

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Dr. Németh Adrienn Katalin

Anatómiai Intézet
Fül-Orr-Gége és Fej-Nyaksebészeti Klinika

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



Pécsi Orvostudományi Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet
2015

I. BEVEZETÉS

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. A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis peptid (VIP) család tagja, és ez utóbbival 68%-os hasonlóságot mutat. 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 az idegrendszerben mutatták ki, de mára szinte minden szervben kimutatták már, többek között különböző endokrin mirigyekben, a kardiovaszkuláris, az urogenitális és légző szervrendszerben valamint a látó- és hallórendszerben is.

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. A PACAP receptorok szinte minden szervben expresszálódnak, azonban az altípusok eloszlása szervrendszerenként változó.

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.

Általános élettani hatásai közül kiemelendő neuroprotektív és neurotrófikus hatása, mivel segíti a neuronok növekedését és differenciálódását, valamint védi a neuronokat különböző károsító hatásokkal szemben. A neuroprotektív hatásán kívül általános citoprotektív hatása is ismert, ugyanis az idegsejteken kívül többek között az endothelsejteket, a szívizomsejteket, a vesesejteket, belsejteket is védi károsító hatásokkal szemben.

A PACAP receptorok száma és az endogén PACAP szintje is megnő globális és fokális agyi ischaemia esetén, traumás agyi sérüléskor, valamint számos idegrendszert érintő károsodás esetén, amely az endogén PACAP védő hatását igazolja. 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. 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.

A PACAP neuroprotektív hatásának hátterében antiinflammatorikus, antioxidáns és antiapoptotikus hatása feltételezhető. A PACAP antiinflammatorikus hatása következtében képes csökkenteni a gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatását kimutatták már más szervekben is, például vese és bél ischaemiás károsodása kapcsán. 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.

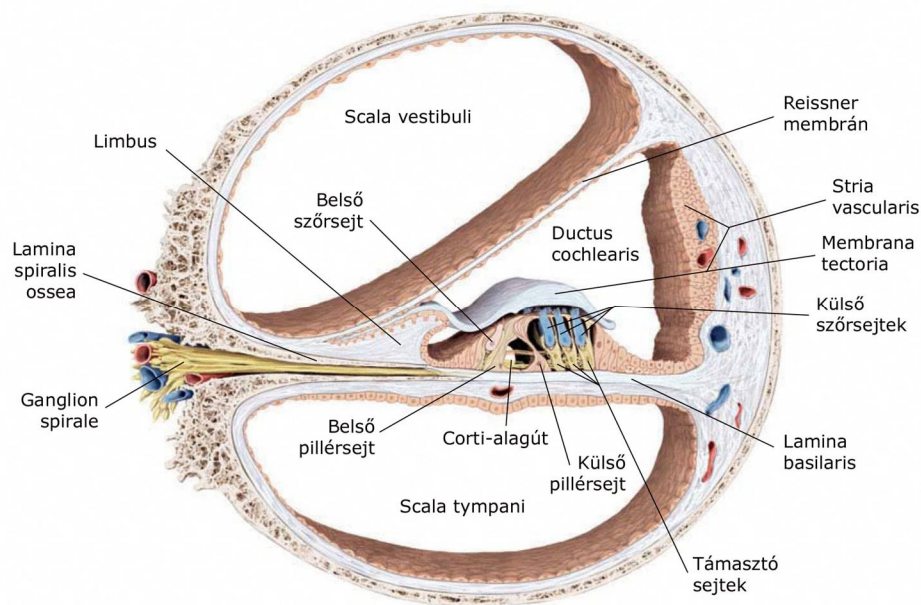
A PACAP-génhiányos egerek

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. 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-, 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, hőmérsékletszabályozás, napi ritmus reguláció; metabolikus eltérések, emelkedett inzulin érzékenység és halálozási arány, valamint csökkent szaporodási képesség - rendelkeznek. 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. Szintén fokozottabb a retinális károsodás a PACAP-génhiányos egerekben kétoldali arteria carotis leköttést 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 szívmuscle károsodás esetén is, ahol az endogén PACAP hiánya súlyosabb elváltozások kialakulásához vezetett. A homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek károsító hatásokra fellépő fokozott sérülékenységének hátterében a megnövekedett apoptózis, gyulladáso reakció és oxidatív stressz feltételezhető.

A belső fül felépítése emberben és emlősökben

A halló érzékszervet (organum spirale, Corti-féle szerv) különböző típusú támasztó sejtek és szekunder érzékszertípusú neuroepitheliumsejtek (külső és belső szőrsejtek) alkotják (1. ábra). A ductus cochlearis oldalsó falát dús, érfonatot tartalmazó köbhám borítja, a stria vascularis, amely az endolympha termelésében játszik szerepet. 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. 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 endolymphát tartalmaz, amit a stria vascularis és a támasztósejtek termelnek. Az endolympha az intracelluláris térhez hasonlóan gazdag K^+ -ban és szegény Na^+ -ban. Az endolympha és a perilympha fehérje összetétele nagyon hasonló. A perilympha főleg prealbumint, albumint, α_1 -antitripsint, α_1 -antikimotripsint, transzferrint, β_2 -transzferrint tartalmaz. Az endolymphában identifikált fehérjék: albumin, α -kimotripszin, α -antitripszin, α -HS-glükoprotein, transzferrin, ApoD, ApoJ, fetuin.

A madarak belső fülében a hártás és a csontos labirintus egyaránt fejlett. A ductus cochlearis nem csiga alakú, mint az emlősökben, hanem egy gyengén hajlott cső, melyben a Corti-szervnek megfelelő, de azzal nem megegyező felépítésű úgynevezett érzékdomb helyezkedik el. A madarak ductus cochlearisa rövidebb, mint az emlősöké, azonban érzékszert sűrűsége nagyobb. 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.



1. ábra: A Corti-féle szerv felépítése (Thieme 2007)

A PACAP előfordulás 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. Kimutatták továbbá a ganglion spirale és a stria vascularis marginalis sejtjeiben. 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, ahol mennyiségük a basalis kanyarulatától a csúcsig nő. A PACAP és a PAC1 receptor halló szervrendszerben betöltött szerepéről keveset tudunk, azonban az ismert, hogy fontos szerepet játszik a hallás afferentációjának modulálásában. 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.

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. 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. 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. Míg a vesekárosodás általában reverzibilis, a belső fül károsodás maradandó. Általában az aminoglikozidok irreverzibilis károsodást okoznak mind a vestibuláris, mind a cochleáris részen a belső fülnek, azonban míg egyesek elsősorban vestibulotoxikusak: gentamycin, tobramycin, mások főleg cochleo-toxikus hatással rendelkeznek:

neomycin, amikacin, kanamycin. 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.

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 sejtben belüli jelátviteli útvonalakat.

Szőrsejt károsodást okozó apoptózisnak két formája ismert: a halál-receptorok által mediált extrinsic útvonal, beleértve a tumor nekrosis faktor családot, és a mitokondrium által mediált intrinsic útvonal, amelyek végül kaspáz aktiváción keresztül a sejtek pusztulásához vezetnek.

A belső fül kutatás egyik fő iránya az említett károsodások vizsgálata, valamint az olyan anyagok keresése, melyekkel ezek a károsodások kivédhetők. Számos biztató terápiai ágens tanulmányoztak már ototoxikus károsodás ellen, például antioxidáns gyógyszereket, antiapoptotikus stratégiákat, de ezek hatékonyságát eddig csak állatkísérletekben sikerült igazolni.

A Ca^{2+} -kötő fehérjék

A szőrsejt normális működéséhez az endolympha megfelelő Ca^{2+} koncentrációja szükséges, melyet a szőrsejtben található Ca^{2+} -kötő fehérjék szabályoznak, ezért fontos szerepük lehet a különböző ototoxikus ágensek szőrsejt károsító hatásának kivédésével szemben. Számos kísérletben vizsgálták a Ca^{2+} -kötő fehérjéket (például: parvalbumin, calbindin, calretinin, calmodulin, calsequestin) különböző fajok szőrsejtjeiben, például béka, teknős és emlősök belső fülében.

Azt is megállapították, hogy a labirintus vestibularis részének sérülése esetén az endolympha Ca^{2+} koncentrációja megnő, ami zavart okoz a cochlea működésében. A zajkárosodásnak kitett állatokban, a külső szőrsejtben a Ca^{2+} koncentráció megemelkedik, és magas szinten is marad, ami szintén káros a sejtek számára. 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 PTE-MTA „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. 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 fiziológias körülmények között, valamint kanamycin-kezelést követően.

III. PACAP PROTEKTÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA OXIDATÍV STRESSZ-INDUKÁLTA APOPTÓZIS MODELLBEN CSIRKE COCHLEÁRIS SEJTKULTÚRÁBAN IN VITRO

Anyagok és módszerek

A cochleáris sejtkultúra elkészítéséhez frissen keltetett házi csirkék ductus cochlearisát izoláltuk az os temporale kipreparálásával (6 szériában, 40 csirke/széria). Az állatokat halothán anesztézia után 1 napos korukban dekapitáltuk. A csirkék ductus cochlearisát eltávolítottuk, majd a preparátumból steril körülmények között sejteket izoláltunk. 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. csoport sejteit 1mM H₂O₂-ot és 100 nM PACAP1-38-at tartalmazó médiumban inkubáltunk 120 percig.

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

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 ± S.E.M. értéként adtuk meg, amelyeken egyutas ANOVA, majd *post hoc* Neuman-Keul analízist végeztünk.

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. A fentiek alapján megállapítható, hogy a PACAP kezelés szignifikánsan csökkentette az oxidatív stressz-indukálta életképesség csökkenést csirke belső fül sejtkultúrában.

IV. ENDOLYMPHA ÖSSZETÉTELÉNEK VIZSGÁLATA CSIRKÉKBEN SZISZTÉMÁS PACAP KEZELÉST KÖVETŐEN

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 csípessel steril szűrőpapírcsíkra préseltük ki az endolympht (n=5/csoport). A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak. A papírcsíkok által megkötött fehérjét 30 µl mintapufferben oldottuk ki, majd erős vortexelés után a szűrőpapírokat eltávolítottuk a csövekből. Az így kapott oldatból microchip elektroforézist végeztünk. A mintákon lézer-indukálta fluoreszcencia vizsgálatot végeztünk, és az eredmények kiértékelését a Protein 230 assay software segítségével végeztük.

Eredmények

A csirke endolymphta protein összetétele komplex mintázatot mutatott, számos protein csúcs volt detektálható a 14 és 81 kDa molekulatömeg régióban. Vizsgálataink során nem találtunk

jelentős különbséget a fehérje összetétel tekintetében a kontroll és a különböző időpontokban vizsgált PACAP-pal kezelt csirkék endolympha mintái között.

V. PAC1 RECEPTOR ÉS Ca^{2+} -KÖTŐ FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA VAD TÍPUSÚ ÉS PACAP-GÉNHIÁNYOS EGEREK BELSŐ FÜLÉBEN FIZIOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT ÉS KANAMYCIN-INDUKÁLTA OTOTOXICITÁST KÖVETŐEN

Bevezetés

Az „A” kísérletben vizsgáltuk a PAC1 receptor lokalizációját, valamint 3 különböző Ca^{2+} -kötő fehérje (parvalbumin, calretinin, calbindin) lokalizációját és expresszióját 5 napos vad és homozigóta PACAP-génhiányos egerekben fiziológias körülmények között.

A „B” kísérletben kétféle Ca^{2+} -kötő fehérje expresszióját vizsgáltuk (calretinin, parvalbumin) 7 napos vad, hetero- és homozigóta PACAP-génhiányos egerekben fiziológias körülmények között és kanamycin kezelést követően.

Kísérleti állatok, kezelési protokoll

A kísérletben vizsgált PACAP-génhiányos egereket japán kollaborációs partnereinktől származnak. Az állatok szaporítása és gondozása a Pécsi Tudományegyetem ellenőrzött protokollja (BA02/2000-15024/2011) szerint, az intézeti ajánlások figyelembevételével történt.

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.

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 μ l fiziológias sóoldatot kaptak subcutan. Ezt követően az állatokat 7 napos korukban dolgoztuk fel.

Szövetteni feldolgozás, metszetek kiértékelése

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. Fagyasztásos technikával (Leica kriosztát, Németország) a koponyából 10 μ m-es sagittális metszeteket készítettünk. A metszeteken immunhisztológiai vizsgálatokat végeztünk, és morfológiai összehasonlításhoz egyes metszeteket hematoxilin-eozin festéssel is megfestettük.

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. GraphPadPrism 5.01-es programmal végeztünk statisztikai elemzést. Az eredmények az alábbi formában jelennek meg: átlag \pm S.E.M., a statisztikai összehasonlítást pedig nem párosított Welch-korrektíós teszttel, valamint a nonparametrikus Mann-Whitney teszttel végeztük.

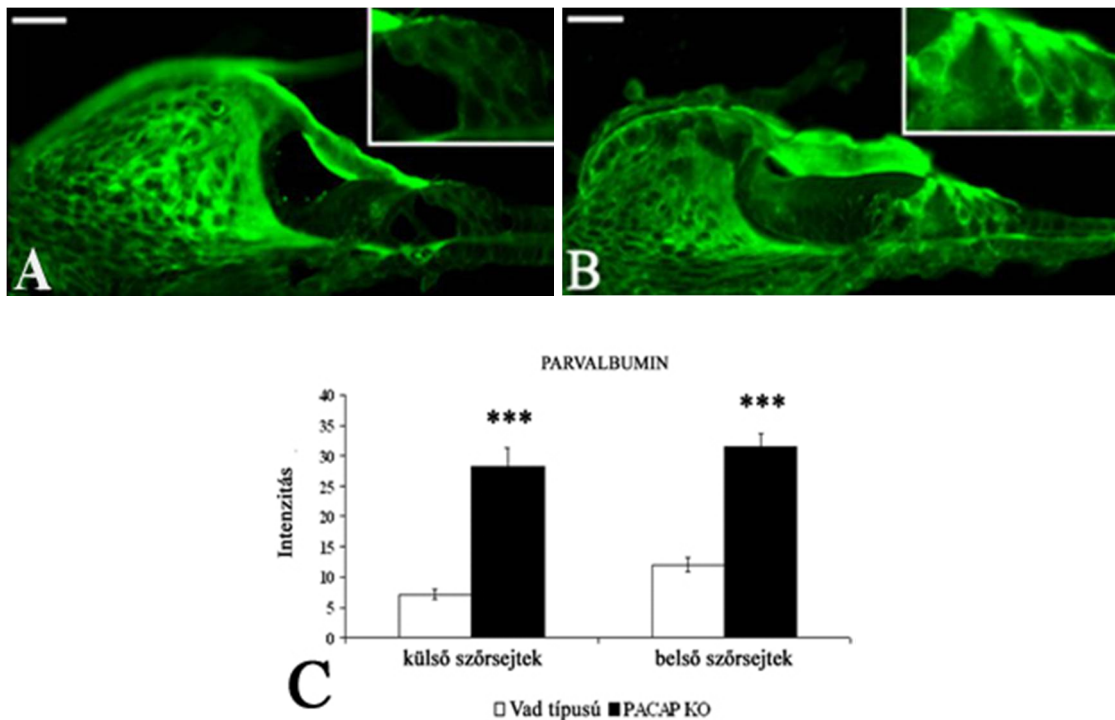
Eredmények

A hematoxilin-eozin festéssel készült metszeteken a vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos egerek belső fülének morfológiájában nem találtunk különbséget.

'A' kísérlet

A PAC1 receptor expressziójának vizsgálata során a vad-típusú egerekben a következő képletek mutattak PAC1 receptor pozitivitást: Corti-féle szerv, ganglion spirale valamint a stria vascularis. 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 két csoport között a PAC1 receptor lokalizációját tekintve nem találtunk különbséget, azonban a vizsgált csoportok külső és belső szőrsejtjei esetében szignifikáns különbség volt az immunjelölődés erősségében: a vad-típusú egerekben a külső és belső szőrsejtek valamint a külső támasztósejtek intenzívebben jelölődtek a PACAP-génhiányos egerekhez képest (2. ábra).

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



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

Aránymérték: 20 μ m

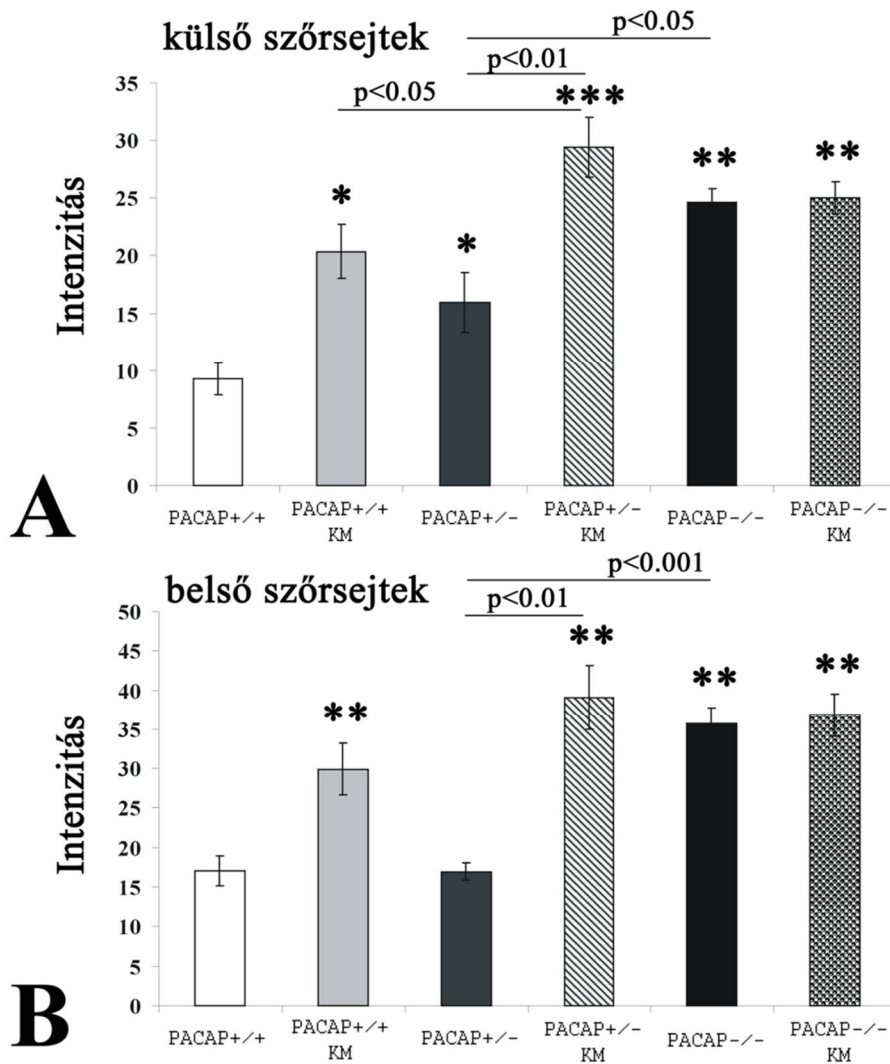
C ábra: Parvalbumin immunfluoreszcencia intenzitásának összehasonlítása vad típusú és homozigóta PACAP-génhiányos (PACAP KO) egerek szőrsejtjeiben.

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

'B' kísérlet

Ebben a kísérleti felállásban 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 kontroll csoportban jelentős különbséget észleltünk a parvalbumin és a calretinin expressziójában a külső és a belső szőrsejtek között a vad típusú és a homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben. A kontroll homozigóta PACAP-génhiányos egereknek mind a külső, mind a belső szőrsejtjeiben nagyobb volt a parvalbumin expresszió, mint kontroll vad típusú társaikban, megegyezően a korábbi kísérlet eredményeivel. A heterozigóta PACAP-génhiányos egerek külső szőrsejtjeiben szintén emelkedett parvalbumin expressziót láttunk, azonban a belső szőrsejtekben nem volt különbség parvalbumin expresszió tekintetében a kontroll vad és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek között. A kontroll csoportban magasabb calretinin expressziót találtunk mind a hetero- mind a homozigóta PACAP-génhiányos egerek esetén a vad-típusú egerekhez képest.

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. Szignifikánsan magasabb parvalbumin expressziót találtunk kanamycin kezelést követően a heterozigóta PACAP-génhiányos egerekben, mint a kanamycinnel kezelt vad társaikban (3. ábra). Kanamycin kezelést követően a calretinin expresszió csak a vad típusú egerek külső szőrsejtjeiben növekedett szignifikánsan, homo- és heterozigóta PACAP-génhiányos egerek esetén a kontroll csoportban detektálható magas calretinin expresszió nem mutatott további szignifikáns emelkedést. Ugyanakkor a heterozigóta PACAP-génhiányos egerek belső szőrsejtjeiben szignifikánsan nagyobb volt a calretinin expresszió kanamycin kezelés után, mint a vad-típusú egerekben.



3. ábra: Parvalbumin immunfluoreszcencia intenzitásának statisztikai analízise a külső (A) és belső (B) szőrsejtekben vad típusú ($PACAP^{+/+}$), heterozigóta ($PACAP^{+/-}$) és homozigóta $PACAP$ -génhiányos egerekben ($PACAP^{-/-}$) fiziológiás 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 ($PACAP^{+/+}$).

VI. 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 sejtenyészetekken 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.

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 sejtenyészetben. A hidrogén-peroxid egy mindenütt jelenlévő, reaktív szabadgyököket (ROS) generáló molekula, mely fiziológias körülmények között is képződik. Különböző ototoxikus hatások következtében (például gentamycin és cisplatin kezelés) képződése fokozódik a belső fülben, ami a sejtek apoptózisához vezet. 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 sejtenyészetben (pl: Annexin V és propidium-jodid festés, JC-1 assay, kaszpáz-3 aktivitás vizsgálata). Ezen kísérletek egyértelműen igazolták az exogén PACAP kezelés protektív hatását H_2O_2 -indukálta oxidatív károsodással szemben csirke belső fül sejtenyészetben, melynek hátterében a bevezetőben ismertetett molekuláris mechanizmusok állnak.

Exogén PACAP kezelés hatása az endolympha fehérje összetételére

Munkám során vizsgáltuk csirkék endolympha fehérjeinek összetételét exogén PACAP kezelés hatására, de szignifikáns változást nem tudtunk detektálni. Az endolympha és perilympha fehérje összetételének vizsgálata normál és patológiás körülmények között segítséget nyújthat a belső fül működésének pontosabb megismeréséhez. A perilympha és endolympha összetételét 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, 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. 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. A PACAP endolympha termelésre kifejtett hatásának feltérképezése további vizsgálatokat igényel. Tekintettel arra, hogy az endolympha fehérjei a perilymphából származnak, jelenleg már folynak azon kísérleteink, ahol humán perilympha mintákban - melyeket cochleáris implantáció műtéte során nyerünk - vizsgáljuk a PACAP jelenlétét és fehérje összetételének változását különböző patológiás elváltozások során.

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 génhiányos egerekben a vad típusú egerekhez hasonlítva, ezért érzékenyebben reagálnak különböző károsító hatásokra. 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, gyulladással járó folyamatokat és oxidatív stresszt okoz, sérülékenyebbé téve az idegrendszert és a perifériás szerveket.

PAC1 receptor expressziójának összehasonlító vizsgálata

Az immunhisztológiai összehasonlító vizsgálataink során a vad-típusú egerek külső és belső szőrsejtjeiben, valamint a Deiters-féle támasztósejtjeiben is találtunk PAC1 receptor expressziót. Eredményeink a PAC1 receptor lokalizációját tekintve a belső fülben megfelelnek a korábbi irodalmi adatoknak. 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 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.

Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziójának összehasonlító vizsgálata

A Ca^{2+} -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 szőrsejtjeiben. A PACAP-génhiányos egerekben talált emelkedett Ca^{2+} -kötő fehérje expresszió háttérében 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 szőrsejtjeiben az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció megemelkedését okozza, amely hatással szemben a szőrsejtjei fokozott Ca^{2+} -kötő fehérjék expresszióval védekeznek. Kísérletünkben a PACAP-génhiányos egerekben a vad típusúhoz 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 szőrsejtjei Ca^{2+} homeosztázisában, és hiánya esetén a szőrsejtjei 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.

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 fizioiógias sóoldattal, majd 7 napos korban vizsgáltuk a vad típusú és PACAP-génhiányos egerek szőrsejtjeiben 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. 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 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. Egerekben és patkányokban a hallás érése a posztnatális időszakban fejeződik be, ezért ezek az állatok jó modellként szolgálnak az ototoxicitás patomechanizmusának vizsgálatára. A jelen kísérletben 5 napos egereket kezeltünk kanamycin egyszeri nagy dóziséval (1mg/g testsúly), mely vezethet gén vagy fehérje expresszió változáshoz. 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.

A PACAP-nak jól ismert az antiapoptotikus és az antioxidáns hatása, 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. Feltételezhetően amint ezeknek a puffereknek az aktivációját nem lehet tovább upregulálni, úgy nem képes tovább kivédeni a sejt a Ca^{2+} ionnal való túltöltődést, és ez az apoptotikus útvonalak aktiválódásához vezet.

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. Audiológusként több, ototoxikus szer által előidézett idegi halláscsökkenet 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.

VII. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Munkánk során igazoltuk a PACAP antiapoptotikus hatását csirke cochleából izolált sejtenyészetben 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 homozigóta PACAP-génhiányos és vad-típusú egerekben. Bár a fénymikroszkópos struktúrák tekintetében nem találtunk eltérést a két állatesoport 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 homozigóta PACAP-génhiányos egerekben, de ez szignifikánsan alacsonyabb volt összehasonlítva vad-típusú társaikkal. Kimutattuk azt is, hogy a Ca^{2+} -kötő fehérjék expressziója magasabb homozigóta PACAP-génhiányos egerek szőrsejtjeiben vad társaikéhoz képest.

4. Az utolsó kísérletben 7 napos vad, hetero- és homozigóta 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 homozigóta- és a heterozigóta PACAP-génhiányos egerek szőrsejtjeiben vad társaikéhoz képest. 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. Ez az endogén PACAP fontos védő funkciójára utal ebben az ototoxikus modellben.

VIII. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Németh A, Szabadfi K, Fülöp B, Reglődi D, Kiss P, Farkas J, Szalontai B, Gábiel 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, Gábiel 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 Menièrè-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 kisgyermekek 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

Tézishez kapcsolódó publikációk impakt faktora: 8,077

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 12,273

Összes idegen idézettség: 34

Összes idézettség: 52

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőimnek Dr. Tamás Andrea egyetemi docensnek és Prof. Dr. Reglódi 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.