A szenzorineurális halláskárosodások gyógyszeres terápiájának kutatása

Doktori értekezés

dr. Polony Gábor

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Vizi E. Szilveszter, az MTA tagja, egyetemi tanár
Dr. Zelles Tibor, Ph. D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár
Dr. Rejtő Kálmán, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tekes Kornélia, DSc., egyetemi tanár,
Dr. Helfferich Frigyes, Ph.D.oszt. vez. főorvos

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék 2
1. Rövidítések jegyzéke 4
2. Bevezetés – Irodalmi háttér 6
2.1. A szenzorineurális halláscsökkenés és a hatékony gyógyszeres kezelés hiánya 8
2.1.1. A szenzorineurális halláscsökkenés etiológiája, patológiája és klinikai diagnózisának kritériumai 8
2.1.2. Kortikoszteroid kezelés 11
2.1.3. Egyéb gyógyszeres kezelések 13
2.1.4. Hiperbárikus oxigénterápia 14
2.2. Rasagilin 16
2.2.1. A Monoamin-oxidázokról (MAO) általában 16
2.2.2. Farmakológia, farmakokinetika, gyógyszerbiztonság 16
2.2.3. Neuroprotektív hatás 17
2.3. A laterális olivocochleáris (LOC) efferensekből felszabaduló DA cochleoprotektív szerepe 18
2.4. Aminoglikozid ototoxicitás és alkalmazása egy SNHL modellben 22
2.4.1. Az aminoglikozid antibiotikumok 22
2.4.2. Az aminoglikozid antibiotikumok mellékhatásai 23
2.4.3. Állatkísérleti modell aminoglikozid okozta halláskárosodás vizsgálatára 25
2.4.4. A kialakuló ototoxicitás lehetséges mechanizmusai 26
2.4.5. Az aminoglikozidok okozta károsodások mérséklése, esetleges megelőzése 27
2.4.6. Egyéb ototoxikus hatóanyagok 28
3. Célkitűzések 29
4. Módszerek 31
4.1. A rasagilin hatás mérése aminoglikozid antibiotikum által kiváltott ototoxicitás modellben in vivo 31
4.1.1. A kanamycin okozta ototoxicitás modell kísérleti elrendezése és a rasagilin kezelés módja. 31
4.1.2. Az agytörzsi kiváltott válasz potenciál (BERA) in vivo mérése 33
4.1.3. Statisztikai analízis 35
4.2. A LOC efferens végkészülékekből felszabaduló DA in vitro mérése 35

4.2.1. DA felszabadulás mérése egér cochleában 35
4.2.2. Az adatok elemzése és statisztikai analízise. 38
5. Eredmények 39
5.1. A rasagilin in vivo hatása az aminoglikozid által kiváltott hallásvesztésre 39
5.2. A LOC efferensek DA felszabadításának mérése egér preparátumon. A Ca^{2+} és Na^{+} csatornák, valamint a DA-visszavétel szerepének igazolása. 43
5.3. A rasagilin cochleáris DA felszabadulásra gyakorolt hatása és annak mechanizmusa 46
6. Megbeszélés 49
6.1. A szenzorineurális hallásvesztések diagnosztikájának néhány lehetséges módszere 49
6.2. A szenzorineurális halláscsökkenések esetén jelenleg alkalmazott kezelési lehetőségek és lehetséges új gyógyszerek 49
6.3. A rasagilin potenciális otoprotektív hatásának *in vivo* vizsgálata a SNHL-ek aminoglikozid által kiváltott formájában 50
6.4. Endogén protektív mechanizmus a cochleában – a rasagilin DA felszabadulást fokozó hatása az LOC terminálisokon 53
6.5. Általános megfontolások a rasagilin esetleges otoprotektív alkalmazását illetően 55
7. Következtetések 59
8. Összefoglalás 61
9. Summary 62
10. Irodalomjegyzék 63
11. Saját publikációk jegyzéke 82
11.1. A disszertációhoz felhasznált publikációk 82
11.2. A témához kapcsolódó egyéb publikációk 82
11.3. A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk 82
12. Köszönetnyilvánítás 84

1. Rövidítések jegyzéke

atm. – atmoszféra

AMPA-receptor - α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionsav receptor

AUC – area under the curve (görbe alatti terület)

BERA – brainstem evoked response audiometry (agytörzsi kiváltott válasz audiometria)

Cd – kadmium

CF – cisztikus fibrózis

CYP 450 – cytochrom P 450 enzim

DA – dopamin

DOPAC – dihydroxi-fenilacetilsav

DPOAE – distorsion product otoacoustic emission (disztorziós otoakusztikus emisszió)

FDA – Food and Drug Administration (amerikai gyógyszer- és élelmiszerellenőrző hatóság)

GAPDH – gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

Glu - glutamát

HBOT – hiperbárikus oxigénterápia

[^{3}H]DA – tríciummal jelölt DA

HPLC - High-performance liquid chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)

HVA - homovanilinsav

IHC – Inner Hair Cell (belső szőrsejt)

i.p. - intraperitoneális

i.t. – intratimpanális

i.v. - intrvénás

LOC – lateralis olivocochlearis köteg

MAO - monoamino-oxidáz

mg/d - milligramm/nap

mGluR – metabotróp glutamát receptor

MPP+ - 1-methyl-4-phenylpyridinium ion

MPTP - 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

NMDA-receptor – N-metil-D-aszpartát receptor

OHC – Outer Hair Cell (külső szőrsejt)

ROS – reaktív oigén származék

s.c. – subcutan (bőr alá)

S.E.M. – standard error of the mean (átlag szórása)

SG – spirális ganglion

SOD – superoxid dizmutáz

SNHL – sensorineural hearing loss (idegi eredetű halláscsökkenés)

TBC – tuberkulózis

TTX – tetrodotoxin

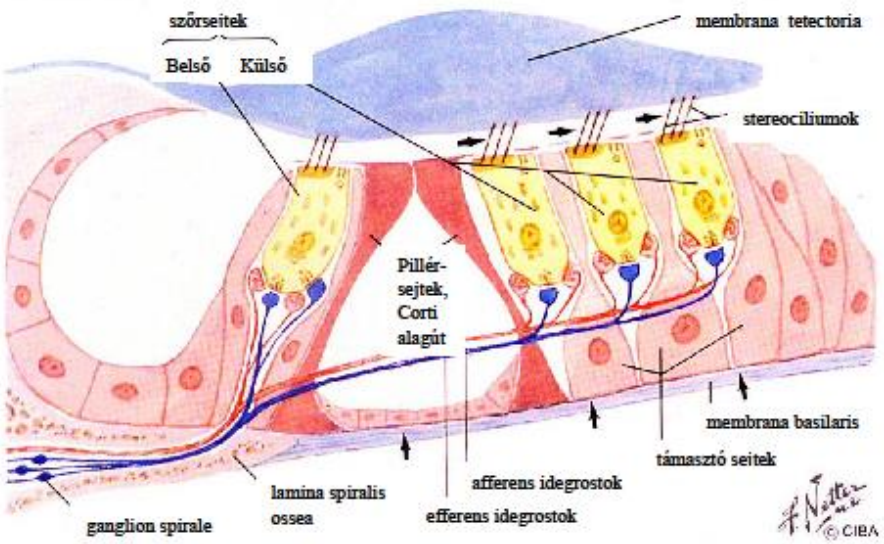
VGCC - Voltage-Gated Calcium Channel (feszültségfüggő kálcium csatorna)

VGSC - Voltage-Gated Sodium Channel (feszültségfüggő nátrium csatorna)

2. Bevezetés – Irodalmi háttér

Mindennapjainkban a megfelelő tájékozódást, eligazodást több érzékszervünk segíti, melyek közül az egyik legfontosabb a hallás, ami egy rendkívül bonyolult mechanikai és elektrofiziológiai folyamatok sorozataként létrejövő érzékelés.

E folyamat részeként a külvilágban létrejövő hangrezgések a hallójáratba jutva - ép hangvezető rendszer esetén - mozgásba hozzák a dobhártyát, ill. ezen keresztül a hallócsontokat. A rezgésbe hozott hallócsontok a hangenergiát az ovális ablakon keresztül átadják a belsőfül folyadékterének, amiben frekvenciaspecifikus hullámok által ingerületbe jönnek a Corti szervben található szenzoros sejtek, a külső és belső szőrsejtek (1. ábra). A szőrsejtekben az extra- és intracelluláris tér között fennálló jelentős potenciálkülönbség megváltozása következtében kialakuló elektromos jeleket a VIII-as agyideg (nervus vestibulocochlearis) hallásért felelős rostjai vezetik el a különböző hallómagvak és a hallókéreg felé.



1. ábra: Corti szerv sematikus rajza (forrás: Felten, Netter's Atlas of Neuroscience, 2nd Edition, 2010, Elsevier, módosítva).

A Corti szervet alkotó sejtek és idegi struktúrák egymáshoz viszonyított helyzete. Látható a szőrsejtek afferens (kék) és efferens (piros) beidegzése. A külső szőrsejtek (OHC) találhatók a Corti szerv laterális, míg a belső szőrsejtek (IHC) a Corti szerv mediális részén. A fekete nyilak a Corti szerv, hangingerek keltette lökéshullámok hatására kialakuló elmozdulásának az irányát jelzik.

Míg ezen folyamat mechanikai részét részletesen ismerjük, az elektrofiziológiai mechanizmusok pontos részleteit illetően hiányosak az ismereteink. A belsőfül alapvető működésével kapcsolatos mechanizmusok kutatásáért és a haladó hullám elmélet kidolgozásáért Békésy György 1961-ben elnyerte az élettani és orvosi Nobel-díjat. Az általa kidolgozott teória mind a mai napig bizonyos kiegészítésekkel érvényben van és alapját képezi a cochlea működéséről alkotott ismereteinknek.

Életünk során számtalan külső és belső behatás éri hallószervünket, amelyek a rendkívül finoman szabályozott rendszerben károsodásokhoz vezethetnek. Ezen behatások az egyre hosszabb várható élettartam miatt összeadódnak, egyre hosszabb ideig hatnak ránk.

Legfontosabbak ezek közül a civilizációs környezetünk részeként egész életünkben fennálló zajterhelés (hangos zenehallgatás, 90-100 dB-t meghaladó munkahelyi zajterhelés hatékony védőfelszerelés hiányában, forgalmas közlekedési csomópontokban jelentkező tartós zaj, stb.), az életkor előrehaladtával fokozatosan károsodó vérellátás okozta perfúziós zavarok, a különböző betegségek gyógyítására kifejlesztett gyógyszerek és kezelési eljárások hatásaként, ill. mellékhatásaként kialakuló kölcsönhatások, valamint több, közvetlenül a hallás szenzorineurális részét károsító kórokozó által kiváltott betegség.

Ezeken felül számtalan olyan tényező is befolyásolhatja hosszú távon a hallásunkat, melyeket egyelőre nem ismerünk, és így az ismeretlen eredetű, idiopátiás csoportba sorolunk.

Mivel az egyre fejlődő orvostudomány hatásának következményeként a várható élettartam mind a fejlett, mind a fejlődő országokban fokozatosan emelkedik, feltételezhető, hogy az összeadódó hatások miatt az idősebb generációkat egyre fokozottabban érintik a halláskárosító tényezők (Schultz-Coulon, 1985; Boettcher et al, 1987).

Ennek az additív hatásnak az életminőségre gyakorolt kedvezőtlen következményei az élet számos területén jelentkezhetnek.

Jelenlegi ismereteink alapján nyilvánvaló, hogy a különböző károsító tényezők több patomechanizmuson keresztül fejtik ki hatásukat. Elsősorban ennek a

multifaktoriális jellegnek köszönhető, hogy mindezidáig nem rendelkezünk igazán hatásos kezeléssel a szenzorineurális halláscsökkenések (SNHL) esetében.
Egyre elfogadottabbnak látszik azonban az a nézet is, miszerint a különböző károsító tényezők komplex hatásmechanizmusai nagymértékben hasonlítanak egymásra. Ezen folyamatok alapvető részét képezi a különböző noxák következtében kialakuló glutamát mediálta excitotoxicitás, mely reaktív szabad gyökök képződéséhez és ezeken keresztül súlyos sejtkárosodásokhoz vezethet. (Bondy és Lee 1993; Reynolds és Hastings 1995; Lipton, 1999).

Az excitotoxicitás elleni endogén védekező mechanizmusok közül jelentős szerepet játszik a laterális olivocochleáris neuronokból felszabaduló, és az elsődleges hallóneuronok kóros túlaktiválódását gátló, ezáltal protektív hatást kifejtő dopamin (DA) (Ohmori, 1992; Puel, 1995; Gáborján et al., 1999; Halmos et al. 2000; 2005). Mind a DA felszabadulás fokozásán, mind a raktárakba történő visszavétel és a DA lebomlásának gátlásán keresztül elősegíthetjük az excitotoxicitás káros hatásainak a kivédését.
A károsító tényezők többes támadáspontjából következik, hogy a lehetséges hatásos cochleoprotektív szereknek is multiplex védőmechanizmuson keresztül kell kifejteni védő hatásukat.

Ezen elgondolásból kiindulva vizsgáltuk meg in vitro és in vivo körülmények között az anti-Parkinson kezelés részeként törzskönyvezett, számos igazolt támadásponton keresztül neuroprotektív hatással rendelkező rasagilin hatását egy SNHL forma, az aminoglikozid antibiotikum okozta halláskárosodás egérmodelljében.

2.1. A szenzorineurális halláscsökkenés és a hatékony gyógyszeres kezelés hiánya

2.1.1. A szenzorineurális halláscsökkenés etiológiája, patológiája és klinikai diagnózisának kritériumai

A halláscsökkenés az embereknél tapasztalt leggyakoribb érzékvesztés. A modern, iparosodott országokban a hirtelen fellépő halláscsökkenés kialakulásának gyakorisága tág határok között mozog. Bizonyos tanulmányok éves szinten 5-

20/100000 lakost említenek, míg máshol a 160/100000 arányt is eléri az előfordulásuk (Mattox et al., 1977, Klemm et al. 2009).

Számos folyamat vezethet fokozatosan progrediáló szenzorineurális hallásvesztéshez, mint pl. a természetes öregedés (presbyacusis), számos genetikailag meghatározott, ill. idiopathiás betegség, továbbá a mindennapos civilizációs zajterhelés is ezek közé tartozik.

A hirtelen kialakult hallásvesztések hátterében bizonyos patogenetikai tényezők szerepe ismert (fertőzés, vaszkuláris okok, emelkedett fibrinogén szintek, trauma, genetikai betegségek, ám a legnagyobb csoportot – akár az esetek 90%-át - továbbra is az idiopátiás eredetű hallásvesztések alkotják (Suckfüll, et al., 2002., Rauch, 2008., Chau et al., 2012., Weiss et al. 2014.).

A szenzorineurális halláscsökkenés diagnózisának felállítását jelenleg nemzetközileg széles körben elfogadott kritériumok határozzák meg (National Institute of Deafness and Communication Disorders. Sudden Deafness. 2000.):

Legalább 30dB-t elérő, minimum 3, egymást követő mért frekvencián tapasztalt, percepciós jellegű hallásküszöb emelkedést nevezünk szenzorineurális halláscsökkenésnek. Mivel számos esetben nem áll rendelkezésre a halláscsökkenés kialakulását megelőző hallásvizsgálati eredmény, ezért leggyakrabban az ellenoldali fülön mért halláshoz viszonyítjuk a mérési eredményt.

Idiopátiásnak nevezünk egy halláscsökkenést, amennyiben a megfelelő kivizsgálások ellenére sem igazolható a fellépett halláskárosodás eredete.

Az orvosi gyakorlatban több gyógyszer ismert, melyek alkalmazására hasonlóan hatékony, esetleg hatásosabb hatóanyagok hiányában az ismert ototoxikus mellékhatások mellett is rákényszerülünk. Ilyenek a számos, pl. a fej-nyaki daganatok kemoterápiás kezelésére használt platina alapú szerek - azokon belül is leginkább a ciszplatin -, valamint az aerob, Gram negatív baktériumok által okozott fertőzések kezelésére bevált, és bizonyos esetekben nem helyettesíthető antibiotikumok, az aminoglikozidok.

A halláscsökkenések vezetéses formájával ellentétben a percepciós halláskárosodás kezelésére nem áll rendelkezésünkre hatékony terápia (Kaya H. et al. 2014; Salonen, J. et al. 2013). Leginkább az ép és károsodott hallás alapvető molekuláris folyamataival és ezek endogén védő mechanizmusaival kapcsolatos

hiányos ismereteink miatt nem rendelkezünk megfelelő eszközökkel a SNHL megelőzésére és kezelésére.

Számtalan patológiai tényezőt és mechanizmust tartanak felelősnek a szenzorineurális halláscsökkenések kialakulásában (Hinshaw és Feldman, 1945, Boettcher et al, 1987).

Egyetértés látszik kialakulni a tekintetben, hogy a redox háztartásban létrejövő egyensúlyvesztés és az ennek következtében kialakuló reaktív nitrogén és oxigén gyökök (RNS és ROS) intracellulárisan megemelkedett szintje alapvető a SNHL-ek minden szerzett (Mukherjea et al., 2011), valamint számos öröklött formájának (Noben-Trauth és Johnson, 2009) patológiai folyamataiban.

A szőrsejteket érő károsodáson kívül a szenzorineurális halláscsökkenések kialakulásához, ill. fokozódásához hozzájárulhatnak a stria vascularist és a spirális ganglionokat érő behatások is, amik ezek degenerációját okozhatják (Ruedi, 1952; Hawkins, 1976, Johnsson et al., 1981; Harris et al., 2011).

Az ischaemia, hypoglycaemia, ill. különböző halláskárosító gyógyszerek hatására a szőrsejtekből excesszív mértékben felszabaduló glutamát, elsősorban ionotróp receptorainak túlaktiválódásán keresztül fokozza az intracelluláris Ca^{2+} és ROS szintet. Az emelkedő sejten belüli Ca^{2+}-szint több, a sejteket károsító folyamatot indít be:

- károsodik a mitochondriumok energiatermelő funkciója, ezzel károsodik a Ca^{2+}-felvétel az endoplazmás retikulumba és a Ca^{2+} elimináló transzportja
- megemelkedik a Ca^{2+}-függő proteázok, lipázokés endonukleázok aktivitása, károsítva a fehérjéket, lipideket és nukleinsavakat
- aktiválódik az NO-szintézis, ami magas koncentráció elérése esetén neurodegeneratív foyamatok elindításához vezet

Az excitotoxicitás részeként megemelkedett ROS-ok szerepe többszörös: nem csak potencírozzák a kóros folyamatokat, de be is indítanak ilyen folyamatokat, ill. közvetlenül is károsítják a sejt alkotórészeket. Végeredményben a fenti folyamatokon keresztül apoptózishoz és nekrózishoz vezetnek (Lipton, 1999).

Ezen ismeretanyag alapján indultak el a SNHL kialakulásában döntő szerepet játszó Corti-szerv sejtjeinek és a hallóidegek védelmét szolgáló, különböző

antioxidáns és ROS-fogó vegyületekkel kapcsolatos vizsgálatok (Tabuchi et al., 2010; Mukherjea et al., 2011).

A hirtelen kialakult halláscsökkenések jelentős hányadánál (32%-65%) spontán javulás, akár teljes gyógyulás várható (Conlin és Parnes, 2007a), bár ennek klinikai tapasztalataink sokszor ellentmondani látszanak. A prognózist számos tényező befolyásolhatja, úgymint a beteg kora, szédülés együttes fennállása a tünetek kialakulásakor, a halláscsökkenés mértéke, illetve a halláspanaszok kialakulása és a kezelés megkezdése között eltelt idő (Conlin és Parnes, 2007b, Fetterman et al. 1996, Haynes et al. 2007).

Jelenleg nem rendelkezünk olyan kezelési protokollal, ami a hirtelen halláscsökkent betegek jelentős részénél a spontán hallásjavulás esélyénél szignifikánsan nagyobb gyógyulási esélyt biztosítana (Stachler et al., 2012).

Az alkalmazott, de kellő és egyértelműen igazolt hatékonysággal nem rendelkező kezelési próbálkozások sora végtelennek tűnik. Ezek között találhatók többek között a szisztémás és topikus szteroidok, antivirális készítmények, reológiai szerek, diuretikumok, hiperbárikus oxigén kezelés, értágítók, véralvadásgátlók, ozmotikus szerek, plazmaexpanderek, nootróp szerek, ásványi anyagok, valamint középfül-sebészeti beavatkozás során történő fisztulazárás, valamint a szoros obszerváció önmagában.

A SNHL egyéb formáiban a fent felsorolt kezelések hatékonyságára még ennyi pozitív klinikai eredményünk sincs. Ezzel együtt a nem megfelelően tisztázott patológiai háttér miatt bizonyos, nem hirtelen kialakult percepciós halláscsökkenések esetében is megpróbálkozunk a terápiákkal, nem megfeledkezve ezen kezelések pszichológiai (placebo) hatásairól.

2.1.2. Kortikoszteroid kezelés

Laboratóriumi tesztek igazolták a hirtelen kialakult, szenzorineurális halláscsökkenések esetén fellépő gyulladásos sejthalál kaszkádfolyamatának létét, amit a szteroid terápia befolyásolni képes (Stachler et al., 2012).

Jelen esetben a kortikoszteroidok alatt olyan szintetikus glukokortikoidokat értünk, amiket szájon át, intravénásan (i.v.) vagy intratimpanálisan (i.t.) adagolunk. Ide

soroljuk a prednizolont, a metilprednizolont és a dexametazont. A kortikoszteroidok rendelkeznek támadásponttal a belsőfülben, melyeken keresztül ki tudják fejteni hatásukat vírusos, vaszkuláris, autoimmun, Menière-betegséghez társuló és egyéb etiológiájú hallásvesztések esetén (Norris, 1988, McCall et al., 2010).

Számos vizsgálat és összefoglaló elemzés foglalkozott a szisztémásan adagolt szteroidok hatásosságával szenzorineurális halláscsökkenések esetén.
Egy áttekintő vizsgálat eredménye alapján egyes szerzők szerint a kortikoszteroid kezelés nem jár előnyökkel a placebo csoporthoz képest, míg mások jelentős hallásjavulást igazoltak (Wei et al., 2006). Egy későbbi meta-analízis enyhe, de nem szignifikáns hallásjavulást igazolt (Labus et al., 2010).

Ezen adatok alapján az Amerikai Fül-orr-gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Akadémia Alapítvány (American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery Foundation) érvényben lévő, 2012-es, bizonyítékokon alapuló szakmai irányelve szerint ajánlható a betegek részére a hirtelen kialakuló, szenzorineurális halláscsökkenés esetén a szisztémás szteroid kezelés alkalmazása (Stachler et al., 2012).

Az akut szenzorineurális halláscsökkenésben szenvedő betegeknél – a meggyőző bizonyítékok hiányában - erősen mérlegelni kell a kezelés megkezdése előtt a szisztémásan adagolt kortikoszteroidok kockázat/előny arányát.
A spontán javuló halláscsökkenések esetén az a tapasztalat, hogy a legerőteljesebb javulás az első 2 hétben várható (Mattox et al., 1977). Hasonló eredményre számíthatunk szteroid kezelés mellett is, míg a 4.-6. hét között alkalmazott kezelés kevés javulással kecsegtet (Rauch, 2008., Cvorovic et al., 2008).

A szisztémásan adagolt kortikoszetroid kezelésnek számos szervet érintő mellékhatásai ismertek. A leggyakrabban alkalmazott szteroidok, mint a prednizolon, minimális mineralokortikoid hatással rendelkeznek, így mellékhatás-spektruma leginkább a közvetlen glukokortikoid hatásokból, ill. a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg rendszer szupressziójából adódik. Számolhatunk alvászavarokkal, felboruló cukorháztartással, gasztritisszel, ill. gyomorvérzéssel, valamint súlygyarapodással.

Az alkalmazandó szteroid dózisokat illetően számos bevett gyakorlat létezik. Jelentősen eltérő gyakorlatok tapasztalhatók a rendkívül magas, akár 250-500 mg

mg/d dózistól a napi 1 mg/kg dózisig (max. dózis: 60 mg/d), minden esetben a terápia előrehaladtával folyamatosan csökkenő adagok alkalmazása mellett (Stennert et al., 1979, Rauch, 2008).

A jelentős mellékhatások miatt az inzulin-dependens, vagy nehezen beállítható cukorbetegek, nehezen kontrollálható hipertóniás, TBC-ben, illetve egyéb, komoly fertőzésben szenvedő betegek, a gasztrointesztinális fekélyben szenvedők, valamint a súlyosan oszteoporotikus betegek nem vagy csak különös odafigyelés mellett részesülhetnek szisztémás kortikoszteroid kezelésben.
Fontos tényező azonban, hogy a szteroid kezelés mellet jelentkező mellékhatások jelentős része krónikus adagolás mellett jelentkezik. A különböző kezelési gyakorlatok mellett a 10-14 napig tartó adagolás mellékhatásai mérsékeltek és jól tolerálhatóak. Tartós szedés mellett is a legjelentősebb mellékhatásként súlygyarapodás és emelkedett vércukorszintek jelentkeztek (Alexander et al., 2009).

Az egyre gyakrabban intratimpanális úton alkalmazott szteroidok akár önmagukban, akár szisztémás adagolás mellett kiegészítő kezelésként, akár salvage terápiaként adagolva (a kezdeti, szisztémásan kezdett szteroid kezeléssel szemben mutatott hatástalanság esetén) nagyobb arányban biztosítanak hallásjavulást hirtelen hallásvesztés esetén a placebo csoportokkal, ill. a szisztémásan adagolt szteroidokkal kezelt betegekkel szemben. (Battaglia et al. 2008, Filipo et al. 2013).

Tekintettel a lokális alkalmazásra, szisztémás mellékhatások jelentősen kisebb valószínűséggel lépnek fel. Ennek köszönhető, hogy alkalmazásuk érdemi alternatívát jelenthet pl. diabéteszes betegek kezelésénél (Han et al., 2009).

2.1.3. Egyéb gyógyszeres kezelések

A hirtelen halláscsökkenések sokszínű etiológiai hátteréből kiindulva nagy számban kezdődtek terápiás próbálkozások a tünetek csökkentésére. Ilyenek a virális hátteret feltételező antivirális készítmények, a cochleáris ischaemiát feltételező karbogén (összetétel: 30 % CO_2 - 70 % O_2), a fokozott alvadáskészség miatt kipróbált alvadásgátlók, a vér megnövekedett viszkozitását feltételező reológiai készítmények, az emelkedett fibrinogén szintek miatt alkalmazott defibrogenizáció,

a vér alakos elemeinek fokozott aggregációját feltételező aggregáció gátlók, ill. az érszűkületet feltételező vazoaktív anyagok.

Fenti hatóanyagokkal kapcsolatosan erősen megoszlanak a vizsgálati eredmények. Egy részük igazolja, más részük cáfolja a hatóanyagok hatásosságát (Fish et al., 1984, Suzuki et al., 2003, Garcia et al. 2006, Psillas et al., 2008, Agarwal és Pothier, 2009, Labus et al., 2010, Sha et al., 2012, Yildrim et al., 2013).

Részben a vizsgált hatóanyagok hatástalansága, ill. bizonytalan hatékonysága, részben a vizsgálatok nem megfelelő minősége miatt a korábban már hivatkozott Amerikai Fül-orr-gégészeti és Fej-, Nyaksebészeti Akadémia Alapítvány (American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery Foundation) érvényben lévő, 2012-es szakmai irányelve nem javasolja a különböző antivirális, trombolitikus, értágító, vazoaktív anyagok és antioxidánsok alkalmazását hirtelen halláscsökkenésben szenvedő betegeknél (Stachler et al., 2012).

2.1.4. Hiperbárikus oxigénterápia

A hiperbárikus oxigén terápia (HBOT) bizonyos országokban egy gyakran alkalmazott, általában kiegészítő kezelési eljárás hirtelen kialakult szenzorineurális halláscsökkenések esetén, amely során a betegeket egy speciális túlnyomásos kamrába helyezik, ahol lehetőség van különböző, a normál légköri, 1 atm. nyomásnál nagyobb értékű, akár 100%-os oxigén tartós belélegeztetésére. Ennek következtében elérhető az intracochleáris szövetek magasabb oxigén szaturációja, ami az elgondolások szerint a megemelkedő vér oxigenizáltsági szinteken keresztül elősegítheti az esetlegesen károsodott szőrsejtek és a hallóneuronok túlélését.

A magas nyomás miatt a mellékhatásai között elsősorban a barotrauma különböző formái említendők.

Első sikeres alkalmazására hirtelen halláscsökkent betegek esetében az 1960-as évek végén Németországban és Franciaországban került sor.

Az aktuális vizsgálatok szerint szteroid kezelés mellett kiegészítőként alkalmazható. A javasolt kezelések időtartama alkalmanként 1-2 óra, 10-20x ismételve.

A hirtelen halláscsökkenések esetén különösen akkor várható szignifikáns hatás, ha minél előbb sikerül megkezdeni a kezelést a tünetek kialakulásához képest és minél jelentősebb volt a kezdeti hallásvesztés mértéke. Az eredmények messzemenőkig nem egybehangzóak, számos vizsgálat nem tudott kimutatni semmilyen kedvező hatást a HBOT nélküli kezelési csoportokhoz képest. Ennek következtében ezt a rendkívül költséges, sok helyen nehezen elérhető kezelési metódust (600-700$/kezelés) csak különös megfontolást követően javasolt alkalmazni. (Ohno et al., 2010., Körpinar et al., 2011, Stachler et al., 2012, van der Veen EL et al., 2014).
A SNHL jelenlegi, magyarországi kezelési gyakorlata részét nem képezi a HBOT alkalmazása. Magyarországon néhány helyen elérhető a HBOT kezelés. A kezelő helyek honlapjain elérhető tájékoztatás alapján elsősorban dekompressziós betegség, elhúzódó, elégtelen sebgyógyulás, anaerob kórokozók által előidézett, súlyos szövődményekkel fenyegető kórképek, ill. STROKE esetén javasolják alkalmazását.

A számtalan terápiás próbálkozás a betegeknél bizonytalanságérzést alakíthat ki és jelentősen megemeli a kezeléssel kapcsolatosan felmerülő költségeket.
Sikertelen gyógyszeres kezelés esetén számos esetben szükség lehet pszichoterápia alkalmazására is, különösen esetleges tinnitus együttes fennállása esetén.
A kezelések ellenére fennmaradó, szociális küszöböt elérő, ill. azt meghaladó halláscsökkenések esetén jelenleg kizárólag a költséges hallásjavító eszközök jelenthetnek megoldást. A hallókészülékek fejlődésével (legyen az külső, vagy implantálható) az elért életminőség jelentősen javítható, ám az ezzel járó költségeket és esetleges kellemetlenségeket nem mindenki tudja/akarja vállalni.
A mindennapi kommunikációból való kiesés magával hozza a társadalomtól való egyre komolyabb elzárkózást.
Egy hatékony, a különböző eredetű halláscsökkenések mértékét esetlegesen csökkentő, a hallásromlás kialakulásának késleltetését elősegítő gyógyszeres kezelésnek mind társadalmilag, mind közgazdaságilag nagyon jelentős hatása lehetne.
Az érintett emberek életminőségének javítása révén csökkenne a kiszolgáltatottságuk, aktív részesei maradhatnának a társadalomnak és kevésbé szorulnának a környezetük segítségére.

2.2. Rasagilin

2.2.1. A Monoamin-oxidázokról (MAO) általában

A monoamin oxidázok a szervezetben számos helyen előforduló enzimek (különösen a májban, a vesében, a gyomorban, a bélfalban és az agyban találhatók nagyobb mennyiségben), amelyek a monoamin neurotranszmitterek lebontását végzik. Két fajtáját különböztetjük meg, a MAO-A és a MAO-B izoenzimeket.
A MAO-A enzim döntően a szerotonin, melatonin, adrenalin és noradrenalin lebontását végzi, míg a MAO-B enzim elsősorban a feniletilamin lebontásáért felelős. Mindkét enzimforma részt vesz a dopamin lebontásának folyamatában.
Az enzimek elégtelen működésének, illetve mesterséges gátlásának következményeként felszaporodnak a szubsztrátjaik, így azok hatása fokozódik. Ezt a hatást használjuk ki többek között a Parkinson-kór kezelésében, amikor a szelektíven a MAO-B enzimet gátló gyógyszereket (pl. selegilin, rasagilin) alkalmazunk a dopamin-hiányon alapuló betegség terápiájában (Gyires és Fürst, 2011).

2.2.2. Farmakológia, farmakokinetika, gyógyszerbiztonság

A rasagilin (N-propargyl-1R(+)-aminoindan) a klinikai gyakorlatban a Parkinson betegség kezelésére alkalmazott, szelektíven a monoamin-oxidázok B típusát irreverzibilisen gátló, második generációs propargylamin származék (Finberg, 2010).

A rasagilin a Parkinson-kórban alkalmazott első szelektív MAO-B inhibitor selegilin (Deprenil) analógja, azonban alapvetően különbözik a metabolizációjuk. Míg a selegilin, többek között amfetaminra és metamfetaminra bomlik le, a rasagilin lebomlása során aminoindan keletkezik, aminek következtében nem jelentkeznek az amfetaminra jellemző szimpatomimetikus mellékhatások.
Az R-izoforma rendelkezik aktív MAO-gátló hatásokkal, az S-izoforma hatáserőssége ebből a szempontból három nagyságrenddel kisebb.

A klinikumban alkalmazott formája a rasagilin mesylát, amely a számos megvizsgált szerkezeti analóg közül a legkedvezőbb farmakológiai, farmakokinetikai és stabilitási tulajdonságokkal rendelkezik.
A rasagilin MAO-B gátló hatása nagyjából 2 nagyságrenddel erősebb a MAO-A enzimet blokkoló hatásánál (Youdim et al. 2001).
A selegilin és rasagilin hatáserősségét összehasonlítva, a humán szöveteken mért MAO-A-t, ill. MAO-B-t gátló hatásaikban érdemi különbséget nem találtak. In vivo, patkányokon elvégzett vizsgálatok alapján a rasagilin 3-15x bizonyult erősebb MAO-B gátlónak a selegilinnel szemben (Youdim et al. 2001).

Különböző per os dózisokkal ellenőrizték a rasagilin biztonságosságát 1 mg és 20 mg között, huzamosabb ideig alkalmazott, napi egyszeri adagolás mellett. Minden vizsgált dózist jól toleráltak a betegek. Valamennyi alkalmazott dózissal sikerült elérni a maximális MAO-B gátlást, a magasabb adagok mellett korábban alakult ki a teljes hatás (Thebault et al. 2004).

A farmakokinetikai vizsgálatok alapján a rasagilin gyorsan felszívódik a gyomor-bél rendszerből és könnyedén átjut a vér-agy gáton (Gotz et al. 1998, Youdim et al. 2001). Per os adagolás mellett a maximális vérkoncentrációt 30-40 perc elteltével éri el (Stern et al. 2004).

A rasagilin metabolizmusa a májban történik, CYP450 1A2 izoenzim hatására egy dealkilálási lépéssel 1-aminoindan képződik, ami nem rendelkezik sem vazoaktív, sem MAO-bénító hatással. Bizonyos CYP 450 gátló gyógyszerek, úgymint a cimetidin, a ciprofloxacin, vagy a fluvoxamin alkalmazása során jelentősen megnövekedhet, míg egyéb, a CYP 450 1A2-t stimuláló gyógyszerek hatására, mint az omeprazol, jelentősen csökkenhet a rasagilin szérumszintje

, ezért az alkalmazott dózisok módosítására lehet szükség ezen gyógyszerek együttes adagolása mellett (Chen and Swope 2005).

2.2.3. Neuroprotektív hatás

Túl azon, hogy a rasagilin szelektíven gátolja a DA metabolizmusában szerepet játszó MAO-B-t, rendelkezik neuroprotektív hatással is. (Tabakman et al., 2004; Siderowf and Stern, 2006). A rasagilin sejtvédő hatásában részben a MAO-B

blokkolása, ám részben ettől teljesen független folyamatok is szerepet játszhatnak; a molekula N-propargyl lánca tűnik felelősnek. Az MPTP-ből (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) a MAO-B enzim hatására MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) képződik, ami egy ismert neurotoxin. Ennek megfelelően a rasagilin ezen metabolikus folyamat gátlásával neuroprotektív hatással rendelkezik (Heikkila et al., 1985).

A rasagilin hatékony neuroprotektív tulajdonságait alátámasztó adat, hogy a rasagilin S-enantiomerje (TV1022), ami 1000x kevésbé hatásos MAO-B blokkoló, mint a rasagilin, azzal azonos neuroprotektív hatással bír, ráadásul ezen hatás eléréséhez a MAO-B gátló hatásnál alacsonyabb koncentrációk is elegendőek. (Youdim et al., 1999, 2001, Maruyama and Naoi 1999, Maruyama et al., 2000).

Kimutatták, hogy a rasagilin védelmet nyújt a glutamát indukálta excitotoxicitás eseteiben is, mely védőmechanizmus pontos lépései jelenleg még nem ismertek. Feltételezések szerint egyéb folyamatok befolyásolása mellett (pl. ROS-képzés, Ca^{2+}-háztartás befolyásolása) a metabotróp glutamát-1 receptor antagonistáival mutatott szerkezeti hasonlóság is szerepelhet a háttérben (Pellegrini-Gianpietro et al., 1985).

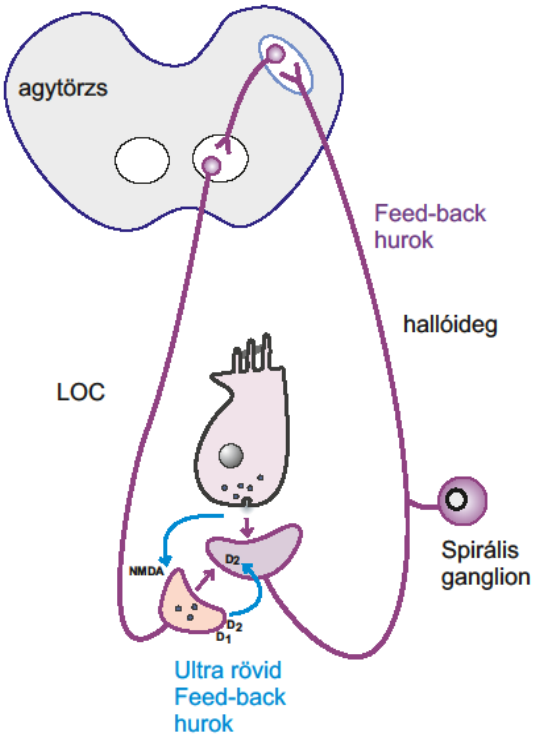
Védő hatását igazolták a neurondegenerációval szemben is (Huang et al., 1999; Speiser et al., 1999; Youdim et al., 2006). Antioxidáns enzimek, mint a szuperoxid dizmutáz (SOD) és kataláz, expressziójának fokozása révén protektív hatással bír az oxidatív károsodással szemben (Carillo et al., 2000; Maruyama et al., 2002). Védelmet nyújt az apoptózissal szemben proapoptotikus enzimek (pl. kaszpáz 3 és a GAPDH) aktivitálódásának gátlása, a citokróm c protein blokkolása, ill. a Bcl-2 család proapoptotikus tagjainak (Bad, Bax) aktivitás-csökkentése, valamint az antiapoptotikus tagok (pl. Bcl-xL) serkentése révén (Weinreb et al., 2004; Maruyama et al. 2001a, 2001b).

2.3. A laterális olivocochleáris (LOC) efferensekből felszabaduló DA cochleoprotektív szerepe

Kimutatták, hogy a zajkárosodás, presbyacusis, cochleáris ischaemia, vagy aminoglikozid okozta ototoxicitás esetén a belső szőrsejtekből (IHC) felszabaduló

nagy mennyiségű glutamát (Glu) a primer hallóideg neuronjainak excitotoxikus károsodását okozza (Duan et al., 2000; Ruel et al., 2007; Tabuchi et al., 2010; Bernarding et al., 2013).

A LOC efferensek, az elsődleges hallóneuronok perifériás terminálisain képzett axodendritikus szinapszisokon keresztül az elsődleges hallóneuron - nucleus cochleáris – oliva superior lateralis – cochlea short loop feed-back kör effektor részét alkotják és a DA felszabadításán keresztül gátolják a hallóneuronok túlaktiválódását, azaz védelmet nyújtanak azok excitotoxikus károsodásával szemben (2. ábra). A DA gátolja a Glu posztszinaptikus hatását és védi az IHC-afferens idegi szinapszist (Gáborján et al., 1999; Halmos et al., 2005, 2008; Ruel et al., 2007; Lendvai et al., 2011).



2. ábra: Dopaminerg feed-back hurkok a cochleában. (forrás: : Lendvai B, Halmos GB, **Polony, G.**, Kapocsi J, Horvath T, Aller M, Vizi ES, Zelles T, Neurochem Int 59:150–158, 2011.)
A cochleáris sejteket érő különböző károsító hatásokkal szembeni védő feed-back mechanizmusokról készített sematikus ábra. Az ultra rövid feed-back hurok kizárólag a cochleára korlátozódik, míg a hosszabb feed-back kör megfelelő működéséhez feltétel az ép LOC és hallóideg. A két feed-back mechanizmusban közös, hogy a DA-t mobilizálják a cochleában.

A D2/D3 dopaminreceptor-antagonista piribedil intracochleáris alkalmazása csökkentette a zajkárosodás és az ischaemia által kiváltott kóros elektrofiziológiai és strukturális változások mértékét (Pujol et al., 1993; d'Aldin et al., 1995a, 1995b; Gil-Loyzaga, 1995), és a D1/D2 receptor agonisták kimutatottan gátolták a primer afferens neuronok NMDA és AMPA által kiváltott elektromos aktivitást (Oestreicher et al., 1997).

Bár a DA-erg rendszeren ható szereket eddig nem tesztelték szisztematikusan, elméletileg minden hatóanyag, ami stimulálni tudja ezt a rendszert, preventív vagy kuratív potenciállal rendelkezhet percepciós hallászcsökkenések esetén (Gáborján et al., 1999; Halmos et al., 2005; Lendvai et al., 2011).

Kutatócsoportunk korábbi kísérleteivel számos ponton igazolta a cochlea dopaminerg rendszerének befolyásolhatóságát.

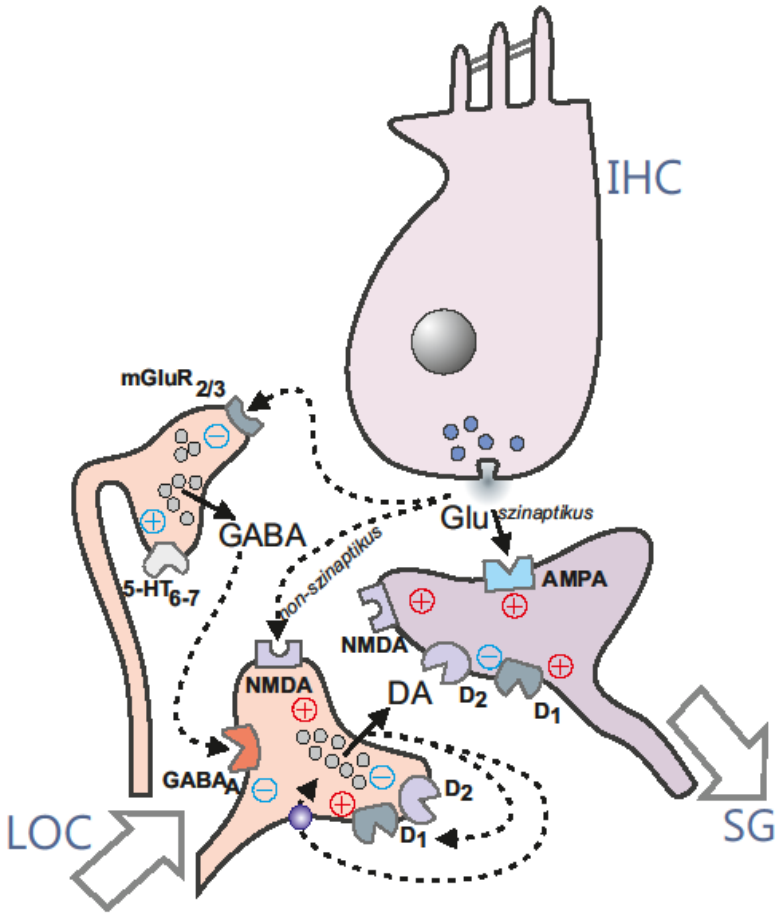
Elsőként igazoltuk a DA neurotranszmitter szerepét neurokémiai módszerrel tengerimalac hallószervben a LOC efferensek és a primer hallóneuron között (Gáborján et al., 1999).

Felvetettük a neomycin ototoxicitásának egyik lehetséges mechanizmusát, miszerint feltehetőleg a VGCC-k gátlásán keresztül megakadályozza a protektív DA felszabadulását (Gáborján et al., 2001).

Megállapítottuk, hogy a cochlea dopaminerg protektív rendszerének modulálásában fontos szerepet játszanak a II-es típusú metabotróp glutamát receptorok (mGluR), melyek aktiválódása a fokozott DA felszabadulás által hatékony védelmet nyújt a túlzott mértékű glutamát felszabadulás következtében kialakult excitotoxicitással szemben (Doleviczényi et al., 2005).

Igazoltuk továbbá a serotonin receptorok (5-HT 6/7) fontos befolyásoló szerepét. Gátlásuk, GABA-erg diszinhibición keresztül, fokozza a DA felszabadulást a LOC efferens végkészülékekből (Doleviczényi et al., 2008).

Rámutattunk arra, hogy az NMDA receptorok jelentős szerepet játszanak az ingerület által kiváltott DA felszabadulásban a cochleán belül (Halmos et al., 2008).



3. ábra: A belső szőrsejt – afferens dendrit – laterális olivo cochleáris efferens végkészülék komplex kémiai anatómiája a cochleán belül. (forrás: Lendvai B, Halmos GB, **Polony, G.**, Kapocsi J, Horvath T, Aller M, Vizi ES, Zelles T, Neurochem Int 59:150–158, 2011.)
A belső szőrsejt (IHC) - afferens dendrit (SG – spirális ganglion) – laterális olivo cochleáris efferens (LOC) anatómiai triász neurokémiai kölcsönhatásai. Az LOC-ból történő acetilkolin és neuropeptidek felszabadulása nem szerepel az ábrán. A szinaptikus jelátvitel (folytonos nyíl) és a nem-szinaptikus információs csatornák (szaggatott nyíl) fontos szerepet játszanak a triászon belüli információáramlás közvetítésében.

A rasagilin, mint a központi idegrendszeri dopaminerg neurotranszmisszió fokozója (Weinreb et al., 2010), elősegítheti a laterális olivo cochlearis efferensekből történő DA felszabadulást (Pujol et al., 1993; Pujol, 1994; Lendvai et al., 2011; Maison et al., 2013).

Úgy gondoltuk, a rasagilin neuroprotektív, antioxidáns és antiapoptotikus hatása, együtt az endogén védő rendszer (LOC efferensek) aktivitását fokozó

hatásával hatékony védelmet biztosíthat a SNHL különböző formáival szemben. Kísérleteinket ezen lehetőség feltérképezése érdekében végeztük., így megalapozottnak láttuk kipróbálni a rasagilin hatékonyságát a percepciós hallásvesztés különböző formáiban.

2.4. Aminoglikozid ototoxicitás és alkalmazása egy SNHL modellben

2.4.1. Az aminoglikozid antibiotikumok

Az aminoglikozid antibiotikumok alkalmazása a streptomycin 1944-es feltalálása óta folyamatos. A széles hatásspektrumuk és olcsó előállítási költségeik miatt korábban rendkívül széles körben elterjedt antibiotikumoknak számítottak világszerte. A penicillin származékokkal szemben nagyon hatásosak a Gram negatív, aerob baktériumok (pl. Enterobacter és Pseudomonas törzsek, Klebsiellák, vagy az E. coli) ellen, ráadásul számos más antimikróbás hatóanyaggal szemben baktericid (baktériumokat elpusztító), nem pedig bakteriosztatikus (a baktériumok szaporodását gátló) hatásúak. Kedvező tulajdonságuk továbbá a hipoallergenitásuk.

Tekintettel a gyomor-bél rendszerből történő gyenge felszívódásukra, leggyakrabban szisztémás adagolásra szorulunk. A legmagasabb szérum plazmaszintet 30-90 perccel a beadását követően érik el, fél életidejük 2-6 óra között van. Antibakteriális hatásuk koncentrációfüggő. A bőrfelszínt érintő bizonyos fertőzések esetén (pl. külső hallójárat gyulladás) lokális alkalmazás is szóba jöhet. A szervezetből döntően a vesén keresztül ürülnek, az eliminációt döntően befolyásolja a glomeruláris filtrációs ráta.

A később tárgyalandó súlyos mellékhatásaik miatt a fejlett országokban felhasználásuk jelentősen visszaszorult, a korlátozottabb anyagi lehetőségekkel rendelkező országokban továbbra is széles körben alkalmazzák őket.

Több olyan terület van azonban, ahol az antibakteriális kezelésben továbbra is elengedhetetlenek világszerte. Ilyenek az autoszomális recesszív módon öröklődő cisztikus fibrózisok esetén gyakran, visszatérően jelentkező, Pseudomonas törzsek okozta pneumóniák, súlyos, Gram negatív, aerob baktériumok (pl. rezisztens E. coli) által okozott húgyúti, hasűri fertőzések, endocarditisek, kora- és újszülöttek

szepszisei, valamint az egyre jobban terjedő, multirezisztens tuberkulózisos esetek. Nemzetközileg bevett gyakorlat a koraszülött és veszélyeztetett újszülötteket ellátó perinatális intenzív centrumokban (PIC) az aminoglikozidok rutinszerű alkalmazása súlyos fertőzések prevenciójára. Számos próbálkozás ellenére, az ismételten fellépő súlyos intenzív osztályos fertőző megbetegedések miatt mindezidáig nem sikerült elhagyni, ill. egyéb antibiotikummal helyettesíteni az alkalmazott protokollokban.

Jelenleg az FDA 9 különböző aminoglikozid alkalmazását engedélyezte: gentamicin, tobramycin, amikacin, streptomycin, neomycin, kanamycin, paromomycin, netilmicin és a spectinomycin.

2.4.2. Az aminoglikozid antibiotikumok mellékhatásai

Az ismert mellékhatások közé tartozik a vesét (nefrotoxicitás), a perifériás egyensúlyszervet és a csigát károsító (ototoxicitás), valamint a neuromuszkuláris ingerületátvitelt gátló hatása. A nefro- és ototoxicitását közvetlenül a streptomycin első alkalmazásai kapcsán észlelték (Hinshaw és Feldman, 1945), míg a neuromuszkuláris kapcsolatot érintő mellékhatását később írták le (Brazil és Corrado, 1957).

Amellett, hogy antibakteriális hatásuk koncentrációfüggő, állatkísérletek adataiból következtetve az ismert toxikus hatások előfordulása is fokozódik a tartósan magas koncentráció fennállásának időtartamával, az adagolás gyakoriságával és a kezelés hosszával párhuzamosan (Wu et al., 2001).

A leggyakrabban előforduló mellékhatások közül a nefrotoxicitás az esetek nagy részében reverzibilis károsodást jelent. A vese károsodása elsősorban a proximális tubulusokat érinti, és aminoglikozid kezelések esetén a betegek 5-15%-át érintheti (Streetman, et al., 2001), más szerzők szerint akár a 20%-ot is elérheti (Swan, 1997). Megfelelő kezelés mellett a vesefunkció teljes rendeződése várható (Heller, 1984).

Az aminoglikozidok szérumszintje a normál veseműködés káros befolyásolása következtében megemelkedik, ami tovább fokozza az antibiotikum toxikus mellékhatásait.

Ototoxikus mellékhatására jellemző, hogy irreverzibilis, rendszerint kétoldali, eleinte a magas frekvenciákat érintő szenzorineurális halláskárosodást okoz (cochleotoxicitás), illetve szédüléssel, hányingerrel, hányással járó egyensúlyszervi károsodást (vestibulotoxicitás) idéz elő.

Sokszor a halláskárosodásra utaló első tünetek a kezelés megkezdését követően napokkal, esetleg hetekkel később jelentkeznek, és az antibiotikum adagolásának befejezését követően még tovább progrediálhatnak.

Az egyes aminoglikozid antibiotikumok halláskárosító hatása eltérő: legerősebb toxikus mellékhatás a neomycintől, majd a gentamicintől, kanamycintől és a tobramycintől várható, legkévésbé a netilmicin és amikacin károsít.

Különböznek a csigára és a vesztibuláris rendszerre kifejtett károsító hatásuk mértékében is. Az amikacin, a neomycin és a dihydrostreptomycin elsősorban cochleotoxikus, míg a gentamicin és a streptomycin alapvetően az egyensúlyszervet károsítja (Gyires és Fürst, 2011; Brunton, 2011; Xie et al., 2011). A vestibulotoxikus mellékhatást bizonyos esetekben terápiás céllal is alkalmazzuk. Nehezen uralható Ménière-betegség eseteiben szoros audiológiai kontroll mellett célzottan károsíthatjuk intratimpanális adagolás mellett a perifériás egyensúlyszervet a szédüléses panaszok csökkentése érdekében.

Krónikusan visszatérő fertőzések, úgymint a cisztikus fibrózis (CF) eseteiben alkalmazott tartós kezelési időtartam esetén a betegek mintegy 20%-nál volt észlelhető klinikailag releváns belsőfül károsodás küszöbaudiometriai vizsgálatokkal (Fee, 1980; Moore et al., 1984; Lerner et al., 1986), de részletes, magas frekvenciákat is tesztelő DPOAE hallásvizsgálatokkal akár 50-75%-ot is elérhette a detektálható ototoxicitás mértéke (Fausti et al., 1992, Md Daud et al., 2014, Al-Malky et al., 2014).

Tartós aminoglikozid expozíció mellett - amire leginkább tuberkulózisos (TBC) esetekben lehet szükség - minden betegnél mérhetővé vált az ototoxicitás valamilyen mértéke (Duggal és Sarkar, 2007).

Várandósság alatt fellépő húgyuti fertőzések esetén a gesztáció második felében alkalmazott, viszonylag rövid antibiotikus kezelés mellett nem lépett fel az újszülöttnél belsőfül károsodás (Kirkwood et al., 2007).

Bizonyos genetikai prediszpozíciók fokozhatják az aminoglikozid kezelések esetén jelentkező ototoxikus mellékhatások előfordulását. Legismertebb közülük a mitochondriális DNS A1555G pontmutációja, ami felvetheti az esetleges genetikai szűrés lehetőségét az aminoglikozidok okozta ototoxicitás elkerülése érdekében antibiotikus terápia megkezdése előtt (Prezant, et al., 1993).

Az ototoxicitás során károsodott belsőfülek mikroszkópos vizsgálata alapján egyértelmű, hogy elsősorban a külső szőrsejtek, később, az idő és a kezelés előrehaladtával a belső szőrsejtek, ill. a belső szőrsejt ribbon szinapszisai, valamint a hallóideg neuronjai károsodnak aminoglikozid kezelés következtében. A szőrsejtkárosodás eleinte a cochlea bazális kanyarulatánál kezdődik, majd halad fokozatosan a csiga csúcsa felé. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a klinikai tapasztalattal, hogy a halláskárosodás minden esetben a magas frekvenciákon kezdődik, majd a későbbiekben érintheti a mélyebb hangmagasságokat is (Ylikoski et al., 1974; Huizing és de Groot, 1987; Dodson, 1997; Duan et al., 2000; Maruyama et al., 2008; Fransson et al., 2010; Liu et al., 2013).

2.4.3. Állatkísérleti modell aminoglikozid okozta halláskárosodás vizsgálatára

Korábban számos állatfajon vizsgálták az aminoglikozidok okozta halláskárosodást, elsősorban tengerimalacokon, ritkábban egyéb rágcsálókon.
Egereken hosszabb ideig nem sikerült érdemben kísérleteket végezni, mivel úgy tűnt, a felnőtt állatok rezisztensek az aminoglikozidok mellékhatásaira. A Wu és munkatársai által kialakított állatmodell lehetővé tette a megfelelő vizsgálatok elvégzését (Wu et al., 2001). Ezen a modellen végzett vizsgálatok igazolták az embereken szerzett tapasztalatokat, miszerint a sejtkárosodás a külső szőrsejtektől halad a belső szőrsejtek felé, illetve a csiga bazális kanyarulatától a csúcsáig.
Agytörzsi kiváltott potenciál vizsgálatok (BERA) segítségével végzett mérések alapján az állatoknál fellépő halláskárosodás a magasabb frekvenciáknál kezdődik, majd progrediál a mélyebb hangok felé.
Magas koncentrációjú aminoglikozid kezelés mellett mind a támasztósejtek, mind a hallóideg degenerációja megfigyelhető (Schacht et al., 2012).

Állatkísérletek alapján, az egyensúlyszervben elsősorban az I-es típusú, majd a II-es típusú szőrsejtek sérülnek, és csak ezeket követik a különböző támasztósejtek károsodása (Wersäll et al., 1969).
A rendelkezésre álló bizonyítékok alapján a szenzoros sejtek károsodása nem indirekt károsodás következménye, hanem direkt gyógyszerhatás eredménye (Schacht et al., 2012).

2.4.4. A kialakuló ototoxicitás lehetséges mechanizmusai

A károsodás hátterében található lehetséges mechanizmusként felmerül, hogy a különböző sejtek különböző szintű károsodásának hátterében a sejtekbe történő gyógyszerfelvétel változó mértéke keresendő. Vizsgálatok támasztják alá, hogy a belsőfül csaknem minden sejtje azonos mértékben képes felvenni az aminoglikozid antibiotikumokat, beleértve azokat is, amiket nem károsítanak (de Groot et al., 1990; Imamura és Adams 2003), és nem található direkt összefüggés a hatóanyag sejtbe történő felvétele és a sejthalál kialakulása között. Az aminoglikozid antibiotikumok percekkel a véráramba jutást követően belépnek a belsőfülbe, ahol 30-180 percen belül stabil koncentrációt érnek el (Tran Ba Huy et al., 1986). A belsőfülben mért koncentráció mintegy 10%-a a plazmában mért legmagasabb szinteknek, de a belsőfülből történő elimináció jelentősen elhúzódhat. Akár 11 hónappal a kezelés befejeztét követően is kimutatható volt nyomokban a gentamicin (Dulon et al., 1993).

Az aminoglikozidok okozta sejtkárosodás folyamatában mind az apoptózis, mind a nekrózis szerepet játszik (Nakagawa et al., 1998).

A patomechanizmusban a normál redox állapot zavarainak, fokozott ROS képződésnek és a hallóideg neuronok excitotoxikus károsodásának alapvető szerepét számos tanulmány igazolta (Basile et al., 1996; Sha and Schacht, 1999; Duan et al., 2000; Poirrier et al., 2010; Huth et al., 2011). A károsodás szempontjából érzékenyebb sejtekben magasabb ROS koncentráció mérhető. (Choung et al., 2009). Az aminoglikozidok által kiváltott hallásvesztés folyamatában szerepet játszó oxidatív stressz, ROS képződés és excitotoxikus neuron-károsodás kiemelt

jelentősége tovább erősítette azt az elképzelésünket, hogy érdemes megvizsgálni a rasagilin hatását aminoglikozid-okozta hallásvesztés modellben.

2.4.5. Az aminoglikozidok okozta károsodások mérséklése, esetleges megelőzése

A terápiás lehetőségekkel kapcsolatos jelen kutatások leginkább a ROS képződéssel kapcsolatos protektív mechanizmusokat célozzák.

A ROS képződés okozta ototoxicitás patomechanizmusának elképzeléseivel összhangban, mind *in vitro*, mind *in vivo* vizsgálatok az antioxidáns hatású vegyületek együttes alkalmazásának protektív hatását igazolták (Rybak és Whitworth, 2005).

Mind a különböző vas-kelátor hatóanyagok, mint a desferoxamin és a dihidroxibenzoát (Song et al., 1996; 1998), mind számos antioxidáns, mint a liponsav, α-tokoferol, ebselen, D-methionin és a szalicilátok (Rybak és Whitworth, 2005) hatásosnak bizonyultak.

Az állatkísérletekben hatásosnak bizonyult vegyületek alkalmazása a humán medicinában számos kérdést és problémát vet fel.

A vas-kelátorok, ill. bizonyos antioxidánsok több olyan mellékhatással rendelkeznek, amik bizonyos betegcsoportoknál kizárják az alkalmazásukat (szalicilátok nem, vagy csak komoly mérlegelés esetén adhatók gasztrointesztinális fekélyes betegek esetén, a desferoxamin önmagában is rendelkezik neuro- és ototoxicitással) (Ryals et al., 1997). A különböző, sejthalálhoz vezető mechanizmusok blokkolása általában csak a folyamat lelassulását eredményezi, tekintettel arra, hogy számos folyamat vezethet a sejtek apoptózisához, ill. nekrózisához (Jiang et al., 2006).

Különösen ígéretesek lehetnek azok a vegyületek, amiket egyéb területen már engedélyeztek a humán gyógyászatban.

A fentiekben tárgyaltak alapján a rasagilin - többes támadáspontján keresztül – alkalmas szer lehet a SNHL-ek hátterében feltételezett károsító hatások kivédésére, ill. ezen folyamatok esetleges blokkolására.

2.4.6. Egyéb ototoxikus hatóanyagok

Számos egyéb vegyület mellékhatás-spektrumában szerepel az oto-, ill. vestibulotoxicitás. Számtalanszor nem, vagy csak későn kerül felismerésre a halláskárosodás, mivel eleinte a hallásvesztés kizárólag a magas frekvenciákat érinti, ami a mindennapi kommunikációban kis jelentőséggel bír.

Gyakoriságuk miatt kiemelkednek a különböző kacs diuretikumok, mint pl. a furoszemid, etakrinsav, vagy a bumetanid, amik önmagukban is rendelkeznek ototoxikus hatással. Az aminoglikozid antibiotikumokkal történő együttes adagolásuk bizonyos esetekben az addicionális toxikus hatás miatt fokozottan súlyos következményekkel járhat (Mathog és Klein, 1969).

Fokozott figyelmet érdemelnek a platina alapú kemoterapeutikumok, ezen csoporton belül is elsősorban a ciszplatin. Alkalmazhatók önállóan, vagy kombinációs kezelés részeként többek között fej-nyaki-, tüdő-, hólyag-, méhnyak-, petefészek-, here-, vagy gasztrointesztinális malignomák esetén (Boulikas és Vougiouka, 2004).

A ciszplatin legsúlyosabb mellékhatásai közé tartozik a nefrotoxicitás. A betegek akár egy harmadánál is észlelhető valamilyen fokú vesekárosodás (Taguchi et al., 2005).

Az aminoglikozid antibiotikumokkal szemben, a ciszplatin esetén szinte kizárólag cochleotoxicitással kell számolnunk, vesztibulotoxicitással nem, viszont bizonyos adatok szerint a ciszplatinnal kezelt betegek akár 90-100%-ban is előfordul halláskárosodás (Benedetti Panici et al., 1993).

A később szintetizált platina alapú szerek, mint a carboplatin és az oxaliplatin alkalmazása mellett jelentősen kisebb arányban kell számolnunk ototoxikus mellékhatásokkal. Alternatív szerként való alkalmazásukat jelentősen behatárolja azonban, hogy bizonyos daganatokkal szemben a ciszplatin sokszorosan hatásosabb lehet, mint a carboplatin, vagy az oxiloplatin (Boulikas és Vougiouka, 2004).

3. Célkitűzések

A halláskárosodás a leggyakoribb emberi szenzoros deficit. Szenzorineurális formáinak kezelésére azonban, ennek ellenére nem rendelkezünk hatékony, specifikus gyógyszerrel.

Az eddig sikertelen gyógyszerfejlesztés egyik fontos oka a patomechanizmus és a lehetséges gyógyszercélpontok ismeretének hiánya. Másik fontos ok, nagy valószínűséggel, a sokkomponensű, komplex, hálózatszerű patomechanizmus, amelynek folyamata nem tartóztatható fel a hálózat egy pontjának gátlásával.

Célunk olyan farmakológiai megközelítés, ill. gyógyszermolekula keresése volt, amely több támadásponton hatva hatékonyan mérsékli a szenzorineurális halláskárosodást. Vizsgálni kívántuk a különböző SNHL-ek hátterében egyaránt legfontosabb okként számon tartott excitotoxicitás/oxidatív stressz/kóros ROS szint emelkedés gátlásának otoprotektív hatékonyságát, ill. az endogén védekező mechanizmus (LOC-DA) modulálásának ezirányú kihasználhatóságát.

Ennek érdekében kívántuk megvizsgálni a DA neurotranszmissziót fokozó, ill. antioxidáns és neuroprotektív tulajdonsággal egyaránt rendelkező rasagilin SNHL elleni védő hatását, valamint elemezni a LOC efferensekből történő protektív DA felszabadulás rasagilinnel történő fokozásának lehetőségét és mechanizmusát.

Kísérletes munkám fő célkitűzései a következők voltak:

1.) Egy olyan, egereken alkalmazható objektív audiometriás módszer és aminoglikozid antibiotikum kiváltotta hallásvesztés egérmodelljének magyarországi beállítása, amelynek segítségével rutinszerűen végezhető, feltételezhetően otoprotektív hatással rendelkező molekulák szenzorineurális halláskárosodás elleni védő hatásának vizsgálata.

2.) Annak meghatározása, hogy a rasagilin befolyásolja-e az ép hallást, ill. rendelkezik-e, és ha igen milyen dózisban és frekvenciákon, otoprotektív hatással a SNHL-ek egy aminoglikozid antibiotikum által kiváltott formájában.

3.) A LOC efferensekből felszabaduló DA mérésének beállítása egér preparátumon. Az irodalomban ezt megelőzően csak tengerimalac cochleában mértek DA felszabadulást.

4.) Annak *in vitro* vizsgálata, hogy az otoprotektív hatást mutató rasagilin fokozza-e a LOC efferensek DA felszabadítását egér cochleájában, és ha igen, milyen dózis hatás összefüggéssel ill. mi a feszültségfüggő nátrium- és kalciumcsatornák és a DA visszavétel szerepe az élettani és a rasagilin okozta cochleáris DA felszabadulásban.

4. Módszerek

Az állatkísérleteket az illetékes Élelmiszerlánc-Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Munkahelyi Állatetikai Bizottságának kontrollja mellett végeztük.

4.1. A rasagilin hatás mérése aminoglikozid antibiotikum által kiváltott ototoxicitás modellben in vivo

4.1.1. A kanamycin okozta ototoxicitás modell kísérleti elrendezése és a rasagilin kezelés módja.

Az egértörzs és az aminoglikozid típusának és koncentrációjának kiválasztása az irodalomban fellelhető adatokból indult ki (Wu et al., 2001). Saját előkísérleteink, mind az egértörzset, mind az aminoglikozid antibiotikum típusát és dózisát illetően, megerősítették, hogy a legegyértelműbben és legmegbízhatóbban kiváltható aminoglikozid indukálta hallásvesztés, ami alkalmas az otoprotektív hatás vizsgálatára, BALB/c egereken, 800 mg/kg subcutan (s.c.) dózisban adagolt kanamycinnel érhető el. (Neomycin és gentamicin az egerek súlygyarapodásának megállásával ill. állatpusztulással is járt. Alacsonyabb dózisok, valamint CD1, C57/B1 egerek alkalmazásakor fellépő halláskárosodás mértéket a céljaink szempontjából elégtelennek ítéltük.)

A négy hetes, hím, BALB/c egereket a Charles River cégtől, Németországból szereztük be.

Első lépésként egy kísérletsorozatot végeztünk el, amivel a kanamycin és a rasagilin hatásának a dinamikáját vizsgáltuk (Humli Viktória munkája).

Az egereket a következő négy kísérleti csoport egyikébe osztottuk:

1. kontroll csoport (fiziológiás sóoldat),
2. Kanamycin 800 mg/kg,
3. Rasagilin 3 mg/kg s.c.,
4. Kanamycin 800 mg/kg + rasagilin 3 mg/kg s.c.

A kezelési csoportok egyenként 8 állatot tartalmaztak. (Egy állat a 4. csoportból a BERA vizsgálat alatt, altatás közben elpusztult.)

A Kanamycin szulfátot (USB Corporation, Cleveland, OH) naponta kétszer (reggel 8-9 óra között és délután 6-7 óra között), két héten keresztül, s.c. injektáltuk az állatoknak.

Az első antibiotikum dózist az első BERA vizsgálat napján, annak elvégzését követően, délután 6-7 óra között adtuk. A rasagilin mesylát-ot (3 mg/kg, s.c.; TEVA) naponta egyszer, a reggeli kanamycin dózissal együtt, de külön injekcióban adagoltuk. Ily módon a rasagilin első adagját a kanamycin első adagjának beadását követően 14 órával alkalmaztuk.

A rasagilin kezelést 5 hétig folytattuk.

A Kontroll-csoportba sorolt egereket azonos mennyiségű fiziológiás sóoldattal s.c. injektáltuk.

A kanamycinnel kezelt csoportnál a második hét után a kanamycin injekciókat fiziológiás sóoldatot tartalmazó injekciókkal váltottuk fel az ötödik hét végéig.

A hallásküszöb meghatározását mindkét fülön BERA vizsgálattal végeztük. Minden állatnál meghatároztuk a hallásküszöböt a gyógyszeres kezelés megkezdése előtt az első héten (kiinduló hallásküszöb), 2 héttel a gyógyszeres kezelést követően, majd ezt követően hetente az 5. hét végéig (összesen 5 vizsgálat).

A hallásküszöb változást az adott állat aktuális és a kezelések megkezdése előtt mért hallásküszöb értékének (kiinduló hallásküszöb) különbsége adja meg.

Az első kísérletsorozat eredményeinek időfüggése alapján egy második, 3 hétig tartó kísérletsorozatot indítottunk, aminek során 2 további rasagilin dózist vizsgáltunk meg.

1. Kontroll,
2. Kanamycin, 800 mg/kg,
3. Kanamycin, 800 mg/kg + Rasagilin, 0.5 mg/kg,
4. Kanamycin, 800 mg/kg + Rasagilin, 6 mg/kg.

Ezen kísérleteket nagyobb egyedszám mellett végeztük (n=20, minden kezelési csoportban), amit a korábbi kísérleti eredmények alapján határoztunk meg. A BERA vizsgálatokat ez esetben csak a bal fülön végeztünk. Az altatás közben a Kontroll csoportból kettő, a Kanamycin csoportból egy, a Kanamycin + Rasagilin 6 mg/kg kezelési csoportból szintén két állat pusztult el. A kanamycin dózisa és a kezelési protokoll megegyezett a korábbiakkal.

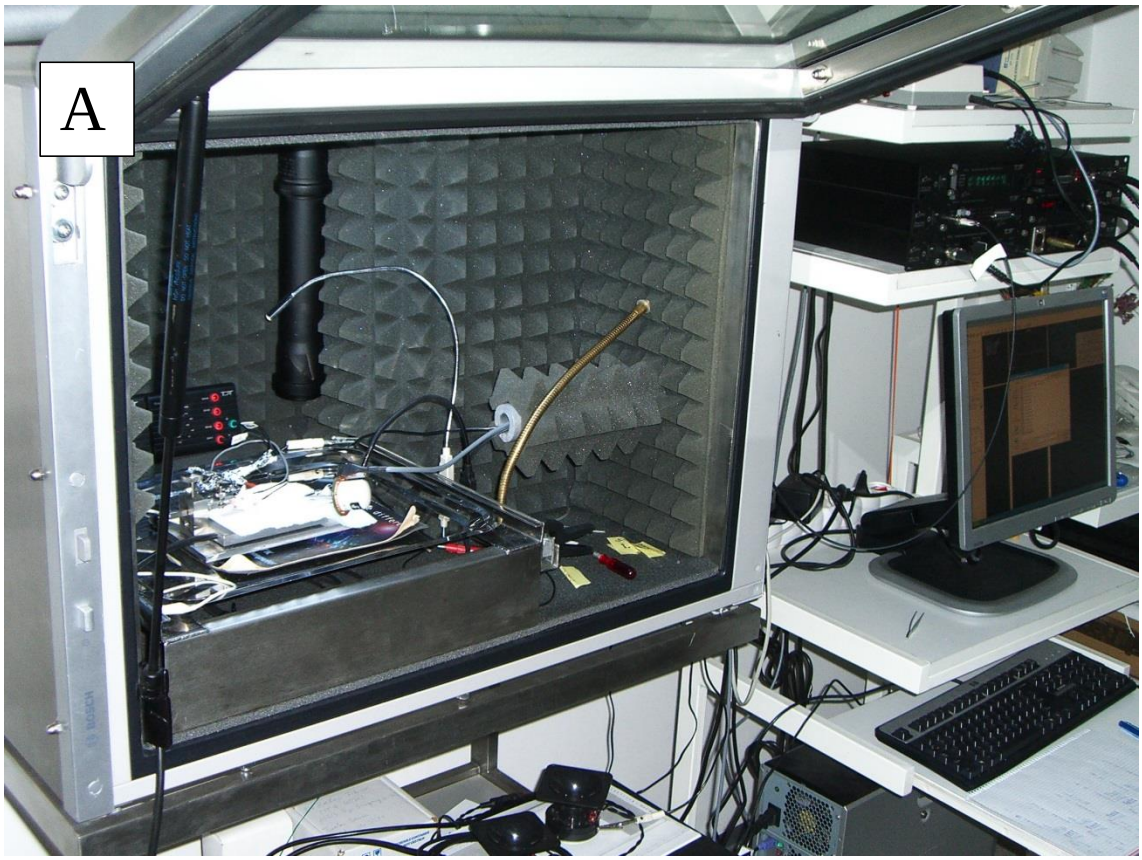
4.1.2. Az agytörzsi kiváltott válasz potenciál (BERA) in vivo mérése

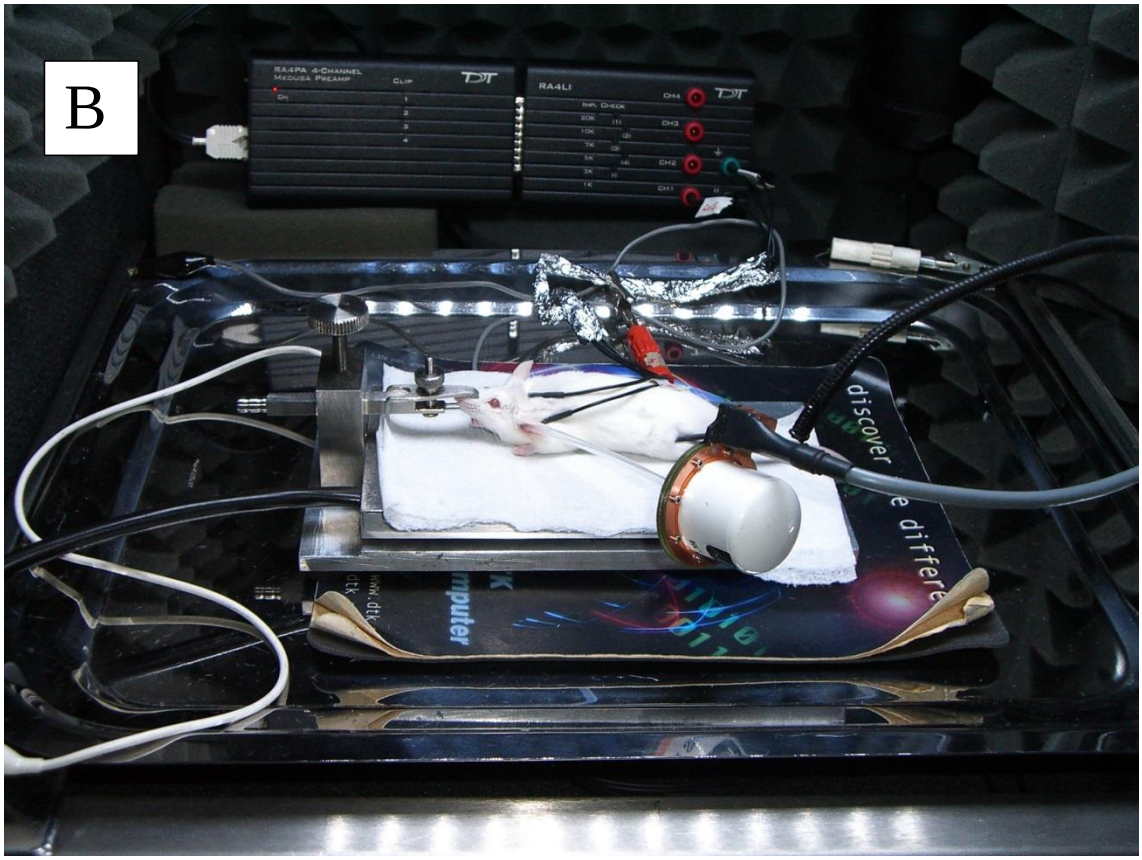
Az egereket intraperitoneálisan (i.p.) adott ketamin (100 mg/kg) és xylazin (10 mg/kg) injekcióval altattuk.

A megfelelő testhőmérsékletüket egy hőmérséklet szabályozott melegítőlappal biztosítottuk.

A hallásküszöböt, a Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL által gyártott BERA készülékkel határoztuk meg (4/A. ábra).

Click (0,4 ms időtartam) és tone burst (3 ms időtartam, 0,2 ms rise/decay) stimulusokat generáltunk (SigGen szoftver csomag) egy zárt akusztikus rendszerben, amelyben az EC1 elektrosztatikus hangszórót egy műanyag csövön keresztül csatlakoztattuk az állatok külső hallójáratába.





4. ábra: BERA vizsgálat altatott egéren.

(A) Elektromos zaj- és hangszigetelt kamrában (Audio Computer Studio Kft., Budapest, Magyarország), a Tucker-Davis Technologies (Alachua, FL) által gyártott BERA készülékkel végeztük a méréseket.

(B) A SigGen szoftver csomag segítségével generált hangimpulzusokat egy EC1 elektrosztatikus hangszóró segítségével műanyag csövön keresztül vezettük az állatok külső hallójáratába (zárt akusztikus rendszer). A kiváltott válasz hullámai subcutan tűelektródákkal vezettük el. A testhőmérsékletet szabályozott hőmérsékletű melegítőlappal biztosítottuk.

A BERA hullámokat subcutan tűelektródákkal vezettük el, amiket a koponyatetőn és a fülkagyló mögött szúrtunk a bőr alá. A föld elektródát a hátsó láb bőre alá helyeztük (4/B. ábra).

A kiváltott válaszokat felerősítettük, és 800 mérést átlagoltunk valós időben. A hangintenzitást 10dB-es lépésenként emeltük 0 dB-ről 80 dB-re click-stimulus üzemmódban.

Ahhoz, hogy különböző frekvenciákon (4, 8, 16, 24 kHz) is megállapíthassuk a hallásküszöböt, a tone burst stimulusok hangintenzitását 10 dB-es lépésenként csökkentettük 90dB-ről indulva.
A hallásküszöböt a legkisebb intenzitású, még felismerhető BERA hullám intenzitás szintjében állapítottuk meg.

4.1.3. Statisztikai analízis

Mindkét vizsgálat küszöbadatait egy lineáris kevert statisztikai modellben elemeztük (figyelembe véve azt, hogy minden állatot minden frekvencián megmértünk, az R statisztikai program "nlme" csomagját használtuk) (Jose Pinheiro, Douglas Bates, Saikat DebRoy, 2013; R Core Team, 2013), amit a kezelések páronkénti elemzése követett (Warnes, 2011). Az első kísérlet sorozatban a bal és jobb fül adatait átlagoltuk. A modell hatásokat együttesen értékeltük az F értékeik alapján. Minden tényezőt és lehetséges kölcsönhatást a $P < 0,05$ minimális szignifikanciaküszöb alapján értékeltünk.
A Tukey-Kramer p-érték korrekciót és konfidencia határokat alkalmaztuk.

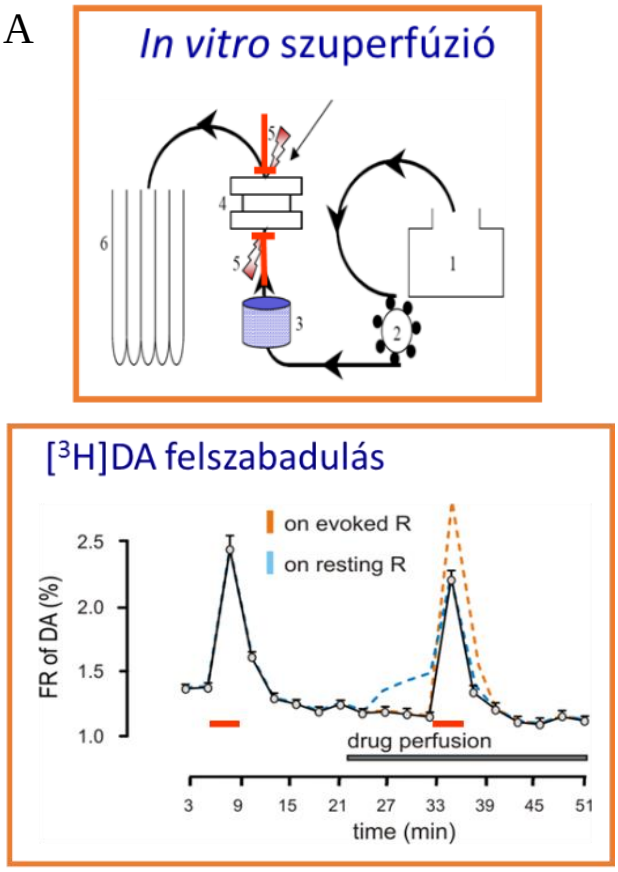
4.2. A LOC efferens végkészülékekből felszabaduló DA in vitro mérése

4.2.1. DA felszabadulás mérése egér cochleában

A kísérleteket 20-35 g testtömegű, CD-1 hím egerek cochleáin végeztük a korábban már leírt módszerünket követve (Gáborján et al., 1999; Halmos et al., 2005, 2008) (5. ábra).

A

B



(Gáborján et al., *Neuroscience*, 1999 90:131–138)

5. ábra: Izolált cochlea preparátumon végzett szuperfúziós DA-mérés módszerének sémás bemutatása.

(A) Az *in vitro* szuperfúzió módszer bemutatása sematikus rajzon. 1. perilympha szerű oldat, 2. folyamatos áramoltatás, 3. 37 °C-os melegítés, 4. a cochlea preparátumokat tartalmazó kamra, 5. elektromos mezőingerlés, 6. a 3 perces frakciók gyűjtése kémcsövekben.

(B) A szuperfúziós DA mérés elvégzését követően a preparátumról készített elektromikroszkópos kép.

(B) A DA frakcionált felszabadulásának (FR) az idő függvényében ábrázolt sematikus görbéje az elektromos mezőingerlések és a drogadás idejének jelölésével.

Az egerek fejét izoflurán bódítás alatt levágtuk, a sziklacsontot kivettük, majd a bulla tympanit megnyitottuk. A cochlea csontos tokját és a stria vascularist sztereomikroszkópos ellenőrzés mellett eltávolítottuk, majd a cochleát a modiolus bázisánál eltörve eltávolítottuk.

A preparátum tartalmazta a ganglion spiralét, az afferens hallórostokat, az efferens kötegek axonjait és axon végződéseit, valamint a belső és a külső szőrsejteket is.

Minden kísérletet egy 37 °C-os, perilympha-szerű oldatban végeztük (Ikeda et al., 1991), ami 150 mM NaCl-ot, 3.5 mM KCl-ot, 1 mM $CaCl_2$-ot, 1 mM $MgCl_2$-ot, 2.75 mM HEPES-t és 2.25 mM Tris-t tartalmazott. A pH-t 7.4-re titráltuk. Az ozmolaritást D-glükózzal állítottuk be és az oldatot folyamatosan 100 % O_2-vel áramoltattuk át.

A cochleákat 0.2 µM [^{3}H]dopaminnal (specifikus aktivitás: 31.0 – 59.3 Ci/mmol; [7,8-^{3}H]DA, Amersham, UK) 35 percen keresztül inkubáltuk, majd áthelyeztük egy mikrotérfogatú plexi kamrába (3 cochlea szervkamránként) ahol a perilympha-szerű oldattal (0,3 ml/min) szuperfundáltuk. Egy órányi előperfúziót követően a kifolyó oldatot 3 perces frakciókban gyűjtöttük (5. ábra).

A minták radioaktivitását, ami a LOC efferens terminálisokból felszabaduló DA-t jelzi, az egyes mintából kivett 500 µl-es frakciók aktivitásának folyadék szcintillációs mérésével határoztuk meg (Packard Tri-Carb 1900TR). A minták 57 percen át tartó gyűjtését követően (19 frakció), a cochleákat 500 µl 10%-os triklórecetsavba helyeztük egy teljes napra, majd ebből 100 µl-t használtunk fel a szövetek radioaktivitásának meghatározására. Megelőzően HPLC mérésekkel kimutatták, hogy a felszabadított radioaktivitás 91-95 %-áért a [^{3}H]DA és ennek metabolitjai, a DOPAC és a HVA felelősek (Gáborján és Vizi, 1999).

A LOC efferensekben akciós potenciált kiváltó elektromos mezőingerlést (30 V, 5 Hz és 0,5 ms impulzusszélesség, 3 perc időtartam) a 3. (S_1) és a 13. (S_2) frakciók alatt alkalmaztuk egy Grass 888 stimulátor segítségével (West Warwick, USA). A platina elektródák a szövetkamra tetején és alján helyezkedtek el. A rasagilint a 8. frakció elejétől (21. perc) a kísérlet végéig adtuk a perfúziós oldathoz.

A $CdCl_2$ és a TTX perfundálását 6 perccel korábban (a 15. perctől) kezdtük. A nomifensin alkalmazását és a hőmérséklet 17 °C-ra csökkentését az előperfúzió 45. percében kezdtük és a kísérlet végéig fenntartottuk.

A DA felszabadulás reverzibilitása és reprodukálhatósága, ill. feszültségfüggő nátrium- (VGSC), és kalciumcsatorna (VGCC) blokkolókkal történő gátolhatósága mellett (az exocitotikus neurotranszmitter felszabadulás bizonyítéka;

lásd Gáborján & Vizi 1999; Gáborján et al. 1999; Halmos et al. 2008), a cochlea preparátumok életképességét közvetlenül a kísérletek előtt és után elvégzett fény- és elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatokkal is igazoltuk (Halmos et al., 2008) (5. ábra).

4.2.2. Az adatok elemzése és statisztikai analízise.

A DA felszabadulást a gyűjtési periódusok alatt lefolyó radioaktivitással jellemeztük, amit az aktuális össz-szöveti radioaktivitás arányában fejeztünk ki (frakcionált felszabadulás, FR).

Az elektromos ingerlés (S_1 és S_2) következtében kialakuló FR emelkedést a görbe alatti területből (AUC) számoltuk: az ingerlés előtti és utáni nyugalmi felszabadulás átlagát kivontuk az elektromos stimulálás ideje alatti teljes felszabadulás mennyiségéből (Halmos et al., 2000, 2005).

Az elektromos ingerléssel kiváltott [^{3}H]DA felszabadulásra gyakorolt gyógyszerhatást az FRS_2/FRS_1 hányadossal jellemeztük, ami a drog jelenlétében ill. hiányában kiváltott válasz arányát mutatja. Az adatokat az átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg. Variancia analízist (ANOVA), és a Tukey's Honest Significant Difference többszörös összehasonlítást használtuk a különböző kezelési csoportok összehasonlítására (R 14.1 program). Alkalmazott szignifikanciaszintek: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ és $***p < 0,001$.

5. Eredmények

5.1. A rasagilin in vivo hatása az aminoglikozid által kiváltott hallásvesztésre

A rasagilin SNHL-re gyakorolt hatását a kanamycin által okozott hallásvesztés modell segítségével vizsgáltuk egereken (Wu et al., 2001). A hallásküszöböket négy különböző frekvencián határoztuk meg (4kHz, 8kHz, 16kHz, 24kHz).

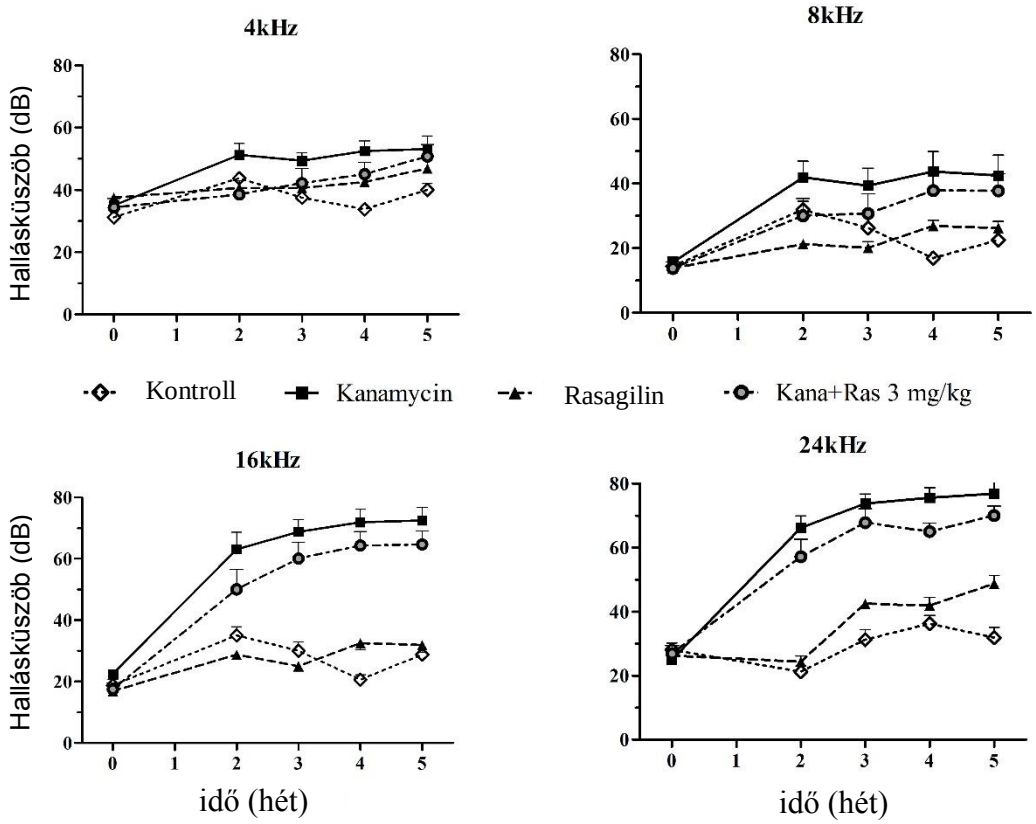
Először egy 5 hetes kísérletet végeztünk, ahol minden vizsgálati csoportba 8 állatot osztottunk (6. ábra; ez a kísérlet Humli Viktória munkája). A két héten át, napi kétszer adagolt Kanamycin (800 mg/kg, s.c.) károsította a BALB/c egerek hallását. A hallásküszöb változás sokkal kifejezettebb volt a magasabb frekvenciákon (16 és 24 kHz; $p < 0,001$), míg alacsonyabb frekvenciákon kisebb mértékű hallásromlást mértünk (8 kHz-en nem is volt statisztikailag szignifikáns a változás, l. 6. ábra).

Három hét elteltével a hallásromlás nem fokozódott tovább (plató fázis; 6. ábra).

A rasagilin alkalmazása egyértelmű tendenciával csökkentette a kanamycin okozta hallásküszöb emelkedés mértékét. Ez egyértelműen leolvasható mind a négy frekvencián, minden mérési időpont esetén, bár az értékek nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsak (6. ábra).

Ezzel szemben a rasagilin adás (3 mg/kg) görbéje mind a négy frekvencián a kontroll csoport (fiziológiás sóoldat) görbéjével hasonló lefutást mutatott, ami egyértelműen jelzi: a rasagilin önmagában nem gyakorol szignifikáns hatást a hallásküszöbre (6. ábra).

A kanamycin okozta hallásvesztés a 3. hétre teljesen kialakult és a rasagilin kanamycin toxicitásra gyakorolt hatása nem változott az 5 hét alatt.

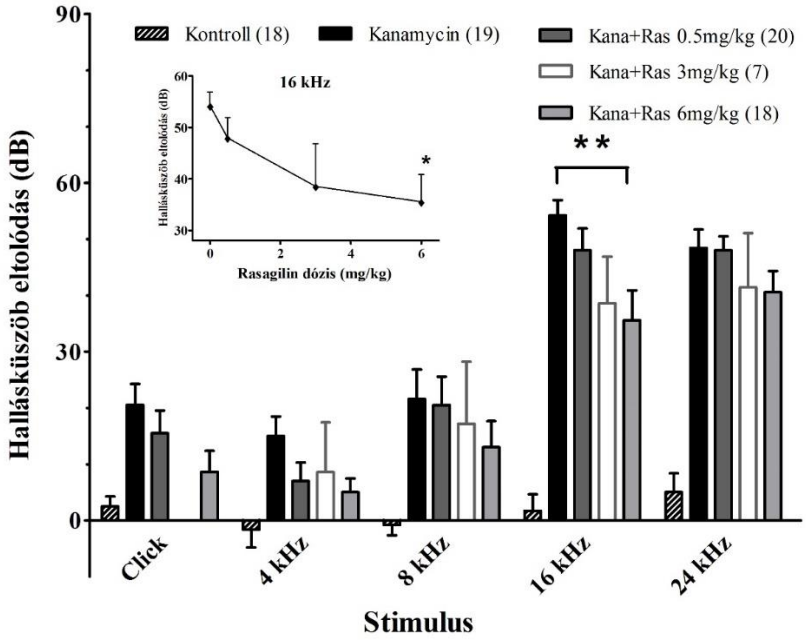


6. ábra: Az *in vivo* rasagilin hatás 5 hetes követése aminoglikozid okozta SNHL egérmodelljében (Humli Viktória munkája alapján)

Kanamycint (800 mg/kg, s.c., naponta kétszer) alkalmaztunk két héten át, ami a hallásküszöb emelkedését eredményezte, különösen a magasabb frekvenciákon (a kontrollhoz hasonlítva; a p értéke 0,017; 0,066; < 0,001 és < 0,001 volt a megfelelő 4, 8, 16 és 24 kHz-es frekvenciákon). A rasagilin kezeléseket (3 mg/kg, s.c., napi egyszer) 14 órával a kanamycin első adagja után indítottuk és 5 héten át folytattuk. Annak ellenére, hogy a rasagilin tendenciózusan mérsékelte a kanamycin indukálta küszöbemelkedést minden vizsgált időpontban és frekvencián, ezek a hatások nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak. A Kontroll csoportban lévő egerek napi kétszer fiziológiás sóoldatot kaptak s.c., 5 héten át. Az önmagában alkalmazott rasagilin hatása nem különbözött a Kontrolltól. A BERA-t BALB/c egerekben, négy különböző frekvencián mértük, amint a Módszerekben leírtuk. Az adatokat átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg; n = 8, kivéve a Kanamycin + rasagilin csoportban. Egy lineáris kevert modellt, majd ezt követően egy páronkénti összehasonlítást használtunk a statisztikai elemzéshez (l. a Módszereket).

Ezért a második kísérletsorozatban a 0,5 és 6 mg/kg dózisú (s.c.) rasagilin hallásküszöb eltolódásra gyakorolt hatását már csak a 3. héten vizsgáltuk. A kanamycin alkalmazása mind click ($p < 0,01$), mind tone burst stimulus (4 kHz, p <

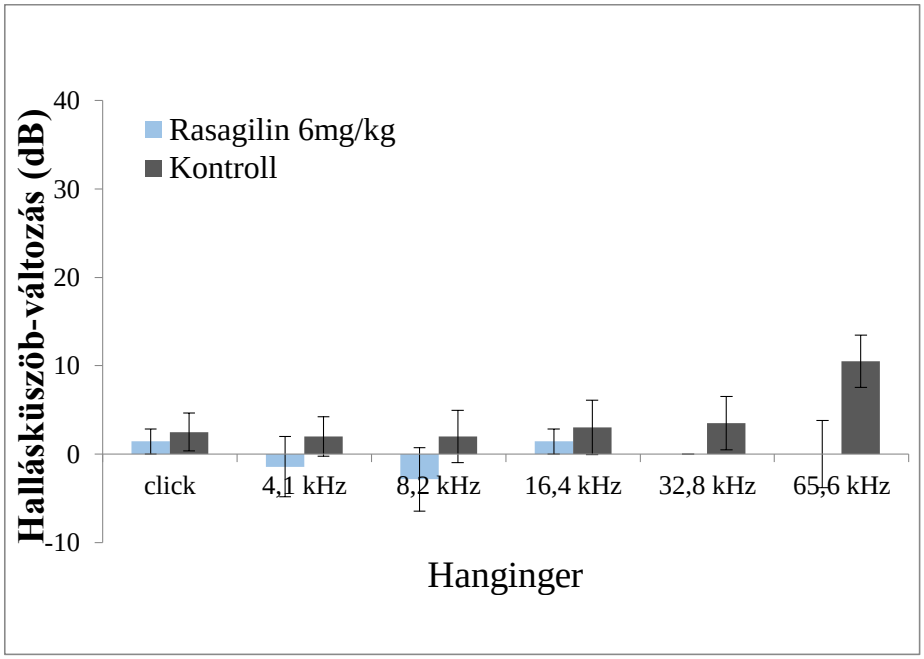
0,05; 8 kHz, p < 0,001; 16 kHz, p < 0,001, 24 kHz, p < 0,001) használata mellett szignifikáns hallásküszöb eltolódást okozott. A hatás erőteljesebb volt a magasabb frekvenciákon (7. ábra). A rasagilin 0,5 mg/kg dózisban 0,5 – 8 dB-lel, ill. 6 mg/kg dózisban 8 – 19 dB-lel csökkentette a kanamycin által kiváltott hallásvesztés mértékét. A rasagilin hatás dózisfüggése még egyértelműbben ábrázolódott, amikor a 3 mg/kg rasagilin hatását is berajzoltuk az ábrába. A legerőteljesebb védő hatás 16 kHz-en jelentkezett (7. ábra).



7. ábra: A rasagilin mérsékelte a kanamycin indukálta hallásvesztést BALB/c egerekben.

A BERA méréseket közvetlenül a gyógyszeradagolás előtt (kiindulási küszöb), ill. 3 héttel később végeztük, ahogy a Módszerekben leírtuk. A küszöbeltolódást a két mérés különbségeként adtuk meg. A kanamycint (800 mg/kg, s.c., napi kétszer) 2 héten keresztül alkalmaztuk, ami szignifikáns hallásvesztést eredményezett mind a click, mind a frekvencia szelektív tone burst stimulusok esetében. A rasagilin kezeléseket (0,5 és 6 mg/kg, s.c., napi egyszer) az első adag kanamycin beadását követően 14 órával indítottuk, és a harmadik hét végén elvégzett második küszöbmérésig folytattuk. A Kontroll csoportban lévő egerek fiziológiás sóoldatot kaptak s.c. A Kanamycin + rasagilin 3 mg/kg kezelésre vonatkozó adatokat (n=7, click mérések nélkül) beillesztettük az ábrába (üres oszlopok), hogy jobban tudjuk szemléltetni a rasagilin hatás egyértelmű dózisfüggését. A betét ábra mutatja a 16 kHz-en tapasztalt dózisfüggést, amely frekvencia az egerek hallásának legérzékenyebb frekvencia-tartományába illeszkedik. Az adatokat átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg; a kísérleti esetszámot a zárójelekben jeleztük. A statisztikai elemzéshez lineáris kevert modellt, majd ezt követő páronkénti összehasonlítást használtunk (lásd a Módszereket; **p < 0,01).

Egy külön kísérletben igazoltuk, hogy a rasagilin önmagában még a legmagasabb, 6 mg/kg dózisban sem befolyásolta szignifikánsan a hallásküszöböt a 3 hetes kísérlet során. A teljes becsült változás 0,24 ± 0,928 dB volt ($p = 0,798$, $n = 7$) (8. ábra).



8. ábra: A rasagilin önmagában a legmagasabb alkalmazott dózisban sem befolyásolta a hallásküszöböt.

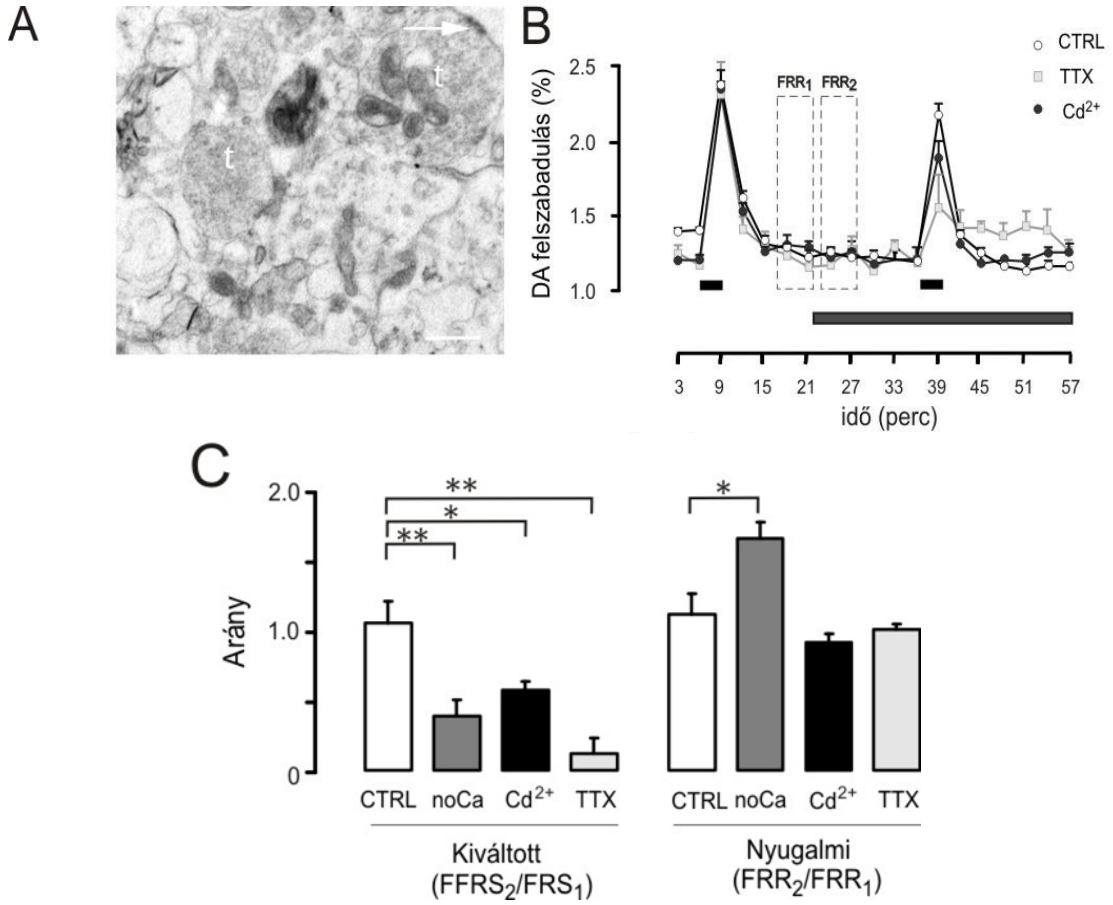
Mind click, mind tone burst stimulusok alkalmazása mellett megvizsgáltuk befolyásolja-e a 3 hetes rasagilin kezelés önmagában, az általunk alkalmazott legmagasabb dózisban (6 mg/kg; $n = 7$), a hallásküszöböt. Azt tapasztaltuk, hogy egyik vizsgált frekvencián sem, ahogy a kontroll állatok ($n = 20$) hallásküszöb változása sem szignifikáns. A Módszerekben korábban leírtaknak megfelelően adagoltuk a rasagilint napi egyszeri dózisban s.c., míg a kontroll csoport állatai fiziológiás sóoldatot kaptak. A statisztikai elemzéshez lineáris kevert modellt használtunk (l. a Módszereket).

5.2. A LOC efferensek DA felszabadításának mérése egér preparátumon. A Ca^{2+} és Na^{+} csatornák, valamint a DA-visszavétel szerepének igazolása

A kontroll körülmények között alkalmazott elektromos ingerlés konstans és reprodukálható DA felszabadulást okozott az izolált cochleában (9/B ábra); a 3 perces átlagos felszabadulás mértéke nyugalmi állapotban a radioaktív DA mennyiség 1,44 ± 0,02 %-a volt (n = 72). Az elektromos ingerlés alatt a DA felszabadulás mértéke elérte a teljes DA tartalom 3,15 ± 0,08 %-át (n=72). Az FRS_2/FRS_1 hányados megközelítően 1 volt (0.96 ± 0,1, n = 12), igazolva a hatás stabilitását.

A két stimulus közötti időben mért DA felszabadulás (nyugalmi DA felszabadulás) is stabilnak bizonyult a kontroll kísérletekben (FRR_2/FRR_1 = 0,92 ± 0,03, n=12).

A 24. perctől a kísérlet végéig tartó Ca^{2+}-mentes közeg 60 %-kal csökkentette a kiváltott felszabadulás mértékét (FRS_2/FRS_1 = 0,39 ± 0,11; $P < 0,01$).
Meglepetésünkre a Ca^{2+}-mentes oldattal történő perfúzió ideje alatt megemelkedett a DA nyugalmi felszabadulás (9/B ábra), ami elképzeléseink szerint részben a csont kompenzatórikus Ca^{2+} felszabadításának tudható be. A magas koncentrációban jelen lévő EGTA nagy valószínűséggel felerősítette ezt a folyamatot.
A nem szelektív, feszültségfüggő Ca^{2+}-csatorna blokkoló Cd^{2+} (100 µM) 41 %-kal gátolta a második elektromos ingerlés hatására kialakuló DA felszabadulást (FRS_2/FRS_1 = 0,57 ± 0,06; $P < 0,05$) (9/B-C ábra). A feszültség-függő Na^{+}-csatorna blokkoló TTX (1 µM) 88 %-kal csökkentette a kiváltott DA felszabadulást (FRS_2/FRS_1=0,11 ± 0,12; $P < 0,001$) (9/B-C ábra). Sem a Cd^{2+}, sem a TTX nem befolyásolta a nyugalmi DA-szintet (Cd^{2+}: FRR_2/FRR_1 = 0,92 ± 0,06; TTX: FRR_2/FRR_1 = 1,01 ± 0,04) (9/B-C ábra).



9. ábra: Idegi eredetű DA felszabadulás izolált egér cochleában.

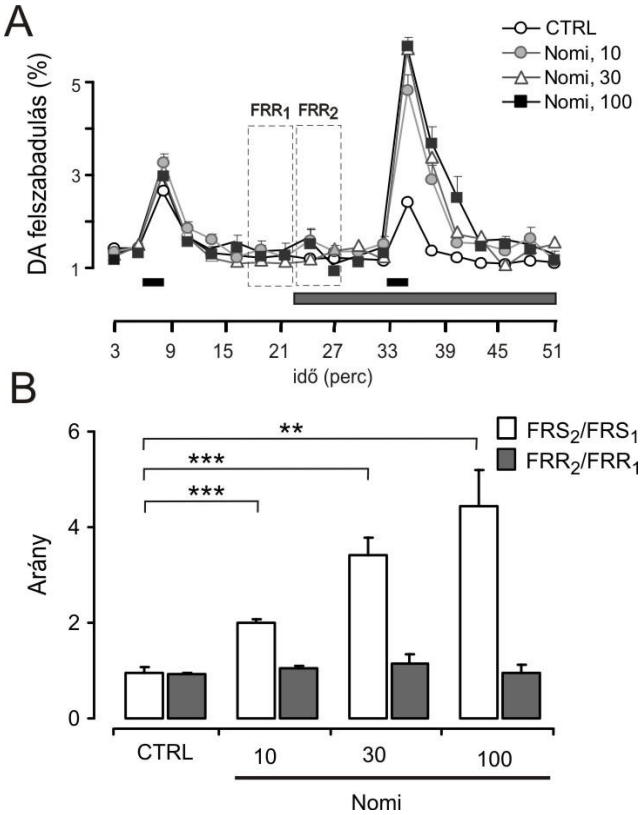
(A) Közvetlenül a kísérlet után fixálóba helyezett cochlea preparátum intakt idegi képleteiről készült elektronmikroszkópos kép. t, idegvégződés; nyíl, szinapszis; méretvonal: 1 µm.

(B) Kontroll (KTRL) körülmények között az elektromos stimulus reverzibilis és reprodukálható DA felszabadulás váltott ki a cochleában. TTX (1 µM) és Cd^{2+} (100 µM) szignifikánsan csökkentette a kiváltott DA felszabadulást. Az elektromos stimulusokat (FRS_1 és FRS_2) vízszintes, fekete vonallal jelöltük. A kontroll nyugalmi periódust (FRR_1) és a nyugalmi felszabadulásra ható gyógyszerhatás fázisát (FRR_2, a mintagyűjtés 21-27. perce) szaggatott négyszögekkel jelöltük. A hatóanyagokat a vízszintes vonal által jelzett időben adagoltuk a perfúziós oldathoz.

(C) Az oszlopdiagram a nyugalmi (FRR_2/FRR_1) és az elektromos stimulusok (FRS_2/FRS_1) által kiváltott DA felszabadulásra gyakorolt gyógyszerhatásokat mutatja. Mindhárom vizsgált kezelés (Ca^{2+}-mentes, Cd^{2+} és TTX) szignifikánsan csökkentette a kiváltott DA felszabadulást. Érdekes módon, a Ca^{2+}-mentes oldat hatására jelentősen emelkedett a nyugalmi DA felszabadulás, amit a preparátum csontos strukturáiból származó kompenzatórikus Ca^{2+} felszabadulással tudunk magyarázni. A Cd^{2+} és TTX nem módosította a nyugalmi DA felszabadulást. Az adatokat átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg. **P < 0,01; *P < 0,05 (n = 5-8).

A DA visszavételét gátló nomifensin a 10-100 μM koncentráció tartományban dózisfüggően megemelte az elektromos stimulus által felszabadított DA mennyiségét (10 μM: FRS_2/FRS_1 = 1,99 ± 0,07; P<0,001; 30 μM: FRS_2/FRS_1 = 3,28 ± 0,42; P < 0,001; 100 μM: FRS_2/FRS_1 = 4,45 ± 0,74; P < 0,001).
A nyugalmi DA felszabadulást azonban nem befolyásolta (10/A-B ábra).

Mindezek mutatják, hogy az irodalomban először sikeresen beállítottuk és alkalmaztuk a LOC efferensekből történő DA felszabadulás mérésének módszerét egérben. Ezt megelőzően ezeket a méréseket csak tengerimalac cochleában végezték.



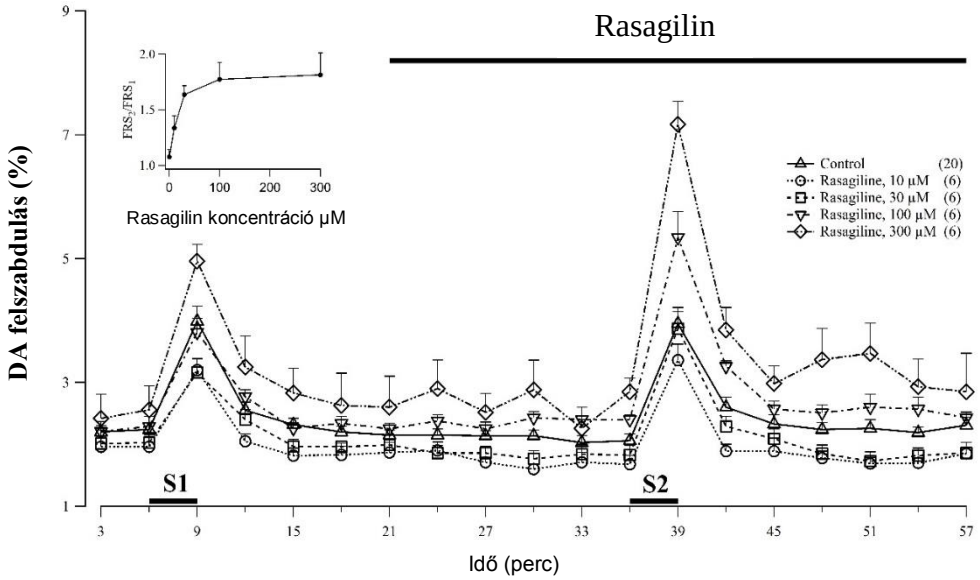
10. ábra: Az uptake gátlás DA felszabadulására gyakorolt hatása egér cochlea preparátumban.

(A) DA felszabadulás kontroll körülmények között és nomifensin kezelés mellett (nomifensin 10-100 μM). A nomifensint a vízszintes szürke vonal által jelölt időben, a 21. perctől kezdve adagoltuk. Az elektromos stimulusokat (FRS_1 és FRS_2) vízszintes fekete vonalakkal jelöltük.
(B) A 10-100 μM dózisban alkalmazott (n = 9-9) nomifensin nyugalmi (FRR_1 és FRR_2) és kiváltott (FRS_1 és FRS_2) DA felszabadulásra gyakorolt hatásának összefoglaló oszlopdiagramja. A nomifensin dózisfüggő módon fokozta az elektromos stimulus hatására kiváltott DA felszabadulást, viszont nem befolyásolta a nyugalmit. Az adatokat átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg. A csillagok a kontrollhoz képest mért szignifikáns különbséget jelölik (n = 9 ***P < 0,001; **P < 0,01).

5.3. A rasagilin cochleáris DA felszabadulásra gyakorolt hatása és annak mechanizmusa

A rasagilin megemelte az elektromos ingerlés hatására kiváltott DA-felszabadulást az egér cochlea preparátumban.

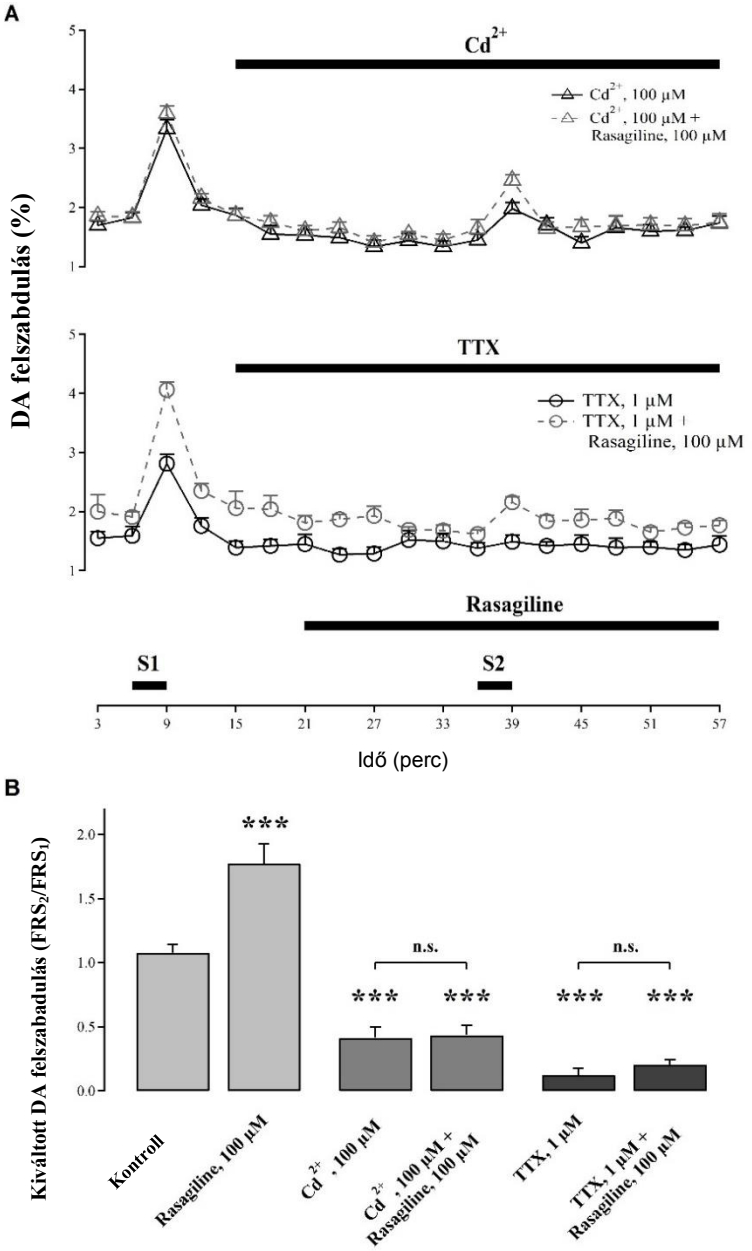
A hatás koncentráció függő volt és 100 µM-nál elérte a platót. A nyugalmi DA felszabadulás nem változott egyik koncentráció esetén sem (11. ábra).



11. ábra. A rasagilin dózisfüggő módon fokozta az elektromos stimulálás által kiváltott DA felszabadulást az egér cochleában.

A 21. perctől kezdve adagoltuk a rasagilint a perfúziós oldathoz, és adását fenntartottuk a kísérlet végéig (vízszintes vonal). A 10-300 µM koncentráció tartományban teszteltük a hatását (Ras 10, Ras 30, Ras 100 és Ras 300). Az S1 és S2 vonalak az elektromos stimulálást jelzik (5 Hz, 0,5 ms, 900 impulzus). A betét ábra a rasagilin elektromos stimulálás által kiváltott frakcionált DA felszabadulásra (FR) gyakorolt dózisfüggő hatását mutatja, amit az FRS_2/FRS_1 hányadossal jellemeztünk (az ingerlés rasagilin jelenlétében és annak hiányában mért hatásainak a hányadosa). Az adatokat az átlag ± S.E.M.-et mutatják; zárójelben a kísérleti elemszámok .

A rasagilin elektromos stimulus kiváltotta DA felszabadulást fokozó hatása lehetséges molekuláris mechanizmusának tisztázása céljából megvizsgáltuk a rasagilin (100 µM) hatását a VGCC-k és VGSC-k gátlása mellett. Cd^{2+} (100 µM) és TTX (1 µM) jelenlétében a stimulus által kiváltott felszabadulás teljesen elmaradt, ami arra szolgáltatott bizonyítékot, hogy a DA felszabadulás axonális aktivitás és Ca^{2+} beáramlás következménye. Ezen körülmények mellett a rasagilin nem tudta fokozni a DA felszabadulást (12. ábra).

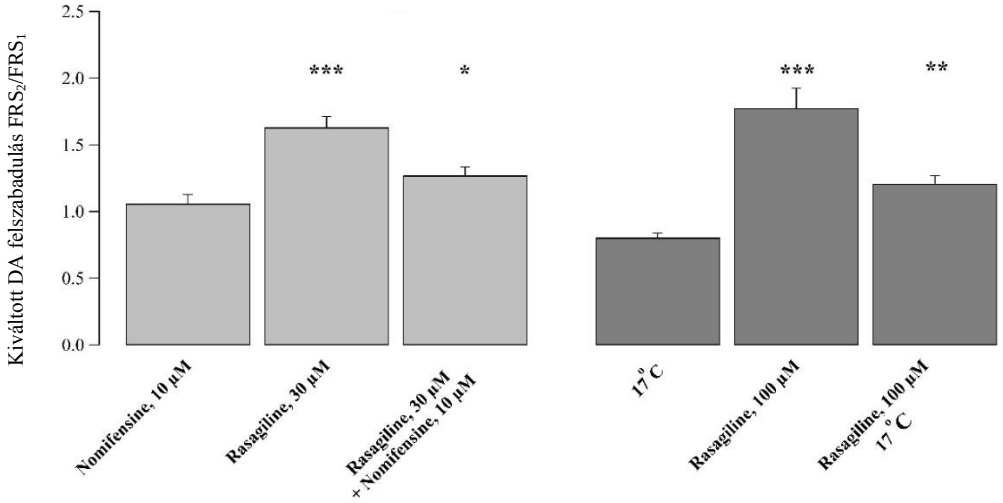


12. ábra. A VGSC-k és VGCC-k gátlása esetén a rasagilinnek (100 µM) semmilyen hatása nem volt az elektromos ingerléssel kiváltott DA felszabadulásra.

A) A VGCC-k (Cd^{2+}, 100 µM) és a VGSC-k (TTX, 1 µM) blokkolása gátolta az elektromos ingerlés DA felszabadító, és a rasagilin potencírozó hatását is. A hatóanyagok adagolását a megfelelő vízszintes vonal jelzi. B) A Cd^{2+} (100 µM), TTX (1 µM), rasagilin (100 µM; Ras 100), valamint ezek kombinációinak hatásai az elektromos ingerlés hatására jelentkező DA felszabadulásra (FRS_2/FRS_1); Összefoglalás és staitisztikai analízis: A csillagok azt jelzik, hogy minden kezelés szignifikáns hatást eredményezett a Kontrollhoz viszonyítva. A rasagilin elveszítette a potencírozó hatását a VGSC-k és VGCC-k blokkolása esetén (n.s., nem szignifikáns). Az adatokat átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg. A kísérleti elemszám kezelési csoportonként 6-6 darab volt, kivéve a Kontrollnál, ahol n = 20. ANOVA, majd Tukey's többszörös összehasonlító teszt; ***$p < 0{,}001$.

Az idegvégződésekbe történő DA visszavétel gátlása a DA-erg neurotranszmisszió potencírozásának ismert módja. Hogy kiderítsük, vajon a visszavétel gátlása szerepet játszik-e a rasagilin DA felszabadulásra gyakorolt hatásában, megvizsgáltuk a rasagilin hatását a szelektív DA uptake gátló nomifensin jelenlétében, ill. alacsony hőmérsékleti körülmények között.

A hőmérséklet S_2 előtti, de S_1 utáni, lecsökkentése 17 °C-ra nagyjából megduplázta az FRS_2/FRS_1 arányt (2,52 ± 0,4, n = 4), igazolva a visszavétel gátlásra gyakorolt hatását, hasonlóan ahhoz, amit már agyszeleteken is igazoltak (Vizi, 1998; Vizi et al., 2004). A nomifensin (10 µM) egér cochleában tapasztalt DA visszavétel gátló hatását is kimutattuk már korábban (Halmos et al., 2008). Kísérleteinkben mind a nomifensin (10 µM), mind az alacsony hőmérséklet (17 °C) szignifikánsan gátolta a rasagilin elektromos ingerléssel kiváltott DA felszabadulást potencírozó hatását (13. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a rasagilin gátolja a DA visszavételt izolált cochlea preparátumokon, és ezen keresztül potencírozza az LOC efferens axonok aktiválásával kiváltott cochleáris DA-erg neurotranszmissziót.



13. ábra. A DA visszavétel blokkolása nomifensinnel vagy alacsony hőmérséklettel gátolta a rasagilin elektromos ingerlésre jelentkező DA felszabadulást potencírozó hatását egér cochleában.

A nomifensin adagolását (10 µM), ill. a perfúziós oldat 17°C-ra hűtését a DA felszabadulás mérésének megkezdése előtt 15 perccel kezdtük (az előperfúzió során), és a kísérlet végéig folytattuk. A rasagilin adását az S2 előtt kezdtük, csakúgy, mint a korábbi kísérleteinkben. A csillagok a 10 µM nomifensinnel, ill. a 17 °C-kal történő összevetés szignifikanciáját mutatják. Az adatokat átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg; n = 6 minden kezelési csoportban. ANOVA, majd Tukey's többszörös összehasonlító teszt; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0,001$.

6. Megbeszélés

6.1. A szenzorineurális hallásvesztések diagnosztikájának néhány lehetséges módszere

A bármilyen okból és dinamikával fellépő halláskárosodás diagnózisa a megfelelő vizsgálatok elvégzéséig csupán a betegek szubjektív érzetére és jelzésére alapozható.

A károsodás tényének és mértékének megállapítására a legegyszerűbben kivitelezhető vizsgálat a tisztahang küszöbaudiometria. A vizsgálat a szubjektív hallásvizsgálatok közé tartozik, ami a beteg aktív együttműködését igényli, ezért az így kapott eredmények nem minden esetben fogadhatók el megfelelőnek, ráadásul a szükséges együttműködésre képtelen betegeknél (kis gyerekek, eszméletlen, altatott betegek) kivitelezhetetlen.

A BERA vizsgálat nem igényli a beteg kooperációját, megbízható képet ad a beteg hallásküszöbéről, ám a vizsgálat komplex volta miatt a mindennapokban nem alkalmas a betegek rutinszerű szűrővizsgálatára.

A belsőfül működésének megítélésére jelenleg legalkalmasabbnak tűnő vizsgálati eljárás az otoakusztikus emisszió. Ezen vizsgálat a beteg által észlelhető hallásromlást megelőzően is már jelezheti a szőrsejtek károsodását, bár nem minden esetben alkalmas hallásküszöb meghatározására.

Ismerten ototoxikus, vagy az ototoxicitás lehetőségét magukban rejtő hatóanyagok alkalmazása esetén, lehetőség szerint a kezelés megkezdése előtt, valamint a kezelések alatt megfelelő időközönként feltétlenül szükséges a szoros audiológiai kontroll. A fenti vizsgálatokkal kapott vizsgálati eredmények lehetővé tehetik számunkra az esetleges terápiaváltást, ill. esetleges kezelés módosítását.

6.2. A szenzorineurális halláscsökkenések esetén jelenleg alkalmazott kezelési lehetőségek és lehetséges új gyógyszerek

Ellentétben a vezetéses hallásvesztéssel, a halláscsökkenés szenzorineurális formáinak esetén nem rendelkezünk a hallásdeficit rendezésére alkalmas specifikus

terápiával. Különböző konvencionális és beültetett hallókészülékek (pl. cochleáris implantátumok) hasznosnak bizonyultak számos esetben, de specifikus gyógyszeres terápiával nem rendelkezünk. A jelen klinikai gyakorlatban szteroidokat, trombolitikumokat, értágítókat és nootróp szereket alkalmazunk, amelyek terápiás hatékonyságát illetően ellentmondásos vizsgálatok születtek.

Állatkísérletes eredmények a szenzorineurális halláskárosodások számos, potenciálisan új gyógyszeres kezelési lehetőségét vetették fel, úgymint az antioxidánsok, a ROS/RNS-fogók, apoptózis-gátlók, neuroprotektív szerek, gyulladáscsökkentő gyógyszerek (pl. szteroidok, aspirin vagy TNF-α-blokkolók), neurotróp faktorok vagy különböző génterápiás megközelítések (Atar and Avraham, 2005; Rybak and Whitworth, 2005; Maruyama et al., 2008; Fransson et al., 2010; Mukherjea et al., 2011; Rudnicki and Avraham, 2012; Kohrman and Raphael, 2013), de ezek egyelőre még nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket.

Annak ellenére például, hogy számos állatkísérlet igazolta az antioxidáns terápia szignifikáns hatásait, a klinikai kipróbálások még nem vezettek meggyőző eredményre (Tabuchi et al., 2010; Mukherjea et al., 2011).

A fentiek alapján relevánsnak gondoltuk kipróbálni, vajon a rasagilin, egy törzskönyvezett szer komplex neuroprotektív, antiapoptotikus és antioxidáns hatással, rendelkezik-e otoprotektív hatásspektrummal.

6.3. A rasagilin potenciális otoprotektív hatásának *in vivo* vizsgálata a SNHL-ek aminoglikozid által kiváltott formájában

A hallásromlások megelőzésében vagy gyógyításában *in vitro* kísérletekben potenciálisan hatásosnak mutatkozó hatóanyagokat minden részletre kiterjedően meg kell vizsgálni *in vivo* körülmények között is, vajon alkalmasak lehetnek-e a humán gyógyászatban.

Egy hatóanyag otoprotektív hatását *in vivo* körülmények között úgy vizsgálhatjuk, hogy lemérjük egy kóros inzultus által kiváltott hallásküszöb eltolódásra kifejtett védő hatását.

Az orvosi gyakorlatban jól ismert ototoxikus mellékhatással rendelkező aminoglikozid antibiotikumok alkalmazása széles körben elfogadott módszer

állatkísérletes halláskárosodás kiváltására és potenciálisan otoprotektív hatással bíró szerek kipróbálására (Basile et al., 1996; Song et al., 1997; Duan et al., 2000; Nekrassov and Sitges, 2000; Wu et al., 2001).

Az aminoglikozidok által kiváltott ototoxicitás mechanizmusa többek között az excitotoxicitásnak (Basile et al., 1996; Duan et al., 2000), ill. az oxidatív stressz és ROS kiemelt szerepének (Basile et al., 1996; Sha and Schacht, 1999; Poirrier et al., 2010; Huth et al., 2011) tulajdonítható.

A hallásküszöb objektív meghatározásának elsőként választandó módszere a BERA.

Az egér igazoltan megfelelő kísérleti állat az emberi hallás és halláskárosodás modellezésére, köszönhetően a hasonló cochleáris anatómiának, élettannak és ototoxicitással összefüggő hallásvesztés-mintázatnak (Wu et al., 2001; Fernandez et al., 2010).

Irodalmi adatokra (Wu et al., 2001) és a korábbi eredményeinkre alapozva a rasagilin potenciálisan otoprotektív hatásának *in vivo* vizsgálatára 800 mg/kg kanamycint (s.c.) alkalmaztunk 2 héten át az aminoglikozid által kiváltott SNHL-modellünkben. A kanamycin által kiváltott hallásküszöb-emelkedés a magasabb frekvenciáknál volt kifejezettebb, ami tökéletes összhangban van mind a humán klinikai gyakorlatban, mind a laboratóriumi állatok esetében tett megfigyelésekkel.

Az aminoglikozid ototoxicitás alapvetően a magas frekvenciákat érintő SNHL (Wu et al., 2001; Guthrie, 2008). A több frekvencián mért hallásküszöb idő függvényében történő ábrázolása azt mutatta, hogy a kanamycin hatásában a platófázist három hét elteltével értük el. Ez az eredmény összhangban volt azokkal a korábbi, klinikai megfigyelésekkel, miszerint az aminoglikozidok ototoxikus hatása gyakran a kezelés befejezését követően kezdődik, lassan fejlődik ki, míg végül irreverzibilissé válik (Xie et al., 2011).

Kísérleteinkben a kanamycin-okozta hallásvesztést mérséklő tendencia volt látható az azonos időben, napi egyszer adott rasagilin (3 mg/kg) hatására. Ez a kedvező hatás megfigyelhető volt a kísérlet teljes 5 hete alatt, mindegyik mért frekvencián. A rasagilin hallásküszöbre gyakorolt hatása dózisfüggést mutatott.

Szignifikáns hatást 16 kHz-en mértük. Ez a frekvencia éppen az egerek hallásérzékenységi optimum tartományába (15-20 kHz) esik (Ehret, 1976) és megfelel az emberi 1-4 kHz-es optimumtartománynak.

Ezen eredmények alapján felmerül a csábító feltételezés miszerint a rasagilin ototprotektív hatását leginkább a beszédértés szempontjából legfontosabb frekvenciatartományban fejti ki.

Felmerül a kérdés, mi a rasagilin otoprotektív hatásának mechanizmusa.

Az FDA által az idiopathiás Parkinson betegség kezelésére jóváhagyott rasagilin egyszerre rendelkezik neuroprotektív, antiapoptotikus és antioxidáns tulajdonságokkal is. Fokozza a Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjainak és a BDNF és GDNF neurotróp faktorok szintézisét, miközben csökkenti a pro-apoptotikus tulajdonságú Bad és Bax fehérjék mennyiségét (Bar-Am et al., 2005; Weinreb et al., 2005; Youdim et al., 2006).

A rasagilin továbbá fokozza az antioxidáns enzimek (glutation peroxidáz és kataláz) aktivitását (Kitani et al., 2000) és gátolja az mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore) kinyílását, akadályozva ezzel a mitokondrium duzzadást, a citokróm c felszabadulást (Youdim et al., n.d.; Maruyama et al., 2001; Akao et al., 2002), ill. a kaszpáz 3 aktiválódást (Bar-Am et al., 2005).

Az excitotoxicitás kiváltásáért felelős NMDA- és AMPA-receptorok szinaptikus denzitásának csökkenését is leírták már rasagilin kezelés következtében (Gardoni et al., 2011).

Ezeket a sejtekben lejátszódó folyamatokat tartjuk felelősnek a rasagilin pozitív *in vivo* hatásaiért.

A rasagilin továbbá protektív hatással rendelkezik zárt koponyasérülés (Huang et al., 1999), ill. kísérletesen előállított fokális ischaemia esetén (Speiser et al., 1999), valamint felvetették, hogy lassíthatja a Parkinson kór progresszióját is (Hoy and Keating, 2012). Szintén kimutatták neuroprotektív hatását a perifériás idegrendszerben, pontosabban egy másik érzékszervben, a retinában (Eigeldinger-Berthou et al., 2012).

A rasagilin ezen hatásai ellensúlyozhatják azokat a hatásokat, amelyeket az aminoglikozidok a redox háztartás megzavarásán, a ROS képzésen (Basile et al., 1996; Sha és Schacht, 1999; Poirrier et al., 2010; Huth et al., 2011), az

excitotoxicitás által létrehozott hallóidegi károsodáson (Ruel et al., 2007; Tabuchi et al., 2010) és az alapvető neurotróp faktorok szintjének csökkentésén keresztül okoznak (Poirrier et al., 2010).

Ezeken a jól jellemzett hatásokon túl a rasagilin elősegíti a DA-erg neurotranszmissziót is (Weinreb et al., 2010), a DA-nak pedig fontos szerepe van abban a feed-back körben, ami endogén védelmet biztosít az SNHL-ekkel szemben (Lendvai et al., 2011).

Emellett egy friss tanulmány szerint, ami az FDA által jóváhagyott 640 hatóanyagot tartalmazó gyógyszeradatbázist vizsgált meg, a DA neurotranszmissziót befolyásoló szerek védőhatással rendelkeznek ototoxikus aminoglikozidokkal és ciszplatinnal szemben (Vlasits et al., 2012).

6.4. Endogén protektív mechanizmus a cochleában – a rasagilin DA felszabadulást fokozó hatása az LOC terminálisokon

Az *in vitro* kísérleteinkben megvizsgáltuk a rasagilin LOC terminálisokból történő DA felszabadulást fokozó képességét.

DA-t tartalmazó LOC rostok találhatók a cochlea – agytörzs - cochlea short-loop feed-back kör efferens szárában (2. ábra), ami fontos szerepet tölt be a hallóideg neuronjai káros túlaktiválódásának gátlásában (Pujol, 1994; Ruel et al., 2007; Lendvai et al., 2011).

A Glu receptorok túlaktiválódása a szőrsejtekből túlzott mennyiségben felszabaduló Glu következménye, ami számos SNHL típusban előfordul (Lendvai et al., 2011), és ez az excitotoxicitás neuronális károsodáshoz vezet ugyanúgy, mint az ischaemiás agykárosodásban (Vizi et al., 2013).

Figyelembe véve a cochleáris DA protektív hatását, számos célpont került látótérbe, amelyekre hatva az endogén DA-erg védőmechanizmus fokozható lenne. Korábban kutatócsoportunk már kimutatta, hogy a 5-$HT_{6/7}$ agonisták (Doleviczényi et al., 2008), a II-es típusú mGluR ligandok (Doleviczényi et al., 2005), a szelektív NMDA receptor agonisták (Halmos et al., 2008) és a D_2 DA receptor antagonisták (Gáborján et al., 1999; Halmos et al., 2005) új lehetőségeket biztosítanak a LOC

terminálisokon történő DA felszabadulás fokozására a cochleában (3. ábra; Lendvai et al., 2011).

Úgy tűnik, az endogen, akciós potenciál által kiváltott DA felszabadulás potencírozása, azaz a protektív LOC feed-back erősítése előnyösebb hatású, mint az LOC efferensek DA felszabadításának axonális aktivitástól független kiváltása, vagy mint a megfelelő receptor ligandok alkalmazása által közvetlenül aktivált, elsődleges hallóneuronokon található posztszinaptikus DA receptorokon keresztül kiváltott hatás.

Feltételezhető, hogy a Parkinson-ellenes szerként törzskönyvezett, szelektív MAO-B gátló rasagilin teljesíti ezeket a feltételeket a DA metabolizmusának gátlása és a LOC efferens terminálisokon lévő raktárainak következményes feltöltése által (Hársing and Vizi, 1984). Ezt támasztja alá, hogy a rasagilin dózisfüggő módon fokozta az akciós potenciál által kiváltott DA felszabadulást a cochleában, a nyugalmi felszabadulás befolyásolása nélkül. A hatás kialakulásához szükséges relatíve magasabb koncentráció feltehetőleg az egerekben döntően MAO-A függő DA deamináció következménye lehet (Garrick and Murphy, 1980; Fornai et al., 1999). Magasabb koncentrációk esetén a rasagilin elveszíti a MAO-B szelektivitását és gátolja a MAO-A-t is (Youdim et al., 2006).

A megfelelően működő VGSC-k és VGCC-k a klasszikus exocitotikus neurotranszmitter felszabadulás szükséges előfeltételei. A rasagilin potencírozó hatásának VGSC-ktől és VGCC-ktől való függése igazolta, hogy hatása a LOC efferensek axonális aktivitásához kötött, szemben az indirekt módon ható szimpatomimetikumokkal, mint pl. az amfetamin, amelyek az akciós potenciál függő vezikuláris felszabadulástól függetlenül indukálják a DA felszabadulást (Fleckenstein et al., 2007).

Korábbi publikációkban rasagilin okozta DA visszavétel gátlást igazoltak a központi idegrendszerben (Lamensdorf et al., 1996; Jankovic and Stacy, 2007). A DA visszavétel gátlásának cochleáris rasagilin hatásban játszott szerepét támasztja alá, hogy a DA visszavétel előzetes akadályozása a szelektív DA visszavételt gátló nomifensinnel vagy alacsony hőmérséklettel a potencírozó hatás elvesztésével járt. A rasagilin nem emelte meg a nyugalmi felszabadulást, ami összhangban van azzal a terápiás céllal, hogy kizárólag az akciós potenciálhoz kapcsolódó LOC feed-back

választ fokozzuk anélkül, hogy folyamatos és az endogén védelemtől független DA szint emelkedést okoznánk. A folyamatosan megemelkedett DA szint a DA receptorok deszenzitizációját okozná és ezzel csökkenne az aktiválódó LOC terminálisok protektív hatása.

6.5. Általános megfontolások a rasagilin esetleges otoprotektív alkalmazását illetően

Felmerül a kérdés, hogyan viszonyulnak egymáshoz az *in vivo* és *in vitro* kísérletekben alkalmazott dózisok és a rasagilin otoprotektív koncentrációja elérhető-e emberi viszonylatban.

Egy egyszerű számítás szerint, alapul véve a test 60 %-os víztartalmát, ill. a rasagilin teljes felszívódásával, valamint a test víztérfogatában való tökéletes eloszlásával számolva, az általunk használt *in vivo* dózisok és az *in vitro* koncentrációk nagyjából azonos nagyságrendben voltak.

Figyelembe véve azt az általános megfigyelést, miszerint az emberben hatásos dózisok általában egy nagyságrenddel alacsonyabbak az egerekben alkalmazottaknál és hogy a rasagilin tolerálhatósága nagyon jó (Thebault et al. 2004), az SNHL-ben történő potenciális alkalmazhatósága reális lehetőség.

Az emberekben döntően MAO-B függő DA deamináció - szemben az egerekkel, ahol a MAO-A szerepe a döntő (Garrick and Murphy, 1980; Fornai et al., 1999) – további érv a MAO-B gátló rasagilin alacsonyabb dózisú humán otoprotektív alkalmazhatósága mellett.

Otoprotektív terápiát alkalmazhatunk megelőzésként, kezelésként, vagy regenerálásként. Elméletileg a megelőző kezelés rejti magában a legnagyobb eséllyel a hatékony gyógyító hatás lehetőségét.

Esetünkben a rasagilint az első kanamycin injekció adását követően 14 órával kezdtük adagolni és még így is szignifikánsan mérsékelte a hallásküszöb emelkedését 6 mg/kg dózisban.

Eredményeink klinikai gyakorlatba történő közvetlen átültetése esetén a rasagilin akut aminoglikozid antibiotikum okozta halláskárosodás kezelésére és megelőzésére lenne alkalmas. Azonban a lehetséges terápiás indikációk köre jóval

szélesebb ennél a különböző SNHL-ek patomechanizmusainak hasonlósága miatt (Hawkins, 1973; Poirrier et al., 2010; Mukherjea et al., 2011).

Az oxidatív stressz és a következményesen kialakuló emelkedett ROS szintek kulcstényezők a presbyacusis kialakulásában (Yamasoba et al., 2013), a platina alapú daganatellenes szerek (Kopke et al., 1997; Schacht et al., 2012), valamint a zajkárosodás által kiváltott SNHL-ben (Henderson et al., 2006). A hallóidegek degenerációja szintén fontos szerepet játszik ezen SNHL-ek mindegyikében (Ylikoski et al., 1974; van Ruijven et al., 2005; Makary et al., 2011; Maison et al., 2013; Yamasoba et al., 2013).

Ennélfogva a rasagilin antioxidáns, neuroprotektív, anti-apoptotikus és DA felszabadulást fokozó hatásának köszönhetően ígéretes terápiás lehetőséget nyújthat a nem aminoglikozid okozta SNHL-ek kezelésében is.

A ciszplatin és azzal rokon daganatellenes szerek alkalmazása esetén, a mellékhatások megelőzése vagy mérséklése céljából egyidejűleg adagolt rasagilin, csakúgy, mint az aminoglikozid kezelés esetén történő együttes adagolás egyike lehet a lehetséges terápiás utaknak. Másrészről a rasagilin tartós alkalmazása kézenfekvő lehet presbyacusis és perzisztáló közepes fokú zajkárosodás okozta szenzorineurális halláscsökkenések esetén.

Az SNHL-ek komplex patomechanizmusa - ami sokkal inkább egy hálózat strukturájával rendelkezik, mintsem egy lineáris kaszkádéval – és a gyógyszeres otoprotektív kezeléssel kapcsolatos áttörés elmaradása együttesen felvetik, hogy az egy támadáspontú terápiás próbálkozások kevesebb sikerrel kecsegtetnek a SNHL-ek terápiájában. A különböző SNHL-ek patomechanizmusainak jelentős átfedése alapján a rasagilin, több támadáspontú hatásmechanizmusával, nem csak az aminoglikozid-indukálta halláskárosodások esetén, hanem egyéb eredetű hallásvesztések esetén is hatékony terápiás lehetőséget nyújthat. Jó tolerálhatósága, ami a 2006-os humán klinikai gyakorlatba történt bevezetése óta igazolást nyert, szintén elősegíti ezen új terápiás indikáció bevezetését.

Az intratimpanális kortikoszteroid kezelés analógiájára megvizsgálható lenne, - bár érdemi mellékhatások nem ismertek - hogy az IT adagolt rasagilin kisebb, célzottan adagolt dózisaival azonos otoprotektív hatás elérhető-e.

Terveink között szerepel az egerekkel végzett in vitro és in vivo eredmények ellenőrzése humán gyógyászatban klinikai körülmények között is.

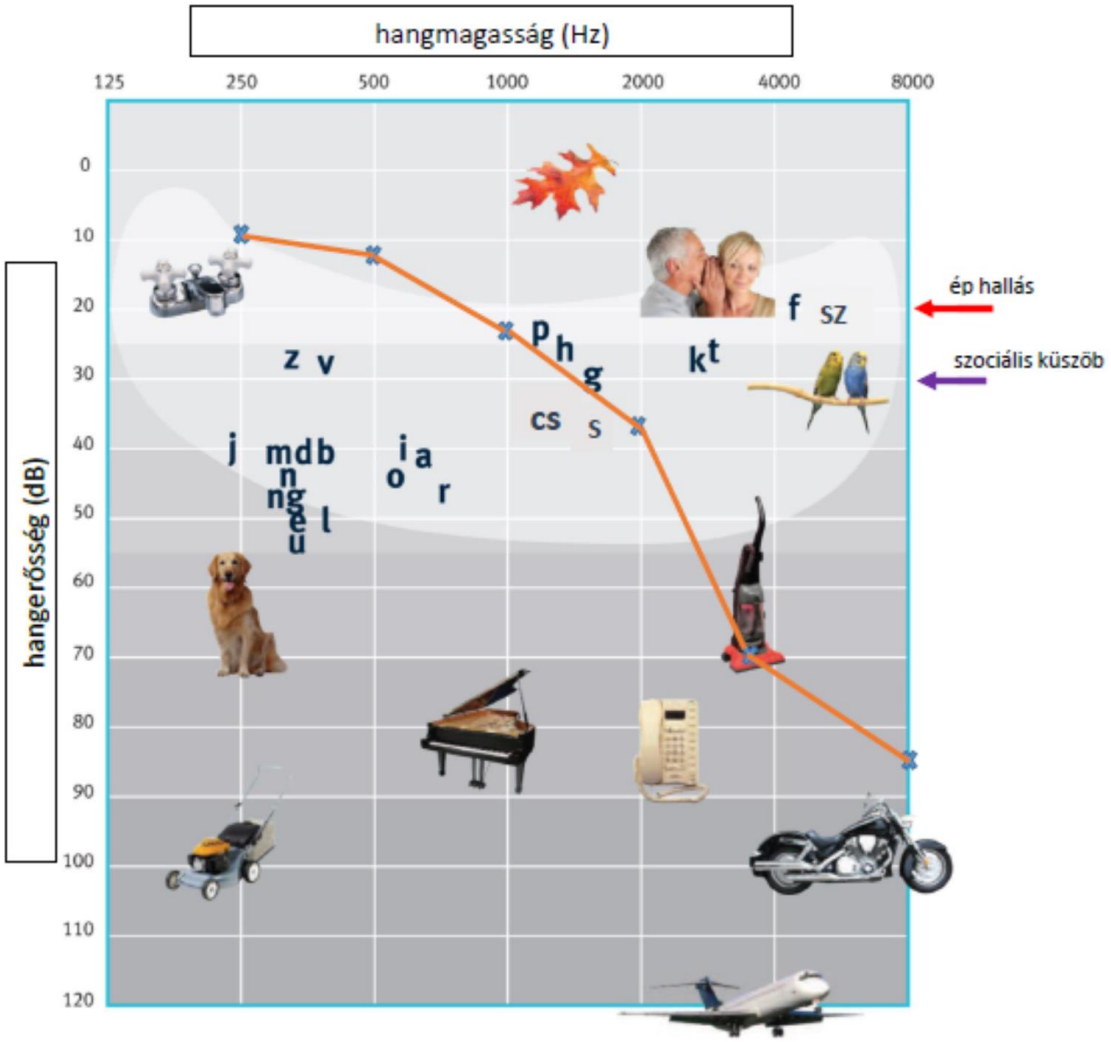
Tekintettel arra, hogy a rasagilin egy széleskörűen tesztelt és a klinikai gyakorlatban már bevált, jóváhagyott gyógyszer a Parkinson-kór kezelésére, az otoprotektív hatás kimutatására irányuló klinikai kivizsgálás feltételei adottak.

A kialakított vizsgálati módszerek lehetővé teszik egyéb, a DA-szintet kedvezően befolyásoló hatóanyagok további tesztelését.

Ez az eredmény a jelen kísérletsorozat sikerességén messze túlmutat. Tekintettel arra, hogy a civilizációs társadalmakban az idősödő korosztályokat a kor előrehaladtával egyre fokozottabban érinti a magasabb frekvenciákon jelentkező halláskárosodás, illetve a fiatalabb generációkat, többnyire szórakozás, vagy munkavégzés közben az erős hanghatások következtében zajkárosodások érhetik, bármilyen megoldás, ami ezen érzékvesztés mérséklésének esélyével kecsegtet, hatalmas jelentőséggel bírhat.

Amennyiben a rasagilin beváltja az *in vitro* és *in vivo* kísérletek alapján hozzá fűzött komoly reményeket, jelentős szociális és anyagi előnyökkel járhat az alkalmazása. A magasabb frekvenciák hallásának elvesztésével járó komoly életminőség-romlás (a mindennapi kommunikáció, bevásárlás, kapcsolattartás családtagokkal, ismerősökkel, információszerzés ellehetetlenedése) (14. ábra) kivédésével egy teljesebb élet lehetősége adódna ezeknek az embereknek.

Végül, de messze nem utolsó sorban az egyik legfontosabb tényező, ami a rasagilin széleskörű alkalmazását elősegítheti akut vagy krónikus hallásvesztések kezelésében az, hogy ezen hatóanyag esetében egy évek óta a humán gyógyászatban alkalmazott, a szükséges teszteken, kipróbálásokon sikeresen átesett, törzskönyvezett gyógyszerről van szó.



14. Ábra: Környezetünk hangjelenségeinek és egy tipikus időskori hallásvesztésnek az ábrázolása egy hangerősség-hangmagasság táblázaton.

Egy küszöb audiometria mérésére használt hangmagasság-hangerősség tábla látható, amin bejelöltük a különböző hangokat átlagos hangmagasságuknak és hangerősségüknek megfelelően, továbbá a környezetünkben ránk ható néhány jellemző hanghatás elhelyezkedését. A 0 dB jelzi a tökéletesen ép hallást. Az ezen szinttől a piros nyíllal jelzett 20dB-es szintig terjedő tartományt ép hallásnak fogadjuk el.

A lila nyíllal jelzett 30dB-es szintet nevezzük szociális küszöbnek, ami azt jelzi, hogy az ezt meghaladó hallásvesztés a betegeknél a mindennapokban tartós kommunikációs zavarokhoz vezet.

A kék x-ekkel és narancssárga összekötő vonallal jelzett görbe egy tipikus, jelentős fokú, időskori hallásvesztés lefutását mutatja. A narancssárga vonaltól jobbra és elfelé található frekvencia és dB tartományban a betegek nem hallanak.

7. Következtetések

Doktori dolgozatommal összefüggő munkám során a Parkinson kór terápiájában már bevezetett gyógyszer, a rasagilin aminoglikozid antibiotikumok okozta szenzorineurális halláskárosodás elleni otoprotektív hatását és ebben a hatásban lehetséges szerepet játszó endogén DA-erg védő mechanizmus rasagilin általi befolyásolhatóságát és annak mechanizmusát vizsgáltam. Ezzel kapcsolatos eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1.) Munkánk során beállítottuk, magyarországi hiányt pótolva:

- az agytörzsi kiváltott válasz potenciál (BERA) *in vivo*, egereken, különböző frekvenciákon végzett mérésének módszerét (objektív audiometria)
- a szenzorineurális halláskárosodások egy fajtájának, az aminoglikozid antibiotikumok okozta halláskárosodásnak az egérmodelljét (kanamycin modell).

A modell, kombinálva az objektív audiometriás módszerrel, alkalmas különböző anyagok, gyógyszerjelölt molekulák hallásvédő hatásának frekvenciafüggő tesztelésére.

2.) Megállapítottuk, hogy a rasagilin dózisfüggő módon (0,5 - 6 mg/kg, s.c.) csökkentette a kanamycin által egerekben kiváltott szenzorineurális halláskárosodást (hallásküszöb eltolódást). Ez a hatás az egerek hallásérzékenységi optimum tartományába eső 16 kHz-en volt a legkifejezettebb. Az ép hallást a rasagilin önmagában a legmagasabb alkalmazott dózisban sem befolyásolta.

3.) Beállítottuk és az irodalomban először alkalmaztuk a LOC efferensekből történő DA mérést egérpreparátumon. Ez lehetővé tette, hogy *in vivo* és *in vitro* kísérleteinket azonos fajú kísérleti állatokon végezzük.

4.) Kimutattuk, hogy a rasagilin dózisfüggő módon (10-300 μM) fokozza az elektromos ingerléssel kiváltott DA felszabadulást egér cochlea preparátumban. A feszültségfüggő Ca^{2+}- és Na^{+}-csatornák, valamint a DA visszavétel gátlásával igazoltuk, hogy a rasagilin az akciós potenciál kiváltotta szinaptikus DA szint emelkedést okozó hatását részben a transzmitter visszavételének gátlásával váltotta

ki. A LOC efferensekből felszabaduló DA-nak szenzorineurális halláskárosodások elleni védő szerepet tulajdonítanak. A rasagilin akciós potenciál függő DA felszabadulást fokozó hatása hozzájárulhat az aminoglikozid antibiotikum kanamycin okozta halláskárosodás elleni protektív hatásához.

8. Összefoglalás

Bár a szenzorineurális halláskárosodások a leggyakoribb szenzoros deficitek közé tartoznak, érdemi gyógyszeres kezeléssel nem rendelkezünk. Különböző formáinak hátterében legfontosabb okként az excitotoxicitás/oxidatív stressz/kóros ROS szint emelkedését feltételezzük. A legújabb terápiás kísérletek többsége az antioxidánsok és a ROS-fogók kipróbálását célozta. Az antioxidánsok állatkísérletekben ígéretesnek tűntek, ám a klinikai vizsgálatok nem igazolták a várakozásokat.

Kísérleteinkben a Parkinson kór kezelésére törzskönyvezett MAO-B gátló rasagilin otoprotektív hatását vizsgáltuk. A hallásküszöböt BERA vizsgálattal mérve, ototoxikus aminoglikozid antibiotikum okozta egér halláskárosodás modellben kimutattuk a kanamycin által okozott hallásküszöb romlás dózisfüggő mérséklését. A hatás a rasagilin 6 mg/kg (s.c.) dózisánál szignifikánsnak bizonyult. A legkifejezettebb hatás az egerek hallásoptimumába eső 16 kHz-nél jelentkezett. A rasagilin állatkísérletekben tapasztalt neuroprotektív, antiapoptotikus és antioxidáns hatásai, az aminoglikozid károsodás egy-egy specifikus mechanizmusát célozva, magyarázhatják az otoprotektív hatást.

A rasagilin dopaminerg neurotranszmissziót erősítő hatása is hozzájárulhat a protekcióhoz. Ennek vizsgálatára, először az irodalomban, beállítottuk a cochleáris dopamin (DA) mérés módszerét egerekben. A laterális olivocochleáris efferensekből felszabaduló DA protektív hatást fejtett ki az excitotoxicitással szemben, ami meghatározó tényezője a szenzorineurális halláskárosodásoknak, így az aminoglikozid antibiotikumok okozta halláscsökkenésnek is. Kimutattuk, hogy a rasagilin dózisfüggő módon megemelte az elektromos stimulus által kiváltott DA szintjét akut egér cochlea preparátumban. Feszültségfüggő Na^{+}-, Ca^{2+}-csatorna- és DA transzporter gátlók alkalmazásával igazoltuk, hogy a rasagilin a DA visszavétel gátlása révén fokozza ezt az akciós potenciál függő hatást.

Az aminoglikozidok okozta halláskárosodás és általában a szenzorineurális halláscsökkenések hatékony gyógyszeres terápiája olyan gyógyszerek alkalmazását teheti szükségessé, melyek több ponton befolyásolják a patomechanizmust. A rasagilin, több támadáspontú hatásával és kedvező mellékhatás spektrumával, alkalmas lehet erre a célra. Klinikai kipróbálásra érdemesnek gondoljuk.

9. Summary

Sensorineural hearing losses are among the most frequent sensory deficits, but they lack effective drug therapies. The pathology of the different forms shows significant overlaps, i.e., excitotoxicity/oxidative stress/excessive elevation of ROS are considered to be the main causes. The majority of recent therapeutic approaches therefore focused on the trials of antioxidants and ROS scavengers in SNHLs. Although the antioxidant therapies in several animal studies seemed to be promising, clinical trials have failed to fulfil expectations.

We investigated the potential of rasagiline, an FDA-approved MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, as an otoprotectant. We showed a dose-dependent alleviation of the kanamycin-induced threshold shifts measured by ABR in an ototoxicant aminoglycoside antibiotic-based hearing loss model in mice.

This effect proved to be statistically significant at a 6 mg/kg (s.c.) dose. The most prominent effect appeared at 16 kHz, which is in the hearing sensitivity optimum for mice. The neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of rasagiline in animal models, all targeting a specific mechanism of aminoglycoside injury, may explain this otoprotection.

The dopaminergic neurotransmission enhancer effect of rasagiline might also contribute to the protection. We have set up, first in the literature, the method of measuring the release of dopamine (DA) in the mouse cochlea. DA, released from lateral olivocochlear fibres, was shown to exert a protective action against excitotoxicity, a pathological factor in SNHLs, including the aminoglycoside-induced one. We have shown that rasagiline enhanced the electric stimulation-evoked release of DA from an acute mouse cochlea preparation in a dose-dependent manner. Using inhibitors of voltage-gated Na^{+}-, Ca^{2+} channels and DA transporters, we revealed that rasagiline potentiated the action potential evoked-release of DA by inhibiting the reuptake.

The complex pathomechanism of aminoglycoside -induced hearing impairments and in general, SNHLs, most likely requires drugs acting on multiple targets for effective therapy. Rasagiline, with its multi-target action and favourable adverse effects profile, might be a good candidate for a clinical trial testing the otoprotective indication.

10. Irodalomjegyzék

Agarwal L, Pothier DD. (2009) Vasodilators and vasoactive substances for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Cochrane Database Syst Rev. CD003422.

Akao Y, Maruyama W, Shimizu S, Yi H, Nakagawa Y, Shamoto-Nagai M, Youdim MBH, Tsujimoto Y, Naoi M (2002) Mitochondrial permeability transition mediates apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous neurotoxin, and is inhibited by Bcl-2 and rasagiline, N-propargyl-1(R)-aminoindan. J Neurochem 82:913–923.

Alexander TH, Weisman MH, Derebery JM, Espeland MA, Ganz BJ, Gulya AJ, Hammerschlag PE, Hannley M, Hughes GB, Moscicki R, Nelson RA, Niparko JK, Rauch SD, Telian SA, Brookhouser PE, Harris JP (2009) Safety of high-dose corticosteroids for the treatment of autoimmune inner ear disease. Otol Neurotol.;30(4):443-448.

Al-Malky G, Dawson SJ, Sirimanna T, Baqkeris E, Suri R (2014) High-frequency audiometry reveals highprevalence of aminoglycoside ototoxicity in children with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. In press.

Atar O, Avraham KB (2005) Therapeutics of hearing loss: expectations vs reality. Drug Discov Today 10:1323–1330.

Bar-Am O, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH (2005) Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. FASEB J 19:1899–1901.

Basile AS, Huang JM, Xie C, Webster D, Berlin C, Skolnick P (1996) N-methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. Nat Med 2:1338–1343.

Battaglia A, Burchette R, Cueva R. (2008) Combination therapy (intratympanic dexamethasone + high-dose prednisone taper) for the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Otol Neurotol. 29(4):453-460.

Benedetti Panici P, Greggi S, Scambia G, Baiocchi G, Lomonaco M, Conti G, Mancuso S. (1993) Efficacy and toxicity of very high-dose cisplatin in advanced ovarian carcinoma: 4-year survival analysis and neurological follow-up. Int J Gynecol Cancer. 3:44–53.

Bennett MH, Kertesz T, Perleth M, Yeung P, Lehm JP. (2012) Hyperbaric oxygen for idiopathic sudden sensorineural hearing loss and tinnitus. Cochrane Database Syst Rev. 2012 CD004739.

Bernarding C, Strauss DJ, Hannemann R, Seidler H, Corona-Strauss FI (2013) Neural correlates of listening effort related factors: influence of age and hearing impairment. Brain Res Bull 91:21–30.

Boettcher FA, Henderson D, Gratton MA, Danielson RW, Byrne CD (1987) Synergistic interactions of noise and other ototraumatic agents. Ear Hear. 8(4):192-212.

Bondy, S. C., Lee, D. K. (1993). Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. Brain Research, 610(2), 229–33.

Boulikas T, Vougiouka M. (2004) Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). Oncol Rep. 11:559–595.

Brazil OV, Corrado AP. The curariform action of streptomycin. J Pharmacol Exp Ther. 120:452–459.

Brunton L. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill Medical, New York, 2011: 1350-1363

Carrillo MC, Minami C, Kitani K, Maruyama W, Ohashi K, Yamamoto T, Naoi M, Kanai S, Youdim MB (2000) Enhancing effect of rasagiline on superoxide

dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the dopaminergic system in the rat. *Life Sci*. 67:577-585.

Chau, J. K., Cho, J. J. W., & Fritz, D. K. (2012). Evidence-based practice: management of adult sensorineural hearing loss. Otolaryngol Clin North Am, 45(5), 941–58.

Chen JJ, Swope DM (2005) Clinical pharmacology of Rasagiline: A novel, second-generation propargylamine for the treatment of Parkinson Disease 45, 878-894

Choung YH, Taura A, Pak K, Choi SJ, Masuda M, Ryan AF. (2009) Generation of highly-reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of Corti treated with gentamicin. Neuroscience. 161:214–226.

Conlin AE, Parnes LS (2007) Treatment of sudden sensorineural hearing loss, II: a meta-analysis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 133(6):582-586.

Conlin AE, Parnes LS. (2007) Treatment of sudden sensorineural hearing loss, I: a systematic review. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 133(6):573-581.

Cvorovic L, Deric D, Probst R, Hegemann S. (2008) Prognostic model for predicting hearing recovery in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Otol Neurotol. 29(4):464-469.

d'Aldin C, Eybalin M, Puel JL, Charachon G, Ladrech S, Renard N, Pujol R (1995a) Synaptic connections and putative functions of the dopaminergic innervation of the guinea pig cochlea. Eur Arch Otorhinolaryngol 252:270–274.

d'Aldin C, Puel JL, Leducq R, Crambes O, Eybalin M, Pujol R (1995b) Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea. Hear Res 90:202–211.

De Groot JCMJ, Meeuwsen F, Ruizentaal WE, Veldman JE. (1990) Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea. Hear Res. 50:35–42.

Dodson HC (1997) Loss and survival of spiral ganglion neurons in the guinea pig after intracochlear perfusion with aminoglycosides. J Neurocytol 26:541–556.

Doleviczényi Z, Halmos G, Répássy G, Vizi ES, Zelles T, Lendvai B (2005) Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission. Neurosci Lett 385:93–98.

Doleviczényi Z, Vizi ES, Gacsályi I, Pallagi K, Volk B, Hársing LG, Halmos G, Lendvai B, Zelles T (2008) 5-HT6/7 receptor antagonists facilitate dopamine release in the cochlea via a GABAergic disinhibitory mechanism. Neurochem Res 33:2364–2372.

Duan M, Agerman K, Ernfors P, Canlon B (2000) Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 97:7597–7602.

Duggal P, Sarkar M. (2007) Audiologic monitoring of multi-drug resistant tuberculosis patients on aminoglycoside treatment with long term follow-up. BMC Ear Nose Throat Disord. 12:1–7.

Dulon D, Hiel H, Aurousseau C, Erre JP, Aran JM. (1993) Pharmacokinetics of gentamicin in the sensory hair cells of the organ of Corti: rapid uptake and long term persistence. C R Acad Sci III. 316:682–687.

Ehret G (1976) Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (Mus musculus). J Am Audiol Soc 1:179–184.

Eigeldinger-Berthou S, Meier C, Zulliger R, Lecaudé S, Enzmann V, Sarra G-M (2012) Rasagiline interferes with neurodegeneration in the Prph2/rds mouse. Retina 32:617–628.

Fausti SA, Frey RH, Henry JA, Olson DJ, Schaffer HI. (1992)Early detection of ototoxicity using highfrequency, tone burst-evoked auditory brainstem responses. J Am Acad Audiol. 1992; 3:397–404.

Fee WE Jr. (1980) Aminoglycoside ototoxicity in the human. Laryngoscope. 90:1–19.

Fernandez EA, Ohlemiller KK, Gagnon PM, Clark WW (2010) Protection against noise-induced hearing loss in young CBA/J mice by low-dose kanamycin. J Assoc Res Otolaryngol 11:235–244.

Fetterman BL, Saunders JE, Luxford WM. (1996) Prognosis and treatment of sudden sensorineural hearing loss. Am J Otol.17(4):529-536.

Filipo R, Attanasio G, Russo FY, Viccaro M, Mancini P, Covelli E. (2013) Intratympanic steroid therapy in moderate sudden hearing loss: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. Laryngoscope. 123(3):774-778.

Finberg JPM, Tenne M, Youdim MBH (1981) Tyramine antagonistic properties of AGN 1135, an irreversible inhibitor of monoamine oxidase type B. *Br J Pharmacol*. 73:65-74.

Finberg JPM (2010) Pharmacology of Rasagiline, a New MAO-B Inhibitor Drug for the Treatment of Parkinson's Disease with Neuroprotective Potential. Rambam Maimonides Med J 1:e0003.

Fisch U, Nagahara K, Pollak (1984) A. Sudden hearing loss: circulatory. Am J Otol. 5(6):488-491.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR (2007) New insights into the mechanism of action of amphetamines. Annu Rev Pharmacol Toxicol 47:681–698.

Fornai F, Chen K, Giorgi FS, Gesi M, Alessandri MG, Shih JC (1999) Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B-deficient mice: a brain dialysis study. J Neurochem 73:2434–2440.

Fransson A, Maruyama J, Miller JM, Ulfendahl M (2010) Post-treatment effects of local GDNF administration to the inner ears of deafened guinea pigs. J Neurotrauma 27:1745–1751.

Gáborján A, Lendvai B, Vizi ES (1999) Neurochemical evidence of dopamine release by lateral olivocochlear efferents and its presynaptic modulation in guinea-pig cochlea. Neuroscience 90:131–138.

Gáborján A, Lendvai B, Vizi ES (1999) Characterization of voltage dependent calcium channels on the lateral olivocochlear efferent fibers of the guinea pig. Neurosci Lett 269:49–51.

García Callejo FJ, Ramírez Sabio JB, Conill Tobías N, Sebastian Gil E, Orts Alborch MH, Marco Algarra J. (2006) Immunomediation or hyperviscosity in rapidly progressive sensorineural hearing loss. A therapeutic approach. Acta Otorrinolaringol Esp. 57(5):204-9.

Gardoni F, Zianni E, Eramo A, Canonico PL, Di Luca M (2011) Effect of rasagiline on the molecular composition of the excitatory postsynaptic density. Eur J Pharmacol 670:458–463.

Garrick NA, Murphy DL (1980) Species differences in the deamination of dopamine and other substrates for monoamine oxidase in brain. Psychopharmacology (Berl) 72:27–33.

Gil-Loyzaga PE (1995) Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. Acta Otolaryngol 115:222–226].

Gotz ME, Breithaupt W, Sautter J, Kupsch A, Schwarz J, Oertel WH, Youdim MB, Riederer P, Gerlach M (1998) Chronic TVP-1012 (rasagiline) dose-activity response of monoamine oxidases A and B in the brain of the common marmoset. *J Neural Transm*. 52(suppl):271-278.

Guthrie OW (2008) Aminoglycoside induced ototoxicity. Toxicology 249:91–96.

Gyires K, Fürst Zs A farmakologia alapjai, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2011: 828-875.

Halmos G, Gáborján A, Lendvai B, Répássy G, Szabó LZ, Vizi ES (2000) Veratridine-evoked release of dopamine from guinea pig isolated cochlea. Hear Res 144:89–96.

Halmos G, Doleviczényi Z, Répássy G, Kittel A, Vizi ES, Lendvai B, Zelles T (2005) D2 autoreceptor inhibition reveals oxygen-glucose deprivation-induced release of dopamine in guinea-pig cochlea. Neuroscience 132:801–809.

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

Han CS, Park JR, Boo SH, Jo JM, Park KW, Lee WY, Ahn JG, Kang MK, Park BG, Lee H (2009) Clinical efficacy of initial intratympanic steroid treatment on sudden sensorineural hearing loss with diabetes. Otolaryngol Head Neck Surg. 141(5):572-578.

Harris MS, Gilbert JL, Lormore KA, Musunuru SA, Fritsch MH. (2011) Cisplatin ototoxicity affecting cochlear implant benefit. Otol Neurotol. 32:969–972.

Hársing LG, Vizi ES (1984) Release of endogenous dopamine from rat isolated striatum: effect of clorgyline and (-)-deprenyl. Br J Pharmacol 83:741–749.

Hawkins JE (1973) Comparative otopathology: aging, noise, and ototoxic drugs. Adv Otorhinolaryngol 20:125–141.

Hawkins, JE. Drug ototoxicity. (1976) In: Keidel, WD, Neff, WD, editors. Sensory Physiology. Vol. 5. Berlin: Springer Verlag; p. 707-748.

Haynes DS, O'Malley M, Cohen S, Watford K, Labadie RF. (2007) Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. Laryngoscope. 117(1):3-15.

Heikkila RE, Duvoisin RC, Finberg JP, YoudimMB. (1985) Prevention of MPTP-induced neurotoxicity by AGN-1133 and AGN-1135, selective inhibitors of monoamine oxidase-B. *Eur J Pharmacol*. 1985;116:313-317.

Heller J. (1984) Effect of some simple manoeuvres on the course of acute renal failure after gentamycin treatment in rats. Int Urol Nephrol. 16:243–251.

Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH (2006) The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. Ear Hear 27:1–19.

Hinshaw HC, Feldman WH. (1945) Streptomycin in treatment of clinical tuberculosis: a preliminary report. Proc Mayo Clinic. 20:313–318

Hoy SM, Keating GM (2012) Rasagiline: a review of its use in the treatment of idiopathic Parkinson's disease. Drugs 72:643–669.

Huang W, Chen Y, Shohami E, Weinstock M (1999) Neuroprotective effect of rasagiline, a selective monoamine oxidase-B inhibitor, against closed head injury in the mouse. Eur J Pharmacol 366:127–135.

Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG (2011) Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. Int J Otolaryngol 2011:937861.

Ikeda K, Saito Y, Nishiyama A, Takasaka T (1991) Effects of pH on intracellular calcium levels in isolated cochlear outer hair cells of guinea pigs. Am J Physiol 261:C231–6.

Imamura S, Adams JC. (2003) Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. J Assoc Res Otolaryngol. 4:176–195.

Jankovic J, Stacy M (2007) Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. CNS Drugs 21:677–692.

Jiang H, Sha SH, Forge A, Schacht J. (2006) Caspase-independent pathways of hair cell death induced by kanamycin in vivo. Cell Death Differ. 13:20–30.

Johnsson LG, Hawkins JE Jr, Kingsley TC, Black FO, Matz GJ. (1981) Aminoglycoside-induced cochlear pathology in man. Acta Otolaryngol Suppl. 383:1–19

Jose Pinheiro, Douglas Bates, Saikat DebRoy DS and the RDCT (2013) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-108.

Kaya, H., Koç, A. K., Sayın, I., Güneş, S., Altıntaş, A., Yeğin, Y., & Kayhan, F. T. (2014). Vitamins A, C, and E and selenium in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Eur Arch Otorhinolaryngol (Epub ahead of print)

Kirkwood A, Harris C, Timar N, Koren G. (2007) Is gentamicin ototoxic to the fetus? J Obstet Gynaecol Can. 29:140–145.

Kitani K, Minami C, Maruyama W, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC (2000) Common properties for propargylamines of enhancing superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat: implications for the life prolonging effect of (-)deprenyl. J Neural Transm Suppl:139–156.

Klemm E, Deutscher A, Mosges R (2009) A present investigation of the epidemiology of in idiopathic suden sensorineural hearing loss.Laryngorhinootologie 88(8):524-527.

Kohrman DC, Raphael Y (2013) Gene therapy for deafness. Gene Ther.

Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van de Water TR (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.

Körpinar S[1], Alkan Z, Yiğit O, Gör AP, Toklu AS, Cakir B, Soyuyüce OG, Ozkul H. (2011) Factors influencing the outcome of idiopathic sudden sensorineural

hearing loss treated with hyperbaric oxygen therapy. Eur Arch Otorhinolaryngol. 268(1):41-47.

Labus J, Breil J, Stutzer H, Michel O. (2010) Meta-analysis for the effect of medical therapy vs. placebo on recovery of idiopathic sudden hearing loss. Laryngoscope. 120(9):1863-1871.

Lamensdorf I, Youdim MB, Finberg JP (1996) Effect of long-term treatment with selective monoamine oxidase A and B inhibitors on dopamine release from rat striatum in vivo. J Neurochem 67:1532–1539.

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

Lerner SA, Schmitt BA, Seligsohn R, Matz GJ. (1986) Comparative-study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. Am J Med. 80:98–104.

Lipton P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. Physiol. Rev. 79: 1431-568

Liu K, Jiang X, Shi C, Shi L, Yang B, Shi L, Xu Y, Yang W, Yang S (2013) Cochlear Inner Hair Cell Ribbon Synapse is the Primary Target of Ototoxic Aminoglycoside Stimuli. Mol Neurobiol. 48(3):647-54

Maison SF, Usubuchi H, Liberman MC (2013) Efferent feedback minimizes cochlear neuropathy from moderate noise exposure. J Neurosci 33:5542–5552.

Makary CA, Shin J, Kujawa SG, Liberman MC, Merchant SN (2011) Age-related primary cochlear neuronal degeneration in human temporal bones. J Assoc Res Otolaryngol 12:711–717.

Marshak, T., Steiner, M., Kaminer, M., Levy, L., & Shupak, A. (2014). Prevention of Cisplatin-Induced Hearing Loss by Intratympanic Dexamethasone: A Randomized Controlled Study. Otolaryngol Head Neck Surg 150(6):983-990.

Maruyama W, Naoi M. (1999) Neuroprotection by (-)-deprenyl and related compounds. *Mech Ageing Dev*. 111:189-200

Maruyama W, Yamamoto T, Kitani K, Carrillo MC, Youdim M, NaoiM. (2000) Mechanism underlying anti-apoptotic activity of a (-)deprenyl related propargylamine, rasagiline. *Mech Ageing Dev*. 116:181-191.

Maruyama W, Youdim MB, Naoi M (2001) Antiapoptotic properties of rasagiline, N-propargylamine-1(R)-aminoindan, and its optical (S)-isomer, TV1022. Ann N Y Acad Sci 939:320–329.

Maruyama W, Akao Y, Youdim MBH, Boulton AA, Davis BA, Naoi M. (2001) Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of gluyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxinN-methyl(R)salsolinol. *JNeurochem*. 78:727-735.

MaruyamaW, Akao Y, CarrilloMC, Kitani K, YoudiumMB, Naoi M. (2002) Neuroprotection by propargylamines in Parkinson's disease: suppression of apoptosis and induction of prosurvival genes. *Neurotoxicol Teratol*. 24:675-682.

Maruyama J, Miller JM, Ulfendahl M (2008) Glial cell line-derived neurotrophic factor and antioxidants preserve the electrical responsiveness of the spiral ganglion neurons after experimentally induced deafness. Neurobiol Dis 29:14–21.

Mathog RH, Klein WJ Jr. (1969) Ototoxicity of ethacrynic acid and aminoglycoside antibiotics in uremia. N Engl J Med. 280:1223–1224.

Mattox DE, Simmons FB (1977) Natural hitory of sudden sensorineural hearing loss. Ann Otol Rhinol Laryngol., 86(4, pt 1):463-480

McCall AA, Swan EE, Borenstein JT, Sewell WF, Kujawa SG, McKenna MJ. (2010) Drug delivery for treatment of inner ear disease: current state of knowledge. Ear Hear. 31(2):156-165.

Md Daud MK, Mohamadl H, Haron A, Rahman NA (2014) Ototoxicity screening of patients treated with streptomycin using distortion product otoacoustic emissions. B-ENT. 10:53-8

Moore RD, Smith CR, Lietman PS. (1984) Risk factors for the development of auditory toxicity in patients receiving aminoglycosides. J Infect Dis. 149:23–30.

Mukherjea D, Rybak LP, Sheehan KE, Kaur T, Ramkumar V, Jajoo S, Sheth S (2011) The design and screening of drugs to prevent acquired sensorineural hearing loss. Expert Opin Drug Discov 6:491–505.

Nakagawa T, Yamane H, Takayama M, Sunami K, Nakai Y. (1998) Apoptosis of guinea pig cochlear hair cells following chronic aminoglycoside treatment. Eur Arch Otorhinolaryngol. 255:127–131.

National Institute of Deafness and Communication Disorders. Sudden Deafness. 2000. http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/sudden.htm

Nekrassov V, Sitges M (2000) Vinpocetine protects from aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss in guinea pig in vivo. Brain Res 868:222–229.

Noben-Trauth K, Johnson KR (2009) Inheritance patterns of progressive hearing loss in laboratory strains of mice. Brain Res 1277:42–51.

Norris CH. (1988) Drugs affecting the inner ear: a review of their clinical efficacy, mechanisms of action, toxicity, and place in therapy. Drugs. 36(6):754-772.

Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D (1997) Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs. Hear Res 107:46–52.

Ohmori H (1992) Afferent and efferent synaptic transmission in hair cells. News Physiol Sci., 11:161-166

Ohno K, Noguchi Y, Kawashima Y, Yagishita K, Kitamura K. (2010) Secondary yperbaric oxygen therapy for idiopathic sudden sensorineural hearing loss in the subacute and chronic phases. J Med Dent Sci. 57(2):127-32.

Pellegrini-Giampietro DE, Cozzi A, Peruginelli F, Leonardi P, Meli E, Pellicciari L, Moroni F (1999) 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)-2-(3′-carboxybicyclo[1.1.1] pentyl)-glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in in vitro and in vivo models of cerebral ischaemia. *Eur J Neurosci*. 11:3637-3647.

Poirrier AL, Pincemail J, Van Den Ackerveken P, Lefebvre PP, Malgrange B (2010) Oxidative stress in the cochlea: an update. Curr Med Chem 17:3591–3604.

Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nat Genet. 4:289–294.

Puel J. L. (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. Prog. Neurobiol. 47: 449-476.

Pujol R (1994) Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. Br J Audiol 28:185–191.

Pujol R, Puel JL, Gervais d’Aldin C, Eybalin M (1993) Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. Acta Otolaryngol 113:330–334.

Psillas G, Pavlidis P, Karvelis I, Kekes G, Vital V, Constantinidis J. (2008) Potential efficacy of early treatment of acute acoustic trauma with steroids and piracetam after gunshot noise. Eur Arch Otorhinolaryngol. 265(12):1465-9.

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. Available at: http://www.r-project.org/.

Rauch SD (2008) Clinical practice: idiopathic sudden sensorineural hearing loss. N Engl J Med. 359(8):833-840.

Reynolds, I. J., Hastings, T. G. (1995). Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. The Journal of Neuroscience 15 (5 Pt 1), 3318–27.

Rudnicki A, Avraham KB (2012) microRNAs: the art of silencing in the ear. EMBO Mol Med 4:849–859.

Ruedi L. (1952) Further observations concerning the toxic effects of streptomycin and quinine on the auditory organ of guinea pigs. Laryngoscope. 62:333–357.

Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel J-L (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. Hear Res 227:19–27.

Ryals B, Westbrook E, Schacht J. (1997) Morphological evidence of ototoxicity of the iron chelator deferoxamine. Hear. Res. 112:44–48.

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

Salonen, J., Johansson, R., Karjalainen, S., Vahlberg, T., Jero, J. P., & Isoaho, R. (2013). Hearing aid compliance in the elderly. B-ENT, 9(1), 23–8.

Schacht J, Talaska AE, Rybak LP (2012) Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. Anat Rec (Hoboken) 295:1837–1850.

Schultz-Coulon HJ (1985) Hearing in advanced age: critical view of so-called presbycusis. HNO 33:2-10.

Sha SH, Kanicki A, Halsey K, Wearne A, Schacht J. (2012) Antioxidant-enriched diet does not delay the progression of age related hearing loss Neurobiol Aging. 33(5):1010.e15-6.

Sha SH, Schacht J (1999) Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. Hear Res 128:112–118.

Siderowf A, Stern M (2006) Clinical trials with rasagiline: evidence for short-term and long-term effects. Neurology 66:S80–8.

Song BB, Schacht J. (1996) Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. Hear Res. 94:87–93.

Song BB, Anderson DJ, Schacht J (1997) Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. J Pharmacol Exp Ther 282:369–377.

Song BB, Sha SH, Schacht J. (1998) Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo- and vestibulo-toxicity. Free Radic Biol Med. 25:189–195.

Speiser Z, Mayk A, Eliash S, Cohen S (1999) Studies with rasagiline, a MAO-B inhibitor, in experimental focal ischemia in the rat. J Neural Transm 106:593–606.

Stachler RJ, Chandrasekhar SS, Archer SM, Rosenfeld RM, Schwartz SR, Barrs DM, Brown SR, Fife TD, Ford P, Ganiats TG, Hollingsworth DB, Lewandowski CA, Montano JJ, Saunders JE, Tucci DL, Valente M, Warren BE, Yaremchuk KL, Robertson PJ (2012) Clinical practice guideline: sudden hearing loss. Otolaryngol Head Neck Surg. 146(3 Suppl):S1-35.

Stennert E, Limberg C, Vollrath M (1979) Bellsche Parese — ein neues Therapiekonzept und seine bisherigen klinischen Ergebnisse. Archives of oto-rhino-laryngology. 223: 402-403 - németül

Stern MB, Marek KL, Friedman J, Hauser RA, LeWitt PA, Tarsy D, Olanow CW (2004) Double-blind, randomized, controlled trial of rasagiline as monotherapy in early Parkinson's disease patients. *Mov Disord*. 19:916-923.

Streetman DS, Nafziger AN, Destache CJ, Bertino AS Jr. (2001) Individualized pharmacokinetic monitoring results in less aminoglycoside-associated nephrotoxicity and fewer associated costs. Pharmacotherapy. 21:443–451.

Suckfüll M, Hearing Loss Study Group (2002) Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial. The Lancet 360: 1811–1817.

Suzuki H, Furukawa M, Kumagai M, Takahashi E, Matsuura K, Katori Y, Shimomura A, Kobayashi T (2003) Defibrinogenation therapy for idiopathic sudden sensorineural hearing loss in comparison with high-dose steroid therapy. Acta Otolaryngol. 123(1):46-50.

Swan SK. (1997) Aminoglycoside nephrotoxicity. Semin Nephrol. 17:27–33.

Tabakman R, Lecht S, Lazarovici P (2004) Neuroprotection by monoamine oxidase B inhibitors: a therapeutic strategy for Parkinson's disease? Bioessays 26:80–90.

Tabuchi K, Nishimura B, Tanaka S, Hayashi K, Hirose Y, Hara A (2010) Ischemia-reperfusion injury of the cochlea: pharmacological strategies for cochlear protection and implications of glutamate and reactive oxygen species. Curr Neuropharmacol 8:128–134.

Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. (2005) Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. Contrib Nephrol. 148:107–121.

Thebault JJ, Guillaume M, Levy R. (2004) Tolerability, safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rasagiline: a potent, selective, and irreversible monoamine oxidase type B inhibitor. *Pharmacotherapy*. 24:1295-1305.

Tran Ba Huy P, Bernard P, Schacht J. (1986) Kinetics of gentamicin uptake and release in the rat. Comparison of inner ear tissues and fluids with other organs. J Clin Invest. 77:1492–1500.

van der Veen EL, van Hulst RA, de Ru JA. (2014) Hyperbaric Oxygen Therapy in Acute Acoustic Trauma: A Rapid Systematic Review. Otolaryngol Head Neck Surg. 151:42-45

Van Ruijven MWM, de Groot JCMJ, Klis SFL, Smoorenburg GF (2005) The cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. Hear Res 205:241–248.

Vizi ES (1998) Different temperature dependence of carrier-mediated (cytoplasmic) and stimulus-evoked (exocytotic) release of transmitter: a simple method to separate the two types of release. Neurochem Int 33:359–366.

Vizi ES, Palkovits M, Lendvai B, Baranyi M, Kovacs KJ, Zelles T (2004) Distinct temperature-dependent dopamine-releasing effect of drugs of abuse in the olfactory bulb. Neurochem Int 45:63–71.

Vizi ES, Kisfali M, Lőrincz T (2013) Role of nonsynaptic GluN2B-containing NMDA receptors in excitotoxicity: evidence that fluoxetine selectively inhibits these receptors and may have neuroprotective effects. Brain Res Bull 93:32–38.

Vlasits AL, Simon J a, Raible DW, Rubel EW, Owens KN (2012) Screen of FDA-approved drug library reveals compounds that protect hair cells from aminoglycosides and cisplatin. Hear Res 294:153–165.

Warnes GR (2011) gmodels: Various R programming tools for model fitting. R package version 2.15.1. Available at: http://cran.r-roject.org/package=gmodels.

Wei BP, Mubiru S, O'Leary S. (2006) Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Cochrane Database Syst Rev.(1):CD003998.

Weinreb O, Bar-Am O, Amit T, Chillag-Talmor O, Youdim MB. (2004) Neuroprotection via pro-survival protein kinase C isoforms associated with Bcl-2 family members. *FASEB J*. 18:1471-1473.

Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Chillag-Talmor O, Youdim MBH (2005) Novel neuroprotective mechanism of action of rasagiline is associated with its propargyl moiety: interaction of Bcl-2 family members with PKC pathway. Ann N Y Acad Sci 1053:348–355.

Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Youdim MBH (2010) Rasagiline: a novel anti-Parkinsonian monoamine oxidase-B inhibitor with neuroprotective activity. Prog Neurobiol 92:330–344.

Weiss, D., Neuner, B., Gorzelniak, K., Bremer, A., Rudack, C., & Walter, M. (2014). Platelet glycoproteins and fibrinogen in recovery from idiopathic sudden hearing loss. *PloS One*, *9*(1), e86898

Wersäll J, Lundquist PG, Björkroth B. (1969) Ototoxicity of gentamicin. J Infect Dis. 119:410–416

Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J (2001) Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. Hear Res 158:165–178.

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

Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K (2013) Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. Hear Res 303:30–38.

Yıldırım E, Murat Özcan K, Palalı M, Cetin MA, Ensari S, Dere H. (2013) Prognostic effect of hyperbaric oxygen therapy starting time for sudden sensorineural hearing loss. Eur Arch Otorhinolaryngol. [Epub ahead of print]

Ylikoski J, Wersäll J, Björkroth B (1974) Degeneration of neural elements in the cochlea of the guinea-pig after damage to the organ of corti by ototoxic antibiotics. Acta Otolaryngol Suppl 326:23–41.

Youdim MBH, Wadia JS, TattonWG. (1999) Neuroprotective properties of the antiparkinson drug rasagiline and its optical S-isomer [abstract]. *Neurosci Lett*. 55:S45.

Youdim MBH, Gross A, Finberg JPM (2001) Rasagiline (N-propargyl-1R(+)-aminoindan), a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. Brit. J. of Pharmacol. 132, 500-506

Youdim MBH, Bar Am O, Yogev-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M, Amit T (2005) Rasagiline: neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. J Neurosci Res 79:172–179.

Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. Nat Rev Neurosci 7:295–309.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertációhoz felhasznált 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.

Halmos, G., Horváth, T., **Polony, G.**, Fekete, A., Kittel, A., Vizi, E. S., Van Der Laan, B F A M 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.

11.2. A témához kapcsolódó egyéb publikációk

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.

11.3. A témához nem kapcsolódó egyéb publikációk

Polony G. Sóoldatos orröblítés felső légúti betegségekben. **(2010)** – Kommentár **Orvostovábbképző Szemle**, 17:(3) pp. 76-77.

Polony G (2006) Az orrvérzések általános orvosi vonatkozásai. **Háziorvostovábbképző Szemle**, 11:(8) pp. 815-818.

Polony G, Péter I, Fodor J, Tímár E, Zalatnay A, Jeney A **(2001)** A kollagenáz enzim jelentősége az emlőcarcinoma progressziójában **Magyar onkológia,** 45: p. 294.

Polony G, Tímár F, Oláh J, Pogány G, Kralovánszky J, Adleff V, Budai B, Jeney A **(2000)** The modification of the cytostatic effect of 5-FU in the presence of extracellular matrix. Abstracts of Semmelweis Symposium - **Oncology** p. 83

Kender Z, **Polony, G.**, Gődény M, Léránt G, Székely E, Igaz P, Rácz K, Tóth M **(2012)** Sinomaxillary myopericytoma associated with oncogenic osteomalacia. **Endocrine abstracts,** 29: Paper P166.

Répássy G, Tamás L, **Polony G.** Epistaxis In: Tamás L (szerk.) Fül-orr-gégészeti útmutató, **2007**: Fül-orr-gégészeti irányelvek és terápiás ajánlások. 192 p. Budakeszi: Mediton Kiadó, 2007. pp. 106-108.

Pogany G, Timar F, Olah J, Harisi R, **Polony G**, Paku S, Bocsi J, Jeney A, Laurie GW **(2001)** Role of the basement membrane in tumor cell dormancy and cytotoxic resistance. **Oncology**, 60:(3) pp. 274-281.

Pogány G, Hariszi R, Tímár F, Oláh J, Paku S, **Polony G**, Jeney A **(2001)** Az extracelluláris mátrix komponenseinek hatása a tumorsejtek biológiai és biokémiai sajátosságaira. **Magyar onkológia**, 45:(3) p. 254.

Pogány G, Timár F, Oláh J, Harisi R, **Polony G**, Bocsi J, Jeney A, Laurie G W **(2000)** Basement membrane induced cell type specific dormancy of tumor cells. **Clinical & Experimental metastasis**, 17: p. 756.

Pogány G, Timár F, **Polony G**, Oláh J, Jeney A **(1999)** Az extracellularis mátrix szerepe a tumorsejtek citoreduktív kezeléssel szembeni válaszreakciójában. **Magyar onkológia**, 43: pp. 49-53.

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Vizi E. Szilveszter Professzor Úrnak, és Zelles Tibornak akiknek a segítsége, útmutatásai, lelkesítése nélkül nem készülhetett volna el ez az értekezés. Hálás vagyok, hogy kutatómunkámat az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben végezhettem ahol ehhez a feltételek a legmagasabb nemzetközi színvonalon voltak biztosítottak.

Szeretnék köszönetet mondani volt és jelenlegi főnökeimnek, Répássy Gábor Professzor Úrnak és Tamás László Tanár Úrnak, akik kutatási tevékenységemet támogatták.

Köszönet illeti minden kollégámat, akik a Semmelweis Egyetem Fül-orr-gége, Fej-, Nyaksebészeti klinikáján Ph.D. napomon helyettem is dolgoztak a betegellátásban.

Köszönet illeti Gáborján Anitát, aki a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben izolált tengerimalac cochleán az *in vitro* mikrotérfogatú perfúziós technikával való dopamin mérést beállította, valamint Szabó Szilárdot, aki sok munkával és türelemmel beállította az objektív hallásvizsgálathoz szükséges ABR készülékeket és segített kidolgozni a mérési módszereket.

Köszönetet szeretnék mondani Halmos Györgynek, aki segített elindítani a kezdeti kísérleteket, valamint Horváth Tamásnak a munkánk közös részéért, Szabó Szilárdnak, Őszi Juditnak kísérleteimhez nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Humli Viktóriát és Aller Mátét, akik áldozatos munkájukkal hozzájárultak kísérleteink és közös munkánk sikeréhez.

Kísérleteink egy részéhez anyagi támogatást nyújtott a rasagilin gyártója, a TEVA Gyógyszergyár. Ők biztosították a rasagilint is a kísérletekhez.

Külön köszönet illeti szüleimet, akik kezdetektől bátorítottak klinikai munkám mellett a tudományos munka végzésére is.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom feleségemnek és gyermekeimnek kutatómunkám és az értekezés megírása alatti megértésükért és támogatásukért.