

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet

Tudományos Diákköri Dolgozat

**EGYEDI SEJTEK ELEKTROPORÁCIÓS TÖLTÉSE Ca^{2+} - ÉRZÉKENY
FESTÉKKEL HALLÓ EGEREK CORTI-SZERVÉNEK FUNKCIONÁLIS
IMAGING VIZSGLATÁHOZ**

Készítette: Berekméri Eszter

Témavezető: Dr. Zelles Tibor
Celluláris Farmakológia Csoport,
Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest

Budapest

2012.

TARTALOM

I. BEVEZETÉS	3
II. HÁTTÉR	4
1. A BELSŐ FÜL ANATÓMIÁJA	4
Az emlős fül szerkezete	4
A belső fül anatómiája	4
A Corti-szerv érzékszetei	5
A Corti-szerv támasztósejtjei	6
2. A HALLÁS ÉLETTANA	7
3. HALLÁSKÁROSODÁS TÍPUSOK	9
4. A PURINERG RECEPTOROK	10
Purinerg membránreceptorok	11
P1 receptorok	11
P2X receptorok	11
P2Y receptorok	12
Purin receptorok szerepe a hallásban	13
5. AZ ELEKTROPORÁCIÓ	14
Történeti áttekintés	14
Elméleti háttér	15
6. OPTIKAI INDIKÁTOROK	16
Ca ²⁺ érzékeny indikátorok	17
III. CÉLKITŰZÉSEK	19
IV. ANYAG ÉS MÓDSZER	20
A hemicochlea preparátum elkészítése	20
Az elektroporációs technikával történő festés	20
Az Ca ²⁺ koncentráció változásának megfigyelése	21
A kísérletek értékelése	21
V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	22
Megközelítés és pipetta paraméterek	22
Az áramimpulzus paramétereinek beállítása és a festékkoncentráció	23
A megvilágítás mértéke	25
A sejtek festődésének sikeressége	25
Funkcionális kalcium imaging vizsgálatok – az ATP kiváltotta intracelluláris Ca ²⁺ válaszok mérése	27
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	29
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	31
XI. IRODALOM JEGYZÉK	33
KÖSZNETNYÍLVÁNÍTÁS	36

I. BEVEZETÉS

A halláskárosodás a leggyakoribb emberi szenzoros deficit. Az Európai Unióban a népesség több mint 10%-át érinti. Gyerekkorban gátolja a beszéd kialakulását, a kognitív fejlődést és a tanulást. Idősebb korban izolációhoz, depresszióhoz vezethet [I].

A külső- vagy középfület érintő vezetékes halláskárosodásokkal szemben a belsőfül (cochlea) érzékszétjeinek, illetve az idegi vezetés és jelfeldolgozás idegsejtjeinek károsodása következtében kialakuló szenzorineurális halláskárosodások (SNHL-ek) gyógyszeres terápiája megoldatlan. Ennek fő oka, hogy nem ismerjük elég behatóan a kóroktant és az endogén védekezési mechanizmusokat. Ezek megismerését nehezíti, hogy a halláskárosodással foglalkozó kutatócsoportok a Corti-szerv kifejezett sérülékenysége valamint az anatómiai struktúra bonyolultsága és nehéz hozzáférhetősége miatt döntően organotipikus preparátumokat, illetve embrionális korú állatból nyert sejt kultúrákat használnak. Mivel a halláskárosodások döntő többsége a hallószerv és a hallás kifejlődése után alakul ki a még nem halló egerekből nyert preparátumokon végzett kísérletek elsődlegesen fejlődésbiológiai kérdések vizsgálatára és kevésbé a halláskárosodások modellezésére alkalmasak. A Dallos Péter és munkatársai által kifejlesztett hemicochlea preparátum lehetővé tette a már kifejlett hallású egerek Corti-szervén végzett kísérletezést [1]. Ezek a munkák azonban eddig a cochleáris mikromechanika és az elektrofiziológia területére szorítkoztak, a sejtek intracelluláris hírvivőinek vizsgálatára kifejezetten alkalmas funkcionális imaging vizsgálatokat nem foglalták magukba.

Az ATP, mint jelátvivő, fontos szerepet játszik a Corti-szerv fejlődésében és sejtjeinek élettani szabályozásában is. Ezen túlmenően, a Corti-szerv minden sejt típusán megtalálható purinerg receptorain keresztül, részese a belsőfül zaj- és egyéb halláskárosodás elleni védekező rendszerének is [2]. A védelemben játszott, egyedi sejt típusokra lebontott pontos szerepe azonban még ismeretlen. Az ATP jellemző hatása, hogy membránreceptoraihoz kötődve változást idéz elő az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációban.

Kutatócsoportunk halló egerek akut hemicochlea preparátumán kívánt beállítani egy elektroporációs festési módszert, amely fluoreszcens jelzőfestékek egyedi sejtekbe juttatására alkalmas. A módszer lehetővé teszi a nagy tér- és időbeli felbontású, funkcionális kalcium imaging vizsgálatokat, melyeket a Corti-szerv sejtjeiben végbemenő purinerg jelátvitel megfigyeléséhez kívánunk felhasználni. Diákköri munkám során ennek a módszernek a beállításában és alkalmazásának első kísérleteiben vettem részt. A módszer segítségével a SNHL-ok sejt szintű patomechanizmusát emberi halláskárosodások modelljeként szolgáló genetikailag módosított egerekben is vizsgálhatjuk.

II. HÁTTÉR

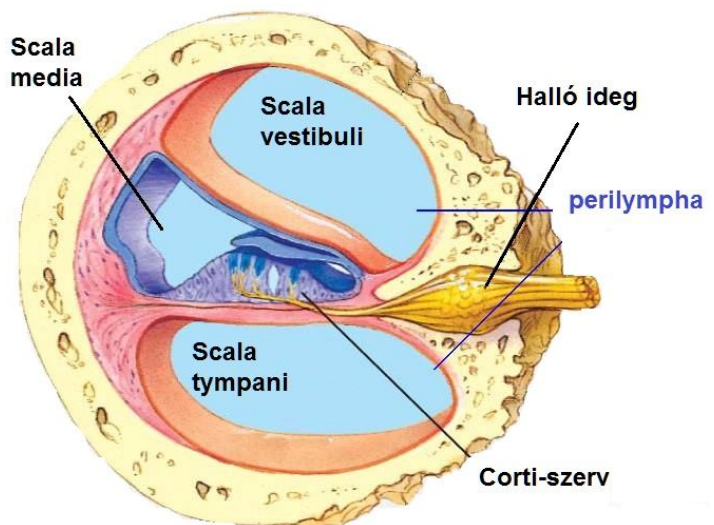
1. A BELSŐ FÜL ANATÓMIÁJA

Az emlős fül szerkezete

Az emlősök hallószerve három, funkcionálisan eltérő részre tagolódik. A *külső fül* feladata a hanghullámok felfogása a fülkagyló porcos képletének segítségével, és dobhártyához vezetése a hallójáraton át. A határt a külső- és a *középfül* között a dobhártya, egy rugalmas, rostos hártya képezi, amely a mechanikai hullámok hatására rezgésbe jön. A dobhártya túloldalán helyezkedik el a dobüreg, amelyben a három hallócsontocska található. Továbbá innen nyílik a garattal összeköttetést teremtő fül- avagy Eustach-kürt, melynek nyomáskiegyenlítő szerepe van. Az egymáshoz ízületekkel kapcsolódó hallócsontocskák közül az első a kalapács (mallus), amely nyelével a dobhártyához rögzül. A kalapács a dobhártyától átvett rezgéseket az üllőhöz (incus), ez utóbbi pedig a kengyelhez (stapes) továbbítja. A stapes a rezgéseket már felerősítve adja át a *belső fül*nek, ami a sziklacsont pars petrosajában elhelyezkedő csontos labirintusban található. Az ebben található csiga (cochlea) két nyíláson keresztül is kapcsolatban áll a középfüllel: az ovális ablak (foramen ovale) a kengyel talpához kapcsolódik, a kerek ablak (foramen rotundum) pedig a csiga bázisánál nyílik a dobüregbe. A belső fül csontos labirintusa nem csak a hallószervet, de az egyensúlyozó szervet is magában foglalja a három félkörös ívjáráttal [3].

A belső fül anatómiája

A belső fül feladata a középfültől átvett mechanikai rezgések átalakítása elektromos ingerületté. Ebben speciális anatómiája segíti. A cochlea egy folyadékkal telt, csigaformát öltött csőszerű képlet, amely saját tengelye (a modiolus) körül tekeredett fel [3]. A cső belsejét három részre osztja két membrán. A foramen ovale a scala vestibuliban folytatódik, ami a csiga csúcsán (a helicotreman) átfordul a scala tympaniba. E két tér között található a scala



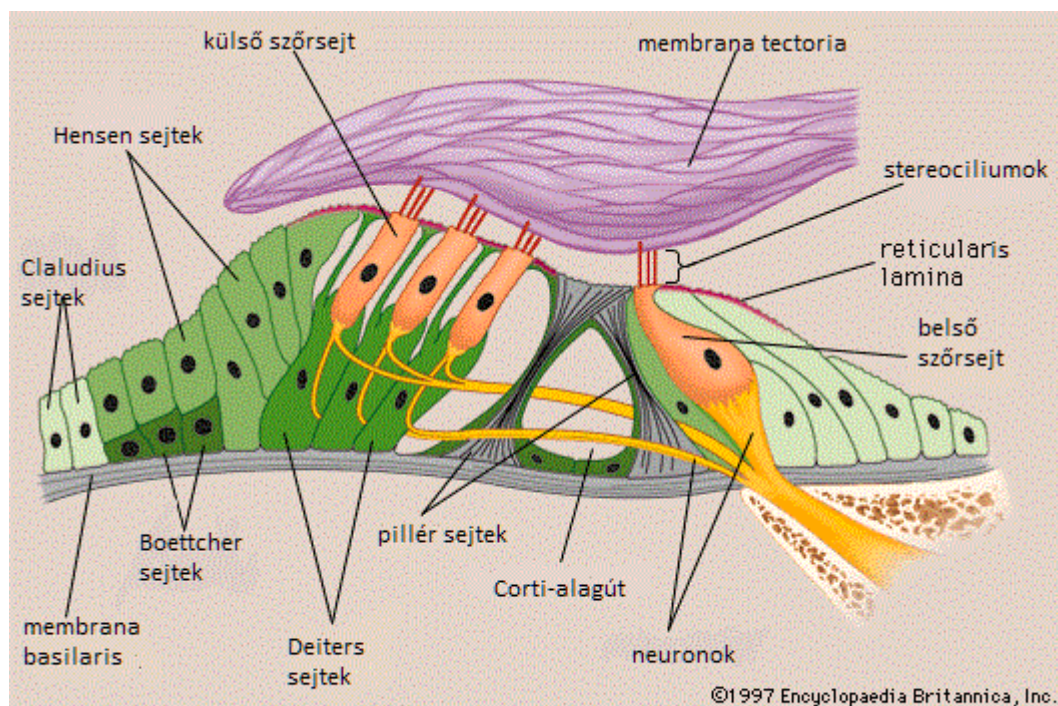
1. ábra. A cochlea egyik kanyarulatának keresztmetszete

media, amit a scala vestibuli felé a Reissner-féle membrán, a scala tympani felé pedig a bazális membrán (membrana basilaris) határol (1. ábra). Itt található a hallás tulajdonképpeni szerve a Corti-féle szerv. A két határoló teret perilympa tölti ki, ami egy extracelluláris folyadék, a scala mediában viszont endolympha kering, egy magas K^+ , alacsony Ca^{2+} tartalmú folyadék, amelyben a Corti-szerv szenzoros sejtjeinek stereociliumai is fürdenek. Az endolympha és perilympa közötti ionkoncentráció különbségek hozzák létre az endocochleáris potenciált, melynek értéke +90 mV körüli [3, 4].

A Corti-szervet különböző érzék- és támasztósejtek alkotják. E sejtek fölé hajol a membrana tectoria (2. ábra).

A Corti-szerv érzéksejtjei

A Corti-szervben a mechanikai rezgések felfogásáért és ingerületté alakításáért különleges, szenzoros sejtek felelnek, amelyeknek két típusa ismert. A belső szőrsejtek egy sorban helyezkednek el a Corti-alagút modiolushoz közelebbi oldalán. A külső szőrsejtek három-négy sort alkotnak a Corti-alagút túloldalán. Mindkét érzéksejtféle apikális felszínéről lépcsőzetesen hosszabbodó stereociliumok indulnak, amelyek a scala media endolymphával teli üregébe nyúlnak és érintkeznek a membrana tectoriával (külső szőrsejtek) ill. közvetlenül alatta végződnek (belső szőrsejtek) [3]. A membrana basilaris kilengésekor a membrana tectoria alatt lévő stereociliumok elhajlanak. A stereociliumok oldalsó- és csúcsi



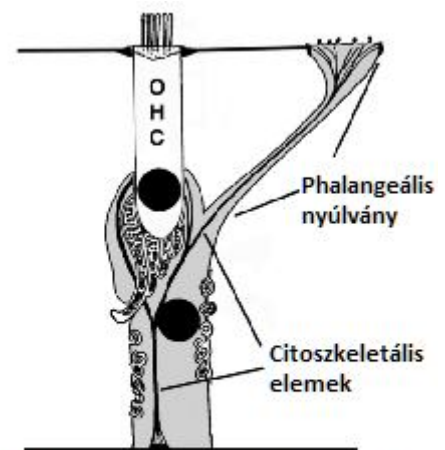
2. ábra. A Corti-szerv anatómiája

kapcsolatokkal (lateralis- és tip-link-ek) egymáshoz vannak horgonyozva [4]. A magasabb stereociliumok irányába történő elhajláskor a tip linkek közvetítésével a stereociliumok csúcsán elhelyezkedő mechanoelektrikus transzdukciós (MET) csatornák nyitnak. A beáramló K^+ és Ca^{2+} ionok depolarizálják a sejtet. A depolarizáció hatására L-típusú feszültség függő Ca^{2+} csatornák is megnyílnak és kiváltják a sejtek hallóneuronokkal szinaptizáló bázisán a Glu tartalmú transzmitter vezikulák exocitózisát [3, 4].

A belső szőrsejtek a tulajdonképpeni receptorsejtek, amelyek a hallóneuronokat ingerületbe hozva továbbítják az auditoros információt. A külső szőrsejtek elsődleges feladata a cochleáris erősítés. A jelerősítést és a frekvencia szelektivitás fokozását membránpotenciál függő szomatikus elektromotilitásuknak és a MET csatorna kapcsolt stereocilium köteg motilitásnak köszönhetik [3, 4].

A Corti-szerv támasztósejtjei

A Corti-szerv támasztó sejtjei a szerv alakjának fenntartásában, az érzéksejtek működésében, és tartásában (a szőrsejtek egyike sem érintkezik a bazális membránnal) játszanak szerepet [3]. A belső szőrsejtre borul a belső határoló sejt (inner border cell, a modiolus felől) és a belső phalangeális sejt (inner phalangeal cell, a Corti-alagút felől). Ezek a borító sejtek finom phalangeális nyúlványukkal teljesen beborítják a szőrsejtet és az afferens neuronok végét [5]. A belső szőrsejt mellett található a pillérsejtek két sora (belső és külső pillérsejtek). A két pillér fordított V alakzatot alkotva zárja közre a Corti-alagutakat. Alakjuk jellegzetesen a páronként összeérő fejből, egy pálcika alakú törzsből és egy kiszélesedő, a bazális membránon rögzülő talpi részből áll. Jellemzően nagyon ellenállóak a környezeti hatásoknak. Rengeteg párhuzamos lefutású mikrotubulust tartalmaznak, aktinnal összekötve, ami rugalmassá teszi őket, így inkább hajlanak, mint szakadnak [6]. A külső pillérsejtek mellett található a Deiters sejtek három sora, amelyek a külső szőrsejteket tartják (3. ábra). Apikális homorulatukban ülnek a szőrsejtek bazális pólusukkal, míg apikális pólusuk érinti a támasztósejt magasan felnyúló, kiszélesedő phalangeális nyúlványát [7]. Ez a szoros kapcsolat a Deiters és a szőrsejt között valószínűsíti, hogy a támasztó sejt segíti a szőrsejt erősítő mechanizmusát: a phalangeális nyúlvány merevségének változása (ami



3. ábra. Egy Deiters sejt és egy külső szőrsejt (OHC) viszonya

korábbi kísérletek szerint adenosin-trifoszfát és Ca^{2+} hatására is létrejön) befolyásolja a külső szőrsejt erősítő mechanizmusát. A Deiters sejtek ezenkívül egymással is szoros, gap junction kapcsolatokat tartanak fenn, amely lehetőséget ad sejtek közötti ionáramok kialakulására [4]. Tovább haladva a Corti-szerv külső fala felé a Hensen sejtek találhatók. Ezek különböző nagyságú sejtek, amelyek vagy a bazális membránról erednek és viszonylag nagyméretűek, vagy két sorban egymás fölé helyezkedő kisebb méretű sejtek. Érdekességük, hogy citoplazmájukban kevés sejtorganelum található, ám az apikális kanyarulatok felé haladva egyre nagyobb méretű lipid cseppeket tartalmaznak [5]. A Hensen sejtek mellett elhelyezkedő Claudius sejtek köbhámsejtek. A cochlea bazális kanyarulatában a Claudius sejtek alatt és mellett megjelennek a Boettcher sejtek is. Ezek speciális struktúrával rendelkeznek: sejtmembránjuk újszerű kitüremkedéseket képez, melyek zipzár-szerűen egymásba fűződnek. Ezen túlmenően mikrovillusokat is bocsátanak az intercelluláris térbe. Sok proteint és enzimet tartalmaznak, köztük calmodulint, egy Ca^{2+} kötő fehérjét is [8].

A Corti-szerv egyéb sejtjei közül említést érdemelnek a stria vascularis sejtjei, amelyek a külső falat határolják és szerepük az endolympha termelése, ezzel az endocochleáris potenciál fenntartása [4].

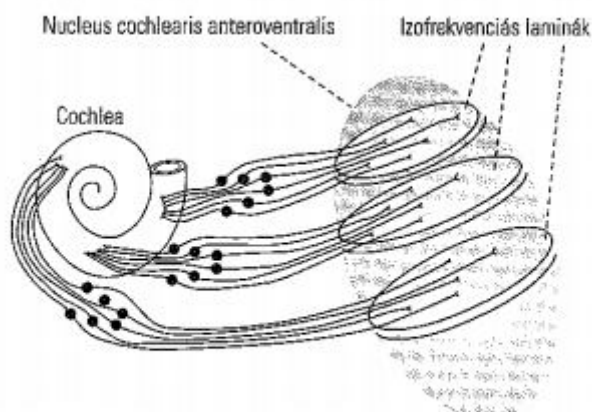
2. A HALLÁS ÉLETTANA

A cochlea frekvenciaelemző tulajdonsággal rendelkezik, amely a tonotópián alapszik [3]. Ez a jelenség segít megkülönböztetnünk a különböző frekvenciájú hangokat. A foramen ovalén keresztül a scala vestibuliba jutó és a perilymphát megrezegtető hanghullámok a frekvenciájuknak megfelelően csak egy bizonyos helyen térítik ki maximálisan a bazális membránt. Az alacsonyabb frekvenciájú, mély hangok eljutnak a cochlea csúcsáig, míg a magasak a bazális részen hozzák létre a legnagyobb amplitudójú kitérést, aztán elnyelődnek. Ennek egyik oka a bazális membrán feszségének és szélességének folyamatos változása a cochleán belül [3, 9]. A membrana basilaris a csiga bázisán feszes és keskeny (nagyjából 100 μm), az apikális részen azonban laza és széles (500 μm). A kitérés a hanghullám intenzitásával arányos. Ezek a tulajdonságok szabják meg, hogy hol a legnagyobb a vándorló hullám keltette kitérés, ami egyúttal azt jelenti, hogy a bazális membrán a hangok passzív frekvencia analízisét végzi [3]. További frekvencia szelektivitás növekedést és erősítést a külső szőrsejtek végeznek két reverz transzdukciós mechanizmuson keresztül (cochleáris erősítés). Az egyikért a stereocilium köteg felelős és közvetlenül a MET csatornához kötött, a másikat maga a sejttest végzi és a MET csatornák által létrehozott receptor potenciál vezérelt prestin motorra épül [4]. Ez direkt feszültség-erő konverterként működik, a

piezoelektromossághoz hasonlatosan [31]. Az intracelluláris Ca^{2+} -nak szerepe van mindkettő szabályozásában. A külső szőrsejtek ezen aktív folyamataikkal modulálják a Corti-szerv merevségét és a bazális membrán vibrációját, így befolyásolva a belső szőrsejtek auditoros információfeldolgozó funkcióját. A Deiters sejtek aktívan is hozzájárulnak a külső szőrsejtek működéséhez. Intracelluláris Ca^{2+} emelkedésre képesek összehúzódní, ami - szoros kapcsolatuk miatt - feltehetően kihat a szőrsejtekre is [10].

A belső szőrsejtekben is depolarizációt okozó MET csatornák nyitását feszültség-függő Ca^{2+} csatorna nyitás és Ca^{2+} beáramlás követi, ami transzmitter felszabadulást vált ki a bázisukon [3]. A transzmitter a glutamát, amit az afferens rostokon AMPA-receptorokat aktivál. Kotranszmitterként a glutamát mellett ATP is felszabadul. A nervus cochlearis afferens rostjainak több mint 90%-a a belső szőrsejtekhez fut (egy szőrsejt, ~10 afferens rost, minden rost csak egy belső szőrsejthez kapcsolódik), a külső szőrsejteken az efferens beidegzés dominál [3]. A külső szőrsejtek bázisán szinaptizáló mediális olivocochleáris efferens rostok a szőrsejteket hyperpolarizálják és az elektromotilitást gátolják. Szerepük a figyelemre számot tartó hangok zajos környezetben való detektálásában és diszkriminálásában valamint a túl erős hangoktól való védelemben van. A belső szőrsejteken szinaptizáló elsődleges hallóneuronok beidegzését a laterális olivocochleáris efferensek adják. Szerepük feltehetően a hang lokalizálásának pontosításában és az afferensek zajkárosodása elleni védekezésben van. Az egy belső szőrsejt ingerületét szállító afferensek a cochleáris magokban egymás mellett végződő izofrekvenciás laminákat hoznak létre [3]. Ez a tonotóp szerveződés végig jellemzi a hallópályát (4. ábra). A colliculus inferiorba befutó rostok közül néhány nem auditív terület felé halad tovább, amelyek különböző érző funkciókat irányítanak auditív bemenettel. A pálya végül a corpus geniculatum medialéból kerül a temporális lebeny Sylvius árka (fissura Silvii) mélyén található primer hallókéregbe (Brodmann 41 és 42), ami szintén több, tonotóp areából áll: a magas frekvenciák a fissura mélyén, az alacsonyok a gyrus felszínéhez közel

adnak jelet [3].



4. ábra. A tonotópiás szerveződés a hallópálya egészére jellemző

3. HALLÁSKÁROSODÁS TÍPUSOK

Az emlős hallószervben az érzéksejtek az idő előrehaladtával folyamatos pusztulásnak vannak kitéve, ugyanakkor veleszületett rendellenességeként is felléphet a hallószerv valamely részének diszfunkciója. A halláskárosodás a leggyakoribb emberi szenzoros deficit. Az Európai Unió a népességének több mint 10%-át érinti. Gyerekkorban hatással van a beszéd kialakulására, befolyásolja a kognitív fejlődést és a tanulást. Hátrányosan érinti a mindennapi életet, a munkavégzést. Súlyosabb esetben izolációhoz, depresszióhoz is vezethet [1]. Társadalmi hatásuk így igen jelentős.

A halláskárosodásokat két csoportba osztjuk, aszerint, hogy a hallórendszer mely részét érintik az elváltozások. Ha a külső- vagy középfül károsodik, azt vezetékes halláskárosodásnak nevezzük. Ezek ma már gyógyszeresen, vagy műtétiileg kezelhetők. Ha a belsőfülben, vagy a neurális vezetésben következik be a károsodás, akkor szenzorineurális halláskárosodásról (SNHL) beszélünk. Kezelésükre jelenleg nincs hatékony gyógyszeres terápia, amelynek fő oka, hogy nem ismerjük eléggé a patofiziológiájukat. A cochlea különleges struktúrája és nagyfokú érzékenysége nagyban nehezíti a vizsgálatokat.

A szenzorineurális halláskárosodások közé tartozik az időskori hallásromlás, a presbycusis. Patológiájában feltehetőleg az ischaemia és a reaktív oxigénszármazékok (ROS) megnövekedett szintje játszik fontos szerepet. Kiválthatják a hallásvesztést egyes ototoxikus mellékhatású gyógyszerek is. Irreverzibilis halláskárosodást okozhatnak az aminoglükozid antibiotikumok (pl. kanamicin, gentamicin, sztreptomycin, amikacin, tobramicin), melyek alkalmazása ugyanakkor egyes bakteriális fertőzésekben (meningitis, szepszis, tuberkulózis) elkerülhetetlen. Az aminoglükozidok egy többlépcsős folyamat során kerülnek be a Cortiszerv szőrsejtjeibe. Itt a fémionokkal kelát komplexet képeznek, amelyek redox-aktívak, reaktív oxigénszármazékokat generálnak. A ROS-ok oxidáció útján károsítják a biomolekulákat. Gátolják az ion- és MET csatornákat és növelik az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt is. Mindezek eredményeként a sejtek apoptotikusan károsodnak. Az aminoglükozidok ototoxikus mellékhatásai dózisfüggők, ugyanakkor hosszabb, magas dózisú kezelés abbahagyása után is folytatódhat a szőrsejtkárosító hatás [11].

Közismert, hogy a nagy intenzitású zaj is halláscsökkenéshez, sükettséghez vezethet. A szőrsejtek stereociliumai fizikailag elpusztulhatnak egy hirtelen, nagy erejű hanghatás következtében (pl. egy robbanás során). Egy tartósabban fennálló inger esetén a sejtekben megnő a ROS szint, aminek károsító hatását a stria vascularis ereinek erős zajban

megfigyelhető beszűkülése miatt fellépő ischémia tovább fokoz. A sejtek apoptotikus és nekrotikus sejthalállal elpusztulnak [12].

A halláskárosodások genetikailag is öröklődhetnek. Előfordulnak mind domináns, mind recesszív formában, esetleg X-kromoszómához kapcsoltn. Eddig több mint 100 génről derítették ki, hogy szerepet játszhatnak a halláskárosodások különböző fajtáinak kialakulásában [13].

Születés közbeni oxigénhiány, vagy az anya terhesség alatti rubeola vagy szifilisz fertőzése, esetleg az újszülötteknél jelentkező sárgaság hosszabb idejű fennállása szintén növeli a halláskárosodás vagy teljes sükettség kialakulásának veszélyét.

4. A PURINERG RECEPTOROK

Az élő szervezetekben a nukleotid-vegyületek, melyek általánosan egy purin- vagy pirimidin-vázis szerves bázisból, egy öttagú cukormolekulából, illetve foszfátcsoportból, csoportokból épülnek fel, szerteágazó szerepkörrel rendelkeznek. Részt vesznek a nukleinsavak felépítésében (DNS, RNS), s ezáltal a genetikai információ tárolásában, az elektrontranszportban (pl.: nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+), nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP^+)), különféle enzimek, receptorok aktiválásában, de nélkülözhetetlenek a sejtek energiaháztartásában (adenozin-5'-trifoszfát (ATP)), illetve a többsejtűek szignalizációs folyamataiban is (pl.: ATP, mint transzmitter).

A továbbiakban ez utóbbi, szignalizációs szerepüket tárgyaljuk részletesebben. Ez a funkció elsődlegesen a purin-nukleotidokhoz kapcsolódik, megnevezésére ezért a purinerg rendszer kifejezést használják. Megjegyzendő azonban, hogy az ún. purinreceptorok, eltérő affinitással bár, de pirimidin-nukleotidokra is érzékenyek lehetnek.

A nukleotid-vegyületek extracelluláris jelenlétét és szerepét először – kutyák, macskák és tengeri malacok kardiovaszkuláris rendszerét tanulmányozva – Drury és Szent-Györgyi Albert írta le 1929-ben [22]; a purinerg transzmisszió elmélete pedig 1972-ben látott napvilágot [23]. A későbbi kutatások bebizonyították, hogy a sejtmembránokon jelen vannak az intracelluláris nukleotidokra specifikusan érzékeny receptorok. Ezek egyaránt megtalálhatók a gasztrointesztinális rendszerben, az izmokban, az epitheliális sejtekben, a húgyhólyagban, a központi- és a perifériás-idegrendszerben, ugyanakkor szerepet játszanak az immunrendszer működésében is. A perifériás-idegrendszerben serkentő vagy gátló neurotranszmitterként is szerepelhetnek, egyaránt szabályozva a sima- és harántcsíkt izmok Ca^{2+} -függő összehúzódását, elernyedését. A központi-idegrendszerben kotranszmitterként, neuromodulátorként szabadulhatnak fel, más neurotranszmitterek kíséretében, és

befolyásolhatják az általuk kiváltott fiziológias vagy patofiziológias válaszokat [24]. Különösen fontos szerepet játszanak a gliasejtek működésében. Az asztrociták között terjedő Ca^{2+} -hullámok fő irányító molekulái; egyéb faktorok mellett a neuron-gliasejt közötti reciprok jelátvitel hírvivői, de nélkülözhetetlenek a mikroglia proliferáció és migráció szabályozásában is [24].

Az ATP és más nukleotidok szekréciós és szinaptikus vezikulumokban tárolódnak, összegyűjtésüket a Cl^- -függő vezikuláris nukleotid transzporter végzi, amely egyaránt felismeri az ATP-t, a GTP-t (guanozin-5'-trifoszfát) és az ADP-t (adenozin-5'-difoszfát) [24]. Az ATP-ről feltételezik, hogy, bár eltérő koncentrációban, de jelen van minden szinaptikus-, szekréciós-vezikulumban. A vezikulumok ürülése után a purin-vegyületek igen gyorsan enzimatisz degradáción esnek át, melyet az ektonukleotidázok végeznek [24, 26, 27]. A bontás következtében előálló metabolikus termékek azonban továbbra is a purinerg receptorok ligandjaiként viselkedhetnek (pl. az ATP-ből keletkező ADP, a GTP-ből származó GDP). Az ATP végső bomlásterméke, az adenzin, a P1-típusú purinerg receptorok legfőbb endogén aktivátora. Megjegyzendő, hogy a jelátvitelben szerepet játszó adenzin nemcsak bomlásból származhat, hanem egyes sejtek (neuronok, asztrociták) direkt szintetizálhatják [24].

Purinerg membránreceptorok

A purinerg membránreceptorok népes családját két csoportra szokás osztani, a P1 és P2 receptorokra (5. ábra).

P1 receptorok

A P1 receptorok az adenzin G-protein kapcsolt receptorai. Négy típusuk ismert: A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$, A_3 . Az A_1 és A_3 receptorok $\text{G}_{i/o}$ – típusú G-proteinekkal kapcsoltak, ezért aktiválásuk gátolja a sejtben a ciklikus-adenozin-monofoszfát (cAMP) képződését [24]. Az $\text{A}_{2\text{A}}$ és $\text{A}_{2\text{B}}$ receptorok aktiválása ezzel épp ellentétes eredményre vezet: a ligandkötés G_s típusú proteinek közbeiktatásával a cAMP szint emelkedését okozza [24].

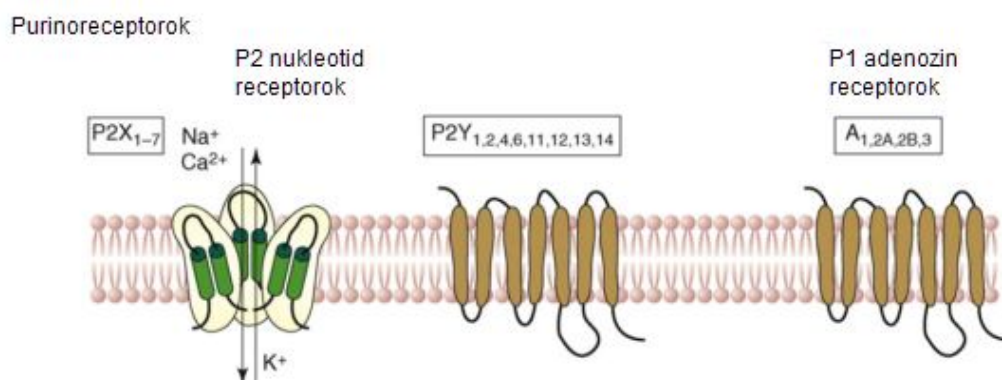
P2X receptorok

A P2X receptorok ionotróp membránreceptorok, melyek nem-szelektív kationcsatornaként funkcionálnak (extracelluláris purin nukleotid (pl. ATP) megkötésekor Ca^{2+} , Na^+ , és K^+ - ionokkal szemben egyaránt áteresztővé válnak). A P2X receptorok trimerek,

három alegység alkotja őket. Hat altípus képes homotrimereket alkotni. Az így képződött receptorok állhatnak ugyanolyan alegységekből, ezzel homotrimer csatornákat alkotva. Ilyenek a P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ és a P2X₇ receptorok. A heterotrimerek alkotásában többféle alegység vesz részt, így alakulhatnak ki a P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6}, P2X_{4/6} és P2X_{4/7} receptorok [24, 25]. A homomer P2X₇ receptort csak 100-1000 μ M ATP képes aktiválni, fő feladata az apoptózis indukálása a megnövelt intracelluláris Ca²⁺ szint előidézésével. A többi típus már 1-10 μ M ATP hatására is áteresztővé válik [25]. A különböző altípusok sejt- és szövetfüggően más-más mennyiségben expresszálódnak a sejtmembránban. A posztzinaptikusan elhelyezkedő P2X receptorok több más ionotróp receptorral is kapcsolatban lehetnek. Ca²⁺-permeabilitásuk révén fontos szerepet játszanak a fiziológiás és patofiziológiás folyamatokban [25].

P2Y receptorok

A P2Y receptorok a G-protein-kapcsolt, hét transzmembrán doménnel rendelkező, metabotróp receptorok közé tartoznak. A kapcsolódó G-proteinek típusa alapján két alcsoportba osztják őket [24]. Az első alcsoportba a P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ és P2Y₁₁ receptorok tartoznak. Ezekhez G_q/G₁₁ típusú G-proteinek kötődnek, melyek a foszfolipáz C aktiválásával az inozitol-1,4,5-trifoszfát – diacil-glicerol (IP3/DAG) jelátviteli útvonalon át az intracelluláris Ca²⁺ szint növekedését idézik elő, mivel az inozitol-trifoszfát mobilizálni képes (IP3-receptor) az endoplazmatikus retikulumban tárolt, nagy mennyiségű Ca²⁺-ot [4, 24]. A második alcsoportba a P2Y₁₂, P2Y₁₃ és P2Y₁₄ receptorok tartoznak. Ezekre a G_{i/o} kötődés a jellemző, minek következtében aktiválódásukkor gátolják az adenilát-cikláz enzimet (a cAMP szint csökken), illetve negatívan befolyásolják más receptorok működését. A P2Y receptorokra jellemző továbbá, hogy más G-proteinekkel is képesek kapcsolódni, valamint az, hogy már az embrionális élet során megjelennek a központi idegrendszer neuronjaiban és gliasejtjeiben [24]. Agonistái nemcsak adenozin-, hanem uracil-nukleotidok is lehetnek.



5. ábra. Purinerg receptorok és szerkezetük

TRENDS in Neurosciences

Előfordulnak homo- és heterodimer formában, valamint más receptorokkal is kapcsolódhatnak.

Purin receptorok szerepe a hallásban

Mind a halló-, mind az egyensúlyozó szervben megtalálható a P2X és P2Y receptorok minden típusa [4, 26]. A belső fülben fő agonistájuk az ATP, melynek szerepe van a mechanotranszdukción, a kémiai ingerületátvitel és az alakváltozással együtt járó mechanikai változások szabályozásában, valamint védelmi feladata is jelentős. Akusztikus túlingerlés, zaj, ischaemia, ototoxikus drogok hatása esetén az endolympha átlagos nanomoláris ATP szintje mikromoláris koncentrációt ér el. Az ATP több helyről szabadulhat fel. A stria vascularis marginális sejtjeiben elektronmikroszkóppal megfigyelhető, a felszíntől 2-4 μm -re található vezikulák adenin nukleotidokkal, részben ATP-vel, „pötytyözöttek” [26]. ATP forrásként szolgálnak a Corti-szerv támasztó- és szőrsejtjei is. A támasztósejtekből connexin és pannexin típusú hemicsatornákon keresztülráramolhat ki az ATP. Ezek a csatornák vesznek részt a támasztósejtek közti gap junctionok kialakításában is, melyek lehetővé teszik az ionok [4, 28], és más kisebb (1 kDa alatti) molekulák áramlását, így a nukleotidokét is. Továbbá ATP a környező epithel sejtjeiből is kerülhet az endolymphába exocitózissal, anioncsatornán át, és más, még nem definiált módon, növekvő ozmotikus vagy mechanikus stressz hatására [26].

Az endolymphetikus ATP szint növekedés a scala mediát bélelő sejtek (Reissner-membrán), a külső szőrsejtek és a külső sulcus sejtek apikális felszínén levő P2X₁ és P2X₂ receptorokat aktiválja, amelyek az endolymphetikus K⁺ koncentráció szabályozásában játszanak szerepet. A scala media ATP szintjének növekedése gyors, reverzibilis potenciál esést okoz, ahogy a receptorok permeábilissá válnak a kationokra. A csökkenő K⁺ szint meggátolja az érzéksejtek túlingerlődését, azaz – mintegy védekezésként - csökken a hallás érzékenysége. Folyamatos zaj hatására megnő a P2X₂ receptorok expressziója is [26].

A külső sulcus sejtek egy ATP-érzékeny csatorna segítségével is abszorbeálnak kationokat. Az ATP-érzékeny csatorna fenntartja az alacsony Na⁺ és Ca²⁺ szintet az endolymphában, így még jobban csökkenti a sejtek túlingerlésének esélyét [26].

A külső és belső szőrsejteken is főként P2X₂ receptorokat írtak le eddig, amelyek a sejtek depolarizációjában vesznek részt [26, 27]. Megnövekedett extracelluláris ATP szint hatására a külső szőrsejtben a befelé irányuló ionáramok megváltoztatják az elektromotilitást, ami elősegíti erősítő hatásukat (ld. fentebb). Az érzéksejteken továbbá jelen vannak P2Y₁, P2Y₂ és P2Y₄ receptorok is. A támasztó sejtekben a P2X alcsalád tagjai dominálnak, amelyek a gyors mechanikai struktúra változást teszik lehetővé. Ugyanakkor a

pillér, Deiters és Hensen sejteken expresszáldó P2Y₄ receptorok tovább növelik az intracelluláris Ca²⁺ szintet egy-egy stimulus alkalmával [4, 27].

Az ATP ezenkívül hatással van a kémiai ingerületátvitelre is. Az endolymphából átdiffundálva a perilymphába, a P2X receptorokon keresztül hatva erősítik vagy gyengítik a szörsejtek transzmisszióját. A spirál ganglion sejtek szörsejtekhez futó dendritjein elsődlegesen P2X₂ és P2X₇ receptorok találhatók. Ezek agonistái direkt módon aktiválják az afferens rostokat, így a hangolás kevésbé lesz finom, szélesedik az ingerületbe jövő neuronok köre. A P2Y receptorok a spirál ganglion sejtek szómáján találhatók, és segítik a neuronok depolarizációját [27].

5. AZ ELEKTROPORÁCIÓ

Az elektroporáció napjainkban széleskörűen használt technika. Általánosságban a géntechnológiához kötik, mint idegen DNS egyik lehetséges beviteli módját egy prokariota vektorba. Ugyanakkor izolált eukaryota sejteket is gyakran elektroporálnak, hogy bizonyos enzimeket, antitesteket, biológiai reagenseket, makromolekulákat, vírusokat vagy egyéb részecskéket vétessenek fel velük és intracelluláris vizsgálatokat végezhesse rajtuk. Újabban nem csak a sejtek, de a szövetek elektroporációs lehetőségeit is elkezdtek vizsgálni, amely olyan potenciális lehetőségeket rejt magában, mint a daganatok kemoterápiája, a gén terápia, a transzdermális (bőrön át adható) gyógyszeradagolás vagy esetleg egy nem invazív mintavételi eljárás biokémiai mérésekhez.

Történeti áttekintés

Az elektromos mező befolyása a sejtmembrán konduktivitására már az 1940-es évek óta ismert. 1943-ban Goldman *Chara australia-val* folytatott kísérletei során a hiperpolarizált membránon egy gyorsan lezajló vezetőképesség növekedést figyelt meg [14], mely jelenség igen hasonló volt ahhoz, amit membránok dielektromos bontása közben korábban már leírtak. A jelenség visszafordítható volt. A sokszor ismétlődő potenciálváltások nem változtatták meg a membrán karakterisztikáját. 1967-ben és 1968-ban Sale és Hamilton két cikke [15, 16] arról számolt be, hogy élesztők, baktériumok és vörösvérsejtek membránja intenzív elektromos pulzusok hatására kiszakadhat. A kutatók felvetették, hogy az elektromos mező a membrán-komponensek konformációjának megváltoztatása által lokális lízist okoz, egyúttal megbecsülték azt a transzmembrán potenciált, ahol ez bekövetkezik. Neumann és Rosenheck úgy találta, hogy a nyugalmi transzmembrán feszültség szint felett a chromaffin granulomok

szívárogtatni kezdik ATP és katekolamin tartalmukat [17]. Ezt a jelenséget elektropermeabilitásnak nevezték el, utalva az áteresztőképesség változására elektromos pulzusok hatására. Ezek után intenzíven kezdték tanulmányozni az elektromos mező hatását emberi vörösvérsejteken. Bizonyították, hogy az elektromos mező elsődlegesen pórusokat alakít ki a membrán felszínén. Kinosita és Tsong munkássága mutatott rá, hogy a pórusok képesek visszazárni, és a bekerült molekulákat benntartani a citoplazmában [18]. Ezután a figyelem a pórusképződés (még ma sem megfejtett) mechanizmusára terelődött, ugyanakkor megkezdődött az elektroporáció gyakorlati alkalmazása. 1982-ben Neumann írta le azt a módszert, melyben elektroporációval vitt be transzformált gént eukarióta sejtbe [19].

Elméleti háttér

Normális élettani körülmények között a plazmamembrán barrier szerepet tölt be, elszigetelve a sejtet a külvilágtól. A membránok kettős lipid rétegből állnak, amelyben a lipid molekulák hidrofób részei egymás felé, hidrofil részei pedig az extra- vagy intracelluláris tér felé néznek. Ebbe a lipid membránba fehérje molekulák ékelődnek, vagy teljesen átérve (transzmembrán fehérjék) vagy csak részlegesen belemerülve a kettős lipid rétegbe. A membrán átjárhatatlanságának következtében az anyagforgalom jelentős része különböző transzportereken, carrier-eken keresztül zajlik.

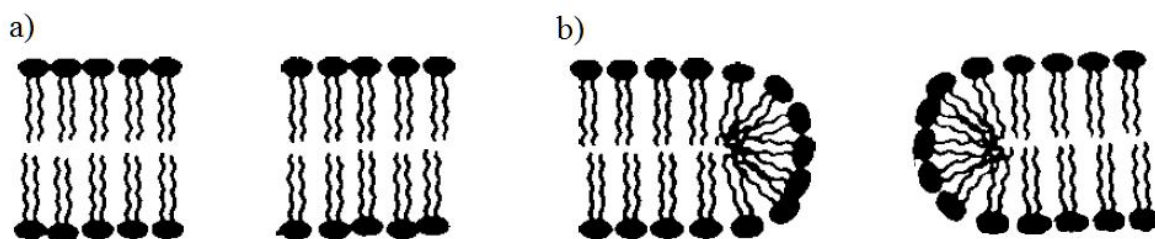
Elektroporáció során rövid elektromos pulzus (μs - ms) éri a sejtet. Tapasztalati eredmények szerint ennek hatására bizonyos típusú, töltéssel rendelkező membránalkotók szerkezeti átrendeződésen mennek át, a felületi potenciálok megváltozásával nő a membrán két oldala közötti potenciálkülönbség (eléri a 0,5-1,5 Voltot), ami egyes helyeken képes pórusok nyitására. Ezzel megnő a sejt áteresztő képessége, így akár olyan nagy méretű molekulák felvételére is képes lesz, mint egy DNS molekula [19]. A pórusok nyitásakor az anyagok kémiai gradiensüknek megfelelően, diffúzióval áramolnak be a sejtbe, illetve ki a sejtből, ugyanakkor az áramimpulzus töltés függő irányban viszi a töltéssel rendelkező anyagokat. A pulzus és a membrán tulajdonságai együttesen határozzák meg a beavatkozás végkifejletét: a pórusok visszazáródhatnak, ekkor a sejtmembránban nem keletkezik maradandó, életképességet csökkentő elváltozás (reverzibilis elektroporáció), de megtörténhet az is, hogy a pórusok záródása nem tökéletes, maradandó átrendeződések mennek végbe a sejtmembrán komponensei között, esetleg azonnali lízis is bekövetkezik (irreverzibilis elektroporáció) [20].

Az elektroporációt magyarázó teoretikus modellek közül napjainkban a pórus képződés sztohasztikus modelljei képesek értelmezni a kísérleti tapasztalatokat vagyis, hogy a

mesterségesen előállított kétrétegű, csak lipid molekulákból álló membránban egy kritikus transzmembrán feszültség fölött a lízis valószínűsége különösen nagy lesz.

Az elektromos tér a membrán minden pontjában laterális erőket eredményez, amelyek a membránt összetartó erőkkel szemben dolgoznak, és pórus keletkezéséhez vezethetnek elegendően erős tér esetén.

A szimulációk segítségével atomi szinten is kutatják az elektroporáció dinamikáját. A szimulációk visszaadják a kísérleti eredmények jelentős részét, ami azok megbízhatóságát támasztja alá. Ilyen szimulációkból tudjuk, hogy a kritikus elektromos mező (0.36-0.7V/nm) felett kör alakú pórusok keletkeznek a membránban [21]. A pórusok néhány nanoszekundum alatt kialakulnak. Először, a membrán mindkét rétegében lévő, poláris fejcsoportok kissé elfordulnak. Ezután előpórusok formálódnak, amelyek 3-4 lipid fejcsoportot és számos vízmolekulát tartalmaznak. Végül kialakulnak a pórusok, amelyek falát poláris fejcsoportok borítják. Vagyis a kezdeti átrendeződések hidrofób pórusokat hoznak létre, amelyek szinte azonnal stabilabb hidrofil pórusokká alakulnak át [20, 21] (6. ábra). A nagyobb molekulákat átengedő másodlagos pórusok valószínűleg az elsődleges pórusok bővülésével, a nyomás-áramlás változás miatt alakulnak ki, mert a pulzus ráadása után viszonylag több idő telik el megjelenésükig. A pórus kialakulás során lipid molekulák szabadulnak ki a lipid matrixból az extra- és intracelluláris térbe [21].



6. ábra. Elektroporáció során először instabil hidrofób pórusok (a)) keletkeznek a kettős lipid membránban, melyek szinte azonnal energetikailag stabilabb hidrofil pórusokká (b)) alakulnak

Bár a szimulációk és modellek segítségével sok kérdésre fény derült a membrán átrendeződésekkel kapcsolatban, ugyanakkor az elektroporáció során a pórusok kialakulásának menete valamint a membrán helyreállítási folyamatainak mikéntje még korán sem tekinthető tisztázottnak.

6. OPTIKAI INDIKÁTOROK

A sejtszintű funkcionális imaging vizsgálatok során alapvető, hogy a vizsgálandó változásokat nagy érzékenységgel tudjuk detektálni. Ehhez megfelelő molekuláris indikátorokat, mikroszkópokat, optikai filtereket, fotodetektorokat kell kiválasztanunk.

Az optikai indikátoroknak több fajtája is ismert. Általánosságban a sejt egyes paramétereinek változásával változtatják optikai tulajdonságaikat (emissziójuk, abszorpciójuk mértékét). Az elérhető indikátorok között találhatunk membránpotenciál érzékeny festékeket, amelyek a sejt membrán potenciál változásait érzékelik. Két csoportra oszthatók: a lassan reagálók sejt permeábilisak, a gyorsan reagálók viszont amfipatikus molekuláikkal beékelődnek a sejtmembránba. Fényemissziójuk intenzitása lineárisan követi a membrán potenciál változásait [29].

Más indikátorok bizonyos ionokra érzékenyek. Amikor a megfelelő kémiai csoportjukkal megkötik az adott iont megváltozik optikai tulajdonságuk. Tipikusan ilyen festékeket használnak a H^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- és a Ca^{2+} koncentráció változásainak megfigyeléséhez [29, III]. Jelenleg a Ca^{2+} indikátorok használata a legjobban kidolgozott és a legszélesebb körben elterjedt.

Ca^{2+} érzékeny indikátorok

A Ca^{2+} érzékeny festékek, olyan Ca^{2+} kelátorok, amelyek optikai tulajdonságaikat változtatják Ca^{2+} kötése során. A legmodernebbek kelátorként BAPTA-t [1,2-bis(o-amino)etán-N,N,N',N'-tetraacetil savat] használnak különböző fluorofor molekulákkal konjugálva. A BAPTA alapú kelátoroknak nagyon jó a Ca^{2+} specifitásuk, fiziológias körülmények között nem szelektívek Mg^{2+} -ra, sem H^+ -re és Ca^{2+} affinitásuk kevésbé érzékeny a pH változásokra [29, III]. Jellemző rájuk az a hullámhossz tartomány amelyen abszorbeálják ill. emittálják a fényt [29, III]. Ca^{2+} kötő képességüket jellemzi a disszociációs állandójuk (K_d), mely az a Ca^{2+} koncentráció, ahol a festék molekulák 50%-a ionkötött formában van. Fluoreszcenciájuk megközelítőleg lineárisan változik az $[Ca^{2+}]_i$ függvényében, amennyiben annak értéke a K_d érték 0.1-és 10-szerese közti tartományban van. Nem-lineáris a válasz az e tartomány feletti és alatti $[Ca^{2+}]_i$ esetében. Ennek következtében a festék kiválasztásánál szempont, hogy a mérendő $[Ca^{2+}]_i$ tartományhoz igazodjon az adott festék K_d -je. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -hoz közeli K_d -jú festékekkel a kisebb Ca^{2+} emelkedéseket, a magasabb K_d -vel rendelkező, azaz kisebb affinitású, festékekkel a nagyobb és gyorsabb Ca^{2+} válaszokat tudunk mérni. Az emittált fény intenzitása függ az adott időpillanatban Ca^{2+} -ot kötő és nem kötő indikátorok számától és a festék fluorofor részének fizikokémiai tulajdonságaitól.

Az egy hullámhosszon gerjeszthető illetve emittáló indikátorok mellett ismerünk két hullámhosszú, úgynevezett ratio festékeket is. Ezek a kettős excitációjú ill. a kettős emissziójú festékek. A legismertebb kettős gerjesztésű Ca^{2+} indikátor a Fura-2. Ca^{2+} kötött formája 340, szabad formája 380 nm hullámhosszú fénnel gerjeszthető optimálisan [III]. A két gerjesztési

hullámhosszon külön-külön mért emittált fényintenzitás hányadosát képezve a gerjesztő fény változásaitól, a festékkoncentrációtól, az esetleges fimon mozgásoktól relatíve függetlenül jellemezhetjük az intracelluláris Ca^{2+} változását. Megfelelő kalibráció után az abszolút $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értéket is kiszámolhatjuk.

A fluoreszcens indikátorok alkalmazásának egyik sarkalatos pontja a festékek sejtbe juttatása. Alkalmazhatjuk a legegyszerűbb módszert, amikor a poláros festékmolekulákat apolárossá tesszük egy acetoximetil (AM) csoport hozzákapcsolásával [III]. Az ilyen festéket tartalmazó pufferban fürdetett sejtek felveszik a festéket (tömeges töltési eljárás) majd aspecifikus észterázaikkal lehasítják az észterkötéssel odakapcsolt AM csoportot, miáltal a festék molekula csapdába esik a sejtben. Az eljárás hátránya, hogy válogatás nélkül festi a sejteket és alapos átmosás ellenére is relatíve sok festék marad a sejtközi térben. Ennek következménye a rosszabb jel-zaj arány és a szomszédos sejtekből átszóródó fény, ami kisebb térbeli felbontást és alacsonyabb érzékenységet eredményez. Ezek a hátrányok kiküszöbölhetőek a vizsgálni kívánt sejt indikátor festéket is tartalmazó mikropipettával történő megszúrásával (patch clamp). A módszer hátránya, hogy nehezebben kivitelezhető és hosszabb időt igényel a festék bediffundálása. Emiatt kevés sejt feltöltésére ad módot és a pipetában lévő puffer a sejt belsejét, többek között az ott lévő hírvivő molekulákat is kimossa. A két módszer előnyeit ötvözi bizonyos tekintetben az elektroporációs indikátortöltés. Alkalmazásával gyorsan és szelektíven tölthető egy preparátumban több sejt is, ami biztosítja a jó jel-zaj arányt és a sejt intracelluláris miliójének érintetlenségét is. A módszert eredményesen használják akut agyszelet preparátumon [30], de kifejlett hallású egerek hemicochlea preparátumán történő alkalmazását még senki sem írta le. *Munkánkban ennek a módszertani beállítására vállalkoztunk.*

III. CÉLKITŰZÉSEK

A Corti-szerv egyes sejtjeinek élettani és kórélettani működését döntően még nem halló – és ezért elsődlegesen fejlődésbiológiai kérdések vizsgálatára alkalmas – egerekből nyert preparátumokon tanulmányozzák, holott a halláskárosodások legtöbbje a hallás kifejlődése után következik be [1].

Az akut hemicochlea preparátum lehetőséget ad rá, hogy – a szöveti struktúra megőrzése mellett – halló egerek cochleáján végezzünk kísérleteket [1]. Ezt a preparátumot funkcionális imaging vizsgálatokhoz azonban eddig még nem alkalmazták.

Célunk volt, hogy az agyszeleteken már sikerrel alkalmazott elektroporációs indikátor töltés [30] módszerét beállítsuk kifejllett hallású egerek Corti-szerv sejtjeinek festésére is. Ennek érdekében meg kívántuk vizsgálni, hogy:

1. kifejllett hallású egerek hemicochlea preparátumán (> P15) alkalmazható-e a módszer,
2. többféle kalcium indikátor bevitelére is alkalmas-e,
3. a Corti-szerv minden sejt típusa feltölthető-e vele,
4. a módszer a kísérleteink elvégzéséhez szükséges ideig biztosítja-e a megfelelő indikátor töltöttségi állapotot,
5. az elektroporációval festett sejtek megőrzik-e funkciójukat és reagálnak-e élettani ingerekre (esetünkben ATP adására).

Amennyiben a módszerrel hatékonyan, különösebb sejtkárosítás nélkül, szelektíven juttathatunk megfelelő mennyiségű indikátort a Corti-szerv különböző típusú sejtjeibe, egy olyan eszköz lesz a kezünkben, amellyel a purinerg jelátvitel cochleáris működésben játszott szerepén túl vizsgálni fogjuk tudni a SNHL-ek patofiziológiáját genetikailag módosított, emberi halláskárosodások modelljeként szolgáló egerekben is.

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteink az Intézeti Etikai Kódex szabályai szerint készültek, amelyek figyelembe veszik az állatkísérletekre vonatkozó hatályos törvényt [243/1998. (XII. 31.) Kormányrendelet].

A hemicochlea preparátum elkészítése

A kísérletekhez már kifejlett hallású, 15-27 napos, CD1-es törzshöz tartozó egereket használtunk. Az állatokat először 2 ml izofluránnal elbódítottuk, majd dekapitáltuk, eltávolítottuk a fejbőrt és a foramen magnumon keresztül történő midsagittális metszéssel kettészeltük a koponyát. Az agyféltekék eltávolítása után a láthatóvá vált cochleákat leválasztottuk a sziklacsontokról. A látható idegektől, kötőszöveti feleslegtől való megtisztítás után vibratommal (Vibratome 3000, Ted Pella Inc.) kettévágtuk a csigát, mégpedig úgy, hogy a félkörös ívjáratokat egy vékony kartonlappal megemeltük, így a modiolus párhuzamossá vált a tálca síkjával.

A preparálás és a kísérlet alatt a cochleát és hemicochleát nátrium-glükonátos szörsejtoldatban (NaCl 22,5 mM, KCl 3,5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10mM, glükóz 5,5 mM, Na-glükonát 120mM) tartottuk, amelyet 100% O₂-vel buborékoltattunk. A preparátum készítése során az oldatot jeges közegben tartottuk.

Az elektroporációs technikával történő festés

Az elkészült preparátumot Olympus BX50WI epifluoreszcens mikroszkópba helyeztük. A Corti-szerv érző- és támasztósejtjeinek vizualizálása ferde megvilágítást alkalmazva, 40x-es, víz immerziós objektívvel történt. A sejtek membránjához mikromanipulátorral (Burleigh) boroszilikát üveg pipettát (4-6 MΩ) érintetünk, mely Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) vagy Fura2/K⁺ Ca²⁺ érzékeny fluoreszcens festéket tartalmazott. A festékeket desztillált vízben oldottuk fel; végkoncentrációjuk 1 mM volt. 10 ms-os elektromos pulzussal nyitottunk pórusokat a sejten, amelyekbe így beáramolhatott a festék. Az elektromos erőter létrehozásához a pipettában húzódnó differens és a kamrában levő indifferens elektródnak a folyadékterekben át kapcsolatban kellett állnia egymással. Az impulzus optimális áramerősségét 10μA-nek találtuk. A sejt feltöltődésének menetét, és ez utáni alakulását fluoreszcens mikroszkóp üzemmódban követtük.

Az Ca^{2+} koncentráció változásának megfigyelése

A kísérletek szobahőmérsékleten folytak, a preparátum mindvégig O_2 -vel buborékolgatott nátrium-glükonátos szörsejtoldatban fürdött. A perfúzió sebessége 3 ml/ perc volt.

A megfestett sejt(ek) állapotának rögzítése céljából a kísérlet előtt és után is ferde megvilágítású képsorozat készült vertikális irányban a preparátumról. A fluoreszcens vizsgálatokban a sejtekbe juttatott OGB-1 és Fura2/ K^+ festékeket 494 ill., 340/380 nm-en gerjesztettük (TILL Polychrome I monokromátor). A detektálás 523 ill. 510 nm-en történt. Legalább 3 perces alapvonal felvétel után (10 s-onkénti exponálás) adtuk az ATP-t 30 s-on keresztül, 25-100 μM koncentrációban. Az ATP-stimulus alatt a felvételek 2 s-onként készültek. Ismételt ingerlés esetén legalább 10-15 percet vártunk az ATP okozta deszenzitizáció elkerülésére.

A kísérletek értékelése

Az online rögzített adatokat offline értékeltük Axon Imaging Workbench 4.0 programmal. Ennek során visszajátszottuk a kísérlet alkalmával rögzített képeket, és felvettük az egyes sejtek időben változó intenzitásának görbáját.

Az egy hullámhosszon gerjesztett OGB-1 indikátorral festett sejtek esetében a nyers fluoreszcencia értékekből az intracelluláris Ca^{2+} változásokat jellemző normalizált fluoreszcencia változást a $\Delta F/F = (F-F_0)/F_0$ értékkel adtuk meg (ahol F_0 a stimulus előtti, az F pedig a stimulus utáni aktuális fluoreszcencia)

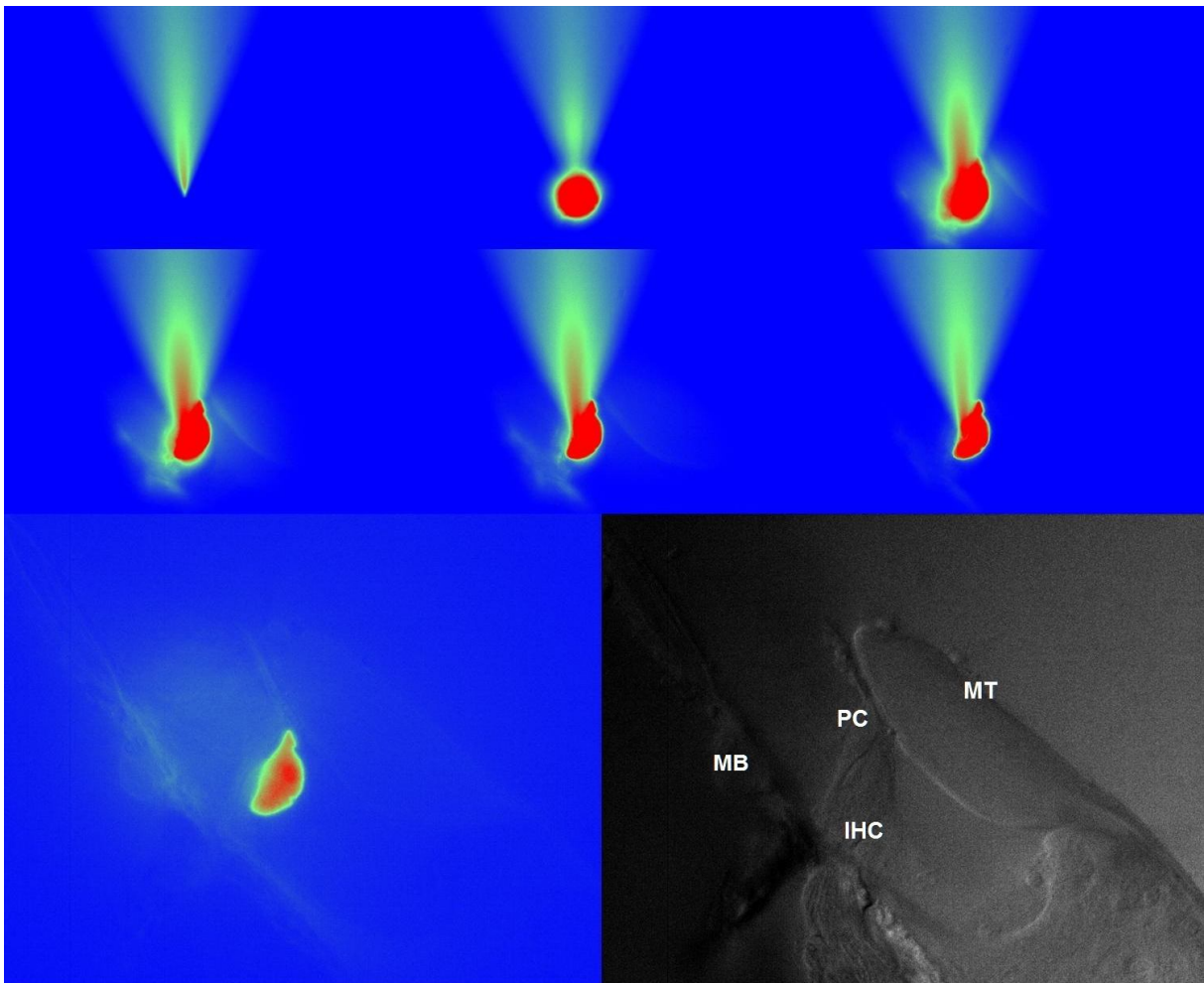
A Fura2/ K^+ ratiometrikus festékkel jelölt sejteken, a 340 és 380 nm-es gerjesztések mellett detektált fényintenzitások hányadosával, az un. ratio értékkel jellemeztük a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat.

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Munkánk során funkcionális imaging vizsgálatokat végeztünk kifejllett hallású egerekből készített hemicochlea preparátum Corti-szerv sejtjein, melyeket az általunk beállított elektroporációs módszerrel festettünk meg Ca^{2+} indikátorokkal.

Megközelítés és pipetta paraméterek

A kiválasztott sejteket mikromanipulátor segítségével közelítettük meg. A megközelítés módját tapasztalati úton határoztuk meg. A speciális anatómiai struktúra miatt ugyanis a pipetta elakadás nélküli útját befolyásolják a Corti-szerv egyes struktúrái (membrán elemek, lamina reticularis). A legmegfelelőbb megközelítés a függőleges irányból történő „ráereszkedés” a sejtre, majd a sejtmembrán benyomása diagonális irányból. A túl magasról



7. ábra. Belső szőrsejt elektroporációs töltése Ca^{2+} érzékeny festékkel kifejllett hallású egér hemicochleában. A képsorozat mutatja, hogy a megfelelően pozicionált pipettából áramimpulzusra (10 μA , 10 ms) a festék (1mM OGB-1) szelektíven a célsejtbe diffundál. Az extracelluláris tér háttérfestődése elhanyagolható és a folyamatos puffer perfúzió ezt is kimossa. (IHC, belső szőrsejt; PC, pillérsejt; MB, membrana basilaris, MT, membrana tectoria)

kezdet diagonális irányból való megközelítés elakadást eredményezhet a membrán struktúrákban, a lamina reticularisban, és a mikrotubulus gazdag pillérsejtekben. A pipettának egyértelműen hozzá kell érnie a sejthez, enyhén be kell nyomnia a membránját, különben a festék nem a sejtbe, hanem a környező területre lövell ki; időlegesen ellepi a sejt felszínét azt az illúziót keltve, hogy a megfestés sikeres volt. Ekkor viszont a festék 2-3 percen belül lemosódik a sejt felszínéről, ellentétben a ténylegesen sikeres festéssel, amikor is a festék akár 40-60 percig láthatóvá teszi a sejtet.

A pipetta elvételekor a függőleges irányú lassú felemelkedés az, ami a legkevésbé károsítja a sejtet, nem szakítja ki a membránt és nem mozditja el az eredeti helyéről (a pipetta, diagonális irányú eltávolításakor, hajlamos maga után „húzni” a sejtet).

A festéshez 4-6 M Ω ellenállású, boroszilikát üvegpipettákat használtunk. Munkánk során azt tapasztaltuk, hogy a pipettába bekerülő kisebb szennyeződés, buborék, vagy a szájára tapadt kevés sejtmembrán nem gátolta a következő sejt megfestését.

Az áramimpulzus paramétereinek beállítása és a festékkoncentráció

A pipetta megfelelő pozicionálása után áramimpulzust adtunk, melynek hatására a sejtmembránon pórusok nyíltak és a pipettában levő festék diffúzióval ill. – töltött molekula lévén – a rá ható elektromos tér erő hatására bejutott a sejt belsejébe (7. ábra). Az impulzus paramétereinek beállításánál elsődleges szempontunk a sejt minimális károsítása volt. A túlzottan nagy áramerősség, vagy hosszú ideig tartó stimulus irreverzibilisen megváltoztathatja a sejtmembrán szerkezetét, ami végső esetben a sejt idő előtti halálához vezet. Ugyanakkor nem csökkenthettük az időt valamint az erősséget túlságosan, hogy a pórusok nagysága, illetve nyitási ideje lehetővé tegye elegendő mennyiségű festék bejutását a sejtbe. Ezen okok folytán a festékkoncentráció és az áram impulzus paramétereinek beállítása szorosan összefügg egymással.

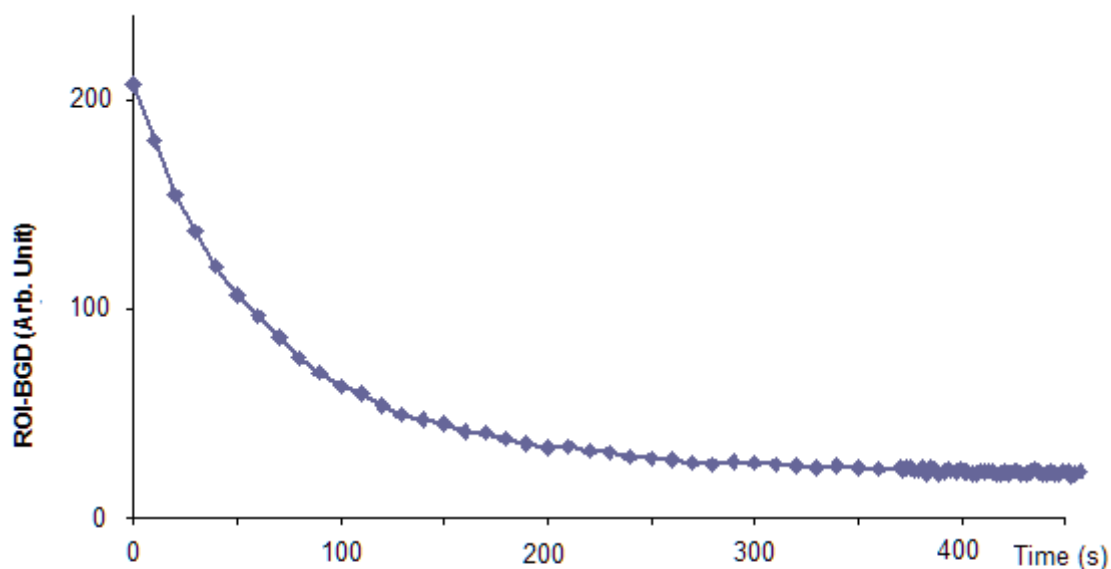
Az impulzus idejét, szakirodalomból szerzett adatokat is figyelembe véve, 10 ms-ban határoztuk meg, amely tökéletesen bevált a későbbi tapasztalataink alapján is.

A festékkoncentrációt kezdetben 1 mM-ban határoztuk meg, és ehhez 10 mA erősségű impulzust rendeltünk. Ezekben a kísérletekben sikeres festés során nagyon erősen festődő sejtekhez jutottunk. A festődés erősségének csökkentése végett a koncentráció 500 μ M-ra csökkentettük. Azonban mind az 500 μ M-lal, mind az 1 mM koncentrációval festett sejtek gyorsan veszítettek intenzitásukból, megduzzadtak. Eme jelenségekből arra következtettünk, hogy az impulzus áramerősségének nagysága károsította a membránt, tartósan áteresztővé tette, a sejtek pedig ozmotikus hatás miatt elpusztultak.

A sejtek életben tartása céljából lecsökkentettük az áramerősséget $100\ \mu\text{A}$ -re, és visszatértük az $1\ \text{mM}$ festékkoncentrációhoz. Az így festett sejtek jó állapotban éltek túl a festési eljárást, és hasonlóan gyorsan és erőteljesen festődtek. A validálási kísérletek során azonban meredeken csökkent az intenzitásuk, amit a photobleaching jelenségével magyaráztunk (8. ábra).

A fluoreszcens festék molekulák többszöri gerjesztési és emissziós ciklus után elvesztik gerjeszthetőségi képességüket. Ezt a jelenséget nevezzük photobleaching-nek. Minden indikátor molekula különböző számú foton emissziója után ég ki, de összességében exponenciális függvénnyel írható le a molekulák számának és a bleaching előtt emittált fotonok számának összefüggése. (Vagyis, minél több festék molekula található a megfigyelt sejtben, a molekulák annál kevesebb fotont emittálnak egyenként, gyorsan kiégnek. Kisebb indikátor molekula számnál az egyes molekulák, akár $2,5 \cdot 10^6$ fotont is képesek emittálni.)

Ezután, hogy a sejtet még kevésbé károsítsuk a festés során, nem a festékkoncentrációt csökkentettük, hanem a töltési áramerősséget vittük le $10\ \mu\text{A}$ -re. Az így festődött sejtek láthatóan kevesebb indikátor molekulát vesznek fel egy impulzus hatására, ugyanakkor a fluoreszcenciájukat képesek hosszútávon megtartani, ami a kísérletek elvégzése szempontjából az egyik legfontosabb tényező.



8. ábra. A photobleaching jelensége egy pillérsejten. Túl erős megvilágítás esetén a sejt 5 perc alatt szinte teljesen láthatatlanná válik (elveszti fluoreszcenciáját) az indikátor molekulák kiégése miatt. Az ábra a pillérsejt fölött mért, háttérlevonás utáni intenzitás értékeket mutatja (ROI-BGD, önkényes értékek) az idő függvényében.

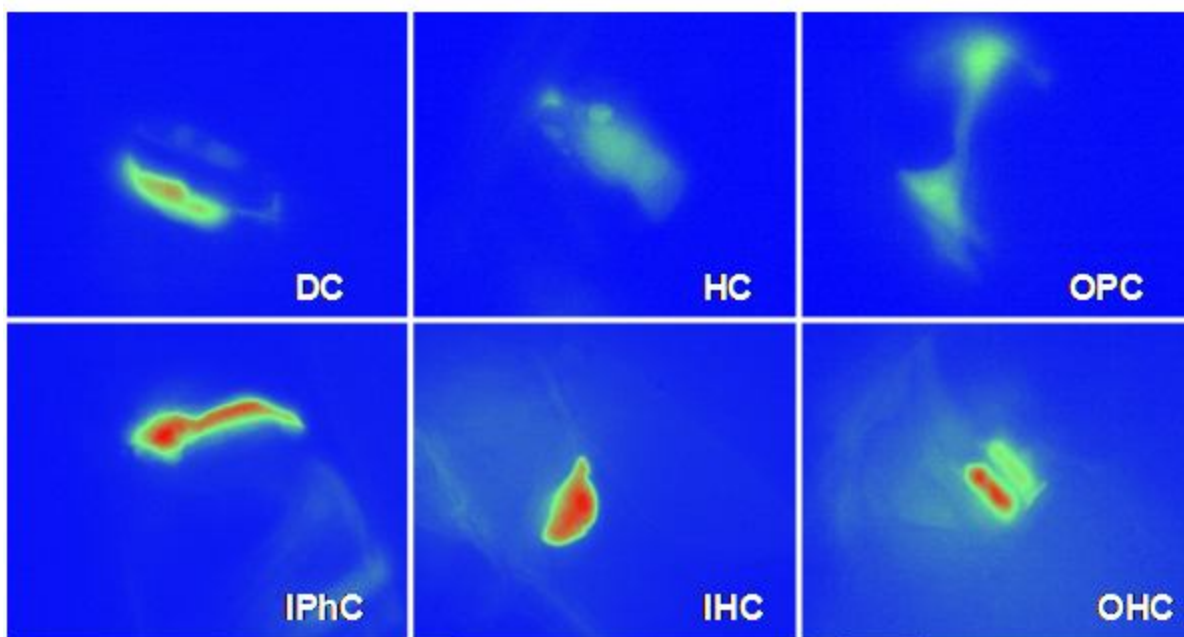
A megvilágítás mértéke

A photobleaching jelenségének minimalizálásához a sejtek kezdeti intenzitásának 250-160 egységnek (a mi mérőrendszerünk esetében érvényes önkényes egységek, arbitrary units) kell lennie (a háttér levonása után 130-50 egység). Ekkor – mivel a „bleachelődés” nem jelentős – az intenzitás gyorsan beáll egy állandó szintre. Kissé nagyobb intenzitás értékeknél gyors intenzitás esés történik (az indikátor egy részének kiégése során), majd beáll egy igen lassan csökkenő, kvázi állandó intenzitás szint.

A bleaching nemcsak a felvett indikátor molekulák számától, hanem a megvilágító fény intenzitásától és a megvilágítás idejétől is függ. Attól függően, hogy a festés során milyen mennyiségű indikátor molekulát sikerült a sejtbe juttatni (az állandóan tartott ingerlési paraméterek és festékkoncentráció ellenére némi eltérés sejtről-sejtre tapasztalható) finoman utánállítottuk a megvilágítás idejét, és – manuálisan állítható rekesz segítségével – a sejtre eső fény intenzitását is, úgy, hogy az emittált intenzitás csak minimális mértékben változzon.

A sejtek festődésének sikeressége

Összességében elmondhatjuk, hogy az elektroporációs technika töltési paramétereit sikerült úgy optimalizálni, hogy a Corti-szerv minden sejttypusát (9. ábra) a funkcionális imaging vizsgálatok igényeinek megfelelően tudjuk festeni mind OGB-1, mind Fura2/K⁺



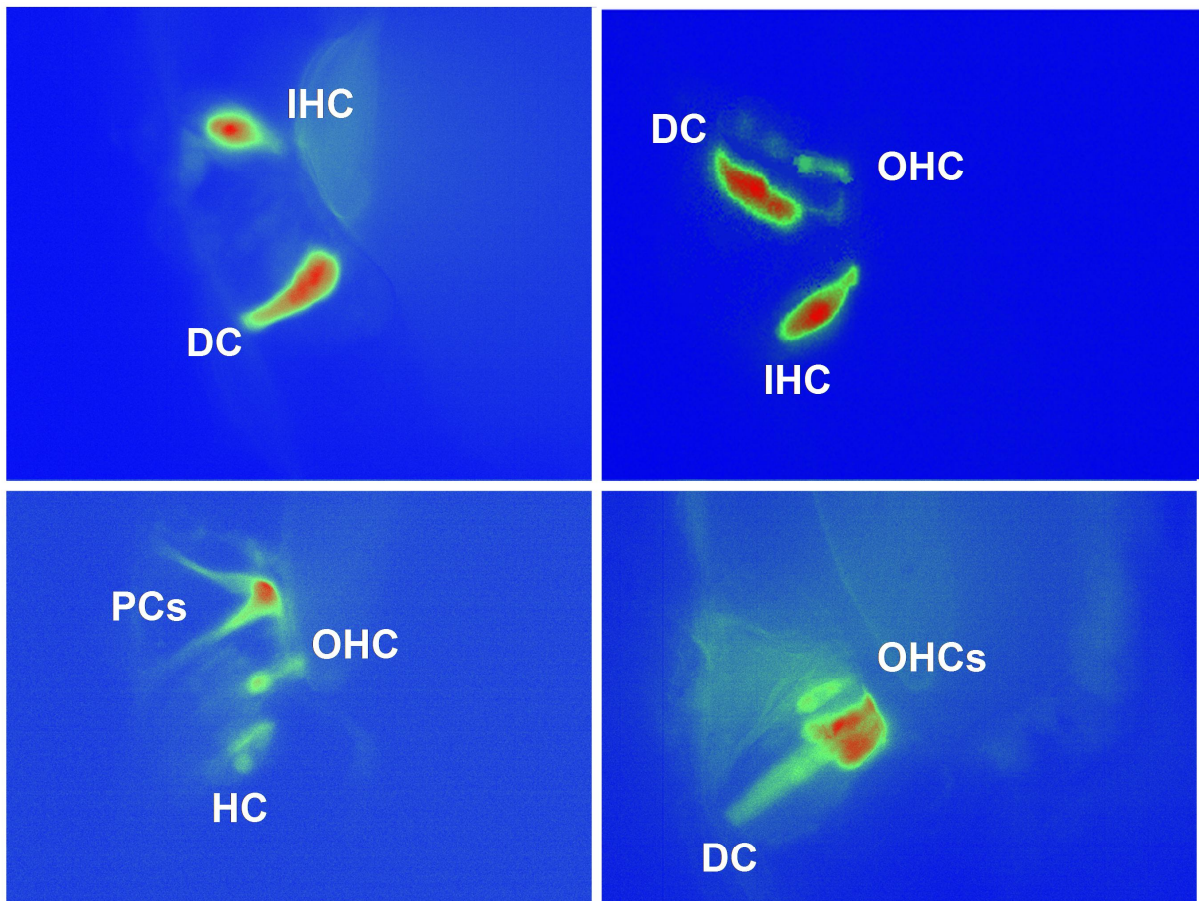
9. ábra. Elektroporációval a Corti-szerv szenzoros és támasztó sejtjei is feltölthetők egér hemicochlea preparátumban (10 μ A, 10 ms, 1 mM OGB-1). DC, Deiters sejt; HC, Hensen sejt; OPC, külső pillérsejt; IPhC, belső phalangeális sejt; IHC, belső szőrsejt; OHC, külső szőrsejt

fluoreszcens Ca^{2+} indikátorokkal.

A szelektív festésnek köszönhetően olyan struktúrák váltak láthatóvá a sejteken, melyeket eddig nem tudtunk megfigyelni. Ilyen a például a Deiters sejtek phalangeális nyúlványa (12. és 13. ábra Deiters sejtet ábrázoló képe). Ez lehetőséget ad a polarizált sejtek elkülönülő részeinek külön vizsgálatára.

A sejtek vizsgálhatóságának ideje a photobleaching csökkentésével megnőtt. Az egyes sejteken akár 40-50 perces funkcionális kalcium imaging vizsgálatokat is végezhattünk.

Ugyanakkor egy sejt megfestése elektroporációval igen gyors művelet. Egyetlen pipettával egy Corti-szervben akár 4-6 sejtet is képesek voltunk tölteni, ami lehetővé tette különböző sejtek párhuzamos vizsgálatát (10. ábra).



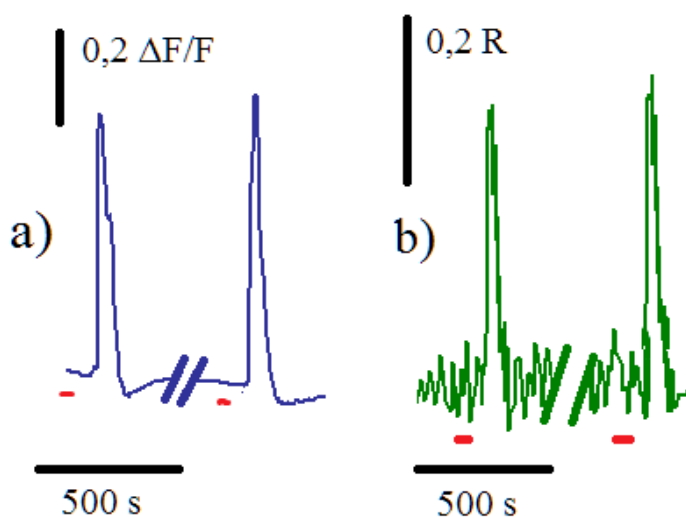
10. ábra. Több sejt párhuzamos töltése elektroporációval egy Corti-szerven belül. A módszer gyorsasága és ismételhetősége lehetővé teszi, hogy egy preparátumon belül több sejtet is feltöltsünk és így alkalmassá tegyünk a funkcionális imaging vizsgálatra. A megfestett sejtek ebben az esetben is kiemelkednek a háttérből és jól elkülöníthetők egymástól. DC, Deiters sejt; HC, Hensen sejt; OPC, külső pillérsejt; IHC, belső szőrsejt; OHC, külső szőrsejt

Funkcionális kalcium imaging vizsgálatok – az ATP kiváltotta intracelluláris Ca^{2+} válaszok mérése

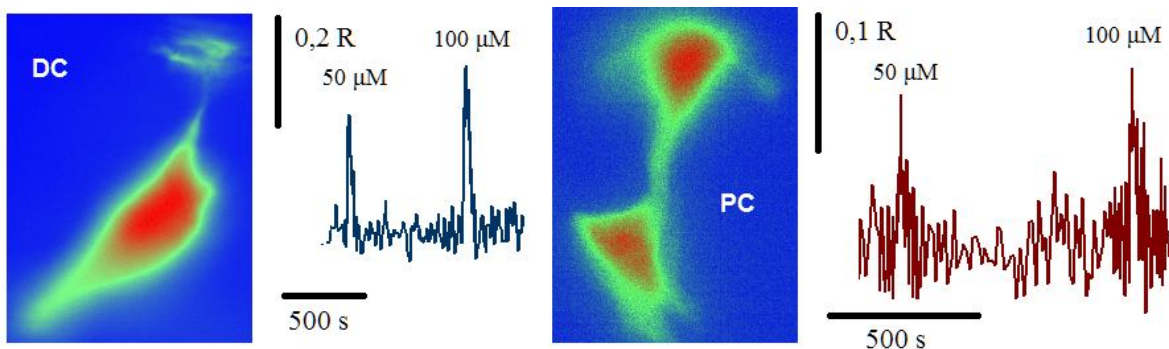
Igazolnunk kellett a sejtek töltést követő élet- és válaszképességének fennmaradását is. Ehhez ATP-t, mint élettani stimulust használtunk, mely a purinerg receptorokon keresztül Ca^{2+} szint változást idéz elő a sejtekben. A Corti-szerv sejtjein megtalálhatók mind az ionotróp P2X, mind a metabotróp P2Y receptorok, hiszen a hallószervben az ATP transzmitterként és otoprotektív faktorként is szerepet játszik [26]. Az ATP-t 25 – 100 μM -os koncentrációban, 30 másodpercre adtuk hozzá a perfúzióhoz.

Az ATP stimulus hatására az életben lévő sejteken aktiválódnak a P2X receptorok, melyek az extracelluláris térből Ca^{2+} -ot engednek be, valamint a P2Y receptorok, melyek G-proteinek segítségével aktiválják a foszfolipáz C – inositol-trifoszfát (IP3) kaszkádot [24, 25, 26]. Az IP3 a sejtben levő endoplazmatikus retikulumon levő receptoraihoz kapcsolódik, melynek következménye a belső Ca^{2+} raktárak citoplazmába ürülése. A Ca^{2+} koncentráció változását elektroporációval a sejtbe juttatott Ca^{2+} érzékeny fluoreszcens festékekkel tudtuk detektálni.

OGB-1 fluoreszcens indikátorral sikerült intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést megfigyelnünk mindkét érzéksajt típuson (külső- és belső szőrsejtek), valamint Deiters phalangeális sejteken. Fura2/ K^+ indikátorral pedig Deiters, Hensen és pillérsejteken detektáltunk ezidáig Ca^{2+} tranzienseket. OGB-1 esetében a $(F-F_0)/F_0$, Fura-nál pedig a ratio (R) értékekkel jellemeztük a Ca^{2+} változásokat.



11. ábra. Az ATP a jelzőfestékkel feltöltött sejtekben jól mérhető intracelluláris Ca^{2+} válaszokat vált ki. A válaszok ismételtelhetőek. Az ábrán OGB-1 (a) és Fura2/ K^+ (b) festékekkel töltött Deiters sejtek válaszai láthatóak 30 másodpercig a perfúzióban adott ATP-re (100 μM). A deszenzitizáció elkerülése érdekében két ingerlés között legalább 10 percet vártunk. A piros pontok az ATP adás idejét mutatják.

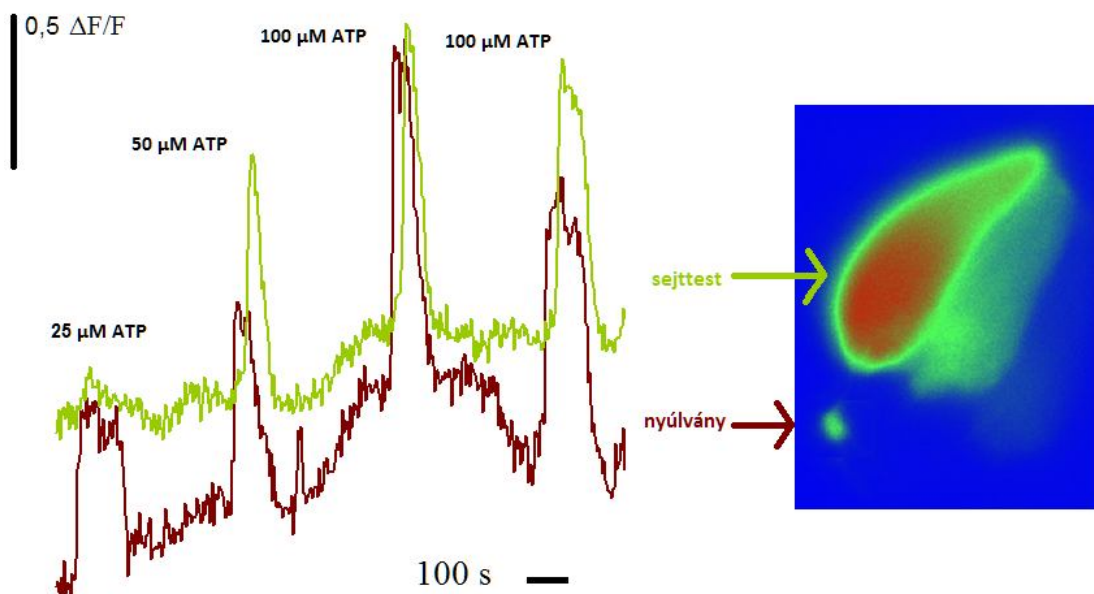


12. ábra. Az ATP által kiváltott Ca^{2+} válaszok dózis és sejtípus függőek. Látható, hogy 100 μM ATP mindkét sejtípusban nagyobb Ca^{2+} emelkedést okoz mint az 50 μM . Eddigi kísérleteink alapján a pillérsejtek konzekvensen kisebb válaszokat mutattak mint a Deiters sejtek. DC, Deiters sejt; PC, pillérsejt

Az ATP stimulusokat minden sejtípusban meg tudtuk ismételni, mindkét indikátor használatakor (11. ábra).

Az egymás után következő ingerléseket növekvő ATP koncentrációval is elvégeztük. Elmondhatjuk, hogy magasabb dózisú ATP nagyobb Ca^{2+} választ vált ki (12. ábra).

Az elektroporációs festési technika nagy szelektivitása és kifejezetten jó jel-zaj aránya lehetővé tette számunkra az egyes sejteken belüli struktúrák vizsgálatát is. Ezek közül kiemelkednek a Deiters sejtek phalangeális nyúlványán végzett megfigyelések. Az esetek többségében a nyúlvány maga nem volt látható csupán a végén levő, kiöblösödő, „tappancs-szerű” vége. Mértük tudtuk e „tappancs” intenzitás változásait is. Megfigyeltük, hogy kisebb koncentrációra a nyúlvány az érzékenyebb. A fluoreszcens tranziens felfutása a nyúlványban ugyanolyan meredek volt, mint a szómában, de a „tappancs” válasza időben konzekvensen hamarabb jelentkezett és lecsengése hosszabban elnyúlt.



13. ábra. Az elektroporációs töltés lehetővé teszi, hogy egy sejt eltérő kompartmentjeiben külön vizsgáljuk az intracelluláris Ca^{2+} változásokat és dinamikájukat. Deiters sejt nyúlványa és szómája eltérő nagyságú és lefutású ATP választ mutat. Ráadásul a nyúlvány Ca^{2+} válasza mindig megelőzi a sejttest választ.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

Az enyhe vagy súlyosabb halláskárosodásoktól százmilliók szenvednek világszerte. A hallórendszer sérülése hátrányosan befolyásolja az egyén életvitelét, és társadalmi elszigetelődéshez vezethet [1]. Komoly társadalmi jelentőségük ellenére keveset tudunk a károsodások kialakulásához vezető folyamatokról. A fiziológiai, patofiziológiai ismereteink bővítése előfeltétele a sikeres terápia kifejlesztésének. Ennek képezi fontos részét a sejt- és molekuláris szintű ismeretek szerzése, melynek nélkülözhetetlen megközelítési módja a nagy tér- és időbeli felbontású funkcionális imaging vizsgálatok végzése. Ezeknek viszont előfeltétele az indikátor festékek szelektív, kíméletes és gyors sejtekbe juttatása. Kifejlett hallású egér Corti-szervén végzett funkcionális kalcium imaging vizsgálataink továbbfejlesztése érdekében állítottuk be az elektroporációs indikátor töltés módszerét egér hemicochlea preparátumon. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy:

1. halló egerek hemicochlea preparátumában a Corti-szerv sejtjeinek indikátor töltésére is alkalmas az elektroporáció
2. a módszerrel egyhullámhosszú OGB-1, és két hullámhosszú Fura2/K⁺ Ca²⁺ érzékeny fluoreszcens indikátorok is szelektíven és gyorsan sejtekbe juttathatók,
3. az általunk beállított elektromos impulzus (10 ms, 10 μ A) és pipetta paraméterek (4-6 M Ω), valamint festékkoncentráció (1mM) alkalmasak a Corti-szervben található érzék- és támasztósejtek minden típusának OGB-1 és Fura2/K⁺ fluoreszcens indikátorokkal történő megfestésére; a szelektív festésnek köszönhetően sikerült láthatóvá tennünk olyan sejtstruktúrákat is, melyek más festési eljárással nem vizualizálhatóak,
4. a photobleaching jelenségének kiküszöbölése után a megfestett sejtek akár 40-50 percen keresztül is vizsgálhatóak voltak, ami már elegendő az általunk tervezett kísérletek elvégzéséhez,
5. a Corti-szerv élettani és kórélettani működésében is meghatározó szerepet játszó ATP adására a megtöltött sejtek a várt [Ca²⁺]_i emelkedéssel válaszoltak; a válaszok ismételtetők voltak és nagyságuk az ATP koncentrációjától függött (dózis-hatás összefüggés); a megőrzött sejtműködés és a módszer alkalmazhatóságának további bizonyítékeként foghatjuk fel, hogy több sejt

párhuzamos vizsgálata mellett, egy sejt különböző kompartmentjeinek eltérő dinamikájú Ca^{2+} válaszai is nyomon követhetők.

A fenti eredményeink igazolják, hogy az elektroporációs technika megfelelő indikátor töltést biztosít halló egerek hemicochlea preparátumában végzett nagy tér- és időbeli felbontású, funkcionális kalcium imaging vizsgálatokhoz. A szelektív festésből eredő jobb jel-zaj arány segíti a Corti-szerv fiziológiai és patofiziológiai folyamatainak feltérképezését. Mivel a módszert egereken állítottuk be, alkalmas az egyre nagyobb számban rendelkezésre álló emberi halláskárosodás modellként szolgáló, genetikailag módosított egerek Corti-szervének vizsgálatára is.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A leggyakoribb emberi szenzoros deficit a hallószervet érintő károsodás. Ennek irreverzibilis, jelenleg gyógyszeresen nem gyógyítható formáját adják a szenzorineurális halláskárosodások (SNHL). Ebben az esetben a belsőfülben (a cochleában), vagy az idegi vezetésben, feldolgozásban következik be az elváltozás [I]. Patofiziológiai ismereteink bővülése előfeltétele a hatékony terápia kifejlesztésének. Ennek érdekében foglalkoztunk egy, a Corti-szerv sejt szintű mechanizmusainak funkcionális imaging vizsgálatát megkönnyítő, elektroporációs festési módszer beállításával.

Az általunk használt hemicochlea preparátum alkalmazásával a lehetőségünk nyílik rá, hogy az eddigi vizsgálatokban szereplő, még nem halló egerekből nyert és ezért elsődlegesen fejlődésbiológiai kérdések vizsgálatára alkalmas preparátumok adta lehetőségeket meghaladva, már kifejlett Corti-szervvel rendelkező egerekkel dolgozzunk [1]. A hemicochlea preparátumokat 15-27 napos egerek cochleájának kettévágásával készítettük. A Corti-szerv epifluoreszcens mikroszkópban kiválasztott és beazonosított sejtjeit mikromanipulátor vezette, fluoreszcens jelzőfestékkel töltött üvegpipettával megérintettük, majd a festéket áraminjekcióval a sejtbe lőttük. Az elektroporáció pórusokat nyit a sejtmembránon, és a sejt képessé válik a festék (estetünkben a Ca^{2+} érzékeny Oregon Green BAPTA-1 és Fura2) felvételére [20]. A kísérletek során meghatároztuk az optimális festékkoncentrációt (1mM), áramerősséget (10 μA), áramimpulzus szélességet (10ms), pipettaparamétereket (4-6M Ω). Módszerünkkel a Corti-szerv érzék- és támasztósejtjeit is tölteni tudjuk, egy preparátumban akár 4-6 db sejtet is. A szelektív töltésnek köszönhetően (a háttér nem festődik) a jel-zaj arány sokkal jobb, mint a laborunkban eddig alkalmazott töltési módszer esetében. Validálásaként a megtöltött sejtekben 50 - 100 μM ATP által kiváltott Ca^{2+} tranzienseket mértünk funkcionális imaging módszerrel. A Corti-szerv sejtjei, különböző eloszlásban, de mind rendelkeznek purinerg receptorokkal (P2X és P2Y), amelyek második hírvivőként Ca^{2+} -ot is használnak [26].

Kísérleteink során először alkalmaztuk elektroporációs módszert kifejlett Corti-szerv sejtjeinek megtöltésére, és ezen módszer alkalmazásával később lehetőségünk lesz a SNHL-ok sejt szintű patomechanizmusát vizsgálni vad és emberi halláskárosodás modelljeként szolgáló genetikailag módosított egerekben is.

VIII. SUMMARY

Impairment of hearing is the most common sensory deficit in the human population. Sensorineural hearing losses (SNHLs) are the incurable forms of this impairment at present. In this case the lesion affects the inner ear (cochlea) or the neural conductivity or processing. Invention of effective drug therapy needs deepening of our patophysiological knowlege at the cellular level. Our aim was to set up and optimize the method of loading of Ca^{2+} indicators by electroporation, which makes easier and more reliable the funtional imaging of cells in the organ of Corti.

Majority of SNHLs are developed after the onset of hearing, but investigations at the cellular level in mice are usually performed before that in the literature. The hemicochlea preparation, we use is suitable for investigations in mice with mature hearing ($> \text{P15}$), i.e., developmental changes do not disturb drawing conclusions. The preparation was made by cutting in half the cochlea of 15-27 days old mice. Cells of interest were identified in an epiflourescent microscope. The fluorescent indicator was injected by a current impulse after touching the cell with the dye loaded micropipette driven by a micromanipulator. The electroporation opens poruses in the cell membrane and the indicator is forced to enter the cell. We used the two Ca^{2+} indicators, Oregon Green BAPTA-1 and Fura2. By testing them, we have defined their optimal concentration in the pipette (1mM), the intensity (10 μA) and the duration (10ms) of the electroporation current and the parameters of the pipette (4-6M Ω). With this method we can load both the sensory- and the supporting cells of the organ of Corti (4-6 cell per preparation). Due to the selective filling the background staining remains low and the signal-to-noise ratio is much better than in the case of bulk loading we used before. To validate this new method, we stimulated the loaded cells with 50 and 100 μM ATP and measured intracellular Ca^{2+} transient with functional imaging techique. All cells of the organ of Corti have purinerg receptors (P2X and P2Y) using Ca^{2+} as a second messenger.

We have set up the method of Ca^{2+} indicator loading by electroporation of cells of the mature organ of Corti. Using this technique we will have the opportunity to investigate the patomechanism of SNHLs at cellular level in both wild type and genetically modified mice serving as a model of inhereted human deafnesses.

XI. IRODALOM JEGYZÉK

1. Edge, R. M., Evans, B. N., Pearce, M., Richter, C., Hu, X., & Dallos, P. Y. (1998). Morphology of the unfixed cochlea. *Hearing Research*, 124, 1–16.
2. Gary Housley, Jonathan Gale (2010) Purinerg signalling in the inner ear—perspectives and progress *Purinerg signalling*, 6, 151-153
3. Fonyó A., Ligeti E.(2008) Hallás és egyensúlyérzékelés, Az orvosi élettan könyve. Medicina, Budapest, 605-614
4. Mammano, F., Bortolozzi, M., Ortolano, S., & Anselmi, F. (2007). Ca²⁺ signaling in the inner ear. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22, 131–44. doi:10.1152/physiol.00040.2006
5. Paul Fuchs (2010) The Oxford Handbook of Auditory Science: The Ear, Oxford University Press, Oxford
6. Tolomeo, J. A., & Holley, M. C. (1997). Mechanics of microtubule bundles in pillar cells from the inner ear. *Biophysical journal*, 73(4), 2241–7. doi:10.1016/S0006-3495(97)78255-9
7. Parsa, A., Webster, P., & Kalinec, F. (2012). Deiters cells tread a narrow path-The Deiters cells-basilar membrane junction-. *Hearing research*, 290(1-2), 13–20. doi:10.1016/j.heares.2012.05.006
8. Kanazawa, A., Sunami, K., Takayama, M., Nishiura, H., Tokuhara, Y., Sakamoto, H., Iguchi, H., et al. (2004). Probable function of Boettcher cells based on results of morphological study: localization of nitric oxide synthase. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, (554), 12–6. doi:10.1080/03655230410018444
9. Emadi, G., Richter, C.-P., & Dallos, P. (2004). Stiffness of the gerbil basilar membrane: radial and longitudinal variations. *Journal of neurophysiology*, 91(1), 474–88. doi:10.1152/jn.00446.2003
10. Yu, N., & Zhao, H.-B. (2009). Modulation of outer hair cell electromotility by cochlear supporting cells and gap junctions. *PloS one*, 4(11), e7923. doi:10.1371/journal.pone.0007923
11. Guthrie, O. W. (2008). Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology*, 249(2-3), 91–6. doi:10.1016/j.tox.2008.04.015
12. Gale, J. E., Piazza, V., Ciubotaru, C. D., & Mammano, F. (2004). A Mechanism for Sensing Noise Damage in the Inner Ear. *Current Biology*, 14, 526–529. doi:10.1016/j
13. Dror, A. a, & Avraham, K. B. (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron*, 68(2), 293–308. doi:10.1016/j.neuron.2010.10.011
14. Goldman, D. E. (1943) Potencial impedance and rectification in membranes. *Journal of General Physiology*, 27, 37-50.

15. Sale, A. J. H. and Hamilton, W. A. (1968) Effects of high electric fields in microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 163, 37-43.
16. Sale, A. J. H. and Hamilton, W. A. (1967) Effects of high electric fields in microorganisms. I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 148, 781-788.
17. Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972) Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology*, 10, 279-290.
18. Kinoshita, K. and Tsong, T. Y. (1979) Voltage-induced conductance in human erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 554, 479-497.
19. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofsehneider, P. H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*, 1, 841-845.
20. Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2), 135–160. doi:10.1016/S0302-4598(96)05062-3
21. Rainer A. Böckmann, Bert L. de Groot, Sergej Kakorin, Eberhard Neumann and Helmut Grubmüller (2008) Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal*, 95, 1837–1850
22. Drury, A. N., Szent-Györgyi, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *Journal of Physiology*, 68, 213-237.
23. Burnstock, G., Dumsday, B., Smythe, A. (1972) Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *British Journal of Pharmacology*, 44, 451-461.
24. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, 32(1), 19–29. doi:10.1016/j.tins.2008.10.001
25. Geiger, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G., & Ford, A. P. D. W. (2006). Pharmacology of P2X channels. *European journal of physiology*, 452(5), 513–37. doi:10.1007/s00424-006-0070-9
26. Lee, J. H., & Marcus, D. C. (2008). Purinergic signaling in the inner ear. *Hearing research*, 235(1-2), 1–7. doi:10.1016/j.heares.2007.09.006
27. Housley, G. D., Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2009). Purinergic signaling in special senses. *Trends in neurosciences*, 32(3), 128–41. doi:10.1016/j.tins.2009.01.001
28. Piazza, V., Ciubotaru, C. D., Gale, J. E., Mammano, F. (2007) Purinergic signalling and intercellular Ca²⁺ wave propagation in the Organ of Corti, *Cell Calcium*, 41, 77-86

29. Sinha, S. R., & Saggau, P. (1999). Optical Recording from Populations of Neurons in Brain Slices. In Windhorst and Johansson (Ed.), *Moderne Techniques in Neuroscience Research* (pp. 459–486). Berlin: Springer.
30. Thomas Nevian, Fritjof Helmchen (2007) Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation, *European Journal of Physiology*, 454, 675-688
31. Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. (2000) **Prestin** is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*;405(6783):149-55

Internetes hivatkozások:

- I. WHO hivatalos honlapja (<http://www.who.int/topics/deafness/en/>)
- II. 1. ábra forrása: <http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch50/cochlea.html>
- III. Invitrogen cég honlapja: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>

KÖSZNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Zelles Tibornak, hogy mindig szakított időt rám, segítette elméleti és gyakorlati előrehaladásom.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a labor minden tagjának, különösen Aller Máténak, hogy a technikai kérdésekben mindig fordulhattam hozzá.

Végül szeretnék barátomnak, Lőrincz Tibornak, is megköszönni minden támogatást, biztatást, amit egy-egy sikertelen kísérlet után kaptam tőle.

A kutatás a TÉT_10-1-2011-0421, NKTH-ANR Programme 2010, Hungarian-French Collaborative R&I Programme on Biotechnologies valamint a TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-011 „A tehetséggondozás és kutatóképzés komplex rendszerének fejlesztése a Szent István Egyetemen” c. pályázat támogatásával valósult meg.