

ПРОТОКОЛ КОРОТКОГО ЗВУКОВОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ОСЛАБЛЯЕТ ПРОЯВЛЕНИЯ ЦИСПЛАТИНОВОЙ ОТОТОКСИЧНОСТИ У КРЫС

Иванов С.А.^{1,2}, Журавский С.Г.^{1,2}, Галагудза М.М.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург,
Россия

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Иванов Сергей Александрович
ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад.
И.П.Павлова» Минздрава России
ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург,
Россия, 197022
E-mail: serjivanov84@gmail.com

Статья поступила в редакцию 05.09.2016
и принята к печати 10.09.2016.

Резюме

Цель исследования. Оценить возможность защитного эффекта акустического воздействия в условиях проявления острой цисплатиновой ототоксичности. **Материалы и методы.** Лабораторных крыс стока Wistar подвергали различным вариантам акустического воздействия перед однократным внутривенным введением цисплатина в дозе 7 мг/кг. Функциональное состояние улитки оценивалось с помощью метода отоакустической эмиссии. **Результаты.** Минимальная депрессия амплитуды кривой отоакустической эмиссии на третьи сутки после введения цисплатина зарегистрирована в группе с экспозицией тонального звукового сигнала 5 кГц при интенсивности 100 дБ непрерывно в течение 15 минут. **Выводы.** Выявленный режим акустического воздействия может рассматриваться как экспериментальная основа для разработки метода отопротекции в режиме звукового прекондиционирования.

Ключевые слова: звуковое прекондиционирование, цисплатин, ототоксичность, отоакустическая эмиссия.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2016; 3 (4): 90–96.

BRIEF PROTOCOLS OF SOUND PRECONDITIONING INHIBIT CISPLATIN-INDUCED OTOTOXICITY IN RATS

Ivanov S.A.^{1,2}, Zhuravsky S.G.^{1,2}, Galagudza M.M.^{1,2}

¹Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Sergey A. Ivanov
Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
L'va Tolstogo str. 6/8
Saint Petersburg, Russia,
197022
E-mail: serjivanov84@gmail.com

Received 05 September 2016; accepted 10 September 2016.

Abstract

Objective. In this study, we compared the effectiveness of different protocols of sound preconditioning against cisplatin-induced ototoxicity. **Materials and methods.** Laboratory rats were subjected to different protocols of acoustic stimulation before intravenous injection of cisplatin at a dose of 7 mg/kg. The functional state of inner ear was evaluated using otoacoustic emission. **Results.** Minimal depression of otoacoustic emission amplitude tracing on the third day after cisplatin injection was registered in the group subjected to the following sound preconditioning protocol: tonal signal 5 kHz, intensity 100 dB, continuous period of 15 minutes. **Conclusion.** The result obtained indicates that sound preconditioning could be recommended for prevention of ototoxicity-mediated hearing loss in the clinical settings.

Key words: sound preconditioning, cisplatin, ototoxicity, otoacoustic emission.

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (4): 90–96.

Введение

Ятрогенная ототоксичность — известная причина необратимого снижения остроты слуха в условиях применения ряда фармакологических препаратов: платиносодержащих противоопухолевых препаратов, аминогликозидных антибиотиков, петлевых диуретиков и др. [1]. Следует отметить, что цисплатин (ЦП) среди этих препаратов имеет самый высокий потенциал повреждения периферического звена слухового анализатора. Широкое применение ЦП как в детской (остеосаркома, ретино-, гепатобластомы, опухоль Вильмса и др.), так и во взрослой (рак легких, репродуктивных органов, головы и шеи и др.) онкологической практике делает цисплатиновую ототоксичность (ЦО) крайне актуальной проблемой. Так, частота возникновения клинически выраженных ототоксических

реакций зависит от схем терапевтического лечения и выявляется уже в 26% случаев при курсовой дозе ЦП до 240 мг/м² [1] и более чем у 50% обследуемых с дозами, превышающими 400 мг/м² [2].

Особенность ятрогенной ототоксичности — ее предсказуемость, а, следовательно, возможность проведения мер профилактики, а также лечение до появления стойкого функционально значимого клеточного дефицита сенсорных и невралгических элементов улитки [1]. Однако следует отметить, что возможности фармакотерапии заболеваний внутреннего уха и сегодня продолжают оставаться ограниченными из-за существования гематолабиринтного барьера [3]. В связи с этим, для тех клинических областей, где широко применяются ототоксические лекарственные препараты, целесообразно было бы использовать методы ототроп-

ных воздействий, нефармакологическим способом повышающих неспецифическую резистентность кохлеарных тканей.

Одним из наиболее изучаемых направлений тканевой защиты является контролируемое включение эндогенных механизмов цитопротекции, отвечающее физиологической концепции preconditionирования [4]. Его эффективность многократно доказана как в экспериментальной [5], так и в клинической практике, а методы, основанные на феномене preconditionирования, уже применяются для защиты органов и тканей при различных кардиологических, гастроэнтерологических и неврологических заболеваниях [6, 7, 8].

Представляется целесообразным изучить возможности preconditionирования в аспекте защиты слухового анализатора при известных ототравляющих условиях. При этом для индукции защитных процессов во внутреннем ухе с помощью физиологически адекватного стимула может использоваться акустическое воздействие (АВ) неповреждающей интенсивности. Несмотря на то, что сам феномен звукового preconditionирования (ЗПрЕК) известен давно [9], изучение защитных возможностей АВ в ототоксических условиях только начинается [10].

Цель работы — оценить ототективный потенциал предварительного воздействия акустического стимула на модели острого цисплатинового повреждения слухового анализатора.

Материалы и методы

В работе использовались крысы-самцы стока Wistar, 84 особи, возраста 14-16 недель, массой 250-300 г, без признаков соматической патологии и воспалительных процессов в среднем ухе. Выделено 12 экспериментальных групп по 7 животных (14 ушей) в каждой.

Для создания модели цисплатиновой ототоксичности внутривенно однократно вводили раствор ЦП (Cisplatin-Teva 100 мг / 100 мл) 1 мг/мл, в дозе

7 мг/кг. Режим введения осуществлялся по схеме: $\frac{1}{2}$ объема раствора в течение 2 минут, перерыв 15 минут, затем $\frac{1}{2}$ оставшегося объема — в последующие 2 минуты. Инъекции проводились в боковую вену хвоста животным, фиксированным в камере Когана.

Экспозиция акустической стимуляции проводилась за 20 минут перед введением ЦП в условиях звукоизолированной камеры в свободном звуковом поле подачей звукового тона 5 кГц в различных вариантах интенсивности и длительности (таблица 1). Для каждой экспериментальной группы создавалась контрольная группа с инъекцией 1 мл физиологического раствора и проведением соответствующего протокола АВ.

Для оценки функциональной активности периферического звена слухового анализатора использовали метод регистрации амплитуды отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (ПИ ОАЭ). В работе использовался прибор «Нейро-Аудио» («Нейрософт», Россия), оснащенный программным обеспечением «Neuro-Audio. NET».

Регистрация ПИ ОАЭ проводилась в условиях анестезии тиопенталом натрия 50 мг/кг внутривенно трижды: за 1 сутки до и к окончанию 1-х и 3-х суток после введения ЦП. В работе представлены статистические результаты сравнения амплитуд ПИ ОАЭ до введения и на 3-и сутки после введения ЦП на частотах 3077 Гц, 4 кГц, 5 кГц, 6400 Гц.

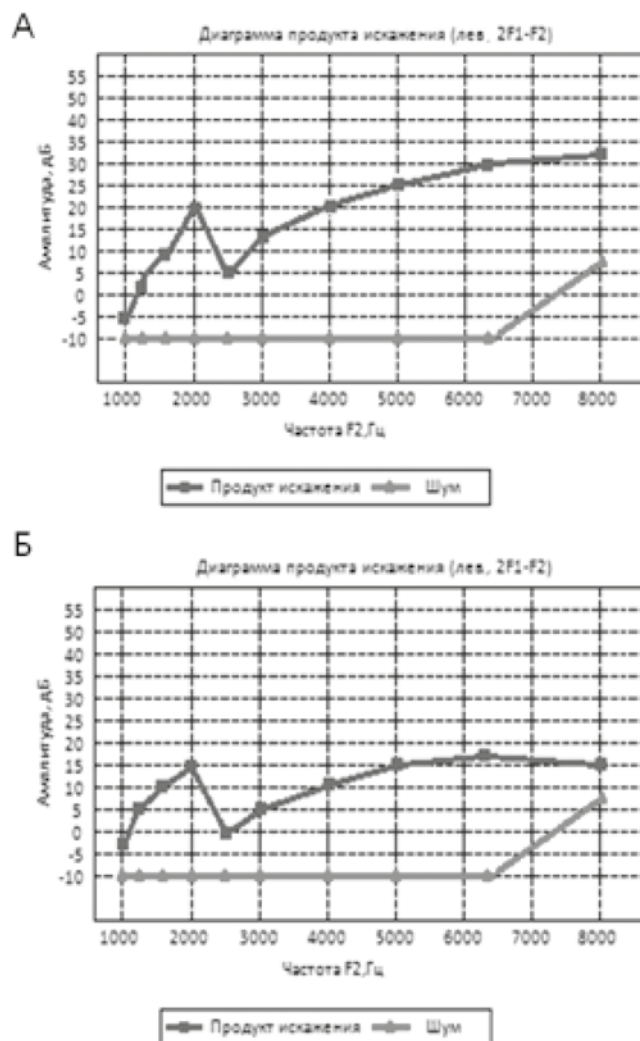
Для проверки различий между двумя выборками парных измерений использовался непараметрический Т-критерий Уилкоксона. Для количественных признаков общее межгрупповое различие оценивалось при помощи критерия Краскала — Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для статистической обработки данных применялся программный пакет SPSS 17.0.

Содержание и все манипуляции на экспериментальных животных соответствовали требованиям Этического комитета ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, разработанным на основе Хельсинкской Декларации.

Таблица 1. Исследуемые протоколы акустической стимуляции

Группы	Варианты режимов воздействия звукового тона 5 кГц
ЦП+АВ1	интенсивность 100 дБ, непрерывно 15 минут
ЦП+АВ2	Интенсивность 100 дБ, дискретно: 5 минут нагрузка, 5 минут перерыв, 5 минут нагрузка, 5 минут перерыв, 5 минут нагрузка
ЦП+АВ3	интенсивность 100 дБ, непрерывно 5 минут
ЦП+АВ4	интенсивность 90 дБ, непрерывно 15 минут
ЦП+АВ5	интенсивность 80 дБ, непрерывно 15 минут

Рисунок 1. Пример депрессии амплитуды кривой ПИ ОАЭ к 3-м суткам после однократного внутривенного введения цисплатина в дозе 7 мг/кг.



А — исходная амплитуда кривой ПИ ОАЭ; Б — амплитуда кривой ПИ ОАЭ через 3-е суток после введения цисплатина.

Результаты

В контрольных группах озвучивания не было выявлено значимых изменений амплитуды ПИ ОАЭ, что позволяет говорить об отсутствии самостоятельного травматического действия предложенных для изучения вариантов акустической стимуляции.

К третьим суткам после внутривенного введения ЦП наблюдалась отчетливая депрессия амплитуды ПИ ОАЭ, свидетельствующая об адекватности дозы и способа введения препарата задаче создания модели острого цисплатинового повреждения слухового анализатора у крыс (рисунок 1).

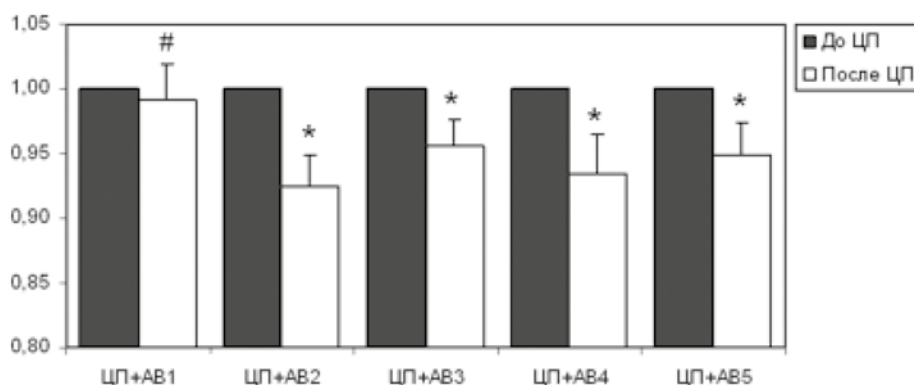
В группах с предварительной экспозицией звукового воздействия перед введением ЦП значения амплитуды ПИ ОАЭ оказывались ниже, чем перед началом эксперимента ($p < 0,05$). Однако, группы имели различия по интенсивности этой депрессии, или,

другими словами, изучаемые протоколы акустического воздействия демонстрировали неодинаковый ототективный эффект (рисунок 2).

Значение медианы в группах ЦП+AB2, ЦП+AB4, ЦП+AB5 было отрицательным (таблица 2), что говорит о наименьшей выраженности влияния звука на формирования ЦО. Иная ситуация наблюдалась в группах ЦП+AB1 и ЦП+AB3. Здесь наименьшее значение среднеквадратичного отклонения отмечено в группе ЦП+AB1, что указывает на наименьшее снижение амплитуды ПИ ОАЭ и, соответственно, о наиболее выраженном ототективном эффекте соответствующего протокола.

При сравнении изучаемых показателей между группами только группа ЦП+AB1 отличалась от групп ЦП+AB2, ЦП+AB4 и ЦП+AB5 ($p < 0,05$) (таблица 3).

Рисунок 2. Степень угнетения амплитуды ПИ ОАЭ после введения цисплатина для всех оцениваемых частот в группах с различными протоколами звукового воздействия.



Исходная амплитуда ПИ ОАЭ принята за единицу. # — $P = 0,2$; * — $P < 0,05$ в сравнении с исходным уровнем. Условные обозначения — см. Таблицу 1.

Таблица 2. Значение показателей среднего, среднеквадратичного отклонения и медианы для групп различных вариантов акустического воздействия

№ группы	Статистические критерии		
	Среднее	Среднеквадратичное отклонение	Медиана
ЦП+AB1	-0.08	3.19	0.00
ЦП+AB2	-2.33	4.66	-1.00
ЦП+AB3	-1.07	4.38	0.00
ЦП+AB4	-2.04	4.73	-2.00
ЦП+AB5	-1.50	4.37	-2.00

Таблица 3. Результаты сравнения изменения показателей ПИ ОАЭ в группах различных протоколов акустического воздействия

Сравниваемые группы	p	Сравниваемые группы	p
ЦП+AB1 и ЦП+AB3	0,19	ЦП+AB2 и ЦП+AB4	0,61
ЦП+AB1 и ЦП+AB2	0,018*	ЦП+AB2 и ЦП+AB5	0,26
ЦП+AB1 и ЦП+AB4	0,013*	ЦП+AB3 и ЦП+AB4	0,13
ЦП+AB1 и ЦП+AB5	0,0022*	ЦП+AB3 и ЦП+AB5	0,07
ЦП+AB2 и ЦП+AB3	0,12	ЦП+AB4 и ЦП+AB5	0,76

* $p < 0,05$, непараметрический критерий Уилкоксона.

Таким образом, настоящим исследованием выявлен протокол звукового воздействия тональным сигналом 5 кГц при интенсивности 100 дБ в режиме 15-минутной непрерывной экспозиции, демонстрирующий слухосохраняющий эффект в условиях создания острого цисплатинового повреждения слухового анализатора.

Обсуждение

Развитие защитного эффекта акустической стимуляции в режиме ЗПрЕК в условиях, в частности, острой ЦО имеет патогенетическое обоснование. Цитотоксический эффект ЦП, как известно, развивается за счет гиперактивации реакций окислительного стресса путем хелатирования серы цито-

зольных «платинофилов» (глутатиона, метионина) и повреждения митохондрий, приводящего к некомпенсируемому образованию активных форм кислорода, а также утечке ионов кальция, с последующим запуском апоптоза [11]. В тоже время акустическая стимуляция в субтравматической интенсивности запускает ряд внутриклеточных неспецифических *регулируемых* процессов в сенсорном отделе слухового анализатора, наиболее существенными из которых являются интенсификация антиоксидантной защиты (повышение синтеза глутатиона, регуляция внутриклеточного тока ионов кальция и др.), активация ряда нейротрофических систем [12]. Таким образом, внутриклеточные процессы, инициируемые во внутреннем ухе в рамках физиологических эффектов акустической стимуляции, могут рассматриваться как тренирующие реакции цитопротективного свойства, способные ограничивать интенсивность цитотоксических реакций ЦП адресно в тканях внутреннего уха.

К сожалению, несмотря на то, что феномен ЗПреК в эксперименте исследуется уже более 50 лет, акустические параметры изучаемых протоколов не подходят для применения в клинических условиях в связи с тем, что применялись многочасовые или высоко-интенсивные, граничащие с травматической, экспозиции акустических стимулов [9, 13, 14]. Кроме того, возможность защитного эффекта ЗПреК изучалась применительно к узкому спектру патологических состояний, прежде всего к хронической и острой акустическим травмам [3]. Особенность нашего эксперимента — расширение его клинической направленности. Речь идет, во-первых, об изучении коротких по времени экспозиций стимуляции, которые по своим акустическим характеристикам реальны для применения в клинических условиях, а, во-вторых, изучение слухосохраняющей возможности ЗПреК в условиях модели актуальной отоневрологической патологии — ятрогенной (лекарственной) острой сенсоневральной тугоухости.

На модели ЦО мы продемонстрировали отопротективный потенциал акустического воздействия, примененного в режиме звукового preconditionирования. Выявленный протокол звуковой стимуляции по своим характеристикам (физиологической адекватности для слухового рецептора и акустической безопасности) допускает его изучение в клинических условиях. Звуковая экспозиция в указанных параметрах может быть использована для разработки нефармакологической слухосохраняющей методики, применяемой в условиях онкологической практики с целью профилактики ятрогенного ототоксического повреждения слухового анализатора.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (15-04-08138).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Roland PS, John A, Rutka MD. Ototoxicity. Decker B.C., ON: Elsevier, 2004. p. 220.
2. Bokemeyer C, Berger CC, Hartmann JT et al. Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. Br. J. Cancer. 1998; 77(8):1355–1362.
3. Felix D. Rational pharmacotherapy of the inner ear. Advances in Oto-Rhino-Laryngology. Basel: Karger. 2002. p.168.
4. Zhuravsky SG, Galagudza MM, Prosvirina MS et al. Pre- and postconditioning phenomena from old principle to a new therapeutic strategy. Bulletin FCSKE imeni V.A. Almazova=Bulletin of Almazov federal heart blood, and endocrinology centre. 2012; 5(16):16–29. in Russian. [Журавский С.Г., Галагудза М.М., Просвирнина М.С. и др. Феномены пре- и посткондиционирования: от старого принципа к новой стратегии терапии. Бюллетень ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова. 2012; 5(16):16–29].
5. Galagudza MM, Nekrasova MK, Syrenskii AV, Nifontova EM. Cardioprotective effect of anti-ischemic and metabolic pre-conditioning in experiment. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova=Russian Journal Of Physiology. 2006; 92(3):284–291. In Russian. [Галагудза М.М., Некрасова М.К., Сыренский А.В. и др. Устойчивость миокарда к ишемии и эффективность ишемического preconditionирования при экспериментальном сахарном диабете. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2006; 92(3):284–291].
6. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. J. Am. Coll. Cardiol. 2006; 47(11): 2277–2282.
7. Faries PL, DeRubertis B, Trocciola S et al. Ischemic preconditioning during the use of the PercuSurge occlusion balloon for carotid angioplasty and stenting. Vascular. 2008; 16(1): 1–9.
8. Desai KK, Dikdan GS, Shareef A et al. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation. Liver Transpl. 2008; 14:1569–1577.
9. Miller JD, Watson CS, Covell WP. Deafening effects of noise on the cat. Acta Otolaryngol Suppl. 1963; 176: 1–91.
10. Theneshkumar S, Lorito G, Giordano P et al. Effect of noise conditioning on cisplatin-induced ototoxicity: a pilot study. Med Sci Monit. 2009; 15(7): 173–177.
11. Ivanov SA, Zhuravsky SG, Galagudza MM. Ototoxicity of cisplatin. Vestnik Otorinolaringologii=Bulletin of Otorhinolaryngology. 2012; 4:82–7. In Russian [Иванов С.А., Журавский С.Г., Галагудза М.М. Циспла-

тиновая ототоксичность. Вестник оториноларингологии. 2012; 4:82–87].

12. Ivanov SA, Zhuravsky SG, Galagudza MM. Molecular mechanisms of otoprotection by sound preconditioning. Bulletin FCSKE imeni V.A. Almazova = Bulletin of Almazov federal heart blood, and endocrinology centre. 2013; 6(23):69-76. In Russian. [Иванов СА, Журавский СГ, Галагудза ММ. Молекулярные механизмы отопротекции в условиях феномена звукового preconditionирования (обзор литературы). Бюллетень ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова. 2013; 6(23):69-76].

13. Subramaniam M, Campo P, Henderson D. The effect of exposure level on the development of progressive resistance to noise. Hear Res. 1991; 52:181-188.

14. Henselman LW, Henderson D, Subramaniam M et al. The effect of 'conditioning' exposures on hearing loss from impulse noise. Hear Res. 1994; 78(1):1–10.

Информация об авторах:

Иванов Сергей Александрович — аспирант Лаборатории слуха и речи НИЦ ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

Журавский Сергей Григорьевич — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории слуха и речи НИЦ ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; заведующий Научно-исследовательской группой экспериментальной патоморфологии Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, профессор РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Author information:

Sergey A. Ivanov, PhD student, Laboratory of Hearing and Speech, assistant of the Department of Pathophysiology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Sergei G. Zhuravskii, MD, head of the Group of Experimental Pathomorphology Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Laboratory of Hearing and Speech, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

Michael M. Galagudza, MD, Head of Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Professor at the Department for Pathophysiology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.