

Parakrin szabályozású védekező mechanizmusok vizsgálata a Corti szervben

Doktori tézis

Dr. Horváth Tamás

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelles Tibor egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Zsembery Ákos Ph.D., egyetemi docens
Dr. Helfferich Frigyes Ph.D., osztályvezető
főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:
Prof. Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Küstel Marianna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Hirschberg Andor, Ph.D., osztályvezető
főorvos

Budapest
2016

1 BEVEZETÉS

Általános bevezetés

A szenzorineurális halláskárosodás egy az életminőséget jelentősen lerontó állapot, mely az előregedő társadalom és az egyre fokozódó zajterhelés miatt lassan népbetegségnek tekinthető, amihez hozzájárul az ototoxicitás és a genetikai halláscsökkenés is. Ezidáig nem sikerült sem a megelőzésére, sem a már kialakult halláscsökkenés kezelésére hatékony farmakológiai terápiát találni, ezért kiemelkedően fontos terület a hallás élettanának és kórélettanának kutatása, melyben Békésy munkásságával az élen a magyar kutatók úttörőszerepet játszottak.

A szenzorineurális halláscsökkenés kezelése kutatását elősegítheti, hogy a belsőfülben, a mechanikai hanghullámokat felerősítő és elektromos jellé alakító Corti szervben eleve léteznek endogén protektív folyamatok, melyek célja, hogy megelőzzék a halláskárosodást, illetve mérsékeljék a károsodás mértékét. Munkám során a Corti szerv két különböző, parakrin szabályozású védekező mechanizmusát vizsgáltam kísérletes modellekben.

Az aktív hangerősítés védelmi jellegű szabályozása: purinerg Ca^{2+} szignalizáció a támasztósejtekben

A Corti szerv lateralis részén található külső szőrsejtek aktívan, frekvencia-specifikusan felerősítik a hanghullámokat, ehhez szükséges az őket gliaszerű szövetágyként körülvevő támasztósejtek megfelelő működése is. Ezt az aktív hangerősítő rendszert védelmi szempontból elsősorban az ATP szabályozza, parakrin módon, P2X ionotrop, és P2Y metabotrop receptorokon keresztül, az extracelluláris térből származó, vagy a belső raktárakból felszabadított Ca^{2+} -ra épülő, intra- és/vagy intercellularis Ca^{2+} szignálok segítségével.

Az ATP tónusosan szabadul fel a stria vascularisból az endolymphába. Zajterhelés esetén a felszabadulás fokozódik, és részben helyben, a stria vascularis marginalis sejtjeiben leszabályozza az endolymphába történő K^+ kiválasztását, másrészt viszont az endolymphát határoló sejtek felszínén található P2X receptorok segítségével K^+ shunt alakul ki az a perilymphába, ezzel redukálva az endocochlearis potenciált, így lecsökkentve az eleve kóros intenzitású hangok további felerősítését. Ebben a folyamatban a gliaszerű hálózatot alkotó támasztósejtek aktívan részt vesznek, melyek connexin hemichanneleken keresztül maguk is képesek ATP-t bocsátani az endolymphába, sőt, lokális szöveti sérülés esetén a sérült szőrsejtekből is kerülhet ATP az endolymphába, mely a környező

támasztősejtekben Ca^{2+} szignálokra épülő riasztási rendszert aktivál. Az ATP mindezek mellett a Corti szerv mikromechanikáját is képes szabályozni. Habár az ATP indukálta Ca^{2+} válaszokat már többfajta támasztősejtben is vizsgálták, ezek a kísérletek jellemzően izolált sejteken, vagy sejttenyészetben, illetve embrionális vagy újszülött állatok Corti szervéből származó sejtekben történtek. A cochlea, azon belül a Corti szerv bonyolult anatómiája és működése szükségessé tenné egy az in vivo szituációhoz közelebb álló olyan kísérletes modell kialakítását, melynek segítségével halló, érett állatokból származó támasztősejtek purinerg Ca^{2+} szignalizációját párhuzamosan lehessen vizsgálni a különböző morfológiájú, ultrastruktúrájú, elhelyezkedésű, és különböző funkciójú támasztősejt típusokban.

A dopaminerg lateralis olivocochlearis (LOC) efferensek szerepe

A hangerősítő rendszer protektív szabályozása mellett létezik egy a belső szőrősejtek által már elektromos jellé alakított hanginger a központi idegrendszer felé továbbító afferens hallóideg védelmét szolgáló rendszer is. A belső szőrősejtből kóros intenzitású hanginger esetén extrém mértékű glutamát szabadul fel, mely excitotoxikus hatású a hallóidegen. A glutamát okozta túlstimulálás excesszív Na^+ és Ca^{2+} beáramlást okoz az afferens hallóideg AMPA és az NMDA csatornáin keresztül, amely megnövekedett vízbeáramláshoz és következményes duzzanathoz vezet, a Ca^{2+} pedig a sejten belül proteáz és lipáz enzimeket aktiválhat, ami sejtpusztulást okozhat. Az agytörzsből a belső szőrősejt – afferens hallóideg szinapszis környékére projiciáló lateralis olivocochlearis (LOC) efferens dopaminerg rostjaiból felszabaduló dopamin (DA) csökkenteni képest ezt az excitotoxikus hatást mérsékelni.

A LOC rostokból felszabaduló DA regulációjának már számos aspektusa ismert, de a pontos lokális szabályozása még nem teljesen feltárt. A nitrogén monoxid (NO) a központi idegrendszerben fokozza a DA felszabadulást, és mivel egyértelmű NO aktivitást találtak a csigában, melynek termeléséért felelős nitrogén-monoxid szintáz (NOS) különböző izoformáit is kimutatták már a cochleában, felmerül a NO regulációs szerepe a dopaminerg LOC rostok vonatkozásában. A NOS neurális izoformájának működése az NMDA receptorokhoz kötött, mely a belső szőrősejtek neurotranszmitterének, a glutamát egyik ionotrop receptora. Így nem kizárt, hogy az NMDA receptor és a NO részvételével egy az agytörzsi visszacsatolásnál rövidebb, lokális visszacsatolási rendszer is szabályozza a DA felszabadulást a LOC efferensekből.

2 CÉLKITŰZÉS

A Corti szerv támasztósejtjei purinerg Ca^{2+} szignalizációjának vizsgálata kapcsán:

- 1.) Olyan funkcionális imaging módszer beállítása, amelynek segítségével jó tér- és időbeli felbontással, parallel tudjuk vizsgálni a Corti szerv különböző típusú támasztósejtjeinek Ca^{2+} szignalizációját, halló egerek in situ hemicochlea preparátumában.
- 2.) A Corti szerv három különböző támasztósejtje (pillér-, Deiters- és Hensen) nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jének összevetése és az ATP adásra kiváltott Ca^{2+} válaszok reverzibilitásának, ismételhetőségének és dózis függésének vizsgálata.
- 3.) Meghatározni az ionotrop P2X és a metabotrop P2Y receptorok részvételét az ATP kiváltotta Ca^{2+} válasz kialakításában.
- 4.) A három támasztósejt típus purinerg Ca^{2+} jelátvitelének összehasonlítása.

A LOC efferensek DA felszabadításának NMDA receptor és NO mediálta regulációja kapcsán:

- 5.) Az NMDA és az NO cochleáris DA felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- 6.) A LOC efferensekből történő DA felszabadulás NMDA receptor és NO mediálta regulációs mechanizmusának feltárása.

3 MÓDSZEREK

Általános kísérleti protokoll

Kísérleteinkhez folyamatosan oxigenizált ún. szőrsejtoldatot (mesterséges perilymphát) alkalmaztunk (150 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 2.75 mM HEPES, 2.25 mM Tris. pH 7,4, 300 mosm/kg, 1g α ,D-glükóz). A hemicochlea kísérletekhez p15-21 mindkét nemű, a PCR kísérletekhez p15-19 mindkét nemű, a $[^3\text{H}]$ dopamin ($[^3\text{H}]$ DA) felszabadulás méréshez 15-25g, hím, CD1 vad típusú egereket használtunk.

Hemicochlea Ca²⁺ imaging

Egér hemicochlea preparátum

Az állatokat dekapitáltunk, a koponyát a sagittalis síkban kettévágtuk, feltártuk és eltávolítottuk a bulla tympanit, majd szőrsejtoldatba helyeztük. Sztereomikroszkóp alatt feltártuk a cochleát. A csigát disszekáltuk, egy kis átlátszó műanyag lapra ragasztottuk, és közvetlen a modiolus felett kettévágtuk.

Ca²⁺ imaging

A kiperarált hemicochleákat 10 μ M fura-2 AM Ca²⁺ indikátor festékkel inkubáltuk 30 percig, majd egy perfúziós rendszerbe helyeztük, és alternálva, 340 \pm 5 nm és 380 \pm 5 nm excitációs fényvel világítottuk meg. Az emittált fényt 510 nm \pm 10 nm-es filterrel szűrtük, a fluoreszcens felvételeket Olympus BX50WI mikroszkóphoz csatolt, hűtött CCD kamerával készítettük. A rendszert Imaging Workbench 4.0 szoftver vezérelte. Az összes kísérletet a cochlea basalis kanyarulatán végeztük.

Az alkalmazott vegyületek adásának módja

Az ATP-t 30 másodpercig perfundáltuk. A vizsgált vegyületeket 5 perccel az első ATP ingerlést követően kezdtük hozzáadni a szőrsejt oldathoz, majd 15 perces folyamatos perfúziót követően végeztük el a második ATP ingerlést. Hasonlóan jártunk el a Ca²⁺ mentes szőrsejt oldat vizsgálatakor is, lecserélve a Ca²⁺-ot tartalmazó standard oldatot Ca²⁺ mentes + 1 mM EGTA-t tartalmazó oldatra.

Ca²⁺ válaszok értékelése, statisztikai analízis

Az emittált fluoreszcens fény ratio-ból (F340 / F380) abszolút értékű, sejten belüli [Ca²⁺]_i koncentrációt számoltunk. A sejtek fluoreszcencia intenzitását a környékbeli sejtmentes területet háttérként használva korrigáltuk. A sejtek [Ca²⁺]_i számítását off-line végeztük a következő egyenlet segítségével: $[Ca^{2+}]_i = K_d \times F_{max380}/F_{min380} \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, amelyben az R a 340 nm és a 380 nm excitációhoz tartozó emittált intenzitás aktuális aránya, míg R_{max} és R_{min} 0 mM és teljes [Ca²⁺]_i szaturáció esetén mért arány, F_{max380} és F_{min380} pedig a 380 nm excitációhoz tartozó fluoreszcencia intenzitás 0 mM és teljes [Ca²⁺]_i szaturáció esetén. A rendszerre jellemző K_d, F_{max380}/F_{min380}, R_{min}, és R_{max} értékeket empirikusan határoztuk meg. A Ca²⁺ válaszokat az ATP-kiváltotta [Ca²⁺]_i

csúcs amplitúdójával jellemeztük ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nM-ban; csúcs - alap). A drog, valamint a Ca^{2+} mentes oldat ATP válasza való hatását a drogot tartalmazó ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,2}$), illetve a drogmentes oldatban ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,1}$) mért válasz arányával fejeztük ki ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,2}/\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i,1}$). A deszenzitizációt hasonlóképpen vizsgáltuk, azaz a második ATP választ viszonyítottuk az első válaszhoz. Az adatokat átlag \pm szórás (standard error of the mean - SEM) formában számítottuk. A kísérletek statisztikai elemzésére egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni post hoc teszttel, kivéve a deszenzitizáció vizsgálatoknál, ahol kétszempontos ANOVA- t használtunk Bonferroni post hoc teszttel. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$.

PCR kísérletek

Az egereket dekapitáltuk, majd a bullákat kipreparáltuk. A cochlea megnyitását követően a Corti-féle szervet eltávolítottuk a csontos modiolusról, a preparátumot azonnal szárazjégen lévő Eppendorf csövekben gyűjtöttük, majd az analízisig $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk.. A cochlea mintákban található teljes RNS állományt Trizol reagens alkalmazásával izoláltuk. Az RNS (2 μl) reverz ranszkripcióját RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit segítségével végeztük. Az amplifikáció jellemzői a következők voltak: denaturáció 5 percig $95\text{ }^\circ\text{C}$ -on, $80\text{ }^\circ\text{C}$ -on start, majd 40 cikluson át, 1-1 percig $94\text{-}59\text{-}72\text{ }^\circ\text{C}$ -on meghosszabbítás, végül $72\text{ }^\circ\text{C}$ -on 5 percig a végső meghosszabbítás. A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel analizáltuk.

[^3H]dopamin (^3H]DA) felszabadulás mérés egér cochleában

Izolált egér cochlea preparátum

Az egereket dekapitáltuk, feltártuk a bulla tympanit, majd kipreparáltuk, és szörsejtoldatba helyeztük. Sztereomikroszkóp segítségével feltártuk a belsőfület, a csiga csontos vázát körkörösén lepattintottuk, a stria vascularist pedig lefejtjük, így a ganglion spirale, az afferens hallórostokat, az efferens idegek axonjait és axonterminálisait, valamint a teljes Corti-szervet tartalmazó preparátumhoz jutottunk.

In vitro mikrotérfgatú perfúzió és elektromos téringlerlése

A belsőfül- preparátumot 1 ml szörsejt-oldatba helyeztük, melyhez $0,2\text{ }\mu\text{M}$ [^3H]DA-t (specifikus aktivitás: 45.0 Ci/mmol) adtunk, és így 35 percig

inkubáltuk. Ezt követően 100 µl belső térfogatú plexi kamrákba helyeztük, és 37 °C-os szőrsejt oldattal perfundáltuk. 60 percen keresztül tartó előperfúzióval átmostuk a preparátumot, majd a következő 57 percben 3 perces frakciókban gyűjtöttük az oldatot, melyek [³H]DA tartalmát a minták radioaktivitásának mérésével határoztuk meg, folyadék szcintillációs számláló segítségével. A kamrában található cochlea szöveten elektromos téringerlést alkalmaztunk platina elektródok segítségével, a harmadik (S1) és a tizenharmadik (S2) frakcióban, 30 V feszültséggel, 5 Hz frekvenciával, 0,5 ms-os impulzus- időtartamig.

Az alkalmazott vegyületek adásának módja

A kísérleteink egy részében DA felvételt gátló nomifensint alkalmaztunk, melyet a preperfúziót követően, a kísérletek kezdetétől perfundáltunk a rendszerbe. A többi vegyületet a gyűjtési szakban, két elektromos téringerlés között, a huszonegyedik perctől kezdve a kísérletek befejezéséig adtuk folyamatosan. Az NMDA-t Mg²⁺ mentes szőrsejtoldatban, 10 µM glicinnel együtt adtuk a perfúzióhoz.

A [³H]DA felszabadulás kiszámítása, statisztikai analízis

Az adott gyűjtött frakcióra vonatkozó [³H]DA felszabadulás mértékét a szövetben a gyűjtési időszakban mérhető teljes [³H]DA mennyiség százalékában adtuk meg (fractional release – FR). Az elektromos téringerlésekkel (S1 és S2) kiváltott DA felszabadulást FRS1 és FRS2-ként jelöltük: a téringerléssel kiváltott teljes [³H]DA felszabadulás értékéből levontuk a nyugalmi felszabadulást (az ingerlés előtti és az ingerlés hatásának befejeződését követő frakciók átlagát). A vizsgált vegyületek hatását a jelenlétükben és a hiányukban alkalmazott elektromos téringerlés során létrejött [³H]DA felszabadulás arányával, FRS2/FRS1-ként határoztuk meg. A nyugalmi felszabadulást 3 különböző, egyenként 6 perces periódusban mért FR átlagok alapján kalkuláltuk, melyek közül az FRR1 a 15-21 perces, az FRR2 a 21-27 perces, az FRR3 pedig a 30-36 perces 2-2 frakciókat jelöli. Ezek közül az FRR2 és az FRR3 már a vizsgált vegyületek jelenlétében, de még a második ingerlés előtt mért érték, míg az FRR1 értéke a vizsgálandó vegyületektől mentes, kontroll értéknek felel meg. A vegyületek nyugalmi DA felszabadulásra vonatkozó hatása a fentieknek megfelelően az FRR2/FRR1, vagy az FRR3/FRR1 arányszámmal került meghatározásra. Statisztikai analízisre egyszempontos ANOVA-t használtunk, és Tukey-féle post hoc páros összehasonlítást. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Alkalmazott vegyületek

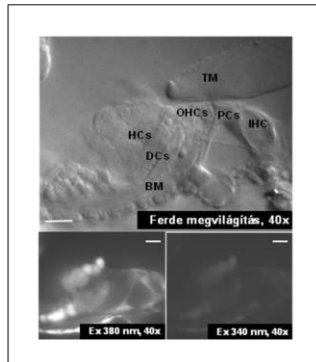
ATP, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonsav (PPADS), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), glicin, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), diethylamine NONOate (DEA-NONOate), (2R)-amino-5-phosphonopentanoate (AP-5), ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), nomifensin maleát, nitroprusszid nátrium, szőrsejt oldat elkészítéséhez szükséges vegyületek (Sigma-Aldrich). Fura-2 AM, Pluronic F-127, Calcium Calibration Buffer Kit with Magnesium #2 (Molecular Probes). Cyclopiazonic acid (CPA; Alamone labs). [7,8-3H]DA (Amersham).

4 EREDMÉNYEK

Purinerg jelátvitel a Corti szerv támasztősejtjeiben

Pillér, Deiters és Hensen sejtek Ca^{2+} imaging vizsgálatának beállítása halló egerek hemicochlea preparátumában

A sejteket mikroszkóp segítségével, ferde megvilágítás és 40-szeres nagyítás mellett azonosítottuk az anatómiai elhelyezkedésük és alakjuk alapján (*1. ábra*). Minden kísérlet elején meghatároztuk a sejtek nyugalmi intracellularis Ca^{2+} koncentrációját. A 2. ábra grafikusán mutatja a pillér (61 ± 4 nM, $n = 41$), a Deiters (58 ± 5 nM, $n = 65$), és a Hensen sejtek (98 ± 10 nM, $n = 53$) átlagos nyugalmi Ca^{2+} koncentrációját.



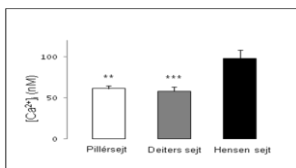
1. ábra: Ca^{2+} imaging halló egerekből nyert hemicochlea preparátumban.

Corti szerv ferde natív fényvel, valamint fura-2 AM bulk loading után 340 és 380 nm-es excitációs fényvel megvilágítva. TM, membrana tectoria; BM, membrana basilaris;

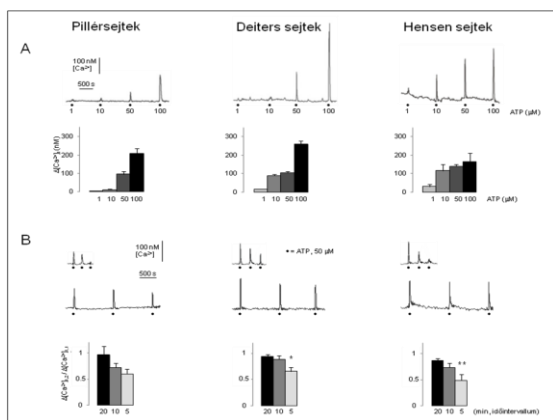
IHC, belső szőrsejt; PC, pillérsejt; OHC, külső szőrsejt; DC, Deiters sejt; HC, Hensen sejt. A fehér vízszintes jelölés: 20 μm .

Az ATP ismételhető, reverzibilis, és dóziszfüggő Ca^{2+} válaszokat vált ki

30 másodpercig adott ATP 1-100 μM koncentrációban mindegyik vizsgált sejttípusban reverzibilis és megismételhető Ca^{2+} jelet indukált (3/A. ábra). A pillér sejtek mutatták a legkisebb ingerelhetőséget a Deiters és a Hensen sejtekkel szemben (3/A. ábra). Mivel 50 μM ATP gyors, hasonló alakú Ca^{2+} jeleket váltott ki mindhárom sejttípusban ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ nM-ban; pillér sejt: 96 ± 14 nM, $n=41$; Deiters sejt: 104 ± 9 nM, $n=65$; Hensen sejt: 140 ± 10 nM, $n=53$), ezért ezt a koncentrációt használtuk a későbbi kísérleteink során.



2. ábra: Alap $[\text{Ca}^{2+}]_i$; a Corti szerv különböző típusú támasztősejjeiben. Átlag + SEM; $n = 41, 65, 53$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

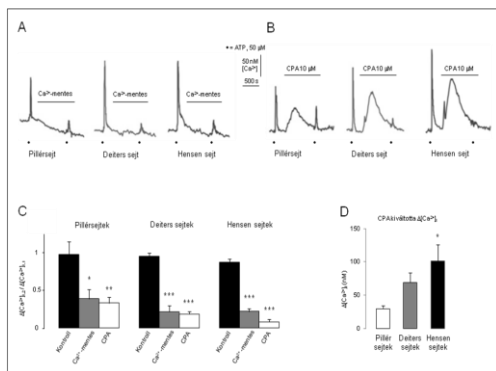


3. ábra: Az ATP reverzibilis és megismételhető intracelluláris Ca^{2+} jeleket váltott ki a pillér-, a Deiters és a Hensen sejtekben.

A) Felső görbék: 1, 10, 50 és 100 μM ATP, 30 s, fekete pontok; segédvonalak: $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ és idő; alsó oszlopdiagramok: átlag $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ + SEM; 1, 10, 50, 100 μM ATP, 30 s; pillérsejt $n = 4, 3, 41, 2$; Deiters sejt, $n = 9, 9, 65, 8$; Hensen sejt, $n = 2, 2, 53, 3$; B) Felső görbék: 50 μM

ATP, 5, 30 s perfúzió, fekete pontok; segédvonalak: $\Delta[Ca^{2+}]_i$ és idő; alsó oszlopdiagramok: átlag $\Delta[Ca^{2+}]_i + SEM$; alsó oszlopdiagramok: átlag $(\Delta[Ca^{2+}]_{i,2} / \Delta[Ca^{2+}]_{i,1}) + SEM$; 50 μM ATP, 20, 10, 5 min; Pillérsejtek, $n = 9, 6, 11$; Deiters sejt, $n = 14, 9, 20$; Hensen sejt, $n = 20, 4, 8$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Az ATP ismételt adása az ingerlések közt eltelt idővel fordítottan arányosan a $[Ca^{2+}]_i$ jelekben reverzibilis csökkenést okozott (3/B. ábra). Az amplitúdócsökkenés elhanyagolhatóvá vált, mikor az ingerlések között 20 perc telt el (pillér sejt: $3 \pm 1,6 \%$, $n = 9$; Deiters sejt: $6 \pm 4 \%$, $n = 14$; Hensen sejt: $13 \pm 4 \%$, $n = 20$), ezért a későbbiekben 20 perces időintervallumú ingerlést alkalmaztunk kísérleteinkben. Ezzel szemben szignifikáns amplitúdó csökkenés volt megfigyelhető 5 perces időintervallumú ingerlés esetén a Deiters és a Hensen sejtekben ($34 \pm 8 \%$, $n = 20$ és $51 \pm 12 \%$, $n = 8$), bár a pillér sejtek esetében csak tendencia szintjén ($40 \pm 9 \%$, $n = 11$).

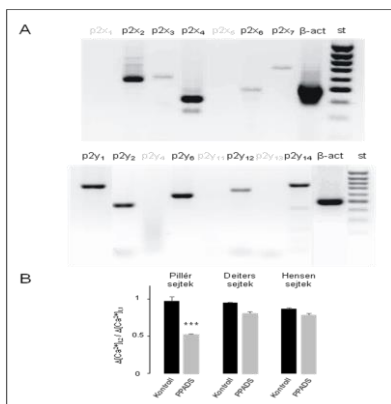


4. ábra: A támasztősejtekben az ATP által kiváltott Ca^{2+} válaszok mind az extracelluláris Ca^{2+} -tól, mind a belső raktárakból felszabaduló Ca^{2+} -tól függenek.

A-B) Mintagörbék: külső Ca^{2+} megvonása (+ 1 mM EGTA), illetve 10 μM CPA-val való perfúzió; 50 μM ATP, 30 s; segédvonalak: $\Delta[Ca^{2+}]_i$ és idő; A Ca^{2+} adását a vízszintes vonalak jelzi. C) átlag $(\Delta[Ca^{2+}]_{i,2} / \Delta[Ca^{2+}]_{i,1}) + SEM$; Ca^{2+} megvonás (+ 1 mM EGTA), illetve 10 μM CPA; Pillérsejtek, $n = 9, 7, 8$; Deiters sejt, $n = 14, 12, 10$; Hensen sejt, $n = 20, 14, 7$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. D) CPA 10 μM perfúzió; átlag $\Delta[Ca^{2+}]_i + SEM$; $n = 8, 10, 7$; * $p < 0.05$.

A Ca^{2+} tranziensek kiváltásában szerepet játszanak a P2X (extracelluláris Ca^{2+} függő) és a P2Y (intracelluláris Ca^{2+} raktár függő) receptorok is

Ca^{2+} mentes szőrsejt oldat (+1 mM EGTA) szignifikánsan lecsökkentette az ATP kiváltotta Ca^{2+} jelek amplitúdóját mindhárom sejttypusban (4/A. és C ábra). A gátlás kifejezettebb volt a Deiters és a Hensen sejtkben (a kontroll jel 22 ± 8 és 22 ± 4 %-a), mint a pillér sejtben (a kontroll jel 38 ± 14 %-a). A belső Ca^{2+} raktárakat a SERCA pumpa gátló CPA-val ($10 \mu\text{M}$) ürítettük ki, mely mindhárom sejttypusban gátolta az ATP által kiváltott Ca^{2+} válaszokat (4/B. és C ábra), és ez a hatás a Deiters és a Hensen sejtkben ismét robusztusabb volt (a kontroll jel 18 ± 4 és 8 ± 3 %-a), mint a pillér sejtben (a kontroll jel 33 ± 8 %-a; 3/C ábra). A CPA önmagában, a második ATP ingerlés előtt megemelte a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t mindegyik sejttypusban (4/B. ábra), és ez a jelenség is erőteljesebb volt a Hensen és a Deiters sejtkben, mint a pillér sejtben (4/D. ábra).



5. ábra: Az RT-PCR vizsgálat mind a P2X, mind a P2Y receptorcsalád számos altípusának expresszióját igazolta a halló egerek Corti szervében. A PPADS hatása különböző purinerg receptor populációt valószínűsít a pillérsejtkben, összehasonlítva a Deiters és a Hensen sejtkkel.

A) β -act: β -actin B) PPADS ($30 \mu\text{M}$); átlag + SEM; pillérsejtek, $n = 9$; Deiters sejtek, $n = 14$; Hensen sejtek, $n = 20$, 7. *** $p < 0.001$.

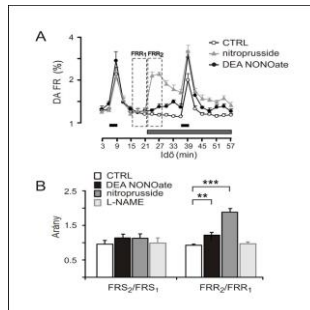
A P2X és a P2Y receptorok több altípusának mRNS-e is jelen van a Corti szerv sejtjeiben, eltérő mintázatban

15-19 napos CD-1 egerek Corti szervében RT-PCR-ral P2X2, P2X3, P2X4, P2X6, P2X7 valamint P2Y1, P2Y2, P2Y6, P2Y12, P2Y14 receptorok mRNS-ét tudtuk detektálni (5/A. *ábra*). A nem szelektív purinerg receptor antagonistá PPADS 30 μM koncentrációban gátolta a pillér sejtben az ATP-kiváltotta Ca^{2+} választ, míg a Deiters és a Hensen sejtben nem (5/B. *ábra*).

Az NMDA receptorok és az NO cochleáris DA felszabadulást befolyásoló hatása

A NO fokozza a cochleáris DA felszabadulást, amely nem áll tonikus NO szabályozás alatt

300 μM -os koncentrációban a NO donor nitroprusszid jelentős emelkedést okozott a nyugalmi DA felszabadulásban ($\text{FRR}_2/\text{FRR}_1=1.84\pm 0.10$; $P<0.001$), bár a stimulált DA felszabadulásban nem ($\text{FRS}_2/\text{FRS}_1=1.13\pm 0.12$; $P<0.51$; 6/A–B. *ábra*). A szelektív NO donor DEA-NONOate (100 μM) szintén megemelte a nyugalmi DA felszabadulást, ($\text{FRR}_2/\text{FRR}_1=1.17\pm 0.03$; $P<0.01$; 6/A–B. *ábra*). A NOS gátló L-NAME (100 μM) nem befolyásolta a DA felszabadulást ($\text{FRS}_2/\text{FRS}_1=1.05\pm 0.11$; ($\text{FRR}_2/\text{FRR}_1=1.02\pm 0.06$), ami nem valószínűsít tónusos modulációt (6/B. *ábra*).



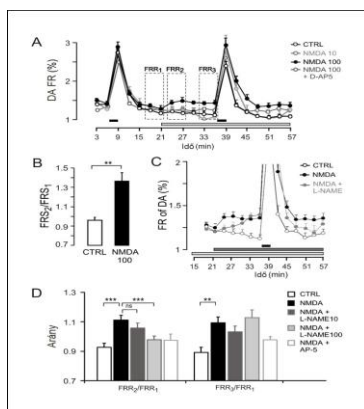
6. *ábra*: A külső NO hatása, és az endogén NO tónus hiánya.

A) Nitroprusszid nátrium (300 μM), DEA NONOate (100 μM); vízszintes fekete vonalak: elektromos téringelés (FRS_1 , FRS_2); vízszintes szürke vonal: vizsgált anyagok adása; B) Nitroprusszid nátrium (300 μM), DEA NONOate (100 μM), L-NAME (100 μM); $\text{FRS}_2/\text{FRS}_1$:

elektromos ingerléssel kiváltott, *FRR2/FRR1*: alap DA felszabadulás; átlag + SEM; $n = 8$, *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$.

Az NMDA fokozza a DA felszabadulást a LOC rostokból, részben NO közvetítésével

100 μM NMDA kisebb, de szignifikáns nyugalmi DA felszabadulás fokozódást okozott, míg 10 μM NMDA nem ($n=12$, *7/A-B. ábra*). Megmértük a nyugalmi NMDA-kiváltotta DA felszabadulást 0-6 perccel az NMDA adásától kezdve (*FRR2*), illetve 9-15 perccel az NMDA adásától kezdve (*FRR3*; $n=12$; *7/C. ábra*). 100 μM NMDA mindkét fázisban szignifikánsan megemelte a nyugalmi DA felszabadulást (*FRR2/FRR1*= 1.12 ± 0.04 $P < 0.01$; (*FRR3/FRR1*= 1.11 ± 0.04 $P < 0.001$), 17 és 20%-os növekedést okozva. 100 μM NMDA az elektromosan indukált DA felszabadulást is fokozta (*FRR2/FRR1*= 1.36 ± 0.09 $n=10$; $P < 0.05$; *7/A-B. ábra*).



7. ábra: Az NMDA receptorok a cochleában NO segítségével indukálják a DA felszabadulást

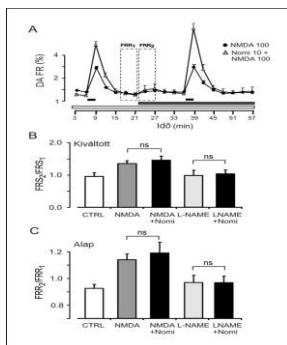
A) NMDA (10, 100 μM). D-AP-5-öt (50 μM); vízszintes fekete vonalak: elektromos téringerlés (*FRR1*, *FRR2*); szaggatott vonalú álló téglalapok: kontroll (*FRR1*), korai droghatás (*FRR2*), késői droghatás (*FRR3*); vízszintes szürke vonal: NMDA; B) NMDA (100 μM); *FRR2/FRR1*: téringerléssel kiváltott DA felszabadulás; átlag + SEM; $n = 10$, ** $P < 0.01$; C) NMDA (100 μM), L-NAME (100 μM); vízszintes szürke vonal: NMDA; világosszürke vonal: L-NAME; D) L-NAME (10, 100 μM), D-AP-5 (50 μM); átlag + SEM; *FRR2/FRR1*: korai NMDA-kiváltotta, *FRR3/FRR1*: késői NMDA-kiváltotta alap DA felszabadulás; $n = 10$, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Az NMDA hatást L-NAME jelenlétében is megvizsgáltuk. 10 μM koncentrációban az L-NAME nem modulálta az NMDA kiváltotta DA

felszabadulást ($P < 0.139$; **7/D. ábra**), míg $100 \mu\text{M}$ L-NAME szignifikánsan lecsökkentette a DA felszabadulást az első fázisban ($\text{FRR2}/\text{FRR1} = 0.99 \pm 0.04$ $n = 7$; $P < 0.001$), a későbbi fázisban nem ($\text{FRR3}/\text{FRR1} = 1.13 \pm 0.06$ $n = 7$; $P < 0.879$; **7/C-D. ábra**). A szelektív NMDA antagonistá AP-5 $50 \mu\text{M}$ koncentrációban teljesen legátolta az NMDA okozta DA felszabadulást (**7/D. ábra**).

Az NMDA/NO hatásban a DA visszavétel nem játszik szerepet

A DA visszavételt gátló Nomifensine folyamatos, $10 \mu\text{M}$ koncentrációjú perfúziója közben adott $100 \mu\text{M}$ L-NAME sem a nyugalmi, sem a stimulált DA felszabadulásra nem volt hatással ($\text{FRS2}/\text{FRS1} = 1.04 \pm 0.11$; $\text{FRR2}/\text{FRR1} = 0.97 \pm 0.05$, $n = 5$, $P < 0.01$, **8/A–C ábra**).



8. ábra: A DA visszavétel nem befolyásolja az NMDA-indukálta DA kibocsátást.

A) NMDA ($100 \mu\text{M}$), nomifensine ($10 \mu\text{M}$); vízszintes szürke vonal: NMDA, világoszürke vonal: nomifensine; vízszintes fekete vonalak: elektromos téringerlés (FRS1, FRS2); B) NMDA ($100 \mu\text{M}$), L-NAME ($100 \mu\text{M}$); átlag + SEM; ns = nem szignifikáns. C) NMDA ($100 \mu\text{M}$), L-NAME ($100 \mu\text{M}$), nomifensine ($10 \mu\text{M}$); átlag + SEM; ns = nem szignifikáns.

5 MEGBESZÉLÉS

Purinerg Ca^{2+} szignalizáció halló egerek támasztősejtjeiben

ATP és Ca^{2+} jelátvitel a cochleában – a hemicochlea preparátum jelentősége

A támasztősejtek purinerg Ca^{2+} szignalizációját eddig elsősorban izolált sejtes kísérletekben vagy sejtenyészetekben, illetve embrionális vagy újszülött rágcsálókban vizsgálták. Az egerek két hetes életkorukig nem

hallanak, tehát az embrionális vagy újszülött állatokból eredmények nem tükrözik az érett, halló állatok cochleájában zajló folyamatokat. A purinerg Ca^{2+} szignalizáció vizsgálatára használt kísérletes módszerek pedig nem őrzik meg a Corti szerv bonyolult felépítését, illetve sejtenyészetekben metabolikus átalakulás mehet végbe, mely befolyásolja az eredmények validitását. Modellünk előnyét az adja, hogy lehetőséget nyújt egyszerre több, különböző támasztósejt szimultán, kalibrált Ca^{2+} szint vizsgálatára az eredeti, in vivo anatómiai helyzetüket megközelítő szöveti környezetben, akut preparátumként, halló egérben.

Az ATP kiváltotta Ca^{2+} válaszok karakterisztikája a támasztósejtekben

Érett állatokból származó, izolált támasztósejteken igen széles koncentráció tartományban (0,01-1000 μM) vizsgálták az ATP Ca^{2+} válaszokat kiváltó hatását, leggyakrabban azonban 10 és 100 μM ATP-t használtak. A mi hemicochlea modellünkben 1 és 100 μM közötti koncentrációjú ATP perfúziója dóziszfüggő módon váltott ki Ca^{2+} szignálokat minden vizsgált sejtípusban (pillér, Deiters és Hensen sejt). A különböző sejtípusokat egymással összehasonlítva, a pillér sejtek egyértelműen kevésbé érzékenyek ATP-re, mint a másik két sejtípus (Deiters és Hensen). A Deiters és a Hensen sejtekben általunk mért nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a Ca^{2+} jelek kiváltásához szükséges ATP koncentrációjának nagyságrendje megfelel a korábban izolált sejteken mért értékeknek, bár a korrekt összehasonlítást nehezíti, hogy ezekben a kutatásokban csak egy hullámhosszú festéket, vagy nem kalibrált arány- illetve DF/F értékeket használtak.

Kísérleteink során deszenzitizációt tapasztaltunk, ha két ingerlés közti idő intervallumot lecsökkentettük 10, illetve még inkább, ha 5 percre. 20 perces időközökben végzett ingerlés esetén nem figyeltünk meg szignifikáns amplitúdó különbséget az egyes Ca^{2+} jelek között, ami lehetőséget adott a belső standardos kísérleti elrendezés alkalmazására.

Megvizsgáltuk, hogy modellünkben a Ca^{2+} válaszok kialakulásában milyen mértékben vesznek részt az ionotrop P2X, és a metabotrop P2Y receptorok. Az előbbi receptor (P2X) aktivitásának vizsgálatára kivontuk a perfúziós oldatból a Ca^{2+} -ot, míg a második (P2Y) receptor részvételének meghatározására a belső Ca^{2+} raktárakat kiürítő ún. SERCA pumpa gátló CPA-t adtunk a perfúziós oldathoz. Az irodalom alapján a két eljárást (külső Ca^{2+} megvonás, illetve a belső raktárak kiürítése) egy modellen eddig nem alkalmazta senki. Kísérleteinkben mindkét eljárás során a Ca^{2+} szignálok amplitúdójának jelentős csökkenését észleltük, ami alapján feltételezhetjük, hogy mindegyik sejtípusban mind P2X, mind P2Y receptorok részt vesznek az ATP indukálta Ca^{2+} válaszok létrejöttében. Habár nem fehére szinten, és

nem sejt-specifikusan, de ezt az eredményünket támogatja RT-PCR analízisünk is, ami P2X_{2,3,4,6,7} és P2Y_{1,2,6,12,14} receptorok mRNS-einek jelenlétét mutatta ki hasonló egerek Corti szervében. A széles spektrumú purinerg receptor antagonistá PPADS gátló hatása a pillérsejtekben és hatástalansága a Deiters- és a Hensen sejtekben eltérő funkcionális purinerg receptor populációt valószínűsít a pillér- vs. Deiters/Hensen sejteken.

Purinerg Ca²⁺ szignalizációs különbségek az egyes támasztósejt típusok között

Kísérleteink során azt találtuk, hogy az egyes Ca²⁺ források blokkolása jóval nagyobb mértékű gátlást okozott a Deiters és a Hensen sejtekben, mint a pillérsejtekben, valamint a SERCA pumpa gátló CPA is kifejezettebb Ca²⁺ szivárgást okozott az endoplazmás retikulumból (ER) az előbbi két sejttypusban. A szivárgás mértéke jellemzi az ER kapacitását, illetve permeabilitását, valamint befolyásolja töltöttségi állapotát, ami viszont kihat a Ca²⁺ válaszok kialakulására. Így a Deiters, de még inkább a Hensen sejtekben észlelt kifejezettebb ER Ca²⁺ szivárgás a belső raktárak Ca²⁺ szignalizációban betöltött nagyobb aktivitására utal, szemben a pillér sejtekkel. Ez magyarázhatja azt is, hogy a Hensen illetve a Deiters sejtek esetében miért észleltünk a külső Ca²⁺ megvonás nyugalmi [Ca²⁺]_i-ra való hatásával szembeni nagyobb rezisztenciát. Ugyanis az extracelluláris Ca²⁺ megvonása a pillérsejtekben okozta leggyakrabban az alap [Ca²⁺]_i lassú csökkenését, míg ezt csak ritkán figyeltünk meg a Deiters sejtekben, és szinte nem fordult elő a Hensen sejtekben. Végül a Hensen sejtek esetében észlelt legnagyobb mértékű Ca²⁺ szivárgás magyarázatot adhat a magasabb nyugalmi [Ca²⁺]_i-ra is.

Míg a pillérsejtekben a külső Ca²⁺ megvonás és a belső raktárak kiürítése okozta válasz amplitúdó csökkenés összege megközelítőleg megegyezett a kontroll kísérletekben mért válaszok amplitúdójával, addig a Deiters és a Hensen sejtekben ez az összeg jóval meghaladta a kontroll válaszok amplitúdójának nagyságát. Az utóbbi sejttypusok külső- és belső Ca²⁺-tól függő ATP válaszainak szupralineáris additivitása - szemben a pillérsejteknél tapasztalt lineáris additivitásával - az extra- és az intracelluláris Ca²⁺ függő ATP szignalizáció szinergikus interakciójára utal. A jelenség hátterében a Ca²⁺ indukálta Ca²⁺ release (CICR) állhat, melynek lényege, hogy a belső Ca²⁺ raktárak kiürítése nem csupán az eredendően belső raktárakra épülő Ca²⁺ jelek kialakulását, de a külső, extracelluláris térből származó Ca²⁺ jelek belső raktárakból történő felerősítését is gátolja. CICR során az extracelluláris térből belépő Ca²⁺ a belső raktárakból is felszabadít Ca²⁺-ot ryanodine vagy IP₃ receptorokon keresztül. A CICR

együttal magyarázatot adhat a CPA masszív gátló hatására, amely meghaladta az extracelluláris Ca^{2+} megvonásának hatását is. A Deiters és a Hensen sejtekkel szemben a pillérsejtekben vélhetően nem játszik szerepet CICR a purinerg Ca^{2+} szignálok létrejöttében. Emellett a pillérsejtek az ATP-re is kevésbé voltak szenzitívek, ebben a sejttypusban PPADS érzékenységet is igazoltunk, míg a Deiters és Hensen sejtekben nem, valamint a Deiters és a Hensen sejtekkel összehasonlítva jóval kisebb mértékű Ca^{2+} szivárgást észleltünk CPA hatására a belső raktárakból. A purinerg Ca^{2+} szignalizációban tetten érhető különbségek összhangban vannak azzal, hogy a különböző morfológiájú, ultrastruktúrájú, és elhelyezkedésű támasztósejteknek nem egyforma funkciót tulajdonítanak. Az egyes támasztósejt típusok purinerg Ca^{2+} szignalizációjában megmutatkozó különbségeknek a szenzorineurális halláscsökkenés elleni terápia targetálásánál is jelentősége lehet.

Az NMDA receptorok és az NO szerepe a LOC efferensek DA felszabadulásában – az „ultra-short feedback loop”

Munkacsoportunk korábbi eredményei összhangban álltak azzal az elképzeléssel miszerint a dopaminerg LOC rostok egy feedback rendszer efferens karjaként otoprotektív szerepet tölthetnek be, mérsékelve az afferens hallóideg rostok glutamáterg túlaktiválódását és így excitotoxikus károsodását. Az IHC – afferens hallóideg– LOC efferens kapcsolat összetettsége miatt a parakrin szabályozás jelentősége ebben a rendszerben vélhetően nagy, amihez ideális szabályozó jelölt az NO. Bár kísérleteinkben nem tudtunk a LOC efferensek DA felszabadítására ható endogén tónusos NO regulációt kimutatni, és az elektromos téringertés okozta DA felszabadulás mértékét sem fokozta a NO, viszont egyértelműen befolyásolta a nyugalmi DA felszabadulását, amit az NO donor nitroprusszid és a DEA NONO-át hatásával igazoltunk. Az NMDA receptorok aktivációja is fokozta a nyugalmi DA felszabadulást és ezt részben, a hatás korai fázisában, NO közvetítésével tette. Eredményeink arra utalnak, hogy a dopaminerg LOC efferensekből történő DA felszabadításon keresztül az NO egy lokális protektív feedback rendszer része lehet. Nem kizárt, hogy a korábban munkacsoportunk által igazolt lokális GABAerg diszinhibición túl egy másik helyi protektív visszacsatolási mechanizmus is létezik: az IHC-k által kibocsátott nagy mennyiségű Glu képes arra, hogy a saját toxikus hatását az NMDA receptorok aktivációjával, részben parakrin NO hatás közvetítésével mérsékelje úgy, hogy a LOC rostokban fokozza a DA felszabadulást, így védve az idegvezetőket a Glu excitotoxicitástól. Ezt a feltételezett

védelmi folyamatot *ultra-short feedback loop*-nak neveztük el. A nomifensine hatástalansága az NMDA kiváltotta válaszokra azt valószínűsíti, hogy a NO mediálta NMDA hatás elsősorban NO diffúzió útján jött létre, nem pedig transzporter reguláció útján.

6 KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az irodalomban először alkalmaztunk megfelelő tér- és időbeli felbontású funkcionális imaging módszert a Corti szerv különböző típusú támasztósejtjei Ca^{2+} szignalizációjának párhuzamos vizsgálatára halló egerek *in situ* hemicochlea preparátumában. A preparátum unikális tulajdonságai folytán (halló állat, jól megőrzött szöveti struktúra), az irodalomban alkalmazott preparátumokhoz viszonyítva, megbízhatóbb következtetések vonhatók le a kifejlett hallású eger hallószervének működésével kapcsolatban.

2. Az ATP reverzibilis, ismételhető, és deszenzitizációt mutató Ca^{2+} tranzienseket vált ki - dózis függő módon - mindhárom vizsgált támasztósejtben (pillér-, Deiters- és Hensen sejtek).

3. Az ATP kiváltotta Ca^{2+} tranziensek kialakításában mindhárom sejttípusban szerepe van az ionotrop P2X (extracelluláris Ca^{2+} függő) és a metabotrop P2Y receptoroknak (intracelluláris Ca^{2+} függő) is. Mindkét receptor több altípusának mRNS-e is jelen van a Corti szervben.

4. A pillér sejtekre az extra- és intracelluláris Ca^{2+} -függő válasz komponensek lineáris additivitása és a purinerg receptor antagonist PPADS-sel szembeni érzékenység, a Deiters és Hensen sejtekre az extra- és intracelluláris Ca^{2+} -függő válasz komponensek szupralineáris additivitása (a CICR) és az ER fokozottabb Ca^{2+} csurgása jellemző. A purinerg Ca^{2+} szignalizáció különbözősége hozzájárulhat a sejtek cochleáris (pato)fiziológiában játszott különböző szerepéhez.

5. Exogén NO hatására megnő a LOC efferensek nyugalmi DA felszabadítása. A NOS gátlás hatástalansága a reguláló endogén NO tónus hiányára utal. Az NMDA receptor aktiváció a nyugalmi és az elektromos ingerléssel kiváltott DA felszabadulást is fokozza.

6. Az NMDA DA felszabadulást fokozó hatásában szerepe van az NMDA receptor aktivációra keletkező NO-nak is, de nem vesz benne

részt a DA visszavétel rendszer regulációja. Az NMDA receptor/NO/DA felszabadulás feed back mechanizmus feltehetően védő hatású az excesszív Glu felszabadulás okozta excitotoxikus hallóneuron károsodással szemben.

7 PUBLIKÁCIÓS LISTA

A disszertációhoz felhasznált publikációk:

Horváth T, Polony G, Fekete Á, Aller M, Halmos G, Lendvai B, Heinrich A, Sperlág B, Vizi ES, Zelles T (2016). ATP-Evoked Intracellular Ca²⁺ Signaling of Different Supporting Cells in the Hearing Mouse Hemicochlea. **Neurochemical Research**, 41(1-2):364-75.

Halmos G, **Horváth T**, Polony G, Fekete Á, Kittel Á, Vizi ES, Van Der Laan BFAM, Zelles T, Lendvai B (2008). The role of N-methyl-D- aspartate receptors and nitric oxide in cochlear dopamine release. **Neuroscience**, 154(2), 796–803.

A témához kapcsolódó egyéb publikációk

Polony G, Humli V, Andó R, Aller M, **Horváth T**, Harnos A, Tamás L, Vizi ES, Zelles T (2014). Protective effect of rasagiline in aminoglycoside ototoxicity. **Neuroscience**, 265:263-73.

Lendvai B, Halmos GB, Polony G., Kapocsi J, **Horvath T**, Aller M, Vizi ES, Zelles T (2011) Chemical neuroprotection in the cochlea: The modulation of dopamine release from lateral olivocochlear efferents. **Neurochemistry International**, 59:(2) pp. 150- 158.

Halmos Gy, Doleviczényi Z, **Horváth T**, Polony G, Vizi E Szilveszter, Lendvai Balázs, Zelles T (2006) In vitro ischaemia hatása a cochlearis dopamin felszabadulására. **Fül- Orr-Gégegyógyászat**, 52:(4) pp. 245-252.

A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk

Horváth T, Horváth B, Varga Z, Liktör B Jr, Szabadka H, Csákó L, Liktör B (2015) Severe neck infections that require wide external drainage: clinical analysis of 17 consecutive cases. **European archives of oto-rhino-laryngology**, 272(11) pp. 3469-74.

Horváth T (2011) Az információs forradalom orvosi szemmel. **Lege Artis Medicinae** 21(6-7) pp. 494-496

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Zelles Tibor PhD egyetemi docensnek, a segítséget, útmutatást, türelmet és biztatást, hogy a klinikai gyógyító munkám mellett messzemenőig támogatta a kutatómunkámat.

Köszönöm volt és jelenlegi főnökeimnek, Csokonai Vitéz Lajos PhD Főorvos Úrnak, valamint Liktor Bálint Osztályvezető Főorvos Úrnak önzetlen támogatásukat, hogy a tudományos munkámra is időt szakíthattam. Szintén köszönöm Z. Szabó László Emeritus Professzor Úrnak, hogy felkeltette a tudomány iránti érdeklődésemet és mindvégig ösztönzött a kutatómunkám során.

Külön köszönetet szeretnék mondani Halmos Györgynek PhD, aki segített elindulni a kísérletes munkában és a hemicochlea preparátum beállításában, valamint Polony Gábornak PhD az áldozatos közös munkáért. Szintén köszönet illeti Gáborján Anitát PhD, aki megalapozta a kísérleteimben használt, in vitro mikrotérfogató perfúziós technikával végzett dopamin mérés használatát.

Nagyon köszönöm Vizi E. Szilveszter Professzor Úrnak, az MTA rendes tagjának, valamint az MTA KOKI és a SE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet munkatársainak a segítséget és a támogatást, kiemelten Fekete Ádám PhD, Szabó Szilárd PhD, Lendvai Balázs DSc, Aller Máté, Téglás Tímea, Humli Viktória, Berekméri Eszter, és Őszi Judit laborban velem együtt dolgozó munkatársaimnak. Hálás vagyok, hogy kutatómunkámat az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben és a SE Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében végezhettem ahol ehhez a feltételek a legmagasabb nemzetközi színvonalon voltak biztosítottak.

Szeretném megköszönni minden volt és jelenlegi kollégámnak a volt Országos Gyógyintézeti Központ (HIETE), és a Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül- Orr- Gégészeti Osztályán a türelmüket, támogatásukat és segítségüket.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, feleségemnek a kitartást és támogatást, gyermekeimnek a türelmet, szüleimnek a bátorítást és a tanácsokat.