

Ocena funkcji neutrofilów u dzieci z głębokim niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie i o nieznannej etiologii

Neutrophil function assessment in children with profound hearing loss of hereditary and unknown origin

MAŁGORZATA ŚMIECHURA^{1/}, ANDRZEJ MAKOWSKI^{1/}, AGATA MAKOWSKA PIONTEK^{1/}, PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ^{2/}, HENRYK TCHÓRZEWSKI^{2/}, MAŁGORZATA PAWEŁCZYK^{3/}, MARIOLA ŚLIWIŃSKA-KOWALSKA^{3/4/}

^{1/} Klinika Otolaryngologii Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

^{2/} Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

^{3/} Klinika Audiologii i Foniatrii Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi

^{4/} Zakład Otolaryngologii Środowiskowej Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Wprowadzenie. Mimo, że układ nerwowy i układ immunologiczny połączone są licznymi wzajemnymi powiązaniem, w dotychczasowej literaturze brak jest praktycznie danych dotyczących zależności między genetycznie uwarunkowanymi chorobami układu nerwowego a zaburzeniami immunologicznymi, jakkolwiek wydają się one prawdopodobne.

Cel pracy. Ocena odporności naturalnej u dzieci z niedosłuchem w zależności od udowodnionego, bądź nieudowodnionego genetycznego tła choroby.

Materiał i metody. Badaniu poddano 29 dzieci z niedosłuchem odbiorczym głębokiego stopnia. U dziewięciorga z nich potwierdzono genetyczne tło choroby (mutacja typu 35delG w genie koneksyny 26). U wszystkich dzieci oceniono zawartość neutrofilów we krwi obwodowej oraz produkcję reaktywnych form tlenu (RTF) bez stymulacji, a następnie po stymulacji fMLP (formylo-metionylo-leucylofenyloalanina), OZ (opsonizowanym zymosanem) i PMA (12-mirystyniano-13-octan forbolu).

Wyniki. W grupie dzieci z genetycznie uwarunkowanym niedosłuchem stwierdzono niższy poziom neutrofilów we krwi obwodowej w porównaniu z dziećmi z niedosłuchem o nieznannej etiologii. Wykazano upośledzenie produkcji RTF spontanicznej i po stymulacji fMLP. Pomiar produkcji RTF przez neutrofile stymulowane OZ i PMA nie wykazał różnic między grupami.

Wnioski: Wstępne obserwacje sugerują istnienie nieprawidłowości w układzie mechanizmów odporności naturalnej u dzieci z głębokim niedosłuchem odbiorczym o podłożu genetycznym w porównaniu z dziećmi o nieznannej etiologii choroby.

Słowa kluczowe: koneksyna 26, niedosłuch, odporność naturalna, chemiluminescencja

Introduction. Although several links have been shown between central nervous system and immune system, in the up-to date literature there is practically no data on possible connection between genetic central nervous system diseases and the innate immunity in spite that such links seem to be likely.

Aim. Assess the innate immunity in children with hearing loss of hereditary and unknown origin.

Material and methods. 29 children with profound sensorineural hearing loss were included into the study. In nine of them a genetic background of the disease was proved (35delG mutation in Connexin 26 gene). In all children, the number of neutrophils in the whole blood and the production of reactive oxygen species (ROS) by the not stimulated neutrophils and after stimulation with fMLP (formyl-Met-Leu-Phe), OZ (opsonized zymosan) or PMA (phorbol myristate acetate) were assessed.

Results. The level of neutrophils in the whole blood was lower in children with the hereditary origin of the hearing loss when compared with children without the genetic background of the hearing loss. In addition, the intensity of ROS production without stimulation and after stimulation with fMLP was handicapped. ROS production by OZ- and PMA-stimulated neutrophils has been found to be the same in both subgroups.

Conclusions. The preliminary results of this study suggest that the mechanisms of the innate immunity may be affected in children with hearing loss of hereditary origin as compared with children with hearing loss of unknown origin.

Key words: GJB2, hearing loss, natural immune system, blood chemiluminescence

© Otorinolaryngologia 2007, 6(1): 27-31

www.mediton.pl/orl

Nadesłano: 31.07.2006

Zakwalifikowano do druku: 16.03.2007

Adres do korespondencji / Address for Correspondence

Małgorzata Śmiechura

Klinika Otolaryngologii Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki

ul. Rzgowska 281-289, 93-338 Łódź

tel. 0-42 271-21-25, 0-42 271-17-01

WSTĘP

Układ nerwowy i układ immunologiczny połączone są licznymi wzajemnymi powiązaniem. Najlepszym tego przykładem jest funkcjonowanie osi psycho-endokrynno-immunologicznej z udziałem głównych mediatorów, jakimi są w szczególności neurohormony, neuropeptydy i cytokiny [1].

Szereg badań wykazało, że odpowiedź immunologiczna nabyta ma znaczenie w patogenezie wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego, w tym również narządu słuchu. Bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, a także krew-perylimfa, uznawane dawniej za „nieprzenikalne”, pozwalają w rzeczywistości na swobodny transport zarówno antygenów, jak i przeciwciał, warunkujących rozwój procesów autoimmunizacyjnych [2]. Stwierdzono, że równowaga między cytokinami komórek Th1, monocytów/makrofagów i komórek Th2 może mieć istotne znaczenie w warunkowaniu rozwoju degeneracji włókien nerwowych w stwardnieniu rozsianym [3]. Natomiast klasyczną jednostką chorobową ucha wewnętrznego rozwijającą się na podłożu autoimmunizacyjnym jest szybko postępujący niedosłuch czuciowo-nerwowy, podatny na leczenie glikokortykosteroidami [2].

W dotychczasowej literaturze brak jest praktycznie danych dotyczących zależności między genetycznie uwarunkowanymi chorobami układu nerwowego a zaburzeniami immunologicznymi, jakkolwiek wydają się one prawdopodobne. Przykładowo, w zespole Downa zaburzenia układu immunologicznego występują równolegle z genetycznie uwarunkowanymi dysmorficznymi zmianami twarzoczaszki i nieprawidłowościami ucha [4]. Badania na zwierzętach wykazały, że istnieje związek między przyspieszonym procesem starzenia się narządu słuchu (*presbyacsis*) u myszy a zaburzeniami immunologicznymi [5]; istnieją przy tym dane, że *presbyacsis* w znacznej mierze zależy od uwarunkowań genetycznych [6]. W doświadczeniach na zwierzętach wykazano również, że mechanizmy immunologiczne odgrywają istotną rolę protekcyjną w odniesieniu do toksyczności glutamianu, jednego z głównych neurotransmiterów ucha wewnętrznego i ośrodkowego układu nerwowego [7].

Kluczową rolę w odporności naturalnej u ludzi odgrywają neutrofile (granulocyty obojętnochłonne). Komórki te jako pierwsze napływają do miejsca zapalenia, eliminują bądź inaktywują bakterie, niektóre wirusy i grzyby. W procesie fagocytozy neutrofile reagują kilkudziesięciokrotnym wzrostem zużycia tlenu, który służy wytwarzaniu i uwalnianiu na zewnątrz komórki dużych ilości

anionorodnika ponadtlenkowego [8,9]. Wielkość tego strumienia sprawia, że pobudzone neutrofile są jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu (RFT) w organizmie. Dzięki zastosowaniu odpowiednich stymulatorów, działających drogą receptorową, jak i pozareceptorową oraz blokerów receptorów, pobudzenie komórki i ocena transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego mogą być łatwo i wiarygodnie ocenione poprzez pomiar produkcji RFT [10].

W poprzedniej pracy oceniono odsetek granulocytów we krwi obwodowej, stężenie reaktywnych form tlenu produkowanych przez neutrofile oraz zbadano efekt preaktywacji neutrofilów poprzez inkubację z TNF α u 5 dzieci głuchych w porównaniu z 10 dzieci zdrowych. Wykazano, że funkcja neutrofilów, mierzona ilością wytwarzanych RFT, jest ograniczona u dzieci z głębokim niedosłuchem, co może wskazywać na nieprawidłowości w układzie mechanizmów obronnych w tej grupie pacjentów [11].

Celem niniejszej pracy była ocena odporności naturalnej dzieci z niedosłuchem odbiorczym głębokiego stopnia w zależności od udowodnionego, bądź nieudowodnionego genetycznego tła choroby.

MATERIAŁ I METODY

Badania oceniające wpływ niedosłuchu na odporność naturalną wykonano w grupie 29 dzieci (16 dziewczynek i 13 chłopców) z obustronnym niedosłuchem odbiorczym głębokiego stopnia, w wieku od 11 do 14 lat. Poza niedosłuchem, wszyscy pacjenci byli klinicznie zdrowi.

Z przeprowadzonego wywiadu wynikało, że dzieci te nie były obciążone żadnym ze znanych środowiskowych czy chorobowych czynników ryzyka uszkodzenia słuchu [12]. Natomiast u 9 dzieci wywiad rodzinny wskazywał na możliwość genetycznego tła choroby.

W celu potwierdzenia lub wykluczenia genetycznego podłoża choroby wszystkie dzieci poddano badaniu na obecność mutacji typu 35delG w genie koneksyny 26 (*GJB2*) (najczęstszej mutacji w populacji kaukaskiej). Badanie to przeprowadzono techniką specyficjnie polimerazowej reakcji łańcuchowej (*Allele-Specific polymerase chain reaction* – AS-PCR), z zastosowaniem starterów specyficznych dla sekwencji dzikiej i zmutowanej [13]. Z grupy 29 badanych dzieci, u 9 (4 dziewcząt i 5 chłopców) stwierdzono obecność mutacji w genie *GJB2*. Dodatni wywiad rodzinny korelował w pełni ze stwierdzeniem mutacji u dziecka.

U wszystkich dzieci wykonano morfologię krwi obwodowej wraz ze wzorem odsetkowym krwinek białych oraz oceniono odporność naturalną poprzez pomiar produkcji reaktywnych form tlenu (RTF) produkowanych przez neutrofile. Ocenę wytwarzania RFT przeprowadzono metodą chemiluminescencji zależnej od luminolu w krwi pełnej przy użyciu aparatu MLX (*Microtiter Plate Lumenometr; Dynex*). Zjawisko chemiluminescencji polega na emisji promieniowania świetlnego będącej następstwem produkcji reaktywnych form tlenu. Oceniano chemiluminescencję spontaniczną oraz stymulowaną stymulatorami receptorowo-zależnymi jak fMLP (formylo-metionilo-leucylofenyloalanina), OZ (opsonizowany zymosan) i receptorowo-niezależnymi jak PMA (12-mirystyniano-13-octan forbolu). Wyniki badań przedstawiono w jednostkach umownych *Relative Light Unit Total* (RLU).

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie, oceniając różnice poszczególnych parametrów między grupą dzieci z udowodnionym tłem genetycznym niedosłuchu (n=9) i grupą dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii (n=20). W ocenie statystycznej wykorzystano test t-Studenta, test dokładny Fischera oraz test Cohrana-Coxa. Za poziom istotny statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

Porównanie morfologii krwi obwodowej u dzieci z niedosłuchem odbiorczym uwarunkowanym genetycznie i bez udowodnionego tła genetycznego choroby wykazało obniżenie bezwzględnej wartości granulocytów w pierwszej z podgrup. Średnia wartość bezwzględna neutrofilów krwi obwodowej u dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie wynosiła $3,33 \pm 0,92$ tys/ml, natomiast u dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii równa była $4,18 \pm 1,74$ tys/ml. Zmiana ta była jedynie na granicy istotności statystycznej ($p = 0,07$). Również średnia zawartość odsetkowa neutrofilów krwi obwodowej u dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie była niższa i wynosiła $47,54 \pm 4,16\%$, w porównaniu z dziećmi z niedosłuchem o nieznannej etiologii – $51,88 \pm 7,59\%$. Pozostałe parametry krwi obwodowej, czyli bezwzględna liczba białych krwinek (WBC), bezwzględna liczba czerwonych krwinek (RBC), hemoglobina (Hb), hematokryt (Ht) - bezwzględna liczba płytek krwi (PLT) nie wykazywały znaczących różnic w porównywanych grupach dzieci niedosłyszających. Dane zestawiono w tabeli I.

Tabela I. Wartości średnie \pm SD wybranych parametrów morfologii krwi obwodowej u dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie i dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii

Parametry	Dzieci z niedosłuchem	
	uwarunkowanym genetycznie	o nieznannej etiologii
WBC (tys/ml)	$7,08 \pm 2,843$	$8,09 \pm 0,13$
GRAN (tys/ml)	$3,33 \pm 0,92^*$	$4,18 \pm 1,74^*$
GRAN (%)	$47,54 \pm 4,16^*$	$51,88 \pm 7,59^*$
RBC (x 10 ¹² /l)	$5,80 \pm 3,43$	$4,74 \pm 0,31$
Hb (g/dl)	$16,94 \pm 9,76$	$13,21 \pm 0,94$
Ht (%)	$44,48 \pm 16,01$	$39,25 \pm 2,06$
PLT (x 10 ⁹ /l)	$261,00 \pm 74,29$	$281,60 \pm 82,98$

* $p = 0,07$

U dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie średnia wartość chemiluminescencji spontanicznej (oceniającej produkcję RFT przez niestymulowane neutrofile) wynosiła $0,044 \pm 0,041$ RLU i była istotnie niższa niż w grupie dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii ($0,120 \pm 0,104$ RLU; $p < 0,05$). W przypadku stymulacji neutrofilów przez fMLP wartość produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile w grupie dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie wyniosła $0,124 \pm 0,083$ RLU, a w grupie dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii $0,224 \pm 0,196$ RLU i również była statystycznie istotna ($p < 0,05$). Natomiast w przypadku stymulacji neutrofilów przez OZ i PMA nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami (tab. II).

Tabela II. Analiza wartości produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile spoczynkowe i stymulowane fMLP, OZ i PMA u dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie i dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii. Wartości (średnie \pm SD) przedstawiono w jednostkach *Relative Light Units Total*

	Dzieci z niedosłuchem	
	uwarunkowanym genetycznie	o nieznannej etiologii
Średni wiek badanej grupy	14	11
Neutrofile niestymulowane	$0,044 \pm 0,041^*$	$0,120 \pm 0,104^*$
Neutrofile estymulowane		
fMLP	$0,124 \pm 0,083^*$	$0,224 \pm 0,196^*$
OZ	$0,261 \pm 0,166$	$0,309 \pm 0,184$
PMA	$0,311 \pm 0,241$	$0,288 \pm 0,175$

* $p < 0,05$

Porównując wyniki uzyskane w obu grupach dzieci głuchych stwierdzono, że widoczne są nieprawidłowości w układzie mechanizmów odporności naturalnej u dzieci z głębokim niedosłuchem odbiorczym o udowodnionym tle genetycznym choroby.

DYSKUSJA

W niniejszej pracy oceniono odporność naturalną u dzieci z głębokim niedosłuchem odbiorczym. Grupę badaną stanowiło 29 dzieci, wszystkie z nich przebadano w kierunku mutacji 35delG w genie koneksyny 26 (zwanym również genem *GJB2*). Mutacja 35delG jest najczęściej występującą mutacją warunkującą głuchotę dziedziczną u ludzi rasy białej. Odpowiedzialna jest za 50-70% wszystkich izolowanych głuchot recesywnych [14]. Dzieci obciążone tą mutacją od urodzenia wykazują obustronny, czuciowo-nerwowy niedosłuch, najczęściej znacznego stopnia, przy czym głuchota ta może występować w rodzinie sporadycznie. *GJB2* jest małym genem, zawierającym tylko dwa eksony, łatwym i relatywnie tanim do skryningowej oceny w obciążonej niedosłuchem populacji. Mutację 35delG w genie koneksyny 26 potwierdzono u 9 z 29 badanych dzieci. Mimo, że również u pozostałych 20 dzieci teoretycznie nie można wykluczyć głuchoty uwarunkowanej genetycznie, w tym innej mutacji w genie koneksyny 26 lub mutacji innego genu, brak było danych klinicznych, czy danych z wywiadu sugerujących taką możliwość. Stąd przyjęto, zdając sobie sprawę z ograniczeń takiego podziału, że u dzieci, u których nie stwierdzono mutacji *GJB2* występowała pozagenetyczna przyczyna niedosłuchu.

W niniejszej pracy porównano skład morfologiczny krwi obwodowej u dzieci z niedosłuchem odbiorczym uwarunkowanym genetycznie i dzieci z nieustalonym tłem choroby. Stwierdzono obniżenie zarówno bezwzględnej, jak i procentowej wartości neutrofilów w pierwszej z podgrup.

Badanie odporności naturalnej przeprowadzono na drodze oceny produktów wybuchu tlenowego, będącego efektem pobudzenia neutrofilów. Pobudzenie tych komórek prowadzi do wytwarzania anionorodnika nadadtlenkowego $\cdot\text{O}_2$ [10], który jako związek nietrwały staje się substratem do tworzenia toksycznych reaktywnych form tlenu, takich jak $\text{HO}_2\cdot$ (rodnik wodoronadtlenkowy), H_2O_2 (nadtlenek wodoru), ten z kolei w reakcji utleniania jonów metali przejściowych (Fe^{2+} do Fe^{3+} , Cu^+ do Cu^{2+}) prowadzi do powstania jednej z najbardziej reaktywnych form w układach biologicznych, rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) [15]. Fizjologiczną funkcją wybuchu tlenowego jest zniszczenie obcych komórek. W warunkach patologicznych, gdy dochodzi do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu, bądź załamania obrony antyoksydacyjnej organizmu, potencjał tlenowy zostaje wykorzystany przeciwko własnym komórkom [16].

Reakcje różnych ligandów z odpowiednimi dla nich receptorami na powierzchni granulocytów uruchamiają różne enzymatyczne szlaki przenoszenia sygnałów, czego efektem końcowym jest uwalnianie reaktywnych form tlenu i chemiluminescencja. Wybuch tlenowy powoduje zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia, a kierunek i czas narastania tych zmian jest uzależniony od rodzaju zastosowanego stymulatora. Chemiluminescencję można wywołać drogą receptorową, zależną od stężenia jonów wapnia, poprzez zajęcie receptora chemotaktycznego (fMLP) lub receptora dla fragmentu Fc przeciwciała i dopełniacza (OZ), jak też drogą pozareceptorową, niezależną od Ca^{2+} (PMA). Czułość testu chemiluminescencji stosowanego do oceny aktywności neutrofilów jest największa, gdy jest on przeprowadzany z zestawem różnych stymulatorów; pozwala bowiem ocenić czy obniżona zdolność komórki do wybuchu tlenowego spowodowana jest brakiem receptora czy defektem szlaku transmisji dla określonego sygnału [17,18].

W niniejszej pracy wykazano, że wartości RFT u dzieci z genetycznie uwarunkowanym niedosłuchem są istotnie niższe niż w grupie dzieci z niedosłuchem o nieustalonej etiologii. Dotyczyło to produkcji RFT przez neutrofile niestymulowane oraz stymulowane receptorowo-zależnym stymulatorem fMLP. Obniżenie wartości produkcji RFT, podobnie jak ich podwyższenie, może być przyczyną szeregu nieprawidłowości i prowadzić do częstych, nawracających infekcji [10]. Wykazano, że stres oksydacyjny poprzez RFT odgrywa również istotną rolę w rozwoju uszkodzenia komórek słuchowych ucha wewnętrznego pod wpływem leków ototoksycznych [19], hałasu [20] i procesu starzenia [21]. Nie wykazano natomiast różnicy między podgrupami dzieci niedosłyszających w stosunku do produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile stymulowane innymi stymulatorami, jak OZ i PMA.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki świadczą o istniejących różnicach pomiędzy stanem układu mechanizmów naturalnej odporności immunologicznej w grupie dzieci z niedosłuchem uwarunkowanym genetycznie i dzieci z niedosłuchem o nieznannej etiologii, jednakże celem potwierdzenia tych spostrzeżeń konieczne jest prowadzenie dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Amati L, Seelicato F, Ranieri M, Megna M, Galantino M, Miniello S, Megna G, Jirillo E. Bridges between nervous and immune systems: their disconnection and clinical consequences. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28(4): 633-650.
2. Śliwińska-Kowalska M. Immunologia i immunopatologia ucha wewnętrznego. (w) *Audiologia Kliniczna*. Śliwińska-Kowalska M (red.). Mediton, Łódź 2005: 79-84.
3. Lisak RP, Benjamins JA, Bealmear B, Yao B, Land S, Nedelkoska L, Skundric D. Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for immune-related molecules by central nervous system mixed glial cell cultures. *Mult Scler* 2006; 12: 149-168.
4. Venail F, Gardiner Q, Mondain M. ENT and speech disorders in children with Down's syndrome: an overview of pathophysiology, clinical features, treatments, and current management. *Clin Pediatr (Phila)* 2004; 43(9): 783-791.
5. Iwai H, Lee S, Inaba M, Sugiura K, Baba S, Tomoda K, Yamashita T, Ikehara S. Correlation between accelerated presbycusis and decreased immune functions. *Experim Gerontol* 2003; 38: 319-325.
6. Sliwiska-Kowalska M, Pawelczyk M, Kowalski TJ. Genetic factors in susceptibility to age- and noise-related hearing loss. *Pol Merk Lek* 2006; 124: 384-388.
7. Schori H, Yoles E, Wheeler LA, Raveh T, Kimchi A, Schwartz M. Immune-related mechanisms participating in resistance and susceptibility to glutamate toxicity. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 557-564.
8. Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1999; 179(Suppl 2): 309-317.
9. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232: 3-14.
10. Lewkowicz P, Lauk-Puchała B, Banasik M, Górańska N, Tchórzowski H. Próba standaryzacji pomiaru chemiluninescencji krwi pełnej jako metody oceny funkcji ludzkich granulocytów w badaniach *in vitro*. *Diagn Lab* 1999; 35: 497.
11. Śmiechura M, Makowski A, Lewkowicz P, Tchórzowski H. Does the hearing loss affect the child's innate immunity? *Pol Merk Lek* 2006; 20(115): 62-64.
12. Niedzielska G. Głuchota wrodzona. (w) *Audiologia Kliniczna*. Śliwińska-Kowalska M (red.). Łódź, Mediton 2005: 353-359.
13. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srikumari Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJH, Sheffield VC. Identification of mutations in the Connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 1998; 11: 387-394.
14. Sliwiska-Kowalska M, Kotyło P, Borowiec M, Gajda-Szadkowska A, Kowalski ML. Występowanie mutacji 35delG w genie koneksyny 26 wśród dzieci głuchych i niedosłyszących oraz ich rodziców. *Otorynolaryngologia* 2003; 2(3): 126-132.
15. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. PWN, Warszawa 2004: 27-47.
16. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Głowacka E, Cedzyński M, Swierzek A, Lauk-Puchała B, Tchórzowski H. Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *Oral Patrol Med* 2003; 32(8): 475.
17. Jakubczak B, Wasik M, Popko K, Demkow U. Kinetics of calcium ion concentration accompanying signal transduction in neutrophils from children with increased susceptibility to infections. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57(Suppl 4): 131-137.
18. Fracka B, Jakubczak B, Kowalewska M, Gorska E, Wasik M, Roszkowska-Blaim M. Familial occurrence of granulocyte disorders in two children with recurrent otitis media. *Med Wieku Rozwoj* 2003; 7(2): 193-200.
19. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjee D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2006; ahead of print.
20. Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hua Hu B. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear & Hearing* 2006; 27: 1-19.
21. Riva C, Donadieu E, Magnan J, Lavieille JP. Age-related hearing loss in CD/1 mice is associated to ROS formation and HIF target proteins up-regulation in the cochlea. *Exp Gerontol* 2006; ahead of print.