

**PACAP (hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid)
hatásának vizsgálata a belső fülben *in vitro* és *in vivo*
kísérletekben**

Doktori (Ph. D.)-értekezés

Dr. Németh Adrienn Katalin

Anatómiai Intézet

Fül-Orr-Gége és Fej-Nyaksebészeti Klinika

Témavezetők: Dr. Tamás Andrea, egyetemi docens
Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Programvezető: Dr. Csernus Valér, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Lénárd László, egyetemi tanár



Pécsi Orvostudományi Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet

2015

Tartalom

| | |
|---|----|
| I. BEVEZETÉS | 1 |
| 1.1. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) | 1 |
| 1.2. A PACAP hatásai | 2 |
| 1.3. A PACAP-génhiányos egerek | 4 |
| 1.4. A belső fül felépítése emberben és emlősökben..... | 6 |
| 1.5. A madarak és az emlősök belső fülének összehasonlítása | 10 |
| 1.6. A PACAP előfordulása a hallórendszerben..... | 12 |
| 1.7. Apoptózis a belső fülben, aminoglikozid antibiotikumok által okozott belső fül károsodás | 13 |
| 1.8. A Ca ²⁺ -kötő fehérjék | 15 |
| II. CÉLKITŰZÉSEK..... | 17 |
| III. KÍSÉRLETEK..... | 18 |
| 3.1. PACAP protektív hatásának vizsgálata oxidatív stressz-indukálta apoptózis modellben csirke cochleáris sejtkultúrában in vitro | 18 |
| 3.1.1. Anyagok és módszerek | 18 |
| 3.1.2. Eredmények | 19 |
| 3.2. Endolympha összetételének vizsgálata csirkékben szisztémás PACAP kezelést követően | 21 |
| 3.2.1. Anyagok és módszerek | 21 |
| 3.2.2. Eredmények | 22 |
| 3.3. PAC1 receptor és Ca ²⁺ -kötő fehérjék vizsgálata vad típusú és PACAP- génhiányos egerek belső fülében fiziológias körülmények között és kanamycin-indukálta ototoxicitást követően..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1. Bevezetés | 24 |
| 3.3.2. Kísérleti állatok..... | 24 |
| 3.3.3. Kezelési protokoll..... | 25 |
| 3.3.4. Szöveti feldolgozás | 25 |
| 3.3.5. Immunhisztokémiai metszetek kiértékelése | 26 |
| 3.3.6. Eredmények | 27 |
| IV. MEGBESZÉLÉS | 39 |
| 4.1. A PACAP antiapoptotikus hatása a belső fülben | 39 |
| 4.2. Exogén PACAP kezelés hatása az endolympha fehérje összetételére | 41 |
| 4.3. Vad típusú és PACAP-génhiányos egerek belső fülének összehasonlító vizsgálata | 44 |
| 4.3.1. PAC1 receptor expressziójának összehasonlító vizsgálata..... | 47 |
| 4.3.2. Ca ²⁺ -kötő fehérjék expressziójának összehasonlító vizsgálata..... | 47 |
| 4.3.3. Kanamycin-indukálta ototoxikus hárosodás vizsgálata vad típusú és PACAP-génhiányos egerekben | 50 |
| V. ÖSSZEGZÉS..... | 56 |
| VI. IRODALOM | 57 |
| 6.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények | 57 |
| 6.2. Ábrák forrás listája..... | 75 |
| VII. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK | 76 |
| VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS..... | 78 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIF: apoptózis indukáló faktor

ANOVA: analysis of variance - variancia analízis

ApoD: apolipoprotein D

ApoJ: apolipoprotein J

ATP: adenzin-trifoszfát

Bad: Bcl-2 család tagja - apoptózis regulátor (Bcl-2-associated death promoter)

Bax: Bcl-2 család tagja - X protein

BALB/c: laboratóriumban kitenyésztett, albínó házi egér törzs

Bcl-2: B-cell lymphoma 2 - apoptózis regulátor

Bcl-xL: B-cell lymphoma extra large - Bcl-2 család tagja, apoptózis regulátor

BM: membrana basilaris

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

CCD: charge-coupled device, töltés-csatolt eszköz

CREB: cAMP reszponzív elem-kötő protein (cAMP responsive element binding protein)

DAG: diacilglicerin

DCs: Deiters-féle támasztó sejtek

DMEM/FCS: Dulbecco által modifikált Eagle médium, mely 10% embrionális borjú szérumot tartalmaz

DPOAE: distortion product otoacoustic emissions

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay - enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

FBS: foetalis borjú szérum

GDNF: glia sejt által termelt neurotrófikus faktor

GLAST: glutamát aszpartát traszporter

H₂O₂: hidrogén-peroxid

IHC: belső szőrsejtek

IP₃: inozitol trifoszfát

IPC: belső pillérsejt

JNK: c-Jun N-terminális kináz

Kaspáz-3: ciszteinil aszpartát specifikus proteáz (cisteinyl aspartate-specific protease)

KM: kanamycin

KO: knock out

MALDI TOF: matrix-assisted laser desorption ionization time of flight

MAPK: mitogén aktiválta protein kináz

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid

NGS: normál kecske szérum

NMDA: N-methyl-D-aszpartát sav

OCP: organ of Corti protein

OHCs: külső szőrsejtek

OPC: külső pillérsejt

PACAP: hipofízisis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid

PAC1 receptor: PACAP specifikus transzmembrán G-protein receptor

PBS: NaCl tartalmú foszfátpuffer

PC12: pheocromocytoma sejtvonal

PKA: protein kináz A

PLC: foszfolipáz C

p38MAPK: p38 mitogén-aktivált protein kináz

ROS: reaktív oxigéngyökök/reaktív szabadgyökök

SDS: nátrium dodecil szulfát

S: rövid szőrsejtek

S.E.M.: standard error of the mean

T: hosszú szőrsejtek

TM: membrana tectoria

Ttg: testtömeg-gramm

VPAC: PACAP-ot és VIP-t azonos affinitással kötő G-protein receptor

VIP: vazóaktív intestinalis peptid

I. BEVEZETÉS

1.1. A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid egy neuropeptid, amelyet 1989-ben birka hipotalamuszból izoláltak azon hatása kapcsán, hogy hipofízis sejt kultúrákban serkentette a sejtek adenilát-cikláz aktivitását (Miyata et al. 1989). A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis peptid (VIP) család tagja, és ez utóbbival 68%-os hasonlóságot mutat (Vaudry et al. 2009). A polipeptid a szervezetben két aktív formában van jelen, egy 27 aminosavas (PACAP27) és egy 38 aminosavas (PACAP38) forma létezik, melyek közül az utóbbi a domináns.

A PACAP-ot először a központi idegrendszerben, például a hipotalamuszban, az agykéregben, a bazális ganglionokban és az agytörzsben (Arimura et al. 1991; Hannibal 2002) azonosították. Ezt követően a perifériás idegrendszerben is kimutatták, ahol PACAP-immunreaktivitás detektálható a spinális ganglionok kis érzőidegsejtjeiben, valamint a vegetatív pre- és postganglionáris neuronokban (Köves et al. 1990). Mára a PACAP jelenlétét leírták szinte minden szervben, többek között különböző endokrin mirigyekben, a kardiovaszkuláris rendszerben, az urogenitális szervrendszerben és a légzőrendszerben is (Vaudry et al. 2009).

A PACAP receptorait két G-proteinhez kötött receptor családba soroljuk. A PAC1 receptor szelektíven közvetíti a PACAP hatását, míg a VPAC receptor családba tartozó VPAC1 és VPAC2 receptorok egyforma affinitással kötik a VIP-t és a PACAP-ot (Vaudry et al. 2009). A receptorok hét transzmembrán doménből állnak, ehhez kapcsolódik a receptor intracelluláris doménje, amely a jel továbbításáért felel a megfelelő G-protein megkötésével. A PAC1 receptorokon belül számos variáns is ismerünk. Ezeket az különbözteti meg egymástól, hogy a 3. intracelluláris karon az adott receptor tartalmaz-e úgynevezett „hip” és „hop” szekvenciákat. Ezek alapján megkülönböztethető PAC1R-hip, -hop1, -hop2, -hiphop1, -hiphop2, valamint ilyen szekvenciákat nem tartalmazó short variáns (Arimura 1998).

A PACAP receptorok szinte minden szervben expresszálnak, azonban az altípusok eloszlása szervrendszerenként változó. PAC1 receptor mutatható ki többek között a központi és a perifériás idegrendszerben, az endokrin mirigyekben, a gonádokban, a placentában, a nyirokszervekben, az emésztőrendszerben és a retinában is (Filipsson et al. 1998; Joo et al. 2004; Hashimoto et al. 1996; Vaudry et al. 2009). VPAC receptor a központi idegrendszer mellett a tüdőben, a májban, a lépben, az emésztőtraktusban, a csecsemőmirigyben és a petefészekben található meg (Joo et al. 2004; Vaudry et al. 2009).

1.2. A PACAP hatásai

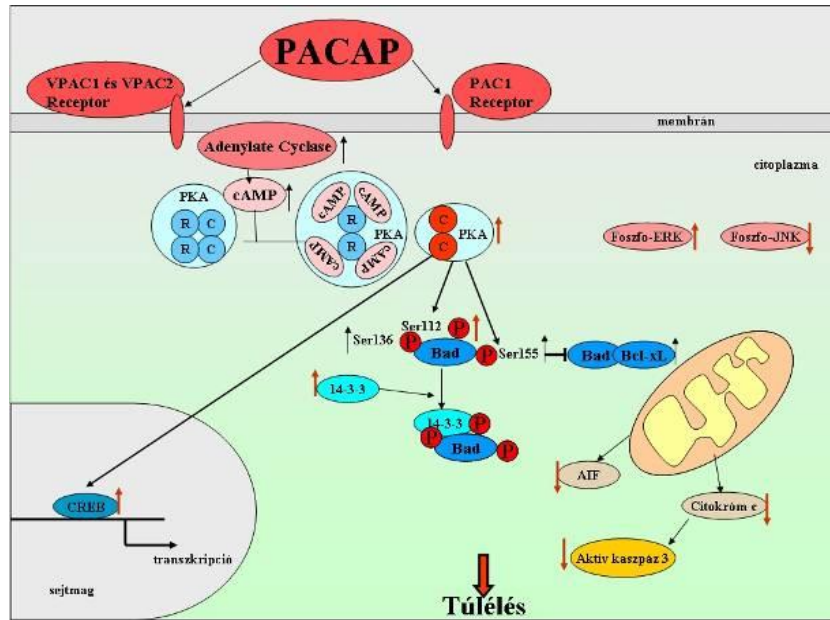
A PACAP széleskörű élettani hatásokkal rendelkezik, ugyanis befolyásolja szinte az összes szervrendszer működését. Többek között szerepet játszik az endokrin mirigyek, a kardiovaszkuláris rendszer, a hipotalamusz hő- és táplálkozást irányító központjainak és a circadián ritmusnak a szabályozásában is (Arimura 1998; Vaudry et al. 2009).

Általános élettani hatásai közül kiemelendő neuroprotektív és neurotrófikus hatása, mivel segíti a neuronok növekedését és differenciálódását, valamint védi a neuronokat különböző károsító hatásokkal szemben, mint például 6-hidroxidopamin, etil-alkohol, oxidatív stressz, anizomicin károsodás (Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004; Ravni et al. 2006; Botia et al. 2007; Vaudry et al. 2009; Nakamachi et al. 2011; Reglődi et al. 2011). A neuroprotektív hatásán kívül általános citoprotektív hatása is ismert, ugyanis az idegsejteken kívül többek között az endothelsejteket, a szívizomsejteket, a vesesejteket és a belsejteket is védi károsító hatásokkal szemben (Gasz et al. 2006; Rácz et al. 2007; Szakály et al. 2008, 2010; Ferencz et al. 2010a, b; Horváth et al. 2010).

A PACAP receptorok száma és az endogén PACAP szintje is megnő globális és fokális agyi ischaemia esetén (Gilliardon et al. 1998; Shin et al. 2001; Stumm et al. 2007; Riek-Burchardt et al. 2010), traumás agyi sérüléskor, valamint számos idegrendszeri érintő károsodás esetén, amely az endogén PACAP védő hatását igazolja (Larsen et al. 1997; Moller et al. 1997; Zhang et al. 1998; Zhou et al. 1999, Tamás et al. 2012). Az endogén PACAP protektív szerepére utal az is, hogy homo- és heterozigóta PACAP-

génhiányos valamint vad-típusú egerek azonos mértékű károsítása esetén, a homo- és heterozigóta egerekben jóval nagyobb elváltozás jön létre, mint vad társaikban (Reglődi et al. 2012). Más vizsgálatok az exogén PACAP protektív hatását mutatták ki különböző idegrendszeri sérülések során, ugyanis ischaemiás és traumás agyi károsodások kapcsán, retinális károsodásban, valamint neurodegeneratív betegségeket (Parkinson-kór, Huntington-kór, Alzheimer-kór) modellező állatkísérletekben is csökkentette a PACAP kezelés az idegrendszeri károsodás mértékét (Reglődi et al. 2002, 2004, 2011; Tamás et al. 2002, 2006, 2012; Armstrong et al. 2004, 2008; Dejda et al. 2005, 2008; Rácz et al. 2006; Atlasz et al. 2007, 2010; Brenneman 2007; Ohtaki et al. 2008; Seki et al. 2008; Bourgault et al. 2009; Nakamachi et al. 2010; Szabadfi et al. 2010, 2012, 2014).

A PACAP neuroprotektív hatásának hátterében antiinflammatorikus, antioxidáns és antiapoptotikus hatása feltételezhető. A PACAP antiinflammatorikus hatása következtében képes csökkenteni a gyulladásos citokinek expresszióját és a mikroglia sejtek aktivációját az idegrendszerben (Delgado 2002; Delgado et al. 2003, 2004; Yang et al. 2006), de gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatását kimutatták már más szervekben is, például vese és bél ischaemiás károsodása kapcsán (Riera et al. 2001; Ferencz et al. 2009, 2010a, b). A PACAP antiapoptotikus hatásának hátterében számos molekuláris biológiai útvonalat térképeztek fel. A PACAP képes gátolni a sejtelhalást a proapoptotikus faktorok gátlásával, mint például a c-Jun N-terminális kináz (JNK), kaszpáz-3, p38 mitogén-aktivált protein kináz (p38 MAPK), apoptózis indukáló faktor (AIF) és a Bcl család proapoptotikus tagjai: Bax és Bad aktivitásának csökkentésével, valamint képes gátolni a citokróm c felszabadulást a mitokondriumokból. A PACAP emellett aktiválja az antiapoptotikus faktorok foszforilációját, mint Bcl-2, extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK1/2), 14-3-3 fehérje és Akt (Vaudry et al. 2002, 2005; Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004; Rácz et al. 2006) (1. ábra).



1. ábra: A PACAP lehetséges in vivo molekuláris hatásmechanizmusa glutamát-indukálta retinális károsodásban. Forrás: Reglódi 2009

1.3. A PACAP-génhiányos egerek

A PTE Anatómiai Intézetében több éve folynak kísérletek homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerekkel, amelyekkel lehetőség nyílik az endogén PACAP teljes vagy részleges hiányában létrejövő elváltozások tanulmányozására fiziológias és patológias körülmények között (Hashimoto et al. 2001). A homozigóta PACAP-génhiányos csoportba tartozó egerek a PACAP mutált génjével rendelkeznek (az 5. exonban található egy mutáció), ezért nem fejeződik ki a PACAP, a heterozigóta PACAP-génhiányos állatok pedig csak hordozzák a mutált gént, ezért a PACAP, ugyan a fiziológiásnál kisebb mértékben, de képes expresszálni a szervezetükben.

A homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos és a vad-típusú egerek szerveinek makroszkópos és morfológiai összehasonlító vizsgálata során nem látható markáns különbség a két csoport között, azonban finom morfológiai vizsgálómódszerekkel (immunhisztokémia, elektronmikroszkópia), valamint funkcionális tesztek segítségével jelentős különbségek mutathatók ki. A PACAP-génhiányos egerek memóriazavarokkal, magatartászavarokkal, normálistól különböző élettani funkciókkal - eltérő stressz válasz,

hőmérséklet szabályozás, napi ritmus reguláció; metabolikus eltérések, emelkedett inzulin érzékenység és halálozási arány; csökkent szaporodási képesség - rendelkeznek (Hashimoto et al. 2001, 2009; Matsuyama et al. 2003; Cummings et al. 2004; Tomimoto et al. 2008; May és Vizzard 2010; Reglődi et al. 2012).

Az endogén PACAP védő szerepére enged következtetni az is, hogy azonos mértékű károsító hatásra a homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben jóval nagyobb elváltozás jön létre különböző szerveket érintő károsodás esetén, mint vad társaikban. A PACAP-génhiányos állatok szignifikánsan nagyobb léziót szenvednek agyi ischaemia esetén és axonális károsodás során (Reglődi et al. 2012). Szintén fokozottabb a retinális károsodás a PACAP-génhiányos egerekben kétoldali arteria carotis leköttét követően, valamint excitotoxikus lézió után vad-típusú állatokhoz viszonyítva. Az idegrendszeri léziók mellett vizsgálták az endogén PACAP szerepét vesekárosodásban, inflammatorikus és ischaemiás intestinalis sérülésekben, valamint toxikus hasnyálmirigy és szívizomsejt károsodás esetén is, ahol az endogén PACAP hiánya súlyosabb elváltozások kialakulásához vezetett (Vaudry et al. 2005; Chen et al. 2006; Ohtaki et al. 2006; Tan et al. 2009; Nakamachi et al. 2010; Ferencz et al. 2010a; Endo et al. 2011; Szakály et al. 2011; Reglődi et al. 2012; Szabadfi et al. 2012; Tsuchikawa et al. 2012). A homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek károsító hatásokra fellépő fokozott sérülékenységének hátterében a megnövekedett apoptózis, gyulladásozó reakció és oxidatív stressz feltételezhető (Reglődi et al. 2012).

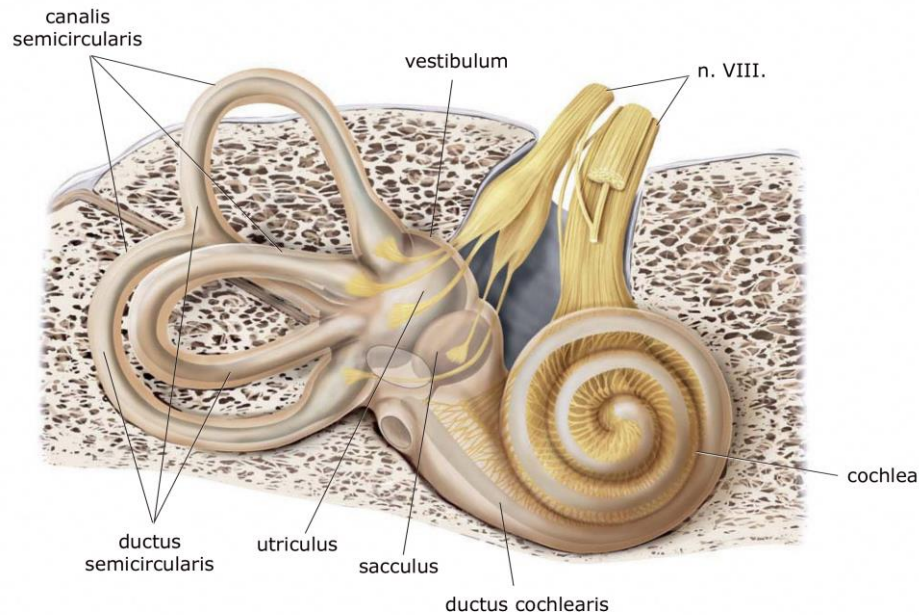
1.4. A belső fül felépítése emberben és emlősökben

A belső fület a csontos és a hártvás labyrinthus, valamint a VIII. agyideg (nervus vestibulocochlearis) végelágazódásai és dúcai alkotják. A belső fülben egymáshoz kapcsolódóan találjuk az egyensúlyrendszer és a hallórendszer érzékszerveit. A halántékcsontról sziklacsontra részében található bonyolult üregrendszer a csontos labyrinthus, melyben található a hártvás labyrinthus, amely szerkezete hasonló, de jóval bonyolultabb a csontos labyrinthushoz képest. A hártvás labyrinthusban elhelyezkedő folyadékteret endolymphának, az ezt körülvevő folyadékteret pedig perilymphának nevezzük.

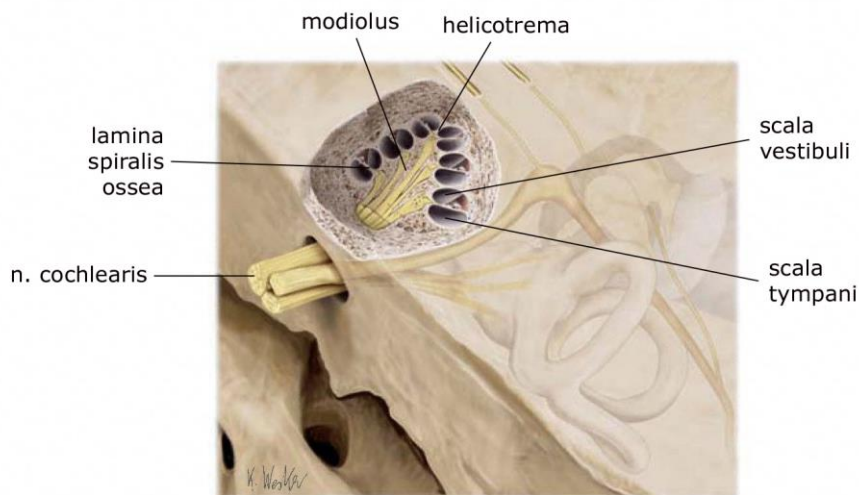
A csontos labyrinthus központi részéből (vestibulum) indul ki a három félkörös ívjárat (canales semicirculares ossei) és a cochlea (2. ábra). A hártvás labyrinthus részei a vestibulumban elhelyezkedő utriculus és sacculus, valamint a 3 ductus semicirculares és a cochleában található hártvás csiga (ductus cochlearis) (2. ábra). A cochlea tengelye kúp alakú, üreges képződmény, a modiolus, ebben hosszanti járatok találhatóak a hallóideg és a csiga ereinek továbbvezetésére (3. ábra). A modiolus körül tekeredik a csiga járata, amely közepének megfelelően halad egy csontos lemez, a lamina spiralis ossea, mely a hártvás csigával kiegészülve a csigajáratot két további részre, a csúcs felé eső scala vestibulira, valamint a bázis felé eső scala tympanira osztja. A csúcsi részben az előbb említett két scala közlekedik egymással, ezt a részt helicotremanak nevezik (3. ábra). A lamina spiralis ossea tövénél, a modiolusban egy háromszög átmetszetű csatorna halad, melyben a hallóideg spirális dúca, a ganglion spirale helyezkedik el (4. ábra).

A lamina spiralis ossea széléről (limbus) kettő hártvás lemez feszül ki a csiga oldalához, amelyek a ductus cochlearis falát alkotják. A limbus felső ajkához a paries vestibularis (Reissner membrán) rögzül, az alsó ajkáról pedig a lamina basilaris ered, melyen a tulajdonképpeni hallószerv helyezkedik el (4. ábra). A halló érzékszervet (organum spirale, Corti-féle szerv) különböző típusú támasztó sejtek és szekunder érzékszertípusú neuroepitheliumsejtek alkotják. A Corti-féle szerv harántmetszetén egy spirális járat, a Corti-féle alagút helyezkedik el, amelyet két, egymással homorú ívet képező sejt határol, ezek a pillérsejtek. A modiolushoz közelebb elhelyezkedőt belső

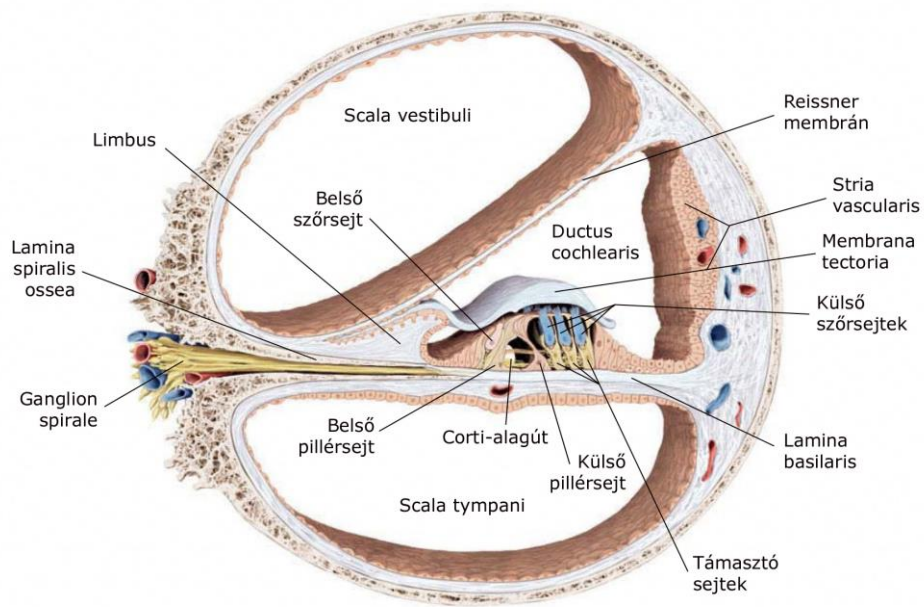
pillérsejtnak, a távolabbit külső pillérsejtnak nevezzük. A belső pillérsejttől mediálisan egy sorban a belső szőrsejtek, a külső pillérsejttől laterálisan pedig három sorban a külső szőrsejtek, alattuk pedig a támasztósejtek helyezkednek el. Az egész spirális érzékszerv felett egy vaskos hártya, a membrana tectoria lebeg, illetve a szőrsejtek csúcsán támaszkodik. A ductus cochlearis oldalsó falát dús, érfonatot tartalmazó köbhám borítja, a stria vascularis, amely az endolympa termelésében játszik szerepet (4. ábra) (Szentágothai és Réthelyi 2002).



2. ábra: A csontos és hártyás labirintus (Thieme 2007)



3. ábra: A csontos csiga felépítése (Thieme 2007)



4. ábra: A ductus cochlearis felépítése (Thieme 2007)

A csigában három folyadéktér különíthető el: perilympha, endolympha és Corti-lympha. Perilympha tölti ki a scala tympanit és a scala vestibulit, a két scala folyadéktere a helicotrémánál közlekedik egymással. A Corti-alagutat Corti-lympha tölti ki (3., 4. ábra). A perilympha és a Corti-lympha összetétele az extracelluláris folyadék, illetve a

liquor összetételéhez hasonlít: magas a Na^+ tartalma és alacsony a K^+ szintje. A ductus cochlearis endolympht tartalmaz, amit a stria vascularis és a támasztósejtek termelnek. A stria vascularis alatti megvastagodott periosteum, melyet ligamentum spirale-nak is neveznek, a perilympa fehérjék endolymphába való bejutásában és a K^+ transzportban játszik szerepet (Thalmann et al. 1992; Spicer és Schulte 1996). Az endolympa az intracelluláris térhez hasonlóan gazdag K^+ -ban és szegény Na^+ -ban. Az endolympa és a perilympa fehérje összetétele nagyon hasonló. A perilympa főleg prealbumint, albumint, α_1 -antitripszint, α_1 -antikimotripszint, transzferrint, β_2 -transzferrint tartalmaz (Arrer et al. 1988). Az endolympában identifikált fehérjék: albumin, α -kimotripszin, α -antitripszin, α -HS-glükoprotein, transzferrin, ApoD, ApoJ, fetuin (Thalmann et al. 2006).

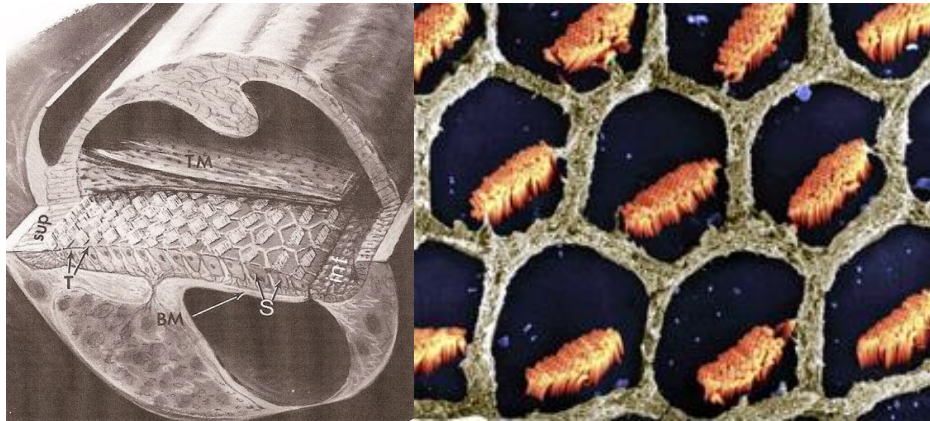
A szőrsejtek két folyadékteret választanak el egymástól, bázisuk a perilympával érintkezik, a stereociliumok pedig az endolympa térbe nyúlnak bele. Az endo- és a perilympa között elektromos potenciál különbség van. Hang hatására a perilympa rezgései a membrana basilaris alakváltozásához vezetnek. A belső szőrsejtek ciliumai nincsenek beágyazva a membrana tectoriaába, úgy tűnik, hogy ezeket a membrana tectoria és az alatta lévő szőrsejtek közötti folyadék mozgása hajlítja, a külső szőrsejtek stereociliumai viszont a membrana tectoria állományába ágyazottan helyezkednek el. Hang hatására a szőrsejteken lévő stereociliumok a limbustól elfelé, sugárirányba mozdulnak el, ekkor a mechano-szenzitív kation csatornák megnyílnak, ellenkező irányba történő mozgás esetén pedig záródnak. Depolarizáció hatására a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák megnyílnak, és Ca^{2+} áramlik be az endolympából a belső szőrsejtekbe transzmitter leadást okozva (glutamát), a külső szőrsejtekben pedig aktiválja a citoszkeletont (Fonyó 2011). A külső szőrsejtek aktin rostokat tartalmaznak, és aktív összehúzódásra képesek a prestin motor molekula révén. Ezek alapján úgy gondolják, hogy a külső szőrsejtek modifikálni képesek a belső szőrsejtek működését mechanikai, indirekt módon (Pytel 1996).

1.5. A madarak és az emlősök belső fülének összehasonlítása

A madarak belső fülében a hártvás és a csontos labirintus egyaránt fejlett. Az emlősökéhez hasonlóan három félkörös ívjárat van, ezeknek megtalálhatjuk tágult szakaszait, az ampullákat is, valamint fellelhető az utriculus és a sacculus is. Ezen utóbbihoz csatlakozik a ductus reuniens keresztül a ductus cochlearis, azonban az emlősök feltekeredett ductus cochleariséval szemben ez nem csiga alakú, hanem egy gyengén hajlott cső (5. ábra). Benne a Corti-szervnek megfelelő, de azzal nem megegyező felépítésű úgynevezett érzékdomb helyezkedik el (6. ábra). A madarak ductus cochlearisa rövidebb, mint az emlősöké, azonban érzéksejt sűrűsége nagyobb (6. és 7. ábra). Lényegében az emberhez hasonló tartományban hallanak, legjobban az 1000-6000 Hz közötti hangokat érzékelik. Lényeges különbség a madarak és emlősök szőrsejtjei között, hogy a madarak szőrsejtjei regenerációra képesek, ugyanis a madarak pótolni tudják a zaj vagy más toxikus ártalom hatására elpusztult szőrsejtjeiket. A károsodás következtében a madarak támasztósejtjei differenciálódásra képesek, megváltoztatják gén expressziójukat, és szőrsejteké alakulnak át (Cotanche és Kaiser 2010).



5. ábra: A madarak (bal) és az emlősök (jobb) hártvás labirintusa
(Forrás: www.bio.purdue.edu; www.med.unc.edu)



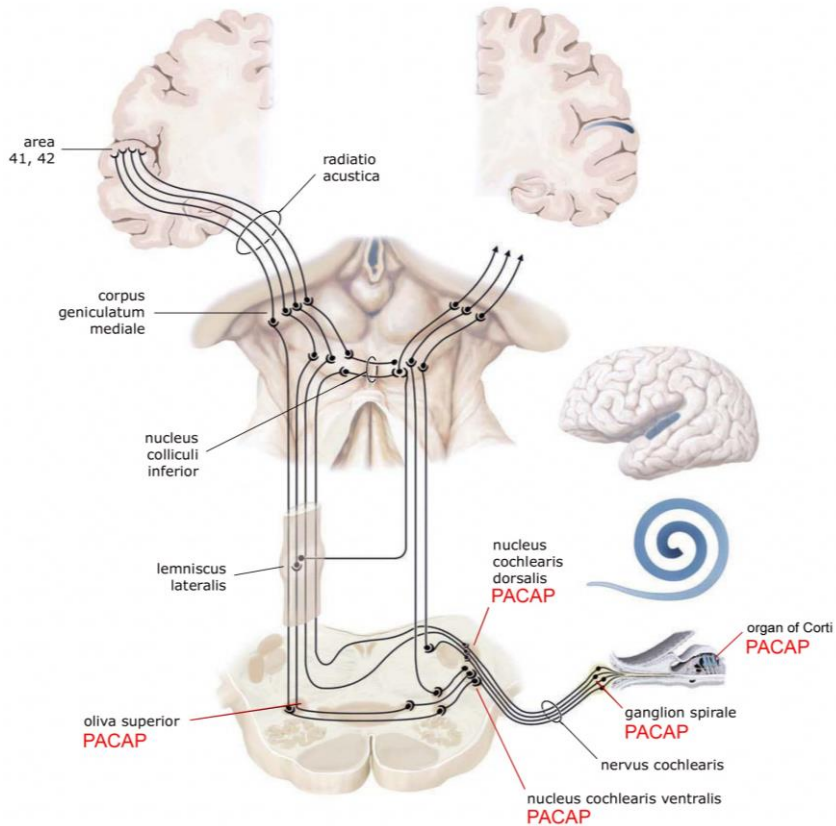
6. ábra: Madarak cochleájának átmetszete bal oldalon: BM-membrana basilaris, TM-membrana tectoria, S-rövid szőrsejtek, T-hosszú szőrsejtek
 (Forrás: <http://people.eku.edu/ritchison/birdbrain2.html>)
 Jobb oldalon a szőrsejtek scanning elektronmikroszkópos képe
 (Forrás: Read.uconn.edu)



7. ábra: Bal oldal: Emlősök cochleájának átmetszete, a ductus cochlearisban látható a Corti-féle szerv
 (Forrás: www.hearnet.com)
 Jobb oldal: a scanning elektronmikroszkópos képen a külső szőrsejtek három, a belső szőrsejtek egy sorban helyezkednek el
 (Forrás: www.scripps.edu)

1.6. A PACAP előfordulása a hallórendszerben

A PACAP-ot kimutatták a halló szervrendszer különböző részeiben. Korábban PACAP immunpozitív sejteket találtak immunhisztokémiai vizsgálatokkal és in situ hibridizációval az agytörzsi cochleáris magvakban és az oliva superiorban, ahol a PACAP a sejtek megközelítőleg egyharmadában jelen van és neurotransmitterként funkcionál (Kausz et al. 1999; Hannibal 2002; Reuss et al. 2009) (8. ábra). Kimutatták továbbá a ganglion spirale és a stria vascularis marginalis sejtjeiben (Kawano et al. 2001). Más kísérletekben a PACAP prekursor fehérjéjének mRNS-ét, valamint a PAC1 receptor mRNS-ét mutatták ki a következő képletekben: stria vascularis, ganglion spirale, belső és külső szőrsejtek, pillérsejtek, támasztósejtek (Abu-Hamdan et al. 2006), ahol mennyiségük a basalis kanyarulattól a csúcsig nő (Drescher et al. 2006). A PACAP és a PAC1 receptor halló szervrendszerben betöltött szerepéről keveset tudunk, azonban ismert, hogy fontos szerepet játszik a hallás afferenciájának modulálásában (Drescher et al. 2006). Az a tény, hogy a PACAP és a PAC1 jelen van a stria vascularisban, közel az endolymphatikus térhez, azt sugallja, hogy a PACAP-nak szerepe lehet az endolympha termelésében, potenciáljának és/vagy összetételének szabályozásában is (Abu-Hamdan et al. 2006).



8. ábra: A hallópálya felépítése és a PACAP előfordulása a hallópálya különböző részein (Thieme 2007)

1.7. Apoptózis a belső fülben, aminoglikozid antibiotikumok által okozott belső fül károsodás

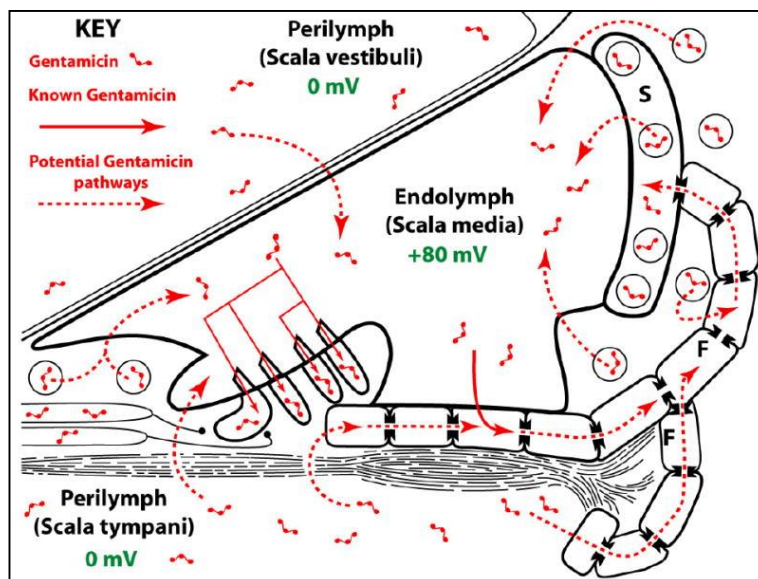
Az apoptózisnak fontos szerepe van a belső fül normál érése és az oxidatív stressz által károsodott sejtek cochleából történő eltávolítása során is (Huang et al. 2000). A megnövekedett apoptózis belső fül károsodáshoz, hallásvesztéshez vezet. Fokozott sejthalált okozhat a belső fülben a túlzott zajterhelés, fertőzések, illetve öröklött betegségek, autoimmun és öregedéssel járó folyamatok (Yehoash 2002). Apoptózist okozhat még az esszenciális növekedési faktorok hiánya és különböző exogén toxinok, mint például a cisplatin és az aminoglikozid antibiotikumok.

Az aminoglikozid antibiotikumokat a klinikai gyakorlatban multirezisztens Gram-negatív bakteriális fertőzésekben alkalmazzák, bár használatát mellékhatásai korlátozzák: toxikus hatású a belső fülre, vesére, idegrendszerre (Rybak és Withworth 2005). Míg a vesekárosodás általában reverzibilis (Hock és Anderson 1995), a belső fül károsodás maradandó (Greenwood 1959). Általában az aminoglikozidok irreverzibilis károsodást okoznak mind a vestibuláris, mind a cochleáris részén a belső fülnek, azonban míg egyesek elsősorban vestibulo-toxikusak: gentamycin, tobramycin, mások főleg cochleo-toxikus hatással rendelkeznek: neomycin, amikacin, kanamycin (Matz 1993; Rizzi és Hirose 2007). Az ototoxicitás klinikai tünetei: bilaterális, magas frekvenciákon kezdődő irreverzibilis idegi halláscsökkenés, fülzúgás, szédülés, nystagmus, hányinger, hányás. Kihasnálva a gentamycin vestibulo-toxicitását, a klinikai gyakorlatban széles körben használatos a Ménière betegség terápiájában, intratympanalis injekció formájában (Kaplan et al. 2000).

Szisztémás alkalmazás során az aminoglikozid antibiotikum bejut a sejtekbe, majd ki is ürül. Mivel ezek pozitív töltésű, vízdékony molekulák, melyek nehezen jutnak át a lipid membránokon, endocitózis útján vagy a nem szelektív kation csatornákon keresztül jutnak be a sejtekbe. Azonban vannak olyan sejtek, mint például a belső fül szőrsejtjei és a vese proximális tubulusainak sejtjei, melyek hajlamosak visszatartani az aminoglikozid antibiotikumokat. A feltételezett halláskárosító folyamat valószínűleg a következő lépéseken keresztül jön létre: 1. az antibiotikum bejut az endolymphába, 2. endocitózissal vagy a nem specifikus kation csatornákon keresztül bejut a szőrsejtbe az apikális részükön, 3. reaktív oxigéngyököket generálnak, megemelik a sejt Ca^{2+} szintjét, és befolyásolnak más sejten belüli jelátviteli útvonalakat (Halliwell és Gutteridge 1990; Kopke et al. 1997; Hirose et al. 1999; Dehne et al. 2000; Li és Steyger 2009) (9. ábra).

Szőrsejtkárosodást okozó apoptózisnak két formája ismert: a halál-receptorok által mediált extrinsic útvonal, beleértve a tumor nekrosis faktor családot (Huth et al. 2011), és a mitokondrium által mediált intrinsic útvonal (Rybak és Withworth 2005), amelyek végül kaszpáz aktiváción keresztül a sejtek pusztulásához vezetnek (Cheng et al. 2005).

A belső fül kutatás egyik fő iránya az említett károsodások vizsgálata, valamint az olyan anyagok keresése, melyekkel ezek a károsodások kivédhetők. Számos bízató terápia ágens tanulmányoztak már ototoxikus károsodás ellen, például antioxidáns gyógyszereket, antiapoptotikus stratégiákat, de ezek hatékonyságát eddig csak állatkísérletekben sikerült igazolni (Seidman és Vivek 2004; Rybak és Whitworth 2005; Poirrier et al. 2010).



9. ábra: Az ábra a gentamycin szörsejtbe való lehetséges bejutását mutatja, annak az endolymphával határos részén. Az aminoglikozidok bejuthatnak az endolymphába a laterális fal kapillárisain keresztül vagy közvetlenül a perilymphából (Li és Steyger 2009).

1.8. A Ca^{2+} -kötő fehérjék

A szörsejtek normális működéséhez az endolymph megfelelő Ca^{2+} koncentrációja szükséges, melyet a szörsejtekben található Ca^{2+} -kötő fehérjék szabályoznak. Számos kísérletben vizsgálták a Ca^{2+} -kötő fehérjéket (például: parvalbumin, calbindin, calretinin, calmodulin, calsequestin) különböző fajok szörsejtjeiben, például béka, teknős és emlősök belső fülében (Dechesne et al. 1991, 1994; Kerschbaum és Hermann

1993; Slepecky és Ulfendahl 1993; Pack és Slepecky 1995; Soto-Prior et al. 1995; Baird et al. 1997; Heller 2002; Hackney et al. 2003; Yang et al. 2004).

Azt is megállapították, hogy a labirintus vestibularis részének sérülése esetén az endolympha Ca^{2+} koncentrációja megnő, ami zavart okoz a cochlea működésében (Ikeda et al. 2010). A zajkárosodásnak kitett állatokban, a külső szőrsejtekben a Ca^{2+} koncentráció megemelkedik, és magas szinten is marad, ami szintén káros a sejtek számára (Fridberger et al. 1998). Hackney és munkatársai (2005) kísérleteik alapján azt feltételezték, hogy a Ca^{2+} emelkedés által okozott ártalmak kivédésére a szervezetben védőmechanizmusok lépnek fel. Vizsgálták a Ca^{2+} -kötő fehérjék koncentrációját patkány cochlea sejtekben, és azt feltételezték, hogy ezen fehérjék magas koncentrációja megvédi a sejteket a zajártalom hatására létrejövő intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedésétől, ezért fontos szerepük lehet a különböző ototoxikus ágensek szőrsejtkárosító hatásának kivédésében.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Anatómiai Intézetében működő MTA-PTE „Lendület” PACAP kutatócsoport egyik fő kutatási területe a PACAP neuroprotektív hatásának vizsgálata. A munkacsoport mellett más kutatók is számos eredményt publikáltak a PACAP védő hatásáról különböző érzékszervekkel kapcsolatban, de a hallórendszerbeli hatásáról kevés adat áll rendelkezésünkre.

Fül-orr-gégész és audiológus szakorvosként a munkacsoporthoz csatlakozva célul tűztük ki a PACAP belső fülre kifejtett hatásának vizsgálatát, illetve a klinikai gyakorlat szempontjából annak kutatását, hogy más szervrendszerekben leírt védő szerepéhez hasonlóan képes-e a PACAP csökkenteni vagy kivédeni az ototoxikus károsodásokat.

1. Kutatómunkám első szakaszában kísérleti állatként egynapos csirkéket használtunk. *In vitro* körülmények között vizsgáltuk a PACAP antiapoptotikus hatását csirkéből készült belső fül sejttenyészetben H₂O₂-indukálta oxidatív stressz károsodás esetén.

2. Az a tény, hogy a PACAP és a PAC1 jelen van a stria vascularisban, közel az endolymphatikus térhez, azt sugallja, hogy a PACAP-nak szerepe lehet az endolympha termelésében, potenciáljának és/vagy összetételének szabályozásában is (Abu-Hamdan et al. 2006). Ezért munkám második részében célul tűztük ki a szisztémás PACAP kezelés hatásának vizsgálatát az endolympha fehérje összetételére csirkében *in vivo*.

3. A heterozigóta és homozigóta PACAP-génhiányos egerek segítségével munkacsoportunknak lehetősége nyílt az endogén PACAP hatásainak vizsgálatára *in vivo*. Kutatómunkám harmadik szakaszában immunhisztológiai vizsgálatok segítségével hasonlítottuk össze a PAC1 receptor lokalizációját, valamint a belső fül károsodására utaló Ca²⁺-kötő fehérjék lokalizációját és expresszióját homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos és vad egerek cochleáiban fiziológiás körülmények között, valamint kanamycin-kezelést követően.

III. KÍSÉRLETEK

3.1. PACAP protektív hatásának vizsgálata oxidatív stressz-indukálta apoptózis modellben csirke cochleáris sejt kultúrában in vitro

3.1.1. Anyagok és módszerek

A cochleáris sejt kultúra elkészítéséhez frissen keltetett házi csirkék ductus cochlearisát izoláltuk az os temporale kivevővel (6 szériában, 40 csirke/széria). Kutatásunk során azért választottuk a csirke modellt, mert ductus cochlearisuk könnyebben kivevő, és a szőrsejtek sűrűsége nagyobb, mint az emlősök cochleájában. Az állatokat halothán anesztézia után 1 napos korukban dekapitáltuk. A csirkék ductus cochlearisát eltávolítottuk, majd a preparátumból steril körülmények között sejteket izoláltunk. A sejteket 24 órán át inkubáltuk párásított 95% levegő és 5% széndioxid keverékben 37 °C fokon, 10% hő által inaktivált foetalis bovin szérumot tartalmazó médiumban (FBS, Gibco, Magyarország). A kísérletben vizsgált csirke cochleáris sejt kultúra szőrsejteket és támasztósejteket tartalmazott. Az összes beavatkozást a Pécsi Tudományegyetem etikai útmutatásának megfelelően végeztük (engedély szám: No: BA02/2000-20/2006). A kísérletekben felhasznált PACAP1-38-at Prof. Tóth Gábor szintetizálta (Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Kémiai Intézet).

A cochleáris sejteket 4 különböző csoportba osztottuk:

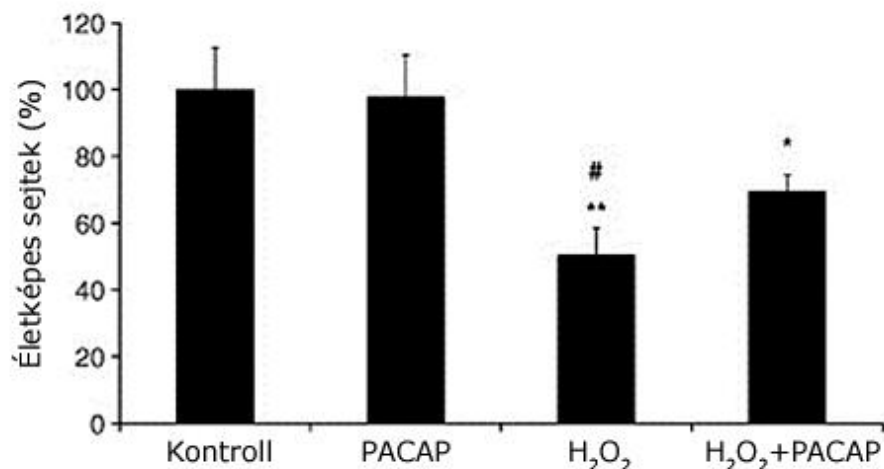
1. kontroll csoport
2. PACAP-pal kezelt sejtek, melyeket 100 nM PACAP1-38-at tartalmazó médiumban inkubáltunk 120 percig,
3. H₂O₂-dal kezelt sejtek, melyeket 1mM H₂O₂-os médiumban inkubáltunk 120 percig,
4. a 4. csoport sejtjeit 1mM H₂O₂-ot és 100 nM PACAP1-38-at tartalmazó médiumban inkubáltunk 120 percig.

A vizsgált sejt kultúrákban lévő sejtek életképességét ezután kolorimetrikus MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) teszttel vizsgáltuk. A teszt

az MTT redukcióján alapul, amely a redukció során kék formazán vegyületté változik, megfestve az élő sejtek funkcionáló mitokondriumait. A sejteket egy 96-os plate-re helyeztük, 10^5 sejtsűrűséggel, és egy éjszakán át tenyésztettük. A kezelés után a médiumot eltávolítottuk és friss, 0,5%-os vízdékony sárga mitokondriális MTT-t tartalmazó DMEM/FCS-t (Dulbecco által modifikált Eagle médium, mely 10% embrionális borjú szérumot tartalmaz) adtunk a sejtekhez. A tenyészetet ezután 0,5 mg/ml MTT-t tartalmazó PBS-ben (NaCl tartalmú foszfátpuffer) inkubáltuk 3 órán keresztül, 37 °C-on és 5% CO₂-ot tartalmazó légkörben. Három órás inkubáció után a médiumot eltávolítottuk, és az MTT-ből átalakult vízdékony, kék formazán festéket isopropanol savval (Sigma, Magyarország) oldottuk. Az élő sejtek funkcionáló mitokondriumai által létrehozott formazán vegyület mennyiségét 550 nm-en, ELISA reader-en (Anthos Labtech 2010; Vienna, Austria) mértük. A kiértékelés során az eredményeket a kontroll értékekhez viszonyítottuk (100%). A három egymástól függetlenül végzett kísérlet eredményeit átlag \pm S.E.M. értéként adtuk meg, amelyeken egyutas ANOVA, majd *post hoc* Neuman-Keul analízist végeztünk.

3.1.2. Eredmények

A sejtek életképességének vizsgálata során MTT teszttel azt találtuk, hogy a PACAP kezelés önmagában nem okozott szignifikáns eltérést, míg a H₂O₂ kezelés szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét a kontroll csoporthoz képest. A 4. csoportban az 1mM H₂O₂ kezelésben részesített sejteket PACAP-pal együtt inkubálva szignifikánsan több sejt maradt életben a csak H₂O₂-dal kezelt csoporthoz viszonyítva (10. ábra).



10. ábra: A sejtek életképességének vizsgálata MTT teszttel (kontroll csoport=100%)
 * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontroll csoporthoz viszonyítva; # $P < 0,05$ az 1mM H₂O₂-dal és a
 100 nM PACAP-pal kezelt csoporthoz viszonyítva.

A fentiek alapján tehát megállapítható, hogy a PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz-indukálta életképesség csökkenést csirke belső fül sejt kultúrában. Munkacsoportunk további molekuláris biológiai módszereket is alkalmazott a PACAP antiapoptotikus és antinekrotikus hatásának vizsgálata céljából ezeken a sejteken, ezen eredményeket a megbeszélés fejezetben fogom részletesen ismertetni.

3.2. Endolympha összetételének vizsgálata csirkékben szisztémás PACAP kezelést követően

Mint az a bevezetőben részletezésre került, korábban már kimutatták a PACAP jelenlétét a belső fülben, arról azonban még nincs információnk, hogy az exogén PACAP kezelés hatással van-e az endolympha összetételére. Több neuropeptidről - mint például a P anyag, vazopresszin, szomatosztatin - már ismert, hogy hatással vannak az endolympha szekréciójára és összetételére (Ferrary et al. 1996; Kitano et al. 1999). A hártyás labirintusban a stria vascularis és a támasztó sejtek termelik az endolymphát, és mivel a PACAP és specifikus receptora, a PAC1 receptor, is bizonyítottan jelen van a stria vascularisban, ezért feltételezhetően szerepe lehet az endolympha termelésének és összetételének szabályozásában. Munkám második felében azt vizsgáltuk, hogy a szisztémásan adott PACAP hatására csirkékben változik-e az endolympha fehérje összetétele.

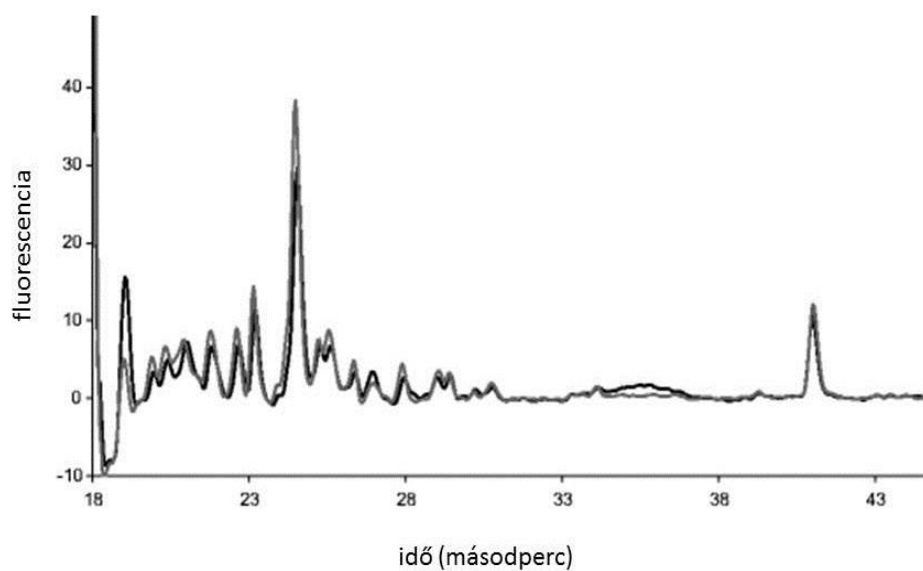
3.2.1. Anyagok és módszerek

1 napos csirkéket – 20 µg intraperitoneális PACAP1-38 adagolását követően – 1, 6 és 24 óra múlva dekapitáltunk. A ductus cochlearisokat eltávolítottuk, majd steril csipesszel steril szűrőpapírcsíkra préseltük ki az endolymphát (n=5/csoport). A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak. Az endolymphával átítatott szűrőpapírcsíkokat feldolgozásig steril Eppendorf csövekben jégen tároltuk. A papírcsíkok által megkötött fehérjéket 30 µl mintapufferben oldottuk ki (0,125 M Tris/HCl, pH:6,8, 4% nátrium dodecil szulfát-SDS, és 10% béta-merkaptotanol). Erős vortexelés után a szűrőpapírokat eltávolítottuk a csövekből. Az így kapott oldatból microchip elektroforézist végeztünk (Kustos et al. 2005) az Agilent 2100 Bioanalyzer rendszer alkalmazásával (Agilent, Darmstadt, Németország). A vizsgálat során a Protein 230-as fehérje chipet használtuk. A protein chip mikropillárisait a kizárólagos gél-festék keverékkel töltöttük fel. A gél egy lineáris polimert tartalmaz szűrő ágensként, ez biztosítja a 14-230 kDa tartományban a fehérjék molekulatömeg alapján történő

szétválasztását. A festék lehetővé teszi a fehérje-SDS komplexek chipen belüli jelölését. Az előkészített oldatokból 4-4 µl-t 2 µl denaturáló oldattal kevertünk össze, amely a pontos méret meghatározáshoz szükséges kis és nagy molekulatömegű (16 és 210 kDa) belső standardokat is tartalmazta. A mintákat 5 percig 100 °C főztük, centrifugálással koncentráltuk, majd 14 µl desztillált vízzel hígítottuk. Minden mintából 6-6 µl-t vittünk fel a chip megfelelő helyeire. Egy chip 10 fehérjeminta elemzésére alkalmas. A méréseket háromszor ismételtük meg a reprodukálhatóság bizonyítására. A mintákon lézer-indukálta fluoreszcencia vizsgálatot végeztünk, és az eredmények kiértékelését a Protein 230 assay software segítségével végeztük.

3.2.2. Eredmények

A szűrőpapírokról nyert fehérjék mennyisége elegendő volt a microchip technológiával történő fehérje meghatározáshoz. A csirke endolympha protein összetétele komplex mintázatot mutatott, számos protein csúcs volt detektálható a 14 és 81 kDa molekulatömeg régióban. Tekintettel arra, hogy a proteinek többsége a fent említett molekulatömeg tartományban jelent meg, a fehérjecsúcsok alapvető szeparációját nem lehetett elérni. Vizsgálataink során nem találtunk jelentős különbséget a fehérje összetétel tekintetében a kontroll és a különböző időpontokban vizsgált PACAP-pal kezelt csirkék endolympha mintái között (11. ábra).



11. ábra: A csirke endolympa fehérje összetételének vizsgálata microchip elektroforézissel. A reprezentatív kontroll csoport fehérjemintázata fekete vonallal, a PACAP-pal kezelt csoporté szürke vonallal jelölve.

3.3. PAC1 receptor és Ca²⁺-kötő fehérjék vizsgálata vad típusú és PACAP-génhiányos egerek belső fülében fiziológiás körülmények között és kanamycin-indukálta ototoxicitást követően

3.3.1. Bevezetés

Az „A” kísérletben vizsgáltuk a PAC1 receptor lokalizációját, valamint 3 különböző Ca²⁺-kötő fehérje (parvalbumin, calretinin, calbindin) lokalizációját és expresszióját 5 napos vad és homozigóta PACAP-génhiányos egerekben fiziológiás körülmények között.

A „B” kísérletben kétféle Ca²⁺-kötő fehérje expresszióját vizsgáltuk (calretinin, parvalbumin) 7 napos vad, hetero- és homozigóta PACAP-génhiányos egerekben fiziológiás körülmények között és kanamycin kezelést követően.

3.3.2. Kísérleti állatok

A kísérletben vizsgált PACAP-génhiányos egereket japán kollaborációs partnereinktől származnak (Hashimoto et al. 2001, 2009). Ezek az egerek a PACAP mutált génjével rendelkeznek: az 5. exonban található egy mutáció, melynek következtében a PACAP nem fejeződik ki. Az állatok szaporítása és gondozása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (BA02/2000-15024/2011) szerint, az intézeti ajánlások figyelembevételével történt. Az állatokat 12 órás világos-sötét ciklusban tartottuk, táplálékot és folyadékot biztosítottunk számukra (ad libitum).

Az 'A' kísérleteket 5 napos vad típusú (PACAP^{+/+}, n=9) és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP^{-/-}, n=9) egereken végeztük.

'B' kísérlet során 7 napos, homozigóta (PACAP^{-/-}, n=6), heterozigóta (PACAP^{+/-}, n=6) PACAP-génhiányos és vad-típusú (PACAP^{+/+}, n=6) egerek mintáit dolgoztuk fel.

3.3.3. Kezelési protokoll

Az 'A' kísérletben részt vevő állatok kezelésben nem részesültek. A 'B' kísérlet során 5 napos korukban a vad típusú (PACAP^{+/+}), hetero- (PACAP^{-/+}) és homozigóta (PACAP^{-/-}) PACAP-génhiányos egereknek 1mg/ttg kanamycin egyszeri dózisát adtuk be subcutan (50 mg/ml, Sigma, Magyarország). A kontroll állatok 50 µl fiziológiás sóoldatot kaptak subcutan. Ezt követően az állatokat 7 napos korukban dolgoztuk fel.

3.3.4. Szöveti feldolgozás

Az egereket 5 ('A' kísérlet), illetve 7 napos ('B' kísérlet) korukban szisztémás analgetikummal túllaltattuk (Pentobarbital, Nembutal, Sanofi-Phykaxia, Magyarország), majd az egerek fejét azonnal 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk egy éjszakán át. Ezután a fejeket 0,1 M-os foszfát-pufferben (PBS; Sigma) mostuk, majd emelkedő koncentrációjú szacharóz-PBS-oldatokba helyeztük. Először 10%-os oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 20%-os szacharóz oldatba tettük metszésig. Fagyasztásos technikával (Leica kriosztát, Németország) a koponyából 10 µm-es sagittális metszeteket készítettünk. Ezután megfelelően pozicionálva a lemetszett szövetet zselatinózott tárgylemezre vittük fel, és további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Egy cochleából 10-12 metszetet készítettünk, majd kiválasztottuk azokat, melyeken látható volt a modiolus, és csak a cochlea középső kanyarulatát vizsgáltuk.

A kriosztátos metszeteken immunhisztológiai vizsgálatokat végeztünk. A morfológiai összehasonlításhoz egyes metszeteket hematoxin-eozin festéssel is megfestettük. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a metszeteket nedves kamrában, a permeabilitás növelésének érdekében 6x5 percig PBS-ben oldott 0,1%-os Triton X-100 oldattal inkubáltuk. Ezt követően normál kecske szérummal (NGS) inkubáltuk 1 órán keresztül, hogy a nem specifikus jelölődés mértékét a lehető legkisebbre csökkentjük. Ezután a metszeteket a megfelelő primer antitestekkel inkubáltuk szobahőmérsékleten, egy éjszakán át, nedves kamrában. Az alkalmazott primer antitestek: PAC1 receptor antitest (anti-nyúl, 1:100; Sigma, Magyarország), valamint a

különböző Ca^{2+} -kötő fehérjék elleni antitestek; calretinin (anti-egér, 1:1000, Swant, Svájc), calbindin (anti-egér, 1:500, Sigma, Magyarország), és parvalbumin (anti-egér, 1:500, Sigma, Magyarország). A kísérletben olyan parvalbumin elleni antitestet használtunk, mely a parvalbuminnak minden izoformáját jelöli.

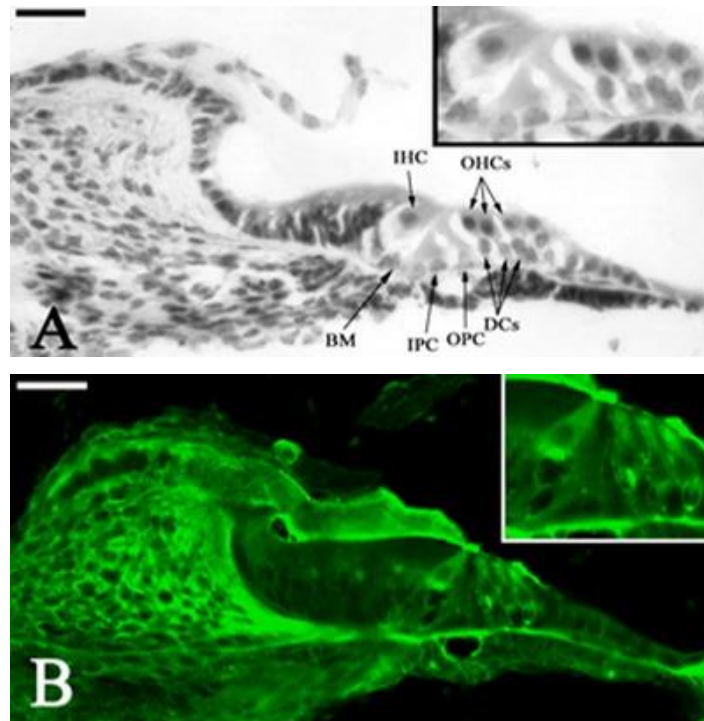
Másnap a metszeteket 6x5 percig PBS-ben mostuk, majd 2 órán keresztül nedves sötétkamrában Alexa Fluor „568” és „488” másodlagos antitestekkel inkubáltuk (1:1000, Southern Biotech, Magyarország). Ezt követően 3x5 percig mostuk a metszeteket PBS-el, majd Fluoromount-G-vel (Southern Biotech, Magyarország) fedtük, és kiértékelésig 4 °C-on lefedve tároltuk. A negatív kontrollként szolgáló metszeteket csak a másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Ebben az esetben, a metszetekben fluoreszcens jelölődést nem tapasztaltunk, ezzel bizonyítva a szekunder antitestek specifikus kötődését.

3.3.5. Immunhisztokémiai metszetek kiértékelése

A metszetekről digitális felvételeket készítettünk CCD kamerával felszerelt Nikon Eclipse 80i típusú mikroszkóppal (Nikon, Japán). A képeket a Spot Basic Programmal készítettük, és a továbbiakban Adobe Photoshop 7.0-val dolgoztuk fel. Ezután a készített képeken összehasonlítottuk a vad és a PACAP-génhiányos egerek cochleájának szőrsejtjeiben látható immunfluoreszcens festődés lokalizációját és intenzitását. Az immunfluoreszcencia mértékét az ImageJ 1.440 program segítségével állapítottuk meg, amely a jelintenzitás erősségét egy viszonyszám segítségével adta meg 0-85-ig terjedő skála segítségével. Az értékeket minden esetben a metszetek háttérintenzitásával korrigáltuk, majd ebből a GraphPadPrism 5.01-es programmal végeztünk statisztikai elemzést. Az eredmények az alábbi formában jelennek meg: átlag intenzitás \pm S.E.M., a statisztikai összehasonlítást pedig nem párosított Welch-korrektív teszttel, valamint a nonparametrikus Mann-Whitney teszttel végeztük.

3.3.6. Eredmények

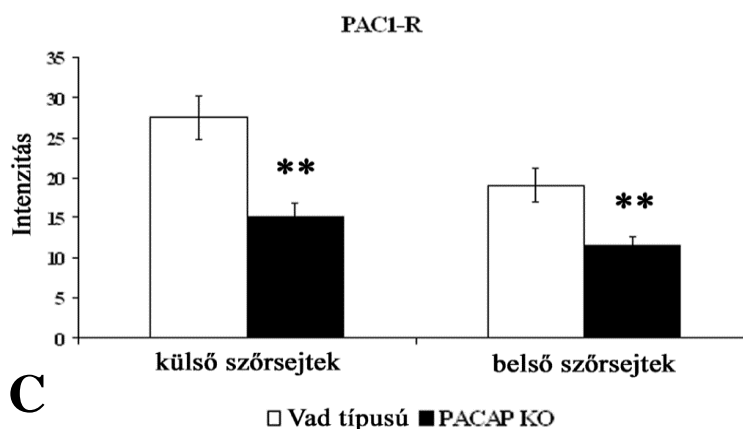
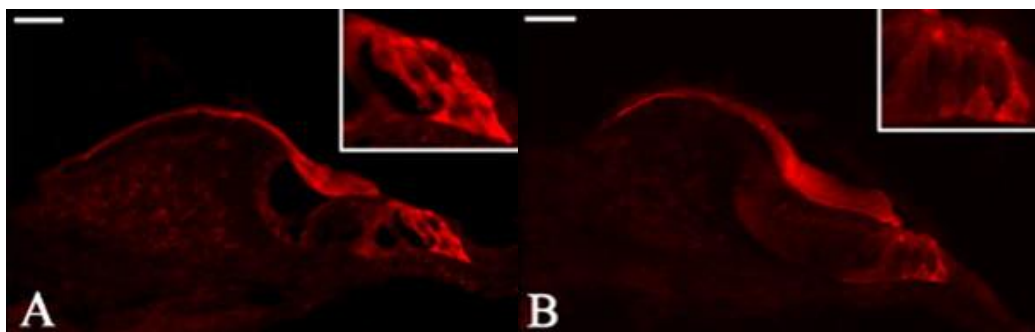
A hematoxilin-eozin festéssel készült metszeteken a vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek belső fülének morfológiájában nem találtunk különbséget. Mindkettőben megtalálhatók a korábban már ismertetett struktúrák: a ganglion spirale, a stria vascularis, a Corti-szerv. A baziláris membránon láthatóak a pillérsejtek, közöttük a Corti-alagút, körülvéve egy sorban a belső és három sorban a külső szőrsejtekkel valamint a Deiters-féle támasztósejtekkel (12. ábra).



12. ábra: Reprezentatív szövettani képek homozigóta PACAP-génhiányos egér Corti-szervét mutatják, a felső ábrán hematoxilin-eozin festéssel (A), az alsó ábrán calretinin immunhisztokémiával (B). A képek jobb felső sarkában a Corti-szerv kinagyított képe látható. A képek az 'A' kísérletből származnak. Jól láthatóak a belső (IHC) és a külső szőrsejtek (OHCs), a Deiters-féle támasztósejtek (DCs), a belső pillérsejt (IPC) és külső pillérsejt (OPC), valamint a baziláris membrán (BM). Aránymérték 20 μ m.

'A' kísérlet

A PAC1 receptor expressziójának vizsgálata során a vad-típusú egerekben számos képlet mutatott PAC1 receptor pozitivitást (13. ábra). A Corti-féle szerven kívül a ganglion spirale valamint a stria vascularis is expresszált PAC1 receptort. A Corti-féle szervben mind a belső, mind a külső szőrsejtek, a külső támasztósejtek (Deiters-sejtek) valamint a pillérsejtek mutattak erős PAC1 receptor pozitivitást. A kísérletünkben talált PAC1 receptor expresszió egyezik a korábban leírt receptor eloszlásokkal (Kawano et al. 2001; Abu-Hamdan et al. 2006). A PAC1 receptor lokalizációját tekintve a két csoport között nem találtunk különbséget: a külső és a belső szőrsejtek, valamint a támasztósejtek is expresszálták a PAC1 receptort. Azonban a vizsgált csoportok külső és belső szőrsejtjei esetében szignifikáns különbség volt az immunjelölődés erősségében (13. ábra). A vad-típusú egerekben a külső és belső szőrsejtek valamint a külső támasztósejtek intenzívebben jelölődtek a PACAP-génhiányos egerekhez képest.



13. ábra: Reprezentatív immunhisztológiai képek a PAC1 receptor expresszióját mutatják vad típusú (A) és homozigóta PACAP-génhiányos egerek (B) Corti-féle szervében.

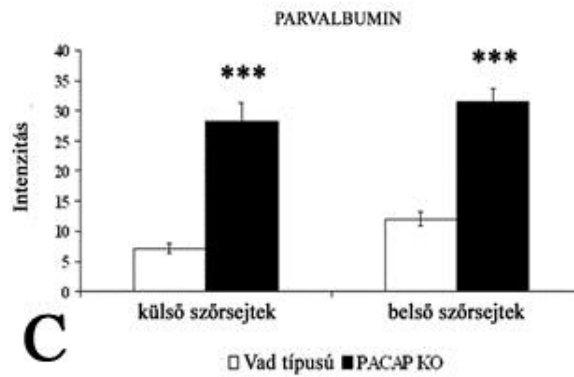
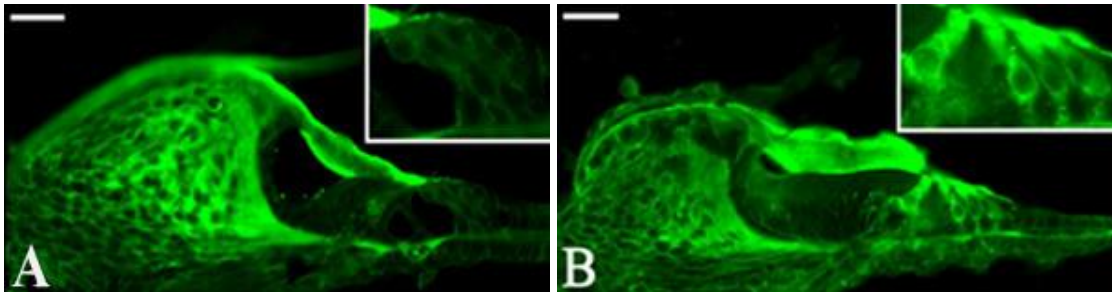
Aránymérték: 20 μ m.

A kinagyított képek a külső és belső szőrsejteket, valamint a támasztósejteket mutatják, amelyek PAC1 receptort expresszálnak. A vad-típusú egerekben (A) a külső szőrsejtek és a külső támasztó sejtek intenzívebben jelölődtek a PACAP-génhiányos egerekhez képest (B).

C ábra: PAC1 receptor immunfluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerek szőrsejtjeiben. ** $p < 0,001$ vs. vad-típusú egerek

A Ca^{2+} -kötő fehérjék (parvalbumin, calretinin, calbindin) vizsgálatakor azt találtuk, hogy a vad-típusú egerekben a szőrsejtek csak nagyon gyengén expresszálták mindhárom vizsgált fehérjét (14., 15. és 16. ábra). Ezzel ellentétben a homozigóta PACAP-génhiányos egerek belső és külső szőrsejtjeiben mindhárom Ca^{2+} -kötő fehérje szignifikánsan intenzívebb jelölődést mutatott.

A homozigóta PACAP-génhiányos egerekben parvalbumin esetében az egész sejttest szignifikánsan erősebben jelölődött, és ez a különbség főleg a sejtek stereociliumaiban volt megfigyelhető, összehasonlítva a vad-típusú egerekkel (14. ábra A, B). A szőrsejtek calretinin tekintetében is jelentősen erősebb immunpozitivitást mutattak, mint a vad-típusú egerek, amely különbség statisztikai analízissel is szignifikáns volt (15. C ábra). A calretinin főleg a szőrsejtek stereociliumaiban akkumulálódott, kevésbé intenzívebb festődést mutatott a sejttestekben (15. ábra A, B). Calbindin vizsgálata kapcsán gyengébb jelölődést kaptunk a vad-típusú egerekben, mint a parvalbumin vagy a calretinin esetén, azonban a PACAP-génhiányos egerekben erősebb jelölődést láttunk a másik kettő Ca^{2+} -kötő fehérjéhez viszonyítva (16. ábra).

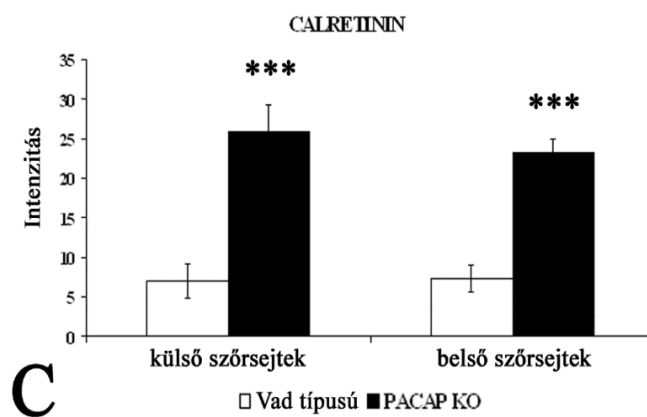
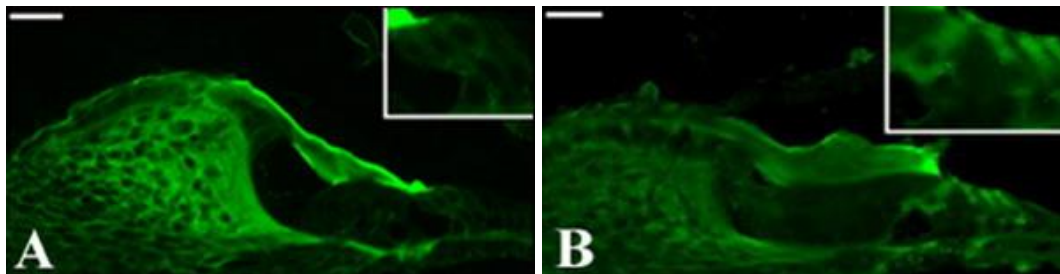


14. ábra: Reprezentatív immunhisztológiai képek a parvalbumin expressziót mutatják vad típusú (A) és homozigóta PACAP-génhiányos (B) egerek Corti-féle szervében.

Aránymérték: 20 μ m

C ábra: Parvalbumin immunfluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerek szőrsejtjeiben.

*** $p < 0,0001$ vs. vad-típusú egerek

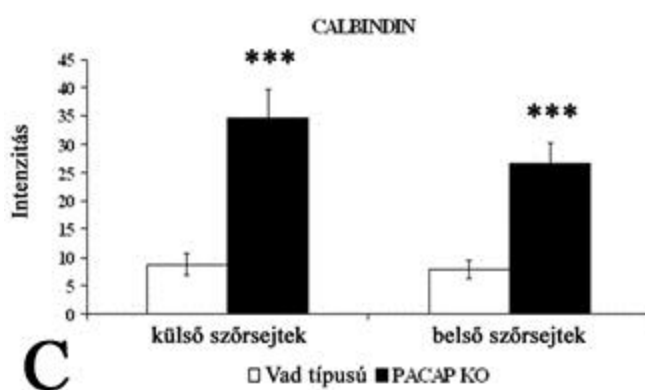
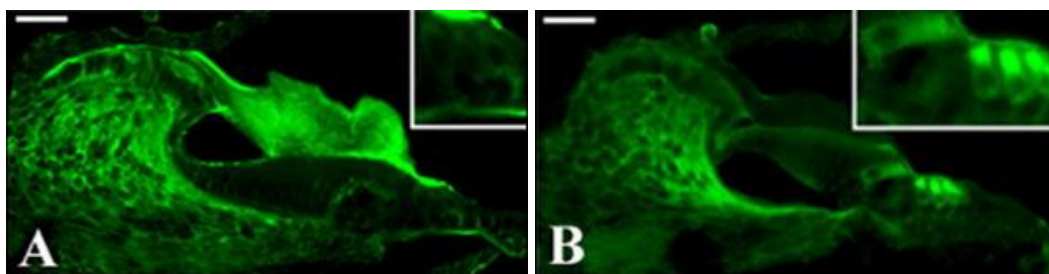


15. ábra: Reprerzentatív immunhisztológiai képek a calretinin expresszióját mutatják vad típusú (A) és homozigóta PACAP-génhiányos (B) egerek Corti-féle szervében.

Aránymérték: 20 μ m

C ábra: A calretinin immunfluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerek szőrsejtjeiben.

*** $p < 0,0001$ vs. vad-típusú egerek



16. ábra: Reprezentatív immunhisztológiai képek a calbindin expresszióját mutatják vad típusú (A), és homozigóta PACAP-génhiányos (B) egerek Corti-féle szervében.

Aránymérték: 20 μ m

C ábra: Calbindin immunfluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerek szőrsejtjeiben.

*** $p < 0,0001$ vs. vad-típusú egerek

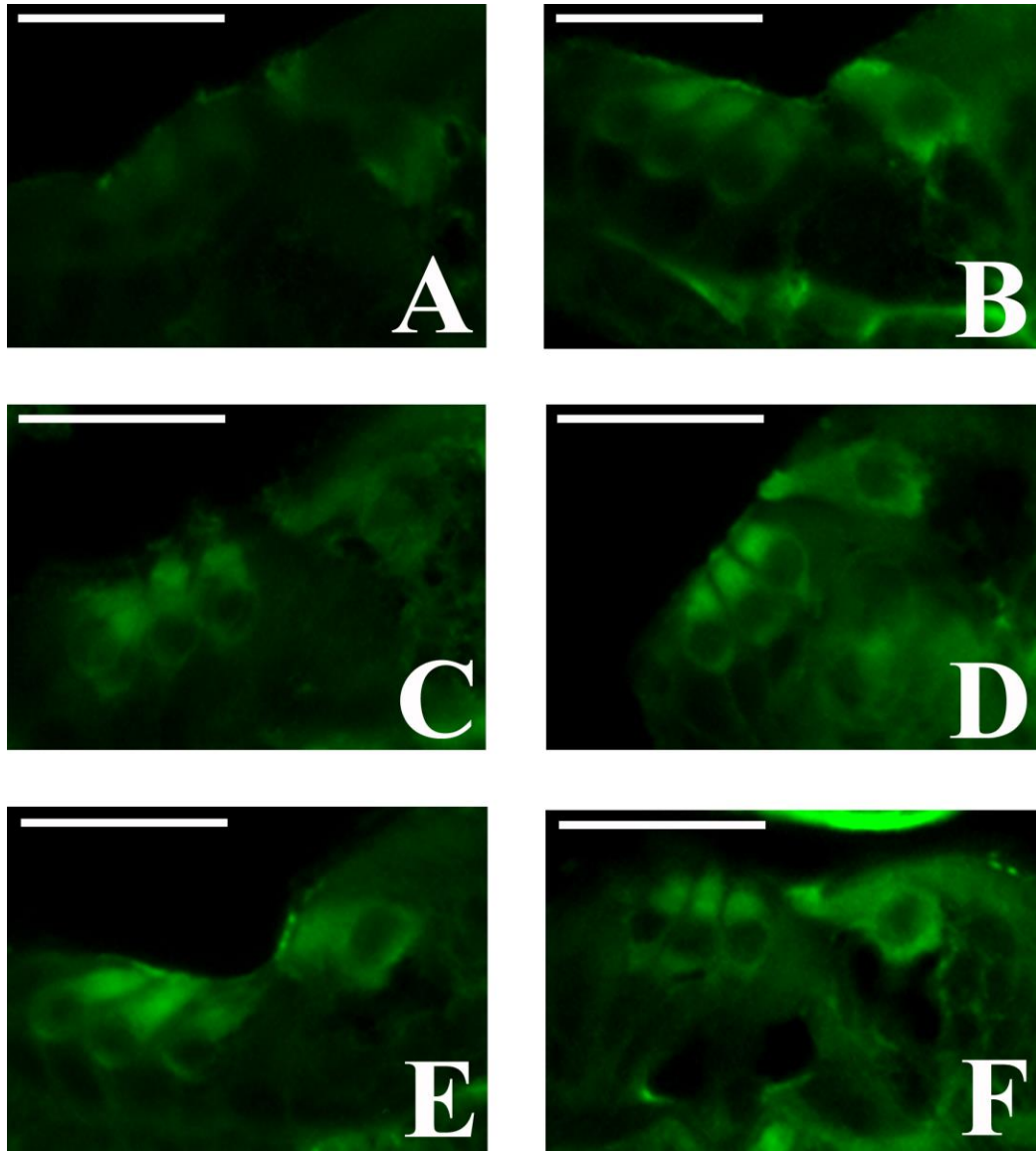
'B' kísérlet

Jelen kísérleti felállásban többféle genotípusú egérrel dolgoztunk, a vad-típusú és a homozigóta PACAP-génhiányos egerek mellett heterozigóta PACAP-génhiányos egereket is vizsgáltunk. A Ca^{2+} -kötő fehérjék közül a parvalbumin és calretinin expressziót vizsgáltuk a kontroll csoportban és kanamycin kezelést követően.

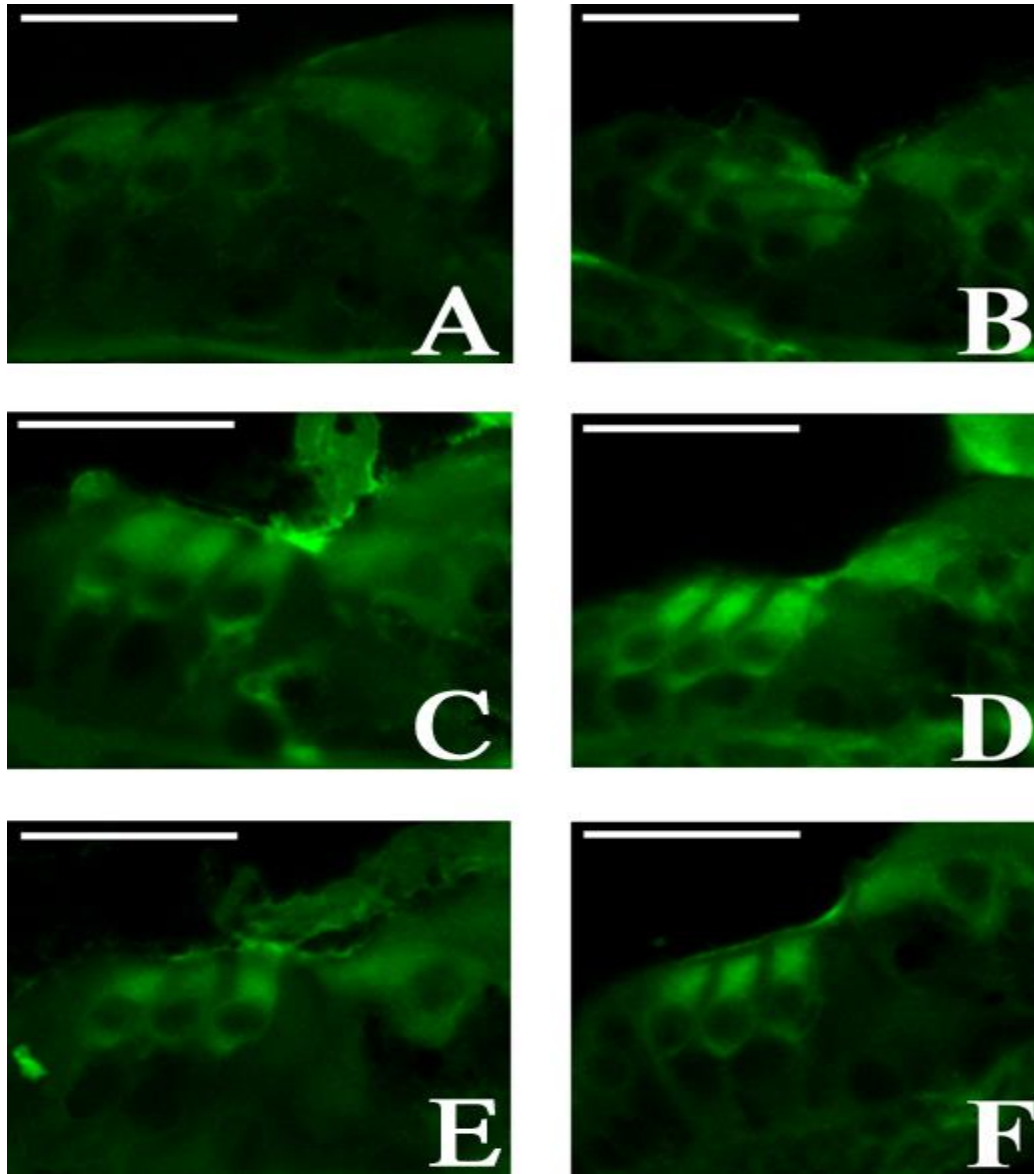
A vad és homozigóta PACAP-génhiányos egerek esetében kontroll körülmények között az 'A' kísérlettel megegyező eredményeket kaptunk. A kontroll csoportban jelentős különbséget észleltünk a külső és a belső szőrsejtek parvalbumin és a calretinin expressziójában a vad típusú és a homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek között (17. A,C,E ábra; 18. A,C,E ábra). A kontroll homozigóta PACAP-génhiányos egereknek mind a külső, mind a belső szőrsejtjeiben nagyobb volt a parvalbumin expresszió, mint kontroll vad típusú társaikban (17. A, E ábra). A heterozigóta PACAP-génhiányos egerek külső szőrsejtjeiben szintén emelkedett parvalbumin expressziót láttunk, összehasonlítva a vad típusú egerekkel. Ezzel szemben a belső szőrsejtekben nem volt különbség parvalbumin expresszió tekintetében a kontroll vad és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek között (17. A, C ábra). A kontroll csoportban magasabb calretinin expressziót találtunk mind a hetero- mind a homozigóta PACAP-génhiányos egerek esetén a vad-típusú egerekhez képest (18. ábra A,C,E ábra).

Kanamycin kezelés után szignifikánsan megemelkedett a vad és a heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben a parvalbumin expressziója, míg a kontroll állatokban talált magas parvalbumin expresszió nem emelkedett tovább a homozigóta PACAP-génhiányos egerekben (17. ábra; 19. ábra). Szignifikánsan magasabb parvalbumin expressziót találtunk kanamycin kezelést követően a heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben, mint a kanamycinnel kezelt vad társaikban (17. ábra B, D; 19. ábra). Kanamycin kezelést követően a calretinin expresszió csak a vad típusú egerek szőrsejtjeiben növekedett szignifikánsan (18. A, B ábra; 20. ábra), homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek esetén a kontroll csoportban detektálható magas calretinin expresszió nem mutatott további szignifikáns emelkedést (18. ábra C, D, E, F; 20. ábra). Ugyanakkor a heterozigóta PACAP-génhiányos egerek belső szőrsejtjeiben

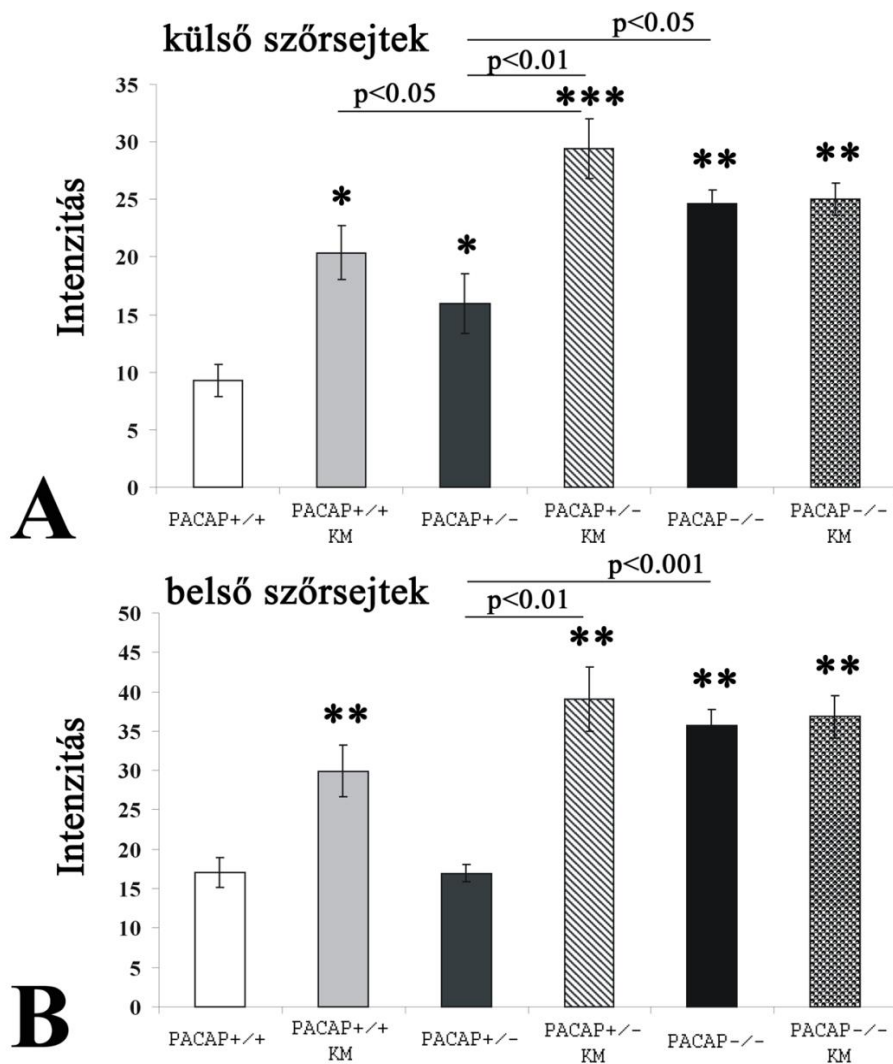
szignifikánsan nagyobb volt a calretinin expresszió kanamycin kezelés után, mint a vad-típusú egerekben (20. ábra).



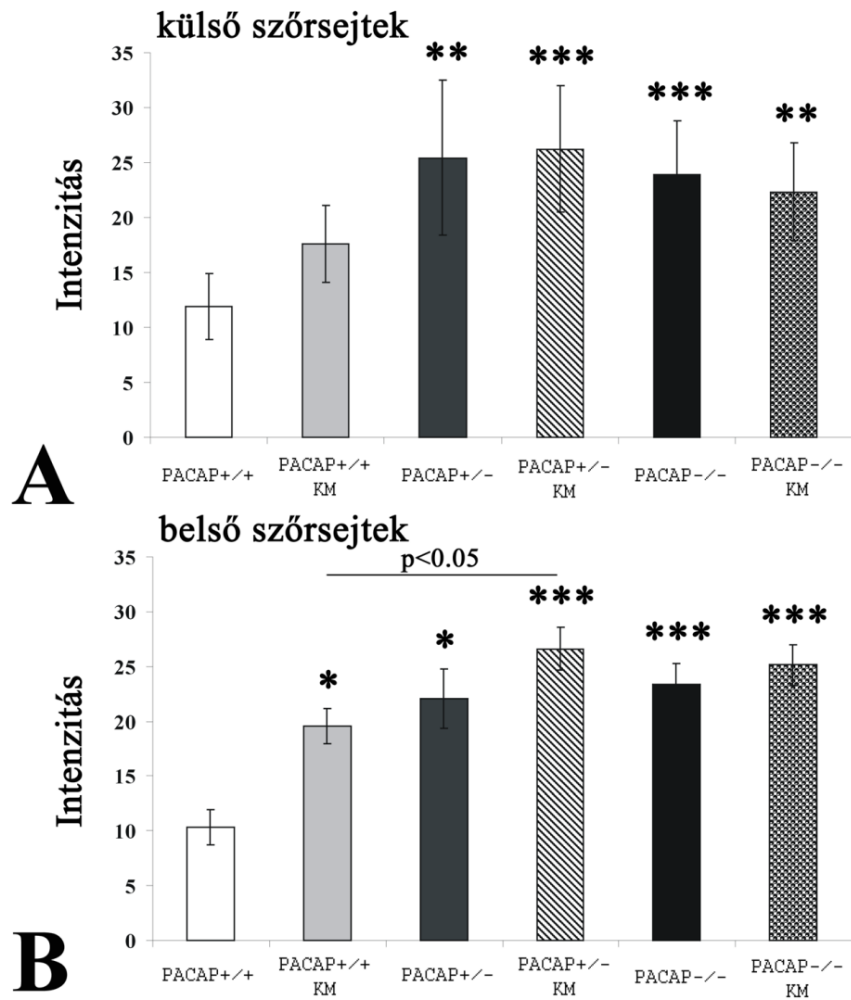
17. ábra: Reprézntatív immunhisztológiai képek a parvalbumin expressziót mutatják vad típusú (A, B), heterozigóta (C, D) és homozigóta PACAP-génhiányos egerek (E,F) belső és külső szőrsejtjeiben fízológias sóoldat (kontroll csoport A, C, E) és kanamycin kezelés után (B, D, F). Aránymérték: 20 μ m



18. ábra: Reprezentatív immunhisztológiai képek a calretinin expressziót mutatják vad típusú (A, B), heterozigóta (C, D) és homozigóta PACAP-génhiányos (E,F) egerek belső és külső szőrsejtjeiben fiziológias sóoldat (kontroll csoport A, C, E) és kanamycin kezelés után (B, D, F). Aránymérték: 20 μ m



19. ábra: Parvalbumin immunfluoreszenca intenzitásának statisztikai analízise a külső (A) és belső (B) szőrsejtekben vad típusú ($PACAP^{+/+}$), heterozigóta ($PACAP^{+/-}$) és homozigóta $PACAP$ -génhiányos egerekben ($PACAP^{-/-}$) fiziológias sóoldat ($PACAP^{+/+}$; $PACAP^{+/-}$; $PACAP^{-/-}$) és kanamycin kezelés után ($PACAP^{+/+}$ KM; $PACAP^{+/-}$ KM; $PACAP^{-/-}$ KM), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. vad típusú egerek ($PACAP^{+/+}$).



20. ábra: Calretinin immunfluoreszcens intenzitásának statisztikai analízise a külső (A) és belső (B) szőrsejtek között, vad típusú (PACAP^{+/+}), heterozigóta (PACAP^{+/-}) és homozigóta PACAP-génhiányos egerekben (PACAP^{-/-}) fiziológias sóoldat (PACAP^{+/+}; PACAP^{+/-}; PACAP^{-/-}) és kanamycin kezelést követően (PACAP^{+/+} KM; PACAP^{+/-} KM; PACAP^{-/-} KM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. vad típusú egerek (PACAP^{+/+})

IV. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során az exogén és endogén PACAP hatásait vizsgáltuk a belső fülben *in vitro* és *in vivo* körülmények között különböző állatfajokban. Az exogén PACAP antiapoptotikus hatását csirke cochleából készült sejttenyészeteken vizsgáltuk *in vitro*. Csirkében *in vivo* körülmények között az exogén PACAP endolympha összetételére gyakorolt hatásait is kutattuk. PACAP-génhiányos egerekben az endogén PACAP hiányának következményeit vizsgáltuk a belső fülben kontroll körülmények között és kanamycin-indukálta ototoxicitás során Ca^{2+} -kötő fehérjék segítségével.

4.1. A PACAP antiapoptotikus hatása a belső fülben

Kutatómunkám első részében MTT teszttel igazoltuk a PACAP protektív hatását H_2O_2 -indukálta oxidatív károsodással szemben csirke belső fül sejttenyészetben. A hidrogén-peroxid egy mindenütt jelenlévő, reaktív szabadgyököket (ROS) generáló molekula, mely fiziológias körülmények között is képződik (Halliwell és Gutteridge 1990; Dehne et al. 2000). Különböző ototoxikus hatások következtében (például gentamycin és cisplatin kezelés) képződése fokozódik a belső fülben, ami a sejtek apoptózisához vezet (Kopke et al. 1997; Hirose et al. 1999).

Miután igazoltuk a PACAP védő hatását a belső fülben, munkacsoportunk további molekuláris biológiai módszereket is alkalmazott a PACAP antiapoptotikus és antinekrotikus hatásának vizsgálata céljából H_2O_2 -indukálta oxidatív károsodással szemben csirke belső fül sejttenyészetben. Annexin V és propidium-jodid festéssel azt mutattuk ki, hogy a H_2O_2 -dal és PACAP-pal kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt az élő sejtek aránya, és szignifikánsan kevesebb volt az apoptotikus sejtek száma a csak H_2O_2 -dal kezelt csoporthoz képest. Bár a PACAP kezelés csökkentette a H_2O_2 -dal kezelt sejtek nekrozisát is, ez a különbség nem volt szignifikáns. Szintén ezen a sejtvonalon alkalmazta munkacsoportunk a JC-1 assayt, amely apoptotikus sejtkárosodás detektálására alkalmas a mitokondriális depolarizáció kimutatásának segítségével. JC-1 assay-t követően áramlási citometriával vizsgáltuk az apoptotikus és

élő sejtek számát, és kimutattuk, hogy a H₂O₂-dal és PACAP-pal kezelt csoportban szignifikánsan emelkedett az élő sejtek, és csökkent az apoptotikus sejtek százalékos aránya a H₂O₂-dal kezelt csoporthoz viszonyítva. Az apoptotikus útvonalak közül a kaszpáz-3 aktivitásának vizsgálata is megtörtént áramlási citometria segítségével, ahol a PACAP kezelés önmagában nem okozott szignifikáns változást az apoptotikus marker aktivációjában, de a H₂O₂-dal és PACAP-pal kezelt csoportban jelentősen csökkent a kaszpáz-3 aktivációja a csak H₂O₂-dal kezelt csoporthoz viszonyítva. Ezen kísérletek egyértelműen igazolták az exogén PACAP kezelés protektív hatását H₂O₂-indukálta oxidatív károsodással szemben csirke belső fül sejtenyészetben.

A PACAP protektív szerepét oxidatív stressz-indukálta károsodással szemben először kisagyi szemcsesejt kultúrában mutatták ki (Vaudry et al. 2002), de azóta számos más, nem csak neuronális sejtvonalon is kimutatták a PACAP antiapoptotikus hatását különböző károsító hatásokkal szemben (Somogyvári-Vigh és Reglődi 2004; Vaudry et al. 2009). A PACAP antiapoptotikus hatásának molekuláris biológiai hátterét vizsgálták már a kisagyi szemcsesejteken kívül többek között retinában, PC12, mikroglia, szívízom, endothel és vesesejteken is. A PACAP védő hatásának hátterében számos, részben egymással konvergáló jelátviteli útvonal áll, és a hatás közvetítéséért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős. A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát ciklázot, és a foszfolipáz C-t, melynek hatására cAMP-függő és attól független útvonalak aktiválódnak. A PKA útvonal aktivációja során az antiapoptotikus hatású ERK foszforiláció megemelkedik, a proapoptotikus JNK és p38MAPK foszforiláció pedig gátlódik, valamint aktiválódik a CREB foszforilációja is. Az apoptózis mitokondriális útvonalát is befolyásolni képes a PACAP, ugyanis a Bcl család antiapoptotikus tagjait aktiválja (Bcl-2, Bcl-xL), míg proapoptotikus tagjait inaktíválja (Bad, Bax), részben a 14-3-3 fehérje segítségével. A 14-3-3 fehérje foszforilálja a Bad-ot, ami ennek hatására nem tudja megkötni és inaktíválni a Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjéket. A Bcl család antiapoptotikus hatásának következtében csökken a mitokondriumból kiszabaduló citokróm *c* szint a citoplazmában, ami további apoptózist gátló hatással rendelkezik. A PACAP nemcsak a cAMP útvonalon keresztül, hanem a foszfolipáz C (PLC), inozitol trifoszfát (IP₃) és diacilglicerin (DAG) útvonalon keresztül is hat, és végül ezen útvonalak egymással konvergálva a kaszpáz aktivitást csökkentik. A kaszpáz-

3 aktivitásának gátlását más kutatócsoportokhoz hasonlóan mi is igazoltuk, de a PACAP más kaszpázok hatását is gátolni képes. A PACAP képes gátolni a mikroglia sejtek citokin aktivációját is, valamint más kaszpáz független útvonalon keresztül is gátolni képes az apoptózist, például az AIF kiáramlását is gátolja. Mindezen útvonalak együttes hatása állhat a PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásának hátterében (Somogyvári-Vigh, Reglődi 2004; Vaudry et al. 2009) (1. ábra). Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy munkánkkal szélesítettük azon leírt sejtípusok körét, ahol a PACAP védő hatást fejt ki oxidatív stressz indukálta sejtpusztulással szemben.

4.2. Exogén PACAP kezelés hatása az endolympha fehérje összetételére

Munkám során vizsgáltuk csirkék endolympha fehérjéinek összetételét exogén PACAP kezelés hatására, de szignifikáns változást nem tudtunk detektálni.

Az endolympha és perilympha fehérje összetételének vizsgálata normál és patológias körülmények között segítséget nyújthat a belső fül működésének pontosabb megismeréséhez. Emberi perilympha vizsgálata nehézkes, mivel a műtét során vett minták vérrel szennyeződhetnek, így általában nem alkalmasak pontos analízisre. Post mortem vizsgálatokkal prealbumint, albumint, α_1 -antitripszint, α_1 -antikimotripszint, transferrint, β_2 -transzferrint identifikáltak humán perilympha mintákban (Arrer et al. 1988).

Tekintettel arra, hogy endolympha nyérése technikailag még nehezebb, mint a perilympháé, így főleg állatkísérletekből ismert a fehérje összetétele. Az endolympha protein összetétele hasonló a perilympháéhoz, de fehérje tartalma ötször-nyolcszor alacsonyabb, ez arra enged következtetni, hogy az endolympha fehérjéi a perilymphából származnak. Valószínű, hogy a perilympha fehérjéi átjutnak a ligamentum spirálén a bazális és a marginális sejtekbe, így transzportálódnak az endolymphába. Néhány, a plazmából származó proteinben relatíve gazdag az endolympha, mint például apolipoprotein J és D-ben, melyek feladata valószínűleg az endolymphatikus térben lévő sejtmembránok védelme. A kis számban jelenlévő glükozilált fehérjék folyamatosan szekretálódnak az endolymphába speciális epitheliális sejtek által, és feladatuk, hogy fenntartsák a strukturális és funkcionális integritását az extracelluláris

szuperstruktúráknak, mint például a membrana tectoriának, vagy a félkörös ívjátatokban található cupuláknak. Ezek a makromolekulák a saccus endolymphaticusba szállítódnak el, majd eliminálódnak onnan (Thalmann and Thalmann 1999).

A fül-orr-gégészek által sokat kutatott Ménière betegség hátterében endolymphaticus hydrops valószínűsíthető. Ezen betegség patogenezisének kutatása kapcsán merült fel a saccus endolymphaticus fehérjetartalmának vizsgálata is, tekintettel arra, hogy jelen ismereteink szerint fontos szerepe van az endolympha szekréciójában, felszívódásában, térfogatának szabályozásában, valamint a már nem szükséges molekulák eliminálásában. A saccus endolymphaticus teljes fehérjetartalma megközelítőleg 40%-ban egyezik a plazmáéval és hasonló a fehérje mintázata is. A cochleában lévő endolymphának 40-szer kisebb a fehérjetartalma, benne számos prominens fehérjét azonosítottak: albumin, α -kimotripszin, α -antitripszin, α -HS-glükoprotein, transzferrin, ApoD, ApoJ, fetuin. A legfeltűnőbb különbség, hogy míg a saccus endolymphaticusban nincs, addig a cochleáris endolymphának szignifikánsan magas az ApoD fehérje tartalma, mely relatíve nagy koncentrációban megtalálható még a liquorban valamint a perilymphában, a plazmában viszont nagyon alacsony a koncentrációja. A belsőfülben a sacculusban és az utriculusban lévő bioásványok, az otoconiumok fehérje összetételét is vizsgálták, és főként osteopontint és fetuint azonosítottak. Az osteopontinnak fiziológiás körülmények között a sejtek adhéziójában és az extracelluláris mátrix fehérjéinek megkötésében van szerepe, valószínűleg az otoconiák szintézisét segíti. Fetuin megtalálható az endolymphában is, ismert kalcifikációt gátló hatása. Feltételezik, hogy szabályozó szerepe van az otoconiumok szintézisében, gátolja azok túlságos kalcifikációját. A Corti-féle szerv fehérje tartalmának vizsgálata során elektroforézissel több prominens fehérjét találtak: OCP1, OCP2, calmodulin, calbindin. Immunhisztokémiai és in situ hibridizációs technikák segítségével a külső szőrsejtekben oncomodulint, a belső szőrsejtekben α -parvalbumint mutattak ki (Thalman et al. 2006).

A perilympha és endolympha összetételét tehát emberben és főleg tengerimalacban már sok kutatócsoport vizsgálta, de a csirke endolympha összetételével kapcsolatban kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Madarak belső fülének vizsgálata során főként az endolympha és perilympha ionösszetételét (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) vizsgálták, ugyanis

ezeknek fontos szerepük van a szőrsejtek aktivációjának szabályozásában (Runhaar et al. 1991; Sauer et al. 1999), de a fehérjeösszetételre vonatkozóan nem találtunk pontos irodalmi adatot. Vizsgálataink során a csirke endolympha protein összetétele komplex mintázatot mutatott, számos protein csúcs volt detektálható a 14 és 81 kDa molekulatömeg régióban, de a fehérjecsúcsok szeparációjára és azonosítására vizsgálati módszerünkkel nem volt lehetőség.

Számos kutatás irányul tehát a peri- és endolympha összetételének vizsgálatára (Thalman et al. 1992, Swan et al. 2009), és kimutatták, hogy a perilympha fehérje tartalma bizonyos kóros állapotok során megnő. Ezt tapasztalták acusticus neurinómában (Lysaght et al. 2011), Hakuba és munkatársai pedig 2000-ben kimutatták, hogy a megfelelő glutamát transzporter hiányában (GLAST) a perilympha glutamát tartalma zajkárosodás esetén megemelkedik.

A PACAP kezelés hatására létrejövő esetleges változások a fiziológiától eltérő cochleáris vagy vesztibuláris funkciókra is utalhatnak. Vizsgálataink során szignifikáns eltérést nem tudunk kimutatni az exogén PACAP kezelés hatására, ebből arra következtethetünk, hogy az általunk alkalmazott kezelés jelentősen nem befolyásolta a fiziológias funkciókat.

Bár munkánk során nem találtunk szignifikáns eltérést az exogén PACAP kezelés után az endolympha fehérje összetételében, az a tény, hogy a PACAP és a PAC1 jelen van a stria vascularisban, közel az endolymphatikus térhez, azt sugallja, hogy a PACAP-nak szerepe lehet az endolympha termelésében, potenciáljának és/vagy összetételének szabályozásában (Abu-Hamdan et al. 2006). A PACAP endolympha termelésre kifejtett hatásának feltérképezése további vizsgálatokat igényel. Tekintettel arra, hogy az endolympha fehérjéi a perilymphából származnak (Thalman és Thalman 1999), jelenleg már folynak azon kísérleteink, ahol humán perilympha mintákban - melyeket cochleáris implantáció műtéte során nyerünk - vizsgáljuk a PACAP jelenlétét és fehérje összetételének változását különböző pathológias elváltozások során. Az elmúlt években több kutatócsoport is foglalkozott a humán perilympha vizsgálatával, nemrégiben Lysaght és munkatársai (2011) 271 féle különböző fehérjét mutattak ki a perilymphából tömegspektrometria segítségével. Ebben a vizsgálatban 2 betegcsoporttól gyűjtöttek perilymphát, az egyik csoportban vestibularis schwannoma műtét, a másik csoportban

pedig cochleáris implantáció kapcsán. Minden betegnél súlyosfokú idegi halláscsökkenés volt mérhető. Perilympa vizsgálatát azért tartották fontosnak, mert elhelyezkedése alapján feltételezhető, hogy belső fül károsodás esetén a perilymphában nagyobb koncentrációban jelennek meg a károsodott sejtek által kibocsátott fehérjék, mint a vérben vagy a liquorban. Összehasonlítva a mintákat, 71 fehérjét azonosítottak, melyek jelen voltak mindegyik mintában. Ezeket a fehérjéket összevetve a korábbi vizsgálatban találtakkal (Thalman et al. 1994) 91%-ban találtak egyezést, továbbá újonnan 46 fehérjét azonosítottak. Tovább vizsgálva a perilympa mintákat, 15 fehérjét javasolnak a jövőben biomarkerként használni vestibularis schwannomás betegekben annak vizsgálatára, hogy okoz-e a tumor idegi halláscsökkenést vagy nem. Hasonlónak találták a perilympa fehérje összetételét a plazma és a liquor fehérjéivel, azonban számszerű összehasonlítás ebben a vizsgálatban nem volt lehetséges. Szintén hasonlóságot fedeztek fel az emberi és az egér perilympa fehérjéi között, így felmerül egér modell használata a belső fül betegségek biomarkereinek kutatásában (Lysaght et al. 2011).

Célunk a későbbiekben humán endolympha minta gyűjtése is, ami műtét során két esetben lehetséges: labyrinthectomia és a saccus endolymphaticus drenálása - saccotomia kapcsán. Ezen nagyon ritka műtéteket olyan Ménière betegekben végezzük, akiknél konzervatív terápiával nem érhető el a tünetek jelentős javulása.

4.3. Vad típusú és PACAP-génhiányos egerek belső fülének összehasonlító vizsgálata

Munkánk során először 5 napos vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek belső fülében vizsgáltuk a PAC1 receptor és a Ca^{2+} -kötő fehérjék expresszióját szövettani módszerekkel. Haematoxin-eozin festéssel nem találtunk eltérést a belső fül felépítésében a két állatcsoport között, azonban immunhisztokémiai vizsgálatokkal szignifikáns különbséget találtunk a PAC1 receptor és a Ca^{2+} -kötő fehérjék tekintetében a homozigóta PACAP-génhiányos egerek belső és külső szőrsejtjeiben a vad-típusú egerekhez képest.

A bevezetésben már említésre került, hogy az endogén PACAP hiánya számos szerv működésében okoz eltéréseket a génhíányos egerekben a vad típusú egerekhez hasonlítva, ezért érzékenyebben reagálnak különböző károsító hatásokra. Élettani funkcióik normálistól eltérőek, alacsonyabb a szaporodási képességük, magasabb a halálozási arányuk, eltérést mutatnak egyes szervek pl. a fogak fejlődésében, memória- és magatartás zavarai is vannak, például depresszióhoz hasonló tünetekkel rendelkeznek. Fájdalomra és stresszre adott válaszaik is sokszor a normálistól eltérőek (Reglődi et al. 2012; Gaszner et al. 2012a,b; Sándor et al. 2010; Sándor et al. 2014). Néhány tanulmányban morfológiai eltéréseket is találtak: a kisagy fejlődése súlyosan érintett PACAP-génhíányos egerekben (Allias et al. 2007); bár súlyra és nagyságra nincs különbség (Vaudry et al. 2005), azonban szövettani vizsgálattal kimutatták, hogy 4. posztnatalis napon a külső, a 7. posztnatalis napon pedig a belső szemcsés réteg vékonyabb szignifikánsan. A szemcses sejtek differenciálódása késik, míg a természetesen előforduló sejthalál emelkedett az egyedfejlődés során PACAP-génhíányos egerekben (Allais et al. 2007). Más kísérletben a normálistól eltérő axonális arborizációt találtak a gyrus dentatusban ezekben az egerekben (Yamada et al. 2010). Kísérletesen előidézett encephalomyelitisben a PACAP-génhíányos egerekben súlyosabb klinikai és patológiai elváltozásokat találtak (Tan et al. 2009). Motoros ideg sérülés esetén csökkent regenerációt és fokozott gyulladást választ (Armstrong et al. 2008), gerincvelő sérülésekor nagyobb károsodott területet és az idegi funkciók csökkent javulását tapasztalták ezekben az egerekben (Tsuchikawa et al. 2011). Endotoxin indukálta szubakut légúti gyulladásban a PACAP-génhíányos egerekben fokozott légúti hiperreaktivitást, súlyosabb gyulladás által okozott szövettani elváltozásokat valamint a myeloperoxidáz aktivitás jelentősen emelkedését mutatták ki vad egerekhez képest (Elekes et al. 2011). Doxorubicin által indukált cardiomyopathiában a PACAP-génhíányos egerek mortalitása jelentősen emelkedett -megközelítőleg 20% volt túlélő - és a reaktív oxigén metabolitok szintje 30%-al volt magasabb, mint vad társaikban (Mori et al. 2010). Ischaemiás vesekárosodás esetén PACAP-génhíányos egerekben nagyobb szöveti károsodás volt detektálható, például tubuláris és Bowmann tok tágulat, fokozott fehérvérsejt infiltráció (Szakály et al. 2011). Ischaemiás vékonybél károsodás esetén mind a kvalitatív, mind a kvantitatív szövettani károsodásokat nagyobbaknak találták

PACAP-génhiányos egerekben (Ferencz et al. 2010a). Vastagbélgyulladást modellező kísérletben a klinikai tüneteket, a gyulladás szöveti jeleit valamint ezzel összefüggésben a colorectális tumor kialakulásának lehetőségét fokozottnak találták PACAP-génhiányos egerekben (Azuma et al. 2008; Nemetz et al. 2008). Kísérletesen előidézett allergiás kontakt dermatitisben fokozott gyulladási reakciót és nagyobb ödéma képződést figyeltek meg (Kemény et al. 2010), és a szemet érő ischaemiás vagy toxikus károsodás esetén is nagyobb retinális károsodást és az apoptotikus markerek emelkedését találták ezekben az egerekben (Endo et al. 2011, Szabadfi et al. 2012).

Összegezve megállapítható, hogy az idegrendszer és a perifériás szervek különböző károsodásai esetén a PACAP hiánya fokozott sérülékenységet okoz. Általánosan elfogadott, hogy a PACAP protektív hatása komplex reakciók sorozataként jön létre, mint például antioxidáns, antiapoptotikus és gyulladáscsökkentő hatások révén. Ezeket a mechanizmusokat támasztják alá az előzőekben említett vizsgálatok eredményei, miszerint a PACAP hiánya fokozott apoptózist, gyulladási folyamatokat és oxidatív stresszt okoz, sérülékenyebbé téve az idegrendszert és a perifériás szerveket (Reglődi et al. 2012). Egy 2014-ben megjelent közleményben munkacsoportunk elsőként vizsgálta és hasonlította össze vad és PACAP-génhiányos egerek különböző agyterületeinek fehérjéit MALDI TOF tömegspektrometriás módszerrel (Maász et al. 2014). A vizsgálat során a 22 azonosított fehérjéből 14 upregulációját, 4 fehérje downregulációját állapították meg PACAP-génhiányos egerekben, 4 fehérje esetén nem találtak különbséget a vad egerekkel összehasonlítva. Azon fehérjék, melyek tekintetében downregulációt találtak, az oxidatív stressz elleni és antioxidáns védelemmel hozhatóak összefüggésbe, valamint glükolizáló enzimek egy csoportja. Az ATP szintáz esetén upregulációt találtak a PACAP-génhiányos egerekben. Az eredmények arra utalnak, hogy az endogén PACAP szükséges a kedvező energia egyensúly biztosításához és hiányában a szervezet sérülékenyebb a károsító hatásokkal szemben. Az is feltételezhető, hogy a PACAP-génhiányos egerek a sérült energia egyensúlyt az ATP szintáz emelésével kompenzálják normál körülmények között. Ez lehet a magyarázata annak is, amit más vizsgálatban találtak Ohtaki és munkatársai (2010), hogy a fiatal PACAP-génhiányos egerekben miért nem emelkedett az oxidatív stressz szint ellentétben az idősebb állatokkal. Több más fehérje esetén is volt különbség, például

szerkezeti fehérjék tekintetében, azonban ezek funkcionális jelentősége még vizsgálat alatt áll. Összegezve megállapítható, hogy az endogén PACAP hatással van az energia homeosztázisra, mely annak hiányában sérül. Megváltozott, kóros körülmények között a PACAP-génhiányos egerek ezt a megbillent energia egyensúlyt nem tudják kompenzálni, ezért sokkal sérülékenyebbek külső károsodásokkal szemben (Maász et al 2014).

4.3.1. PAC1 receptor expressziójának összehasonlító vizsgálata

Az immunhisztológiai összehasonlító vizsgálataink során a vad-típusú egerek külső és belső szőrsejtjeiben, valamint a Deiters-féle támasztósejtekben is találtunk PAC1 receptor expressziót. Eredményeink a PAC1 receptor lokalizációját tekintve a belső fülben megfelelnek a korábbi irodalmi adatoknak. Abu-Hamdan és munkatársai 2006-ban kimutatták patkány cochleában a PAC1 receptornak két variánsát. Drescher és munkatársai (2006), hasonlóan a mi vizsgálatainkhoz, PAC1 receptor pozitivitást találtak szőrsejtjeiben és Deiters-féle támasztósejtjeiben is. Munkacsoportunk elsőként végzett immunhisztológiai vizsgálatokat PACAP-génhiányos egerek belső fülében. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a homozigóta PACAP-génhiányos egerek belső és a külső szőrsejtjeiben, valamint a Deiters-féle támasztósejtjeiben talált PAC1 receptor expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt a vad-típusú társaikhoz képest. A PAC1 receptorok idegrendszeri expressziójának pontos szabályozása még nem teljesen ismert, de Girard és munkatársai (2006) is fejlődésbeli késést mutattak ki mind a három receptor altípus agyi expressziójában PACAP- és VIP-génhiányos egerekben vad-típusú társaikhoz képest. A PACAP-ról ismert, hogy indukálja saját receptorának, a PAC1 receptornak is az expresszióját. Eredményeink ezzel is összefüggésben lehetnek, mivel endogén PACAP hiányában a PAC1-mediálta folyamatok is valószínűleg csökkennek.

4.3.2. Ca²⁺-kötő fehérjék expressziójának összehasonlító vizsgálata

A Ca²⁺-kötő fehérjék detektálása során parvalbumin, calretinin és calbindin immunpozitivitást vizsgáltuk 5 napos vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos

egerek külső és a belső szőrsejtjeiben. Összehasonlító vizsgálatainkhoz az 5 napos kort olyan vizsgálatok alapján választottuk, melyek bizonyították, hogy ezek a fehérjék ebben az időpontban már expresszálódnak a szőrsejtben.

Calretinin immunreaktivitás a belső szőrsejtben az 19. embrionális nap és a születés között jelenik meg, míg a külső szőrsejt a posztnatális 1. naptól expresszálja. Mind a belső, mind a külső szőrsejt pozitív a 4. posztnatális napon, de a 10. naptól a külső szőrsejtben az immunpozitivitás kezd eltűnni (Dechesne et al. 1994). Tengerimalacok, felnőtt patkányok, mongóliai futóegerek cochleának vizsgálata során az egerekéhez hasonló calretinin eloszlást találtak (Dechesne et al. 1991; Pack és Slepecky 1995).

A parvalbuminnak két izoformája van, az alfa- és béta-parvalbumin (Pauls et al. 1996). Patkány cochleában a béta-parvalbumin expressziója posztnatális 2.-4. nap között kezdődik, míg az alfa-parvalbumin expressziója a születés előtt kezdődik és magas marad a felnőtt kor során is (Hackney et al. 2005; Yang et al. 2004). Sakaguchi és munkatársai (1998) hasonló eredményeket találtak egerek és futóegerek belső fülében.

Calbindint találtak patkányoknál mind a belső, mind a külső szőrsejt citoplazmájában a posztnatális 7. napon, majd utána expressziójuk csökken mind a két fajta szőrsejtben az érés során, majd a 26. posztnatális napra a belső szőrsejtekből teljesen eltűnik (Hackney et al. 2005).

A Ca^{2+} -kötő fehérjék (calretinin, calbindin, parvalbumin) fontos szerepet játszanak a citoplazmális Ca^{2+} ionok pufferolásában, befolyásolják a Ca^{2+} -hoz kötött jelátviteli utakat és a Ca^{2+} homeosztázist is (Schwaller 2010). Régóta ismert, hogy az emelkedett sejten belüli Ca^{2+} koncentráció minden sejtbe, így a szőrsejtekre is káros hatással van (Orrenius et al. 1992; Trump és Berezesky 1996), mert olyan Ca^{2+} -függő folyamatokat indukál, melyek végeredményben a sejt apoptotikus vagy nekrotikus pusztulását okozzák. A különböző ototoxikus ágensek és a túlzott zajterhelés - mint vezető okai a sükettségnek - oly módon érik el hatásukat, hogy fenntartják az ilyenkor megnövekedett Ca^{2+} koncentrációt a szőrsejtben (Ikeda et al. 1988; Li és Steyger 2009). Ez úgy jön létre, hogy a megnövekedett extracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására a sejthártyán is nagyobb mennyiségű Ca^{2+} ion jut be a sejtbe, ami a szőrsejt tartósan megnövekedett Ca^{2+} koncentrációjához vezet (Ikeda et al. 1988; Fridberger et al. 1998; Lendvai et al.

2011). Más esetekben is megfigyelték az endolympha Ca^{2+} koncentrációjának emelkedését, amely káros lehet a szőrsejtekre, például sebészileg előidézett endolymphaticus hydropsban (Salt és DeMott 1994). A Ca^{2+} -indukálta sejtkárosodás kivédhető, ha a sejten belüli Ca^{2+} emelkedést gátoljuk, amiben a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek fontos szerepe van (Gilbert et al. 1995).

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a homozigóta PACAP-génhiányos egerek szőrsejtjeiben a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója szignifikánsan magasabb a vad-típusú egerekhez képest. Számos irodalmi adat számol be arról, hogy különböző halláskárosító hatások (zaj, öregedés) következtében megemelkedik a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója a belső fülben. Korábban kimutatták, hogy hang stimuláció hatására a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója megnő a colliculus inferiorban (Idrizbegovic et al. 1999) és a nucleus cochlearisban (Idrizbegovic et al. 1998). A presbyacusist modellező C57-es egértörzs vizsgálata során bebizonyították, hogy a belső fület érintő degeneratív elváltozások módosítják az idegrendszer homeosztázisát úgy, hogy az öregedés folyamán a posteroventralis és dorsalis cochlearis magok neuronjaiban megnövelik a Ca^{2+} -kötő fehérjék arányát, ugyanis a parvalbumin és calretinin immunpozitivitásának emelkedését figyelték meg mindkét mag esetében 1-30 hónapos egereket vizsgálata során (Idrizbegovic et al. 2003). Hasonló eredményeket találtak az idegi hallásvesztés modelljeként szolgáló 24 hónapos BALB/c egerekben is (Idrizbegovic et al. 2006). Ebben a kísérletben kimutatták a Ca^{2+} -kötő fehérjék expresszió növekedését a nucleus cochlearisban, ami arra enged következtetni, hogy a korral járó Ca^{2+} -indukálta toxicitás kivédésében fontos szerepük lehet a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek.

Tekintettel arra, hogy a sejtdegeneráció hátterében gyakran a Ca^{2+} homeosztázis károsodása áll, ezért feltételezhető hogy a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek védő szerepük lehet egyes neuronális károsodásokban (Heizmann 1992). Iacopino és mtsai (1992) vizsgálták a Ca^{2+} -kötő fehérjék szintjét (calbindin) idegsejtekben különböző neurodegeneratív modellekben, köztük Parkinson-kór modellben is, ahol a substantia nigra károsodott sejtjeinek többsége nem, azonban a jóval kisebb számú túlélő sejtek tartalmaztak calbindint. Egy másik kutatócsoport status epileptikus követően vizsgálta a hippocampalis sejtek Ca^{2+} -kötő fehérje expresszióját, és arra a feltételezésre jutottak, hogy a calretinin és parvalbumint expresszáló sejtek számának csökkenése fontos

szerepet játszhat az epilepszia progressziójában (van Vliet et al. 2004). Hippocampus idegsejtkultúrában a glutamát kezelés kóros intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnövekedést hoz létre. Ebben a modellben vizsgálták exogén PACAP kezelés hatását, ami PAC1 receptoron keresztül gátolta az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnövekedést, így megvédte a sejteket a glutamát-indukálta károsodással szemben (Dong et al. 2000).

A PACAP-génhiányos egerekben talált emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje expresszió hátterében álló folyamatok még nem teljesen ismertek. Az irodalmi adatokkal összevetve eredményeinket feltételezhető, hogy a belső fület érintő különböző károsodások hatására az endolympha Ca^{2+} koncentrációja megnő, mely a szőrsejtekben az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedését okozza, amely hatással szemben a szőrsejtek fokozott Ca^{2+} -kötő fehérjék expresszióval védekeznek. Kísérletünkben a PACAP-génhiányos egerekben a vad típushoz képest a Ca^{2+} -kötő fehérjék jóval nagyobb expresszióját találtuk, ezek alapján feltételezhető, hogy a PACAP hiánya megnövekedett endolympha Ca^{2+} koncentrációt okoz, mely közvetetten a Ca^{2+} -kötő fehérjék emelkedett expressziójához vezet. Ebből arra lehet következtetni, hogy a PACAP-nak fontos szerepe van a szőrsejtek Ca^{2+} homeosztázisában, és hiánya esetén a szőrsejtek jóval sérülékenyebbek toxikus hatásokkal szemben hasonlóan más károsodásokhoz. Másrészt lehetséges, hogy endogén PACAP hiányában a megbillent védekezőrendszer egyensúlyának fenntartása érdekében növekszik a Ca^{2+} -kötő fehérjéknek az expressziója.

4.3.3. Kanamycin-indukálta ototoxikus károsodás vizsgálata vad típusú és PACAP-génhiányos egerekben

A kanamycin-indukálta ototoxikus károsodás vizsgálata során az állatokat 5 napos korban kezeltük kanamycinnel és fiziológias sóoldattal, majd 7 napos korban vizsgáltuk a vad típusú és PACAP-génhiányos egerek szőrsejteiben a Ca^{2+} -kötő fehérje expressziójának változását. Ebben a kísérletben a homozigóta PACAP-génhiányos egerek mellett heterozigóta PACAP-génhiányos egereket is vizsgáltunk, ugyanis az elmúlt években egyre szélesebb körben használják a heterozigóta egereket a homozigóta egerek magas mortalitása miatt (Endo et al. 2011; Tsuchikawa et al. 2012). A

homozigóta egerekhez hasonlóan a heterozigóta PACAP-génhiányos egerek is érzékenyebbek különböző idegrendszeri-, vese-, és bélkárosító hatásokkal szemben a vad egerekhez képest (Vaudry et al. 2005; Chen et al. 2006; Ohtaki et al. 2006; Armstrong et al. 2008; Ferencz et al. 2010a; Tan et al. 2009; Nakamachi et al. 2010; Szakály et al. 2011, Reglődi et al. 2012). Heterozigóta PACAP-génhiányos egerek vizsgálata során stroke modellben magasabb mortalitást és 25%-al emelkedett agyi ödémát találtak (Nakamachi et al. 2010). Gerincvelősérülést követően ezekben az egerekben nagyobb volt a károsodott terület nagysága, a sérült idegsejtek száma valamint a funkcionális veszteség mértéke összehasonlítva a vad egerekhez képest (Tsuchikawa et al. 2011). Kísérletesen előidézett cardiomyopathiában a heterozigóta PACAP-génhiányos egerek túlélése 50%, a homozigóta PACAP-génhiányos egereké 20%, a vad típusú egereké 90% volt. Echocardiográfiás vizsgálattal enyhe, de szignifikáns funkcionális csökkenést mértek a heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben, valamint fénymikroszkópos szövettani vizsgálat során 30%-al nagyobb szívizom fibrózist és degeneratív elváltozásokat találtak ezen egerekben (Mori et al. 2010).

Vizsgálataink során a homozigóta egerekhez hasonlóan a heterozigóta egerek szőrsejtjeiben is emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje expressziót detektáltunk a vad-típusú egerekhez képest kontroll körülmények között, de a parvalbumin expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt a heterozigóta egerekben a homozigóta egerekhez viszonyítva. May és Vizzard (2010) hasonló eredményeket kaptak a PACAP-génhiányos egerek húgyhólyagjának morfológiai és funkcionális vizsgálata során, ugyanis a heterozigóta egerek enyhébb patológiás eltéréseket mutattak homozigóta társaikhoz képest.

Kanamycin-kezelést követően is szignifikáns eltéréseket találtunk a 7 napos PACAP-génhiányos és vad-típusú egerek szőrsejtjeinek vizsgálata során. A legtöbb ototoxikus állatmodellben felnőtt állatokat tanulmányoznak, azonban az újszülött állatok éretlen belső füle fokozottabban érzékeny az aminoglikozid indukálta ototoxicitásra (Bernard 1981; Pujol 1986). Egerekben és patkányokban a hallás érése a posztnatális időszakban fejeződik be, ezért ezek az állatok jó modellként szolgálnak az ototoxicitás patomechanizmusának vizsgálatára (Osako et al. 1979; Marot et al. 1980; Lenoir et al.

1983; Prieve és Yanz 1984; Henley és Rybak 1995). A jelen kísérletben 5 napos egereket kezeltünk kanamycin egyszeri nagy dóziséval (1mg/g testsúly), mely vezethet gén vagy fehérje expresszió változáshoz (Taylor et al. 2008). Vizsgálatainkban kanamycin kezelést követően szignifikánsan megemelkedett parvalbumin expressziót detektáltunk a vad típusú és a heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben, de az alaphelyzetben is emelkedett parvalbumin expresszió a homozigóta PACAP-génhiányos egerekben tovább nem emelkedett szignifikánsan. A calretinin expreszió csak a vad-típusú egerekben emelkedett szignifikánsan a kanamycin kezelés után, a homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben az eredetileg is fokozott expresszió nem emelkedett tovább.

Az első lépést az aminoglikozid által kiváltott ototoxicitásban a szabadgyökök fokozott termelése jelenti, mely apoptózist okozva a sejtek halálához vezet. A fő apoptotikus út, amelyet az aminoglikozid antibiotikumok okoznak, az intrinsic apoptotikus útvonal, melynek aktivációja során az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedik citotoxikus szintet elérve (Orrenius et al. 1992; Trump és Berezesky 1996). A toxicitás megállítható a Ca^{2+} koncentráció emelkedésének megelőzésével (Gilbert et al. 1995), utalva a Ca^{2+} -kötő fehérjék fontos védő szerepére ebben a folyamatban. Korábban már több munkacsoport folytatott kutatásokat, hogy olyan anyagot találjanak, mely csökkenti, vagy esetleg kivédi az aminoglikozidok által okozott ototoxicitást. Ennek során apoptózist gátló, szabadgyököket semlegesítő, illetve neurotrófikus faktorokat vizsgáltak, amelyek legtöbb esetben csak az állatkísérletes modellekben bizonyultak hatékonynak és a klinikai gyakorlatban nem. Először az aszpirint tesztelték sikeresen gentamycin indukálta halláscsökkenésben (Sha et al. 2006; Behnoud et al. 2009). Antioxidáns anyagokat vizsgálva, az N-acetilcisztein mérsékelte a halláscsökkenés előfordulását haemodializált, gentamycinnel kezelt betegekben (Feldman et al. 2007). Ezzel ellentétben az E vitamin alkalmazása nem okozott szignifikáns védelmet gentamycin által okozott halláscsökkenésben (Kharkheli et al. 2007). Másik lehetőség az ototoxicitás kivédésére az apoptotikus útvonalak blokkolása. A JNK és a kaszpázok gátlásával lehetőség nyílt a szörsejtkárosodás mértékének csökkentésére aminoglikozid kezelést követően (Pirvola et al. 2000). GDNF (glia sejt

által termelt neurotrófikus faktor) és más neurotrófikus faktorok is védő hatást fejtettek ki aminoglikozid okozta halláskárosodást vizsgáló állatkísérletekben (Yagi et al 1999).

A PACAP-nak jól ismert az antiapoptotikus és az antioxidáns hatása (Ohtaki et al. 2010), ezért fontos szerepe lehet az aminoglikozidok által indukált ototoxicitás kivédésében. A vizsgálati eredmények arra engednek következtetni, hogy az emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje expresszió talán késleltetni képes az apoptotikus útvonalak aktivációját. Feltételezzük, hogy az endogén PACAP hiánya patológiás állapot a szőrsejtek számára, amelynek hatására a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója megemelkedik már normál körülmények között is. A homozigóta PACAP-génhiányos egerekben ez elér egy olyan maximális szintet, ahonnan a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója már nem képes tovább növekedni ototoxikus hatásokra sem. Amint ezeknek a puffereknek az aktivációját nem lehet upregulálni, úgy nem képes tovább kivédeni a sejt a Ca^{2+} ionnal való túltöltődést, és ez az apoptotikus útvonalak aktiválódásához vezet (Tombal et al. 2002).

Vizsgálatainkkal először sikerült kimutatni az endogén PACAP otoprotektív hatását kanamycin indukálta belső fül toxicitásban. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az exogén PACAP-nak védő hatása lehet különböző ototoxikus behatások esetén, bár további vizsgálatok szükségesek a PACAP pontos hatásmechanizmusának leírására aminoglikozid által indukált ototoxicitásban.

A világon széles körben használják az aminoglikozid antibiotikumokat, mind a fejlődő, mind a fejlett országokban például életet veszélyeztető újszülöttkori szepszis, endocarditis, komplikált húgyuti, hasi fertőzések, vagy osteomyelitis esetén (Radigan et al. 2010). Cisztás fibrózisban, ahol a halált 85%-ban a tüdő megbetegedése okozza, a túlélést növelni lehet tobramycin vagy más aminoglikozid rendszeres belélegzésével, vagy intravénás alkalmazása által (Frederiksen et al. 1996). Terhesség alatt bekövetkezett komplikált húgyuti fertőzésben is egyre gyakrabban alkalmazzák a gentamycint az E. coli megnövekedett ampicillinnel szembeni rezisztenciája miatt, bár így veszélyes lehet a magzatra is, hiszen át tud jutni a placentán. Ezen fenti tulajdonságot azonban ki lehet használni chorioamnionitis és intrauterin fertőzések esetén (Lyell et al. 2010).

Fej-nyaksebészeti tumoros megbetegedések kemoterápiás kezelésében korábban évtizedeken át a cisplatin volt az egyik legtöbbet alkalmazott szer. Irodalmi közlések

szerint akár a betegek 93%-ban is okozhat idegi halláscsökkenést a cisplatin és ezidáig még nem ismert olyan kezelés, mely ezen hatását kivédené (Waissbluth et al. 2013). Az aminoglikozid antibiotikumok és a cisplatin kétoldali idegi halláscsökkenést okozhatnak először a magas frekvenciákon, majd a mélyebb frekvenciákon is hosszabb ideig alkalmazva. Az aminoglikozid antibiotikumok esetén vestibulotoxikus hatás is jelentkezhet, különböző mértékben egyensúly zavart és/vagy szédülést is okozhatnak. Az előzőekben említett mindkét gyógyszer hatása általában prolongált, napokkal, hetekkel a terápia kezdete után jelentkezik, illetve a tünetek súlyosbodhatnak a kezelés befejezése után is (Schacht et al. 2012). Az aminoglikozidok által okozott ototoxicitás nagymértékben függ a vizsgált betegcsoporttól, a kezelés paramétereitől, a beadás módjától és hogy milyen kritérium alapján határozzák meg a halláscsökkenést. Akut fertőzés 5-7 napos kezelése esetén a betegek megközelítőleg 20%-ában halláscsökkenést, 15%-ában pedig egyensúlyzavart tapasztaltak korábbi vizsgálatok során (Xie et al. 2011). Az American Academy of Audiology 2009-ben irányelveket határozott meg az aminoglikozid okozta halláskárosodások monitorozására: tisztahang audiometriát javasolnak végezni a hagyományosan mért frekvenciákon (125-8000 Hz) valamint magasabb frekvenciákon is (8000-20000 Hz). A méréseket a kezelés megkezdése előtt, majd a kezelés során 1x vagy 2x egy héten, aztán a kezelés befejezésekor és utána néhány hónappal ajánlják elvégezni. Manapság DPOAE (distortion product otoacoustic emissions) vizsgálatokat is végeznek az előzőek kiegészítéreként, mely objektív módszer lévén elengedhetetlen az aminoglikoziddal kezelt gyermekek hallásának meghatározásában (Al-Malky et al. 2011). A DPOAE egy olyan objektív hallásvizsgáló módszer, mellyel a külső szőrsejtek funkciója jól monitorozható, ezért használják világszerte többek között újszülöttkori hallásszűrésre valamint a belső fül kutatásban.

Audiológusként több, ototoxikus szer által előidézett idegi halláscsökkenéssel beteggel találkoztam munkám során. A cisplatin okozta halláskárosodások általában jól rehabilitálhatóak hagyományos hallókészülékkel. Az aminoglikozid antibiotikumok azonban több esetben oly mértékű, süketséggel határos halláscsökkenést okoztak, hogy cochleáris implantációt kellett végeznünk. A jövőben nagy áttörést jelentene egy olyan otoprotektív szer felfedezése, ami nemcsak az állatkísérletes modellekben, de a klinikai

gyakorlatban is hatásos lenne. Ezért a jövőben tervezzük az exogén PACAP kezelés hatásának vizsgálatát ototoxikus modellekben, hogy további eredményekkel alátámaszthassuk a PACAP ígéretes otoprotektív hatását.

V. ÖSSZEGZÉS

1. Munkánk során igazoltuk a PACAP antiapoptotikus hatását csirke cochleából izolált sejtenyészletben oxidatív stressz-indukálta károsodással szemben.

2. Vizsgálataink során nem találtunk szignifikáns eltérést a csirke endolymphájának fehérje összetételében PACAP kezelés hatására.

3. Vizsgáltuk továbbá a PAC1 receptor és a Ca^{2+} -kötő fehérje expressziót 5 napos homoizgóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerekben. Bár a fénymikroszkópos struktúrák tekintetében nem találtunk eltérést a két állatcsoport között, azonban immunhisztokémiai vizsgálatokkal szignifikáns különbséget találtunk a PAC1 receptor és a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziójában. A belső és a külső szőrsejtekben, valamint a Deiters-sejtekben találtunk PAC1 receptor expressziót a homoizgóta PACAP-génhiányos egerekben, de ez szignifikánsan alacsonyabb volt összehasonlítva vad-típusú társaikkal. Kimutattuk azt is, hogy a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója magasabb homoizgóta PACAP-génhiányos egerek szőrsejtjeiben vad társaikéhoz képest.

4. Az utolsó kísérletben 7 napos vad, hetero- és homoizgóta PACAP-génhiányos egerek Ca^{2+} -kötő fehérje expresszióját vizsgáltuk fiziológias sóoldat és kanamycin kezelést követően. Kimutattuk, hogy a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója magasabb a homoizgóta- és a heteroizgóta PACAP-génhiányos egerek szőrsejtjeiben vad társaikéhoz képest. Kanamycin kezelést követően szignifikánsan megemelkedett parvalbumin expressziót detektáltunk a vad típusú és a heteroizgóta PACAP-génhiányos egerekben, de az alaphelyzetben is emelkedett parvalbumin expresszió a homoizgóta PACAP-génhiányos egerekben tovább nem emelkedett szignifikánsan. A calretinin expresszió csak a vad típusú egerekben emelkedett szignifikánsan a kanamycin kezelés után, a homo- és heteroizgóta PACAP génhiányos egerekben az eredetileg is fokozott expresszió nem emelkedett tovább. Ez az endogén PACAP fontos védő funkciójára utal ebben az ototoxikus modellben.

Eredményeink alapján valószínűsíthetjük a PACAP otoprotektív szerepét, de a hatásmechanizmus pontosabb feltérképezése céljából további kísérletek szükségesek.

VI. IRODALOM

6.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Abu-Hamdan MD, Drescher MJ, Ramakrishnan, NA, Khan KM, Toma VS, Hatfield JS, Drescher DG (2006) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) in the cochlea: Evidence for specific transcript expression of PAC1-R splice variants in rat microdissected cochlear subfractions. *Neuroscience* 140:147-161

Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ (2007) Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 25:2604-2618

Al-Malky G, Suri R, Dawson SJ, Sirimanna T, Kemp D (2011) Aminoglycoside antibiotics cochleotoxicity in paediatric cystic fibrosis (CF) patients: A study using extended high-frequency audiometry and distortion product otoacoustic emissions. *Int J Audiol* 50:112-122

Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991) Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129:2787-2789

Arimura A (1998) Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 48:301-331 Review

Arrer E, Oberascher G, Gibitz HJ (1988) Protein distribution in the human perilymph. A comparative study between perilymph (post mortem), CSF and blood serum. *Acta Otolaryngol* 106:117-123

Armstrong BD, Hu Z, Abad C, Yamamoto M, Rodriguez WI, Cheng J, Lee M, Chhith S, Gomariz RP, Waschek JA (2004) Induction of neuropeptide gene expression and blockade of retrograde transport in facial motor neurons following local peripheral nerve inflammation in severe combined immunodeficiency and BALB/C mice. *Neuroscience* 129:93-99

Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lau G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA (2008) Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Neuroscience* 151:63-73

Atlasz T, Babai N, Kiss P, Reglődi D, Tamás A, Szabadfi K, Tóth G, Hegyi O, Lubics A, Gábrriel R (2007) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is protective in bilateral carotid occlusion-induced retinal lesion in rats. *Gen Comp Endocrinol* 153:108-114

Atlasz T, Szabadfi K, Kiss P, Rácz B, Gallyas F, Tamás A, Gaál V, Márton Zs, Gábrriel R, Reglődi D (2010) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the retina: focus on the retinoprotective effects. *Ann N Y Acad Sci* 1200:128-139 Review

Azuma YT, Hagi K, Shintani N, Kuwamura M, Nakajima H, Hashimoto H, Baba A, Takeuchi T (2008) PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *J Cell Physiol* 216:111-119

Baird RA, Steyger PS, Schuff NR (1997) Intracellular distributions and putative functions of calcium-binding proteins in the bullfrog vestibular otolith organs. *Hear Res* 103:85-100

Bernard PA (1981) Freedom from ototoxicity in aminoglycoside treated neonates: a mistaken notion. *Laryngoscope* 91: 1985-1994

Behnoud F, Davoudpur K, Goodarzi MT (2009) Can aspirin protect or at least attenuate gentamicin ototoxicity in humans? *Saudi Med J* 30:1165-1169

Brenneman DE (2007) Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides* 28:1720-1726 Review

Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D (2007) Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides* 28:1746-1752 Review

Bourgault S, Vaudry D, Dejda A, Doan ND, Vaudry H, Fournier A (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: focus on structure-activity relationships of a neuroprotective peptide. *Curr Med Chem* 16:4462-4480 Review

Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW (2005) Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13:343-348

Chen Y, Samal B, Hamelink CR, Xiang CC, Chen Y, Chen M, Vaudry D, Brownstein MJ, Hallenbeck JM, Eiden LE (2006) Neuroprotection by endogenous and exogenous PACAP following stroke. *Regul Pept* 137:4-19

Cotanche DA, Kaiser CL (2010) Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hear Res* 266:18-25

Cummings KJ, Pendlebury JD, Sherwood NM, Wilson RJ (2004) Sudden neonatal death in PACAP-deficient mice is associated with reduced respiratory chemoresponse and susceptibility to apnoea. *J Physiol* 555:15-26

Dechesne CJ, Winsky L, Kim HN, Goping G, Vu TD, Wenthold RJ, Jacobowitz DM (1991) Identification and ultrastructural localization of a calretinin-like calcium-binding protein (protein 10) in the guinea pig and rat inner ear. *Brain Res* 560:139-148

Dechesne CJ, Rabejac D, Desmadryl G (1994) Development of calretinin immunoreactivity in the mouse inner ear. *J Comp Neurol* 346:517-529

Dejda A, Sokołowska P, Nowak JZ (2005) Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep* 57:307-320 Review

Dejda A, Jolivel V, Bourgault S, Seaborn T, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D (2008) Inhibitory effect of PACAP on caspase activity in neuronal apoptosis: a better understanding towards therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *J Mol Neurosci* 36:26-37 Review

Dehne N, Lautermann J, ten Cate WJ, Rauen U, de Grott H (2000) In vitro effects of hydrogen peroxide on the cochlear neurosensory epithelium of guinea pig. *Hear Res* 143:162-170

Delgado M (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 297:1181-1185

Delgado M, Leceta J, Ganea D (2003) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *Leukoc Biol* 73:155-164

Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D (2004) VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *FASEB J* 18:1453-1455

Drescher MJ, Drescher DG, Khan KM, Hatfield JS, Ramakrishnan NA, Abu-Hamdan MD, Lemonnier LA (2006) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) are positioned to modulate afferent signaling in the cochlea. *Neuroscience* 142:139-164

Dong Y, Tang TS, Lu CL, He C, Dong JB, Huang XY, Sun FZ, Bao X (2000) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ameliorates the damage and inhibits the increase of intracellular calcium concentration in cultured hippocampal neurons induced by glutamate. *Sheng Li Xue Bao* 52:402-406

Elekes K, Sándor K, Móricz A, Kereskai L, Kemény A, Szóke E, Perkecz A, Reglődi D, Hashimoto H, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs (2011) Pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide plays an anti-inflammatory role in endotoxininduced airway inflammation: in vivo study with gene-deleted mice. *Peptides* 32:1439-1446

Endo K, Nakamachi T, Seki T, Kagami N, Wada Y, Nakamura K, Kishimoto K, Hori M, Tsuchikawa D, Shinntani N, Hashimoto H, Baba A, Koide R, Shioda S (2011) Neuroprotective effect of PACAP against NMDA-induced retinal damage in the mouse. *J Mol Neurosci* 43:22-29

Feldman L, Efrati S, Eviatar E, Abramsohn R, Yarovoy I, Gersch E, Averbukh Z, Weissgarten J (2007) Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney Int* 72:359-363

Ferencz A, Rác B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, Nedvig K, Kalmár-Nagy K, Horváth OP, Wéber G, Róth E (2009) Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J Mol Neurosci* 37:168-176

Ferencz A, Kiss P, Wéber G, Helyes Zs, Shintani N, Baba A, Reglődi D (2010a) Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knock-out and wild-type mice. *J Mol Neurosci* 42:435-442

Ferencz A, Wéber, Gy, Helyes, Zs, Hashimoto H, Baba A., Reglődi D (2010b) Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. *J Mol Neurosci* 42: 428-434

Ferrary E, Bernard C, Teixeira M, Julien N, Bismuth P, Stekers O, Amiel C (1996) Hormonal modulation of inner ear fluids. *Acta Oto-laryngologica* 116:244-247

Filipsson K, Sundler F, Hannibal J, Ahren B (1998) PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects. *Regul Pept* 74:167-175

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. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7127-7132

Fonyó: Az Orvosi Élettan Tankönyve (Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest, 2011, V. kiadás)

Frederiksen B, Lanng S, Koch C, Høiby N (1996) Improved survival in the Danish center-treated cystic fibrosis patients: results of aggressive treatment. *Pediatr Pulmonol* 21:153-158

Gasz B, Rác B, Róth E, Borsiczky B, Ferencz A, Tamás A, Cserepes B, Lubics A, Gallyas Jr F, Tóth G, Lengvári I, Reglődi D (2006) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Peptides* 27:87-94

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Zs (2012a) The behavioral phenotype of pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide deficient mice in anxiety and depression induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol Dis* 45:633-644

Gaszner B, Kormos V, Kozicz T, Hashimoto H, Reglődi D, Helyes Zs (2012b) The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus, ventral lateral septum, and dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 202:283-299

Gilbert RJ, Pothoulakis C, LaMont JT, Yakubovich M (1995) Clostridium difficile toxin B activates calcium influx required for actin disassembly during cytotoxicity. *Am J Physiol* 268:G487-G495

Gillardon F, Hata R, Hossmann KA (1998) Delayed up-regulation of Zac1 and PACAP type I receptor after transient focal cerebral ischemia in mice. *Mol Brain Res* 61:207-210

Girard BA, Lelievre V, Braas KM, Razinia T, Vizzard MA, Ioffe Y, El Meskini R, Ronnett GV, Waschek JA, May V (2006) Noncompensation in peptide/receptor gene expression and distinct behavioral phenotypes in VIP- and PACAP-deficient mice. *J Neurochem* 99:499-513

Greenwood GJ (1959) Neomycin ototoxicity; report of a case. *AMA Arch Otolaryngol* 69:390-397

Hackney CM, Mahendrasingam S, Jones EM, Fettiplace R (2003) The distribution of calcium buffering proteins in the turtle cochlea. *J Neurosci* 23:4577-4589

Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25:7867-7875

Hakuba N, Koga K, Gyo K, Usami SI, Tanaka K (2000) Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci* 20:8750-8753

Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85

Hannibal J (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 453:389-417

Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S, Baba A. (1996) Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 371: 567-577

Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13355-13360

Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita M, Nagai K, Takeda M, Baba A (2009) Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone. *J Neurochem* 110:595-602

Heller S (2002) Molecular screens for inner ear genes. *J Neurobiol* 53:265-275

Heizmann CW (1992) Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *Gen Physiol Biophys* 11:411-425

Henley CM, Rybak LP (1995) Ototoxicity in developing mammals. *Brain Res Brain Res* 20:68-90 Review

Hirose K, Westrum LE, Stone JS, Zirpel L, Rubel EW (1999) Dynamic studies of ototoxicity in mature avian auditory epithelium. *Ann N Y Acad Sci* 884:389-409

Hock R, Anderson RJ (1995) Prevention of drug-induced nephrotoxicity in the intensive care unit. *J Crit Care* 10:33-43

Horváth G, Rácz B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F Jr, Bognár Z, Szabó A, Magyarlaci T, László E, Lubics A, Tamás A, Tóth G, Szakály P (2010) Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. *J Mol Neurosci* 42:411-418

Huang T, Cheng AG, Stupak H, Liu W, Kim A, Staecker H, Lefebvre PP, Malgrange B, Kopke R, Moonen G, Van De Water TR (2000) Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int J Dev Neurosci* 18:259-270

Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG (2011) Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol* 2011:937-861

Iacopino A, Christakos S, German D, Sonsalla PK, Altar CA (1992) Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* 13:251-261

Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Canlon B (1998) Modulating calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the cochlear nucleus by moderate noise exposure in mice. A quantitative study on the dorsal and posteroventral cochlear nucleus. *Brain Res* 800:86-96

Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Canlon B (1999) Sound stimulation increases calcium-binding protein immunoreactivity in the inferior colliculus in mice. *Neurosci Lett* 259:49-52

Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Viberg A, Canlon B (2003) Auditory peripheral influences on calcium binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus during aging in the C57BL/6J mouse. *Hear Res* 179:33-42

Idrizbegovic E, Salman H, Niu X, Canlon B (2006) Presbycusis and calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of BALB/c mice. *Hear Res* 216-217:198-206

Ikeda K, Kusakari J, Takasaka T (1988) Ionic changes in cochlear endolymph of the guinea pig induced by acoustic injury. *Hear Res* 32:103-110

Ikeda R, Nakaya K, Oshima T, Kawase T, Kobayashi T (2010) Calcium concentration in cochlear endolymph after vestibular labyrinth injury. *Neuroreport* 21:651-655

Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol* 476: 388-413

Kaplan DM, Nedzelski JM, Chen JM, Shipp DB (2000) Intratympanic gentamicin for the treatment of unilateral Meniere's disease. *Laryngoscope* 110:1298-1305

Kausz M, Murai Z, Arimura A, Köves K (1999) Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) immunoreactive elements in the brainstem of rats studied by immunohistochemistry. *Neurobiology* 7:19-30

Kawano, H, Shimozone M, Tono T, Miyata A, Komune S (2001) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the cochlea of rats. *Molecular Brain Research* 94: 200-203

Kemény A, Reglódi D, Cseharovszky R, Hashimoto H, Baba A, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency enhances oxazolone-induced allergic contact dermatitis in mice. *J Mol Neurosci* 42:443-449

Kerschbaum HH, Hermann A (1993) Calcium-binding proteins in the inner ear of *Xenopus laevis* (Daudin). *Brain Res* 617:43-49

Kharkheli E, Kevanishvili Z, Maglakelidze T, Davitashvili O, Schacht J (2007) Does vitamin E prevent gentamicin-induced ototoxicity? *Georgian Med News* 146:14-17.

Kitano, H, Suzuki, M, Kitanishi T, Yazawa Y, Isono T, Takeda T, Kimura H, Tooyam I (1999) Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuroreport* 10:1205-1207

Kopke RD, Liu W, Gabaiyadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrane B, Ruben RJ, Raybak L, Van De Water TE (1997) Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* 18:559-571

Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Miller J (1990) Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 127: 264-271

Kustos I, Andrásfalvy M, Kustos T, Kocsis B, Kilar F (2005) Effect of iron restriction on outer membrane protein composition of *Pseudomonas* strains studied by conventional and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 26:3789-3795

Larsen JO, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J (1997) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat after transection of the masseteric nerve. *Mol Brain Res* 46:109-117

Lendvai B, Halmos GB, Polony G, Kapocsi J, Horváth T, Aller M, Szilveszter Vizi E, Zelles T (2011) Chemical neuroprotection in the cochlea: the modulation of dopamine release from lateral olivocochlear efferents. *Neurochem Int* 59:150-158

Lenoir M, Marot M, Uziel A (1983) Comparative ototoxicity of four aminoglycosidic antibiotics during the critical period of cochlear development in the rat. A functional and structural study. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh.)* 405: 1-16

Li H, Steyger PS (2009) Synergistic ototoxicity due to noise exposure and aminoglycoside antibiotics. *Noise Health* 11:26-32.

Li Y, Ding D, Jiang H, Fu Y, Salvi R (2011) Co-administration of cisplatin and furosemide causes rapid and massive loss of cochlear hair cells in mice. *Neurotox Res* 20:307-319

Lysaght AC, Kao SY, Paulo JA, Merchant SN, Steen H, Stankovic KM (2011) Proteome of human perilymph. *J Proteome Res* 10:3845-3851

Lyell DJ, Pullen K, Fuh K, Zamah AM, Caughey AB, Benitz W, El-Sayed YY (2010) Daily compared with 8-hour gentamicin for the treatment of intrapartum chorioamnionitis: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 115:344-349

Maász G, Pirger Z, Reglődi D, Petrovics D, Schmidt J, Kiss P, Rivnyák A, Hashimoto H, Avar P, Jámber E, Tamás A, Gaszner B, Márk L (2014) Comparative protein composition of the brains of PACAP-deficient mice using mass spectrometry-based proteomic analysis. *J Mol Neurosci*. 54:310-319.

Marot M, Uziel A, Romand R (1980) Ototoxicity of kanamycin in developing rats: relationship with the onset of auditory function. *Hear Res* 2:111-113

Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A (2003) Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) or PACAP type 1 receptor-mutant mice. *Neuroreport* 14:2095-2098

Matz GJ (1993) Aminoglycoside cochlear ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am* 26:705-712

May V, Vizzard MA (2010) Bladder dysfunction and altered somatic sensitivity in PACAP^{-/-} mice. *J Urol* 183:772-779

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574

Moller K, Reimer M, Ekblad E, Hannibal J, Fahrenkrug J, Kanje M, Sundler F (1997) The effects of axotomy and preganglionic denervation on the expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), galanin and PACAP type 1 receptors in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res* 775:166-182

Mori H, Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Sato A, Endo K, Iso Y, Suzuki H, Takeyama Y, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Shioda S (2010) Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Circ J* 74:1183-1190

Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Watanabe J, Mori H, Sato A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shioda S (2010) Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl* 106:43-46

Nakamachi T, Farkas J, Watanabe J, Ohtaki H, Dohi K, Arata S, Shioda S (2011) Role of PACAP in neural stem/progenitor cell and astrocyte—from neural development to neural repair. *Curr Pharm Des* 17:973-984

Nemetz N, Abad C, Lawson G, Nobuta H, Chhith S, Duong L, Tse G, Braun J, Waschek JA (2008) Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *Int J Cancer* 122:1803-1809

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7488-7493

Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S (2008) Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci* 36:16-25 Review

Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S (2010) Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci* 42:397-403

Orrenius S, McCabe MJ Jr, Nicotera P (1992) Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 64-65:357-364 Review

Osako S, Tokimoto T, Matsuura S (1979) Effects of kanamycin on the auditory evoked responses during postnatal development of the hearing of the rat. *Acta Otolaryngol* 88: 359-368

Pack AK, Slepecky NB (1995) Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of corti: cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients. *Hear Res* 91:119-135

Pauls TL, Cox JA, Berchtold MW (1996) The Ca²⁺(-) binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes: new structural and functional findings. *Biochim Biophys Acta* 1306:39-54 Review

Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarma M, Murakata C, Camoratto AM, Walton KM, Ylikoski J (2000) Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci* 20:43-50

Poirrier AL, Van den Ackerveken P, Kim TS, Vandenbosch R, Nguyen L, Lefebvre PP, Malgrange B (2010) Ototoxic drugs: difference in sensitivity between mice and guinea pigs. *Toxicol Lett* 193:41-49

Prieve BA, Yanz JL (1984) Age-dependent changes in susceptibility to ototoxic hearing loss. *Acta Otolaryngol (Stockh.)* 98: 428-438

Pujol R (1986) Periods of sensitivity to antibiotic treatment. *Acta Otolaryngol (Stockh.)* 429: 29-33

Pytel J.: *Audiológia* (1996) Viktória KFT

Rácz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Róth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglódi D (2006) The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involve inhibition of proapoptotic signaling pathways. *Regul Pept* 137:20-26

Rácz B, Gasz B, Borsiczky B, Gallyas F Jr, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Kiss P, Róth E, Ferencz A, Tóth G, Hegyi O, Wittmann I, Lengvári I, Somogyvári-Vigh A, Reglódi D (2007) Protective effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in endothelial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Gen Comp Endocrinol* 153:115-123

Rácz B, Gasz B, Gallyas F Jr, Kiss P, Tamás A, Józsa R, Lubics A, Lengvári I, Tóth G, Hegyi O, Róth E, Reglódi D (2008) PKA-Bad-14-3-3 and Akt-Bad-14-3-3 signaling pathways are involved in the protective effects of PACAP against ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Regul Pept* 145:105-115

Radigan EA, Gilchrist NA, Miller MA (2010) Management of aminoglycosides in the intensive care unit. *J Intensive Care Med* 25:327-342

Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D (2006) The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem* 98:321-329

Reglódi D, Tamás A, Somogyvári-Vigh A, Szántó Z, Kertes E, Lénárd L, Arimura A, Lengvári I (2002) Effects of pretreatment with PACAP on the infarct size and functional outcome in rat permanent focal cerebral ischemia. *Peptides* 23: 2227-2234

Reglódi D, Tamás A, Lubics A, Szalontay L, Lengvári I (2004) Morphological and functional effects of PACAP in a 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Regul Pept* 123:85-94

Reglódi D (2009) A PACAP neuroprotektív és általános citoprotektív hatásainak vizsgálata in vitro és in vivo modellekben. MTA Doktori értekezés. Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Intézet, Pécs.

Reglódi D, Kiss P, Lubics A, Tamás A (2011) Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 17:962-972

Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábrriel R, Horváth G, Szakály P, Sándor B, Lubics A, László E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Zs, Welke L, Lakatos A, Tamás A (2012) PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. *Neurotox Res* 21:435-444

Reuss S, Disque-Kaiser U, Antoniou-Lippert P, Gholi MN, Riemann E, Riemann R (2009) Neurochemistry of olivocochlear neurons in the hamster. *Anat Rec* 292:461-471

Riek-Burchardt M, Kolodziej A, Henrich-Noack P, Reymann KG, Holtt V, Stumm R (2010) Differential regulation of CXCL12 and PACAP mRNA expression after focal and global ischemia. *Neuropharmacology* 58:199-207

Riera M, Torras J, Cruzado JM, Lloberas N, Liron J, Herrero I, Navarro MA, Grinyo JM (2001) The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response. *Transplantation* 72:1217-1223

Rizzi MD, Hirose K (2007) Aminoglycosid ototoxicity. *Current Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 15:352-357

Runhaar G, Schedler J, Manley GA (1991) The potassium concentration in the cochlear fluids of the embryonic and post-hatching chick. *Hear Res* 56:227-238

Rybak LP, Whitworth CA (2005) Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today* 10:1313-1321 Review

Sakaguchi N, Henzl MT, Thalmann I, Thalmann R, Schulte BA (1998) Oncomodulin is expressed exclusively by outer hair cells in the organ of Corti. *J Histochem Cytochem* 46:29-40

Salt AN, DeMott J (1994) Endolymph calcium increases with time after surgical induction of hydrops in guinea-pigs. *Hear Res* 74:115-121

Sándor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhász T, Reglődi D, Márk L, Kiss P, Jüngling A, Fülöp B, Nagy A, Hashimoto H, Zákány R, Nagy A, Tamás A (2014) Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci*. 54:331-341

Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D, Helyes Zs (2010) Impaired nocifensive behaviours and mechanical

hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides* 44:363-371

Sauer G, Richter CP, Klinke R (1999) Sodium, potassium, chloride and calcium concentrations measured in pigeon perilymph and endolymph. *Hear Res* 129:1-6

Schacht J, Talaska Andra E, Rybak Leonard P (2012) Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec (Hoboken)* 295: 1837-1850

Schwaller B (2010) Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a004051 Review

Seidman MD, Vivek P (2004) Intratympanic treatment of hearing loss with novel and traditional agents. *Otolaryngol Clin North Am* 37:973-990

Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S (2008) Suppression of ganglion cell death by PACAP following optic nerve transection in the rat. *J Mol Neurosci* 36:57-60

Sha SH, Qiu JH, Schacht J (2006) Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *N Engl J Med* 354:1856-1857

Shin CM, Chung YH, Kim MJ, Cha CI (2001) Spatial and temporal distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in gerbil global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 309:53-56

Slepecky NB, Ulfendahl M (1993) Evidence for calcium-binding proteins and calcium-dependent regulatory proteins in sensory cells of the organ of Corti. *Hear Res* 70:73-84

Somogyvári-Vigh A, Reglődi D (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: A potential neuroprotective peptide. *Review of Current Pharmaceutical Design* 10:2861-2889

Soto-Prior A, Cluzel M, Renard N, Ripoll C, Lavigne-Rebillard M, Eybalin M, Hamel CP (1995) Molecular cloning and expression of alpha parvalbumin in the guinea pig cochlea. *Brain Res Mol Brain Res* 34:337-342

Spicer SS, Schulte BA (1996) The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res* 100:80-100

Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Holtt V (2007) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal cerebral ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage. *J Neurochem* 103:1666-1681

Swan EE, Peppi M, Chen Z, Green KM, Evans JE, McKenna MJ, Mescher MJ, Kujawa SG, Sewell WF (2009) Proteomics analysis of perilymph and cerebrospinal fluid in mouse. *Laryngoscope* 119:953-958

Szabadfi K, Mester L, Reglődi D, Kiss P, Babai N, Rácz B, Kovács K, Szabó A, Tamás A, Gábrriel R, Atlasz T (2010) Novel neuroprotective strategies in ischemic retinal lesions. *Int J Mol Sci* 11:544-561

Szabadfi K, Atlasz T, Kiss P, Dányádi B, Tamás A, Helyes Zs, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Tóth G, Gábrriel R, Reglődi D (2012) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) are more susceptible to retinal ischemic injury in vivo. *Neurotox Res* 21:41-48

Szabadfi K, Szabó A, Kiss P, Reglődi D, Sétáló G Jr, Kovács K, Tamás A, Tóth G, Gábrriel R (2014) PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy *Neurochem Int* 64:84-91

Szakály P, Kiss P, Lubics A, Magyarlaki T, Tamás A, Rácz B, Lengvári I, Tóth G, Reglődi D (2008) Effects of PACAP on survival and renal morphology in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. *J Mol Neurosci* 36:89-96

Szakály P, Horváth G, Kiss P, László E, Farkas J, Fürjes G, Németh J, Reglődi D (2010) Changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide following renal ischemia-reperfusion in rats. *Transplant Proc* 42:2283-2286

Szakály P, László E, Kovács K, Rácz B, Horváth G, Ferencz A, Lubics A, Kiss P, Tamás A, Brubel R, Opper B, Baba A, Hashimoto H, Farkas J, Matkovits A, Magyarlaki T, Helyes Zs, Reglődi D (2011) Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. *Neuropeptides* 45:113-121

Szentágothai János, Réthelyi Miklós: *Funkcionális anatómia* (Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest, 2002)

Tamás A, Reglődi D, Szántó Z, Borsiczky B, Németh J, Lengvári I (2002) Comparative neuroprotective effects of preischemic PACAP and VIP administration in permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neuroendocrinol Lett* 23:249-254

Tamás A, Zsombok A, Farkas O, Reglődi D, Pál J, Büki A, Lengvári I, Povlishock JT, Dóczy T (2006) Postinjury administration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) attenuates traumatically induced axonal injury in rats. *J Neurotrauma* 23:686-695

Tamás A, Reglődi D, Farkas O, Kövesdi E, Pál J, Povlishock JT, Schwarz A, Czeiter E, Szántó Z, Dóczy T, Büki A, Bukovics P (2012) Effect of PACAP in central and peripheral nerve injuries. *Int J Mol Sci* 13: 8430-8448

Tan YV, Abad C, Lopez R, Dong H, Liu S, Lee A, Gomariz RP, Leceta J, Waschek JA (2009) Targeted gene deletion reveals that pituitary adenyl cyclase activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance in mice and plays a protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2012-2017

Taylor RR, Nevill G, Forge A (2008) Rapid hair cell loss: A mouse model for cochlear lesions. *J Assoc Res Otolaryngol* 9:44-64

Thalmann I, Comegys TH, Liu SZ, Ito Z, Thalmann R (1992) Protein profiles of perilymph and endolymph of the guinea pig. *Hear Res* 63:37-42

Thalmann I, Kohut RI, Ryu J, Comegys TH, Senarita M, Thalmann R (1994) Protein profile of human perilymph: in search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 111:273-280.

Thalmann R, Thalmann I (1999) Source and role of endolymph macromolecules. *Acta Oto-laryngol* 119: 293-296

Thalmann I, Hughes I, Tong BD, Ornitz DM, Thalmann R (2006) Microscale analysis of proteins in inner ear tissues and fluids with emphasis on endolymphatic sac, otoconia, and organ of Corti. *Electrophoresis* 27:1598-1608

Tombal B, Denmeade SR, Gillis JM, Isaacs JT (2002) A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ* 9:561-573

Tomimoto S, Ojika T, Shintani N, Hashimoto H, Hamagami K, Ikeda K, Nakata M, Yada T, Sakurai Y, Shimada T, Morita Y, Ishida C, Baba A (2008) Markedly reduced white adipose tissue and increased insulin sensitivity in Adcyap1-deficient mice. *J Pharmacol Sci* 107:41-48

Trump BF, Berezsky IK (1996) The role of altered $[Ca^{2+}]_i$ regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta* 1313:173-178

Tsuchikawa D, Nakamachi T, Tsuchida M, Wada Y, Hori M, Farkas J, Yoshikawa A, Kagami N, Imai N, Shintani N, Hashimoto H, Atsumi T, Shioda S (2012) Neuroprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on spinal cord injury. *J Mol Neurosci* 48:508-517

van Vliet EA, Aronica E, Tolner EA, Lopes da Silva FH, Gorter JA (2004) Progression of temporal lobe epilepsy in the rat is associated with immunocytochemical changes in inhibitory interneurons in specific regions of the hippocampal formation. *Exp Neurol* 187:367-379

Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ (2002) PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 15:1451-1460

Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay RL, Gonzalez B, Eiden LE (2005) Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. *Peptides* 26:2518-2524

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault A, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharm Rev* 61:283-357

Waissbluth S, Daniel SJ (2013) Cisplatin-induced ototoxicity: transporters playing a role in cisplatin toxicity. *Hear Res.* 299:37-45

Xie J, Talaska AE, Schacht J (2011) New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res.* 281:28-37

Yagi M, Magal E, Sheng Z, Ang KA, Raphael Y (1999) Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Hum Gene Ther* 10:813-823

Yamada K, Matsuzaki S, Hattori T, Kuwahara R, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kumamoto N, Yamada K, Yoshikawa T, Katayama T, Tohyama M (2010) Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborizations. *PLoS One* 5:e8596

Yang D, Thalmann I, Thalmann R, Simmons DD (2004) Expression of alpha and beta parvalbumin is differentially regulated in the rat organ of Corti during development. *J Neurobiol* 58:479-492

Yang S, Yang J, Yang Z, Chen P, Fraser A, Zhang W, Pang H, Gao X, Wilson B, Hong JS, Block ML (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP4-6 are neuroprotective through inhibition of NADPH oxidase: potent regulators of microglia-mediated oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 319:595-603

Yehoash R (2002) Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. *Br Med Bull* 63:25-38

Zhang Y, Danielsen N, Sundler F, Mulder H (1998) Pituitary adenylate cyclase activating peptide is upregulated in sensory neurons by inflammation. *Neuroreport* 9:2833-2836

Zhou X, Rodriguez WI, Casillas RA, Ma V, Tam J, Hu Z, Lelievre V, Chao A, Waschek JA (1999) Axotomy-induced changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and PACAP receptor gene expression in the adult rat facial motor nucleus. *J Neurosci Res* 57:953-961

6.2. Ábrák forrás listája

2. 3. 4. 8. ábrák: Thieme Atlas of Anatomy, Head and Neuroanatomy Thieme, Stuttgart, New York, 2007.

5. ábra: www.bio.purdue.edu; www.med.unc.edu

6. ábra: <http://people.eku.edu/ritchisong/birdbrain2.html>, Read.uconn.edu

7. ábra: www.hearnet.com, www.scripps.edu

9. ábra: Li és Steyger 2009

VII. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Németh A, Szabadfi K, Fülöp B, Reglődi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gábrriel R, Hashimoto H, Tamás A (2014) Examination of calcium-binding protein expression in the inner ear of wild-type, heterozygous and homozygous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-knockout mice in kanamycin-induced ototoxicity. *Neurotox Res* 25:57-67 (IF: 3.151)

Gaál V, Márk L, Kiss P, Kustos I, Tamás A, Kocsis B, Lubics A, Németh V, Németh A, Lujber L, Pytel J, Tóth G, Reglődi D (2008) Investigation of the effects of PACAP on the composition of tear and endolymph proteins. *J Mol Neurosci* 36:321-329 (IF: 2.061)

Rácz B, Horváth G, Reglődi D, Gasz B, Kiss P, Gallyas F Jr, Sümegi B, Tóth G, Németh A, Lubics A, Tamás A (2010) PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: an in vitro study. *Regul Pept* 160:91-98 (IF: 2.473)

Tamás A, Szabadfi K, Németh A, Fülöp B, Kiss P, Atlasz T, Gábrriel R, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Helyes Zs, Reglődi D (2012) Comparative examination of inner ear in wild type and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-deficient mice. *Neurotox Res* 21:435-444 (IF: 2.865)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Németh A, Nagy Gy, Pytel J (2004) Retrocochlearis laesiók komplex elektrofiziológiai kimutatása. *Fül-orr-gégegyógyászat* 50:349-353

Nagy Gy, Bauer M, Járai T, Németh A, Pytel J (2004) Saccotomia szerepe a Meniérè-betegségek kezelésében *Fül-orr-gégegyógyászat* 50:345-348

Gerlinger I, Szalai G, Hollódy K, Németh A (2007) Ultrasound guided intraglandular injection of botulinum toxin A in children sufferin from drooling. *J Laryngol Otol.* 121:947-951 (IF: 0,54)

Mike A, Gaál V, Németh A, Kövér F, Komoly S, Illés Zs (2007) Susac-szindróma: egy ritka autoimmun kórkép neurológiai, pszichiátriai, szemészeti, fül-orr-gégészeti és neuro-radiológiai vonatkozásai. *Orvosi Hetilap* 148. évfolyam, 19. szám - 897-905.

Gerlinger I, Tóth M, Lujber L, Szanyi I, Móricz P, Somogyvári K, Németh A, Pytel J, Mann W (2009) Necrosis of the long process of the incus following stapes surgery: New anatomical observations Laryngoscope 119:721-726. (IF: 1.617)

Bakó P, Németh A, Egyed K, Szabadi É, Göbel Gy, Vető F, Pytel J, Gerlinger I (2010) Kétoldali halláscsökkenés, mint a fenyegető beékelődés vezető tünete. Fül-orr-gégegyógyászat 56:102-106

Bocskai T, Saárossy K, Németh A, Pytel J (2012) Csecsemők és kisgyermek szedációja BERA vizsgálat alatt. Fül-orr-gégegyógyászat 57:24-29

Szanyi I, Bakó P, Németh A, Gerlinger I (2014) Elektroakusztikus stimulációval szerzett kezdeti tapasztalatok a PTE Fül-, Orr-, Gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Klinikán. Otolaryngologia Hungarica 60:143-147

Pytel J, Németh A, Tóth Á, Répássy G (2014) Az Arlevert szerepe a szédülés kezelésében. Otolaryngologia Hungarica 60:163-167

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőimnek Dr. Tamás Andrea egyetemi docensnek és Prof. Dr. Reglődi Dóra egyetemi tanárnak - aki munkacsoportunk vezetője is - szeretném megköszönni munkájukat és aktív támogatásukat.

Köszönet továbbá Dr. Szabadfi Krisztina † tudományos munkatársnak valamint Prof. Dr. Gábrriel Róbert egyetemi tanárnak.

Köszönöm Dr. Fülöp Balázs Dániel PhD hallgatónak hathatós segítségét és Kiss Anikónak a munkáját, valamint az Anatómiai Intézet és a MTA-PTE „Lendület” PACAP munkacsoport tagjainak is.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Gerlinger Imrének és a Fül-Orr-Gége és Fej-Nyaksebészeti Klinikán kollégáimnak támogatásukért.