

Szenzorineurális halláskárosodások és lehetséges gyógyszeres terápiájuk - az immunrendszer lehetséges szerepe

Doktori értekezés

Szepesy Judit

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szirmai Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Dóra Dávid, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Révész Péter, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Demeter Kornél, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Küstel Marianna, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2022

1.1. TARTALOMJEGYZÉK	
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
3. BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR	9
3.1. A hallás és jelentősége	9
3.2. A cochlea felépítése és működése	10
3.3. A halláscsökkenés	13
3.4. A szenzorineurális halláscsökkenés leggyakoribb formái	15
3.4.1. Időskori halláscsökkenés	16
3.4.2. Zajártalom okozta halláscsökkenés	16
3.4.3. Gyógyszerek mellékhatásaként fellépő halláscsökkenés.....	17
3.5. A szenzorineurális halláscsökkenés főbb patológiai jellemzői.....	17
3.5.1. Excitotoxicitás	18
3.5.2. Oxidatív stressz.....	18
3.5.3. Programozott sejthalál	19
3.6. A szenzorineurális halláscsökkenés jelenlegi terápiás megközelítése, hatékony gyógyszeres kezelésének hiánya.....	20
3.7. A szenzorineurális halláskárosodások gyógyszeres terápiájának kutatása, leggyakoribb terápiás célpontok	23
3.7.1. Az egér, mint modellállat a szenzorineurális halláskárosodások kutatásában	23
3.7.2. Neuroprotektív vegyületek	24
3.7.3. Dopaminerg neurotranszmisszió modulálása – a lateralis olivocochleáris (LOC) efferens rendszer szerepe.....	25
3.7.4. Antioxidánsok.....	25
3.7.5. Antiapoptotikus vegyületek.....	26
3.8. Lehetséges ototoxikus vegyületek és kutatásuk jelentősége	27
3.9. A szenzorineurális halláscsökkenés preklinikai vizsgálatának leggyakoribb módszerei	28

3.9.1. Auditoros agytörzsi kiváltott válasz	28
3.9.2. Cochleogram.....	29
3.9.3. Spirális ganglionsejtek vizsgálata.....	30
3.10. Az immunrendszer hallásban betöltött szerepe	30
3.10.1. Immunfolyamatok a belfülben	31
3.10.2. Az immunrendszer szerepe a szenzorneurális halláskárosodásokban.....	32
3.10.3. Autoimmun eredetű halláscsökkenés	33
3.11. Immunmodulátorok és lehetséges szerepük– az immunrendszer Janus arca	34
3.11.1. A több támadáspontú selegilin mint lehetséges hallásvédő vegyület a szenzorneurális halláskárosodások gyógyszeres terápiájában	34
3.11.2. Az immunellenőrzőpont-gátló PD1 inhibitor mint lehetséges halláskárosító vegyület	36
3.12. A cochleáris makrofágok vizsgálata.....	37
4. CÉLKITŰZÉSEK	38
4.1. A selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálata	38
4.2. A PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatásának vizsgálata	39
5. MÓDSZEREK	40
5.1. Etikai vonatkozások.....	40
5.2. Kísérleti állatok.....	40
5.3. Kísérleti elrendezés.....	40
5.3.1. A selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálatára felállított kísérleti elrendezés és kezelési protokoll.....	40
5.3.2. A PD-1 gátló immunterápia és hallás kapcsolatának vizsgálatára felállított kísérleti elrendezés és kezelési protokoll	43
5.4. Auditoros agytörzsi kiváltott válasz (ABR)	45
5.5. Túlélési analízis	48
5.6. A szövettani analízisekhez szükséges szövetek előkészítése	48

5.7. A cochlea külső és belső szőrsejtjeinek kvantifikálása	49
5.7.1. A cochleák disszekciója és Phalloidin/DAPI festése.....	49
5.7.2. A külső és belső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata	49
5.8. Beágyazás és metszetkészítés	50
5.9. Hematoxylin-eozin festés és a spirális ganglionsejtek vizsgálata	50
5.10. Iba1 immunhisztokémia.....	51
5.11. Statisztikai analízis	52
6. EREDMÉNYEK.....	54
6.1. A krónikus selegilin kezelés hatása a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek hallásfunkciójára.....	54
6.1.1. Kísérlet I. A krónikus selegilin kezelés (1,5 mg/kg) enyhe védőhatást mutatott a BALB/c állatok időskori halláskárosodásának kialakulásával szemben.....	54
6.1.2. Kísérlet II. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) jelentős mértékű védőhatást mutatott a BALB/c állatok időskori halláskárosodásának progressziójával szemben	56
6.2. A krónikus selegilin kezelés hatása a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek folyadékfogyasztására, testsúlyára és élettartamára	58
6.2.1. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) csökkentette a BALB/c egértörzsek folyadékfogyasztását	59
6.2.2. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) csökkentette a BALB/c egértörzsek súlygyarapodásának mértékét	60
6.2.3. A krónikus selegilin kezelés nem befolyásolta az állatok élettartamát	62
6.3. A PD-1 gátló kezelés nem befolyásolta a C57BL/6 állatok hallásfunkcióját.....	64
6.4. A PD-1 gátló kezelés hatásának vizsgálata a belsőfül morfológiájára	65
6.4.1. A PD-1 gátlás az apikális és középső kanyarulatokban nem befolyásolta a szőrsejtek számát, a bazális kanyarulatban azonban mérsékelte a külső szőrsejt veszteséget.....	65

6.4.2. Az anti-PD-1 kezelés a spirális ganglionsejtek számát és morfológiáját a cochlea egyik kanyarulatában sem változtatta meg	67
6.5. A PD-1 gátló kezelés az Iba1-pozitív makrofágok számát az apikális és középső kanyarulatokban nem befolyásolta, a bazális kanyarulatban megemelte	69
7. MEGBESZÉLÉS	70
7.1. A selegilin, mint potenciális otoprotektív vegyület és vizsgálata az AHL egérmodelljeiben.....	71
7.1.1. A krónikus selegilin kezelés hallásfunkcióra gyakorolt hatása és annak háttérében álló lehetséges mechanizmusok.....	72
7.1.2. A krónikus selegilin kezelés hatása a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek folyadékfogyasztására, testsúlyára és élettartamára.....	76
7.1.3. A csökkent kalóriabevitel mint limitáló tényező.....	77
7.2. A PD-1 gátló immunterápia potenciális ototoxikus hatásának vizsgálata.....	78
7.2.1. A PD-1 gátló immunterápia hallásra gyakorolt hatása és annak háttérében álló lehetséges mechanizmusok	78
7.2.2. A PD-1 gátló immunterápia hallásra gyakorolt hatásával kapcsolatos eredményeink összehasonlítása az irodalommal.....	80
7.3. Kutatási eredményeink jelentősége	82
8. KÖVETKEZTETÉSEK.....	84
9. ÖSSZEFOGLALÁS	86
10. SUMMARY	87
11. IRODALOMJEGYZÉK	88
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	121
12.1.A disszertációhoz felhasznált publikációk.....	121
12.2.A témához kapcsolódó egyéb publikációk	121
12.3.A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk	121
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	122

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAO-HNFS	American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery Foundation (Amerikai Fül-orr-gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Akadémia Alapítvány)
ABR	Auditory Brainstem Response (auditoros agytörzsi kiváltott válasz)
AHL	Age-related Hearing Loss (időskori halláskárosodás)
ANXA1	Annexin A1
ATP	Adenosine Triphosphate (adenozin-5'-trifoszfát)
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (agyi eredetű neurotróf faktor)
BERA	Brainstem Evoked Response Audiometry (agytörzsi kiváltott potenciál audiometria)
BM	Basilar Membrane (baziláris membrán)
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (kemokin (C-C motívum) ligand 2)
CCL4	Chemokine (C-C motif) Ligand 4 (kemokin (C-C motívum) ligand 4)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (citotoxikus T-limfocita antigén 4)
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12 (kemokin (C-X-C motívum) ligandum 12)
DA	Dopamine (dopamin)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)
DC	Deiters' Cell (Deiters sejt)
DIHL	Drug-Induced Hearing Loss (gyógyszer okozta halláskárosodás)
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerellenőrző Hatóság)
HBOT	Hyperbaric Oxygen Therapy (hiperbárikus oxigénterápia)
HC	Hensen's Cell (Hensen sejt)
IBC	Inner Border Cell (belső határsejt)
IHC	Inner Hair Cell (belső szőrsejt)
IBA1	Ionized Calcium-Binding Adapter molecule 1 (ionizált kalcium-kötő adaptor molekula 1)

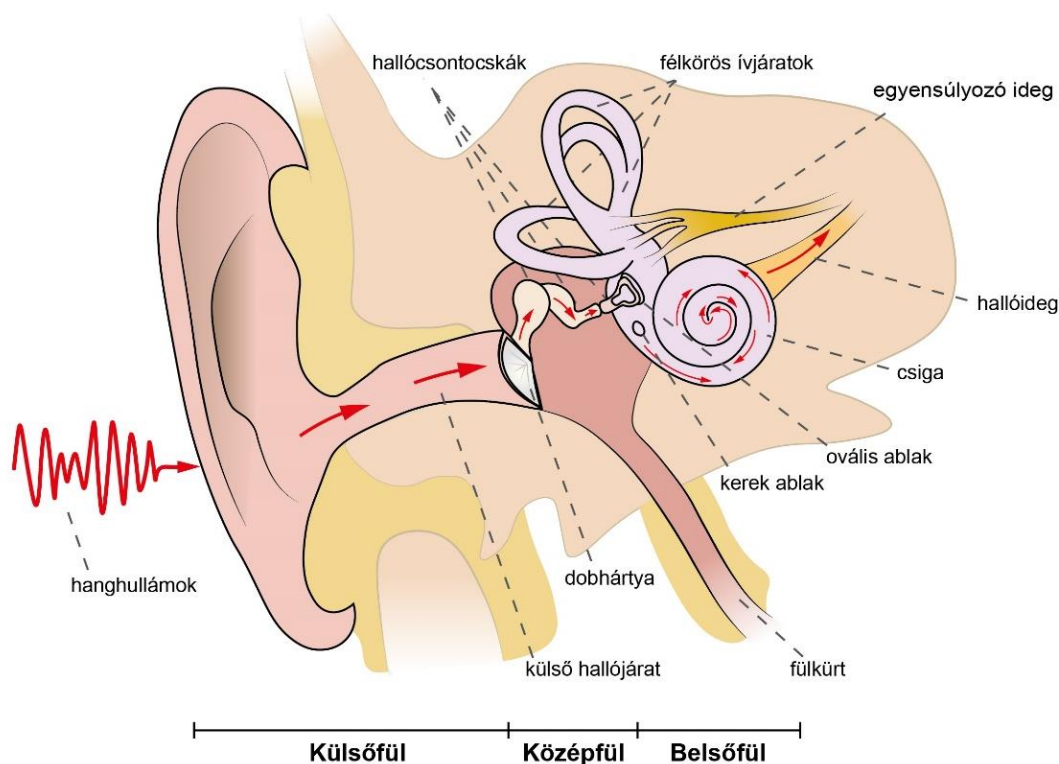
ICI	Immune Checkpoint Inhibitor (immunellenőrzőpont-gátló)
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1 (inzulinszerű növekedési faktor)
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IPC	Inner Pillar Cell (belső pillérsejt)
IPhC	Inner Phalangeal Cell (belső phalangeális sejt)
LOC	Lateral Olivocochlear (laterális olivocochleáris)
MAO-B	Monoamine oxidase B (monoamin-oxidáz B)
MOC	Medial Olivocochlear (mediális olivocochleáris)
NAC	N-acetyl-cysteine (N-acetil-cisztein)
NF-κB	Nuclear factor kappa B (nukleáris faktor-kappa B)
NIHL	Noise-Induced Hearing Loss (zajártalom okozta halláskárosodás)
NOX	NADPH Oxidase (NADPH oxidáz)
OHC	Outer Hair Cell (külső szőrsejt)
OPC	Outer Pillar Cell (külső pillérsejt)
PCD	Programmed Cell Death (programozott sejthalál)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (foszfáttal pufferolt sóoldat)
PD-1	Programmed Cell Death protein 1 (programozott sejthalál fehérje 1)
PFA	Paraformaldehyde (paraformaldehid)
PTS	Permanent Threshold Shift (tartós halláskárosodás)
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktív oxigén származékok)
SEM	Standard Error of the Mean (átlag szórása)
SGN	Spiral Ganglion Neuron (spirális ganglionsejt)
SNHL	Sensorineural Hearing Loss (szenzorineurális halláskárosodás)
SSNHL	Sudden Sensorineural Hearing Loss (akut szenzorineurális halláskárosodás)
STAT-1	Signal transducer and activator of transcription 1 (jelátvivő és transzkripció aktiváló 1)
TGF-β	Transforming Growth factor β (transzformáló növekedési faktor β)
TM	Tectorial Membrane (tektoriális membrán)
TNFα	Tumor Necrosis Factor- α (tumor nekrozis faktor α)

TTS Temporary Threshold Shift (átmeneti halláskárosodás)
WHO World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

3. BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR

3.1. A hallás és jelentősége

A beszéd elsajátításának, a kommunikációnak, a külvilágból való információszerzésnek nélkülözhetetlen eszköze a hallás képessége. Segíti a társadalmi beilleszkedést, a világban való tájékozódást, emellett hozzájárul személyiségünk fejlődéséhez.



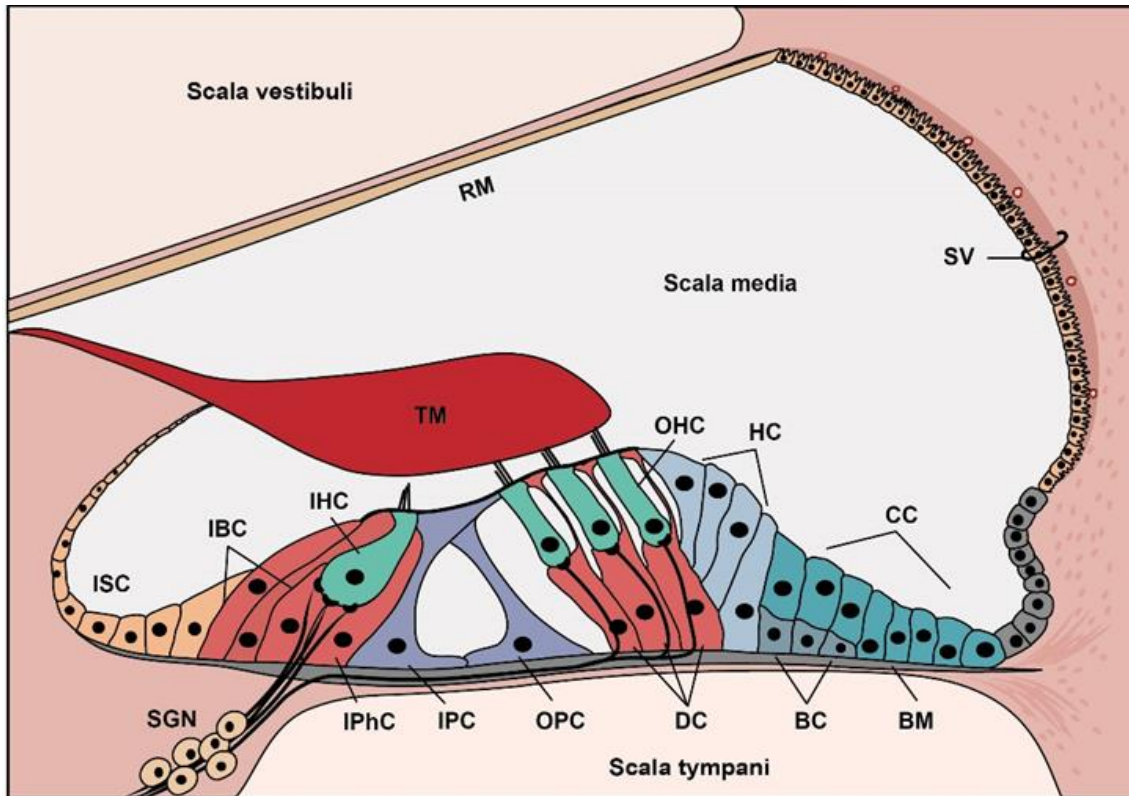
1. ábra. A fül és a hallás folyamata

A hallás egy rendkívül összetett folyamat, amely magába foglalja a hangfrekvenciájú levegőrezgések, vagyis a hangok észlelését és feldolgozását. Ennek során a környezetből érkező különböző frekvenciájú és intenzitású hanghullámokat a külsőfül hallójárata a dobhártyához vezet, megrezgetve annak membránját (1. ábra; Répássy Gábor, Fül-Orr-Gégészet, Fej-Nyak-Sebészet Egyetemi Tankönyv (2011) 1.1 (1) ábrája alapján saját készítés). A dobhártya a rezgéseket a középfül dobüregében található hallócsontocskák láncolatának továbbítja. A hallócsontocskák (kalapács, üllő, kengyel) elsődleges feladata annak biztosítása, hogy a hangrezgés minél kisebb veszteséggel jusson az alacsony akusztikus impedanciájú levegőközezből a belsőfül magas akusztikus impedanciájú folyadékterébe (impedancia illesztés). A mechanikai rezgéseket a kengyel vezeti a

belsőfülbe, talplemezével a belsőfül ovális ablakának nyílásába illeszkedve. Ez a rezgés mozgásba hozza a belsőfül cochleájában (csiga) lévő folyadékkompartmentet, amely folyamat végezetül az ott található elsődleges hallóneuronokban akciós potenciál kialakulásához vezet. Az elektromos jeleket a VIII. agyideg (nervus vestibulocochlearis) hallásért felelős rostjai közvetítik az agy hallóközpontjába, a primer hallókéregbe (1).

3.2. A cochlea felépítése és működése

A hallás szempontjából kiemelt struktúra a belsőfülben található cochlea. A cochlea spirális felépítésű, emberben 2 és 3/4 csavarulattal rendelkező üreges szerv. Tengelyét (modiolus) körülölelő üregrendszer a csontos labirintusból és az abban haladó, hasonló alakú hártás labirintusból áll. A cochleában három járat (scalae) különül el (2. ábra). A cochlea felső részén található a scala vestibuli, amelynek folyadéktere a cochlea csúcsán, a helicotreman keresztül közlekedik a cochlea alsó részén futó scala tympanival. A középfüлтől a scala vestibulit az ovális ablak, a scala tympanit a kerek ablak választja el. Mindkét járat belsejét az extracelluláris folyadékhoz hasonló ionösszetételű (magas Na^+ - és alacsony K^+ -koncentráció) perilymfa tölti ki. A két járat között helyezkedik el a vakon végződő scala media vagy ductus cochlearis, amelyet a scala vestibuli felé a Reissner-féle membrán, a scala tympani felé pedig a baziláris membrán (BM) határol. A scala mediát kitöltő endolimfa ionösszetételében az intracelluláris tér folyadékához hasonlít (magas K^+ - és alacsony Na^+ koncentráció), termelésében a scala media laterális határát jelentő stria vascularis sejtjei játszanak szerepet. A cochleát ellátó erek továbbá a nervus cochleáris rostjai a modiolusban futnak (1).



2. ábra. A Corti-féle szerv felépítésének sematikus ábrája (2). A cochleát a baziláris membrán (BM) és a Reissner-féle membrán (RM) három járatra (scalae) osztja. A scala mediában található a Corti-féle szerv. A három sorban elhelyezkedő külső szőrsejteket (OHC) és az egyetlen sejtstort alkotó belső szőrsejteket (IHC) különböző típusú támasztósejtek veszik körül (IBC, IPhC, IPC, OPC, DC, HC, CC, BC). ISC – belső árok sejtek; IBC – belső határsejtek; IPhC – belső phalangeális sejtek; IPC és OPC – belső és külső pillér sejtek; DC – Deiters sejtek; HC – Hensen sejtek; CC – Claudius sejtek, BC – Boettcher sejtek, SV – stria vascularis

A scala media BM-ján helyezkedik el a hallás receptor szerve, a Corti-féle szerv. A Corti-féle szerv különböző típusú támasztósejtekből, a hallószerv érzékszeteiből (szőrsejtek), a spirális ganglionsejtek (spiral ganglion neuron, SGN) perifériás nyúlványaiból, a mediális illetve laterális olivocochleáris efferensek végződéseiből (medial, lateral olivocochlear efferents, MOC, LOC) továbbá egy kocsonyaszerű képletből, a tectoriális membránból (TM) épül fel (2. ábra). A BM-on helyet foglaló támasztósejtek szoros kapcsolatban vannak a felettük elhelyezkedő szőrsejtekkel. A belső határsejtek (inner border cells, IBC) és a belső phalangeális sejtek (inner phalangeal cells, IPhC) az egy sorban elhelyezkedő belső szőrsejteket (inner hair cells, IHC), a Deiters

sejtek (Deiters' cells, DC) a 3-4 sort alkotó külső szőrsejteket (outer hair cells, OHC) veszik körül. A szőrsejtek apikális felszínén mechanoszenzitív kationcsatornákat tartalmazó sztereocíliumok találhatóak, amelyek vékony fehérjekötegek révén kapcsolódnak a mellettük lévő sztereocíliumokhoz. A szőrsejtek felett húzódó TM és az IHC-k sztereocíliumai között vékony rés található, ezzel szemben az OHC-k sztereocíliumai érintik a TM-et. Az IHC-k illetve OHC-k között található a Corti-alagút, amelyet két oldalról a belső és külső pillérsejtek határolnak (inner-, outer pillar cells, IPC, OPC). A Corti-féle szervet az OHC-ktől laterális irányban a Hensen sejtek, a Boettcher sejtek és a Claudius sejtek csoportjai határolják, az IHC-ktől mediálisan pedig a belső sulcus sejtek zárják le (1).

Hanginger hatására a kengyel talpa benyomódik az ovális ablak nyílásába; a kerek ablak membránja ezzel szinkron kidomborodik. A kialakult nyomáskülönbség a scala vestibuli és scala tympani között a perilymfa elmozdulásához és vándorló hullám formájában a BM kilengéséhez vezet. A vándorló hullám elméletének leírásáért, a csigán belüli stimuláció fizikai mechanizmusának felfedezéséért Békésy György 1961-ben Nobel-díjat kapott. A BM a cochlea bázisán keskeny és feszes, a cochlea csúcsa (apex) felé haladva szélesedik, szerkezete lazább. Ennek következtében a magas hangok (nagy frekvenciájú rezgések) a cochlea bázisán, a mély hangok (alacsony frekvenciájú rezgések) a cochlea csúcsán hoznak létre maximális kitérést. Ez a jelenség a cochlea frekvenciaanalizáló működésének egyik alapja. A membrán kilengésekor a szőrsejtek sztereocíliumai a TM alatt kialakuló örvénylés (IHC) illetve a TM húzóereje (OHC) következtében elhajlanak. A növekvő nagyságú sztereocíliumok irányába való elhajlás mechanoszenzitív kationcsatornákat megnyílásához, a magas K^+ tartalmú endolimfából K^+ -ok beáramlásához és a sejtek depolarizációjához vezet. Ennek hatására megnyílnak a sejteken található feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák és az IHC-k bázisán glutamát neurotranszmitter szabadul fel, ami átviszi az ingerületet az elsődleges hallóneuronokra. Az OHC-k membránpotenciáljának változása a sejtek hosszának (elektromotilitás) és feszességének változásához vezet, ami befolyásolja a BM rezgését (elektro-mechanikus transzdukció). Az IHC-k a hangérzékelés tulajdonképpeni receptorsejtjei, amelyek a hangrezgéseket idegi impulzussá alakítják az SGN-ek afferens végződéseiben. Az OHC-k szerepe, a BM rezgéseinek modulálásán keresztül, az akusztikus jel erősítése és a

frekvenciaszelektivitás fokozása. Károsodásuk esetén hallásunk mintegy 50-60 decibellel (dB) romlik (1).

A hallás rendkívül komplex és finoman szabályozott folyamatából továbbá a cochlea finom struktúrájából adódóan a hallórendszer különlegesen érzékeny a belső és külső behatásokkal szemben. Ezen hatások következményeként a hallószerv strukturális és funkcionális károsodása illetve különböző típusú és mértékű halláscsökkenés léphet fel.

3.3. A halláscsökkenés

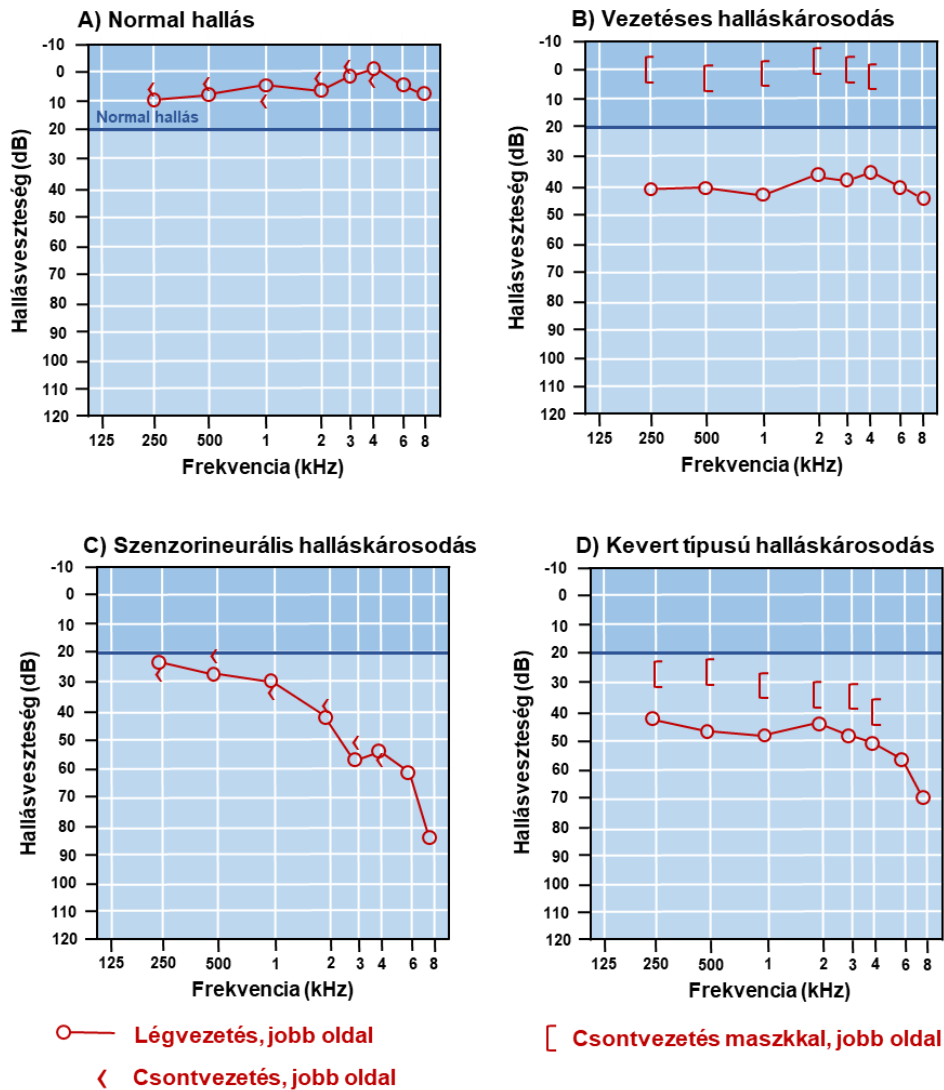
A hallásvesztés napjaink egyik vezető egészségügyi problémája. A világon több mint 400 millió ember küzd legalább 35 dB-t meghaladó halláscsökkenéssel, akik közül 34 millió gyermek (3). Gyerekek esetében hátráltatja az értelmi fejlődést és rontja az iskolai teljesítményt. Felnőttkorban szintén komoly hátrányt jelent mind az érintett egyén mind környezete számára. Becslések szerint a kezeletlen halláskárosodások évente több mint 90 milliárd Euro költségterhet jelentenek az Európai Unióban. 2030-ra a társadalomra az első tíz legjelentősebb terhet rakó betegség közé prognosztizálják a magas- és közepes jövedelmű országokban (4).

A halláscsökkenések okai három fő típusra oszthatók aszerint, hogy a hangvezető rendszerben, vagy a hangfelfogó-, hangfeldolgozó apparátusban van eltérés: vezetékes-, szenzorneurális-, valamint e kettő eredményeként kialakuló kevert típusokra. Ezen típusú halláscsökkenések légvezetékes illetve csontvezetékes hallásküszöbre kifejtett jellegzetes hatását a 3. ábra mutatja be sematikusán, összehasonlítva egy, a normál hallás esetén megfigyelhető audiogrammal (3/A ábra; a 3. ábra Gregg R. et al. (2004) közleményének 2. ábrája (5) továbbá a Handbook of Otolaryngology, Head and Neck Surgery (2011) című könyv 2.7. ábrája (6) alapján saját készítés). A külsőfül vagy középfül betegsége okozza a vezetékes típusú halláscsökkenést. Kialakulásában elsősorban a fülzsír felhalmozódása, a középfül fertőzése, a dobhártya sérülése illetve a kengyel fixációjával járó abnormális csontosodás (otosclerosis) játszik szerepet. A csont- és légvezetékes küszöb külön fut, a közöttük lévő eltérés (csontlégköz) legalább 10, de maximum 60 dB (3/B ábra). Ez a jellemzően minden frekvenciára kiterjedő halláscsökkenés súlyossági foktól függetlenül ma már jó eredménnyel rehabilitálható a

modern fülsébeszeti beavatkozások segítségével, sikertelenség esetén hallásjavító készülék alkalmazásával.

A belsőfület illetve a hallóideget/hallópályát érintő idegi eredetű vagy szenzorineurális halláskárosodás (sensorineural hearing loss, SNHL) eleinte a magasabb frekvenciákat érinti, később azonban ráterjed a beszédfrekvenciákra is. A légvezetési és csontvezetési küszöb mértéke közel azonos (3/C ábra). Terápiájának sikerességét a hallásvesztés mértéke határozza meg. A kis-, közepes-, és nagyfokú idegi halláscsökkenés ma már eredményesen kezelhető a korszerű hallásjavító eszközök segítségével. A súlyos fokú-, siketséggel határos halláscsökkenés valamint a siketség azonban nem kezelhető nagy teljesítményű hallásjavító készülékekkel sem.

A közép-és belsőfül együttes károsodásakor fellépő kevert típusú hallásvesztés során mind a légvezetési, mind a csontvezetési küszöb emelkedik. A köztük lévő eltérés mértéke 10-60 dB (3/D ábra).



3. ábra. Szubjektív küszöbaudiometriai vizsgálatok során kapott jellegzetes tisztahangküszöb-audiogramok. Az audiogramok a jobb fül légvezetéses illetve csontvezetéses értékeit szemléltetik. **A)** Normál hallás **B)** Vezetékes halláskárosodás **C)** Szenzorineurális halláskárosodás **D)** Kevert típusú halláskárosodás.

3.4. A szenzorineurális halláscsökkenés leggyakoribb formái

A szenzorineurális halláskárosodások során a belsőfül illetve a hallóidegpálya valamely eleme sérül vagy – hereditár halláskárosodások esetén – hibásan fejlődik. Az érintett struktúrák illetve a halláskárosodás mértéke etiológiánként eltérő. Kialakulásának leggyakoribb okai között szerepel egyes gyógyszerek (pl. aminoglikozidok, platinaszármazékok) mellékhatása, a zaj, az öregedés során kialakuló degeneratív folyamatok, egyes genetikai mutációk jelenléte, valamint számos autoimmun jelenség. A

legnagyobb humán jelentőségű SNHL-ek közé az időskori halláscsökkenés (presbycusis; age-related hearing loss, AHL), a zajártalom okozta halláscsökkenés (noise-induced hearing loss, NIHL) továbbá a gyógyszerek mellékhatásaként fellépő halláscsökkenés (drug-induced hearing loss, DIHL) tartoznak.

3.4.1. *Időskori halláscsökkenés*

Az AHL a SNHL-ek leggyakoribb formája (7). Előfordulása az átlagéletkor növekedésével folyamatosan nő. Gondoljunk idősödő társadalmainkra, ahol elkerülhetetlenül egyre többen szenvednek időskori hallásvesztésben. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) tanulmányai szerint a 60 év feletti több mint 25%-a küzd különböző mértékű hallásvesztéssel (3). Az életkorral összefüggő halláscsökkenés rendszerint fiatal felnőttkorban manifesztálódik (a 30-as évek végén), az életkor előrehaladtával fokozatos romlást mutatva (8). Eleinte csak a magas frekvenciákat érinti, később azonban ráterjed a mélyebb hangokra – köztük a beszédfrekvenciákra – is. A halláscsökkenés illetve a zajos környezetben való beszédértési nehézség fellépése (9) akadályozza a mindennapi kommunikációt, ami akár szociális izolációhoz, depresszióhoz is vezethet (10). A betegség multifaktoriális jellegű, kialakulásában szerepet játszik a cochlea öregedése, különböző környezeti hatások (pl. zajártalom), genetikai tényezők, immunológiai elváltozások, bizonyos otológiai rendellenességek és egyéb komorbiditások kumulatív hatása (8, 11, 12). A progresszív folyamat során elsősorban a cochleában lévő szőrsejtek, SGN-ek valamint a stria vascularis sejtjei károsodnak (13).

3.4.2. *Zajártalom okozta halláscsökkenés*

Az SNHL-ek másik gyakori formája a NIHL. A munkahelyi zajterhelés a felnőttek halláskárosodásának megközelítőleg 16%-áért felelős, prevalenciája – részben a zenei szokások megváltozása miatt – folyamatosan nő (8). A fülhallgatóval való hangos zenehallgatás általános elterjedése, elsősorban a 12-35 éves korosztály körében, a probléma gyakoriságának és jelentőségének növekedését vetíti előre. A WHO 1 milliárdra becsüli az ezen okból kockázatnak kitett fiatalok számát (3). A NIHL sok esetben átmenetinek (TTS, temporary threshold shift) bizonyul és a hallás visszatér a normális szintre, azonban a hallásküszöb eltolódás gyakran maradandóvá válik (PTS, permanent threshold shift). Halláscsökkenést okozhat egyszeri zajbehatás (egyszeri nagy

intenzitású, 125 dB feletti zaj) (14), de tartós halláskárosodás kialakulásához általában többszöri vagy krónikus (85 dB-t meghaladó, tartós, évekig vagy évtizedekig tartó zajterhelés) zajexpozíció vezet (15). A kockázati tényezők között szerepelnek nem zaj eredetű belsőfül megbetegedések, keringési zavarok, oxigénhiányos állapotok, ototoxikus anyagok (16). Akut zajártalomnál károsodhat a hangvezető rendszer, mely többek között a dobhártya szakadásában, az ovális ablak rupturájában nyilvánulhat meg. A belsőfülben található szenzoros szőrsejtek sztereocíliumai fizikailag eltörhetnek, akár fuzionálhatnak (17). Krónikus zaj hatására elsősorban a Corti-féle szervben található szőrsejtek, támasztósejtek, továbbá az SV illetve a ligamentum spirale képletei érintettek (18-22).

3.4.3. Gyógyszerek mellékhatásaként fellépő halláscsökkenés

Bizonyos gyógyszerek, elsősorban az aminoglikozid antibiotikumok mellékhatásként visszafordíthatatlan halláskárosodást okozhatnak. Bár az aminoglikozidok okozta halláskárosodás ritkább mint például a zaj indukálta, de a jelentőségét tekintve nagy. A toxikus halláskárosodásra való fogékonyság függ az adásmódtól, a genotípustól és a fennálló betegségektől (23). Egyes betegeknél a halláscsökkenés már a kezelést követő napon jelentkezhet, míg mások több hónapos kúra után sem tapasztalnak hallásromlást (24). A cochlea károsodása eleinte a magasabb frekvenciákat érinti (25), majd kiterjed az alacsonyabb frekvenciatartományokra is. Néhány napos kezelés után a betegek körülbelül 20%-ánál lép fel hallásromlás (26-28). Egy akár 6-12 hónapig tartó hosszabb kezelés hatására már minden egyes betegnél hallásvesztés figyelhető meg (29). Ototoxikus mellékhatás jelentkezhet többek között a platinavegyületek, kacsdiuretikumok illetve szalicilátok alkalmazásakor is, amelynek eredménye a cochlea bilaterális károsodása. Az aminoglikozidok a cochlea valamennyi sejtípusába penetrálnak (30, 31). Az ototoxicitás okozta károsodás leginkább az OHC-ket érinti (23), az IHC-k csak ezt követően sérülnek (32). A szőrsejtek mellett károsodnak az SV sejtjei, a támasztósejtek továbbá az SGN-ek is (32).

3.5. A szenzorineurális halláscsökkenés főbb patológiai jellemzői

A különböző SNHL-ek hátterében számos azonos eredetű ok áll. Az excitotoxicitás, az oxidatív stressz illetve a programozott sejthalál valamennyi SNHL forma kialakulásának meghatározó patológiai tényezője.

3.5.1. *Excitotoxicitás*

A Corti-féle szerv és a hallópálya neuronjainak károsodásában jelentős szerepet játszik az excitotoxicitás. Ennek folyamán túlzott mennyiségű glutamát szabadul fel az IHC-kből, ami túlaktiválja és károsítja az elsődleges hallóneuronokat (33-36).

Az IHC-k a hallás valódi receptorsejtjei. Az ingerületek 95%-át ezen sejtek és a hozzájuk kapcsolódó afferens idegrostok (n. cochlearis) továbbítják a hallóközpont felé (37-40). Hanginger hatására feszültségfüggő kalcium csatornákon át Ca^{2+} -ok áramlanak a sejtbe. Az intracelluláris Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) növekedés hatására az IHC-kből felszabaduló neurotranszmitter aktiválja a n. cochlearis rostjait (41, 42). Az IHC-k és az afferens hallóidegek közötti ingerületátvivő anyag a glutamát (38). Abnormális ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) növekedés hatására excesszív mennyiségű glutamát szabadul fel, ami az idegsejtek degenerációját illetve pusztulását eredményezheti. Ez a folyamat presbycusisban (11, 43), zajkárosodásban (35), aminoglikozid okozta halláscsökkenésben (34) és hirtelen hallásvesztésben (44) is kóroki tényező. Rövid ideig tartó noxa (pl. akut zajexpozíció) az afferensek terminálisainak duzzadásához vezet, a hallásfunkció romlását eredményezve. Ezek a duzzadt terminálisok képesek regenerálódni, így a hallásküszöb emelkedése rendszerint átmenti. A nagy intenzitású vagy krónikusan fennálló zajártalom proteázokat, endonukleázokat és lipázokat aktiváló folyamatokat indukál, amely az SGN-ek pusztulásához vezet (44, 45).

3.5.2. *Oxidatív stressz*

A sejtkárosodás fontos iniciátor tényezője a reaktív oxigén származékok (ROS) szintjének növekedése, ami a ROS képződés és elimináció egyensúlyának megszűnésével következik be. Az oxidatív stressznek fontos szerepet tulajdonítanak a cochlea betegségeiben, az SNHL különböző formáinak kialakulásában (46-49). A ROS homeosztázis felborulása metabolikus elégtelenséget vált ki a sejtekben, ami végül a sejtek, elsősorban az OHC-k halálához vezet (50, 51). Az oxidatív stressz közvetlenül is képes károsítani a különböző sejtalkotókat (52, 53), továbbá a kóros Ca^{2+} szint növekedéshez hasonlóan (54, 55) részt vesz az excitotoxicitás okozta sejtkárosodásban is (56, 57).

A ROS szint növekedése károsítja a mitokondrium DNS-ét, zavart okozva a belsőfül különböző sejteinek működésében (58). Ezek pusztulása okozza a szenzoros

presbycusist. A ROS szerepét ebben a presbycusis típusban olyan kísérletes modellekben bizonyították be, amelyekben sérült az endogén antioxidáns rendszer (59-61).

A 100 dB-nél nagyobb erősségű zaj hatására a ROS szintje megemelkedik a cochleában (62). A ROS képes károsítani a DNS-t, a lipideket, a fehérjéket, és sejthalált (nekrózist és apoptózist) indukálni.

Az aminoglikozidok fokozzák a ROS és a szabadgyök képződést. Dekompartmentalizálják és megkötik a biomolekulákban található fémionokat kelát komplexet képezve (63). Ezek a komplexek redox aktívak és ROS képződést generálnak (23, 61, 64). Az aminoglikozidok közvetlenül képesek szabályozni a ROS metabolizmusban szerepet játszó enzimek aktivitását. Gátolják az antioxidáns hatású katalázokat, illetve aktiválják az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (iNOS) (65). Fokozzák a NADPH-oxidáz (NOX) aktivációt, ami szuperoxid termeléshez vezet. A képződött ROS aktiválja mind a sejt nekrozisát, mind az apoptózist (66).

3.5.3. Programozott sejthalál

A programozott sejthalál (PCD, programmed cell death) valamennyi SNHL forma patomechanizmusának meghatározó tényezője (61).

A PCD különböző formái, az apoptózis, az autofágia valamint a nekroptózis, a szervezet megfelelő működésének, az egyedfejlődésnek elengedhetetlen elemei. Az apoptózis egy adenzin-5'-trifoszfát (ATP)-függő, enzimek által mediált folyamat, amely során a szervezet számára felesleges vagy veszélyt jelentő sejtek elhalása megy végbe. A kiváltó tényezők között különböző intrinzik (pl. vírusok, DNS-t károsító sugárzás) és extrinzik (stressz) faktorok szerepelnek. A nekroptózis a sejtek mikrokörnyezetében megjelenő rendellenességek esetén indukálódó folyamat. Az autofágia a sejtek intracelluláris illetve extracelluláris stresszre illetve éhezésre adott válaszában játszik kulcsfontosságú szerepet. Többek között az oxidatív stressz csökkentésével védelmet nyújthat a NIHL és DIHL kialakulásával szemben. Fontos szerepe van a szőrsejtek morfológiájának, ezáltal a hallóképességnek a fenntartásában (61). Az apoptózis és a nekroptózis mindig sejthalálhoz vezet, míg az autofágia a sejtek túlélését vagy pusztulását egyaránt eredményezheti. Fiziológias körülmények között a PCD-t kiváltó illetve gátló faktorok között finom egyensúly áll fenn a szervezet egészében, így a hallórendszerben is. Ennek felborulása valamely SNHL forma kialakulásához vezethet (61).

Az öregedés, a zajexpozíció továbbá az ototoxikus hatással rendelkező gyógyszerek különböző biokémiai útvonalakon keresztül mind-mind képesek a hallórendszer sejtjeiben PCD indukálására, amely folyamat a sejtek pusztulásához vezet. A normális mértékű neuron degeneráció az öregedés természetes velejárója. A neurális AHL formát nagyon gyors afferens neuron degeneráció jellemzi, amely folyamat az IHC-k pusztulását követően következik be (67). Zajterhelést követően fokozott kromatin kondenzáció és az apoptózis különböző markereinek – többek között a kaspáz 3, 8 és 9 illetve Bad protein - emelkedett szintje figyelhető meg. Az aminoglikozidok elsősorban a belső, mitokondriális útvonal aktiválásával okozzák a szőrsejtek illetve az SGN-ek apoptózisát, azonban az SV sejtjeinek pusztulását is megfigyelték (61).

Az excitotoxicitás, az oxidatív stressz és a PCD mint közös kóroki tényezők mellett számos más patológiai faktor is szerepet játszik az egyes SNHL formák megjelenésében. Az AHL kialakulásához köthető diszfunkciók közé tartozik a hősokk fehérjék és az akvaporinok abnormalitása (68, 69), az immunrendszer rendellenes működése (70), az SV vaszkularizáltságának csökkenése. Utóbbi a metabolikus/striális presbycusis forma kialakulásáért felelős (71). Az aminoglikozidok okozta ototoxicitás az aminoglikozidok-indukálta foszfoinozítidek depléciója okozta kálium csatorna inhibíció következménye is lehet (72). Az ioneloszlás egyensúlya kruciális a megfelelő szenzoros működéshez. A K^+ körforgásában résztvevő struktúrák kimondottan érzékenyek a zajexpozícióra. Továbbá megfigyelték a K^+ homeosztázisának fenntartásával és a HSP70-nel kapcsolatos géneket, melyek befolyásolhatják a NIHL kialakulását (73, 74). Mindemellett a nagyon erős zaj képes csökkenteni a cochlea véráramlását, a vérellátás zavara pedig a hallásküszöb eltolódásához vezet (75).

3.6. A szenzorineurális halláscsökkenés jelenlegi terápiás megközelítése, hatékony gyógyszeres kezelésének hiánya

A vezetéssel típusú halláskárosodásokkal szemben az SNHL-ek komoly kihívást jelentenek a farmakológiai kutatások számára. Az SNHL-ek patomechanizmusának komplex, multifaktoriális jellege, a normál illetve károsodott hallórendszerben zajló molekuláris mechanizmusok illetve endogén védő mechanizmusok hiányos ismerete nehézséget jelent a gyógyszerfejlesztők számára. Egyelőre a szupportív kezelésen kívül

nem létezik igazán hatékony gyógyszeres terápia, ami ezen károsodásokat mérsékelné, illetve megelőzné.

Jelenleg a kortikoszteroid kezelés, különböző keringésjavítók adása, a hiperbárikus oxigénterápia (HBOT) továbbá hallókészülék vagy cochleáris implantátum alkalmazása elterjedt gyakorlat a klinikumban.

Az akut idegi halláscsökkenés (sudden sensorineural hearing loss; SSNHL) hátterében rendszerint gyulladós sejthalál kaszkádfolyamatok állnak (76). Ebből kifolyólag a klinikumban a betegség megjelenése esetén kortikoszteroid adás javallott. Az Amerikai Fül-orr-gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Akadémia Alapítvány (American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery Foundation, AAO-HNFS) érvényben lévő, 2019-es szakmai irányelve a kortikoszteroid kezelést önmagában vagy HBOT-tal kombinálva javasolja, a tünetek megjelenésétől számított 2 héten belül (77). A kortikoszteroidok (prednizolon, metilprednizolon, dexametazon) adagolása általában szisztémásan történik, ezáltal számos szervet érintő mellékhatás kialakulásához vezethetnek (pl. gastritis, gyomorvérzés, a cukorháztartás zavara). A lehetséges mellékhatások továbbá a kezelés hatásosságának bizonytalansága (78, 79) következtében a kezelés megkezdése előtt a kortikoszteroidok kockázat/előny aránya mérlegelendő. Alternatívát a lokális úton történő alkalmazásuk elterjedése jelent (pl. intratympanális adásmód). Ennek során a mellékhatások kisebb valószínűséggel jelentkeznek, mindemellett ez az adásmód nagyobb hatékonyságot mutatott a szisztémás adagolással szemben (80-82). Az AAO-HNFS 2019-es szakmai irányelvében az intratympanális szteroid terápia a tünetek tartós fennállása esetén javallt, azok megjelenésétől számított 2-6 hétben (77).

Habár az AAO-HNFS 2019-es szakmai irányelve már nem javasolja a keringésjavítók rutinszerű adását (77), a klinikumban mégis gyakran alkalmazzák ezen készítményeket. A leggyakrabban alkalmazott keringésjavítók közé a pentoxifyllin, a dextrán, a papaverin, a vinpocetin és a piracetam tartoznak (83). Ezen vegyületek hatékonysága még nem kellően alátámasztott, bizonyos esetekben azonban jelentős hallásjavulás érhető el alkalmazásukkal. Az eddigi eredmények megítélésében nehézséget okoz az a tapasztalat, miszerint a SSNHL sok esetben spontán javulást mutat.

A cochlea oxigénigénye rendkívül magas, amelynek biztosítása nélkülözhetetlen a megfelelő hallásfunkcióhoz. Cochleáris hypoxia esetén többek között neuronpusztulás,

a belsőfül endolimfájának rendellenessége, ennek eredményeként pedig halláskárosodás léphet fel. Az SSNHL kezelésére, elsősorban kiegészítő terápiaként, számos országban alkalmazzák a HBOT-t. A módszernek számos prospektív, randomizált kísérlet bizonyította hatékonyságát. A terápia során a betegeknek lehetőségük van egy speciális túlnyomásos kamrában a normál légköri nyomásnál nagyobb értékű, akár 100%-os oxigén tartós belélegzésére. Ezáltal megnő a cochleáris szövetek oxigén telítettsége, amely megakadályozhatja a szőrsejtek illetve SGN-ek pusztulását. A kezelések javasolt időtartama naponta 90 perc, 10-20x ismételve, kezelésként 2-2,5 atmoszféra nyomást alkalmazva (84). Az AAO-HNFS irányelve a HBOT-t kizárólag kortikoszteroid kezeléssel kombinálva javasolja a tünetek megjelenésétől számított 2 héten (kezdeti terápia) vagy 1 hónapon belül (úgynevezett mentőterápia) (77). Mellékhatásként leggyakrabban a középfül barotraumája léphet fel. A kezelés költségessége (2000-5000 \$/10 kezelés) valamint a lehetséges kontraindikációk (például pangásos szívelégtelenség, reaktív légúti betegségek, szorongás) miatt a HBOT alkalmazása megfontolandó (84). Magyarországon a HBOT-hoz való hozzáférés erősen korlátozott, jelenlegi terápiás megoldást a szisztémás kortikoszteroid kezelés jelent.

A SSNHL sikertelen gyógyszeres kezelése valamint az SNHL-ek krónikus fennállása esetén hallásjavító eszközök alkalmazása válik szükségessé. Ide tartoznak a hallókészülékek, amelyek a felerősített hangot a hallójáratba továbbító elektromos hangerősítők. Alkalmazásuk független az életkortól. Mind a légvezetéses, mind a csontvezetéses típusnak számos fajtája elterjedt a gyakorlatban. Manapság a digitális jelfeldolgozású, hallójáratba illetve nyitott illesztésű, kis méretű fül mögötti készülékek a legkeresettebbek (85). Kétoldali belsőfül-eredetű siketség vagy súlyos mértékű hallásvesztés esetén, amely nagyteljesítményű hallókészülékekkel sem javítható, a cochleáris implantátum alkalmazása jelenthet megoldást. A cochleáris implantátum a külvilágból származó hangok és a központi idegrendszer között létesít kapcsolatot, mintegy helyettesítve a belsőfület. A különböző frekvenciájú hangok akusztikai energiáját elektromos jellé alakítja és egy elektróda segítségével közvetlenül a hallóneuronokhoz juttatja. A készülék működésének nélkülözhetetlen eleme a hallóneuronok épsége. Ennek hiányában az agytörzsi implantáció jöhet szóba, amely a cochleáris implantátummal szemben jóval szerényebb eredményekhez vezethet. Cochleáris implantáció mind prelingualis siketek (hallásvesztés a beszéd elsajátítása

előtt), mind postlingualis siketek (hallásvesztés a beszéd elsajátítása után) esetében lehetséges. Az implantációtól igazán jó eredmény akkor várható, ha a beültetés a prelingualis siketek esetében legfeljebb 1-2 éves korban, postlingualis siketek esetében pedig a hallásvesztést követően minél korábbi időpontban megtörténik. A később implantált betegek esetében az eszköz hatékonysága kevésbé kielégítő a frekvencia diszkrimináció, a zajos környezetben való beszédértés továbbá a mindennapi feladatok (pl. telefonbeszélgetés) segítése tekintetében (86).

Az igen költséges és életmódbeli változásokat is igénylő hallásjavító eszközök alkalmazása gyakran sikeres, azonban sem a hallókészülék, sem az implantáció nem képes pótolni a természetes hallást.

3.7. A szenzorineurális halláskárosodások gyógyszeres terápiájának kutatása, leggyakoribb terápiás célpontok

Az SNHL elleni hatékony gyógyszeres terápia hiánya, a jelentős piaci igény miatt a gyógyszeripar figyelme kezd ezen a területen folyó kutatások felé fordulni (87). A valamilyen szintű reziduális hallással rendelkező, hallókészüléket vagy cochleáris implantátumot kapott betegek beszédértése, zeneélvezete vagy háttérzajban mért hallása kifejezetten jobb mint a semmilyen maradványhallással nem rendelkezőké, éppen ezért igen nagy érdeklődés mutatkozik olyan gyógyszerek iránt is, amelyek a reziduális hallás védelmét tudnák biztosítani (88). Az SNHL-ek patomechanizmusának sejt- és molekuláris szintű vizsgálata során eddig számtalan potenciálisan protektív hatású támadáspontot jelöltek meg. A patomechanizmus ismeretében otoprotektív hatás feltételezhető azon vegyületektől, amelyeknek szerepük lehet a redox rendszer megbillent egyensúlyának helyreállításában, az elsődleges hallóneuronok túlaktiválódásának gátlásában, az apoptotikus folyamatok szabályozásában valamint az endogén protektív hatású LOC efferens rendszer hatásának fokozásában a dopaminerg neurotransmisszió serkentése révén (89-94).

3.7.1. Az egér, mint modellállat a szenzorineurális halláskárosodások kutatásában

Egy potenciálisan hallásvédő vegyület klinikumban való kipróbálásához elengedhetetlenek az állatmodelleken végzett preklinikai vizsgálatok. Napjainkban a belsőfüllel és a belsőfül patológiájával kapcsolatos kutatások egyik fő modellállata a laboratóriumi egér. Az egerek jól alkalmazhatóak az emberi halláskárosodás

modellezésére, mert nagyon hasonló a cochleájuk neuroanatómiája, élettana és a halláskárosodásuk patofiziológiája (95-97). Az egerek genetikai manipulálhatósága, a rendelkezésre álló, a hallás szempontjából jelentős géneket illetve génhibákat hordozó egértörzsek sokfélesége szintén hozzájárul az egér halláskutatásban való alkalmazásához. Egerekben bizonyos gének jelenléte - amelyeknek ortológja emberben is megtalálható – fokozza az AHL valamint a NIHL kialakulásának kockázatát (98, 99). Ezek alapján az egyes egérmodellek jó prediktív értékkel bírnak, vagyis a hallásvédőnek bizonyult vegyületek nagyobb eséllyel lesznek védőhatásúak emberben is, növelve a gyógyszerfejlesztés hatékonyságát és sikerrátáját.

Az SNHL-ek gyógyszeres terápiájának kutatásában leggyakrabban alkalmazott egérmodellek közé többek között a BALB/c, a C57BL/6 illetve a DBA/2 beltenyésztett egértörzsek tartoznak (100). Ezen törzsek különböző mértékű, az életkorral fokozódó, eleinte az emberhez hasonlóan csak a magasabb frekvenciákat érintő hallásvesztést valamint eltérő mértékű zajérzékenységet mutatnak (96). Az ototoxikus gyógyszerek iránti érzékenység szintén megfigyelhető az egyes altörzsekben (101-103). Ezáltal mindhárom törzs alkalmas az AHL valamely típusának, a NIHL-nek illetve a DIHL-nek a modellezésére, patomechanizmusának vizsgálatára, lehetséges hallásvédő vegyületek tesztelésére.

3.7.2. *Neuroprotektív vegyületek*

A halláskárosodások kutatásának háttérében évtizedekig a szőrsejtek álltak, azonban az utóbbi időkben kezdik felismerni az SGN-ek károsodásának jelentőségét (104). Számos neuroprotektív hatással bíró vegyület védőhatását figyelték meg különböző állatmodellekben illetve bizonyos klinikai vizsgálatok során. Állatkísérletekben valamint keresztmetszeti és kohorszvizsgálatokban az aldeszteron, az inzulinszerű növekedési faktor (IGF1) és az agyi eredetű neurotróf faktor (BDNF) AHL elleni védőhatását mutatták ki, amelynek háttérében feltehetőleg az SGN-ek védelme állt. Ugyanakkor egy idősebb korosztályon végzett, populáció alapú longitudinális kohorsz vizsgálat nem támasztotta alá ezen vegyületek otoprotektív hatását (105). Tengerimalacban a riluzol zajexpozíció-indukálta cochleáris excitotoxicitással szembeni védőhatását írták le, amelyet a vegyület a glutamát excitotoxicitás gátlása révén fejtett ki (106). A

neuroprotektív tulajdonságokkal bíró eritropoetin adása szintén mérsékelte az SGN-ek pusztulását - ezáltal az AHL kialakulását - C57BL/6 egerekben (107).

3.7.3. *Dopaminerg neurotranszmisszió modulálása – a lateralis olivocochleáris (LOC) efferens rendszer szerepe*

A LOC efferens rendszer működésének befolyásolása egy másik fontos terápiás célpont az SNHL-ek megelőzésének kutatásában. A LOC efferensek az elsődleges hallóneuronok belső szőrsejtek alatti terminálisán képeznek szinapszist az emlős hallórendszerben (108). Szomájuk az oliva superiorban van, tüzelésüket - a cochleáris magokon keresztül – az elsődleges hallóneuron aktivációja váltja ki. A LOC efferensek szerepe, többek között, az elsődleges hallóneuron kóros túlaktiválódása elleni védelem. Ebben a védelemben fontos szerepet játszik a dopamin (DA), amely gátolja a hallóneuronok zaj okozta túlaktiválódását és kimutatottan védi azokat a károsodással szemben (89, 90, 109). Kutatócsoportunk elsőként szolgáltatott neurokémiai bizonyítékot a LOC efferensek DA felszabadítására (110) és a DA neurotranszmisszió modulációjára (111-114). Számos meggyőző kísérletben igazolták, hogy DA receptor agonisták gátolják az elsődleges afferens hallóneuronok tüzelését és megakadályozzák ezen neuronok strukturális károsodását (89, 90, 94). D1/5 agonista alkalmazása tengerimalac cochleán markánsan elnyomta a hallóideg akciós potenciáljának amplitúdóját (115). A MAO-B gátló rasagilin többek között a LOC efferensekből történő DA felszabadítás fokozása révén bizonyult otoprotektív hatásúnak a kanamycin okozta halláskárosodás egérmodelljében (102). Ezen ismeretek alapján minden olyan vegyület, ami fokozza a dopaminerg neurotranszmissziót, potenciálisan otoprotektív (91).

3.7.4. *Antioxidánsok*

Mindhárom SNHL típus esetén a kutatások gyakran a ROS képződéssel kapcsolatos protektív mechanizmusokat célozzák. Az oxidatív stressz ellen a legkézenfekvőbb védekezés az antioxidánsok alkalmazása. AHL esetén L-carnitin, N-acetil-cisztein (NAC), különböző vitaminok (C és E), melatonin, lazaroid és lecitin adásával is próbálkoztak állatkísérletes modellekben (116, 117). A glutation (118), a D-metionin (119), az ebselen (120), a rezveratrol (121), az aszkorbinsav (122), vagy a Q10 koenzim (123) a különböző állatmodellekben, a zaj előtt alkalmazva, mind csökkentették a

károsodás mértékét. A NAC-ot széles körben alkalmazzák a különböző típusú zajterhelésnek kitett állatmodellekben, számos tanulmány azonban cáfolja a NAC védőhatását (124, 125). Az aminoglikozidok okozta halláskárosodás mérséklésére eddig vizsgált vegyületek közé többek között különböző vas-kelátor hatóanyagok, mint a deferoxamin és a dihidroxibenzoát (126, 127), a liponsav, α -tokoferol, ebselen, D-metionin és a szalicilátok tartoznak (128). Annak ellenére, hogy a vas-kelátorok preklinikai vizsgálata sikeres volt, humán adatokból származó pozitív eredmények még nem állnak rendelkezésünkre (129).

3.7.5. *Antiapoptotikus vegyületek*

Az antiapoptotikus ágensek alkalmazása egy másik potenciális lehetőség a terápiára. c-Jun N-terminális kináz (JNK)-inhibitor illetve retinsav adásának védőhatását figyelték meg a zaj okozta hallásküszöb eltolódással szemben, amely hatás a mitogén aktivált protein kináz (MAPK)-JNK apoptotikus kaszkád gátlásán keresztül érvényesült (130, 131). A pán-kaspáz gátló Z-VAD-FMK vegyület DBA/2J illetve A/J egerekben mérsékelte a hallás romlását a kaspáz-mediálta apoptózis gátlásán keresztül (132). Az autofágia serkentő rapamycin csökkentette a zaj következtében bekövetkező sejtpusztulás mértékét és a hallásküszöb eltolódást, ezáltal a NIHL kialakulását *in vivo* egérmodellben (133).

Az állatkísérletekben eddig hatásosnak bizonyult vegyületek alkalmazása a humán medicinában számos kérdést és problémát vet fel. Tumorterápiában részesülők esetén a tiolvegyületek, köztük a NAC szisztémás alkalmazását korlátozza ezen vegyületek ciszplatin hatékonyságát csökkentő hatása (129). Az állatmodellekben szisztémásan alkalmazott E vitamin dózisa humán szempontból rendkívül magas. A subarachnoidális vérzés kockázatának növelésével alkalmazása fokozott mortalitáshoz vezethet (129). Az mTOR kinázt gátló rapamycin az autofágia serkentése mellett számos jelátviteli útvonalat befolyásol és így nagyszámú mellékhatással rendelkezik (pl. hiperglikémia, inzulinrezisztencia, hiperlipidémia) (134).

A számos ígéretes preklinikai eredmény ellenére jelenleg sincs forgalomban az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal (U.S. Food and Drug Administration; FDA) illetve az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi

Intézet (OGYÉI) által elfogadott specifikus hallásvédő vegyület. Bizonyos forgalomban lévő gyógyszerek indikációi között ugyan szerepel a belfül illetve különböző fülészeti kórképek mint terápiás célpontok (pl. Chinotal és Trental, hatóanyag: pentoxifyllin; Cavinton és Vinpocetin-Covex, hatóanyag: vinpocetin), azonban ezen indikációkat alátámasztó kiterjedt klinikai vizsgálatokat még nem végeztek. A ClinicalTrials.gov és az EudraCT adatbázisok szerint a jelenlegi gyógyszerfejlesztési kísérletek vegyületei közül még egy gyógyszert sem tesztelnek széleskörű klinikai vizsgálatban, ezáltal az új terápiás lehetőségek feltárása továbbra is szükséges.

3.8. Lehetséges ototoxikus vegyületek és kutatásuk jelentősége

Az SNHL-ek hatékony farmakoterápiájának hiánya következtében kiemelkedő jelentőséggel bír a betegség kialakulásának megelőzése, a halláskárosodást kiváltó tényezők (pl. különböző vegyületek) ismerete is.

Egy-egy új gyógyszer engedélyeztetésekor kritikus fontosságú a mellékhatásprofil feltérképezése, a biztonságosság megítélése. Egyes ritka mellékhatásokra csak a IV. fázis vizsgálata során derül fény, ugyanis ekkor alkalmazzák a gyógyszert elég nagy populáción ahhoz, hogy ezek a nem kívánt hatások észlelhetővé váljanak (135). A klinikumban alkalmazott gyógyszerek közül, mint a tumorelleses platina vegyületek, az aminoglikozid antibiotikumok illetve a nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek, több mint 150 vegyület ismert ototoxikus hatású (136, 137). A vegyületek egy része által kiváltott károsodás reverzibilis, azonban jelentős hányaduk alkalmazása irreverzibilis halláskárosodás kialakulásához vezethet. Ezen gyógyszerek mellékhatásaként fellépő hallásvesztésnek - a többi SNHL-hez hasonlóan - jelenleg nincs hatékony és célzott gyógyszeres terápiája. Ebből kifolyólag kiemelkedően fontos a károsodás megelőzése, a prevenció. Az ototoxikus gyógyszerek okozta halláskárosodás kialakulását nagymértékben befolyásolja az alkalmazott gyógyszer típusa, dózisa és adásmódja, a kezelések száma illetve gyakorisága, a beteg életkora és egyéni érzékenysége (136). Az ismert halláskárosító vegyület körültekintő alkalmazásával, a kezelés időtartama alatt a hallás gyakori monitorozásával mérsékelhető annak ototoxikus hatása (138). Ehhez nélkülözhetetlenek a megfelelő preklinikai vizsgálatok, amelyek információt szolgáltatnak a lehetséges halláskárosító hatásról ill. annak mechanizmusáról. A problémát felismerve egyre nő azon kísérletek száma, amelyek a

feltételezhetően halláskárosító vegyületek vizsgálatára irányulnak. A HEI-OC1 sejtvonalat továbbá a zebraadánió (*Danio rerio*) lárvájának oldalvonal szervét – amely a humánhoz hasonló szőrsejteket tartalmaz - már számos alkalommal használták modellként potenciális ototoxikus anyagok *in vitro* illetve *in vivo* szűrésére (139). Coffin és munkatársai egy szerkezeti hasonlóság összehasonlításán alapuló számítógépes modell segítségével vizsgálta egyes vegyületek ototoxikus potenciálját (139). Ezzel szemben Lee és munkatársai egy számítógépes algoritmus alkalmazásával már longitudinális kohorsz vizsgálatokból származó adatok elemzését végezte egyes, a klinikumban már alkalmazott gyógyszerek esetleges ototoxikus hatásának kimutatására (140).

3.9. A szenzorineurális halláscsökkenés preklinikai vizsgálatának leggyakoribb módszerei

Az SNHL-ek patomechanizmusának tanulmányozására, különböző vegyületek hallásra kifejtett hatásának vizsgálatára számos *in vitro* illetve *in vivo* módszer áll a kutatók rendelkezésére. A hallásfunkció legszélesebb körben elterjedt *in vivo* vizsgálati módszere az auditoros agytörzsi kiváltott válasz mérése. Az *in vitro* kísérletek során leggyakrabban a külső és belső szőrsejtek, valamint az SGN-ek strukturális épségét, esetleges módosulásait vizsgálják. Ennek oka ezen sejtek meghatározó szerepe az érkező akusztikus jelek erősítésében, detektálásában és továbbításában. A különböző típusú SNHL-ek kialakulása során ezen sejtek morfológiai változása, degenerációja vagy hiánya a hallásvesztés egyértelmű jele.

3.9.1. Auditoros agytörzsi kiváltott válasz

Az auditoros agytörzsi kiváltott válasz (auditory brainstem response – ABR) az egyik leggyakrabban alkalmazott *in vivo* eljárás a hallásküszöb meghatározására. A módszer objektivitása mellett minimális invazivitása és ismételhetsége miatt vált széles körben elterjedté (141). Egy vegyület hallásra gyakorolt hatásának nyomon követéséhez (hatás kezdete, hatás változásának mértéke, stb.) elengedhetetlenek az ismételt mérések. További előnye, hogy a klinikumban hallásküszöb vizsgálatára alkalmazott rutinmódszer, az agytörzsi kiváltott potenciál audiometria (Brainstem Evoked Response Audiometry, BERA) megfelelője (142), ezáltal növeli az *in vivo* preklinikai kísérletek translációs értékét. A hallásküszöb értékek rögzítését elektromosan szigetelt környezetben, altatott

állatokon végzik. Altatás során az izommozgás illetve az agyi aktivitás lecsökken, javítva a jel-zaj arányt, ezáltal a méréskor regisztrált kiváltott válaszgörbe értékelhetőségét. Az akusztikai ingerlés speciális hangszórókkal, az elvezetés subcutan elhelyezett tülelektrodákkal történik. A hanginger továbbá az adatgyűjtés különböző paramétereit szabadon állíthatók (frekvencia, intenzitás, időtartam, stb.). Az akusztikus stimulusok tervezésére, a válaszok rögzítésére, az ingerlés és adatgyűjtés időbeli összehangolására speciálisan erre a célra tervezett műszerek állnak rendelkezésünkre. A hallásküszöb megállapítása mellett a hallópálya, így az agytörzs lézióinak vizsgálatára is alkalmas ez a módszer, így a humán diagnosztikában is nagy szerepe van (143-145).

3.9.2. Cochleogram

A Corti-féle szervben elhelyezkedő szőrsejtek morfológiai tanulmányozásának egyik alapvető módszere a cochleogram készítése. A módszerrel frekvenciaspecifikusan nyerhetünk információt az egyes cochleáris régiók (apikális, középső illetve bazális) szőrsejtjeinek állapotáról (146). Ennek alapja, hogy a Corti-féle szerv tonotopikus elrendeződést mutat, apikális részén az alacsony, bazális részén a magas frekvenciákat kódolva. Egy adott pontja egy adott frekvenciának feleltethető meg, amelynek meghatározása különböző kísérletes eredmények alapján készített egyenletekkel történik. Azonban fontos megemlíteni, hogy ezek közelítő értékek, egyes távolságokat illetően az egyenletek eredménye között akár egy oktávnyi különbség is lehet. Laborunkban a Müller és munkatársai által készített egyenletet alkalmazzuk, akik direkt elektrofiziológiai méréseket alkalmaztak számításaik során (147). Úgy gondoljuk, hogy a direkt módszer pontosabb képet ad az adott frekvenciákat ért történésekről.

A szőrsejtek vizsgálatához először az eltávolított majd dekalifikált cochleából mikrodisszekciós eszközökkel kipreparáljuk a Corti-féle szervet a cochlea teljes hosszában. Ezt követően a fluoreszcensen megfestett Corti-féle szerv külső és belső szőrsejtjeinek állapota, az ép sejtek aránya epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgálható. A fluoreszcens jelölés jellemzően phalloidinnal történik. A phalloidin az aktin filamentumokhoz kötődik, amely a szőrsejtek esetében a sztereocíliumok és a reticuláris lamina intenzív festődését okozza. Egy szőrsejt pusztulása során először a sztereocíliumai dezorganizálódnak, majd az apoptózissal párhuzamosan a szőrsejteket ölelő Deiters' sejtek heget képeznek a szőrsejtek helyén (21, 148, 149). A képződött heg jól

megkülönböztethetővé teszi az ép és károsodott szőrsejteket, illetve felismerhetővé válik hiányuk. Ha a károsodás csak részben érintette a sejtet, illetve az apoptotikus folyamatok még nem mentek végbe teljesen, a szőrsejtek állapota egyértelműen nem megítélhető. Ehhez nyújt segítséget a sejtmagok párhuzamos megfestése 4',6-diamidino-2-phenylindollal (DAPI). A sejtmag piknotikussá válása, hiánya a szőrsejt degenerációjának egyértelmű jele. A károsodott szőrsejtek száma manuálisan, egyenkénti leszámolással kerül meghatározásra. Az adatokból készített cochleogram nem más, mint egy diagram, amelyen az elpusztult szőrsejtek százalékos arányát ábrázoljuk a frekvencia, tehát a tonotópia függvényében.

A külső és belső szőrsejtek anatómiai vizsgálatának módszerét (cochlea disszekció, a Corti-féle szerv festése, szőrsejtszámolás, cochleogram készítés) 2018. augusztusában egy egy hétig tartó amerikai tanulmányúton sajátítottam el (Kresge Hearing Research Institute, Raphael Laboratory; Medical Science Unit II, Ann Arbor, MI 4605, Egyesült Államok).

3.9.3. *Spirális ganglionsejtek vizsgálata*

Az SGN-ek károsodása valamennyi SNHL típusban felelős a halláscsökkenés kialakulásáért, sérülésük kiemelt kóroki tényező. Ezen neuronok morfológiai épsége illetve száma információt nyújt az SGN-ek patológiás folyamatok által való érintettségéről (150). A sejtek állapota a modiolussal párhuzamosan (midmodiolárisan) metszett, majd hematoxylin–eozinnal festett preparátumokon jól vizsgálható a Corti-féle szerv apikális, középső illetve bazális kanyarulataiban.

3.10. Az immunrendszer hallásban betöltött szerepe

Az elmúlt két évtizedben számos, a halló- és immunrendszer kapcsolatát tárgyaló közlemény jelent meg az irodalomban. A belsőfület sokáig, mint immunprivilegizált szervet írták le. A cochleáris immunitás hiányát a nyirokelvezetés hiányával, a cochleáris folyadék igen alacsony immunglobulin koncentrációjával valamint a belsőfület a szisztémás immunrendszertől elválasztó vér-labirintus gát felépítésével magyarázták (151). Az utóbbi években azonban világossá vált, hogy a belsőfül nem immunprivilegizált: noha a keringő antigéneket hatásosan kizárja a vér-labirintus gát,

számos csontvelői eredetű szöveti makrofág található a belsőfül különböző régióiban (152, 153).

3.10.1. Immunfolyamatok a belsőfülben

A hallószervben már számos, az immunválasz kiváltásához szükséges sejttípust leírtak (154, 155). Ezen sejtek közül a rezidens makrofágok azok, amelyek a cochleában állandó jelleggel megtalálhatóak. Elsősorban a stria vascularis, a ligamentum spirale, a spirális limbus és az SGN-ek területén helyezkednek el (151, 156-162). Aktiválódásuk különböző káros behatások (pl. zajexpozíció, iszkémia, citotoxikus vegyületek) eredménye (156, 162, 163). A cochlea károsodása esetén, a makrofágok aktiválódása mellett, monociták beáramlását és monocita eredetű makrofágokká történő differenciálódását is megfigyelték (153). Az aktivált makrofágok különböző proinflammatorikus mediátorokat (pl. tumor nekrozis faktor- α , TNF- α ; interleukin-1 β , IL-1 β ; interleukin-6, IL-6; leukotriének; tromboxánok; prosztoglandin) és kemokineket (kemokin ligand 2, CCL2; kemokin ligand 4, CCL4; kemokin (C-X-C motívum) ligandum 12, CXCL12) expresszálnak (155, 164-169), amelyek közül a gyulladással kapcsolatos reakció iniciálásnak, erősítésének és fenntartásának egyik legfontosabb faktora a TNF- α (170-172). A gyulladás csúcspontján a proinflammatorikus mediátorok csökkent termelődése figyelhető meg, párhuzamosan az antiinflammatorikus mediátorok (transzformáló növekedési faktor béta, TGF- β ; interleukin-10, IL-10) növekvő expressziójával.

Időközben a gyulladást „feloldó” pro-rezolúciós mediátorok (lipoxinok; rezolvinok; protektinek; marezinek; annexin A1, ANXA1) szintézise és felszabadulása is megkezdődik, amelyek szerepet játszanak a proinflammatorikus mediátorok expressziójának leállításában és a sérült szövetek eltávolításában (164). Az ANXA1 mediátor, amelynek G protein kapcsolt ALX/FPR2 receptorai a Corti-féle szerv valamennyi sejttípusában (IHC, OHC, DC, pillér sejtek) kifejeződnek (173), jelentős szerepet tölt be a cochleáris immunfolyamatok szabályozásában (164, 173-175). Gátolja a proinflammatorikus citokinek felszabadulást, fokozza más pro-rezolúciós mediátorok expresszióját és serkenti a Corti-féle szerv támasztósejtjeinek nem professzionális fagocitákká történő transzformációját (173, 176). Meghatározó szerepét a glükokortikoidok SNHL-ekkel szemben mutatott védőhatása is alátámasztja. Az ANXA1

szintézise és felszabadulása kulcsszerepet játszik a kortikoszteroidok gyulladásgátló hatásának kifejeződésében (173, 177-179).

A Corti-féle szervben nem találhatóak professzionális fagocitasejtek. Az elhalt sejtek és szövettörmelékek eltakarítását a támasztósejtekből differenciálódott nem professzionális fagociták végzik, miközben számos, a gyulladás szempontjából fontos molekulát termelnek (157, 180, 181). A spirális limbusban, a ligamentum spiraleban illetve a stria vascularisban található fibrociták szerepe hasonló (155, 156, 166, 182-185). A cochleát ért stressz során proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1 β és IL-6) (155, 166, 181, 182) illetve adhéziós molekulák (155, 166, 186) felszabadításával részt vesznek az immunválasz aktiválásában (156, 183-185), ugyanakkor stressz okozta károsodásuk CD45 (+) csontvelőből származó fehérvérsejtek –lényegében monociták - megjelenését indukálja (156).

Habár a cochlea fő immunsejtjei a makrofágok, alacsony számban a granulociták, a T- és a B-limfociták valamint a természetes ölüsejtek jelenléte is kimutatható posztnatálisan (187).

3.10.2. Az immunrendszer szerepe a szenzorineurális halláskárosodásokban

Az immunrendszer amellet, hogy védelmi szerepet tölt be a belsőfül működésében, a különböző SNHL-ek kialakulásának is fontos kóroki tényezője. Azon felvetés, miszerint a hallásvesztés hátterében immunfolyamatok is állnak, az immunszuppresszáns tulajdonságú glukokortikoidok otoprotektív hatásának megfigyeléséből származik (188). Az immunrendszer nélkülözhetetlen a cochlea normál szerkezetének és funkciójának fenntartásában, azonban az immunfolyamatokat aktiváló és gátló faktorok egyensúlyának felborulása a belsőfül károsodásához, ezáltal különböző típusú SNHL-ek kialakulásához vezet (43, 159, 164, 189).

Az öregedés során kialakuló, alacsony szintű krónikus gyulladással járó állapot, az ún. „inflammaging”, az életkorral összefüggő halláskárosodás egyik patológiai tényezője (190, 191), amelynek hátterében a szőrsejtek és az SGN-ek fokozatosan progrediáló degenerációja áll (157, 190, 192). A szőrsejtek pusztulásában aktív szerepet játszanak a rezidens makrofágok, a szőrsejtek mikro környezetének megváltoztatásával. Az életkor előrehaladtával a BM scala tympani felőli oldalán található makrofágok számának illetve morfológiájának dinamikus változását írták le. Emellet a még ép szőrsejtrégiókban a makrofágok amőboid transzformációját is megfigyelték (192). A tonotópia, vagyis a

„hely elv” az AHL kialakulásához vezető immunreakciók során is érvényesül. Az apikális és bazális kanyarulatokban elhelyezkedő makrofágok mind fenotípusukat, mind a szenzoros sejtek degenerációjára adott válaszreakciójukat tekintve különböznek (169).

Intenzív zajexpozíció hatására a cochleában gyulladós folyamatok indulnak el, amelynek során rezidens makrofágok aktivációját (163), proinflammatorikus mediátorok upregulációját valamint különféle gyulladós sejtek véráramból történő gyors beáramlását figyelték meg (156, 163, 167, 182, 193, 194). A gyulladós sejtek infiltrációja rendkívül gyors. A zajártalmat követően néhány órán belül jelentős számú leukocita jelenik meg a Corti-féle szerv számos régiójában (156, 167, 193, 195, 196). A proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6), a kemokinek (pl. MCP-1/CCL2) (193), a ROS (186, 197) és a káros hatású adhéziós molekulák (184, 186) szekrécióját az akusztikus ártalom által upregulált nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) aktiváció fokozza (166, 184, 186, 197). Az intenzív zajártalom mellett az immunrendszer fokozott aktivitását a krónikus, kisebb intenzitású zajbehatás során is kimutatták (155).

Az immunrendszer az AHL és a NIHL mellett az ototoxikus vegyületek halláskárosító hatásának kialakulásában is szerepet játszik. Az aminoglikozidok illetve a ciszplatin aktiválják a gyulladós sejteket és fokozzák a gyulladós mediátorok expresszióját. Ezen hatásuk közvetlenül vagy közvetve ROS generálásán keresztül érvényesül (198, 199). Hasonlóan a zajkárosodáshoz kapcsolódó immunválaszhoz, az aminoglikozidok beadását követően emelkedik a makrofágok száma az SGN-ek és a cochlea laterális falának régiójában (200-203). Ezen immunsejtek citotoxikus citokinek felszabadítása révén a szőrsejtek pusztulását eredményezik (189). Ciszplatin kezelés szintén fokozza a szőrsejtek pusztulását proinflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6) felszabadítása (172), továbbá a NOX3 enzim aktiválása révén. A NOX3 aktivációjának eredménye - ROS szintézisen valamint a jelátvivő és transzkripciós aktivátor 1 (Signal transducer and activator of transcription 1, STAT-1) aktiválásán keresztül - az OHC-k apoptózisa (198).

3.10.3. Autoimmun eredetű halláscsökkenés

Az esetek 30%-ában valamilyen szisztémás autoimmun betegség részeként (pl. rheumatoid arthritis, Sjögren szindróma) hirtelen fellépő halláskárosodás jelenik meg. Az immunszuppresszív terápiára és a szteroid kezelésre adott jó válaszkészség arra utal, hogy

ezekben az esetekben immun-mediált folyamatok játszódnak le. A pácienseken végzett MR és PET vizsgálatok szintén a belsőfül gyulladási aktivitását támasztják alá (204).

Az autoimmun eredetű SNHL-ekben a II-IV. típusú túlérzékenységi reakcióknak tulajdonítanak szerepet. A II. típusú, IgG és IgM izotípusú antitestek által előidézett reakciók szerepét a betegség hátterében Harris és munkatársai tengerimalacokon végzett vizsgálata mellett a betegek szérumának belsőfül-antigénekre mutatott reaktivitása is bizonyítja (152, 205). A III. típusú, immunkomplexek mediálta reakció szerepét állatmodellekben igazolták. Az IgG, IgM és anti-DNS immunkomplexek lerakódnak a stria vascularisban és károsítják az endothelsejteket, aminek hatására zavart szenved a vér-labirintus gát és hallásvesztés lép fel (205, 206). A IV., késői típusú túlérzékenységi reakció jelenlétét szintén állatmodelleken figyelték meg (205, 207).

3.11. Immunmodulátorok és lehetséges szerepük– az immunrendszer Janus arca

Az immunrendszer jelentős szerepet tölt be a belsőfül normál működésében, de a hallásvesztés kialakulásának hátterében is fontos tényező. Az összes SNHL forma hátterében felvetették illetve igazolták már szerepét. Az immunfolyamatok finom szabályozása hallásvédő hatást fejthet ki, túlzott mértékű aktiválása illetve működésének elnyomása viszont halláscsökkenés kialakulását eredményezheti. Ezen ismeretek alapján az immunrendszer működését is befolyásoló gyógyszerek alkalmazásakor akár otoprotektív, akár ototoxikus hatás is várható, az immunrendszerre gyakorolt hatás mértékétől valamint a targetek immunfolyamatokban betöltött szerepétől függően.

3.11.1. A több támadáspontú selegilin mint lehetséges hallásvédő vegyület a szenzorineurális halláskárosodások gyógyszeres terápiájában

Az FDA által is törzskönyvezett selegilin [(-)deprenyl] egy irreverzibilis, relatíve szelektív MAO-B gátló vegyület (208), amelyet évtizedek óta sikeresen alkalmaznak a Parkinson-kór és különböző depressziós kórképek kezelésére (209). Katekolamin, DA felszabadító hatása mellett jelentős antioxidáns, antiapoptotikus és neuroprotektív hatással is rendelkezik (210, 211). A szuperoxid-diszmutáz valamint a kataláz enzimek működésének serkentésével csökkenti az oxidatív stressz okozta károsodást. A selegilin okozta enzimindukció lassabb folyamat, krónikus kezelést követően válik jelentőssé (212). A selegilin neuroprotektív tulajdonságának hátterében többek között az NMDA

receptor által közvetített excitotoxicitás megelőzése/mérséklése, különböző neurotrofikus faktorok felszabadulásának fokozása áll (212). Polony és munkatársai a selegilin rokonvegyületének, a rasagilinnek otoprotektív hatását írták le a kanamycin okozta halláskárosodás egérmodelljében. A rasagilin védőhatását részben a LOC efferensekből történő DA felszabadítás serkentése, ezáltal az SGN-ek védelme révén fejthette ki (102). A selegilin szabályozza az apoptózissal kapcsolatos fehérjék expresszióját is. Adását követően gátolta a BAX mitokondriális transzlokációját és a BCL-2 szintjének csökkenését, ezzel szemben csökkentette a kaszpáz-3, a c-JUN és a GAPDH aktivitást (212). Antioxidáns, antiapoptotikus és neuroprotektív tulajdonságai mellett közvetlenül vagy közvetve részt vesz az immunfolyamatok szabályozásában is. A selegilin számos kísérletben növelte az IL-2, az IL-1, az IL-6, neutrofinok, proinflammatorikus citokinek illetve a természetes ölüsejtek termelődését (213). Müller és munkatársai szerint a selegilin neuroprotektív hatásának hátterében a vegyület citokin bioszintézisre kifejtett hatása is szerepet játszik (214). Kísérleteikben a protektív hatást mutató selegilin fokozta az IL-1 β , IL-6 és TNF szintézisét. Mindemellett a selegilin a MAO enzimaktivitás gátlásával hozzájárul a DA szintjének növekedéséhez, amely neurotranszmitter jelentős szerepet tölt be a gyulladásos folyamatok szabályozásában (215-217). Egy nemrég megjelent összefoglaló közleményben felvetették a MAO-gátlók krónikus gyulladásos betegségek kezelésére való alkalmazásának lehetőségét is (216). Két, korábban beadott szabadalom tárgya a selegilin, mint az immunrendszer életkorral összefüggő hanyatlását mérséklő illetve az immunrendszer diszfunkciójának kezelésére szolgáló vegyület alkalmazása (218, 219) (EP0732101B1, US5387615A). A fent leírt hatások - az SNHL-ek patomechanizmusának ismeretében - továbbá korábbi kísérletek során kapott eredmények alapján a selegilin valamennyi SNHL forma, köztük a krónikus gyulladásos állapottal járó AHL farmakoterápiájának ígéretes jelöltje.

Habár a selegilin, mint potenciális hallásvédő vegyület, szabadalmi oltalom alatt áll (220, 221) (US5561163, EP0831798B1), a beadott szabadalom egy nem jól kontrollált, nem kellően alapos, idős kutyákon végzett kísérlet eredményein alapul. A vizsgálatból hiányzott a kontroll csoport, az állatok hallását pedig vezényszavakra adott válaszreakciójuk és a gazdák véleménye alapján ítélték meg (222). A vegyület halláskárosodásra kifejtett hatásának részletes, objektív vizsgálata még mindig hiányzik.

3.11.2. Az immunellenőrzőpont-gátló PD1 inhibitor mint lehetséges halláskárosító vegyület

A citotoxikus T-limfocita antigén 4-et (CTLA-4) és a programozott sejthalál fehérje 1-et (PD-1) megcélzó immunellenőrzőpont-gátlók (ICI) forradalmasították a daganat farmakoterápiát, példátlan hatékonyságot érve el több rosszindulatú daganat kezelésében (metasztatikus melanoma, nem kissejtes tüdőrák). A gyógyszercsoport első tagját, az ipilimumabot (CTLA-4 gátló) 2011-ben engedélyezte az FDA. Mind a CTLA-4, mind a PD-1 a T-sejtek gátlásáért felelős ellenőrzési pontként szolgáló receptor, amelynek célja a perifériás tolerancia kialakítása és az autoimmunitás megakadályozása. A daganatsejtek az immunrendszer ellenőrző pontjain ható ligandumok (PD-L1, CTLA-4) expressziójával képesek elrejtőzni a citotoxikus T-sejtek elől, elnyomva a tumorelles immunválaszt. A CTLA-4 valamint a PD-1 receptorok blokkolásával ez az antitumor immunválasz már kiváltható (223).

Az ICI-eket egyre inkább alkalmazzák a korai elváltozások kezelésében monoterápiában vagy kombinációban egymással és más kezelésekkel, beleértve a célzott terápiát, a sugárterápiát és a kemoterápiát. Az ICI kiváló terápiás hatása ellenére ezek a gyógyszerek tipikusan széles spektrumú toxicitási reakciókat eredményeznek, melyek legfőképp az immunrendszer túlzott aktiválása következtében jönnek létre (irAE – immune-related adverse events). Mivel működésük alapja, hogy az immunrendszer fiziológiásan is jelen lévő, toleranciát indukáló mechanizmusait akadályozzák, sok szervben immun-mediált gyulladást okoznak. Ezek elsősorban a kardiovaszkuláris és a pulmonáris rendszert érintő illetve hematológiai elváltozásokat okozó mellékhatások (224-226), amelyek megjelenése kombinációs terápiában még kifejezettebb, azonban előfordulnak sporadikusan megjelenő, ICI gátló alkalmazásával összefüggésbe hozható ritka nem kívánt hatások is (227). Az eddigi megfigyelések mellett egyre több esettanulmány számol be ICI gátló kezelést követően fellépő hallásvesztésről (228), melynek hátterében szintén az immunrendszer túlzott aktiválása áll. Az autoimmun mechanizmusok által mediált halláskárosodás ismert elváltozás. Korábbi vizsgálatok során az adoptív celluláris terápia (adoptive cell immunotherapy) következtében kialakult halláscsökkenést a kezelt betegek közel 50%-ában figyelték meg (229, 230). Az ICI kezeléshez kapcsolódó ototoxicitás első egyedi esetét 2016-ban írták le (231), amelyet fokozatosan egyre több eset követett. Az esettanulmányokban bemutatott SNHL-ek ipilimumabot (CTLA-4 inhibitor) követő pembrolizumab (PD-1 gátló) terápia, továbbá

ipilimumab vagy nivolumab (PD-1 gátló) monoterápia következtében léptek fel (232-234). Három esettanulmányt találtunk, ahol a magas frekvenciákat érintő hirtelen kétoldali hallásromlás összefüggésbe hozható a PD-1 gátló immunterápiával, egy páciensnél ez rövid vertigo epizódokkal társulva jelentkezett (231, 233, 235). PD-1 gátló alkalmazását követően mind az FDA mellékhatásbejelentő rendszerében (FDA Adverse Event Reporting System Public Dashboard), mind a European Medicines Agency (EMA) EudraVigilance adatbázisában több, a halló- és egyensúlyozószervet érintő mellékhatás került jelentésre.

Az audiovesztibuláris mellékhatásokra irányuló klinikai vizsgálatok eddig nem történtek. Tekintve, hogy a magas frekvenciákat érintő halláskárosodás idős korban változó súlyossággal ugyan, de egyébként is jelen van, így a betegnek nem feltűnő az állapotromlás, illetve a szédülés tulajdonítható a tumor által kiváltott tünetek egyikének, ezek a mellékhatások számos esetben felfedezetlenek maradhatnak. Ugyanakkor vizsgálatuk fontossága vitathatatlan a hallás védelme érdekében, az ICI molekulák működésének és szervezetre gyakorolt hatásának megértésében, ezenfelül a belsőfül immunrendszerének tulajdonságairól is információval szolgálhat.

3.12. A cochleáris makrofágok vizsgálata

A belsőfülben zajló immuntörténések vizsgálata során gyakran a cochlea makrofágjainak számában illetve morfológiájában bekövetkező változásokat tanulmányozzák (236, 237). Az így kapott eredményekből következtetni lehet a belsőfül immunrendszerének aktivitására (237, 238).

A makrofágok vizsgálatának egyik gyakran alkalmazott *in vitro* módszere az ionizált kalciumkötő adapter molekula 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, azaz Iba1), más néven allograft gyulladásos faktor 1 (allograft inflammatory factor 1, AIF1) immunhisztokémia. Az Iba1 egy erősen konzervált citoplazmatikus kalciumkötő fehérje, amely szerepet játszik a sejtmozgásban és a fagocitózisban. Később azt is leírták, hogy egy „pán-makrofág marker” és a moniciták/makrofágok valamennyi altípusában expresszálódik. Széles körben alkalmazzák mikroglia-sejtek illetve makrofágok kimutatására normál és patológias körülmények között, különböző fajokban, beleértve az embert is (239). Kimutatása Iba1-ellenes monoklonális antitestek alkalmazásával történik.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A halláscsökkenés illetve hallásvesztés a leggyakoribb emberi szenzoros deficit, amelyet modern korunk népbetegségeként tartanak számon. A vezetési típusú formájával szemben a szenzorineurális halláskárosodások farmakoterápiája nem megoldott. A hatékony gyógyszeres terápia hiánya szükségessé teszi potenciális hallásvédő vegyületek keresését, továbbá az esetlegesen halláskárosító hatással rendelkező vegyületek ismeretét.

Kísérleteink fókuszában potenciálisan hallásvédő vagy ototoxikus tulajdonsággal rendelkező vegyületek vizsgálata állt. Célunk egyrészt olyan, több támadásponttal rendelkező gyógyszermolekula keresése volt, amely képes lehet a leggyakoribb SNHL forma, az AHL kialakulásának megelőzésére/kivédésére. A betegség hátterében álló, eddig feltárt patomechanizmusok ismeretében a neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns és immunmodulátor tulajdonságokkal rendelkező selegilint ígéretes jelöltnek gondoltuk. Ezen túlmenően jól kontrollált kísérleti körülmények között kívántuk megvizsgálni a korábbi vigilancia jelentések és egy-két esettanulmány alapján mellékhatásként hallásromlást is mutató PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatását. A PD-1 gátlásán alapuló immunellenőrzőpont-gátló terápia hatékonyságának köszönhetően egyre nagyobb teret hódít az onkológiában. A vegyület potenciális halláskárosító hatásának és mechanizmusának feltérképezése kiemelkedően fontos az esetleges hallásvesztés megelőzése érdekében.

Konkrét célkitűzések:

4.1. A selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálata

- 1) Annak *in vivo* vizsgálata, hogy a selegilin a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákon, alacsonyabb (0,15 és 1,5 mg/kg) dózisokban alkalmazva, rendelkezik-e otoprotektív hatással az AHL-re mérsékelten (BALB/c) és fokozottan (DBA/2J) érzékeny egértörzsekben.
- 2) Annak *in vivo* vizsgálata, hogy a selegilin a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákon, magasabb (15 és 45 mg/kg) dózisokban alkalmazva, rendelkezik-e

otoprotektív hatással az AHL-re mérsékelten (BALB/c) és fokozottan (DBA/2J) érzékeny egértörzsekben.

- 3) A selegilinnel kapcsolatos korábbi, élethossz növelő eredmények alapján annak vizsgálata, hogy a krónikus selegilin kezelés, különböző dózisokban alkalmazva, növeli-e az állatok túlélési valószínűségét.

4.2. A PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatásának vizsgálata

- 1) Annak *in vivo* vizsgálata, hogy a PD-1 gátló terápia befolyásolja-e a hallásfunkciót a PD-1 gátlás egyéb szerveket érintő mellékhatásaira korábban érzékenynek bizonyult C57BL/6 egerekben.
- 2) Annak *in vitro* meghatározása, hogy a PD-1 gátló terápia hatással van-e a cochlea külső és belső szőrsejtjeinek állapotára, épségére.
- 3) Annak *in vitro* meghatározása, hogy a PD-1 gátló terápia befolyásolja-e a cochlea spirális ganglionsejtjeinek számát illetve morfológiáját.
- 4) Annak meghatározása immunhisztokémiai módszerekkel, hogy a PD-1 gátló terápia befolyásolja-e a cochleáris makrofágok számát.

5. MÓDSZEREK

5.1. Etikai vonatkozások

Kísérleteinket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának továbbá a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztosági és Állategészségügyi Igazgatóságának jóváhagyásával végeztük (Állatkísérleti engedély: PE/EA/1912-7/2017). Az állatok tartása, kezelése, a kísérletek végrehajtása a National Institute of Health (NIH) irányelveinek követése alapján történt (National Research Council (2011), Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition).

5.2. Kísérleti állatok

A selegilin AHL-re kifejtett hatásának vizsgálata hím BALB/cAnNCrl (#028) és hím DBA/2J (#625) egereken történt (továbbiakban BALB/c illetve DBA/2J). Az állatok a Charles River Laboratories tenyésztő németországi és franciaországi telephelyéről származtak (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts).

A PD-1 gátló immunterápia hallórendszerre gyakorolt hatását hím C57BL/6J egerekben vizsgáltuk (Onkológiai Kutatóközpont, Kísérletes Farmakológiai Osztály 1122 Budapest, Magyarország).

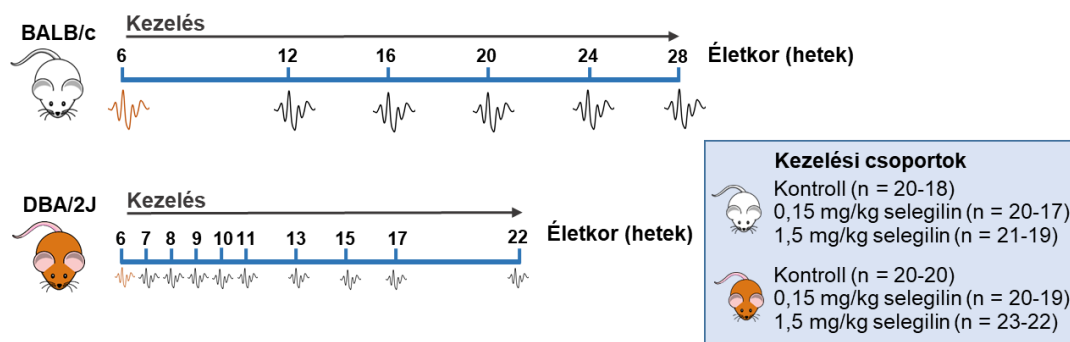
Az állatokat mindkét kísérlet során 12:12 órás fény-sötét ciklusban, ad libitum etetés és itatás mellett, kontrollált körülmények között tartottuk (20–24 °C és 35–75% relatív páratartalom). Ketrecentként 10 (BALB/c illetve DBA/2J) illetve 2-3 (C57BL/6J) állatot helyeztünk el.

5.3. Kísérleti elrendezés

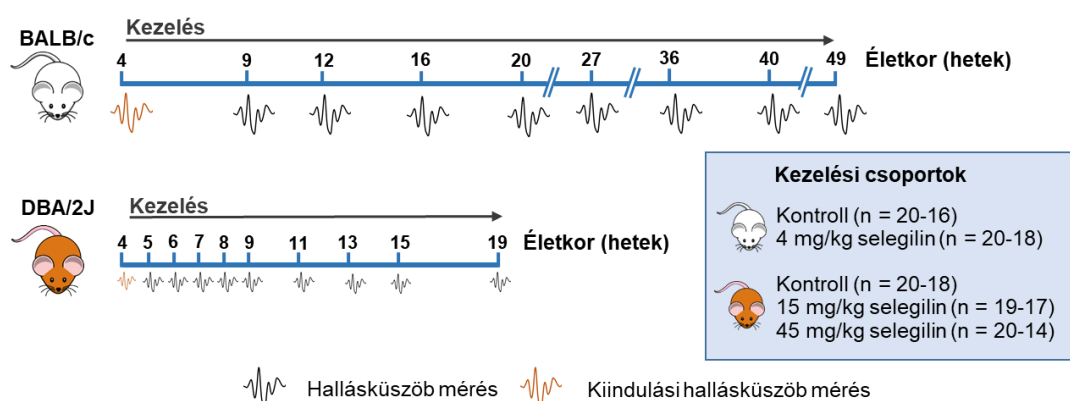
5.3.1. *A selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálatára felállított kísérleti elrendezés és kezelési protokoll*

A magas kiindulási elemszám (n=19-23/csoport) biztosítása valamint a selegilin szélesebb dózistartományának tesztelése érdekében a kísérleteket két kísérleti alrészben végeztük (Kísérlet I és II). A kísérleti állatok krónikus per os kezelése selegilin hidrokloriddal (Chinoïn Private Co. Ltd., Budapest) történt, az állatok ivóvizében oldva a vegyületet.

Kísérlet I.



Kísérlet II.



4. ábra. Kísérleti beosztás a selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálatára BALB/c és DBA/2J egértörzsekben (240). A selegilin adott dózisait (0,15; 1,5; 4; 15 és 45 mg/kg) az állatok per os kapták, az ivóvízben oldva. A vegyület a kísérlet teljes időtartama alatt ad libitum hozzáférhető volt az állatok számára. A kontroll csoportok csapvizet, a selegilin oldószerét kapták. A hallásküszöb meghatározására alkalmas auditoros agytörzsi kiváltott válasz (ABR) mérések időpontjait ABR hullámok jelölik. Az első ABR mérés (kiindulási hallásküszöb mérés) a kezelés megkezdése előtti napon történt. A DBA/2J törzs progresszív halláskárosodása következtében az állatok ABR méréseinek gyakorisága meghaladta a BALB/c csoportokét. A teljes kísérlet két kísérleti alrészről állt. Az egyes alrészek kezelési csoportjait külön ábrák (kék háttér) jelölik, zárójelben feltüntetve a kiinduló illetve végső elemszámokat. Kísérlet I. Mindkét egértörzs a selegilin 0,15 illetve 1,5 mg/kg dózisait kapta. Kísérlet II. A BALB/c állatok esetében a selegilin 4 mg/kg dózisát, a DBA/2J törzs esetében pedig a vegyület 15 illetve 45 mg/kg dózisait alkalmaztuk. A BALB/c egerek dóziscsökkentésére és a 4. kezelési csoport kihagyására azért volt szükség, mert az állatok folyadékfogyasztása csökkent a magasabb selegilin koncentrációk alkalmazása során.

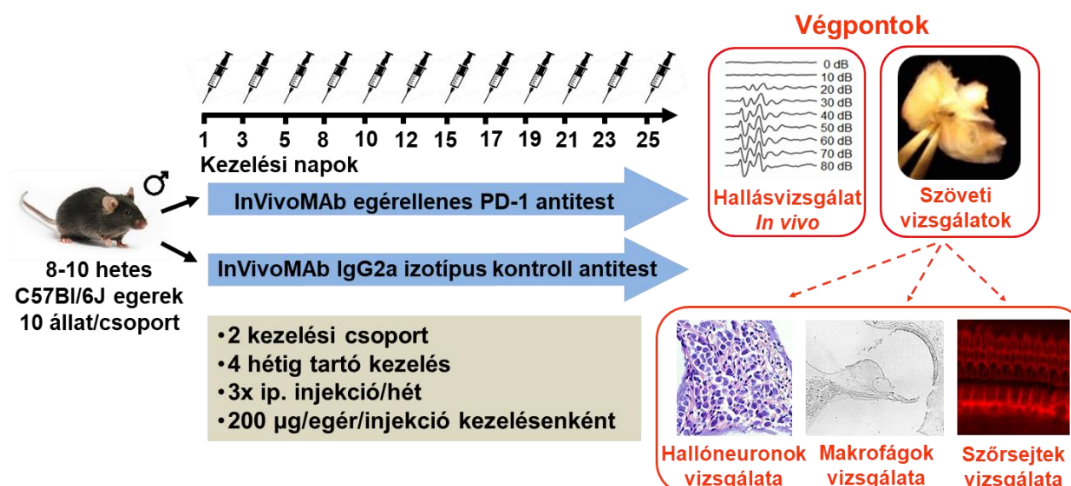
Kísérlet I. Az első kísérleti alrészben hím BALB/c és DBA/2J egerek 3-3 kezelési csoportját vizsgáltuk. A BALB/c törzs kontroll (n=20-18), 0,15 mg/kg (n=20-17) és 1,5 mg/kg (n=21-19) dózisú selegilinnel kezelt csoportjainak vizsgálata a DBA/2J törzs kontroll (n=20-20), 0,15 mg/kg (n=20-19) és 1,5 mg/kg (n=23-22) dózisú selegilinnel kezelt csoportjaival párhuzamosan történt (4. ábra). A csoportonkénti kiindulási és végső elemszámok zárójelesen szerepelnek az egyes csoportokat követően. A selegilinnel való kezelést az állatok 6 hetes korában kezdtük, közvetlenül a kiindulási hallásküszöbük rögzítése után, és a kísérlet teljes időtartama alatt folytattuk. A BALB/c törzs kezelése az állatok 28 hetes koráig tartott, amely idő alatt rendszeresen monitoroztuk az állatok hallásküszöb változását. A DBA/2J törzs kezelése továbbá a hallásküszöb változásának nyomonkövetése az állatok 22 hetes koráig tartott, tekintettel a kezelési csoportokban kialakult igen progresszív AHL-re. A DBA/2J egerek hallásküszöb értékei az állatok 22 hetes korára elérték a 90 dB-t (4.1 kHz<), az általunk generált maximális hangnyomásszint értéket. A selegilin krónikus adását per os formában végeztük, az állatok ivóvizében oldva a vegyületet. A kontroll állatok csapvizet ittak. Az állatok testsúlyát, folyadékfogyasztását a teljes kísérlet alatt folyamatosan monitoroztuk, meghatározva a selegilin napi bejutott dózisát (mg/kg). A testsúlyt individuálisan, a folyadékfogyasztást ketrecenként rögzítettük. A napi bejutott dózis értékét a selegilin ivóvízben lévő koncentrációjából, az egerek testtömegéből továbbá a ketrecenként számolt átlagos folyadékfogyasztásból (ml/egér) kalkuláltuk. A koncentrációkat szükség esetén módosítottuk a kívánt dózisok (0,15 és 1,5 mg/kg) elérése érdekében. Számításaink alapján a napi bejutott dózisok a következők voltak: BALB/c (átlag±SD): 0,14±0,05 mg/kg és 1,32±0,41 mg/kg; DBA/2J (átlag±SD): 0,19±0,08 mg/kg és 1,91±0,75 mg/kg (a továbbiakban 0,15 és 1,5 mg/kg). Habár a bejutott dózisban való ingadozás elkerülhetetlen velejárója egy vegyület ivóvízben történő adagolásának, a parenterális illetve per os gavage kezeléssel járó stressz és fertőzés elkerülésével mégis előnyös módja a vegyületek krónikus adásának.

Kísérlet II. A selegilin magasabb dózisainak vizsgálatára a második kísérleti alrészben került sor. Az első alrészhez hasonlóan a BALB/c törzs kontroll (n=20-16) és 4 mg/kg dózisú selegilin (n=20-18) csoportjait a DBA/2J törzs kontroll (n=20-18), 15 mg/kg (n=19-17) és 45 mg/kg (n=20-14) dózisú selegilin csoportjaival párhuzamosan vizsgáltuk (4. ábra). A csoportonkénti kiindulási illetve végső elemszámokat az egyes csoportokat

követően zárójelesen tüntettük fel. A kiindulási hallásküszöb rögzítésére az állatok 4 hetes korában került sor. A BALB/c törzs esetében a kezelés illetve a hallásküszöb változásának monitorozása egy hosszabb periódust ölelt fel (4-49 hetes életkor). A DBA/2J törzs csoportjainak kezelése és hallásküszöb változásának nyomonkövetése szűkebb időtartamra korlátozódott (4-19 hetes életkor) a kezelési csoportokban megjelenő igen progresszív AHL következtében (8/B ábra). Az állatok tartásának körülményei, a selegilin adásmódja, a napi bejutott dózis kiszámításához alkalmazott mérések és módszerek (testsúly illetve folyadékfogyasztás mérése) megegyeztek az első kísérleti alrészben leírtakkal. A kontroll állatok csapvizet kaptak. A DBA/2J törzssel szemben a BALB/c állatok kevésbé tolerálták a selegilint magasabb koncentrációban tartalmazó ivóvizet, jelentősen csökkentve napi folyadékbevitelüket. A legmagasabb, BALB/c egerek által még tolerált koncentráció alkalmazásával elért dózis 4 mg/kg volt. Ennek következtében a tervezett 15 illetve 45 mg/kg dózisu selegilinnel kezelt csoportok helyett a BALB/c állatok esetében egy, 4 mg/kg dózisu selegilint kapó csoportot vizsgáltunk. A kalkulált napi bejutott dózisok a következők voltak: BALB/c (átlag±SD): 3,84±0,55 mg/kg; DBA/2J (átlag±SD): 14,93±2,81 mg/kg és 46,82±1,35 mg/kg (a továbbiakban 4, 15 és 45 mg/kg).

5.3.2. A PD-1 gátló immunterápia és hallás kapcsolatának vizsgálatára felállított kísérleti elrendezés és kezelési protokoll

Kísérletünk során a hallórendszert érintő funkcionális és morfológiai vizsgálatokat végeztünk kontroll és PD-1 gátló kezelésnek kitett hím C57BL/6J egereken.



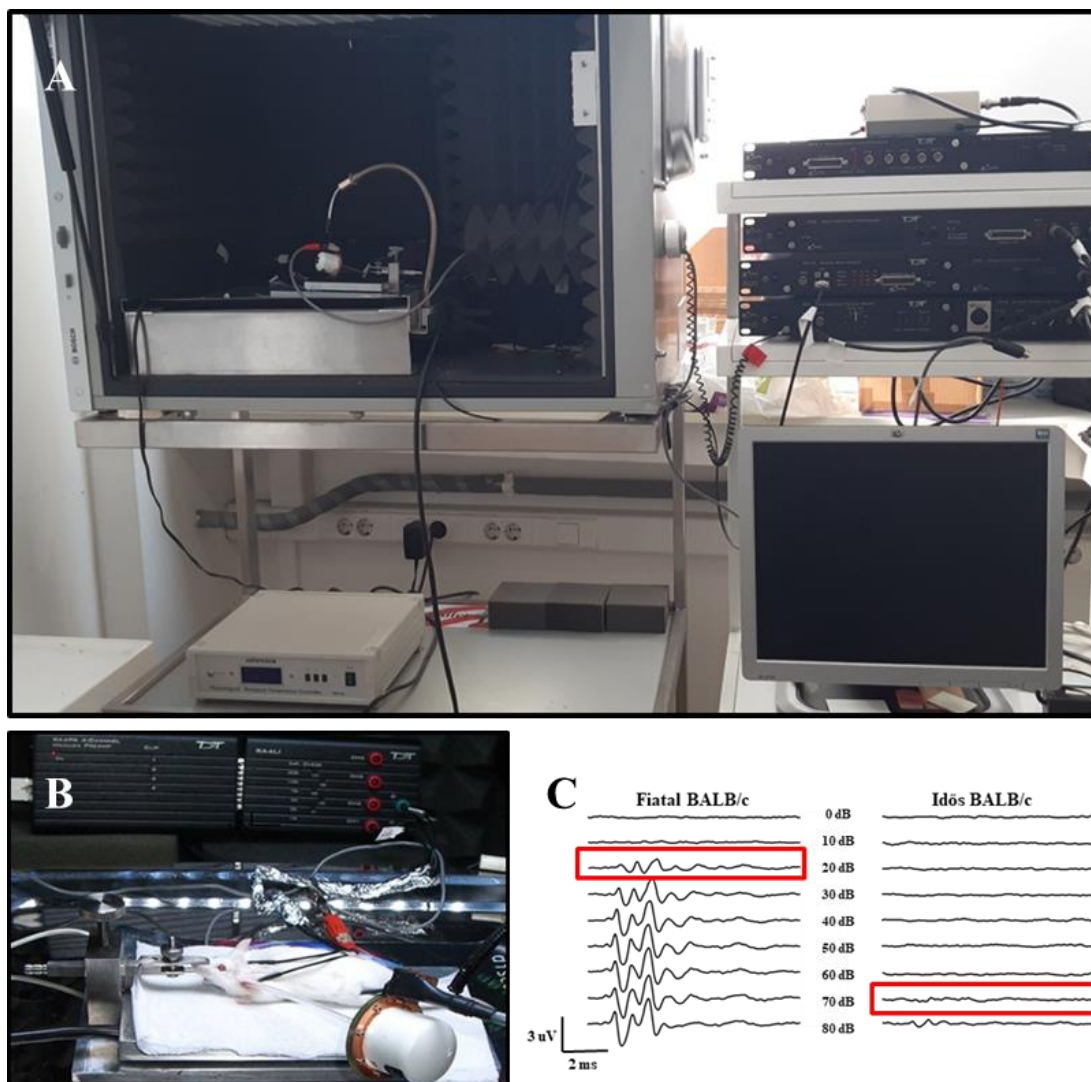
5. ábra. Kísérleti beosztás a PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatásának vizsgálatára C57BL/6J egerekben (241). C57BL/6J egereket 8-10 hetes koruktól kezdődően 4 hétig tartó kezelésnek tettük ki, hetente háromszor, intraperitoneális (i.p.) injekcióban adva a vegyületeket. Egy-egy injekció alkalmával minden egyes vegyületet 200 µg/egér dózisban alkalmaztunk. A kísérlet során párhuzamosan 2 kezelési csoportot vizsgáltunk: 1) Izotípus kontroll (PD-1 gátló izotípus kontrollja) 2) PD-1 gátló (monoklonális egér anti-PD-1 antitest). A 4 hetes kezelési periódust követően a hallásküszöb meghatározására alkalmas ABR méréseket végeztünk, majd az állatok terminálását követően eltávolítottuk az állatok mindkét cochleáját a belsőfület érintő morfológiai elváltozások valamint az immunaktivitás későbbi vizsgálatának céljából.

Az izotípus kontroll (n=10-10) és az egér anti-PD-1 antitesttel kezelt csoport (n=10-9) vizsgálata egymással párhuzamosan történt (5. ábra). A csoportonkénti kiindulási illetve végső elemszámokat zárójelben tüntettük fel. A kezelés dózisát, beviteli módját és a kezelés időtartamát korábban megjelent, az általunk alkalmazott ellenanyag tumorellenes hatékonyságát és mellékhatásprofilját vizsgáló közleményekre alapozva választottuk ki (242-245). Az állatok 8-10 hetes koruktól kezdődően 4 hétig tartó kezelésben részesültek, hetente háromszor, intraperitoneális injekció formájában. A vegyületeket kezelésenként 200 µg/egér dózisban alkalmaztuk. Az PD-1 gátló antitestet (InVivoMAb monoklonális egér anti-PD-1 antitest - RMP1-14 klón) és a gátló antitestnek megfelelő izotípus kontroll ellenanyagot (tisztított InVivoMAb patkány IgG2a izotípus kontroll antitestet - 2A3 klón) egy kifejezetten a kísérleti állatokban történő *in vivo* felhasználásra fejlesztett monoklonális antitesteket gyártó cégtől vásároltuk (Bioxcell, USA).

5.4. Auditoros agytörzsi kiváltott válasz (ABR)

In vivo kísérleteink során a hallás állapotát, a hallásküszöböt és annak változását objektív audiometriával, az ABR módszerrel határoztuk meg, amely a hanginger hatására kiváltott agyi elektromos aktivitás mérésére alkalmas objektív vizsgálat. A módszer a klinikumban a hallásküszöb vizsgálatára alkalmazott rutinmódszer, a BERA megfelelője. Az ABR objektivitása mellett minimális invazivitása és ismételhősége miatt vált széles körben elterjedté.

In vivo kísérleteinket ketamin-xylazinnal altatott állatokon végeztük (100 mg/kg ketamin és 10 mg/kg xylazin; intraperitoneálisan). A ketamin alkalmazásához szükséges engedélyünk száma: 57128/2016/KAB. Altatás során az izommozgás illetve az agyi aktivitás lecsökken, javítva a jel-zaj arányt, ezáltal a méréskor regisztrált kiváltott válaszgörbe értékelhetőségét. Az állatok testhőmérsékletét (36-38 °C) az anesztézia alatt kontrollált hőmérsékletű melegítőpaddal (Supertech Instruments, Pécs) tartottuk fenn.



6. ábra. *In vivo* funkcionális hallásvizsgálat. **A)** Az agytörzsi kiváltott válasz (ABR) mérésére alkalmas berendezés. Az állatok hallásvizsgálata elektromos zaj-és hangszigetelt kamrában történt. Az akusztikus stimulusok generálását, a válaszként kapott hallásgörbék analízisét a Tucker Davis Technologies által gyártott ABR készülékkel végeztük. **B)** A hangimpulzusokat zárt rendszerben, EC1 típusú elektrosztatikus hangszóró segítségével juttattuk az állatok fülébe. Az agyhullámok elvezetése subcutan beszűrt tüelektródák segítségével történt. Az altatás során a testhőmérséklet optimális szinten tartását regulált hőmérsékletű fűtőpad biztosította. **C)** Egy fiatal (4 hetes), normál hallású és egy idős (49 hetes), halláskárosodott BALB/c egér audiogramja. A reprezentatív hallásgörbék egy kontroll állat 16.4 kHz-es frekvencián rögzített hallásküszöb változását mutatják.

A hallásvizsgálatokat egy elektromosan árnyékolt, hangszigetelt kamrában végeztük a Tucker Davis Technologies (TDT) cég által kifejlesztett mérőrendszer segítségével (TDT system 3; RX6 signal processor és RA16 Medusa Base Station; TDT, Alachua, FL, USA) (6/A ábra). A kiváltott potenciálok elvezetése a koponyatetőbe (aktív), a jobb fülkagyló mögé (referencia) illetve a jobb hátsó lábba (föld) subcutan elhelyezett tüelettrodák segítségével történt (6/B ábra). A mérések során az állatok jobb fülének hallásküszöb értékeit rögzítettük a SigGen program (TDT, Alachua, FL, USA) által generált frekvencia-független click (hossz: 0,4 ms) illetve frekvencia-függő tone burst (hossz: 3 ms, emelkedés/esés: 0,2 ms) hangstimulusokat alkalmazva. Click inger esetén a hangnyomásszintet 10 dB-es lépésekkel növeltük 0-80 dB tartományban. Tone burst inger esetén a hangnyomásszint 10 dB-es lépésekkel történő csökkentését 90-10 dB-es tartományban végeztük, a TDT által gyártott programozható attenuátor segítségével (PA5 Programmable Attenuator; TDT, Alachua, FL, USA). A hangstimulusokat a BioSigRP program (TDT, Alachua, FL, USA) által vezérelt EC-1 típusú elektrosztatikus hangszóróhoz (TDT, Alachua, FL, USA) rögzített műanyag cső segítségével juttattuk az állat külső hallójáratába (zárt rendszer). A RA4LI Low Impedance Headstage (TDT, Alachua, FL, USA) digitális jeleinek erősítése RA4PA Medusa PreAmplifier segítségével történt (TDT, Alachua, FL, USA). Az akusztikai rendszer kalibrálását a SigCalRP (TDT, Alachua, FL, USA) kalibrációs szoftver továbbá az ACO Pacific által gyártott mikrofon (ACO Pacific Inc., Belmont, CA 94002, USA; Model 7017) alkalmazásával végeztük. Az ABR görbék vizuális értékelése a kiváltott potenciálok erősítését, szűrését majd átlagolását (800 mintavételezés átlaga) követően történt. Hallásküszöbnek azt a legkisebb hangnyomásszintet tekintettük, ahol az egerekre jellemző 5-7 jól elkülöníthető hullám közül legalább egy egyértelműen felismerhető volt a regisztrátumon (6/C ábra). Az ismételt méréseket tartalmazó AHL kísérlet során a csoportok átlagos hallásküszöb eltolódásának értékét hasonlítottuk össze, adott életkorokban. A hallásküszöb eltolódás mértékét úgy számítottuk ki, hogy a kísérlet elején regisztrált hallásküszöb értéket (kiindulási hallásküszöb) kivontuk a különböző életkorokban regisztrált hallásküszöb értékekből. A PD-1 gátló antitest hatását vizsgáló kísérletünkben hallásküszöbök összehasonlítását végeztük.

A két egértörzs kezelési csoportjainak párhuzamos vizsgálata, a magas csoportonkénti elemszám, a mérések időigénye és gyakorisága következtében az AHL kísérletünkben

egy szűkebb frekvenciatartományt (4-16 kHz) vizsgáltunk, amely a 4,1; 8,2 és 16,4 kHz-es frekvenciákat tartalmazta. Az alkalmazott tartomány magában foglalja az egerek hallásérzékenységi optimumát (~ 15-20 kHz), amelynek emberi megfelelője (1 – 4 kHz) (246) a beszédértés szempontjából kiemelt jelentőségű (247). Az alkalmazott frekvenciák jelentőségét tovább növeli, hogy az audiológiai vizsgálatok is ebben a tartományban történnek (248-251) továbbá a hallókészülék elrendelésének egyik kritériuma az 500-4000 Hz-en a 30-40 dB-t elérő vagy azt meghaladó mértékű halláscsökkenés fennállása (252). A PD-1 gátló immunterápia hallásra gyakorolt hatásának vizsgálatát kiterjesztett frekvenciatartományban végeztük (4-32 kHz).

5.5. Túlélési analízis

Az időskori halláskárosodás kísérletünkben megvizsgáltuk a selegilin különböző dózisainak BALB/c és DBA/2J egerek élettartamára gyakorolt hatását. Az állatok állapotát ketrecenként naponta ellenőriztük. A túlélési analízist Kaplan-Meier módszerrel végeztük. A görbék log rank (Mantel-Cox) és Breslow-Wilcoxon teszttel hasonlítottuk össze. A túlélési arányt a túlélés százalékában ábrázoltuk.

5.6. A szövettani analízisekhez szükséges szövetek előkészítése

A PD-1 gátló immunterápia külső és belső szőrsejtekre, SGN-ekre továbbá a belsőfül makrofágjainak számára gyakorolt hatását különböző szövettani technikák alkalmazásával a 4 hetes kezelési periódust követően vizsgáltuk.

Ehhez a 10 darab izotípus kontroll és a 9 darab anti-PD-1 antitesttel kezelt állat izofluránnal történő bódítását majd terminálását követően mindkét oldali belsőfület kiproparáltuk a sziklacsontból. A mintákat foszfát pufferes sóoldatba (PBS, pH=7,4) helyeztük. Sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk a kengyelt, majd egy-egy lyukat fúrtunk a kerek ablakon és a csontos cochlea csúcsán. Az így kialakított nyílásokon keresztül perfundáltunk 0,2 ml 4%-os paraformaldehid-oldatot (PFA, PBS-ben oldva). Ezt követte az Eppendorf csövekbe, majd rázókészülékre helyezett minták fixálása 4%-os PFA-ban (2 óra, szobahőmérséklet). A csontos cochleákat dekalifikálás céljából 5%-os etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) oldatban (PBS-ben oldva 0,4 % -os PFA-val, pH=7,4) tároltuk 6 napig, szobahőmérsékleten, szintén rázókészüléken. Az EDTA oldatot naponta

cseréltük. A szőrsejtek, SGN-ek illetve makrofágok vizsgálatát a dekalcifikált cochleákban végeztük.

5.7. A cochlea külső és belső szőrsejtjeinek kvantifikálása

5.7.1. A cochleák disszekciója és Phalloidin/DAPI festése

A dekalcifikált cochleák Corti-féle szervének teljes tonotópiás tengely mentén való kipreparálása 6 darab izotípus kontroll és 6 darab anti-PD-1 antitesttel kezelt állat jobb oldali cochleájából történt. A disszekciót sztereomikroszkóp alatt, mikrosebészeti eszközökkel végeztük (INOX#5 és INOX#5SF csipeszek, Vannas Spring Scissors mikroolló; Fine Science Tools, Dumont, Switzerland). A cochlea falát, a vesztibuláris végkészüléket, a ligamentum spirálét, a Reissner-féle membránt, a modiolust és a TM-et óvatosan eltávolítottuk, majd a Corti-féle szervet hosszában 3-6 részre vágtuk. A mintákat 3x5 percig tartó PBS mosást követően 0,3%-os Triton X-100 detergensbe (Sigma #X-100) helyeztük. Ezt a minták Alexa Fluor 594 Phalloiddinnel (1:200 hígítás, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #A12381) való festése követte. Az aktin filamentumokhoz kötődő phalloidin a szőrsejtek aktinban gazdag sztereocíliumait (253) teszi láthatóvá, ezáltal igen elterjedt festési eljárás a szőrsejtek számának/épségének meghatározásához. A 40 percig tartó festést fénytől elzárva, szobahőmérsékleten végeztük. Ezt újabb 3, egyenként 5 percig tartó PBS-ben történő mosás követte. A sejtmagok láthatóvá tétele 2,4 diamidino-2-fenilindol (DAPI) festéssel történt (1 $\mu\text{mol/l}$, 5 percen keresztül, Cell Signaling Technology, Leiden, Hollandia; #4083S). A minták végső mosását követően (3x5 perc, PBS-ben) a kipreparált Corti-féle szerveket tárgylemezre helyeztük. A lemezek fedéséhez ProLong Gold antifade reagenst (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #P36930) használtunk.

5.7.2. A külső és belső szőrsejtek mikroszkópos vizsgálata

A szőrsejtek vizsgálata CCD kamerával felszerelt Leica LMD6 mikroszkóppal történt, epifluoroszcens üzemmódban (DFC7000T; Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). A sejtek számának illetve épségének meghatározását 40x HC PL Fluotar objektívvel végeztük (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). Az elpusztult OHC-k és IHC-k számát a teljes Corti-féle szerv mentén, 190-250 μm hosszú szakaszonként határoztuk

meg. Az adatok elemzésére a Kresge Hearing Research Institute CytoGram Program 3.0.6-os verziójának (Ann Arbor, MI, USA) átalakított változatát alkalmaztuk. A BM teljes hosszának átlagosan 95%-át értékeltük, a Corti-féle szerv csúcsi régiójától (apex) kezdve a leolvasást. A Corti-féle szerv legbazálisabb régióját (a teljes hossz mintegy 5%-a) a szőrsejtsorok szorosabb elhelyezkedése, nehezebb azonosíthatósága illetve a szakasz fokozott sérülékenységéből adódó gyakori hiánya miatt nem értékeltük. Az eredmények alapján mind az izotípus kontroll (n=6), mind az anti-PD-1 antitesttel kezelt (n=6) állatok adataiból cochleogramot készítettünk. A frekvencia – apextől való távolság relációt Müller és munkatársai (147) egyenlete alapján számoltuk. A statisztikai analízishez a BM-t három egyenlő részre osztottuk: apikális, középső és bazális régiókra.

5.8. Beágyazás és metszetkészítés

Az SGN-ek illetve a makrofágok vizsgálatát a cochlea középső tengelyével, a modiolussal párhuzamosan készült metszeten végeztük (midmodioláris metszetek). Ehhez első lépésként a dekalifikált szövetekből felszálló alkoholsorral eltávolítottuk a mintákban lévő felesleges vizet. A dehidrációt 35, 50 és 70%-os etil-alkoholban 2x15 percig történő áztatással kezdtük. A víztelenítési eljárás további lépéseit (70, 80, 95%-os és abszolút alkoholban 2x1 óráig történő áztatás) és a beágyazás előkészítését egy Leica TP 1020 típusú szövetfeldolgozó automatával végeztük (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). Intermedierként xylolt alkalmaztunk (2x1 óra) a beágyazószer szövetmintába való bevitelére. Mind a dehidrációt, mind a xylollal való kezelést szobahőmérsékleten végeztük. A víztelenített cochleákat 60 °C-os paraffinba ágyaztuk, majd Leica HistoCore MULTICUT mikrotómmal (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) 4 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszetek tárgylemezre való szárítása melegítő lapon történt (60 °C, 10 perc).

5.9. Hematoxylin-eozin festés és a spirális ganglionsejtek vizsgálata

Az SGN-ek sejttestjeinek láthatóvá tételére hematoxylin–eozinnal történő ún. mag–plazma festést alkalmaztunk (Harris Hematoxylin: Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA; Eozin: Leica Biosystems, Wetzlar, Németország). A hematoxylin a sejtek magját kékeslilára festi. Az eozin a citoplazmát és a sejtközötti állományt rózsaszín-piros árnyalatban tünteti fel. Annak érdekében, hogy elkerüljük ugyanazon ganglionsejt

ismételt számolását, minden negyedik metszetet festettünk meg. A metszeteket deparaffináltuk (2x10 perc xyloolban való áztatás) majd leszálló alkoholsorban rehidráltuk (áztatás abszolút, 95, 80, 70%-os alkoholban 5-5 percig). A felesleges alkoholt először 1, majd azt követően 5 percig tartó desztillált vizes áztatással távolítottuk el. Ezt követően végeztük a minták hematoxylin festését (5 perc). A kékítési folyamat csapvízben történt (10 perc). A felesleges festéket az alkohol 0,5%-os savas oldatával (30 másodperc) elimináltuk. A differenciálást ismételt csapvizes kékítési folyamat követte (10 perc). Az eozinos festés (1 perc) 95%-os alkoholban való áztatást (10 másodperc) követően történt. A felesleges eozint 95%-os alkohollal mostuk ki (1 perc). A mintákat felszálló alkoholsorban (95%-os és kétszer abszolút alkoholban 1-1 percig történő áztatás) víztelenítettük, majd 2x5 percig xyloolban áztattuk. A minták fedésére CV mount beágyazószert (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) használtunk. Az SGN-ekről egy Leica LMD6 mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) készítettünk felvételeket. A képek átmenőfényes üzemmódban, 40x HC PL Fluotar objektívvel (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) készültek 4 darab anti-PD-1 antitesttel kezelt (2 jobb és 2 baloldali belsőfül) és 4 darab izotípus kontroll (2 jobb és 2 baloldali belsőfül) állat cochleájának apikális, középső és bazális kanyarulatában található ganglionsejtekről. Az egyes régiókban meghatároztuk a sejtszámokat illetve az adott terület nagyságát (átlagosan $16,785 \mu\text{m}^2$, de legalább $6000 \mu\text{m}^2$). Minden állat esetében kanyarulatonként 5-5-5 darab metszetet értékeltünk. A kapott adatok átlagát darab ganglionsejt/10 000 μm^2 területegységre vonatkozóan ábrázoltuk.

5.10. Iba1 immunhisztokémia

A makrofágok számát Iba1 festéssel vizsgáltuk 2 izotípus kontroll és 3 anti-PD-1 antitesttel kezelt állat cochleájából készített metszeteken. A folyamat első lépéseként a két kezelési csoport 6-6 midmodioláris metszetét deparaffináltuk (2x10 perc xyloolban való áztatás), majd leszálló alkoholsorban rehidráltuk (áztatás abszolút, 95, 80, 70%-os alkoholban 5-5 percig). A felesleges vizet először 1, majd azt követően 5 percig tartó desztillált vizes öblítéssel eltávolítottuk. A hő indukálta antigén feltárást előlegegített citrát pufferben ($\text{pH} \approx 6,5$), összesen 10 percig tartó mikrohullámú melegítéssel végeztük (4 x 1,5 perc és 2 x 2 perc melegítés, köztük azonos hosszúságú szünetek). A minták hűlését követően a lemezeket 3x5 percig PBS-ben mostuk. Az endogén peroxidáz

aktivitás gátlására PBS-sel készített 3%-os hidrogén-peroxid oldatot alkalmaztunk (10 perc). PBS-ben való háromszori mosás után (3x5 perc) szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, 2,5% zsírszegény tejpórt tartalmazó PBS-ben oldott 2,5%-os normál kecskeszérummal (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010, USA) blokkoltuk az aspecifikus antigénkötődést. Az Iba1-ellenes elsődleges antitestben (1:2000, nyúl, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Neuss, Németország) egy éjszakan keresztül 4°C-on inkubáltuk a mintákat. A mintákra 3x10 perc PBS mosást követően ráértük a másodlagos antitestként használt SignalStain® Boost IHC Detection Reagent-et (HRP, nyúl; Cell Signaling Technology, Leiden, Hollandia), amit újabb 3x10 perc PBS-ben való mosás követett. A reakciót ImmPACT DAB EqV Substrate Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010, USA) segítségével tettük láthatóvá. A specifikus jelek barnás elszíneződés formájában voltak detektálhatóak. A 10 percig tartó csapvizet mosást követően a mintákat felszálló alkoholsorban víztelenítettük (egyszer 95%-os és kétszer abszolút alkoholban 1-1 percig) majd 2x5 percig xyloolban áztattuk. A minták fedése CV mount beágyazószerrel történt. A metszetekről egy Leica LMD6 mikroszkóppal, átmenőfényes üzemmódban, 40x HC PL Fluotar objektívvel készítettünk felvételeket. A minták független, vak kiértékelését két személy végezte.

5.11. Statisztikai analízis

A szőrsejtpusztulás mértékének és az SGN-ek sűrűségének meghatározása, valamint a hallásküszöb illetve a hallásküszöb eltolódás mérése során kapott adatok statisztikai kiértékelése kétszemponos ANOVA-val és azt követő Bonferroni post-hoc teszttel történt. A számításokat minden vizsgált frekvencián és a click hangstimuluson külön-külön végeztük. A kontroll illetve a selegilin különböző dózisaival kezelt állatok testsúlyának összehasonlítására egyszemponos ANOVA-t és azt követő Bonferroni post-hoc tesztet alkalmaztunk. A túlélési görbék meghatározását Kaplan-Meier módszerrel, a görbék összehasonlítását Mantel-Cox és Gehan-Breslow-Wilcoxon próbákkal végeztük. A csoportonkénti átlagos hallásküszöb eltolódás, a testsúlyváltozás illetve a túlélési arány összehasonlításánál a GraphPad Prism szoftver 6.01-es verzióját használtuk. A hallásküszöböknek, a szőrsejtpusztulás mértékének továbbá az SGN-ek sűrűségének összehasonlítása a szoftver 8.4.3-as verziójával történt. Az eredményeket átlag \pm SEM

értékek formájában ábrázoltuk. A statisztikai elemzésekkor alkalmazott szignifikanciaszintek a következők: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A krónikus selegilin kezelés hatása a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek hallásfunkciójára

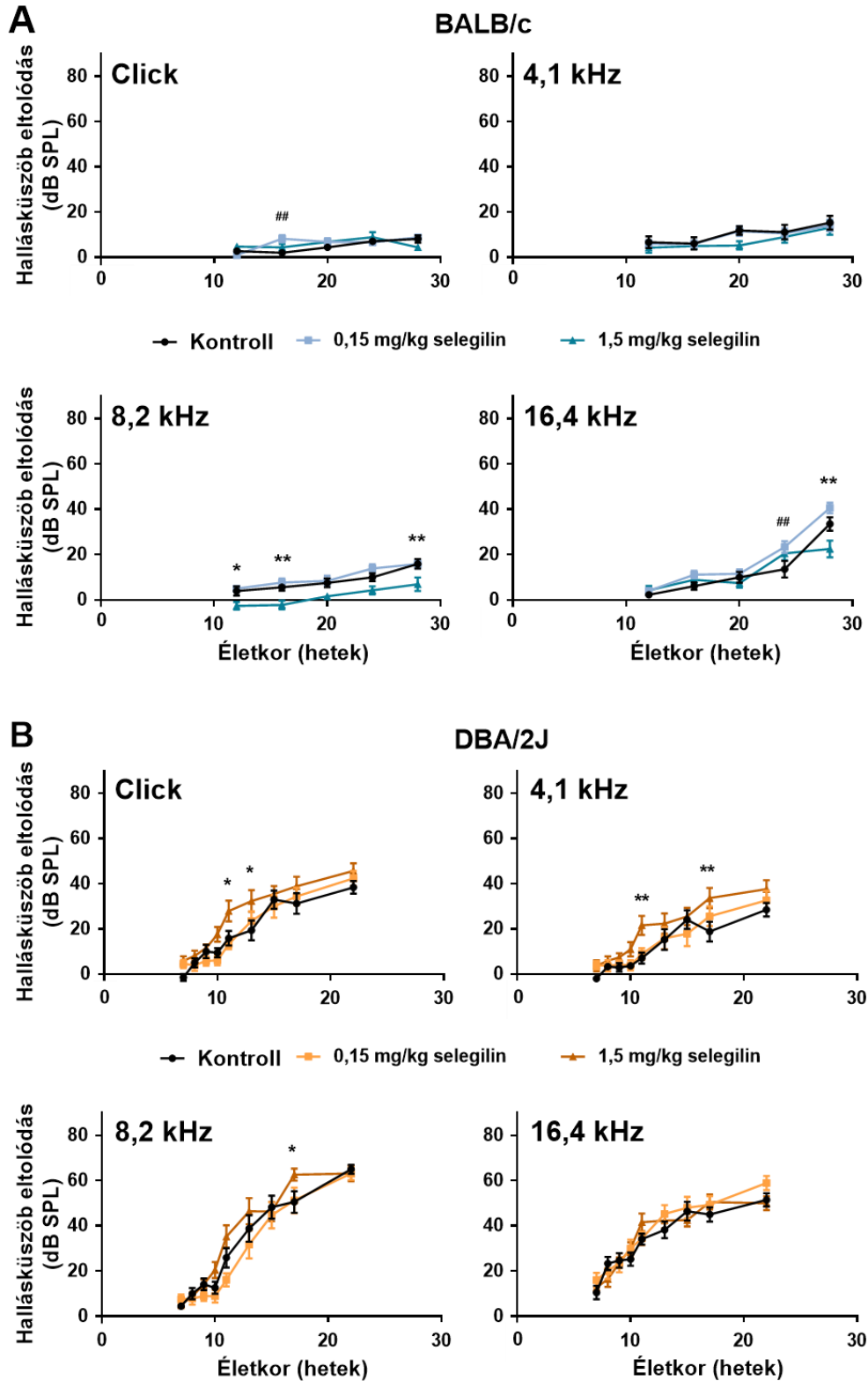
A selegilin időskori halláskárosodás elleni védőhatását az AHL-re mérsékelten érzékeny BALB/c és fokozottan érzékeny DBA/2J egértörzsekben vizsgáltuk, két kísérleti alrészben (Kísérlet I. és II.) A selegilin különböző dózisainak az állatok hallásfunkciójára gyakorolt hatását rendszeres ABR mérésekkel követtük nyomon. A kísérleti protokollt a 4. ábra mutatja be. A kísérlet részletes leírását (alkalmazott akusztikus stimulusk, mérési időpontok, gyógyszeradagolás, vizsgált dózisok) részletesen lásd a 5.3.1 és 5.4 fejezetekben.

Meg kell említeni, hogy a BALB/c egerek a selegilint nagyobb töménységben tartalmazó vízből jelentősen kevesebbet ittak (0,58 ml/egér/nap), így csökkentenünk kellett az ivóvizük selegilin tartalmát. Különböző koncentrációk tesztelésével és ezzel párhuzamosan az állatok folyadékfogyasztásának mérésével választásunk a 0,05 mg/ml koncentrációjú oldatra esett. Ennek alkalmazásával az állatok napi átlagos folyadékbevitelére már kielégítőnek bizonyult (2 ml/nap/egér), azonban a tervezett 15 illetve 45 mg/kg dózisok helyett a megivott dózis csak 4 mg/kg volt. A DBA/2J egerek vízfogyasztását nem befolyásolta az ivóvíz selegilin koncentrációja. Ennek következtében a kísérlet második részében a BALB/c törzs esetén kettő (kontroll; 4 mg/kg selegilin), a DBA/2J törzs esetén pedig három (kontroll; 15 ill. 45 mg/kg selegilin) csoport vizsgálatát végeztük.

6.1.1. Kísérlet I. A krónikus selegilin kezelés (1,5 mg/kg) enyhe védőhatást mutatott a BALB/c állatok időskori halláskárosodásának kialakulásával szemben

A kontroll BALB/c állatok az életkorral fokozatosan progrediáló hallásküszöb emelkedést mutattak. A hallásküszöb eltolódás az állatok 28 hetes korára $15,29 \pm 3,11$ dB, $15,88 \pm 2,11$ dB és $33,53 \pm 2,96$ dB volt az általunk vizsgált 4,1; 8,2 és 16,4 kHz-es frekvenciákon. A frekvenciafüggetlen click hangstimulus tekintetében nem tapasztaltunk hallásromlást (7/A ábra). A 0,15 mg/kg-os dózisban alkalmazott selegilinnel a click inger esetén és a 16,4 kHz-es frekvencián látható átmeneti, csupán 1-1 adott életkort érintő hatása. A selegilin 1,5 mg/kg-os dózisa a 8,2 kHz-es frekvencián enyhén, de tartósan

csökkentette a hallásküszöb eltolódásának mértékét az állatok 12, 16 és 28 hetes korában. Hasonló mértékű csökkenést tapasztaltunk 16,4 kHz-en, az utolsó mérési időpontban (7/A ábra).



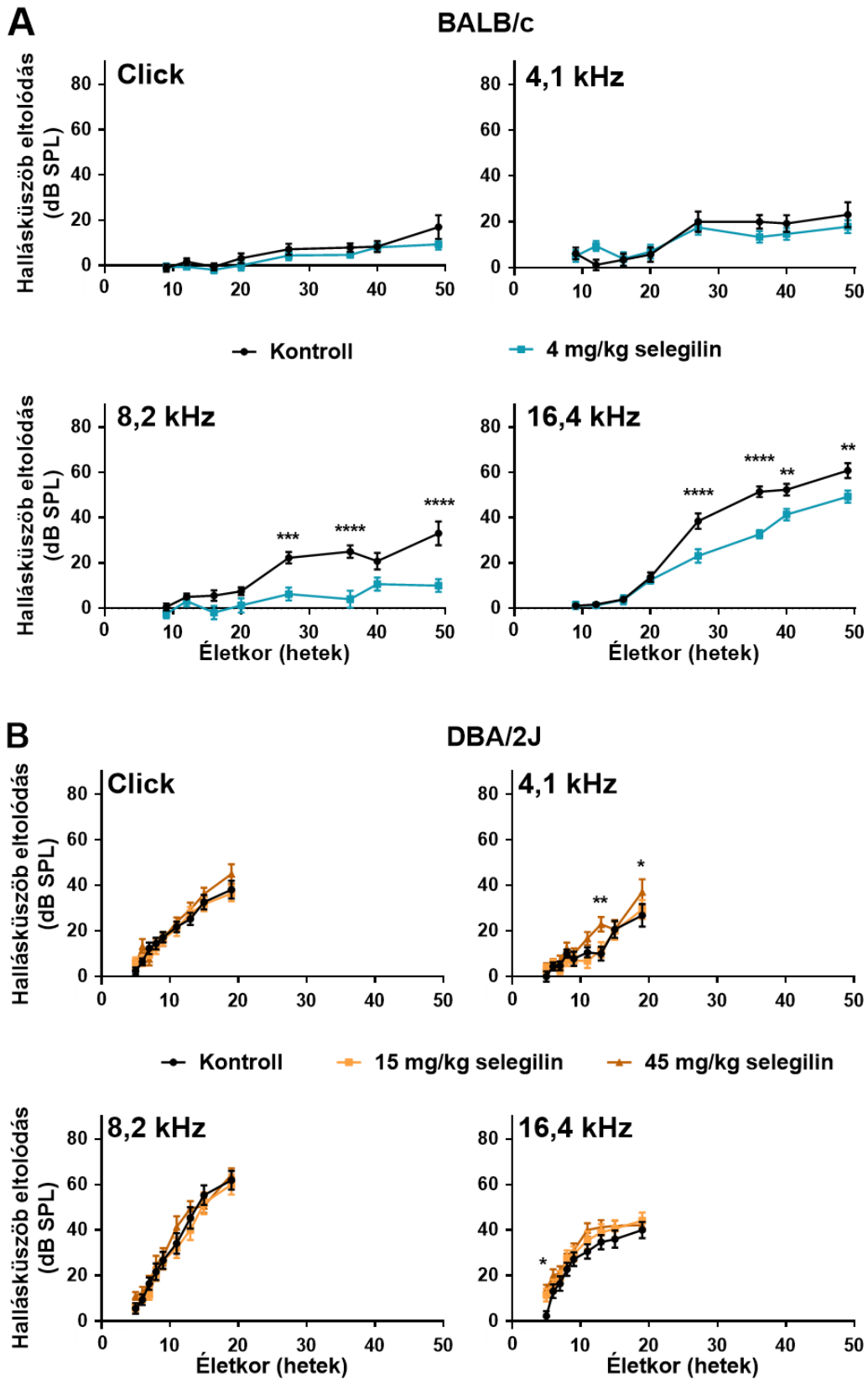
7. ábra. A krónikus per os selegilin kezelés hatása az idős kori hallásvesztésre BALB/c és DBA/2J egerekben (240). A selegilint per os, ivóvízben kapták az állatok. A kísérlet során a hallásküszöb változását ABR módszerrel követtük nyomon mind click, mind tone burst (4,1; 8,2 és 16,4 kHz) hangstimulusokat alkalmazva. A BALB/c (A) és a DBA/2J (B) törzs állatainak kezelése 0,15 illetve 1,5 mg/kg selegilin dózisokkal történt. Az adatokat átlag \pm SEM-ben ábrázoltuk. A # és * a kontrollhoz képest mért szignifikáns különbséget mutatja. 0,15 mg/kg (## $p < 0,01$), 1,5 mg/kg (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A DBA/2J egértörzs már fiatal korban kifejeződő, progresszív hallásromlást mutatott (7/B ábra). A hallásküszöb eltolódásának mértéke, időbeli változása mind a click hangstimulus, mind a vizsgált frekvenciák tekintetében hasonló volt a kontroll és a 0,15 mg/kg selegilinnel kezelt csoportokban. Habár a 1,5 mg/kg dózisban alkalmazott selegilin click inger esetén illetve a 4,1 és 8,2 kHz-es frekvenciákon küszöbemelkedést okozott, a hatás átmenetinek illetve csak bizonyos életkorokban jelentkezőnek bizonyult.

Az adatok alapján elmondható, hogy a selegilin 1,5 mg/kg dózisa enyhe mértékű védőhatást fejtett ki a BALB/c állatok életkorral összefüggő halláscsökkenésére. Ezzel szemben ez a dózis inkább felerősítette a DBA/2J egerek életkorfüggő küszöbeltolódását.

6.1.2. Kísérlet II. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) jelentős mértékű védőhatást mutatott a BALB/c állatok idős kori halláskárosodásának progressziójával szemben

A II. kísérleti alrészben a BALB/c egerek hallásküszöb változását az állatok 49 hetes koráig követtük. A kontroll csoport hallásküszöb értékei a kor előrehaladtával fokozatos emelkedést mutattak az általunk vizsgált akusztikus stimulusokon (8/A ábra). A legnagyobb mértékű hallásromlást a 16,4 kHz-es frekvencián detektáltuk. A kontroll és a selegilinnel kezelt (4 mg/kg) csoport hallásküszöb eltolódásának mértéke a click és a 4,1 kHz-es frekvencián közel azonos volt. Ezzel szemben a vegyület szignifikánsan csökkentette a hallásvesztés kialakulását a 8,2 illetve 16,4 kHz-es frekvenciákon. A jelentős mértékű hallásvédelem az állatok 27 hetes korában jelentkezett és a kísérlet további szakaszában (22 héten keresztül) mindvégig megmaradt.



8. ábra. A nagy dózisú, krónikus per os selegilin kezelés mérsékelte a BALB/c egértörzs életkorral összefüggő hallásromlását (240). A DBA/2J egerekben a vegyület nem mutatott védőhatást. A selegilint per os, ivóvízben kapták az állatok, BALB/c törzs esetén 4 mg/kg (**A**), DBA/2J törzs esetén pedig 15 illetve 45 mg/kg dózisokban (**B**) alkalmazva. A hallásküszöb változását ABR módszerrel követtük nyomon. ABR méréseket a BALB/c egértörzsön 4-49 hetes életkorban, a DBA/2J törzsön pedig 4-19 hetes életkor között végeztünk. Az ábrán a kontrollhoz képest mért szignifikáns különbségeket tüntettük fel (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt). (**A**) 4 mg/kg (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$), (**B**) 45 mg/kg (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A törzsre jellemző, fiatal életkorban kezdődő, igen progresszív hallásvesztés kialakulása következtében a DBA/2J törzs hallásküszöb változását az állatok 19 hetes koráig követtük, gyakoribb ABR méréseket végezve. A kontroll és a selegilinnel kezelt (15 illetve 45 mg/kg) csoportok hallásvesztésének mértéke és időbeli változása közel azonos volt (8/B ábra). A 45 mg/kg selegilinnel kezelt csoport esetén szignifikáns, de átmeneti hallásromlás mutatkozott három vizsgált időpontban (13 és 19 hetes életkorban 4,1 kHz-en; 5 hetes életkorban 16,4 kHz-en).

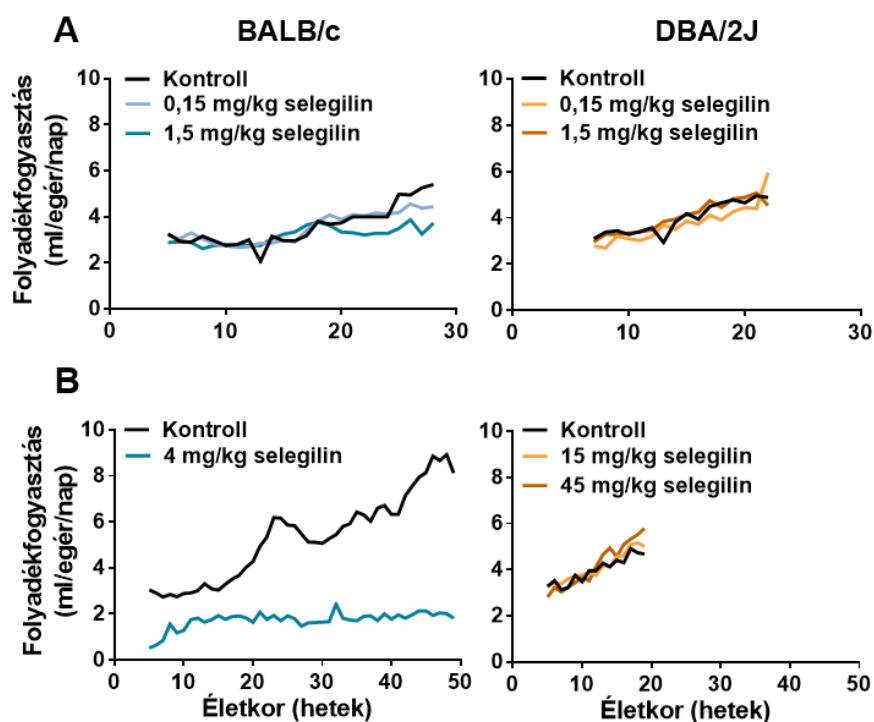
Eredményeink azt mutatják, hogy a krónikus, orális formában alkalmazott selegilin kezelés 4 mg/kg dózisban a magas frekvenciákon jelentősen csökkentette a BALB/c egértörzs hallásromlásának mértékét, az állatok 27 hetes korától kezdődően. Ezzel szemben a selegilin magasabb dózisa (15 és 45 mg/kg) a DBA/2J egértörzs halláscsökkenésének progresszióját nem befolyásolták.

6.2. A krónikus selegilin kezelés hatása a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek folyadékfogyasztására, testsúlyára és élettartamára

A hosszú kezelési idő miatt a selegilint per os, az ivóvízzel adagoltuk. A kezelés teljes időtartama során folyamatosan monitoroztuk az állatok folyadékfogyasztását illetve testsúlyát, meghatározva a selegilin napi bejutott dózisát (mg/kg). Emellett a kísérlet hosszan tartó, krónikus jellegéből adódóan, továbbá a selegilinnel kapcsolatos korábbi, élethossz növelő eredmények (254) alapján megvizsgáltuk, hogy a selegilin kezelés befolyásolja-e a vizsgált egértörzsek élettartamát.

6.2.1. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) csökkentette a BALB/c egértörzs folyadékfogyasztását

Az I. kísérleti alrészben, a kezelési időszak utolsó harmadában a kis dózisu selegilin kezelés csökkentette a BALB/c állatok folyadékfogyasztását (9/A ábra). A 0,15 és 1,5 mg/kg selegilinnel kezelt, 28 hetes korú BALB/c egerek átlagos folyadékfogyasztása 4,44 és 3,72 ml/egér/nap volt, szemben a kontroll állatok 5,40 ml/egér/nap vízbevitelével. A selegilin 0,15 illetve 1,5 mg/kg dózisokban alkalmazva nem befolyásolta a DBA/2J egerek vízfogyasztását (9/A ábra). Az adatok statisztikai elemzésére nem volt lehetőség az egerek csoportos elhelyezése miatt (10 egér/kecsec).



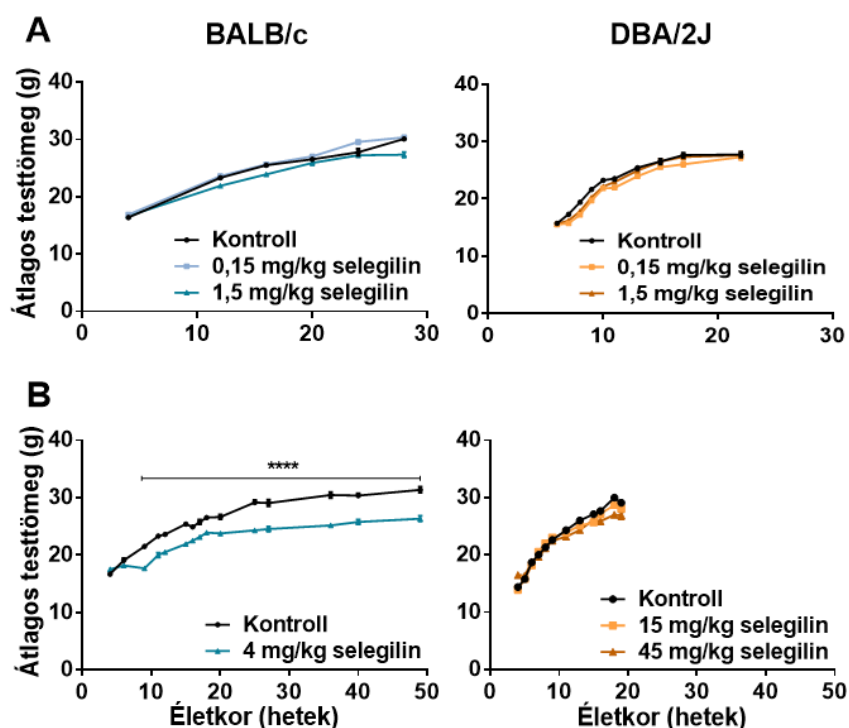
9. ábra. A különböző dózisokban alkalmazott krónikus per os selegilin kezelés folyadékfogyasztásra gyakorolt hatása BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsekben (240). A Módszerek fejezetben korábban leírtaknak megfelelően a selegilin adása per os, ivóvízben oldva történt. A kísérlet során állatkecsecenként folyamatosan követtük az állatok folyadékfogyasztását (ml/egér/nap), hogy kiszámolhassuk a selegilin bejutott dózisát. (A) 0,15 és 1,5 mg/kg (Kísérlet I) továbbá (B) 4, 15 és 45 mg/kg (Kísérlet II) dózisu selegilin kezelés hatása a BALB/c és DBA/2J egértörzsek folyadékfogyasztására.

A II. kísérleti alrészben, a BALB/c egerek 4-49 hetes életkorában végzett kísérleti periódus során a kontroll állatok folyadékfogyasztása az átlagos napi 2,74-3,31 ml/egér bevitelről 8,12-8,85 ml/egér-re nőtt. Ezzel szemben a 4 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt csoport állatainak folyadékfogyasztása a teljes kísérlet során átlagosan 1,61–2,14 ml/egér/nap között ingadozott (9/B ábra). A folyadékfogyasztásban mutatkozott jelentős különbség ellenére mindkét kezelési csoport állatai a kísérlet teljes ideje alatt jó egészségi állapotban voltak. A DBA/2J törzs kezelési csoportjainak napi átlagos folyadékbevitel a kísérlet 9. kezelési hetéig közel azonos volt. Ezt követően a 45 mg/kg dózisú selegilin csoport folyadékfogyasztása kismértékben meghaladta a másik két csoportét (9/B ábra).

6.2.2. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) csökkentette a BALB/c egértörzs súlygyarapodásának mértékét

A kísérlet során rendszeresen mértük az állatok testsúlyát a selegilin napi bejutott dózisának (mg/kg) kiszámításához.

Az I. kísérleti alrészben a BALB/c törzs kontroll állatainak testsúlya az állatok 6-28 hetes kora között $16,40 \pm 0,18$ g-ról $30,11 \pm 0,34$ g-ra nőtt. A selegilin alkalmazott legkisebb dózisa (0,15 mg/kg) nem volt hatással az állatok súlygyarapodására, 1,5 mg/kg dózisban azonban három időpontban csökkentette annak mértékét ($p < 0,01$ 12 és 16 hetes korban; $p < 0,001$ 28 hetes korban) (10/A ábra). A kontroll DBA/2J egerek átlagos súlya $15,7 \pm 0,26$ g-ról $27,7 \pm 0,51$ g-ra nőtt (6-22 hetes korig), szemben a 0,15 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt csoporttal, amely csoport súlygyarapodása az állatok 7-17 hetes kora között ennél kisebbnek bizonyult ($p < 0,05$ – $p < 0,001$; 7-17 hetes életkorban) (10/A ábra). A szignifikáns különbségek ellenére minden csoport átlagos testsúlya illetve súlygyarapodása illeszkedik az adott altörzsre jellemző normál súlygyarapodás tartományába (255, 256).



10. ábra. A különböző dózisokban alkalmazott krónikus per os selegilin kezelés testsúlyváltozásra kifejtett hatása BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsekben (240).

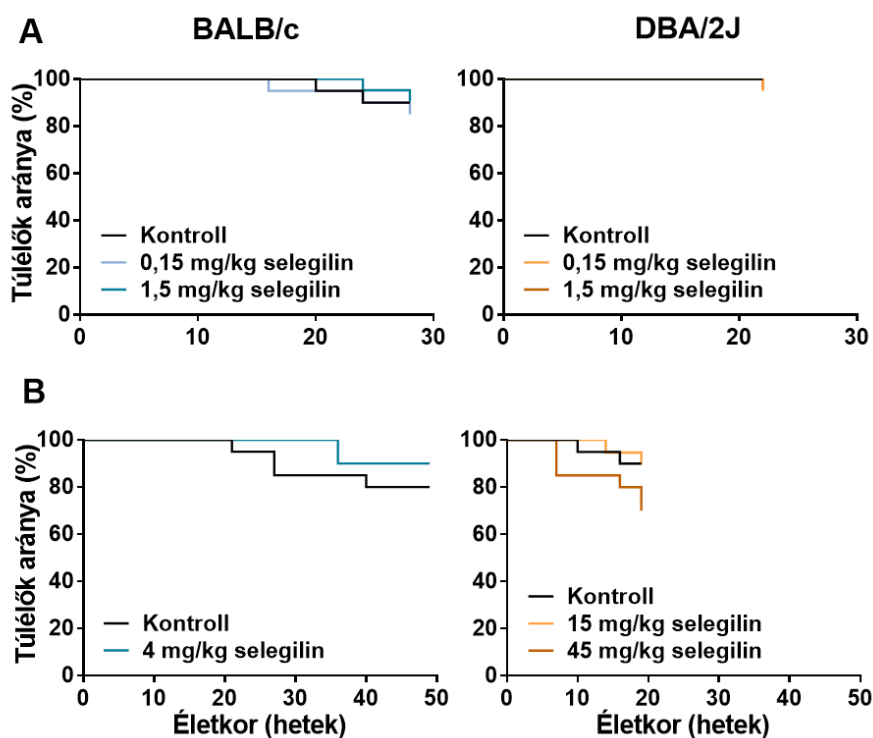
A folyadékfogyasztáshoz hasonlóan a kísérlet során folyamatosan követtük az állatok testsúlyának változását, a selegilin bejutott dózisának kiszámításához. **(A)** Alacsonyabb (0,15 és 1,5 mg/kg; Kísérlet I) és **(B)** magasabb (4 mg/kg illetve 15 és 45 mg/kg; Kísérlet II) dózisú selegilin kezelés testsúlyváltozásra kifejtett hatása BALB/c és DBA/2J egerekben. A testsúlyra vonatkozó adatokat átlag \pm SEM-ben ábrázoltuk (egyszempontos ANOVA-t, Bonferroni post-hoc teszt, **** $p < 0,0001$).

A II. kísérleti alrészben a kontroll BALB/c állatok testsúlya $16,70 \pm 0,30$ g-ról $31,37 \pm 0,51$ g-ra nőtt a 45 hétig tartó kísérleti periódus során. A 4 mg/kg dózisú selegilin kezelés szignifikáns mértékben csökkentette az állatok súlygyarapodását ($17,53 \pm 0,32$ g – $26,35 \pm 0,49$ g) a kísérlet teljes időtartama alatt (10/B ábra). Ez a 10-18 % súlybéli eltérés azonban összhangban áll az állatkísérletek etikai irányelveivel (257-259) és illeszkedik a tenyésztő által közzétett, 3-15 hetes, BALB/cAnNCrl altörzsre vonatkozó normál súlygyarapodás tartományába (256). Ezen túlmenően a selegilinnel kezelt állatok a kontroll csoportokhoz hasonlóan nem mutatták sem fájdalom, sem szorongás jeleit. Mind megjelenésük, mind viselkedésük a kísérlet teljes időtartama alatt normális volt. A súlygyarapodás mértékének csökkenése feltehetően a BALB/c törzs ízpreferenciája miatt

fellépett csökkent folyadékbevitel következménye (260). A DBA/2J kontroll állatok testsúlya $14,40 \pm 0,54$ g-ról $29,11 \pm 0,43$ g-ra változott az állatok 4-19 hetes korában. A 15 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt csoport ehhez hasonló mértékű súlygyarapodást ($14,00 \pm 0,63$ g – $28,12 \pm 0,55$ g) mutatott. Ezzel szemben a 45 mg/kg selegilin kezelés az állatok 13 és 19 hetes kora között csökkentette a súlygyarapodás mértékét ($16,50 \pm 0,52$ g – $26,86 \pm 0,65$ g) (10/B ábra).

6.2.3. *A krónikus selegilin kezelés nem befolyásolta az állatok élettartamát*

Ahogy a 11/A ábrán látható, az I. kísérleti alrészben a BALB/c állatok túlélési aránya mindhárom kezelési csoport esetén közel azonos volt. A Kaplan-Meier-módszerrel végzett, log-rank (Mantel-Cox) és Gehan-Breslow-Wilcoxon teszteken alapuló analízis nem mutatott statisztikai különbséget. Az állatok 28 hetes korában a kontroll csoport túlélési aránya 90%, a 0,15 és 1,5 mg/kg selegilinnel kezelt csoportoké pedig 85 illetve 90,5% volt. A 0,15 és 1,5 mg/kg selegilinnel kezelt DBA/2J egerek 22 hetes korukban 95% illetve 95,7% -os túlélési arányt mutattak, ezzel szemben a kontroll csoport valamennyi állata túlélte a kísérleti időszakot (11/A ábra). Ezen eredmények alapján a krónikus selegilin kezelés 0,15 és 1,5 mg/kg dózisokban alkalmazva nem befolyásolta a BALB/c illetve DBA/2J egértörzsek túlélési valószínűségét.

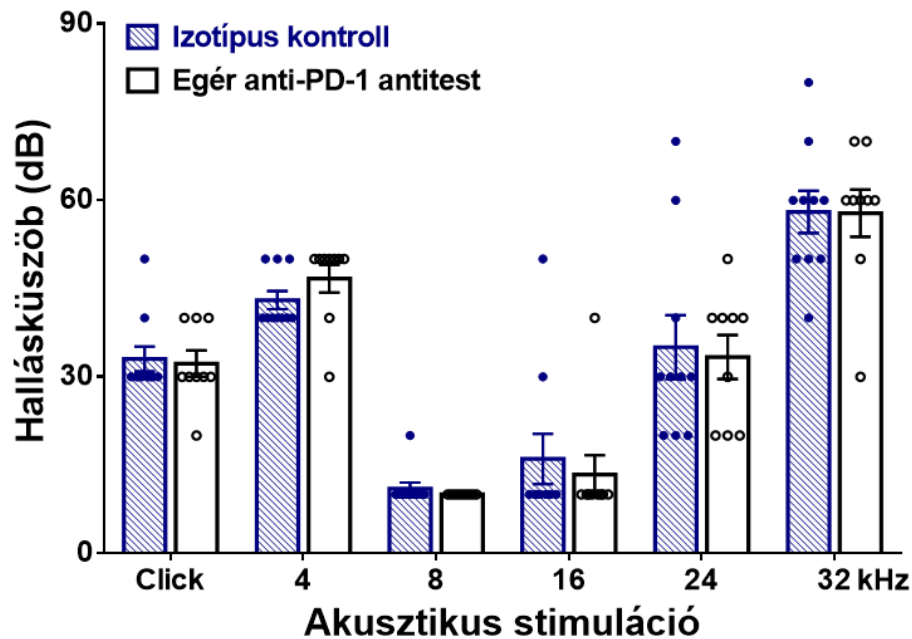


11. ábra. A krónikus per os selegiline kezelés egyik alkalmazott dózisban sem befolyásolta szignifikánsan a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek túlélési valószínűségét (240). A Kaplan-Meier-féle diagramok a per os selegilin kezelés különböző dózisainak hatását mutatják a túlélési arányra vonatkozóan BALB/c és DBA/2J egerek kezelési csoportjaiban. A túlélési elemzésekhez Mantel-Cox és Gehan-Breslow-Wilcoxon tesztek alkalmaztunk.

A II. kísérleti alrészben a 4 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt BALB/c állatok a 45 hetes kezelési periódust követően 90%-os túlélési arányt mutattak, amely érték nem tért el szignifikánsan a 80%-os túlélést mutató kontroll csoporttól (11/B ábra). A 45 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt DBA/2J egerek a kísérlet végén csak 70%-os túlélést mutattak, azonban ez nem különbözött szignifikánsan sem a kontroll (90%), sem a 0,15 mg/kg selegilint kapó (89,5%) kezelési csoportok túlélési arányától (11/B ábra). Bár a selegilin statisztikailag nem befolyásolta az állatok túlélését, a selegilin nagyobb dózisainak alkalmazásakor a BALB/c egértörzs esetében a túlélési arány kismértékű növelésére, a DBA/2J egerekben pedig annak mérsékelt csökkentésére irányuló hatást figyelhetünk meg.

6.3. A PD-1 gátló kezelés nem befolyásolta a C57BL/6 állatok hallásfunkcióját

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, a PD-1 gátló kezelésnek van-e hatása a hallásfunkcióra, különböző akusztikus stimulusokat alkalmazva (4, 8, 16, 24, 32 kHz és click hangstimulus), PD-1 gátló és izotípus kontroll antitesttel kezelt C57BL/6J egerek hallásküszöb értékeit hasonlítottuk össze. A hallásfunkció vizsgálatát a négy hétig tartó kezelési periódust követően végeztük. A mért hallásküszöb értékek mindkét csoport esetén megfeleltek a C57BL/6J egértörzs hasonló korú állataira jellemző értékeknek. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget sem a frekvenciafüggetlen click hangstimulus, sem a vizsgált frekvenciák (4-32 kHz) esetén (12. ábra).



12. ábra. A PD-1 gátló terápia nem befolyásolta a C57BL/6J állatok hallásküszöb értékét (241). A funkcionális hallásvizsgálatra alkalmas ABR méréseket a 4 hetes kezelési periódust követően végeztük. A hallásküszöb értékekben nem mutatkozott különbség sem a frekvenciafüggetlen click, sem a burst hangstimulusok (4, 8, 16, 24 és 32 kHz) esetén az izotípus kontroll (n=10) és az egér anti-PD-1 antitesttel (n=9) kezelt állatok között. Az adatokat átlag \pm SEM-ben adtuk meg (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt $*p < 0,05$).

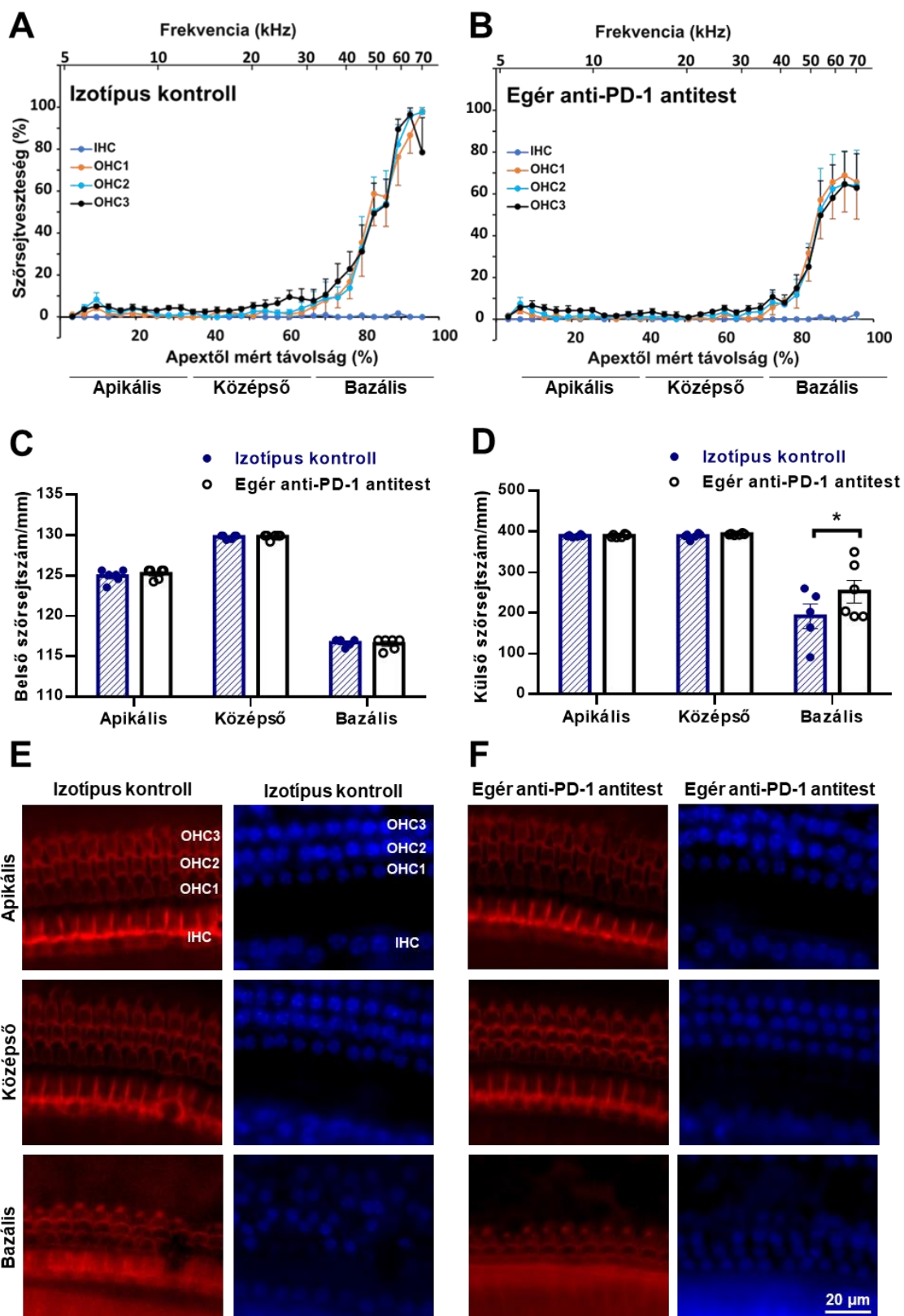
6.4. A PD-1 gátló kezelés hatásának vizsgálata a belsőfül morfológiájára

Megvizsgáltuk a PD-1 gátló immunterápia belsőfülre kifejtett hatását az SNHL-ek során elsődlegesen érintett receptor sejtekben és elsődleges hallóneuronokban.

6.4.1. A PD-1 gátlás az apikális és középső kanyarulatokban nem befolyásolta a szőrsejtek számát, a bazális kanyarulatban azonban mérsékelte a külső szőrsejt veszteséget

A Corti-féle szerv szőrsejtjeinek épségét az Alexa Fluor 594 Phalloidinnal jelölt aktin filamentumok és a DAPI-val megfestett sejtmagok vizsgálatával határoztuk meg. A 32 kHz-nél alacsonyabb frekvenciákon egyik kísérleti csoportban sem tapasztaltunk szőrsejtpusztulást. A 32 kHz feletti frekvenciákon viszont a PD-1 gátló terápiában részesülő állatok mérsékeltebb OHC pusztulást mutattak (13/B ábra), összehasonlítva a kontroll állatokban megfigyelt OHC veszteséggel (13/A ábra). A bazális régió legmagasabb frekvenciáihoz közeledve a kontroll állatoknál csaknem 100%-os volt az OHC pusztulás mértéke. Az OHC-k számában bekövetkező veszteség PD-1 gátló kezelés hatására körülbelül 60-70%-ra mérséklődött ebben a régióban. Az apikális, középső és bazális kanyarulatok mm-re számított szőrsejtsűrűségeinek statisztikai analízisekor (kétfváltozós ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt) a bazális részen megfigyelt eltérés az OHC-k számában szignifikánsnak bizonyult (13/D ábra). Az IHC-k tekintetében egyik régióban sem volt különbség a két csoport között (13/C ábra).

A PD-1 gátló antitest kezelés nem befolyásolta az ép szőrsejtek számát sem az apikális, sem a középső kanyarulatokban, azonban védőhatást fejtett ki a bazális szegmensben. A szőrsejtek illetve sejtmagok állapotát az izotípus kontroll (13/E ábra) illetve az anti-PD-1 antitesttel kezelt csoportok (13/F ábra) Corti-féle szervének apikális, középső továbbá bazális szakaszáról készült reprezentatív felvételek szemléltetik.

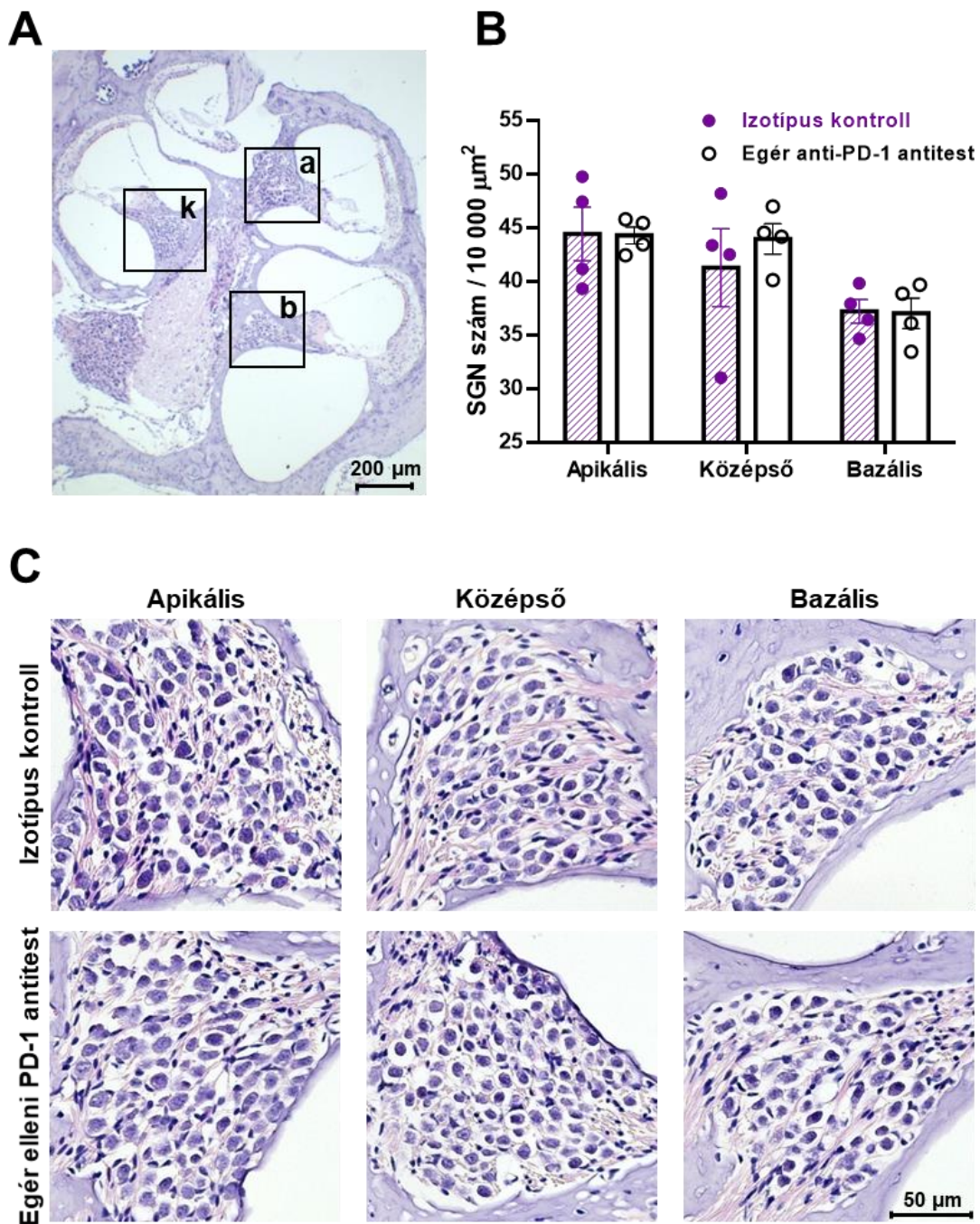


13. ábra A PD-1 gátló immunterápia nem befolyásolta a szőrsejtek számát a cochlea apikális és középső kanyarulataiban, ezzel szemben a bazális kanyarulatban a külső szőrsejtekre irányuló védőhatást mutatott (241). A kontroll (A) és az anti-PD-1

antitesttel kezelt **(B)** állatok ($n = 6$ egér/csoport) szőrsejtpusztulásának mértéke a cochlea csúcstól (apex) mért távolság illetve a frekvencia függvényében (cochleogram). A 32 kHz-et meghaladó frekvenciákon a C57BL/6J egértörzsre jellemző OHC pusztulás figyelhető meg, amelynek mértéke kisebb a PD-1 gátló antitesttel kezelt csoportban. Az oszlopdiagramok az IHC-k **(C)** és OHC-k **(D)** átlagos sűrűségét ábrázolják a Corti-szerv három régiójában. A bazális szakaszon lévő OHC-k szignifikánsan kisebb károsodást szenvedtek az anti-PD-1 antitesttel kezelt csoport esetében **(D)**. **(E,F)**: A Corti-féle szerv régióiról készített reprezentatív felvételek. A szőrsejtek láthatóvá tétele Alexa Fluor 594 Phalloidin (piros) és DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo) (kék) festéssel történt. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, $*p < 0.05$). IHC: belső szőrsejtsor; OHC1/2/3: 1., 2. és 3. külső szőrsejtsorok.

6.4.2. Az anti-PD-1 kezelés a spirális ganglionsejtek számát és morfológiáját a cochlea egyik kanyarulatában sem változtatta meg

A hematoxylin-eozinnal festett metszeteken (14/A ábra) egyik cochleáris kanyarulatban sem találtunk eltérést az SGN-ek számát (14/B ábra), illetve morfológiáját (14/C ábra) illetően. A neuronok mindkét kezelési csoportban épnek mutatkoztak, degeneráció jelei nem voltak felfedezhetőek.

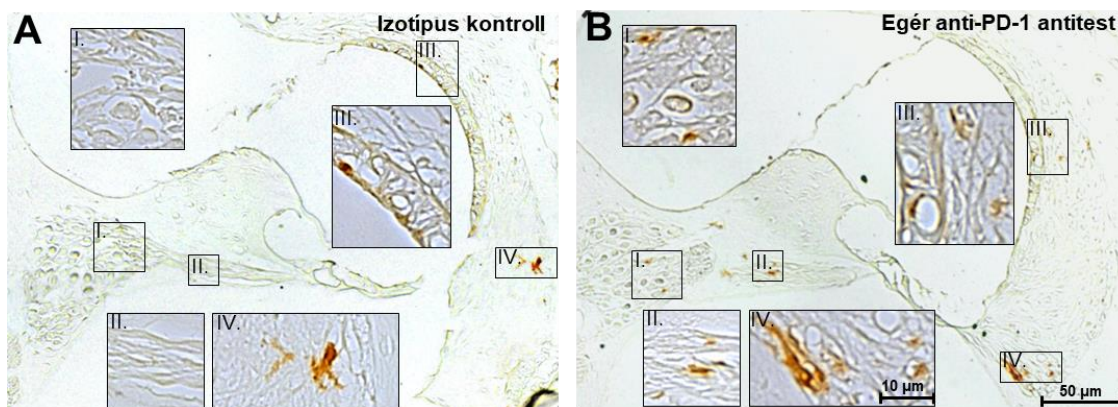


14. ábra. A belsőfül spirális ganglion neuronjainak hematoxilin-eozin festése (241). (A) 6,3x objektívvel készült reprezentatív felvétel a cochlea keresztmetszetéről. A metszést a modiolus tengelyével párhuzamosan végeztük. A négyzetek a cochlea apikális (a), középső (k) és bazális (b) régiójában elhelyezkedő SGN-eket jelölik. (B) A cochlea 3 régiójában mért SGN sűrűség oszlopdiagramja. Az adatok az átlag \pm SEM értékeket ábrázolják. A statisztikai analízis (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, $*p < 0,05$) nem mutatott szignifikáns különbséget az izotípus kontroll és az egér anti-PD-1

antitesttel kezelt csoport között (n=4 egér/csoport, cochleánként 5 metszet átlaga). (C) 40x nagyítással készült reprezentatív felvételek cochlea 3 kanyarulatában elhelyezkedő SGN-ekről. A két kezelési csoport neuronjai sem számbeli, sem morfológiai különbséget nem mutattak. A diagramokon az átlag \pm standard hiba értékeit ábrázoltuk. SGN: spirális ganglionsejt.

6.5. A PD-1 gátló kezelés az Iba1-pozitív makrofágok számát az apikális és középső kanyarulatokban nem befolyásolta, a bazális kanyarulatban megemelte

Iba1-pozitív makrofágokat elsősorban az SGN-ek régiójában, az SGN-ek nyúlványai mentén, a stria vascularisban és a ligamentum spirale területén detektáltunk. Az izotípus kontroll és a PD-1 gátlóval kezelt csoportok Iba1-pozitív makrofágjainak száma a cochlea apikális és középső kanyarulataiban nem különbözött egymástól. A bazális kanyarulatban azonban az Iba1-pozitív makrofágok számában egy megközelítőleg 1,56-szoros növekedést tapasztaltunk a PD-1 gátló csoport esetén (15. ábra).



15. ábra. Reprezentatív felvételek a cochlea bazális kanyarulatában kimutatott makrofágokról (241). A cochlea bazális régiójában az anti-PD1 antitesttel kezelt csoport (B) erőteljesebb DAB reakciót, azaz emelkedett makrofágszámot mutatott az izotípus kontroll csoporthoz (A) képest. Az anti-PD-1 antitesttel kezelt csoport (n=3) anti-egér-Iba1 immunhisztokémiával detektált Iba1-pozitív sejtjeinek száma 1,56-szorosa az izotípus kontroll csoportban (n=2) kapott értéknek. A római számok az SGN-eknek (I.), a bipoláris neuronok perifériás nyúlványainak (II.), a stria vascularisnak (III.) továbbá a ligamentum spiralenek (IV.) egy-egy kinagyított régióját mutatják.

7. MEGBESZÉLÉS

Annak ellenére, hogy a halláskárosodás a leggyakoribb idegrendszeri érintő betegség, szenzorneurális formáinak gyógyszeres terápiája nem megoldott. Az elmúlt évek során számos vegyület esetén végeztek preklinikai vizsgálatokat, azonban eddig egyik szer sem bizonyult igazán hatékonynak. Egyedüli megoldást jelenleg a különféle hallásjavító készülékek (hallókészülék, cochleáris implantátum) alkalmazása jelenthet, azonban a természetes hallást ezen eszközök sem képesek pótolni, hatékonyságukat pedig számos tényező befolyásolja. Ennek következtében kiemelt jelentőséggel bír mind a halláskárosodás mérséklése/gátlása, mind a halláscsökkenés megelőzése.

Jelen kutatások fókuszában egyrészt potenciális hallásvédő vegyületek keresése, másrészt a halláskárosodást kiváltó tényezők (pl. különböző vegyületek) feltérképezése áll (139, 140). Figyelembe véve a leggyakoribb SNHL formák (AHL, NIHL, DIHL) hátterében álló, eddig ismert patológiai folyamatokat (oxidatív stressz, neuronkárosodás, apoptózis), a preklinikai kísérletek elsősorban a redox rendszert befolyásoló, az elsődleges hallóneuronok aktivitására ható valamint az apoptotikus folyamatok szabályozásában résztvevő vegyületek vizsgálatára irányulnak. Az említett mechanizmusok mellett az elmúlt években az immunrendszer hallásban illetve a halláskárosodások kialakulásában betöltött szerepével kapcsolatos vizsgálatok a halláskutatás területének fókuszába („hot topic”) kerültek. Kimutatták, hogy az immunrendszer amellet, hogy védelmi szerepet tölt be a belsőfül működésében, a különböző SNHL-ek kialakulásának hátterében is jelentős kóroki tényező. Ezáltal az immunmodulátorok mint új potenciális hallásvédő/halláskárosító vegyületek jelentek meg a halláskutatásban (261, 262).

Kísérleteink középpontjában olyan vegyületek vizsgálata állt, amelyek hatásmechanizmusuk alapján potenciális otoprotektív illetve ototoxikus hatással rendelkezhetnek. A fent leírtak alapján relevánsnak gondoltuk megvizsgálni a neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező, továbbá az immunfolyamatokat is befolyásoló selegilin lehetséges hallásvédő hatását a leggyakoribb SNHL forma, az AHL egérmódeljében. Másrészt kontrollált, objektív vizsgálatokkal szerettük volna megvizsgálni, hogy az előzetes vigilancia jelentésekben és három esettanulmányban megjelenő hallásromlás valóban a daganatellenes immunellenőrzőpont-gátló terápiának a mellékhatása-e. A PD-1 gátló terápia az

immunrendszer túlaktiválódásához és autoimmun szervkárosodásokhoz vezethet, ami involválhatja a hallórendszert is, halláskárosodást okozva.

7.1. A selegilin, mint potenciális otoprotektív vegyület és vizsgálata az AHL egérmodelljeiben

Az AHL az idősödő lakosság egyik leggyakrabban előforduló neurodegeneratív betegsége. A hatékony kezelés igénye ellenére az AHL farmakoterápiája máig nem megoldott, elsősorban a betegség kialakulásának háttérében álló patomechanizmusok összetettsége miatt. Az X-kromoszóma kapcsolt apoptózis-gátló fehérje és más apoptózist gátló molekulák használata (263), továbbá antioxidánsok (264, 265) vagy neuroprotektív vegyületek (129) alkalmazása már számos állatkísérletben védő hatásúnak bizonyult, azonban ezen vegyületek egyike sem váltotta még be a hozzá fűzött humán terápiás reményeket. Az FDA által jóváhagyott, Parkinson-kór elleni gyógyszer, a selegilin komplex neuroprotektív, antioxidáns és antiapoptotikus hatású, emellett immunmoduláló tulajdonságokkal is rendelkezik. További előnye, hogy a selegilint a klinikumban már évtizedek óta alkalmazzák, ezáltal számos eredmény áll rendelkezésünkre a szervezetre gyakorolt hatásával kapcsolatban és nem kell tartanunk súlyos, nem várt toxicitási reakcióktól. Ezen ismeretek birtokában – gondolva a repositioning lehetőségére – érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a selegilin pozitív hatást gyakorol-e a presbycusisra és csökkenti-e a betegség progresszióját.

A selegilin különböző dózisainak AHL-re gyakorolt hatását két AHL egérmodellben vizsgáltuk. A két egértörzs jelentős különbséget mutat a halláskárosodás időbeli alakulását tekintve, amelynek háttérében genetikai tényezők állnak. A BALB/c egértörzs fokozatosan progrediáló halláscsökkenése az állatok 4 hetes korában kezdődik, elsősorban a magasabb frekvenciákat érintve. Számottevő hallásküszöb emelkedés az állatok 24-28 hetes korában figyelhető meg, amely 10 hónapos korukra válik jelentőssé (100, 266). A DBA/2J egerekben az életkorral összefüggő hallásvesztés korábban, az elválasztás után elkezdődik és a törzsre jellemző igen progresszív hallásvesztés már az állatok 3 hónapos korára kialakul (100, 266, 267). Mivel az AHL időbeli lefolyásában a humán populációban is előfordulnak egyéni különbségek, az AHL elleni potenciális hallásvédő vegyületek vizsgálata eltérő progressziójú hallásvesztést mutató

egértörzsekben növeli a kísérlet transzlációs értékét. Ezenkívül két különböző egértörzs bevonása javítja a eredmények általánosíthatóságát is.

7.1.1. A krónikus selegilin kezelés hallásfunkcióra gyakorolt hatása és annak háttérben álló lehetséges mechanizmusok

Tekintettel a két törzsben fellépő AHL progressziójára, úgy gondoltuk, hogy a selegilin fiatal kortól történő krónikus alkalmazása előnyösebb lehet. A kezelést az I. kísérleti alrészben az állatok 6 hetes, a II. alrészben pedig az állatok 4 hetes korában kezdtük és a teljes kísérleti periódus alatt folytattuk. A selegilin 4 mg/kg dózisban alkalmazva mérsékelte az AHL kialakulásának progresszióját BALB/c egerekben. Ez a dózis 20 mg/nap humán dózisonak felel meg (268), amely a klinikumban a Parkinson-kór kezelésére alkalmazott 5-10 mg napi dózis 2-4-szerese (240). A hallásvédelem az állatok 27 hetes korában vált jelentőssé és a kísérlet során mindvégig megmaradt. A szignifikáns védőhatás kiterjedt az egerek hallásérzékenységi optimum tartományára (~15-20 kHz), ami megfeleltethető az emberi hallásoptimum ill. beszédértés ~2-4 kHz-es tartományának. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a selegilin otoprotektív hatását a beszédértés szempontjából legfontosabb frekvenciatartományban is kifejti.

A BALB/c egértörzssel szemben a selegilin a DBA/2J egértörzs halláscsökkenésének progresszióját nem befolyásolta. Feltételezésünk szerint ennek oka az eltérő genetikai háttérben keresendő. Különböző típusú Ahl gének jelenléte fokozza az AHL kialakulásának lehetőségét. A BALB/c törzs homozigóta az Ahl1 alléllra, amíg a DBA/2J törzs nagyobb érzékenysége az Ahl1, Ahl8 és Ahl9 gének jelenlétének köszönhető (269-271). A selegilin hatékonyságában mutatkozó különbségek oka feltehetően a DBA/2J törzsben jelenlévő több, AHL-re hajlamosító gén egyidejű jelenléte, amelynek eredménye egy progresszívebb, súlyosabb fokú és valószínűleg összetettebb patológiai háttérrel mutató AHL forma kialakulása.

A selegilin DBA/2J törzsben mutatott hatástalansága nem csökkenti a BALB/c egerekben tapasztalt hallásvédelem jelentőségét. Az eltérő genetikai háttérű egértörzsekhez hasonlóan az életkorral összefüggő halláscsökkenéshez vezető egyéni hajlam emberekben is megfigyelhető, amelynek háttérben szintén genetikai tényezők állnak (272-275). Ennek eredményeként terápiarezisztens és kezelésre reagáló betegek csoportjait különíthetjük el (129). Feltételezésünk szerint a selegilin otoprotektív hatását

a betegek egy adott alcsoportjában, az egyéni genetikai háttértől függően fejtheti ki (személyre szabott orvoslás).

Felmerül a kérdés, hogy milyen mechanizmusok állhatnak a selegilin otoprotektív hatásának hátterében. A selegilin neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns valamint dopamin lebomlást és visszavételt gátló hatásai az általunk alkalmazott 4 mg/kg dózisban érvényesülnek (276, 277). Feltételezésünk szerint ezen hatásai, különböző mértékben egyaránt hozzájárultak a hallásvédő hatás kialakulásához.

Ismeretes, hogy az OHC-k és az SGN-ek degenerációja az AHL egyik meghatározó patológiai tényezője (100). A DBA/2J törzs esetén ezen sejtek súlyos mértékű, életkorfüggő elvesztése már fiatal egerekben is megfigyelhető (100). Irodalmi adatok alapján az állatok hallásfunkciójának korai elvesztése nagy valószínűséggel az OHC-k korai degenerációjának eredménye (100). Ezzel szemben a BALB/c törzsrre a sejtek progrediáló pusztulása jellemző. Az SGN-ek elvesztése az állatok ~4 hónapos korában kezdődik és fokozatosan halad előre (100, 278, 279). Néhány hét elteltével a sejtek pusztulása a hallásküszöb emelkedésében is manifesztálódik. Az OHC-k elvesztése a cochlea bazális régiójában kezdődik az állatok 50 napos és 4 hónapos kora között. A cochlea középső régiójában a degradáció megjelenése csak az állatok 10 hónapos korában figyelhető meg, a bazális régiónál kisebb mértékben (100). Kísérleteinkben a selegilin 4 mg/kg-os dóziséval kezelt csoportban a hallásvesztés mértékének csökkenését 27 hetes kortól figyeltük meg a 8,2 illetve 16,4 kHz-es frekvenciákon. A védőhatás megjelenési ideje jól korrelál a BALB/c egértörzs SGN elvesztésének időbeli megjelenésével, másrészt a cochlea középső régióját érinti, ahol ebben az életkorban az SGN-ek pusztulása és nem az OHC-k károsodása a jellemző kóros folyamat. Ennek alapján feltételezzük, hogy a selegilin által kiváltott neuroprotekciónak az AHL elleni otoprotektív hatás egyik fő tényezője.

A selegilin antioxidáns hatása szintén hozzájárulhatott a hallásvédelem kialakulásához, amelynek hátterében többféle mechanizmus is állhat. A MAO enzimek által katalizált aminoxidáció egyik végterméke a H₂O₂, amely további ROS-ok képződése révén is citotoxikus reakciókat indukál (280). A selegilin a MAO enzim gátlásán keresztül mérsékelheti az oxidatív stresszt, ezáltal a citotoxikus folyamatokat. A nukleáris faktor-eritroid 2 kapcsolt faktor 2 (Nrf2) kiemelt szerepet játszik a sejtek redox

homeosztázisának fenntartásában (281). Ezen transzkripciós faktor csökkent expressziója szerepet játszik az AHL kialakulásában (281). A selegilin fokozza a Nrf2 nukleáris transzlokációját illetve az antioxidáns válaszelemhez (antioxidant response element; ARE) való kapcsolódását, ezáltal közvetve képes csökkenteni az oxidatív stressz mértékét (282).

A selegilin otoprotektív hatásában szerepet játszó további mechanizmus a DA felszabadulást fokozó hatása lehet. A glutamát túlzott mértékű felszabadulása az IHC-kből az SGN-ek IHC-vel képzett szinapszisának károsodásához, súlyosabb esetben a teljes ganglionsejt halálához vezet (34-36). Ezt az excitotoxikus túlaktivációt gátolja a LOC efferensekből felszabaduló DA. A LOC efferensek axodendritikus szinapsziszokat képeznek az SGN-eken és a glutamát posztzinaptikus hatását csökkentő DA felszabadítása révén védik az IHC-SGN szinapszist (35, 91, 102, 113, 283). Idősödő állatokban korábban megfigyelték a cochleáris dopaminerg rendszer életkorral összefüggő változását. Vicente-Torres és munkatársai a DA és az abból képződött metabolitok cochleáris koncentrációjának emelkedését írták le idősebb patkányokban, amely mint kompenzációs mechanizmus játszhat szerepet az I-es típusú neuronok életkorral összefüggő elvesztésével szemben (284). Ezen ismeretek alapján elméletileg minden olyan gyógyszer, amely fokozza a LOC-DA rendszer működését, potenciálisan otoprotektív (102, 112, 285). A selegilin a MAO enzim gátlásán keresztül befolyásolja a dopaminerg neuronális transzmissziót és fokozza a DA felszabadulását (286, 287). Polony és munkatársai kimutatták, hogy a rasagilin - a selegilin rokon vegyülete (212) - a DA metabolizmus és felvétel gátlásával fokozta a DA felszabadulását a LOC terminálisokból egér cochlearis preparátumban és mérsékelte az aminoglikozid antibiotikum által kiváltott halláskárosodást (102). Ezen túlmenően a DA-receptorok érzékenysége selegilin kezelés hatására nem változik (288), amely magyarázatként szolgálhat a hosszú távú selegilin kezelés mellett is fennmaradt hallásvédelemre.

A selegilin jól ismert hatásai mellett a vegyület immunrendszerre kifejtett hatása szintén hozzájárulhatott az AHL-lel szemben mutatott védőhatásához. Az AHL kialakulásának hátterében álló, eddig kevésbé feltárt mechanizmus az életkorral összefüggő krónikus, alacsony szintű steril gyulladás („inflammaging”) (289). Ennek során a szervezet egyre kevésbé képes a proinflammatorikus proteinek termelésének szabályozására, esetleges down-regulációjára valamint az elpusztult sejtek hatékony

eliminációjára. A folyamat végső soron a proinflammatorikus fehérjék illetve sejttörmelékek felhalmozódásához vezet (290, 291). Feltételezésünk szerint a selegilin többek között a citokin termelés befolyásolása, az oxidatív stressz mérséklése, a MAO-B gátlása illetve a DA szint emelése révén szerepet játszhat a belsőfül immundiszfunkciója következtében fellépő károsodás mérséklésében. A selegilin fokozza a természetes ölüsejtek termelését, befolyásolja a citokinek bioszintézisét (213, 214). Ennek révén segítheti a krónikus gyulladás során felhalmozódott sejttörtemelék eltávolítását. A gyulladásos reakciók modulálásának egyik fontos tényezője az oxidatív stressz. Redox-egyensúlyban az immunválasz mint védekezési mechanizmus lép fel. A redox-egyensúly felborulása során az immunrendszert moduláló jelátviteli utak megváltoznak, ami az immunválasz szabályozási zavarához, a proinflammatorikus válaszok túlsúlyához vezet (292). Ezek alapján a selegilin az oxidatív stressz csökkentése révén képes mérsékelni a fokozott ROS képződés okozta gyulladást (293). Az aminok MAO enzim által közvetített lebontásakor H_2O_2 (280), aldehidek és ammónium képződnek. Ezen metabolikus végtermékek mindegyike képes gyulladásos folyamatok indukálására (216). A selegilin a MAO-B enzim gátlásával csökkentheti ezen metabolitok képződését, ezáltal mérsékelheti az általuk kiváltott gyulladást. A DA mint neurotranszmitter szerepet játszik az immunfolyamatok szabályozásában. Receptorai valamennyi immunsejt alpopuláción megtalálhatók, amelyek révén részt vesz ezen sejtek aktivációjának, proliferációjának és citokintermelésének modulálásában (217, 294). Képes a nyugvó T-sejtek aktiválására, a stimulált T-sejtek működésének gátlására (295) valamint a D1 receptoron keresztül gátolja az NLRP3 inflammaszóma aktivációt (217). Az NLRP3 expressziója az életkor előrehaladtával fokozódik a cochleában, amely folyamat szerepet játszik az AHL kialakulásában (296). Ezen irodalmi adatok alapján a selegilin a DA szint emelésén keresztül csökkentheti az NLRP3 inflammaszóma által okozott IL-1 β és IL-18 proinflammatorikus citokinek termelését (289), ezáltal az általuk kiváltott gyulladásos folyamatokat.

7.1.2. *A krónikus selegilin kezelés hatása a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsek folyadékfogyasztására, testsúlyára és élettartamára*

A selegilin amellet, hogy mérsékelte a BALB/c egértörzs életkorral kialakuló hallásvesztését, nem várt hatásként befolyásolta ezen törzs folyadékfogyasztását illetve súlygyarapodását.

A krónikus kísérlet során a selegilint per os formában, az ivóvízben oldva adagoltuk. Egy gyógyszer alkalmazásának ezen módja számos előnnyel jár. Amellet, hogy kiküszöböli a napi parenterális injekciók illetve gavage okozta stresszt, csökkenti a fertőzések kockázatát. Ezen túlmenően ez a leggyakoribb humán adagolási mód a klinikumban (297, 298). Számos korábbi tanulmányban a selegilint ilyen módon alkalmazva nem tapasztaltak változást az állatok folyadékfogyasztásában (299-301) és megfelelő adásmódnak bizonyult. Kísérleteinkben, az irodalommal ellentétben, a selegilin ivóvízben történő adagolása a BALB/c egereknél koncentrációfüggő módon csökkentette a folyadékfogyasztás mértékét. Ennek következtében jelentősen csökkentenünk kellett az ivóvizük selegilin tartalmát, amelynek eredményeként a tervezett 15 illetve 45 mg/kg dózisok helyett a megivott dózis csak 4 mg/kg volt. A BALB/c törzssel szemben a DBA/2J egerek vízfogyasztását nem befolyásolta az ivóvíz selegilin tartalma. Felmerült bennünk a kérdés, vajon mi állhat a selegilin ezen törzsfüggő hatásának hátterében. Kachele és munkatársai egy ízpreferencia kísérlet eredményeként leírták, hogy a BALB/c6NCrIBL altörzs a magasabb moláris koncentrációjú NaCl, citromsav valamint kinin HCl oldatok iránt csökkent preferenciát mutat (260). Boughter és munkatársai megfigyelték a BALB/cBy egerek keserű ízzel szemben mutatott érzékenységet, amelynek hátterében elsősorban genetikai tényezők állnak (302). A National Toxicology Program jelentésében a BALB/c egerek csökkent folyadékfogyasztását a folyadék ízéhez társították (303). Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a BALB/c egerek csökkent folyadékfogyasztása a törzs speciális ízpreferenciájával függött össze, vagyis ez a törzs nem szereti a selegilin-HCl ízt.

A selegilinnel kezelt BALB/c csoportokban a folyadékfogyasztás mellett az állatok testtömege is elmaradt a kontroll csoporttól, de így is az altörzsre jellemző normál súlytartományon belül maradt, annak alsó határán mozgott (256). A súlygyarapodás mértékének csökkenése összefüggést mutatott az ivóvíz selegilin koncentrációjával. Feltételezésünk szerint a súlygyarapodás csökkenésének hátterében a csökkent vízfelvétel állt és nem egy, a selegilin által okozott súlycsökkentő mechanizmus érvényesült.

Kísérletünkben a 4 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt BALB/c csoportok folyadékfogyasztásának csökkenése már a súlygyarapodás csökkenésének megkezdése előtt jelentkezett. Ez alátámaszthatja azt a hipotézist, miszerint a súlygyarapodás csökkenése a csökkent vízfelvételt kompenzáló csökkent táplálékfogyasztás következménye lehet. A csökkentett táplálékbevitel a szervezet védekező válasza a szervezet folyadékgyensúlyának védelmére (304).

A folyadékfogyasztásra illetve testúlyra gyakorolt hatásaival szemben a selegilinnel az állatok élettartamára kifejtett hatása összecsengett az irodalommal. Kísérletünk során a selegilin egyik egértörzsben sem befolyásolta jelentősen az állatok túlélési valószínűségét. Habár a krónikus selegilin kezelés élettartam-hosszabbító hatását patkányokon, hörcsögökön illetve kutyákon végzett kísérletekben már leírták, egerek esetében a vegyület ezen hatása számos esetben nem volt kimutatható (300, 305).

7.1.3. A csökkent kalóriabevitel mint limitáló tényező

A BALB/c egértörzs 4 mg/kg dózisú selegilinnel kezelt csoportjának csökkent súlygyarapodása egy, a selegilintől független otoprotektív faktor lehetséges szerepét veti fel. A csökkentett kalóriabevitelt mint az AHL kialakulását befolyásoló tényezőt már több kísérletben vizsgálták. Habár korábban beszámoltak arról, hogy a kalóriakorlátozás (caloric restriction, CR) csökkentheti az AHL súlyosságát (306, 307), számos ellentmondásos kutatási eredmény született ebben a témában. Sweet és munkatársai kísérleteiben a CR enyhítette az AHL progresszióját CBA/J egerekben, de csak abban az esetben, mikor a CR a hallórendszer degenerációjának kezdeti fázisában történt (308). Kenneth R. Henry a diétás megszorítás (dietary restriction, DR) AHL-re kifejtett hatását vizsgálta különböző beltenyésztett egértörzsekben (309). Az AKR egértörzsben a DR nem befolyásolta sem az állatok élettartamát, sem az AHL progresszióját. Ezzel szemben a diétán tartott AU/Ss egerek tovább éltek és kevésbé súlyos fokú AHL-t mutattak, mint a kontroll csoport állatai. Eredményei alapján Henry arra a következtetésre jutott, hogy a cochleáris funkció és a DR közötti kapcsolat genotípusfüggő. A Willott és munkatársai által végzett kísérletekben a CR-nek az életkorral összefüggő cochleáris degenerációra kifejtett kedvező hatása, ha egyáltalán megfigyelhető volt, szintén genotípusfüggést mutatott (310). Vizsgálataik során a CR a BALB/c egértörzs BALB/cByJ altörzsében nem bizonyult védőhatásúnak.

Habár nem zárhatjuk ki teljesen a CR szerepét a kísérletünk során megfigyelt hallásvédelemben, a szakirodalomban található ellentmondásos eredmények, továbbá a kísérletünkben megfigyelhető hallásvédelem megjelenésének és súlygyarapodás csökkenésének időbelisége (a súlygyarapodás mérséklődése jóval megelőzte a protektív hatást) nem támasztja alá a CR lehetséges otoprotektív szerepét. Ezenkívül számos tanulmány kimutatta, hogy a selegilinnel kezelt állatok testtömegének változása, esetenként csökkenése, nem járult hozzá a vegyület pozitív hatásához (300, 311-313).

7.2. A PD-1 gátló immunterápia potenciális ototoxikus hatásának vizsgálata

Az immunsejtek (pl. rezidens makrofágok, infiltráló monociták) (162, 164, 192) cochleáris jelenléte alapvetően hozzájárul a belsőfül egészséges működésének fenntartásához, túlzott aktiválódásuk azonban a cochleáris szövetek károsodáshoz és halláskárosodás kialakulásához vezethet (156, 157, 162, 163, 314-316). A klinikumban alkalmazott bizonyos gyógyszerek (pl. daganatellenes platinavegyületek, aminoglikozid antibiotikumok) – hasonlóan a cochleáris öregedéshez és a zajexpozícióhoz – gyulladást indukálnak (103, 155, 166, 172, 191, 198, 200-203), amely folyamat hozzájárul az általuk okozott SNHL kialakulásához. A daganatellenes immunellenőrzőpont-gátló PD1 inhibitorok immunstimuláló hatása, továbbá az alkalmazásukkal összefüggésben kialakult halláskárosodást leíró néhány esettanulmány és vigilancia jelentések alapján feltételeztük, hogy ezen vegyületek az immunrendszer túlzott aktiválásán keresztül potenciális halláskárosító mellékhatással is rendelkezhetnek (231, 233, 235).

A PD-1 gátló immunterápia lehetséges ototoxikus hatásának vizsgálatához a C57BL/6J egértörzset választottuk. A törzs hajlamos a DIHL kialakulására, ennek következtében az ototoxikus kísérletek gyakori modellállata (101, 317-320). Ezen túlmenően az ICI-k különböző szervekre gyakorolt hatásmechanizmusát illetve lehetséges toxikus hatását sok esetben szintén C57BL/6J egereken vizsgálták (244, 321-323).

7.2.1. A PD-1 gátló immunterápia hallásra gyakorolt hatása és annak hátterében álló lehetséges mechanizmusok

Kísérletünkben a 4 hétig tartó PD-1 gátló kezelés nem befolyásolta az állatok hallásfunkcióját az általunk vizsgált 4-32 kHz-es frekvenciatartományban. Ezen

eredményünket, amely szerint a daganatellenes PD-1 gátló immunterápia – a várt halláskárosítással ellentétben – nem befolyásolta a hallásküszöböt, az SGN-ek vizsgálatával kapcsolatban nyert adataink is alátámasztják. A belsőfülben zajló fokozott immunaktivitás összefüggésben állhat a SGN-ek károsodásával, amely neuronok pusztulása rendszerint hallásküszöb emelkedéshez vezet (2, 150, 158, 324). Kísérletünkben az immunstimuláló PD-1 gátló terápia egyik vizsgált cochlea régióban sem befolyásolta a SGN-ek számát illetve struktúráját. Ezen, ellenőrzött körülmények között, izotípus kontrollal és objektív audiometriával végzett kísérleteink arra utalnak, hogy az onkológiai gyakorlatban egyre kiterjedtebben alkalmazott daganatellenes PD-1 gátló kezelés esetében – szemben a gyógyszer bőr, tápcsatorna, máj, tüdő, endokrin szervek elleni autoimmun reakcióival – halláskárosító mellékhatástól a beszédértés frekvenciatartományában nem kell tartani.

A Corti-féle szerv apikális illetve középső szakaszain (<32 kHz) a szőrsejtek számának tekintetében szintén nem találtunk eltérést a kezelési csoportok között. Ezzel szemben a cochlea bázisán a PD-1 gátló antitesttel kezelt csoport OHC száma meghaladta az izotípus kontroll csoportét. A C57BL/6J törzs, hasonlóan a BALB/c illetve a DBA/2J egértörzsekhez, az AHL egyik egérmodellje és az életkorral összefüggő halláskárosodást mutat. Az OHC-k pusztulása illetve a hallásfunkció romlása a cochlea bazális részén kezdődik – a magas frekvenciákat érintve – és fokozatosan terjed az apikális régió felé (267, 325). A bazális szakaszon az állatok 3 hónapos korára az OHC pusztulás mértéke közel 100% (325). Az IHC-k elvesztése később kezdődik és lassabb progressziót mutat (60). Ezen ismeretek alapján a PD-1 inhibíció az életkorral összefüggő OHC veszteség ellen nyújthatott védelmet a cochlea bazális régiójában (<32 kHz). A szőrsejtvédelem rendszerint megmutatkozik a hallásküszöb értékekben is, azonban az általunk tapasztalt védőhatás funkcionálisan nem nyilvánulhatott meg. Ennek oka, hogy a vizsgált egértörzs ebben az életkorban már fokozott hallásküszöb emelkedést mutat a magas frekvenciákon (<32 kHz) (116, 326, 327), megnehezítve a kezelési csoportok közötti különbségek kimutatását, ezért a funkcionális méréseket ezen érintett frekvenciák alatti tartományban végeztük (4-32 kHz).

A bazális régióban az OHC-k száma mellett az Iba1-pozitív makrofágok száma is meghaladta az izotípus kontroll csoportét. Frye és munkatársai C57BL/6J egerekben megfigyelték, hogy a BM makrofágjainak száma illetve morfológiája az életkor

előrehaladtával változik és ez kapcsolatban áll a cochleában található szőrsejtek károsodásának mértékével (192). A cochlea bazális régiójában a makrofágok száma az életkor előrehaladtával csökken. Ez a csökkenés már az állatok 3-5 hónapos korában is megfigyelhető (192). Ezen ismeretek alapján elképzelhető, hogy a PD-1 gátló kezelés a bazális kanyarulatban nem fokozta a makrofágok számát, hanem mérsékelte azok életkorral járó csökkenését.

Feltételezésünk szerint a progresszív OHC pusztulás mérséklése a fokozott/megtartott makrofágaktivitás eredménye, amelynek hátterében hasonló mechanizmusok állhatnak, mint amelyek az Alzheimer-kór egérmódeljében is csökkentették a patológiás folyamatokat és javították a memóriát PD-1 gátló terápiát követően. Az AHL kialakulásának hátterében álló krónikus, alacsony szintű steril gyulladás (289) során sérül a proinflammatorikus proteinek down-regulációjának szabályozása valamint az elpusztult sejtek hatékony eliminációja, amely folyamat a sejtörmelékek felhalmozódásához vezet (290, 291). Alzheimer-kórban az amiloid- β ($A\beta$) felhalmozódás az immunrendszer krónikus stimulációját eredményezi, elindítva egy ördögi kört: egyes citokinek, mint az IL1- β , IL-6 és TNF- α fokozzák a β -amyloid prekursor fehérje és $A\beta$ peptidek szintézisét, amelyek tovább serkentik az immunaktivációt (328). A PD-1 jelátviteli útvonal gátlásával szisztémásan fokozódik az IFN- γ -függő immunválasz, amely segíti a monocita eredetű makrofágok bejutását az agyba, ezáltal fokozza az $A\beta$ plakkok eliminációját (329-331). Az általunk megfigyelt, a PD-1 gátló kezelés hatására a cochlea bázisán kialakult OHC védelem, tekintettel az itt megfigyelt emelkedett/megtartott makrofágszámra, egy hasonló mechanizmus következménye lehet. A stimulált immunválasz segítheti a felgyülemlett sejtörmélek eliminációját, ezáltal csökkentve a krónikus gyulladást, amelynek eredménye a Corti-féle szerv sejtjeinek védelme.

7.2.2. A PD-1 gátló immunterápia hallásra gyakorolt hatásával kapcsolatos eredményeink összehasonlítása az irodalommal

Kísérletünkben a 4 hétig tartó PD-1 gátló kezelés nem befolyásolta sem az állatok hallásfunkcióját az általunk vizsgált 4-32 kHz-es frekvenciatartományban, sem az IHC-k illetve OHC-k számát az apikális és középső cochleáris kanyarulatokban (<32 kHz). Ezen eredményeink összhangban állnak a Spielbauer és munkatársai által korábban leírtakkal.

Az általuk vizsgált frekvenciatartományokban (hallásfunkció: 8-40 kHz; szőrsejtszám: 8-32 kHz) a PD-1 gátló monoterápia nem befolyásolta sem a hallásküszöböt, sem a szőrsejtek számát (332). Munkacsoportunkkal ellentétben azonban ők egyáltalán nem vizsgálták a PD-1-gátló kezelés hatását az SGN-ekre és a cochleáris immunválaszra (pl. makrofág-aktiváció), ill. a bazális régió szőrsejtjeire (>32 kHz). Ezenfelül nem használtak izotípus antitesttel kezelt kontroll csoportot sem. Kuzucu és munkatársai enyhe, átmeneti hallásküszöb emelkedést továbbá az OHC-k mérsékelt pusztulását figyelték meg PD-1 gátló kezelést követően (333). Azonban fontos figyelembe vennünk, hogy a szőrsejtszám meghatározására alkalmazott vizsgálati módszerük eredménye egyszerű megtekintésen és nem kvantitatív adatokon vagy a cochleogram módszeréhez hasonló standard metodikákon alapul (146, 149, 334), mindemellett figyelmen kívül hagyták a Corti-féle szerv tonotopikus elrendeződését is.

Az említett publikációkkal szemben munkacsoportunk a PD-1 inhibitor monoterápia és hallás kapcsolatának átfogóbb vizsgálatát végezte. Kísérletünk magába foglalta a Corti-féle szerv teljes hosszának, a SGN-eknek továbbá a cochlea makrofágjainak vizsgálatát is az irodalomban széles körben elterjedt kvantitatív módszerek alkalmazásával. Tudomásunk szerint az ICI terápia SGN-ekre illetve cochleáris makrofágokra gyakorolt hatását még nem vizsgálták. Mindemellett az irodalomban nem találtunk adatot az ICI-k bazális szőrsejtekre (>32 kHz) kifejtett hatásáról sem, amelyekkel eredményeinket összevethetnénk.

A klinikai adatokat tekintve funkcionális hallásküszöbmérésünk eredménye ellentétben áll a PD-1 gátló immunterápia lehetséges ototoxikus hatását leíró esettanulmányokkal (231, 233, 235), továbbá az FDA és az EudraVigilance adatbázisokban szereplő, a PD-1 gátlókkal összefüggésbe hozható halláskárosodásokról szóló bejelentésekkel. Ezek a jelentések azonban nem állapítanak meg tényleges ok-okozati összefüggést a kezelés és a tünetek kialakulása között. A PD-1 gátlók audiovesztibuláris rendszerre gyakorolt hatását vizsgáló átfogó klinikai vizsgálatokat még nem végeztek.

7.3. Kutatási eredményeink jelentősége

Kutatásunk középpontjában két olyan vegyület állt, amelyek hatásmechanizmusuk – különös tekintettel az immunrendszerre kifejtett hatásuk – alapján befolyásolhatják a különböző típusú SNHL-ok kialakulását.

Munkacsoportunkkal kimutattuk, hogy a krónikus, orális formában alkalmazott selegilin kezelés nem befolyásolta a DBA/2J egerek hallásfunkcióját, a BALB/c egértörzs esetén azonban mérsékelte az AHL progresszióját. A BALB/c törzsben mutatott hallásvédelem a selegilin neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns, DA neurotranszmissziót fokozó (LOC) továbbá immunrendszert befolyásoló hatásával egyaránt magyarázható, azonban teljes biztonsággal nem zárhatjuk ki a kezelt állatoknál tapasztalt – azonban az altörzsre jellemző normál súlygyarapodás tartományába illeszkedő – mérsékelt testsúlygyarapodás/csökkent kalóriabevitel esetleges otoprotektív hatását. A két egértörzs vizsgálatok kapott hatáskülönbség azt mutatja, hogy a selegilin védőhatása a genetikai háttér függvénye. Eredményeink klinikai alkalmazhatóságát tekintve azt mondhatjuk, hogy a krónikus selegilin kezelés alkalmas terápia lehet a humán AHL bizonyos formáiban, figyelembe véve az egyéni genetikai hajlamot (személyre szabott orvoslás).

Annak ellenére, hogy az immunrendszer túlzott aktivációja szerepet játszik az SNHL különböző formáinak patológiájában, eredményeink nem igazolták a PD-1 inhibitorok feltételezett audiovesztibuláris mellékhatásait. A PD-1 gátló terápia kísérletünkben nem befolyásolta a belsőfül struktúrális és funkcionális integritását a legrelevánsabb frekvenciatartományban (4-32 kHz). Meglepő módon a cochlea bazális kanyarulatában (>32 kHz) az öregedéssel összefüggő szörsejtpusztulás mérséklődését tapasztaltuk, emelkedett/megtartott makrofágszám mellett. Kontrollált körülmények között, objektív módszerekkel végzett vizsgálatunk hasznos információt szolgáltat a klinikai gyakorlat számára is: a számos szervben autoimmun reakción alapuló mellékhatásokat kiváltó daganatellenes PD-1 terápia alkalmazásakor halláskárosodásra nem kell számítanunk. A bazális régióban tapasztalt emelkedett/megtartott makrofágszám és az ezzel párhuzamosan megjelenő védelem az időskori OHC pusztulással szemben pedig további kutatások alapjául szolgálhat: izgalmas kérdés ugyanis, hogy az immunrendszer aktivitásának enyhe növelése valóban mérsékelheti-e az időskori hallásvesztést, amelynek hátterében gyulladásozó folyamatok is szerepet játszanak.

Kísérleti eredményeink egyúttal rámutatnak az immunválasz és az immunfarmakoterápia Janus arcára is: habár túlaktiválódása esetén az immunválasz károsodásokat okozhat, kontrollált formában, mérsékelt aktivitás esetén védelmi szerepet tölthet be.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori értekezésemmel kapcsolatos munkám során egyrészt megvizsgáltuk, hogy a neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező, továbbá az immunfolyamatokat is befolyásoló selegilin rendelkezik-e hallásvédő hatással a leggyakoribb SNHL forma, az AHL egérmodelljében. Másrészt feltérképeztük, hogy a korábbi vigilancia jelentések és három esettanulmány alapján mellékhatásként hallásromlást is mutató, az immunrendszer fokozott aktivitását eredményező daganatellenes PD-1 gátló immunterápia befolyásolja-e a hallásfunkciót illetve a belfül sejtjeinek integritását.

A selegilin hallásra kifejtett hatásának vizsgálatával kapcsolatos eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- 1) A krónikus selegilin kezelés a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákon (8-16 kHz), alacsonyabb dózisokban (0,15 és 1,5 mg/kg) alkalmazva, nem befolyásolta az AHL kialakulását egyik általunk vizsgált egértörzsben sem.
- 2) Kimutattuk, hogy a krónikus selegilin kezelés a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákon (8-16 kHz), 4 mg/kg dózisban alkalmazva, csökkentette az AHL kialakulását az AHL-re mérsékelten érzékeny BALB/c egértörzsben. Ezzel szemben az AHL-re fokozottan érzékeny DBA/2J egértörzsben a selegilin magasabb (15 és 45 mg/kg) dózisokban alkalmazva sem mutatott hallásvédő hatást. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a selegilin presbycusis progressziót mérséklő hatását a genetikai háttér is befolyásolja.
- 3) A selegilin egyik dózisban alkalmazva sem befolyásolta jelentősen az állatok élettartamát.

A daganatellenes PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatásának vizsgálatával kapcsolatos eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- 1) A PD-1 gátló kezelés – a feltételezett ototoxikus hatással szemben - nem befolyásolta a hallásfunkciót a PD-1 gátlás egyéb szerveket érintő mellékhatásaira korábban érzékenynek bizonyult C57BL/6J egerekben.
- 2) A PD-1 gátló kezelés nem befolyásolta a szőrsejtek számát a cochlea apikális és középső kanyarulataiban, ezzel szemben a bazális kanyarulatban (magas hangok) a külső szőrsejtekre irányuló védőhatást mutatott.
- 3) A PD-1 gátló kezelés nem befolyásolta a cochlea spirális ganglionsejtjeinek számát illetve morfológiáját.
- 4) A PD-1 gátló kezelés a cochlea bazális kanyarulatában fokozta a makrofágok számát/gátolta azok életkorral járó csökkenését.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A szenzorineurális halláskárosodás (SNHL) korunk népbetegsége, hatékony gyógyszeres terápiája azonban nem megoldott. Ennek következtében kiemelkedő jelentőséggel bír mind a hallásvédő vegyületek keresése, mind az esetlegesen ototoxikus faktorok ismerete. Amíg a neuroprotektív, antioxidáns vagy antiapoptotikus vegyületek feltételezhetően otoprotektívek, az immunrendszer működését befolyásoló gyógyszerek alkalmazásakor akár hallásvédő, akár ototoxikus hatás is várható.

Célunk olyan vegyületek vizsgálata volt, amelyek hatásmechanizmusuk – különös tekintettel az immunrendszerre kifejtett hatásuk – alapján befolyásolhatják az SNHL-ek kialakulását. Egyrészt megvizsgáltuk a több támadáspontú selegilin különböző dózisainak (0,15; 1,5; 4; 15 és 45 mg/kg) lehetséges hallásvédő hatását a leggyakoribb SNHL forma, a presbycusis (AHL) két egérmódeljében. Másrészt feltérképeztük a potenciálisan ototoxikus PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatását.

In vivo vizsgálataink során a hallásfunkció meghatározását az auditoros agytörzsi kiváltott válasz módszerrel végeztük. A PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatásának feltérképezését további *in vitro* módszerekkel egészítettük ki, amelyek során a külső és belső szőrsejtek valamint a spirális ganglionsejtek épségét, továbbá a cochleáris makrofágok számát vizsgáltuk.

Kimutattuk, hogy a krónikus, egy évig tartó selegilin kezelés 4 mg/kg dózisban csökkentette az AHL progresszióját a BALB/c egértörzsben, a DBA/2J törzs hallásfunkciójára azonban nem volt hatással. A PD-1 gátló terápia nem befolyásolta a belsőfül strukturális és funkcionális integritását a 4-32 kHz frekvenciatartományban. Meglepő módon a cochlea bázisán (>32 kHz) az öregedéssel összefüggő külső szőrsejtpusztulás mérséklődött, magasabb makrofágszám mellett.

A selegilinnel kapcsolatos eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a krónikus selegilin kezelés alkalmas terápia lehet a humán AHL bizonyos genetikai hátterű formáiban. A daganatellenes PD-1 gátló kezelés vizsgálatakor kapott eredményeink hozzájárulnak az immunellenőrzőpont gátlókkal kapcsolatos otológiai ismeretek bővítéséhez, a bazális régióban megjelenő szőrsejt védelem pedig további kutatások alapjául szolgálhat. Kísérleti eredményeink egyúttal rámutattak az immunrendszer Janus arcára is: túlaktiválódása károsodásokat okozhat, kontrollált formában azonban védelmi szerepet tölthet be, a hallószervben is.

10. SUMMARY

Sensorineural hearing losses (SNHLs) are among the most frequent sensory deficits but they lack effective pharmacotherapy. Screening of potentially otoprotective drug candidates and the knowledge of potentially ototoxic factors are of paramount importance. While neuroprotective, antioxidant or antiapoptotic compounds are presumed to be otoprotective, drugs that affect the immune system could contribute to either hearing loss or protection.

Our aim was to perform an investigation of compounds which may influence the development of SNHLs based on their mechanism of action – especially on the immune system. We have investigated the otoprotective potential of different doses of selegiline (0,15; 1,5; 4; 15 és 45 mg/kg) against age-related hearing loss (AHL) on ageing BALB/c and DBA/2J mice. On the other hand, we have examined the ototoxic (side) effect of anti-PD-1 antibody treatment on hearing in C57BL/6J mice.

In our *in vivo* studies, auditory brainstem response measurements were performed to test auditory function. After anti-PD-1 antibody treatment, additional *in vitro* methods were used to examine the integrity of outer and inner hair cells (OHCs and IHCs), spiral ganglion neurons, as well as the number of cochlear macrophages.

In BALB/c mice, chronic 4 mg/kg selegiline treatment (1 year) significantly mitigated the progression of AHL. In contrast, the protective effect of selegiline could not be observed in DBA/2J mice. Anti-PD-1 antibody therapy did not affect the functional and morphological integrity of the inner ear at 4–32 kHz (apical-middle turns), but a noticeable preservation of OHCs and an increase in the number of macrophages appeared in the basal part of the cochlea (>32 kHz).

We conclude that chronic selegiline treatment seems to be a reasonable therapy in certain types of human AHL, taking into account individual genetic predisposition. Our results related to anti-PD-1 antibody treatment have contributed to our knowledge of the effect of immune checkpoint inhibitors on hearing. Furthermore, the preservation of OHCs in the basal part of the cochlea might induce further investigations in this research field. Our findings also demonstrate the Janus face of immuno-pharmacotherapy.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Sziklai I. A fül anatómiája, élettana. In: Répássy G (szerk.), Fül-orr-gégészeti fejnagysebészet. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2011: 25-39.
2. Köles L, Szepesy J, Berekméri E, Zelles T. (2019) Purinergic Signaling and Cochlear Injury-Targeting the Immune System? *International journal of molecular sciences*, 20: 2979.
3. World Health O. Deafness and hearing loss. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>. 2021.
4. Mathers CD, Loncar D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, 3: 2011-2030.
5. Gregg RB, Wiorek LS, Arvedson JC. (2004) Pediatric audiology: a review. *Pediatrics in review*, 25: 224-234.
6. Goldenberg D, Goldstein B. Audiology. In: Goldenberg D, Goldstein B (szerk.), *Handbook of Otolaryngology, Head and Neck Surgery*. Thieme Medical Publishers, New York, 2011: 149–159.
7. Gopinath B, Rochtchina E, Wang JJ, Schneider J, Leeder SR, Mitchell P. (2009) Prevalence of age-related hearing loss in older adults: Blue Mountains Study. *Archives of internal medicine*, 169: 415-416.
8. Sheffield AM, Smith RJH. (2019) The Epidemiology of Deafness. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9.
9. Peelle JE, Wingfield A. (2016) The Neural Consequences of Age-Related Hearing Loss. *Trends in neurosciences*, 39: 486-497.
10. Dalton DS, Cruickshanks KJ, Klein BE, Klein R, Wiley TL, Nondahl DM. (2003) The impact of hearing loss on quality of life in older adults. *The Gerontologist*, 43: 661-668.
11. Gates GA, Mills JH. (2005) Presbycusis. *Lancet*, 366: 1111-1120.
12. Van Eyken E, Van Camp G, Van Laer L. (2007) The complexity of age-related hearing impairment: contributing environmental and genetic factors. *Audiology & neuro-otology*, 12: 345-358.
13. Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K. (2013) Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hearing research*, 303: 30-38.

14. Roberto M, Hamernik RP, Turrentine GA. (1989) Damage of the auditory system associated with acute blast trauma. *The Annals of otology, rhinology & laryngology. Supplement*, 98: 23-34.
15. Daniel E. (2007) Noise and hearing loss: a review. *The Journal of school health*, 77: 225-231.
16. Foglalkozás-orvostani Szakmai K. (2008) Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja A zaj okozta halláskárosodás megelőzéséről. *Egészségügyi Közlöny*: 2889-2894.
17. Liberman MC. (1987) Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hearing research*, 26: 65-88.
18. Henderson D, Hu B, Bielefeld E. Patterns and Mechanisms of Noise-Induced Cochlear Pathology. In: Schacht J, Popper AN, Rr F (szerk.), *Auditory Trauma, Protection, and Repair*. Springer US, Boston, MA, 2008: 195-217.
19. Hirose K, Liberman MC. (2003) Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 4: 339-352.
20. Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. (2002) Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hearing research*, 166: 62-71.
21. Thorne PR, Duncan CE, Gavin JB. (1986) The pathogenesis of stereocilia abnormalities in acoustic trauma. *Hearing research*, 21: 41-49.
22. Wang Y, Hirose K, Liberman MC. (2002) Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 3: 248-268.
23. Guthrie ONW. (2008) Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology*, 249: 91-96.
24. Wang S, Bian Q, Liu Z, Feng Y, Lian N, Chen H, Hu C, Dong Y, Cai Z. (1999) Capability of serum to convert streptomycin to cytotoxin in patients with aminoglycoside-induced hearing loss. *Hearing research*, 137: 1-7.
25. Xie J, Talaska AE, Schacht J. (2011) New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hearing research*, 281: 28-37.

26. Fee WE. (1980) Aminoglycoside ototoxicity in the human. *The Laryngoscope*, 90: 1-19.
27. Lerner SA, Schmitt BA, Seligsohn R, Matz GJ. (1986) Comparative study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. *The American journal of medicine*, 80: 98-104.
28. Moore RD, Smith CR, Lietman PS. (1984) Risk factors for the development of auditory toxicity in patients receiving aminoglycosides. *The Journal of infectious diseases*, 149: 23-30.
29. Duggal P, Sarkar M. (2007) Audiologic monitoring of multi-drug resistant tuberculosis patients on aminoglycoside treatment with long term follow-up. *BMC ear, nose, and throat disorders*, 7: 5.
30. de Groot J, Meeuwse F, Ruizendaal W, Veldman J. (1990) Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea. *Hearing research*, 50: 35-42.
31. Imamura S-I, Adams JC. (2003) Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 4: 176-195.
32. Schacht J, Talaska AE, Rybak LP. (2012) Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anatomical record (Hoboken)*, 295: 1837-1850.
33. Bernarding C, Hannemann R, Strauss DJ, Seidler H, Corona-Strauss FI. (2013) Neural correlates of listening effort related factors: influence of age and hearing impairment. *Brain research bulletin*, 91: 21-30.
34. Duan M, Agerman K, Ernfors P, Canlon B. (2000) Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7597-7602.
35. Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel J-L. (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hearing research*, 227: 19-27.
36. Tabuchi K, Nishimura B, Tanaka S, Hayashi K, Hirose Y, Hara A. (2010) Ischemia-reperfusion injury of the cochlea: pharmacological strategies for

- cochlear protection and implications of glutamate and reactive oxygen species. *Current neuropharmacology*, 8: 128-134.
37. Berglund A, Ryugo D. (1987) Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *The Journal of comparative neurology*, 255: 560-570.
 38. Eybalin M. (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiological reviews*, 73: 309-373.
 39. Puel JL. (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Progress in neurobiology*, 47: 449-476.
 40. Spoendlin H. The Innervation Of The Cochlear Receptor. In: MØLLer AR (szerk.), *Basic Mechanisms in Hearing*. Academic Press, New York, 1973: 185-234.
 41. Santos-Sacchi JR. Cochlear physiology. In: Jahn AF, Santos-Sacchi JR (szerk.), *Physiology of the Ear*. Raven Press, New York, 1988: 271-293.
 42. Sewell WF. Neurotransmitters and Synaptic Transmission. In: Dallos P, Popper AN, Fay RR (szerk.), *The Cochlea*. Springer, New York, 1996: 503-533.
 43. Wong AC, Ryan AF. (2015) Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Frontiers in aging neuroscience*, 7: 58.
 44. Pujol R, Puel JL. (1999) Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884: 249-254.
 45. Robertson D. (1983) Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hearing research*, 9: 263-278.
 46. Lynch ED, Kil J. (2005) Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. *Drug discovery today*, 10: 1291-1298.
 47. Mazurek B, Amarjargal N, Haupt H, Gross J. (2006) High potassium concentrations protect inner and outer hair cells in the newborn rat culture from ischemia-induced damage. *Hearing research*, 215: 31-38.
 48. Clerici W, Hensley K, DiMartino D, Butterfield D. (1996) Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hearing research*, 98: 116-124.
 49. Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A. (1995) Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *European archives of otorhinolaryngology*, 252: 504-508.

50. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dulbois-Dauphin M, Krause K-H. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *The Journal of biological chemistry*, 279: 46065-46072.
51. Krause K-H. (2007) Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Experimental gerontology*, 42: 256-262.
52. Fekete A, Vizi ES, Kovács KJ, Lendvai B, Zelles T. (2008) Layer-specific differences in reactive oxygen species levels after oxygen-glucose deprivation in acute hippocampal slices. *Free radical biology & medicine*, 44: 1010-1022.
53. Lipton P. (1999) Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*, 79: 1431-1568.
54. Fridberger A, Flock A, Ulfendahl M, Flock B. (1998) Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca²⁺ concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 7127-7132.
55. Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R. (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *The Journal of neuroscience*, 25: 7867-7875.
56. Le Prell CG, Yamashita D, Minami SB, Yamasoba T, Miller JM. (2007) Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention. *Hearing research*, 226: 22-43.
57. Ohinata Y, Miller JM, Schacht J. (2003) Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. *Brain research*, 966: 265-273.
58. Pickles JO. (2004) Mutation in mitochondrial DNA as a cause of presbycusis. *Audiology and Neuro-Otology*, 9: 23-33.
59. McFadden SL, Ding D, Reaume AG, Flood DG, Salvi RJ. (1999) Age-related cochlear hair cell loss is enhanced in mice lacking copper/zinc superoxide dismutase. *Neurobiology of aging*, 20: 1-8.
60. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS. (2000) Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 1: 243-254.

61. Wu J, Ye J, Kong W, Zhang S, Zheng Y. (2020) Programmed cell death pathways in hearing loss: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 53: e12915.
62. Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. (1999) Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiology & neuro-otology*, 4: 229-236.
63. Hoch I, Berens C, Westhof E, Schroeder R. (1998) Antibiotic inhibition of RNA catalysis: neomycin B binds to the catalytic core of the td group I intron displacing essential metal ions. *Journal of molecular biology*, 282: 557-569.
64. Jezowska-Bojczuk M, Karaczyn A, Kozłowski H. (1998) Copper(II) binding to tobramycin: potentiometric and spectroscopic studies. *Carbohydrate research*, 313: 265-269.
65. Hong SH, Park SK, Cho Y-S, Lee H-S, Kim KR, Kim MG, Chung W-H. (2006) Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. *Hearing research*, 211: 46-53.
66. Jiang H, Sha SH, Forge A, Schacht J. (2006) Caspase-independent pathways of hair cell death induced by kanamycin in vivo. *Cell death and differentiation*, 13: 20-30.
67. Otte J, Schunknecht HF, Kerr AG. (1978) Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation. *The Laryngoscope*, 88: 1231-1246.
68. Li J, Verkman AS. (2001) Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *The Journal of biological chemistry*, 276: 31233-31237.
69. Mikuriya T, Sugahara K, Sugimoto K, Fujimoto M, Takemoto T, Hashimoto M, Hirose Y, Shimogori H, Hayashida N, Inouye S, Nakai A, Yamashita H. (2008) Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. *Brain research*, 1212: 9-17.
70. Seeger K. (2009) Metabolic changes in autoimmune diseases. *Current drug discovery technologies*, 6: 256-261.
71. Schuknecht HF, Gacek MR. (1993) Cochlear pathology in presbycusis. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 102: 1-16.

72. Leitner MG, Halaszovich CR, Oliver D. (2011) Aminoglycosides inhibit KCNQ4 channels in cochlear outer hair cells via depletion of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate. *Molecular pharmacology*, 79: 51-60.
73. Konings A, Van Laer L, Michel S, Pawelczyk M, Carlsson P-I, Bondeson M-L, Rajkowska E, Dudarewicz A, Vandeveld A, Fransen E, Huyghe J, Borg E, Sliwinska-Kowalska M, Van Camp G. (2009) Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. *European journal of human genetics*, 17: 329-335.
74. Van Laer L, Carlsson P-I, Ottschytch N, Bondeson M-L, Konings A, Vandeveld A, Dieltjens N, Fransen E, Snyders D, Borg E, Raes A, Van Camp G. (2006) The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss. *Human mutation*, 27: 786-795.
75. Hultcrantz E. (1979) The effect of noise on cochlear blood flow in the conscious rabbit. *Acta physiologica Scandinavica*, 106: 29-37.
76. Stachler RJ, Chandrasekhar SS, Archer SM, Rosenfeld RM, Schwartz SR, Barrs DM, Brown SR, Fife TD, Ford P, Ganiats TG, Hollingsworth DB, Lewandowski CA, Montano JJ, Saunders JE, Tucci DL, Valente M, Warren BE, Yaremchuk KL, Robertson PJ, American Academy of Otolaryngology-Head and Neck S. (2012) Clinical practice guideline: sudden hearing loss. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 146: S1-35.
77. Chandrasekhar SS, Tsai Do BS, Schwartz SR, Bontempo LJ, Faucett EA, Finestone SA, Hollingsworth DB, Kelley DM, Kmucha ST, Moonis G, Poling GL, Roberts JK, Stachler RJ, Zeitler DM, Corrigan MD, Nnacheta LC, Satterfield L. (2019) Clinical Practice Guideline: Sudden Hearing Loss (Update). *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 161: S1-S45.
78. Labus J, Breil J, Stützer H, Michel O. (2010) Meta-analysis for the effect of medical therapy vs. placebo on recovery of idiopathic sudden hearing loss. *The Laryngoscope*, 120: 1863-1871.
79. Wei BPC, Mubiru S, O'Leary S. (2006) Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2013: CD003998.

80. Battaglia A, Burchette R, Cueva R. (2008) Combination therapy (intratympanic dexamethasone + high-dose prednisone taper) for the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otology & neurotology*, 29: 453-460.
81. Filipo R, Attanasio G, Russo FY, Viccaro M, Mancini P, Covelli E. (2013) Intratympanic steroid therapy in moderate sudden hearing loss: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. *The Laryngoscope*, 123: 774-778.
82. Han C-S, Park J-R, Boo S-H, Jo J-M, Park K-W, Lee W-Y, Ahn J-G, Kang M-K, Park B-G, Lee H. (2009) Clinical efficacy of initial intratympanic steroid treatment on sudden sensorineural hearing loss with diabetes. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 141: 572-578.
83. Sziklai I. A belső fül betegségei. In: Répássy G (szerk.), Fül-orr-gégészeti fej-nyak-sebészet. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011: 123-131.
84. Murphy-Lavoie HM, Mutluoglu M. Hyperbaric Treatment Of Sensorineural Hearing Loss. In: StatPearls. StatPearls Publishing, 2021.
85. Küstel M. A hallókészülék. In: Répássy G (szerk.), Fül-orr-gégészeti fej-nyak-sebészet. Medicina Kiadó Zrt, Budapest, 2011: 145-158.
86. Jóri J, Küstel M. Cochleáris Implantáció. In: Répássy G (szerk.), Fül-orr-gégészeti fej-nyak-sebészet. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2011: 161-164.
87. Kingwell K. (2016) First hearing-disorder drugs stumble. *Nature reviews. Drug discovery*, 15: 733-735.
88. Irving S, Gillespie L, Richardson R, Rowe D, Fallon JB, Wise AK. (2014) Electroacoustic stimulation: now and into the future. *BioMed research international*, 2014: 350504.
89. d'Aldin C, Eybalin M, Puel J, Charachon G, Ladrech S, Renard N, Pujol R. (1995) Synaptic connections and putative functions of the dopaminergic innervation of the guinea pig cochlea. *European archives of otorhinolaryngology*, 252: 270-274.
90. D'Aldin C, Puel J, Leducq R, Crambes O, Eybalin M, Pujol R. (1995) Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea. *Hearing research*, 90: 202-211.
91. 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. *Neurochemistry international*, 59: 150-158.

92. Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D. (1997) Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs. *Hearing research*, 107: 46-52.
93. Puel JL, Bobbin RP, Fallon M. (1988) An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hearing research*, 37: 65-69.
94. Pujol R, Puel JL, Gervais d'Aldin C, Eybalin M. (1993) Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta oto-laryngologica*, 113: 330-334.
95. Ohlemiller KK. (2019) Mouse methods and models for studies in hearing. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 146: 3668-3668.
96. Ohlemiller KK, Jones SM, Johnson KR. (2016) Application of Mouse Models to Research in Hearing and Balance. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*, 17: 493-523.
97. Steel KP, Bock GR. (1983) Hereditary inner-ear abnormalities in animals. Relationships with human abnormalities. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*, 109: 22-29.
98. Davis R, Newlander J, Ling X, Cortopassi G, Krieg E, Erway L. (2001) Genetic basis for susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hearing research*, 155: 82-90.
99. Johnson KR, Zheng QY, Erway LC. (2000) A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics*, 70: 171-180.
100. Willott JF, Turner JG, Carlson S, Ding D, Seegers Bross L, Falls WA. (1998) The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss. *Hearing research*, 115: 162-174.
101. Horvath L, Bächinger D, Honegger T, Bodmer D, Naldi AM. (2019) Functional and morphological analysis of different aminoglycoside treatment regimens inducing hearing loss in mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 18: 1123-1130.
102. Polony G, Humli V, Andó R, Aller M, Horváth T, Harnos A, Tamás L, Vizi ES, Zelles T. (2014) Protective effect of rasagiline in aminoglycoside ototoxicity. *Neuroscience*, 265: 263-273.

103. Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. (2001) Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hearing research*, 158: 165-178.
104. Nakagawa T. (2014) Strategies for developing novel therapeutics for sensorineural hearing loss. *Frontiers in pharmacology*, 5: 206.
105. Paulsen AJ, Cruickshanks KJ, Pinto A, Schubert CR, Dalton DS, Fischer ME, Klein BEK, Klein R, Tsai MY, Tweed TS. (2019) Neuroprotective factors and incident hearing impairment in the epidemiology of hearing loss study. *The Laryngoscope*, 129: 2178-2183.
106. Ruel J, Wang J, Pujol R, Hameg A, Dib M, Puel JL. (2005) Neuroprotective effect of riluzole in acute noise-induced hearing loss. *Neuroreport*, 16: 1087-1090.
107. Monge Naldi A, Belfrage C, Jain N, Wei ET, Canto Martorell B, Gassmann M, Vogel J. (2015) Neuronal erythropoietin overexpression protects mice against age-related hearing loss (presbycusis). *Neurobiology of aging*, 36: 3278-3287.
108. Liberman MC, Dodds LW, Pierce S. (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *The Journal of comparative neurology*, 301: 443-460.
109. Gil-Loyzaga PE. (1995) Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta oto-laryngologica*, 115: 222-226.
110. Gáborján A, Lendvai B, Vizi ES. (1999) Neurochemical evidence of dopamine release by lateral olivocochlear efferents and its presynaptic modulation in guinea-pig cochlea. *Neuroscience*, 90: 131-138.
111. Doleviczényi Z, Halmos G, Répássy G, Vizi ES, Zelles T, Lendvai B. (2005) Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission. *Neuroscience letters*, 385: 93-98.
112. Doleviczényi Z, Vizi ES, Gacsályi I, Pallagi K, Volk B, Hársing LG, Halmos G, Lendvai B, Zelles T. (2008) 5-HT_{6/7} receptor antagonists facilitate dopamine release in the cochlea via a GABAergic disinhibitory mechanism. *Neurochemical research*, 33: 2364-2372.
113. Halmos G, Doleviczényi Z, Répássy G, Kittel A, Vizi ES, Lendvai B, Zelles T. (2005) D₂ autoreceptor inhibition reveals oxygen-glucose deprivation-induced release of dopamine in guinea-pig cochlea. *Neuroscience*, 132: 801-809.

114. Halmos G, Horváth T, Polony G, Fekete A, Kittel A, Vizi ES, van der Laan BFAM, Zelles T, Lendvai B. (2008) The role of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in cochlear dopamine release. *Neuroscience*, 154: 796-803.
115. Garrett AR, Robertson D, Sellick PM, Mulders WHAM. (2011) The actions of dopamine receptors in the guinea pig cochlea. *Audiology and Neuro-Otology*, 16: 145-157.
116. Davis RR, Kuo M-W, Stanton SG, Canlon B, Krieg E, Alagramam KN. (2007) N-Acetyl L-cysteine does not protect against premature age-related hearing loss in C57BL/6J mice: a pilot study. *Hearing research*, 226: 203-208.
117. Seidman MD, Khan MJ, Tang WX, Quirk WS. (2002) Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 127: 138-144.
118. Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, Raphael Y, Miller JM. (1998) Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain research*, 784: 82-90.
119. Campbell K, Meech R, Klemens J, Gerberi M, Dyrstad S, Larsen D, Mitchell D, El-Azizi M, Verhulst S, Hughes L. (2007) Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. *Hearing research*, 226: 92-103.
120. Pourbakht A, Yamasoba T. (2003) Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hearing research*, 181: 100-108.
121. Seidman M, Babu S, Tang W, Naem E, Quirk WS. (2003) Effects of resveratrol on acoustic trauma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 129: 463-470.
122. McFadden SL, Woo JM, Michalak N, Ding D. (2005) Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hearing research*, 202: 200-208.
123. Fetoni AR, Piacentini R, Fiorita A, Paludetti G, Troiani D. (2009) Water-soluble Coenzyme Q10 formulation (Q-ter) promotes outer hair cell survival in a guinea pig model of noise induced hearing loss (NIHL). *Brain research*, 1257: 108-116.
124. Davis RR, Custer DA, Krieg E, Alagramam K. (2010) N-Acetyl L-Cysteine does not protect mouse ears from the effects of noise*. *Journal of occupational medicine and toxicology*, 5: 11.

125. Hamernik RP, Qiu W, Davis B. (2008) The effectiveness of N-acetyl-L-cysteine (L-NAC) in the prevention of severe noise-induced hearing loss. *Hearing research*, 239: 99-106.
126. Song BB, Schacht J. (1996) Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. *Hearing research*, 94: 87-93.
127. Song BB, Sha SH, Schacht J. (1998) Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo- and vestibulo-toxicity. *Free radical biology & medicine*, 25: 189-195.
128. Rybak LP, Whitworth CA. (2005) Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug discovery today*, 10: 1313-1321.
129. Wang J, Puel J-L. (2018) Toward Cochlear Therapies. *Physiological reviews*, 98: 2477-2522.
130. Shim HJ, Kang HH, Ahn JH, Chung JW. (2009) Retinoic acid applied after noise exposure can recover the noise-induced hearing loss in mice. *Acta otolaryngologica*, 129: 233-238.
131. Wang J, Ruel J, Ladrech S, Bonny C, van de Water TR, Puel J-L. (2007) Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial cell death pathway restores auditory function in sound-exposed animals. *Molecular pharmacology*, 71: 654-666.
132. Yang L, Zhang H, Han X, Zhao X, Hu F, Li P, Xie G, Gao L, Cheng L, Song X, Han F. (2015) Attenuation of hearing loss in DBA/2J mice by anti-apoptotic treatment. *Hearing research*, 327: 109-116.
133. Yuan H, Wang X, Hill K, Chen J, Lemasters J, Yang S-M, Sha S-H. (2015) Autophagy attenuates noise-induced hearing loss by reducing oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 22: 1308-1324.
134. Salmon AB. (2015) About-face on the metabolic side effects of rapamycin. *Oncotarget*, 6: 2585-2586.
135. Cesana B, Biganzoli E. (2018) Phase IV Studies: Some Insights, Clarifications, and Issues. *Current clinical pharmacology*, 13: 14-20.
136. Lord SG. (2019) Monitoring Protocols for Cochlear Toxicity. *Seminars in hearing*, 40: 122-143.

137. Tanaka M, Hasegawa S, Nakao S, Shimada K, Mukai R, Matsumoto K, Nakamura M. (2019) Analysis of drug-induced hearing loss by using a spontaneous reporting system database. *PloS one*, 14: e0217951.
138. Laurell G. (2019) Pharmacological intervention in the field of ototoxicity. *HNO*, 67: 434-439.
139. Coffin AB, Boney R, Hill J, Tian C, Steyger PS. (2021) Detecting Novel Ototoxins and Potentiation of Ototoxicity by Disease Settings. *Frontiers in neurology*, 12: 725566.
140. Lee S, Cha J, Kim J-Y, Son GM, Kim D-K. (2021) Detection of unknown ototoxic adverse drug reactions: an electronic healthcare record-based longitudinal nationwide cohort analysis. *Scientific reports*, 11: 14045.
141. Scimemi P, Santarelli R, Selmo A, Mammano F. (2014) Auditory brainstem responses to clicks and tone bursts in C57 BL/6J mice. *Acta otorhinolaryngologica Italica*, 34: 264-271.
142. Pytel J. Kiváltott Válasz Audiometria. In: Répássy G (szerk.), Fül-orr-gégészeti fej-nyak-sebészet. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2011: 63-79.
143. Chiappa K, Gladstone K, Young R. (1979) Brain stem auditory evoked responses: studies of waveform variations in 50 normal human subjects. *Archives of neurology*, 36: 81-87.
144. Alvarado J, Fuentes-Santamaría V, Jareño-Flores T, Blanco J, Juiz J. (2012) Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neuroscience research*, 73: 302-311.
145. Parham K, Sun X-M, Kim DO. Noninvasive Assessment of Auditory Function in Mice: Auditory Brainstem Response and Distortion Product Otoacoustic Emissions. In: Willott JF (szerk.), *Handbook of Mouse Auditory Research*. CRC Press, Boca Raton, 2001: 37-58.
146. Viberg A, Canlon B. (2004) The guide to plotting a cochleogram. *Hearing research*, 197: 1-10.
147. Müller M, von Hünenbein K, Hoidis S, Smolders J. (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hearing research*, 202: 63-73.
148. Raphael Y. (2002) Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. *British medical bulletin*, 63: 25-38.

149. Raphael Y, Altschuler R. (1991) Scar formation after drug-induced cochlear insult. *Hearing research*, 51: 173-183.
150. Lang H. Loss, Degeneration, and Preservation of the Spiral Ganglion Neurons and Their Processes. In: Dabdoub A, Fritzsche B, Popper A, Fay R (szerk.), *The Primary Auditory Neurons of the Mammalian Cochlea* Springer New York LLC, New York, 2016: 229-262.
151. Okano T. (2014) Immune system of the inner ear as a novel therapeutic target for sensorineural hearing loss. *Frontiers in pharmacology*, 5: 205.
152. Harris J. (1983) Immunology of the inner ear: response of the inner ear to antigen challenge. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 91: 18-32.
153. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J. (2008) Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *Journal of neuroscience research*, 86: 1758-1767.
154. Adams J. (2002) Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: a technical note. *Otology & neurotology*, 23: 316-322.
155. Tan WJ, Thorne PR, Vlajkovic SM. (2016) Characterisation of cochlear inflammation in mice following acute and chronic noise exposure. *Histochemistry and cell biology*, 146: 219-230.
156. Hirose K, Discolo CM, Keasler JR, Ransohoff R. (2005) Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *The Journal of comparative neurology*, 489: 180-194.
157. Hu BH, Zhang C, Frye MD. (2018) Immune cells and non-immune cells with immune function in mammalian cochleae. *Hearing research*, 362: 14-24.
158. Kaur T, Zamani D, Tong L, Rubel EW, Ohlemiller KK, Hirose K, Warchol ME. (2015) Fractalkine Signaling Regulates Macrophage Recruitment into the Cochlea and Promotes the Survival of Spiral Ganglion Neurons after Selective Hair Cell Lesion. *The Journal of neuroscience*, 35: 15050-15061.
159. Liu W, Molnar M, Garnham C, Benav H, Rask-Andersen H. (2018) Macrophages in the Human Cochlea: Saviors or Predators-A Study Using Super-Resolution Immunohistochemistry. *Frontiers in immunology*, 9: 223.

160. O'Malley JT, Nadol JB, McKenna MJ. (2016) Anti CD163+, Iba1+, and CD68+ Cells in the Adult Human Inner Ear: Normal Distribution of an Unappreciated Class of Macrophages/Microglia and Implications for Inflammatory Otopathology in Humans. *Otology & neurotology*, 37: 99-108.
161. Shi X. (2010) Resident macrophages in the cochlear blood-labyrinth barrier and their renewal via migration of bone-marrow-derived cells. *Cell and tissue research*, 342: 21-30.
162. Zhang W, Dai M, Fridberger A, Hassan A, Degagne J, Neng L, Zhang F, He W, Ren T, Trune D, Auer M, Shi X. (2012) Perivascular-resident macrophage-like melanocytes in the inner ear are essential for the integrity of the intrastrial fluid-blood barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 10388-10393.
163. Fujioka M, Okano H, Ogawa K. (2014) Inflammatory and immune responses in the cochlea: potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss. *Frontiers in pharmacology*, 5: 287.
164. Kalinec GM, Lomberk G, Urrutia RA, Kalinec F. (2017) Resolution of Cochlear Inflammation: Novel Target for Preventing or Ameliorating Drug-, Noise- and Age-related Hearing Loss. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11: 192.
165. Kurabi A, Keithley EM, Housley GD, Ryan AF, Wong AC. (2017) Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hearing research*, 349: 129-137.
166. Tan WJ. (2013) Noise-induced cochlear inflammation. *World Journal of Otorhinolaryngology*, 3: 89.
167. Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Shibata S, Yamashita D, Masuda M, Mihara M, Ohsugi Y, Ogawa K, Okano H. (2010) Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neuroscience research*, 66: 345-352.
168. Wood MB, Zuo J. (2017) The Contribution of Immune Infiltrates to Ototoxicity and Cochlear Hair Cell Loss. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11: 106.
169. Yang W, Vethanayagam R, Dong Y, Cai Q, Hu B. (2015) Activation of the antigen presentation function of mononuclear phagocyte populations associated

- with the basilar membrane of the cochlea after acoustic overstimulation. *Neuroscience*, 303: 1-15.
170. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. (2002) Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *The Laryngoscope*, 112: 1627-1634.
 171. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. (2003) Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 4: 139-147.
 172. So H, Kim H, Lee J-H, Park C, Kim Y, Kim E, Kim J-K, Yun K-J, Lee K-M, Lee H-Y, Moon S-K, Lim DJ, Park R. (2007) Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 8: 338-355.
 173. Kalinec F, Webster P, Maricle A, Guerrero D, Chakravarti D, Chakravarti B, Gellibolian R, Kalinec G. (2009) Glucocorticoid-stimulated, transcription-independent release of annexin A1 by cochlear Hensen cells. *British journal of pharmacology*, 158: 1820-1834.
 174. D'Acquisto F, Perretti M, Flower R. (2008) Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *British journal of pharmacology*, 155: 152-169.
 175. Lim LHK, Pervaiz S. (2007) Annexin 1: the new face of an old molecule. *The FASEB Journal*, 21: 968-975.
 176. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. (2016) Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *Journal of immunology research*, 2016: 8239258.
 177. Harrop-Jones A, Wang X, Fernandez R, Dellamary L, Ryan AF, LeBel C, Piu F. (2016) The Sustained-Exposure Dexamethasone Formulation OTO-104 Offers Effective Protection against Noise-Induced Hearing Loss. *Audiology and Neuro-Otology*, 21: 12-21.
 178. Urrutia RA, Kalinec F. (2015) Biology and pathobiology of lipid droplets and their potential role in the protection of the organ of Corti. *Hearing research*, 330: 26-38.

179. Zhou Y, Zheng G, Zheng H, Zhou R, Zhu X, Zhang Q. (2013) Primary observation of early transtympanic steroid injection in patients with delayed treatment of noise-induced hearing loss. *Audiology and Neuro-Otology*, 18: 89-94.
180. Abrashkin K, Izumikawa M, Miyazawa T, Wang C, Crumling M, Swiderski D, Beyer L, Gong T, Raphael Y. (2006) The fate of outer hair cells after acoustic or ototoxic insults. *Hearing research*, 218: 20-29.
181. Cai Q, Vethanayagam R, Yang S, Bard J, Jamison J, Cartwright D, Dong Y, Hu B. (2014) Molecular profile of cochlear immunity in the resident cells of the organ of Corti. *Journal of neuroinflammation*, 11: 173.
182. Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. (2006) Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *Journal of neuroscience research*, 83: 575-583.
183. Ichimiya I, Yoshida K, Hirano T, Suzuki M, Mogi G. (2000) Significance of spiral ligament fibrocytes with cochlear inflammation. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 56: 45-51.
184. Adams J, Seed B, Lu N, Landry A, Xavier R. (2009) Selective activation of nuclear factor kappa B in the cochlea by sensory and inflammatory stress. *Neuroscience*, 160: 530-539.
185. Yoshida K, Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G. (1999) Effect of proinflammatory cytokines on cultured spiral ligament fibrocytes. *Hearing research*, 137: 155-159.
186. Yamamoto H, Omelchenko I, Shi X, Nuttall AL. (2009) The influence of NF-kappaB signal-transduction pathways on the murine inner ear by acoustic overstimulation. *Journal of neuroscience research*, 87: 1832-1840.
187. Matern M, Vijayakumar S, Margulies Z, Milon B, Song Y, Elkon R, Zhang X, Jones SM, Hertzano R. (2017) Gfi1Cre mice have early onset progressive hearing loss and induce recombination in numerous inner ear non-hair cells. *Scientific reports*, 7: 42079.
188. Kanzaki J, Ouchi T. (1981) Steroid-responsive bilateral sensorineural hearing loss and immune complexes. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 230: 5-9.

189. Francis SP, Cunningham LL. (2017) Non-autonomous Cellular Responses to Ototoxic Drug-Induced Stress and Death. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11: 252.
190. Lowthian J, Britt C, Rance G, Lin F, Woods R, Wolfe R, Nelson M, Dillon H, Ward S, Reid C, Lockery J, Nguyen T, McNeil J, Storey E. (2016) Slowing the progression of age-related hearing loss: Rationale and study design of the ASPIRIN in HEARING, retinal vessels imaging and neurocognition in older generations (ASPREE-HEARING) trial. *Contemporary clinical trials*, 46: 60-66.
191. Verschuur C, Agyemang-Prempeh A, Newman TA. (2014) Inflammation is associated with a worsening of presbycusis: evidence from the MRC national study of hearing. *International journal of audiology*, 53: 469-475.
192. Frye MD, Yang W, Zhang C, Xiong B, Hu BH. (2017) Dynamic activation of basilar membrane macrophages in response to chronic sensory cell degeneration in aging mouse cochleae. *Hearing research*, 344: 125-134.
193. Tornabene S, Sato K, Pham L, Billings P, M. Keithley E. (2006) Immune cell recruitment following acoustic trauma. *Hearing research*, 222: 115-124.
194. Tan BTG, Lee MMG, Ruan R. (2008) Bone-marrow-derived cells that home to acoustic deafened cochlea preserved their hematopoietic identity. *The Journal of comparative neurology*, 509: 167-179.
195. Du X, Choi C-H, Chen K, Cheng W, Floyd RA, Kopke RD. (2011) Reduced formation of oxidative stress biomarkers and migration of mononuclear phagocytes in the cochleae of chinchilla after antioxidant treatment in acute acoustic trauma. *International journal of otolaryngology*, 2011: 612690.
196. Sautter NB, Shick EH, Ransohoff RM, Charo IF, Hirose K. (2006) CC chemokine receptor 2 is protective against noise-induced hair cell death: studies in CX3CR1(+GFP) mice. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 7: 361-372.
197. Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Fujioka M, Ogita K, Ogawa K. (2006) Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain research*, 1068: 237-247.

198. Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Jajoo S, Rybak LP, Ramkumar V. (2011) Short interfering RNA against STAT1 attenuates cisplatin-induced ototoxicity in the rat by suppressing inflammation. *Cell death & disease*, 2: e180.
199. Oh G-S, Kim H-J, Choi J-H, Shen A, Kim C-H, Kim S-J, Shin S-R, Hong S-H, Kim Y, Park C, Lee S-J, Akira S, Park R, So H-S. (2011) Activation of lipopolysaccharide-TLR4 signaling accelerates the ototoxic potential of cisplatin in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186: 1140-1150.
200. Hirose K, Sato E. (2011) Comparative analysis of combination kanamycin-furosemide versus kanamycin alone in the mouse cochlea. *Hearing research*, 272: 108-116.
201. Kaur T, Ohlemiller KK, Warchol ME. (2018) Genetic disruption of fractalkine signaling leads to enhanced loss of cochlear afferents following ototoxic or acoustic injury. *The Journal of comparative neurology*, 526: 824-835.
202. Ladrech S, Wang J, Simonneau L, Puel J-L, Lenoir M. (2007) Macrophage contribution to the response of the rat organ of Corti to amikacin. *Journal of neuroscience research*, 85: 1970-1979.
203. Sato E, Shick HE, Ransohoff RM, Hirose K. (2010) Expression of fractalkine receptor CX3CR1 on cochlear macrophages influences survival of hair cells following ototoxic injury. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 11: 223-234.
204. Rossini BAA, Penido NdO, Munhoz MSL, Bogaz EA, Curi RS. (2017) Sudden Sensorineural Hearing Loss and Autoimmune Systemic Diseases. *International archives of otorhinolaryngology*, 21: 213-223.
205. Li G, You D, Ma J, Li W, Li H, Sun S. (2018) The Role of Autoimmunity in the Pathogenesis of Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Neural plasticity*, 2018: 7691473.
206. Trune DR, Kempton JB, Hefeneider SH, Bennett RM. (1997) Inner ear DNA receptors in MRL/lpr autoimmune mice: potential 30 and 70 kDa link between autoimmune disease and hearing loss. *Hearing research*, 105: 57-64.
207. Zhou B, Kermany MH, Glickstein J, Cai Q, Cai C, Zhou Y, Nair U, Kim JW, Kim P, Liu W, Kanangat S, Yoo TJ. (2011) Murine autoimmune hearing loss mediated by CD4+ T cells specific for β -tubulin. *Clinical immunology*, 138: 222-230.

208. Knoll J, Magyar K. (1972) Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Advances in biochemical psychopharmacology*, 5: 393-408.
209. Bodkin J, Amsterdam J. (2002) Transdermal selegiline in major depression: a double-blind, placebo-controlled, parallel-group study in outpatients. *The American journal of psychiatry*, 159: 1869-1875.
210. Knoll J. (1992) (-)Deprenyl-medication: a strategy to modulate the age-related decline of the striatal dopaminergic system. *Journal of the American Geriatrics Society*, 40: 839-847.
211. Miklya I. (2016) The significance of selegiline/(-)-deprenyl after 50 years in research and therapy (1965-2015). *Molecular psychiatry*, 21: 1499-1503.
212. Szökő É, Tábi T, Riederer P, Vécsei L, Magyar K. (2018) Pharmacological aspects of the neuroprotective effects of irreversible MAO-B inhibitors, selegiline and rasagiline, in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*, 125: 1735-1749.
213. Duran N, Alonso JC, Favaro WJ. Deprenyl, an old drug with new anticancer potential: Mini review. *arXiv-Quantitative Biology, Biomolecules*, 2021.
214. Müller T, Kuhn W, Krüger R, Przuntek H. (1998) Selegiline as immunostimulant- a novel mechanism of action? *Journal of neural transmission (Supplementum)*, 52: 321-328.
215. Feng Y, Lu Y. (2021) Immunomodulatory Effects of Dopamine in Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*, 12: 663102.
216. Ostadkarampour M, Putnins EE. (2021) Monoamine Oxidase Inhibitors: A Review of Their Anti-Inflammatory Therapeutic Potential and Mechanisms of Action. *Frontiers in pharmacology*, 12: 676239.
217. Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z, Zhou R. (2015) Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*, 160: 62-73.
218. Milgram NW, Stevens DR, Ivy GO. Use of L-deprenyl for retarding age dependent deterioration of the immune system function in mammals. (Office EP szerk.), 1991.
219. Milgram NW, Stevens DR, Ivy GO. L-deprenyl for treating immune system dysfunction and compositions for same. (Patent US szerk.), 1993.

220. Ruehl WW. Use of selegiline to treat hearing loss in mammals. (Specification EP szerk.), 1996.
221. Ruehl WW, Stevens DR. Treating hearing loss with deprenyl. (Patent US szerk.), 1995.
222. Ruehl W, Entriken T, Muggenburg B, Bruyette D, Griffith W, Hahn F. (1997) Treatment with L-deprenyl prolongs life in elderly dogs. *Life sciences*, 61: 1037-1044.
223. Fésüs V. (2017) Recent advances of immunooncology in the treatment of solid tumours and haematological malignancies: the immune checkpoint inhibitors. *Magyar onkologia*, 61: 116-125.
224. Nosedá R, Bertoli R, Müller L, Ceschi A. (2019) Haemophagocytic lymphohistiocytosis in patients treated with immune checkpoint inhibitors: analysis of WHO global database of individual case safety reports. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7: 117-117.
225. Porcu M, De Silva P, Solinas C, Battaglia A, Schena M, Scartozzi M, Bron D, Suri JS, Willard-Gallo K, Sangiolo D, Saba L. (2019) Immunotherapy Associated Pulmonary Toxicity: Biology Behind Clinical and Radiological Features. *Cancers*, 11: 305-305.
226. Varricchi G, Galdiero MR, Mercurio V, Bonaduce D, Marone G, Tocchetti CG. (2018) Pharmacovigilating cardiotoxicity of immune checkpoint inhibitors. *The Lancet. Oncology*, 19: 1545.
227. Page DB, Postow MA, Callahan MK, Allison JP, Wolchok JD. (2014) Immune modulation in cancer with antibodies. *Annual review of medicine*, 65: 185-202.
228. Hu F, Ye X, Zhai Y, Xu J, Guo X, Guo Z, Zhou X, Ruan Y, Zhuang Y, He J. (2020) Ear and labyrinth toxicities induced by immune checkpoint inhibitors: a disproportionality analysis from 2014 to 2019. *Immunotherapy*, 12: 531-540.
229. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee C-CR, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer

- regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114: 535-546.
230. Seaman BJ, Guardiani EA, Brewer CC, Zalewski CK, King KA, Rudy S, Van Waes C, Morgan RA, Dudley ME, Yang JC, Rosenberg SA, Kim HJ. (2012) Audiovestibular dysfunction associated with adoptive cell immunotherapy for melanoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 147: 744-749.
231. Zibelman M, Pollak N, Olszanski AJ. (2016) Autoimmune inner ear disease in a melanoma patient treated with pembrolizumab. *Journal for immunotherapy of cancer*, 4: 8.
232. Diamantopoulos PT, Stoungioti S, Anastasopoulou A, Papaxoinis G, Gogas H. (2018) Incomplete Vogt-Koyanagi-Harada disease following treatment with encorafenib and binimetinib for metastatic melanoma. *Melanoma research*, 28: 648-651.
233. Tampio AJF, Dhanireddy S, Sivapiragasam A, Nicholas BD. (2021) Bilateral Sensorineural Hearing Loss Associated With Nivolumab Therapy for Stage IV Malignant Melanoma. *Ear, nose, & throat journal*, 100: 286S-291S.
234. Voskens CJ, Goldinger SM, Loquai C, Robert C, Kaehler KC, Berking C, Bergmann T, Bockmeyer CL, Eigentler T, Fluck M, Garbe C, Gutzmer R, Grabbe S, Hauschild A, Hein R, Hundorfean G, Justich A, Keller U, Klein C, Mateus C, Mohr P, Paetzold S, Satzger I, Schadendorf D, Schlaepfli M, Schuler G, Schuler-Thurner B, Trefzer U, Ulrich J, Vaubel J, von Moos R, Weder P, Wilhelm T, Göppner D, Dummer R, Heinzerling LM. (2013) The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the ipilimumab network. *PloS one*, 8: e53745.
235. Hobelmann K, Fitzgerald D. (2019) A Case of Pembrolizumab Induced Autoimmune Sensorineural Hearing Loss. *Journal of Otology & Rhinology*, 8.
236. Dong Y, Zhang C, Frye M, Yang W, Ding D, Sharma A, Guo W, Hu BH. (2018) Differential fates of tissue macrophages in the cochlea during postnatal development. *Hearing research*, 365: 110-126.
237. Okayasu T, Quesnel AM, O'Malley JT, Kamakura T, Nadol JB. (2020) The Distribution and Prevalence of Macrophages in the Cochlea Following Cochlear

- Implantation in the Human: An Immunohistochemical Study Using Anti-Iba1 Antibody. *Otology & neurotology*, 41: e304-e316.
238. Chai Y, He W, Yang W, Hetrick AP, Gonzalez JG, Sargsyan L, Wu H, Jung TT, Li H. (2021) Intratympanic Lipopolysaccharide Elevates Systemic Fluorescent Gentamicin Uptake in the Cochlea. *The Laryngoscope*, 131: E2573-E2582.
239. Pierezan F, Mansell J, Ambrus A, Rodrigues Hoffmann A. (2014) Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *Journal of comparative pathology*, 151: 347-351.
240. Szepesy J, Humli V, Farkas J, Miklya I, Tímár J, Tábi T, Gáborján A, Polony G, Szirmai Á, Tamás L, Köles L, Vizi ES, Zelles T. (2021) Chronic Oral Selegiline Treatment Mitigates Age-Related Hearing Loss in BALB/c Mice. *International journal of molecular sciences*, 22: 2853.
241. Szepesy J, Miklós G, Farkas J, Kucsera D, Giricz Z, Gáborján A, Polony G, Szirmai Á, Tamás L, Köles L, Varga ZV, Zelles T. (2020) Anti-PD-1 Therapy Does Not Influence Hearing Ability in the Most Sensitive Frequency Range, but Mitigates Outer Hair Cell Loss in the Basal Cochlear Region. *International journal of molecular sciences*, 21: 6701.
242. Holmgaard R, Zamarin D, Munn D, Wolchok J, Allison J. (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *The Journal of experimental medicine*, 210: 1389-1402.
243. Moynihan K, Opel C, Szeto G, Tzeng A, Zhu E, Engreitz J, Williams R, Rakhra K, Zhang M, Rothschilds A, Kumari S, Kelly R, Kwan B, Abraham W, Hu K, Mehta N, Kauke M, Suh H, Cochran J, Lauffenburger D, Wittrup K, Irvine D. (2016) Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nature medicine*, 22: 1402-1410.
244. Martini E, Kunderfranco P, Peano C, Carullo P, Cremonesi M, Schorn T, Carriero R, Termanini A, Colombo F, Jachetti E, Panico C, Faggian G, Fumero A, Torracca L, Molgora M, Cibella J, Pagiatakis C, Brummelman J, Alvisi G, Mazza E, Colombo M, Lugli E, Condorelli G, Kallikourdis M. (2019) Single-Cell

- Sequencing of Mouse Heart Immune Infiltrate in Pressure Overload-Driven Heart Failure Reveals Extent of Immune Activation. *Circulation*, 140: 2089-2107.
245. Twyman-Saint Victor C, Rech A, Maity A, Rengan R, Pauken K, Stelekati E, Benci J, Xu B, Dada H, Odorizzi P, Herati R, Mansfield K, Patsch D, Amaravadi R, Schuchter L, Ishwaran H, Mick R, Pryma D, Xu X, Feldman M, Gangadhar T, Hahn S, Wherry E, Vonderheide R, Minn A. (2015) Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature*, 520: 373-377.
246. Ehret G. (1974) Age-dependent hearing loss in normal hearing mice. *Die Naturwissenschaften*, 61: 506-507.
247. Spiby DJ. Screening for Hearing Loss in Older Adults. In External Review against Programme Appraisal Criteria for the UK National Screening Committee (UK NSC). 2014: 52-63.
248. Bagai A, Thavendiranathan P, Detsky A. (2006) Does this patient have hearing impairment? *JAMA*, 295: 416-428.
249. Lycke M, Lefebvre T, Cool L, Eygen KV, Boterberg T, Schofield P, Debruyne PR. (2018) Screening Methods for Age-Related Hearing Loss in Older Patients with Cancer: A Review of the Literature. *Geriatrics*, 3: 48.
250. Olusanya BO, Davis AC, Hoffman HJ. (2019) Hearing loss grades and the International classification of functioning, disability and health. *Bulletin of the World Health Organization*, 97: 725-728.
251. Zahnert T. (2011) The Differential Diagnosis of Hearing Loss. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108: 433-444.
252. World Health O. Guidelines for hearing aids and services for developing countries. <https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-hearing-aids-and-services-for-developing-countries>. 2019.
253. Ciuman R. (2011) Auditory and vestibular hair cell stereocilia: relationship between functionality and inner ear disease. *The Journal of Laryngology & Otology*, 125: 991-1003.
254. Kitani K, Minami C, Yamamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo M-C. (2002) Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials

- of propargylamines for human use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959: 295-307.
255. Charles River L. DBA/2J (JAX™ Mice Strain) - Growth Chart. <https://www.criver.com/products-services/find-model/jax-dba2j-mice?region=3631>. 2021.
256. Charles River L. BALB/c Mouse - Growth Chart. <https://www.criver.com/products-services/find-model/balbc-mouse?region=3631>. 2021.
257. Morton DB. (2000) A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR journal*, 41: 80-86.
258. Morton DB, Griffiths PH. (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *The Veterinary record*, 116: 431-436.
259. Talbot SR, Biernot S, Bleich A, van Dijk RM, Ernst L, Häger C, Helgers SOA, Koegel B, Koska I, Kuhla A, Miljanovic N, Müller-Graff F-T, Schwabe K, Tolba R, Vollmar B, Weegh N, Wölk T, Wolf F, Wree A, Zieglowski L, Potschka H, Zechner D. (2020) Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Laboratory animals*, 54: 99-110.
260. Kachele DL, Lasiter PS. (1990) Murine strain differences in taste responsivity and organization of the rostral nucleus of the solitary tract. *Brain research bulletin*, 24: 239-247.
261. Buniel MC, Geelan-Hansen K, Weber PC, Tuohy VK. (2009) Immunosuppressive therapy for autoimmune inner ear disease. *Immunotherapy*, 1: 425-434.
262. Srivastava A, Al-Zubidi N, Appelbaum E, Gombos DS, Nader M-E, Gidley PW, Chambers MS. (2020) Immune-Related Oral, Otologic, and Ocular Adverse Events. *Advances in experimental medicine and biology*, 1244: 295-307.
263. Ruan Q, Zeng S, Liu A, Chen Z, Yu Z, Zhang R, He J, Bance M, Robertson G, Yin S, Wang J. (2014) Overexpression of X-Linked Inhibitor of Apoptotic Protein (XIAP) reduces age-related neuronal degeneration in the mouse cochlea. *Gene therapy*, 21: 967-974.

264. Ding D, Jiang H, Chen G-D, Longo-Guess C, Muthaiah VPK, Tian C, Sheppard A, Salvi R, Johnson KR. (2016) N-acetyl-cysteine prevents age-related hearing loss and the progressive loss of inner hair cells in γ -glutamyl transferase 1 deficient mice. *Aging*, 8: 730-750.
265. Marie A, Meunier J, Brun E, Malmstrom S, Baudoux V, Flaszka E, Naert G, Roman F, Cosnier-Pucheu S, Gonzalez-Gonzalez S. (2018) N-acetylcysteine Treatment Reduces Age-related Hearing Loss and Memory Impairment in the Senescence-Accelerated Prone 8 (SAMP8) Mouse Model. *Aging and disease*, 9: 664-673.
266. Ralls K. (1967) Auditory sensitivity in mice, *Peromyscus* and *Mus musculus*. *Animal behaviour*, 15: 123-128.
267. Zheng Q, Johnson K, Erway L. (1999) Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing research*, 130: 94-107.
268. CDER. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2015: 1-27.
269. Johnson KR, Longo-Guess C, Gagnon LH, Yu H, Zheng QY. (2008) A locus on distal chromosome 11 (ahl8) and its interaction with *Cdh23* ahl underlie the early onset, age-related hearing loss of DBA/2J mice. *Genomics*, 92: 219-225.
270. Nagtegaal A, Spijker S, Crins T, Neuro-Bsik Mouse Phenomics C, Borst J. (2012) A novel QTL underlying early-onset, low-frequency hearing loss in BXD recombinant inbred strains. *Genes, brain, and behavior*, 11: 911-920.
271. Wang Q, Zhao H, Zheng T, Wang W, Zhang X, Wang A, Li B, Wang Y, Zheng Q. (2017) Otoprotective effects of mouse nerve growth factor in DBA/2J mice with early-onset progressive hearing loss. *Journal of neuroscience research*, 95: 1937-1950.
272. Ahituv N, Avraham K. (2000) Auditory and vestibular mouse mutants: models for human deafness. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 11: 181-192.
273. Boucher S, Tai FWJ, Delmaghani S, Lelli A, Singh-Estivalet A, Dupont T, Niasme-Grare M, Michel V, Wolff N, Bahloul A, Bouyacoub Y, Bouccara D, Fraysse B, Deguine O, Collet L, Thai-Van H, Ionescu E, Kemeny J-L, Giraudet F, Lavieille J-P, Devèze A, Roudevitch-Pujol A-L, Vincent C, Franco-

- Vidal V, Thibult-Apt C, Darrouzet V, Bizaguet E, Coez A, Aschard H, Michalski N, Lefevre GM, Aubois A, Avan P, Bonnet C, Petit C. (2020) Ultrarare heterozygous pathogenic variants of genes causing dominant forms of early-onset deafness underlie severe presbycusis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117: 31278-31289.
274. Hertzano R, Dror AA, Montcouquiol M, Ahmed ZM, Ellsworth B, Camper S, Friedman TB, Kelley MW, Avraham KB. (2007) Lhx3, a LIM domain transcription factor, is regulated by Pou4f3 in the auditory but not in the vestibular system. *The European journal of neuroscience*, 25: 999-1005.
275. Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, Brownstein Z, Dagan-Rosenfeld O, Shahin H, Roeb W, McCarthy S, Nord AS, Gordon CR, Ben-Neriah Z, Sebat J, Kanaan M, Lee MK, Frydman M, King M-C, Avraham KB. (2010) Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *American journal of human genetics*, 87: 101-109.
276. Magyar K, Pálfi M, Tábi T, Kalász H, Szende B, Szöko E. (2004) Pharmacological aspects of (-)-deprenyl. *Current medicinal chemistry*, 11: 2017-2031.
277. Szelenyi I. *Inhibitors of Monoamine Oxidase B*. Birkhäuser Basel, Basel, 1993.
278. Fetoni AR, Picciotti PM, Paludetti G, Troiani D. (2011) Pathogenesis of presbycusis in animal models: a review. *Experimental gerontology*, 46: 413-425.
279. Ohlemiller KK, Gagnon PM. (2004) Apical-to-basal gradients in age-related cochlear degeneration and their relationship to "primary" loss of cochlear neurons. *The Journal of comparative neurology*, 479: 103-116.
280. Tábi T, Vécsei L, Youdim MB, Riederer P, Szökő É. (2020) Selegiline: a molecule with innovative potential. *Journal of neural transmission*, 127: 831-842.
281. Li D, Zhao H, Cui Z-K, Tian G. (2021) The Role of Nrf2 in Hearing Loss. *Frontiers in pharmacology*, 12: 620921.
282. Xiao H, Lv F, Xu W, Zhang L, Jing P, Cao X. (2011) Deprenyl prevents MPP(+)-induced oxidative damage in PC12 cells by the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression through the activation of PI3K/Akt and Erk. *Toxicology*, 290: 286-294.

283. Halmos G, Gáborján A, Lendvai B, Répássy G, Szabó LZ, Vizi ES. (2000) Veratridine-evoked release of dopamine from guinea pig isolated cochlea. *Hearing research*, 144: 89-96.
284. Vicente-Torres MA, Dávila D, Muñoz E, Gil-Loyzaga P. (2002) Effects of aging on cochlear monoamine turnover. *Advances in oto-rhino-laryngology*, 59: 112-115.
285. Kujawa SG, Liberman MC. (2015) Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hearing research*, 330: 191-199.
286. Ebadi M, Sharma S, Shavali S, El Refaey H. (2002) Neuroprotective actions of selegiline. *Journal of neuroscience research*, 67: 285-289.
287. Hársing LG, Vizi ES. (1984) Release of endogenous dopamine from rat isolated striatum: effect of clorgyline and (-)-deprenyl. *British journal of pharmacology*, 83: 741-749.
288. Timar J, Knoll B, Knoll J. (1986) Long-term administration of (-)deprenyl (selegiline), a compound which facilitates dopaminergic tone in the brain, leaves the sensitivity of dopamine receptors to apomorphine unchanged. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 284: 255-266.
289. Bazard P, Pineros J, Frisina RD, Bauer MA, Acosta AA, Paganella LR, Borakiewicz D, Thivierge M, Mannering FL, Zhu X, Ding B. (2021) Cochlear Inflammaging in Relation to Ion Channels and Mitochondrial Functions. *Cells*, 10: 2761.
290. Paplou V, Schubert NMA, Pyott SJ. (2021) Age-Related Changes in the Cochlea and Vestibule: Shared Patterns and Processes. *Frontiers in neuroscience*, 15: 680856.
291. Watson N, Ding B, Zhu X, Frisina RD. (2017) Chronic inflammation - inflammaging - in the ageing cochlea: A novel target for future presbycusis therapy. *Ageing research reviews*, 40: 142-148.
292. Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. (2018) Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12: 114.

293. Cui Y, Liu K, Ip M, Liang Y, Mak J. (2020) Protective effect of selegiline on cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammation in rat lungs in vivo. *Annals of translational medicine*, 8: 1418.
294. Vidal PM, Pacheco R. (2020) The Cross-Talk Between the Dopaminergic and the Immune System Involved in Schizophrenia. *Frontiers in pharmacology*, 11: 394.
295. Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. (2010) The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain, behavior, and immunity*, 24: 525-528.
296. Shi X, Qiu S, Zhuang W, Yuan N, Wang C, Zhang S, Sun T, Guo W, Gao F, Yang S, Qiao Y. (2017) NLRP3-inflammasomes are triggered by age-related hearing loss in the inner ear of mice. *American journal of translational research*, 9: 5611-5618.
297. Bauer C, Brozoski T. (2001) Assessing tinnitus and prospective tinnitus therapeutics using a psychophysical animal model. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 2: 54-64.
298. Brozoski T, Spires T, Bauer C. (2007) Vigabatrin, a GABA transaminase inhibitor, reversibly eliminates tinnitus in an animal model. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 8: 105-118.
299. Bekesi G, Tulassay Z, Lengyel G, Schaff Z, Szombath D, Stark J, Marczell I, Nagy-Repas P, Adler I, Dinya E, Racz K, Magyar K. (2012) The effect of selegiline on total scavenger capacity and liver fat content: a preliminary study in an animal model. *Journal of neural transmission*, 119: 25-30.
300. Bickford P, Adams C, Boyson S, Curella P, Gerhardt G, Heron C, Ivy G, Lin A, Murphy M, Poth K, Wallace D, Young D, Zahniser N, Rose G. (1997) Long-term treatment of male F344 rats with deprenyl: assessment of effects on longevity, behavior, and brain function. *Neurobiology of aging*, 18: 309-318.
301. Speiser Z, Fine T, Litinetsky L, Eliash S, Blaugrund E, Cohen S. (2008) Differential behavioral syndrome evoked in the rats after multiple doses of SSRI fluoxetine with selective MAO inhibitors rasagiline or selegiline. *Journal of neural transmission*, 115: 107-116.
302. Boughter JD, Bachmanov AA. (2007) Behavioral genetics and taste. *BMC neuroscience*, 8 Suppl 3: S3.

303. Bucher JR. (2007) NTP toxicity studies of sodium dichromate dihydrate (CAS No. 7789-12-0) administered in drinking water to male and female F344/N rats and B6C3F1 mice and male BALB/c and am3-C57BL/6 mice. Toxicity report series: 1-G4.
304. Hamilton LW, Flaherty CF. (1973) Interactive effects of deprivation in the albino rat. *Learning and Motivation*, 4: 148-162.
305. Kitani K, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. (1998) Assessing the effects of deprenyl on longevity and antioxidant defenses in different animal models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854: 291-306.
306. Seidman MD. (2000) Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *The Laryngoscope*, 110: 727-738.
307. Someya S, Yamasoba T, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. (2007) Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiology of aging*, 28: 1613-1622.
308. Sweet RJ, Price JM, Henry KR. (1988) Dietary restriction and presbycusis: periods of restriction and auditory threshold losses in the CBA/J mouse. *Audiology : official organ of the International Society of Audiology*, 27: 305-312.
309. Henry KR. (1986) Effects of dietary restriction on presbycusis in the mouse. *Audiology : official organ of the International Society of Audiology*, 25: 329-337.
310. Willott JF, Erway LC, Archer JR, Harrison DE. (1995) Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds. *Hearing research*, 88: 143-155.
311. Milgram NW, Racine RJ, Nellis P, Mendonca A, Ivy GO. (1990) Maintenance on L-deprenyl prolongs life in aged male rats. *Life sciences*, 47: 415-420.
312. Stoll S, Hafner U, Pohl O, Müller WE. (1994) Age-related memory decline and longevity under treatment with selegiline. *Life sciences*, 55: 2155-2163.
313. Yen TT, Knoll J. (1992) Extension of lifespan in mice treated with *Dinh lang* (*Policias fruticosum* L.) and (-)-deprenyl. *Acta physiologica Hungarica*, 79: 119-124.

314. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Guilliams M, Haskó G. (2019) Rethinking Communication in the Immune System: The Quorum Sensing Concept. *Trends in immunology*, 40: 88-97.
315. Koo J-W, Quintanilla-Dieck L, Jiang M, Liu J, Urdang ZD, Allensworth JJ, Cross CP, Li H, Steyger PS. (2015) Endotoxemia-mediated inflammation potentiates aminoglycoside-induced ototoxicity. *Science translational medicine*, 7: 298ra118.
316. Shi X. (2016) Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (review). *Hearing research*, 338: 52-63.
317. Alvi SA, Nelson-Brantley J, Staecker H. (2018) Alginate Ototoxicity in the Mouse Model. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 159: 733-738.
318. Chen L, Xiong S, Liu Y, Shang X. (2012) Effect of different gentamicin dose on the plasticity of the ribbon synapses in cochlear inner hair cells of C57BL/6J mice. *Molecular neurobiology*, 46: 487-494.
319. Lee SH, Ju HM, Choi JS, Ahn Y, Lee S, Seo YJ. (2018) Circulating Serum miRNA-205 as a Diagnostic Biomarker for Ototoxicity in Mice Treated with Aminoglycoside Antibiotics. *International journal of molecular sciences*, 19: 2836.
320. Lim J-O, Ko J-W, Shin N-R, Jung T-Y, Moon C, Kim H-C, Shin I-S, Kim J-C. (2019) Cisplatin-induced ototoxicity involves interaction of PRMT3 and cannabinoid system. *Archives of toxicology*, 93: 2335-2346.
321. Hartley GP, Chow L, Ammons DT, Wheat WH, Dow SW. (2018) Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. *Cancer immunology research*, 6: 1260-1273.
322. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, Elco CP, Lee N, Juneja VR, Zhan Q, Lian CG, Thomi R, Hoetzenecker W, Cozzio A, Dummer R, Mihm MC, Flaherty KT, Frank MH, Murphy GF, Sharpe AH, Kupper TS, Schatton T. (2015) Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell*, 162: 1242-1256.
323. Wu A, Maxwell R, Xia Y, Cardarelli P, Oyasu M, Belcaid Z, Kim E, Hung A, Luksik AS, Garzon-Muvdi T, Jackson CM, Mathios D, Theodoros D, Cogswell J, Brem H, Pardoll DM, Lim M. (2019) Combination anti-CXCR4 and anti-PD-1 immunotherapy provides survival benefit in glioblastoma through immune cell

- modulation of tumor microenvironment. *Journal of neuro-oncology*, 143: 241-249.
324. Sekiya T, Tanaka M, Shimamura N, Suzuki S. (2001) Macrophage invasion into injured cochlear nerve and its modification by methylprednisolone. *Brain research*, 905: 152-160.
 325. Spongr VP, Flood DG, Frisina RD, Salvi RJ. (1997) Quantitative measures of hair cell loss in CBA and C57BL/6 mice throughout their life spans. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 101: 3546-3553.
 326. Ohlemiller KK, Wright JS, Heidbreder AF. (2000) Vulnerability to noise-induced hearing loss in 'middle-aged' and young adult mice: a dose-response approach in CBA, C57BL, and BALB inbred strains. *Hearing research*, 149: 239-247.
 327. Zhang Q, Liu H, McGee J, Walsh EJ, Soukup GA, He DZZ. (2013) Identifying microRNAs involved in degeneration of the organ of corti during age-related hearing loss. *PloS one*, 8: e62786.
 328. Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B. (2004) How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging cell*, 3: 169-176.
 329. Baruch K, Deczkowska A, Rosenzweig N, Tsitsou-Kampeli A, Sharif A, Matcovitch-Natan O, Kertser A, David E, Amit I, Schwartz M. (2016) PD-1 immune checkpoint blockade reduces pathology and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 22: 135-137.
 330. Rosenzweig N, Dvir-Szternfeld R, Tsitsou-Kampeli A, Keren-Shaul H, Ben-Yehuda H, Weill-Raynal P, Cahalon L, Kertser A, Baruch K, Amit I, Weiner A, Schwartz M. (2019) PD-1/PD-L1 checkpoint blockade harnesses monocyte-derived macrophages to combat cognitive impairment in a tauopathy mouse model. *Nature communications*, 10: 465.
 331. Schwartz M. (2017) Can immunotherapy treat neurodegeneration? *Science*, 357: 254-255.
 332. Spielbauer K, Cunningham L, Schmitt N. (2018) PD-1 Inhibition Minimally Affects Cisplatin-Induced Toxicities in a Murine Model. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 159: 343-346.

333. Kuzucu İ, Baklacı D, Guler İ, Uçaryılmaz EÖ, Kum RO, Özcan M. (2019) Investigation of the Ototoxic Effect of Pembrolizumab Using a Rat Model. *Cureus*, 11: e6057.
334. Bohne B, Harding G. (1993) Combined organ of Corti/modiolus technique for preparing mammalian cochleas for quantitative microscopy. *Hearing research*, 71: 114-124.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

12.1. A disszertációhoz felhasznált publikációk

Judit Szepesy, Viktória Humli, János Farkas, Ildikó Miklya, Júlia Tímár, Tamás Tábi, Anita Gáborján, Gábor Polony, Ágnes Szirmai, László Tamás, László Köles, Elek Sylvester Vizi, Tibor Zelles (2021). Chronic Oral Selegiline Treatment Mitigates Age-Related Hearing Loss in BALB/c Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, 6:2853.

Judit Szepesy†, Gabriella Miklós†, János Farkas, Dániel Kucsera, Zoltán Giricz, Anita Gáborján, Gábor Polony, Ágnes Szirmai, László Tamás, László Köles, Zoltán V. Varga, Tibor Zelles (2020). Anti-PD-1 Therapy Does Not Influence Hearing Ability in the Most Sensitive Frequency Range, but Mitigates Outer Hair Cell Loss in the Basal Cochlear Region. **International Journal of Molecular Sciences**, 18:6701.

László Köles, **Judit Szepesy**, Eszter Berekméri, Tibor Zelles (2019). Purinergic Signaling and Cochlear Injury-Targeting the Immune System? **International Journal of Molecular Sciences**, 20(12):2979.

12.2. A témához kapcsolódó egyéb publikációk

Daniel Balazs Fulop, Viktória Humli, **Judit Szepesy**, Virag Ott, Dora Reglodi, Balazs Gaszner, Adrienn Nemeth, Agnes Szirmai, Laszlo Tamas, Hitoshi Hashimoto, Tibor Zelles, Andrea Tamas (2019). Hearing impairment and associated morphological changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. **Scientific Reports**, (1):14598.

12.3. A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk

Eszter Berekméri, **Judit Szepesy**, László Köles, Tibor Zelles (2019). Purinergic signaling in the organ of Corti: Potential therapeutic targets of sensorineural hearing losses. **Brain Research Bulletin**, 151:109-118.

Huba Kalász, Gellért Karvaly, Kamil Musilek, Kamil Kuca, Jung Young-Sik, Barbara Malawska, Ernest A. Adeghate, Syed M. Nurulain, **Judit Szepesy**, Tibor Zelles, Kornélia Tekes (2019). Dose-Dependent Tissue Distribution of K117, a Bis-pyridinium Aldoxime, in Rats. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, 13(1):1-6.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, *Dr. Zelles Tibornak* és *Dr. Szirmai Ágnesnek*, akik szakmai tudásukkal elősegítették fejlődésemet és akiknek segítségével nem készülhetett volna el doktori értekezésem. Közülük is külön meg szeretném köszönni *Dr. Zelles Tibornak*, hogy segítséget nyújtott kísérleteim tervezésében, kiértékelésében továbbá a munkám során felmerülő problémák megoldásában. Köszönöm, hogy elindított a kutatói pályán.

Köszönöm *Prof. Dr. Ferdinandy Péternek* és a *Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetének* a kísérletes munkámhoz szükséges feltételek biztosítását.

Szeretnék köszönetet mondani *Prof. Dr. Tamás Lászlónak* és a *Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikájának*, akik kutatási tevékenységemet támogatták.

Köszönettel tartozom *Humli Viktóriának*, akinek jelentős szerepe volt a hallásvizsgálathoz alkalmazott ABR módszer beállításában és a funkcionális vizsgálatok kivitelezésében. Köszönet illeti *Miklós Gabriellát*, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott az izolált egér cochleán végzett *in vitro* kísérletek beállításában.

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni a Kresge Hearing Research Institute munkatársainak, *Dr. Yehoash Raphaelnek* és *Lisa A Beyernek*, akik nélkül a cochleogram készítés módszerét nem sajátíthattam volna el.

Köszönöm *Dr. Varga Zoltánnak* és *Kovács Andreának* a cochlea morfológiai vizsgálatában továbbá az immunhisztokémiai mérések elvégzésében nyújtott segítségét.

Külön köszönettel tartozom *Dr. Varga Zoltánnak* és a *Kardiovaszkuláris és Metabolikus Kutatócsoportnak* a PD-1 gátló immunterápia hatásának vizsgálatára alkalmas kezelési protokoll tervezéséért és kivitelezéséért.

Köszönöm *Dr. Giricz Zoltánnak* a cochleogram módszerének beállításához szükséges konfokális mikroszkóp használatának lehetőségét, a mérésekkel kapcsolatban nyújtott segítségét.

Köszönet illeti *Farkas Jánost* a belsőfül morfológiai vizsgálatában nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom *családomnak*, akik egész életem során mellettem álltak és támogattak.

A doktori tézis elkészítéséhez felhasznált publikációk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (NKFIH K-128875), a Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (neurológia és terápia célú fejlesztés tématerületek) illetve a Tématerületi Kiválósági Program és a Kutatási Kiválósági Program (FIKP 2020 és TKP/ITM/NKFIH), a Horizon 2020 program (No 739593), a Nemzeti Szívprogram (NVKP_16-1-2016-0017) és a Versenyképes Közép-Magyarország Operatív Program (VEKOP-2.3.3-15-2017-00016) támogatásával készültek.

Szepesy Judit munkáját az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 program (Az orvos-, egészségügyi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése), a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítvány és a Prof. Dr. Romics László Akadémikus Emlékére Alapítvány támogatta.