

## 1. A nem szindrómás nagyothallás több génes öröklődésének vizsgálata

Európában ill. Magyarországon az un. gap junction proteint kódoló *GJB2* gén (Connexin 26) mutációi felelősek leggyakrabban a veleszületett, nem szindrómás nagyothallásért. A különböző connexin gének recesszív öröklődésű heterozigóta mutációinak hatása összegződhet és együtt már nagyothallást eredményezhet. Korábban kimutattuk, hogy a magyarországi populációban a veleszületett nagyothallásért leggyakrabban felelős genetikai hiba a *GJB2* (Connexin 26) génben van. A leggyakoribb genetikai eltérés a 35delG deléció, valamint a R127H (c.380G>A) és W24X (c.71G>A) mutációk voltak. A kontroll csoportban a 35delG hordozási gyakorisága 4,8%-t mutatott.

Az esetek kb. 20%-ban csak 1 heterozigóta recesszív genetikai eltérés volt detektálható a *GJB2* génben. Mivel a különböző connexin gének recesszív öröklődésű heterozigóta mutációinak hatása összegződhet és együtt már többgénes nagyothallást eredményezhetnek, ezért további két connexin gént (*GJB3* és *GJB6*) ill. a *GJB2* gén 5' nem kódoló szakasz splice site régióját is megvizsgáltuk 47 nagyothalló esetben, akiknél a *GJB2* gén kódoló exonjában csak egy mutáció volt kimutatható. Tizenegy DNS mintában volt detektálható a *GJB2* gén 5' nem kódoló szakasz splice site régiójának -3170>A mutációja. Egy p.R127H heterozigóta beteg esetében ez a genetikai eltérést homozigóta formában identifikáltuk. A *GJB6* génben egy deléciót [ $\Delta$ (*GJB6*-D13S1830)] (2 fő), míg a *GJB3* génben 3 féle nukleotid cserét (2 új és 1 ismert) [c.357C>T, c.798C>T és c.94C>T (p.R32W)] találtunk. Eredményeink a -3170>A mutáció rutin vizsgálatának fontosságára hívja fel a figyelmet különösen a *GJB2* heterozigóta nagyothalló esetekben. A *GJB3* és a *GJB6* gének vizsgálata – a bennük előforduló mutációk alacsony előfordulási gyakorisága miatt - nem érdemes, hogy a rutin diagnosztika részét képezze.

A nagyothallás génvizsgálatát a *pres* gén vizsgálatára is kiterjesztettük. Tanulmányunk során 50 ismeretlen eredetű, 30-60 dB közötti nem szindrómás nagyothalló beteg és 50 normál hallású egyén (kontroll csoport) DNS mintájában a *pres* gén molekuláris genetikai analízisét végeztük el. A prestin fehérjét kódoló gén – *pres* – a hetes (7q22.1) human kromoszómán helyezkedik el és 21 kódoló exonból áll. Elektromos impulzus hatására intracellulárisan klór iont köt meg, és a membránfeszültség hatására azt az extracelluláris tér irányába mozgatja úgy, hogy az ion nem kerül ki az extracelluláris térbe (inkomplett transzporter). Az anion vándorlása a fehérjén belül konformáció változást idéz elő, amely a sejt alakváltozásához vezet és a külső szőrsejt hosszát akár 3-5% növelni tudja, így a hallásunkat 40-50 dB-lel javítja, valamint a frekvencia szelektivitását is nagymértékben emeli. Egy nagyothalló fiú gyermek és teljes hallású apa esetében a 6. kódoló exonban p.R150Q misszensz mutáció volt kimutatható heterozigóta formában. Erre a mutációra nézve a kontroll csoportban nem volt hordozó személy. Az p.R150Q mutációt tartalmazó DNS-ről - emberi vese sejtvonalban-szintetizálódott fehérjén végeztük el a funkcionális analízist, un. teljes sejt patch-clamp elektrofiziológiai módszerrel. A külső szőrsejt elektromotilitását jelző non-linearis kapacitás funkció (NLC) hasonló volt a vad és a mutáns sejtvonalban, bár az R150Q mutáns in vitro 25%-os erősítésbeni csökkenést mutatott. A kapott eredményt összevetve a fenotípussal megállapítható, hogy a 75% -os csökkent funkció is elég a megfelelő erősítéshez. Ez volt az első olyan genetikai és elektrofiziológiai vizsgálat, amely a *pres* gén kódoló exonjában genetikai hibát mutatott ki.

## 2. A vezetékes halláscsökkenést okozó stapes fixációk etiopathogenezisének vizsgálata

Az otosclerosis kanyaróvírus által okozott gyulladással járó betegség. Az otosclerosis kapcsán az oticus capsula és a stapes talp káros csontátépülése zajlik, melyet gyulladással és a csontanyagcserében szerepet játszó citokinek megváltozott expressziója, valamint a kanyaróvírus által aktivált celluláris immunválasz együttesen okoz. Az otosclerosis stapes fixáció jelentősen fokozott TNF-alfa expresszióval jellemezhető, melynek mértéke függ az otosclerosis szövettani aktivitásától, valamint a tünetek fennállási idejétől. A TNF-alfa expresszió mértéke összefügg az otosclerosis által okozott szenzorineurális halláscsökkenés fokával. Feltételezzük, hogy az otosclerosis kísérelő szenzorineurális halláscsökkenést gyulladással járó citokinek okozzák. Otosclerosis esetén a TNF-alfa antagonistaként működő osteoprotegerin szintje jelentősen csökkent, különösen

a kezdeti-, igen aktív stádiumokban. Feltehetően ez a fenomén is hozzájárul a fokozott csontremodellációhoz és az újabb otosclerosis góccok megjelenéséhez. A nem otosclerosis stapes ankylosis nem eredményez változást a TNF-alfa illetve egyéb gyulladásos cytokinek expressziójában. Az osteoprotegerin szintek sem kórosak. Az otosclerosis szövettani aktivitása, a tünetek első megjelenésétől eltelt idő, a TNF-alfa expresszió valamint az audiológiai módszerekkel kifejezett aktivitás között igen szoros párhuzam figyelhető meg. A stapes fixáció eredményeképpen létrejött vezetési halláscsökkenés nem egységes kórkép, két fő csoportra osztható: otosclerosis és nem-otosclerosis stapes ankylosis (pseudo-otosclerosis). Ez utóbbi heterogén kórfolyamatok gyűjtőcsoportja, melyek patológiai alapját nem gyulladásos, degeneratív folyamatok képezik. Az otosclerosis a folyamat aktivitásától függetlenül igen alacsony, néha kimutathatatlan kanyaróvírus ellenes szérumszinttel jár, amely alkalmas lehet a betegség preoperatív diagnózisára is.

### 3. Percepció nagyothallás modellezése izolált külső szőrsejt elektromodilitás modellen

A cochlearis külső szőrsejtek hallásélettani szerepe igen sokrétű, ezért az utóbbi időben a hallásélettani kutatások középpontjába kerültek. Ezek a sejtek nem csak az alacsony intenzitású hangok érzékelésében vesznek részt, hanem a cochlea összetett szabályzó rendszerének kulcsfontosságú elemei is. Korábbi kutatási eredményeink rávilágítottak arra, hogy ezek a sejtek rendelkeznek egy intrinzik szabályzó rendszerrel, melyen keresztül közvetlenül változtatható a cochleában zajló hangerősítés hatékonysága és a cochlea erős hanghatásokkal szembeni adaptációja. A cochlearis külső szőrsejtek említett intrinzik szabályzó rendszere képes megnövelni a sejtek mechanikai ellenállását (stiffness) és csökkenteni a sejt nyugalmi hosszát. Jelen kutatásaink eredményeként először sikerült bizonyítanunk, hogy a külső szőrsejtek mechanikai ellenállása több szinten szabályozott és elsőként sikerült kísérletes bizonyítékot adnunk arra, hogy a külső szőrsejtek mechanikai ellenállásának változtatása számottevően képes megváltoztatni a külső szőrsejtek hangerősítő funkcióját. Az eredményeink felhasználásával nem csak pontosítottuk és kiegészítettük azt a hallásélettani modellt, mely alapján feltételezhető volt egy ilyen jelenség megléte, hanem kísérletesen igazoltuk és matematikailag leírtuk a külső szőrsejtek mechanikai ellenállásának megváltozása által okozott hangerősítő funkcióváltozást. Ezek az eredmények közelebb visznek minket számos klinikai tünet megértéséhez, rávilágítanak a klinikumban evidenciaként kezelt, de tisztázatlan eredetű jelenségek sejt szintű okaira (pl.: a cochlea hangterheléssel szembeni fáradási jelensége, Meniere betegség akut rohamai kapcsán kialakuló átmeneti hallásvesztés, impulzus zajok által keltett kellemetlen hangélmény jelensége). Mindemellett ezek a kutatási eredmények további kutatási lehetőségeket nyitnak, melyek eredményei akár közvetlenül is felhasználhatók lesznek a klinikumban.

### 4. a) Deiter's sejtek káliumáramainak elektrofiziológiai jellemzése

A Corti szervben belül található a szőrsejtek, melyek a hallás tulajdonképpeni receptor sejtjei. A Corti alagúttól befelé a belső, ettől laterálisan a külső szőrsejtek. A külső szőrsejteket a Deiters-féle támasztósejtek határolják. A Deiters sejtek szoros kapcsolatban állnak a külső szőrsejttel, ahhoz mind az apikális, mind a bazális pólusán csatlakoznak, úgynevezett „mikromechanikai egységet” alkotnak (Laffon). A Deiters sejtek szerepe a cochleáris mikromechanikában és a belső fül elektrolit homeosztázisában így a hallás percepciójának folyamatában még nem tisztázott. Feltételezések szerint a Deiters sejtek a külső szőrsejtek erősítő mechanizmusát segítik, (Nenov, Slepecky). Mások a Deiters sejteknek a belső fül elektrolit homeosztázisában játszott regulátor szerepét vetik fel (Laffon). A korábbi kísérletekben csak morfológiai eltéréseket sikerült kimutatni a Deiters sejtek között, funkcionális különbségeket nem sikerült detektálni (Laffon).

Kísérleteink célja a sejtek funkcionális vizsgálata során a sejtek kifelé irányuló feszültségfüggő  $K^+$  áramának karakterizálása, a sejtek morfológiája és áramkarakterisztikája közötti esetleges kapcsolat, valamint a Deiters sejtek cochleában betöltött szerepének vizsgálata.

Az elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a Deiters sejtek kifelé irányuló feszültségfüggő  $K^+$  áramáért két különálló csatorna populáció felelős.

A sejtek depolarizációja során kialakuló kifelé irányuló áram inaktivációja két fázisú volt. Ez a két fázisú inaktiváció két feszültségfüggő, eltérő inaktivációs kinetikával rendelkező  $K^+$  csatorna meglétét feltételezi. Azonban találtunk öt sejtet, amelyek inaktivációs kinetikája monofázisú volt, ezeken a sejteken egy  $K^+$  csatorna volt jelen. ChTx és TEA eltérő mértékben blokkolta a gyors és a lassú komponens. 10 nM ChTx sejtekhez adásakor a blokkolt áramban főként a gyorsan inaktíváló komponens volt jelen, míg 1 mM TEA esetén a blokkolt áram főként a lassan inaktíváló komponens tartalmazta

Nenov és mtsai azt feltételezték, hogy az egyik kifelé kapuzó feszültségfüggő  $K^+$  csatorna valószínűleg  $Kv1.5$  típusú. A mi farmakológiai eredményeink ezt nem igazolták. A ChTx és TEA szenzitivitás, valamint az inaktivációs kinetika alapján a gyorsan inaktíváló áramkomponens létrehozó csatorna tartozhat a  $Kv 1.3$  típusba (Grissmer, Somodi). A lassan inaktíváló áramkomponensért felelős csatorna molekuláris azonosítása még a további kísérletek feladata.

A vizsgált Deiters sejtek nem képeztek homogén populációt. A sejteket két csoportra osztottuk: vastag sejttestű Deiters sejtek, melyek rövid KSZ-hez kapcsolódnak és vékony típusú sejtek, melyek hosszú KSZ-hez kapcsolódnak. Az áram mérési adatok alapján a vékony és a vastag típusú sejtek felszínén ugyanazok a  $K^+$  csatornák találhatóak. A két csoport között nem volt különbség a mért két fázisú áramgörbe inaktivációs időállandói között, ugyanakkor a vékony sejteken nagyobb áramamplitúdót mértünk, mely a gyorsan inaktíváló áramkomponens nagyobb abszolút expressziójának következménye. Ennek megfelelően az áramkomponensek aránya eltérő volt a két morfológiai csoport között. A különböző  $K^+$  konduktanciával rendelkező Deiters sejtek, melyek a cochleában eltérő helyen találhatóak, eltérő mértékben befolyásolják a belső fül  $K^+$  recirkulációs mechanizmusát, melynek zavara percepció halláscsökkenéshez vezet.

#### 4.b) Zajkezelt tengeri malacok külső szőrsejtjeinek purinoceptor megoszlása és intracelluláris kalciumszintje

A környezeti ártalmak, mint például a tartós zajhatás a belső fül sejtjes elemeinek károsítása révén idegi típusú halláscsökkenéshez vezetnek (Décori, Subramaniam). A belső fül sejtek közül a legérzékenyebb sejtek a külső szőrsejtek, ezek közül is a magas hangok percepciójában szerepet játszó, bazális csavarulaton elhelyezkedő sejtek. Zaj hatására a külső szőrsejtek sztereocíliumai sérülnek, károsodnak a sejtek mitokondriumai. Ezen folyamatok végül a sejtek duzzadásához, funkciójuk elvesztéséhez és végül a sejtek pusztulásához vezetnek (Saunders, Berridge). Feltételezések szerint ezen károsító mechanizmusok hátterében a sejtek ionháztartásának felborulása és különösen a  $Ca^{2+}$  szint változása áll, mely sejtfalmerevség változást hoz létre a külső szőrsejt oldalfalán (Batta, 2003; Batta, 2004).

Kísérleteinkben megmértük a tartós, közepes intenzitású zajterhelés (80 dB SPL, 14 napig) hatására bekövetkező nyugalmi  $Ca^{2+}$  szint változást. Tartós zajterhelés hatására a sejtek intracelluláris nyugalmi  $Ca^{2+}$  szintje megemelkedett, mely eltérés kifejezettebb volt a bazális csavarulatokról preparált sejtekben, melyek a magas frekvenciájú hangok percepciójáért felelősek. A zajterhelés képes megváltoztatni a külső szőrsejtek különböző neurotranszmitterekre adott válaszát is. 180  $\mu$ M ATP hatására a kezelt sejtekben kisebb volt a  $Ca^{2+}$  szint emelkedés. Ezen mérések során szintén találtunk eltérést a cochlea bazális és apikális csavarulatáról származó sejtek között. A folyamatos KSZ stimuláció, és az ennek következtében kialakuló magasabb nyugalmi intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint a sejt felszíni purinerg receptorok expresszióját csökkentette, mely állhat a kísérleteink során megfigyelt kisebb amplitúdójú és hosszabb latenciával kialakuló ATP-re adott  $Ca^{2+}$  válasz hátterében.

A kezelt sejtek ATP adás után létrejövő kisebb mértékű válaszkészsége a sejtek funkciójának csökkenését jelenti, a tartósan magas nyugalmi  $Ca^{2+}$  szint a sejtek pusztulásához, irreverzibilis idegi típusú halláscsökkenéshez vezet.