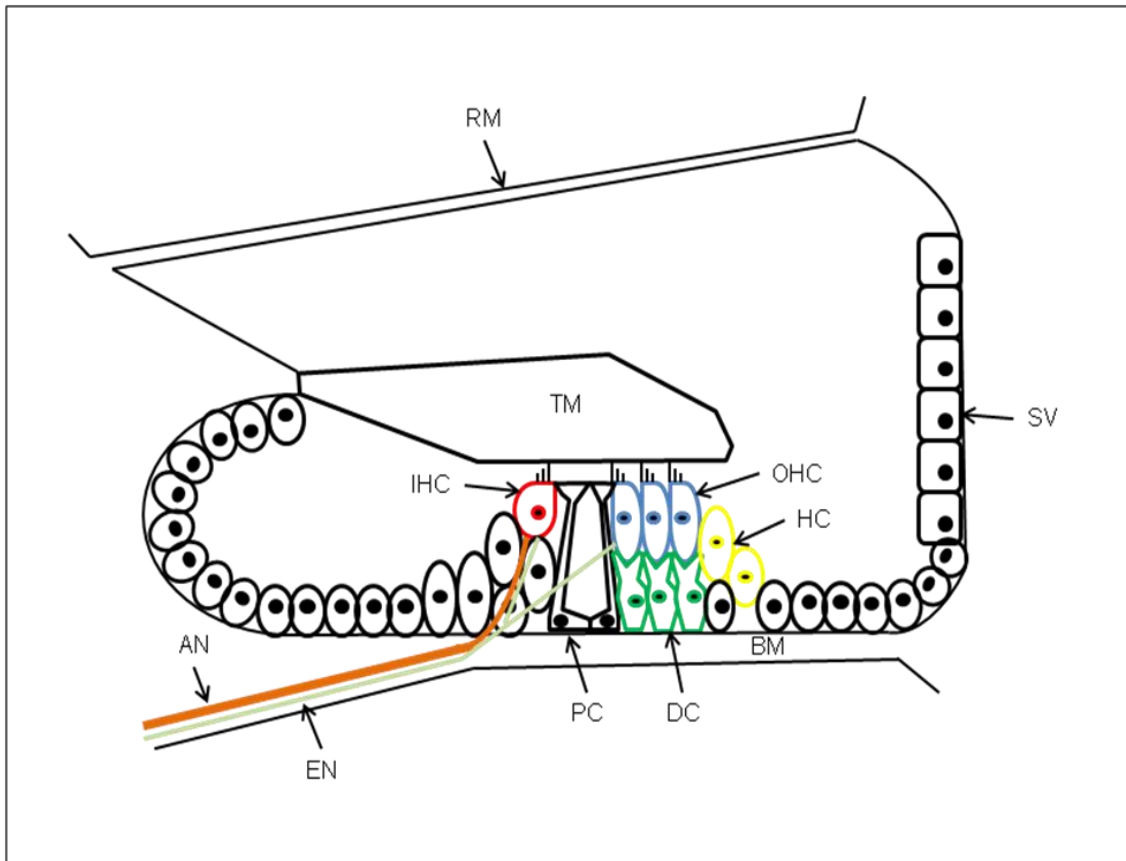
Mg²⁺ - Magnézium

MOC - Mediális olivocochleáris (efferens)
Na⁺ - Nátrium
NMDA – N-metil-D-aszpartát
NO - Nitric oxide
NOS - Nitric oxide synthase
OC - Olivocochleáris rendszer
OHC – Külső szőrsejt
PC – Pillérsejt
PCR - Polymerase chain reaction
PPADS - Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonsav
RM – Reissner membrán
ROS – Reaktív oxigén származékok
RyR – Ryanodin receptor
SERCA - Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
SV – Stria vascularis
TH - Tirozin-hidroxiláz
TM – Membrana tectoria

2. Bevezetés

2.1. A Corti szerv anatómiája és élettana

A Corti szerv a szőrsejtek és az őket körülvevő támasztósejtek által alkotott szenzoros epithelium, ami a csigában (cochlea) a mechanikai hanghullámok felerősítésért és elektromos jellé történő átalakításáért felelős. A szőrsejteket két csoportba lehet sorolni: az úgynevezett belső szőrsejtek (inner hair cell – IHC) a tényleges szenzoros sejtek, és a Corti szerv medialis részén található, míg a külső szőrsejtek (outer hair cell – OHC) a Corti szerv lateralis felén helyezkednek el, és egyfajta erősítő és frekvencia diszkriminátor szerepet töltenek be azzal, hogy a karakterisztikus frekvenciájuknak megfelelő hanghullámok amplitúdóját felerősítik (Dallos 1992). A szőrsejteket körülvevő, gap junction hálózattal összekötött támasztósejtek glia-szerű funkcióval bírnak, mind élettani, mind patológiás körülmények között elősegítik a szőrsejtek optimális működését (*1. ábra*). A csupor alakú belső szőrsejtek egy sorban helyezkednek el, belőlük mintegy 3500 található egy felnőtt ember fülében. A tetejükön lévő, aktintartalmú sztereociliumok a hanghullámok hatására meghajolnak, ami megnyitja a sztereociliumokban található, nem szelektív kationcsatornákat, a mechano-elektromos transzdukciós csatornákat (MET), melyeken keresztül K^+ és Ca^{2+} áramlik a sejtbe (Hudspeth 1982, Fettiplace and Hackney 2006). Ez receptor-potenciál kialakulásához vezet, mely a belső szőrsejt basalis, szinaptikus oldalán excitotikus transzmitter felszabadulást vált ki (Sewell 1996). A belső szőrsejtek működéséhez nélkülözhetetlen az endocochleáris potenciál, ami a belsőfül csigájának speciális összetételű folyadéktereiből adódó elektrokémiai grádiens. A belső szőrsejtek ugyanis két különböző folyadéktér határán helyezkednek el. A sztereociliumok és az apicalis felszínük az endolymphával érintkezik, mely 150 mM K^+ -ot, 2 mM Na^+ -ot, és 20 μM Ca^{2+} -ot tartalmaz (Bosher and Warren 1978), míg a sejttest nagy része az alatta található, a scala tympanit kitöltő perilymphával érintkezik, melynek ionösszetétele megegyezik a liquoréval. Az endolympha és a perilympha közötti +80 mV elektrokémiai potenciál (v. Békésy 1952, v. Békésy 1952) is elősegíti, hogy a szőrsejtek érzékenyek legyenek a legkisebb mechanikai hatásra, hanghullámra is.



1. ábra: A Corti szerv sematikus anatómiája:

Rövidítések: RM – Reissner membrán, TM – membrana tectoria, SV – stria vascularis, IHC – belső szőrsejt, OHC – külső szőrsejt, HC – Hensen sejt, DC – Deiters sejt, PC – pillérsejt, BM – membrana basilaris, AN – afferens ideg, EN – efferens ideg

A szőrsejtek speciális, úgynevezett ribbon-szinapszis révén kapcsolódnak az alsó pólusuknál az afferens hallóideggel. A ribbon-szinapszis a receptorsejtek jellemzője (Smith and Sjostrand 1961), ami lehetővé teszi, hogy a változó mértékű receptorpotenciálnak megfelelően, multivezikuláris exocytózis révén, rövid idő alatt nagy mennyiségű neurotranszmitter – glutamát – ürüljön a szinaptikus részbe. A glutamát az adott IHC-hez kapcsolódó, jellemzően 10-30 afferens hallóidegrost dendritjein található AMPA receptorokat aktiválja (Glowatzki and Fuchs 2002). Az AMPA szerepére bizonyítékként szolgált, hogy míg az intracochleárisan adott AMPA (Puel, Ladrech et al. 1991), és kainát is (Bledsoe, Bobbin et al. 1981) fokozták, addig az AMPA receptor antagonisták (Littman, Bobbin et al. 1989) csökkentették a szummációs akciós potenciált, miközben a szőrsejtek potenciáljai érdemben nem változtak.

A tömzsi belső szőrsejtekkel szemben inkább nyújtott henger alakú külső szőrsejtek 3-4 sorban helyezkednek el a Corti szerv lateralis részén. A külső szőrsejtek nem passzív szenzorok, hanem aktív mozgásukkal frekvenciaspecifikusan felerősítik a hanghullámokat (Brownell, Bader et al. 1985). Ezt az erősítő hatást a külső szőrsejtek elsősorban szomatikus mozgással érik el (Dallos, Zheng et al. 2006), azonban ehhez hozzáadódik a sztereocíliumaik aktív mozgása is (Martin and Hudspeth 1999), bár a két mechanizmus pontos aránya nem tisztázott. A külső szőrsejtek motorja a baktériumok flagellumával szerkezeti rokonságot mutató prestin (Zheng, Shen et al. 2000), melyet a membránpotenciál változása aktivál, és a konformációváltozásához nem igényel ATP-t, ezért képes rendkívül gyors összehúzódásra és elernyedésre. Az erősítő hatás aktivációja – ezzel a frekvencia-szelektív amplifikáció - még nem teljesen tisztázott, de vélhetően a receptorpotenciál megváltozása indítja a folyamatot, ami a külső szőrsejtek MET csatornáinak kinyílása vált ki (Fettiplace and Hackney 2006).

A két, különböző funkciójú és elhelyezkedésű szőrsejteket körülveszik az úgynevezett támasztósejtek. A támasztósejtek egymással gap junction-ok segítségével szoros összeköttetésben álló, glia-jellegű szövetet alkotnak, melyek a szőrsejtek működését segítik nutritív, szabályozási, és protektív szempontból is. Habár általánosságban szokás támasztósejtekről beszélni, az elhelyezkedésüktől és az alakjuktól függően különbség mutatkozik az egyes támasztósejtek működésében (Raphael and Altschuler 2003). A támasztósejtek közül a külső szőrsejtek környékét alkotó sejtek morfológiailag jelentősen különböznek egymástól, ezek a Corti alagúttól lateralisán, sorrendben a pillér, a Deiters, és a Hensen sejtek. A fenti sejtekből felépülő, bonyolult működésű Corti szerv, valamint beidegzésének megfelelő funkciója feltétele a jó hallásnak.

A felső pólusuknál fogva összeboruló pillérsejtek határolják a Corti alagutat, bennük mikrotubulusok és aktin mikrofilamentumok találhatóak. A pillérsejtek ultrastruktúrája és a mikrotubulusok izoformái alapján vélhetően alapvetően csak statikus szerepük van (Raphael and Altschuler 2003). A pillérsejtek szomszédai a Deiters sejtek, melyek a processus phalangealisokkal és a sejttestük felső részével egyfajta fészket alkotnak a külső szőrsejteknek. Az ultrastruktúrájuk hasonló a pillérsejtekhez, viszont velük szemben úgy tűnik, hogy a Deiters sejteknek aktív funkciói is vannak. Például modulálják a cochlea mikromechanikáját (Dulon, Blanchet et al. 1994, Bobbin 2001), illetve szerepet játszanak a káros zajterhelés okozta halláskárosodás elleni védekezésben

(Flock, Flock et al. 1999). Sőt, a Deiters sejtek képesek fagocitálni az elhalt külső szőrsejteket (Bird, Daudet et al. 2010), valamint madarakban belőlük új szőrsejtek is kialakulhatnak (Cotanche and Kaiser 2010). A Deiters sejtektől lateralisán elhelyezkedő Hensen sejtekben nem találni mikrofilamentumokat, viszont lipidcseppeket tartalmaz a cytoplazmájuk, amelyek vélhetően a gap junction-ök működésének szabályozásában játszanak szerepet (Bruzzone, White et al. 1996, Lagostena, Ashmore et al. 2001). Külön érdekesség, hogy a Deiters és a Hensen sejteknek efferens beidegzésük van, míg a pillérsejteknek nincs (Burgess, Adams et al. 1997).

2.2. A szenzorieurális halláskárosodások

A szenzorieurális (percepciós) halláskárosodások (SNHL) a belsőfület és a hallópályát érintő károsodások. Leggyakoribb formái a presbyacsis, a zaj- vagy toxikus anyag okozta ill. a genetikai alapú hallásvesztések.

2.2.1 Presbyacsis

A presbyacsis, vagy időskori halláscsökkenés életkorral járó degeneratív folyamat, mely során a hallás percepciós komponense fokozatosan romlik. Ahogy az emberi átlagéletkor fokozatosan nő, úgy a presbyacsis is egyre nagyobb egészségügyi problémát jelent. Például szűk harminc év alatt, 1965 és 1994 között 150%-kal nőtt az időskori halláscsökkenés incidenciája (Adams and Marano 1999), napjainkban pedig a 65 évesnél idősebbek körében 40%-ban fordul elő (Gates and Mills 2005). A presbyacsis alapvetően genetikailag determinált, de környezeti faktorok is szerepet játszanak a kialakulásában (Fetoni, Picciotti et al. 2011), a fiatalabb életkorban elszenvedett zaj-expozíció, illetve szisztémás betegségek, kóros állapotok – például cukorbetegség, arteriosclerosis, veseelégtelenség – felgyorsíthatják az időskori halláscsökkenés megjelenésének idejét (Gates, Schmid et al. 2000).

A presbyacsis degeneratív folyamatai kialakulhatnak a periférián a hallószervben és a központi idegrendszerben is (Howarth and Shone 2006), de úgy tűnik, hogy elsősorban perifériás folyamatok dominálnak a centrális változásokkal szemben (Jennings and Jones 2001). A periférián alapvetően négy különböző manifesztációja ismert az életkorral járó degeneratív folyamatoknak: szőrsejt-elhalás, az afferens ideg pusztulása,

a stria vascularis működési zavara, és a membrana basilaris megvastagodása (Gacek and Schuknecht 1969), bár jellemzően a különböző mechanizmusok egyszerre, legfeljebb nem azonos mértékben jelentkeznek. Korábban úgy tűnt, hogy az afferens neuronok kizárólag szőrsejt károsodás esetén degenerálódnak (Takeno, Wake et al. 1998), azonban az utóbbi időben ez a teória megdőlni látszik, mivel kimutatták, hogy a két folyamat egymástól függetlenül is bekövetkezhet (Linthicum and Fayad 2009). A központi idegrendszerben az életkorral csökken a halláshoz kapcsolódó neuronok száma (Arnesen 1982), és a maradék sejtek alakja és neurokémiai profilja is megváltozik (Chisolm, Willott et al. 2003).

A presbyacusicus molekuláris patomechanizmusa is multifaktoriális. Felmerült, hogy a reaktív oxigén származékokat (ROS) elimináló intracelluláris rendszerek időskori kapacitáscsökkenése is elindíthatja a degenerációt (Cui, Kong et al. 2012), amit alátámaszt az a megfigyelés is, hogy a ROS eliminációjához szükséges egyes fehérjék genetikailag determinált expressziója befolyásolja az időskori halláscsökkenés megjelenésének idejét (Ates, Unal et al. 2005). Presbyacusicus során a szabadgyökök fő támadáspontja a cochleában a mitokondriumok, melyek a hallószervben a többi szervekhez képest még érzékenyebbek az oxidatív stresszre (Someya and Prolla 2010). A ROS mellett apoptózis, programozott sejthalál is közrejátszik az időskori halláscsökkenésben, melynek lehetősége többek között az apoptózisért felelős gének cochleáris expressziójának megváltozása miatt merült fel (Tadros, D'Souza et al. 2008). Az apoptosist szabályozó fehérjék genetikai variációit a halláscsökkenéssel korreláltató vizsgálatok is erre mutatnak (Wang, Menchenton et al. 2010), valamint a belsőfül sejtjeinek korral járó DNS fragmentálódásának megfigyelése is ezt erősíti (Jokay, Soos et al. 1998).

2.2.2 Zajártalom

A zajártalom a presbyacusicushoz hasonlóan, a modern kor egyre jobban előtérbe kerülő problémája. Manapság a világon körülbelül 500 millió ember van kitéve ennek a környezeti ártalomnak (Alberti 1998). Korábbi kutatási eredmények alapján hosszú ideig azt feltételezték, hogy a zajártalom hátterében elsősorban a szőrsejtek és a környező struktúrák mechanikai károsodása áll (Spoendlin 1971, Hunter-Duvar and Elliott 1972), melyen tovább ront a belsőfül romló vérkeringése (Perlman and Kimura

1962, Miller, Brown et al. 2003). Ugyanakkor Lim és Melnick már 1971-ben felvetette annak a lehetőségét, hogy – hasonlóan az időskori halláscsökkenéshez – a szabad gyököknek is fontos szerepe lehet a zaj okozta halláskárosodás létrejöttében (Lim and Melnick 1971), melyet később még számos kutatás is alátámasztott (Yamane, Nakai et al. 1995, Ohlemiller, Wright et al. 1999). Emellett a zajterhelés a szőrsejtekben tartósan emeli a Ca^{2+} szintet, ami károsítja a sejteket (Fridberger, Flock et al. 1998), amit kísérletes környezetben, Ca^{2+} csatorna blokkolókkal ki lehet védeni (Heinrich, Maurer et al. 1999). Fontos szerepe van a zajkárosodásban az IHC-k által túlzott mértékben kibocsátott glutamát okozta afferens ideg excitotoxicitásnak. A nagy mennyiségű glutamát az extraszinaptikus NMDA receptorokat aktiválja, amelyeken keresztül Na^+ és Ca^{2+} áramlik a neuronokba, így azok megduzzadnak (Gil-Loyzaga and Pujol 1990, Pujol, Puel et al. 1993, Pujol and Puel 1999, Jager, Goiny et al. 2000), illetve a Ca^{2+} a sejtet irreverzibilisen károsító proteáz és lipáz enzimeket is aktivál (Choi, Tanneti et al. 2000). Zajártalom során az afferens neuronok degenerációja a szőrsejtek károsodása nélkül is bekövetkezhet (Kujawa and Liberman 2009).

2.2.3 Ototoxicitás

Számos gyógyszer mellékhatása lehet az ototoxicitás, mely a Corti szerv szintjén is jelentkezhet, szerencsére ezeket a gyógyszereket pont a mellékhatások miatt a fejlett világban egyre kevesebbet használják. Ugyanakkor például az aminoglikozidok manapság is a legtöbbször felírt antibiotikumok a fejlődő világban, mivel a többi antibiotikumhoz képest jóval olcsóbbak, és a mai napig meglehetősen effektív antimikrobás szerek (Price 1986). Az aminoglikozid antibiotikumok voltak az első gyógyszerek, melyekről korán, már az 1940-es évek végén kiderült, hogy elsődleges célpontjuk a szőrsejtek, így okoznak halláscsökkenést (Caussé, Gondet et al. 1949). További kutatások kimutatták, hogy a szőrsejtek közül is először a külső szőrsejteket károsítják, a belső szőrsejtek csak tartós expozíció során sérülnek. Ehhez később nagyon hasonlóan találták a platinaszármazékok ototoxicitásának patogenezisét is (Hawkins 1973). Az aminoglikozid okozta ototoxicitásra predisponáló tényező a genetikailag fokozott érzékenység erre a mellékhatásra, ami a mitokondriumok szintjén manifesztálódik (Hu, Qui et al. 1991), melyet a halláskárosodást elszenvedett betegek 17-33%-ában kimutattak (Fischel-Ghodsian 2005), és akár egyetlen adag, terápiás dózisu antibiotikumtól kialakulhat (Pandya 2004). Ezt a jelenséget az endoszimbiózis

teóriával magyarázzák, feltételezve, hogy az antibiotikumok a prokariótákéra jobban emlékeztető mitokondrium DNS-t könnyen károsíthatják (Ruiz-Pesini and Wallace 2006).

Az aminoglikozidok nagy valószínűséggel a sztereociliumokon található MET csatornákon keresztül jutnak be a szőrsejtekbe (Marcotti, van Netten et al. 2005), bár az endocytózist sem zárható kitéljesen (Hashino and Shero 1995). A sejtbe jutott aminoglikozid molekulák a ROS szint emelkedését okozzák (Priuska and Schacht 1995), amely először a sztereocíliumokat károsítja, majd később apoptotikus folyamatokat indít el a sejtben, megölve ezzel (Lenoir and Puel 1987). A Corti szervben az aminoglikozidok a szőrsejtek mellett a támasztósejteket is károsítják, elsősorban a sejtek közötti gap junction kapcsolatot blokkolják (Todt, Ngezahayo et al. 1999), amit a platinaszármazékok esetében is sikerült kimutatni (Zhao, Lin et al. 2004).

2.2.4 Genetikai halláscsökkenés

Percepció halláscsökkenés vagy sükettség kizárólag genetikai okok miatt is kialakulhat. Ezeknek 70-80%-a úgynevezett nem szindrómás halláscsökkenés, azaz a hallásproblémához nem társul más megbetegedés (Angeli, Lin et al. 2012), míg szindrómás halláscsökkenésről a genetikai halláskárosodások 20-30%-ában beszélhetünk, mely esetekben a halláscsökkenés mellett más szervi betegségek is manifesztálódnak. A leggyakoribb szindrómás halláscsökkenés az Usher, a Pendred, a Jervell, és a Lange-Nielson szindróma. A nem szindrómás halláscsökkenés 60-75%-ban autoszomális recesszív, 20-30%-ban domináns öröklődést mutat, és nagyságrendileg 2% körül mozog az X kromoszómához vagy a mitokondriumokhoz kötött forma (Morton 1991). Genetikai halláscsökkenés esetén a halláskárosodás mértéke nagyon változó lehet, enyhétől a teljes sükettségig széles skálán mozog, azonban a recesszív és az X kromoszómához kötött forma jellemzően súlyosabb problémát okoz (Liu and Xu 1994). Genetikai halláscsökkenés nem okvetlen jelent veleszületett halláskárosodást, hanem progresszív hallásromlásként is megmutatkozhat, ami meglepően gyakran fordul elő (Davis, Efenbein et al. 1986). Jellemzően az autoszomális recesszív forma prelingualisan, míg a domináns forma postlingualisan jelentkezik. A nem szindrómás halláscsökkenés szinte kizárólag cochleáris problémát jelent (Smith, Bale et al. 2005), leggyakrabban a Gap Junction Beta 2 (GJB2) gén mutációja áll a háttérben, ami a

connexin 26 kódolásáért felelős (Estivill, Fortina et al. 1998, Kelley, Harris et al. 1998). Ezzel a GJB2 mutáció az autoszomális recesszív halláscsökkenések közel 50, míg az összes genetikai halláscsökkenés körülbelül 20%-áért felelős.

2.3. Protektív folyamatok a Corti szervben

A belsőfülben eddig több hallásvédő mechanizmust azonosítottak. Ilyen endogén védekező mechanizmus a cochleáris erősítés mérséklése vagy a belső szőrsejt (IHC)-hallóneuron ingerületátvitel hatékonyságának laterális olivocochleáris (LOC) efferensek általi csökkentése. Ezeknek a mechanizmusoknak hallásélettani szerepe van, de ezen felül fontosak a halláskárosodás megelőzésében, illetve a károsodás mértékének csökkentésében.

2.3.1 Az ATP regulációs szerepe a cochlea védekező mechanizmusaiban

A belsőfül egyik endogén protektív mechanizmusa a külső szőrsejtek és az őket gliaszerűen körülvevő támasztósejtek működésének szabályozása révén az aktív halláserősítést befolyásolja, és a fő regulátora az ATP (adenozin-trifoszfát). 1954-ben Holton és Holton kutatási eredményei vetették fel először annak a lehetőségét, hogy az ATP a sejtek energiaforrásán túl, ingerületátvivő szerepet is játszhat az élőlényekben (Holton and Holton 1954). Ezt később számos megfigyelés támasztotta alá, melyek során minden olyan tulajdonságot bizonyítottak, ami az ATP neurotransmitter szerepét igazolja, például ATP termelést és vezikuláris tárolást idegterminálisokban, mely ingerlésre az extracelluláris térbe ürül, idegsejtek ingerelhetőségét ATP-vel, ectoenzimekkel történő ATP bontást, illetve különböző kémiai anyagok ATP-kiváltotta idegsejtaktiváció potenciózó és gátló hatását (Burnstock 2006). Az elmúlt évtizedekben kiderült, hogy szinte minden szervrendszerben jelen van az ATP, mint ingerületátvivő anyag (Burnstock 1999), kotranszmitterként is, de neuromodulátor szerepet is betölt.

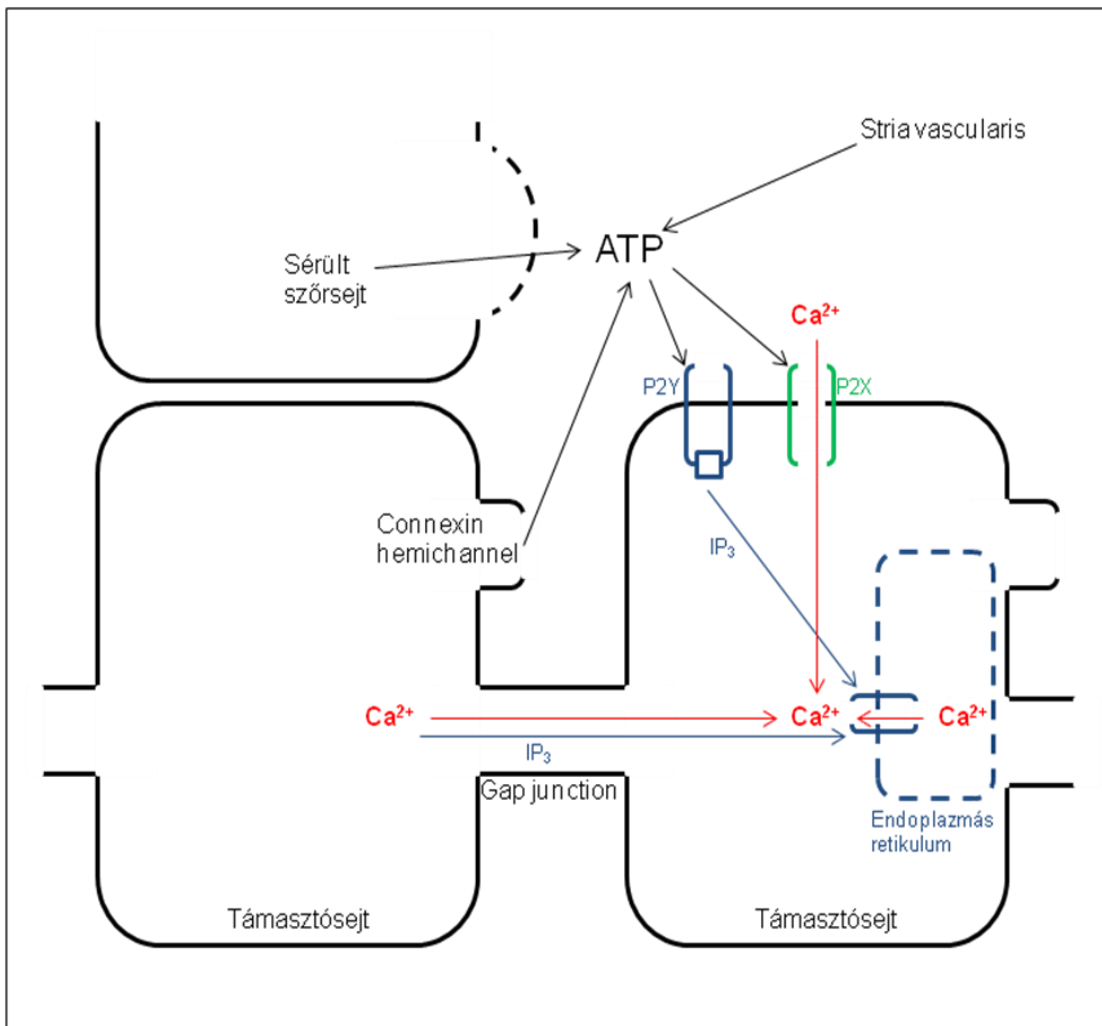
Az ATP a purinerg receptorcsaládon belül az úgynevezett P2 receptorokon hat. A P2 receptorok alapvetően két nagy alcsoportba, a ligand vezérelt ioncsatorna P2X és a metabotrop, G-fehérjéhez kötött P2Y receptorok közé sorolhatók (Burnstock 2007). Mind az ionotrop P2X, mind a metabotrop P2Y receptorcsaládból számos altípus vesz részt különböző fiziológiás és patológiai audiológiai folyamatokban (Abbraccio,

Burnstock et al. 2009, Housley, Bringmann et al. 2009), számos lokalizációban azonosítva a belsőfülben (Housley, Bringmann et al. 2009). ATP tónusosan szabadul fel a stria vascularisból az endolymphába, mely zajterhelés esetén fokozódik (White, Thorne et al. 1995, Munoz, Kendrick et al. 2001). A zajhatásra megemelkedő endolymphaticus ATP lecsökkenti a stria vascularis marginalis sejteinek endolymphába történő K^+ szekrécióját, így redukálja az endocochleáris potenciált, ezáltal gátolja az eleve kóros intenzitású hangok további erősítését (Lee and Marcus 2008). Ezt a hatást az ATP a P2Y4 receptorok segítségével, $[Ca^{2+}]_i$ szignálok révén fejt ki (Shen and Marcus 1998). Emellett az ATP parakrin módon az endolymphát határoló sejtek apicalis felszínén nagy denzitásban található P2X2 receptorok aktivációjával képes shuntolni a K^+ -ot a perilymphába (Xiang, Bo et al. 1999), ezzel szintén lecsökkentve az endocochleáris potenciált (Thorne, Munoz et al. 2004). Tartós zajhatásra fokozódik a P2X2 receptorok expressziója, és a külső szőrsejtek ATP érzékenysége is (Wang, Raybould et al. 2003). A támasztósejtek által shuntolt K^+ a perilymphába, illetve a sejteket hálózatba kapcsoló gap junction rendszeren keresztül laterális irányba távozik, és a ligamentum spirale sejteiből az extracelluláris térbe kerül. Onnan az epithelialis sejtek alatt található fibrocyták veszik fel, és visszajuttatják a stria vascularisba (Zhao, Kikuchi et al. 2006, Housley, Bringmann et al. 2009, Zhu and Zhao 2010).

Az ATP helyi parakrin mediátorként a Corti szerv sejtei közti jelátvitelnek is fontos eleme (Wangemann 1996, Zhao, Yu et al. 2005). Mind a sejthártyában található connexin hemichanneleken keresztül (Zhao, Yu et al. 2005), mind Ca^{2+} -függő vesicularis release révén (Wangemann 1996) kerülhet ATP a Corti szerv sejteiből az extracelluláris térbe. Sőt, szöveti sérülés esetén ATP a sérült sejtekből is kikerülhet a szövetközi térbe, és a támasztósejtek hálózatában szintén Ca^{2+} szignálokra épülő riasztási rendszert aktivál (Gale, Piazza et al. 2004, Lahne and Gale 2010) (**2. ábra**). Ez a lokális parakrin szabályozás a külső szőrsejtek elektromotilitását is befolyásolja (Zhu and Zhao 2010). A külső szőrsejtek környéki támasztósejtek közötti gap junction kapcsolat gátlásával a külső szőrsejtek hyperpolarizált állapotba kerülnek, ezáltal kevésbé tudják felerősíteni a hanghullámokat (Rajagopalan, Greeson et al. 2007).

A K^+ szint befolyásolásán túl, a purinerg Ca^{2+} szignalizáció a támasztósejtek révén a Corti szerv direkt mikromechanikáját is modulálja, protektív módon. Flock és munkatársai vizsgálataik során észlelték, hogy intenzív zajhatásra a Deiters és a Hensen

sejtek relatív elhelyezkedése reverzibilisen megváltozik a Corti szervben, a modiolustól való távolságuk csökken, ezzel egyidőben pedig a cochleáris mikrofonpotenciál redukcióját is detektáltak (Flock, Flock et al. 1999). Ez lehetne akár egy következményes, passzív folyamat is, de Dulon és munkatársai már 1994 leírták, hogy intracellularis Ca^{2+} felszabadításának hatására az izolált Deiters sejtek processus phalangealisai elmozdultak (Dulon, Blanchet et al. 1994).



1. ábra: Az ATP lehetséges forrásai a támasztósejtek környékén.

ATP származhat a stria vascularisból az endolymphába szecernálva, sérült szőrsejtekből, valamint a támasztósejtekből connexin hemichanneleken keresztül. Az ATP a támasztósejtek felületi P2 receptoraihoz kapcsolódva az extracelluláris térből származó, vagy a belső raktárakból felszabadított Ca^{2+} -ra épülő, intra- és/vagy intercellularis Ca^{2+} jeleket indukálhat. A Ca^{2+} és az IP_3 a gap junction-ökön keresztül jut át egyik sejtől a másikba.

Később, 2001-ben egy Bobbin laborjában elvégzett kísérletsorozatban hasonló jelenséget figyeltek meg a Deiters sejtek mellé adott ATP esetén is (Bobbin 2001), majd 2009-ben Yu leírta, hogy a Deiters sejtek citoszkeletonjának megváltozása, vagy a Deiters sejtek és a külső szőrsejtek közötti kapcsolat megbontása is csökkenti az OHC-k elektromotilitását (Yu and Zhao 2009). Tehát vélhetően mind az OHC-k elektromotilitásának regulálása a támasztósejtek által, mind a támasztósejtek mikromechanikája parakrin purinerg szabályozás alatt álló Ca^{2+} jelátvitellel is történik.

Habár az ATP kiváltotta Ca^{2+} jelzéseket már többfajta támasztósejtben is vizsgálták, ezek a kísérletek jellemzően izolált sejteken történtek (Ashmore and Ohmori 1990, Dulon, Moataz et al. 1993, Dulon, Blanchet et al. 1994, Matsunobu and Schacht 2000, Chung and Schacht 2001), vagy embrionális illetve újszülött állatok Corti szervében (Gale, Piazza et al. 2004, Piazza, Ciubotaru et al. 2007, Anselmi, Hernandez et al. 2008). A nagyon kevés funkcionális Ca^{2+} imaging vizsgálat pedig vagy nem tért ki az ATP okozta Ca^{2+} válaszokra (Lin, Webster et al. 2003), vagy pedig kizárólag egy sejt típusra koncentrált (Lagostena, Ashmore et al. 2001, Lagostena and Mammano 2001).

2.3.2 Az olivocochleáris rendszer és szerepe

Hallásvédő szerepet tulajdonítanak a belsőfülben az olivocochleáris (OC) rendszernek is. A cochlea az afferens beidegzésen kívül ugyanis efferens beidegzést is kap, aminek a hallás élettanában játszott szerepén túl a hallószerv károsodása (pl. zajkárosodás) elleni védelemben is van szerepe. A nagyobb méretű sejtekből álló, myelinizált axonnal bíró medialis olivocochleáris (MOC) efferensek az olivától medialisán elhelyezkedő magokból indulnak ki (medialis oliva superior, MSO), míg a laterális olivocochleáris (LOC) efferensek neuronjai kisebb sejttestűek, amelyek a laterális oliva superiorban (LSO) valamint kéregszerűen körülötte helyezkednek el, és axonjaikat nem borítja myelinhüvely (Warr 1975, Warr and Guinan 1979). A MOC efferensek főleg a kontralaterális cochleát idegzik be, és a külső szőrsejteken szinaptizálnak (Liberman and Brown 1986, Brown 1989). A LOC efferensek számos varikozitással bíró rostjai döntően az azonos oldali cochleába vetítenek, és az elsődleges hallóneuronok perifériás dendritjére adnak szinapszist, az IHC-k alatt (Spoendlin 1979, Bodian and Gucer 1980,

Lieberman 1980, Aschoff and Ostwald 1988, Liberman, Dodds et al. 1990, Satake and Liberman 1996, Safieddine, Prior et al. 1997, Warr, Boche et al. 1997, Szucs and Rusznak 2002).

2.3.2.1 A MOC efferensek protektív szerepe

A MOC efferensek ingerlésének hatására (Gifford and Guinan 1987) csökken a hallóideg összetett akciós potenciál (compound akciós potenciál; (Galambos 1956), a membrana basilaris hanginger hatására létrejövő kitérése (Murugasu and Russell 1996) és a disztorziós otoakusztikus emisszió amplitúdója (Mountain 1980). A hatás alapja az OHC-k elektromechanikus mozgása (szomatikus elektromotilitás és sztereocílium köteg motor) által biztosított cochleáris amplifikáció szabályozása. A MOC efferensekből felszabaduló ACh nagy Ca^{2+} permeabilitású $\alpha 9$ és $\alpha 10$ alegység tartalmú nikotinos acetilkolin receptorokat (nAChR) nyit és a Ca^{2+} -érzékeny K^+ csatornák aktiválásán keresztül hyperpolarizálja az OHC-eket, csökkenti a receptor potenciált és ezáltal gátolja a cochleáris amplifikációt (Blanchet, Erostequi et al. 2000). A MOC efferensek egy olyan gyors szabályozó rendszert biztosítanak, ami amellett, hogy hozzájárul a biológiailag fontos hanginformáció szimultán háttérzajból történő kiemeléséhez és a zajos környezetben is fontos beszédértéshez, védelmet is biztosít a zajkárosodással szemben is (Murugasu and Russell 1996, Guinan 2010, Rabbitt and Brownell 2011). Az nAChR $\alpha 9$ alegység KO egereken végzett vizsgálatok is megerősítették ezt az elképzelést (Vetter, Liberman et al. 1999).

2.3.2.2 A LOC efferensek protektív szerepe és DA felszabadításuk preszinaptikus regulációja

A LOC efferens terminálisokból számos különböző neurotranszmitter anyag ürül, többek között ACh, gamma-amino-vajsav (GABA), dopamin (DA), enkefalinok, dinorfinok, calcitonin-gene-related-peptid, és szerotonin is (Eybalin 1993, Gil-Loyzaga 1995, Puel 1995, Safieddine, Prior et al. 1997), melyek közül a legtöbb molekula pontos szabályozó szerepe és hatásmechanizmusa egyelőre nem ismert teljes mélységében. A transzmitter- tartalom alapján a LOC rendszeren belül meg lehet különböztetni két különböző neuroncsoportot. Az egyik elsődlegesen kolinerg, de ezekben a sejtekben GABA is termelődik (Maison, Emeson et al. 2003). A másik idegsejtcsoport elsődlegesen DA-erg (Darrow, Simons et al. 2006). A LOC efferenseknek feltehetően

szerepe van a hangforrás térbeli lokalizációjában (Groff and Liberman 2003, Darrow, Simons et al. 2006), másrészt – a DA-erg neuronok révén – védelmet biztosítanak az elsődleges hallóneuronok excitotoxikus károsodása ellen, ami pl. a káros zajterhelés hatására az IHC-kből történő kórosan fokozott Glu felszabadulás következtében alakulhat ki (Eybalin, Charachon et al. 1993, Pujol 1994, Oestreicher, Arnold et al. 1997, Darrow, Maison et al. 2007).

Az afferens neuronok dendritjein már az összes ionotrop glutamát receptor jelenlétét kimutatták (Matsubara, Laake et al. 1996, Knipper, Kopschall et al. 1997, Furness and Lawton 2003, Hakuba, Matsubara et al. 2003, Eybalin, Caicedo et al. 2004). Az NMDA és az AMPA receptoroknak fontos szerepe van a szenzorieurális halláskárosodásokban (Puel, Ruel et al. 1998, Duan and Cooke 2000, Ohinata, Miller et al. 2003), de az NMDA receptoroknak szerepet tulajdonítanak a tinnitus kialakulásában is (Guitton, Caston et al. 2003). A glutamát kórosan magas koncentrációja excesszív Na^+ és Ca^{2+} áramlást okoz az afferens dendritek AMPA és NMDA csatornáin keresztül, amely megnövekedett vízbeáramláshoz és következményes duzzanathoz vezet (Pujol, Lavigne-Rebillard et al. 1990). Az NMDA receptorokon keresztül beáramló Ca^{2+} a sejten belül proteáz és lipáz enzimeket aktivál, ami sejtpusztuláshoz vezet (Choi, Tenneti et al. 2000, Ohinata, Miller et al. 2003). A LOC efferensek az IHC-hallóneuron jelátvitel hatékonyságát szabályozzák azáltal, hogy a felszabaduló DA csökkenti a hallóneuronok excitabilitását és akciós potenciál tüzelését (Mulders and Robertson 2004, Le Prell, Halsey et al. 2005, Darrow, Simons et al. 2006, Niu and Canlon 2006, Lendvai, Halmos et al. 2011). Kísérletesen igazolt, hogy a LOC efferensek aktiválása ill. DA agonisták adása csökkenti a compound akciós potenciált, valamint véd a hallóneuronok zaj okozta strukturális- és a funkcionális károsodása ellen (Pujol, Puel et al. 1993, d'Aldin, Eybalin et al. 1995, Gil-Loyzaga 1995, Oestreicher, Arnold et al. 1997, Ruel, Nouvian et al. 2001). Az OC rendszer de-efferenciációja fokozza a mérsékelt zaj okozta hallóneuron pusztulást (Maison, Usubuchi et al. 2013). A hallóneuronok excitotoxikus sérülése megfigyelhető a zajkárosodáson kívül egyéb szenzorieurális halláskárosodásokban is, így a belsőfül ischemiás károsodása, az aminoglikozid antibiotikumok vagy az időskor okozta hallásvesztésben is. A LOC efferensekből felszabaduló DA-nak feltehetőleg védő hatása van ezekben az esetekben is (Lendvai, Halmos et al. 2011).

A LOC idegsejtek 5-35%-át sorolják a DAerg csoportba, melyek sejttestjei tartalmazzák az L-DOPA szintézishez szükséges tirozin-hidroxiláz (TH) enzimet (Campbell and Henson 1988, Mulders and Robertson 2004, Niu, Bogdanovic et al. 2004). Az egyéb katekolaminok jelenléte ellen szól, hogy a TH mellett DA beta-hidroxiláz (a DA noradrenaliná alakításáért felelős enzim) pozitív neuronok rostjai nem lépnek be a Corti szervbe (Darrow, Simons et al. 2006). A DAerg beidegzés targetspecificitását igazolta, hogy immunhisztokémiai vizsgálattal az OHC-k környékén nem található TH pozitív sejtek (Eybalin 1993). A DA neurotranszmitter szerepét a DA szintézishez szükséges enzimek jelenléte mellett (Usami, Hozawa et al. 1988, Eybalin 1993, d'Aldin, Eybalin et al. 1995) igazolja, hogy elektromos ingerlésre DA szabadul fel a cochleában, melynek idegi eredetét mutatja a hatás felfüggeszthetősége az axoniális vezetés vagy a feszültségfüggő kalciumcsatornák gátlásával (Gaborjan and Vizi 1999). Szintén a DA neurotranszmitter szerepét támasztja alá, hogy transzporterfehérjék visszaveszik (Gaborjan, Lendvai et al. 1999, Halmos, Doleviczenyi et al. 2005, Ruel, Wang et al. 2006), illetve, hogy a DA receptorok megtalálhatók posztszinaptikusan (Karadaghy, Lasak et al. 1997, Inoue, Matsubara et al. 2006, Niu and Canlon 2006). A DA felszabadulás preszinaptikus regulációja is megfigyelhető. Kutatócsoportunk mutatta ki, hogy a D1 receptorok aktivációja fokozza a bazális DA felszabadulást, és az elektromos ingerlés során ürülő DA mennyiségét a LOC rostokból, míg D1 antagonisták gátolják ezt a hatást (Gaborjan, Lendvai et al. 1999). Szintén kutatócsoportunk igazolta, hogy a szelektív D2 receptor antagonistá sulpirid illetve L-741,626 szignifikánsan emelte az elektromos stimulus során felszabaduló DA mennyiségét (Halmos, Lendvai et al. 2002, Halmos, Doleviczenyi et al. 2005), ami a preszinaptikus D2 receptorok feedback gátló hatását igazolja. Serkentő és gátló típusú DA autoreceptorok együttes expressziója nem példa nélküli (Ciruela, Casado et al. 2006), a két receptortípus aktivációjának súlya együttesen determinálja a DA aktuális felszabadulását. Vélhetően a bazális DA szekréció és a szinaptikus térben található DA mennyisége a neuroprotekción szinten tartásáért felelős, ill. az aktuális fokozott DA felszabadulás terminálását így szabályozza a szervezet. A LOC efferensek DA neurotranszmisszióját 5-HT_{6/7} receptorok (Doleviczenyi, Vizi et al. 2008), II-es csoportú metabotróp Glu receptorok (Doleviczenyi, Halmos et al. 2005) szintén modulálják, és mi irtuk le a az NMDA receptorok preszinaptikus reguláló szerepét is (Halmos, Horvath et al. 2008, Lendvai, Halmos et al. 2011). Ez utóbbi, melyben szerepe van a NO-nak, és egyben parakrin szabályozás is, disszertációm részét is képezi. A nitrogén-monoxidot (NO) képző

nitrogén-monoxid szintáz (NOS) neurális izoformájának működése az NMDA receptorokhoz kötött, amelyeken keresztül beáramlik az aktivációjukat kiváltó Ca^{2+} (Brenman and Bredt 1997). A striatumban a NO befolyásolja a neuronokból való DA felszabadulást (Hanbauer and Grilli 1992). Kis és munkatársai kimutatták, hogy a DA felszabadulást fokozó hatását az NO nem-szinaptikusan, a DA visszavétel molekulák gátlásán keresztül fejt ki a striatumban (Kiss, Zsilla et al. 2004). A NOS különböző izoformáit kimutatni a cochleában (Michel, Hess et al. 1999), és egyértelmű NO aktivitást találtak a csigában, amit N-nitro-L-arginine methyl ester-rel (L-NAME) sikerült gátolni (Shi, Dai et al. 2003). Humán kísérleti eredmények alapján is felmerült az NO neurotranszmitter/neuromodulátor szerepe a cochleában (Popa, Anniko et al. 2001). Habár a NO jelátvitel számos aspektusát kimutatták már a csigában (Takumida and Anniko 2002), feltáratlan az NO lokális neurotranszmissziót moduláló hatása.

3. Célkitűzések

Számos endogén és exogén noxa vezet szenzorineurális halláskárosodáshoz, melyek megelőzésére és kezelésére nincs hatékony gyógyszeres terápia. Ugyanakkor a belsőfülben vannak endogén védelmi mechanizmusok, melyek segítenek megelőzni és/vagy mérsékelni a halláskárosodást. Ezen mechanizmusok alaposabb megismerése a szenzorineurális halláskárosodások elleni küzdelemben is segítséget nyújthatna.

Ilyen „beépített” védelmi mechanizmus a Corti szervben a külső szőrsejtek erősítő funkcióját, a cochleáris amplifikációt ill. az endolympha K^+ szintjét is szabályozó támasztósejtek parakrin regulációja, melynek alapja a támasztósejtek ATP mediálta Ca^{2+} szignalizációja. Az elsődleges hallóneuronokat védik a perifériás denritjeiken szinaptizáló LOC efferensek, amelyek DA felszabadításán keresztül fékezik túlaktiválódásukat és excitotoxikus károsodásukat.

Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a hallás ezen védelmi mechanizmusában milyen módon vesz részt az ATP ill. az NMDA receptor/NO mediálta parakrin szabályozás. Munkánk során célunk volt:

A Corti szerv támasztósejtjei purinerg Ca^{2+} szignalizációjának vizsgálata kapcsán:

- 1.) Olyan funkcionális imaging módszer beállítása, amelynek segítségével jó tér- és időbeli felbontással tudjuk vizsgálni a Corti szerv különböző támasztósejtjeinek Ca^{2+} szignalizációját halló egerek *in situ* hemicochlea preparátumában.
- 2.) A Corti szerv három különböző támasztósejtje (pillér-, Deiters- és Hensen-) nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jének összevetése és az ATP adásra kiváltott Ca^{2+} válaszok reverzibilitásának, ismételhetőségének és dózis függésének vizsgálata.
- 3.) Meghatározni az extracelluláris Ca^{2+} függő ionotrop P2X és az intracelluláris Ca^{2+} függő metabotrop P2Y receptorok részvételét az ATP kiváltotta Ca^{2+} válasz kialakításában.
- 4.) A három támasztósejt típus purinerg Ca^{2+} jelátvitelének összehasonlítása.

A LOC efferensek DA felszabadításának NMDA receptor és NO mediálta regulációja kapcsán:

- 5.) Az NMDA és az NO cochleáris DA felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálata.

6.) A LOC efferensekből történő DA felszabadulás NMDA receptor és NO mediálta regulációs mechanizmusának feltárása.

4. Módszerek

4.1. Felhasznált állatok

A hemicochlea kísérletekhez p15-21 korú, mindkét nemű, a [³H]dopamin ([³H]DA) felszabadulás méréshez 15-25 g-os (~3-4 hetes) hím CD1 egereket (MTA KOKI, OGR) használtunk. A kísérleteket a National Institute of Health előírásai és a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Állatetikai Kódexében foglaltak betartásával végeztük, folyamatosan törekedve a felhasznált állatszám és az állatok szenvedésének minimalizálására. Az állatkísérleti engedélyek száma: 3259/002/2003; 22.1/3669/003/2008; XIV-I-001/1028-4/2012.

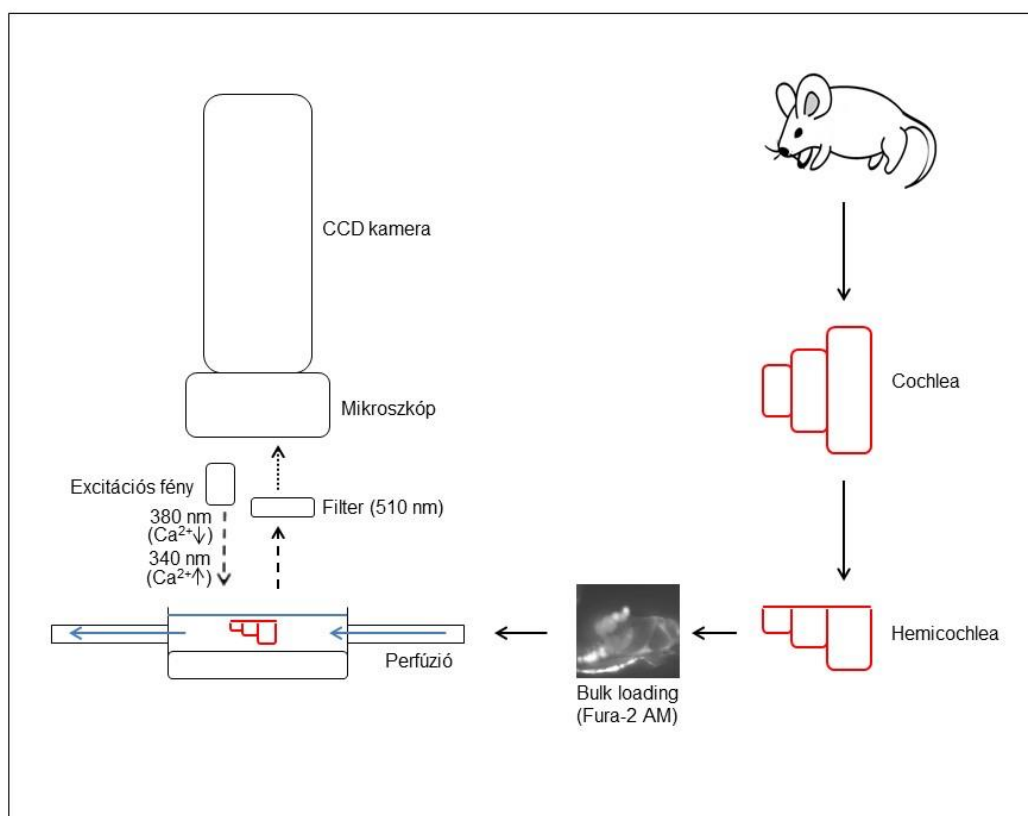
4.2. Egér hemicochlea Ca²⁺ imaging

4.2.1. Egér hemicochlea preparátum

A hemicochlea preparátum elkészítését Edge és Dallos által leírt módon végeztük (Edge, Evans et al. 1998). A P15-21 korú CD-1 egereket dekapitáltuk, a koponyabázistól disztálisan megmaradt csigolyadarabokat eltávolítottuk. A lágyrészeket leválasztottuk, majd a koponyát a sagittalis síkban kettévágtuk. Feltártuk és kiemeltük a bulla tympanit, majd folyamatosan O₂-vel szaturált szőrsejtoldatba helyeztük. A szőrsejtoldat (mesterséges perilympa; Ikeda, Saito et al. 1991) a következő összetevőket tartalmazta: 150 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2.75 mM HEPES, 2.25 mM Tris, 5.55 mM glükóz; pH 7.4; 320 mOsm/l. Sztereomikroszkóp (Olympus SZ2-ST, Olympus Corporation, Philippines) alatt a bullát fedő csontlemezt eltávolítottuk, és feltártuk a cochleát. A csigát a félkörös ívjáratokkal együtt disszekáltuk a környező maradvány csontos struktúráktól és lágyrészekről két csipesz segítségével. A cochlea medialis felszínét egy papírvatta darabbal megszártítottuk, majd egy előzetesen a vibratomba (Vibratome Series1000, Technical Products International Inc., St. Louis, Mo, USA) helyezett, 7 mm átmérőjű átlátszó műanyag lapocskára ragasztottuk (Loctite 404, Hartford, CT, USA). Az így rögzített cochleára ismét szőrsejtoldatot öntöttünk, majd azt követően a modiolus mentén kettévágtuk. Minden vágáshoz új pengét használtunk (Wilkinson Sword GmbH, Germany).

4.2.2. Ca²⁺ imaging

A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük (22-24 °C). A kiperarált hemicochleákat pluronic F-127-et (0.05%, w/v) és 10 μM membrán permeábilis fura-2 AM Ca²⁺ indikátor festéket tartalmazó oxigenált szőrsejt oldatban inkubáltuk 30 percig, majd szőrsejt oldattal háromszor átmostuk. A fura-2-vel megfestett preparátumot a mikroszkóp objektív alá (vízimmersziós LUMPlanFl 40x/0.80w), 3.5 ml/perc sebességű szőrsejt oldattal átáramoltatott perfúziós rendszerbe helyeztük, és alternálva, 340 ± 5 nm és 380 ± 5 nm excitációs fényel világítottuk meg (Polychrome II monochromator, TILL Photonics, Germany). Az emittált fényt 510 ± 10 nm-es filterrel szűrtük. A fluoreszcens felvételeket az Olympus BX50WI epifluoreszcens mikroszkóphoz (Olympus, Japan) csatlakoztatott hűtött Photometrics Quantix CCD kamerával készítettük (Photometrics, USA; **3. ábra**).



2. ábra: Hemicochlea Ca²⁺ imaging kísérleti elrendezése.

A P15-21 CD-1 egerekből származó hemicochlea preparátumot szőrsejt oldatban, fura-2 AM Ca²⁺ festékkel töltöttük meg, majd egy vízimmersziós epifluoreszcens mikroszkóp alatt felállított perfúziós rendszerbe helyezve, alternálva 340 és 380 nm-es fényrel

megvilágítottuk. Az emittált fényt egy 510 nm-es szűrőn keresztül detektáltuk CCD kamerával.

A rendszert az Imaging Workbench 4.0 szoftver vezérelte (INDEC BioSystems, USA). A képeket 1-2 kép/s sebességgel készítettük az ATP- és a CPA-kiváltotta válaszok ideje alatt, a köztes időben 10-30 másodpercenként készült kép, hogy csökkentsük a festék és a preparátum UV károsodását. A sejtek nem egyforma mértékben festődtek, ahogy az más szövetpreparátumok fura-2 AM-mel történő festése esetén is rendre megfigyelhető (pl. Zelles et al., 2001; Fekete et al., 2009). Az összes kísérletet a cochlea basalis kanyarulatán végeztük.

4.2.3. Az alkalmazott vegyületek adásának módja

Az ATP-t 30 másodpercig perfundáltuk. A vizsgált vegyületeket az első ATP ingerlést követően 5 perccel kezdtük hozzáadni a szörsejt oldathoz, majd 15 perces folyamatos perfúziót követően végeztük el a második ATP ingerlést. Hasonlóan jártunk el a Ca^{2+} mentes szörsejt oldat vizsgálatakor is, csak ebben az esetben a Ca^{2+} -ot tartalmazó standard oldatot cseréltük le Ca^{2+} mentes és + 1 mM EGTA-t tartalmazó oldatra az első ATP ingerlés után 5 perccel.

4.2.4. Ca^{2+} válaszok értékelése, statisztikai analízis

Az emittált fluoreszcens fény arányból (F_{340} / F_{380}) abszolút értékű, sejten belüli $[\text{Ca}^{2+}]_i$ koncentrációt számoltunk. A sejtek fluoreszcencia intenzitását a környékbeli sejtmentes területet háttérként használva korrigáltuk. A sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jének kiszámítását off-line végeztük a következő egyenlet segítségével (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985): $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times F_{\text{max}380} / F_{\text{min}380} \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$, amelyben az R a 340 nm és a 380 nm excitációhoz tartozó emittált intenzitás aktuális aránya, míg R_{max} és R_{min} 0 mM és teljes $[\text{Ca}^{2+}]$ szaturáció esetén mért arány, $F_{\text{max}380}$ és $F_{\text{min}380}$ pedig a 380 nm excitációhoz tartozó fluoreszcencia intenzitás 0 mM és teljes $[\text{Ca}^{2+}]$ szaturáció esetén. A rendszerre jellemző K_d , $F_{\text{max}380} / F_{\text{min}380}$, R_{min} , és R_{max} értékeket empirikusan határoztuk meg a Calcium Calibration Buffer Kit with Magnesium #2 (Molecular Probes, USA) segítségével. A Ca^{2+} válaszokat az ATP-kiváltotta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csúcs amplitúdójával jellemeztük ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nM-ban; csúcs - alap). A vegyületek, valamint a Ca^{2+} mentes oldat ATP válaszra való hatását a vegyületet tartalmazó ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,2}$), illetve a vegyületmentes

oldatban ($\Delta [Ca^{2+}]_{i,1}$) mért válasz arányával fejeztük ki ($\Delta [Ca^{2+}]_{i,2} / \Delta [Ca^{2+}]_{i,1}$). A deszenzitizációt hasonlóképpen vizsgáltuk, azaz a második ATP választ viszonyítottuk az első válaszhoz. Az adatokat átlag \pm szórás (standard error of the mean - SEM) formában adtuk meg. A kísérletek száma (n) az egyes sejtek számát jelöli, amelyet minimum négy különböző állatból nyertünk minden egyes farmakon vizsgálata során. A kísérletek statisztikai elemzésére egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni post hoc teszttel, kivéve a deszenzitizáció vizsgálatoknál, ahol kétszempontos ANOVA-t használtunk Bonferroni post hoc teszttel. *p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001.

4.3. RT-PCR kísérletek

20 db P15-19 CD-1 egeret dekapitáltunk, majd a bullákat kipreparáltuk a koponyából. A cochlea megnyitását követően a Corti szövet sztereomikroszkóp alatt leválasztottuk a csontos modiolusról. A stria vasculárist is eltávolítottuk. A szövetet azonnal szárazjégen lévő Eppendorf csövekben gyűjtöttük majd az analízisig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A cochlea mintákban található teljes RNS tartalom izolációját Trizol izolációs reagens alkalmazásával végeztük a gyártó protokollját követve (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA). Az RNS (2 μ l) reverz ranszkripcióját RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Life Technologies) segítségével végeztük a korábbi leírásoknak megfelelően (Sperlagh, Szabo et al. 2003, Papp, Balazsa et al. 2004). A PCR reakcióban különböző P2X és P2Y receptor altípusokra specifikus primereket alkalmaztunk a cDNS-ek amplifikációjára, míg β -aktin primereket a kontroll amplifikációra. A következő primer szekvenciákat használtuk a reakcióban: P2X1-hez (Fwd) 5'-CCT TGG CTA TGT GGT GCG AGA GTC, (Rev) 3'-AGG CAG GAT GTG GAG CAA TAA GAG; P2X2 5'-ATG GTG CAG CTG CTC ATT, 3'-AAA CGT GCA GTG CTT CAG; P2X3 5'-ATC AAG AAC AGC ATC CGT TTC CCT, 3'-AGT GTT GTC TCA GTC ACC TCC TCA; P2X4 5'-ATC GTC ACC GTG AAC CAG ACA CA, 3'-CCA CGA TTG TGC CAA GAC GGA AT, P2X5 5'-TTT CTT CGT GGT CAC CAA CCT GAT, 3'-ATT TGT GGA GCT GAA GTG ACA GGT; P2X6 5'-CTG TGG GAT GTG GCT GAC TT, 3'-TCA AAG TCC CCT CCA GTC AT, P2X7 5'-CCA CAA CTA CAC CAC GAG AAA C, 3'-ACT TCT TGG CCC TTG ACA TCT T, P2Y1 5'-AAG ACC GGT TTC CAG TTC TAC TAC, 3'-CAC ATT TCT GGG GTC TGG AAA TCC; P2Y2 5'-TGC TGG TGC TGG CCT GCC AGG CAC, 3'-GCC CTG CCA GGA

AGT AGA GTA CCG; P2Y4 5'-ATG AGG ATT TCA AGT TCA TCC TGC, 3'-TAG ACC ACG TTG ACA ATG TTC AGT; P2Y6 5'-CTG CGT CTA CCG TGA GGA TT, 3'-GCT ATG AAG GGC AGC AAG AA; P2Y12 5'-CAG GTT CTC TTC CCA TTG CT, 5'-CAG CAA TGA TGA TGA AAA CC; P2Y13 5'-ATC TTG AAC AAG GAG GCA A, 5'-TCT TTT TAC GAA CCC TGT T; P2Y14 5'-TAG AGG CCA TAA ACT GTG CTT, 5'-AAT TCT TCC TGG ACT TGA GGT; β -actin 5'-AGC TGA GAG GGAAATCGTGC-3', 5'-GAT GGA GGG GCC GGA CTC AT-3'.

Az amplifikáció jellemzői a következők voltak: 5 perc kezdeti denaturáció 95 °C-on, 5 percig, hot start 80 °C-on, majd 94 °C-on 1 percig, 59 °C-on 1 percig és 72 °C-on 1 percig 40 ciklusig, majd végső extenzió 72 °C-on, 5 percig. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel analizáltuk.

4.4. [³H]DA felszabadulás mérés egér cochleában

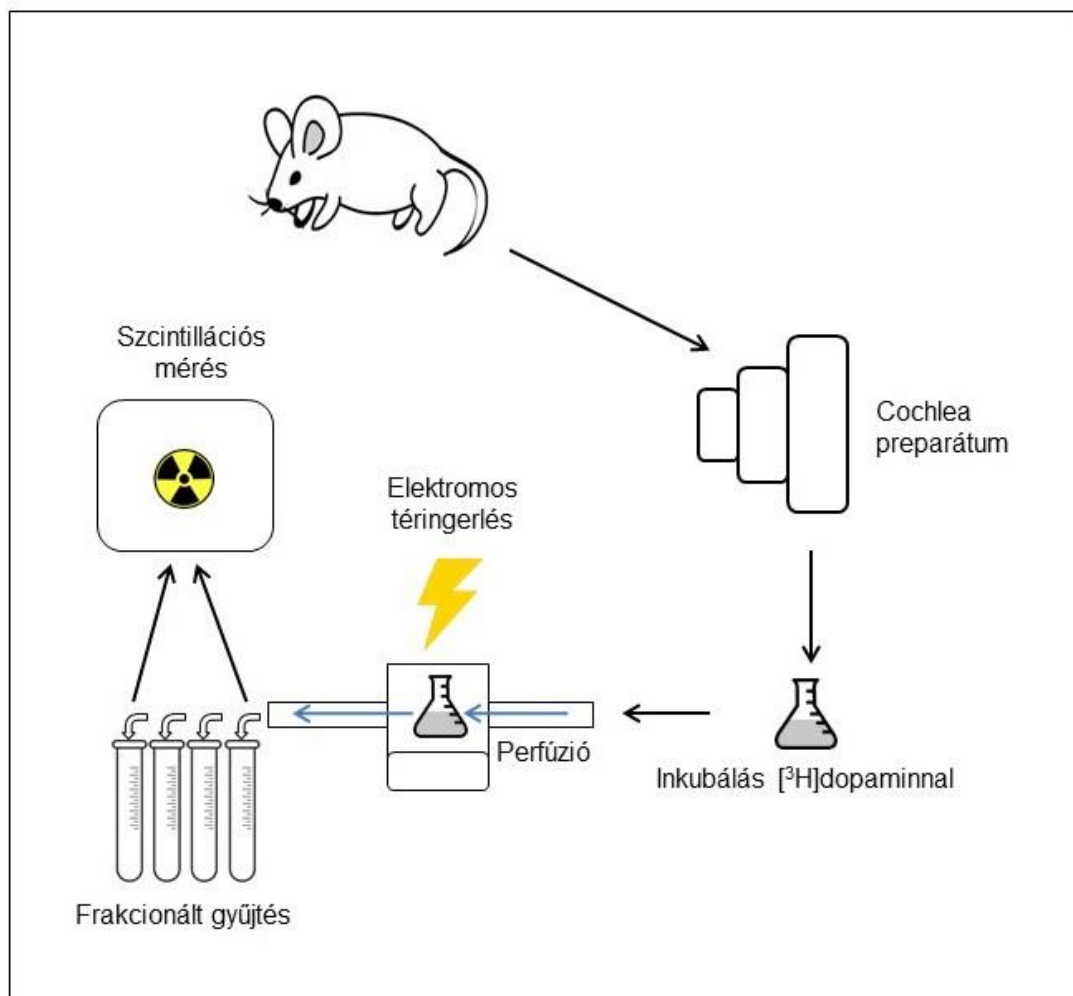
4.4.1. Izolált egér cochlea preparátum

Az egereket dekapitáltuk, a nyakcsigolya-maradványokat közvetlen a koponyabázison eltávolítottuk. A lágyrészeket élesen leválasztottuk, majd átvágtuk az occipitalis koponyacsontot, feltárva a bulla tympanit. Az eltávolított bullát szörsejtoldatba helyeztük, a preparátumon való további manipulációkat ebben végeztük O₂ szaturálás mellett. Sztereomikroszkóp (Olympus SZ2-ST, Olympus Corporation, Philippines) alatt a bullát fedő vékony csontlemezt levettük, ezzel feltártuk a belfület, melyben láthatóvá vált a csiga. A csiga csontos vázát körkörösén lepattintottuk, a stria vascularist lefejtettük, így a ganglion spirale, az afferens hallórostokat, az efferens idegek axonjait és axonterminálisait, valamint a teljes Corti-szervet tartalmazó preparátumhoz jutottunk.

4.4.2. In vitro mikroperfúzió

Kísérleteinket a Gáborján és munkatársai által leírtak alapján végeztük (Gaborjan and Vizi 1999). A cochlea preparátumot 1 ml szörsejt-oldatba helyeztük, melyhez 0.2 μ M [7,8-³H]DA-t (specifikus aktivitás: 45.0 Ci/mmol) adtunk és így 35 percig inkubáltuk (O₂ szaturálás, 37 °C). Ezt követően a cochlea szövetet 100 μ l belső térfogatú plexi kamrákba helyeztük át (3 preparátum / kamra). A kamrákat 3ml/perc sebességgel, 37 °C-os szörsejt oldattal perfundáltuk. 60 percen keresztül tartó előperfúzióval átmostuk a preparátumot, majd a következő 57 percen 3 perces frakciókban gyűjtöttük az oldatot,

melyek [^3H]DA tartalmát a minták radioaktivitásának mérésével határoztuk meg. Ehhez folyadék szcintillációs számlálót használtunk (Packard Tri- Carb 1900TR, Meridien, CT, USA), amelynek segítségével frakciónként 500 μl perfundáló folyadék radioaktivitását mértük meg (**4. ábra**). A cochleák szöveti radioaktivitásának méréséhez a preparátumokat 4 °C fokon, 24 órára, 500 μl 10%-os triklórecetsav oldatba tettük, majd ennek 100 μl -ét használtuk fel a mérésre.



4. ábra : A [^3H]DA felszabadulás mérés kísérleti elrendezése.

A CD-1 egerekből származó cochlea preparátumokat tríciummal jelölt dopaminnal, szőrsejt oldatban inkubáltuk, majd mikrotérfogatú kamrákba tettük és perfundáltuk. A kísérletek meghatározott időpontjaiban elektromos téringерлést alkalmaztunk. A vizsgált vegyületeket a perfúzióba adagoltuk. A rendszerből kifolyó oldatot frakcionáltan felfogtuk, a frakciók radioaktivitását ([^3H]DA tartalmát) szcintillációs számlálóval meghatároztuk.

4.4.3. A cochlea preparátum elektromos téringерlése

A kamrában található cochlea szöveten elektromos téringерlést alkalmaztunk a kamra alsó és felső pólusánál elhelyezett platina elektródok segítségével, a harmadik (S1) és a tizenharmadik (S2) frakcióban, 30 V feszültséggel, 5 Hz frekvenciával, 0.5 ms-os impulzus időtartammal. Az ingerléshez Grass S88 stimulátort használtunk (West Warwick, USA). Az elektromos téringерlés a preparátum idegi elemeiben akciós potenciált generál és a LOC efferensek terminálsaiból vezikuláris exocitózissal DA-t, ill. [³H]DA-t szabadít fel.

4.4.4. Az alkalmazott vegyületek adásának módja

A kísérleteink egy részében DA felvételt gátló nomifensint alkalmaztunk, melyet a preperfúziót követően, a kísérletek kezdetétől perfundáltunk a rendszerbe. A többi vegyületet a gyűjtési szakban, két elektromos téringерlés között, a huszonegyedik perctől kezdve a kísérletek befejezéséig adtuk folyamatosan. Az NMDA-t Mg²⁺ mentes szörsejtoldatban, 10 µM glicinnel együtt tettük a perfúzióhoz.

4.4.5. A [³H]DA felszabadulás kiszámítása, statisztikai analízis

A csökkenő szöveti radioaktivitás miatt a kiáramló [³H]DA mennyisége is folyamatosan csökken. Emiatt egy adott gyűjtött frakcióra vonatkozó [³H]DA kiáramlás mértékét a szövetben a gyűjtési időszakban mérhető teljes [³H]DA mennyiség százalékában adtuk meg (fractional release – FR). Az elektromos téringерlésekkel (S1 és S2) kiváltott DA felszabadulást FRS1 és FRS2-ként jelöltük: a téringерléssel kiváltott teljes [³H]DA felszabadulás értékéből levontuk a nyugalmi felszabadulást (az ingerlés előtti és az ingerlés hatásának befejeződését követő frakciók átlagát). A vizsgált vegyületek hatását a jelenlétükben és a hiányukban alkalmazott elektromos téringерlés során létrejött [³H]DA felszabadulás arányával, FRS2/FRS1-ként határoztuk meg. A nyugalmi felszabadulást 3 különböző, egyenként 6 perces periódusban mért FR átlagok alapján kalkuláltuk, melyek közül az FRR1 a 15-21 perces, az FRR2 a 21-27 perces, az FRR3 pedig a 30-36 perces 2-2 frakciót jelöli. Ezek közül az FRR2 és az FRR3 már a vizsgált vegyületek jelenlétében, de még a második ingerlés előtt mért érték, míg az FRR1 értéke a vizsgálandó vegyületektől mentes, kontroll értéknek felel meg. A vegyületek

nyugalmi DA felszabadulásra gyakorolt hatása a fentieknek megfelelően az FRR2/FRR1, vagy az FRR3/FRR1 arányszámmal került meghatározásra. Az *n* a kísérletek számát jelöli. Statisztikai analízisre egyszempontos ANOVA-t használtunk és Tukey féle post hoc páros összehasonlítást. **p*< 0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001.

4.5. Alkalmazott vegyületek

ATP, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonsav (PPADS), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), glicin, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), diethylamine NONOate (DEA-NONOate), (2R)-amino-5-phosphonopentanoate (AP-5), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), nomifensin maleát, nitroprusszid nátrium, szőrsejt oldat elkészítéséhez szükséges vegyületek (Sigma-Aldrich). Fura-2 AM, Pluronic F-127, Calcium Calibration Buffer Kit with Magnesium #2 (Molecular Probes). Cyclopiazonic acid (CPA; Alamone labs). [7,8-³H]DA (Amersham).

5. Eredmények

5.1. Purinerg Ca^{2+} szignalizáció a Corti szerv támasztósejtjeiben

5.1.1. Pillér, Deiters és Hensen sejtek Ca^{2+} imaging vizsgálatának beállítása halló egerek hemicochlea preparátumában

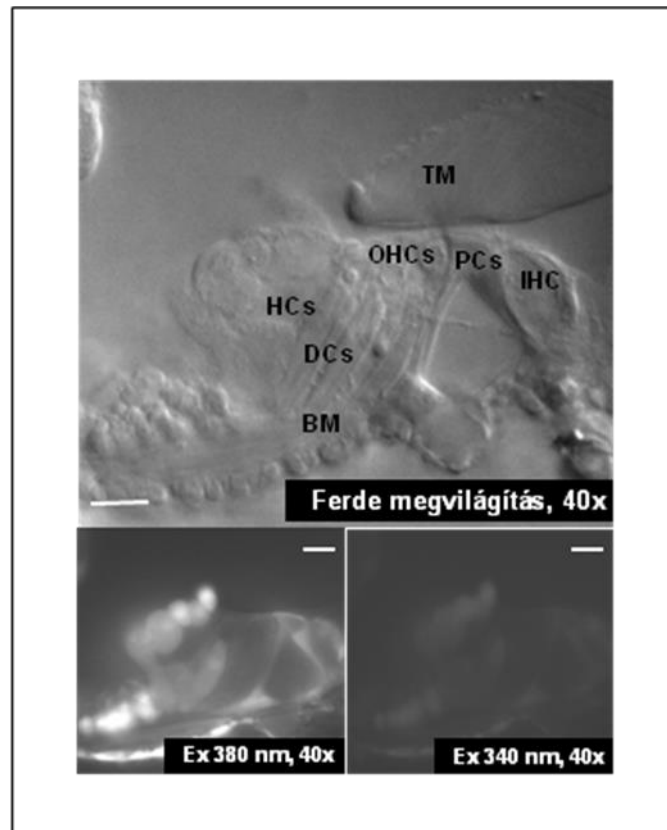
Létrehoztunk egy kísérletes modellt 15-21 napos halló egerek hemicochlea preparátumára alapozva (Edge, Evans et al. 1998, Richter, Evans et al. 1998, Keiler and Richter 2001, Teudt and Richter 2007), hogy megvizsgáljuk az aktív halláserősítésért felelős külső szőrsejtek körül elhelyezkedő, különböző típusú és funkciójú támasztósejtek ATP által kiváltott Ca^{2+} válaszainak karakterisztikáját. A sejteket mikroszkóp segítségével, ferde megvilágítás és 40-szeres nagyítás mellett azonosítottuk az anatómiai elhelyezkedésük és alakjuk alapján. Minden sejtípusnak, valamint a spiralis limbusnak, a membrana tectoria, és a membrana basilarisnak is egyértelműen láthatónak kellett lennie a vizsgálat következő fázisához. Ezután a hemicochleát megfestettük a nagy affinitású fura-2 AM fluoreszcens Ca^{2+} festékkel (5. *ábra*). Habár a preparátum egyes sejtjei nem egyforma mértékben vették fel a festéket (lásd. 4.2.2. Ca^{2+} imaging), jellemzően legalább 2-3 különböző típusú támasztósejt megfestődött minden hemicochlea mérésre alkalmas optikai síkjában, biztosítva ezzel a kísérletek kivitelezhetőségének megfelelő hatékonyságát. Kizárólag olyan megfestődött sejteken történt mérés, amelyek nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ja stabil volt, és amelyek a fenti kritériumok alapján egészséges hemicochlea preparátumokban helyezkedtek el.

Minden kísérlet elején meghatároztuk a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t. A 6. *ábra* mutatja a pillér (61 ± 4 nM, $n = 41$), a Deiters (58 ± 5 nM, $n = 65$), és a Hensen sejtek (98 ± 10 nM, $n = 53$) átlagos nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jét. Érdekes módon a Hensen sejtek esetében ez jóval magasabb volt, mint a pillér vagy a Deiters sejteknél, ami utalhat az egyes sejtípusok $[\text{Ca}^{2+}]_i$ háztartásának és jelátvitelének különbözőségére, főleg az alacsonyabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tartományban.

5.1.2. Az ATP reverzibilis, ismételhető, dózisfüggő és deszenzitizációt mutató Ca^{2+} válaszokat vált ki

Az ATP a Ca^{2+} szignalizáció fontos regulátora a cochleában. Megvizsgáltuk, hogy halló egerek hemicochlea preparátumban az ATP kivált-e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást a Corti szerv

különböző támasztósejteiben. 30 másodpercig ATP-t adtunk a perfundált szőrsejtoldathoz. Az ATP 1-100 μM tartományban mindegyik vizsgált sejtípusban reverzibilis és megismételhető Ca^{2+} választ indukált (7/A. *ábra, felső sor*). A pillérsejtek mutatták a legkisebb érzékenységet: 1 és 10 μM ATP dózis ebben a sejtípusban kisebb amplitúdójú Ca^{2+} választ váltott ki, mint a Deiters vagy Hensen sejtekben (7/A. *ábra, oszlopdiagramok*).

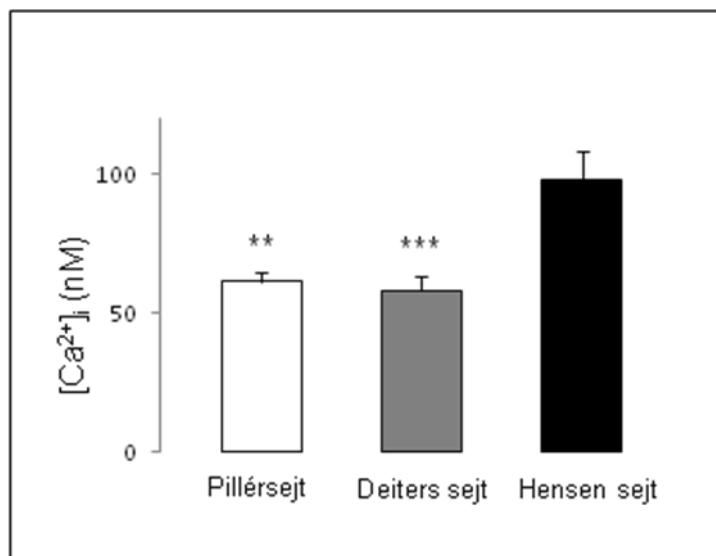


5. ábra: Ca^{2+} imaging halló egerekből nyert hemicochlea preparátumban.

A felső ábra a bazális kanyarulatból származó Corti szervet mutatja ferde megvilágítás mellett. Az alsó két fluoreszcens képet ugyanazon a preparátumon készítettük 340 és 380 nm-es megvilágításnál, miután bulk loading technikával fura-2 AM festékkel töltöttük. TM, membrana tectoria; BM, membrana basilaris; IHC, belső szőrsejt; PC, pillérsejt; OHC, külső szőrsejt; DC, Deiters sejt; HC, Hensen sejt. A skála 20 μm távolságot mutat.

A további vizsgálatok során 50 μM ATP-t alkalmaztunk, ami gyorsan felfutó, hasonló alakú Ca^{2+} tranzienseket váltott ki megbízható módon mindhárom sejtípusban ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ – pillérsejt: 96 ± 14 nM, n=41; Deiters sejt: 104 ± 9 nM, n=65; Hensen sejt: 140 ± 10

nM, n=53). Az ATP ismételt adása az ingerlések közt eltelt idővel fordítottan arányosan a $[Ca^{2+}]_i$ jelekben reverzibilis amplitúdó-csökkenést okozott, mely tekintetben nem volt érdemi különbség az egyes sejtípusok között (7/B. *ábra, oszlopdiagramok*).



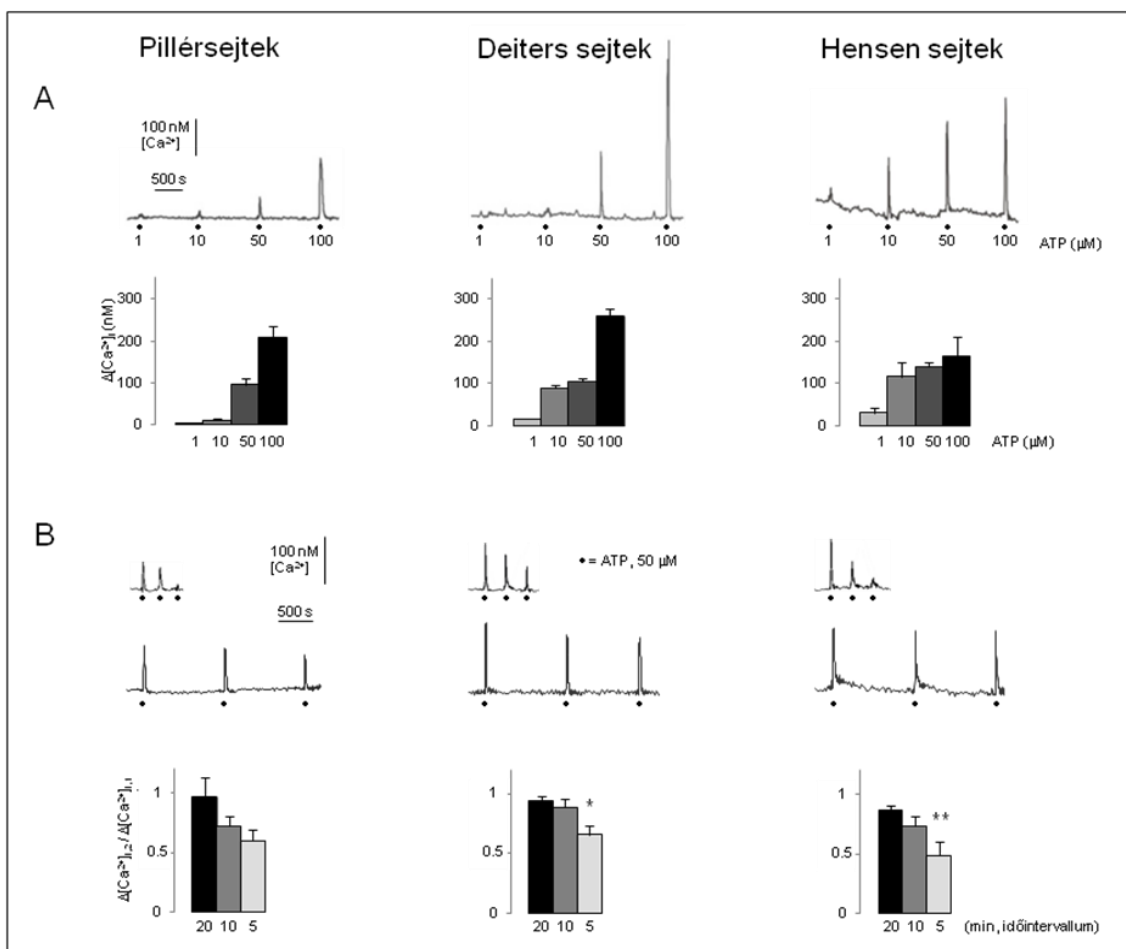
6. ábra: Nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ a Corti szerv különböző típusú támasztósejtjeiben.

Az oszlopdiagrammok az egyes támasztósejt típusok átlagos (+ SEM) nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jét mutatják; pillér sejt $n = 41$; Deiters sejt $n = 65$; Hensen sejt $n = 53$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Az amplitúdó csökkenés elhanyagolhatóvá vált, mikor az ATP ingerlések között 20 perc telt el (pillérsejt: $3 \pm 16\%$, $n = 9$; Deiters sejt: $6 \pm 4\%$, $n = 14$; Hensen sejt: $13 \pm 4\%$, $n = 20$), ezzel szemben szignifikáns amplitúdó-csökkenés volt megfigyelhető 5 perces időintervallumú ingerlés esetén a Deiters és a Hensen sejtekben ($34 \pm 8\%$, $n = 20$ és $51 \pm 12\%$, $n = 8$). A pillér sejtek esetében is tendenciózus válasz amplitúdó csökkenés volt megfigyelhető ($40 \pm 9\%$, $n = 11$), de az 5 perc és a 20 perces ingerlés között nem volt szignifikáns a különbség. Az ATP harmadszori adása megerősítette, hogy míg az 5 perces ingerlés egyértelműen deszenzitizációt okoz, addig 20 perc időkülönbség esetén a jelek amplitúdója érdemben nem csökken (7/B. *ábra, mintagörbék*). A későbbiekben 20 perces időintervallumú ingerlést alkalmaztunk, ami lehetővé tette azt is, hogy egy kísérleti beavatkozás ATP válaszra gyakorolt hatását ugyanazon sejt beavatkozás előtti, “tiszta” ATP válaszához hasonlíthassuk (belső standard).

5.1.3. A Ca^{2+} tranziensek kiváltásában szerepet játszanak a P2X (extracelluláris Ca^{2+} függő) és a P2Y (intracelluláris Ca^{2+} raktár függő) receptorok is

Az ATP kiváltotta Ca^{2+} jelek extracelluláris Ca^{2+} beáramlása révén, és belső raktárakból való Ca^{2+} felszabadulás útján is létrejöhetnek. Annak eldöntésére, hogy a három Corti szerv támasztósejt típus esetében a két lehetséges forrás közül melyiknek van szerepe a Ca^{2+} válasz kialakításában megvontuk a külső Ca^{2+} -ot ill. kiürítettük a Sarco/endoplazmatikus reticulum Ca^{2+} -ATPáz (SERCA)-függő belső Ca^{2+} raktárakat.



7. ábra: Az ATP reverzibilis, ismételhető, dózisfüggő és deszenzitizációt mutató Ca^{2+} válaszokat váltott ki halló egerek pillér-, Deiters- és Hensen sejteiben.

A) Felső görbék: A mintagörbék emelkedő dóziszú ATP-re adott Ca^{2+} válaszokat mutatnak (1, 10, 50 és 100 μM ; 30 másodperc perfúzió; fekete pontok), 20 perces időközökben végzett ingerlések során, ugyanazon sejtekben. A skála vonalak a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást és az időt mutatják. Alsó oszlopdiagramok: a különböző koncentrációjú ATP ingerekre adott átlagos (+ SEM) Ca^{2+} válaszokat mutatják a különböző típusú támasztósejtekben. 1 μM (világosszürke oszlop), 10 μM (szürke oszlop), 50 μM

(sötétszürke oszlop) és 100 μM (fekete oszlop) ATP. Pillérsejtek, $n = 4, 3, 41, 2$; Deiters sejtek, $n = 9, 9, 65, 8$; Hensen sejtek, $n = 2, 2, 53, 3$.

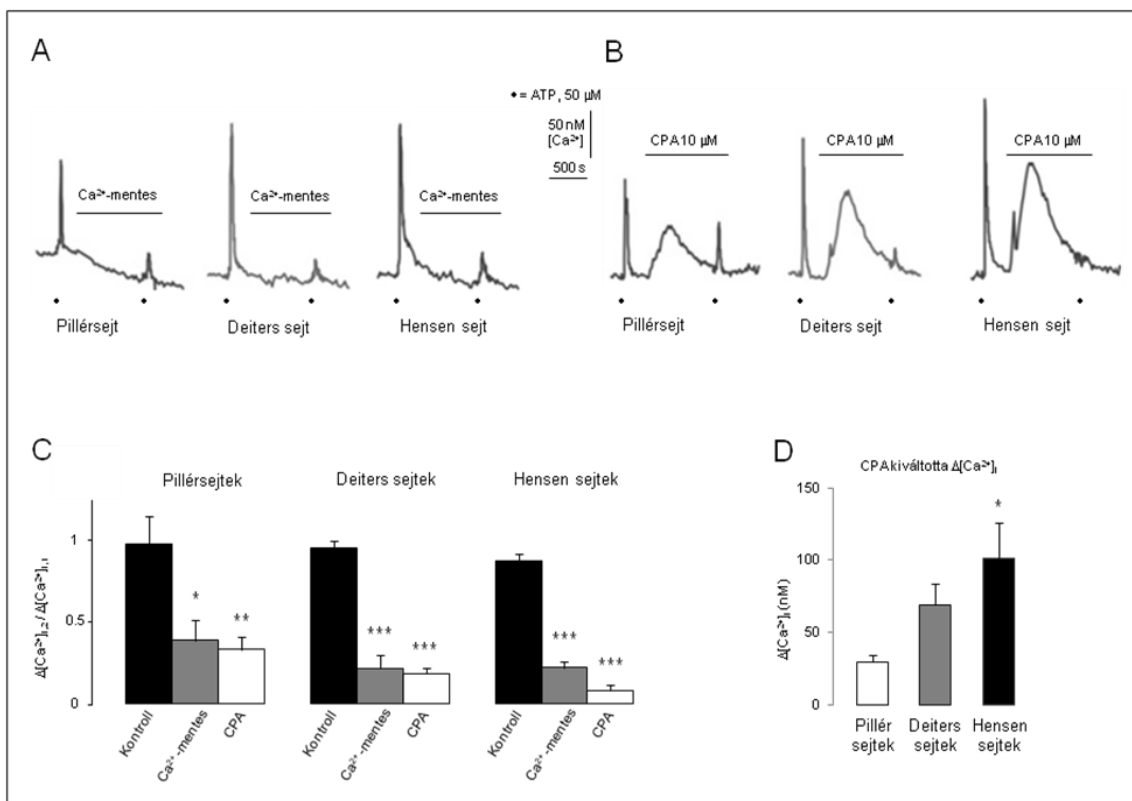
B) Felső görbék: A mintagörbék 50 μM ATP-vel történő (fekete pontok) ismételt ingerlések (30 másodperc) során kapott Ca^{2+} válaszokat mutatják. A skála vonalak a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást és az időt mutatják. Alsó oszlopdiaagramok: a 2. ATP válasz (50 μM) amplitúdójának csökkenése az ismétlések között eltelt időtől függött mindhárom sejttípusban (20, 10 és 5 min; fekete, sötétszürke, és világosszürke oszlopok). Az oszlopok a 2. válaszok elsőkhöz viszonyított arányának átlagait (+ SEM) mutatják ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,2} / \Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,1}$). Pillérsejtek, $n = 9, 6, 11$; Deiters sejtek, $n = 14, 9, 20$; Hensen sejtek, $n = 20, 4, 8$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Ca^{2+} mentes szőrsejt oldat (+1 mM EGTA) szignifikánsan csökkentette az ATP kiváltotta Ca^{2+} válaszok amplitúdóját mindhárom sejttípusban (8/A. és C. ábra), azaz a $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,2} / \Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,1}$ arány lecsökkent. A gátlás egyértelműen kifejezettebb volt a Deiters és a Hensen sejtekben (az első ATP tranziens 22 ± 8 és 22 ± 4 %-a), mint a pillérsejtben (az első ATP tranziens 38 ± 14 %-a; 8/C. ábra). A belső Ca^{2+} raktárakat a raktár újratöltést akadályozó specifikus SERCA pumpa gátló CPA-val (10 μM) üritettük ki. A CPA is mindhárom sejttípusban szignifikánsan gátolta az ATP által kiváltott Ca^{2+} válaszokat (8/B. és C. ábra), és ez a hatás a Deiters, valamint a Hensen sejtben ismét robusztusabb volt (az első ATP tranziens 18 ± 4 és 8 ± 3 %-a), mint a pillér sejtekben (az első ATP tranziens 33 ± 8 %-a; 8/C. ábra). A CPA arra is alkalmas, hogy jellemezzük a SERCA-függő belső Ca^{2+} raktárakat azáltal, hogy az újratöltés hiányában felfedjük Ca^{2+} szivárgásuk mértékét. A CPA önmagában, a második ATP ingerlés előtt, megemelte a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t mindegyik sejttípusban (8/B. ábra), és ez a jelenség is erőteljesebb volt a Hensen és a Deiters sejtben, mint a pillérsejtekben. Ennek a háttérben megint csak az egyes sejttípusok Ca^{2+} szignálrendszerének különbözősége állhat (8/D. ábra).

5.1.4. P2X és P2Y receptor altípus mRNS-ek is jelen vannak a Corti szervben; a PPADS megmutatta a pillér- vs. Deiters és Hensen sejtek funkcionális purinerg receptor profiljának különbözőségét

A P2X és a P2Y receptor alegységeket kódoló mRNS-ek expressziójának vizsgálatával arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az ATP által kiváltott intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésben mely P2 receptor altípusok játszhatnak szerepet a halló CD-1 egerek Corti szervében. RT-PCR módszerrel a 15-19 napos CD-1 egerek Corti szervében P2X2, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7 valamint P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, P2Y14 receptor

altípusok mRNS-ének jelenlétét mutattuk ki (9/A. ábra). Az RT-PCR eredmények alátámasztják a Ca^{2+} imaging kísérletek eredményeit: P2X és P2Y receptorok is szerepet játszhatnak az ATP válasz kialakításában.



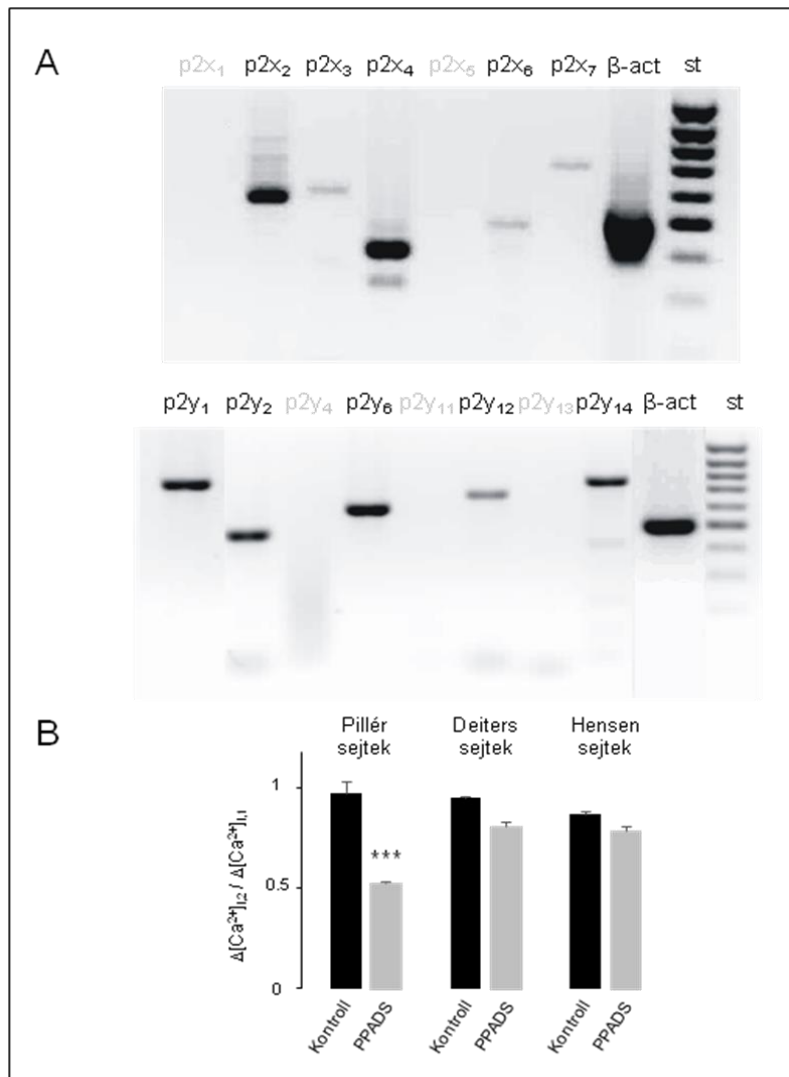
8. ábra: A támasztósejtekben az ATP által kiváltott Ca^{2+} válaszok az extracelluláris Ca^{2+} -tól és a belső raktárakból felszabaduló Ca^{2+} -tól is függenek.

A-B) Mintagörbék a külső Ca^{2+} megvonás, illetve CPA perfúzió ATP-kiváltotta Ca^{2+} válaszokra gyakorolt hatásának bemutatására a különböző támasztósejtekben. A fekete pontok az ATP ($50 \mu\text{M}$) ingerlést mutatják. A Ca^{2+} mentes oldat (+ 1 mM EGTA) és a CPA ($10 \mu\text{M}$) adását a vízszintes vonalak jelzi. A skála vonalak a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást és az időt mutatják.

C) A Ca^{2+} megvonás, illetve a CPA ($10 \mu\text{M}$) hatása az $50 \mu\text{M}$ ATP-vel kiváltott Ca^{2+} tranziensekre. Az oszlopok a Ca^{2+} megvonás/CPA adás jelenlétében (2. ATP válasz), ill. hiányában (1. ATP válasz) regisztrált tranziens amplitúdók arányának átlagait (+ SEM) mutatják ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,2} / \Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,1}$). Pillérsejtek, $n = 9, 7, 8$; Deiters sejtek, $n = 14, 12, 10$ és Hensen sejtek, $n = 20, 14, 7$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

D) A CPA ($10 \mu\text{M}$) megemelte a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t mindhárom sejtípusban: enyhébben a pillér- ($n = 8$), kifejezettebben a Deiters- ($n = 10$) és a Hensen sejtekben ($n = 7$; * $p < 0.05$ a pillérsejtekkel összehasonlítva). Az oszlopok a CPA-ra adott átlag $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést mutatják (nM; + SEM).

A széles spektrumú, nem szelektív purinerg receptor antagonistá PPADS 30 μM koncentrációban gátolta a pillérsejtekben az ATP kiváltotta Ca^{2+} választ, ezzel szemben a Deiters- és a Hensen sejtek Ca^{2+} válaszában nem okozott szignifikáns változást (**9/B. ábra**). Ez arra utal, hogy funkcionális különbség van a pillér- vs. Deiters- és Hensen sejtek funkcionális purinerg receptor populációi között.



9. ábra: Az RT-PCR elemzés többféle P2X és P2Y receptor altípus expresszióját tárta fel a halló egerek Corti szervében. A PPADS hatása különböző funkcionális purinerg receptor populációt valószínűsít a pillér- vs. Deiters- és Hensen sejtekben.

A) P2X2, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7 és P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, P2Y14 receptorokat kódoló mRNS-ek (fekete betűk) voltak kimutathatók a Corti szervben. A P2X és P2Y

receptorokat kódoló mRNS méretét 100 bp-os létra (st) segítségével azonosítottuk. Belső kontrollnak a béta-aktint (β -act) használtuk.

B) Az oszlopok a PPADS (30 μ M) jelenlétében (2. ATP ingerlés), illetve annak hiányában (1. ATP ingerlés) kiváltott Ca^{2+} válaszok arányát (+ SEM) mutatja ($\Delta[Ca^{2+}]_{i,2} / \Delta[Ca^{2+}]_{i,1}$). Pillérsejtek, $n = 9, 9$; Deiters sejtek, $n = 14, 14$ és Hensen sejtek, $n = 20, 7$. *** $p < 0.001$.

5.2. Az NMDA receptorok és az NO cochleáris DA felszabadulást befolyásoló hatása

5.2.1. A NO fokozza a cochleáris DA felszabadulást, amely nem áll tónusos NO szabályozás alatt

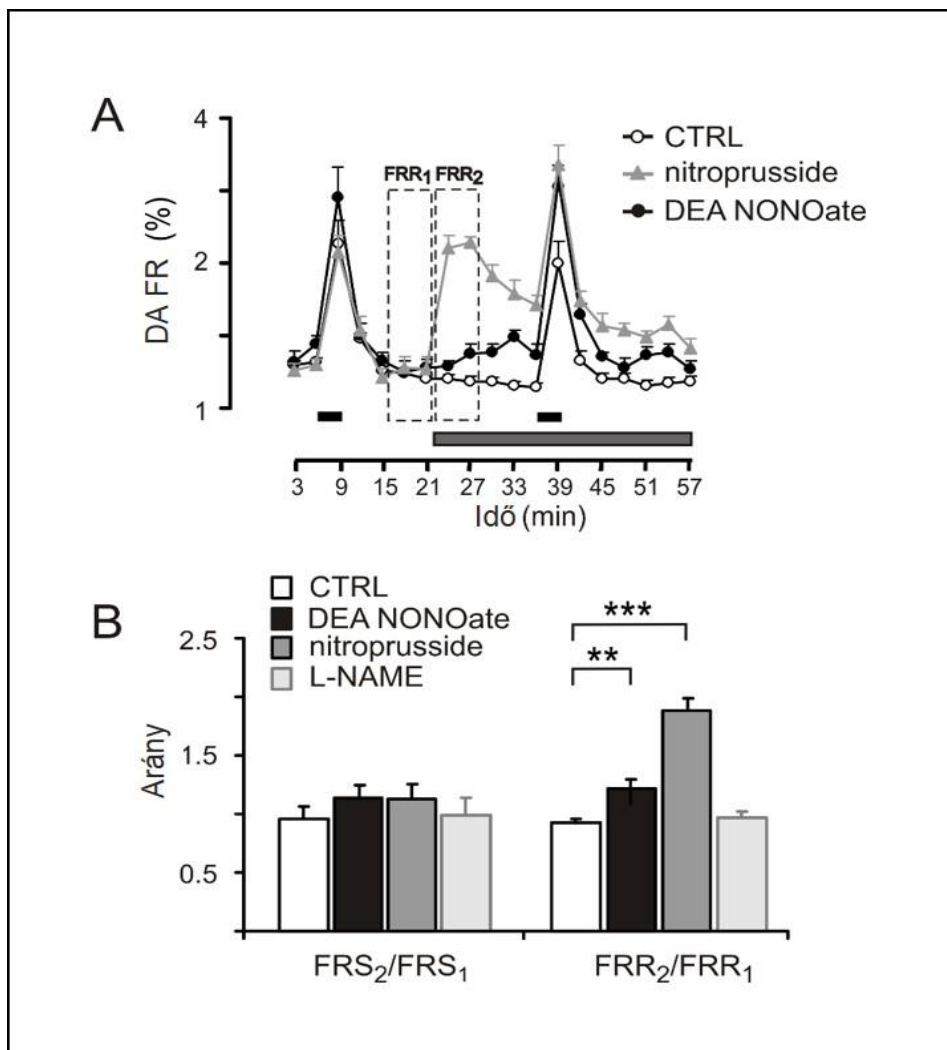
A dopaminerg LOC rostokon végzet kísérleteink során először a NO cochleáris dopamin felszabadulásra kifejtett hatását vizsgáltuk. A NO donor nitroprusszid nátrium (300 μ M) perfuzátumhoz való hozzáadása során jelentős emelkedést észleltünk a nyugalmi DA felszabadulásban ($FRR_2/FRR_1 = 1.84 \pm 0.10$; $p < 0.001$). Azonban a nitroprusszid stimuláló hatása csak a nyugalmi DA felszabadulásra terjedt ki, az elektromos téringerléssel kiváltott DA felszabadulást nem fokozta ($FRS_2/FRS_1 = 1.13 \pm 0.12$; $p = 0.51$; **10/A–B. ábra**).

Megerősítendő az előző eredményünk NO specificitást, a szelektív NO donor DEA-NONOate (100 μ M) hatását is megvizsgáltuk. A DEA-NONOate szintén növelte a nyugalmi DA felszabadulást, bár kisebb mértékben ($FRR_2/FRR_1 = 1.17 \pm 0.03$; $p < 0.01$; **10/A–B. ábra**). Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a DA felszabadulás tónusos NO szabályozás alatt áll-e. A nem szelektív NOS gátló L-NAME 100 μ M dózisban nem befolyásolta a DA felszabadulást ($FRS_2/FRS_1 = 1.05 \pm 0.11$; $FRR_2/FRR_1 = 1.02 \pm 0.06$), ami a tónusos moduláció hiányát jelzi (**10/B. ábra**).

5.2.2 Az NMDA fokozza a DA felszabadulást a LOC rostokból, részben NO közvetítésével

Az IHC–hallóneuron szinapszis neurotranszmittere a Glu. Megvizsgáltuk, hogy a glutamát ionotrop receptorának, az NMDA receptornak az aktivációja befolyásolja-e a dopamin felszabadulást a LOC rostokból. 100 μ M NMDA Mg^{2+} -mentes oldatban, glicin jelenlétében a nyugalmi DA felszabadulásban szignifikáns emelkedést okozott ($n = 12$, **11/A., C. és D. ábra**). Az NMDA indukálta DA felszabadulás időbeli karakterizálása céljából megmértük a nyugalmi DA felszabadulást az NMDA adásának kezdetekor (az

NMDA adás 0-6. percében, a perfúzió 21-27. perce között; FRR₂) és egy későbbi fázisban (az NMDA adás 9-15. percében, a perfúzió 30-36. perce között; FRR₂; n=12; 11/a. és C. ábra).



10. ábra: Az exogén NO fokozza a nyugalmi DA felszabadulást, endogén NO tónus nem mutatható ki.

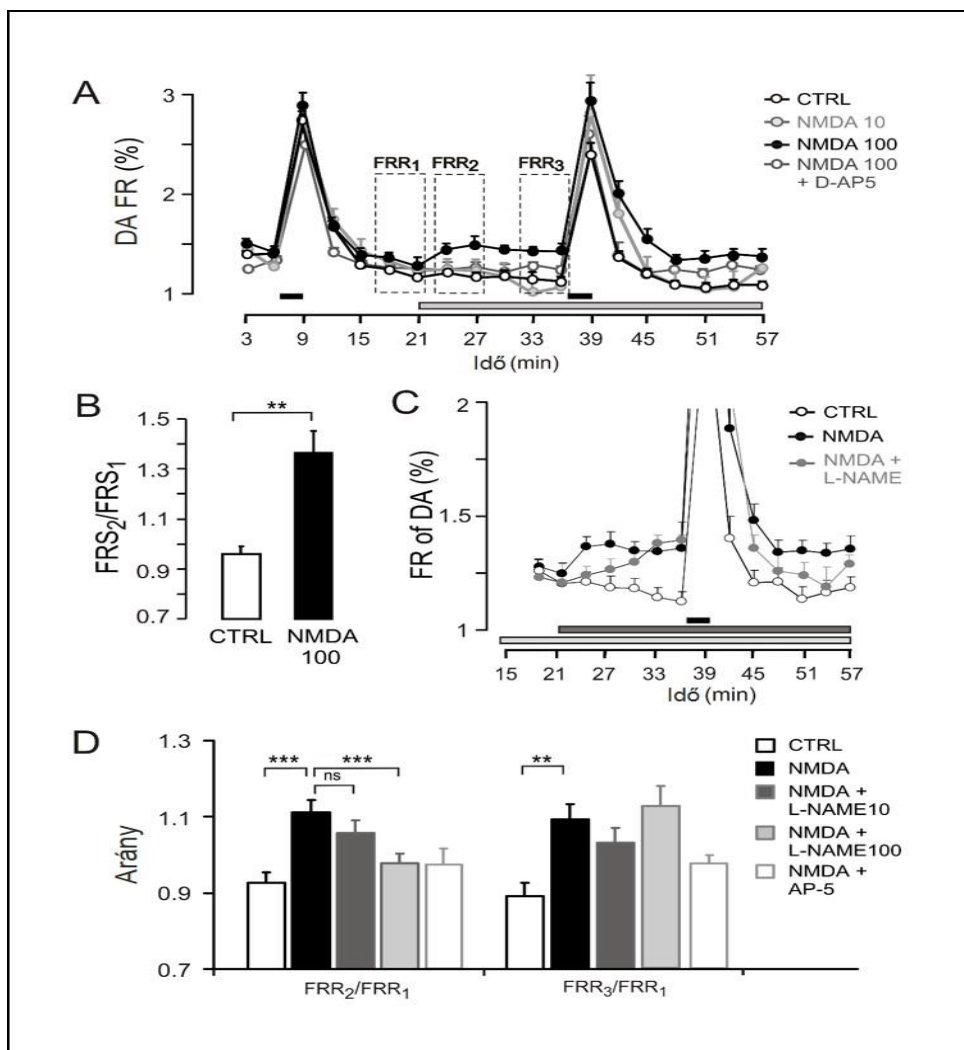
A) DA felszabadulás kontroll körülmények között, valamint nitroprusszid nátrium (300 μ M), illetve DEA NONOate (100 μ M) hozzáadása mellett. A vízszintes rövid fekete vonalak az elektromos téringerlést jelzik (FRS₁ és FRS₂). A vizsgált anyagokat a 21. perctől adtuk a perfúzióhoz, ezt a vízszintes szürke vonallal jelöltük.

B) Az oszlopdiaagrammok a nitroprusszid nátrium (300 μ M), a DEA NONOate (100 μ M), és az L-NAME (100 μ M) elektromos ingerléssel kiváltott (FRS₂/FRS₁) és alap (FRR₂/FRR₁) DA felszabadulásra kifejtett hatását mutatják (átlag + SEM). A nitroprusszid nátrium és a DEA NONOate szignifikánsan megemelte a nyugalmi DA felszabadulást (n = 8; ***p < 0.001, **p < 0.01).

A kontroll kísérletekben a különböző fázishoz tartozó frakciók összehasonlításával igazoltuk, hogy a nyugalmi felszabadulás meglehetősen stabil ($FRR_2/FRR_1 = 0.96 \pm 0.02$; $FRR_3/FRR_1 = 0.92 \pm 0.03$). 100 μM NMDA mindkét fázisban szignifikánsan megemelte a nyugalmi DA felszabadulást ($FRR_2/FRR_1 = 1.12 \pm 0.04$; $p < 0.01$; $FRR_3/FRR_1 = 1.11 \pm 0.04$; $p < 0.001$), 17 ill. 20%-os növekedést okozva. Az FRR_3 és FRR_2 fázisokban mért DA felszabadulás között nem volt szignifikáns eltérés. A direkt felszabadulást fokozó hatásán túl, az NMDA az elektromosan kiváltott DA felszabadulást is fokozta ($FRS_2/FRS_1 = 1.36 \pm 0.09$, $n = 10$; $p < 0.05$; **11/B. ábra**), bár 10 μM koncentrációban érdemben sem a nyugalmi, sem az elektromosan stimulált DA felszabadulást nem növelte (**11/A. ábra**).

Eldöntendő, hogy az NMDA indukálta DA felszabadulás köthető-e NO képződéshez, az NMDA hatást L-NAME jelenlétében is megvizsgáltuk. L-NAME-t perfundáltunk a preperfúziótól kezdve a mintagyűjtés végéig. Alacsony (10 μM L-NAME) koncentrációban nem befolyásolta az NMDA kiváltotta DA felszabadulást ($p = 0.139$; **11/D. ábra**). Ezzel szemben 100 μM L-NAME szignifikánsan lecsökkentette a DA felszabadulást, de csak a nyugalmi felszabadulás első fázisban ($FRR_2/FRR_1 = 0.99 \pm 0.04$, $n=7$; $p < 0.001$). A későbbi fázisban már nem volt kimutatható hatása ($FRR_3/FRR_1 = 1.13 \pm 0.06$, $n=7$; $p = 0.879$; **11/C-D. ábra**).

Az NMDA hatás specificitásának ellenőrzése céljából szelektív NMDA antagonistá AP-5-öt perfundáltunk a preperfúziótól kezdve 50 μM koncentrációban. Az AP-5 teljesen legátolta a cochleában az NMDA okozta nyugalmi DA felszabadulást (**11/D. ábra**) és megakadályozta az NMDA téringerléssel kiváltott DA felszabadulást fokozó hatását is ($FRS_2/FRS_1 = 1.03 \pm 0.07$, ami nem szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest).



11. ábra: Az NMDA receptorok részben NO közreműködésével váltják ki a DA felszabadulást a cochleában.

A) DA felszabadulás kontroll körülmények között, valamint NMDA (10 és 100 μM), és D-AP-5 (50 μM) hozzáadása mellett. Az elektromos téringertést (FRS₁ és FRS₂) vízszintes rövid fekete vonalakkal jelöltük. A kontroll nyugalmi felszabadulást (FRR₁), a nyugalmi felszabadulásra gyakorolt droghatás korai fázisát (FRR₂, a mintagyűjtés 21-27. perce; az NMDA perfúziójának 0-6. perce), illetve a droghatás késői fázisát (FRR₃, a mintagyűjtés 30-36. perce; az NMDA perfúziójának 9-15. perce) a szaggatott vonalú álló téglalapok jelzik. Az NMDA-t a 21. perctől kezdtük adni, ezt a vízszintes szürke vonal jelzi.

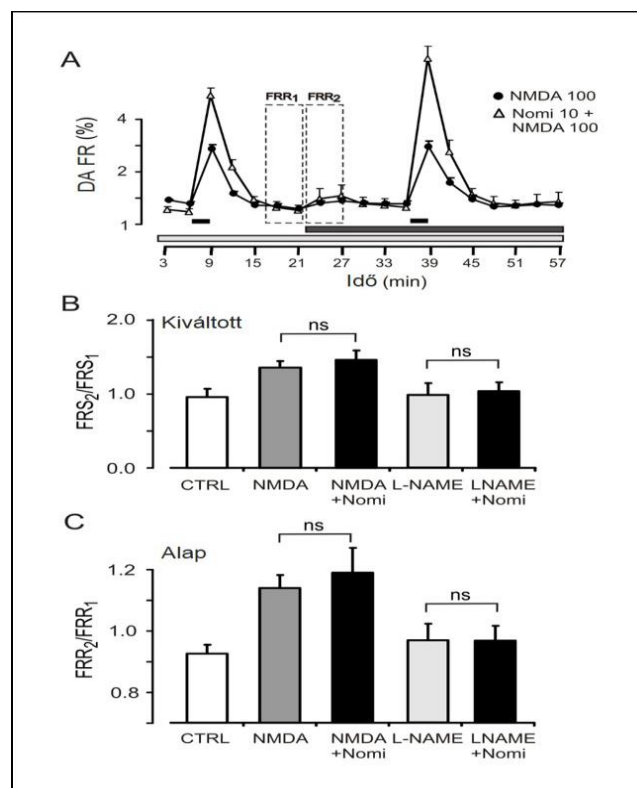
B) Az összesítő oszlopdiagram az NMDA (100 μM) téringertéssel kiváltott DA felszabadulásra (FRS₂/FRS₁) való hatását mutatja (átlag + SEM; n = 10; **p < 0.01).

C) Nyugalmi DA felszabadulás kontroll körülmények között, valamint NMDA (100 μM) és NMDA plusz L-NAME együttes (100 - 100 μM) hozzáadása mellett. Az NMDA-t a 21. perctől (vízszintes szürke vonal), az L-NAME-t a preperfúziótól kezdve (világosszürke vonal) tettük a perfúziós oldathoz

D) Az oszlopdiaagrammok az L-NAME (10 és 100 μM) és az AP-5 (50 μM) NMDA-kiváltotta nyugalmi DA felszabadulásra kifejtett hatását mutatják. Az L-NAME kivédte a felszabadulás első fázisát (FRR2/FRR1), de nem befolyásolta a második fázist (FR3/FRR1; átlag + SEM; n = 10; **p < 0.01, *p < 0.05).

5.2.3. Az NMDA/NO hatásban a DA visszavétel nem játszik szerepet

Mivel korábban már kimutatták, hogy a NO a központi idegrendszerben a DA visszavétel gátlása révén fokozza a DA felszabadulást (Kiss, Zsilla et al. 2004), megvizsgáltuk, hogy a LOC efferens rostok esetében az NMDA kiváltotta DA felszabadulásban szerepet játszik-e az NO közvetítette DA visszavétel gátlás. A kísérlet teljes ideje alatt jelen lévő DA visszavételt gátló nomifensin (10 μM) nem befolyásolta L-NAME-nak (100 μM) sem a nyugalmi DA felszabadulást okozó, sem a stimulált felszabadulást fokozó hatását, így a visszavétel szerepe az NMDA/NO hatásban nem igazolódott ($\text{FRS}_2/\text{FRS}_1 = 1.04 \pm 0.11$; $\text{FRR}_2/\text{FRR}_1 = 0.97 \pm 0.05$, n = 5; p < 0.01; *12/A–C ábra*).



12. ábra: A DA visszavétel nem játszik szerepet az NMDA-indukálta DA felszabadulás fokozódásában.

A) Az NMDA (100 μM) DA felszabadulásra gyakorolt hatása nomifensin jelenlétében (10 μM ; áttetsző szürke háromszögek) és hiányában (fekete pontok). Az NMDA a 21. perctől (vízszintes sötétszürke vonal), a nomifensin a preperfúziótól kezdve (vízszintes világosszürke vonal) került a perfúzióba. Az elektromos téringert (FRS1 és FRS2) a rövid fekete vonalak jelzik.

B) Az oszlopdiagram az NMDA (100 μM) és az L-NAME (100 μM) elektromos téringerttel kiváltotta DA felszabadulásra kifejtett hatását mutatja a nomifensin (10 μM) szimultán applikációjával, illetve anélkül.

C) Az oszlopdiagram az NMDA (100 μM) és az L-NAME (100 μM) nyugalmi DA felszabadulásra kifejtett hatását mutatja a nomifensin (10 μM) szimultán applikációjával, illetve anélkül. Látható, hogy a nomifensin sem az NMDA, sem az L-NAME hatását nem befolyásolta szignifikánsan. Átlag + SEM; n = 5-6; ns = nem szignifikáns.

6. Megbeszélés

6.1. Purinerg Ca^{2+} szignalizáció halló egerek támasztósejtjeiben

6.1.1. ATP és Ca^{2+} jelátvitel a cochleában – a hemicochlea preparátum jelentősége

A sejten belüli Ca^{2+} szignálok számtalan élettani és kórélettani folyamatot szabályoznak másodlagos hírvivőként (Bootman, Collins et al. 2001), többek között a belsőfülben, a csigában is (Ceriani and Mammano 2012). A cochlea szabályozásában meghatározó szerepet játszó purinerg rendszer is kiemelt másodlagos hírvivőként használja az intracelluláris Ca^{2+} -ot. A purinerg Ca^{2+} szignalizáció már az embrionális érési folyamatokban is megfigyelhető, de a posztembrionális időszakban is komoly jelentősége van a hallás élettani folyamatainak regulációjában, valamint patológiás körülmények között is (Housley, Jagger et al. 2002, Gale, Piazza et al. 2004, Tritsch, Yi et al. 2007, Housley, Bringmann et al. 2009, Mammano 2013). A csigában az ATP szabályozó hatása egyrészt “hormonszerű”, tónusos mechanizmus, ami a stria vascularisból történő ATP felszabaduláson alapul, és elsősorban a cochlea aktív hangerősítését szabályozza zajterhelés esetén (Munoz, Kendrick et al. 2001). Emellett a Corti-féle szervben helyileg is felszabadul ATP, mely auto- és parakrin reguláló hatással bír. Felszabadul ATP sérült szőrsejtekből, mely a környező támasztósejtek között haladó, intercelluláris Ca^{2+} hullámot vált ki (Gale, Piazza et al. 2004, Piazza, Ciubotaru et al. 2007), de a támasztósejtek maguk is képesek ATP-t felszabadítani connexin hemicsatornákon keresztül (Zhao, Yu et al. 2005). Ilyen jellegű parakrin ATP szabályozást már kimutattak gliában és glia jellegű szövetekben (Scemes and Spray 2012, Vardjan and Zorec 2015, Voigt, Grosche et al. 2015), melyhez hasonló felépítésű és szerepű a támasztósejt-rendszer is. Az ATP-kiváltotta Ca^{2+} jeleket eddig elsősorban izolált sejtes kísérletekben (Ashmore and Ohmori 1990, Dulon, Moataz et al. 1993, Dulon, Blanchet et al. 1994, Matsunobu and Schacht 2000, Chung and Schacht 2001), illetve embrionális vagy újszülött rágcsálókban (Gale, Piazza et al. 2004, Piazza, Ciubotaru et al. 2007, Anselmi, Hernandez et al. 2008) vizsgálták, miközben az egerek két hetes életkorukig nem hallanak (Ehret 1976), így az újszülött vagy embrionális állatokból nyert eredmények, bár kétségtelen fejlődésbiológiai jelentőséggel bírnak, nem tükrözik az érett, halló állatok cochleájában zajló folyamatokat. A hagyományos kísérletes modellek nem őrzik meg a Corti szerv bonyolult felépítését, illetve sejtenyészetekben metabolikus átalakulás mehet végbe, mely befolyásolja az

eredményeket. Modellünk előnyét az adja, hogy lehetőséget nyújt egyszerre több, különböző támasztósejt szimultán, kalibrált Ca^{2+} szint vizsgálatára az eredeti, in vivo anatómiai helyzetet megközelítő szöveti környezetben, akut preparátumként, halló egérben.

Az megőrzött anatómiai struktúra azt is jelenti, hogy modellünkben a támasztósejtek közötti összeköttetés, a gap junction hálózat épen marad. A Corti szervben gap junction-okat kizárólag a támasztósejtek között mutattak ki, míg a szenzoros szőrsejtek között, vagy a szenzoros és a nem szenzoros sejtek között nincs ilyen kapcsolat (Kikuchi, Kimura et al. 1995, Zhao and Santos-Sacchi 2000). Habár a szőrsejtek és a hozzá kapcsolódó afferens idegek végzik a direkt hangátalakítást, elektromos jelgenerálást, és annak továbbítását a központi idegrendszerbe, a támasztósejtek közötti gap junction hálózat intakt működése is létfontosságú a hallószerv élettani működéséhez. A gap junction hálózat hiánya, kóros működése süketiséget okoz (Beltramello, Piazza et al. 2005, Zhang, Tang et al. 2005). A gap junction-ok elsődlegesen Cx26 és Cx30 connexin fehérjékből épülnek fel a cochleában (Lautermann, ten Cate et al. 1998, Forge, Becker et al. 2003), melyek közül a Cx30 elsősorban kationok számára átjárható (Manthey, Banach et al. 2001), míg a Cx26 az ionok mellett hírvivő molekulák számára is (Beltramello, Bicego et al. 2003), aminek köszönhetően például ATP, ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP), ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) és inozitol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) is részt tudnak venni az intercelluláris jelátvitelben. A fentieknek megfelelően a gap junction-ok elsődleges szerepe a jelátvitel és az ion homeosztázis biztosítása (Santos-Sacchi 1985). Ez utóbbi funkciójukon belül ki kell emelni az endolympha K^+ tartalmának shuntölését (Boettger, Hubner et al. 2002), mellyel a Corti szerv érzékenységét tudják csökkenteni patológiás körülmények között, elkerülve vagy mérsékelve ezáltal a szerv károsodását. Az érett egyedekben zajló élettani és patológiás folyamatok szabályozása mellett a támasztósejtek a cochlea fejlődésében is fontos szabályozó szerepet játszanak. Még a hallás kialakulása előtt, spontán ATP felszabadításukon keresztül aktiválják az IHC-ket és elősegítik az IHC-hallóneuron szinapszis valamint a hallópálya érését (Tritsch, Yi et al. 2007).

6.1.2. Az ATP kiváltotta Ca^{2+} válaszok karakterisztikája a támasztősejtekben

A támasztősejtekben Ca^{2+} válaszokat kiváltó ATP koncentrációját a felszabadulás vagy a receptorok környékén metodikai nehézségek miatt legfeljebb csak becsülhetjük, de pontosan meghatározni nem tudjuk (Lazarowski, Boucher et al. 2003), és ez a megállapítás a cochleára is igaz (Housley, Marcotti et al. 2006). Újszülött állatokból származó támasztősejt tenyészetben intra- és intercelluláris Ca^{2+} oszcillációt figyeltek meg már nagyon alacsony, nanomoláris koncentrációjú ATP helyi adását követően is (Gale, Piazza et al. 2004, Piazza, Ciubotaru et al. 2007), mely jelenség egy lassú lecsengésű Ca^{2+} szignálba ment át az ATP koncentrációjának pár mikromolra történő emelésének hatására. Érett állatokból származó, izolált támasztősejtekben igen széles koncentráció tartományban (0.01-1000 μM) tesztelték az ATP Ca^{2+} válaszokat kiváltó hatását (Ashmore and Ohmori 1990, Dulon, Moataz et al. 1993, Matsunobu and Schacht 2000, Chung and Schacht 2001), leggyakrabban azonban 10 és 100 μM ATP-t használtak a kísérletek folyamán. Felnőtt tengerimalacokból származó in situ preparátum Deiters- (Lagostena and Mammano 2001) és Hensen sejteiben (Lagostena, Ashmore et al. 2001) is megfigyeltek ATP indukálta Ca^{2+} válaszokat. A Hensen sejtek esetében az EC_{50} értéket ~50 μM -nak találták, majd a 100 μM (pipettából történő puffantás) és az 1 mM ATP (caged ATP) által kiváltott tranziensek tulajdonságait vizsgálták tovább. A támasztősejtek különböző közleményekben meghatározott ATP érzékenységének közvetlen összehasonlítását megnehezíti a különböző preparátumok (faj, életkor, preparálás) és különböző ATP applikációk (pipetta puff, perfúzió, caged ATP) alkalmazása. A mi in situ hemicochlea preparátumunkban 1 és 100 μM közötti koncentrációjú ATP perfúziója dóziszfüggő módon váltott ki reverzibilis és ismételhető Ca^{2+} szignálokot mindhárom vizsgált sejttypusban (pillér-, Deiters- és Hensen sejt).

Figyelembe véve az ATP adásunk módszerét (rövid perfúzióban; l. Módszerek), a sejtek felszínén lévő receptorokat valójában elérő ATP koncentráció valószínűleg alacsonyabb mint a perfúzióra kerülő oldat ATP koncentrációja. Más megfogalmazásban, a sejtek ATP érzékenysége valószínűleg kicsit magasabb. Mindazonáltal, mivel a három támasztősejttypus eredményeit egy preparátumban, azonos kondíciók mellett mértük, valószínűleg megbízhatóbban mutatják a pillér sejtek alacsonyabb érzékenységét, amelyekben még 10 μM ATP koncentráció sem okozott szignifikáns $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést, szemben a Deiters- és Hensen sejtekben megfigyelt egyértelmű válasszal. A kiváltott tranziensek amplitúdója és a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$, amit abszolút értékekben (nM)

mértünk, azonos nagyságrendben volt a felnőtt tengerimalacból izolált Deiters- és Hensen sejtekben mért értékekkel (Lagostena, Ashmore et al. 2001, Lagostena and Mammano 2001), bár a korrekt összehasonlítást nehezíti, hogy ezekben a kísérletekben csak egy hullámhosszú festéket, vagy nem kalibrált arány- illetve $\Delta F/F$ értékeket használtak. A fenti, Mammano munkacsoport által végzett vizsgálatsorozatokban mind a Deiters, mind a Hensen sejtekben megfigyeltek deszenzitizációt (Lagostena, Ashmore et al. 2001, Lagostena and Mammano 2001), melyet mi is tapasztaltunk, ha a két ATP stimulus közti idő intervallum 10 vagy még inkább ha 5 perc volt. 20 perces időközökben végzett ingerlés esetén nem figyeltünk meg szignifikáns amplitúdó különbséget az egyes Ca^{2+} jelek között, ami lehetőséget adott a belső standardos kísérleti elrendezés alkalmazására.

Az ATP válaszok karakterisztikáját meghatározza, hogy mind az ionotrop P2X, mind a metabotrop P2Y receptorcsaládnak számos altípusa van. Ezidáig 7 különböző P2X receptor expresszióját sikerült kimutatni, melyek 3 alegységből, homo- vagy heteromer formában épülnek fel, azonban a P2X6 receptor csak heteromultimer formában funkcionál (Burnstock 2007). A P2X receptorok nem szelektív kationcsatornaként működnek, némileg eltérő Na^+ és Ca^{2+} áteresztő képességgel. Ez alól kivétel a P2X7 receptor, amely magas koncentrációjú, tartós ATP ingerlés hatására nagyméretű molekulák részére is átjárhatóvá válik. A P2Y receptorcsaládhoz 8 különböző humán receptor tartozik, azonban ezeken túl még több receptor-altípust mutattak ki nem emlősökben. A P2Y receptorok G-fehérjék közvetítésével fejtik ki hatásukat. A P2Y1, Y2, Y4, és Y6 receptorok aktivációja inozitol-triszfoszfát (IP_3) szintézis fokozódásához vezet, ezen keresztül pedig intracelluláris Ca^{2+} választ vált ki. A többi P2Y receptor az (Burnstock 2007) adenilát-cikláz rendszeren fejt ki hatását, vagy esetleg azzal szinkron az IP_3 termelést is befolyásolja.

Kérdés volt, hogy a pillér-, Deiters- és Hensen sejtek ATP kiváltotta Ca^{2+} válaszában melyik P2 receptor vesz részt. Az ionotrop P2X receptorok szerepének vizsgálatára kivettük a perfúziós oldatból a Ca^{2+} -ot, míg a metabotrop P2Y receptorok részvételének megállapítására a belső Ca^{2+} raktárakat kiürítő SERCA pumpa gátló CPA-t adtunk a perfúziós oldathoz. Mindkét beavatkozás során a Ca^{2+} szignálok amplitúdójának jelentős csökkenését észleltük, ami alapján feltételezhetjük, hogy mindegyik sejtípusban mind a P2X, mind a P2Y receptorok részt vesznek az ATP indukálta Ca^{2+}

válaszok kialakulásában. Habár nem fehérje szinten, és nem sejt-specifikusan, de ezt az eredményünket támogatja RT-PCR analízisünk is, ami P2X_{2,3,4,6,7} és P2Y_{1,2,6,12,14} receptorok mRNS-einek jelenlétét mutatta ki hasonló egerek Corti szervében.

A széles spektrumú purinerg receptor antagonistá PPADS alkalmazása további információval szolgált a támasztósejtek purinerg receptorainak funkcionális expresszióját illetően. A PPADS gátolja számos P2X és néhány P2Y receptor működését (Gever, Cockayne et al. 2006, von Kugelgen 2006). Gátló hatása a pillér sejtekben és hatástalansága a Deiters- és a Hensen sejtekben eltérő funkcionális purinerg receptor populációt valószínűsít a pillér- vs. Deiters/Hensen sejteken.

Az extracelluláris Ca²⁺ megvonás ATP indukálta Ca²⁺ válaszra való gátló hatását pillér, Deiters- és Hensen sejtekben már több kísérleti modellben is vizsgálták, jellemzően izolált sejteken (Ashmore and Ohmori 1990, Dulon, Moataz et al. 1993, Matsunobu and Schacht 2000, Chung and Schacht 2001) és/vagy in situ preparátumon (Lagostena, Ashmore et al. 2001, Lagostena and Mammano 2001), de egyik közlemény sem vizsgálta mindhárom támasztósejt típuson ugyanabban a preparátumban szinkron. Vélhetően ez az oka annak, hogy a különböző vizsgálatok a Ca²⁺ mentes környezet intracelluláris Ca²⁺ tranziens gátló hatékonyságát nagyon különböző mértékűnek találták, beleértve a válasz teljes eltörlését is Hensen sejtekben (Dulon, Moataz et al. 1993).

Az ER Ca²⁺ raktár kiürítésének hatását jóval kevesebben vizsgálták, és azt is újszülött P1-3 patkányokból készült szövetkultúrán (Gale, Piazza et al. 2004, Piazza, Ciubotaru et al. 2007). Legjobb tudomásunk szerint mindkét eljárás (külső Ca²⁺ megvonás, illetve a belső raktárak kiürítése) hatását egy modellen, különösen egyszerre mindhárom támasztósejt típusban, eddig nem vizsgálta meg senki.

6.1.3. Purinerg Ca²⁺ szignalizációs különbségek az egyes támasztósejt típusok között

Kísérleteink során nem csak azt találtuk, hogy az ATP kiváltotta Ca²⁺ tranziens az extracelluláris Ca²⁺-on kívül az intracelluláris Ca²⁺ raktáraktól is függ, de megfigyelhető volt, hogy ez a Deiters és a Hensen sejtekben kifejezettebb volt, mint a pillérsejtekben. Különböző típusú sejtekben már korábban kimutatták, hogy a SERCA pumpa gátló thapsigargin vagy a CPA felfedi az ER Ca²⁺ szivárgást (Hofer, Curci et al. 1996, Dyachok, Tufveson et al. 2004), beleértve a gliaszövetet is (Beck, Nieden et al. 2004).

A szivárgás mértéke jellemzi az endoplazmás retikulum kapacitását, illetve permeabilitását, valamint befolyásolja töltöttségi állapotát, ami viszont kihat a Ca^{2+} válaszok kialakulására (Camello, Lomax et al. 2002). Így a Deiters, de még inkább a Hensen sejtekben észlelt kifejezettebb ER Ca^{2+} szivárgás a belső raktárak Ca^{2+} szignalizációban betöltött nagyobb aktivitására utal, szemben a pillér sejtekkel. Ez magyarázhatja azt is, hogy a Hensen illetve a Deiters sejtek esetében miért észleltünk a külső Ca^{2+} megvonás nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra való hatásával szembeni nagyobb rezisztenciát. Az extracelluláris Ca^{2+} megvonása a pillérsejtekben okozta leggyakrabban az alap $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lassú csökkenését, míg ezt csak ritkán figyeltünk meg a Deiters sejtekben, és szinte nem fordult elő a Hensen sejtekben.

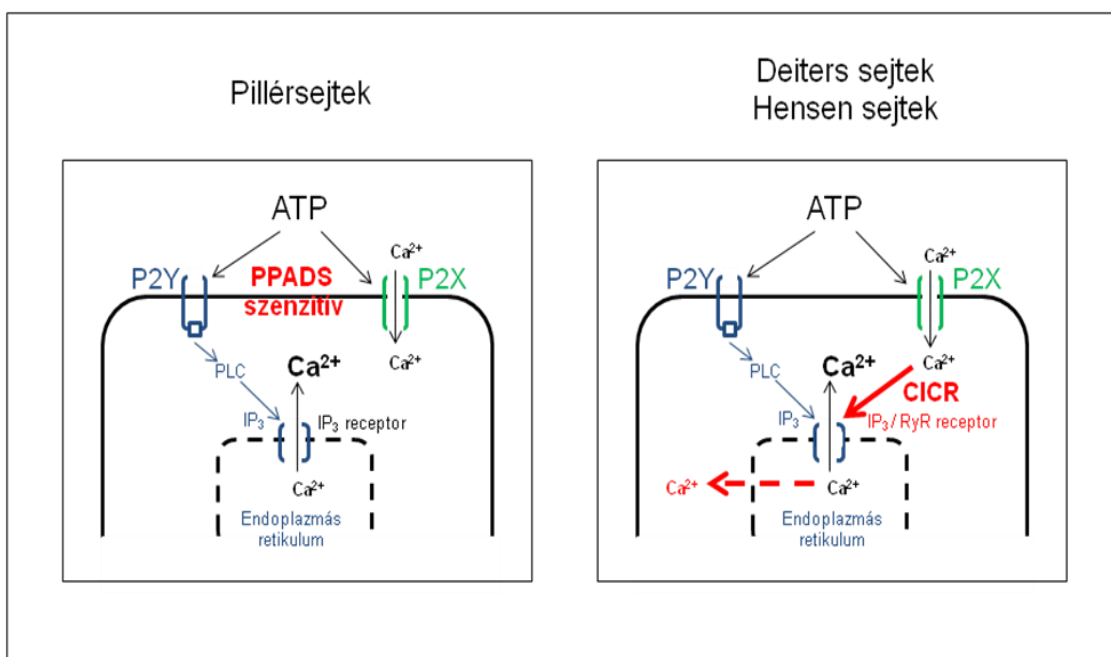
Míg a pillérsejtekben a külső Ca^{2+} megvonás és a belső raktárak kiürítése okozta válasz amplitúdó csökkenés összege megközelítőleg megegyezett a kontroll kísérletekben mért válaszok amplitúdójával, addig a Deiters és a Hensen sejtekben ez az összeg jóval meghaladta a kontroll válaszok amplitúdójának nagyságát. Az utóbbi sejtípusok külső- és belső Ca^{2+} -tól függő ATP válaszainak szupralineáris additivitása - szemben a pillérsejteknel tapasztalt lineáris additivitásával - az extra- és az intracelluláris Ca^{2+} függő ATP szignalizáció szinergikus interakciójára utal. A jelenség hátterében a Ca^{2+} indukálta Ca^{2+} felszabadulás (CICR) állhat, melynek lényege, hogy a belső Ca^{2+} raktárak kiürítése nem csupán az eredendően belső raktárakra épülő Ca^{2+} jelek kialakulását, de a külső, extracelluláris térből származó Ca^{2+} jelek belső raktárak általi felerősítését is gátolja. Jelen esetben nem csak önmagában a metabotrop P2Y receptorok, de az ionotrop P2X receptorok működésére is kihat. Ez oda-vissza igaz: a külső Ca^{2+} megvonása nem csak a beáramló Ca^{2+} -ból felépülő szignálokat gátolja, hanem blokkolja a belső raktárak erősítő funkcióját is a Ca^{2+} felszabadításuk indításához szükséges primer Ca^{2+} szignál létrejöttének gátlásával. A CICR egyúttal magyarázatot adhat a CPA masszív gátló hatására, amely meghaladta az extracelluláris Ca^{2+} megvonásának hatását is.

CICR során az extracelluláris térből belépő Ca^{2+} a belső raktárakból is felszabadít Ca^{2+} -ot ryanodine (RyR) vagy IP_3 receptorokon keresztül. A klasszikus felfogás szerint a CICR RyR-ok segítségével valósul meg, mert az IP_3 receptorokon keresztüli CICR esetén a folyamat egy másik hírvivőtől, konkrétan az IP_3 jelenlététől is függ (Endo 2009). RyR-okon alapuló CICR-t már megfigyeltek a belsőfülben, a szőrsejtekben és a ganglion spirale neuronjaiban (Beurg, Hafidi et al. 2005, Grant, Slapnick et al. 2006,

Morton-Jones, Cannell et al. 2008), azonban a RyR-ok jelenléte, illetve szerepe ellentmondásos a támasztósejtekben. Piazza és munkatársai szerint újszülött patkányok támasztósejtjeinek ATP indukálta Ca^{2+} jelátvitelében nincs szerepe a ryanodine receptoroknak (Piazza, Ciubotaru et al. 2007). Ezzel szemben Morton-Jones és kutatócsoportja felnőtt patkányok Deiters sejtjeinek csúcsi régiójában nagy mennyiségben talált RyR-okat (Morton-Jones, Cannell et al. 2006), és a Hensen sejtek közötti jelátvitelt is befolyásolja a RyR agonista koffein és ryanodin (Sato, Handa et al. 1998), valamint fiatal tengerimalacok cochleájának mikromechanikájára is kihat ez a két vegyület (Bobbin 2002). Liang és kollégáinak kutatási eredménye segíthet feloldani az ellentmondásokat, mivel ők kimutatták, hogy a RyR-ok expressziója az egyedfejlődés során változik (Liang, Huang et al. 2009). Míg újszülött patkányokban nem sikerült RyR-ok jelenlétét igazolni a támasztósejtekben, addig 10 napos újszülöttekben már mindegyik támasztósejtben ki lehetett mutatni, felnőtt állatokban pedig még az újszülötteknél is kifejezettebb expressziót találtak. Mivel kísérleteink során fiatal felnőtt állatokkal dolgoztunk, a RyR függő CICR részvétele az ATP kiváltott Ca^{2+} válaszban reális lehetőség a Deiters és Hensen sejtekben.

Az IP_3 függő CICR figyelhető meg azokban a sejtekben, amelyek intracelluláris Ca^{2+} szignalizációja nagymértékben IP_3 függő (Hajnoczky, Hager et al. 1999). Ezekben a sejtekben a kezdeti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés érzékenyíti a belső raktárakat IP_3 -ra, és így jön létre egy a klasszikus CICR-nek megfelelő jel felerősítés és az ER-on szomszédos IP_3 receptorok érzékenyítésével jel tovaterjedés (Sheppard, Simpson et al. 1997). Az IP_3 a cochleában is igen fontos hírvivő molekula. Ha a képződése zavart szenved, az halláscsökkenéshez vezet (Rodriguez, Simeonato et al. 2012), illetve az a mutáció, ami miatt a gap junction-ök IP_3 átjárhatósága megszűnik, sükettséghez okoz (Beltramello, Piazza et al. 2005). Az IP_3 függő CICR is összhangban van eredményeinkkel, megmagyarázza, hogy a Deiters és a Hensen sejtek ATP kiváltotta Ca^{2+} válaszai miért mutatnak nagymértékű függést a belső raktárak telítettségi állapotától. Eredményeink szerint a Deiters és a Hensen sejtek purinerg Ca^{2+} jelátviteli rendszere nagyfokú hasonlóságot mutat, szemben Dulon és munkatársai izolált sejteken kapott eredményeivel (Dulon, Moataz et al. 1993), akik úgy találták, hogy míg a Deiters sejtekben az ATP mind a külső, mind a belső Ca^{2+} -ot mobilizálja, addig a Hensen sejtek esetében a belső raktárakból felszabaduló Ca^{2+} nem játszik szerepet a Ca^{2+} szignálok létrejöttében.

A Deiters és a Hensen sejtekkel szemben a pillérsejtek purinerg Ca^{2+} szignalizációjában a CICR vélhetően nem játszik szerepet. A Deiters és a Hensen sejtekkel összehasonlítva kisebb mértékű ER Ca^{2+} szivárgást mértünk. A pillérsejtek az ATP-re is kevésbé voltak érzékenyek. A Deiters és Hensen sejtekkel szemben ATP válaszaik PPADS érzékenységet mutattak (13. ábra). A purinerg Ca^{2+} szignalizációban tetten érhető különbségek összhangban vannak azzal, hogy a különböző morfológiájú, ultrastruktúrájú, és elhelyezkedésű támasztósejteknek nem egyforma funkciót tulajdonítanak (Raphael and Altschuler 2003). A pillérsejtekkel szemben a Deiters és a Hensen sejteknek a statikai szerepen túl további funkciói lehetnek a hallás élettanában és patofiziológiájában. Ezek a sejtípusok afferens beidegzéssel is rendelkeznek, míg a pillérsejtek nem (Burgess, Adams et al. 1997, Fechner, Burgess et al. 1998). Az egyes támasztósejt típusok purinerg Ca^{2+} szignalizációjában megmutatkozó különbségeknek a szenzorineurális halláscsökkenés elleni terápia targetálásánál is jelentősége lehet.



13. ábra: Különbségek a támasztósejtek purinerg Ca^{2+} szignalizációjában.

6.3. Az NMDA receptorok és az NO szerepe a LOC efferensek DA felszabadulásában – az „ultra-short feedback loop”

A Corti szerv támasztósejtjei purinerg Ca^{2+} szignalizációjának vizsgálata mellett az afferens hallóideg védelmében is szerepet játszó dopaminerg LOC rendszer

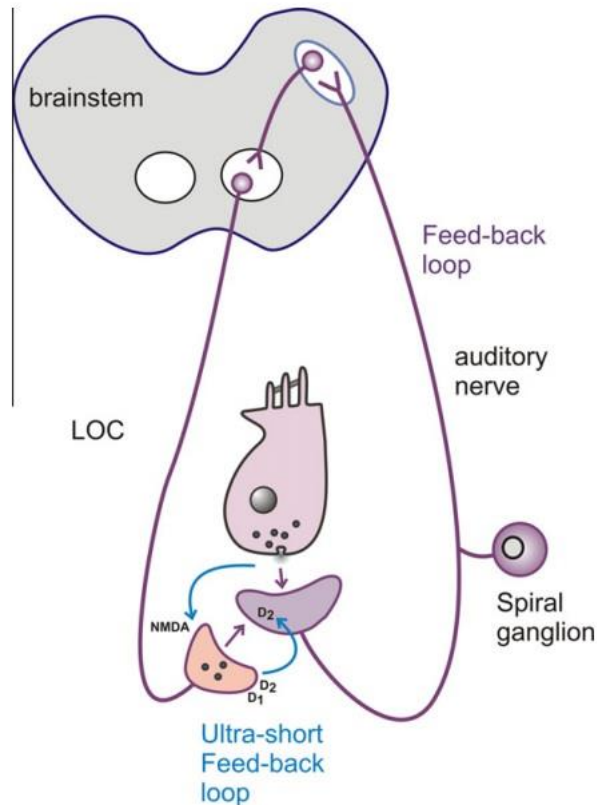
szabályozásának további karakterizálását is megkíséreltük. Munkacsoportunk korábbi eredményei összhangban álltak azzal az elképzeléssel miszerint a dopaminerg LOC rostok egy feedback rendszer efferens karjaként otoprotektív szerepet tölthetnek be, mérsékelve az afferens hallóideg rostok glutamáterg túlaktiválódását és így excitotoxikus károsodását (Gaborjan, Lendvai et al. 1999, Lendvai, Halmos et al. 2011). A korábbi kísérletek alapján igazolódott, hogy a LOC rostok DA felszabadítása tónusos GABAerg gátlás alatt áll, mely gátlás GABA_A antagonistá bicucullinnal, illetve a metabotrop glutamát receptorok agonistáival felfüggeszthető (Doleviczenyi, Halmos et al. 2005), így az IHC-kból felszabaduló Glu a GABAerg LOC rostok gátlásán keresztül tudja a DA felszabadulás fokozásával mérsékelni saját potenciális sejtkárosító hatását. Emellett felmerült egy másik diszinhibitoros szerotonerg mechanizmus jelenléte is a DA felszabadulás szabályozásában (Doleviczenyi, Vizi et al. 2008).

Az IHC – afferens hallóideg– LOC efferens kapcsolat bonyolult szinaptikus rendszer (Satake and Liberman 1996, Sobkowicz, August et al. 2004). Ugyan a LOC efferensek kifejtett hallás esetén elsősorban az afferens neuronon szinaptizálnak, de az afferens neuronon végződő hagyományos, axo-dendritikus szinapszis mellett az idegrostok egy kisebb része a belső szőrsejtekkel is érintkezik a szőrsejt és afferens neuron szinapszisa környékén. Ez a kapcsolat azonban eltér a hagyományos szinapszis felépítésétől (Hashimoto, Kimura et al. 1990, Liberman, Dodds et al. 1990, Satake and Liberman 1996). Emellett megfigyelhető itt egy speciális sejtközötti kapcsolat, az úgynevezett triádikus szinapszis, ahol a LOC efferens egy szinapszis keretében egy belső szőrsejttel és a hozzá kapcsolódó afferens neuronnal is szinaptikus kapcsolatot alakít ki (Sobkowicz, August et al. 2004). A neuronális kapcsolatok összetettsége miatt a parakrin szabályozás jelentősége ebben a rendszerben vélhetően nagy. Ilyen szempontból ideális szabályozó jelölt az NO, amely nemszinaptikusan is képes jelátvitelre (Kiss, Zsilla et al. 2004). A központi idegrendszerben már kimutatták a DA felszabadulásra kifejtett hatását (Hanbauer and Grilli 1992). Jelenléte igazolt a cochleában (Michel, Hess et al. 1999, Popa, Anniko et al. 2001, Shi, Ren et al. 2001). Ugyanakkor az NO valós élettani-kórélettani hatását kettősség kíséri: bár az NO részben fontos, regulátor szerepet betöltő jelátviteli molekula, viszont citotoxikus hatása is lehet, mely akár sejthalálhoz is vezethet (Moncada and Bolanos 2006, Brown 2010). Ez utóbbi lehetőséget erősíti, hogy számos kísérletsorozat eredménye szerint a belsőfül több patológiás állapota (ischemia, zajártalom, időskori halláscsökkenés) részben az NO

fokozott termelődésére, magas NO szintre vezethető vissza (Takumida, Anniko et al. 2001, Tabuchi, Nishimura et al. 2010).

Shi és munkacsoportja a NOS gátló L-NAME segítségével zajhatásra fokozódó NOS aktivitást igazolt a cochleában (Shi, Ren et al. 2002), mely NOS aktivitás hátterében több enzim izoforma működése is állhat, mivel több altípust is sikerült kimutatni a csigában (Michel, Hess et al. 1999). Ugyanakkor az excitotoxicitás vonatkozásában az NMDA működéséhez kötött nNOS enzim a legfontosabb, melynek jelenlétét már a belsőfül több sejtjében is igazolták, például a ganglion spirale-ban, az IHC-k és az OHC-k alatt található idegvégződésekben, de magukban a szőrsejtekben, illetve a Deiter's sejtekben is (Fessenden, Coling et al. 1994, Zdanski, Prazma et al. 1994, Takumida and Anniko 2002).

Bár kísérleteinkben nem tudtunk a LOC efferensek DA felszabadítására ható endogén tónusos NO regulációt kimutatni, és az elektromos téringerlés okozta DA felszabadulás mértékét sem fokozta a NO, viszont egyértelműen befolyásolta a nyugalmi DA felszabadulását, amit az NO donor nitroprusszid és a DEA NONO-át hatásával igazoltunk. Az NMDA receptorok aktivációja is fokozta a nyugalmi DA felszabadulást és ezt részben, a hatás korai fázisában, NO közvetítésével tette. Eredményeink arra utalnak, hogy a dopaminerg LOC efferensekből történő DA felszabadításon keresztül az NO egy lokális protektív feedback rendszer része lehet. Nem kizárt, hogy a korábban említett lokális GABAerg diszinhibíció túl egy másik helyi protektív visszacsatolási mechanizmus is létezik: az IHC-k által kibocsátott nagy mennyiségű Glu képes arra, hogy a saját toxikus hatását az NMDA receptorok aktivációjával, részben parakrin NO hatás közvetítésével mérsékelje úgy, hogy a LOC rostokban fokozza a DA felszabadulást, így védve az idegvégződések a Glu excitotoxicitástól. Ezt a feltételezett védelmi folyamatot *ultra-short feedback loop*-nak neveztük el (**14. ábra**).



14. ábra: Dopaminerg feed-back körök a cochleában. (forrás: Lendvai B, Halmos GB, Polony, G., Kapocsi J, Horvath T, Aller M, Vizi ES, Zelles T, *Neurochem Int* 59:150–158, 2011).

A LOC efferensekből felszabaduló DA nem kizárólag az agytörzsből érkező visszacsatolási impulzusok által szabályozott, hanem helyileg a glutamát aktiválta NMDA receptorok aktiválása révén is felszabadulhat (ultra-short feed back loop), részben NO közvetítésével.

Kísérleteinkben az NMDA indukálta DA felszabadulásban szerepet játszó NO forrását nem sikerült azonosítani. Mivel az NO egy jól diffundáló anyag, szabadon megy át biológiai membránokon (Gally, Montague et al. 1990), valószínűleg a dopaminerg LOC efferensek környezetében található sejtekben, idegvégződéseken képződik a rajtuk lévő NMDA receptorok aktiválását követően. Az NMDA receptorhoz kötött nNOS által termelt NO nyugalmi DA felszabadulást fokozó hatása érdekes kapocs lehet a glutamaterg és a monoaminerg transzmisszió között, az előbbi esetében valószínűleg nem szinaptikus módon (Kiss and Vizi 2001, Vizi, Kiss et al. 2004).

Az agyban az NO gátolja a monoamin felvételt (Lonart and Johnson 1994), így a DA visszavétel gátlás felmerült mint az NO hatás lehetséges mechanizmusa. A visszavétel

kísérlet alatti, nomifensinnel történő “kikapcsolásának” cochleában tapasztalt hatástalansága azonban ellene szól ennek a lehetőségnek.

7. Következtetések

- 1) Az irodalomban először alkalmaztunk megfelelő tér- és időbeli felbontású funkcionális imaging módszert a Corti szerv támasztósejtjei Ca^{2+} szignalizációjának parallel vizsgálatára halló egerek *in situ* hemicochlea preparátumában. A preparátum unikális tulajdonságai folytán (halló állat, jól megőrzött szöveti struktúra), az irodalomban alkalmazott preparátumokhoz viszonyítva, megbízhatóbb következtetések vonhatók le a kifejtett hallású egér hallószervének működésével kapcsolatosan.
- 2) Az ATP reverzibilis és ismételhető Ca^{2+} tranzienseket vált ki - dózis függő módon - mindhárom vizsgált támasztósejtben (pillér-, Deiters- és Hensen sejtek).
- 3) Az ATP kiváltotta Ca^{2+} tranziensek kialakításában mindhárom sejttypusban szerepe van az ionotrop P2X (extracelluláris Ca^{2+} függő) és a metabotrop P2Y receptoroknak (intracelluláris Ca^{2+} függő) is. Mindkét receptor több altípusának mRNS-e is jelen van a Corti szervben.
- 4) A pillérsejtekre az extra- és intracelluláris Ca^{2+} -függő válasz komponensek lineáris additivitása és a purinerg receptor antagonistá PPADS-sel szembeni érzékenység, a Deiters és Hensen sejtekre az extra- és intracelluláris Ca^{2+} -függő válasz komponensek szupralineáris additivitása (a CICR) és az ER fokozottabb Ca^{2+} csurgása jellemző. A purinerg Ca^{2+} szignalizáció különbözősége hozzájárulhat a sejtek cochleáris (pato)fiziológiában játszott különböző szerepéhez.
- 5) Exogén NO hatására megnő a LOC efferensek nyugalmi DA felszabadítása. A NOS gátlás hatástalansága a reguláló endogén NO tónus hiányára utal. Az NMDA receptor aktiváció a nyugalmi és az elektromos ingerléssel kiváltott DA felszabadulást is fokozza.
- 6) Az NMDA DA felszabadulást fokozó hatásában szerepe van az NMDA receptor aktivációra keletkező NO-nak is, de nem vesz benne részt a DA visszavevő rendszer regulációja. Az NMDA receptor/NO/DA felszabadulás feed-back mechanizmus feltehetően védő hatású az excesszív Glu felszabadulás okozta excitotoxikus hallóneuron károsodással szemben.

8. Összefoglalás

A hallásvesztés a leggyakoribb emberi szenzoros károsodás. A cochlea vagy a hallóneuron károsodása, azaz a szenzorineurális hallásvesztés (SNHL) gyógyszeresen nem gyógyítható. Azonban a cochleában vannak endogén védekező mechanizmusok: a cochleáris erősítés mérséklése vagy a belső szőrsejt (IHC)-hallóneuron ingerületátvitel hatékonyságának laterális olivocochleáris (LOC) efferensek általi csökkentése ilyenek. A cochleáris erősítést a Corti szerv támasztósejtjei és azok parakrin ATP kiváltotta Ca^{2+} szignalizációja is szabályozza. A cochlea speciális anatómiája nagyban nehezíti ennek vizsgálatát. Az irodalomban először végeztünk funkcionális képalkotó vizsgálatokat (fura-2) szimultán három különböző típusú támasztósejten halló egerek hemicochlea preparátumában, hogy vizsgálhassuk a pillér-, Deiters és Hensen sejtek purinerg Ca^{2+} jelátvitelét. Vizsgálatunkban az ATP dózis függő módon reverzibilis, ismételhető és deszenzitizációt mutató Ca^{2+} tranzienseket váltott ki mindhárom sejttypusban. Igazoltuk a P2X és a P2Y szerepét is a válaszban, amit RT-PCR eredményeink megerősítettek. A nem szelektív purinerg antagonistá PPADS hatása eltérő receptor profilt sejtet a pillér- vs. Deiters- és Hensen sejtek esetében. Utóbbi két sejttypusban, de a pillérsejtekben nem, a Ca^{2+} -függő P2X- és a belső Ca^{2+} raktár függő P2Y közvetítette ATP válaszok szupralineáris additivitását figyeltük meg. Az interakció magyarázata a Ca^{2+} -indukálta Ca^{2+} felszabadulás lehet. Ez összhangban van a Deiters és Hensen sejtekben tapasztalt nagyobb belső Ca^{2+} raktár aktivitással. Az eredmények utalhatnak ezen sejttypusok cochleáris védelmi funkcióban játszott eltérő szerepére is. A LOC efferensek, az agytörzsön keresztüli feed-back hurok efferens rostjai, szinapszist adnak a hallóneuronok perifériás dendritjére és ezen keresztül védik őket az IHC-kból pl. túlzott zajterhelés hatására kóros mennyiségben kiömlő Glu okozta excitotoxikus károsodás ellen. Kimutattuk, hogy az NMDA receptor aktiválásának hatására megnő a [^3H]DA elektromos ingerléssel kiváltott és nyugalmi felszabadulása is egér cochleában. A nyugalmi felszabadulás kezdeti fázisában az NO volt a közvetítő parakrin transzmitter. Az NO tónusos felszabadulására nem találtunk bizonyítékot, ahogy a DA visszavétel gátlását sem tudtuk igazolni a hatásáért felelős mechanizmusként. A Glu kiváltotta protektív DA felszabadulás egy lokális ultra-rövid feed-back mechanizmus alapját képezheti. A hallás védelmében szerepet játszó endogén védelmi mechanizmusok funkciójának és modulációjának pontosabb feltérképezése, fiziológiai jelentőségén túl, utat nyithat a SNHL-ok farmakológiai terápiája felé is.

9. Summary

Hearing loss is the most common human sensory deficit. Impairments of the cochlea or the auditory nerve, i.e., sensorineural hearing losses (SNHLs) are not curable by pharmacological tools. However, there are endogenous protective mechanisms in the cochlea. Attenuation of cochlear amplification and decrease in the efficiency of the inner hair cell (IHC)-auditory nerve transmission by the lateral olivocochlear (LOC) efferents protect hearing. Cochlear amplification is regulated by the paracrine ATP-evoked Ca^{2+} signaling in the supporting cells of the organ of Corti, however, the special anatomy of the cochlea hampers observing these mechanisms. For the first time, we have performed functional ratiometric Ca^{2+} imaging (fura-2) in three different supporting cell types in the hemicochlea preparation of hearing mice to measure purinergic receptor-mediated Ca^{2+} signaling in pillar, Deiters' and Hensen's cells. ATP evoked reversible, repeatable and dose-dependent Ca^{2+} transients and desensitization in all three cell types. Involvement of both P2X and P2Y receptor types was proved in all three cell types. RT-PCR results supported this finding. The effect of the non-selective purinergic antagonist PPADS suggested different functional purinergic receptor population in pillar vs. Deiters' and Hensen's cells. We also found supralinear additivity of the extracellular Ca^{2+} -dependent P2X-mediated and the internal Ca^{2+} store-dependent P2Y-mediated ATP responses in the latter cell types, but not in the pillar cells, that might be explained by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. This is in accordance with the higher activity of the internal Ca^{2+} stores in Deiters' and Hensen's cells. These results might also reflect the distinct roles these cells play in cochlear protective function. LOC efferent fibers, efferent arm of a feed-back loop through the brainstem, have axodendritic synapses on auditory nerve dendrites and can protect them from excitotoxic damage caused by the excess release of Glu from IHCs e.g. in loud noise. We showed that activation of NMDA receptors increased the electrical-field stimulation-evoked and the resting release of [^3H]DA from the mouse cochlea. The initial phase of the resting DA release was NO mediated. We found no evidence of tonic endogenous release of NO and the inhibition of DA uptake was not involved in the paracrine NO effect. The Glu-evoked release of the protective DA might form the basis of an ultra-short local feed-back loop in the cochlea. Deciphering the precise function and modulation of endogenous pathways playing a role in the protection of hearing could open, over its physiological significance, new ways of pharmacological interventions in SNHLs.

10. Irodalomjegyzék

Abbracchio, M. P., G. Burnstock, A. Verkhratsky and H. Zimmermann (2009). "Purinergic signalling in the nervous system: an overview." Trends Neurosci **32**(1): 19-29.

Adams, P. F. and M. A. Marano (1999). Current estimates from the National Health Interview Survey. Vital Health Stat. N. C. f. H. Statistics. **10**: 193.

Alberti, P. (1998). Advances in Noise Research. Protection Against Noise. D. Prasher and L. M. Luxon. London, Whurr Publisher Ltd., London. **1**: 7-15.

Angeli, S., X. Lin and X. Lin (2012). "Genetics of hearing and deafness." Anat Rec Hoboken(295): 1812-1829.

Anselmi, F., V. H. Hernandez, G. Crispino, A. Seydel, S. Ortolano, S. D. Roper, N. Kessaris, W. Richardson, G. Rickheit, M. A. Filippov, H. Monyer and F. Mammano (2008). "ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18770-18775.

Arnesen, A. R. (1982). "Presbycusis--loss of neurons in the human cochlear nuclei." J Laryngol Otol **96**(6): 503-511.

Ashmore, J. F. and H. Ohmori (1990). "Control of intracellular calcium by ATP in isolated outer hair cells of the guinea-pig cochlea." J Physiol **428**: 109-131.

Ates, N. A., M. Unal, L. Tamer, E. Dericci, S. Karakas, B. Ercan, Y. S. Pata, Y. Akbas, Y. Vayisoglu and H. Camdeviren (2005). "Glutathione S-transferase gene polymorphisms in presbycusis." Otol Neurotol **26**(3): 392-397.

Beck, A., R. Z. Nieden, H. P. Schneider and J. W. Deitmer (2004). "Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ." Cell Calcium **35**(1): 47-58.

Beltramello, M., M. Bicego, V. Piazza, C. D. Ciubotaru, F. Mammano and P. D'Andrea (2003). "Permeability and gating properties of human connexins 26 and 30 expressed in HeLa cells." Biochem Biophys Res Commun **305**(4): 1024-1033.

Beltramello, M., V. Piazza, F. F. Bukauskas, T. Pozzan and F. Mammano (2005). "Impaired permeability to Ins(1,4,5)P₃ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness." Nat Cell Biol **7**(1): 63-69.

- Beurg, M., A. Hafidi, L. J. Skinner, J. Ruel, R. Nouvian, M. Henaff, J. L. Puel, J. M. Aran and D. Dulon (2005). "Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells." Eur J Neurosci **22**(5): 1109-1119.
- Bird, J. E., N. Daudet, M. E. Warchol and J. E. Gale (2010). "Supporting cells eliminate dying sensory hair cells to maintain epithelial integrity in the avian inner ear." J Neurosci **30**(37): 12545-12556.
- Blanchet, C., C. ErosteGUI, M. Sugasawa and D. Dulon (2000). "Gentamicin blocks ACh-evoked K⁺ current in guinea-pig outer hair cells by impairing Ca²⁺ entry at the cholinergic receptor." J Physiol **525 Pt 3**: 641-654.
- Bledsoe, S. C., Jr., R. P. Bobbin and D. M. Chihal (1981). "Kainic acid: an evaluation of its action on cochlear potentials." Hear Res **4**(1): 109-120.
- Bobbin, R. P. (2001). "PPADS, an ATP antagonist, attenuates the effects of a moderately intense sound on cochlear mechanics." Hear Res **156**(1-2): 10-16.
- Bobbin, R. P. (2002). "Caffeine and ryanodine demonstrate a role for the ryanodine receptor in the organ of Corti." Hear Res **174**(1-2): 172-182.
- Boettger, T., C. A. Hubner, H. Maier, M. B. Rust, F. X. Beck and T. J. Jentsch (2002). "Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4." Nature **416**(6883): 874-878.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, C. M. Peppiatt, L. S. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S. C. Tovey, J. T. Seo, M. J. Berridge, F. Ciccolini and P. Lipp (2001). "Calcium signalling--an overview." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 3-10.
- Bosher, S. K. and R. L. Warren (1978). "Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid." Nature **273**(5661): 377-378.
- Brenman, J. E. and D. S. Bredt (1997). "Synaptic signaling by nitric oxide." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 374-378.
- Brown, G. C. (2010). "Nitric oxide and neuronal death." Nitric Oxide **23**(3): 153-165.
- Brownell, W. E., C. R. Bader, D. Bertrand and Y. de Ribaupierre (1985). "Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells." Science **227**(4683): 194-196.
- Bruzzone, R., T. W. White and D. L. Paul (1996). "Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling." Eur J Biochem **238**(1): 1-27.

- Burgess, B. J., J. C. Adams and J. B. Nadol, Jr. (1997). "Morphologic evidence for innervation of Deiters' and Hensen's cells in the guinea pig." Hear Res **108**(1-2): 74-82.
- Burnstock, G. (1999). "Purinergetic cotransmission." Brain Res Bull **50**(5-6): 355-357.
- Burnstock, G. (2006). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." Trends Pharmacol Sci **27**(3): 166-176.
- Burnstock, G. (2007). "Purine and pyrimidine receptors." Cell Mol Life Sci **64**(12): 1471-1483.
- Camello, C., R. Lomax, O. H. Petersen and A. V. Tepikin (2002). "Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling." Cell Calcium **32**(5-6): 355-361.
- Campbell, J. P. and M. M. Henson (1988). "Olivocochlear neurons in the brainstem of the mouse." Hear Res **35**(2-3): 271-274.
- Caussé, R., I. Gondet and B. Vallancien (1949). "Action de la streptomycine sur les cellules cillees des organes vestibulaires de la souris." Compt Rend Soc Biol(143): 619-620.
- Ceriani, F. and F. Mammano (2012). "Calcium signaling in the cochlea - Molecular mechanisms and physiopathological implications." Cell Commun Signal **10**(1): 20.
- Chisolm, T. H., J. F. Willott and J. J. Lister (2003). "The aging auditory system: anatomic and physiologic changes and implications for rehabilitation." Int J Audiol **42** **Suppl 2**: 2S3-10.
- Choi, Y. B., L. Tenneti, D. A. Le, J. Ortiz, G. Bai, H. S. Chen and S. A. Lipton (2000). "Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation." Nat Neurosci **3**(1): 15-21.
- Chung, J. W. and J. Schacht (2001). "ATP and nitric oxide modulate intracellular calcium in isolated pillar cells of the guinea pig cochlea." J Assoc Res Otolaryngol **2**(4): 399-407.
- Ciruela, F., V. Casado, R. J. Rodrigues, R. Lujan, J. Burgueno, M. Canals, J. Borycz, N. Rebola, S. R. Goldberg, J. Mallol, A. Cortes, E. I. Canela, J. F. Lopez-Gimenez, G. Milligan, C. Lluís, R. A. Cunha, S. Ferre and R. Franco (2006). "Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers." J Neurosci **26**(7): 2080-2087.

- Cotanche, D. A. and C. L. Kaiser (2010). "Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration." Hear Res **266**(1-2): 18-25.
- Cui, H., Y. Kong and H. Zhang (2012). "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." J Signal Transduct **2012**: 646354.
- d'Aldin, C., M. Eybalin, J. L. Puel, G. Charachon, S. Ladrech, N. Renard and R. Pujol (1995). "Synaptic connections and putative functions of the dopaminergic innervation of the guinea pig cochlea." Eur Arch Otorhinolaryngol **252**(5): 270-274.
- Dallos, P. (1992). "The active cochlea." J Neurosci **12**(12): 4575-4585.
- Dallos, P., J. Zheng and M. A. Cheatham (2006). "Prestin and the cochlear amplifier." J Physiol **576**(Pt 1): 37-42.
- Darrow, K. N., S. F. Maison and M. C. Liberman (2007). "Selective removal of lateral olivocochlear efferents increases vulnerability to acute acoustic injury." J Neurophysiol **97**(2): 1775-1785.
- Darrow, K. N., E. J. Simons, L. Dodds and M. C. Liberman (2006). "Dopaminergic innervation of the mouse inner ear: evidence for a separate cytochemical group of cochlear efferent fibers." J Comp Neurol **498**(3): 403-414.
- Davis, J. M., J. Elfenbein, R. Schum and R. A. Bentler (1986). "Effects of mild and moderate hearing impairments on language, educational, and psychosocial behavior of children." J Speech Hear Disord **51**(1): 53-62.
- Doleviczenyi, Z., G. Halmos, G. Repassy, E. S. Vizi, T. Zelles and B. Lendvai (2005). "Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission." Neurosci Lett **385**(2): 93-98.
- Doleviczenyi, Z., E. S. Vizi, I. Gacsalyi, K. Pallagi, B. Volk, L. G. Harsing, Jr., G. Halmos, B. Lendvai and T. Zelles (2008). "5-HT_{6/7} receptor antagonists facilitate dopamine release in the cochlea via a GABAergic disinhibitory mechanism." Neurochem Res **33**(11): 2364-2372.
- Duan, S. and I. M. Cooke (2000). "Glutamate and GABA activate different receptors and Cl⁻ conductances in crab peptide-secretory neurons." J Neurophysiol **83**(1): 31-37.
- Dulon, D., C. Blanchet and E. Laffon (1994). "Photo-released intracellular Ca²⁺ evokes reversible mechanical responses in supporting cells of the guinea-pig organ of Corti." Biochem Biophys Res Commun **201**(3): 1263-1269.

Dulon, D., Moataz, R. and P. Mollard (1993) "Characterization of Ca²⁺ signals generated by extracellular nucleotides in supporting cells of the organ of Corti." *Cell Calcium* **14**(3):245–254.

Dyachok, O., G. Tufveson and E. Gylfe (2004). "Ca²⁺-induced Ca²⁺ release by activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in primary pancreatic beta-cells." *Cell Calcium* **36**(1): 1-9.

Edge, R. M., B. N. Evans, M. Pearce, C. P. Richter, X. Hu and P. Dallos (1998). "Morphology of the unfixed cochlea." *Hear Res* **124**(1-2): 1-16.

Ehret, G. (1976). "Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*)." *J Am Audiol Soc* **1**(5): 179-184.

Endo, M. (2009). "Calcium-induced calcium release in skeletal muscle." *Physiol Rev* **89**(4): 1153-1176.

Estivill, X., P. Fortina, S. Surrey, R. Rabionet, S. Melchionda, L. D'Agruma, E. Mansfield, E. Rappaport, N. Govea, M. Mila, L. Zelante and P. Gasparini (1998). "Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness." *Lancet* **351**(9100): 394-398.

Eybalin, M. (1993). "Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea." *Physiol Rev* **73**(2): 309-373.

Eybalin, M., A. Caicedo, N. Renard, J. Ruel and J. L. Puel (2004). "Transient Ca²⁺-permeable AMPA receptors in postnatal rat primary auditory neurons." *Eur J Neurosci* **20**(11): 2981-2989.

Eybalin, M., G. Charachon and N. Renard (1993). "Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine." *Neuroscience* **54**(1): 133-142.

Fechner, F. P., B. J. Burgess, J. C. Adams, M. C. Liberman and J. B. Nadol, Jr. (1998). "Dense innervation of Deiters' and Hensen's cells persists after chronic deafferentation of guinea pig cochleas." *J Comp Neurol* **400**(3): 299-309.

Fessenden, J. D., D. E. Coling and J. Schacht (1994). "Detection and characterization of nitric oxide synthase in the mammalian cochlea." *Brain Res* **668**(1-2): 9-15.

Fetoni, A. R., P. M. Picciotti, G. Paludetti and D. Troiani (2011). "Pathogenesis of presbycusis in animal models: a review." *Exp Gerontol* **46**(6): 413-425.

Fettiplace, R. and C. M. Hackney (2006). "The sensory and motor roles of auditory hair cells." Nat Rev Neurosci **7**(1): 19-29.

Fischel-Ghodsian, N. (2005). "Genetic factors in aminoglycoside toxicity." Pharmacogenomics **6**(1): 27-36.

Flock, A., B. Flock, A. Fridberger, E. Scarfone and M. Ulfendahl (1999). "Supporting cells contribute to control of hearing sensitivity." J Neurosci **19**(11): 4498-4507.

Forge, A., D. Becker, S. Casalotti, J. Edwards, N. Marziano and G. Nevill (2003). "Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assesment of connexin composition in mammals." J Comp Neurol **467**(2): 207-231.

Fridberger, A., A. Flock, M. Ulfendahl and B. Flock (1998). "Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca²⁺ concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 7127-7132.

Furness, D. N. and D. M. Lawton (2003). "Comparative distribution of glutamate transporters and receptors in relation to afferent innervation density in the mammalian cochlea." J Neurosci **23**(36): 11296-11304.

Gaborjan, A., B. Lendvai and E. S. Vizi (1999). "Neurochemical evidence of dopamine release by lateral olivocochlear efferents and its presynaptic modulation in guinea-pig cochlea." Neuroscience **90**(1): 131-138.

Gaborjan, A. and E. S. Vizi (1999). "Characterization of voltage dependent calcium channels on the lateral olivocochlear efferent fibers of the guinea pig." Neurosci Lett **269**(1): 49-51.

Gacek, R. R. and H. F. Schuknecht (1969). "Pathology of presbycusis." Int Audiol(8): 199.

Galambos, R. (1956). "Some recent experiments on the neurophysiology of hearing." Ann Otol Rhinol Laryngol **65**(4): 1053-1059.

Gale, J. E., V. Piazza, C. D. Ciubotaru and F. Mammano (2004). "A mechanism for sensing noise damage in the inner ear." Curr Biol **14**(6): 526-529.

Gally, J. A., P. R. Montague, G. N. Reeke, Jr. and G. M. Edelman (1990). "The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3547-3551.

Gates, G. A. and J. H. Mills (2005). "Presbycusis." Lancet **366**(9491): 1111-1120.

- Gates, G. A., P. Schmid, S. G. Kujawa, B. Nam and R. D'Agostino (2000). "Longitudinal threshold changes in older men with audiometric notches." Hear Res **141**(1-2): 220-228.
- Gever, J. R., D. A. Cockayne, M. P. Dillon, G. Burnstock and A. P. Ford (2006). "Pharmacology of P2X channels." Pflugers Arch **452**(5): 513-537.
- Gifford, M. L. and J. J. Guinan, Jr. (1987). "Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses." Hear Res **29**(2-3): 179-194.
- Gil-Loyzaga, P. and R. Pujol (1990). "Neurotoxicity of kainic acid in the rat cochlea during early developmental stages." Eur Arch Otorhinolaryngol **248**(1): 40-48.
- Gil-Loyzaga, P. E. (1995). "Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine." Acta Otolaryngol **115**(2): 222-226.
- Glowatzki, E. and P. A. Fuchs (2002). "Transmitter release at the hair cell ribbon synapse." Nat Neurosci **5**(2): 147-154.
- Grant, L., S. Slapnick, H. Kennedy and C. Hackney (2006). "Ryanodine receptor localisation in the mammalian cochlea: an ultrastructural study." Hear Res **219**(1-2): 101-109.
- Groff, J. A. and M. C. Liberman (2003). "Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus." J Neurophysiol **90**(5): 3178-3200.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6):3440-50.
- Guinan, J. J., Jr. (2010). "Cochlear efferent innervation and function." Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg **18**(5): 447-453.
- Guitton, M. J., J. Caston, J. Ruel, R. M. Johnson, R. Pujol and J. L. Puel (2003). "Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors." J Neurosci **23**(9): 3944-3952.
- Hajnoczky, G., R. Hager and A. P. Thomas (1999). "Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca²⁺." J Biol Chem **274**(20): 14157-14162.

Hakuba, N., A. Matsubara, J. Hyodo, M. Taniguchi, T. Maetani, Y. Shimizu, Y. Tsujiuchi, M. Shudou and K. Gyo (2003). "AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist reduces progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia." Brain Res **979**(1-2): 194-202.

Halmos, G., Z. Doleviczenyi, G. Repassy, A. Kittel, E. S. Vizi, B. Lendvai and T. Zelles (2005). "D2 autoreceptor inhibition reveals oxygen-glucose deprivation-induced release of dopamine in guinea-pig cochlea." Neuroscience **132**(3): 801-809.

Halmos, G., T. Horvath, G. Polony, A. Fekete, A. Kittel, E. S. Vizi, B. F. van der Laan, T. Zelles and B. Lendvai (2008). "The role of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in cochlear dopamine release." Neuroscience **154**(2): 796-803.

Halmos, G., B. Lendvai, A. Gaborjan, M. Baranyi, L. Z. Szabo and L. Csokonai Vitez (2002). "Simultaneous measurement of glutamate and dopamine release from isolated guinea pig cochlea." Neurochem Int **40**(3): 243-248.

Hanbauer, I. and M. Grilli (1992). "Molecular mechanisms involved in transport and release of dopamine in primary cultures of mesencephalic neurons." Neurochem Int **20 Suppl**: 101S-105S.

Hashimoto, S., R. S. Kimura and T. Takasaka (1990). "Computer-aided three-dimensional reconstruction of the inner hair cells and their nerve endings in the guinea pig cochlea." Acta Otolaryngol **109**(3-4): 228-234.

Hashino, E. and M. Shero (1995). "Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells." Brain Res **704**(1): 135-140.

Hawkins, E., Jr. (1973). "Ototoxic mechanisms. A working hypothesis." Audiology **12**(5): 383-393.

Heinrich, U. R., J. Maurer and W. Mann (1999). "Ultrastructural evidence for protection of the outer hair cells of the inner ear during intense noise exposure by application of the organic calcium channel blocker diltiazem." ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec **61**(6): 321-327.

Hofer, A. M., S. Curci, T. E. Machen and I. Schulz (1996). "ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores." FASEB J **10**(2): 302-308.

Holton, F. A. and P. Holton (1954). "The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings." J Physiol **126**(1): 124-140.

Housley, G. D., A. Bringmann and A. Reichenbach (2009). "Purinergic signaling in special senses." Trends Neurosci **32**(3): 128-141.

Housley, G. D., D. J. Jagger, D. Greenwood, N. P. Raybould, S. G. Salih, L. E. Jarlebark, S. M. Vljakovic, R. Kanjhan, P. Nikolic, D. J. Munoz and P. R. Thorne (2002). "Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission." Audiol Neurootol **7**(1): 55-61.

Housley, G. D., W. Marcotti, D. Navaratnam and E. N. Yamoah (2006). "Hair cells--beyond the transducer." J Membr Biol **209**(2-3): 89-118.

Howarth, A. and G. R. Shone (2006). "Ageing and the auditory system." Postgrad Med J **82**(965): 166-171.

Hu, D. N., W. Q. Qui, B. T. Wu, L. Z. Fang, F. Zhou, Y. P. Gu, Q. H. Zhang, J. H. Yan, Y. Q. Ding and H. Wong (1991). "Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance." J Med Genet **28**(2): 79-83.

Hudspeth, A. J. (1982). "Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells." J Neurosci **2**(1): 1-10.

Hunter-Duvar, I. M. and D. N. Elliott (1972). "Effects of intense auditory stimulation: hearing losses and inner ear changes in the squirrel monkey." J Acoust Soc Am **52**(4): 1181-1192.

Ikeda, K., Y. Saito, A. Nishiyama and T. Takasaka (1991). "Effects of pH on intracellular calcium levels in isolated cochlear outer hair cells of guinea pigs." Am J Physiol **261**(2 Pt 1): C231-236.

Inoue, T., A. Matsubara, S. Maruya, Y. Yamamoto, A. Namba, A. Sasaki and H. Shinkawa (2006). "Localization of dopamine receptor subtypes in the rat spiral ganglion." Neurosci Lett **399**(3): 226-229.

Jager, W., M. Gojny, M. Herrera-Marschitz, L. Brundin, A. Fransson and B. Canlon (2000). "Noise-induced aspartate and glutamate efflux in the guinea pig cochlea and hearing loss." Exp Brain Res **134**(4): 426-434.

Jennings, C. R. and N. S. Jones (2001). "Presbycusis." J Laryngol Otol **115**(3): 171-178.

Jokay, I., G. Soos, G. Repassy and B. Dezso (1998). "Apoptosis in the human inner ear. Detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other markers." Hear Res **117**(1-2): 131-139.

Karadaghy, A. A., J. M. Lasak, J. S. Chomchai, K. M. Khan, M. J. Drescher and D. G. Drescher (1997). "Quantitative analysis of dopamine receptor messages in the mouse cochlea." Brain Res Mol Brain Res **44**(1): 151-156.

Keiler, S. and C. P. Richter (2001). "Cochlear dimensions obtained in hemicochleae of four different strains of mice: CBA/CaJ, 129/CD1, 129/SvEv and C57BL/6J." Hear Res **162**(1-2): 91-104.

Kelley, P. M., D. J. Harris, B. C. Comer, J. W. Askew, T. Fowler, S. D. Smith and W. J. Kimberling (1998). "Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss." Am J Hum Genet **62**(4): 792-799.

Kikuchi, T., R. S. Kimura, D. L. Paul and J. C. Adams (1995). "Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis." Anat Embryol (Berl) **191**(2): 101-118.

Kiss, J. P. and E. S. Vizi (2001). "Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission." Trends Neurosci **24**(4): 211-215.

Kiss, J. P., G. Zsilla and E. S. Vizi (2004). "Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors." Neurochem Int **45**(4): 485-489.

Knipper, M., I. Kopschall, K. Rohbock, A. K. Kopke, I. Bonk, U. Zimmermann and H. Zenner (1997). "Transient expression of NMDA receptors during rearrangement of AMPA-receptor-expressing fibers in the developing inner ear." Cell Tissue Res **287**(1): 23-41.

Kujawa, S. G. and M. C. Liberman (2009). "Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss." J Neurosci **29**(45): 14077-14085.

Lagostena, L., J. F. Ashmore, B. Kachar and F. Mammano (2001). "Purinergetic control of intercellular communication between Hensen's cells of the guinea-pig cochlea." J Physiol **531**(Pt 3): 693-706.

Lagostena, L. and F. Mammano (2001). "Intracellular calcium dynamics and membrane conductance changes evoked by Deiters' cell purinoceptor activation in the organ of Corti." Cell Calcium **29**(3): 191-198.

Lahne, M. and J. E. Gale (2010). "Damage-induced cell-cell communication in different cochlear cell types via two distinct ATP-dependent Ca waves." Purinergetic Signal **6**(2): 189-200.

- Lautermann, J., W. J. ten Cate, P. Altenhoff, R. Grummer, O. Traub, H. Frank, K. Jahnke and E. Winterhager (1998). "Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea." Cell Tissue Res **294**(3): 415-420.
- Lazarowski, E. R., R. C. Boucher and T. K. Harden (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." Mol Pharmacol **64**(4): 785-795.
- Le Prell, C. G., K. Halsey, L. F. Hughes, D. F. Dolan and S. C. Bledsoe, Jr. (2005). "Disruption of lateral olivocochlear neurons via a dopaminergic neurotoxin depresses sound-evoked auditory nerve activity." J Assoc Res Otolaryngol **6**(1): 48-62.
- Lee, J. H. and D. C. Marcus (2008). "Purinergetic signaling in the inner ear." Hear Res **235**(1-2): 1-7.
- Lendvai, B., G. B. Halmos, G. Polony, J. Kapocsi, T. Horvath, M. Aller, E. Sylvester Vizi and T. Zelles (2011). "Chemical neuroprotection in the cochlea: the modulation of dopamine release from lateral olivocochlear efferents." Neurochem Int **59**(2): 150-158.
- Lenoir, M. and J. L. Puel (1987). "Dose-dependent changes in the rat cochlea following aminoglycoside intoxication. II. Histological study." Hear Res **26**(2): 199-209.
- Liang, Y., L. Huang and J. Yang (2009). "Differential expression of ryanodine receptor in the developing rat cochlea." Eur J Histochem **53**(4): e30.
- Lieberman, M. C., L. W. Dodds and S. Pierce (1990). "Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy." J Comp Neurol **301**(3): 443-460.
- Lim, D. J. and W. Melnick (1971). "Acoustic damage of the cochlea. A scanning and transmission electron microscopic observation." Arch Otolaryngol **94**(4): 294-305.
- Lin, X., P. Webster, Q. Li, S. Chen and Y. Ouyang (2003). "Optical recordings of Ca²⁺ signaling activities from identified inner ear cells in cochlear slices and hemicochleae." Brain Res Brain Res Protoc **11**(2): 92-100.
- Linthicum, F. H., Jr. and J. N. Fayad (2009). "Spiral ganglion cell loss is unrelated to segmental cochlear sensory system degeneration in humans." Otol Neurotol **30**(3): 418-422.
- Littman, T., R. P. Bobbin, M. Fallon and J. L. Puel (1989). "The quinoxalinediones DNOX, CNOX and two related congeners suppress hair cell-to-auditory nerve transmission." Hear Res **40**(1-2): 45-53.

- Liu, X. and L. Xu (1994). "Nonsyndromic hearing loss: an analysis of audiograms." Ann Otol Rhinol Laryngol **103**(6): 428-433.
- Lonart, G. and K. M. Johnson (1994). "Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [3H]dopamine and [3H]glutamate by striatal synaptosomes." J Neurochem **63**(6): 2108-2117.
- Lonart, G. and M. J. Zigmond (1991). "High glutamate concentrations evoke Ca(++)-independent dopamine release from striatal slices: a possible role of reverse dopamine transport." J Pharmacol Exp Ther **256**(3): 1132-1138.
- Maison, S. F., R. B. Emeson, J. C. Adams, A. E. Luebke and M. C. Liberman (2003). "Loss of alpha CGRP reduces sound-evoked activity in the cochlear nerve." J Neurophysiol **90**(5): 2941-2949.
- Maison, S. F., H. Usubuchi and M. C. Liberman (2013). "Efferent feedback minimizes cochlear neuropathy from moderate noise exposure." J Neurosci **33**(13): 5542-5552.
- Mammano, F. (2013). "ATP-dependent intercellular Ca²⁺ signaling in the developing cochlea: facts, fantasies and perspectives." Semin Cell Dev Biol **24**(1): 31-39.
- Manthey, D., K. Banach, T. Desplantez, C. G. Lee, C. A. Kozak, O. Traub, R. Weingart and K. Willecke (2001). "Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels." J Membr Biol **181**(2): 137-148.
- Marcotti, W., S. M. van Netten and C. J. Kros (2005). "The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels." J Physiol **567**(Pt 2): 505-521.
- Martin, P. and A. J. Hudspeth (1999). "Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14306-14311.
- Matsubara, A., J. H. Laake, S. Davanger, S. Usami and O. P. Ottersen (1996). "Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti." J Neurosci **16**(14): 4457-4467.
- Matsunobu, T. and J. Schacht (2000). "Nitric oxide/cyclic GMP pathway attenuates ATP-evoked intracellular calcium increase in supporting cells of the guinea pig cochlea." J Comp Neurol **423**(3): 452-461.

Michel, O., A. Hess, W. Bloch, E. Stennert, J. Su and K. Addicks (1999). "Localization of the NO/cGMP-pathway in the cochlea of guinea pigs." Hear Res **133**(1-2): 1-9.

Miller, J. M., J. N. Brown and J. Schacht (2003). "8-iso-prostaglandin F(2alpha), a product of noise exposure, reduces inner ear blood flow." Audiol Neurootol **8**(4): 207-221.

Moncada, S. and J. P. Bolanos (2006). "Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration." J Neurochem **97**(6): 1676-1689.

Morton-Jones, R. T., M. B. Cannell and G. D. Housley (2008). "Ca²⁺ entry via AMPA-type glutamate receptors triggers Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from ryanodine receptors in rat spiral ganglion neurons." Cell Calcium **43**(4): 356-366.

Morton-Jones, R. T., M. B. Cannell, L. H. Jeyakumar, S. Fleischer and G. D. Housley (2006). "Differential expression of ryanodine receptors in the rat cochlea." Neuroscience **137**(1): 275-286.

Morton, N. E. (1991). "Genetic epidemiology of hearing impairment." Ann N Y Acad Sci **630**: 16-31.

Mountain, D. C. (1980). "Changes in endolymphatic potential and crossed olivocochlear bundle stimulation alter cochlear mechanics." Science **210**(4465): 71-72.

Mulders, W. H. and D. Robertson (2004). "Dopaminergic olivocochlear neurons originate in the high frequency region of the lateral superior olive of guinea pigs." Hear Res **187**(1-2): 122-130.

Munoz, D. J., I. S. Kendrick, M. Rassam and P. R. Thorne (2001). "Vesicular storage of adenosine triphosphate in the guinea-pig cochlear lateral wall and concentrations of ATP in the endolymph during sound exposure and hypoxia." Acta Otolaryngol **121**(1): 10-15.

Murugasu, E. and I. J. Russell (1996). "The effect of efferent stimulation on basilar membrane displacement in the basal turn of the guinea pig cochlea." J Neurosci **16**(1): 325-332.

Niu, X., N. Bogdanovic and B. Canlon (2004). "The distribution and the modulation of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the lateral olivocochlear system of the guinea-pig." Neuroscience **125**(3): 725-733.

Niu, X. and B. Canlon (2006). "The signal transduction pathway for the dopamine D1 receptor in the guinea-pig cochlea." Neuroscience **137**(3): 981-990.

- Oestreicher, E., W. Arnold, K. Ehrenberger and D. Felix (1997). "Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs." Hear Res **107**(1-2): 46-52.
- Ohinata, Y., J. M. Miller and J. Schacht (2003). "Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea." Brain Res **966**(2): 265-273.
- Ohlemiller, K. K., J. S. Wright and L. L. Dugan (1999). "Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure." Audiol Neurootol **4**(5): 229-236.
- Pandya, A. (2004). Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial. R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger et al., University of Washington.
- Papp, L., T. Balazsa, A. Kofalvi, F. Erdelyi, G. Szabo, E. S. Vizi and B. Sperlagh (2004). "P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices." J Pharmacol Exp Ther **310**(3): 973-980.
- Perlman, H. B. and R. Kimura (1962). "Cochlear blood flow and acoustic trauma." Acta Otolaryngol(54): 99-110.
- Piazza, V., C. D. Ciubotaru, J. E. Gale and F. Mammano (2007). "Purinergic signalling and intercellular Ca²⁺ wave propagation in the organ of Corti." Cell Calcium **41**(1): 77-86.
- Popa, R., M. Anniko, M. Takumida and W. Arnold (2001). "Localization of nitric oxide synthase isoforms in the human cochlea." Acta Otolaryngol **121**(4): 454-459.
- Price, K. E. (1986). "Aminoglycoside research 1975-1985: prospects for development of improved agents." Antimicrob Agents Chemother **29**(4): 543-548.
- Priuska, E. M. and J. Schacht (1995). "Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex." Biochem Pharmacol **50**(11): 1749-1752.
- Puel, J. L. (1995). "Chemical synaptic transmission in the cochlea." Prog Neurobiol **47**(6): 449-476.
- Puel, J. L., S. Ladrech, R. Chabert, R. Pujol and M. Eybalin (1991). "Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea." Hear Res **51**(2): 255-264.
- Puel, J. L., J. Ruel, C. Gervais d'Aldin and R. Pujol (1998). "Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss." Neuroreport **9**(9): 2109-2114.

- Pujol, R. (1994). "Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea." Br J Audiol **28**(4-5): 185-191.
- Pujol, R., M. Lavigne-Rebillard and A. Uziel (1990). "Physiological correlates of development of the human cochlea." Semin Perinatol **14**(4): 275-280.
- Pujol, R. and J. L. Puel (1999). "Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings." Ann N Y Acad Sci **884**: 249-254.
- Pujol, R., J. L. Puel, C. Gervais d'Aldin and M. Eybalin (1993). "Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea." Acta Otolaryngol **113**(3): 330-334.
- Rabbitt, R. D. and W. E. Brownell (2011). "Efferent modulation of hair cell function." Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg **19**(5): 376-381.
- Rajagopalan, L., J. N. Greeson, A. Xia, H. Liu, A. Sturm, R. M. Raphael, A. L. Davidson, J. S. Oghalai, F. A. Pereira and W. E. Brownell (2007). "Tuning of the outer hair cell motor by membrane cholesterol." J Biol Chem **282**(50): 36659-36670.
- Raphael, Y. and R. A. Altschuler (2003). "Structure and innervation of the cochlea." Brain Res Bull **60**(5-6): 397-422.
- Richter, C. P., B. N. Evans, R. Edge and P. Dallos (1998). "Basilar membrane vibration in the gerbil hemicochlea." J Neurophysiol **79**(5): 2255-2264.
- Rodriguez, L., E. Simeonato, P. Scimemi, F. Anselmi, B. Cali, G. Crispino, C. D. Ciubotaru, M. Bortolozzi, F. G. Ramirez, P. Majumder, E. Arslan, P. De Camilli, T. Pozzan and F. Mammano (2012). "Reduced phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis impairs inner ear Ca²⁺ signaling and high-frequency hearing acquisition." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(35): 14013-14018.
- Ruel, J., R. Nouvian, C. Gervais d'Aldin, R. Pujol, M. Eybalin and J. L. Puel (2001). "Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea." Eur J Neurosci **14**(6): 977-986.
- Ruel, J., J. Wang, D. Dememes, S. Gobaille, J. L. Puel and G. Rebillard (2006). "Dopamine transporter is essential for the maintenance of spontaneous activity of auditory nerve neurones and their responsiveness to sound stimulation." J Neurochem **97**(1): 190-200.

- Ruiz-Pesini, E. and D. C. Wallace (2006). "Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA." Hum Mutat **27**(11): 1072-1081.
- Safieddine, S., A. M. Prior and M. Eybalin (1997). "Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig." Eur J Neurosci **9**(2): 356-367.
- Santos-Sacchi, J. (1985). "The effects of cytoplasmic acidification upon electrical coupling in the organ of Corti." Hear Res **19**(3): 207-215.
- Satake, M. and M. C. Liberman (1996). "Morphological subclasses of lateral olivocochlear terminals? Ultrastructural analysis of inner spiral bundle in cat and guinea pig." J Comp Neurol **371**(4): 621-632.
- Sato, Y., T. Handa, M. Matsumura and Y. Orita (1998). "Gap junction change in supporting cells of the organ of Corti with ryanodine and caffeine." Acta Otolaryngol **118**(6): 821-825.
- Scemes, E. and D. C. Spray (2012). "Extracellular K(+) and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels." Neurochem Res **37**(11): 2310-2316.
- Sewell, W. F. (1996). Neurotransmitters and synaptic transmission, New York: Springer.
- Shen, Z. and D. C. Marcus (1998). "Divalent cations inhibit IsK/KvLQT1 channels in excised membrane patches of strial marginal cells." Hear Res **123**(1-2): 157-167.
- Sheppard, C. A., P. B. Simpson, A. H. Sharp, F. C. Nucifora, C. A. Ross, G. D. Lange and J. T. Russell (1997). "Comparison of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor distribution and subcellular Ca²⁺ release sites that support Ca²⁺ waves in cultured astrocytes." J Neurochem **68**(6): 2317-2327.
- Shi, X., C. Dai and A. L. Nuttall (2003). "Altered expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the cochlea." Hear Res **177**(1-2): 43-52.
- Shi, X., T. Ren and A. L. Nuttall (2001). "Nitric oxide distribution and production in the guinea pig cochlea." Hear Res **153**(1-2): 23-31.
- Shi, X., T. Ren and A. L. Nuttall (2002). "The electrochemical and fluorescence detection of nitric oxide in the cochlea and its increase following loud sound." Hear Res **164**(1-2): 49-58.

Smith, C. A. and F. S. Sjostrand (1961). "Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections." J Ultrastruct Res **5**: 523-556.

Smith, R. J., J. F. Bale, Jr. and K. R. White (2005). "Sensorineural hearing loss in children." Lancet **365**(9462): 879-890.

Sobkowicz, H. M., B. K. August and S. M. Slapnick (2004). "Synaptic arrangements between inner hair cells and tunnel fibers in the mouse cochlea." Synapse **52**(4): 299-315.

Someya, S. and T. A. Prolla (2010). "Mitochondrial oxidative damage and apoptosis in age-related hearing loss." Mech Ageing Dev **131**(7-8): 480-486.

Sperlagh, B., G. Szabo, F. Erdelyi, M. Baranyi and E. S. Vizi (2003). "Homo- and heteroexchange of adenine nucleotides and nucleosides in rat hippocampal slices by the nucleoside transport system." Br J Pharmacol **139**(3): 623-633.

Spoendlin, H. (1971). "Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation." Acta Otolaryngol **71**(2): 166-176.

Tabuchi, K., B. Nishimura, S. Tanaka, K. Hayashi, Y. Hirose and A. Hara (2010). "Ischemia-reperfusion injury of the cochlea: pharmacological strategies for cochlear protection and implications of glutamate and reactive oxygen species." Curr Neuropharmacol **8**(2): 128-134.

Tadros, S. F., M. D'Souza, X. Zhu and R. D. Frisina (2008). "Apoptosis-related genes change their expression with age and hearing loss in the mouse cochlea." Apoptosis **13**(11): 1303-1321.

Takeno, S., M. Wake, R. J. Mount and R. V. Harrison (1998). "Degeneration of spiral ganglion cells in the chinchilla after inner hair cell loss induced by carboplatin." Audiol Neurootol **3**(5): 281-290.

Takumida, M. and M. Anniko (2002). "Nitric oxide in the inner ear." Curr Opin Neurol **15**(1): 11-15.

Takumida, M., M. Anniko, R. Popa and D. M. Zhang (2001). "Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide." Acta Otolaryngol **121**(1): 16-20.

Teudt, I. U. and C. P. Richter (2007). "The hemicochlea preparation of the guinea pig and other mammalian cochleae." J Neurosci Methods **162**(1-2): 187-197.

Thorne, P. R., D. J. Munoz and G. D. Housley (2004). "Purinergic modulation of cochlear partition resistance and its effect on the endocochlear potential in the Guinea pig." J Assoc Res Otolaryngol **5**(1): 58-65.

Todt, I., A. Ngezahayo, A. Ernst and H. A. Kolb (1999). "Inhibition of gap junctional coupling in cochlear supporting cells by gentamicin." Pflugers Arch **438**(6): 865-867.

Tritsch, N. X., E. Yi, J. E. Gale, E. Glowatzki and D. E. Bergles (2007). "The origin of spontaneous activity in the developing auditory system." Nature **450**(7166): 50-55.

Usami, S., J. Hozawa, M. Tazawa, T. Yoshihara, M. Igarashi and G. C. Thompson (1988). "Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea." Acta Otolaryngol Suppl **447**: 36-45.

v. Békésy, G. (1952). "DC Resting Potentials Inside the Cochlear Partition." J Acoust Soc Am(24): 72.

v. Békésy, G. (1952). "Resting potentials inside the cochlear partition of the guinea pig." Nature(169): 241-242.

Vardjan, N. and R. Zorec (2015). "Excitable Astrocytes: Ca(2+)- and cAMP-Regulated Exocytosis." Neurochem Res **40**(12): 2414-2424.

Vetter, D. E., M. C. Liberman, J. Mann, J. Barhanin, J. Boulter, M. C. Brown, J. Saffiote-Kolman, S. F. Heinemann and A. B. Elgoyhen (1999). "Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation." Neuron **23**(1): 93-103.

Vizi, E. S., J. P. Kiss and B. Lendvai (2004). "Nonsynaptic communication in the central nervous system." Neurochem Int **45**(4): 443-451.

Voigt, J., A. Grosche, S. Vogler, T. Pannicke, M. Hollborn, L. Kohen, P. Wiedemann, A. Reichenbach and A. Bringmann (2015). "Nonvesicular release of ATP from rat retinal glial (Muller) cells is differentially mediated in response to osmotic stress and glutamate." Neurochem Res **40**(4): 651-660.

von Kugelgen, I. (2006). "Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes." Pharmacol Ther **110**(3): 415-432.

Wang, J., T. Menchenton, S. Yin, Z. Yu, M. Bance, D. P. Morris, C. S. Moore, R. G. Korneluk and G. S. Robertson (2010). "Over-expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein slows presbycusis in C57BL/6J mice." Neurobiol Aging **31**(7): 1238-1249.

Wang, J. C., N. P. Raybould, L. Luo, A. F. Ryan, M. B. Cannell, P. R. Thorne and G. D. Housley (2003). "Noise induces up-regulation of P2X2 receptor subunit of ATP-gated ion channels in the rat cochlea." Neuroreport **14**(6): 817-823.

Wangemann, P. (1996). "Ca²⁺-dependent Release of ATP from the Organ of Corti Measured with a Luciferin-Luciferase Bioluminescence Assay." Audit Neurosci **2**: 187-192.

White, P. N., P. R. Thorne, G. D. Housley, B. Mockett, T. E. Billett and G. Burnstock (1995). "Quinacrine staining of marginal cells in the stria vascularis of the guinea-pig cochlea: a possible source of extracellular ATP?" Hear Res **90**(1-2): 97-105.

Xiang, Z., X. Bo and G. Burnstock (1999). "P2X receptor immunoreactivity in the rat cochlea, vestibular ganglion and cochlear nucleus." Hear Res **128**(1-2): 190-196.

Yamane, H., Y. Nakai, M. Takayama, H. Iguchi, T. Nakagawa and A. Kojima (1995). "Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma." Eur Arch Otorhinolaryngol **252**(8): 504-508.

Yu, N. and H. B. Zhao (2009). "Modulation of outer hair cell electromotility by cochlear supporting cells and gap junctions." PLoS One **4**(11): e7923.

Zdanski, C. J., J. Prazma, P. Petrusz, G. Grossman, E. Raynor, T. L. Smith and H. C. Pillsbury (1994). "Nitric oxide synthase is an active enzyme in the spiral ganglion cells of the rat cochlea." Hear Res **79**(1-2): 39-47.

Zhang, Y., W. Tang, S. Ahmad, J. A. Sipp, P. Chen and X. Lin (2005). "Gap junction-mediated intercellular biochemical coupling in cochlear supporting cells is required for normal cochlear functions." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15201-15206.

Zhao, H. B., T. Kikuchi, A. Ngezahayo and T. W. White (2006). "Gap junctions and cochlear homeostasis." J Membr Biol **209**(2-3): 177-186.

Zhao, H. B. and J. Santos-Sacchi (2000). "Voltage gating of gap junctions in cochlear supporting cells: evidence for nonhomotypic channels." J Membr Biol **175**(1): 17-24.

Zhao, H. B., N. Yu and C. R. Fleming (2005). "Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18724-18729.

Zhao, W., Z. X. Lin and Z. Q. Zhang (2004). "Cisplatin-induced premature senescence with concomitant reduction of gap junctions in human fibroblasts." Cell Res **14**(1): 60-66.

Zheng, J., W. Shen, D. Z. He, K. B. Long, L. D. Madison and P. Dallos (2000). "Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells." Nature **405**(6783): 149-155.

Zhu, Y. and H. B. Zhao (2010). "ATP-mediated potassium recycling in the cochlear supporting cells." Purinergic Signal **6**(2): 221-229.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertációhoz felhasznált publikációk

Horváth T, Polony G, Fekete Á, Aller M, Halmos G, Lendvai B, Heinrich A, Sperlág B, Vizi ES, Zelles T (2016). ATP-Evoked Intracellular Ca²⁺ Signaling of Different Supporting Cells in the Hearing Mouse Hemicochlea. **Neurochemical Research**, 41(1-2):364-75.

Halmos G, **Horváth T**, Polony G, Fekete Á, Kittel Á, Vizi ES, Van Der Laan BFAM, Zelles T, Lendvai B (2008). The role of N-methyl-D- aspartate receptors and nitric oxide in cochlear dopamine release. **Neuroscience**, 154(2), 796–803.

11.2. A témához kapcsolódó egyéb publikációk

Polony G, Humli V, Andó R, Aller M, **Horváth T.**, Harnos A, Tamás L, Vizi ES, Zelles T (2014). Protective effect of rasagiline in aminoglycoside ototoxicity. **Neuroscience**, 265:263-73.

Lendvai B, Halmos GB, Polony G., Kapocsi J, **Horvath T**, Aller M, Vizi ES, Zelles T (2011) Chemical neuroprotection in the cochlea: The modulation of dopamine release from lateral olivocochlear efferents. **Neurochemistry International**, 59:(2) pp. 150-158.

Halmos Gy, Doleviczényi Z, **Horváth T**, Polony G, Vizi E Szilveszter, Lendvai Balázs, Zelles T (2006) In vitro ischaemia hatása a cochlearis dopamin felszabadulására. **Fül-Orr-Gégegyógyászat**, 52:(4) pp. 245-252.

11.3. A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk

Horváth T, Horváth B, Varga Z, Liktör B Jr, Szabadka H, Csákó L, Liktör B (2015) Severe neck infections that require wide external drainage: clinical analysis of 17 consecutive cases. **European archives of oto-rhino-laryngology**, 272(11) pp. 3469-74.

Horváth T (2011) Az információs forradalom orvosi szemmel. **Lege Artis Medicinae** 21(6-7) pp. 494-496

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Zelles Tibor PhD egyetemi docensnek, a segítséget, útmutatást, türelmet és biztatást, hogy a klinikai gyógyító munkám mellett messzemenőig támogatta a kutatómunkámat.

Köszönöm volt és jelenlegi főnökeimnek, Csokonai Vitéz Lajos PhD Főorvos Úrnak, valamint Liktör Bálint Osztályvezető Főorvos Úrnak önzetlen támogatásukat, hogy a tudományos munkámra is időt szakíthattam. Szintén köszönöm Z. Szabó László Emeritus Professor Úrnak, hogy felkeltette a tudomány iránti érdeklődésemet és mindvégig ösztönzött a kutatómunkám során.

Külön köszönetet szeretnék mondani Halmos Györgynek PhD, aki segített elindulni a kísérletes munkában és a hemicochlea preparátum beállításában, valamint Polony Gábornak PhD az áldozatos közös munkáért. Szintén köszönet illeti Gáborján Anitát PhD, aki megalapozta a kísérleteimben használt, *in vitro* mikrotérfogatú perfúziós technikával végzett dopamin mérés használatát.

Nagyon köszönöm Vizi E. Szilveszter Professor Úrnak, az MTA rendes tagjának, valamint az MTA KOKI és a SE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet munkatársainak a segítséget és a támogatást, kiemelten Fekete Ádám PhD, Szabó Szilárd PhD, Lendvai Balázs DSc, Aller Máté, Téglás Tímea, Humli Viktória, Berekméri Eszter, és Ószi Judit laborban velem együtt dolgozó munkatársaimnak. Hálás vagyok, hogy kutatómunkámat az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben és a SE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében végezhettem ahol ehhez a feltételek a legmagasabb nemzetközi színvonalon voltak biztosítottak.

Szeretném megköszönni minden volt és jelenlegi kollégámnak a volt Országos Gyógyintézeti Központ (HIETE), és a Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül- Orr- Gégészeti Osztályán a türelmüket, támogatásukat és segítségüket.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, feleségemnek a kitartást és támogatást, gyermekeimnek a türelmet, szüleimnek a bátorítást és a tanácsokat.