

Rola stresu oksydacyjnego w uszkodzeniach słuchu spowodowanych hałasem

The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss

ANNA WOLNIAKOWSKA, MARIOLA ŚLIWIŃSKA-KOWALSKA

Klinika Audiologii i Foniatrii, Instytut Medycyny Pracy im. J. Nofera w Łodzi

Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia ponad 466 milionów ludzi na świecie ma uszkodzenie słuchu, z czego ok. 40% osób dotkniętych jest niedosłuchem w stopniu umiarkowanym i głębokim, znacząco obniżającym jakość życia. Jedną z najczęstszych przyczyn uszkodzenia słuchu jest narażenie na hałas. Uszkodzenie słuchu spowodowane hałasem (noise-induced hearing loss, NIHL) na dzień dzisiejszy jest procesem nieodwracalnym. Dla podjęcia skutecznych działań terapeutycznych istotne jest zrozumienie patofizjologii NIHL, w tym zwłaszcza leżącego u jego podłoża stresu oksydacyjnego. W pracy opisano szczegółowo rolę stresu oksydacyjnego w urazie akustycznym, przedstawiono mechanizmy obronne komórek przed reaktywnymi formami tlenu i azotu oraz podsumowano wyniki badań dotyczących terapeutycznego działania związków antyoksydacyjnych w NIHL, prowadzonych zarówno na modelach doświadczalnych i u ludzi.

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, apoptoza, *d*-metionina

According to the World Health Organization (WHO), more than 466 million people in the world suffer from hearing loss, about 40% of whom are affected by moderate and deep hearing loss, significantly reducing quality of life. The most common causes of hearing loss are exposure to noise and aging of the hearing organ (presbycusis). As of today, noise-induced hearing loss (NIHL) is an irreversible process.

In order to take effective therapeutic measures it is significant to understand pathophysiology of NIHL, especially the underlying oxidative stress. The work describes in detail the role of oxidative stress in acoustic trauma, presents defense mechanisms of cells against reactive oxygen and nitrogen forms, and summarizes the results of studies on the therapeutic effect of antioxidant compounds in NIHL, both on experimental models and in humans.

Key words: reactive oxygen species, apoptosis, *d*-methionine

© Otolaryngologia 2019, 18(1): 1-11

www.mediton.pl/orl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Klinika Audiologii i Foniatrii
Instytut Medycyny Pracy im. J. Nofera
ul. Św. Teresy 8, 91-348 Łódź
tel. 042 63 14 523; e-mail: Anna.Wolnioskowska@imp.lodz.pl

Wprowadzenie

Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization*, WHO) ponad 466 milionów ludzi na świecie ma uszkodzenie słuchu [1], z czego ok. 40% osób dotkniętych jest niedosłuchem w stopniu umiarkowanym i głębokim, znacząco obniżającym jakość życia [2]. Najczęstszymi przyczynami uszkodzeń słuchu są narażenie na hałas i starzenie się narządu słuchu (*presbycusis*). Oba procesy mogą ze sobą współistnieć. Przemawiają za tym obserwacje wskazujące, że w populacji ogólnej, wśród osób z ubytkami słuchu, ponad 88% posiada audiogram charakterystyczny dla uszkodzeń słuchu

spowodowanych hałasem, z typowym załamkiem dla wysokich częstotliwości [3].

Mimo wielu działań prowadzących do obniżenia poziomów akustycznych dźwięku, hałas jest czynnikiem niemożliwym do wyeliminowania, ze względu na jego występowanie praktycznie w każdym obszarze działalności człowieka. Najwyższe poziomy narażenia na hałas występują w środowisku pracy, w tym w przemyśle ciężkim (90-94 dB), maszynowym (92-125 dB), lekkim (91-114 dB) oraz budownictwie i przemyśle materiałów budowlanych (91-119 dB). W środowisku ogólnym największe zagrożenie wynika z uczęszczania do dyskotek

i klubów nocnych (92-100 dB), uprawiania hałaśliwych sportów (86-94 dB) czy myślistwa (szczytowy dźwięk osiąga poziom 140 dB). Populację zwiększonego ryzyka rozwoju uszkodzenia słuchu stanowi również młodzież słuchająca głośnej muzyki przez osobiste odtwarzacze muzyki.

Na dzień dzisiejszy uszkodzenie słuchu spowodowane hałasem (*noise-induced hearing loss*, NIHL) jest procesem nieodwracalnym, dlatego też bardzo ważna jest profilaktyka oraz wczesna interwencja farmakologiczna. Dla podjęcia skutecznych działań terapeutycznych istotne jest zrozumienie patofizjologii NIHL. W przypadku ekspozycji na dźwięki o umiarkowanie wysokim poziomie akustycznym, czyli takie jakie panują na przykład w przemyśle, głównym mechanizmem uszkodzeń słuchu jest stres oksydacyjny i związana z nim nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu i azotu. Stąd poznanie tego mechanizmu i możliwości interwencji farmakologicznej stwarza nadzieję na skuteczne leczenie uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem w przyszłości.

Stres oksydacyjny a uraz akustyczny

Stres oksydacyjny zdefiniowany jest jako zaburzenie komórkowej równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku reakcji utleniania i jest ściśle związany z tlenem i jego reaktywnymi formami [4]. Reaktywnymi formami tlenu i azotu (RFT i RFA) nazywamy molekuły mające na powłoce walencyjnej co najmniej jeden niesparowany elektron, warunkujący ich wysoką reaktywność.

RFT i RFA pochodzą z przemian metabolicznych zachodzących w organellach komórkowych, a głównym generatorem tych molekuł są mitochondria, w których odbywa się oddychanie komórkowe. W łańcuchu transportu elektronów cząsteczka tlenu (O_2) jest zredukowana do 2 cząsteczek wody ($2H_2O$). Szacuje się jednak, że 1-2% tlenu ulega niekompletnej przemianie i powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), który może być konwertowany do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i wysoce reaktywnego rodnika hydroksylogowego (OH^{\cdot}) [5]. Natomiast wzrost aktywności mitochondrialnej syntazy tlenu azotu, na przykład w warunkach hypoksji, zwiększa produkcję tlenu azotu, który w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym prowadzi do powstania toksycznego nadtlenuazotynu. Innymi endogennymi źródłami RFT i RFA są reakcje katalizowane przez cytochrom P450, peroksydazy i oksydazę NADPH. W ilości fizjologicznej są one niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmów, biorąc udział między innymi w odpowiedzi immunologicznej czy przekazywaniu sygnałów w szlakach komórkowych. W prawidłowych wa-

runkach liczba generowanych RFT i RFA jest ściśle kontrolowana przez systemy antyoksydacyjne organizmu. Długotrwałe utrzymujące się podwyższone stężenie wolnych rodników prowadzi do destrukcji składników komórek i rozwoju wielu chorób, w tym uszkodzeń słuchu spowodowanych hałasem.

Hałas, obok promieniowania jonizującego czy zanieczyszczeń powietrza, jest jednym z zewnętrznych czynników przyczyniających się do powstawania większych ilości wolnych rodników. Zaobserwowano, że już w okresie 1–2 godzin po ekspozycji na nadmierne poziomy dźwięków następuje wzmożona produkcja RFT w uchu wewnętrznym [6, 7] i poziom ten utrzymuje się nawet do 10 dni [7, 8]. Istotnym wydaje się być także fakt, że podwyższony poziom tych molekuł stwierdzono w komórkach słuchowych, zanim zaobserwowane zostały jakiegokolwiek uszkodzenia [9]. Badania prowadzone na myszach i świnkach morskich wykazały wzrost stężenia anionorodnika ponadtlenkowego [8, 10], rodnika hydroksylogowego [6, 11] czy reaktywnych form azotu [12, 13] w strukturach ślimaka w wyniku narażenia na hałas.

Potwierdzeniem roli stresu oksydacyjnego w uszkodzeniach słuchu po hałasie w strukturach ucha wewnętrznego jest także zwiększona poekspozycyjna aktywność enzymów antyoksydacyjnych, na przykład katalazy [14, 15] czy reduktazy glutationowej [14].

Kolejnym argumentem potwierdzającym znaczenie stresu oksydacyjnego po narażeniu na hałas jest wzmożona peroksydacja lipidów, której produktem jest 4-hydroksynonenal (4-HNE). Poekspozycyjny wzrost poziomu 4-HNE stwierdzono u świnek morskich po ekspozycji na hałas o poziomie 120 dB SPL [7, 16] i u myszy po narażeniu na dźwięki o poziomie 96 dB SPL [17].

Ucho wewnętrzne, ze względu na dużą aktywność metaboliczną, jest narządem bardzo wrażliwym na działanie stresu oksydacyjnego. Podwyższone stężenie RFT powodowane działaniem hałasu może prowadzić do uszkodzenia komórek słuchowych w ślimaku, jak również neuronów zwoju spiralnego [18]. W literaturze opisującej różne szlaki śmierci komórek słuchowych, stres oksydacyjny wskazywany jest jako czynnik aktywujący zarówno dla apoptozy, jak i nekrozy. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Hu i wsp. w 2002 roku zaobserwowano, że obie te drogi rozpadu komórek słuchowych mogą zachodzić jednocześnie [19]. Nekrozę komórek słuchowych wywołaną nagromadzeniem reaktywnych molekuł rozpoczyna peroksydacja lipidów błony komórkowej, w wyniku której dochodzi do pęcznienia i nieregulowanego

rozpadu komórki. Organella komórkowe, wydostając się na zewnątrz, wywołują reakcję zapalną, a w konsekwencji – śmierć komórki.

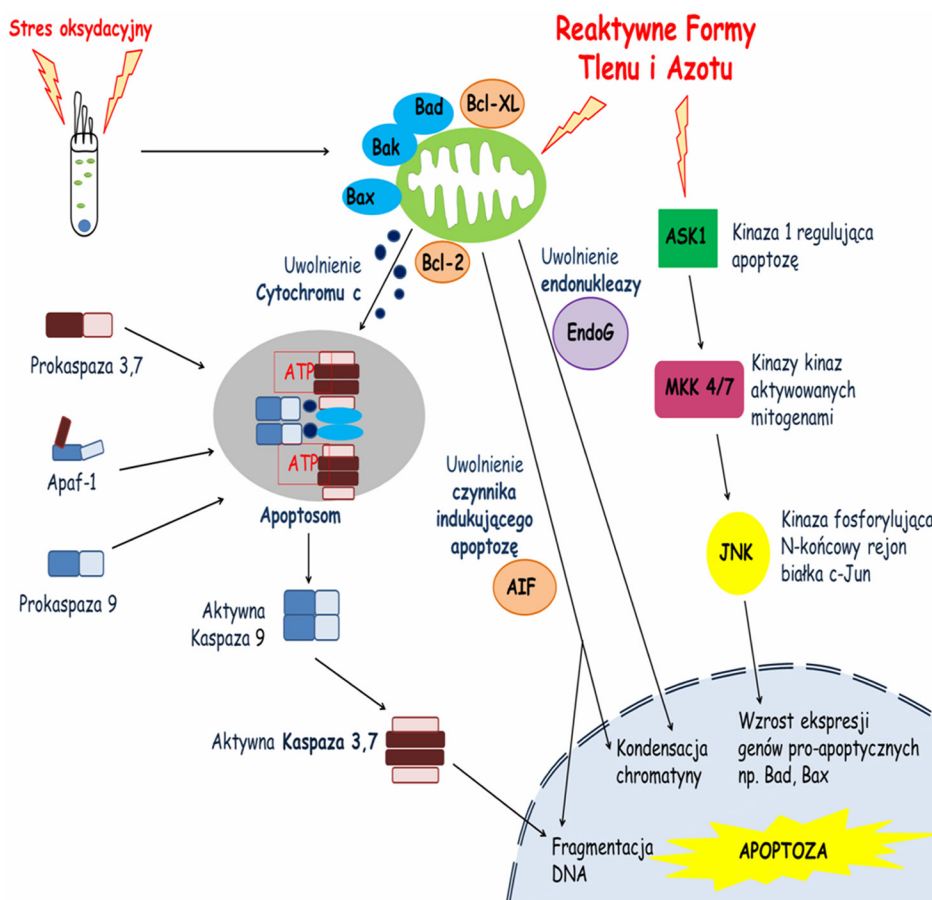
Dominującą drogą rozpadu komórek słuchowych po narażeniu na hałas jest jednak apoptoza. Peroksydacja lipidów, będąca skutkiem działania stresu oksydacyjnego sprzyja uwalnianiu z błony mitochondrialnej cytochromu c (cyt. c), który aktywuje wewnętrzny szlak apoptotyczny (ryc. 1). W warunkach stresowych dochodzi dodatkowo do zaburzenia równowagi pomiędzy białkami anti- (Bcl-2 i Bcl-XL) i pro-apoptotycznymi (Bax, Bad, Bak), na korzyść tych drugich, co skutkuje otwarciem kanałów w błonie mitochondrialnej (tzw. megakanatów mitochondrialnych) i wypłynięciem cyt. c do cytosolu. Następnie cyt. c, przy udziale ATP, wiąże się z białkowym czynnikiem Apaf-1 oraz prokaspazą 9, tworząc apoptosom, który kolejno aktywuje kaskadę kaspaz efektorowych szlaku apoptotycznego, powodujących zmiany morfologiczne w komórce i ostatecznie prowadząc do jej śmierci [20].

Poza cyt. c z mitochondrium w warunkach stresu oksydacyjnego, uwalniany jest także czynnik indukujący apoptozę (*apoptosis inducing factor*, AIF) oraz endonukleaza (EndoG). AIF wpływa na kondensację chromatyny i fragmentację DNA [21], natomiast

EndoG trawi DNA w jądrze komórkowym [22]. Oba te mitochondrialne czynniki są niezależnymi od kaspaz efektorami apoptozy [23]. Reaktywne formy tlenu mogą regulować także działanie kinaz MAP. Wzrost stężenia wolnych rodników powoduje odłączenie tioredoksyny od sygnałowej kinazy regulującej apoptozę (ASK-1), tym samym aktywując ją [24] i rozpoczynając trójpoziomą kaskadę kinaz. ASK-1 aktywuje kinazy aktywujące MAPK (MKK4 i MKK7), które następnie fosforylują kinazę efektorową MAP – JNK, czyli kinazę fosforylującą N-końcowy region białka c-Jun, indukującego transkrypcję genów kodujących białka proapoptotyczne [25] (ryc. 1).

Mechanizmy ochronne komórek przed reaktywnymi formami tlenu i azotu

Wytwarzanie reaktywnych form tlenu w podstawowych procesach metabolicznych „narzuciło” organizmom aerobowym wykształcenie bariery chroniącej przed ich toksycznym działaniem. W warunkach homeostazy, dzięki działaniu szeregu mechanizmów obronnych, nadmiar wolnych rodników jest usuwany, a powstałe uszkodzenia – naprawiane. Bariere antyoksydacyjną można podzielić na trzy linie obrony:

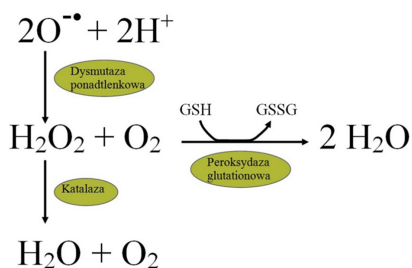


Ryc. 1. Schemat szlaków apoptotycznych indukowanych stresem oksydacyjnym (opracowanie własne)

- Pierwsza linia obrony – linia prewencyjna, której celem jest zapobieganie reakcji RFT z biomolekułami. Tworzą ją antyoksydanty enzymatyczne, do których zaliczamy dysmutazę ponadtlenkową, katalazę i peroksydazę glutationową.
- Druga linia obrony – linia interwencyjna, której zadaniem jest terminacja łańcuchowej wolnorodnikowej reakcji. Małocząsteczkowe antyoksydanty, takie jak α -tokoferol, kwas askorbinowy czy D-metionina, konkurują z potencjalnymi kandydatami do utlenienia przez RFT, skutkiem czego powstaje mniej toksyczny rodnik.
- Trzecia linia obrony – linia naprawy, której enzymy usuwają efekty reakcji RFT ze związkami biologicznymi, np. glutation.

Należy również podkreślić, że konkretny rodnik może uszkadzać kilka struktur, dlatego też w odpowiedzi na stres oksydacyjny interweniuje grupa współdziałających ze sobą przeciwutleniaczy, a neutralizacja reaktywnych form tlenu jest procesem wieloetapowym. Warto zwrócić także uwagę, że endogenna defensywa antyoksydacyjna nigdy nie jest skuteczna w 100%. Na przykład podczas przekształcania ponadtlenku ($O_2^{\cdot-}$) do nadtlenu wodoru (H_2O_2) przez dysmutazę ponadtlenkową w obecności tlenku azotu (NO^{\cdot}), dochodzi do reakcji pomiędzy ponadtlenkiem i tlenkiem azotu, w wyniku której powstaje silnie toksyczny nadtlenoazotyn ($ONOO^-$).

Najistotniejszym mechanizmem ochronnym jest zapobieganie powstawaniu najbardziej toksycznego z rodników – rodnika hydroksylowego. Obrona ta opiera się na eliminacji prekursorów tej RFT, czyli anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru. Zadanie to należy do wzajemnie uzupełniających się enzymów I linii obrony antyoksydacyjnej: dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Omawiając podstawowe mechanizmy obrony komórkowej przed RTF, nie można pominąć glutationu, który w zredukowanej formie odpowiada za detoksykację nadtlenu wodoru (ryc. 2).



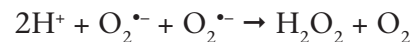
Ryc. 2. Schemat działania mechanizmów antyoksydacyjnych

Dysmutazy ponadtlenkowe (Superoxide Dismutase, SOD)

Rodzinę dysmutaz ponadtlenkowych stanowią metaloproteiny należące do grupy oksydoreduktaz. U ssaków można wyróżnić 3 dysmutazy ponadtlenkowe:

- enzym cytoplazmatyczny zawierający jony cynku i miedzi (Cu/Zn-SOD; SOD-1),
- enzym mitochondrialny zawierający jony manganu (Mn-SOD; SOD-2),
- enzym zewnątrzkomórkowy z jonami cynku i miedzi (EC-SOD; SOD-3).

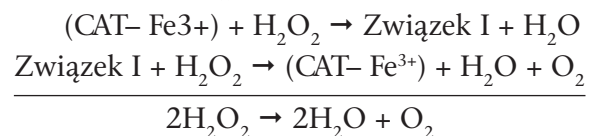
SOD jest enzymem przyspieszającym reakcję, w której anionorodnik ponadtlenkowy jest przekształcany w mniej toksyczny nadtlenek wodoru oraz tlen.



Po raz pierwszy udział SOD w zapobieganiu uszkodzeniom słuchu indukowanym hałasem zaobserwowano u szczurów w 1993 roku [26]. Otoprotekcyjne działanie SOD zostało również zademonstrowane za pomocą inżynierii genetycznej – myszy pozbawione enzymu SOD-1 okazały się bardziej wrażliwe na hałas niż myszy kontrolne, które produkują SOD-1 [6].

Katalaza (Catalase, CAT)

Katalaza jest enzymem, z grupy oksydoreduktaz, którego grupę prostetyczną stanowi hem, występującym w komórkach zwierzęcych, roślinnych oraz bakteryjnych. Hemoproteina ta wykazuje podwójną aktywność. Katalizuje ona dysproporcjonowanie nadtlenu wodoru (aktywność katalazowa), a także utlenia związki będące donorami wodoru, takie jak metanol, etanol czy chinony (aktywność peroksydazowa). Podstawowe zadanie tego enzymu, czyli dysmutacja nadtlenu wodoru do wody i tlenu, odbywa się dwuetapowo [27]:



W uchu wewnętrznym po raz pierwszy katalaza została odkryta w 1979 roku w peroksysomach prążka naczyniowego u świnek morskich [28]. Udział endogennej katalazy w ochronie narządu słuchu przed wpływem hałasu nie został jeszcze dokładnie zbadany i opisany, a dostępne dane literaturowe są niespójne. Najbardziej przekonujące dowody potencjalnego związku między aktywnością katalazy a ekspozycją na nadmierne poziomy dźwięków dotyczą zmniejszonego poziomu katalazy u tureckich pracowników tekstylnych narażanych na hałas w porównaniu z osobami z grupy kon-

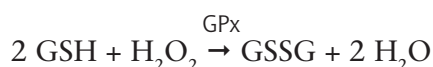
trojnej. Autorzy badań wyniki te zinterpretowali jako odzwierciedlające zużycie katalazy w wyniku neutralizacji wolnych rodników [29]. W odniesieniu do genów, które wpływają na wytwarzanie katalazy, sugeruje się zależność pomiędzy występowaniem polimorfizmów ludzkiej katalazy i rozwojem NIHL [30].

Glutation

Glutation, czyli γ -glutamylcysteinyloglicyna, jest niskocząsteczkowym związkem, należącym do najważniejszych przeciwutleniaczy występujących powszechnie w komórkach organizmów. Ten tripeptyd charakteryzuje się wiązaniem peptydowym z grupą γ -karboksylową (zamiast α), które chroni go przed naturalnym rozkładem przez peptydazy. Drugą istotną jego cechą jest posiadanie grupy tiolowej (-SH), należącej do reszty cysteinowej i nadającej cząsteczce glutationu reaktywność.

Antyoksydacyjne działanie glutationu wiąże się z detoksykacją nadtlenu wodoru, nadtlenu organicznych i innych RFT oraz egzo- i endogennych związków elektrofilnych [31]. Ponadto związek ten bierze udział w odbudowie uszkodzonych elementów błony komórkowej i DNA. Jest źródłem protonów dla reduktazy rybonukleotydu. Glutation uważany jest za najważniejszy komórkowy „bufor tiolowy”, a stosunek stężeń jego formy zredukowanej do utlenionej (GSH/GSSG) określany jest jako miara stanu oksydoredukcji komórki. W warunkach prawidłowych ponad 98% tego związku występuje w postaci zredukowanej. Jednakże bardzo łatwo ulega on utlenieniu do disulfidu glutationu (GSSG) [32].

Reakcje biochemiczne, w których glutation reaguje z reaktywnymi cząsteczkami zachodzą przy udziale enzymów należących do rodziny transferaz S-glutationowych (GST). W wyniku redukcji nadtlenu wodoru przez GSH, w obecności peroksydazy glutationowej (GSH-Px), powstaje disulfid glutationu i woda:



Za przenoszenie niezwiązanych elektronów z H_2O_2 na GSSG odpowiedzialny jest selen, będący grupą prostetyczną GSH-Px. Do enzymatycznego układu związanego z glutationem należy także reduktaza glutationowa (GR). Enzym ten katalizuje przemianę grup sulfhydrylowych i disiarczków (redukuje GSSG), przy udziale kofaktora NADPH [33]:



Długotrwały stres oksydacyjny może prowadzić do obniżenia stężenia wewnątrzkomórkowego GSH. Powoduje on zaburzenie zdolności komórki do redukcji utlenionego glutationu i jego nagromadzenie w cytozolu. Dlatego też, aby zachować równowagę w komórce, GSSG musi być usuwany poza nią lub też reagować z grupami sulfhydrylowymi białek, tworząc mieszane disulfidy. Inne badania wskazują natomiast na wzrost stężenia glutationu zredukowanego w organizmie poprzez zwiększenie jego syntezy w procesie adaptacji do warunków stresu oksydacyjnego [34]. Zatem system enzymatyczny związany z glutationem jest złożony, a każdy element odgrywa ważną rolę w redukcji wolnych rodników przez GSH.

W narządzie słuchu obecność glutationu stwierdzono w prążku naczyniowym i więzadle spiralnym [35]. Różnice gatunkowe wykazane na modelach zwierzęcych nie pozwalają dokładnie sprecyzować roli GSH w uchu wewnętrznym człowieka. Na przykład u świnek morskich występuje wyższe stężenie glutationu w nabłonku czuciowym niż u szczurów, przy jednocześnie niższej aktywności peroksydazy glutationowej, a zbliżonych do siebie poziomach GR i GST [36]. Różnice te mogą wpływać na „odpowiedź” endogennego glutationu na potencjalne czynniki uszkodzające ślimak, czy podawane leki otoprotekcyjne mające za zadanie zwiększyć stężenie GSH (np. L-NAC, D-Met), czy wspomagać działania GPx (ebselen).

W licznych publikacjach opisano zmiany poziomu glutationu i powiązanych z nim enzymów spowodowanych ekspozycją na hałas zarówno w narządzie Cortiego, jak i ścianie bocznej schodów ślimaka [30, 37]. Ponadto, badania z zastosowaniem związków leczniczych potwierdziły rolę GSH w „wyciszeniu” skutków wpływu hałasu na słuch. Zastosowanie L-butionina-S,R-sulfoksyminy (BSO), związku hamującego endogenną syntezę glutationu, spowodowało zwiększenie podatności ucha wewnętrznego na działanie hałasu, podczas gdy użycie 2-oksotiazolidyno-4-karboksylatu (OTC), który jest źródłem cysteiny do syntezy GSH, zredukowało zaburzenia słuchu [7]. Innym przykładem może być praca Ohlemillera i wsp, którzy zaobserwowali, że myszy pozbawione enzymu GSH-Px1 miały zwiększoną podatność na zaburzenia słuchu [38].

Ochronne działanie związków antyoksydacyjnych w uszkodzeniach słuchu spowodowanych hałasem

Ze względu na coraz wyraźniejszą rolę stresu oksydacyjnego w rozwoju NIHL, uwaga badaczy skupia się na egzogennych środkach terapeutycznych wzmacniających endogenną obronę antyoksydacyjną.

L-NAC

Zróznicowane pod względem dawki, modelu zwierzęcego i parametrów hałasu, badania wykazały, że zastosowanie N-acetylcysteiny (NAC) w urazie akustycznym istotnie chroni ucho wewnętrzne przed jego następstwami. NAC jest pochodną L-cysteiny, stosowaną w medycynie jako mukolityk i antidotum w zatruciach paracetamolem. Potencjalny mechanizm działania NAC opiera się na dostarczaniu do organizmu cysteiny, niezbędnej do syntezy glutationu. Pełni ona także rolę „wymiatacza” rodnika hydroksylowego i nadtlenu wodoru [39]. Zredukowanie wielkości PTS (*Permanent Threshold Shift*; trwałe przesunięcie progu słuchu) po zastosowaniu NAC zaobserwowano w badaniach na szynszylach [40], szczurach [41], świnkach morskich [42], królikach [43]. Ponadto Bielefeld i wsp. wykazali, że NAC chroni zarówno przed bodźcami akustycznymi o charakterze ciągłym, jak i impulsowym, czy też hałasem o poziomach dźwięku podlegającym rozkładowi o dużej kurtozie [44]. Dane dostępne w literaturze pokazują, że lepsze efekty terapeutyczne na modelach zwierzęcych daje aplikowanie związku poprzez wstrzyknięcie do organizmu (a nie w formie doustnej), w dawce co najmniej 325 mg/kg przed ekspozycją na hałas [43]. Niestety, prowadzone próby kliniczne z NAC u ludzi nie przyniosły spodziewanych efektów. Pomimo wcześniejszych pozytywnych wyników suplementacji NAC [45], w II-iej fazie badań klinicznych nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w przesunięciach progów słuchu w grupach ochotników amerykańskiej piechoty morskiej otrzymujących NAC dawce 2700 mg/dzień lub placebo przez okres 13 pierwszych dni treningu na strzelnicy [46].

Ebselen

Ebselen jest syntetycznym związkiem zawierającym selen, a jego główne zadanie opiera się na „naśladowaniu” peroksydazy glutationowej (GPx), która przyspiesza neutralizowanie nadtlenu wodoru przez glutation. Wendel wykazał, że ebselen katalizuje tworzenie GSSG z GSH jeszcze skuteczniej niż GPx [47]. Związek ten zapobiega powstawaniu lub otwieraniu porów przejściowych przepuszczalności błony mitochondrialnej. Są one krytyczne w urazie akustycznym, ponieważ po ich otwarciu pozwalają GSH „uciec” z mitochondriów, zmniejszając tym samym wychwytywanie RFT. Co ważne, ebselen jest zmiataczem nadtlenuazotynowym (ONOO-), tlenu azotu (NO-) i organicznych wodoronadtlenków [39]. Ochronę ucha wewnętrznego przed NIHL przy użyciu ebselenu wykazano w modelach trwałych przesunięć progu słuchu [48-51], jak i zmian czasowych [52]. W większości z tych badań

ebselen stosowano doustnie, co powinno ułatwiać jego stosowanie w badaniach u ludzi. Ponadto, jednoośrodkowe, randomizowane, podwójnie ślepe, kontrolowane placebo badania kliniczne II fazy, wykazały, że podawanie ebselenu przez 4 dni (zaczynając terapię 2 dni przed narażeniem) w 50% redukuje TTS (*Temporary Threshold Shift*; czasowe przesunięcie progu słuchu) dla częstości 4 kHz, powstałe po 4 godzinnym narażeniu na hałas u ludzi [ClinicalTrials.gov, number NCT01444846] [53].

Witamina A

Otoprotekcyjne działanie witaminy A zaobserwowano u myszy zarówno w suplementacji rozpoczynającej się przed ekspozycją na hałas [54], jak i w terapii opóźnionej [55]. Źródłami witaminy A są wątroba wołowa, ryby, zielone, pomarańczowe i żółte warzywa. Główną postacią witaminy A pochodzącą ze zwierzęcych źródeł pokarmowych jest retinol i estry retinyłu, które przekształcane są w retinol w jelicie cienkim, a następnie przechowywane w wątrobie. Retinol przekształcany jest następnie w retinal (aktywny w siatkówce) oraz kwas retinowy, utlenioną formę witaminy A – najbardziej aktywną biologicznie. W przypadku witaminy A bardzo istotne jest jej spożywanie w odpowiedniej dawce. Nadmierna podaż (>10 000 IU/dzień) może przyczyniać się do rozwoju wad wrodzonych [56]. Witamina ta pozyskiwana jest ze źródeł roślinnych w postaci karotenoidów. α -kardenoid, β -kardenoid oraz kryptokszantyna są „prowitaminami A” redukowanymi do retinolu czy estrów retinyłu, a nawet bezpośrednio przekształcanymi w kwas retinowy. Metabolizm karotenoidów u ludzi nie został w pełni poznany z wielu powodów, w tym nie tylko technicznych i metodologicznych wyzwań, ale także z interakcji między dietetycznymi przeciwutleniaczami, interakcji między karotenoidami, tłuszczami i włóknami oraz z braku jednego dobrego modelu zwierzęcego, w którym absorpcja i metabolizm są podobne jak u ludzi [57, 58].

Należy zwrócić uwagę, że ochronne działanie β -kardenoidu zostało opisane jedynie w połączeniu z suplementacją witaminą C i E oraz magnezem u świnek morskich [59] i myszy [60]. Jednak rola β -karotenu w tym badaniu jest niejasna, ponieważ β -karotenu nie można było wykryć w próbkach osocza pobranych od pacjentów z świnkami morskimi [59]. Należy zauważyć, że czas dawkowania w stosunku do hałasu był krytyczny. β -karoten (w połączeniu z witaminą C i E) nie był skuteczny w zmniejszaniu NIHL, gdy leczenie rozpoczęto zaledwie na 1 godzinę przed ekspozycją [61]. Przy krótkoterminowym dawkowaniu wydaje się, że kluczowe znaczenie w obronie przed hałasem ma

kombinacja obejmująca witaminy i magnez. Wyniki badań nad wpływem witaminy A na rozwój NIHL u ludzi są niejednoznaczne. Zwiększony poziom retinolu w surowicy i zwiększone poziomy karotenoidów w surowicy wiązały się z mniejszą częstością występowania wad słuchu u osób ze społeczności japońskiej [62]. Przeciwnie, u mieszkańców Australii zwiększony retinol w surowicy związany był ze zwiększoną częstością występowania upośledzenia słuchu [63].

Witamina C

Witamina C wzmacnia obronę endogenną poprzez zwiększenie wewnątrzkomórkowego i mitochondrialnego GSH, jak również GPx, SOD [64] i katalazy [65]. Witamina C ma również istotny bezpośredni wpływ na redukcję wielu wolnych rodników, w tym anionorodnika ponadtlenowego, tlenu singletowego i rodników hydroksylowych. Suplementy witaminy C są łatwo dostępne bez recepty. Jednak przyjmowanie zbyt dużej ilości tej witaminy może powodować dyskomfort w żołądku i jelitach. Należy również zwrócić uwagę na potencjalne interakcje między suplementami dostępnymi bez recepty a wcześniej istniejącymi schorzeniami lub innymi lekami na receptę. Witamina C może zwiększać obciążenie żelazem u pacjentów z hemochromatozą, a suplementy witaminy C mogą wchodzić w interakcje z terapiami nowotworowymi lub niektórymi lekami przeciwcholesterolowymi.

Zredukowane PTS po suplementacji witaminą C wykazano początkowo u świnek morskich utrzymywanych na diecie własnej [66]. W większości innych badań oceniano jednocześnie wiele składników odżywczych i wykazano redukcję NIHL w przypadku kombinacji, które oprócz witaminy C zawierały inne czynniki. Należy tutaj wspomnieć o badaniach Le Prell, które zostały opisane przy omawianiu witaminy A [59, 60]. W przypadku tej witaminy należy również zauważyć, że czas dawkowania w stosunku do narażenia na hałas był bardzo istotny. Długoterminowe (35 dni przed hałasem) suplementy z samą witaminą C były korzystne [66], jednakże witamina C (w połączeniu z witaminą E i β -karotenem) nie była skuteczna w zmniejszaniu NIHL po rozpoczęciu leczenia zaledwie 1 godzinę przed ekspozycją na hałas [61].

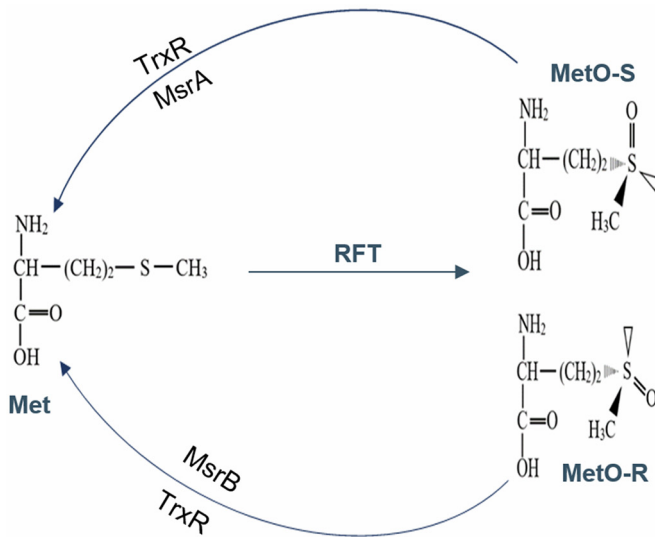
Witamina E

Źródłem witaminy E są orzechy, nasiona i oleje roślinne, a także zielone warzywa liściaste i zboża. Istnieje osiem różnych tokoferoli i tokotrienoli, które wchodzi w zakres ogólnej nazwy „witamina E”. Spośród nich α -tokoferol i γ -tokoferol to dwie najczęstsze postacie dietetyczne. Ponieważ

α -tokoferol jest najbardziej biologicznie aktywnym przeciwutleniaczem, skupił on więcej uwagi niż γ -tokoferol w badaniach nad jego wpływem na zdrowie człowieka. Badania nad udziałem witaminy E w ochronie słuchu wykazały, że związek ten chroni ucho wewnętrzne przed działaniem hałasu [67-69]. Zaobserwowano, że suplement wielowitaminowy, zawierający witaminę E, jako jeden ze składników (witaminy A, E, B1, B2, B6 i B12, L-arginina, miłorząb dwuklapowy, magnez, selen, cynk i Koenzym Q10, dostarczany jako Acupal 400®) zmniejszył NIHL, chociaż nie było możliwości zbadania względnego udziału któregośkolwiek z zastosowanych w tym badaniu pojedynczych środków aktywnych [70]. Działanie witaminy E opiera się na hamowaniu peroksydacji lipidów. Dane epidemiologiczne dotyczące potencjalnej roli witaminy E w ochronie ludzkiego słuchu w procesie starzenia się wykazały szereg efektów, w tym korzyści z zastosowania samej witaminy E [63, 71], korzyści zastosowania witaminy E w połączeniu z β -karotenem i witaminą C [72] lub brak efektu ochronnego [73].

D-Metionina

D-Metionina (D-Met) jest związkiem, którego otoprotekcyjne działanie zaobserwowano w uszkodzeniach słuchu po narażeniu na hałas [74], czy w przypadku stosowania ototoksycznych leków – cisplatyny [75-77] lub aminoglikozydów [77, 78]. Ważny aminokwas, jakim jest metionina, występuje powszechnie w produktach, będących źródłem białka, czyli w mięsie, orzechach, fasoli, ziarnach. Izomer D w wysokim stężeniu można znaleźć przede wszystkim w przetworach mlecznych, które powstały w wyniku fermentacji (jogurty, sery). Łagodzenie zaburzeń słuchu indukowanych na przykład hałasem za pomocą stosowania D-Met związane jest z bezpośrednim, jak i pośrednim, działaniem antyoksydacyjnym tego czynnika. Metionina jest jednym z łatwiej utlenianych aminokwasów i reaguje z nadtlakiem wodoru, rodnikiem hydroksylowym, podchlorynem czy nadtlenoazotynem, stanowiąc akceptor dla rodników [79]. W wyniku połączenia Met z RFT dochodzi do powstania sulfo-tlenku metioniny (MetO) i utraty aktywności przez reaktywną formę tlenu. Produkt tej reakcji, czyli MetO, jest mieszaniną dwóch diastereoizomerów MetO-S i MetO-R, które przy udziale specyficznych reduktaz sulfo-tlenku metioniny (MsrA i MsrB) w obecności tioreduktazy mogą zostać zredukowane do metioniny (ryc. 3). Każdy taki cykl eliminuje niebezpieczne dla organizmu związki, stanowiąc naturalny system oczyszczania [80]. Zdolność ta wyjaśnia, dlaczego Met może chronić przed czynnikami, takimi jak cisplatyna, aminoglikozydy czy

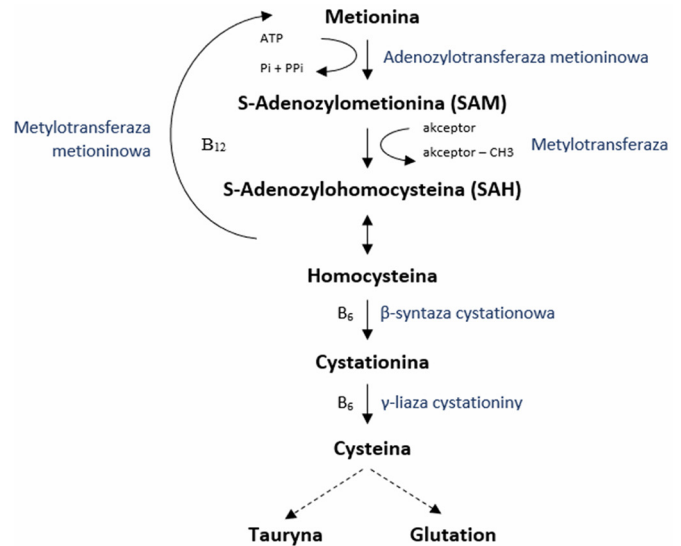


Ryc. 3. Biochemia utleniania i redukcji metioniny
Met – metionina; MetO-S/R – diastereoizomery sulfotlenku metioniny; MsrA/B – specyficzne reduktazy sulfotlenku metioniny; TrxR – reduktaza tioredoksyny; RFT – reaktywne formy tlenu

hałas, prowadzącymi do nieodwracalnych uszkodzeń ślimaka.

Pośredni efekt przeciwutleniający Met opiera się natomiast na dostarczaniu grupy cysteinowej do syntezy glutationu (ryc. 4), który jest najważniejszym przeciwutleniaczem występującym w komórkach. Wpływa ona zatem na wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego glutationu (GSH) [81], a zwłaszcza glutationu mitochondrialnego [82]. Istotne jest to ze względu na istnienie zależności pomiędzy stopniem utraty komórek słuchowych a funkcjonowaniem mitochondriów w urazie akustycznym [83]. Ponadto, D-Met może zapobiegać wpływowi GSH z komórki, który jest naturalną odpowiedzią organizmu na uszkodzenia [84].

Prowadzone na modelach zwierzęcych badania wykazały, że D-Met podawana doustnie [77], poprzez iniekcję [85] czy bezpośrednio na okienko okrągłe [86] powoduje zmniejszenie zaburzeń słuchu. Redukcję PTS zaobserwowano zarówno stosu-



Ryc. 4. Szlak metabolizmu metioniny i homocysteiny

jąc ten aminokwas do 2 dni przed narażeniem [85], jak również, gdy terapia została rozpoczęta 1, 3, 5 i 7 godzin po ekspozycji [77, 87]. Zmniejszenie TTS odnotowano u świnek morskich krótko narażonych na hałas (10 i 45 minut) [88, 89]. Efektu tego nie potwierdzono u myszy i szynszyli dla ekspozycji na hałas trwającej co najmniej 4 godziny [74, 90]. Nadal jednak brakuje badań ujednoczonych pod względem modelu zwierzęcego, parametrów hałasu i czasu trwania narażenia.

Podsumowanie

Uszkodzenie słuchu spowodowane hałasem jest na dzień dzisiejszy procesem nieodwracalnym. Konieczne jest zatem poszukiwanie środków terapeutycznych pozwalających na zwiększenie mechanizmów obronnych narządu słuchu. Ponieważ w patomechanizmie NIHL wiodącą rolę odgrywa stres oksydacyjny, prowadzone badania w znaczącej mierze dotyczą protekcyjnej roli egzogennych środków terapeutycznych, które mogłyby skutecznie wzmocnić endogenne mechanizmy antyoksydacyjne po narażeniu na hałas.

Piśmiennictwo

1. World Health Organization. Addressing the rising prevalence of hearing loss. Genewa, 2018.
2. World Health Organization. Primary ear and hearing care training resource. Genewa, 2006.
3. The National Institute on Deafness and Other Communication Disorders. Hearing Loss and Older Adults. Pobrano z lokalizacji <https://www.nidcd.nih.gov/health/hearing-loss-older-adults> 2016.
4. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Warszawa, 2003.
5. Poyton R, Ball K, Castello P. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. Trends Endocrinol Metab 2009; 20(7): 332-40.
6. Ohlemiller K, Wright J, Dugan L. Early Elevation of Cochlear Reactive Oxygen Species following Noise Exposure. Audiol Neurotol 1999; 4(5): 229-36.
7. Yamashita D, Jiang H, Schacht J, Miller J. Delayed production of free radicals following noise exposure. Brain Re 2004; 1019(1-2): 201-9.

8. Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Konishi K, Iguchi H, Nakagawa T, et al. The emergence of free radicals after acoustic trauma and strial blood flow. *Acta Oto-Laryngol* 1995; 519(Suppl.): 87-92.
9. Choung Y, Taura A, Pak K, Choi S, Masuda M, Ryan A. Generation of highly-reactive oxygen species is closely related to hair cell damage in rat organ of Corti treated with gentamicin. *Neuroscience* 2009; 161(1): 214-26.
10. Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A. Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol* 1995; 252(8): 504-8.
11. Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, Miller J. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res* 1999; 815(2): 317-25.
12. Shi X, Nuttall A. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress. *Brain Res* 2003; 967(1-2): 1-10.
13. Wei-Ju H, Xiao-Rui S, Nuttall A. Distribution and change of peroxynitrite in the guinea pig cochlea following noise exposure. *Biomed Rep* 2018; 9(2): 135-41.
14. Jacono A, Hu B, Kopke R, Henderson D, Van De Water T, Steinman H. Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla. *Hear Res* 1998; 117(1-2): 31-8.
15. Rewerska A, Pawelczyk M, Rajkowska E, Politanski P, Sliwiska-Kowalska M. Evaluating D-methionine dose to attenuate oxidative stress-mediated hearing loss following overexposure to noise. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270(4): 1513-20.
16. Maulucci G, Troiani D, Eramo S, Paciello F, Podda M, Paludetti G, et al. Time evolution of noise induced oxidation in outer hair cells: role of NAD(P)H and plasma membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840(7): 2192-202.
17. Honkura Y, Matsuo H, Murakami S, Sakiyama M, Mizutani K, Shiotani A, et al. NRF2 Is a Key Target for Prevention of Noise-Induced Hearing Loss by Reducing Oxidative Damage of Cochlea. *Sci Rep* 2016; 6: 19329.
18. Huang T, Cheng A, Stupak H, Liu W, Kim A, Staecker H, et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18(2-3): 259-70.
19. Hu B, Henderson D, Nicotera T. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res* 2002; 166(1-2): 62-71.
20. Dinh C, Goncalves S, Bas E, Van De Water T, Zine A. Molecular regulation of auditory hair cell death and approaches to protect sensory receptor cells and/or stimulate repair following acoustic trauma. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 96.
21. Lorenzo H, Susin S, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6(6): 516-24.
22. Li L, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412(6842): 95-9.
23. Yamashita D, Miller J, Jiang H, Minami S, Schacht J. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. *Neuroreport* 2004; 15(18): 2719-22.
24. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO Journal* 1998; 17(9): 2596-606.
25. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF alpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005; 120(5): 649-61.
26. Seidman M, Shivapuja B, Quirk W. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 109(6): 1052-6.
27. Choi C, Chen K, Du X, Floyd R, Kopke R. Effects of delayed and extended antioxidant treatment on acute acoustic trauma. *Free Radic Res* 2011; 45: 1162-72.
28. Spector G, Carr C. The ultrastructural cytochemistry of peroxisomes in the guinea pig cochlea: a metabolic hypothesis for the stria vascularis. *Laryngoscope* 1979; 89(6 Pt 2 Suppl 16): 1-38.
29. Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M. Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett* 2005; 380(3): 234-8.
30. Kirkegaard M, Murai N, Risling M, Suneson A, Jarlebark L, Ulfendahl M. Differential gene expression in the rat cochlea after exposure to impulse noise. *Neuroscience* 2006; 142: 425-35.
31. Bliska A, Kryczyk A, Włodek L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postepy Hig Med Dosw* 2007; 61: 438-53.
32. Bukowska B. Funkcje glutationu oraz czynniki zmniejszające jego stężenie. *Med Pracy* 2005; 56(1): 69-80.
33. Flohe L. Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci* 1988; 49: 663-8.
34. Łukaszewicz-Hussain A. Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu. *Med Pracy* 54(5): 473-9.
35. Usami S, Hjelle O, Ottersen O. Differential cellular distribution of glutathione (an endogenous antioxidant) in the guinea pig inner ear. *Brain Research* 1996; 743: 337-40.
36. Lautermann J, Crann S, McLaren J, Schacht J. Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear Res* 1997; 114(1-2): 75-82.
37. Yamasoba T, Nuttall A, Harris C, Raphael B, Miller J. Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res* 1998; 784(1-2): 82-90.
38. Ohlemiller K, McFadden S, Ding D, Lear P, Ho Y. Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2000; 1(3): 243-54.
39. Abi-Hache R, Zine A, Van De Water T. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotective strategies. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2010; 5: 147-63.
40. Kopke RD, Weisskopf PA, Boone JL, Jackson RL, Wester DC, Hoffer ME, et al. Reduction of noise-induced hearing loss using L-NAC and salicylate in the chinchilla. *Hear Res* 2000; 149(1-2): 138-46.
41. Wu H, Hsu C, Cheng T, Guo Y. N-acetylcysteine attenuates noise-induced permanent hearing loss in diabetic rats. *Hear Res* 2010; 267(1-2): 71-7.

42. Fetoni A, Ralli M, Sergi B, Parrilla C, Troiani D, Paludetti G. Protective effects of N-acetylcysteine on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2009; 29(2): 70-5.
43. Motalebi Kashani M, Saberi H, Hannani M. Prevention of Acoustic Trauma-Induced Hearing Loss by N-acetylcysteine Administration in Rabbits. *Arch Trauma Res* 2013; 1(4): 145-50.
44. Bielefeld E, Kopke R, Jackson R, Coleman J, Liu J, Henderson D. Noise protection with N-acetyl-L-cysteine (NAC) using a variety of noise exposures, NAC doses, and routes of administration. *Acta Otolaryngol* 2007; 127(9): 914-9.
45. Kopke R, Bielefeld E, Liu J, Zheng J, Jackson R, Henderson D, et al. Prevention of impulse noise-induced hearing loss with antioxidants. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(3): 235-43.
46. Kopke R, Slade M, Jackson R, Hammill T, Fausti S, Lonsbury-Martin B, et al. Efficacy and safety of N-acetylcysteine in prevention of noise induced hearing loss: a randomized clinical trial. *Hear Res* 2015; 323: 40-50.
47. Wendel A, Fausel M, Safayhi H, Tiegies G, Otter R. A novel biologically active selenoorganic compound - II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 3241-5.
48. Pourbakht A, Yamasoba T. Ebselen attenuates cochlear damage caused by acoustic trauma. *Hear Res* 2003; 181: 100-8.
49. Lynch E, Gu R, Pierce C, Kil J. Ebselen-mediated protection from single and repeated noise exposure in rat. *Laryngoscope* 2004; 114: 333-7.
50. Lynch E, Kil J. Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. *Drug Discovery Today* 2005; 10: 1291-8.
51. Kil J, Pierce C, Tran H, Gu R, Lynch E. Ebselen treatment reduces noise induced hearing loss via the mimicry and induction of glutathione peroxidase. *Hear Res* 2007; 226(1-2): 44-51.
52. Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M. Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett* 2005; 380(3): 234-8.
53. Kil J, Lobarinas E, Spankovich C, Griffiths S, Antonelli P, Lynch E, et al. Safety and efficacy of ebselen for the prevention of noise-induced hearing loss: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2017; 390(10098): 969-79.
54. Ahn J, Kang H, Kim Y, Chung J. Anti-apoptotic role of retinoic acid in the inner ear of noise-exposed mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 485-90.
55. Shim H, Kang H, Ahn J, Chung J. Retinoic acid applied after noise exposure can recover the noise-induced hearing loss in mice. *Acta Otolaryngology* 2009; 129: 233-8.
56. Rothman K, Moore L, Singer M, Nguyen U, Mannino S, Milunsky A. Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 1995; 333: 1369-73.
57. Maiani G, Caston M, Catasta G, Toti E, Cambrodon G, Bysted A, et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol Nutr Food Res* 2009; 2: S194-218.
58. Kim J, Kim Y. Animal models in carotenoids research and lung cancer prevention. *Transl Oncol* 2011; 4: 271-81.
59. Le Prell C, Dolan D, Bennett D, Boxer P. Nutrient plasma levels achieved during treatment that reduces noise-induced hearing loss. *Transl Res* 2011; 158(1): 54-70.
60. Le Prell C, Gagnon P, Bennett D, Ohlemiller K. Nutrient-enhanced diet reduces noise-induced damage to the inner ear and hearing loss. *Transl Res* 2011; 158: 38-53.
61. Le Prell C, Hughes F, Miller J. Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 1454-63.
62. Michikawa T, Nishiwaki Y, Kikuchi Y, Hosoda K, Mizutari K, Saito H, et al. Serum levels of retinol and other antioxidants for hearing impairment among Japanese older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64: 910-15.
63. Gopinath B, Flood V, McMahon C, Burlutsky G, Spankovich C, Hood L, et al. Dietary antioxidant intake is associated with the prevalence but not incidence of age-related hearing loss. *Nutr Health Aging* 2011; 15: 896-900.
64. Jagetia G, Rajanikant G, Rao S, Baliga M. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated γ radiation. *Clinica Chimica Acta* 2003; 332(1-2): 111-21.
65. Dereköy F, Köken T, Yilmaz D, Kahraman A, Altuntaş A. Effects of ascorbic acid on oxidative system and transient evoked otoacoustic emissions in rabbits exposed to noise. *Laryngoscope* 2004; 114(10): 1775-9.
66. McFadden S, Woo J, Michalak N, Ding D. Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res* 2005; 202: 200-8.
67. Rabinowitz P, Pierce Wise J, Hur Mobo B, Antonucci P, Powell C, Slade M. Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear Res* 2002; 173: 164-71.
68. Hou F, Wang S, Zhai S, Hu Y, Yang W, He L. Effects of alpha-tocopherol on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res* 2003; 179(1-8): 1-8.
69. Yamashita D, Jiang H, Le Prell C, Schacht J, Miller J. Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience* 2005; 134: 633-42.
70. Cascella V, Giordano P, Hatzopoulos S, Petrucci J, Prosser S, Simoni E, et al. A new oral otoprotective agent. Part 1: Electrophysiology data from protection against noise-induced hearing loss. *Med Sci Monit* 2011; 18: BR1-8.
71. Spankovich C, Hood L, Silver H, Lambert W, Flood V, Mitchell P. Associations between diet and both high and low pure tone averages and transient evoked otoacoustic emissions in an older adult population-based study. *J Am Acad Audiol* 2011; 22: 49-58.
72. Choi C, Chen K, Du X, Floyd R, Kopke R. Effects of delayed and extended antioxidant treatment on acute acoustic trauma. *Free Radic Res* 2011; 45: 1162-72.
73. Shargorodsky J, Curhan S, Eavey R, Curhan G. A prospective study of vitamin intake and the risk of hearing loss in men. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 142: 231-6.
74. Kopke R, Coleman J, Liu J, Campbell K, Riffenburgh R. Candidate's thesis: enhancing intrinsic cochlear stress defenses to reduce noise-induced hearing loss. *Laryngoscope* 2002; 112(9): 1515-32.
75. Campbell K, Rybak L, Meech R, Hughes L. D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. *Hear Res* 1996; 102(1-2): 90-8.

76. Ekborn A, Laurell G, Johnström P, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. D-Methionine and cisplatin ototoxicity in the guinea pig: D-methionine influences cisplatin pharmacokinetics. *Hear Res* 2002; 165(1-2): 53-61.
77. Campbell K, Meech R, Klemens J, Gerber M, Dyrstad S, Larsen D, et al. Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. 2007; 226(1-2): 92-103.
78. Sha S, Schacht J. Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potential protectant. *Hear Res* 2000; 142: 34-40.
79. Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(1): 93-105.
80. Bin P, Huang R, Zhou X. Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine. *BioMed Research International*, 2017.
81. Lu S. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin Liver Dis* 1998; 18(4): 331-43.
82. Fernández-Checa J, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Marí M, Miranda M, et al. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 1998; 8(1-2): 7-11.
83. Hyde G, Rubel E. Mitochondrial role in hair cell survival after injury. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 113(5): 530-40.
84. Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 1998; 12(6): 479-86.
85. Claussen A, Fox D, Yu X, Meech R, Verhulst S, Hargrove T, et al. D-methionine pre-loading reduces both noise-induced permanent threshold shift and outer hair cell loss in the chinchilla. *Int J Audiol* 2013; 52(12): 801-7.
86. Korver K, Rybak L, Whitworth C, Campbell K. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 126(6): 683-9.
87. Campbell K, Claussen A, Meech R, Verhulst S, Fox D, Hughes L. D-methionine (D-met) significantly rescues noise-induced hearing loss: timing studies. *Hear Res* 2011; 282(1-2): 138-44.
88. Cheng P, Liu S, Young Y, Hsu C, Lin-Shiau S. Protection from noise-induced temporary threshold shift by D-methionine is associated with preservation of ATPase activities. *Ear Hear* 2008; 29(1): 65-75.
89. Alagic Z, Gojny M, Canlon B. Protection against acoustic trauma by direct application of D-methionine to the inner ear. *Acta Otolaryngol* 2011; 131(8): 802-8.
90. Samson J, Wiktorek-Smagur A, Politanski P, Rajkowska E, Pawlaczyk-Luszczynska M, Dudarewicz A, et al. Noise-induced time-dependent changes in oxidative stress in the mouse cochlea and attenuation by D-methionine. *Neuroscience* 2008; 152(1): 146-50.