

# A Corti-féle szerv támasztósejtjeinek vizsgálata fejlődésben lévő és kifejlett hallású egerek hemicochlea preparátumában

Doktori értekezés

**Berekméri Eszter**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens  
Hivatalos bírálók: Jancsik Veronika, Ph.D.,  
nyugdíjas tudományos főmunkatárs  
Zsembery Ákos, M.D., Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2020

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	5
2. Bevezetés .....	7
2.1.1. A cochlea fő struktúráinak kialakulása.....	7
2.1.2. A Corti-féle szerv receptor és támasztósejtjei .....	8
2.1.3. A hallás kezdete (~P10) utáni további érési folyamatok.....	10
2.2. A Corti-féle szerv élettani működésének áttekintése.....	10
2.2.1. Szőrsejtek mechanoelektromos transzdukciója .....	10
2.2.2. A támasztósejtek főbb feladatai Corti-féle szerv fejlődése és megfelelő működésének fenntartása során .....	12
2.3. A purinerg jelátviteli rendszer .....	16
2.3.1. ATP felszabadulás .....	16
2.3.2. ATP receptorok .....	19
2.3.3. ATP hatás megszűnésének mechanizmusa a cochleában.....	23
2.4. Egyéb, vizsgált jelátviteli rendszerek a rágcsáló cochleában .....	24
2.4.1. Transziens receptor potenciál csatornák .....	25
2.4.2. Kolinerg jelátvitel támasztósejtekben.....	26
2.5. Intracelluláris $Ca^{2+}$ homeosztázis .....	26
2.6. A halláskutatás gyakorlati jelentősége, transzlációs vonatkozásai.....	27
2.6.1. Szenzorineurális halláskárosodások .....	27
2.6.2. A purinerg szignalizáció SNHL vonatkozásai.....	28
2.6.3. Acetil-kolin receptorok és TRP csatornák SNHL vonatkozásai .....	28
3. Célkitűzések .....	30
4. Módszerek .....	32
4.1. Kísérleti állatok .....	32
4.2. Hemicochlea preparátum elkészítése.....	32
4.3. Egy-sejt elektroporációs indikátortöltés .....	33
4.4. Kalcium-imaging (morfometriai és farmakológiai vizsgálatokhoz) .....	34
4.5. Drog adagolás menete .....	35
4.6. Adatelemzés.....	36
4.6.1. Funkcionális $Ca^{2+}$ imaging .....	36

4.6.2.	Fejlődő Deiters sejtek morфомetriai mérései.....	37
5.	Eredmények .....	38
5.1.	Egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszer beállítása és validálása .....	38
5.1.1.	Az egy-sejt elektroporáció alkalmas $Ca^{2+}$ indikátor bejuttatására a Corti-féle szerv támasztósejtjeibe .....	38
5.1.2.	ATP-vel reverzibilis és ismételhető $Ca^{2+}$ válaszok válthatóak ki Deiters, Hensen és Claudius sejtekben.....	43
5.1.3.	TRPA1 és TRPV1 csatornák stimulációja nem idézett elő $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést .....	46
5.1.4.	ACh receptor agonista karbakollal Deiters és Hensen sejteken is kiváltható $Ca^{2+}$ tranziens .....	48
5.2.	A morfológia és a purinerg szignalizáció fejlődése a Deiters sejtekben .....	49
5.2.1.	Deiters sejtek sejttestének és nyúlványának morfológiai változásai a postnatális fejlődés során nem mutatnak tonotópikus eltéréseket.....	49
5.2.2.	A fejlettség-függő spontán $Ca^{2+}$ aktivitás tonotópikus heterogenitást és szubcelluláris különbséget mutat.....	52
5.2.3.	ATP kiváltotta $[Ca^{2+}]_i$ jelek korfüggőek.....	54
5.2.4.	Szelektív P2Y receptor aktiváció kor- és tonotópia-függő $Ca^{2+}$ tranzienseket vált ki, P2Y dominanciával az apikális kanyarulatban.....	58
6.	Megbeszélés .....	61
6.1.	Egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszer beállítása és validálása egér hemicochlea preparátumban .....	61
6.1.1.	Hemicochlea preparátum előnyei .....	61
6.1.2.	Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltés cochleáris támasztósejtekben...	62
6.1.3.	ATP kiváltotta $Ca^{2+}$ válaszok Hensen, Claudius és Deiters sejtekben, beleértve ez utóbbiak phalangeális nyúlványát – szubcelluláris imaging lehetősége .....	63
6.1.4.	TRPA1 aktiválása nem váltott ki $Ca^{2+}$ választ Deiters és Claudius sejtekben, de Hensen sejtekben funkcionálhat ez a csatorna.....	65
6.1.5.	TRPA1 agonista elmozdulást okozott a Corti-szervben.....	65
6.1.6.	TRPV1 agonista kapszaicinnek nem volt hatása a vizsgált támasztósejtek intracelluláris $Ca^{2+}$ szintjére .....	66

6.1.7. ACh receptor aktiváció Deiters és Hensen sejtben is $Ca^{2+}$ tranziens idéz elő .....	66
6.2. A morfológia és a purinerg szignalizáció fejlődése az apikális és középső cochleáris kanyarulat Deiters sejtjeiben .....	67
6.2.1. A Deiters sejtek postnatális morfológiai fejlődése a hallás kifejlődésének kritikus időszakában .....	67
6.2.2. A spontán $Ca^{2+}$ aktivitás a phalangeális nyúlványon és a sejttesten is csökken a kor előrehaladtával.....	68
6.2.3. ATP indukálta $Ca^{2+}$ tranziensek alakja függ a fejlődési stádiumtól.....	70
6.2.4. P2X és P2Y receptorok együttesen vesznek részt a fejlődésben, tonotópia függően .....	70
7. Következtetések.....	72
8. Összefoglalás .....	75
9. Summary.....	76
10. Irodalomjegyzék .....	77
11. Saját publikációk jegyzéke .....	97
12. Köszönetnyilvánítás .....	98

## 1. Rövidítések jegyzéke

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> – extracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció

ö. e. – önkényes egység (arbitrary unit)

ABC – ATP-t kötő transzporter (ATP -binding cassette transporter)

ACh – acetil-kolin (acetylcholine)

AChR – acetil-kolin receptor (acetylcholine receptor)

ADP – adenzin-difoszfát (adenosine-diphosphate; purinerg receptor agonista)

AHL – korfüggő halláskárosodás (age-related hearing loss)

AITC – allil-izo-tio-cianát

AM – acetoxi-metil

ATP – adenzin-trifoszfát (adenosine-triphosphate; purinerg receptor agonista)

AUC – görbe alatti terület (area under curve)

BC – Boettcher sejt (Boettcher's cell)

BM – *membrana basilaris* (basal membrane)

CC – Claudius sejt (Claudius' cell)

CCD – töltés csatolt eszköz (charge coupled device)

CCh – karbakol (carbachol; AChR agonista)

CFTR – cisztás fibrózishoz köthető transzmembrán konduktancia szabályozó (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)

CPA – ciklopiazonsav (cyclopiazonic acid; endoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup> pumpa-blokkoló)

Cx – connexin

DAG – diacil glicerol

DC – Deiters sejt (Deiters' cell)

E – embrionális

HC – Hensen sejt (Hensen's cell)

IBC – belső határoló sejt (innner boarder cell)

IHC – belső szőrsejt (innner hair cell)

IPhC – belső phalangeális sejt (innner phalangeal cell)

IP3 – inozitol-triszfoszfát (inositol 1,4,5-trisphosphate)

ISC – belső árok sejt (inner sulcus cell)

OHC – külső szőrsejt (outer hair cell)

NTPD-áz – ektonukleotidáz (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase)

P – postnatális

Px – pannexin

PC – pillér sejt (pillar cell)

RM – Reissner membrán

ROS – reaktív oxigén gyök (reactive oxygen species)

S/N – jel/zaj arán (signal-to-noise ratio)

SNHL – szenzorineurális halláskárosodás (sensorineural hearing loss)

sv – *stria vascularis*

TM – *membrana tectoria* (tectorial membrane)

TNP-ATP – trinitrofenol-adenozin-trifoszfát (trinitrophenol-adenosine-triphosphate; purinerg receptor antagonista)

TRP – tranziens-receptor potenciál csatorna

TRPA1 – tranziens-receptor potenciál ankyrin 1-es típusú csatorna

TRPV1 – tranziens-receptor potenciál vanilloid 1-es típusú csatorna

## 2. Bevezetés

A hallás perifériás érzékszerve a belső fül csontos csigájában (a cochleában) helyet foglaló Corti-féle szerv. A csontos foglalat és a bonyolult anatómiai felépítés miatt az egyik legnehezebben megközelíthető és vizsgálható szerveink közé sorolható. Jelenlegi tudásunk nagy része a hallószerv működéséről még napjainkban is fiatal állatok vizsgálatából származik. Ezek az eredmények azonban csak korlátozottan ültethetőek át a kifejlett Corti-féle szervre, hiszen fejlődés alatt számos csatorna/receptor/egyéb fehérje expressziós mintázata változik. Ez nemcsak az olyan kísérleti állatokon (pl.: egérféléken) végzett tanulmányokról mondható el, amelyek hallószerve csak a második-harmadik postnatális hétre fejlődik ki [1, 2], de az *in utero* hallással rendelkező állatok (pl.: tengerimalac) szervén is mutattak ki további, postnatális érési folyamatokat [3].

### 2.1.1. A cochlea fő struktúráinak kialakulása

Az egér hallószerv fejlődése az agyhólyag mellett gyülekező, speciális transzkripcióss profillal rendelkező sejtekből indul, melyek kialakítják az úgynevezett otikus plakkot a 8,5. embrionális napon (E8,5). A sejtek osztódása és növekedése folytán, az idő előrehaladtával a plakk betűródik, kialakul az otikus kehely, majd lefűződve az otociszta [4, 5]. A E11,5. napon kezdődő betűródéssel indul meg a sejtek morfogenezise, amelynek következményeként a 14. postnatális napon (P14) megjelenik az első hallásoptimum – az, az egér esetében 15 kHz körüli frekvenciatartomány, ahol a legérzékenyebb a szerv a hangingerekre [4–6]. Az otocisztát körülvevő mesenchymális sejtrétegből alakul ki a hártás labirintus csontborítása [5].

A kialakult otociszta belsejét endolymphatikus folyadék tölti ki, melynek összetétele és mennyisége a fejlődés során változik. A cochleáris csatorna az E16,5 napra különül el teljesen az egyensúlyozó rendszerhez kapcsolódó struktúráktól. Ezekben a napokban jelenik meg a csatorna két oldalán az az üregrendszer, amely majd a perilymphatikus térrész lesz a kifejlett egyedekben. A cochleáris csatornát körülvevő, főleg fibrocita típusú, sejtek apoptózisa során P0 korra alakul ki a csigában a három jól elkülönülő térrész vagy *scala* (1. ábra) [4]. Az eredeti cochleáris csatorna a közepén elhelyezkedő *scala mediat* fogja alkotni, melyben az endolympha kering és magában foglalja az érzékszervet. A *scala mediat* a *scala tympanitól* az érzékszerv által termelt *membrana*

*basilaris* választja el, míg a *scala vestibuli*től a sejtapoptózisokból megmaradó Reissner-féle membrán sejtjei választják el (1. ábra). Ezen apoptózissal létrejövő két szélső *scala*, P11 korban, az apikális szakaszon összenyílik, kialakítva a *helicotrema*t. Folyadékterük egységesen perilympa lesz, míg a *scala media*t továbbra is magas  $K^+$  tartalmú endolympha tölti ki.

### **2.1.2. A Corti-féle szerv receptor és támasztósejtjei**

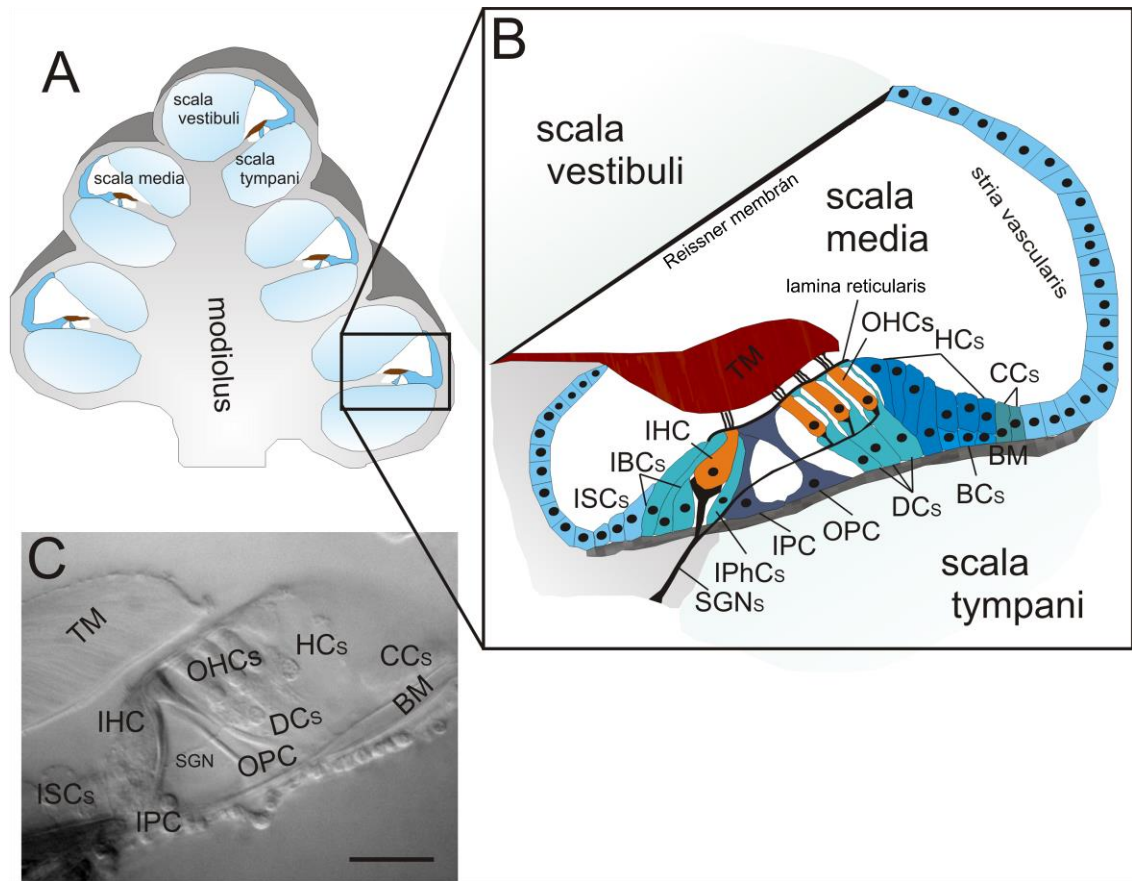
A neuroblastok az otociszta záródásakor vándorolnak be a szervkezdeménybe és közös prekursorait adják a receptor szőrsejteknek, támasztósejteknek és az elsődleges hallóneuronoknak [7]. E16,5 időszaktól indul meg a sejtek dramatikus proliferációja-differenciációja, amely során létrejön a leendő Corti-féle szervet jellemző sejtömeg [4, 5, 8]. A kialakuló átmeneti struktúrát Kölliker-féle szervnek nevezzük és a belső szőrsejteket és az azt körülvevő karcsú támasztósejtek sokaságát takarja [8].

A Kölliker-szervben kezdődik meg a támasztósejtek és a szőrsejtek elkülönülése [6]. Napjaink regenerációs medicinája aktívan kutatja ezt a fejlődési időszakot, keresve azokat a genetikai faktorokat, amelyek predesztinálják a szőrsejt-támasztósejt létet és a későbbiekben lehetőséget adhatnak az elveszett, és eredetileg nem pótolható, szőrsejtek visszaállítására a támasztósejtek proliferáltatása és/vagy transzdzifferenciáltatása révén.

A fejlődés menete mediolaterálisan és bazoapikálisan halad, azaz először a csiga bazális kanyarulatánál lévő belső szőrsejtek jelennek meg. Ekkor közvetlen ingerléssel már kiváltható a klasszikus mechanoelektromos transzdukciós (MET) csatornák árama [6, 9]. Egyes kutatócsoportok szerint az érés kezdete nem teljesen a bazális, inkább a középső kanyarulat alsóbb részein indul és innen terjed mindkét irányba a fejlődés frontvonala [5]. A csiga bazális-apikális pólusa között fejlettségi szintben 2-4 nap eltérés is lehet [9]. A kialakuló belső szőrsejteket övező karcsú, oszlopszerű támasztósejtek nagy része a fejlődés további szakaszában apoptotizál [5]. Az epithélium vertikális rétegződésen megy keresztül, melynek során a szőrsejtek elválnak a bazális membrántól és a támasztósejtek által körülfogott helyeikre kerülnek. A Corti-féle szerv szabályos szerkezetének kialakulása során a belső szőrsejtek egyetlen sorát a belső határoló és belső phalangeális támasztósejtek fogják közre, míg a külső szőrsejtek három sorát a Deiters sejtek támogatják (1. ábra B és C). A két szőrsejt típus sorait a pillér sejtek választják el egymástól, miközben a Corti-alagutat szegélyezik. A külső



szőrsejtektől laterálisan a Hensen sejtek zárják le a Corti-féle szervet. A Hensen sejtekhez csatlakozó köbös Claudius és Boettcher sejtek alakítják ki a külső árkot, amely átmenetet képez a csiga oldalfalát borító *stria vascularis* között (1. ábra).



**1. ábra.** A cochlea és a Corti-féle szerv felépítésének sematikus képe (AB) és a hallószerv kifejtett hallású egerből készült hemicochlea preparátumon (C, apikális kanyarulat). A csiga (cochlea) tengelye, a *modiolus*, körül csavarodik fel, fajfüggő módon több kanyarulatot is megtehet, így tengerimalac esetében 5 (A), eger és ember esetében 2,75 fordulatot tesz meg. Kanyarulatainak száma fajfüggő. Minden kanyarulat 3 további részre különül (AB), melyek közül a középső, *scala media*, tartalmazza a hallószerv érzékhámját (BC). A ferde megvilágítással készült eger hemicochlea preparátumában jól azonosíthatók a sematikus ábrán narancssal jelölt szőrsejtek (IHC – belső szőrsejt és OHCs – külső szőrsejtek), valamint a kézzel jelölt különböző támasztósejttípusok (ISCs – belső árok sejtek; IBCs – belső határoló sejtek; IPhCs – belső phalangeális sejtek; IPC és OPC – belső és külső pillér sejtek; DCs – Deiters sejtek; HCs – Hensen sejtek; CCs – Claudius sejtek) és membránkomponensek (TM – *membrana tectoria*; BM – *membrana basilaris*). lépték: 30  $\mu\text{m}$ . [10]

A sejtek differenciációja és a szerv fölé boruló, főleg kollagén rostok alkotta, *membrana tectoria* kialakulásának idejéből arra következtethetünk, hogy a Corti-féle szerv a bazális póluson a P11, az apikális részen a P14 napra érik meg strukturálisan [4].

Ezeket az anatómiai alapú megfigyeléseket élettani, viselkedési kísérletekkel is alá lehet támasztani, így a P14-es időpont egybe esik az érzékenységi optimum megjelenésével egerekben [1].

### **2.1.3. A hallás kezdete (~P10) utáni további érési folyamatok**

A hallás kezdete (~P10-12-től a receptorsejtek reagálnak a külvilágból érkező hangingerekre) után a szőrsejtek, elhelyezkedésétől függő, tonotópikus beidegzettsége újra rendeződik a környezeti jeleknek megfelelően (remapping) és kialakul a végleges, felnőtt korra is jellemző frekvencia térkép [11]. A kialakuló frekvencia térkép, tonotópia, a későbbiekben az egész hallópályát és idegi feldolgozást jellemzi. Alapja, hogy a csiga bazális kanyarulatában a magas frekvencián, míg egyre feljebb haladva az alacsonyabb frekvenciákon megszólaló hangok váltanak ki ingerületet. Az aktiválódó neuronok a szomszédos területekről elindulva mindvégig egymás térbeli közelségében haladnak a VIII. agyidegen keresztül, kapcsolnak át az átkapcsolási pontokban és vetülnek a hallókéregre.

A remapping során strukturálisan már kevés változás figyelhető meg, azonban funkcionálisan új csatornák megjelenésével az egyes sejtekből elvezethető áramok változásokon mennek keresztül, valamint egyes molekulák expressziós mintázata is változásokat mutat (melyeknek hatásait még nem teljesen ismerjük). A postnatális fejlődéssel foglalkozó kutatások legfeljebb az első hónap végéig futnak. Innentől egyes egértörzsekben már működésbe lépnek a korfüggő halláskárosodással (age-related hearing loss - AHL) kapcsolatos gének: olyan mutációk, amelyek egyes, a hallásban kiemelt jelentőségű molekulát (pl.: connexinek, P2X2 receptor) érintenek [12]. Így például a több AHL gént is tartalmazó DBA/J egértörzs egyedei a harmadik hónap végére teljesen megsüketülnek [13].

## **2.2.A Corti-féle szerv élettani működésének áttekintése**

### **2.2.1. Szőrsejtek mechanoelektromos transzdukciója**

A hang a levegő rezgése, melyet a külső fül fülkagylója gyűjt össze, a hallójárat irányít a dobhártyához és a középfül hallócsontocskáinak részvételével felerősítve kerül át a belső fülbe. Az utolsó hallócsontocska, a kengyel, talpa benyomódik a vékony hártyával fedett ovális ablakon. A rezgés átadódik a *scala vestibuli* terében lévő

perilymphának és ebben halad tovább. A csiga csúcsán lévő *helicotrema* nevű nyíláson átkerül az alsó perilymphatikus folyadéktérbe, a *scala tympani*-ba. Itt a rezgő folyadék energiája egy részét átadja a Corti-féle szerv alapját képező *membrana basilaris*-nak. A bazális membrán végzi el az első frekvenciaelemzést a feldolgozás során, ugyanis fizikai tulajdonságai (szélesség, vastagság, feszeség) csak bizonyos helyen lesznek megfelelőek egy adott frekvencia átvételére. Itt fogja elérni a maximális kitérését. A magasabb hangok nagy frekvenciája a csiga alsó részén (keskeny, feszes bazális membránál), a mélyebb hangok alacsonyabb frekvenciája a csiga csúcsán (szélesebb, lazább membrán esetén) térítik ki a *membrana basilaris*-t, ezzel megalapozva a hallórendszer további részeire is kiterjedő tonotópiát.

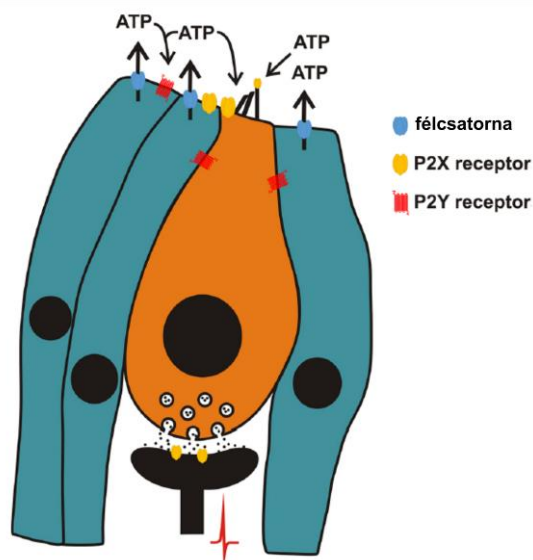
A kitérő *membrana basilaris*-sal természetesen a rajta pihenő Corti-szerv is elmozdul. A külső szőrsejtek sztereociliumai érintik a felettük húzódó *membrana tectoriát*, így a membrán kitérésekor a sztereociliumok elhajlanak, nyitva ezzel a rajtuk elhelyezkedő mechanoelektromos transzdukciós (MET) csatorna-komplexet. A nem-szelektív kation csatorna-komplexen keresztül főleg  $K^+$  áramlik be az endolymphatikus térből, depolarizálva a sejtet és további, feszültség-függő csatornák nyitását előidézve [14, 15]. A depolarizálódott külső szőrsejtek laterális falában lévő speciális motorprotein, a prestin, alakváltozást idéz elő a szőrsejtben, amely kihat a környező struktúrákra, elmozdítva azokat, így a *membrana tectoriát* is. A külső szőrsejteknek ezt az erősítő tulajdonságát nevezik cochleáris amplifikációnak, ami a hallásérékenység és a frekvencia szelektivitás fokozásához járul hozzá [16, 17]. A további kitérések elegendőek ahhoz, hogy a belső szőrsejtek *membrana tectoriától* távolabb eső sztereociliumai is érintkezzenek vele, elhajoljanak és megnyíljanak a rajtuk elhelyezkedő MET csatornák. Ez depolarizálja a sejtet, amely erre glutamát ürítéssel válaszol, ingerelve a spirális ganglion neuron (SGN) afferenseket. A cochleáris amplifikáció folyamata nélkül is végbe mehet a belső szőrsejtek aktiválódása, ehhez azonban nagyobb hangnyomású (40-50 dB-lel hangosabb) hanginger szükséges [18]. A belső szőrsejtek a tényleges receptorsejtek. Számtalan afferens (I. típusú SGN) idegrost fut hozzájuk, amelyek a hanginformáció központba szállításáért felelősek [19]. Egy-egy ilyen szőrsejt több afferens beidegzést is kap, míg a külső szőrsejtekre sokkal kisebb mértékű beidegzés jellemző (a II. típusú SGN-ok mindegyike több külső szőrsejttől veszi fel az ingert).

## 2.2.2. A támasztósejtek főbb feladatai Corti-féle szerv fejlődése és megfelelő működésének fenntartása során

A támasztósejtek, mint ahogy a központi idegrendszer glia sejtjei, az elmúlt években kerültek a figyelem előterébe. Egyre több kutatás látszik igazolni azt az elképzelést, hogy a támasztósejtek nem csupán strukturális és élettani támogató szerepet játszanak a szőrsejtek életben tartásával, hanem aktívan is részt vesznek és befolyásolnak olyan folyamatokat, mint a hallásérzékenység vagy a hallószerv megfelelő anatómiai felépítésének kialakítása [20, 21].

### 2.2.2.1. Fejlődő receptorsejt-neuron szinapszisokérésének támogatása

Néhány napos patkányban a SGN-ok a belső spirális hálózattig (a belső szőrsejtek vonaláig) érnek. Később áthaladnak a pillér sejtek övezte Corti-alagúton és a külső spirális hálózat kialakításával beidegzik a külső szőrsejteket (OHC-k) is [22, 23]. A beidegzés ekkor nem specifikus, mind az I-es és II-es típusú SGN-ok beidegzik az IHC-ket és OHC-eket is. Az első hallás optimum megjelenése előtti héten (~P7-14) kezdődik meg a specifikusság kialakítása, a nem használt szinapszisok felszámolása [24].



**2. ábra.** Elsődleges hallóneuronok szinaptikus specializációjában szerepet játszanak a támasztósejtek félcsatornán keresztül történő ATP kibocsájtásával (lásd később). Az ATP parakrin jelátvitellel aktiválja a fejlődő szőrsejteket, bennük  $Ca^{2+}$  akciós potenciált és glutamát transzmitter ürülést vált ki, melynek hatására a neuronok tüzelni kezdenek. A szinaptikus aktivitás a szőrsejt-SGN szinapszisok megerősödéséhez vezet [10].

Ebben az időszakban figyelhető meg az elsődleges hallóneuronok jellegzetes spontán aktivitása (P9-11 a csúcspanna periódus patkány esetében [25]). Ezeket az esemény-független  $\text{Ca}^{2+}$  akciós potenciálokat az érő szőrsejtek generálják, jelet adva az egyes szinapszisok hasznosságáról, illetve felesleges voltáról [8]. A szőrsejtek ingerületbe jöveteléért feltehetően a klaszterekben aktiválódó támasztósejtek felelősek, melyek aktivációjuk során ATP-t szabadítanak fel. Az ATP parakrin szignálként a közelben elhelyezkedő szőrsejtek purinerg receptorain keresztül depolarizálja azokat, elősegítve a glutamát neurotranszmissziót [8, 25–28] (2. ábra).

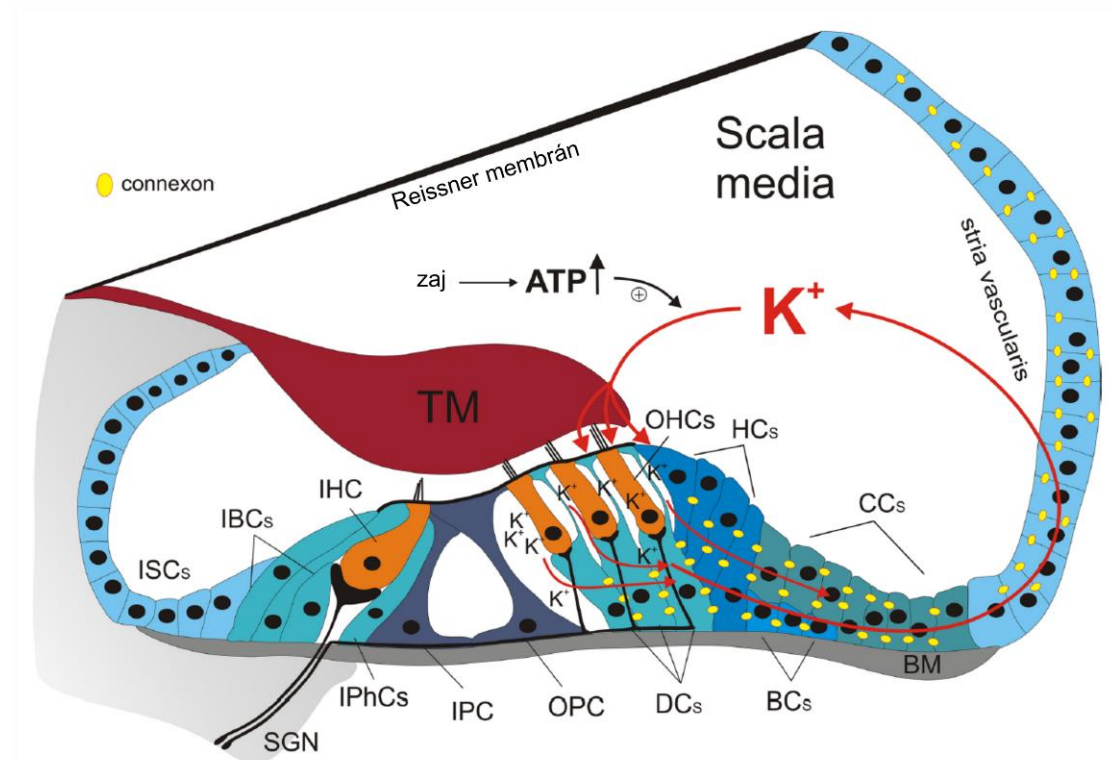
A postnatális fejlődés során ez a spontán, nem hanginger által kiváltott aktivitás – mely, az egész leendő hallórendszert jellemzi – fokozatosan visszafejlődik, és a második hét végére teljesen megszűnik (belső szőrsejtek esetén). Külső szőrsejtek esetében csak egy nagyon rövid időperiódusban találtak eddig spontán  $\text{Ca}^{2+}$  aktivitást – a P7-8-as időszakban [29]. Az említett időszak alatt az innerváció a klasszikus mintázatot veszi fel: az I-es típusú SGN-ok egy-egy belső szőrsejtet, a II-es típusúak pedig több külső szőrsejtet látnak el szinapszissal. Az afferensek mellett, acetil-kolint tartalmazó efferens neuronok futnak nagy mennyiségben a külső szőrsejtekhez, amelyek a sejtek negatív-visszacsatolását és ezzel hallásvédő funkcióját irányítják [30–32].

Egyes támasztósejtek szintén rendelkeznek beidegzéssel, bár ennek foka a receptorsejtekéhez képest igen alacsony. Eddig a Deiters és Hensen sejtekről bizonyították anatómiai munkák efferens beidegzésüket, szerepük azonban kérdéses a hallás szempontjából [33].

#### **2.2.2.2. $\text{K}^+$ recirkuláció és a hallásérzékenység szabályozása**

A támasztósejtek a szőrsejtek működését a kifejlett hallószervben is befolyásolják a környező folyadékterek ionkoncentrációjának szabályozásával. Szerepet játszanak az endolympha  $\text{K}^+$  szintjének beállításában (3. ábra), ezzel a hallásérzékenység finom hangolását is végzik [34]. A szőrsejtek sztereociliumai a magas  $\text{K}^+$  tartalmú endolymphába nyúlnak, így az aktiválódó MET csatornákon keresztül főként  $\text{K}^+$  kerül a sejtekbe, amely a bazolaterális membránokon keresztül távozik a perilymphatikus térbe. Innen a támasztósejtek veszik fel és kiterjedt réskapcsolat (gap junction) összeköttetéseiken keresztül visszajuttatják a *stria vascularis* marginális sejtszeteihez, ahol reszekretálódhat az endolymphába [10, 20, 35]. Lehetőség van azonban a  $\text{K}^+$

perilymphában tartására: a támasztósejtek réskapcsolataik zárásával képesek gátolni a  $K^+$  visszajuttatását. Így az endolympha és a szőrsejt sejtplazmája közötti potenciál lecsökken. A potenciál csökkenés miatt kisebb lesz az ionok szőrsejtbe lépését elősegítő elektromos hajtóerő és ezzel csökken a szőrsejtek depolarizációjának mértéke [10, 20, 35]. A réskapcsolat záródás előidézhető a sejtek intracelluláris  $Ca^{2+}$  szintjének növelésével, amely a zaj hatására megnövekvő endolymphatikus ATP koncentráció és az általa elindított purinerg jelátviteli mechanizmusok révén valósul meg [10, 36, 37].



**3. ábra.** A támasztósejtek kiterjedt réskapcsolataikkal segítik az endolympha  $K^+$  szintjének beállítását, ezzel szerepet játszanak a hallás érzékenység modulálásában. Zajterhelésre az endolympha ATP szintje megemelkedik, ezzel egyrészt a purinerg receptorokon keresztül fokozódik a  $K^+$  beáramlás a sejtekbe (azaz az endolympha  $K^+$  szintje és a további hajtóerő az ionbeáramláshoz lecsökken), másrészt  $[Ca^{2+}]_i$  növekedést idéz elő, melyek következtében a  $K^+$  a perilymphatikus térben marad a réskapcsolatok záródása miatt. A  $K^+$  nem kerül vissza a *stria vascularis* sejtjeibe, hogy onnan reszekretálódhasson az endolymphába, helyreállítva az eredeti  $K^+$  szintet. Az endolymphatikus potenciál tartósan csökken, ezzel gátolva a szőrsejtek és az elsődleges hallóneuronok túlingerlődését és excitotoxicitását [10].

### 2.2.2.3. Hallásvédő támasztósejt funkciók

A támasztósejtek mindezek mellett a sérülékenyebb szőrsejtek apoptotikus folyamatait és a hegszövetképzést is szabályozzák. A sérült területeket körbe veszik és elhatárolják az ép területektől, azok megóvása érdekében. Az elpusztult szőrsejtek bekebelezését is a támasztósejtek végzik a Corti-szervben [38, 39].

Fiatal állatokban a szőrsejt sérülést követően intercelluláris  $Ca^{2+}$  hullámok haladnak végig a támasztósejteken, amelyet génexpressziós mintázatváltozás követ [40, 41]. A  $Ca^{2+}$  hullámok nyomán a mitogén aktiválta protein kináz jelátviteli út több alkotó eleme is aktiválódik, amelyek közül kiemelhetjük az ERK1/2 extracelluláris kinázokat. Ezek a támasztósejtekből a sérülést követő 5-10 percen félcsatornákon keresztül távoznak és a sérült szőrsejtek további eliminációs folyamataiban vesznek részt, ezzel óvva a szerv integritását [40].

Bár az emlősök nem képesek az elvesztett szőrsejtek pótlására, más rendszertani csoportokban (madarak, hüllők) ez lehetséges. A szőrsejt pótlás alapvetően két módon történhet: mitotikus helyettesítéssel vagy direkt támasztósejt transzdifferentiációval [42, 43]. Mindkettő a támasztósejtek átprogramozásával (expressziós mintázatának változásával) valósul meg.

### 2.2.2.3. Cochleáris amplifikáció

A támasztósejtek közül szeretném kiemelni a Deiters-féle sejtet, amelyről speciális, polarizált anatómiai szerkezete miatt, úgy gondolják hogy szerepet játszik a külső szőrsejtek amplifikációs mechanizmusaiban [44, 45]. Kimutatták (izolált sejtek esetében), hogy az egyébként a szőrsejtek apikális pólusáig felnyúló phalangeális nyúlványa (1. ábra) képes elmozdulni exogén ATP hatására [46]. Különleges alakja miatt azonban nagyon nehezen vizsgálható *in situ* preparátumokban: phalangeális nyúlványuk sok esetben a külső szőrsejtek takarásába kerül. A legtöbb Deiters sejtet érintő vizsgálat eddig fiatal állatok izolált sejtjein történt – Ph. D. munkám során ezen sejtípussal kiemelten foglalkoztam kifejezve *in situ* funkcionális  $Ca^{2+}$  imaging vizsgálatának módszerét.

## 2.3.A purinerg jelátviteli rendszer

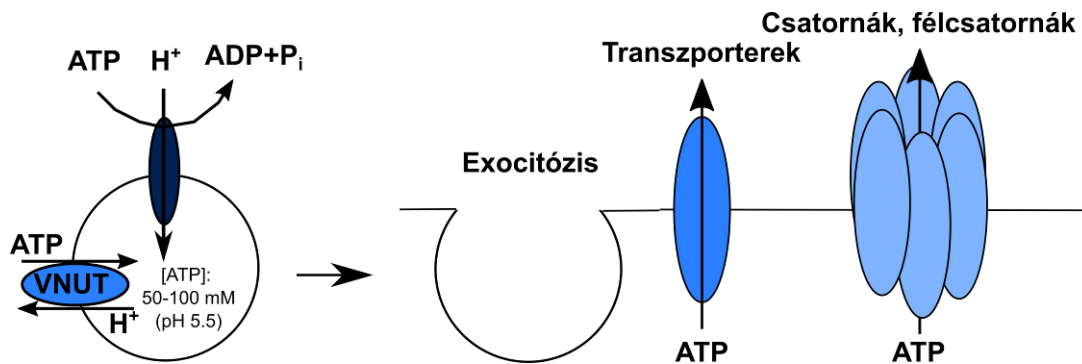
Az ATP, ismert energiatároló-, közlő-, feladatain kívül, mint extracelluláris jelátviteli molekula is megtalálható az élőlényekben. Főként helyi, auto- és parakrin szignalizációs mechanizmusokban vesz részt [47–49]. A purin és pirimidin nukleotidok jelátvivő szerepét elsőként Szent-Györgyi és Drury vetette fel [50]. Felvetésük bizonyítást nyert az évek során, ahogy sorban sikerült kimutatni a neurotranszmitter rendszerekre jellemző molekulákat: a felszabadulást (release-t) segítő fehérjéket, a receptorokat és a lebontó/visszavevő mechanizmusokhoz kapcsolódó fehérjéket.

### 2.3.1. ATP felszabadulás

Az ATP, a koncentráció különbségek miatt (intracellulárisan: ~10 mM ([51]; extracellulárisan nanomoláris koncentráció [52]), mindig kifelé áramlik a sejtekből, így energia befektetése nélkül megoldható az ATP felszabadítás. Maga a folyamat több, eltérő úton is végbe mehet [53] (2. és 4. ábra). A legfontosabb és talán a legjobban leírt folyamat az exocitózis, amelyet neuroszekretoros sejtekben figyeltek meg először. Neuroendokrin és exokrin sejtekben tiszta ATP tartalmú vezikulák különíthetőek el, míg egyéb neuronokban, érzékszövetekben kotranszmitterként vannak jelen más jelátvivő anyagok mellett. Az ATP felszabadulás szabályos  $Ca^{2+}$ -függő vezikulafúzióval történik [54]. A vezikulába való bekerüléséért a Soluble Carrier 17A9 nevű fehérje a felelős, amit nem régen azonosítottak, mint vezikuláris nukleotid transzportert [54]. Feltehetően exocitózissal ürülnek azok az ATP-vel telt vezikulák is, amelyeket a belső fülbeli *stria vascularis* sejtjeiben figyeltek meg [55].

Az exocitózison túl az ATP távozhat a sejtől transzmembrán molekulák segítségével (félcsatornák, P2X7, kalcium-homeosztázis modulátor-1 csatorna, térfogat szabályozott csatorna, Maxi anion csatornák és különböző szállító molekulák: ABC-transzporterek, CFRT; 2. és 4. ábra) [56]. Ezek közül kiemelném a félcsatornák és a P2X7 szerepét, valamint kitérnék a sejt sérülést követő extracelluláris ATP szint növekedésre is.





**4. ábra.** ATP felszabadulási mechanizmusok. Az ATP a vezikulákba a vezikuláris nukleotid transzporterek (VNUT) egyik típusának segítségével, a Soluble Carrier 17A9-cel jut be, majd onnan szabályozott exocitózissal szabadul fel. Ugyanakkor egyéb felszabadulási módokat is feltártak: különböző transzporterek (pl.: ABC transzporterek) és csatornák, félcsatornák (pl.: P2X7 alkotta csatornák, connexin-pannexin félcsatornák) is alkalmasak az ATP sejtől történő felszabadítására. (Saját ábra [48] nyomán.)

#### 2.3.1.1. Félcsatornák és cochleáris expressziójuk

Mind a connexin (Cx), mind a pannexin (Px) fehérjék expresszióját kimutatták már a belső fülben.

Az, egyenként 4 transzmembrán domént tartalmazó, Cx-ek hatásával összekapcsolódva connexonokat alkotnak, amelyek a sejt felszínén félcsatornáként jelennek meg (4. ábra), míg két sejt connexonja összekapcsolódva réskapcsolatot hoz létre [57]. Nyitással lehetővé teszik a sejtbe/sejtből és a sejtek közötti anyagáramlást. Aktiválásukat befolyásolja a sejtek membrán potenciálja (-40 - -60 mV között nyitottak), valamint néhány altípusuk (így a fülben találhatóak is) érzékeny  $Ca^{2+}$ -ra és harang alakú nyitási-valószínűségi görbét mutatnak a  $Ca^{2+}$  koncentráció függvényében [54, 56].

Cx26 és Cx30 expresszálódik a cochleáris támasztósejteken és az oldalfal sejtjein, de a szőrsejteken nem (3. ábra) [58]. Mindkét fehérje génjének mutációja halláskárosodást okoz [59]. Valószínűleg a fejlődés során jelentkező, szőrsejtek fejlődését is irányító  $Ca^{2+}$  hullámok terjedésében játszanak szerepet: egyrészt ATP felszabadítással (2. ábra), másrészt réskapcsolatokon keresztüli intercelluláris IP3 áramlás segítségével [29, 60].

A pannexinek (Px) a gerinctelen innexinekkel rokon fehérjék, amelyek molekuláris felépítésben nagyon hasonlítanak a Cx-ekre, bár nincs közöttük szekvencia homológia [61]. 4 transzmembrán domént tartalmazó 6 Px áll össze koncentrikusan, csatornát alkotva [62]. Nem képeznek réskapcsolatokat, csak félcsatornákat alkotnak. Három fehérjét sikerült mindmáig elkülöníteni (Px1, 2, 3), és mindhárom expresszióját

kimutatták a belső fülben [63]. Legelterjedtebb közülük a Px1, amelyről bizonyították ATP permeabilitását is [64]. A Px1 csatornák mechanikusan ingerelhetők, valamint az  $[Ca^{2+}]_i$  szint növekedése is nyitja ezeket a csatornákat [64]. ATP-re is nyitnak, de nem közvetlenül, hanem P2X7 receptor ( $Ca^{2+}$  független módon, lásd lejjebb) és P2Y receptorok ( $Ca^{2+}$  függő módon) közvetítésével. Azonban, ha a külső ATP koncentráció nagyobb, mint ami a csatorna nyitáshoz szükséges, akkor hatása gátlásba megy át és záródik a csatorna [54, 56].

Ezek alapján a Px-ek szerepe, a Cx-ekhez hasonlóan, a  $Ca^{2+}$  hullámok terjedésében lehet, amelyet ATP kibocsátással, az extracelluláris szintjének emelésével idéznek elő és tartanak fenn [65]. Ugyanakkor a Px-ek szerepét a  $Ca^{2+}$  hullámok terjedésében egyesek kizárták a fül esetében [66] – nekik Cx26  $-/-$  és Cx30  $-/-$  egérben megszűnt a  $Ca^{2+}$  hullám terjedése, míg P2X7  $-/-$  és Panx1  $-/-$  egérben nem. Más csoportok ezzel szemben a Px1 molekulát tartják a fő hullámterjedést elősegítőnek és a Cx-ek szerepét kérdőjelezzik meg [63, 67, 68].

### **2.3.1.2. P2X7 purinoreceptor**

Érdekesség, hogy az egyik ATP vezérelt ioncsatornáról, a P2X7-ről is kimutatták ATP áteresztőképességét. Ez annak tudható be, hogy a P2X7-es csatorna pórusátmérője igen nagy a többi ATP kapuzott ioncsatornáéhoz képest. Egyes források szerint a 900 Da-nál nagyobb molekulákat is képes átengedni [54]. Feltételezik, hogy a P2X7 Px1 csatornával asszociált és valójában Px1 felelős az ATP felszabadulásért, ami a P2X7 aktiválódását kíséri [61]. Ez az interakciós komplex ATP aktiválta ATP felszabadulást vált ki, ami az alapját képezheti az ATP vezérelte  $Ca^{2+}$  hullámoknak.

### **2.3.1.3. Sejtsérülés okozta ATP felszabadulás**

Szabályos metabotróp körülmények között a sejtek (neuronok) citoplazmatikus ATP szintje  $\sim 10$  mM. Stressz hatására az idegsejtek, ugyanúgy, mint a belső fül szőrsejtjei ATP felszabadulással válaszolnak [32, 41, 69–71]. Ez egyszerű kísérleti felállásban a szőrsejtek lézeres eltávolításakor vagy erős mechanikus ingerlésekor is megfigyelhető [40, 41], de az endolympha ATP tartalmának növekedése is kimutatható tartós zaj vagy iszkémia hatására [72]. Ugyanakkor az endolymphetikus ATP szint növekedésének nem csak a szőrsejtsérülés során felszabaduló ATP lehet az oka, hanem a *stria vascularis*

marginális sejtjeinek fokozott ATP exocitózisa is, amely káros ingerek hatására indul meg [73].

Eddig, tudomásunk szerint, még nem foglalkoztak a támasztósejtek sérülésével, de a központi idegrendszer asztrocitáin szintén sikerült kimutatni ATP felszabadulást metabolikus stressz hatására [74].

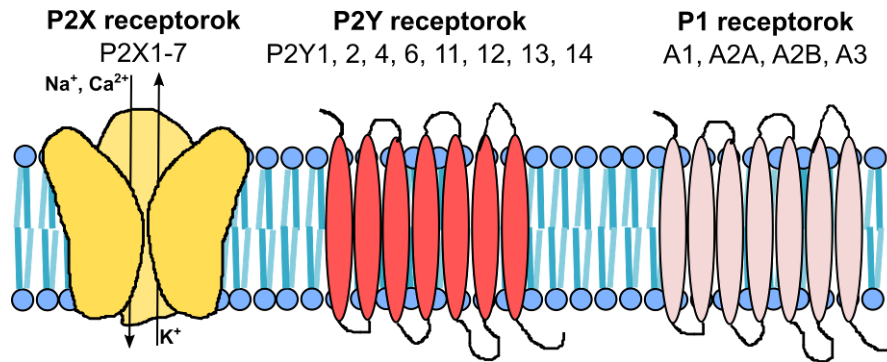
### **2.3.2. ATP receptorok**

A purinerg receptorok két nagycsaládra oszthatóak: az adenzin érzékeny P1 és az ATP érzékeny P2 családra. A P2 család tovább osztható P2X ionotróp és P2Y metabotróp alcsaládokra (5. ábra).

Az ionotróp receptor család 7 további receptor altípust foglal magába (P2X1-7). A receptorok homo-és/vagy heterotrimerekből épülnek fel, amelyek egyenként két transzmembrán domént tartalmaznak, és nem-szelektív kationcsatornaként funkcionálnak nyitásuk esetén [75]. A különböző felépítésű receptorok eltérnek egymástól konduktivitásban, deszenzitizációs időben, pH és agonista-antagonista iránti érzékenységben [76–79].

Az altípusok közül kiemelendő a P2X7-es altípus, amely legtöbbször homomerként fordul elő (bár írtak le P2X4/7 heteromert is [80]). Jellemzője, hogy a többi altípusnál nagyobb ATP koncentráció képes csak aktiválni és hatalmas pórusokat képezve, ionokon kívül más anyagok be- és kiáramlását is elősegítheti (lásd feljebb említett ATP felszabadulás) [81–83].

A metabotróp család 8 további receptort foglal magába (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14). Ezek közül a P2Y11 nem található meg a rágcsálógenomban [84, 85]. Másodlagos jelátviteli útvonalak aktiválása tekintetében két csoportra oszthatóak: az első csoporthoz P2Y1, 2, 4, 6, és P2Y11 tartozik, míg a másodikhoz P2Y12, 13, és P2Y14. Az első csoportba tartozó P2Y receptorok serkentő G-proteint kötnek, amely a DAG-IP3 másodlagos intracelluláris jelátviteli utat indítja el (lásd alább), míg a második csoport tagjai G<sub>i</sub> gátló proteinhez kapcsolódnak [86].

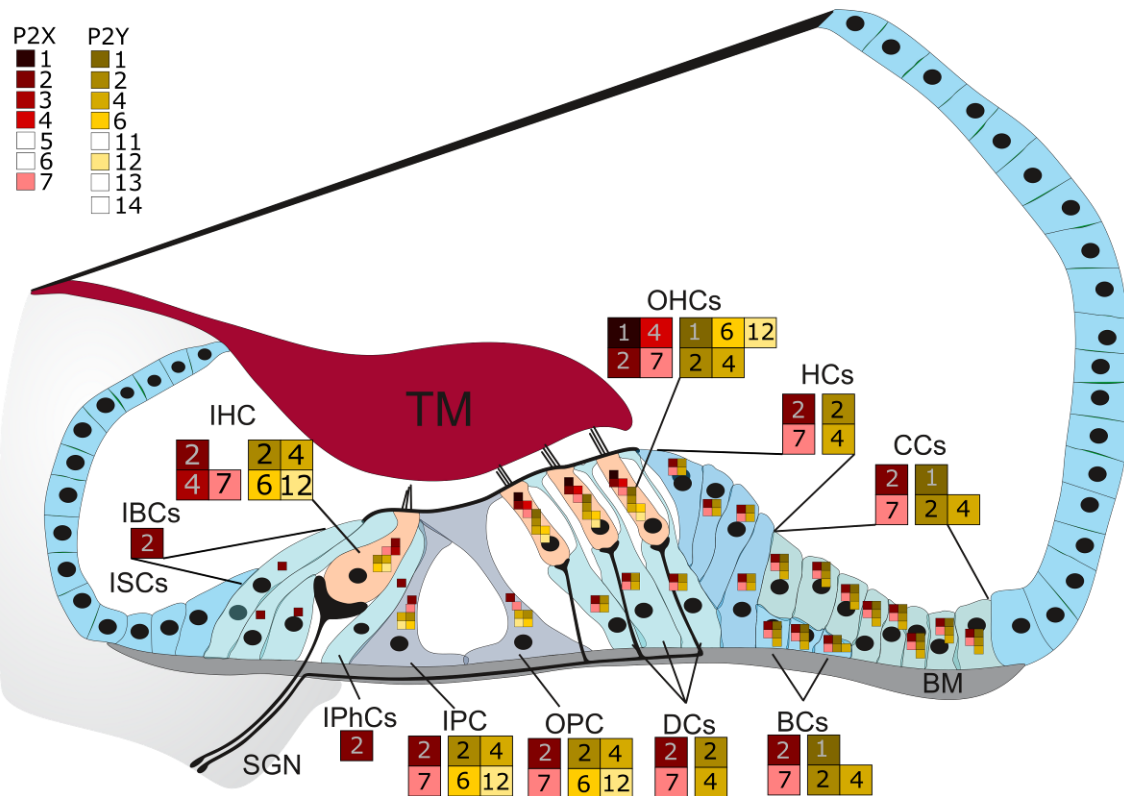


**5. ábra.** A purinerg receptorok típusait két nagycsaládra oszthatjuk: az adenozin érzékeny P1 és az ATP érzékeny P2 családra. A P2 családon belül elkülönítünk ionotróp P2X receptorokat, amelyeknek további 7 altípusa létezik (P2X1-7), valamint metabotróp P2Y receptorokat, amelyekből további 8-at tartanak számon (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14). A P2X receptorok egyenként 3 alegységből épülnek fel és altípustól függően homo- illetve heterotrimereket alkotnak. (Saját ábra [48] alapján.)

### 2.3.2.1. A belső fülben megtalálható purinerg receptorok

A cochleában számos purinerg receptor típust azonosítottak, amelyek részt vesznek a megfelelő morfológiai és funkcionális fejlődés modulálásában, a „vészjelző” ATP érzékelésével megfelelő másodlagos jelátviteli útvonalakat indítanak el és szerepet játszanak a hallás érzékenységének beállításában [10, 37, 41, 87–90].

Több purinerg receptor expressziójáról kimutatták, hogy csupán átmeneti, a fejlődés egy bizonyos időszakára (pl.: a szinapszis érés idejére) korlátozódik a jelenléte (ilyen a P2X1 és P2X3 altípus) [91, 92]. Más receptoroknak az idő előrehaladtával folyamatosan csökkenő szintet tulajdonítanak [93]. Az 1. táblázat és a 6. ábra szemlélteti az eddig kimutatott receptorok elhelyezkedését, sejtszintre bontva, két, a hallásfejlődés szempontjából fontos időpillanatban: P14 előtt, még szenzitivitási optimummal nem rendelkező és P14 után, már kifejelettnak tekinthető hallású rágsáló hallószerv esetében.



**6. ábra.** ATP receptorok elhelyezkedése a Corti-féle szervben. A hallószerv sejtjeinek leggyakoribb purinerg receptor típusa a P2X2-es típus, amely a szerv szinte minden sejtjén előfordul, kiemelt sűrűséggel a szőrsejtek sztereocíliumain és a támasztősejtek endolymphatikus felszínén, valamint az ATP legfőbb forrásának tartott *stria vascularis* marginális sejtjein. Gyakran előforduló receptor típus még a P2Y4-es metabotróp receptor és a csak nagy ATP koncentrációra érzékeny P2X7 receptor. Az ábrán minden, valaha a Corti-szervben kimutatott, általunk ismert közleményben publikált P2 receptor szerepel, függetlenül a kimutatás módszerétől, illetve a kísérleti állat fajától. A receptorok jelzéseit egységesen a sejtmagok környékén helyeztem el, tekintve, hogy nem minden kimutatási forma alkalmas szubcelluláris lokalizáció meghatározására. Sejtek rövidítése mellett nagyobb négyzetekben is szerepelnek az adott sejten kimutatott receptor altípusok (A jelzés magyarázatban minden ismert purinerg receptor szerepel, fehér négyzettel jelöltem, amelyeket még egyáltalán nem mutattak ki a Corti-féle szervben.)

**1. táblázat:** P2 receptorok a cochleában. A táblázat összefoglalja a Corti-féle szerv sejtjeiben detektált purinerg receptorokat, 3 fajban, az első hallás optimum megjelenése előtti (P0-14) és utáni (>P14) időszakban (a tengerimalac hallása már *in utero* megkezdődik, így ezekben a sorokban nincs időbeli elkülönítés). 3 féle mérést különítettünk el: mRNS mérés (RT-PCR, single-cell PCR, *in situ* hibridizáció, etc.); protein mérés (Western-blot, receptor hisztológia, etc.); funkció mérés (elektrofiziológia, imaging, farmakológiai és kinetikai karakterizálás) [10].

sejt	faj	mérés	P0-14	>P14
külső szőrsejt	tengerimalac	mRNS	P2X2, P2X7 [94]	
		protein	P2X1, P2X2, P2X4, P2X7; P2Y1, P2Y2, P2Y4 [95–100]	
		funkció	P2X2 [99, 101]	
	patkány	mRNS	P2X2 [102]	P2X2 [102, 103]
		protein	P2X2, P2X3; P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 [104–106]	P2X2; P2Y1, P2Y4, P2Y6 [104, 106]
	egér	protein	P2X2, P2X3 [91, 107, 108]	P2X2 [108, 109]
funkció		P2X2 [107, 108, 110]	P2X2 [69, 108]	
belső szőrsejt	tengerimalac	mRNS	P2X2 [94]	
		protein	P2X2; P2Y4 [96, 98]	
		funkció	P2X2 [97, 101]	
	patkány	mRNS	P2X2 [102]	P2X2 [102, 103]
		protein	P2X2, P2X3, P2X7; P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 [104–106]	P2X2, P2X7; P2Y4 [103, 106, 111]
	egér	protein	P2X3 [91, 107]	-
funkció		P2X2 [107]	P2X2 [69]	
belső szőrsejt támasztósejtjei	patkány	mRNS	P2X2 [102]	P2X2 [102]
		protein	P2X2 [104]	P2X2 [104]

## 1. táblázat (folytatás)

sejt	faj	mérés	P0-14	>P14
pillér sejtek	tengerimalac	mRNS	P2X2 [94]	
		protein	P2X2; P2Y4 [96, 98]	
		funkció	P2X7 [58]	
	patkány	mRNS	P2X2 P2Y2, P2Y12 [102]	P2X2, P2Y2, P2Y4, P2Y6 [102, 103, 106]
		protein	P2Y2, P2Y12 [106]	P2X2, P2X7; P2Y2, P2Y4, P2Y6 [106, 111]
		funkció	P2Y2, P2Y4 [112]	-
Deiters sejtek	tengerimalac	mRNS	P2X2 [94]	
		protein	P2X2; P2Y4 [96, 98]	
		funkció	P2X2, P2X7 [58, 113]	
	patkány	mRNS	P2X2; P2Y2 [102, 106]	P2X2 [102, 103]
		protein	P2X2, P2X7; P2Y2 [104–106, 111]	P2X2, P2X7 [103, 104, 111]
	egér	protein	P2X2 [107]	P2X2 [109]
Hensen sejtek	tengerimalac	mRNS	P2X2 [94]	
		protein	P2X2; P2Y4 [96, 98]	
		funkció	P2X7 [58]	
	patkány	mRNS	P2X2; P2Y2 [102, 106]	P2X2 [102]
		protein	P2X2; P2Y2 [104, 106]	P2X2 [104]
		funkció	P2Y2, P2Y4 [112]	-
egér	protein	P2X2 [107]	-	
külső árok sejtei	tengerimalac	funkció	P2X7 [58]	
	patkány	mRNS	P2X2; P2Y2 [102, 106]	P2X2; P2Y1, P2Y2 [102, 106]
		protein	P2X2; P2Y2 [104, 106]	P2X2; P2Y1, P2Y2 [104, 106]
		funkció	P2X4; P2Y2, P2Y4 [41, 112]	-

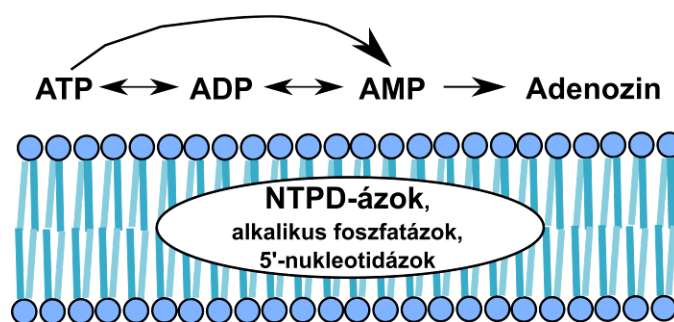
### 2.3.3. ATP hatás megszűnésének mechanizmusa a cochleában

Az extracelluláris ATP hatás megszűnéséért elsősorban a membrán kötött ektonukleotidázok (NTPD-ázok) felelősek (7. ábra). A felnőtt rágcsáló cochleában kimutatták az enzimsalád minden tagját (NTPD-áz 1-8) [114]. A család tagjai speciális tér- és időbeli expressziót mutatnak, valamint az NTPD-áz 1 és 2 expressziójának zaj hatására bekövetkező növekedését is kimutatták. Ezen két enzimtípus közül az NTPD-áz 1-es érzékenyebbnek tűnik a zajhatásra: már kisebb dB értékeknél megfigyelhető a felülregulálódása [115]. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy kontroll szintje is jellemzően magasabb, mint a 2-es típusú enzimnek. Lokalizációjukat tekintve főként a *stria*

*vascularis* területén és a SGN sejtestestjeinek felületén helyezkednek el [115–117]. Egérben a támasztósejtek (köztük a Deiters sejtek) is erősen NTPD-áz 2 immunreaktívak [117]. NTPD-áz 3-ról szintén kimutatták zaj hatására történő felülszabályozódását, amely főleg a szőrsejt-SGN szinapszisok környékén jelentős [52].

A támasztósejtek purinerg szignalizációjának modulálása szempontjából kiemelendő az NTPD-áz 5-ös és 6-os enzim, amely a felnőtt patkány Deiters sejteinek membránjában nagy mennyiségben kimutatható. NTPD-áz 5 szintje szintén növekedést mutat cochleáris stressz hatás esetén, míg a 6-os típusról ezt nem sikerült eddig kimutatni [114, 118].

A membránhoz kötött nukleotid bontó enzimek az ATP-t ADP-re, illetve AMP-re és végül adenzinra bontják el. Ezek közül az ADP agonista hatású P2Y receptorok némelyikén, míg az adenzin saját, P1 receptorain keresztül hat a sejtekre.



**7. ábra.** Az extracelluláris ATP lebontásáért membránkötött hidrolázok felelősek, amelyek közül kiemelkedően fontosak a cochleáris jelátvitelben az ektonukleotidázok (NTPD-ázok). Ezeken kívül, szintén membránhoz kötötten fordulnak elő alkalikus foszfatázok és 5'-nukleotidázok, amelyek egy vagy két foszfátcsoport lehasításával végsősoron adenzint hoznak létre az ATP-ből. (Saját ábra [48] nyomán.)

## 2.4. Egyéb, vizsgált jelátviteli rendszerek a rágcsáló cochleában

A hallás élettani folyamata során a szőrsejtek depolarizációját glutamát felszabadulás követi, amely a SGN afferenseken helyet foglaló AMPA-receptorokon át indítja el a jelet az idegrendszer felé. A szőrsejt-SGN szinaptikus jelátvitel jól dokumentált folyamat, azonban, a támasztósejtek jelátviteli rendszerei kevésbé tanulmányozottak, holott anatómiailag kimutatták, hogy egyes támasztósejt típusok (a Deiters és a Hensen sejtek) efferens beidegzést is kapnak a központ felől [33, 119]. Az efferensek acetil-kolint tartalmaznak, de gamma-amino-vajsavat is kimutattak a terminálsaikban [120].



Ezen túlmenően a laterális olivocochleáris komplexből érkező efferensekben más transzmittereket, például dopamint és szerotonint, is találtak [120].

A támasztósejtek vizsgálata során főleg neuropeptid receptorokat figyeltek meg rajtuk, így opioid [121] és szomatosztatin receptorokat [122]. Neuropeptid receptorokon kívül, a TRP csatornák expresszióját is bizonyították a cochlea számos komponensén [123, 124].

Doktori munkám során további két, intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint növekedésén keresztül ható receptor/csatorna családot vizsgáltam, melyek a szakirodalom szerint kiterjedten expresszálódnak a cochleáris támasztósejteken.

#### **2.4.1. Tranziens receptor potenciál csatornák**

A tranziens receptor potenciál (TRP) csatornacsalád tagjait főként anatómiai módszerekkel tanulmányozták a cochleában. A TRP csatornák nem-szelektív kationcsatornák, amelyek érzékenyek a környezeti hatásokra (pl.: pH, hőmérséklet, mechanikai hatások), de különböző alkaloidokkal is kiváltható az aktiválódásuk [125]. Általánosan jellemző rájuk a 6 transzmembrán domén.

A TRP ankirin 1 (TRPA1) csatornáról korábban feltételezték, hogy a szőrsejtek MET csatorna komplexének része, nagy pórusa és konduktanciája miatt. Később azonban kimutatták, hogy TRPA1<sup>-/-</sup> állatban is megmarad a szőrsejtek mechanoelektromos transzdukciója [126]. TRPA1 csatornát támasztósejteken is detektálták, erős expresszióval Hensen sejteken, mérsékelttel Deiters, Claudius és pillér sejteken [123, 127, 128]. Az anatómiai-immunjelölések mellett  $Ca^{2+}$  imaging vizsgálatok és farmakológiai eredmények is támogatják TRPA1 csatornák jelenlétét a támasztósejteken, legalábbis fiatal állatok esetében (P0-7) [128]. A kimutatott  $[Ca^{2+}]_i$  szint emelkedéseken kívül sejtkontrakciót is sikerült kimutatni, ami a TRPA1 csatornák és a támasztósejtek cochleáris amplifikációban játszott szerepére utal [128].

TRP vanilloid 1 (TRPV1) csatornákat is mutattak ki korábban rágcsáló cochleából. Egész szerv preparátumokból kinyert RNS alapján az E18-P8 periodusban emelkedett a szintje [129]. Immunhisztokémiai vizsgálatok is alátámasztották TRPV1 támasztósejteken való jelenlétét patkány és tengerimalac cochleában. Itt is kiemelt expressziót találtak Hensen sejtek esetében, valamint a pillér sejteken [124, 130].

### 2.4.2. Kolinerg jelátvitel támasztósejtekben

Acetil-kolint tartalmazó efferens rostok futnak a külső szőrsejtekhez, erős hanghatás után gátolva annak összhuzékonyságát. Ez a visszacsatoló (feed-back) rendszer szerepet játszik a cochleáris amplifikációt gátló folyamatokban [131, 132]. Megfigyelések szerint az efferensek kollaterálisokat adnak le a közelben elhelyezkedő támasztósejteknek, így a Deiters és a Hensen sejteknek [119, 133–135]. Az anatómiai kutatások mellett farmakológiaiailag is bizonyították izolált Deiters sejtek acetil-kolinnal való aktiválhatóságát, feltételezhetően  $\alpha 9$ -es altípust tartalmazó nikotinos ACh receptoron (nAChR) keresztül [136]. Korábban a külső szőrsejteken ugyanezt az alegységet tartalmazó,  $\alpha 9\alpha 10$ -es receptorokat azonosítottak [137]. Ezen receptorok jellegzetessége, hogy a többi nACh receptornál nagyobb a  $\text{Ca}^{2+}$  áteresztőképessége így funkcionális  $\text{Ca}^{2+}$  imaging módszerrel is nyomon követhető az aktiválódása. Mindezek mellett különleges farmakológiai profillal is rendelkezik: a nikotin antagonistája és nem agonistája ennek a receptor típusnak [138].

### 2.5. Intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ homeosztázis

A sejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintje fontos szabályozó jel: többek között szerepet játszik a sejtosztódás, differenciáció, apoptózis, mozgás, neurotranszmisszió és génexpresszió regulálásában [139]. Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedése és csökkenése többféle módon kiváltható.

A legegyszerűbb  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növelő mechanizmusok az extracelluláris térben nagyobb szabad ion koncentrációban jelen lévő, a  $\text{Ca}^{2+}$  elektrokémiai gradiensének megfelelő beáramlását idézik elő, különböző  $\text{Ca}^{2+}$  permeábilis csatornák segítségével, amelyeknek 2 fő típusa a ligand vezérelt és a feszültségfüggő ioncsatornák. A ligand vezérelt csatornákon (pl.: P2XR, AChR) beáramló ionmennyiség, gyakran elegendően nagy depolarizációt idéz elő a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák (pl.:  $\text{Ca}_v1.3$ ) nyitásához [139]. A feszültségfüggő csatornák legtöbbje erősen szelektív az adott ionra, annak gyors intracelluláris koncentrációnövekedését idézi elő.

A másik  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növelő mechanizmus metabotróp receptorokon (pl: P2YR) keresztül megy végbe. Ezek a receptorok jellemzően kisebb ligand koncentrációra aktiválódnak, mint ionotróp társaik. Aktiválódásukat több másodlagos jelátviteli rendszer is követheti, amelyek közül a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis kapcsán a diacilglicerol (DAG) - inozitol-

triszfoszfát (IP3) útvonalat emelném ki [139]. Ennek során a metabotróp receptorhoz kötődő G-protein ( $G_q$ ) aktiválódása folyamán a membránban elhelyezkedő lipidről IP3 hasítódik le, majd a citoplazmába kerülve az endoplazmatikus retikulumon (ER) lévő receptoraihoz kötődik. Az ER-on elhelyezkedő IP3 receptor egy ligand vezérelt  $Ca^{2+}$  csatorna, lehetővé teszi az ER-ban tárolt  $Ca^{2+}$  citoplazmába történő kijutását. Az ER másik  $Ca^{2+}$  csatornája a rianodin-érzékeny csatorna,  $Ca^{2+}$ -ot kötve nyit, így  $Ca^{2+}$  indukálta  $Ca^{2+}$  felszabadulás figyelhető meg az aktiválódása során [139].

Miközben a citoplazmatikus  $Ca^{2+}$  koncentráció növekszik, különböző, azt csökkentő mechanizmusok is működésbe lépnek:  $Ca^{2+}$ -kötő fehérjék pufferelik a beáramló ionokat, majd egy bizonyos szabad  $Ca^{2+}$  koncentráció hatására működésbe lépnek a  $Ca^{2+}$ -pumpák, amelyek egyik típusa vissza az ER-ba (SERCA), másik típusa az extracelluláris térbe juttatja ki a felesleges ionokat (PMCA) [139].

## **2.6. A halláskutatás gyakorlati jelentősége, transzlációs vonatkozásai**

Számos betegség mellett a halláskárosodások prevalenciája is nő világszerte. Jelenleg megközelítőleg 400 millió ember érintett (<https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/deafness-and-hearing-loss> , WHO 2018). Ugyanakkor az öregedő népesség, a zajos városi életforma terjedése és a szórakozási szokások átalakulása miatt feltételezhetően növekedni fog ezen egyének száma. A hallás elvesztése a szociális kapcsolatok romlásához vezet, amely súlyosabb esetekben elszigetelődést és depressziót is kiválthat.

### **2.6.1. Szenzorineurális halláskárosodások**

A vezetékes, külső- és középfület érintő, halláskárosodásokkal szemben a szenzorineurális halláskárosodások (SNHL) kifejezett kihívást jelentenek a gyógyszerkutatások terén. Eddig, a transz-tympanikusan adott szteroidokon túl, nem sikerült kifejleszteni igazoltan hatásos gyógyszeres terápiát a belső fül és az elsődleges hallóneuronok károsodásával kialakuló hallásfunkció vesztesre. Ebben szerepe van annak, hogy sem az élettani, sem a patológiai ismereteink nem elegendően mélyek az összetett molekuláris mechanizmusok megértéséhez. Jelenleg a gyógyszer mellékhatás okozta halláskárosodások mellett, az időskori és a fokozott zajterhelés okozta halláskárosodások a leggyakoribb formái a SNHL-eknek [140].

### **2.6.2. A purinerg szignalizáció SNHL vonatkozásai**

Fentebb láthattunk néhány példát a purinerg receptorok hallásban, hallásérzékenység beállításában játszott (feltételezett) szerepére: a  $K^+$  szint modulálása az endolymphatikus térben, szinapszis érés szabályozása és a valószínűsített részvétel a cochleáris mikromechanikában. Ezek mellett a vészjelzésként, szőrsejt károsodást követő patológiás intercelluláris  $Ca^{2+}$  hullámok kialakításában és fenntartásában is szerepük van [40, 141, 142].

A purinerg rendszer részvételét a SNHL-ok több típusában is kimutatták. Az egyik legegyszerűbb bizonyíték erre a P2X2 receptor mutációjával járó öröklődő sükettségforma [108]. A nem genetikai formák esetében feltehető, hogy a rendszer befolyásolásával jótékony irányban mozdíthatnánk el a molekuláris folyamatokat. A témát legjobban a zajterhelés okozta halláskárosodások esetében járták körbe. Zaj hatására több purinerg receptor típus alul- és felülexpresszáldását, valamint az exogén ATP-t bontó ektonukleotidázok felülexpresszáldását is leírták [52, 103, 115, 118]. *In vivo* kísérletekből a purinerg rendszernek protektív hatásokat tulajdonítanak, de vannak ennek ellentmondó eredmények is. Protektívnek vélt hatás a külső ATP adását követő endocochleáris potenciál csökkenése, amelynek következtében a szőrsejtbe áramló ionok hajtóereje is csökken és ezzel megakadályozza az elsődleges hallóneuronok túlingerlődését [143]. Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy PPADS és suramin – széles spektrumú purinerg receptor antagonisták – is csökkentik az endocochleáris potenciált [144, 145]. Perilymphatikusan adagolt PPADS-nek jótékony hatását tudták kimutatni a közepesen intenzív zajjal szemben [146].

A jelenlegi kutatások az adenzin receptorokat említik, mint lehetséges megoldást SNHL-ok kezelésére [147–149]. Azonban nem felejthetjük el, hogy ezen receptorok befolyásolása súlyos szív- és érrendszeri mellékhatásokat okozhat a pácienseknél. Ezért minél sürgetőbb lenne megértenünk a P2 receptorok szignalizációs rendszerét.

### **2.6.3. Acetil-kolin receptorok és TRP csatornák SNHL vonatkozásai**

A belső fülben a kolinerg szignalizáció felelős az efferens védekező beidegződés jelátvitelért, amely nem csak a külső szőrsejtet, de néhány támasztósejtet is érint. Jelenleg úgy tűnik egy különleges nikotinos receptor altípus található meg ezeken a sejteken: az  $\alpha 9\alpha 10$  összetételű [136, 150, 151].

Az acetil-kolin receptorok száma csökken a kor előrehaladtával, amelynek szerepe lehet az időskori hallásvesztésben [152]. Azonban még nem találtak olyan, ezeket a receptorokat érintő mutációt, amely halláskárosodást idézett volna elő. Sőt,  $\alpha 9^{-/-}$  és  $\alpha 10^{-/-}$  egerek hallásában sem mutatkozott károsodás [153]. Ugyanakkor  $\alpha 9$  alegység expressziójának fokozásával egérben, sikerült erősebb védekező, a hallásküszöböt növelő mechanizmusokat megfigyelni [153].

A tranziens receptor potenciál csatornák SNHL-okban betöltött szerepe kérdéses. Számos adat támogatja a szerepüket a hallás folyamataiban, azonban egyelőre nem sikerült felderíteni a pontos folyamatokat, amelyekben akár gyógyszer célpontként is funkcionálhatnak. Korábban a TRPA1 csatornáról feltételezték, hogy része a szőrsejtek MET csatorna komplexének, azonban később TRPA1 $^{-/-}$  állatban megtartottnak találták a mechanoelektromos transzdukciót [126, 127]. Hasonlóan, a szőrsejtek jelátvitelében gondolták korábban fontosnak a TRPV4 csatornát, amelyről szintúgy kiderült, hogy nem a mechanoelektromos transzdukcióban játszik szerepet, de TRPV4 $^{-/-}$  állatban mégis magasabb hallásküszöb értékek mérhetőek – egyelőre ismeretlen mechanizmuson keresztül valósul meg ez a károsodás [154]. A TRPV csatornák hallásban betöltött szerepét *in vivo* kísérletekben is alátámasztották. TRPV1-et aktiváló kapszaicin adását követően a cochleáris axonok elvezetését mérve nagyobb hanginger kell az ingerület megjelenéséhez és kisebb amplitúdóval halad a potenciál [124]. TRPV1-et potenciális targetnek tartják a halláskárosodások kivédése szempontjából [155].

TRP csatornák egy másik altípusa, a mukolipin alcsalába tartozó, TRPML3 csatorna egyik mutánsa teljesen süket állatokat eredményez. Ezt a csatornát korábban szőrsejtek membránfelületén írták le. Anatómiailag sejtes elváltozások tapasztalhatóak a Corti-szervben a szőrsejtek és a *stria vascularis* sejtjeinek körében, azonban a mechanizmus még ez esetben sem feltárt [154].

### 3. Célkitűzések

A halláskárosodás a leggyakoribb érzékszervi megbetegedés, melynek SNHL formáira a mai napig nem áll rendelkezésünkre megfelelő gyógyszeres terápia. Ennek egyik oka, hogy az élettani, kórélettani folyamatok nem megfelelően felderítettek. A halláskutatással foglalkozó kutatócsoportok nagyrésze fejlődésben lévő Corti-szerv preparátumokat, izolált sejteket használ, amelyekből a kinyert biológia paraméterek még változnak a kifejlett hallás kialakulásáig.

Hemicochlea preparátum alkalmazásával kutatócsoportunknak már korábban lehetősége nyílt a kifejlett hallószerv vizsgálatára az anatómiai struktúra nagymértékű megtartása mellett [156]. Ugyanakkor funkcionális  $Ca^{2+}$  imaging kísérleteink során a használt tömeges indikátortöltési eljárás, előnyei mellett, számos hátránnyal rendelkezik. Célunk volt ezen módszertan fejlesztése, tehát:

*Specifikus, gyors, szubcelluláris funkcionális  $Ca^{2+}$  imaging vizsgálatokra alkalmas indikátor töltési eljárás kifejlesztése kifejlett hallású egerek hemicochlea preparátumában:*

1. A hemicochlea preparátumban alkalmazni egy olyan célzott egy-sejt  $Ca^{2+}$  indikátortöltési eljárást, amely a Corti-szerv egyedi sejtjeinek vizsgálatát teszi lehetővé.
2. A szelektív egy-sejt töltés és az extracelluláris térbe kerülő indikátor mennyiségének csökkentésével a fluoreszcencia forrása egyértelműen azonosítható legyen.
3. Növekedjen a mérések jel-zaj aránya, így a kisebb változások is nyomon követhetőek legyenek.
4. Alkalmazható legyen a Corti-féle szerv több sejt típusán is.

A külső szőrsejtek speciális, polarizált felépítésű támasztósejtje a Deiters-féle sejt. Alakja, vékony nyúlványa miatt nehezen tanulmányozható teljes egészében, saját környezetében. Izolált sejt kísérletek tudtak eddig csupán leírást adni működéséről. Célunk ezen támasztósejt típus részletes vizsgálata volt, különös tekintettel a

fejlődésben és a halláskárosodások elleni védelemben is nagy szerepet játszó purinerg  $\text{Ca}^{2+}$  jelátviteli mechanizmusaira:

*Deiters sejtek purinerg szignalizációs változásait nyomon követni a hallás kifejlődése szempontjából kritikus postnatális időszakban:*

5. A Deiters sejtek purinerg receptorok által közvetített  $\text{Ca}^{2+}$  jeleit két kanyarulatban, szubcelluláris kompartmentenként nyomon követni, a hallás kifejlődése során (P5-25).
6. Az egyedi sejtöltés által lehetővé tett morfológiai változások nyomon követése.

## 4. Módszerek

### 4.1. Kísérleti állatok

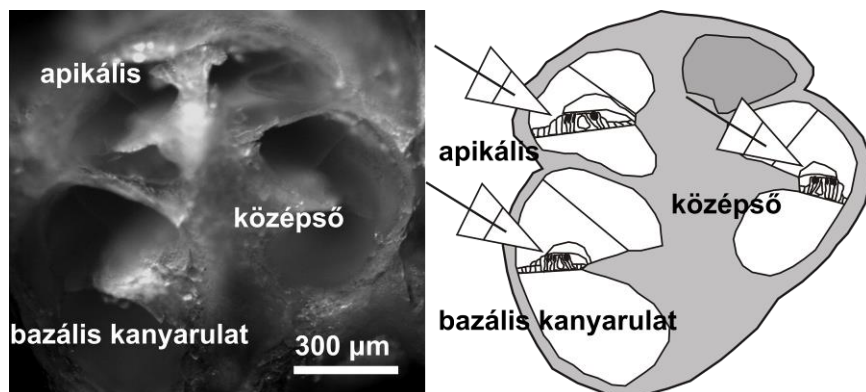
Az elvégzett kísérletek a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának irányelvei alapján történtek, amelyek összhangban vannak a hatályos törvényi előírásokkal (1998, XXVIII. törvény „Az állatok védelméről és kíméletéről”). (A kísérletek etikai engedélyszámai: XIV-I-001/1028-4/2012 és PE/EA/1912-7/2017.)

A kísérletekben felhasznált BALB/c törzsű egerek (P5-25) a SE NET SPF Állatházából származtak.

### 4.2. Hemicochlea preparátum elkészítése

Hemicochlea preparátumainkat Dallos Péter módszerét követve készítettük [157]. Ennek során az egereket izofluránnal elbódítottuk, majd dekapitáltuk. A koponyát középsíkban felvagtuk, az agyat csipesszel eltávolítottuk és a cochleákat finom erőbehátással kiszakítottuk a még el nem csontosodott halántékcsontról *pars petrosájából*, jéghideg perilympha-szerű (összetétele mM-ban: NaCl 22,5; KCl 3,5; CaCl<sub>2</sub> 1; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES-Na 10; Na-glukonát 120; glükóz 5,55; pH 7,4; 320 mOsm/l), oxigenizált folyadékba téve. Ezután az egyes cochleák mediális felszínét pillanatragasztóval (Loctite 404, Hartford, CT) egy 7 mm átmérőjű műanyaglapocskához rögzítettük és a jéghideg perilympha-szerű oldatot tartalmazó vibratóm vágókamrába helyeztük, ahol a modiolus mentén kettémetszettük (Vibratome Series 3000, Technical Products International Inc., St. Louis, MO, 146 USA; mikrotómpenge: Feather Microtome Blade R35, CellPath Ltd, Newtown, UK; sebessége: 30 mm/perc, vibráció amplitudója: 1 mm). A megfelelő sík beállítása sztereomikroszkóp (Olympus SZ2-ST, Olympus Corporation, Fülöp-szigetek) segítségével történt. A kísérlet további részében csak a leragasztott cochlea féllal (hemicochlea) dolgoztunk (8. ábra).



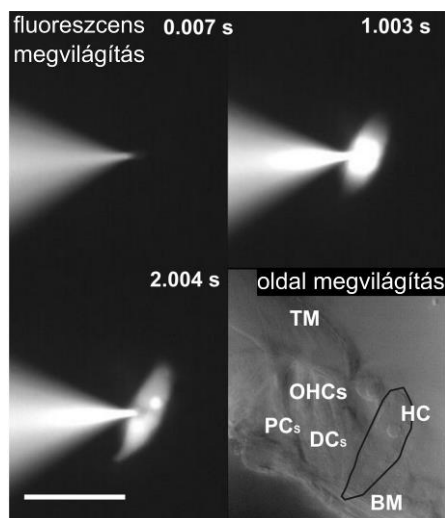


**8. ábra.** Hemicochlea preparátum 4x-es nagyítású objektív alatt és sematikusán, az elektroporációs töltő-pipetta megközelítési irányait mutatva. A hemicochlea preparátum lehetőséget ad mind a három kanyarulatban helyet foglaló Corti-féle szervek vizsgálatára az anatómiai struktúra nagymértékű megtartása mellett. Ferde megvilágítású képeken jól beazonosíthatóak mind a kanyarok, mind a hallószerv különböző szerkezeti elemei, így az elektroporációs pipettával egyértelműen megcélozhatók és megközelíthetőek a kiválasztott sejtek. [158]

### 4.3. Egy-sejt elektroporációs indikátortöltés

Agyszeretek egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszere [159] alapján állítottuk be saját töltési eljárásunkat. A kísérletek a preparálást követően szobahőmérsékleten folytak (22-24 °C). A hemicochlea preparátumok oxigenizált perilymphával töltött szervkamrába kerültek, ahol az extracelluláris folyadék perfúziójának sebessége 3,5 ml/perc volt. Az elektroporálni kívánt sejteket ferde, vörös megvilágítás mellett választottuk ki LUMPlanFl 40x/0,80w vízimmerziós, 3,3 mm-es munkatávolságú objektívvel (Olympus, Japan). 5-7 MΩ-os boroszilikát üvegpipettát töltöttünk meg  $\text{Ca}^{2+}$  indikátorral (Oregon Green 488 BAPTA-1 káliumsó (OGB-1); fura-2/ $\text{K}^{+}$  - mind a ThermoFisher Scientific gyártmánya). Az indikátor végkoncentrációja 1 mM volt. A pipettákat mikromanipulátor (Burleigh PCS-5000, Thorlabs, München, Németország) segítségével, vizuális ellenőrzés mellett vezéreltük a sejt közelébe (8. és 9. ábra). A sejteket finoman megérintettük a pipetta hegyével, majd egyszerű négyszögimpulzussal (10 ms hosszan, 10  $\mu\text{A}$  amplitudóval) ingereltük. Az elektromos áram hatására a sejtmembránon ideiglenesen kis pórusok nyílnak meg [160], amelyeken keresztül az indikátormolekulák töltésüknek megfelelően beáramolhatnak a citoplazmába (9. ábra). Az általunk választott négyszög stimulussal elegendő volt egyetlen ingerlés a sejtek megtöltésére, amennyiben a pipetta megfelelő helyzetben volt. A pulzust pCLAMP10 szoftver által vezérelt stimulátor rendszerrel generáltuk (Biostim

STE-7c, Supertech Ltd, Pécs, Magyarország; MultiClamp 700B Amplifier and Digidata 1322A, Molecular Devices, Budapest, Magyarország).



**9. ábra.** Egy-sejt elektroporációs indikátortöltés menete egy bazális kanyarulatbeli Hensen sejt esetében. Az elektromos impulzus 10 ms, ezután megközelítőleg 2-3 másodpercen belül a fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$  indikátor egyenletesen eloszlik a sejtekben. A töltöttség a kísérletek időtartama alatt egyenletes marad (1,5-2 óra), amennyiben a sejt nem sérült az elektroporáció során.

#### 4.4. Kalcium-imaging (morfometriai és farmakológiai vizsgálatokhoz)

Az Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) indikátorral töltött sejteket  $494 \pm 5$  nm hullámhosszú fényel gerjesztettük (Polychrome II monochromator, TILL Photonics, Németország). Az emittált fényt ez esetben egy sávszűrőn ( $535 \pm 25$  nm) keresztülvezettük a kamerába. Az OGB-1 indikátor előnye, hogy a gerjesztési hullámhossza nagyobb, így kevésbé károsítja a preparátumban lévő sejteket (kevésbé fototoxikus, mint az UV fényel gerjesztendő Fura-2 indikátor család).

Fura-2/ $\text{K}^+$  ratiometrikus indikátorral töltött sejtek esetében váltakozó megvilágítást alkalmaztunk:  $340 \pm 5$  nm és  $380 \pm 5$  nm hullámhosszú fényel gerjesztettük a sejteket. Az emittált fény szűrője  $510 \pm 20$  nm között engedett át.

A fluoreszcens képek OlympusBX50WI epifluoreszcens, Photometrics Quantix hűtött CCD kamerával (Photometrics, USA) felszerelt mikroszkóppal (Olympus, Japan) készültek. A mérő rendszert Imaging Workbench 6.0 szoftver (INDEC BioSystems, USA) vezérelte. A felvételkészítés sebessége 1 illetve 0,5 Hz volt az agonistákkal való

perfúzió alatt, míg az ingerlések között 0,1 és 0,05 Hz OGB-1 típusú illetve fura-2/K<sup>+</sup> festékek esetén.

Az elektroporációs indikátortöltés AM-töltéssel történő összevetéséhez néhány hemicochlea preparátumot fura-2/AM festékkel töltöttünk meg, hasonlóan, ahogy a csoport korábbi tanulmányaiban leírtuk [156]. Az indikátorok apoláros acetoximetilészter (AM) származékai könnyen átjutnak az élő sejtek membránján, azonban a citoplazmában lévő nem specifikus észterázok lehasítják ezt a molekularészletet az indikátorról, így az csapdába kerül a sejtben. Összefoglalva az általunk alkalmazott festési protokolt: az elkészített hemicochlea preparátumokat 10 µM fura-2/AM-ben inkubáltuk pluronic F-127 (0,05 térfogat%) jelenlétében 30 percen át. Ezután 15 percen keresztül normál kísérleti oldatban mostuk, annak érdekében, hogy az aspecifikus észterázok a festékről lehasíthassák az acetoxi-metilészter (AM) csoportot. Ezek után a megvilágítás és a felvétel paraméterei megegyeztek a fura-2/K<sup>+</sup> esetben leírtakkal.

A kísérletek az állat feláldozásától 1,5-3 órán keresztül zajlottak. Azok a sejtek, amelyek morfológiailag károsodottnak látszottak ki lettek zárva a további elemzésekből.

#### **4.5. Hatóanyag adagolás menete**

A kísérlet során az agonisták (ATP –100µM, UTP – 100 µM, allil-izotiocianát (AITC) – 200, 400, 2000 µM, kapszaicin – 330, 990 nM és karbakol – 100 µM, mind: Sigma-Aldrich, USA) a perfúzióba lettek adagolva 30 másodpercen keresztül. A perfúziós front 27-30 másodperc alatt érte el a kísérleti kamrát, amelynek űrtartalma ~1,9 ml volt. A jó állapotban lévő sejtek a drog adásának első pillanatától megközelítőleg 60-80 másodpercen belül válaszoltak. A 100 másodpercen kívül eső válaszokat nem tekintettük droghatásnak az előforduló spontán aktivitások miatt (ezektől már nem elkülöníthetőek ez esetben a kapott válaszok). Az első agonista adása előtt legalább 3 perces alapintenzitást vettünk fel a sejtről. Két agonista adása között minimum 10 perc nyugalmi időt tartottunk az esetlegesen receptor deszenzitizáció megszűnése érdekében [156].

Oldatcsere (Ca<sup>2+</sup> mentes oldat; összetevői mM-ben: NaCl 22,5; KCl 3,5; MgCl<sub>2</sub> 2; HEPES 10; Na-glukonát 120; glükóz 5,55; EGTA 1; pH 7,4; 320 mOsm/l) tesztelése során belső kontrollos kísérleti felállást választottunk (14. ábra): Az első, a sejt

válaszképességét ellenőrző stimulus ATP volt, amelyet 15 percen keresztül követtett a  $\text{Ca}^{2+}$  mentes oldat. 15 perc után kiváltottuk az újabb ATP választ. A  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldat után újabb 15 perces fázis következett, amikor az eredeti oldattal keringettük a rendszert. Egy utolsó ATP stimulus követette a visszamosást, tesztelendő a sejt életben maradását és válaszképességének megmaradását (14. ábra). Amennyiben a sejt nem válaszolt ezen, harmadik ATP stimulusra úgy kizárásra került a további elemzésekből.

## 4.6. Adatelemzés

### 4.6.1. Funkcionális $\text{Ca}^{2+}$ imaging

A felvett képsorok off-line kerültek elemzésre. A sejtintenzitás mérésére területeket jelöltünk ki a képsoron, amely területen található pixelek intenzitásának átlagával dolgoztunk. Az elektroporációs módszer validálási-vizsgálatok esetében a sejttestek egésze került be a területbe, míg a szubcelluláris kompartmentek fejlődésének és purinerg szignalizációjának meghatározására irányuló vizsgálatokban a Deiters sejtek phalangeális nyúlványának teteje, illetve a sejttesten 3, az előzővel azonos méretű terület került kijelölésre. Mindezek mellett egy közeli, töltött sejtektől mentes terület lett kiválasztva a háttérintenzitás méréséhez. Ezt a későbbiekben levontuk a sejtintenzitás adatokból.

OGB-1 indikátor esetében normalizált amplitúdókat számítottunk (Igor Pro 6.37 programmal) a következő módon:

$$\frac{dF}{F_0} = \frac{F_t - F_0}{F_0}$$

ahol,  $F_t$  a  $t$  időben mért intenzitás értéke (a mérőrendszer önkényes egysége),  $F_0$  a kezdőpontban (alapvonalon) mért sejtintenzitás.

Fura-2/ $\text{K}^+$  és fura-2/AM esetében a teljes időre kiszámítottuk kéthullámhosszú megvilágítás okozta emittált fluoreszcencia intenzitások hányadosát (ratio értékét):

$$R = F_{340}/F_{380}$$

Amplitúdók mérése során az intenzitásgörbe legmagasabb pontját vettük 100 %-nak. A válaszok időtartamának számításakor ezen intenzitás 50 %-ának elérése és erre az értékre történő visszaesés közötti időt néztük (másodpercben).

A görbe alatti területeket (AUC) az Igor Pro 6.37 program segítségével számítottuk ki.

A jel-zaj arány számítások során a kétféle fura-2 indikátorral töltött 12-12 sejtet választottunk ki véletlenszerűen és ezek 100  $\mu\text{M}$  ATP-re adott válaszait vetettük össze:

$$S/N = \Delta R / \delta R$$

ahol  $\Delta R$  az ATP által kiváltott válasz amplitudója,  $\delta R$  pedig az alapvonal szórása az ATP adását megelőző minimum 200 másodperces időintervallumban.

A statisztikai elemzés során Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük a csoportok normáeloszlását. Amennyiben lehetséges volt paraméteres próbákat alkalmaztunk (t-tesztek egy és két csoport összevetése esetén, ANOVA, Bonferroni post-hoc teszttel több csoport összevetésekor). Amennyiben a csoport eloszlása nem volt normális, nem-paraméteres tesztek alkalmaztunk (Wilcoxon-teszt egy és két csoport összevetésekor, Kruskal-Wallis teszt, Bonferroni post-hoc teszttel több csoport vizsgálata esetén). A fejlődéstani vizsgálatok során regressziós modelleket alkalmaztunk. A statisztikák R 3.3.2-ben készültek, R Studio környezettel.

A bemutatott ábrák átlag  $\pm$  s.e.m.-et mutatnak. Elkészítésük során Igor Pro 6.37-t, CorelDRAW-t és Inkscape-et alkalmaztunk. Szignifikancia szint jelölések: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.6.2. Fejlődő Deiters sejtek morfometriai mérései**

Deiters sejtek szubcelluláris kompartmentjeinek méréséhez az elektroporációval megtöltött sejtekről készült Z-síkbeli áttekintő felvételeket használtuk, melyekből sejtenként 7-9 db készült. A méréseket FIJI/ImageJ programmal végeztük. A stack képeinek egymásra vetítése után mértük le a paramétereket. A sejttest és a nyúlvány szélesség mérése a sejttest illetve a nyúlvány közepén történt.

A nyúlvány paramétereinek mérésénél csak a fluoreszcens képre tudtunk támaszkodni, de annak érdekében, hogy tudjuk a fluoreszcens kép megbízhatóan alkalmazható morfológiai mérésekre a sejttesten mért paramétereket mind a fluoreszcens, mind az ferde megvilágítású képeken lemértük. Széles látóterű mikroszkópos metodikánál hemicochlea preparátumot már alkalmaztak hasonló, anatómiai vizsgálatok során [11, 161], így ezt megbízhatónak gondoltuk. Amennyiben az ferde megvilágításban mért paraméterek és a fluoreszcens megvilágításban mért paraméterek adatai 5 %-os hibahatáron belül megegyeztek úgy a sejt bekerülhetett az elemzésbe, egyéb iránt kizártuk a további analízisből.

## 5. Eredmények

### 5.1. Egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszer beállítása és validálása

#### 5.1.1. Az egy-sejt elektroporáció alkalmas $\text{Ca}^{2+}$ indikátor bejuttatására a Corti-féle szerv támasztósejtjeibe

A rágcsálók Corti-féle szerve csak a második postnatális hét végére válik éretté [1]. Elsődleges célunk egy hallás érzékenységi optimummal már rendelkező egerek Corti-szervén működő funkcionális  $\text{Ca}^{2+}$  imaging metodika beállítása volt, amely lehetőséget ad az anatómiai struktúra nagymértékű megtartása mellett egyedi sejtek vizsgálatára. Ezt a csoportunk által korábban bevezetett [156] hemicochlea preparátumban történő indikátortöltési eljárás továbbfejlesztésével kívántuk elérni, beállítva egy egyedi sejtek töltésére alkalmas elektroporációs metodikát. Ilyet korábban neuronok töltésére már sikeresen alkalmaztak [159].

A hemicochlea preparátum hozzáférést ad az egér cochlea három kanyarulatához, ezzel a Corti-szerv eltérő tonotópikus helyzetben lévő sejtjei vizsgálhatók (8. ábra). A hallószervben jól azonosíthatók mind az eltérő sejtípusok, mind a membránstruktúrák, így ferde megvilágítás mellett könnyen tájékozódhatunk a szervben (1., 9. és 10. ábra).

Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltés esetünkben jól működött. Gyors (megközelítőleg 10 perc a preparátum kísérleti kamrába való behelyezésétől a feltöltésig) és megbízható (a megfelelően töltött sejtek 1,5-2 órán keresztül tartották a fluoreszcenciájukat, amely elegendő idő volt kísérleteink kivitelezésére). Gyorsaságban és a sejtek életképességének megtartásában felülmúlta a csoport által korábban alkalmazott AM-töltési metodikát, amely 30 perces töltési idő mellett még 15 perces deészterifikálást is igényelt a kísérlet megkezdése előtt [156].

A töltés során a sejtet ferde megvilágítás mellett, piezoelektromos mikromanipulátorral közelítettük meg, indikátort tartalmazó boroszilikát üvegpipettával (8. ábra). A pipetta hegyét egy gyenge oldalirányú mozdulattal érintettük hozzá a sejtmembránhoz, majd leadtuk a 10 ms hosszú, 10  $\mu\text{A}$  nagyságú négyszögimpulzust, ami az elektromosan töltött festékmolekulákat a membránon nyílt pórusokon át a sejtbe „lökte”. A sikeres töltés feltétele a megfelelően elhelyezett pipettahegy. A távol

elhelyezett pipettaból az indikátor a környező térbe szivárgott, aspecifikus festődést okozva (aminek egy részét idővel a perfúzió elmosta). Hasonló hosszúságú, kisebb amplitúdójú (2-5  $\mu\text{A}$ ) négyszögimpulzus, OGB-1 indikátorral töltött pipetta esetében nem megfelelően töltötte a sejteket, amennyiben egyetlen egyszer elektroporáltuk az adott sejtet. Nagyobb amplitúdójú (50-100  $\mu\text{A}$ ) négyszögimpulzus, bár megtöltötte a sejteket, feleslegesen nagyra bizonyult, tekintve, hogy minimalizálni szeretnénk volna a sejtkárosodást. A „túllőtt” sejtek, amelyeknek az elektroporáció során maradandóan sérült a sejtmembránjuk, az idő előrehaladtával elvesztették a fluoreszcenciájukat. Ez a fluoreszcencia veszteség, az elektroporálási kísérletet követő 10 percen bekövetkezett. Kísérleteink alapján a 10  $\mu\text{A}$  négyszög impulzus szükséges és elégséges egyedi támasztósejtek töltéséhez.

A megfelelően töltött sejtek megtartották morfológiájukat és nem változott jelentősen az alap fluoreszcencia szintjük a kísérlet során (pl.: 13. és 14. ábrák példagörbéi).

A rosszul célzott, túl erősen a sejtmembránba nyomott boroszilikát üvegpipetta azonnali sejtkárosodást és festékszivárgást vont maga után.

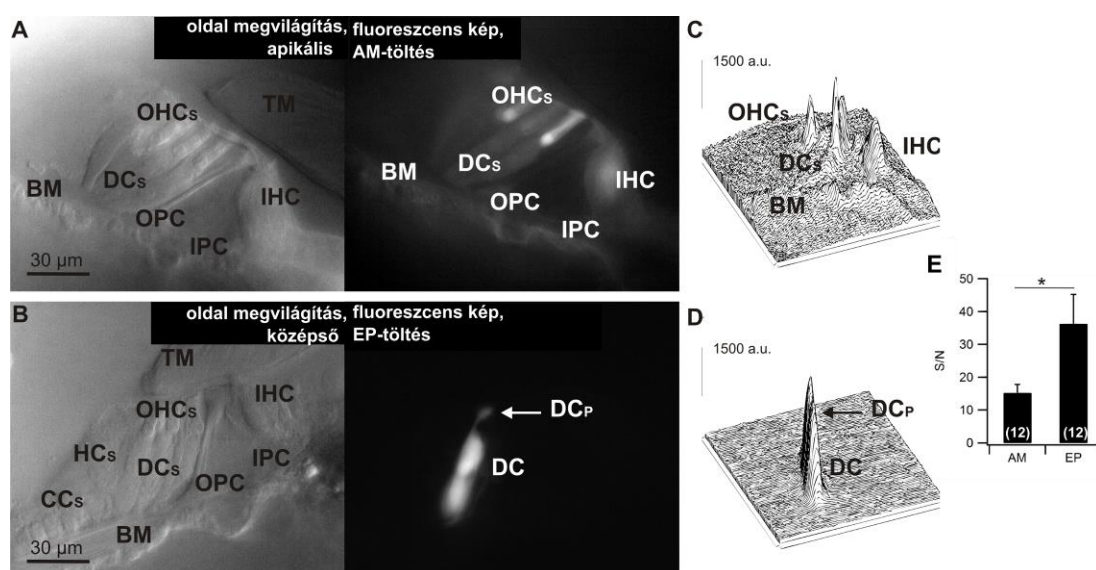
A sejtmembrán megfelelő megérintése után a pipetta eltávolítása volt még kritikus a sejtek túlélése szempontjából. Az optimálisnál gyorsabb eltávolítás a membrán szakadását idézhette elő, megint csak festékszivárgást vonva maga után. A pipetta eltávolításának iránya valamelyest függött a kiválasztott és megtöltött sejt elhelyezkedésétől: a mélyebben fekvő sejteknél célravezetőbb volt diagonális irányban eltávolodni, hogy a felsőbb sejtek, sejtstruktúrák se sérüljenek, ezzel beindítva intercelluláris kommunikációs útvonalakat, amelyek befolyásolhatják a mérendő sejt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintjét is. A felszínen elhelyezkedő sejteknél, azonban, a függőleges pipetta elemelés volt optimális.

Az indikátor koncentrációját a különböző sejtorganelumokban, csak Hensen sejtek esetében figyeltük meg. Ezen sejt típusnál, a többi sejt típusnál gyakrabban, megfigyelhető volt a sejtmag erősebb töltődése, melyre már mások is felfigyeltek (9. ábra) [162, 163].

A metodika beállítása során több indikátor koncentráció is kipróbálásra került: 100, 300, 500  $\mu\text{M}$  és 1 mM. Ezeket a teszteket OGB-1 festékkel végeztük, amelynek egyik előnye, hogy magasabb hullámhossz tartományban (nem UV) gerjeszthető, így a sejtek kisebb fototoxicitásnak vannak kitéve a kísérletek során. Az alacsonyabb koncentráció tartományban (100-500  $\mu\text{M}$ ) festett sejtek tipikusan csak több elektromos impulzus után

érték el megfelelő intenzitást. Ugyanakkor, mint fentebb leírtuk, a többszöri ingerlés növeli a sejt sérülés esélyét, így a nagyobb koncentráció tartományba eső 1 mM-t alkalmaztuk a töltések során, amely esetén egyetlen négyszögimpulzus elegendő volt egy támasztósejt megtöltéséhez. A festék megközelítőleg 5 másodperc alatt egyenletesen eloszlott a legnagyobb (apikálisan elhelyezkedő) sejtekben is (9. ábra).

A beállított paraméterekkel (1 mM indikátor végkoncentráció, 10 ms, 10  $\mu$ A, megfelelő megközelítési és eltávolítási módszerek kitapasztalása) az egy-sejt elektroporációs indikátortöltés sikeressége elérte a 60 %-ot.



**10. ábra.** Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltés jó jel/zaj arány mellett teszi lehetővé egyedi sejtek vizsgálatát. Míg az AM-töltés előnye, hogy egy preparátumban több sejt vizsgálható, hátránya a sejtek nem egyenletes töltődése, valamint a cochlea membránstruktúráinak, érdeklődési körünkön kívül eső sejt képleteknek a töltöttsége, ami növeli a fluoreszcens háttérzajt. A ferde megvilágítású képeken jól beazonosíthatóak a sejtek hemicochlea preparátum Corti-szervén (A – Fura-2/AM és B – Fura-2/K<sup>+</sup>). Az AM-töltés fluoreszcens képén (A) látszik, hogy a sejtek nem egyenletesen vették fel a festéket A külső szőrsejtek töltöttsége teljesen eltakarja a Deiters sejt phalangeális nyúlványát. A fluoreszcens képből készült felületdiagramm (FIJI/ImageJ) felszíne is kaotikusabb (C), mint az egy-sejt elektroporációval töltött Deiters sejt esetében (D). 100  $\mu$ M ATP-vel kiváltott válaszok jel/zaj aránya is látványosan jobb elektroporációs töltés esetében (E, Welch-féle t-teszttel összehasonlítva).

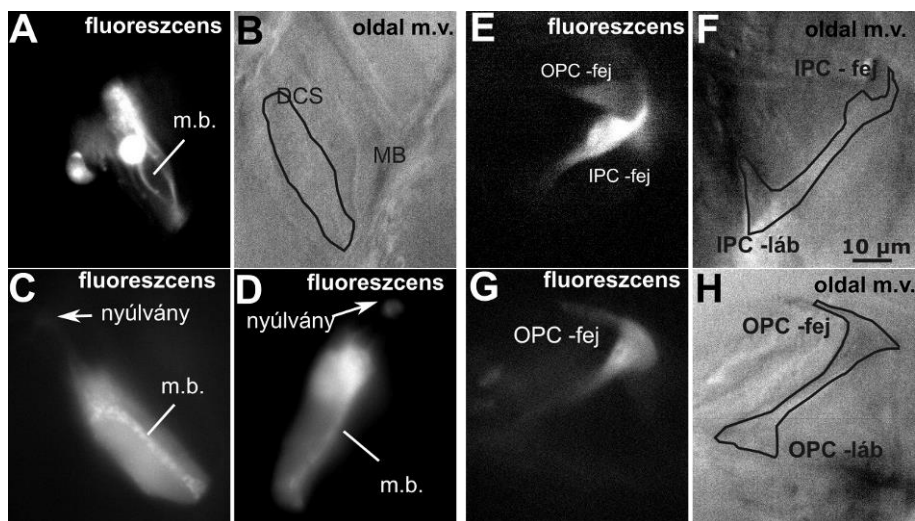
A módszer egyenletesebben töltötte meg a sejteket a korábbi AM-töltési metodikánál, ahol mások által is megfigyelt módon, a sejtek nem azonos mennyiségben veszik fel az extracelluláris térbe adagolt festék molekulákat (10A ábra), hiszen az AM-



töltés során az indikátor molekulák átjutnak a sejtmembránon, az élő sejtekben a citoplazmában lévő nem specifikus észterázok lehasítják a molekula AM-csoportját, amelynek következtében az indikátor bennreked a sejtben. A sejtek töltődése függhet az endogén észteráz szint aktivitásától és a sejtmembránon való átjutás sebességétől (10A ábra). Valamint a nem élő sejtek/struktúrák is festődhetnek, amelyek intenzitása folyamatosan csökken a kísérlet során, hiszen az indikátor kimosódik a perfúzióval. Az alapvonal fluoreszcencia szintjének szórása is kisebb mértékű volt az elektroporációval töltött sejtek esetében a kísérletek során. Mindezek a jel/zaj arány növekedéséhez vezettek, amely a sejtek láthatóságára, jól elkülönülő határaikra (10B és D ábra) illetve a kiváltott  $Ca^{2+}$  tranziensek forrásának észlelésére is vonatkoztatható (10E ábra).

Az egyedi sejtek töltése közben lehetővé vált Deiters sejtek phalangelis nyúlványán is méréseket végeznünk a sejttest mellett (pl.: 10. ábra), az elektroporáció sejtszelektivitása miatt.

Támasztósejtek közül a Deiters és a Hensen sejtek könnyen tölthetők voltak. Nagyobb méreteiknek köszönhetően, jobban megcélozhatók, valamint életképességükről is szemléletesebb képünk volt, már a ferde megvilágítás melletti megfigyelésnél is. Ezek a sejtek a bazális kanyarulatban is elegendően nagy méretűek az egy-sejt elektroporációs töltéshez (pl.: 9. ábra) [161].

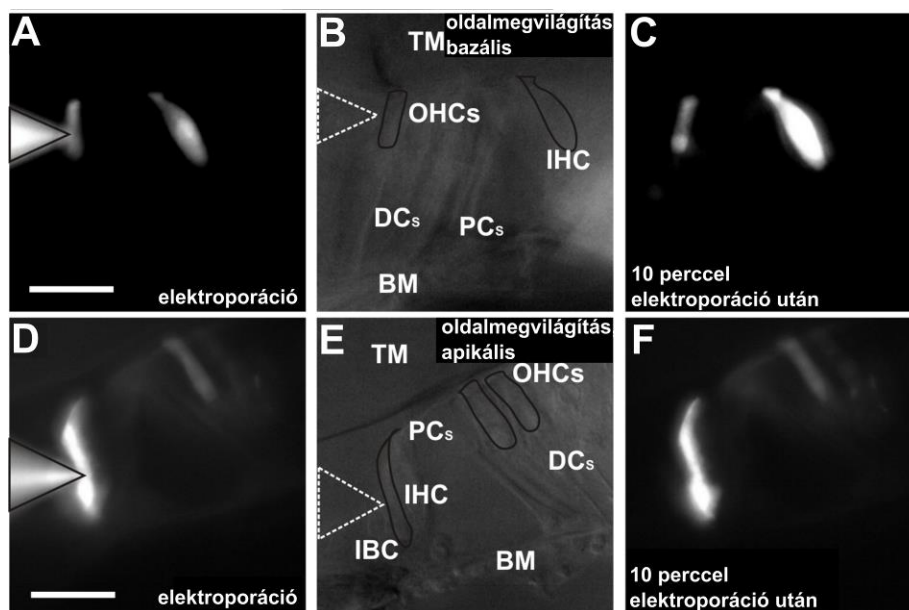


**11. ábra.** Sikertelen Deiters és pillér sejt töltések egy-sejt elektroporációval. Az A-D panelen a boroszilikát üvegpipetta nem megfelelő elhelyezésekor kiadott elektromos impulzus hatásait figyelhetjük meg Deiters sejteken. Érdekes, hogy ennek a sejtípusnak a közepén haladó mikrotubulusköteg (m.b.) erősebben köti a rosszul célzott, túl közelre „lőtt” indikátormolekulákat. Az E-H panelen látható pillér sejtek esetében megfigyelhető, hogy a pillér sejtek kiszélesedő, feji részébe injektált festékmolekulák

nem diffundálnak át a sejt szárán. Esetükben nem sikerült egyenletes festődést elérni. F panel léptéke minden panelre vonatkozik.

A Deiters és Hensen sejtektől laterálisan elhelyezkedő köbalakú Claudius sejtek, kisebb méretük miatt, csak nagyobb gyakorlattal voltak tölthetők, ugyanakkor a Corti-alagutat közrefogó pillér sejtek töltése, minden gyakorlás ellenére is sikertelen maradt. A pillérsejtek sejtteste nagyon keskeny, sok mikrotubulus köteget tartalmazó hajlékony képlet, amely nem volt alkalmas a pipettával való megközelítésre, elhajlott a kisebb erő behatástól, ami szükséges lett volna a sejt megérintésére. A sejtek láb- és fej része tölthető volt, ugyanakkor a festék ezekről a területekről, érdekes módon, nem diffundált tova a nem-töltött, szári rész felé (11E-H ábra).

Bár célunk a támasztősejtek vizsgálata volt, a módszer alkalmas szőrsejtek töltésére is (mind a belső, mind a külső szőrsejtek esetében, 12. ábra). A belső szőrsejteket körülölel belső phalangeális és belső határoló sejtek nem válnak el egyértelműen a ferde megvilágítású képen, így a szőrsejt, vagy éppen ezeknek a támasztősejteknek az egyedi megcélozása nehéz.



**12. ábra.** A támasztősejtek mellett a szőrsejtek (külső OHC és belső IHC A-C) is tölthetőek és jól tartják a festéket az elektroporáció után (C). A belső szőrsejtek megtöltése nehezebb, mert 2 támasztősejt is szorosan körülveszi (IBC – belső határoló sejt és IPhC – belső phalangeális sejt), amelyek elkülönítése a szőrsejttől ferde megvilágítású képen nem egyértelmű. Olykor ezen támasztősejtek töltődnek fel a célba vett belső szőrsejt helyett (D-F), lépték: 15  $\mu\text{m}$ .

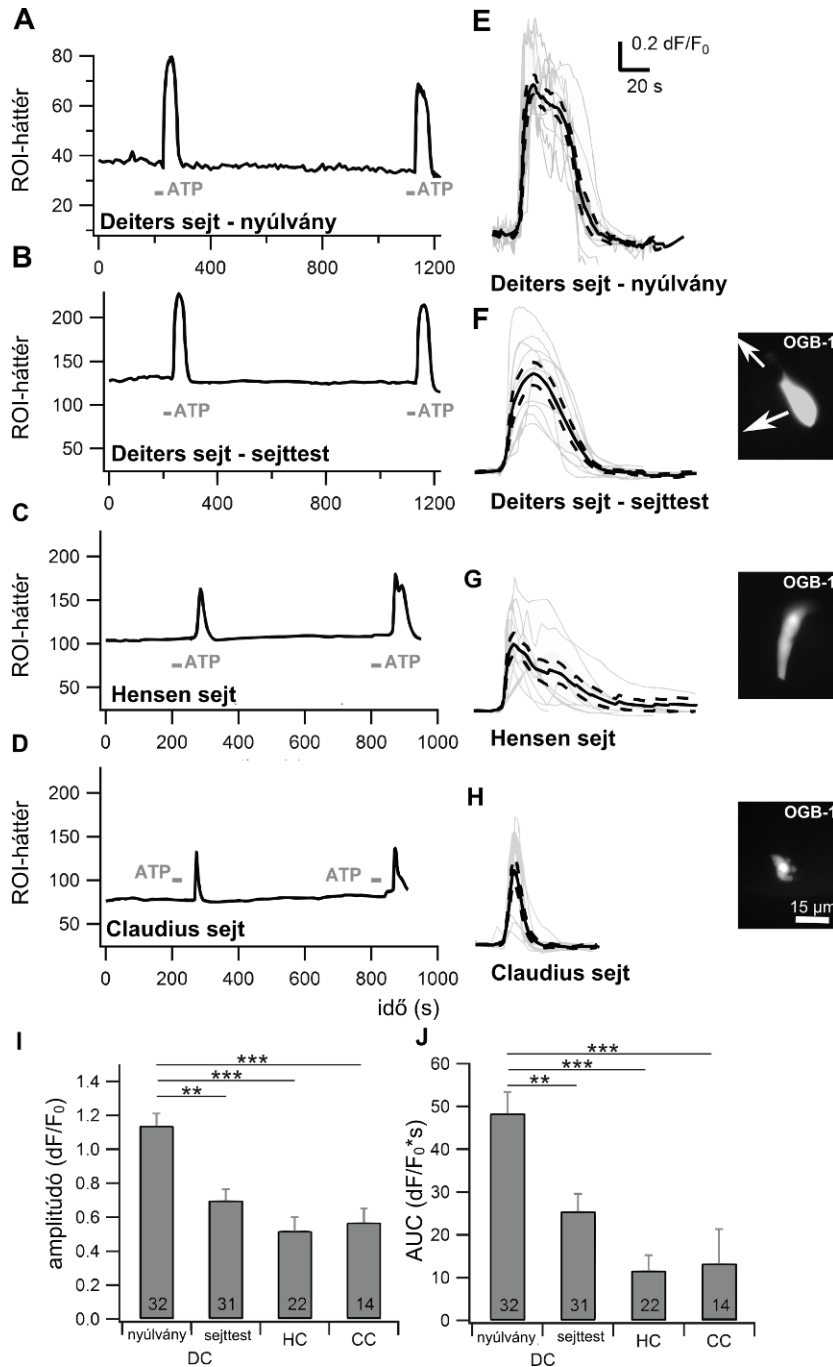
### **5.1.2. ATP-vel reverzibilis és ismételhető $\text{Ca}^{2+}$ válaszok válthatóak ki Deiters, Hensen és Claudius sejtekben**

A beállított módszer validálásához több, a szakirodalom által leírt, a támasztósejteken is megtalálható receptor agonistáját alkalmazva  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  válaszokat váltottunk ki a megtöltött sejteken. Ezeket funkcionális  $\text{Ca}^{2+}$  imaging módszerrel követtünk nyomon. P2, TRPA1, TRPV1 és ACh receptorok és csatornák stimulációjának hatását vizsgáltuk a sejteken.

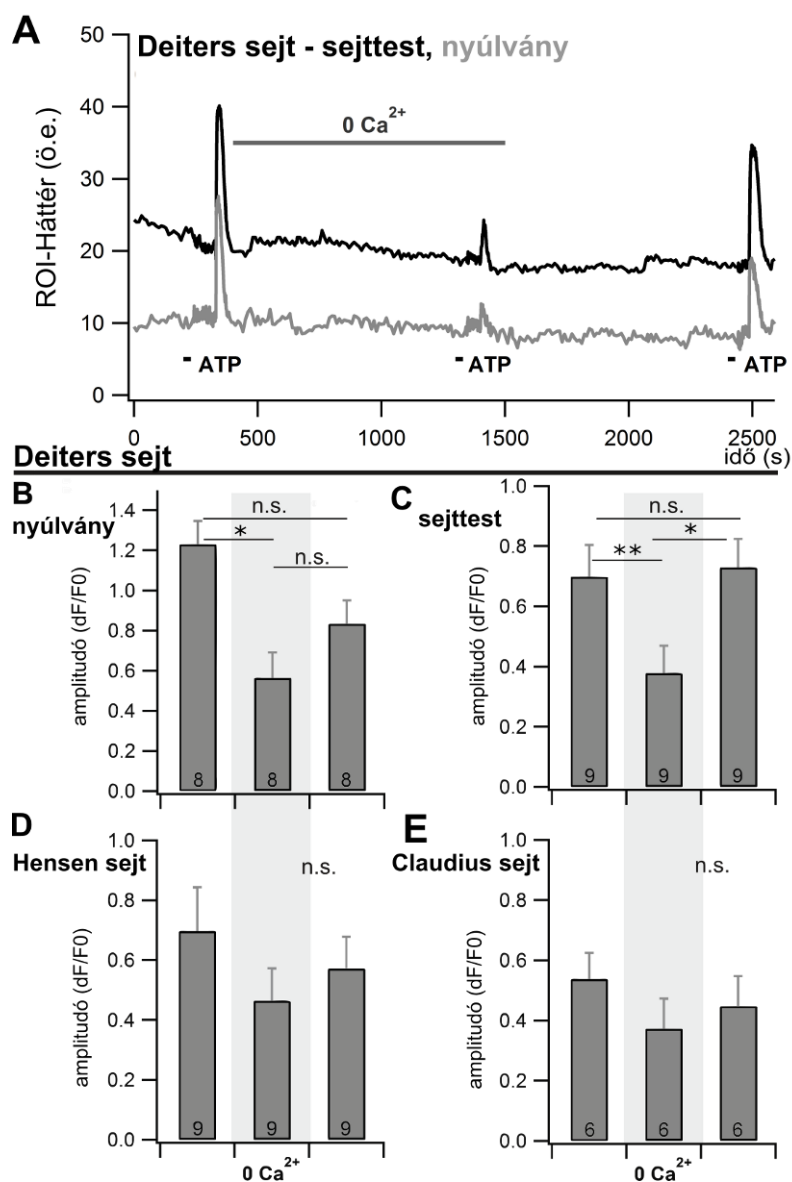
P2 receptorok jelenléte a kifejlett támasztósejteken tényként kezelt a szakirodalomban. Ezt a receptorcsaládot és univerzális agonistájukat, az ATP-t tekintettük kontroll stimulusnak [156]. A TRP csatornák és AChR hatásainak funkcionális feltérképezése még nem történt meg a Corti-szerv esetében. Izolált sejt kísérletek és anatómiai munkák támasztják alá jelenlétüket a támasztósejteken [128, 136].

100  $\mu\text{M}$  ATP-t, 30 másodpercen keresztül a perfúziós oldattal juttattunk a megtöltött sejtekhez, így ismételhető  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket tudtunk mérni, mind a három stabilan tölthető támasztósejttípuson. Deiters sejtek esetében, az elektroporáció szelektivitásának köszönhetően, a nyúlványt, mint szubcelluláris kompartmentet külön is mértük. Az ATP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens amplitúdója és AUC értéke a Deiters sejtek nyúlványán volt a legnagyobb (13C és D ábra). A sejtestek között nem találtunk statisztikai eltérést sem az amplitúdó, sem az AUC értékek terén (amplitúdóknál minden esetben  $p > 0,45$ ; 13I ábra; AUC értékeknél marginálisabb  $p$ -érték jelent meg CC-DC összevetésből: 0,0919; 13J ábra).

Hensen sejtek válaszalakjainak szemrevételezésekor gyakran megfigyelhető volt két-csúcsú  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens, amely az átlagolt görbealakon is megjelenik (13C és G ábra). A görbealakok összevetésekor megfigyelhetjük, hogy a Claudius sejtek válaszában van a leggyorsabb lecsengése a mért sejtek közül (13E-H ábra).



**13. ábra.** ATP hatása egy-sejt elektroporációval töltött támasztősejteken. OGB-1 indikátor használatával három támasztősejttípusról és egy szubcelluláris kompartmentről mondhatjuk el, hogy stabilan tudjuk festeni és ATP által kiváltott Ca<sup>2+</sup> tranzienseket detektálni, amelyek reverzibilisek és ismételhetőek (A-D). Több válasz átlagolásával összevethetők a tranziensek jellegzetességei (E-H, egyenes vonal a sejt válaszgörbék átlagát, a szaggatott vonal a válaszgörbék s.e.m. értékeit, halványszürke vonalak az egyedi mérések görbéit jelölik). A relatív amplitúdó és AUC értékben a Deiters sejtek nyúlványa kiemelkedő a többi sejttesthez képest, míg a sejttestek között nincs statisztikai különbség (I, J, Kruskal-Wallis tesztek, Bonferroni post-hoc teszttel).



**14. ábra.** Az egy-sejt elektroporációs töltési metodikával önkontrollos kísérleti felállások megbízhatóan kivitelezhetők (A). Kontroll környezetben alkalmazott ATP stimulust Ca<sup>2+</sup>-mentes, majd újból normál kísérleti oldatban megismételhetünk (A – példagörbe egy Deiters sejt kompartmentjeinek 3 válaszával). Ezzel lehetőségünk van a kezelés alatti válaszokat a sejt saját, normál körülmények közötti válaszával összevetni, majd egy kimosási periódus után a sejt életképessége is igazolható egy újabb kontroll válasz kiváltásával. Ca<sup>2+</sup>-mentes közegben a támasztósejtek és a Deiters sejt nyúlványának amplitúdója lecsökken, de kimosás után visszatér (B-E; átlag±s.e.m., ANOVA, Bonferroni post-hoc teszttel). Statisztikai eltérést csak a Deiters sejtek esetében találtunk, de a tendencia a másik két vizsgált sejtnél is megfigyelhető.

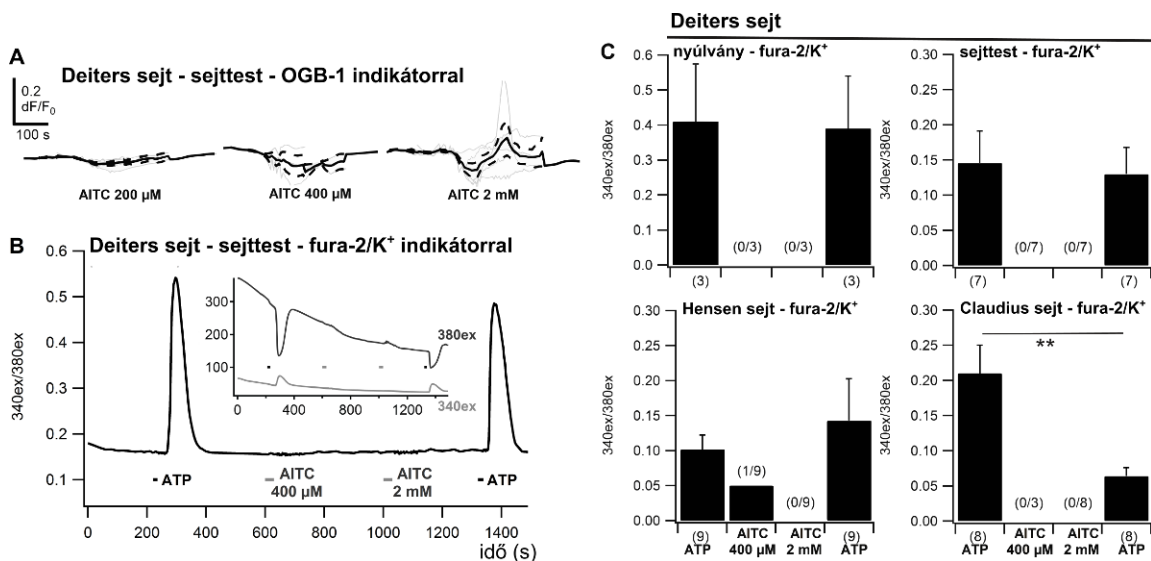
A kísérleti oldat Ca<sup>2+</sup>-mentesre cserélése után is kiválthatók voltak a támasztósejteken a Ca<sup>2+</sup> tranziensek. Ezúttal kisebb amplitúdóval jelentkeztek (p-értékek a kontroll és kezelt összehasonlításakor nyúlvány: p < 0,05; DC: p < 0,01; HC és CC: p < 0,1; 14. ábra). Az oldat visszacserélése és a legalább 15 perces várakozási

idő után visszatért a kontrollhoz hasonló érték, amely a hemicochlea preparátumban történő egy-sejt elektroporációval töltött sejtek hosszú életképességét is bizonyította (14. ábra).

### 5.1.3. TRPA1 és TRPV1 csatornák stimulációja nem idézett elő $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést

Anatómiai tanulmányok alapján TRPA1 és TRPV1 csatornák jelen vannak a Cortiszerv támasztósejtjeinek felszínén [124, 128, 164].

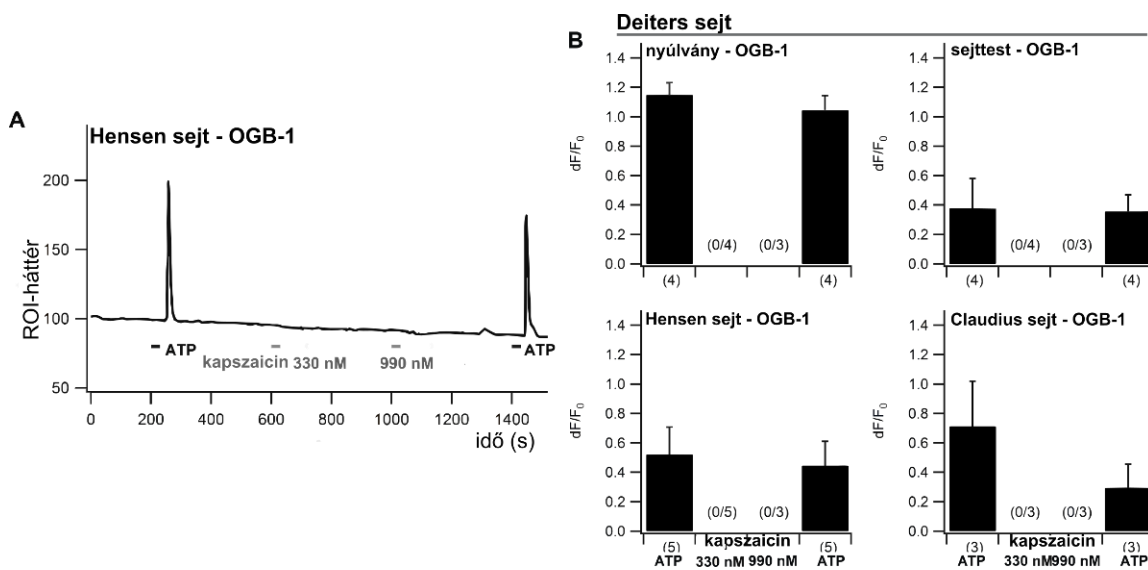
TRPA1 csatornákat allil-izo-tio-cianát (AITC) agonistájával [165, 166] stimuláltuk, szintén 30 másodpercen keresztül a perfúzióba adagolva azt. Az AITC előtt és után ATP-vel ellenőriztük a sejt élet-és válaszképességét. Amennyiben a sejt nem reagált valamely kontroll ATP-adásra, kizárásra került az elemzésből.



**15. ábra.** AITC nem vált ki  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést a belső fül támasztósejtjeiben. A TRPA1 agonista AITC egyhullámhosszú indikátormolekulával töltött sejtekben a sejtek fókuszsíkból való kimozdulása jól követhető (A). Az elmozdulás dózis-függő volt, melyet a mérésre került Deiters sejtek sejttesteinek átlagolt görbéi is mutatnak (A: folyamatos vonal a válaszgörbék átlaga, szaggatott vonal a válasz görbék s.e.m. értékei, a halványszürke vonal az egyedi mérések görbéi). Ratiometrikus, két hullámhosszon gerjesztett fura-2/ $K^+$ -mal az egyedi hullámhosszokon látszik az elmozdulás jelensége (B: beszűrt görbék képe mindkét gerjesztési hullámhosszról), de a ratio értékben ez a mozgási műtermék teljesen eltűnik (B), ugyanakkor  $Ca^{2+}$  tranziensek így sem mérhetőek AITC hatására. Az ábra C része mutatja a fura-2/ $K^+$  festés mellett kapott átlagos amplitúdó értékeket: a 2 kontroll ATP válasz a legtöbb sejtnél hasonló, Claudius sejteknél a második statisztikailag kisebb amplitúdót mutat (a kontroll ATP válaszok

páros t-tesztel, illetve Hensen sejtek esetében Wilcoxon-féle rangkorrelációs tesztel lettek összehasonlítva). AITC-re csak egyetlen Hensen sejt válaszolt.

Az AITC 200, 400  $\mu\text{M}$  és 2 mM koncentrációban alkalmaztuk de egyik dózisban sem tudunk általa kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens mérni (15. ábra). Ugyanakkor az alkalmazást követően az alapvonal dózis-függő elmozdulását tapasztaltuk, amely feltehetően a fókuszsíkból történő sejt-elmozdulás miatt következett be (15A és B ábra). A mozgási műtermékeket kiküszöbölő ratiometrikus fura-2/ $\text{K}^+$ -mal is elektroporáltunk sejteket [167], ennek a feltételezésnek a bizonyítására. A várakozásnak megfelelően a fókuszsíkból való elmozdulást korrigálta a ratio számítás és ugyanúgy lehetőség maradt a Deiters sejtek phalangeális nyúlványának detektálására. Ugyanakkor fura-2/ $\text{K}^+$ -mal sem sikerült  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedést elvezetnünk sem Deiters, sem Claudius sejtekből (16B és C ábra). Egyetlen, éppen már halló egér (P15), Hensen sejtjében azonban egy alacsony amplitúdójú jelet mértünk (15C ábra). A mért tranziens az ATP által kiváltott jeleknél időben később jelent meg (40 másodperccel).



**16. ábra.** TRPV1 csatornák agonistája sem idéz elő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedést a támasztósejtekben. Kapszaicint adva, 2 koncentrációban, nem figyeltünk meg sem sejtválaszt, sem mozgási műterméket (A: példagörbe egy Hensen sejten végzett kísérletről). A sejtek életképessége a kapszaicin előtt és után is ATP-vel került bizonyításra. B részen az amplitúdók átlagait $\pm$ s.e.m.-et láthatjuk, jól megfigyelhető ATP és hiányzó kapszaicin válaszokkal (A két kontroll ATP válasz páros t-tesztel lett összehasonlítva az egyes sejtek esetében).

A második kontroll ATP-re adott jel visszatért és az első kontroll értékeihez hasonlított, kivéve Claudius sejtek esetében, ahol az AITC kezelés utáni ATP jel jelentősen kisebb volt a kezdeti kontrollnál ( $p < 0,01$ ; 15C ábra).

A TRPV1 csatornákat kapszaicinnal aktiváltuk, 330 és 990 nM koncentrációkban [165, 166]. Egyik koncentrációban sem tudtunk  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket elvezetni a támasztósejtekről, valamint az AITC esetében tapasztal fókuszsíkból történő sejtelmozdulást sem tapasztaltuk. A kapszaicin ingerlést megelőző és követő ATP indukálta válaszok megint csak hasonlóak voltak a sejtekben. Claudius sejtekben sem csökkent jelentősen az amplitúdó ( $dF/F_0$ ) nagysága ( $p = 0,2413$ ; 16. ábra).

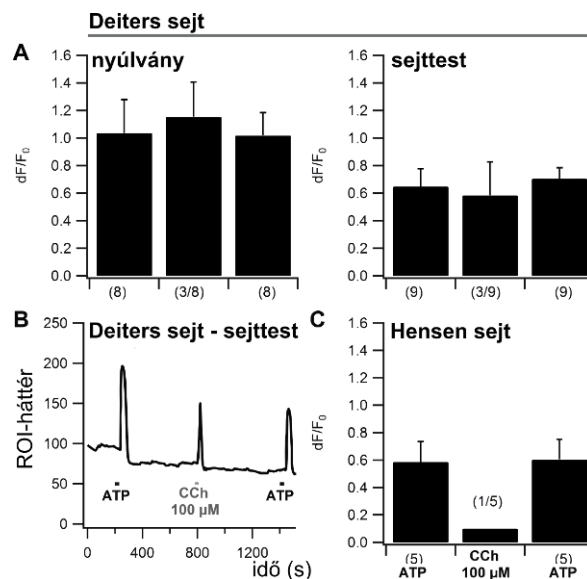
#### **5.1.4. ACh receptor agonista karbakollal Deiters és Hensen sejteken is kiváltható $\text{Ca}^{2+}$ tranziens**

Deiters és Hensen sejtek efferens beidegzést kapnak, amely feltehetően kolinerg receptorokon keresztül valósul meg [119, 133–135]. Egy-sejt elektroporációs módszerünk további validálásához ezt a rendszert választottuk és karbakollal, egy ACh receptor agonistával ingereltük ezt a két sejtípust. Az agonista kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy a Deiters sejtek ACh receptora a nagy  $\text{Ca}^{2+}$  áteresztőképességű  $\alpha 9$ -es altípust is tartalmazó alegységekből épül fel [136], amelynek farmakológiai profilja eltér a szokványos nikotinos ACh receptorokétól. Hensen sejtek esetleges ACh receptorairól eddig nem készült tanulmány, csupán efferens kollaterálisokat detektáltak, amelyek feléjük haladnak.

100  $\mu\text{M}$  karbakollal 30 másodpercen keresztül adagoltunk a perfúziós oldatba, melyet az előzőkhez hasonlóan leírt életképesség ellenőrző ATP előzött meg és követett. Deiters sejteknek mindkét kompartmentumában mértünk  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedést karbakoll hatására, az estek  $\sim 33$  %-ában. A karbakoll által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek amplitúdója az ATP által indukáltakhoz volt hasonló, bár a lecsenési idejük gyorsabb volt (ez főként a nyúlványban volt jelentős: ATP által kiváltott válasz időtartama  $41,34 \pm 5,94$  s, míg a karbakollal kiváltotté  $17,87 \pm 3,43$  s;  $p = 0,0166$ ). Hensen sejtek esetében egyetlen egy karbakoll indukálta  $\text{Ca}^{2+}$  jelet sikerült mérnünk, amely  $\sim 20$  %-os válaszarányt feltételez (17. ábra). A Hensen sejten detektált tranziens amplitúdójában és AUC értékében is elmaradt az ATP által kiváltott értékektől, de tisztán és egyértelműen a karbakoll váltotta ki (a sejt nem volt spontán aktív, sem előtte, sem utána, a tranziens pedig ATP



válaszoknál megszokott, tehát a drog odaérésével nagyjából megegyező időben jelentkezett).



**17. ábra.** Deiters és Hensen sejtek stimulálhatók karbakollal. Az efferens beidegzéseket kapó támasztósejttípusok, feltehetően nikotinos ACh receptorokon keresztül aktiválhatók. Deiters sejtek ~ 33 % (A), míg Hensen sejtek ~20 %-ban (C) reagáltak az agonistára (a válaszok ANOVA és Bonferroni post-hoc tesztel lettek összehasonlítva). A Deiters sejteken nem találtunk eltérést az ATP és a karbakol kiváltott válasza amplitúdójában (B: példagörbe egy Deiters sejten végzett kísérletről).

## 5.2. A morfológia és a purinerg szignalizáció fejlődése a Deiters sejtekben

### 5.2.1. Deiters sejtek sejttestének és nyúlványának morfológiai változásai a postnatális fejlődés során nem mutatnak tonotópikus eltéréseket

Egy-sejt elektroporációs indikátortöltés mellett tanulmányoztuk a Deiters sejtek postnatális morfológiai fejlődését. A mérések két, az apikális és a középső kanyarulatban a hallás fejlődésének szempontjából kritikus első hét végétől a harmadik hét végéig tartottak. 5-7 napos állatok Corti-szervei látványosan eltérő anatómiai felépítéssel rendelkeznek, mint a 10-11 napos és idősebb egerekben megfigyelhető hallószerv. A sejtek közötti terek nem kifejezettek, tömörebb szerkezetet alkotnak. Maga a Corti-alagút nincs megnyitva egyik vizsgált kanyarulatban sem (18A ábra). Néhány esetben marginális pillérek is meg lehetett figyelni a ferde megvilágítású képeken. Ezek a képletek a fejlődő hallószervben kialakulóban lévő *membrana tectoria-*

t kötik legkülső Deiters sejtek sorához és jellegzetes rostos-fonalas szerkezettel rendelkeznek.

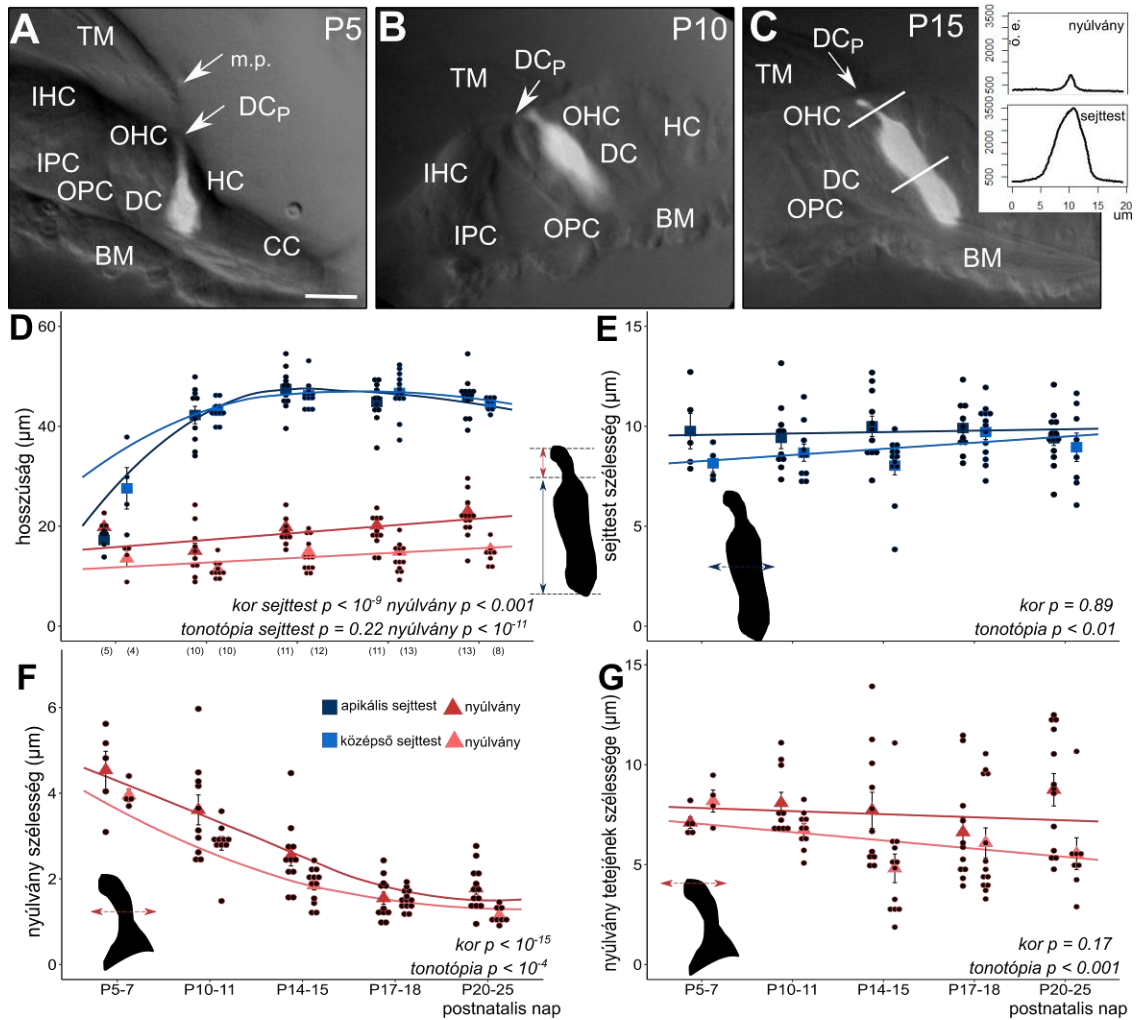
P5-7-es korban az apikális kanyarulatban helyetfoglaló Deiters sejtek sejtteste és nyúlványa nem különül el élesen, hasonlóak mind vastagságban, mind hosszúságban (18D és E ábra). A korábban érő középső kanyarulatban a nyúlvány megkezdte a hosszbeli növekedését (18A és D ábra).

P10-11-es korra, amikor a szőrsejtek érzékennyé válnak a külső hangingerekre, a sejttestek hirtelen növekedésnek indultak és P14-15-re elérték a kifejlett szervre jellemző sejthosszokat. A kezdetben tapasztalt különbség a sejttest hosszokban a kanyarulatok között, erre az időszakra statisztikailag nem kimutathatóra csökkent ( $p > 0,05$ ) és az illesztett modell alapján az életkor maradt az egyetlen releváns faktor a sejttest növekedése szempontjából (18D ábra;  $p < 10^{-9}$ ).

A sejttest szélességbeli növekedése nem volt jelentős a fejlődés során, azonban itt jobban érvényesültek az elhelyezkedésből adódó tonotópikus különbségek: a középső kanyarulat sejtei vékonyabbak voltak az apikálisan elhelyezkedő sejteknél (18E ábra;  $p < 0,01$ ).

A nyúlvány növekedése során végig tartotta a jellegzetes tonotópikus eltéréseket, így az apikális régióban található sejtek nyúlványa minden esetben hosszabbnak bizonyult, mint a középső kanyarulatban elhelyezkedő sejteké (18A ábra;  $p < 10^{-11}$ ). Ugyanakkor korfüggés is kimutatható volt a nyúlvány fejlődése során ( $p = 0,001$ ). Szélességüket tekintve a nyúlványok szára jelentős átalakuláson ment keresztül és a kiindulásnál vékonyabb felépítésűek lettek (18D ábra;  $p < 10^{-15}$ ). A karcsúsodás során a kor mellett az elhelyezkedésnek is szignifikáns hatását tudtuk kimutatni ( $p < 10^{-4}$ ).

A száron kívül a nyúlványhoz tartozik annak kiszélesedő, apikális része, amelynek átmérője nem változott jelentősen a fejlődés alatt (18F ábra). Ez az állandóság kell a *lamina reticularis* integritásának fenntartásához. A középső kanyarulat kisebb sejtszélességű, a tonotópiának megfelelően (18F ábra;  $p < 0,001$ ).



**18. ábra.** Deiters sejtek sejttestének és nyúlványának morfológiai fejlődése (P5-25) a cochlea apikális és középső kanyarulatában. Elektroporációval feltöltött Deiters sejtek fluoreszcens képeit ferde megvilágítású képre illesztve láthatjuk a vizsgált sejtet a fejlődés egyes szakaszaiban (A-C, középső kanyarulatban). A fluoreszcens képekre FIJI szoftverrel illesztett vonal profil segítségével pontosabban meghatározhattuk a kompartmentek dimenzióit (C beillesztett képek). P5-ös periódusban a Corti-alagút még nem nyílt meg, marginális pillérek figyelhetők meg a 3. sorban elhelyezkedő Deiters sejtek felett (A). A sejtek alakja teljesen eltér az idősebb állatokban megfigyelt sejtektől (B, C). P10-től már nyitott Corti-alagutak láthatók a preparátumban. Ebben a fejlődési szakaszban a sejttest látványos növekedésen ment keresztül és megközelítőleg el is érte a felnőtt kori hosszát (D, kék négyszögek). A nyúlvány is lassú növekedést mutatott a kor előrehaladtával, valamint tonotópikus eltérések figyelhetők meg az esetben: az apikális nyúlvány nagyobb értékeket vett fel (D, piros háromszögek). A nyúlvány szélessége csökkent a kor előre haladtával (F). Itt szintén megfigyelhető volt tonotópikus eltérés: az apikális kanyarulatbeli sejtek nyúlványának vastagsága felülmúlta a középső kanyarulatbeliekét. A sejttest szélessége (E) és a nyúlvány tetejének szélessége (G) nem változott jelentősen a fejlődés folyamán, de a kanyarulatok közötti különbség ezekben a paraméterekben is megjelent: mindkét esetben az apikális sejtek értékei felülmúlták a középső kanyarulatban elhelyezkedőket. Az adatsorok regressziós modellel kerületek elemzésre, ahol a magyarázó változók a kor és a

tonotópikus elhelyezkedés voltak. Az adatok az átlag  $\pm$  s.e.m. értékeket, valamint az egyedi mérési eredményeket mutatják, az elemszámok zárójelben szerepelnek és minden diagramra azonos értékek vonatkoztathatók. A lépték A-C panelekhez 15  $\mu$ m.

**2. táblázat.** Deiters sejtek sejttestének morfológiai sajátosságainak alakulása a fejlődés különböző időpillanataiban, két különböző cochleáris kanyarulatban (átlag $\pm$ s.e.m.).

	hosszúság ( $\mu$ m)		szélesség ( $\mu$ m)	
	apikális	középső	apikális	középső
<b>P5-7</b>	17,25 $\pm$ 0,97	27,58 $\pm$ 4,15	9,76 $\pm$ 0,89	8,15 $\pm$ 0,43
<b>P10-11</b>	42,25 $\pm$ 1,75	43,09 $\pm$ 0,69	9,42 $\pm$ 0,54	8,68 $\pm$ 0,43
<b>P14-15</b>	47,44 $\pm$ 1,23	46,23 $\pm$ 0,76	10,00 $\pm$ 0,51	8,03 $\pm$ 0,46
<b>P17-18</b>	44,88 $\pm$ 1,19	46,67 $\pm$ 1,17	9,91 $\pm$ 0,36	9,71 $\pm$ 0,37
<b>&gt;P20</b>	45,96 $\pm$ 1,04	44,51 $\pm$ 0,46	9,40 $\pm$ 0,36	8,95 $\pm$ 0,71

**3. táblázat.** Deiters sejtek nyúlványának morfológiai sajátosságainak alakulása a fejlődés különböző időpillanataiban, két különböző cochleáris kanyarulatban (átlag $\pm$ s.e.m.).

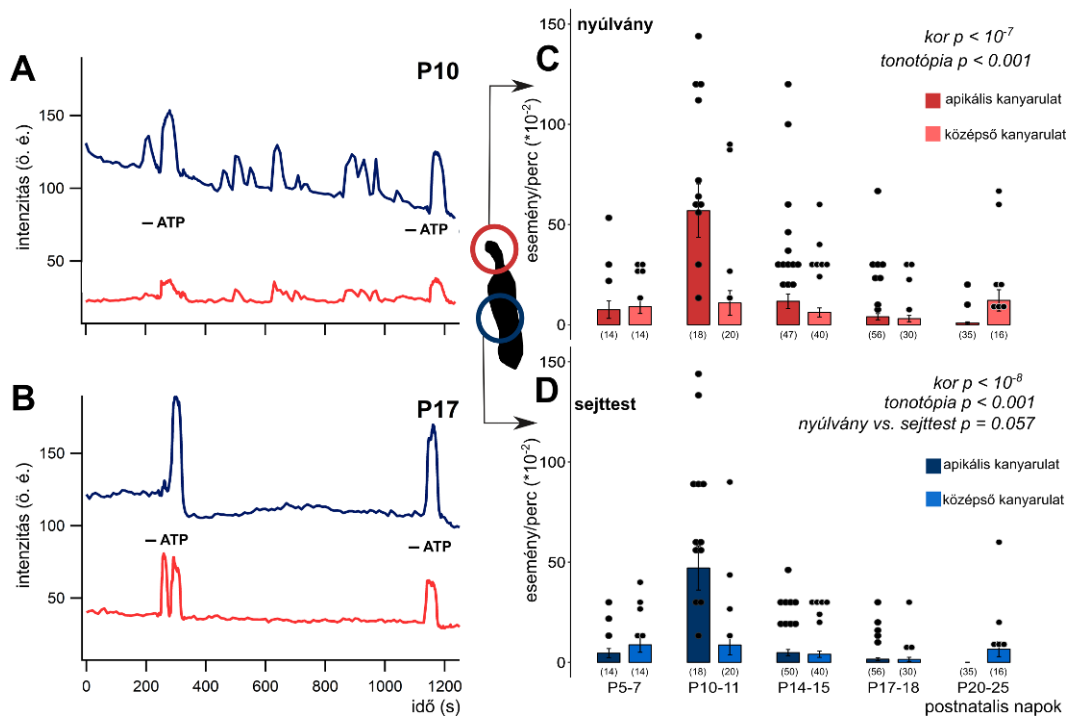
	hosszúság ( $\mu$ m)		szélesség ( $\mu$ m)		tető szélessége ( $\mu$ m)	
	apikális	középső	apikális	középső	apikális	középső
<b>P5-7</b>	19,81 $\pm$ 0,84	13,54 $\pm$ 1,59	4,54 $\pm$ 0,44	3,95 $\pm$ 0,15	7,10 $\pm$ 0,29	8,17 $\pm$ 0,55
<b>P10-11</b>	15,08 $\pm$ 1,55	11,35 $\pm$ 0,55	3,61 $\pm$ 0,35	2,83 $\pm$ 0,16	8,08 $\pm$ 0,53	6,73 $\pm$ 0,29
<b>P14-15</b>	19,79 $\pm$ 0,67	14,9 $\pm$ 0,79	2,54 $\pm$ 0,24	1,85 $\pm$ 0,11	7,71 $\pm$ 0,90	4,81 $\pm$ 0,71
<b>P17-18</b>	20,14 $\pm$ 0,68	14,91 $\pm$ 0,64	1,55 $\pm$ 0,14	1,51 $\pm$ 0,06	6,62 $\pm$ 0,79	6,08 $\pm$ 0,75
<b>&gt;P20</b>	22,95 $\pm$ 1,36	15,28 $\pm$ 0,69	1,78 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,06	8,74 $\pm$ 0,81	5,54 $\pm$ 0,79

### 5.2.2. A fejlettség-függő spontán Ca<sup>2+</sup> aktivitás tonotópikus heterogenitást és szubcelluláris különbséget mutat

A kísérletek során többször tapasztaltunk ingerlés nélkül jelentkező, spontánnak tekintett [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedéseket. Ezek kiemelt gyakorisággal fordultak elő a fejlődésben lévő (az első hallás optimum megjelenése előtt álló, < P14) sejteken (19. ábra; 4. táblázat). A spontán jelek nem korlátozódtak a sejttestre, hanem a phalangeális nyúlványon is megjelentek. Megjelenésük jellemző volt a legfiatalabb vizsgált kortól kezdődően (P5-7). Legkifejezettebb a P10-11-es periódusban volt, az apikális kanyarulat sejtein. Ettől a kortól kezdődően a jelek előfordulási gyakorisága csökkenni kezdett és a harmadik postnatális hét végére teljesen megszűntnek tekinthetők (19. ábra).

A középső kanyarulatban helyet foglaló sejtek vizsgálata során nem találtunk olyan kiemelkedő periódust, mint az apikális kanyarulat sejtjeinél, ugyanakkor hasonlóan emelkedett volt az aktivitás a korai időszakban (az illesztett modell kor-spontán aktivitás összefüggésének  $p$ -értéke  $< 10^{-8}$ ), amely fokozatosan csökkent a fejlődés során, majd a P20-25-ös időszakban enyhe újbóli emelkedés volt tapasztalható.

A kompartmentumok esetében külön-külön is megfigyelhető volt a tonotópia (mindkét kompartmentum esetében:  $p < 0,001$ ). A spontán jelek a nyúlványon tendenciózusan gyakrabban jelentkeztek, mint a sejttesten ( $p = 0,057$ ; 19C és D ábra).



**19. ábra.** Korfüggő spontán  $Ca^{2+}$  aktivitás figyelhető meg Deiters sejtekben a cochlea apikális és középső kanyarulataiban. Az apikális kanyarulatból származó példa görbék mutatják a látványos különbséget P10 (A) és P17 (B) korú állatban tapasztalható  $Ca^{2+}$  események között. A spontán jelek a Deiters sejtek nyúlványában (C) és sejttestében (D) is jelentkeztek, egyértelműen csökkenő tendenciával a kor előrehaladtával. A legjelentősebb spontán aktivitás az apikális kanyarulat sejtjein volt tapasztalható a P10-11-es periódusban, mindkét kompartmentben. Tonotópikus különbség, az apikális kanyarulat javára volt megfigyelhető mind a sejttest, mind a nyúlvány esetében. A kompartmentek között tendenciájában találtunk különbséget: a nyúlványon átlagosan több  $Ca^{2+}$  jelet tudtunk detektálni. Az adatsorok regressziós modellel kerületek elemzésre, ahol a magyarázó változók a kor és a tonotópikus elhelyezkedés voltak, illetve a kompartmentum összevetéseknél a sejtregió. Az adatok átlag $\pm$ s.e.m. értékeket és az egyedi mérési pontokat mutatják, hagyva, a számossága miatt a megértést zavaró, 0 értékeket. A megfigyelt kompartmentek száma zárójelben található.

**4. táblázat.** Spontán jelek megjelenése különböző korú Deiters sejtek két szubcelluláris kompartmentjében, két eltérő kanyarulatban ( $\cdot 10^{-2}$  esemény/perc; átlag $\pm$ s.e.m.).

	sejttest		nyúlvány	
	apikális	középső	apikális	középső
<b>P5-7</b>	4,65 $\pm$ 2,26	0,88 $\pm$ 0,36	7,51 $\pm$ 4,34	9,04 $\pm$ 3,51
<b>P10-11</b>	47,14 $\pm$ 11,07	8,68 $\pm$ 4,96	56,92 $\pm$ 13,34	10,86 $\pm$ 6,12
<b>P14-15</b>	4,86 $\pm$ 1,56	4,10 $\pm$ 1,58	11,69 $\pm$ 3,60	6,10 $\pm$ 2,24
<b>P17-18</b>	1,59 $\pm$ 0,74	1,50 $\pm$ 1,04	3,94 $\pm$ 1,56	3,0 $\pm$ 1,55
<b>&gt;P20</b>	0 $\pm$ 0	6,70 $\pm$ 3,83	0,8 $\pm$ 0,6	12,11 $\pm$ 5,30

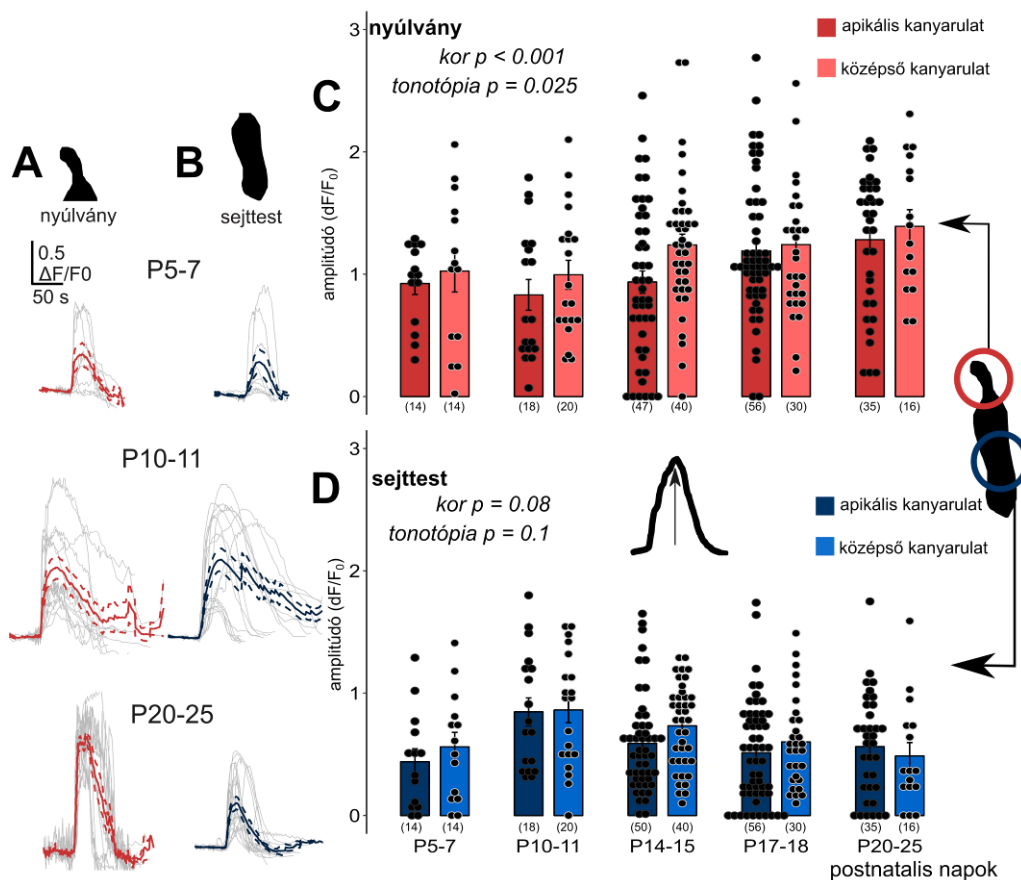
### 5.2.3. ATP kiváltotta $[Ca^{2+}]_i$ jelek korfüggőek

Az általunk vizsgált minden postnatális fejlődési periódusban képesek voltunk ATP-vel (100  $\mu$ M, 30 s) előidézni  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést. Ez mindkét kompartmentre és kanyarulatra igaz volt. Ugyanakkor különbségeket tapasztaltunk a különböző fejlődési periódusokban mért  $Ca^{2+}$  tranziensek karakterisztikájában (20., 21. ábra és 5., 6. táblázat).

#### 5.2.3.1. $Ca^{2+}$ tranziensek amplitúdójának alakulása a fejlődés alatt

A Deiters sejtek két kompartmentjén kiváltott  $Ca^{2+}$  tranziensek karakterisztikája eltérő a különböző fejlődési stádiumokban (20. ábra A és B). Fiatal (P5-7) egerek Deiters sejtjei mérsékelten reagálnak ATP-re. A P10-11-es periódusra viszont ATP jelentős  $Ca^{2+}$  beáramlást tud előidézni (20C és D ábra). Az apikális sejtek nyúlványain hasonló maximális amplitúdójú tranzienseket tudunk mérni a postnatális fejlődés első két hetében, majd enyhe emelkedés volt megfigyelhető a harmadik hét alatt. A középső kanyarulatban lévő sejtek nyúlványain hasonló növekedés már a P14-15 periódusban megjelenik (20C és D ábra). A két kanyarulat között szignifikáns eltérést tapasztaltunk ( $p = 0,025$ ), de a kor befolyásolta legjobban az amplitúdók alakulását ( $p < 0,001$ ).

A sejttesteken mérhető amplitúdó maximumok más módon alakultak. Hasonlóan kis amplitúdóról indulva, P10-11-re kiemelkedően megnöttek, majd innentől újból csökkenni kezdtek mindkét kanyarulatban. Ennek megfelelően a statisztika is kevésbé fontosnak jelölte meg a sejttestek amplitúdójának alakulása során a lokalizációt ( $p = 0,1$ ), azonban, a korfüggés is csak tendenciájában jelenik meg, mint befolyásoló tényező ( $p = 0,08$ ).



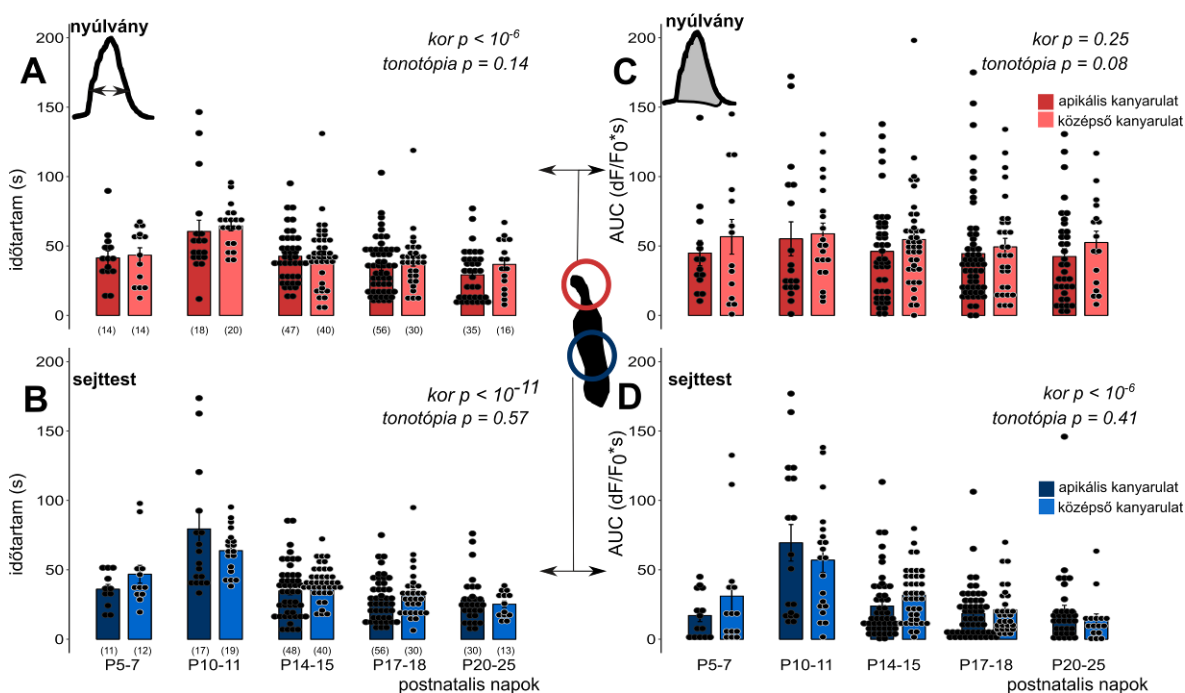
**20. ábra.** Az ATP kor- és elhelyezkedésfüggő  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket vált ki a Deiters sejtek sejttestjeiben és nyúlványjaiban. Az apikális kanyarulatban mért egyedi sejtválaszok (szürke) átlagolásaiból származó folyamatos görbéken (piros – nyúlvány, A; kék – sejttest, B) és a hozzájuk tartozó szaggatott vonallal jelölt s.e.m. értékeken jól látható az ATP által kiváltott tranziensek alakjának változása a kor előrehaladtával. Az oszlop diagrammok ezen válaszok amplitúdójának átlag±s.e.m. értékeit, valamint az egyedi mérési pontokat mutatják a nyúlvány (C) és a sejttest (D) esetében a két vizsgált kanyarulatban. A nyúlvány esetében sokkal jelentősebb, mind a kor-, mind a tonotópikus különbség a sejtek válaszában, míg a sejttestnél egyik magyarázó változó sem érte el a szignifikancia szintet a regressziós analízis során. Ugyanakkor a sejttest esetében P10-11-től egy lassú csökkenés figyelhető meg az amplitúdó esetében (D).

### 5.2.3.2. Válasz időtartam változása a postnatalis fejlődés során

A válasz időtartama (a maximális amplitúdó felét elérő intenzitás értéktől, ugyaneddig az értékig történő visszaesésig eltelt idő) is változik a fejlődés során. Nyúlvány esetében (bár nem annyira, mint az amplitúdóknál láttuk) a P10-11-es periódustól csökkenni kezd az időtartam, karcsúsodnak a  $\text{Ca}^{2+}$  jelek (21A ábra). A karcsúsodás folyamata hasonlóan zajlik a kanyarulatokban ( $p=0,14$ ), azonban a

postnatális napok száma jelentősen befolyásolja a várható  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens időtartamát ( $p < 10^{-6}$ ).

Sejttestek esetében hasonlóan alakult a mért paraméter: a kanyarulatoktól nem ( $p = 0,57$ ), de a kortól nagymértékben ( $p < 10^{-11}$ ) függ a tranziens időtartama (21B ábra).



**21. ábra.** ATP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek időtartama és görbe alatti területei (AUC) nem mutatnak tonotópikus eltéréseket, azonban fejlődési állapot függők. Az oszlopdiaagrammok az átlagos válaszidőtartamokat (A, B) és AUC értékeket (C, D) mutatják  $\pm$  s.e.m. értékekkel, illetve az egyedi mérési pontokkal a nyúlvány (A, C) és a sejttest (B, D) esetében a cochlea két kanyarulatában. Megfigyelhető a fokozatos csökkenés a fejlődés előrehaladtával a P10-11-es periódust követően, minden mérés esetében (kivéve a nyúlvány AUC értékeinél). Nem találtunk különbséget az apikális és középső kanyarulatban elhelyezkedő Deiters sejtek kompartmentjeinek válaszaik között. Az adatsorok regressziós modellel kerületek elemzésre, ahol a magyarázó változók a kor és a tonotópikus elhelyezkedés voltak. A mérések száma zárójelben található az időtartamot mutató oszlopok alatt (A, B), amely értékek az AUC mérésekre is vonatkoznak.

### 5.2.3.3. Korfüggő görbe alatti terület (AUC) változások

Az ATP által kiváltott  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  jelekről egy összefoglaló képet adhat a görbe alatti terület (AUC). Itt is a P10-11-es korosztályban detektáltuk a legmagasabb értékeket, minden kanyarulatban, minden kompartment esetében (21C és D ábra). A nyúlvány AUC értékek megközelítőleg azonosak a különböző korosztályokban. Ahogy az amplitúdó növekszik, a válasz időtartama csökken. Ennek a két paraméternek az



ellentétes irányú változása a görbe alatti területet (amely közelíthető a két paraméter szorzatával) nagyjából hasonló értéken tartja végig, a fejlődés során. A középső kanyarulatban lévő nyúlványok átlag értékei minden korban felülmúlják az apikális kanyarulatban mértet, de csak tendenciózus különbséget sikerült kimutatni a kanyarulat hatásában ( $p = 0,08$ ). A kornak statisztikailag semmilyen hatását nem tapasztaltuk, valószínűleg a fentebb említett területszámítási jellemzők miatt ( $p = 0,25$ ).

A sejttestek esetében az AUC értékek a többi paraméterhez hasonlóan a P10-11-es korosztályt követően fokozatosan csökkennek (21D ábra). A kanyarulatok között semmilyen különbség nem tapasztalható ( $p = 0,41$ ), míg a korfüggés ebben az esetben igen kifejezett ( $p < 10^{-6}$ ).

**5. táblázat.** ATP kiváltotta, Deiters sejtek nyúlványán mért  $Ca^{2+}$  tranziensek paraméterei (átlag $\pm$ s.e.m.). A mérések az apikális és a középső cochleáris kanyarulatban történtek.

	amplitúdó (dF/F <sub>0</sub> )		válasz időtartam (s)		AUC (dF/F <sub>0</sub> *s)	
	apikális	középső	apikális	középső	apikális	középső
<b>P5-7</b>	0,92 $\pm$ 0,08	1,02 $\pm$ 0,17	41,41 $\pm$ 5,06	43,39 $\pm$ 5,26	44,85 $\pm$ 9,13	56,62 $\pm$ 12,56
<b>P10-11</b>	0,83 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,11	60,47 $\pm$ 8,13	64,45 $\pm$ 3,46	55,12 $\pm$ 12,26	58,80 $\pm$ 7,77
<b>P14-15</b>	0,93 $\pm$ 0,09	1,23 $\pm$ 0,08	42,57 $\pm$ 2,90	43,01 $\pm$ 3,61	46,04 $\pm$ 5,29	54,64 $\pm$ 5,59
<b>P17-18</b>	1,18 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,11	35,10 $\pm$ 2,63	39,13 $\pm$ 3,64	44,43 $\pm$ 4,92	49,3 $\pm$ 6,22
<b>&gt;P20</b>	1,28 $\pm$ 0,09	1,39 $\pm$ 0,13	29,15 $\pm$ 3,01	36,72 $\pm$ 4,52	42,41 $\pm$ 5,62	52,45 $\pm$ 8,17

**6. táblázat.**  $Ca^{2+}$  tranzienseinek paraméterei ATP ingerlést követően a Deiters sejtek sejttestein (átlag $\pm$ s.e.m.). A mérések az apikális és a középső kanyarulatban történtek.

	amplitúdó (dF/F <sub>0</sub> )		válasz időtartam (s)		AUC (dF/F <sub>0</sub> *s)	
	apikális	középső	apikális	középső	apikális	középső
<b>P5-7</b>	0,43 $\pm$ 0,10	0,56 $\pm$ 0,11	36,04 $\pm$ 3,88	46,82 $\pm$ 6,9	17,04 $\pm$ 4,37	31,05 $\pm$ 11,03
<b>P10-11</b>	0,84 $\pm$ 0,11	0,86 $\pm$ 0,10	79,48 $\pm$ 12,30	63,75 $\pm$ 3,76	69,46 $\pm$ 13,15	56,96 $\pm$ 8,84
<b>P14-15</b>	0,58 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,05	34,68 $\pm$ 2,79	40,90 $\pm$ 1,91	23,87 $\pm$ 3,33	31,74 $\pm$ 3,01
<b>P17-18</b>	0,51 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,06	28,82 $\pm$ 2,31	32,4 $\pm$ 3,14	18,39 $\pm$ 2,53	21,10 $\pm$ 3,10
<b>&gt;P20</b>	0,56 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,10	27,94 $\pm$ 3,16	25,17 $\pm$ 2,57	19,95 $\pm$ 4,49	14,18 $\pm$ 4,05

#### **5.2.4. Szelektív P2Y receptor aktiváció kor- és tonotópia-függő $\text{Ca}^{2+}$ tranzienseket vált ki, P2Y dominanciával az apikális kanyarulatban**

UTP-t, P2Y receptor agonistát, adtunk (100  $\mu\text{M}$ , 30 s), hogy megfigyelhessük külön a purinerg receptor alcsaládok fejlődésbeli expressziós mintázatát. 3 kitüntetett fejlődési periódusban tanulmányoztuk a P2Y receptorok jelentőségét: P10-11 (a halláskezdetnek megjelölt időpont), P14-15 (az első hallásoptimum – 15 kHz – megjelenésének időpontja) és P17-18 (az utolsó mitózisok lezáródásának időszaka a hallószervben). Az UTP minden kiválasztott időpontban alkalmas volt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés kiváltására a kompartmentekben (22. ábra, 7. és 8. táblázat). A válaszok alakjukban és paramétereikben hasonlóak, de kisebbek az ATP által kiváltott jeleknél. Az amplitúdók összevetésénél a nyúlvány ( $p < 0,001$ ) és a sejttest ( $p < 0,001$ ) is szignifikánsan kisebb eredményeket adott az ATP-nél mértéknél.

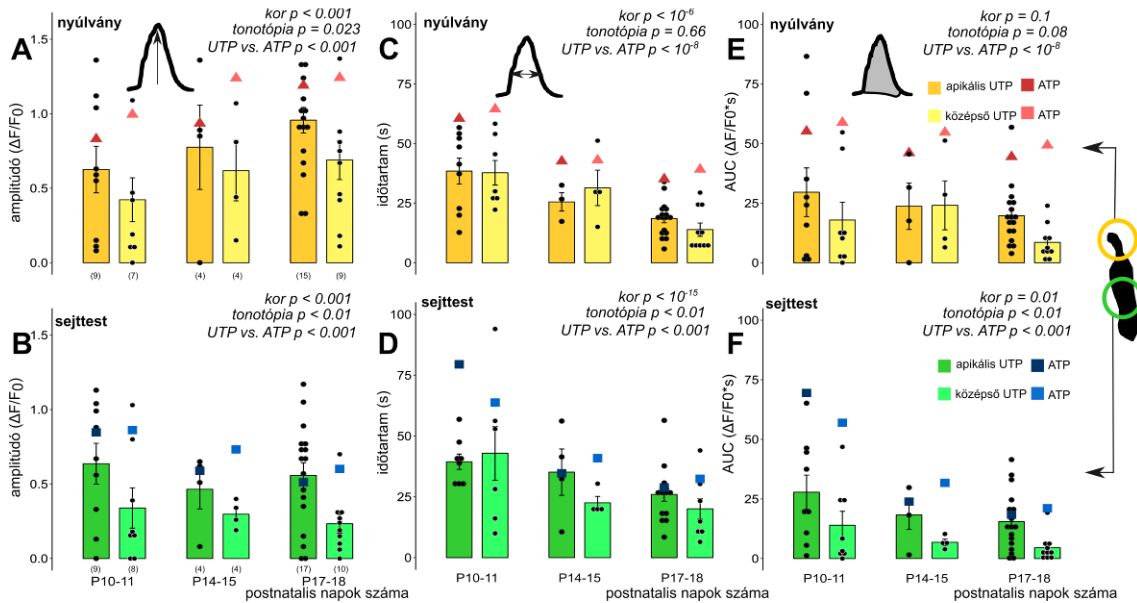
A nyúlvány amplitúdók P10-11-től növekedést mutatnak ( $p < 0,001$ ), hasonlóan az ATP által kiváltott válaszok amplitúdóihoz (22A ábra). Tonotópikus eltéréseket is tapasztaltunk: az apikális kanyarulatban mért értékek felülmúlták a középső kanyarulatban elhelyezkedő Deiters sejtek nyúlványainak értékeit ( $p = 0,023$ ).

A sejttest amplitúdók alig csökkentek az apikális kanyarulatban, míg a középsőben folyamatos lassú csökkenés figyelhető meg a korrrel (22B ábra; kor hatása  $p < 0,001$ ). A tonotópikus eltérés is szignifikánsnak bizonyult ( $p < 0,01$ ).

A válasz időtartamok rövidebbek az UTP által kiváltott tranziensek esetében, mint az ATP által kiváltottak (nyúlvány:  $p < 10^{-8}$ ; sejttest:  $p < 0,001$ ). Az időtartamok a korrrel csökkentek, a válasz alakok karcsúsodtak (nyúlványnál  $p < 10^{-6}$ ; sejttestnél  $p < 10^{-15}$ ). Elhelyezkedés szempontjából, a nyúlvány válasz időtartama nem függ a kanyarulattól, ahol a sejt elhelyezkedik ( $p = 0,66$ ), míg a sejttest esetében kimutatható az eltérés a kanyarulatok között: a középső kanyarulatban elhelyezkedő sejttestek válaszána időtartama rövidebb, mint az apikális területen lévő sejteké (22C és D ábra;  $p < 0,01$ ).

Az UTP által kiváltott válaszok AUC értékei csökkenést mutattak a sejttest esetében mindkét kanyarulatban (tonotópia  $p < 0,01$ ) a fejlődés folyamán (22F ábra; kor hatása az AUC értékekre  $p = 0,01$ ), hasonlóan az ATP által kiváltott válaszok AUC értékeihez. A két agonista között azonban jelentős eltérést lehetett kimutatni: Az UTP hatás alatt mért AUC értékek messze az ATP által kiváltottak mögött maradnak ( $p < 0,001$ ). A nyúlvány görbe alatti területeiben, ahogy ATP esetében is tapasztaltuk, nincs eltérés a

kor és a sejt elhelyezkedésének függvényében (22E ábra). Ugyanakkor ebben a kompartmentben is határozottan kisebb értékek voltak megfigyelhetők UTP adagolást követően, mint ATP-t követően ( $p < 10^{-8}$ ).



**22. ábra.** Perfúzióban adott P2Y agonista UTP (100  $\mu$ M)  $Ca^{2+}$  tranzienseket váltott ki, ami fejlődésbeli (P10-18-as időszakban) és tonotópia-függést is mutatott. Az oszlopdiaigrammok a kiváltott tranziensek amplitúdóit (A, B), időtartamát (C, D) és AUC értékeit (E, F) mutatják a Deiters sejtek nyúlványain (A, C, E) és sejttestjein (B, D, F), a sötétebb színnel jelölt apikális és a világosabb középső kanyarulatokban (átlag $\pm$ s.e.m. és egyedi mérési pontok). Megfigyelhető a fokozatos amplitúdó növekedés a nyúlvány esetében (A), míg csökkenés a sejttest esetében (B). Az időtartam és az AUC értékek mindkét kompartmentben csökkenést mutatnak a fejlődés folyamán. Tonotópikus eltérés volt megfigyelhető az amplitúdók esetében, illetve az időtartam az apikális kanyarulatban hosszabb volt a sejttest esetében. Az UTP által kiváltott hatások hasonlóak az ATP-nél megfigyeltekkel – ugyanakkor kisebb amplitúdók, rövidebb időtartam és kisebb AUC értékek voltak tapasztalhatóak (az ATP tranziensek átlagai jelölve vannak az ábrákon: pirosas háromszögek jelképezik a nyúlványra, kék négyzetek a sejttestre jellemző értékeket, az adatsorok regressziós modellel kerületek elemzésre, ahol a magyarázó változók a kor és a tonotópikus elhelyezkedés voltak illetve az agonista hatás összevetése során az alkalmazott agonista.).

**7. táblázat.** UTP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek két cochleáris kanyarulatban, Deiters sejtek nyúlványain (átlag $\pm$ s.e.m.).

	amplitúdó (dF/F <sub>0</sub> )		válasz időtartam (s)		AUC (dF/F <sub>0</sub> *s)	
	apikális	középső	apikális	középső	apikális	középső
<b>P10-11</b>	0,62 $\pm$ 0,15	0,42 $\pm$ 0,14	38,41 $\pm$ 5,44	37,73 $\pm$ 5,51	29,57 $\pm$ 10,21	17,89 $\pm$ 7,50
<b>P14-15</b>	0,77 $\pm$ 0,28	0,61 $\pm$ 0,20	25,51 $\pm$ 4,42	31,39 $\pm$ 7,45	23,67 $\pm$ 9,47	24,07 $\pm$ 10,27
<b>P17-18</b>	0,95 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,13	18,52 $\pm$ 1,78	13,9 $\pm$ 2,78	12,37 $\pm$ 3,00	8,50 $\pm$ 2,27

**8. táblázat.** UTP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek két cochleáris kanyarulatban, Deiters sejtek sejttestjein (átlag $\pm$ s.e.m.).

	amplitúdó (dF/F <sub>0</sub> )		válasz időtartam (s)		AUC (dF/F <sub>0</sub> *s)	
	apikális	középső	apikális	középső	apikális	középső
<b>P10-11</b>	0,63 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,13	39,41 $\pm$ 3,34	42,9 $\pm$ 12,79	27,81 $\pm$ 7,20	13,93 $\pm$ 8,86
<b>P14-15</b>	0,46 $\pm$ 0,13	0,29 $\pm$ 0,09	35,13 $\pm$ 9,53	22,54 $\pm$ 2,63	18,27 $\pm$ 6,06	6,80 $\pm$ 1,32
<b>P17-18</b>	0,55 $\pm$ 0,08	0,23 $\pm$ 0,06	25,99 $\pm$ 3,10	20,06 $\pm$ 5,06	15,47 $\pm$ 3,01	4,51 $\pm$ 1,77

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszer beállítása és validálása egér hemicochlea preparátumban

#### 6.1.1. Hemicochlea preparátum előnyei

Bár a hemicochlea preparátumban a csiga félbevágásával megnyílnak a cochleáris folyadék kompartmentek, sérülnek a hidrodinamikai és amplifikációs tulajdonságok [157, 168], számos előnnyel rendelkezik, amelyek lehetővé teszik a hallószerv funkcionális és morfológiai vizsgálatát. Egyik ezek közül a megtartott sejtközötti kapcsolatok illetve a hozzáférési lehetőség több kanyarulathoz, ami lehetőséget ad tonotópikus vizsgálatokra. A preparátumban klasszikus keresztmetszeti képben vizsgálható a Corti-szerv, a születést követő három-négy hétben, azaz lehetőség van a már kifejlett, felnőtt-szerű hallószerv vizsgálatára [1].

Cochleáris sejtkultúrák vagy izolált sejtek alkalmasak egyedi sejtek vizsgálatára, ugyanakkor a sejtek mikrokönyezete, az intercelluláris kapcsolatok nem megőrződtek ezen preparátum típusokban [169], így a sejtek között zajló interakciós folyamatok már nem tanulmányozhatók. Az organotipikus preparátumok esetében ez a hátrány nem áll fenn, de a cochleáris explantátum és cochlea szeletpreparátumok fiatal, még nem kifejtett Corti-szervvel rendelkező állatokból készülnek [41, 112, 170, 171]. A falcsont megnyitásával tengerimalacban a folyadékterek megtartása mellett csak az apikális kanyarulatban levő sejtek apikális felszínéhez lehet hozzáférni *in vivo* mérésekben [172, 173].

A hemicochlea preparátum számos más preparátum típus előnyeit egyesíti (8. ábra). A preparátumot először kutatócsoportunk használta funkcionális  $Ca^{2+}$  imaging mérésekre [156], előtte anatómiai, biofizikai paraméterek mérésére alkalmazták csupán [157, 174–176]. Munkánk során tömeges indikátortöltési eljárást alkalmaztunk az indikátor AM formájával, ami a legelterjedtebb töltési módszer  $Ca^{2+}$  imaging kísérletek esetében [112, 169, 177, 178]. A tömeges töltés kényelmes és egyszerű formája az indikátor sejtbe való bevitelének, de a molekulák megragadnak az extracelluláris terekben is, így a háttérfestődés jelentős, ami a jel/zaj arány csökkenését idézi elő. Az

AM-kötött festékek bármely élő sejt számára felvehetőek, vagyis nem lehet velük szelektíven egy sejt  $\text{Ca}^{2+}$  jeleit megfigyelni. A mérések során az összes jelölt sejt válaszolhat egy-egy kiváltó ingerre, a fluoreszcencia szóródása viszont rontja a forrás azonosításának lehetőségét (10. ábra) [172]. Ezen felül a festési eljárás és az azt követő deészterifikálás hosszabb időt vesz igénybe, csökkentve a preparátum kísérletben való részvételének idejét.

Az általunk beállított és validált egy-sejt elektroporációs indikátortöltés lehetőséget ad kiválasztott támasztósejtek önmagában történő vizsgálatára halló egér hemicochlea preparátumában. Ráadásként az elektroporációs metodika gyors és jelentősen jobb jel/zaj arányt biztosít, amelynek köszönhetően nő a kísérleteink térbeli feloldó képessége, a fluoreszcencia intenzitás forrása egyértelműen beazonosítható a háttér és más sejtek minimális jelölődése miatt.

### **6.1.2. Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltés cochleáris támasztósejtekben**

Az egy-sejt elektroporációs indikátortöltést korábban neuronális dendrit tüskék  $\text{Ca}^{2+}$  jeleinek méréséhez használták [159]. Bár korábban megjelent egy módszertani tanulmány, amelyben az egy-sejt elektroporációt igyekeztek átültetni cochleáris sejtekre [171], csak fiatal állatokból készült (P0-7) cochlea szeleteken sikerült alkalmazniuk,  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienseket pedig nem vezettek el, azaz nem igazolták az alkalmazhatóságát. A későbbiekben sem közöltek tanulmányt a módszer használatával.

Az általunk beállított módszer sikerrátája hasonlatos az agyszeletekben leírt neuronok indikátortöltéséhez, a preparátum túlélése kiváló egy sikeres elektroporációs festést követően: szinte az összes sejt válaszképes a töltés utáni 1 órában, amelyre szükségünk volt, hogy kiviteleggük a kísérleteinket. Ebben feltehetően szerepet játszott a művelet gyorsasága. A jel/zaj arány javítása érdekében az indikátor töltésre használt boroszilikát pipettán nem alkalmaztunk nyomást, a megközelítés során sem, így minimálisra szorítottuk a nem kívánt festék szivárgást. A környezetbe kerülő indikátormolekulákat a kísérlet első 10 percében kimosta a perfúzió. A környezetbe kerülő kevés festék sem akadályozta a láthatóságát az olyan szubcelluláris sejtrégióknak, mint a Deiters sejtek phalangeális nyúlványa.

Deiters sejtek szubcelluláris kompartmentjeinek mérésére korábban csak izolált sejtek esetében volt lehetőség [162, 169].

A tömeges töltés előnye, hogy több sejt megtöltődik a preparátumban (10. ábra), így azonos körülmények között vizsgálhatók és összevethetők a különböző sejtípusok vagy vizsgálhatók olyan jelenségek, mint az intercelluláris  $Ca^{2+}$  hullámok. Ugyanakkor egy-sejt elektroporációval is sikeresen tudunk tölteni több sejtet a hemicochleában, bár sokkal nagyobb gyakorlat és ügyesség kell ennek kivitelezéséhez.

Munkánk során sikeresen alkalmaztuk az egy-sejt elektroporációs indikátortöltést Deiters, Hensen és Claudius sejteken (13. ábra), ugyanakkor a pillér sejtek töltődése nem volt megfelelő (11. ábra). A feji, illetve talpi kiszélesedő rész elektroporálása során a festék molekulák nem jutottak át a sejt szárán, így a festődés nem lett homogén az egész sejtben. Érdekes, hogy hasonló problémát nem találtunk a Deiters sejtek phalangeális nyúlványának festődése kapcsán. Itt a sejttest elektroporálásakor a sokkal vékonyabb nyúlványon át is eljutott a festék a *lamina reticularis* részét képező nyúlvány kiszélesedésbe.

Az indikátormolekulák szubcelluláris kompartmentalizációja Deiters sejtek esetében csak nem megfelelő töltésnél, a pipetta mélyebbre szúrásánál jelentkezett, amikor az elérte a sejt közepén haladó mikrotubulus köteget. Ez egy tapasztalt kísérletező számára könnyen felismerhető a megjelenő mikrotubuláris kötegekről (11. ábra).

A támasztósejtek mellett a külső és belső szőrsejtek is elektroporálhatónak bizonyultak (12. ábra).

### **6.1.3. ATP kiváltotta $Ca^{2+}$ válaszok Hensen, Claudius és Deiters sejtekben, beleértve ez utóbbiak phalangeális nyúlványát – szubcelluláris imaging lehetősége**

Az egy-sejt elektroporáció alkalmazhatóságát és megbízhatóságát a sejtek életben maradásának és válaszképességének igazolásával kívántuk alátámasztani. Ehhez a P2 receptor agonista ATP-t választottuk stimulusnak, amellyel kutatócsoportunk korábban foglalkozott és tudtuk, hogy a tömeges-töltési eljárást követően hemicochleában a támasztósejtek válaszolnak ATP-re [156].

Az elektroporált sejtek esetében is sikerült ATP-vel visszatérő és ismételhető [ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> tranziens megfigyelni (13. ábra). A válaszok jel/zaj aránya nagyobb volt, mint a tömeges töltés mellett megfigyelhető válaszoké (10. ábra). Deiters sejtekben, amelyek két, jól elkülöníthető kompartmenttel rendelkeznek, a szelektív egyedi sejt töltés

lehetővé tette a szubcelluláris vizsgálatokat (mind ATP, mind karbakol vagy akár UTP által kiváltott válaszok esetében, 13-22. ábrák).

Az ATP által kiváltott válaszok eltértek karakterisztikájukban a különböző támasztósejtekben: a Hensen sejtek esetében gyakran tapasztalható volt a  $\text{Ca}^{2+}$  válasz kétsúcsúsága (13. ábra). A Claudius sejtek mutatták a leggyorsabb visszatérési időt az ATP stimulust követően, míg a Deiters sejtek nyúlványán voltak mérhetőek a legnagyobb amplitúdójú  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek (13. ábra). Ennek oka lehet, hogy itt található a mért sejtek/kompartmentek közül a legnagyobb denzitásban ATP által aktiválható receptorok, csatornák [40, 104, 107]. Ugyanakkor az alacsonyabb intenzitás alapvonal és a kisebb kompartment is szerepet játszhat a nagy amplitúdó kialakításában [179].

A támasztósejtek további vizsgálatával P2X ionotróp és P2Y metabotróp receptorokat is el lehet különíteni az elektroporációs metodika használatával. Mindkét csoport jelenlétét leírták az újszülött és az idősebb Corti-szervben [156, 180, 181]. A két csoport elkülönítéséhez  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes oldatban váltottuk ki az ATP indukálta  $\text{Ca}^{2+}$  tranzienszt. Ekkor belső raktárak felszabadulása látható, így a P2Y receptorok jelenléte igazolható. A kísérlet önkontrollos elrendezése (14. ábra) lehetővé teszi, hogy a teljes ATP kiváltotta  $\text{Ca}^{2+}$  választ, és a kisebb, csak P2Y részvételével létrejövő  $\text{Ca}^{2+}$  választ ugyanazon a sejten tudjuk összehasonlítani. Így az eredmények variabilitása is csökkenthető. A harmadik stimulus alkalmazása – ismét  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében – megerősíti az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  ATP válaszban játszott szerepét és igazolja, hogy a sejt élet-és válaszképessége a kísérlet végén is megtartott.

$\text{Ca}^{2+}$ -mentes közegben ingerelve a sejteket, mindegyiknél megfigyelhető volt az ATP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens, amelyből a sejteken jelenlévő, funkcionális P2Y receptorokra következtettünk (14. ábra). A tranziensek amplitúdójának csökkenése mutatja, hogy a külső  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás is hozzájárul az ATP válaszhoz, így P2X receptorok jelenléte is bizonyítható. Ezek az eredmények egybevágóak a szakirodalomban leírtakkal [29, 40, 46, 104, 107, 113, 182].



#### **6.1.4. TRPA1 aktiválása nem váltott ki Ca<sup>2+</sup> választ Deiters és Claudius sejtekben, de Hensen sejtekben funkcionálhat ez a csatorna**

TRP csatornák jelenlétét a cochleában anatómiai módszerekkel vizsgálták. A validációs kísérleteink során, funkcionális megközelítést alkalmaztunk: TRPA1 agonista AITC-t és TRPV1 agonista kapszaicint adtunk a perfúzióhoz.

TRPA1 csatornák expresszióját korábban kimutatták a támasztósejteken, főleg Hensen sejtek mutattak immunpozitívnak a tanulmányokban [123, 127, 128], de Deiters sejtek, Claudius sejtek és pillér sejtek is jelölődtek [128]. A TRPA1 promóter megjelölésével a TRPA1 csatorna jelenlétét újszülött támasztósejteken cochleáris explant preparátumban is bizonyították, míg idősebb állatok preparátumán csak SGN rostok jelölődtek [128, 183]. Kísérleteink ez utóbbi álláspontot igazolják. Az agonista AITC-vel, az irodalomban a TRPA1 receptor aktiválására alkalmas több koncentrációban sem tudtunk Ca<sup>2+</sup> tranzienseket kiváltani a sejtekben. Egyetlen, Hensen sejtben kialakuló, kis amplitúdójú Ca<sup>2+</sup> választ sikerült megfigyelni a 400 µM adagolása mellett, amely azonban nem jelentkezett a nagyobb koncentrációnál (15. ábra).

#### **6.1.5. TRPA1 agonista elmozdulást okozott a Corti-szervben**

A Ca<sup>2+</sup> tranziensek elmaradása mellett azonban egy dózis-függő, fókuszsíkból való Corti-szerv elmozdulást tapasztaltunk AITC adagolása során. Ezt feltehetően AITC kiváltotta sejtkontrakció okozta, melyet TRPA1 aktiválódása során feltételeztek szőrsejtek, Deiters sejtek és pillér sejtek esetében is P0-7-es preparátumban [127, 128]. Ez a kontrakció nem volt megfigyelhető *Trpa1* <sup>-/-</sup> genotípusú egerekben, amely ezen csatornák szerepét hangsúlyozza. A munkánk során nem tapasztaltuk a vizsgált Deiters sejtek direkt kontrakcióját. A többi immunpozitív sejtet pedig nem akartuk (OHC) vagy nem tudtuk (PC) vizsgálni, így a TRPA1 csatornák jelenlétét a Corti-szervben nem tudjuk kizárni.

Szintén ezen csatornák jelenlétére utalhat a Claudius sejteken tapasztalható második, AITC stimulációk után adott ATP válasz amplitúdójának csökkenése (15. ábra), amely magyarázható a koexpresszálódó TRPA1-P2X receptorok keresztinhibíciójával is [184].

### **6.1.6. TRPV1 agonista kapszaicinnek nem volt hatása a vizsgált támasztósejtek intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szintjére**

TRPV1 csatornák jelenlétére a belső fülben szintén anatómiai munkákból következtettünk. TRPV1 expresszióról korábban kiderült, hogy faj és korfüggő mintázatot mutat a cochleáris epitheliumban. Az egér hallószervben RNS szintje először emelkedik az E18 – P8 periódusban (hasonlóan a TRPA1 csatornához) [129]. Ugyanakkor más munkák pont ebben az időszakban nem találtak TRPV1 RNS-t [185]. A TRPV1 fehérjét immunjelöléssel sikerült kimutatni tengerimalac és patkány támasztósejtjein, főleg Hensen sejten, külső és belső pillér sejten [124, 130].

Kísérleteink során választ nem kaptunk kapszaicin adagolásra, ami a >P14 korú egerekben a TRPV1 csatorna hiányára utal Deiters, Hensen és Claudius sejteken (16. ábra).

A Ca<sup>2+</sup> válasz hiányán túl, a TRPA1 csatorna ingerlésekor fellépő fókuszszíkból való kitérést sem tapasztaltuk.

Ezek alapján kísérleteink nem tudják megerősíteni a TRPV1 csatornák támasztósejteken lévő funkcionális expresszióját.

### **6.1.7. ACh receptor aktiváció Deiters és Hensen sejteken is Ca<sup>2+</sup> tranzienszt idéző**

Kolinerg efferensek innerválják a motilis külső szőrsejteket, negatívan szabályozva a cochleáris amplifikációt [131, 132]. Deiters és Hensen sejtekhez efferens kollaterálisok futnak anatómiai pályajelölések alapján [33, 119, 134]. Ennek megerősítésére már történtek funkcionális vizsgálatok is: izolált Deiters sejteken sikerült kiváltani ACh indukált áramokat, és feltételezések szerint  $\alpha 9$ -alegységet tartalmazó nikotinos ACh csatorna lehet felelős ezekért a jelekért [136]. Az  $\alpha 9$ -es mellett az  $\alpha 10$ -es alegység is részt vehet a csatorna alkotásban. Hasonló összetételű, nagy Ca<sup>2+</sup> permeabilitású receptort írtak le a szőrsejteken is [136, 138, 186].

Hensen sejtek beidegzéséről csak anatómiai megfigyeléseink vannak.

Széles spektrumú ACh receptor agonistát, karbakolt, használtunk a kísérleteinkben, amely agonista hatása a  $\alpha 9$ -alegységen is [187]. A reagáló Deiters sejtek aránya (~33 %), hasonló volt a Matsunobu és munkatársai által izolált Deiters sejteken tapasztalt arányhoz [136]. Amplitúdóban hasonlóak voltak az ATP indukálta válaszokhoz (18.

ábra). A Hensen sejtek 20 %-án sikerült kiváltanunk karbakollal  $\text{Ca}^{2+}$  tranziens, amelynek amplitúdója kisebb volt, mint az ATP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensé. Ez valószínűsíti a Hensen sejtek és megerősíti a Deiters sejtek kolinerg beidegzését is a hallás optimummal rendelkező állatok cochleában.

## **6.2. A morfológia és a purinerg szignalizáció fejlődése az apikális és középső cochleáris kanyarulat Deiters sejtjeiben**

### **6.2.1. A Deiters sejtek postnatális morfológiai fejlődése a hallás kifejlődésének kritikus időszakában**

Az egérfélék hallószerve születéskor fejletlen és az újszülött egerek süketek [11]. Számos tanulmány mutatott ki fontos strukturális és funkcionális változást az egér cochleában, amely megközelítőleg a születés utáni harmadik hét végére tekinthető teljesen kifejlettnek [1, 2].

A hemicochlea preparátumot ferde megvilágításban már korábban is alkalmazták morfológiai paraméterek mérésére, hiszen keresztmetszetben jó rálátást ad a Cortiszervre, ráadásul 3 kanyarulathoz enged hozzáférést, ezzel a tonotópikus eltérések is jól megfigyelhetők [11, 157, 161, 188, 189]. Azonban az ferde megvilágításban nem látszik a Deiters sejtek phalangeális nyúlványa, a külső szőrsejtek takarása miatt, így ennek a szubcelluláris régióknak a fejlődése felderítetlen maradt eddig. Ugyanakkor kutatások szerint ez a kompartment fontos szerepet játszhat a cochleáris mikromechanikában [190, 191]. Az egy-sejt elektroporációval töltött, fluoreszcens képen tanulmányozhatóvá váltak a fejlődő Deiters sejtek nyúlványa is (19. ábra).

A Deiters sejtek sejtteste az első hallásoptimum megjelenésének idejében (~ P14) [1] elérte a felnőtt méretet és a kezdetben meglévő tonotópikus eltérések elmosódtak a fejlődés folyamán (19. ábra). Ez hasonló a mongol futóegerekben tapasztaltakhoz, ahol a Deiters sejtek az apikális-középső, -felsőközépső kanyarulatokban nagyon hasonló magasságúak [11]. Az általunk mért felnőtt sejtmagasság ( $45,96 \pm 1,04 \mu\text{m}$  az apikális kanyarulatban), nagyobb mint azt más egértörzsekben, például 129/SvEv-ben, mértek ( $33,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ) [161]. Ugyanakkor pont ez a tanulmány foglalkozik az egértörzsek között tapasztalható belső fül morfológiai eltéréseivel, összevetve számos törzset, amelyben az általunk alkalmazott BALB/c nincsen benne [161].

A phalangeális nyúlvány a vizsgált periódusban alig mutatott hosszváltozást, ugyanakkor tonotópicusan az apikális kanyarulatban hosszabb nyúlványokkal találkozhatunk, mint a középső kanyarulatban. Ez a vártaknak megfelelően alakult, hiszen tudjuk, hogy a szőrsejtek magassága is változik a csiga tengelye mentén. A nyúlványok a szőrsejtek apikális felszínével együtt alkotják a *lamina reticularis*-t, így a hosszuknak korrelálnia kell a szőrsejtek hosszával. A szőrsejteknek azonban hosszabbnak kell lenniük, mivel általánosságban 2-3 sejsorral apikálisabban és kissé laterálisan végződnek a kiindulási pontjukhoz képest [190, 192]. A szőrsejtek a középső és apikális kanyarulat között ~1,2-szeresükre nyúlnak [161]. Méréseink alapján a kifejlett hallószervben (>P20) ez a középső-apikális kanyarulatbeli növekedés a Deiters sejtek nyúlványa esetében ~1,5-szörös volt. Ez lehet BALB/c törzsbeli sajátosság.

Korábban, egy mongol ugróegerekkel végzett tanulmányban, a külső szőrsejtek születéskor majdnem ugyanolyan méretűek voltak, mint a felnőtt állatokban [11]. A Nuel-féle tér a szőrsejtek és a Deiters sejtek nyúlványai között a P6-10-es korban nyílik meg, megelőzve a Corti-alagutat. Ahogy a nyúlványok vastagsága csökken, úgy jelenik meg ez az intercelluláris tér [12, 23, 193]. Az általunk megfigyelt nyúlvány karcsúsodási folyamat a P17-18-as időpontig tartott.

### **6.2.2. A spontán $Ca^{2+}$ aktivitás a phalangeális nyúlványon és a sejttesten is csökken a kor előrehaladtával**

A spontán  $Ca^{2+}$  aktivitás és a fiatalkori intercellulárisan terjedő  $Ca^{2+}$  hullámok a Corti-szervben jól leírt folyamatok [8, 25–28, 41, 194]. A feltételezések szerint a  $Ca^{2+}$  jeleket a támasztósejtekből connexin/pannexin félcsatornákon keresztül felszabaduló ATP váltja ki, parakrin módon a közelben elhelyezkedő purinerg receptorok aktiválása révén. Szerepük feltehetően a szőrsejt-SGN szinapszis éréseben, megerősítésében, a gyenge szinapszisok eltávolításában van [24, 26, 66, 194–200].

A legtöbb tanulmány a purinerg jelátvitel közvetítette  $Ca^{2+}$  jelekkel kapcsolatban, a Kölliker-féle szerv magas, oszlopszerű támasztósejtjeinek működését írja le és megközelítőleg az első postnatális hét eseményeit elemzi. A Kölliker-féle szervről a  $Ca^{2+}$  hullám átterjedhet a pillér sejteken át a Deiters sejtek területére [33, 112, 142, 194]. Az organotipikus cochleáris explantokon végzett kutatások a  $Ca^{2+}$  hullámok terjedését felülnézetben, az endolymphatikus felszín felől tudják leírni. Egyszerű  $Ca^{2+}$

imaginggel a sejtek mélyebb rétegei nem láthatóak. Ugyanakkor a hemicochleában teljes keresztmetszeti képet kapunk a Corti-szervről, ezzel minden sejtípus teljes egészében látható, a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitel nyomon követhető.

Egy-sejt elektroporációval sikerült kimutatnunk, hogy a Deiters sejtek phalangeális nyúlványa magasabb spontán  $\text{Ca}^{2+}$  aktivitást mutat, mint a mélyebb réteget alkotó sejttest. Ezt a magasabb aktivitási frekvenciát magyarázhatja az endolymphatikus felszínen elhelyezkedő nagymennyiségű félcsatorna [201]. Így a helyben felszabaduló ATP hamarabb elérheti ezen a területen a receptoraktivációhoz szükséges koncentrációt. E mellett az endolymphatikus felszínen sűrűbben helyezkednek el a purinerg receptorok is [100, 113, 162, 163, 202]. Izolált sejtekben (szőrsejtek, Hensen és Deiters esetében) is kimutatták, hogy az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint emelkedés az apikális felszínükön kezdődik és úgy halad tovább a bazális pólus felé [107, 162, 163, 169]. Ugyanakkor ezt néhány esetben csak a drog adagolásából származó műterméknek vélték [162].

A spontán jelek frekvenciája az apikális kanyarulatban, más tanulmányokhoz hasonlóan, P10 körül érte el a maximumát [8, 27, 203]. Ugyanakkor sokkal kisebb frekvenciát figyeltünk meg, mint más kutatók [194].

A korfüggő spontán aktivitás csökkenés feltehetően egyes purinerg receptorok tranziens jelenléte miatt van. Így több típusról kimutatták, hogy a P10-es érési időszakban jelen van (pl.: P2X1, P2X2/3), majd fokozatosan eltűnik a Corti-szervből. Olyan receptorokról is tudunk, amelyeknek csak a mennyisége csökken az életkor előre haladtával, de nem szűnik meg az expressziójuk teljesen [29, 91, 92, 106, 202, 204].

A receptor mintázat expressziós profiljának változásán túl a félcsatornák expressziója is változhat a kor előrehaladtával, amelynek hasonló következményei lehetnek [66].

Az apikális kanyarulatban észlelt P10-11-es magas aktivitás kiemelkedően fontos időszak a külső szőrsejt fejlődése szempontjából. Ekkor kezd expresszálni a prestin motor protein [17, 205]. A szinapszis érés és tisztítás is erre az időszakra tehető a külső szőrsejtek esetében is [24, 196]. Ugyanakkor érdekes, hogy ez a kiemelkedő periódus nincs jelen a középső kanyarulatban. Ez annak tudható be, hogy a cochleában a Corti-szerv érése bazo-apikális gradienst mutat, így elképzelhető, hogy a vizsgált időszakot megelőzően találhattunk volna növekedett spontán jel aktivitást [11, 206]. Ugyanakkor egy nemrég megjelent tanulmány a külső szőrsejtek aktivitási maximumát P0-ra teszi, és a spontán jelek teljes lecsengését jósolja a P7-es napra [29].

### **6.2.3. ATP indukálta $\text{Ca}^{2+}$ tranziensek alakja függ a fejlődési stádiumtól**

A purinerg receptor expresszió a cochleában erősen korfüggő folyamat. A receptor sűrűség a postnatális első hétben emelkedik a Deiters sejteken, majd P11-12 körül csökkenni kezd [94, 103, 106, 107, 109, 111, 207, 208]. Ez a receptor mintázat szépen magyarázza az általunk is megfigyelt változásokat az amplitúdóban, a válasz időtartamban és AUC értékekben, amelyeket ATP adásakor tapasztaltunk a különböző életkorokban.

Először emelkedést tapasztaltunk a paraméterekben P5-7-től P10-11-ig, ahol tetőztek ezek az értékek, majd egy lassabb csökkenő periódus következett az utolsó mért időszakig.

A nyúlvány amplitúdója lassan növekedett, amely növekedés összefüggésben volt a sejtek tonotópikus helyzetével. Ez egyenlőtlen purinerg receptor eloszlásra utalhat a cochleán belül. A növekedés oka lehet, az anatómiai változás is: ahogyan a nyúlvány térfogata folyamatos csökkenést mutatott, úgy a  $dF/F_0$  értékek számítása során az amplitúdóérték növekedését idézte elő.

A válasz időtartama és AUC értéke mindkét kompartmentben hasonlóan csökkenő tendenciát mutatott. Ezek oka a  $\text{Ca}^{2+}$  pufferelő és eltávolító mechanizmusok egységesebb voltában kereshető, amelyeket eddig csak szőrsejtekben vizsgáltak [209].

### **6.2.4. P2X és P2Y receptorok együttesen vesznek részt a fejlődésben, tonotópia függően**

Az ATP endogén agonistája a P2X és a P2Y receptoroknak is, amelyekből több altípus expresszióját is megfigyelték Deiters sejteken [96, 98, 106, 113]. Hogy tanulmányozhassuk a P2Y receptorok szerepét, a fejlődés kritikus időszakában UTP-t, P2Y agonistát adtunk a perfúzióba.

A UTP által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensek hasonlóan kor-függők voltak, mint az ATP által kiváltottak. Az amplitúdó, időtartam és AUC tekintetében ugyanakkor kisebb értékeket vettek fel. Ezek alapján feltételezhető, hogy mindkét receptor altípus szerepet játszik az ATP kiváltotta  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelben a fejlődő Deiters sejtek esetében. Ez független a sejt kanyarulatbeli helyzetétől.

Ugyanakkor a statisztikai értékelés ellenére felmerülhet, hogy a két kanyarulat P2X és P2Y profilja különbözik. Az ATP kiváltotta válaszok nagyobbak a középső

kanyarulatban, míg az UTP kiváltotta válaszok amplitúdója az apikális kanyarban nagyobb. A két agonista által kiváltott tranziensek paraméterértékei hasonlóbbak az apikális kanyarulatban, amely P2Y receptorok itt előforduló nagyobb arányával magyarázható.

Munkánk során sikerült egy olyan megbízhatóan működő egy-sejt elektroporációs indikátortöltési módszert beállítanunk, amelynek segítségével hemicochlea preparátumban nagy tér- és időbeli feloldással vizsgálhatjuk a Corti-szerv támasztósejtjeink intracelluláris  $Ca^{2+}$  változásait halló és még kifejetlen hallású egerekben is. A módszerrel ezidáig nem vizsgálható szubcelluláris részletek váltak tanulmányozhatóvá. Kísérleteink során, hasonló körülmények között (fejlettségi szint, tonotópikus megközelítés) eddig nem kutatott jelátviteli rendszereket tudtunk vizsgálni. Eredményeink számos új megfigyeléssel járulnak hozzá a hallás élettanának sejtszintű megismeréséhez, mind a fejlődő, mind a kifejettnek tekinthető támasztósejtekkel kapcsolatban.

## 7. Következtetések

A szenzorineurális halláskárosodásokra jelenleg nem áll rendelkezésre megfelelő gyógyszeres terápia, holott prevalenciájuk, az öregedő társadalmak, a zajosabb városi életvitel és a szórakozási szokások változása miatt folyamatosan növekszik. A gyógyszeres terápia kifejlesztésének feltétele a hallás ill. a halláskárosodások többségéért felelős hallószerv a csiga (pato)fiziológiai működésének, fejlődésének az ismerete. A kutatásainkhoz használt hemicochlea preparátum a sejtközötti kapcsolatok megtartása mellett, három tonotópikus tartományhoz biztosít hozzáférést. További előnye, hogy a hallásoptimum megjelenését követő időszakban is elkészíthető, érettebb szerv tanulmányozható.

A hemicochlea preparátumot korábban morfológiai és mechanikai paraméterek mérésére alkalmazták és kutatócsoportunk volt az első, amely funkcionális imaging vizsgálatokat végzett vele. A tömeges indikátortöltési módszer továbbfejlesztésével szerettünk volna egy nagy térbeli felbontásra, kiváló jel/zaj arányra képes indikátortöltési módszert beállítani további vizsgálatainkhoz.

*Kifejlesztettünk egy, a hemicochlea preparátumban alkalmazható, a Corti-féle szerv támasztósejtjeinek nagy térbeli felbontású funkcionális  $Ca^{2+}$  imaging vizsgálatát lehetővé tevő, egy-sejt elektroporációs indikátortöltési eljárást:*

1. Egy-sejt elektroporációs festés mellett jó jel/zaj arányú funkcionális  $Ca^{2+}$  imaging méréseket végeztünk hemicochlea preparátumban, 3 tonotópikusan elkülönülő hely támasztósejtjein.
2. A célzott egy-sejt töltés miatt a háttér minimálisan jelölődik, a fluoreszcencia változás forrása egyértelműen azonosítható. A térbeli felbontás kiváló.
3. A jó jel/zaj aránynak köszönhetően a kisebb intracelluláris  $Ca^{2+}$  változások is mérhetőek.
4. A Corti-féle szerv 3 támasztósejt típusán megbízhatóan alkalmazható. Ugyanakkor a szőrsejtek is jól viselik az elektroporációs töltést, ami lehetőséget ad, későbbi, receptor sejteket érintő tanulmányok kivitelezésére is.



A támasztósejtek közül az egyik legjellegzetesebb a külső szőrsejteket támasztó, hosszú nyúlvánnyal rendelkező Deiters sejt. Az említett phalangeális nyúlvány a szőrsejtek között felnyúlva, tömeges töltés esetében azok által takartan, éri el a receptor sejtek apikális felszínét. 4 érzéksejtet kapcsol össze. Szerkezetében dominálnak a citoskeletális elemek, amely az alapját képezheti a cochleáris amplifikációs mechanizmusban betöltött szerepének. Ugyanakkor a szoros sejtkapcsolat és a szőrsejtek „árnyékoló” jelenléte miatt eddig nem volt vizsgálható természetes környezetében.

A hallószerv fejlődési-érési folyamataiban kiemelt jelentőségű a purinerg jelátvitel, amelynek receptor expressziós mintázata változáson megy át az érés folyamán. A Deiters sejtek is expresszálják P2X és P2Y receptorait, azonban ezeknek sem a pontos szubcelluláris elhelyezkedése, sem a szervfejlődés folyamán bekövetkező változása nem volt ismert.

*Beállított módszerünkkel új szubcelluláris régiója vált vizsgálhatóvá a Deiters sejteknek. A purinerg szignalizáció és a morfológia változása követhető a sejttest és a nyúlvány részben, a hallás érése szempontjából kritikus postnatális periódusban:*

5. Egy-sejt elektroporációval külön nyomon tudtuk követni a sejttest és a phalangeális nyúlvány  $Ca^{2+}$  jeleit az apikális és a középső cochleáris kanyarulatban a hallás fejlődése során (P5-25).

- A fejlődés során megfigyelhető spontán  $Ca^{2+}$  tranziensek száma fokozatos csökkenést mutat a két kompartmentben, mindkét vizsgált kanyarulat esetében.

- Az ATP által kiváltott  $Ca^{2+}$  tranziensek több paramétere is kor-függően változik, így az idővel csökken a válasz időtartama, mindkét kanyarulaton, illetve a sejttest görbe alatti területe. Nem változik jelentősen a kor előrehaladtával a nyúlvány görbealatti területe, de növekszik annak amplitúdója.

- P2Y agonista UTP kiváltotta tranziensek a P10-18-as periódusban, az ATP-vel kiváltottakhoz hasonlóan változnak, de a tranziens paraméterekben alatta maradnak. Kisebb a különbség a két agonista által kiváltott tranziensek értékeiben az apikális kanyarulat esetében, amiből az itt előforduló P2Y dominanciára következtetünk.

6. Az egy-sejt elektroporáció során láthatóvá váló szubcelluláris kompartmentumok morfológiai fejlődését, érését is meg tudtuk figyelni.

- A sejtest hosszbeli növekedése megáll a P14-15-ös időszakra, tonotópikus eltéréseket nem mutat. A szélességében viszont a tonotópikus helyzet a meghatározó és lényegi változáson nem megy át a vizsgált időszakban.

- A nyúlvány hossza a P17-18-es periódusra éri el végleges szélességét, míg hosszában folyamatos emelkedés figyelhető meg. A nyúlvány morfológiai paramétereit nagymértékben meghatározza a sejt tonotópikus helyzete.

## 8. Összefoglalás

A szenzorneurális halláskárosodásokra, növekvő prevalenciájuk ellenére, nincs hatékony gyógyszeres terápia. Ennek oka a kifejlett hallószerv felderítetlen (kór)élettana, ami az azt burkoló csontos cochlea anatómiai felépítésére, nehéz kísérleti megközelíthetőségére vezethető vissza.

Az általunk alkalmazott hemicochlea preparátummal a 25. napig tudjuk vizsgálni a szervet. Eddigre véglegesen kifejlődik a süketen születő egérfélékben is. A preparátum alkalmas a magas (bazálisan)- és a mély (apikálisan elhelyezkedő) frekvenciatartományokra érzékeny Corti-szerv tartományok (tonotópikus szervezettség) vizsgálatára, az intercelluláris kapcsolatok megtartása mellett.

A kifejlett támasztósejtek élettanát, tonotópikus különbségeit nem vizsgálták, bár aktívan is részt vesznek a hallás folyamataiban. A purinerg rendszer talán a legfontosabb az érzékszervek intercelluláris, parakrin szignalizációs mechanizmusaiiban. A hallás érési-fejlődési folyamataiban, a szerv érzékenységének beállításában szerepet játszanak ionotróp P2X és metabotróp P2Y receptorai.

A szerv támasztósejtjein vizsgáltuk a purinerg  $Ca^{2+}$  szignalizációs mechanizmusokat az általunk beállított egy-sejt elektroporációs  $Ca^{2+}$ -indikátortöltési módszerrel. A Deiters, Hensen és Claudius támasztósejteket jelöltünk >P14 egér (hallásoptimum megjelenése) hallószervben, több tonotópikus pozícióban. A validálás során visszatérő és ismételhető  $Ca^{2+}$  tranzienseket mértünk purinerg agonista hatására, amik  $Ca^{2+}$ -mentes oldatban csökkentek, jelezve P2X és P2Y receptorok együttes jelenlétét. A TRP agonistákkal nem tapasztaltunk  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést, míg a beidegzett sejtípusok részben reagáltak nAChR agonistára. Az egy-sejt elektroporáció szelektív jelölése vizsgálhatóvá tette a Deiters sejtek nyúlványát, így, egyedülállóan, szubcelluláris funkcionális imaging vizsgálatokat is végeztünk. A P7-25-ban, apikális és középső kanyarulatban foglalkoztunk a morfológiai fejlődéssel és az ATP-re, P2Y receptor szelektív UTP-re adott  $Ca^{2+}$  tranziensekkel. A morfológiai érés a P14-15 után nem mutatott változást, de a tonotópia végig jellemző. A  $Ca^{2+}$  jelek paraméterei kor- és tonotópia függően alakultak. P2Y dominancia figyelhető meg az apikális kanyarulat sejtjei.

Vizsgálataink az egy-sejt elektroporációs módszer beállításával és alkalmazásával a támasztósejteken postnatálisan megvalósuló P2X és P2Y receptorok összehangolt működését, fejlődésbeli varianciáját bizonyítják.

## 9. Summary

Despite their increasing prevalence, there is no effective drug therapy for sensorineural hearing loss. The main reason for this is the unrevealed (patho-) physiology of the adult auditory organ, which is due to the complicated anatomical structure and difficult accessibility of the cochlea.

The hemicochlea used in our research allows us to examine the organ until 25 days after birth. For this time it reaches its final stage of development in mice (deaf at birth). The preparation is suitable for the examination of locations specialized in the high (basal) and low (apical) frequency ranges (tonotopic organization), while maintaining intercellular connections.

The physiology and tonotopic differences of adult supporting cells have not been studied, although they are actively involved in the auditory processes. The purinergic system is perhaps the most important in the intercellular, paracrine signaling mechanisms of the senses. Ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors play a role in the maturation-developmental processes of hearing and in the regulation of organ sensitivity.

Purinergic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling mechanisms were investigated on supporting cells using the single-cell electroporation  $\text{Ca}^{2+}$  indicator loading method. Deiters', Hensen's, and Claudius' cells were dyed in >P14 mouse (onset of hearing optimum: P14) at multiple tonotopic positions. During validation, reversible and repeatable ATP induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients were measured, which decreased in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution, indicating the coexpression of P2X and P2Y receptors. TRP agonists did not induce increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , but innervated cells partially responded to the nAChR agonist. Selective dyeing of single-cell electroporation made it possible to examine the process of Deiters cells and, uniquely, subcellular measurements were performed in P7-25, in apical and middle turns. We examined morphological development and  $\text{Ca}^{2+}$  transients induced by ATP and P2Y receptor selective UTP. Morphological maturation did no change after P14-15, but tonotopy was characteristic throughout. The parameters of the transients were age- and tonotopy-dependent. P2Y dominance was observed in apical cells.

We set up and used a single-cell electroporation method for demonstrate the coordinated function and developmental variation of P2X and P2Y receptors in supporting cells during and after the development of hearing onset.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Ehret G. (1976) Development of Absolute Auditory Thresholds in the House Mouse (*Mus musculus*). *J Am Audiol Soc*, 1: 179–184.
2. Kraus HJ, Aulbach-Kraus K. (1981) Morphological changes in the cochlea of the mouse after the onset of hearing. *Hear Res*, 4: 89–102.
3. Nowak R, Zelck U, Rathsack R, Oehme P, Scholtz HJ, Koitschev A, Beleites B. (1990) Postnatal development of substance P in the inner ear of the guinea pig. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*, 247: 147–148.
4. Kopecky B, Johnson S, Schmitz H, Santi P, Fritzsche B. (2012) Scanning Thin-Sheet Laser IMaging Microscopy Elucidates Details on Mouse Ear Development. *Dev Dyn*, 241: 465–480.
5. Iizuka-Kogo A. (2018) Spatiotemporal coordination of cellular differentiation and tissue morphogenesis in organ of Corti development. *Med Mol Morphol*, : 1–17. doi:10.1007/s00795-018-0185-z.
6. McKenzie E, Krupin A, Kelley MW. (2004) Cellular Growth and Rearrangement during the Development of the Mammalian Organ of Corti. *Dev Dyn*, 229: 802–812.
7. Fekete DM, Wu DK. (2002) Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol*, 12: 35–42.
8. Dayaratne MWN, Vlajkovic SM, Lipski J, Thorne PR. (2014) Kölliker’s Organ and the Development of Spontaneous Activity in the Auditory System: Implications for Hearing Dysfunction. *Biomed Res Int*, 2014: 1–8. doi:10.1155/2014/367939.
9. Lelli A, Asai Y, Forge A, Holt JR, Geleoc GSG. (2009) Tonotopic Gradient in the Developmental Acquisition of Sensory Transduction in Outer Hair Cells of the Mouse Cochlea. *J Neurophysiol*, 101: 2961–2973. doi:10.1152/jn.00136.2009.
10. Berekméri E, Szepesy J, Köles L, Zelles T. (2019) Purinergic signaling in the organ of Corti: Potential therapeutic targets of sensorineural hearing losses. *Brain Res Bull*, August 2018: 1–10. doi:10.1016/j.brainresbull.2019.01.029.
11. Richter C-P, Edge R, He DZZ, Dallos P. (2000) Development of the Gerbil Inner

- Ear Observed in the Hemicochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 1: 195–210. doi:10.1007/s101620010019.
12. Walters BJ, Zuo J. (2013) Postnatal development, maturation and aging in the mouse cochlea and their effects on hair cell regeneration. *Hear Res*, 297: 68–83. doi:10.1016/j.heares.2012.11.009.
  13. Bowl MR, Dawson SJ. (2015) The mouse as a model for age-related hearing loss - A mini-review. *Gerontology*, 61: 149–157.
  14. Nayak GD, Ratnayaka HSK, Goodyear RJ, Richardson GP. (2007) Development of the hair bundle and mechanotransduction. *Int J Dev Biol*, 51: 597–608. doi:10.1387/ijdb.072392gn.
  15. Ospeck M, Dong X, Fang J, Iwasa KH. (2006) Electromotility in outer hair cells: a supporting role for fast potassium conductance. *J Oto-Rhino-Laryngology Its Relat Spec*, 68: 373–377.
  16. Abe T, Kakehata S, Kitani R, Maruya SI, Navaratnam D, Santos-Sacchi J, Shinkawa H. (2007) Developmental expression of the outer hair cell motor prestin in the mouse. *J Membr Biol*, 215: 49–56.
  17. Xia A, Song Y, Wang R, Gao SS, Clifton W, Raphael P, Chao S II, Pereira FA, Groves AK, Oghalai JS. (2013) Prestin regulation and function in residual outer hair cells after noise-induced hearing loss. *PLoS One*, 8: e82602.
  18. Liberman MC, Gao J, He DZZ, Wu X, Jia S, Zuo J. (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*, 419: 300–304. doi:10.1038/nature01059.
  19. Fuchs PA, Glowatzki E. (2015) Synaptic studies inform the functional diversity of cochlear afferents. *Hear Res*, 330: 18–25. doi:10.1016/j.heares.2015.09.007.
  20. Monzack EL, Cunningham LL. (2013) Lead roles for supporting actors: critical functions of inner ear supporting cells. *Hear Res*, 303: 20–29. doi:10.1016/j.heares.2013.01.008.
  21. Mellado Lagarde MM, Cox BC, Fang J, Taylor R, Forge A, Zuo J, Lagarde MMM, Cox BC, Fang J, Taylor R, Forge A, Mellado Lagarde MM, Cox BC, Fang J, Taylor R, Forge A, Zuo J. (2013) Selective Ablation of Pillar and Deiters' Cells Severely Affects Cochlear Postnatal Development and Hearing in Mice. *J Neurosci*, 33: 1564–1576. doi:10.1523/JNEUROSCI.3088-12.2013.
  22. Simmons DD, Mansdorf NB, Kim JH. (1996) Olivocochlear innervation of inner

- and outer hair cells during postnatal maturation: Evidence for a waiting period. *J Comp Neurol*, 370: 551–562.
23. Kikuchi K, Hilding D. (1965) The Development of the Organ of Corti in the Mouse. *Acta Otolaryngol*, 60: 207–221. doi:10.3109/00016486509127003.
  24. Greenwood D, Jagger DJ, Huang L-CL-C, Hoya N, Thorne PR, Wildman SS, King BF, Pak K, Ryan AF, Housley GD. (2007) P2X receptor signaling inhibits BDNF-mediated spiral ganglion neuron development in the neonatal rat cochlea. *Development*, 134: 1407–1417. doi:10.1242/dev.002279.
  25. Dayaratne MWN, Vlajkovic SM, Lipski J, Thorne PR. (2015) Putative role of border cells in generating spontaneous morphological activity within Kölliker's organ. *Hear Res*, 330: 90–97. doi:10.1016/j.heares.2015.06.017.
  26. Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE. (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature*, 450: 50–55. doi:10.1038/nature06233.
  27. Tritsch NX, Bergles DE. (2010) Developmental Regulation of Spontaneous Activity in the Mammalian Cochlea. *J Neurosci*, 30: 1539–1550. doi:10.1523/JNEUROSCI.3875-09.2010.
  28. Tritsch NX, Zhang Y-X, Ellis-Davies G, Bergles DE. (2010) ATP-induced morphological changes in supporting cells of the developing cochlea. *Purinergic Signal*, 6: 155–166. doi:10.1007/s11302-010-9189-4.
  29. Ceriani F, Hendry A, Jeng J-Y, Johnson SL, Stephani F, Olt J, Holley MC, Mammano F, Engel J, Kros CJ, Simmons DD, Marcotti W. (2019) Coordinated calcium signalling in cochlear sensory and non-sensory cells refines afferent innervation of outer hair cells. *EMBO J*, 38: e99839. doi:10.15252/embj.201899839.
  30. Guinan JJ. (2017) Olivocochlear efferents: Their action, effects, measurement and uses, and the impact of the new conception of cochlear mechanical responses. *Hear Res*, 362: 38–47. doi:10.1016/j.heares.2017.12.012.
  31. Froud KE, Wong ACY, Cederholm JME, Klugmann M, Sandow SL, Julien JP, Ryan AF, Housley GD. (2015) Type II spiral ganglion afferent neurons drive medial olivocochlear reflex suppression of the cochlear amplifier. *Nat Commun*, 6 November: 1–9. doi:10.1038/ncomms8115.
  32. Liu C, Glowatzki E, Fuchs PA. (2015) Unmyelinated type II afferent neurons

- report cochlear damage. PNAS, 112: 14723–14727. doi:10.1073/pnas.1515228112.
33. Bruce LL, Kingsley J, Nichols DH, Fritzsche B. (1997) The development of vestibulocochlear efferents and cochlear efferents in mice. *Int J Dev Neurosci*, 15: 671–692.
  34. Wangemann P. (2002) K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*, 165: 1–9.
  35. Zdebik AA, Wangemann P, Jentsch TJ. (2009) Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda)*, 24: 307–316. doi:10.1152/physiol.00018.2009.
  36. Wangemann P. (2006) Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol*, 576 Pt 1: 11–21. doi:10.1113/jphysiol.2006.112888.
  37. Housley GD, Jagger DJ, Greenwood D, Raybould NP, Salih SG, Järlebark LE, Vlajkovic SM, Kanjhan R, Nikolic P, Muñoz DJMM, Thorne PR. (2002) Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission. *Audiol Neuro-Otology*, 7: 55–61. doi:10.1159/000046865.
  38. Abrashkin KA, Izumikawa M, Miyazawa T, Wang CH, Crumling MA, Swiderski DL, Beyer LA, Gong TWL, Raphael Y. (2006) The fate of outer hair cells after acoustic or ototoxic insults. *Hear Res*, 218: 20–29.
  39. Bird JE, Daudet N, Warchol ME, Gale JE. (2010) Supporting cells eliminate dying sensory hair cells to maintain epithelial integrity in the avian inner ear. *J Neurosci*, 30: 12545–12556. doi:10.1523/JNEUROSCI.3042-10.2010.
  40. Lahne M, Gale JE. (2008) Damage-induced activation of ERK1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium. *J Neurosci*, 28: 4918–4928. doi:10.1523/JNEUROSCI.4914-07.2008.
  41. Lahne M, Gale JE. (2010) Damage-induced cell-cell communication in different cochlear cell types via two distinct ATP-dependent Ca waves. *Purinergic Signal*, 6: 189–200. doi:10.1007/s11302-010-9193-8.
  42. Raphael Y, Kim YH, Osumi Y, Izumikawa M. (2007) Non-sensory cells in the deafened organ of Corti: Approaches for repair. *Int J Dev Biol*, 51: 649–654.
  43. Oesterle EC, Campbell S. (2009) Supporting cell characteristics in long-deafened



- aged mouse ears. *J Assoc Res Otolaryngol*, 10: 525–544. doi:10.1007/s10162-009-0183-x.
44. Nam J-H. (2014) Microstructures in the Organ of Corti Help Outer Hair Cells Form Traveling Waves along the Cochlear Coil. *Biophys J*, 106: 2426–2433. doi:10.1016/j.bpj.2014.04.018.
  45. Zetes DE, Tolomeo J a, Holley MC. (2012) Structure and mechanics of supporting cells in the Guinea pig organ of corti. *PLoS One*, 7: e49338. doi:10.1371/journal.pone.0049338.
  46. Bobbin RP. (2001) ATP-induced movement of the stalks of isolated cochlear Deiters' cells. *Neuroreport*, 12: 2923–2926. doi:10.1097/00001756-200109170-00034.
  47. Zimmermann H. (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp*, 276: 113–128; discussion 128-30, 233–237, 275–281.
  48. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 32: 19–29. doi:10.1016/j.tins.2008.10.001.
  49. James G, Butt AM. (2001) P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ. *Cell Calcium*, 30: 251–259.
  50. Drury AN, Szent-Györgyi A. (1929) The Physiological Activity of Adenine Compounds with Especial Reference to Their Action Upon the Mammalian Heart. *J Physiol*, .
  51. Lajtha A, Vizi ES. (2008) *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 3rd edition. Springer US; (2008).
  52. Vlajkovic SM, Vinayagamoorthy A, Thorne PR, Robson SC, Wang CJH, Housley GD. (2006) Noise-induced up-regulation of NTPDase3 expression in the rat cochlea: Implications for auditory transmission and cochlear protection. *Brain Res*, 1104: 55–63.
  53. Bodin P, Burnstock G. (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res*, 26: 959–969.
  54. Lazarowski ER. (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*, 8: 359–373.
  55. White PN, Thorne PR, Housley GD, Mockett B, Billett TE, Burnstock G. (1995) Quinacrine staining of marginal cells in the stria vascularis of the guinea-pig

- cochlea: a possible source of extracellular ATP? *Hear Res*, 90: 97–105.
56. Taruno A. (2018) ATP release channels. *Int J Mol Sci*, 19.
  57. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. (2006) The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J*, 397: 1–14. doi:10.1042/BJ20060175.
  58. Zhu Y, Zhao H-BB. (2010) ATP-mediated potassium recycling in the cochlear supporting cells. *Purinergic Signal*, 6: 221–229. doi:10.1007/s11302-010-9184-9.
  59. Ortolano S, Di Pasquale G, Crispino G, Anselmi F, Mammano F, Chiorini J a. (2008) Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear. *PNAS*, 105: 18776–18781. doi:10.1073/pnas.0800831105.
  60. Ceriani F, Pozzan T, Mammano F. (2016) Critical role of ATP-induced ATP release for Ca<sup>2+</sup> signaling in nonsensory cell networks of the developing cochlea. *PNAS*, 113: E7194–E7201. doi:10.1073/pnas.1616061113.
  61. Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E. (2008) P2X 7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling . *Am J Physiol Physiol*, 295: C752–C760.
  62. Spagnol G, Sorgen PL, Spray DC. (2014) Structural order in Pannexin 1 cytoplasmic domains. *Channels*, 8: 157–166.
  63. Zhao HB. (2016) Expression and function of pannexins in the inner ear and hearing. *BMC Cell Biol*, 17. doi:10.1186/s12860-016-0095-7.
  64. Bao L, Locovei S, Dahl G. (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett*, 572: 65–68. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.009.
  65. Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin Y V., Baranova A V., Ivanov D V., Skryma R, Prevarskaya N. (2006) Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol*, 174: 535–546. doi:10.1083/jcb.200601115.
  66. Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessarar N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F. (2008) ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *PNAS*, 105: 18770–18775. doi:10.1073/pnas.0800793105.

67. Chen J, Liang C, Zong L, Zhu Y, Zhao HB. (2018) Knockout of pannexin-1 induces hearing loss. *Int J Mol Sci*, 19: 1–11.
68. Lohman AW, Isakson BE. (2014) Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett*, 588: 1379–1388. doi:10.1016/j.febslet.2014.02.004.
69. Housley GD, Morton-Jones R, Vlajkovic SM, Telang RS, Paramanathasivam V, Tadros SF, Wong ACY, Froud KE, Cederholm JME, Sivakumaran Y, Snguanwongchai P, Khakh BS, Cockayne DA, Thorne PR, Ryan AF. (2013) ATP-gated ion channels mediate adaptation to elevated sound levels. *PNAS*, 110: 7494–7499. doi:10.1073/pnas.1222295110.
70. Franke H, Verkhratsky A, Burnstock G, Illes P. (2012) Pathophysiology of astroglial purinergic signalling. *Purinergic Signal*, 8: 629–657.
71. Cook SP, McCleskey EW. (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain*, 95: 41–47.
72. Muñoz DJ, Thorne PR, Housley GD, Billett TE, Battersby JM. (1995) Extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) in the endolymphatic compartment influences cochlear function. *Hear Res*, 90: 106–118.
73. Muñoz DJB, Thorne PR, Housley GD, Billett TE. (1995) Adenosine 5'-triphosphate (ATP) concentrations in the endolymph and perilymph of the guinea-pig cochlea. *Hear Res*, .
74. Liu HT, Sabirov RZ, Okada Y. (2008) Oxygen-glucose deprivation induces ATP release via maxi-anion channels in astrocytes. *Purinergic Signal*, 4: 147–154.
75. Volonté C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M, Burnstock G. (2006) P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther*, 112: 264–280. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.012.
76. Syed N i H, Kennedy C. (2012) Pharmacology of P2X receptors. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 1: 16–30.
77. North RA, Jarvis MF. (2013) P2X Receptors as Drug Targets. *Mol Pharmacol*, 83: 759–769. doi:10.1124/mol.112.083758.
78. Kügelgen I Von, Bonn D-. (2008) Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. *Biotrend Rev*, : 59–61.
79. North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82: 1013–1067. doi:10.1152/physrev.00015.2002.

80. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. (2007) Evidence for Functional P2X4/P2X7 Heteromeric Receptors. *Mol Pharmacol*, 72: 1447–1456. doi:10.1124/mol.107.035980.
81. Sperlágh B, Illes P. (2014) P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 35: 537–547.
82. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, Pegoraro A, Orioli E, Di Virgilio F. (2018) The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol*, 151: 234–244.
83. Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36: 1277–1283.
84. Von Kügelgen I, Hoffmann K. (2016) Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104: 50–61. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.030.
85. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev*, 58: 281–341.
86. Boeynaems JM, Communi D, Robaye B. (2012) Overview of the pharmacology and physiological roles of P2Y receptors. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 1: 581–588.
87. Thorne PR, Munoz DJB, Nikolic P, Mander L, Jagger DJ, Greenwood D, Vljakovic S, Housley GD. (2002) Potential role of purinergic signalling in cochlear pathology. *Audiol Neuro-Otology*, 7: 180–184. doi:10.1159/000058307.
88. Housley GD. (2000) Physiological Effect of Extracellular Nucleotides in the Inner Ear. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27: 575–580.
89. Housley GD. (1998) Extracellular nucleotide signaling in the inner ear. *Mol Neurobiol*, 16: 21–48. doi:10.1007/BF02740601.
90. Sirko P, Gale JE, Ashmore JF. (2019) Intercellular Ca<sup>2+</sup> signalling in the adult mouse cochlea. *J Physiol*, 597: 303–317.
91. Huang LC, Ryan AF, Cockayne DA, Housley GD. (2006) Developmentally regulated expression of the P2X3 receptor in the mouse cochlea. *Histochem Cell*

- Biol, 125: 681–692.
92. Nikolic P, Housley GD, Luo L, Ryan AF, Thorne PR. (2001) Transient expression of P2X1 receptor subunits of ATP-gated ion channels in the developing rat cochlea. *Dev Brain Res*, 126: 173–182. doi:10.1016/S0165-3806(00)00149-8.
  93. Housley GD, Luo L, Ryan AF. (1998) Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, 393: 403–414.
  94. Parker MS, Larroque ML, Campbell JM, Bobbin RP, Deininger PL. (1998) Novel variant of the P2X2 ATP receptor from the guinea pig organ of Corti. *Hear Res*, 121: 62–70.
  95. Szűcs A, Szappanos H, Batta TJ, Tóth A, Szigeti GP, Panyi G, Csernoch L, Sziklai I. (2006) Changes in Purinoceptor Distribution and Intracellular Calcium Levels following Noise Exposure in the Outer Hair Cells of the Guinea Pig. *J Membr Biol*, 213: 135–141. doi:10.1007/s00232-006-0045-y.
  96. Housley GD, Kanjhan R, Raybould NP, Greenwood D, Salih SG, Järlebark L, Burton LD, Setz VC, Cannell MB, Soeller C, Christie DL, Usami S, Matsubara A, Yoshie H, Ryan a F, Thorne PR. (1999) Expression of the P2X(2) receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the cochlea: implications for sound transduction and auditory neurotransmission. *J Neurosci*, 19: 8377–8388.
  97. Shen J, Harada N, Nakazawa H, Yamashita T. (2005) Involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signalling in cochlear inner hair cells. *Eur J Neurosci*, 21: 2912–2922.
  98. Parker MS, Onyenekwu NN, Bobbin RP. (2003) Localization of the P2Y4 Receptor in the Guinea Pig Organ of Corti. *J Am Acad Audiol*, 14: 286–295.
  99. Zhao H-B, Yu N, Fleming CR, L Bennett M V. (2005) Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *PNAS*, 102: 18724–17729.
  100. Szűcs A, Szappanos H, Tóth A, Farkas Z, Panyi G, Csernoch L, Sziklai I. (2004) Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hear Res*, 196: 2–7. doi:10.1016/j.heares.2004.04.008.
  101. Sueta T, Paki B, Everett a. W, Robertson D. (2003) Purinergic receptors in

- auditory neurotransmission. *Hear Res*, 183: 97–108. doi:10.1016/S0378-5955(03)00221-1.
102. Housley GD, Luo L, Ryan a F. (1998) Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, 393: 403–414.
  103. Wang JC-C, Raybould NP, Luo L, Ryan AF, Cannell MB, Thorne PR, Housley GD. (2003) Noise induces up-regulation of P2X2 receptor subunit of ATP-gated ion channels in the rat cochlea. *Neuroreport*, 14: 817–823. doi:10.1097/01.wnr.0000067784.69995.47.
  104. Jarlebark LE, Housley GD, Thorne PR. (2000) Immunohistochemical localization of adenosine 5`-triphosphate-gated ion channel P2X2 receptor subunits in adult and developing rat cochlea. *J Comp Neurol*, 421: 289–301.
  105. Salih SG, Housley GD, Raybould NP, Thorne PR. (1999) ATP-gated ion channel expression in primary auditory neurones. *Neuroreport*, 10: 2579–2586. doi:10.1097/00001756-199908200-00026.
  106. Huang L-C, Thorne PR, Vlajkovic SM, Housley GD. (2010) Differential expression of P2Y receptors in the rat cochlea during development. *Purinergic Signal*, 6: 231–248. doi:10.1007/s11302-010-9191-x.
  107. Järlebark LE, Housley GD, Raybould NP, Vlajkovic S, Thorne PR. (2002) ATP-gated ion channels assembled from P2X2 receptor subunits in the mouse cochlea. *Neuroreport*, 13: 1979–1984.
  108. Yan D, Zhu Y, Walsh T, Xie D, Yuan H, Sirmaci A, Fujikawa T, Wong ACY, Loh TL, Du L, Grati M, Vlajkovic SM, Blanton S, Ryan AF, Chen Z-Y, Thorne PR, Kachar B, Tekin M, Zhao H-B, Housley GD, King M-C, Liu XZ. (2013) Mutation of the ATP-gated P2X(2) receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *PNAS*, 110: 2228–2233. doi:10.1073/pnas.1222285110.
  109. Telang RS, Paramanathasivam V, Vlajkovic SM, Munoz DJB, Housley GD, Thorne PR. (2010) Reduced P2x(2) receptor-mediated regulation of endocochlear potential in the ageing mouse cochlea. *Purinergic Signal*, 6: 263–272. doi:10.1007/s11302-010-9195-6.
  110. Glowatzki E, Ruppertsberg JP, Zenner H-P, Rüsçh A. (1997) Mechanically and

- ATP-induced currents of mouse outer hair cells are independent and differentially blocked by d-tubocurarine. *Neuropharmacology*, 36: 1269–1275. doi:10.1016/S0028-3908(97)00108-1.
111. Nikolic P, Housley GD, Thorne PR. (2003) Expression of the P2X7 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the developing and adult rat cochlea. *Audiol Neuro-Otology*, 8: 28–37.
  112. Piazza V, Ciubotaru CD, Gale JE, Mammano F. (2007) Purinergic signalling and intercellular Ca<sup>2+</sup> wave propagation in the organ of Corti. *Cell Calcium*, 41: 77–86. doi:10.1016/j.ceca.2006.05.005.
  113. Chen C, Bobbin RP. (1998) P2X receptors in cochlear Deiters' cells. *Br J Pharmacol*, 124: 337–344. doi:10.1038/sj.bjp.0701848.
  114. O'Keefe MG, Thorne PR, Housley GD, Robson SC, Vlajkovic SM. (2010) Developmentally regulated expression of ectonucleotidases NTPDase5 and NTPDase6 and UDP-responsive P2Y receptors in the rat cochlea. *Histochem Cell Biol*, 133: 425–436.
  115. Vlajkovic SM, Housley GD, Muñoz DJB, Robson SC, Sévigny J, Wang CJH, Thorne PR. (2004) Noise exposure induces up-regulation of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Neuroscience*, 126: 763–773. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.023.
  116. Vlajkovic SM, Thorne PR, Sévigny J, Robson SC, Housley GD. (2002) Distribution of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Hear Res*, 170: 127–138.
  117. Vlajkovic SM, Thorne PR, Sévigny J, Robson SC, Housley GD. (2002) NTPDase1 and NTPDase2 immunolocalization in mouse cochlea: Implications for regulation of P2 receptor signaling. *J Histochem Cytochem*, 50: 1435–1441.
  118. O'Keefe MG, Thorne PR, Housley GD, Robson SC, Vlajkovic SM. (2010) Distribution of NTPDase5 and NTPDase6 and the regulation of P2Y receptor signalling in the rat cochlea. *Purinergic Signal*, 6: 249–261. doi:10.1007/s11302-010-9190-y.
  119. Nadol JB, Burgess BJ. (1994) Supranuclear efferent synapses on outer hair cells and Deiters' cells in the human organ of Corti. *Hear Res*, 81: 49–56.
  120. Lendvai B, Halmos GB, Polony G, Kapocsi J, Horváth T, Aller M, Sylvester Vizi E, Zelles T. (2011) Chemical neuroprotection in the cochlea: The modulation of

- dopamine release from lateral olivocochlear efferents. *Neurochem Int*, 59: 150–158. doi:10.1016/j.neuint.2011.05.015.
121. Nguyen KD, Mowlds D, Lopez IA, Hosokawa S, Ishiyama A, Ishiyama G. (2014) Mu-opioid receptor (MOR) expression in the human spiral ganglia. *Brain Res*, 1590: 10–19. doi:10.1016/j.brainres.2014.09.051.
  122. Bodmer D, Brand Y, Radojevic V. (2012) Somatostatin receptor types 1 and 2 in the developing mammalian cochlea. *Dev Neurosci*, 34: 342–353.
  123. Stepanyan RS, Indzhukulian AA, Vélez-Ortega AC, Boger ET, Steyger PS, Friedman TB, Frolenkov GI. (2011) TRPA1-Mediated Accumulation of Aminoglycosides in Mouse Cochlear Outer Hair Cells. *J Assoc Res Otolaryngol*, 12: 729–740. doi:10.1007/s10162-011-0288-x.
  124. Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, Nuttall AL. (2003) Vanilloid Receptors in Hearing: Altered Cochlear Sensitivity by Vanilloids and Expression of TRPV1 in the Organ of Corti. *J Neurophysiol*, 90: 444–455. doi:10.1152/jn.00919.2002.
  125. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. (2006) TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron*, 50: 277–289.
  126. Wu X, Indzhukulian AA, Niksch PD, Webber RM, Garcia-Gonzalez M, Watnick T, Zhou J, Vollrath MA, Corey DP. (2016) Hair-cell mechanotransduction persists in TRP channel knockout mice. *PLoS One*, 11.
  127. Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung ELM, Derfler BH, Duggan A, G??l??oc GSG, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*, 432: 723–730.
  128. Velez-Ortega AC. (2014) *Trpa1* Channels in Cochlear Supporting Cells Regulate Hearing Sensitivity After Noise Exposure. University of Kentucky; (2014).
  129. Asai Y, Holt JR, Géléoc GSG. (2010) A Quantitative Analysis of the Spatiotemporal Pattern of Transient Receptor Potential Gene Expression in the Developing Mouse Cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 11: 27–37. doi:10.1007/s10162-009-0193-8.



130. Takumida M, Kubo N, Ohtani M, Suzuka Y, Anniko M. (2005) Transient receptor potential channels in the inner ear: Presence of transient receptor potential channel subfamily 1 and 4 in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol*, 125: 929–934.
131. Dallos P, He DZ, Lin X, Sziklai I, Mehta S, Evans BN. (1997) Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J Neurosci*, 17: 2212–2226.
132. Kujawa SG, Erostequi C, Fallon M, Crist J, Bobbin RP. (1994) Effects of adenosine 5'-triphosphate and related agonists on cochlear function. *Hear Res*, 76: 87–100.
133. Bruce LL, Christensen MA, Warr WB. (2000) Postnatal Development of Efferent Synapses in the Rat cochlea. *J Comp Neurol*, 423: 532–548.
134. Fechner FP, Nadol JB JR, Burgess BJ, Brown MC. (2001) Innervation of supporting cells in the apical turns of the guinea pig cochlea is from type II afferent fibers. *J Comp Neurol*, 429: 289–298.
135. Raphael Y, Altschuler RA. (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*, 60: 397–422. doi:10.1016/S0361-9230(03)00047-9.
136. Matsunobu T, Chung JW, Schacht J. (2001) Acetylcholine-evoked calcium increases in Deiters' cells of the guinea pig cochlea suggest  $\alpha 9$ -like receptors. *J Neurosci Res*, 63: 252–256.
137. Morley BJ, Simmons DD. (2002) Developmental mRNA expression of the  $\alpha 10$  nicotinic acetylcholine receptor subunit in the rat cochlea. *Dev Brain Res*, 139: 87–96.
138. Fucile S, Sucapane A, Eusebi F. (2006)  $Ca^{2+}$  permeability through rat cloned  $\alpha 9$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*, 39: 349–355.
139. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. (2001) Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, 12: 3–10. doi:10.1006/scdb.2000.0211.
140. Sheffield AM, Smith RJH. (2018) The Epidemiology of Deafness. *Cold Spring Harb Perspect Med*, : a033258.
141. Muñoz DJB, McFie C, Thorne PR. (1999) Modulation of cochlear blood flow by extracellular purines. *Hear Res*, 127: 55–61.

142. Mammano F, Bortolozzi M. (2018) Ca<sup>2+</sup>-signaling, apoptosis and autophagy in the developing cochlea: Milestones to hearing acquisition. *Cell Calcium*, 70: 117–126. doi:10.1016/j.ceca.2017.05.006.
143. LeBlanc C, Bobbin RP. (1999) An interaction between PPADS, an ATP antagonist, and a moderately intense sound in the cochlea. *Hear Res*, 138: 192–200. doi:10.1016/s0378-5955(99)00164-1.
144. Chen C, Skellett RA, Fallon M, Bobbin RP. (1998) Additional pharmacological evidence that endogenous ATP modulates cochlear mechanics. *Hear Res*, 118: 47–61.
145. Kujawa SG, Fallon M, Bobbin RP. (1994) ATP antagonists cibacron blue, basilen blue and suramin alter sound-evoked responses of the cochlea and auditory nerve. *Hear Res*, 78: 181–188.
146. Bobbin RP. (2001) PPADS, an ATP antagonist, attenuates the effects of a moderately intense sound on cochlear mechanics. *Hear Res*, 156: 10–16.
147. Chi A, Wong Y, Guo CX, Gupta R, Housley GD, Thorne PR, Vlajkovic SM. (2010) Post exposure administration of A<sub>1</sub> adenosine receptor agonists attenuates noise-induced hearing loss. *Hear Res*, 260: 81–88. doi:10.1016/j.heares.2009.12.004.
148. Chang H, Telang RS, Sreebhavan S, Tingle M, Thorne PR, Vlajkovic SM. (2017) Pharmacokinetic properties of adenosine amine congener in cochlear perilymph after systemic administration. *Biomed Res Int*, 2017.
149. Vlajkovic SM, Housley GD, Thorne PR. (2009) Adenosine and the auditory system. *Curr Neuropharmacol*, 7: 246–256. doi:10.2174/157015909789152155.
150. Housley GD, Ryan AF. (1997) Cholinergic and purinergic neurohumoral signalling in the inner ear: A molecular physiological analysis. *Audiol Neuro-Otology*, 2: 92–110.
151. Elgoyhen AB, Katz E. (2012) The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris*, 106: 47–56.
152. Tang X, Zhu X, Ding B, Walton JP, Frisina RD, Su J. (2014) Age-related hearing loss: GABA, nicotinic acetylcholine and NMDA receptor expression changes in spiral ganglion neurons of the mouse. *Neuroscience*, 259: 184–193. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.058.
153. Elgoyhen AB, Katz E, Fuchs PA. (2009) The nicotinic receptor of cochlear hair

- cells: A possible pharmacotherapeutic target? *Biochem Pharmacol*, 78: 712–719. doi:10.1016/j.bcp.2009.05.023.
154. Cuajungco MP, Grimm C, Heller S. (2007) TRP channels as candidates for hearing and balance abnormalities in vertebrates. *Biochim Biophys Acta*, 1772: 1022–1027. doi:10.1016/j.bbadis.2007.01.002.
  155. Brito R, Sheth S, Mukherjea D, Rybak L, Ramkumar V. (2014) TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells*, 3: 517–545.
  156. Horváth T, Polony G, Fekete Á, Aller M, Halmos G, Lendvai B, Heinrich A, Sperlágh B, Vizi ES, Zelles T. (2016) ATP-evoked intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling of different supporting cells in the hearing mouse hemicochlea. *Neurochem Res*, 41: 364–375.
  157. Edge RM, Evans BN, Pearce M, Richter CP, Hu X, Dallos P. (1998) Morphology of the unfixed cochlea. *Hear Res*, 124: 1–16. doi:10.1016/S0378-5955(98)00090-2.
  158. Berekméri E, Deák O, Téglás T, Sággy É, Horváth T, Aller M, Fekete Á, Köles L, Zelles T. (2019) Targeted single-cell electroporation loading of Ca<sup>2+</sup> indicators in the mature hemicochlea preparation. *Hear Res*, 371: 75–86.
  159. Nevian T, Helmchen F. (2007) Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation. *Pflugers Arch*, 454: 675–688. doi:10.1007/s00424-007-0234-2.
  160. Tsong TY. (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys J*, 60: 297–306. doi:10.1016/S0006-3495(91)82054-9.
  161. Keiler S, Richter C-P. (2001) Cochlear dimensions obtained in hemicochleae of four different strains of mice: CBA/CaJ, 129/CD1, 129/SvEv and C57BL/6J. *Hear Res*, 162: 91–104.
  162. Lagostena L, Mammano F. (2001) Intracellular calcium dynamics and membrane conductance changes evoked by Deiters' cell purinoceptor activation in the organ of Corti. *Cell Calcium*, 29: 191–198. doi:10.1054/ceca.2000.0183.
  163. Lagostena L, Ashmore JF, Kachar B, Mammano F. (2001) Purinergic control of intercellular communication between Hensen's cells of the guinea-pig cochlea. *J Physiol*, 531: 693–706. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0693h.x.
  164. Ishibashi T, Takumida M, Akagi N, Hirakawa K, Anniko M. (2008) Expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3, and 4 in mouse inner ear.

- Acta Otolaryngol, 128: 1286–1293.
165. SÁGHY É, SZÓKE É, PAYRITS M, HELYES Z, BÖRZSEI R, EROSTYÁK J, JÁNOSI TZ, SÉTÁLÓ G, SZOLCSÁNYI J. (2015) Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca<sup>2+</sup>-gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacol Res*, 100: 101–116.
  166. SÁGHY É, PAYRITS M, BÍRÓ-SÜTŐ T, SKODA-FÖLDES R, SZÁNTI-PINTÉR E, EROSTYÁK J, MAKKAI G, SÉTÁLÓ G, KOLLÁR L, KÓSZEGI T, CSEPREGI R, SZOLCSÁNYI J, HELYES Z, SZÓKE É. (2018) Carboxamido steroids inhibit the opening properties of transient receptor potential ion channels by lipid raft modulation. *J Lipid Res*, 59: 1851–1863. doi:10.1194/jlr.M084723.
  167. GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEH RY. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260: 3440–3450.
  168. RICHTER CP, EVANS BN, EDGE R, DALLOS P. (1998) Basilar membrane vibration in the gerbil hemicochlea. *J Neurophysiol*, 79: 2255–2264. doi:10.1152/jn.1998.79.5.2255.
  169. DULON D, MOATAZ R, MOLLARD P. (1993) Characterization of Ca<sup>2+</sup> signals generated by extracellular nucleotides in supporting cells of the organ of Corti. *Cell Calcium*, 14: 245–254. doi:10.1016/0143-4160(93)90071-D.
  170. LANDEGGER LD, DILWALI S, STANKOVIC KM. (2017) Neonatal Murine Cochlear Explant Technique as an In Vitro Screening Tool in Hearing Research. *J Vis Exp*, : e55704–e55704. doi:10.3791/55704.
  171. LIN X, WEBSTER P, LI Q, CHEN S, OUYANG Y. (2003) Optical recordings of Ca<sup>2+</sup> signaling activities from identified inner ear cells in cochlear slices and hemicochleae. *Brain Res Protoc*, 11: 92–100. doi:10.1016/S1385-299X(03)00019-9.
  172. FRIDBERGER A, FLOCK A, ULFENDAHL M, FLOCK B. (1998) Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca<sup>2+</sup> concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *PNAS*, 95: 7127–7132. doi:10.1073/pnas.95.12.7127.
  173. MAMMANO F, CANEPARI M, CAPELLO G, IJADUOLA RB, CUNEI A, YING L, FRATNIK F, COLAVITA A. (1999) An optical recording system based on a fast CCD sensor for biological imaging. *Cell Calcium*, 25: 115–123.
  174. RICHTER C-P, EMADI G, GETNICK G, QUESNEL A, DALLOS P. (2007) Tectorial

- membrane stiffness gradients. *Biophys J*, 93: 2265–2276. doi:10.1529/biophysj.106.094474.
175. Emadi G, Richter C-P, Dallos P. (2004) Stiffness of the gerbil basilar membrane: radial and longitudinal variations. *J Neurophysiol*, 91: 474–488. doi:10.1152/jn.00446.2003.
  176. Teudt IU, Richter CP. (2014) Basilar membrane and tectorial membrane stiffness in the CBA/CaJ mouse. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol*, 15: 675–694.
  177. Chan DK, Rouse SL. (2016) Sound-Induced Intracellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics in the Adult Hearing Cochlea. *PLoS One*, 11: e0167850.
  178. Matsunobu T, Schacht J. (2000) Nitric oxide/Cyclic GMP pathway attenuates ATP-evoked intracellular calcium increase in supporting cells of the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol*, 423: 452–461.
  179. Helmchen F, Imoto K, Sakmann B. (1996) Ca<sup>2+</sup> buffering and action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J*, 70: 1069–1081. doi:10.1016/S0006-3495(96)79653-4.
  180. Housley GD, Bringmann A, Reichenbach A. (2009) Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci*, 32: 128–141. doi:10.1016/j.tins.2009.01.001.
  181. Lee JH, Marcus DC. (2008) Purinergic signaling in the inner ear. *Hear Res*, 235: 1–7. doi:10.1016/j.heares.2007.09.006.
  182. Sage CL, Marcus DC. (2002) Immunolocalization of P2Y<sub>4</sub> and P2Y<sub>2</sub> Purinergic Receptors in Strial Marginal Cells and Vestibular Dark Cells. *J Membr Biol*, 185: 103–115. doi:10.1007/s00232-001-0116-z.
  183. Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, Hirakawa K, Anniko M. (2009) Expression of transient receptor potential channel melastin (TRPM) 18 and TRPA1 (ankyrin) in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol*, 129: 1050–1060.
  184. Stanchev D, Blosa M, Milius D, Gerevich Z, Rubini P, Schmalzing G, Eschrich K, Schaefer M, Wirkner K, Illes P. (2009) Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X(3) receptors. *Pain*, 143: 26–36. doi:10.1016/j.pain.2009.01.006.
  185. Scheffer DI, Shen J, Corey DP, Chen Z-Y. (2015) Gene Expression by Mouse Inner Ear Hair Cells during Development. *J Neurosci*, 35: 6366–6380. doi:10.1523/JNEUROSCI.5126-14.2015.
  186. Gómez-Casati ME, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Katz E. (2005) Biophysical and

- pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *J Physiol*, 566: 103–118.
187. Verbitsky M, Rothlin C V., Katz E, Belén Elgoyhen A. (2000) Mixed nicotinic-muscarinic properties of the  $\alpha 9$  nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*, 39: 2515–2524.
  188. Hu X, Evans BN, Dallos P. (1999) Direct Visualization of Organ of Corti Kinematics in a Hemicochlea. *J Neurophysiol*, 82: 2798–2807. doi:10.1152/jn.1999.82.5.2798.
  189. Teudt IU, Richter CP. (2007) The hemicochlea preparation of the guinea pig and other mammalian cochleae. *J Neurosci Methods*, 162: 187–197.
  190. Chen S, Xie L, Xu K, Cao H-Y, Wu X, Xu X-X, Sun Y, Kong W-J. (2018) Developmental abnormalities in supporting cell phalangeal processes and cytoskeleton in the *Gjb2* knockdown mouse model. *Dis Model Mech*, 11: dmm033019. doi:10.1242/dmm.033019.
  191. Yu N, Zhao H-B. (2009) Modulation of outer hair cell electromotility by cochlear supporting cells and gap junctions. *PLoS One*, 4: e7923. doi:10.1371/journal.pone.0007923.
  192. Parsa A, Webster P, Kalinec F. (2012) Deiters Cells Tread a Narrow Path —The Deiters Cells-Basilar Membrane Junction. *Hear Res*, 290: 13–20.
  193. Inoshita A, Iizuka T, Okamura HO, Minekawa A, Kojima K, Furukawa M, Kusunoki T, Ikeda K. (2008) Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative *Gjb2* transgenic mice. *Neuroscience*, 156: 1039–1047.
  194. Majumder P, Crispino G, Rodriguez L, Ciubotaru CD, Anselmi F, Piazza V, Bortolozzi M, Mammano F. (2010) ATP-mediated cell-cell signaling in the organ of corti: The role of connexin channels. *Purinergic Signal*, 6: 167–187. doi:10.1007/s11302-010-9192-9.
  195. Fettiplace R. (2017) Hair cell transduction, tuning, and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Compr Physiol*, 7: 1197–1227.
  196. Delacroix L, Malgrange B. (2015) Cochlear afferent innervation development. *Hear Res*, 330: 157–169. doi:10.1016/j.heares.2015.07.015.
  197. Zhao H-BB, Yu N. (2006) Distinct and gradient distributions of connexin26 and connexin30 in the cochlear sensory epithelium of guinea pigs. *J Comp Neurol*, 499: 506–518. doi:10.1002/cne.21113.

198. Liu WJ, Yang J. (2015) Preferentially regulated expression of connexin 43 in the developing spiral ganglion neurons and afferent terminals in post-natal rat cochlea. *Eur J Histochem*, 59. doi:10.4081/ejh.2015.2464.
199. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nickel R. (2002) Connexins and gap junctions in the inner ear. In: *Audiology and Neuro-Otology*. (2002).
200. Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G. (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: 207–231. doi:10.1002/cne.10916.
201. Wang XH, Streeter M, Liu Y-PP, Zhao H-BB. (2009) Identification and characterization of pannexin expression in the mammalian cochlea. *J Comp Neurol*, 512: 336–346.
202. Brändle U, Zenner HP, Ruppertsberg JP. (1999) Gene expression of P2X-receptors in the developing inner ear of the rat. *Neurosci Lett*, 273: 105–108. doi:10.1016/S0304-3940(99)00648-5.
203. Wang HC, Lin CC, Cheung R, Zhang-Hooks Y, Agarwal A, Ellis-Davies G, Rock J, Bergles DE. (2015) Spontaneous Activity of Cochlear Hair Cells Triggered by Fluid Secretion Mechanism in Adjacent Support Cells. *Cell*, 163: 1348–1359. doi:10.1016/j.cell.2015.10.070.
204. Huang LC, Greenwood D, Thorne PR, Housley GD. (2005) Developmental regulation of neuron-specific P2X3 receptor expression in the rat cochlea. *J Comp Neurol*, 484: 133–143.
205. Yu N, Zhu M-L, Zhao H-B. (2006) Prestin is expressed on the whole outer hair cell basolateral surface. *Brain Res*, 1095: 51–58. doi:10.1016/j.brainres.2006.04.017.
206. Bulankina A V., Moser T. (2012) Neural Circuit Development in the Mammalian Cochlea. *Physiology*, 27: 100–112. doi:10.1152/physiol.00036.2011.
207. Kim C-H, Kim H, Lee HS, Chang SO, Oh S-H, Lee JH. (2010) P2Y4-Mediated Regulation of Na<sup>+</sup> Absorption in the Reissner's Membrane of the Cochlea. *J Neurosci*, 30: 3762–3769. doi:10.1523/JNEUROSCI.3300-09.2010.
208. Salih SG, Housley GD, Burton LD, Greenwood D. (1998) P2X2 receptor subunit expression in a subpopulation of cochlear type I spiral ganglion neurones.

- Neuroreport, 9: 279–282. doi:10.1097/00001756-199801260-00019.
209. Buckiová D, Syka J. (2009) Calbindin and S100 protein expression in the developing inner ear in mice. *J Comp Neurol*, 513: 469–482. doi:10.1002/cne.21967.



## 11. Saját publikációk jegyzéke

### A dolgozat alapját képező publikációk:

Berekméri, E., Deák, O., Téglás, T., Sággy, É., Horváth, T., Aller, M., Fekete, Á., Köles, L., Zelles, T., 2019. Targeted single-cell electroporation loading of Ca<sup>2+</sup> indicators in the mature hemicochlea preparation. *Hear. Res.* 371, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.004>

Berekméri, E., Fekete, Á., Köles, L., Zelles, T., 2019. Postnatal Development of the Subcellular Structures and Purinergic Signaling of Deiters' Cells along the Tonotopic Axis of the Cochlea. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8101266>

Berekméri, E., Szepeszy, J., Köles, L., Zelles, T., 2019. Purinergic signaling in the organ of Corti: Potential therapeutic targets of sensorineural hearing losses. *Brain Res. Bull.* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.029>

Köles, L., Szepeszy, J., Berekméri, E., Zelles, T., 2019. Purinergic Signaling and Cochlear Injury-Targeting the Immune System? *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2979. <https://doi.org/10.3390/ijms20122979>

### Egyéb:

Kalász, H., Tekes, K., Faigl, E.B., Pöstényi, Z., Berekméri, E., Karvaly, G., Adeghate, E., 2017. Monitoring the Level of <sup>14</sup>C-Labelled Selegiline Following Oral Administration. *Open Med. Chem. J.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.2174/1874104501711010001>

## 12. Köszönetnyilvánítás

A doktori munkám során részletezett kísérleteket a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmatoterápiás Intézetében végeztem.

Ezúton szeretném megköszönni a segítséget és a támogatást:

Dr. Zelles Tibornak, témavezetőmnek, aki munkám során a segítségemre volt;

Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, aki intézetvezetőként lehetővé tette, hogy doktori munkámat az intézetben végezhessem;

Dr. Köles Lászlónak, aki számos jó tanáccsal látott el a purinerg rendszer kapcsán;

Aller Máténak és Téglás Tímeának, akik a módszer megtanulásában és annak továbbfejlesztésében segítettek munkámat;

Humli Viktóriának és Szepesy Juditnak, akik számos kísérletet könnyítettek meg számomra;

Dr. Sággy Évának, aki a TRP agonista vegyületeket rendelkezésünkre bocsátotta és jó tanácsokkal látott el minket.

Az intézet összes dolgozójának, akik a doktori munkám létrejöttében segítettek;

és végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom családomnak, páromnak és barátaimnak a türelmükért és a támogatásukért.

A disszertáció elkészültéhez hozzájárult az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése pályázat.