

Anna Wolniakowska

Ocena ochronnego działania D-metioniny na narząd słuchu w urazie akustycznym

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Praca wykonana w Klinice Audiologii i Foniatrii Instytutu Medycyny Pracy im. J. Nofera
pod kierunkiem Prof. dr hab. med. Marioli Śliwińskiej-Kowalskiej

STRESZCZENIE

Uszkodzenie słuchu spowodowane hałasem (*noise-induced hearing loss*, NIHL) jest jedną z najczęstszych chorób zawodowych, a sam hałas poważnym zanieczyszczeniem środowiska. Z opublikowanych przez WHO raportów wynika, że ponad 466 milionów ludzi na świecie ma uszkodzenie słuchu, z czego ponad 40% osób jest dotkniętych niedosłuchem w stopniu umiarkowanym i głębokim, znacząco obniżającym jakość życia. Mimo wielu działań prowadzących do obniżenia poziomu hałasu, jest to czynnik niemożliwy do wyeliminowania ze względu na występowanie w każdym obszarze działalności człowieka, w tym zwłaszcza w środowisku pracy.

Stres oksydacyjny uważany jest za główny mechanizm prowadzący do rozwoju NIHL. Zaobserwowano, że już w okresie 1 – 2 godzin po ekspozycji na nadmierne poziomy dźwięków następuje wzmożona produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) w uchu wewnętrznym i poziom ten utrzymuje się nawet do 10 dni. Istotnym wydaje się być także fakt, że podwyższony poziom tych molekuł stwierdzono w komórkach słuchowych zanim zaobserwowane zostały jakiegokolwiek uszkodzenia.

Coraz lepsze zrozumienie mechanizmów oddziaływania hałasu na narząd słuchu umożliwia podejmowanie coraz skuteczniejszych kroków w opracowaniu terapii uszkodzeń słuchu wywołanych tym czynnikiem. Ze względu na istotny udział stresu oksydacyjnego w patogenezie NIHL, najwięcej uwagi poświęca się związkom zwiększającym endogenną obronę antyoksydacyjną, tzw. antyoksydantom. W kręgu potencjalnych związków terapeutycznych w tej grupie jest metionina, naturalny aminokwas występujący w diecie człowieka. Badania na zwierzętach wykazały, że izomer D metioniny (D-Met) podawany doustnie, w iniekcji dootrzewnowej czy bezpośrednio na okienko okrągłe ucha wewnętrznego zmniejsza głębokość uszkodzeń słuchu powodowanych przez substancje ototoksyczne (cisplatyna, gentamycyna) i hałas. Obiecujące wyniki prac prowadzonych na modelach zwierzęcych doprowadziły do rozpoczęcia w 2013 roku badań klinicznych nad suplementacją D-Met u osób narażonych na hałas. Nieznane do końca molekularne mechanizmy działania D-Met, w tym w szczególności brak, jak dotąd, badań nad wpływem D-Met na ekspresję genów stresu oksydacyjnego w urazie akustycznym były przesłanką do podjęcia tej tematyki w pracy doktorskiej.

Cele pracy

Głównym celem pracy była ocena mechanizmów ochronnego wpływu D-metioniny (D-Met) na narząd słuchu myszy w urazie akustycznym.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Porównanie zmian progów słuchu po narażeniu na hałas u myszy, które otrzymywały D-Met i którym nie podawano D-Met, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, nienarażonych na hałas.
2. Porównanie aktywności wybranych biochemicznych markerów stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas u myszy, które otrzymywały D-Met i którym nie podawano D-Met, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, nienarażonych na hałas.
3. Porównanie ekspresji genów kodujących syntezę wybranych markerów stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas u myszy, które otrzymywały D-Met i którym nie podawano D-Met, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych, nienarażonych na hałas.
4. Wyznaczenie skutecznej dawki D-Met działającej ochronnie w urazie akustycznym u myszy.

Materiał i metody

Badania prowadzono na sześciotygodniowych samcach myszy szczepu C57BL/6, obarczonych recesywną mutacją genu na chromosomie 10 locus *ahl 1* (*age-related hearing loss locus 1*), charakteryzujących się przyspieszoną utratą słuchu związaną z procesem starzenia się i narażeniem na hałas.

W celu przeprowadzenia badań czynnościowych, biochemicznych i genetycznych zwierzęta podzielono na 5 grup:

- I – **Kontrola** – bez ekspozycji na hałas i bez podawania D-Met
- II – **Hałas** – ekspozycja na hałas, bez podawania D-Met
- III – **D-Met 100** – ekspozycja na hałas z podawaniem D-Met w dawce 100 mg/kg masy ciała
- IV – **D-Met 200** – ekspozycja na hałas z podawaniem D-Met w dawce 200 mg/kg masy ciała
- V – **D-Met 400** – ekspozycja na hałas z podawaniem D-Met w dawce 400 mg/kg masy ciała

Badania przeprowadzono w 3 punktach czasowych tj. w 1, 7 i 14 dniu po narażeniu na hałas.

Zwierzęta eksponowano na hałas wąskopasmowy o częstotliwości 4 kHz i poziomie 110 dB SPL przez 8 godzin.

D-Metioninę (D-Met) po rozpuszczeniu w roztworze soli fizjologicznej, wstrzykiwano zwierzętom dootrzewnowo w dawce 100, 200 lub 400 mg / kg masy ciała godzinę przed i 1 godzinę po ekspozycji na hałas. Kolejne takie same dawki D-Met podawane były 2 razy dziennie w tych samych odstępach czasowych 1, 2 i 3 dni po narażeniu.

Ocenę zmian progów słuchu przeprowadzono za pomocą badania słuchowych potencjałów wywołanych pnia mózgu (*auditory brainstem response*, ABR) dla częstotliwości 8 kHz. Porównywano wartości progów słuchu uzyskane przed i po ekspozycji na hałas, uzyskując w ten sposób wartości przesunięć progów słuchu wywołanych hałasem dla każdego badanego osobnika.

Do oceny procesów oksydacyjnych zostały zastosowane pomiary poziomu aktywności enzymów będących markerami stresu oksydacyjnego – dysmutaz ponadtlenkowych (SOD) i katalazy (CAT) w tkankach ucha wewnętrznego. Oznaczanie całkowitej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

przeprowadzono za pomocą testu SOD Assay Kit (Cayman Chemical Company), a katalazy - za pomocą testu Catalase Assay Kit (Cayman Chemical Company).

Ocenę ekspresji genów kodujących wybrane markery stresu oksydacyjnego (*Sod1*, *Sod2*, *Cat*) w tkankach ucha wewnętrznego przeprowadzono za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR), poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-PCR). Jako matrycę do syntezy cDNA wykorzystano RNA wyizolowane ze ślimaka myszy zmodyfikowaną metodą Chomczyńskiego. W celu określenia ekspresji badanych genów próby normalizowano wobec genu referencyjnego *Hprt1*.

Wyniki

Wyniki badań słuchu wskazują, że *D*-Met podawana bezpośrednio przed i w trakcie pierwszych dni po narażeniu na hałas powoduje, zależnie od dawki, istotne statystycznie, zmniejszenie wielkości przesunięcia progów słuchu. Ochronny efekt na narząd słuchu widoczny był w 7 i 14 dniu po narażeniu, dla *D*-Met w dawkach 200 i 400 mg/kg masy ciała.

Badania dotyczące wybranych markerów stresu oksydacyjnego wskazują, że podawanie *D*-Met powoduje istotny statystycznie wzrost aktywności dysmutaz ponadtlenkowych (SOD) w tkankach ucha wewnętrznego w 7 i 14 dniu po ekspozycji. Efekt ten widoczny był jedynie dla najwyższej ze stosowanych dawek *D*-Met (400 mg/kg/dawkę). W odniesieniu do katalazy (CAT) stwierdzono natomiast zahamowanie, obserwowanego u myszy narażonych na hałas i nie otrzymujących *D*-Met, wzrostu aktywności tego enzymu w 7 dniu po ekspozycji. Efekt ten widoczny był dla *D*-Met w dawkach 200 i 400 mg/kg masy ciała.

Badania dotyczące ekspresji genów kodujących syntezę wybranych markerów stresu oksydacyjnego wykazały istotny spadek ekspresji *Sod1* – genu kodującego syntezę cytoplazmatycznej SOD, w 1 dniu po ekspozycji oraz jej istotny wzrost w 7 dniu po ekspozycji, utrzymujący się do 14 dnia po ekspozycji. Efekt ten widoczny był jedynie dla najwyższej ze stosowanych dawek *D*-Met (400 mg/kg/dawkę). Pozostaje to w zgodzie z obserwowanym w analogicznych dniach wzrostem poziomu aktywności SOD w tkankach ucha wewnętrznego. Równolegle, w 7 i 14 dniu po ekspozycji obserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji *Sod2* – genu kodującego syntezę mitochondrialnej SOD; efekt ten był również widoczny jedynie dla najwyższej ze stosowanych dawek *D*-Met (400 mg/kg/dawkę). Ocena ekspresji genu *Cat* w wybranych punktach czasowych nie wykazała istotnych zmian dla żadnej z grup myszy. Jakkolwiek obserwowano, równoległą do zmian enzymatycznych, tendencję do zahamowania ekspresji tego genu u zwierząt narażanych na hałas i otrzymujących *D*-Met w stosunku do zwierząt narażanych na hałas i nieotrzymujących *D*-Met.

Wnioski

1. *D*-Met działa ochronnie na narząd słuchu w urazie akustycznym u myszy szczepu C57BL/6, a efekt protekcyjny obserwowany jest już dla dawki 200 mg/kg.
2. Efekt działania ochronnego *D*-Met w urazie akustycznym u myszy szczepu C57BL/6 zależy od regulacji przez *D*-Met procesów stresu oksydacyjnego, w tym modulowania aktywności dysmutaz ponadtlenkowych i katalazy w tkankach ucha wewnętrznego.
3. Wzrost aktywności dysmutaz ponadtlenkowych (SOD) w tkankach ucha wewnętrznego myszy po suplementowaniu *D*-Met związany jest ze wzrostem ekspresji genu *Sod1* – kodującego syntezę cytoplazmatycznej SOD.

4. Zahamowanie wzrostu aktywności katalazy w tkankach ucha wewnętrznego myszy po suplementowaniu D-Met związane jest najprawdopodobniej z zahamowaniem ekspresji genu *Cat*, jakkolwiek wobec braku zmian istotnych statystycznie, wniosek ten wymaga weryfikacji w kolejnych badaniach.
5. Uzyskane wyniki mogą być pomocne w dalszych badaniach klinicznych z zastosowaniem D-Met w profilaktyce uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem

Anna Wolniakowska