

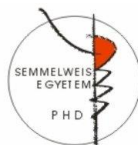
SZENZORINEURÁLIS HALLÁSKÁROSODÁSOK ÉS LEHETSÉGES GYÓGYSZERES TERÁPIÁJUK - AZ IMMUNRENDSZER LEHETSÉGES SZEREPE

Doktori tézisek

Szepesy Judit

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Szökő Éva, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Demeter Kornél, Ph.D.
Dr. Küstel Marianna, Ph.D.

Budapest

2022

1. Bevezetés

1.1. A szenzorineurális halláskárosodás etiológiája, patológiája és hatékony gyógyszeres kezelésének hiánya

A hallásvesztés napjaink egyik vezető egészségügyi problémája. A külsőfül vagy középfül betegsége okozza a vezetésszerű típusú halláscsökkenést, amely súlyossági foktól függetlenül ma már jó eredménnyel rehabilitálható. Ezzel szemben a belsőfület illetve a hallóideget/hallópályát érintő idegi eredetű vagy szenzorineurális halláskárosodások (sensorineural hearing loss, SNHL) 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.

Az érintett struktúrák, illetve a halláskárosodás mértéke etiológiánként eltérő. Az SNHL-ek 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 (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.

Az excitotoxicitás, az oxidatív stressz illetve az apoptózis valamennyi SNHL forma kialakulásának meghatározó patológiai tényezője. Ezen folyamatok eredményeként elsősorban a hallás tulajdonképpeni receptor szervének, a

belsőfül Corti-féle szervének szőrsejtjei (a hallás receptorsejtjei) illetve spirális ganglionsejtjei (SGN) károsodnak. A különböző típusú SNHL-ek kialakulása során ezen sejtek morfológiai változása, degenerációja vagy hiánya a hallásvesztés egyértelmű jele.

Az SNHL-ek patomechanizmusának komplex, multifaktoriális jellege, a normál illetve károsodott hallórendszerben zajló molekuláris mechanizmusok illetve endogén védőmechanizmusok hiányos ismerete nehézséget jelent a gyógyszerfejlesztők számára. Egyelőre a szupportív kezelésen kívül nem létezik igazán hatékony gyógyszeres terápia, ami ezen károsodásokat mérsékelné, illetve megelőzné.

1.2. Farmakoterápiás megközelítés és prevenció

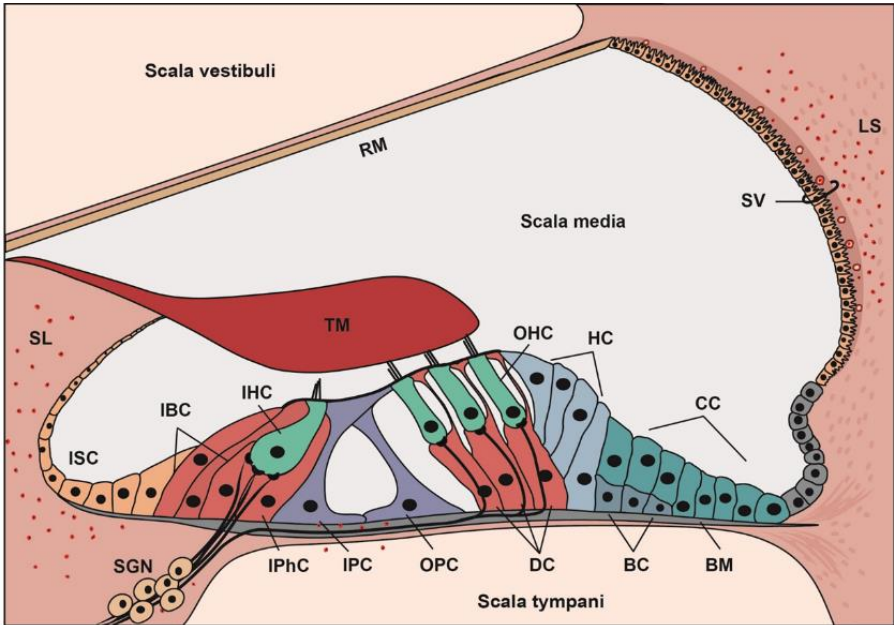
Jelen kutatások fókuszában egyrészt potenciális hallásvédő vegyületek keresése, másrészt a halláskárosodást kiváltó tényezők (pl. különböző vegyületek) feltérképezése áll. Figyelembe véve a leggyakoribb SNHL formák hátterében álló, eddig ismert patológiai folyamatokat (oxidatív stressz, neuronkárosodás, apoptózis), a preklinikai kísérletek elsősorban a redox rendszert befolyásoló, az elsődleges hallóneuronok aktivitására ható valamint az apoptotikus folyamatok szabályozásában résztvevő vegyületek vizsgálatára irányulnak. A neuroprotektív, antioxidáns vagy antiapoptotikus hatással bíró vegyületek vizsgálata során kapott számos ígéretes preklinikai eredmény ellenére jelenleg sincs forgalomban az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal által elfogadott specifikus hallásvédő vegyület, ezáltal az új terápiás lehetőségek feltárása továbbra is szükséges.

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

klínikumban alkalmazott gyógyszerek közül, mint a tumorelles platina vegyületek és az aminoglikozid antibiotikumok, több mint 150 vegyület ismerten ototoxikus hatású. A vegyületek egy része által kiváltott károsodás reverzibilis, azonban jelentős hányaduk alkalmazása irreverzibilis hallásvesztéshez vezethet. 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. Az ismert halláskárosító vegyület körültekintő alkalmazásával, a kezelés időtartama alatt a hallás gyakori monitorozásával mérsékelhető annak ototoxikus hatása.

1.3. Az immunrendszer hallásban betöltött szerepe, immunmodulátorok és lehetséges szerepük

Az említett mechanizmusok mellett az elmúlt években az immunrendszer hallásban illetve a halláskárosodások kialakulásában betöltött szerepével kapcsolatos vizsgálatok a halláskutatás területének fókuszába kerültek. A belsőfület sokáig, mint immunprivilegizált szervet írták le. 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 (*1. ábra*). Aktiválódásuk különböző káros behatások (pl. zajexpozíció, iszkémia, citotoxikus vegyületek, öregedéssel járó degeneratív folyamatok) eredménye.



1. ábra. A Corti-féle szerv felépítésének és a rezidens makrofágok elhelyezkedésének sematikus ábrája. A belfülben található 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 sejsort alkotó belső szőrsejteket (IHC) különböző típusú támasztósejtek veszik körül (IBC, IPhC, IPC, OPC, DC, HC, CC, BC). A rezidens makrofágok elsősorban a stria vascularis (SV), a ligamentum spirale (LS), a spirális limbus (SL) és az SGN-ek területén helyezkednek el. 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

Kimutatták, hogy az immunrendszer nélkülözhetetlen a belfül normál szerkezetének és funkciójának fenntartásában, azonban az immunfolyamatokat aktiváló és gátló faktorok egyensúlyának felborulása a belfül károsodásához, ezáltal különböző típusú SNHL-ek kialakulásához vezet. Az összes SNHL forma hátterében felvetették illetve igazolták már szerepét. 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.

2. Célkitűzés

A vezetésszerű típusú formájával szemben a szenzorineurális halláskárosodások farmakoterápiája nem megoldott. Az igazán hatékony gyógyszeres terápia hiánya szükségessé teszi potenciális hallásvédő vegyületek keresését, továbbá az esetlegesen halláskárosító hatással rendelkező vegyületek ismeretét. Kísérleteink fókuszában olyan vegyületek vizsgálata állt, amelyek hatásmechanizmusuk - különös tekintettel az immunrendszerre kifejtett hatásuk - alapján befolyásolhatják az SNHL-ek kialakulását.

2.1. A selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Célunk annak vizsgálata volt, hogy a neuroprotektív, antiapoptotikus, antioxidáns tulajdonságokkal egyaránt rendelkező, továbbá az immunfolyamatokat is befolyásoló selegilin a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákon, különböző dózisokban alkalmazva, rendelkezik-e otoprotektív hatással a leggyakoribb SNHL forma, az AHL kialakulására mérsékelten (BALB/c) és fokozottan (DBA/2J) érzékeny egértörzsekben.

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

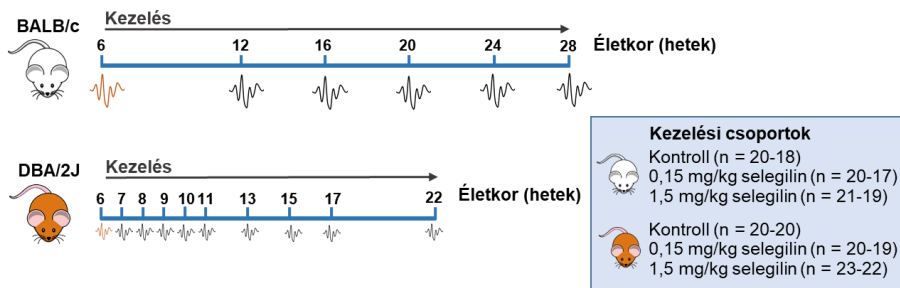
További célunk annak meghatározása volt, hogy a korábbi esettanulmányok során ototoxikus hatást is mutató, az immunrendszer túlaktiválódásához vezető PD-1 gátló immunterápia befolyásolja-e a hallásfunkciót a PD-1 gátlás egyéb szerveket érintő mellékhatásaira korábban érzékenynek bizonyult C57BL/6 egerekben. Ezen túlmenően vizsgálni kívántuk, hogy a PD-1 gátló terápia hatással van-e a belsőfül legérzékenyebb struktúráira illetve a belsőfülben zajló immunfolyamatokra.

3. Módszerek

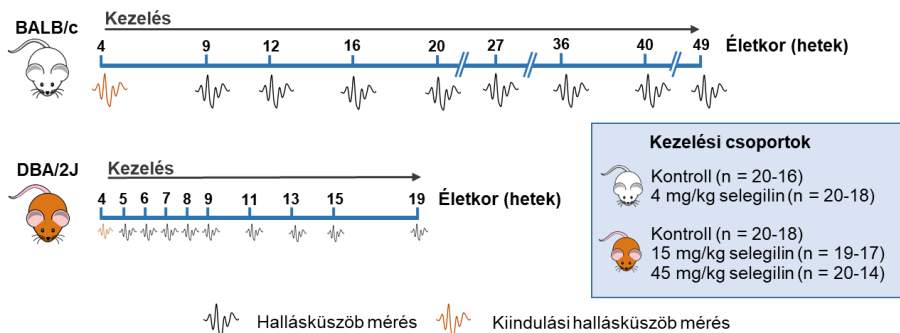
3.1. A selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálata

A selegilin AHL-re kifejtett hatásának vizsgálata hím BALB/c és DBA/2J egereken történt. A magas kiindulási elemszám biztosítása valamint a selegilin szélesebb dózistartományának tesztelése érdekében a kísérleteket két kísérleti alrészben végeztük (Kísérlet I és II; 2. ábra).

Kísérlet I.



Kísérlet II.



2. ábra. Kísérleti beosztás a selegilin időskori halláskárosodásra gyakorolt hatásának vizsgálatára BALB/c és DBA/2J egértörzsekben. A teljes kísérlet két kísérleti alrészből állt. Az

egyres alrészek kezelési csoportjait külön ábrák (kék háttér) jelölik, zárójelben feltüntetve a kiindulási illetve végső elemszámokat.

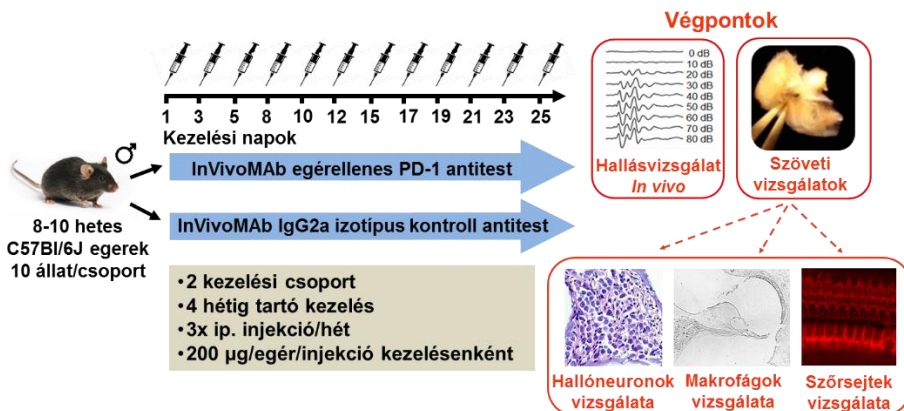
A selegilin adott dózisait (0,15; 1,5; 4; 15 és 45 mg/kg) az állatok per os kapták, az állatok ivóvizében oldva a vegyületet. A vegyület a kísérlet teljes időtartama alatt ad libitum hozzáférhető volt az állatok számára. A kontroll csoportok csapvizet, a selegilin oldószerét kapták.

A kezelési periódus alatt rendszeresen monitoroztuk az állatok hallásfunkcióját. Ennek során a hallás állapotát, a hallásküszöböt és annak változását objektív audiometriával, az auditoros agytörzsi kiváltott válasz (ABR) módszerrel határoztuk meg *in vivo*. Méréseink során a frekvenciafüggetlen click hanginger alkalmazva a hallás általános állapotát vizsgáltuk, a frekvenciaspecifikus tone burst hanginger generálásával pedig a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákat vizsgálva (4-16 kHz) kaptunk információt a hallásküszöb változásáról. A DBA/2J törzs progresszív halláskárosodása következtében az állatok ABR méréseinek gyakorisága meghaladta a BALB/c csoportokét.

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

Kísérletünk során a hallórendszert érintő funkcionális és morfológiai vizsgálatokat végeztünk hím C57BL/6J egereken.

Az 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) (3. ábra).



3. ábra. Kísérleti beosztás a PD-1 gátló immunterápia hallásra kifejtett hatásának vizsgálatára C57BL/6J egerekben.

A 4 hetes kezelési periódust követően ABR méréseket végeztünk (click illetve 4-32 kHz), majd az állatok terminálását követően eltávolítottuk az állatok mindkét cochleáját a belsőfület érintő morfológiai elváltozások valamint az immunaktivitás későbbi vizsgálatának céljából.

A külső (OHC) és belső (IHC) szőrsejtek kvantifikálását a Corti-féle szerv mikrodisszekcióját követő fluoreszcens festési technika segítségével végeztük (Alexa Fluor 594 Phalloidinnel jelölt aktin filamentumok és a DAPI-val megfestett sejtmagok). A preparátumok vizsgálata CCD kamerával felszerelt Leica LMD6 mikroszkóppal történt, epifluoreszcens üzemmódban. Ezen módszer (cochleogram) segítségével frekvenciaspecifikusan nyertünk információt az egyes cochleáris régiók (apikális, középső illetve bazális) szőrsejtjeinek állapotáról.

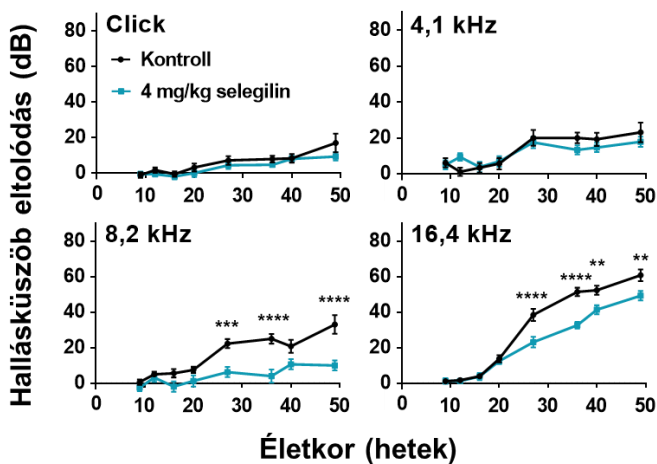
Az SGN-ek sejttestjeinek láthatóvá tételére hematoxylin–eozinnal történő ún. mag–plazma festést alkalmaztunk a cochlea középső tengelyével párhuzamosan készült metszeteken. A metszetek kiértékelése Leica LMD6 mikroszkóppal, átmenőfényes üzemmódban, 40x HC PL Fluotar objektívvel történt. A sejtek számát illetve morfológiáját a cochlea mindhárom kanyarulatában (apikális, középső és bazális) vizsgáltuk.

A belsőfülben zajló immuntörténések vizsgálata során gyakran a cochlea makrofágjainak számában illetve morfológiájában bekövetkező változásokat tanulmányozzák. Az így kapott eredményekből következtetni lehet a belsőfül immunrendszerének aktivitására. A makrofágok számának meghatározását szintén a cochlea középső tengelyével párhuzamosan készült metszeteken végeztük, ionizált kalciumkötő adapter molekula 1 (Iba1) immunhisztokémia alkalmazásával. A metszetek kiértékelése az SGN-ek vizsgálatához hasonlóan Leica LMD6 mikroszkóppal, átmenőfényes üzemmódban, 40x HC PL Fluotar objektívvel történt. A minták független, vak kiértékelését két személy végezte.

4. Eredmények

4.1. A krónikus selegilin kezelés (4 mg/kg) jelentős mértékű védőhatást mutatott a BALB/c állatok időskori halláskárosodásának progressziójával szemben

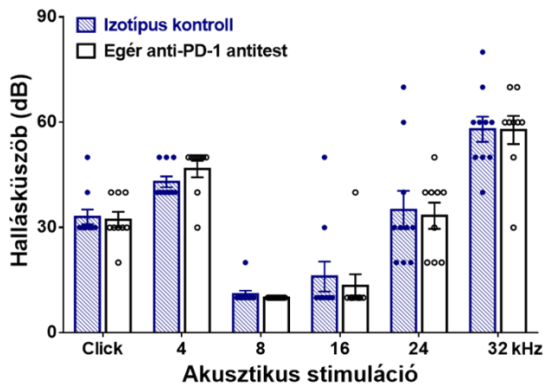
A krónikus selegilin kezelés egyik vizsgált dózisban sem befolyásolta a DBA/2J egértörzs korrall összefüggő halláscsökkenésének progresszióját. Ezzel szemben 4 mg/kg dózisban a magas frekvenciákon jelentősen csökkentette a BALB/c egértörzs hallásromlásának mértékét, az állatok 27 hetes korától kezdődően (4. ábra).



4. ábra. A nagy dóziséjú, krónikus per os selegilin kezelés mérsékelte a BALB/c egértörzs életkorral összefüggő hallásromlását. A hallásküszöb változását ABR módszerrel követtük nyomon az állatok 4-49 hetes életkorában. Az ábrán a kontrollhoz képest mért szignifikáns különbségeket tüntettük fel (kétféltérő ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

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

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, a PD-1 gátló kezelésnek van-e hatása a hallásfunkcióra, különböző akusztikus stimulusokat alkalmazva, PD-1 gátló antitesttel kezelt és izotípus kontroll C57BL/6J egerek hallásküszöb értékeit hasonlítottuk össze. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget sem a frekvenciafüggetlen click hanginger, sem a vizsgált frekvenciák (4-32 kHz) esetén (5. ábra).

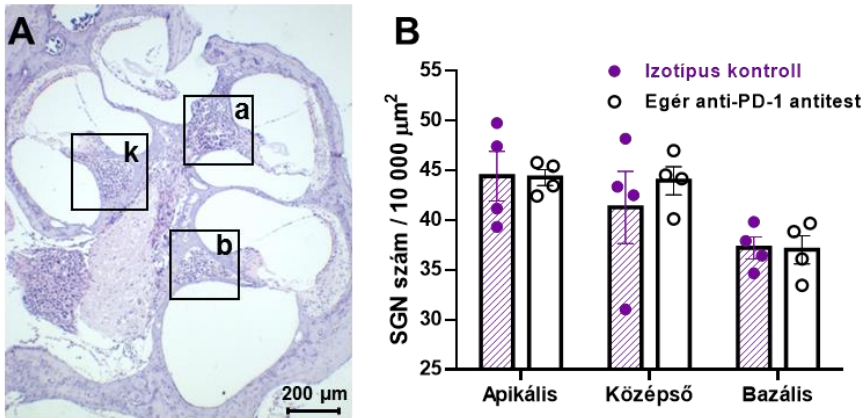


5. ábra. A PD-1 gátló terápia nem befolyásolta a C57BL/6J állatok hallásküszöb értékét. A hallásküszöb értékekben nem mutatkozott különbség sem a frekvenciafüggetlen click hanginger esetén, sem a 4, 8, 16, 24 és 32 kHz-es frekvenciákon az izotípus kontroll (n=10) és az egér anti-PD-1 antitesttel (n=9) kezelt állatok között. Az adatokat átlag ± SEM-ben adjuk meg (kétfázisú ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, *p < 0,05).

4.3. A PD-1 gátló kezelés a spirális ganglionsejtek számát és morfológiáját a cochlea egyik kanyarulatában sem változtatta meg

A hematoxylin-eozinnal festett metszeteken (6/A ábra) egyik cochleáris kanyarulatban sem találtunk eltérést az SGN-ek számát (6/B ábra) illetve

morfológiáját illetően. A neuronok mindkét kezelési csoportban épnek mutatkoztak, degeneráció jelei nem voltak felfedezhetőek.

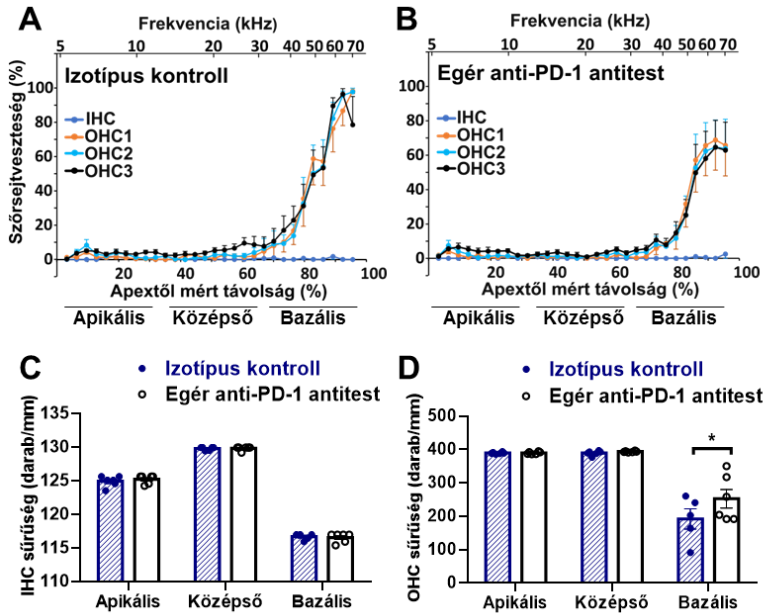


6. ábra. A belsőfül spirális ganglion neuronjainak hematoxylin-eozin festése. (A) 6,3x objektívvel készült reprezentatív felvétel a cochlea keresztmetszetről. A négyzetek a cochlea apikális (a), középső (k) és bazális (b) régiójában elhelyezkedő SGN-eket jelölik. (B) A cochlea 3 régiójában mért SGN sűrűség oszlopdiagramja. Az adatok az átlag ± SEM értékeket ábrázolják. A statisztikai analízis (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, * $p < 0,05$) nem mutatott szignifikáns különbséget a kísérleti csoportok között ($n=4$ egér/csoport, cochleánként 5 metszet átlaga).

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

A PD-1 gátló antitest kezelés nem befolyásolta az ép szőrsejtek számát sem az apikális, sem a középső kanyarulatokban. A 32 kHz-et meghaladó frekvenciák esetében viszont a PD-1 gátló terápiában részesülő állatok mérsékeltebb OHC pusztulást mutattak (7/B ábra), összehasonlítva a kontroll állatokban megfigyelt OHC veszteséggel (7/A ábra). Az apikális, középső és bazális régiók mm-re számított szőrsejtsűrűségeinek statisztikai analízisekor a

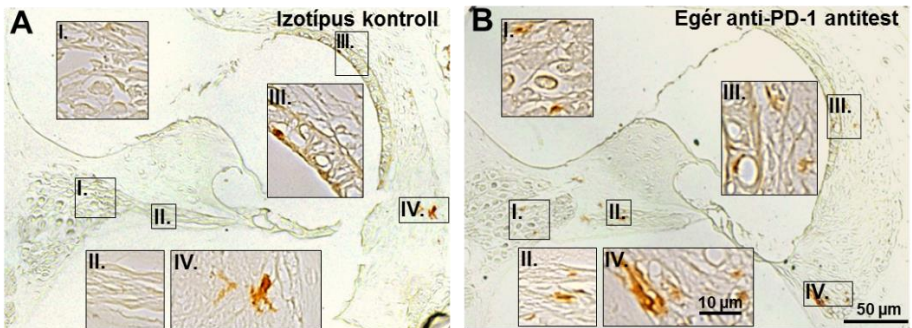
bazális részen megfigyelt eltérés az OHC-k számában szignifikánsnak bizonyult (7/D ábra). Az IHC-k tekintetében egyik régióban sem volt különbség a két csoport között (7/C ábra).



7. ábra. A PD-1 gátló immunterápia a bazális kanyarulatban a külső szőrsejtekre irányuló védőhatást mutatott. A kontroll (A) és az anti-PD-1 antitesttel kezelt (B) állatok ($n = 6$ egér/csoport) szőrsejtpusztulásának mértéke a cochlea csúcsától (apex) mért távolság illetve a frekvenciák függvényében. A 32 kHz-et meghaladó frekvenciákon a C57BL/6J egértörzsre jellemző OHC pusztulás figyelhető meg. Az oszlopdiaagramok 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). Az adatok az átlag \pm SEM értékeket mutatják (kétváltozós ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt, $*p < 0,05$).

4.5. 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.



8. ábra. Reprezentatív felvételek a cochlea bazális kanyarulatában kimutatott makrofágokról. A cochlea bazális régiójában az anti-PD1 antitesttel kezelt csoport (B) erőteljesebb diamino-benzidín (DAB) reakciót, ezáltal 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 sejteinek 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.

5. Következtetések

5.1. A krónikus selegilin kezelés alkalmas terápia lehet a humán AHL bizonyos formáiban, figyelembe véve a genetikai hátteret

Kimutattuk, hogy a krónikus selegilin kezelés a humán szempontból legrelevánsabb frekvenciákon (8-16 kHz), 4 mg/kg dózisban alkalmazva, csökkentette az AHL progresszióját az AHL-re mérsékelten érzékeny BALB/c egértörzsben. Ezzel szemben az AHL-re fokozottan érzékeny DBA/2J egértörzsben a selegilin magasabb dózisokban alkalmazva sem mutatott hallásvédő hatást. Ennek alapján arra következtethetünk, hogy a selegilin AHL-t mérséklő hatása a genetikai háttér függvénye.

5.2. Eredményeink nem igazolták a PD-1 gátló terápia 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 szőrsejtpusztulás 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.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A doktori tézishoz felhasznált saját publikációk jegyzéke

1. 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.
2. 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.
3. 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.

6.2. A doktori tézistől független saját publikációk jegyzéke

1. 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.

2. Daniel Balazs Fulop, Viktoria 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.

3. 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.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Zelles Tibornak és Dr. Szirmai Ágnesnek, akik szakmai tudásukkal elősegítették fejlődésemet és akiknek segítségével nélkül 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 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 és kivitelezésében.

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 elsajátításához 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 terápiás 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, a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítvány és a Prof. Dr. Romics László Akadémikus Emlékére Alapítvány támogatta.