



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE
CICLO XXIV

COORDINATORE Prof. Capitani Silvano

STUDIO DEL DANNO Uditivo CAUSATO
DA RUMORE O DA CISPLATINO: EFFETTO PROTETTIVO
DI ACUVAL400 ED N-QTER

Settore Scientifico Disciplinare MED/32

Dottorando
Dott. Cascella Vincenza

Tutore
Prof. Granieri Enrico

Anni 2009/2011

Ai miei genitori

INDICE

INTRODUZIONE

1. APPARATO Uditivo	1
2. ANATOMIA DELLA COCLEA	3
3. ORGANO DEL CORTI	4
4. STRIA VASCOLARE	7
5. LE VIE NERVOSE Uditive	8
6. TRASMISSIONE E TRASDUZIONE DEL SUONO	10
7. POTENZIALI EVOCATI Uditivi DEL TRONCO ENCEFALICO (ABR)	11
8. IPOACUSIA NEUROSENSORIALE INDOTTA DA TRAUMA ACUSTICO	14
9. OTOTOSSICITÀ	15
10. CISPLATINO (cis-diamminadichloroplatino II)	16
10.1 MECCANISMO D'AZIONE	17
11. SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO	20
12. EFFETTI OTOTOSSICI DEL TRAUMA ACUSTICO	21
13. EFFETTI OTOTOSSICI DEL CISPLATINO	22
14. APPROCCI TERAPEUTICI NEI CONFRONTI DELLA SORDITÀ IN SEGUITO AL TRAUMA ACUSTICO	23
15. COENZIMA Q10	25
16. SCOPO DEL LAVORO	27

MATERIALI E METODI

1. MODELLO ANIMALE	28
2. FARMACI	28
3. ANESTESIA	28
4. MISURAZIONE DEI POTENZIALI EVOCATI (ABR)	29
5. ANALISI STATISTICA	30
6. METODO DI VALUTAZIONE	30
7. ORGANIZZAZIONE ESPERIMENTI	31
7.1 STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL RUMORE	32
1. TRATTAMENTI	32
1.1 ACUVAL@400 ed n-QTER	32
1.2 ESPOSIZIONE AL RUMORE	32
2. ESECUZIONE ESPERIMENTI	33
2.1 ESPERIMENTO I	33
2.2 ESPERIMENTO II	33
2.3 ESPERIMENTO III	33
7.2 STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL CISPLATINO	35
1. TRATTAMENTI	35
1.1 ACUVAL@400 ed n-QTER	35
1.2 CISPLATINO	35
2. ESECUZIONE ESPERIMENTI	36
2.1 ESPERIMENTO I	36
2.2 ESPERIMENTO II	37

RISULTATI	
1. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL RUMORE	38
<i>ESPERIMENTO I</i>	38
<i>ESPERIMENTO II</i>	40
<i>ESPERIMENTO III</i>	42
2. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL CISPLATINO	45
<i>ESPERIMENTO I</i>	45
<i>ESPERIMENTO II</i>	47
DISCUSSIONE	
1. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL RUMORE	49
2. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL RUMORE	52
CONCLUSIONE E OBIETTIVI FUTURI	54
BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUZIONE

1. APPARATO UDITIVO

L'orecchio è l'organo deputato alla percezione degli stimoli uditivi e posizionali. Per tale ragione, esso presenta sia recettori acustici, per la sensibilità uditiva, che recettori statocinetici, per la sensibilità gravitazionale e di accelerazione. Dal punto di vista morfologico e funzionale può essere suddiviso in tre parti: *orecchio esterno*, *medio* ed *interno* (fig. 1).

L'*orecchio esterno* è costituito dal padiglione auricolare, dal meato acustico e dalla membrana timpanica; svolge la funzione di convogliare ed intensificare le vibrazioni sonore verso l'orecchio medio ed aiuta a discriminare la posizione della sorgente sonora.

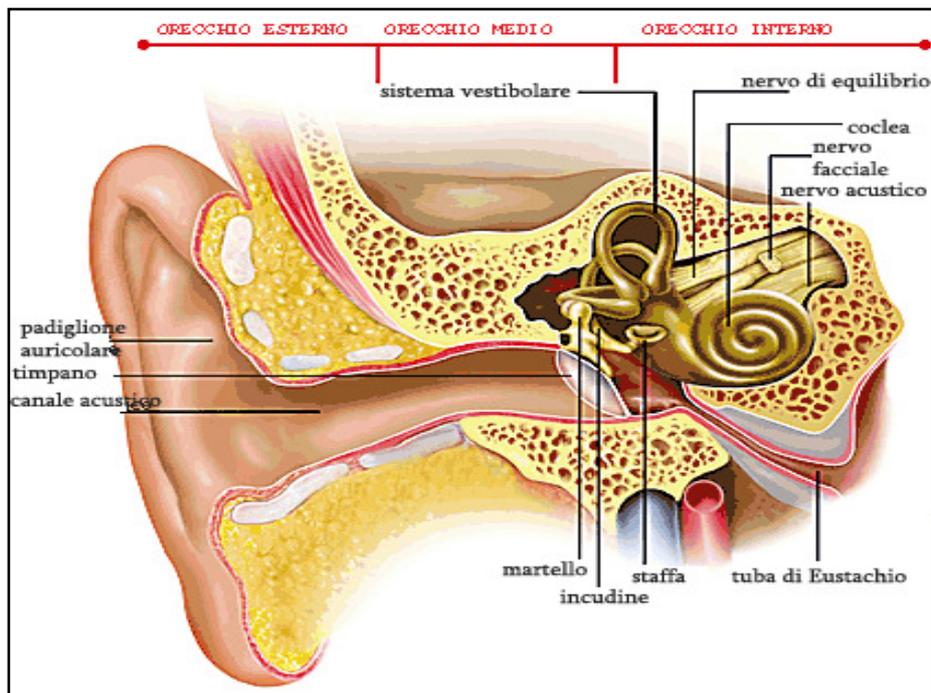


Fig.1: Schema di una sezione frontale dell'orecchio (livelovehear.blogspot.com).

L'*orecchio medio* è costituito dalla cassa del timpano, dalla tuba di Eustachio e da un insieme di cavità che formano l'apparato mastoideo. Nella cassa del timpano è contenuta la catena degli ossicini (martello, incudine e staffa) che amplifica le vibrazioni prodotte dalle onde sonore sulla membrana del timpano e le trasmette al liquido contenuto nell'orecchio interno attraverso la stimolazione della finestra ovale.

L'*orecchio interno* è costituito dalla coclea (dove si trovano i recettori acustici) e dal labirinto (nel quale si trovano i recettori stato-cinetici e che comprende il vestibolo ed i canali semicircolari) (fig.2).

La coclea è la parte più complessa e delicata di tutto l'apparato uditivo, nella maggior parte dei casi la sordità è imputabile a danni del tessuto di tipo neurosensoriale.

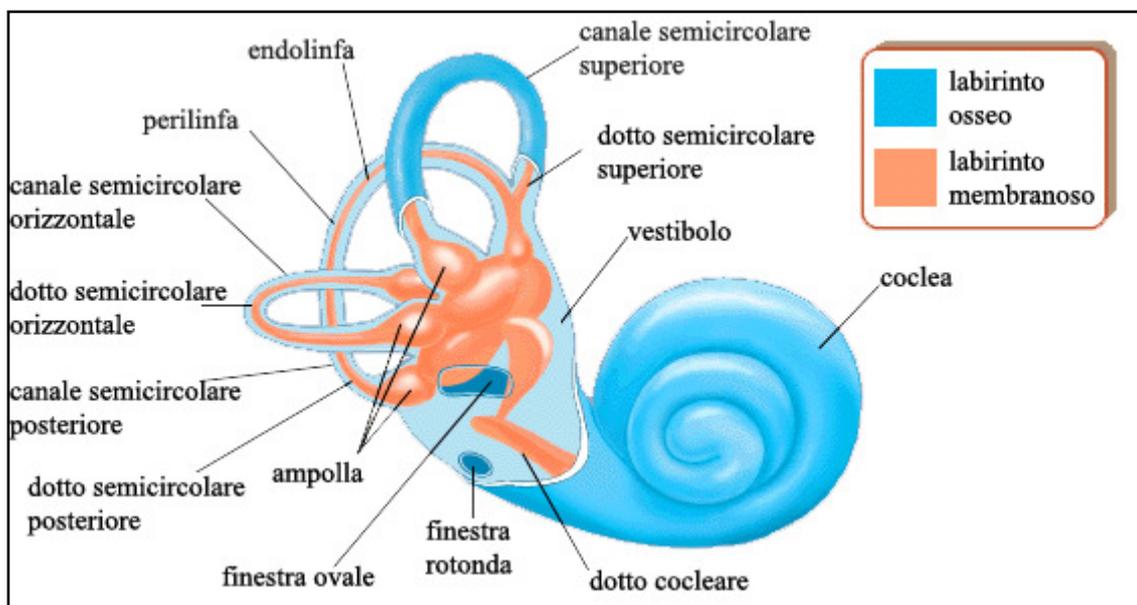


Fig.2: *Rappresentazione del labirinto osseo e membranoso della coclea* (www.student.britannica.com).

2. ANATOMIA DELLA COCLEA

La coclea (fig. 3-A) è una struttura costituita da un canale osseo, contenente un canale membranoso, che nel ratto e nell'uomo, si avvolge per due giri e mezzo attorno ad un pilastro centrale detto *modiolo*, si estende per circa 3.5 cm ed ha la forma di una chiocciola di sezione decrescente a partire dalla base (a contatto con la finestra ovale) fino all'apice.

La figura 3-A mostra una sezione trasversale della coclea, al suo interno si riconoscono tre compartimenti o scale: la *scala vestibolare*, la *scala media* (o dotto cocleare), separata dalla precedente per mezzo della membrana di Reissner, e la *scala timpanica*, separata per mezzo della membrana basilare. La scala timpanica e la scala vestibolare comunicano nella parte apicale della coclea attraverso un foro detto *elicotrema*.

Le suddette cavità cocleari sono colmate da due liquidi l'*endolinfa* che scorre nella scala media e la *perilinf*a che scorre nelle scale vestibolare e timpanica (Grandori & Martini; 1995).

Endolinfa e perilinfa differiscono nella composizione ionica che porta a una differenza di potenziale dell'ordine di 80 millivolt, componente necessaria per la corretta funzione uditiva.

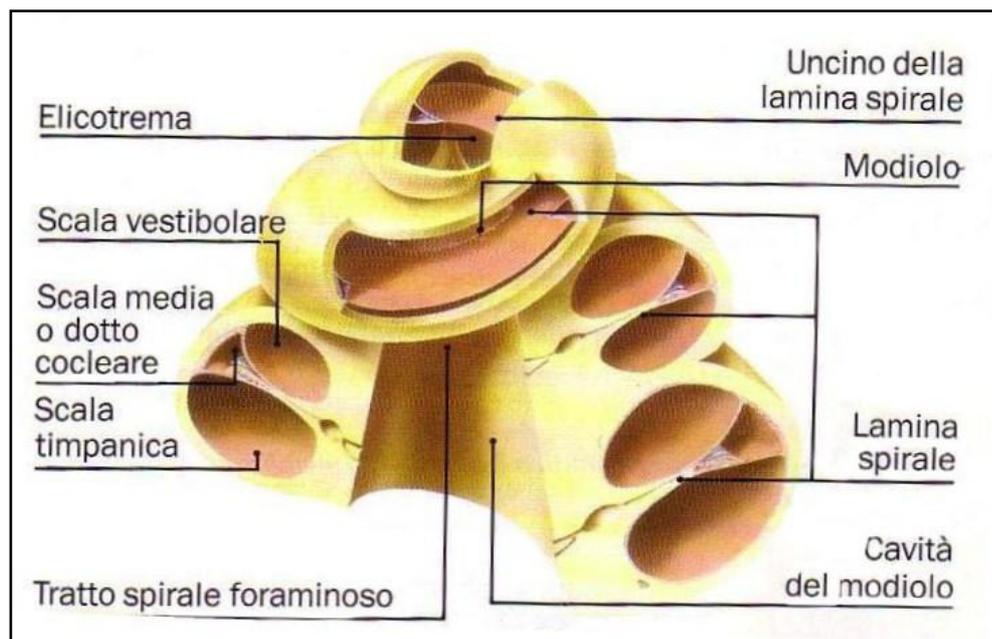


Fig.3-A: Rappresentazione schematica dei canali costituenti la coclea (Colletti e Sittoni-1993).

3. ORGANO DEL CORTI

Il dotto cocleare è delimitato dalla membrana basilare e dalla membrana del Reissner.

In esso si trova l'apparato sensoriale dell'orecchio: l'*Organo del Corti* (ODC) (fig. 3-B), così chiamato in onore di Alfonso Corti che lo scoprì e lo studiò nel 1847.

L'ODC è una struttura cellulare che poggia sulla membrana basilare ed è formato da *cellule sensoriali* e *cellule di sostegno*.

Le cellule sensoriali si dividono in una fila di cellule cigliate interne (CCI) e tre file di cellule cigliate esterne (CCE) (fig.4) (Grandori e Martini; 1995).

Ogni cellula sensoriale è in contatto con diversi tipi di cellule di sostegno: le cellule a pilastro interne ed esterne (cellule di Hensen) che separano le CCE dalle CCI e delimitano il tunnel del Corti e le cellule di Deiters (o di sostegno) che collegano le cellule cigliate esterne alla membrana basilare.

Le CCI hanno un aspetto globoso nella parte basale e media, mentre le CCE hanno una forma cilindrica allungata (Rossi; 1997, Grandori & Martini; 1995).

Dalla parte apicale di ciascuna cellula acustica si dipartono sottili estroflessioni citoplasmatiche chiamate *stereociglia* (fig.4).

Le stereociglia delle CCI sono disposte in due file e allineate a formare una fila continua lungo tutto l'organo, mentre nelle CCE sono disposte in tre file, formando il tipico modulo a *W* il cui apice è diretto verso la stria vascolare (Rossi; 1997) (fig. 4).

Le stereociglia sono coperte dalla *membrana tectoria*, una struttura acellulare costituita da fibrille immerse in una sostanza amorfa con un potenziale d'azione sensitivo positivo.

Alcuni studi dimostrano che la membrana tectoria agisce come scambiatore di ioni pertanto influisce sull'equilibrio chimico dei fluidi a contatto con le stereociglia (Grandori & Martini; 1995).

Quando le stereociglia più alte si inclinano leggermente, per effetto delle oscillazioni della membrana basilare, il fascio stereocigliare si apre a ventaglio mettendo in tensione i filamenti proteici che ne fanno aprire i canali posti sulla loro sommità.

L'apertura di questi canali determina l'ingresso di correnti elettriche sufficienti a depolarizzare la cellula di alcuni millivolt la contrazione che ne deriva stimola le terminazioni dendritiche dei neuroni che si trovano alla base della cellula sensoriale, i cui corpi cellulari costituiscono il ganglio acustico spirale (fig.3-B).

La *membrana basilare* è una membrana elastica formata da una moltitudine di sottili fibre elastiche tese diametralmente tra due creste ossee sporgenti verso l'interno del dotto.

Man mano che si procede verso l'apice le fibre diventano più lunghe rispetto alla base della coclea. A livello del giro basale la membrana basilare risulta stretta e spessa, con una maggiore rigidità, per cui viene sollecitata preferenzialmente da stimoli sonori ad alta frequenza (toni acuti); nel giro apicale, invece, la membrana si fa più larga e sottile, caratteristica che le dà maggiore elasticità e che le permette di entrare facilmente in vibrazione per stimoli a bassa frequenza (toni gravi). La vibrazione della membrana basilare è un'onda simil-sinusoidale che origina sempre dalla base della coclea e si propaga verso l'apice.

La motilità delle ciglia è quindi di fondamentale importanza per l'apparato uditivo, infatti l'assenza o la perdita, anche parziale, delle ciglia e delle cellule cigliate è una delle principali cause di sordità.

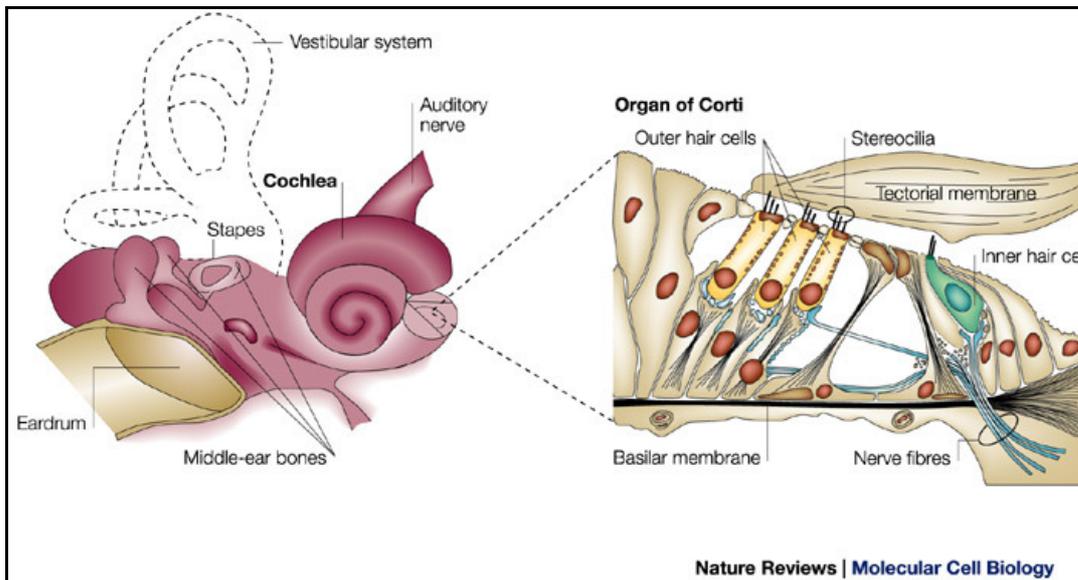


Fig.3-B: Rappresentazione della coclea ed in particolare dell'Organo del Corti contenuto in essa. (Dallos P & Fakler B; 2002).

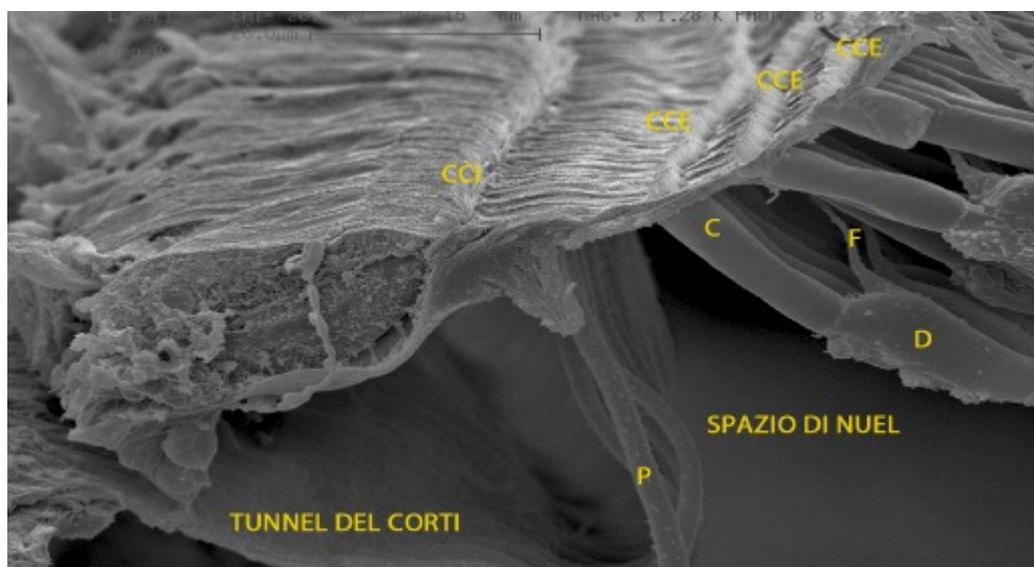


Fig.4: Sezione dell'ODC di cavia. In figura si possono osservare: lo spazio di Nuel e il tunnel del Corti; le tre file delle cellule cigliate esterne (CCE) con il loro tipico corpo cellulare allungato (C) e la fila delle cellule cigliate interne (CCI); le cellule pilastro (P), le cellule di Deiter (D) con i rispettivi prolungamenti chiamati falangi (F). (Giordano P, 2010).

4. STRIA VASCOLARE

La parete laterale del dotto cocleare è rivestito da un epitelio riccamente vascolarizzato: la *stria vascolare* (fig.5).

La stria vascolare insieme all'ODC e alla membrana del Reissner è responsabile della genesi del potenziale endococleare, in quanto concorrono in modo indipendente e coordinato all'omeostasi dell'endolinfa della scala media, che ha una elevata concentrazione di potassio.

La stria vascolare è costituita da tre tipi di cellule: *basali*, *intermedie* e *marginali*. Le cellule marginali ricoprono il bordo del canale endolinfatico e giocano un ruolo chiave negli scambi ionici e nella formazione del potenziale dell'endolinfa.

Il potassio secreto dalla stria vascolare entra nelle cellule cigliate attraverso i canali meccano-sensitivi apicali dello ione K⁺ (codificati dai geni KCNJ10, SLC12A2, KCNE1, KCNQ1) e lascia le CCE attraverso i canali KCNQ4 (Marcus et al.; 2002) (Delpire et al.; 1999).

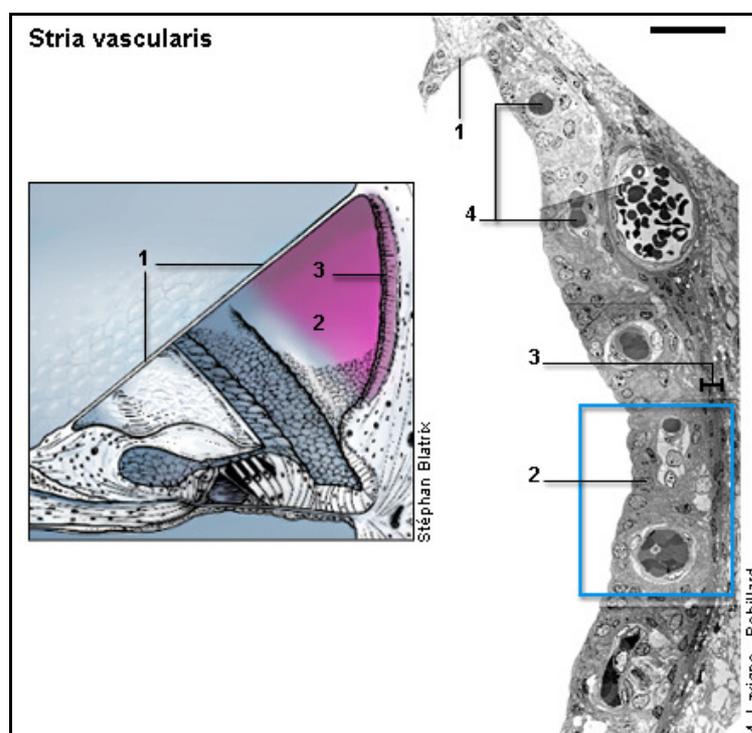


Fig.5: A sinistra, una rappresentazione schematica del dotto cocleare (2) delimitato dall'organo del Corti, dalla membrana del Reissner (1) e dalla stria vascolare (3)(M. Lavigne-rebillard).

A destra, la stria vascolare dell'essere umano: 1 - Parte della membrana di Reissner. 2 - Cellule marginali. 3 - Cellule basali. 4 - Vasi capillari di anima.

5. LE VIE NERVOSE UDITIVE

Nel modiolo è contenuto il *ganglio spirale* (fig.6) che è costituito dai corpi cellulari dei singoli neuroni afferenti alla coclea, essi formano il nervo uditivo il quale assieme al nervo vestibolare costituisce il *nervo acustico* (VIII paio di nervi cranici) (Trevisi & Ricci, 1998).

Il ganglio spirale è caratterizzato da 3 popolazioni di cellule:

- le cellule di tipo I (90-95%) sono neuroni bipolari con terminazioni nervose ricoperte di mielina che perdono man mano che arrivano in prossimità dell'ODC;
- le cellule di tipo II sono neuroni pseudo-unipolari (5%) prive di guaina mielinica e presenti, singolarmente o in gruppo, lungo tutta la spirale della coclea;
- le cellule di tipo III (1%) sono simili al tipo I ma prive di guaina mielinica (Grandori & Martini, 1995, Rossi, 1997, Trevisi & Ricci, 1998).

Le fibre dei neuroni di tipo I innervano principalmente le CCI, le cellule di tipo II invece innervano le CCE, infine, le cellule di tipo III collegano fra loro diverse CCI (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998).

Il 95% delle fibre nervose provenienti dal ganglio spirale prende contatto con le cellule cigliate interne, il restante 5% innerva le CCE (Spoendlin, 1972): poichè le CCI vengono innervate da più fibre nervose permettono di discriminare i suoni, mentre nel caso delle CCE dove una fibra nervosa può innervare più cellule si ottiene una migliore sensibilità del segnale.

I neuroni del ganglio spirale sono la prima tappa della via acustica afferente: il prolungamento periferico di questi neuroni bipolari penetra nella coclea dove si mette in rapporto con le cellule acustiche cigliate dell'ODC; il prolungamento centrale, invece, passa attraverso i canali longitudinali del modiolo, dove gli assoni formano il ganglio spirale e vanno a formare la componente cocleare dell'*ottavo nervo cranico*.

Il nervo cocleare percorre il meato acustico interno per poi unirsi con il nervo vestibolare, formando un unico tronco nervoso. Quest'ultimo penetra nel tronco encefalico a livello del bordo superiore del bulbo, vicino al peduncolo cerebellare inferiore (fig.6) (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998).

Le fibre che compongono il nervo cocleare terminano quindi nei nuclei cocleari del tronco encefalico immediatamente superficiali ai peduncoli cerebellari inferiori (corpo restiforme). Di qui partono le vie nervose ascendenti che formano i lemnischi laterali, dai quali si diparte la radiazione uditiva che si proietta nel giro temporale traverso o di Heschl che si trova lungo la superficie posteriore del giro temporale superiore, dove si trovano le aree acustiche primarie e associative corrispondenti alle aree 41 e 42 della mappa di Brodmann (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998).

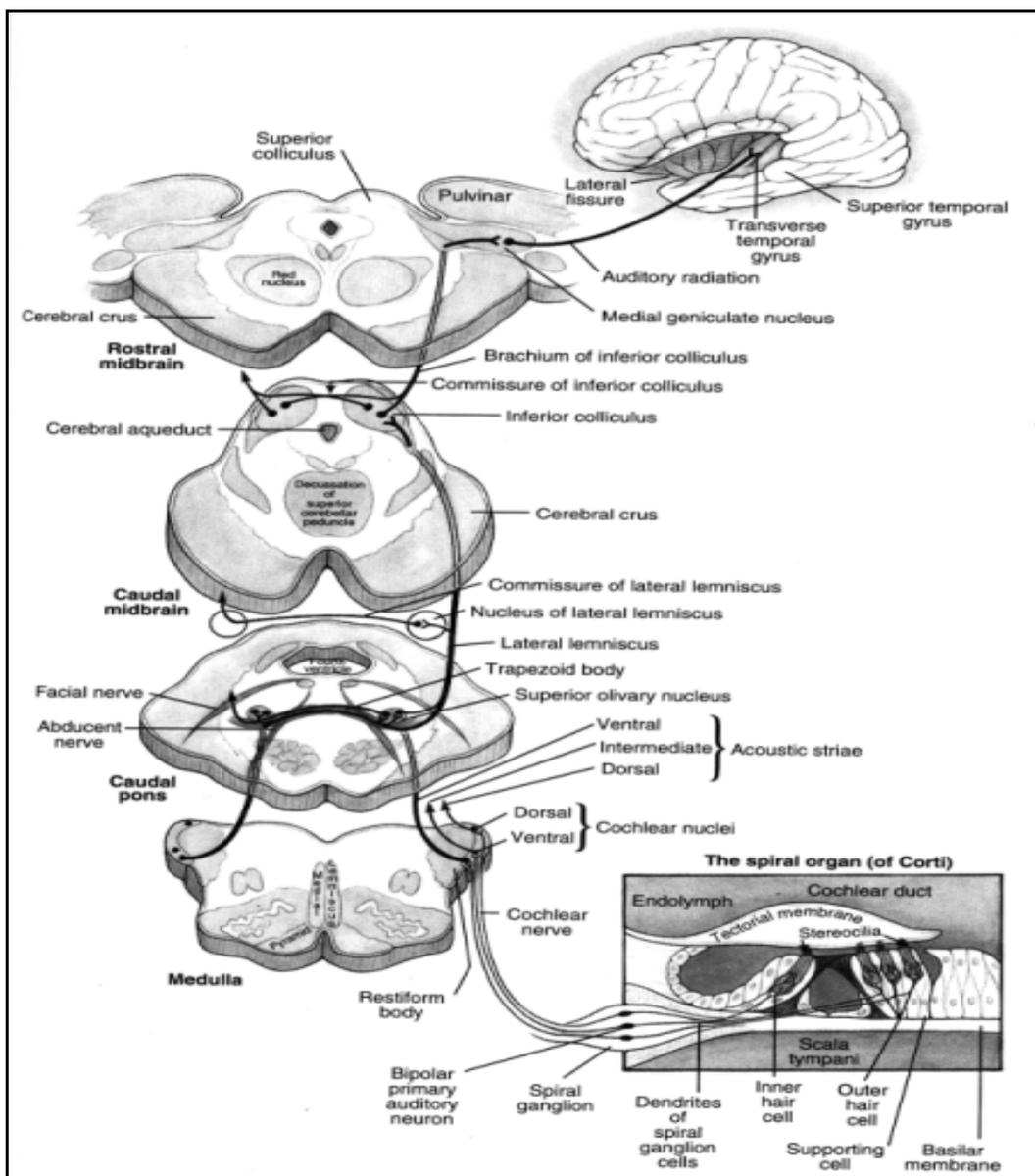


Fig.6: *Rappresentazione del nervo cocleare*
 (<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/brain/CAL3/BaBy1CAL3.htm>).

6. TRASMISSIONE E TRASDUZIONE DEL SUONO

Le onde elastiche, per essere tradotte in segnali elettrici, subiscono una serie di modificazioni meccaniche a livello dell'orecchio medio e di quello interno, allo scopo di adattare l'impedenza del segnale, di amplificarlo e di segregarne le frequenze. Il padiglione auricolare riflette e concentra le onde sonore incanalandole nel meato uditivo esterno verso la membrana timpanica.

Lo spostamento del timpano si ripercuote sulla catena degli ossicini dell'orecchio medio (martello, incudine e staffa) che amplificano le onde sonore e le trasmettono alla perilinfa mediante l'azione del piede della staffa sulla finestra ovale. Poiché la perilinfa è un liquido incomprimibile, è il movimento alternato della membrana della finestra rotonda che causa una deformazione elastica della scala media e delle relative membrane.

I movimenti oscillatori, che si creano nella scala media e in particolare nella membrana basilare, provocano la deformazione dell'ODC attivando o l'inibendo le due popolazioni di cellule recettoriali: le CCE e le CCI.

In entrambi i tipi cellulari l'attivazione avviene a causa della deflessione delle ciglia, con conseguente modificazione della loro forma e rapidissimo accorciamento che comporta una variazione della polarizzazione delle cellule stesse (Grandori & Martini, 1995; Rossi; 1997; Trevisi & Ricci, 1998).

Le CCI essendo le sole connesse sinapticamente con le fibre del nervo acustico rappresentano le vere cellule recettoriali.

Il nervo acustico trasmette l'informazione sonora, trasformata in codice elettrico (potenziali d'azione) alle strutture centrali.

Dal ganglio spirale il segnale acustico, segregato per frequenze, entra nel bulbo e giunge ai nuclei cocleari dorsale e ventrale, qui si attua l'analisi della successione temporale degli stimoli e dell'intensità, successivamente il segnale passa al nucleo olivare superiore ove si attua l'analisi delle differenze interneurali dell'intensità del suono (fig.6).

Dal nucleo olivare passa al nucleo del lemnisco laterale, da dove il segnale raggiunge il collicolo inferiore per arrivare successivamente al talamo (corpo genicolato mediale) (fig.6).

Dal talamo, infine, l'informazione raggiunge la corteccia uditiva primaria e le contigue aree uditive secondarie (fig.6) (Grandori & Martini, 1995; Rossi; 1997; Trevisi & Ricci, 1998).

7. POTENZIALI EVOCATI Uditivi DEL TRONCO ENCEFALICO

(ABR)

Le risposte uditive del tronco encefalico, ABR (Auditory Brainstem Response), rappresentano una risposta elettrofisiologica a uno stimolo esterno (click o tone-burst) di breve durata, che origina dalle fibre nervose della via uditiva primaria del tronco encefalico per propagarsi al collicolo inferiore.

E' un'esame audiometrico non invasivo che permette di registrare l'attività elettrica del nervo cocleare, delle vie dei nuclei del tronco encefalico fino al collicolo inferiore, mediante l'applicazione di tre elettrodi a disco: uno al vertice (attivo), uno alla fronte (terra) e uno sulla mastoide (riferimento).

Il soggetto viene poi posto in una cabina (gabbia di Faraday) che ne assicura l'isolamento elettrico e acustico (Grandori & Martini; 1995).

L'esame viene effettuato

L'ABR viene visualizzato sottoforma di sette onde che compaiono dopo circa 10 millisecondo dallo stimolo acustico e vengono indicate con i numeri romani dalla I alla VII (fig. 7 e fig. 8).

Nell'uomo secondo Moller (1983) ciascuna onda origina in zone ben precise ed in particolare:

- la porzione distale del nervo cocleare per l'onda I;
- la porzione prossimale per l'onda II;
- i nuclei cocleari dorsale e ventrale per l'onda III;
- il complesso olivare superiore per la IV;
- il lemisco laterale per l'onda V;
- le onde VI e VII sono le meno studiate poichè le più difficili da visualizzare; la loro sede d'origine sarebbe posta a livello del collicolo inferiore e del corpo genicolato mediale (Picton et al; 1981)

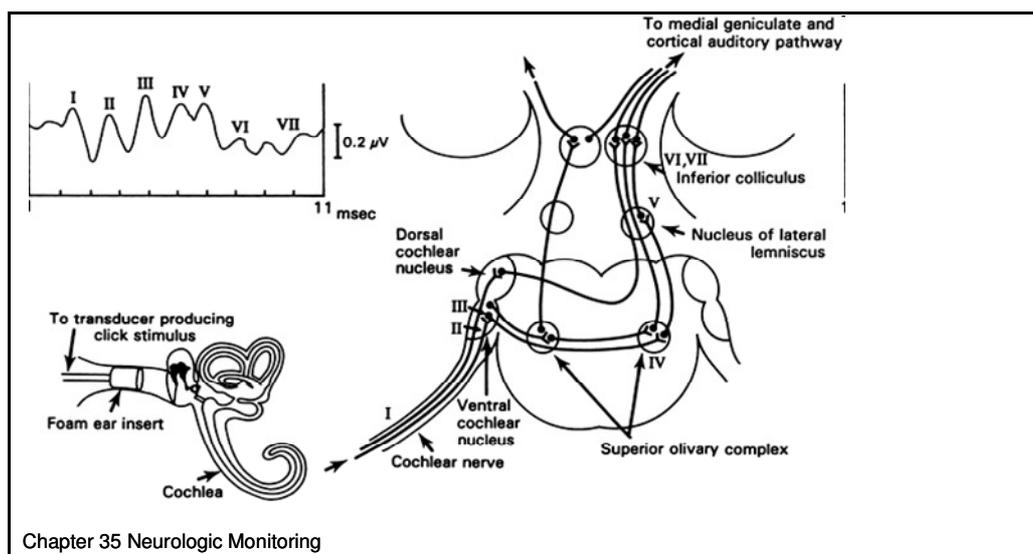


Fig. 7: Risposta elettrofisiologica (ABR) in seguito allo stimolo click. (Black S, Mahla ME, Cucchiara RF, 1994).

Nel campo audiologico infantile di particolare importanza è la presenza dell'onda V che è la sola visualizzabile alle più basse intensità di stimolazione ed è quindi un buon indice della soglia uditiva nel range frequenziale 2-4 KHz.

Quest'onda ha una latenza di circa 6 ms (ad una intensità di 70-80 dB HL) e talvolta compare assieme all'onda IV (*complesso onda IV-V*).

Una disfunzione dell'orecchio medio, qualunque ne sia la causa, porta a una riduzione dell'energia sonora che entra nella coclea con conseguente riduzione dell'onda V.

Nel bambino il sonno spontaneo è la condizione migliore per registrare i potenziali.

Nel ratto la risposta elettrofisiologica consiste di 5-7 picchi di onda misurati nei primi 10 ms dall'inizio di uno stimolo sonoro (Blatchley, 1987; Burkard et al., 1990; Church et al., 1988).

L'onda III rappresenta l'onda di maggiore ampiezza ed è l'ultima a scomparire abbassando il livello di stimolo.

Nell'analisi dei dati si misura la latenza di quest'onda poichè è il migliore indicatore della funzione uditiva centrale: è abbastanza stabile negli animali sani, mentre aumenta sensibilmente in seguito a disfunzioni uditive come quelle provocate dalla somministrazione di farmaci ototossici (Starr et al.; 1976).

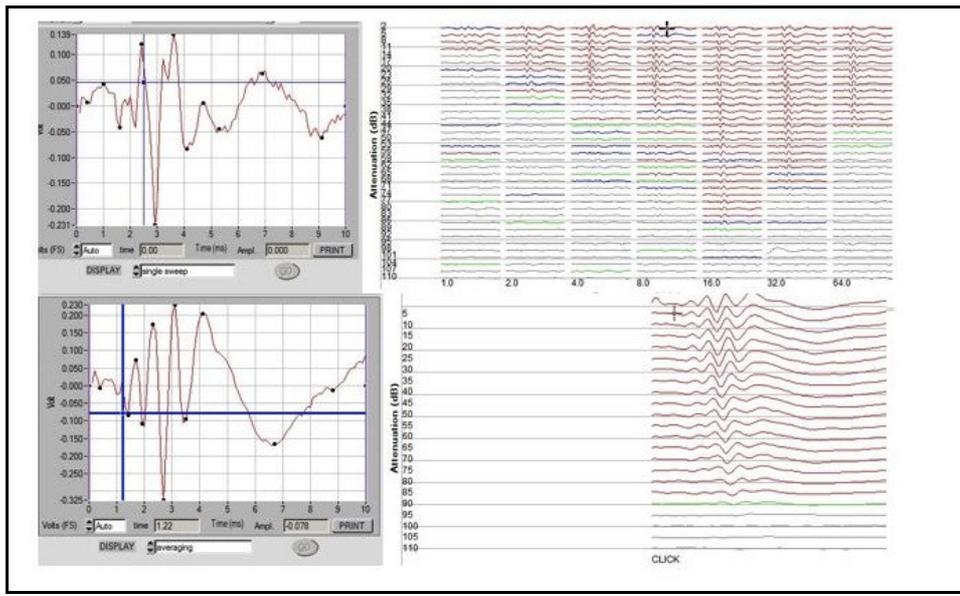


Fig. 8: Rappresentazione di un potenziale evocato del tronco encefalico (ABR), in risposta allo stimolo click registrato su Guinea pig normoudente (Foto del centro di Bioacustica di Ferrara).

8. IPOACUSIA NEUROSENSORIALE INDOTTA DA TRAUMA ACUSTICO

Negli ultimi trent'anni sono stati chiariti molti aspetti relativi all'*ipoacusia neurosensoriale indotta da trauma acustico* (noise induced hearing loss, NIHL) e come essa possa essere una conseguenza di un danno di tipo meccanico e di tipo metabolico.

Il danno meccanico dato dall'esposizione a rumori impulsivi si esplica a livello delle giunzioni cellulari per estendersi alle CCE, quello metabolico, invece, compare durante l'esposizione a rumori continui.

Entrambi i tipi di danno sono responsabili della morte delle cellule cigliate e dei neuroni per apoptosi o necrosi con conseguente perdita uditiva.

La morte cellulare continua anche dopo la cessazione all'esposizione al rumore.

La maggior parte degli studi condotti sulla perdita uditiva, nell'uomo e negli animali, riguardano il rumore continuo, tuttavia, gli stimoli sonori della vita quotidiana sono generalmente intermittenti, basti pensare alla maggior parte degli impianti industriali, nei quali il personale è esposto a questo tipo di rumore di intensità variabile (Yang et al., 2004).

Il rumore intermittente rispetto al quello continuo di pari intensità è responsabile di piccoli spostamenti di soglia temporanea, dovuti ad una minima perdita delle cellule cigliate, sia nell'animale (Akram & Tatsuya, 2003) che nell'uomo (Johnsson & Hawkins, 1976).

A seconda della quantità di energia sonora che passa nell'orecchio interno le lesioni possono essere *reversibili* caratterizzate da un aumento temporaneo delle soglie uditive (*temporary threshold shift* o TTS) con un recupero più o meno di lunga durata, o *irreversibili*, per le quali si ha un aumento permanente delle soglie uditive (*permanent threshold shift* o PTS) (Grandori & Martini; 1995).

Dopo un trauma acustico le lesioni dell'ODC responsabili del TTS sono caratterizzate dalla deformazione delle cellule di sostegno e dal disaccoppiamento tra stereociglia e membrana tectoria delle CCE (Grandori & Martini; 1995).

Le lesioni all'origine dei PTS sono dovute alla perdita di cellule cigliate e di fibre uditive afferenti sulla zona frequenziale interessata (Grandori & Martini; 1995).

9. OTOTOSSICITÀ

La prima definizione di agente ototossico fu data da Johnsson & Hawkins (1976), che definirono *ototossico* “ogni agente terapeutico o altra sostanza chimica che reca danni funzionali e cellulari ai tessuti dell’orecchio interno”.

L’ototossicità può essere acuta o cronica: la prima è reversibile, la seconda è di solito irreversibile. Le manifestazioni cliniche maggiormente documentate a livello dell’orecchio interno possono essere riassunte in: *ipoacusia* (l’insorgenza di un deficit uditivo che può manifestarsi in forma acuta, profonda, media o lieve ed è definita come perdita quantitativa del suono), *acufeni* o *tinnito* (disturbo costituito da rumori che, sotto diversa forma quali fischi, ronzii, fruscii, crepitii, soffi, pulsazioni ecc., hanno origine all’interno dell’apparato uditivo ma vengono percepiti come esterni), *iperacusia* (l’individuo assume una ridotta capacità di tollerare suoni esterni, in tal caso alla ipoacusia si aggiunge la perdita di qualità del suono in entrata) e *vertigini*.

Tra i farmaci particolarmente tossici per l’ODC (cocleotossici) ci sono i *salicilati*, il *chinino* e i suoi sostituti sintetici, i *diuretici*, l’*acido etacrinico*, la *furosemide*, gli *antibiotici aminoglicosidici* e gli *antineoplastici* (Rossi; 1997).

Gli *antibiotici aminoglicosidici* in caso di sovradosaggio o di insufficienza renale possono dar luogo anche a nefrotossicità oltre che ad ototossicità. Sono dei farmaci antimicrobici che dal 1940 vengono utilizzati con successo nel trattamento di gravi infezioni batteriche (Hall & Collis; 1998).

Tra gli antibiotici aminoglicosidici responsabili di ototossicità si ricorda la **streptomina** impiegata per il trattamento della tubercolosi che può determinare tossicità a livello vestibolare, mentre la **neomicina**, la **netilmicina**, la **tobramicina**, la **kanamicina**, l’**amikacina**, la **gentamicina** possono dare prevalentemente danni al sistema uditivo.

Il *sodio salicilato* o acido salicilico (aspirina) può indurre una temporanea perdita di udito e tinnito (Falbe & Hansen, 1941; Muller et al., 2003).

Contrariamente agli antibiotici aminoglicosidici l’ototossicità sensoneuronale causata dai salicilati è reversibile, i danni causati da questo farmaco sono dovute ad alterazione metabolica della coclea (Brockenbrough et al.; 2001).

Gli effetti ototossici a scapito delle cellule cigliate cocleari sono riscontrabili prima di tutto a livello del giro basale e sulle CCE piuttosto che sulle CCI (Hayashida et al.; 1989). Oltre ai salicilati e agli antibiotici aminoglicosidici si è visto che anche i *farmaci antineoplastici*, usati in terapie tumorali, hanno come effetto collaterale l’ototossicità.

Il **cisplatino** (CDDP) è stato utilizzato per la prima volta nel 1971 ed in letteratura è riportato che, oltre ad ototossicità causa anche nefrotossicità come gli aminoglicosidi (Hill et al., 1975; Taguchi et al., 2005).

10. CISPLATINO (cis-diamminadicloroplatino II)

Il cisplatino (cis-diamminedicloroplatino II) (CDDP) è un potente farmaco antitumorale e antiproliferativo alchelante del DNA, largamente usato nel trattamento di tumori solidi del testicolo, cervice, ovaia, vescica, prostata e carcinoma squamoso del collo e della testa (Schweitzer, 1993; James et al., 1997; Sakamoto, 2000).

Il prefisso “cis” del cis-diamminodicloroplatino si riferisce all’arrangiamento dei due atomi di Cl che sono disposti su uno stesso lato rispetto all’atomo di Pt e alle due molecole di NH₃ sono disposte esattamente dall’altra parte (fig. 9) (Andersson et al.; 1994).

Nonostante nell’ambito della farmaceutica moderna sia un composto inusuale, poiché la maggior parte dei farmaci sono di origine organica, il suo successo è dovuto ad una serie di proprietà: mostra un ampio spettro di attività antitumorale; mostra un’eguale efficacia sia contro i tumori a crescita lenta che rapida; non mostra deformazioni e cambiamenti particolari; mostra attività contro le malattie virali e i tumori trapiantabili; agisce sia sui tumori solidi che disseminati.

Originariamente il cisplatino era conosciuto come *cloruro di Peyrone*, nome derivante dal chimico che l’aveva sintetizzato nel 1845.

Uno dei maggiori ostacoli alla diffusione di questo farmaco sono i numerosi effetti collaterali di tossicità, tra cui la nefrotossicità e l’otossicità che si manifesta soprattutto nei bambini (Saito & Aran; 1994).

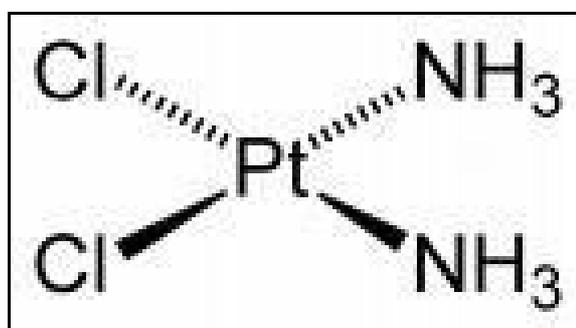


Fig. 9: Struttura chimica del cisplatino.

Il cisplatino può infatti causare danni renali che includono: degenerazione tubulare, necrosi e mineralizzazione delle cellule epiteliali tubulari (Dobyan DC; 1980).

L'effetto ototossico del CDDP è caratterizzato da perdita di udito sensoneuronale progressivo, bilaterale e irreversibile (Sone M; 1998).

I fattori che determinano l'incidenza di ototossicità comprendono: via di somministrazione, dose cumulativa, età, fattori dietetici, livelli di proteine sieriche, fattori genetici (Sakamoto; 2000).

10.1 MECCANISMO D'AZIONE

Il CDDP entra nelle cellule o passivamente per *diffusione* attraverso i canali transmembrana o per *diffusione facilitata* attraverso un sistema di trasporto di membrana non ancora identificato (Gately & Howell, 1990).

In seguito alla diffusione cellulare i due atomi di cloro presenti nel CDDP vengono sostituiti da due molecole di acqua, genera il complesso monoidrato che è una molecola carica positivamente e altamente reattiva (Fig. 10).

Il complesso monoidrato è la forma citotossica in quanto è in grado di interagire con i siti nucleofili come le proteine cellulari, la membrana fosfolipidica, i microfilamenti del citoscheletro, l'RNA e il DNA cellulare e mitocondriale (fig. 11) (Andrews & Howell; 1990).

Tuttavia sembra che solo l'1% del CDDP intracellulare sia in grado di interagire con il DNA nucleare mediante legami crociati che vengono a formarsi tra i filamenti del DNA stesso e tra proteine e DNA.

E' stato dimostrato che il CDDP tende preferenzialmente ad associarsi con la guanina e che tale interazione porta a modificazioni della struttura del DNA (come gli addotti di G*pG*), alterando l'intero ciclo cellulare e in particolare la fase G1 (Sherman et al.; 1988).

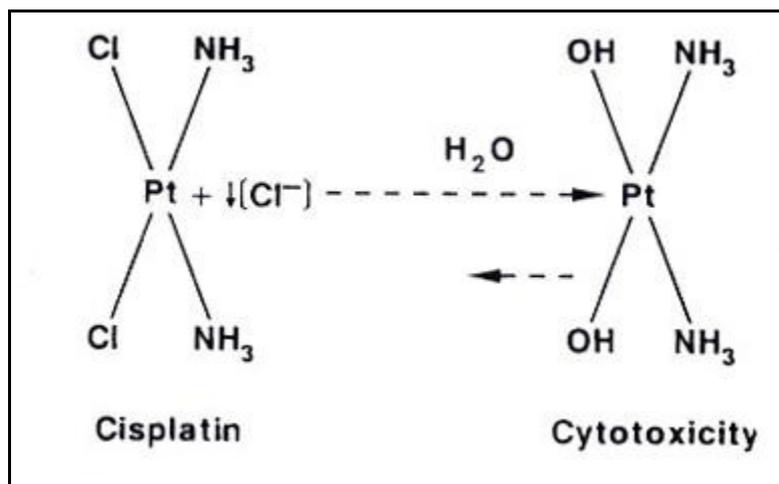


Fig. 10- Formazione delle molecole responsabili delle specie attive del cisplatino.

Inizialmente si credeva che il legame di interazione con il DNA riguardasse l'O₆, tuttavia in seguito si osservò che il sito fondamentale di interazione era l'N₇. Ulteriori studi rivelano che il CDDP mostra preferenze per l'N₇ delle purine (adenina e guanina) e per l'N₃ delle pirimidine (citosina e uracile) (Sadler & Guo; 1998) (Fig. 11).

In particolare, essendo il CDDP bifunzionale si lega con due siti N₇ della guanina (Sadler & Guo; 1998).

Il DNA genomico non rappresenta l'unico target del CDDP, il processo citotossico, infatti, danneggia anche il DNA mitocondriale (Jamieson & Lippard; 1999).

Nonostante in passato si pensava che la citotossità del CDDP fosse il risultato dell'inibizione della sintesi del DNA, è stato documentato che le cellule muoiono a concentrazioni che non inibiscono la sintesi dell'acido nucleico (Sorenson & Eastman; 1988a, 1988b).

Molti studi si focalizzano sull'analisi e sulla caratterizzazione di proteine in grado di riconoscere e riparare i danni agli acidi nucleici.

Ad esempio le HMG (High Mobile Group) sono una famiglia di piccole proteine multifunzionali coinvolte nella regolazione genica e nel mantenimento della struttura cromatinica. Le proteine HGM hanno un'alta affinità per il DNA modificato dal CDDP e sono in grado di proteggerlo dal meccanismo di riparazione (Jamieson & Lippard; 1999).

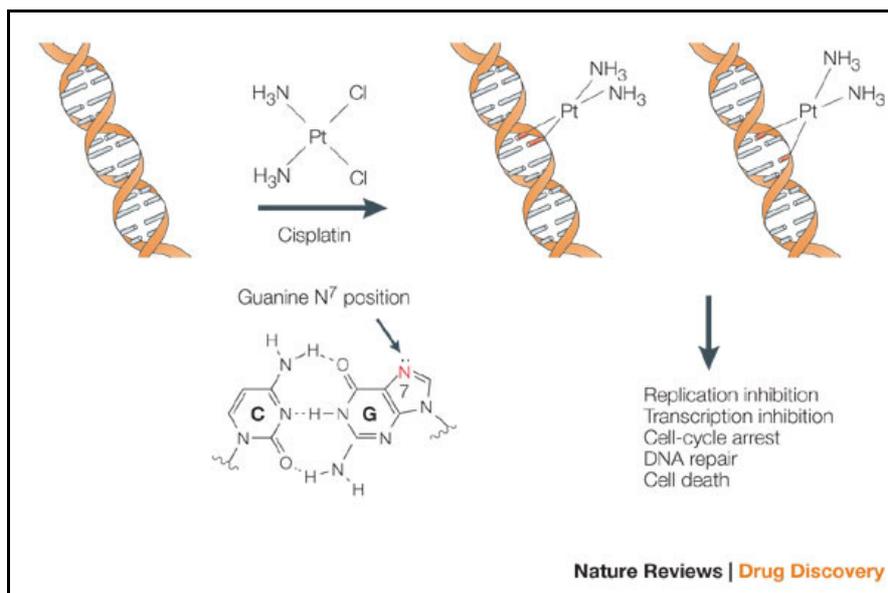


Fig 11: Legame del cisplatino con il DNA (Wang D & Lippard SJ, 2005).

11. SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

Le *specie reattive dell'ossigeno* (ROS) sono radicali liberi che vengono prodotti dall'organismo in molteplici compartimenti, in particolare nei mitocondri, e da diversi enzimi all'interno della cellula in condizioni fisiologiche e patologiche. In particolare l'aumento dei ROS determina un incremento o una modulazione dell'attività di antiossidanti endogeni quali il *glutathione* (GSH) e la *superossidodismutasi* (SOD) (Clerici et al.; 1996).

Il GSH rappresenta uno dei meccanismi di difesa cellulare antiossidante, viene prodotto normalmente da tutte le cellule animali ed è essenziale nel mantenimento dello stato attivo degli agenti antiossidanti, nella riduzione dei ribonucleotidi in deossiribonucleotidi (precursori del DNA) e nella protezione da stress ossidativo causato da ROS (Meister; 1991).

Lo squilibrio tra la formazione delle ROS e dei meccanismi di difesa antiossidante è causa di reazioni citotossiche (Henderson et al.; 2006).

Sebbene i mitocondri siano una delle maggiori fonti dei ROS essi sono allo stesso tempo estremamente suscettibili ad un loro attacco, infatti le membrane mitocondriali sono ricche di acidi grassi poliinsaturi che possono andare incontro a perossidazione lipidica per azione dei ROS, che sono potenti iniziatori (Henderson; 1999).

L'evento cruciale del processo apoptotico è rappresentato dal conseguente aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna attraverso il poro di transizione mitocondriale (PTP) (Papucci et al.; 2003). L'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna induce il rilascio, dallo spazio intermembrana del citosol, di diverse proteine proapoptotiche come il citocromo c, Smac/Diablo, HtrA2 (Omi) e AIF (Green & Reed; 1998).

12. EFFETTI OTOTOSSICI DEL TRAUMA ACUSTICO

L'esposizione a rumori intensi induce *stress ossidativo* e può provocare lesioni vascolari in seguito a ischemia cocleare che precede la riduzione del flusso ematico cocleare.

Henderson e coll. (2006) hanno dimostrato come l'esposizione al rumore porti non solo alla riduzione del flusso sanguigno cocleare, ma anche ad un aumento della funzione mitocondriale, causando la produzione di radicali liberi e la morte cellulare dell'ODC sia attraverso la necrosi che con l'apoptosi (Hu et al.; 2000, Nicotera et al.; 2002).

La formazione dei radicali liberi inizia molto rapidamente dopo il trauma acustico e si può prolungare per diversi giorni raggiungendo il massimo 7-10 giorni dopo l'esposizione a un suono traumatizzante.

Elevati livelli di ROS sono stati trovati nella coclea di lavoratori industriali esposti a un rumore di 95-110 dB SPL (Kaygusuz et al.; 2001).

Le CCE risultano essere le più vulnerabili all'effetto dei radicali liberi mentre le cellule di sostegno e le CCI sono le più resistenti, tuttavia la proporzione delle cellule cigliate in apoptosi e/o in necrosi dipende dalla gravità del trauma sonoro (livello di intensità e durata del danno) (Zeiss; 2003).

I ROS sono coinvolti nel processo apoptotico in modo diretto o addirittura come secondi messaggeri poichè mediano il rilascio del citocromo-c (cyt-c) da parte dei mitocondri (Lander, 1997; Hu et al., 2000). Il cyt-c è una piccola emoproteina (12,4 kilodalton) essenziale per il trasporto di elettroni ed è localizzato sulla membrana interna dei mitocondri che lo rilasciano in risposta a stimoli pro-apoptotici (Liu et al.;1996).

Il rilascio di piccole quantità di cyt-c provoca una interazione con il recettore inositolo trifosfato (IP3), localizzato sul reticolo endoplasmatico, liberando così ioni calcio responsabili dell'attivazione della caspasi 9, una cistein-proteasi che una volta attivata innesca le caspasi 3 e 7 responsabili della distruzione delle cellule (Bertini et al.; 2006).

Dopo esposizione a rumore continuo è stato osservato che un rilascio del *citocromo c* mitocondriale (rilasciato sia nel processo di morte programmata che di necrosi) con un'intensa espressione delle *caspasi 3, 8, 9* nelle cellule che esprimono i segni di apoptosi e non di necrosi (Zou et al., 1997).

In un lavoro condotto sui cincillà viene riportato come la caspasi 3 gioca un ruolo fondamentale nella coclea in seguito all'esposizione al rumore intenso, essa risulta già espressa nelle cellule cigliate dopo due ore e mezza dall'esposizione dimostrando chiaramente la sua funzione di innesco dei processi di morte cellulare (Nicotera et al.; 2003).

13. EFFETTI OTOTOSSICI DEL CISPLATINO

Gli effetti ototossici del CDDP nell'orecchio interno si manifesta soprattutto sull'ODC, sulle cellule del ganglio spirale e sulla stria vascolare causando alterazioni morfologiche e morte cellulare (Kohn et al., 1988; Taudy et al., 1992).

L'ototossicità del CDDP si manifesta in particolare con la perdita sporadica delle CCI ed una perdita progressiva delle CCE dell'orecchio interno, dalla base all'apice della coclea, fino a determinare la perdita uditiva (Safirstein et al., 1986; Stadnicki et al., 1975; Moroso et al., 1983).

Studi condotti sull'uomo e su Guinea pig, ai quali è stato somministrato CDDP, è stata riscontrata una significativa perdita delle CCE a livello del giro basale e una riduzione delle cellule del ganglio spirale (Melamed et al.; 2000) con conseguente perdita uditiva bilaterale alle alte frequenze (4,000–8,000 Hz) (Rybak et al., 1995; Ozols et al., 1985; Anniko et al., 1986; Cardinaal et al., 2000).

Pur essendo noto l'effetto antitumorale del CDDP rimangono ancora non completamente noti i meccanismi molecolari e cellulari della sua ototossicità.

Molti studi dimostrano che il CDDP esplica la sua citotossicità sia attraverso la formazione di addotti con il DNA che bloccano la progressione del ciclo cellulare sia interagendo con i tessuti cocleari generando ROS come l'anione superossido (O_2^{--}) e l'ossido nitrico (NO) (Rybak et al.; 1999). La produzione dei ROS entro la coclea avviene in seguito all'inibizione degli enzimi antiossidanti dovuta al legame del CDDP ai loro gruppi sulfidrilici; questo processo induce il processo apoptotico sia sulle cellule cigliate sia sui neuroni (Clerici et al.; 1996) (Rybak et al.; 1997).

Il CDDP inoltre abbassa i livelli del rame e del selenio che sono essenziali per il funzionamento della superossidodismutasi e della glutatione perossidasi (DeWoskin & Riviere; 1992).

14. APPROCCI TERAPEUTICI NEI CONFRONTI DELLA SORDITÀ IN SEGUITO AL TRAUMA ACUSTICO ED AL CISPLATINO

Numerosi studi riportano come attraverso l'aumento dei livelli di sostanze antiossidanti (per esempio attraverso l'uso di farmaci o manipolazioni genetiche) è possibile promuovere la sopravvivenza delle cellule sensoriali e di proteggerle dal trauma acustico e dagli agenti ototossici (Ciorba et al.; 2008). Diversi agenti antiossidanti chemioprotettivi sono stati utilizzati allo scopo di correggere l'ototossicità del CDDP, quali trolox (Teranishi & Nakashima; 2003), thiourea (Ekborn et al.; 2003.), D- e L- metionina (Ekborn et al.; 2002.) (Li et al.; 2001) e il dexametasone (Kopke et al.; 1997) (Daldal et al.; 2007).

Nel ganglio spirale della coclea di ratto è stato riscontrato come il dexametasone eserciti il suo effetto protettivo, nei confronti dell'ototossicità indotta da CDDP, inibendo la sintesi di NO e aumentando i livelli di GSH, il quale a sua volta riduce la sintesi dei ROS (Daldal et al., 2007; Nagashima & Ogita, 2006) (Li et al.; 2001) (Li et al.; 2002).

Poichè la chemioterapia riduce i livelli plasmatici degli antiossidanti (vitamina E, vitamina C e β -carotene) il loro utilizzo è ampiamente diffuso durante il trattamento chemioterapico, perchè sono capaci di ridurre la generazione di perossilipidi (Conklin; 2000).

Il lavoro di Pirvola e coll. (2000) ha dimostrato che il c-Junk-N-terminal kinase (JNK) rappresenta uno dei principali meccanismi di innesco dell'apoptosi e che l'aumento della fosforilazione di JKN si osserva nelle cellule in risposta al trauma acustico.

Recentemente è stata dimostrata un'efficace protezione con un nuovo peptide inibitore, D-JNK-1, che blocca la cascata apoptotica attraverso MAPK/JNK *signal pathway* (Bonny et al.; 2001): la somministrazione intratimpanica di questa molecola ha protetto le cellule cigliate dell'ODC prevenendo il danno uditivo indotto da trauma acustico, con un effetto dose dipendente che si protrae fino a 12 ore dall'applicazione del farmaco (Eshraghi & Van Water; 2006).

Il trattamento di coclee esposte a trauma da rumore, con D-JNK-1, ha inoltre prevenuto la conversione della TTS in PTS (Eshraghi & Van Water; 2006).

La riduzione del NIHL e della morte delle cellule sensoriali si ottiene con l'utilizzo di antiossidanti esogeni come la vitamina C (ascorbato), E (α -tocoferolo), A (retinolo) e diversi polifenoli, i flavonoidi e composti organo-solfurei (Esposito et al.; 2002).

Le Prell 2007 dimostra che la combinazione di vitamina A, C, E e magnesio, somministrato 1 ora prima dell'esposizione al rumore, contribuisce a una riduzione del NIHL e della morte cellulare.

Fetoni e coll. (2009) dimostrano che la somministrazione intraperitoneale del Coenzima Q₁₀ terclatrato (QTER), 1 ora prima del rumore (6 kHz, per 1h, 120 dB SPL) e poi per tre giorni consecutivi al trauma, protegge le cellule cigliate della coclea dall'apoptosi.

Stessi risultati sono stati riscontrati nel lavoro di Yoshinobu e coll. (2008), dove Guinea pig trattati con CoQ₁₀, per via intraperitoneale, due ore prima l'esposizione al rumore (130 dB SPL per 3 h) non sviluppavano NIHL.

15. COENZIMA Q₁₀

Il *coenzima Q* (*CoQ*) detto anche *ubichinone* (o *Vitamina Q*) è stato scoperto nel 1957 da Fred L. Crane nei mitocondri di cuore di bue. È cioè una molecola organica, un *benzochinone*, con una lunga catena isoprenica (Crane; 2001). In base al numero di unità isopreniche nella catena laterale si possono distinguere diversi tipi di coenzima Q. In particolare nei mitocondri umani il tipo di CoQ è costituito da 10 unità isopreniche e per tale motivo è chiamato *coenzima Q₁₀* (Fig. 12).

In natura il coenzima Q₁₀ è presente nei cereali, nella soia, nelle noci, nei vegetali, nella carne e nel pesce.

Nelle cellule il coenzima Q₁₀ è localizzato nelle membrane biologiche e soprattutto nei mitocondri dove svolge il ruolo di trasportatore di idrogeno nelle catene di ossidoriduzione e dove è responsabile della formazione di enzimi necessari alle funzioni vitali, come ad esempio l'adenosintrifosfato (ATP) che è l'accumulatore di energia delle cellule (Lenaz et al.; 2007).

Sebbene il CoQ₁₀ sia sintetizzato nelle cellule i suoi livelli diminuiscono con l'invecchiamento, la malnutrizione, da farmaci e malattie croniche.

Il CoQ₁₀ viene usato nel trattamento di diversi disordini del metabolismo cellulare, danni ossidativi come il morbo di Parkinson e insufficienza cardiaca congenita (Bonakdar et al.; 2005).

Oltre a svolgere un'azione fondamentale nella produzione di energia il CoQ₁₀ esplica un'azione antiossidante proteggendo le strutture cellulari dai radicali liberi: previene il danno alle biomolecole in diversi tessuti e compartimenti cellulari e sopprime la produzione di NO prevenendo lo stress tissutale (Turunen et al., 2004; Bentinger M et al. 2007; Jung et al., 2009). Nonostante la farmacocinetica del CoQ₁₀ non sia ben nota tale molecola ha un ruolo importante nel corretto funzionamento dell'orecchio interno.

Sato (1988) in un suo lavoro condotto su Guinea pig resi sordi in seguito a ipossia dimostra come il CoQ₁₀ sia efficace nei primi stadi della disfunzione metabolica delle cellule cigliate ed in particolare appena si verificano casi di ipoacusia neurosensoriale.

Un altro studio dimostra come l'*idebenone*, un analogo di natura sintetica del CoQ₁₀, sia in grado di attenuare il NIHL in virtù delle sue proprietà antiossidanti (Sergi et al.; 2006) suggerendo che l'efficacia del CoQ₁₀ dipende dalla capacità d'intercettare i radicali liberi sia nella fase acquosa che lipidica (Mordente et al.; 1998).

La somministrazione del CoQ₁₀ previene il NIHL proteggendo la coclea dallo stress ossidativo indotto da una sovrastimolazione acustica in Guinea pig (Yoshinobu et al.; 2008).

In studi condotti sul CDDP si è visto che il CoQ₁₀ compensa significativamente i deficit dei meccanismi di difesa antiossidativi (ridotti livelli di GSH e attività superossidodismutasi) sopprimendo la perossidazione lipidica (Conklin; 2004).

In seguito a somministrazione del cisplatino il CoQ₁₀ attenua la riduzione del selenio e degli ioni zinco nei tessuti renali prevenendone la nefrotossicità (Fouad et al.; 2010).

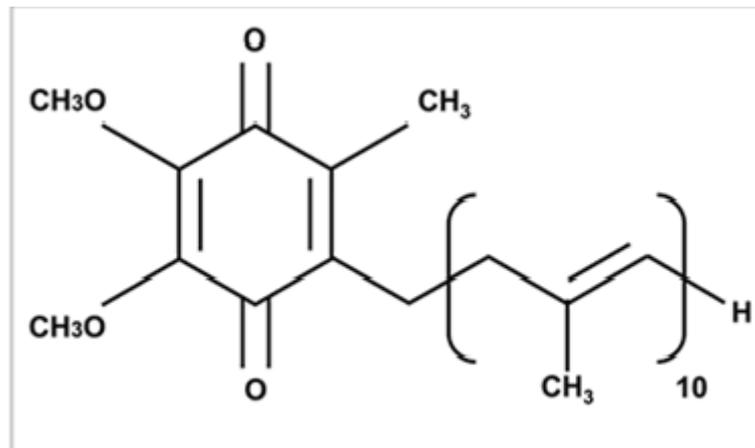


Fig. 12: Struttura chimica del Coenzima Q10.

16. SCOPO DEL LAVORO

L'ototossicità indotta dal trauma acustico e dal CDDP è da tempo oggetto di molti studi.

La perdita uditiva conseguente all'ototossicità comporta la morte per apoptosi delle cellule uditive che non sono capaci di rigenerarsi e quindi di essere sostituite.

Numerosi studi riportano come attraverso l'aumento dei livelli di sostanze antiossidanti (per esempio attraverso l'uso di farmaci o manipolazioni genetiche) è possibile promuovere la sopravvivenza delle cellule sensoriali e di proteggerle dal trauma acustico e dagli agenti ototossici (Ciorba et al.; 2008).

In questa tesi viene riportato lo studio sulla valutazione del potere antiossidativo del CoQ₁₀ contenuto in ACUVAL®400, nei confronti dei danni cocleari in seguito al trauma da rumore (115 dB per 2 h) e alla somministrazione intraperitoneale del CDDP (14 mg/kg unico dosaggio, 4.6 mg/kg/day per 3 giorni).

Il CoQ₁₀ risulta estremamente liposolubile e quindi difficilmente assorbibile, per questo recentemente è stata sviluppata una nuova formula solubile del CoQ₁₀, la forma terclatrata (n-Q_{TER}), che ne facilita l'assorbimento (Nukui et al.; 2007).

MATERIALI E METODI

1. MODELLO ANIMALE

Sono stati utilizzati ratti di sesso maschile del ceppo Sprague Dawley (175-200 gr; Charles River, Italia), stabulati con libero accesso ad acqua e cibo.

2. FARMACI

ACUVAL®400 è un integratore alimentare multivitaminico (contiene le vitamine A, E, B1, B2, B6 e B12, L-Arginine, estratto di *Ginkgo biloba* (Ginkgoselect®), minerali come il magnesio, il selenio e lo zinco, e una piccola quantità di coenzima Q₁₀ in forma terclatrata (n-Q_{TER}) (0,32 mg).

L'integratore è stato disciolto in acqua e somministrato agli animali per via orale alla concentrazione di 100 mg/kg.

n-Qter è stato fornito da Pharmaland (Repubblica di San Marino, Italy) consiste in una forma terclatrata del CoQ10.

Il protettore è stato somministrato a ciascun animale per via orale alla concentrazione di 500 mg/kg.

CISPLATINO (CDDP) (1 mg/mL) fornito da Ebewe Pharma (Italy), è stato somministrato agli animali per via intraperitoneale alla concentrazione di 14 mg/kg totali.

3. ANESTESIA

Per effettuare le registrazioni ABR e i sacrifici, tutti gli animali, sono stati anestetizzati con un cocktail composto da 50 mg Zoletil 100 (Virbac) in 1-ml di soluzione salina, ai quali veniva aggiunta 0.5 ml 2% Xylazine (Rompun).

4. MISURAZIONE DEI POTENZIALI EVOCATI (ABR)

Le risposte uditive del tronco encefalico (ABR) sono state utilizzate per valutare la soglia uditiva prima e dopo i trattamenti. Tutti i test ABR sono stati eseguiti nella camera da 1 m³ insonorizzata, con gli animali posti su di una coperta omotermica che garantiva il mantenimento costante della temperatura corporea a 37.5°C.

Le risposte ABR sono state registrate con 3 elettrodi di ago di platino-iridio posto nella zona subcutanea del vertice (positivo), della mastoide (negativo) e nella zona del dorso (riferimento/massa) dell'animale. Per la stimolazione uditiva è stato utilizzato un trasduttore di suono tweeter Motorola (flat response ± 1.5 dB; 4.0–35 kHz), connesso a un tubicino inserito nel condotto uditivo esterno di ciascun animale.

Le risposte ABR erano amplificate 20.000 volte e filtrate da 20-5000 Hz.

Ogni registrazione era la media di 1000 risposte individuali.

Le risposte ABR erano generate in risposta a un click di 100 μ s e a un tone burst di 2, 4, 8, 16, 32 kHz. Per i burst di 2, 4 e 8 kHz il plateau era di 8 ms e 1 ms di rise-fall time; per stimoli di 16 e 32 kHz il plateau era di 10 ms con rise-fall time di 0.5 ms.

I livelli di stimoli utilizzati andavano da 100 a 30 dB SPL.

L'intensità del suono stimolo è stato variato in intervalli di 5 dB.

Come riferimento è stata rilevata l'onda III che rappresenta l'onda di maggiore ampiezza ed è l'ultima a scomparire quando il livello di stimolo si riduce.

Per comodità le risposte ABR sono state registrate in termini di attenuazione.

Il rapporto tra soglia e attenuazione alla frequenza $F(x)$ è dato dalla seguente formula:

$$\text{Soglia } F(x) = 110 - \text{Attenuazione } F(x).$$

Per evitare una possibile stimolazione binaurale a intensità più alta di stimolo, sono stati utilizzati dei tappi per occludere l'orecchio controlaterale.

5. ANALISI STATISTICA

I dati di soglia uditiva sono stati valutati con un'analisi descrittiva e con ANOVA tramite il programma SPSS per gli esperimenti con un numero consistente di animali. Per tutti gli altri esperimenti, dove si aveva un minore numero di animali, le soglie uditive sono state valutate con il test *t-student*.

Valori di p value < 0.05 sono stati ritenuti significativi, mentre valori di p value < 0.01 sono stati considerati altamente significativi.

6. METODO DI VALUTAZIONE

Nel valutare l'eventuale effetto otoprotettivo della soluzione ACUVAL®400 fortificata dal n-Qter, siamo partiti dall'ipotesi che:

- (1) gli animali trattati con l'agente protettore dovrebbero presentare un recupero più veloce di soglia uditiva rispetto agli animali non-protetti;
- (2) i valori del livello di soglia uditiva degli animali protetti al giorno 21 dovrebbero essere notevolmente simili ai valori di soglia uditiva pre-esposizione.

7. ORGANIZZAZIONE ESPERIMENTI

In questa tesi vengono riportati due studi a loro volta suddivisi in più esperimenti:

Studio sul danno acustico indotto dal rumore (Rif. Paragrafo 7.1)

- Esperimento I (confronto dell'ototossicità indotta dal rumore a due intensità: 95 e 115 dB SPL);
- Esperimento II (analisi dell'effetto protettivo di ACUVAL400 nei confronti del trauma acustico all'intensità di 115 dB SPL);
- Esperimento III (analisi dell'effetto protettivo di ACUVAL400 (100 mg/kg) ed n-QTER (500 mg/kg) nei confronti del trauma acustico all'intensità di 115 dB SPL).

Studio del danno acustico indotto dal cisplatino (Rif. Paragrafo 7.2)

- Esperimento I (analisi dell'effetto protettivo di ACUVAL400 (100 mg/kg) ed n-QTER (500 mg/kg) nei confronti del cisplatino (14 mg/kg) somministrato per via intraperitoneale in un unico dosaggio;
- Esperimento II (analisi dell'effetto protettivo di ACUVAL400 (100 mg/kg) ed n-QTER (500 mg/kg) nei confronti del cisplatino (4,6 mg/kg/day) somministrato per via intraperitoneale per 3 giorni.

7.1. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL RUMORE

1. TRATTAMENTI

1.1 ACUVAL®400 ed n-Q_{TER}

L'integratore Acuval 400® è stato somministrato oralmente alla concentrazione di 100 mg/kg, mentre il coenzima Q terclatrato (n-Qter) aggiuntivo alla concentrazione finale di 500 mg/kg. Entrambi i protettori sono stati disciolti in acqua e la somministrazione orale, effettuata utilizzando un tubicino per alimentazione, è stata effettuata 24 e 2 ore prima e dopo l'esposizione al trauma (post24-48-72 ore).

Gli animali di controllo hanno ricevuto una soluzione orale di salina.

1.2 Esposizione a rumore

Ciascun animale sveglio è stato posto in una gabbia metallica che ne permetteva un'esposizione al trauma acustico di pari intensità ad entrambe le orecchie.

Gli speakers sono stati centrati sugli animali ad una distanza di 30 cm.

Gli stimoli venivano generati da un software (Filtered Noise Generator by Timo Esser©), ed amplificati da un amplificatore Harman Kardon (model 3390).

I livelli di stimolo sono stati calibrati (tipo 2.209 metro livello di precisione del suono, tipo 4.134 microfono Briel e Kjar Instruments, Norcross, GA, USA) in più posizioni all'interno della camera sonora per garantire l'uniformità dello stimolo. Durante l'esposizione al rumore, il livello di stimolo è stato monitorato da un microfono posizionato all'interno della camera insonorizzata.

2. ESECUZIONE ESPERIMENTI

2.1 Esperimento I

Come prima analisi abbiamo voluto confrontare il danno uditivo in seguito a esposizione a rumore bianco a 6 kHz, a due differenti intensità (95 ± 3 dB SPL) e (115 ± 3 dB SPL) per 2 ore su un totale di 10 ratti di sesso maschile.

Gli animali sono stati perciò suddivisi in due gruppi, 95 dB e 115 dB, di 5 animali.

Le soglie uditive, mediante esame ABR, sono state registrate prima dell'esposizione al trauma e nei giorni 1, 7, 14 e 21 dopo l'esposizione al rumore.

Gli animali di entrambi i gruppi sono stati sacrificati al tempo post 21.

2.2 Esperimento II

Uno studio pilota per valutare le proprietà otoprotettive del solo ACUVAL®400 nei confronti del rumore, è stato condotto su 5 ratti Sprague Dawley di sesso maschile.

Le soglie uditive, mediante esame ABR, sono state registrate prima dell'esposizione al trauma e nei giorni 1, 7, 14 e 21 dopo l'esposizione al rumore.

A ciascun animale è stata somministrata oralmente una soluzione di 100 mg/kg di ACUVAL®400, prima e dopo l'esposizione al rumore (115 dB SPL) (24-48-72 h post), utilizzando un tubicino per alimentazione. Gli animali sono stati esposti a un rumore bianco a 6 kHz (115 ± 3 dB SPL) per 2 ore continue e sacrificati al tempo post 21.

2.3 Esperimento III

In quest'ultima parte sperimentale poichè risultati dell'esperimento II non mostravano un'effetto protettivo dell' ACUVAL®400 nei confronti del trauma da rumore, è stata aumentata la concentrazione di n-Qter (500 mg/kg), contenuto nell'integratore alimentare.

Ciascun animale trattato ha ricevuto una soluzione orale di 100 mg/kg di ACUVAL®400 e 500 mg/kg di coenzima Q terclatrato (n-Qter) disciolto in acqua. La somministrazione orale è stata effettuata utilizzando un tubicino per alimentazione.

Sono stati utilizzati 53 ratti di sesso maschile suddivisi in 4 gruppi sperimentali come riportato in tabella:

GRUPPO	TRATTAMENTO	NUMERO ANIMALI
A	RUMORE	15
B	ACUVAL®400 +n-Q_{TER} + RUMORE	15
C	ACUVAL®400 +n-Q_{TER}	9
D	n-Q_{TER} + RUMORE	3
E	CONTROLLO	11

Gruppo A: animali esposti ad un rumore bianco (115 dB SPL) per 2h

Gruppo B: animali esposti al rumore 115 dB SPL e trattati oralmente con una soluzione contenente ACUVAL®400 (100mg/Kg) e n-Q_{TER} (circa 500 mg/kg), 24h e 2h prima dell'esposizione al rumore e per i 3 giorni successivi (24-48-72h post-rumore)

Gruppo C: animali trattati oralmente con una soluzione contenente ACUVAL®400 e n-Q_{TER} alle stesse concentrazioni e agli stessi tempi descritti per il gruppo B.

Gruppo D: animali esposti al rumore 115 dB SPL e trattati oralmente con una soluzione contenente solo n-Q_{TER} (circa 500 mg/kg), 24h e 2h prima dell'esposizione al rumore e per i 3 giorni successivi (24-48-72h post-rumore)

Gruppo E: animali di controllo

A ciascun animale sono state registrate le soglie uditive, mediante esame ABR, prima dell'esposizione al trauma e nei giorni 1, 7, 14 e 21 dopo l'esposizione al rumore.

Per i gruppi A, B e D i sacrifici sono stati eseguiti nei giorni 1-14-21 dopo l'esposizione al rumore, gli stessi tempi sono stati rispettati anche per gli animali che non sono stati esposti al trauma ma solo al trattamento orale (gruppo C).

I ratti dei gruppi di controllo sono stati sacrificati all'inizio e alla fine dell'esperimento (giorni 1 e 21).

7.2. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL CISPLATINO

Lo studio sul danno acustico indotto dal cisplatino (CDDP), come per lo studio condotto sul danno da rumore, è stato suddiviso in più parti con lo scopo di determinare la concentrazione e il modo di somministrazione del CDDP.

In un primo esperimento non riportato in questa tesi, sono state utilizzate due concentrazioni differenti del CDDP (14 mg/kg e 16 mg/kg) somministrate in un unico dosaggio attraverso la via intraperitoneale, per infusione lenta (30 min) a ratti Sprague dawley. I risultati mostravano un'alta mortalità degli animali trattati con la concentrazione di 16 mg/kg. Per tale ragione, abbiamo deciso di utilizzare una concentrazione del chemioterapico di 14 mg/kg (Esperimento I).

1. TRATTAMENTI

1.1 ACUVAL®400 ed n-Q_{TER}

Come per il primo studio condotto sul rumore, anche in quello condotto sul CDDP l'integratore ACUVAL®400 è stato somministrato oralmente alla concentrazione di 100 mg/kg, più 500 mg/kg di coenzima Q terclatrato (n-Qter) (Rif. Paragrafo 7.1).

1.2 CISPLATINO

In entrambi gli esperimenti il CDDP è stato somministrato a una concentrazione di 14 mg/kg, per via intraperitoneale; nel I esperimento la somministrazione è stata eseguita in un unico dosaggio per infusione lenta, mentre per l'esperimento II il CDDP è stato somministrato per tre giorni di seguito, attraverso la via intraperitoneale (4,6 mg/kg/day).

2. ESECUZIONE ESPERIMENTI

2.1 Esperimento I

Sono stati utilizzati 12 ratti di sesso maschile, Sprague Dawley (175-200gr; Charles River, Italia) stabulati con libero accesso ad acqua e cibo.

Gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali come riportato in tabella:

GRUPPO	TRATTAMENTO	NUMERO ANIMALI
1	CDDP (unico dosaggio)	5
2	ACUVAL®400 +n-Q_{TER} + CDDP (unico dosaggio)	5
3	CONTROLLO	2

Gruppo 1: animali a cui è stato somministrato il CDDP (14 mg/kg) in un unico dosaggio, per via intraperitoneale.

Gruppo 2: animali a cui è stato somministrato il CDDP (14 mg/kg) in un unico dosaggio per via intraperitoneale e trattati oralmente con una soluzione contenente ACUVAL®400 (100 mg/Kg) e n-QTER (circa 500 mg/kg), 24h e 2h prima della somministrazione del CDDP e per i 3 giorni successivi (24-48-72h post-trattamento).

Gruppo 3: animali di controllo trattati con salina.

A ciascun animale sono state registrate le soglie uditive, mediante esame elettrofisiologico ABR, prima e dopo i trattamenti, precisamente 96 ore dopo la somministrazione del CDDP, e sacrificati subito dopo (post 96 h) previa anestesia.

2.2 Esperimento II

Sono stati utilizzati 12 ratti di sesso maschile, Sprague Dawley (175-200 gr; Charles River, Italia), stabulati con libero accesso ad acqua e cibo. Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali come riportato in tabella:

GRUPPO	TRATTAMENTO	NUMERO ANIMALI
1	CDDP (3 dosaggi)	5
2	ACUVAL®400 +n-Q_{TER} + CDDP (3 dosaggi)	5
3	CONTROLLO	2

Gruppo 1: animali a cui è stato somministrato il CDDP (4,6 mg/kg/day) per 3 giorni per via intraperitoneale.

Gruppo 2: a cui è stato somministrato il CDDP (4,6 mg/kg/day) per 3 giorni per via intraperitoneale e trattati oralmente con una soluzione contenente ACUVAL®400 (100mg/Kg) e n-Q_{TER} (circa 500 mg/kg), 24h e 2h prima della somministrazione del CDDP e per i 3 giorni successivi (24-48-72h post-trattamento).

Gruppo 3: animali di controllo trattati con salina.

A ciascun animale sono state registrate le soglie uditive, mediante esame elettrofisiologico ABR, prima e dopo i trattamenti, precisamente 96 ore dopo la somministrazione del CDDP, e sacrificati subito dopo (post 96 h) previa anestesia.

RISULTATI

1.STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL RUMORE

ESPERIMENTO I

In una prima analisi abbiamo confrontato su ratto l'effetto del danno causato dall'esposizione a rumore bianco per 2 ore a due differenti intensità 95 e 115 dB SPL.

Le soglie uditive sono state monitorate mediante le registrazioni elettrofisiologiche ABR prima e dopo l'esposizione al rumore e per circa un mese (pre, post1, post7, post14, post21) (Tab.1).

Gli animali esposti al rumore bianco d'intensità 95 dB SPL mostravano al post1 uno spostamento di soglia uditiva temporaneo (TTS) di circa 20 dB (fig.13) per recuperare nel corso di due settimane (post 14) e poi rimanere stabile (post 21).

Gli animali esposti all'intensità di 115 dB SPL, invece, mostravano una perdita uditiva maggiore il giorno dopo il trauma (post 1) con uno spostamento di soglia temporaneo (TTS) di circa 50 dB. Questo spostamento di soglia è parzialmente recuperato 14 giorni dopo l'esposizione con un risultante danno e spostamento di soglia permanente (PTS) di 20 dB (fig.13).

Abbiamo potuto così concludere che l'esposizione al rumore di maggiore intensità (115 dB SPL) era quello che causava un danno uditivo maggiore, poichè in grado di arrecare uno spostamento di soglia uditiva permanente maggiore rispetto all'intensità di 95 dB SPL.

Intensità (dB)	Pre-esposizione	Post1	Post7	Post14	Post21
95	27 ± 4.5	47.6 ± 9.3	38.8 ± 7.31	34.4 ± 4.4	34.4 ± 4.4
115	31.6 ± 4.2	93.4 ± 21.7	61.2 ± 32.2	52.6 ± 23.6	51.6 ± 25.34

Tab.1 Soglie uditive (ABR) negli animali esposti a diverse intensità di rumore (95 e 115 dB SPL) per 2 h (mean±SD).

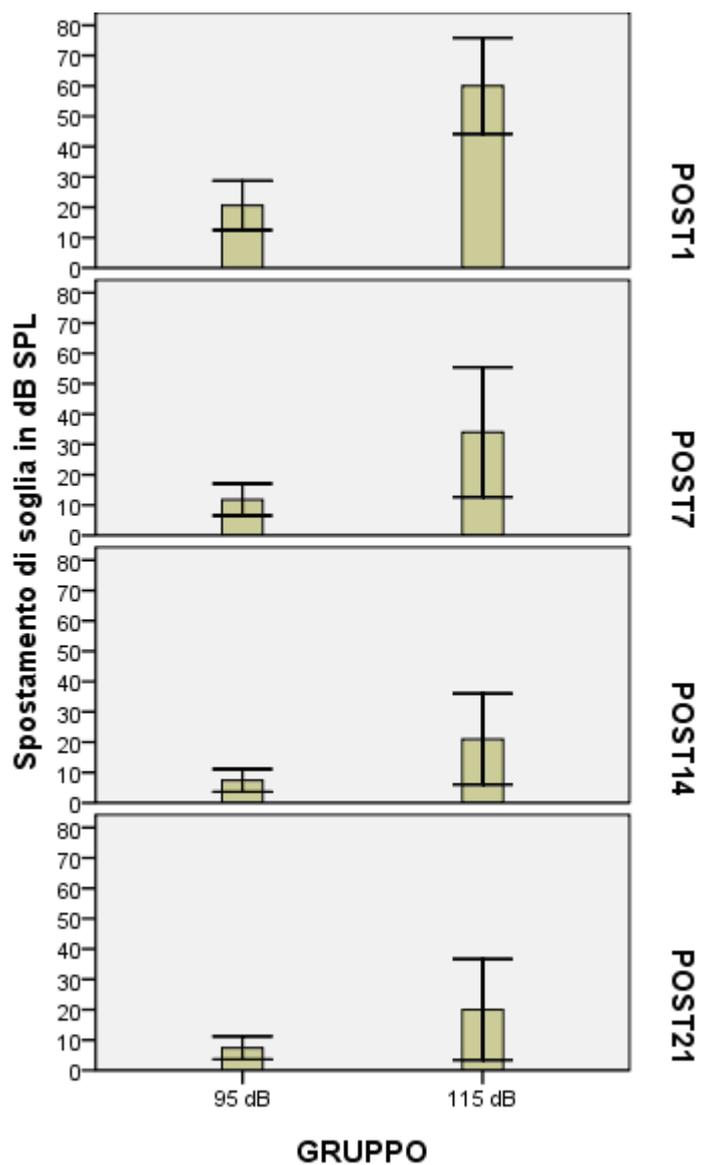


Fig.13: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (click ABR) ai giorni 1-7-14-21 dopo l'esposizione al rumore (95 e 115 dB).

ESPERIMENTO II

Uno studio pilota, sulla valutazione delle proprietà otoprotettive di ACUVAL®400 nei confronti del rumore, è stato condotto su 5 ratti Sprague Dawley di sesso maschile.

A ciascun animale è stata somministrata oralmente, una soluzione di 100 mg/kg di ACUVAL®400, prima dell'esposizione al rumore, d'intensità 115 dB, e dopo il trauma (24-48-72 h post).

L'esame uditivo ABR, effettuato prima e dopo l'esposizione al trauma e al trattamento orale (post1-post7-post14-post21), ha rivelato come le soglie uditive, il giorno dopo dall'esposizione al trauma (post1), abbiano subito uno spostamento di circa 70 dB.

Lo spostamento di soglia si rileva in particolare alle alte frequenze così come riscontrato per il gruppo esposto al trauma ma non trattato con l'integratore alimentare (fig.14).

Nei giorni successivi si è osservato un recupero fisiologico della soglia uditiva di circa 10 dB (fig.14). Al post 21 è possibile osservare come nel complesso le soglie uditive abbiano subito uno spostamento di soglia permanente di oltre 50 dB, con un conseguente danno permanente evidente soprattutto alle alte frequenze (fig.14).

I risultati ottenuti da questo studio pilota, ci hanno permesso di concludere che la somministrazione orale di ACUVAL®400 (100 mg/kg), non ha garantito una prevenzione o un recupero uditivo, in seguito al trauma acustico.

L'ACUVAL®400 è un integratore alimentare che contiene 0,32 mg di n-Q_{TER}®, molto probabilmente, una concentrazione molto bassa o comunque non in grado di garantire una protezione nei confronti del rumore.

Volendo valutare l'effetto otoprotettivo di questo integratore e in particolare, del CoQ₁₀ nella forma terclatrata (n-Q_{TER}) abbiamo deciso di aumentare la concentrazione di tale molecola come riportato nell'esperimento III.

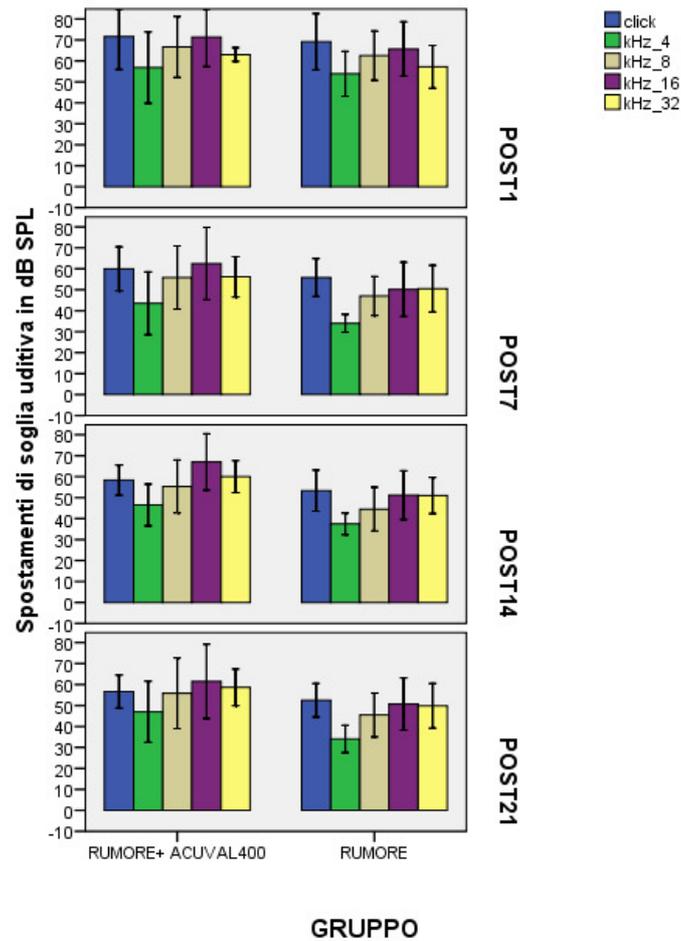


Fig.14: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (ABR) ai giorni 1-7-14-21 dopo l'esposizione al rumore, di animali trattati con ACUVAL®400 (100 mg/kg).

ESPERIMENTO III

L'esperienza I ci ha consentito di confrontare l'entità del danno da rumore ai due tipi d'intensità (95 e 115 dB SPL) e di concludere che l'intensità di 115 dB SPL apportava uno spostamento di soglia permanente (PTS).

L'esperienza II ci è stata utile per dedurre che la sola somministrazione di ACUVAL®400 con la concentrazione di n-Q_{TER} contenuto in esso (0.32 mg), non era sufficiente per garantire una prevenzione o un recupero uditivo in seguito al trauma acustico.

Al fine di valutare l'effetto otoprotettivo dell'integratore, ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} nei confronti del trauma acustico (115 dB SPL) nell'esperienza III la concentrazione dell'n-Q_{TER} è stata portata a 500 mg/kg in aggiunta all'integratore ACUVAL®400.

I risultati elettrofisiologici ottenuti mediante analisi ABR hanno permesso di valutare le soglie uditive degli animali di ciascun gruppo sperimentale (fig.15).

Il Gruppo A (115 dB) mostrava uno spostamento di soglia significativo (55 dB) il giorno dopo l'esposizione al rumore (post 1) (fig.14). La perdita uditiva ha interessato le regioni delle alte frequenze e quindi la porzione basale della coclea (fig.15).

Al giorno 7 (post 7) si è osservato un parziale recupero a tutte le frequenze, si nota infatti uno spostamento di soglia di 25 dB (fig.15). Dal giorno 14 al giorno 21, lo spostamento di soglia lungo tutte le frequenze rimane stabile con una risultante perdita uditiva permanente di 25 dB (fig.15).

Come per l'esperienza I l'esposizione al rumore d'intensità 115 dB ha causato un danno uditivo permanente confermato dallo spostamento di soglia permanente (PTS) di circa 25 dB.

Il gruppo B (115 dB+ACUVAL®400 e n-Q n-Q_{TER}), il giorno dopo l'esposizione al trauma acustico (post 1), mostra una perdita uditiva significativamente inferiore rispetto a quella riscontrata nel gruppo A. Al post 1, infatti, si registra una significativa riduzione dello spostamento di soglia (25 dB) del gruppo B rispetto al gruppo A, anche in questo caso le regioni maggiormente interessate sono quelle delle alte frequenze (fig.15).

Dal giorno 7 in poi, gli spostamenti di soglia sono molto ridotti e anche in questo caso significativamente differenti rispetto agli spostamenti osservati nel gruppo A.

Dall'attenta analisi di questi risultati si può dedurre un effetto protettivo nei confronti dell'innalzamento permanente di soglia.

La riduzione dello spostamento di soglia osservato sin dal primo giorno dopo l'esposizione al trauma (dimezzato rispetto al gruppo A) e la sua ulteriore riduzione dal giorno 7 in poi suggerisce un effetto positivo del farmaco ACUVAL®400 ed n-Q_{TER}, nel ridurre gli effetti del rumore sulla sensibilità uditiva.

Le soglie uditive del gruppo C, animali non esposti al rumore ma solamente trattati con la soluzione orale di ACUVAL®400 ed n-Q_{TER}, non mostrano una variazione significativa suggerendo che il dosaggio utilizzato (100 mg/kg e 500 mg/kg rispettivamente) non aveva avuto effetti avversi sulla sensibilità uditiva (fig 16).

Nel gruppo D gli animali esposti al trauma acustico e trattati con il solo n-Q_{TER} (500 mg/kg) hanno riscontrato uno spostamento di soglia uditiva maggiore rispetto al gruppo B il giorno dopo il trauma acustico (post 1), con un conseguente danno uditivo permanente di circa 40 dB al giorno 21 (post 21) (fig.15).

La somministrazione del solo n-Q_{TER} non è stato sufficiente per garantire una riduzione dello spostamento di soglia, come osservato invece per il gruppo B.

I risultati elettrofisiologici ottenuti per il gruppo B e D sono stati rilevanti per poter concludere che l'ulteriore aggiunta di n-Q_{TER} (500 mg/kg) nell'integratore ACUVAL®400 (100 mg/kg), ha consentito una protezione dell'udito, ovvero una riduzione dello spostamento di soglia, e garantito un veloce recupero della soglia uditiva in tutti gli animali esposti al rumore.

Per valutare gli effetti dei trattamenti è stata condotta un'analisi ANOVA con un disegno 5 (frequenze 2-4-8-16-32 kHz) per i tre gruppi (A, B e D).

L'analisi ANOVA dimostra che circa la metà della varianza totale è spiegata dai trattamenti e che i trattamenti hanno un effetto significativo sugli spostamenti di soglia a tutte le frequenze.

Un'analisi post-hoc (test di Tukey) mostra che il gruppo trattato con rumore (gruppo A) risulta significativamente diverso dagli altri due.

Poiché dai grafici emerge che la variazione più interessante riguarda i differenti spostamenti ottenuti nel gruppo A e nel gruppo B, nel primo giorno successivo all'esposizione a rumore è stata fatta un'analisi ANOVA con disegno 5 (frequenze 2-4-8-16-32 khz) per due trattamenti (A e B).

I trattamenti spiegano circa il 60% della varianza totale gli spostamenti di soglia sono risultati significativamente diversi a tutte le frequenze.

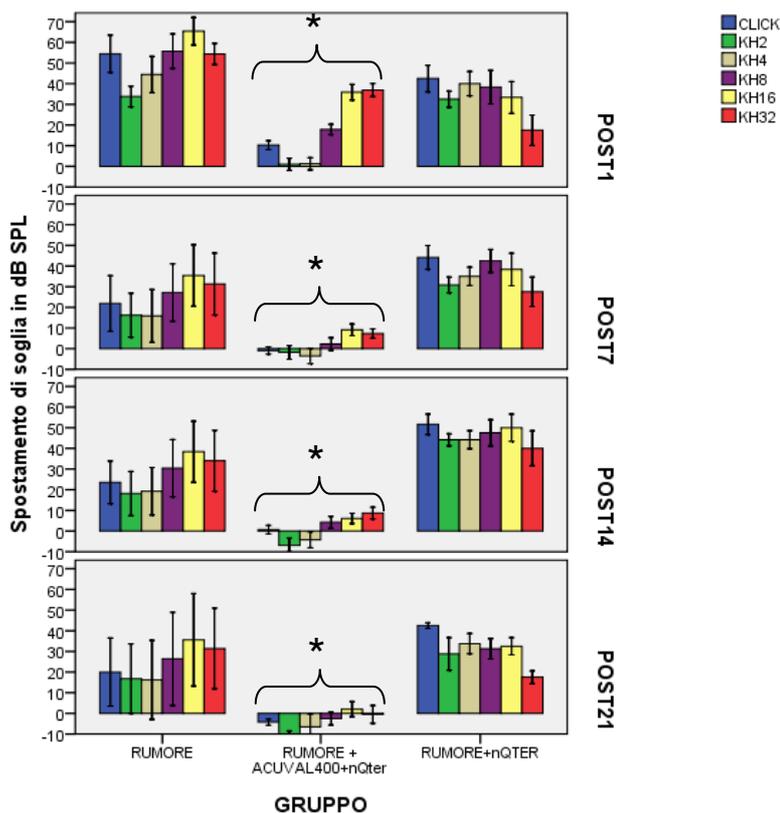


Fig.15: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (ABR; click-frequenze 2-4-8-16-32 kHz), ai giorni 1-7-14-21 dopo l'esposizione al rumore. **Gruppo A:** rumore; **Gruppo B:** rumore+ ACUVAL@400 (100 mg/kg)+ n-QTER (500 mg/kg); **Gruppo D:** rumore+ n-QTER (500 mg/kg). * valori statistici significativi a $P < 0.05$.

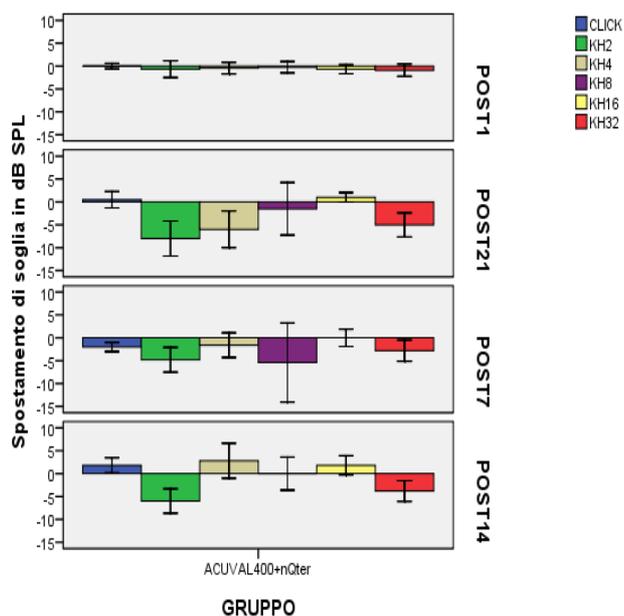


Fig.16: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (ABR; frequenze 2-4-8-16-32 kHz) ai giorni 1-7-14-21 del **gruppo C:** ACUVAL@400 (100 mg/kg) + n-QTER(500 mg/kg).

2. STUDIO SUL DANNO ACUSTICO INDOTTO DAL CISPLATINO

ESPERIMENTO I

In un primo esperimento è stato valutato l'effetto dell'antiossidante ACUVAL®400 con aggiunta di Qter (500 mg/kg) sul danno ototossico provocato dal cisplatino (CDDP, 1 mg/mL, da Ebewe Pharma, Italy) somministrato in un unico dosaggio.

I risultati elettrofisiologici, ottenuti mediante analisi ABR, hanno permesso di valutare gli spostamenti delle soglie uditive degli animali di ciascun gruppo sperimentale dopo 96 ore dal trattamento (fig.17).

I grafici riportati mostrano gli spostamenti delle soglie uditive espresse in dB SPL dopo il trattamento (post 96 h) alle basse e alte frequenze (fig.17).

Si nota come il CDDP in tutti i gruppi dopo le 96 ore dal trattamento abbia provocato un danno consistente alle alte frequenze (16-32-64 kHz), risparmiando le zone delle basse frequenze (2-4-8 kHz) (fig.17).

Le soglie uditive registrate non mostravano alcuna differenza al post 96 per entrambi i gruppi trattati con il CDDP con e senza protettore (ACUVAL®400 ed n-Q_{TER}), la non significatività di questi risultati è stata ulteriormente confermata statisticamente ($P>0.05$).

Inoltre, si è riscontrata un'alta mortalità degli animali trattati con il CDDP alla concentrazione di 14 mg/kg somministrato in un unico dosaggio.

Tuttavia è stato osservato un differente stato di salute generale tra gli animali protetti e non, molto probabilmente dovuto all'integrazione di sali minerali e vitamine contenuti nell'integratore ACUVAL400.

Questa prima parte sperimentale ci ha permesso di concludere che la somministrazione del CDDP 14 mg/kg, dopo le 96 ore dal trattamento, causa un danno alle alte frequenze della coclea di entrambi i gruppi, inoltre, che il chemioterapico dato in un unico dosaggio porta ad un'aumento della mortalità degli animali.

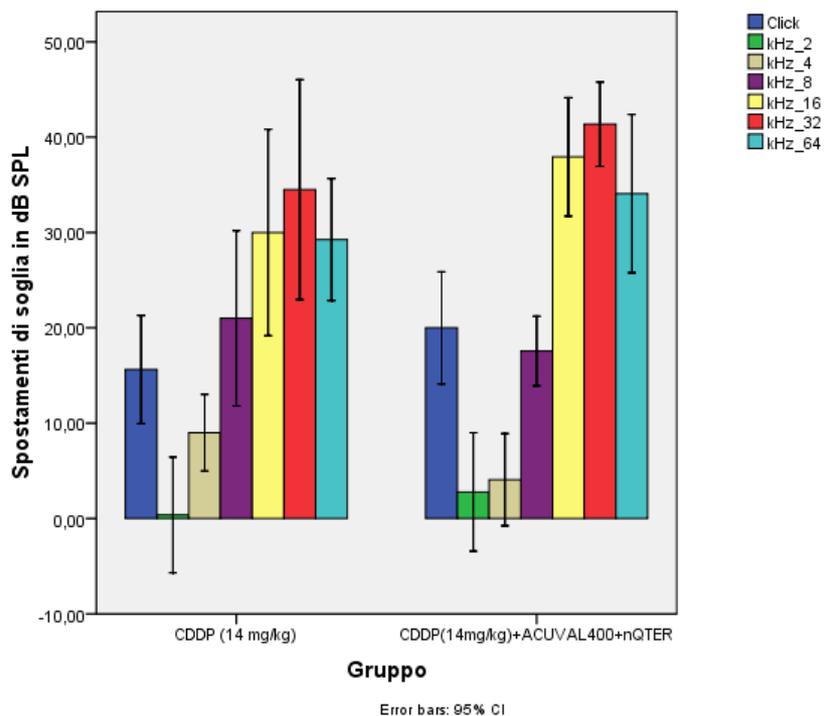


Fig.17: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (ABR) (post 96 h): **Gruppo A:** CDDP (14 mg/kg); **Gruppo B:** CDDP (14 mg/kg) + ACUVAL®400 (100 mg/kg) + n-QTER (500 mg/kg), alle basse (2-4-8 kHz) e alte frequenze (16-32-64 kHz).

ESPERIMENTO II

Nell'esperimento I abbiamo osservato come il CDDP (14 mg/kg), somministrato in un unico dosaggio porta ad un'aumento della mortalità degli animali, oltre che a danneggiare le zone ad alta frequenza della coclea.

Per ridurre la mortalità degli animali abbiamo deciso di mantenere la stessa concentrazione finale del chemioterapico (14 mg/kg) e di somministrarla attraverso la via intraperitoneale in 3 giorni consecutivi (4.6 mg/kg/giorno) piuttosto che in uno.

Anche in questo caso gli spostamenti di soglia uditiva sono state misurate dopo 96 ore dal trattamento con il chemioterapico.

I risultati elettrofisiologici, ottenuti mediante analisi ABR, hanno permesso di valutare gli spostamenti delle soglie uditive degli animali di ciascun gruppo sperimentale dopo 96 ore dal trattamento con il chemioterapico (fig.18).

I grafici riportano gli spostamenti delle soglie uditive espresse in dB SPL, dopo il trattamento (post 96 h) alle basse e alte frequenze (fig.18).

Il gruppo 1 (CDDP 14 mg/kg/day) dopo le 96 ore dal trattamento ha subito un danno consistente alle alte frequenze (16-32-64 kHz) e un lieve danno nelle zone delle basse frequenze (2-4-8 kHz) (fig.18).

Il gruppo 2 (CDDP (4.6 mg/kg/day) ACUVAL®400 (100 mg/kg) e n-QTER (500 mg/kg), diversamente dal gruppo 1 (CDDP 4.6 mg/kg/day), trascorse le 96 ore dal trattamento non ha riscontrato spostamenti di soglia e quindi danni uditivi nè alle zone di bassa che di alta frequenza (fig.18).

Diversamente dall'esperimento precedente i risultati ottenuti mostrano una differenza significativa delle soglie uditive fra i gruppi 1 e 2 al post 96; la significatività di questi risultati è stata ulteriormente confermata dalla statistica ($P < 0.05$) (fig.19).

Inoltre, somministrando il chemioterapico in tre giorni consecutivi (4.6 mg/kg/day) attraverso la via intraperitoneale siamo riusciti a ridurre la mortalità degli animali.

Questa seconda parte sperimentale ci ha permesso di concludere che la somministrazione del CDDP (4.6 mg/kg/day) per 3 giorni consecutivi, oltre a ridurre la mortalità degli animali, causa un danno significativo e maggiore alle alte frequenze della coclea dopo le 96 ore dal trattamento (fig.19).

L'ACUVAL®400 (100 mg/kg) e l'n-QTER (500 mg/kg) hanno garantito una protezione della funzione uditiva dal danno ototossico del CDDP somministrato in tre giorni consecutivi sia alle alte che alle basse frequenze (fig 18 e 19).

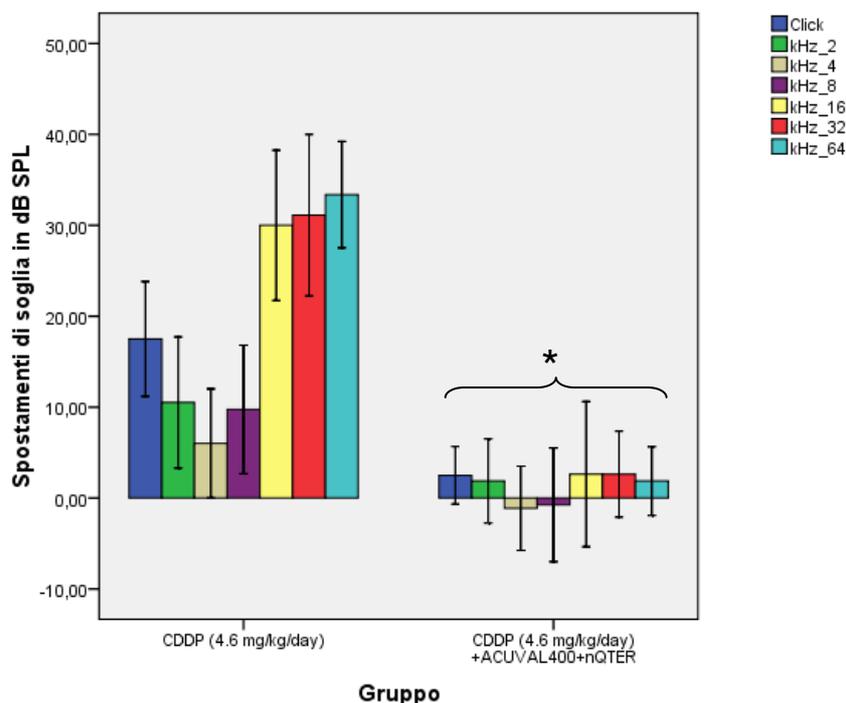


Fig.18: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (post 96 h): **Gruppo 1:** CDDP (4.6 mg/kg/day); **Gruppo 2:** CDDP (4.6 mg/kg/day) + ACUVAL®400 (100 mg/kg) + n-QTER (500 mg/kg), alle basse (2-4-8 kHz) e alte frequenze (16-32-64 kHz). * valori statistici significativi a P<0.05.

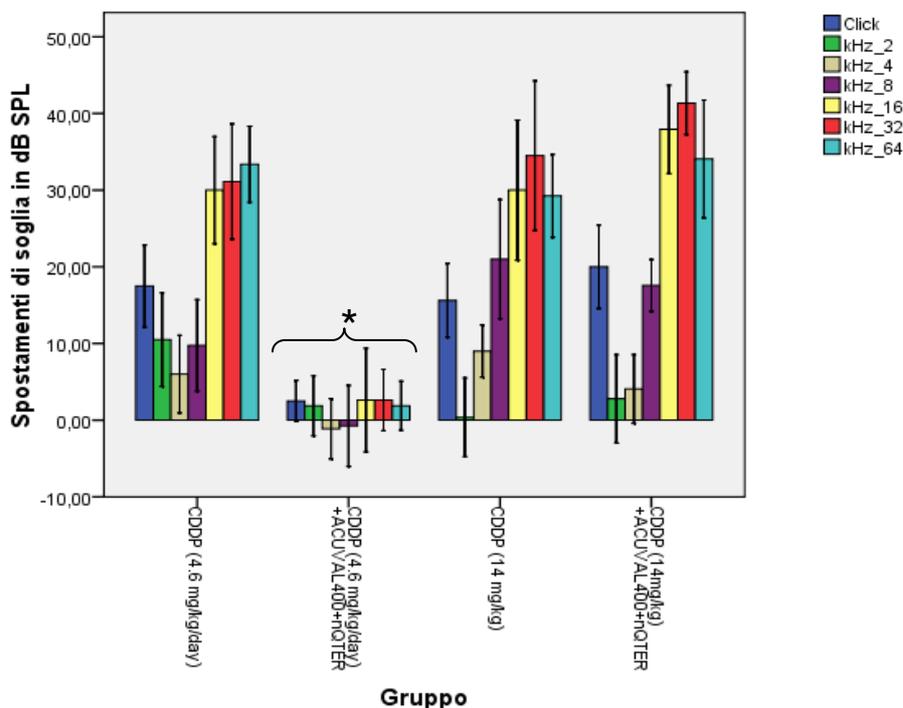


Fig.19: Spostamenti di soglia uditiva in dB SPL (post 96 h) (click, kHz: 2, 4, 8, 16, 32, 64): **Gruppo 1:** CDDP (4.6 mg/kg/day); **Gruppo 2:** CDDP (4.6 mg/kg/day) + ACUVAL®400 (100 mg/kg) + n-QTER (500 mg/kg), alle alte frequenze (16-32-64 kHz) **Gruppo A:** CDDP (14 mg/kg); **Gruppo B:** CDDP (14 mg/kg) + ACUVAL®400 (100 mg/kg) + n-QTER (500 mg/kg), alle basse frequenze (2-4-8 kHz) * valori statistici significativi a P<0.05.

DISCUSSIONE

DISCUSSIONE

La perdita uditiva causata da ototossicità o da trauma acustico comporta la morte delle cellule uditive che sono incapaci di rigenerarsi e quindi di essere sostituite.

Sia l'esposizione al rumore sia il trattamento chemioterapico come il CDDP provocano un'iperproduzione di radicali liberi, questi sono responsabili dell'attivazione della perossidazione lipidica che conduce alla morte delle cellule dell'organo del Corti (Yamane et al.; 1995).

In numerosi lavori è stato verificato come attraverso l'aumento dei livelli di sostanze antiossidanti (per esempio attraverso l'uso di farmaci o manipolazioni genetiche) è possibile promuovere la sopravvivenza delle cellule sensoriali e di proteggerle dal trauma acustico e dagli agenti ototossici (Ciorba et al.; 2008).

In questa tesi viene riportata la valutazione del potere antiossidativo della forma solubile del CoQ₁₀ (n-QTER) contenuto in ACUVAL®400, nei confronti (1) dei danni cocleari in seguito al trauma da rumore (115 dB per 2 h) e (2) alla somministrazione intraperitoneale del CDDP (14 mg/kg unico dosaggio, 4.6 mg/kg/day per 3 giorni).

1. Studio sul danno acustico indotto dal rumore

In una prima fase degli esperimenti è stata confrontata l'entità del danno uditivo causato dal rumore su ratti esposti a due diverse intensità per circa due ore: 95 e 115 dB SPL (Esperimento I) con lo scopo di riuscire ad ottenere un danno permanente non recuperabile fisiologicamente.

I dati ottenuti mediante l'esame uditivo ABR mostravano come l'intensità di 95 dB causava uno spostamento di soglia uditiva temporaneo (TTS) di circa 20 dB, mentre l'intensità 115 dB di circa 50 dB (fig.13).

Inoltre, si osservava un recupero totale della soglia uditiva nell'arco di due settimane soltanto negli animali esposti all'intensità di 95 dB (fig.13). Diversamente, negli animali esposti all'intensità di 115 dB, dopo due settimane si riscontrava un recupero parziale con un risultante danno e spostamento di soglia permanente (PTS) di circa 20 dB (fig.13).

La presenza dello spostamento di soglia uditiva permanente ci ha permesso di concludere che l'intensità di 115 dB determinava un recupero fisiologico più lento con un conseguente danno uditivo maggiore rispetto all'intensità 95 dB.

Il danno uditivo ottenuto dall'intensità di 115 dB era allo stesso tempo tale da non essere poi così traumatico e quindi utile per poter studiare il potere antiossidativo della forma solubile del CoQ₁₀ (n-QTER) contenuto in ACUVAL®400.

Nel lavoro di Yoshinobu e coll. (2008) Guinea pig trattati con il CoQ₁₀, per via intraperitoneale due ore prima l'esposizione al rumore (130 dB SPL per 3 h), non svilupparono NIHL.

Fetoni e coll. (2009) hanno condotto uno studio simile su Guinea pig esposti al trauma acustico (120 dB SPL per 1 h), dove confrontavano l'effetto protettivo tra il CoQ10 e una sua forma solubile (n-QTER), somministrati attraverso la via intraperitoneale (100 mg/kg) 1 h prima e per 3 giorni successivi al trauma. In questo lavoro hanno riscontrato come, seppur entrambe le molecole riducessero la perdita uditiva 21 giorni dopo l'esposizione al trauma, una migliore protezione veniva garantita soltanto con la molecola più solubile (n-QTER), sia a livello morfologico, prevenendo l'apoptosi, sia a livello uditivo, riducendo gli spostamenti di soglia. Entrambe le molecole il giorno dopo l'esposizione al trauma, erano in grado di ridurre lo spostamento di soglia (20-30dB) rispetto agli animali a cui non veniva somministrato nessuna delle due (50-60 dB), ma tale spostamento era ulteriormente ridotto il giorno 7 solo con l'utilizzo di n-QTER fino a scomparire del tutto dopo 21 giorni.

A seguito di tale risultati abbiamo condotto uno studio pilota in cui è stato valutato il potere antiossidativo della forma solubile del CoQ₁₀ (n-QTER), contenuto in ACUVAL®400 (100 mg/kg) nei confronti dei danni cocleari causati dal trauma da rumore all'intensità di 115 dB per 2 h (Esperimento II).

Diversamente dal lavoro condotto da Fetoni, in questo studio abbiamo deciso di somministrare il farmaco attraverso la via orale piuttosto che la via intraperitoneale per due motivi:

- (1) l'ACUVAL®400 essendo una sostanza granulare è difficilmente solubile in acqua, per cui la via orale garantisce un maggior assorbimento rispetto alla via intraperitoneale;
- (2) la somministrazione attraverso la via orale degli antiossidanti è quella più praticata nell'uomo.

I risultati ottenuti rivelavano come ACUVAL®400 (100 mg/kg) non garantiva una prevenzione o un recupero uditivo in seguito al trauma acustico. Infatti, l'esame elettrofisiologico mostrava uno spostamento di soglia uditiva di circa 70 dB il giorno dopo l'esposizione al trauma (post1), in particolare alle alte frequenze (fig.14).

Nei giorni successivi si riscontrava un recupero fisiologico della soglia uditiva di circa 10 dB, con un risultante danno permanente mantenuto alle alte frequenze e ulteriormente confermato da uno PTS al giorno 21 (post21) di oltre 50 dB (fig.14).

In un'ultima parte sperimentale, abbiamo continuato a valutare l'effetto otoprotettivo dell'integratore ACUVAL®400 ed in particolare, del CoQ₁₀ nella forma terclatrata (n-Q_{TER}) contenuto in esso, aumentando la concentrazione di tale molecola (500 mg/kg) in aggiunta all'integratore (100 mg/kg) (Esperimento III).

L'aumento della concentrazione di n-Q_{TER} nell'integratore ACUVAL®400 non causava un'alterazione della sensibilità uditiva, infatti, le soglie uditive degli animali a cui veniva

somministrata la soluzione orale ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} (Gruppo C) non variavano (fig.16). Inoltre, il solo aumento della concentrazione di n-Q_{TER} (500 mg/kg) somministrato oralmente non era in grado di garantire una protezione uditiva in tutti gli animali che venivano esposti al trauma acustico (115 dB) (Gruppo D) (fig.15).

Essi infatti mostravano uno spostamento di soglia uditiva di circa 40 dB al giorno 21 (fig.15). Si evince, dunque, che la somministrazione del solo n-Q_{TER} non era sufficiente a garantire una riduzione dello spostamento di soglia, diversamente da quanto osservato negli animali esposti al trauma e a cui veniva somministrato oralmente anche l'integratore ACUVAL®400 (Gruppo B) (fig.15).

Quest'aspetto molto probabilmente è dovuto al fatto che ACUVAL®400 oltre a contenere una piccola quantità di coenzima Q10 in forma terclatrata (n-Q_{TER}) (0,32 mg) contiene diverse vitamine (A, E, B1, B2, B6 e B12), L-Arginine, estratto di *Ginkgo biloba* (Ginkgoselect®), minerali come il magnesio, il selenio e lo zinco, una combinazione che rende favorevole il meccanismo antiossidativo sui radicali liberi che si generano in seguito all'esposizione al trauma. Difatti, gli animali trattati oralmente con ACUVAL®400 (100 mg/kg) ed n-Q_{TER} (500 mg/kg) (Gruppo B), prima (24 h e 2h pre) e dopo l'esposizione al rumore (24-48-72 h post), mostravano una perdita uditiva significativamente inferiore (circa 25 dB) rispetto agli animali a cui non veniva somministrato alcun farmaco (Gruppo A) (55 dB) già dal primo giorno dopo l'esposizione al trauma (post 1) (fig.15).

Un rapido recupero della funzione uditiva del gruppo B veniva garantita dal giorno 7 in poi, difatti gli spostamenti di soglia risultavano essere decisamente ridotti e, anche in questo caso, significativamente differenti rispetto a quelli riscontrati nel gruppo A (fig.15).

Considerati gli effetti positivi della cosomministrazione orale dei due farmaci, quali la riduzione dello spostamento di soglia osservato sin dal primo giorno dopo l'esposizione al trauma e la sua ulteriore riduzione dal giorno 7 in poi, si può concludere che ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} hanno consentito un rapido recupero della soglia uditiva e quindi una protezione della funzione uditiva in seguito al rumore (115 dB).

2. Studio sul danno acustico indotto dal cisplatino

Una volta osservato che la cosomministrazione dei due farmaci ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} preserva la funzione uditiva riducendo nel tempo i danni conseguenti al trauma acustico il nostro studio si è spostato sull'eventuale effetto protettivo dall'ototossicità del CDDP, un potente chemioterapico capace di ridurre i livelli plasmatici degli antiossidanti con conseguente sviluppo dell'ototossicità (Concklin; 2000). La chemioterapia riduce i livelli plasmatici degli antiossidanti (vitamina E, C e β-carotene) per questo motivo il loro utilizzo è ampiamente diffuso durante il trattamento chemioterapico (Concklin; 2000).

In studi condotti sul CDDP si è visto come il CoQ₁₀ compensi significativamente i deficit dei meccanismi di difesa antiossidativi (ridotti livelli di GSH e attività superossidodismutasi) sopprimendo la perossidazione lipidica (Concklin; 2004). Inoltre altri studi suggeriscono come il CoQ₁₀ non interferisca con l'azione anticancerogena (Concklin, 2000).

Tuttavia pochi sono gli studi *in vivo* condotti sulla valutazione degli effetti protettivi di n-Q_{TER} nei confronti dell'ototossicità del CDDP.

Da diversi anni è ormai noto che gli effetti ototossici del CDDP portano a una conseguente perdita uditiva sia negli animali che nell'uomo, con un danno irreversibile che si manifesta soprattutto alle alte frequenze (4.000-8.000 Hz) (Piel et al.; 1974). Diversi studi anatomici e funzionali dimostrano come il CDDP altera la funzione uditiva sia che esso venga somministrato con un alto dosaggio (acuto) che con un basso dosaggio (cumulativo) (Laurell et al., 1989).

In uno studio viene dimostrato l'effetto protettivo del salicilato di sodio (100 mg/kg/day) in ratti trattati con il CDDP (16 mg/kg/day) per 3 giorni consecutivi (Li et al.; 2002).

Un altro studio condotto presso il nostro laboratorio di ricerca mostra come la combinazione di molecole protettive, come L-NAC (275 mg/kg) o di D-MET (300 mg/kg), con il rumore (85-dB per 15 minuti) sia in grado di prevenire i danni ototossici in seguito al trattamento con CDDP (14 mg/kg) somministrato 1 ora dopo l'iniezione dell'otoprotettore (Sathiyaseelan et al.; 2009).

In un primo esperimento non riportato in questa tesi, sono state utilizzate due concentrazioni differenti del CDDP (14 mg/kg e 16 mg/kg) somministrate in un unico dosaggio attraverso la via intraperitoneale a ratti Sprague dawley.

I dati mostravano un'alta mortalità degli animali trattati con la concentrazione di 16 mg/kg. Ragion per cui abbiamo deciso di somministrare il CDDP per via intraperitoneale alla concentrazione di 14 mg/kg inizialmente in un unico dosaggio (Esperimento I), e successivamente in più dosaggi (4.6 mg/kg/day per 3 giorni) (Esperimento II).

ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} anche per questo studio venivano somministrate attraverso la via orale alla concentrazione di 100 mg/kg e 500 mg/kg rispettivamente.

È stato osservato che negli animali a cui veniva somministrato il chemioterapico (14 mg/kg) sia in un unico sia in più dosaggi si otteneva un danno consistente nella regione basale della coclea (fig.19). L'esame elettrofisiologico, infatti, trascorse le 96 ore dal trattamento registrava gli spostamenti di soglia uditiva alle zone delle alte frequenze (16-32-64 kHz) (fig.19).

In particolare, quando il chemioterapico veniva somministrato in un unico dosaggio (14 mg/kg) si riscontrava un'elevata mortalità degli animali (Esperimento I).

Il danno consistente alle alte frequenze e l'elevata mortalità animale si presentavano anche in quel gruppo di animali che ricevevano il protettore (ACUVAL®400 ed n-Q_{TER}) prima del chemioterapico (24 h e 2 h prima) somministrato in un unico dosaggio (Esperimento I) (fig.17).

Diversamente ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} erano in grado di proteggere dal danno ototossico solamente quando il CDDP veniva somministrato in più dosaggi (4.6 mg/kg/day per 3 giorni) (Esperimento II) (fig.18).

In questo gruppo di animali, infatti, non si osservava alcuno spostamento di soglia uditiva nè alle basse e nè alle alte frequenze ed inoltre la mortalità era nettamente ridotta.

Come osservato nello studio condotto sul danno da rumore ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} erano in grado di preservare la funzione uditiva dal danno ototossico del CDDP, in questo caso ciò accadeva soltanto quando il chemioterapico veniva somministrato in più dosaggi (4.6 mg/kg/day per 3 giorni) (Esperimento II) (fig.19).

CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI

In questa tesi è stato studiato l'effetto protettivo di ACUVAL®400 (100 mg/kg) ed n-Q_{TER}(500 mg/kg) somministrati oralmente nei confronti dei danni ototossici conseguenti all'esposizione al trauma acustico e al CDDP in ratti Sprague Dawley.

In entrambi gli studi ACUVAL®400 ed n-Q_{TER} sono risultati estremamente efficienti nel prevenire e ridurre i danni uditivi causati dal rumore e dal CDDP.

Gli esami elettrofisiologici eseguiti mostrano come le soglie uditive siano state preservate dagli elevati spostamenti di soglia che invece si riscontrano in tutti quegli animali a cui non venivano somministrati i farmaci otoprotettori.

In futuro sarà interessante approfondire tale studio con l'aggiunta di esami istologici che saranno in grado di poter confermare ciò che è stato determinato fin'ora tramite gli esami elettrofisiologici.

In particolare verrà studiata la struttura e gli eventuali danni o perdite delle cellule neuronali del ganglio spirale e delle cellule sensoriali contenute nell'organo del Corti, con un'attenta analisi alla regione basale della coclea, zona particolarmente colpita dal rumore e dal CDDP.

BIBLIOGRAFIA

ANDERSSON A., EBRSSON H. Determination of cisplatin and cisdiammineaquachloroplatinum (II) ion by liquid chromatography using post-column derivatization with diethyldithiocarbamate. *J Chromatogr.* 652: 203-210, 1994.

ANDREWS P. A. & HOWELL S. B. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*, 2: 35-43, 1990.

ANNIKO M, SOBIN A. CDDP: evaluation of its ototoxic potential. *Am J Otol*, 7:276–93, 1986.

AKRAM P, TATSUYA Y. Cochlear damage caused by continuous and intermittent noise exposure. *Hearing research*, 178: 70–78, 2003.

BENTINGER M, BRISMAR K, DALLNER G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7 (Suppl.), S41–S50, 2007.

BERTINI I, CAVALLARO G & ROSATO A. Cytochrome c: occurrence and functions, *Chem. Rev.* 106: 90-115, .2006.

BLACK S, MAHLA ME, CUCCHIARA RF. Neurologic Monitoring. In: Miller RD ed. *Anaesthesia*. New York: Churchill Livingstone. Cap.35, 1994

BLATCHLEY BJ, COOPER WA and COLEMAN JR. Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Dev. Brain Res.* 32: 75-84, 1987.

BONAKDAR RA, GUARNERI E. Coenzyme Q10. *Am Fam Physician.* 72:1065-70, 2005.

BONNY C, OBERSON A, NEGRI S, SAUSER C, SCHORDERET DF. Cellpermeable peptideE inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50: 77–82, 2001.

BROCKENBROUGH JM., RYBAK LP AND & MATZ GJ. Ototoxicity. Head and neck surgery –otolaryngology In B. J. Bailey (Ed.):1893-1898, 2001.

BURKARD R, FELDMAN M, VOIGT HF. Brainstem auditory-evoked response in the rat. *Audiology*. 29: 146-162, 1990.

CARDINAAL RM, GROOT JCMJ, HUIZING EH, VELDMAN JE, SMOORENBURG GF. Dose-dependent effect of 8-day CDDP administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hearing Res*; 144:135–146, 2000.

CHURCH MW AND GRITZKE R. Dose-dependent effects of atropine sulphate on the brainstem and cortical auditory evoked potentials in the rat. *Brain Res*.456: 224-234, 1988.

CIORBA A, ASTOLFI L, MARTINI A. Otoprotection and inner ear regeration. *Aud Med*. 6: 170-175, 2008.

CLERICI WJ, HENSLEY K, DIMARTIN DL, BUTTERFIELD DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlea explants. *Hear Res*, 98: 116-124, 1996.

COLLETTI V, SITTONI V: Fisiologia del sistema uditivo. In: *Otologia clinica - Libreria editrice internazionale*, Milano, 1993.

CONKLIN KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer*,; 37(1):1–18, 2000.

CONKLIN KA. Cancer chemotherapy and antioxidants. *Am Soc Nutr Sc J Nutr*. 134: 3201-3204, 2004.

CRANE FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*, 20, 591–598, 2001.

DALDAL A, ODABASI O, SERBETCIOGLU B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 137: 747-52, 2007.

DALLOS P & FAKLER B. Prestin, a new type of motor protein. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 104-111, 2002.

DELPIRE E, LU J, ENGLAND R, DULL, C, THORNE T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet*, 22: 192-195, 1999.

DEWOSKIN RS & RIVIERE JE. Cisplatin-induced loss of kidney copper and nephrotoxicity is ameliorated by a single dose of diethyldithiocarbamate but not mesna. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112: 182-189, 1992.

DOBYAN DC, LEVI J, JACOBS C, KOSEK J, WEINER MW. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther*, 213: 551-556, 1980.

EKBORN A, LAURELL G, JOHNSTROM P, WALLIN I, EKSBORG S, EHRSSON H. D-Methionine and CDDP ototoxicity in the guinea pig: D-methionine influences CDDP pharmacokinetics. *Hear Res*; 165:53–61, 2002.

EKBORN A, LAURELL G, EHRSSON H, MILLER J. Intracochlear administration of thiourea protects against CDDP-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hear Res*; 181:109–15, 2003.

ESHRAGHI & THOMAS R. VAN DE WATER. Cochlear implantation trauma and noise-induced hearing loss: apoptosis and therapeutic strategies. *The anatomical record part A* 288A: 473–481, 2006.

ESPOSITO E, ROTILIO D, DI MATTEO V, DI GIULIO C, CACCHIO M, ALGERI S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging*, 23: 719–735, 2002.

FALBE HANSEN J. Clinical and experimental Histological studies on effects of salicylates and quinine on the ear. *Acta Otolaryngol.* 44: 1-216, 1941.

FOUAD AA, AL-SULTANB AI, REFAIEA SM, YACOUBIC MT. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. *Toxicology*, 2010.

FETONI AR, PIACENTINI R, FIORITA A, PALUDETTI G, TROIANI D. Water-soluble Coenzyme Q10 formulation (Q-ter) promotes outer hair cell survival in a guinea pig model of noise induced hearing loss (NIHL). *Brain Res*; 1257: 108-116, 2009.

JAMIESON E.R. & LIPPARD SJ. Structure, Recognition and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem.Rev.* 99: 2467-2497, 1999.

GATELY D. P. & HOWELL S. B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer*, 67: 1171-1176, 1993.

GIORDANO P. L'epitelio sensoriale uditivo normale e patologico visto al SEM. *Archives of medical therapy*, Anno II Vol 1, 2010.

GREEN DR & REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. Aug 28; 281: 1309-12, 1998.

HALL RM, COLLIS CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist. Updat.* 1: 109-19, 1998.

HAYASHIDA T, HIEL H, DULON D, ERRE J. Dynamic changes following combined treatment with gentamicin and ethacrynic acid with and without acoustic stimulation. *Acta Otorinolaryngol*, 1989.

HENDERSON D, MCFADDEN SL, LIU CC, HIGHT N, ZHENG XY. The role of antioxidants in protection from impulse noise. *Ann N Y Acad Sci*, 884:368-80, 1999.

HENDERSON D, BIELEFELD EC, HARRIS KC, HU BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear*, 27: 1-19, 2006.

HILL JM, LOEB E, MACLELLAN A, HILL NO, KHAN A, KING JJ. Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases. *Cancer Chemother.* 59: 647-59, 1975.

HU S, HAJ-YEHIA A & LEVI-SCHAFFER F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418, 2000.

HU BH, GUO W, WANG PY, HENDERSON D, JIANG SC. Intense noise induced apoptosis in hair cells of guinea pig cochleae. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 120: 19-24, 2000.

HUANG T, CHENG A, STUPAK H, LIU W, KIM A, STAECKER H, LEFEBVRE PP, MALGRANGE B, KOPKE R, MOONEN G, VAN DE WATER T. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int J of Dev Neurosc* 18: 259-270, 2000.

JAMES G, OLSON E. Deletion of the regulatory domain of protein kinase-C exposes regions in the hinge and catalytic domains that mediated nuclear targeting. *J. Cell. Biol.* 116: 1172-1179, 1997.

JOHNSSON L-G, HAWKINS JE JR: Degeneration patterns in human ears exposed to noise. *Ann Otol. Rhinol. Laryngol.* 85:725-739, 1976.

JUNG HJ, PARK EH, LIM CJ. Evaluation of anti-angiogenic, anti-inflammatory and antinociceptive activity of coenzyme Q10 in experimental animals. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 1391–1395, 2009b.

KAYGUSUZ I, OZTURK A, USTUNDAG B, YALCIN S. Role of free oxygen radicals in noise-related hearing impairment. *Hear Res*, 162 (1-2): 43-47, 2001.

SATO K. Pharmacokinetics of Coenzyme Q10 in Recovery of Acute Sensorineural Hearing Loss due to Hypoxia. *Acta Otolaryngol (Stockh); Suppl.* 458: 95-102, 1988.

KOHN SM, FRADIS J, ZIDAN L, PODOSHIN E, ROBINSON E & ROBINSON I. Cisplatin ototoxicity in guinea pigs with special reference to toxic effects in the stria vascularis, 1988.

KOPKE R.D., LIU W. AND GABAIZADEH R. et al. 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, 1997.

LANDER H.M.. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11: 118-124, 1997.

LAURELL G, ENGSTRÖM B The ototoxic effect of cisplatin in guinea pigs in relation to dosage. *Hearing Res* 38:27-34, 1989.

LENAZ G, FATO R, FORMIGGINI G, GENOVA ML. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* 7 (Suppl.), S8–S33, 2007.

LE PRELL CG, HUGHES LF, MILLER JM. Free radical scavengers vitamins A, C and E plus magnesium reduce noise trauma, 42: 1454-1463, 2007.

LI G, FRENZ DA, BRAHMBLATT S, FEGHALI JG, RUBEN RJ, BERGGREN D, et al. Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from CDDP ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *NeuroToxicology*; 22:163–76, 2001.

LI G, SHA SH, ZOTOVA E, AREZZO J, VAN DE WATER T, SCHACHT J. Salicylate protects hearing and kidney function from CDDP toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest*; 82:585–96, 2002.

LIU X., KIM C., YANG J., JEMMERSON R., WANG X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, *Cell*. 86: 147-57, 1996.

MARCUS DC, WU T, WANGEMANN P, KOFUJI P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol*; 82:C403-C407, 2002.

MEISTER A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy, *Pharmacol Ther* 51: 155–194, 1991.

MELAMED SB, KALTENBACH JA, CHURCH MW, BURGIO DL, AFMAN CE. CDDP-induced increases in spontaneous neural activity in the dorsal cochlear nucleus and associated outer hair cell loss. *Audiology*; 39 (1), 24–29, 2000.

MOLLER AR. *Auditory physiology*, New Yor, Academic Press; 1983.

MORDENTE A, MARTORANA GE, MINOTTI G, GIARDINA B. Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6- (10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem. Res. Toxicol.* 11, 54–63, 1998.

MOROSO MJ, BLAIR RL. A review of CDDPum ototoxicity. *J Otolaryngol*; 12 (6), 365–369, 1983.

MÜLLER M; KLINKE R ; ARNOLD W; OESTREICHER E. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited. *Hearing research*. 183: 37-43, 2003.

NAGASHIMA R., OGITA K. Enhanced biosynthesis of glutathione in the spiral ganglion of the cochlea after in vivo treatment with dexamethasone in mice. *Brain Research* 1117: 101-108, 2006.

NICOTERA T, HENDERSON D, HU BH, ZHENG XY. Noise exposure and mechanisms of hair cell death. In: Prasher D, Henderson D, Kopke R, Salvi R, Hamernik R (Eds.) *Noise Induced Hearing Loss: Advances in Basic Science and Clinical Application*. NRN Publications, Cambridge, England, 2002.

NICOTERA TM, HU BH, HENDRSON D. 2003. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of the chinchilla cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*; 4: 466–477, 2003.

NUKUI K, YAMAGISHI T, MIYAWAKI H, KETTAWAN A, OKAMOTO T, SATO K. Comparison of uptake between PureSorb-Q40 and regular hydrophobic coenzyme Q10 in rats and humans after single oral intake. *J Nutr Sci Vitaminol*; 53:187-90, 2007.

OZOLS RF, YOUNG RC. High-dose CDDP therapy in ovarian cancer. *Semin Oncol*; 12:21–30, 1985.

PAPUCCI L, SCHIAVONE N, WITORT E et al. Coenzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J. Biol. Chem.* 278: 28220–28228, 2003

PICTON TW, STAPELLS DR, CAMBPELL KB. Auditory evoked potentials from the human cochlea and brainstem. *J. Otolaryngol.*, 9 (Suppl): 1-41, 1981.

PIEL IJ, MEYER D, PERCIA CP, WOLFE VI. Effects of cisdiamminedichloroplatinum (NSC-119875) on hearing function in man. *Cancer Chemother Rep* 58:871–875, 1974.

PIRVOLA U, XING-QUN L, VIRKKALA J, SAARMA M, MURAKATA C, CAMORATTO AM, WALTON KM, YLIKOSKI J. Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Neurosci.* 20: 43–50, 2000.

REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-36, 1998.

RYBAK LP, RAVI R, SOMANI SM. Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against CDDP ototoxicity: antioxidant system. *Fundam Appl Toxicol*; 26:293–300, 1995.

RYBAK LP, HUSAIN K, EVENSON L, MORRIS C, WHITWORTH C AND SOMANI SM. Protection by 4-methylthiobenzoic acid against cisplatin-induced ototoxicity: Antioxidant system. *Pharmacol. Toxicol.* 81:173-179, 1997.

RYBAK LP, SOMANI S. Ototoxicity amelioration by protective agents. *Ann NY Acad Sci*; 884, 143–151, 1999.

SADLER PJ AND GUO Z. Metal complexes in medicine: Design and mechanism of action. *Pure and Applied Chem.* 70(4): 863-871, 1998.

SAFINSTEIN R, WINSTON J, GOLDSTEIN M, MOEL D, DIKMAN S, GUTTENPLAN J. CDDP nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis*; 8:356–67, 1986.

SAITO T & ARAN JM. Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL* 56 (6): 315–320, 1994.

SAKAMOTO M, KAGA K, KAMIO T. Extended high-frequency ototoxicity induced by the first administration of cisplatin. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 122 (6): 828-33, 2000.

SATHIYASEELAN T, LORITO G, GIORDANO P, PETRUCCELLI J, MARTINI A, HATZOPOULOS S. Effect of noise conditioning on cisplatin-induced ototoxicity: A pilot study. *Med Sci Monit*; 15(7): 173-177, 2009.

SCHWEITZER VG. Cisplatin-Induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope* , 103, 1993.

SERGI B, FETONI AR, PALUDETTI G, FERRARESI A, NAVARRA P, MORDENTE A, TROIANI D. Protective properties of idebenone in noise-induced hearing loss in the guinea pig. *NeuroReport* 17, 857–861, 2006.

SHERMAN S, GIBSON D, WANG AH-J AND LIPPARD SJ. Crystal and Molecular Structure of cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))], the Principal Adduct Formed by cis-Diamminedichloroplatinum (II) with DNA. *J Am Chem Soc*, 110: 7368-7381, 1988.

SONE M, SCHACHERN PA, PAPARELLA MM. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hear Res.* 115: 217-223, 1998.

SORENSEN C.M. & EASTMAN A. Mechanism of cisdiamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA doublestrand breaks. *Cancer Res.*, 48: 4484-4488, 1988b.

SPOENDLIN H. Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol*, 73: 234-248, 1972.

STADNICKI SW, FLEISCHMAN RW, SCHAEPPI U, MERRIAM P. cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875): hearing loss and other toxic effects in rhesus monkeys. *Cancer Chemother*; 59 (3), 467–480, 1975.

STARR A., HANMILTON AE. Correlation between confirmed sites of neurological lesions and abnormalities of far field auditory evoked responses. *Electroencephalogr. Clin.Neurophysiol.* 41: 595-608, 1976.

TAGUCHI T, NAZNEEN A, ABID MR, RAZZAQUE MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib.Nephrol.* 148: 107-121, 2005.

TAUDY M, SIKI J, POPELAR J & ULEHLOVA L. Carboplatin and cisplatin ototoxicity in guinea pigs. *Audiology* 31(5): 293–299, 1992.

TERANISHI MA AND NAKASHIMA T. Effects of trolox, locally applied on round windows, on CDDP-induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*; 67:133–9, 2003.

TURUNEN M, OLSSON J, DALLNER G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660:171-99, 2004.

WANG D & LIPPARD SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 307-320, 2005.

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 Otorhinolaryngol*; 252: 504-508, 1995.

YANG WP, HENDERSON D, HU BH, NICOTERA TM. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hearing Research*; 196: 69–76, 2004.

YOSHINOBU H, SUGAHARA T, TAKEFUMI M, MAKOTO H, HIROAKI S AND HIROSHI Y. Effect of water soluble coenzyme Q10 on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*; 128: 1071-1076, 2008.

ZEISS CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*; 40: 481–95, 2003.

ZOU H., HENZEL W. J., LIU X., LUTSCHG A., WANG X.. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90(3): 405-13, 1997.

Testi:

GRANDORI F. & MARTINI A (1995). *Potenziali evocati uditivi. Basi teoriche e applicazioni chimiche*. Ed. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova: pp. 635.

ROSSI G. (1997). *Trattato di otorinolaringoiatria*. Ed. Minerva Medica S.p.A., Torino: pp. 622.

TREVISI M. & RICCI D. (1998). *Anatomia funzionale dell'apparato audio-fonatorio*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano: pp. 129.