

Ocena wyników leczenia głuchoty prelingwalnej za pomocą wszczepienia implantu ślimakowego w świetle funkcjonalnego polimorfizmu genów *MMP9* i *BDNF*

Outcome of congenital deafness treatment by cochlear implantation – focus on functional polymorphism of *MMP9* and *BDNF* genes

Monika Matusiak^{1A-G}, Dominika Oziębło^{2B-E}, Monika Ołdak^{2A-E},
Anita Obrycka^{3BF}, Leszek Kaczmarek^{4AE}, Henryk Skarżyński^{1BE}

¹ Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Klinika Oto-Ryńo-Laryngochirurgii, Warszawa/Kajetany

² Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Zakład Genetyki, Warszawa/Kajetany

³ Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Zakład Implantów Słuchowych, Warszawa/Kajetany

⁴ BRAINCITY, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Pracownia Neurobiologii, Warszawa

Wkład autorów:

- A Projekt badania
- B Gromadzenie danych
- C Analiza danych
- D Interpretacja danych
- E Przygotowanie pracy
- F Przegląd literatury
- G Gromadzenie funduszy

Streszczenie

Wprowadzenie: Wytypowanie i wprowadzenie do praktyki klinicznej badania biomarkerów neuroplastyczności u dzieci z głuchotą prelingwalną, leczonych za pomocą wszczepienia implantu ślimakowego pozwoliłoby na zidentyfikowanie pacjentów obarczonych ryzykiem niepowodzenia rehabilitacji słuchu i zoptymalizowanie postępowania terapeutycznego względem nich. W badaniu poddano weryfikacji hipotezę zakładającą, że nosicielstwo określonego zestawu wariantów w genach metaloproteazy macierzowej *MMP-9* i neurotrofiny *BDNF* predysponuje do lepszej odpowiedzi słuchowej na dostarczenie stymulacji zmysłowej, czyli wszczepienie implantu ślimakowego.

Materiał i metody: Retrospektywną analizą objęto grupę 121 pacjentów z obustronnym głębokim niedosłuchem czuciowo-nerwowym, którym wszczepiono implant ślimakowy przed ukończeniem 2 roku życia. Wykonano badania nosicielstwa wariantów funkcjonalnych o numerach: rs3918242 w genie *MMP9* oraz rs6265 w genie *BDNF*. Oceniono zależność pomiędzy nosicielstwem odpowiednich wariantów i rozwojem słuchowym po wszczepieniu implantu ślimakowego. Rozwój słuchowy oceniano testem LittlEARS 6-krotnie: przed aktywacją implantu, a potem w 1., 5., 9., 14., i 24. miesiącu po aktywacji implantu.

Wyniki: Analiza statystyczna wykazała istotne zależności pomiędzy rs3918242 *MMP9* i wynikiem LEAQ w 24. miesiącu po aktywacji implantu oraz pomiędzy rs6265 *BDNF* a wynikiem LEAQ w 5. miesiącu po aktywacji implantu. W podgrupie zaimplantowanej po 1. roku życia stwierdzono istotne statystycznie zależności pomiędzy rs3918242 *MMP9* i wynikiem LEAQ we wszystkich interwałach z wyjątkiem 14 miesięcy po aktywacji implantu. W podgrupie zaimplantowanej przed 1. rokiem życia nie zidentyfikowano istotnych statystycznie różnic w tempie rozwoju słuchowego pomiędzy nosicielami poszczególnych wariantów genów *MMP9* i *BDNF*.

Wnioski: Nosicielstwo genotypu C/C rs3918242 *MMP9* może predysponować do lepszej odpowiedzi słuchowej na dostarczenie stymulacji zmysłowej w 24 miesiące po aktywacji procesora mowy niż nosicielstwo genotypu C/T tego genu.

Słowa kluczowe: neuroplastyczność • *BDNF* • *MMP9* • implant ślimakowy

Abstract

Background: Identification of genetic biomarkers of neuroplasticity after deafness treatment with cochlear implantation (CI) in congenitally deaf children might improve their post-implantation management. This would allow to focus rehabilitation effort on children, who are at risk of spoken language development failure.

Material and methods: We carried out a retrospective cohort analysis investigating whether carrying certain variants in the genes encoding matrix metalloproteinase *MMP9* and neurotrophin *BDNF*, key players in synaptic plasticity, can be taken as prognostic marker of auditory development. In the analyzed group of 121 children we assessed the presence of genetic variants of rs3918242 of *MMP9* and rs6265 of *BDNF* and the results were associated with auditory development measurements with LittleEARS Questionnaire (LEAQ) before implant activation and at 1, 5, 9, 14 and 24 months after CI activation. All enrolled children were diagnosed with congenital deafness and unilaterally implanted before the age of 2 years.

Results: Statistical analysis showed significant association between *MMP9* rs3918242 and LEAQ scores at 24 months after CI activation and between *BDNF* rs6265 and LEAQ score at 5 months after CI activation. In the subgroup implanted after 1 year of life significant associations between *MMP9* rs3918242 and LEAQ scores were observed in all, but 14th month, follow up intervals. No significant associations were identified in the subgroup implanted before 1 year of life.

Conclusions: In summary, carriers of the C/C genotype rs3918242 *MMP9* may respond better to cochlear implantation, by reaching higher LEAQ scores, than carriers of the C/T genotype rs3918242 *MMP9*.

Key words: neuroplasticity • *BDNF* • *MMP9* • cochlear implant

Wprowadzenie

Głuchota wrodzona i jej leczenie

Głuchota wrodzona (inaczej głuchota prelingwalna – nabyta przed wykształceniem komunikacji werbalnej) jest stanem, w którym do neuronów drogi słuchowej intensywnie rozwijającego się dziecka nie docierają pobudzenia zmysłowe [1]. Długotrwały brak stymulacji sensorycznej wywala szereg molekularnych zmian degeneracyjnych w komórkach nerwowych, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania rozwoju funkcjonalnego kory słuchowej, braku rozwoju mowy oraz niezdolności dziecka do komunikowania się na drodze werbalnej [2–10]. Uniknięcie powyższych konsekwencji stało się możliwe dzięki zastosowaniu implantów ślimakowych, które od ponad 30 lat wykorzystywane są standardowo w terapii głuchoty wrodzonej [3,11]. Dzięki tej metodzie większość dzieci z głuchotą rozpoznaną w okresie noworodkowym i niemowlęcym rozwija zdolność komunikacji werbalnej w zakresie kompetencji słuchowych, a niejednokrotnie zrównuje się z prawidłowo słyszącymi rówieśnikami [12–16]. Jednak część zaimplantowanych dzieci, pomimo ich ogromnego wysiłku podczas rehabilitacji, jak również zaangażowania zespołu terapeutów, rozwija te umiejętności znacznie wolniej i nigdy nie osiąga satysfakcjonującego poziomu kompetencji słuchowych [12–16]. Doświadczenia ośrodków implantologicznych jednoznacznie wskazują, że wiek implantacji nie jest jedynym, choć niewątpliwie kluczowym czynnikiem prawidłowego rozwoju słuchowego najmłodszych implantowanych, u których nie stwierdzono dodatkowych obciążeń zdrowotnych [11,12,16–18]. Analiza aktualnego stanu wiedzy nie dostarcza informacji o badaniach potencjalnych biochemicznych lub genetycznych biomarkerów rozwoju słuchu u pacjentów z głuchotą wrodzoną, korzystających z implantu ślimakowego [3]. Istnieje więc uzasadniona potrzeba poszukiwania markerów, które umożliwią jak najwcześniejsze – jeszcze na etapie kwalifikacji do implantacji – zidentyfikowanie przyszłych użytkowników implantu ślimakowego, dla których prognoza wyników rehabilitacji słuchu jest gorsza, i zaopatrzenie ich w poszerzony, wieloczynnikowy program leczniczy.

Neuroplastyczność

Zdolność mózgu do interakcji ze środowiskiem zewnętrznym zdeterminowana jest indywidualnym zakresem aktywności neuronalnej oraz pulą pobudzeń zmysłowych docierających z otoczenia [3]. Stały dopływ bodźców stymuluje pobudliwość neuronalną i wzmacnia potencjał neuronów do tworzenia synaps. Zjawisko zmiany siły oddziaływań synaptycznych nosi nazwę plastyczności synaptycznej. Zostało ono opisane przez Jerzego Konorskiego – polskiego naukowca, pioniera badań nad zjawiskiem plastyczności neuronów, który swoje prace badawcze i doświadczenia prowadził w latach 1933–1973 w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie [19]. Zmiana siły połączeń neuronalnych regulowana jest kaskadowymi mechanizmami białkowymi zarówno w interakcjach pomiędzy neuronami, jak i między neuronami a macierzą zewnątrzkomórkową [20,21]. Badania ludzkiej kory mózgowej z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego dowodzą, że liczba synaps w korze słuchowej – pod wpływem regularnej stymulacji zmysłowej – dynamicznie rośnie do wieku ok. 4–5 lat. Równocześnie przyrostowi temu przeciwwstawia się proces usuwania „niewydolnych” synaps, który od okresu dorosłości zaczyna przeważać [22]. Podczas całego rozwoju osobniczego człowieka obydwa te procesy pozostają w swoistej dynamicznej równowadze, którą uznaje się za podstawę mocy obliczeniowej mózgu [3,21]. Zgodnie z danymi eksperymentalnymi oraz obserwacją kliniczną postuluje się istnienie tzw. okresów krytycznych w najwcześniejszych etapach rozwoju osobniczego, w czasie których w obecności odpowiedniej stymulacji zmysłowej neurony niejako konkurują ze sobą w poszukiwaniu partnera synaptycznego i zdolność do synaptogenezy istotnie wzrasta [3,10,20,21,23].

Neuroplastyczność po deprivacji słuchowej

Brak zdolności do odbioru wrażeń akustycznych przez narząd Cortiego powoduje, że kora słuchowa nie osiąga stanu wyspecjalizowania w zakresie swoich kompetencji zmysłowych [1,3,10]. Wyniki badań na zwierzętach wskazują, że w neuronach drogi słuchowej dochodzi do zmian molekularnych prowadzących do ich funkcjonalnej

niewydolności [3–10,23]. Wszczepienie implantu ślimakowego podczas trwania okresu wysokiej plastyczności umożliwia dostarczenie bodźców zmysłowych do zakończeń nerwu słuchowego i uruchomienie kaskady pobudzeń w komórkach nerwowych drogi słuchowej [10,23]. W efekcie, pod wpływem stałej stymulacji akustycznej docierającej przez implant ślimakowy, kora słuchowa może uzyskać odpowiedni stopień wyspecjalizowania, czyli osoba zaimplantowana może rozwijać poszczególne kompetencje słuchowe [3].

Podłoże molekularne neuroplastyczności synaptycznej

Stan dotychczasowej wiedzy o neuroplastyczności, na przykład w chorobach ośrodkowego układu nerwowego, oraz wyniki eksperymentów na zwierzętach pozwalają założyć, że istnieje molekularna regulacja siły oddziaływań pomiędzy neuronami w narządzie słuchu i równowagi człowieka [21,24–26]. Dynamika synaptyczna oparta jest na różnych procesach, w tym długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (ang. *long term potentiation*, LTP) i długotrwałym osłabieniu synaptycznym (ang. *long term depression*, LTD) i obydwa z nich są regulowane za pośrednictwem wieloenzymatycznych mechanizmów kaskadowych. W procesy te zaprzęgnięte są m.in. metaloproteazy macierzowe, a w szczególności metaloproteaza 9 (*MMP-9*), jak też i neurotrofina *BDNF* (ang. *brain derived neurotrophic factor*) [21,24–27]. *MMP-9* i *BDNF* odgrywają głównie rolę w modulacji wielkości i kształtu synaps pobudzających przez zmianę liczby receptorów AMPA w błonie postsynaptycznej [27–29]. Działanie *MMP-9* odbywa się poprzez cięcie proteolityczne białek adhezji komórkowej na synapsie, prekursorów neurotrofin (w tym *BDNF*), a być może także poprzez cięcie białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM) w tkance nerwowej [21,27,28,30]. *BDNF* jest czynnikiem o uznanej roli w plastyczności neuronalnej i, na poziomie klinicznym, potwierdzonym udziale w procesach poznawczych [25,26,29,31]. Na poziomie molekularnym jest kluczowym elementem regulacji LTP [26,29]. Występowanie wariantów genetycznych obydwu genów powoduje, iż ich produkty białkowe charakteryzują się różną siłą oddziaływania na synapsie. Zjawisko to nosi nazwę polimorfizmu funkcjonalnego. Rs3918242 *MMP9*, definiowany jest również jako –1562 C/T, oraz rs6265 *BDNF*, opisywany jest jako Val66Met [24,26,31]. Udowodniono, że nosiciele genotypu Val/Val *BDNF* wykazują wyższy potencjał do zmian plastycznych w korze ruchowej niż nosiciele genotypu Val/Met [32]. W przypadku *MMP9* substytucja C/T w pozycji –1562 regionu promotorowego wydaje się skutkować wyższą aktywnością transkrypcyjną genu [24]. Udowodniono, że nosiciele mniej aktywnego transkrypcyjnie genotypu C/C wykazują większą zdolność do patologicznej neuroplastyczności niż nosiciele genotypu C/T w populacji polskich pacjentów ze schizofrenią [24].

Biorąc pod uwagę dane wskazujące na udział *MMP-9* i *BDNF* w plastyczności synaptycznej, możliwe jest, że odgrywają one również istotną rolę w neuroplastyczności odpowiedzi na wszczepienie implantu ślimakowego w leczeniu głuchoty wrodzonej. Aby to ocenić, zaprojektowano badanie związku pomiędzy nosicielstwem wariantów funkcjonalnych genów *MMP9* i *BDNF* oraz wynikami badania

rozwoju słuchowego kwestionariuszem LittlEars Auditory Questionnaire (LEAQ) w grupie dzieci będących użytkownikami implantu ślimakowego.

Celem badania była weryfikacja założenia, że nosicielstwo określonej kombinacji wariantów genetycznych *MMP9* i *BDNF* predysponuje dzieci z głuchotą wrodzoną, korzystające regularnie z implantu ślimakowego, do lepszej odpowiedzi słuchowej na dostarczenie stymulacji zmysłowej.

Materiał i metoda

Projekt badania i uczestnicy

Analizowano wyniki badań pacjentów, których leczono w Instytucie Fizjologii i Patologii Słuchu w latach 2009–2017 za pomocą jednostronnego wszczepienia implantu ślimakowego. Kohortę objęta analizą retrospektywną utworzono według następujących kryteriów włączenia: wrodzona obustronna głuchota zdiagnozowana po urodzeniu, potwierdzona wynikami badania słuchowych potencjałów wywołanych pnia mózgu (ABR), aktywacja procesora mowy implantu przed ukończeniem 2. roku życia. Kryteria wyłączenia: współistniejące czynniki ryzyka opóźnionego rozwoju słuchowego, takie jak choroby przewlekłe, wcześniactwo, obciążony wywiad ciążyowy i okołoporodowy, np. przebiegiem infekcji wirusowych w ciąży. Badaną kohortę podzielono ze względu na wiek aktywacji procesora mowy. Wyodrębniono dwie grupy: dzieci, u których aktywowano implant przed 1. rokiem życia oraz dzieci, u których aktywowano implant po 1. roku życia. Badanie zostało zaprojektowane i przeprowadzone zgodnie z deklaracją Helsińską, protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Instytucie Fizjologii i Patologii Słuchu (nr IFPS:KB/13/2015). Rodzice lub opiekunowie prawni wszystkich uczestników udzielili zgody na udział dziecka w badaniu.

Ocena rozwoju słuchowego

Do oceny rozwoju słuchowego uczestników wykorzystano kwestionariusz LEAQ, rutynowo stosowany w ocenie tych procesów u bardzo małych dzieci [33]. Składa się on z 35 pytań, na które rodzice odpowiadają, wybierając jedną z dwóch odpowiedzi „tak” lub „nie”, wynik jest sumą odpowiedzi „tak”. LEAQ został zwalidowany w ponad 20 językach, również wśród dzieci użytkowników implantu ślimakowego [34–40]. Wszyscy uczestnicy zostali zbadani tym testem 6-krotnie: przed aktywacją procesora mowy, a potem: 1, 5, 9, 14 i 24 miesiące po jego aktywacji.

Genotypowanie

Próbki krwi pobrane podczas operacji wszczepienia implantów ślimakowych zostały umieszczone w próbkach Vacutainer zawierających EDTA (Franklin Lakes, NJ, USA). Wyzolowano genomowe DNA. Polimorfizm *MMP9* rs3918242 (NM_004994.2:c.-1590C>T) genotypowano przy użyciu metody PCR-RFLP. Region genomowy zawierający rs3918242 amplifikowano przy użyciu pary starterów: 5'GCCTGGCACATAGTAGGCC3' i 5'CTTCCTAGCCAGCCGGC3' (Oligo IBB PAN, Warsaw, Poland) w następujących warunkach: wstępna denaturacja w 95°C przez 5 min, 35 cykli

denaturacji w 94°C przez 35 s, przyłączanie starterów w 62°C przez 30 s i wydłużanie w 72°C przez 45 s, końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 min. Następnie 10 ul produktu PCR poddawano trawieniu przez noc z 10 jednostkami enzymu restrykcyjnego PaeI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w 37°C. Po trawieniu fragmenty DNA rozdzielano podczas elektroforezy w żelu agarozowym i wizualizowano przy użyciu DigiDoc-It Imaging System (UVP LCC, Upland, CA, USA). Allelowi zawierającemu wariant referencyjny C odpowiadał prążek DNA o wielkości 435 par zasad, a allel zawierający alternatywny wariant T były reprezentowane przez prążki DNA o wielkości 188 i 247 par zasad.

Polimorfizm *BDNF* rs6265 (NM_170735.5:c.196G>A) genotypowano przy użyciu zestawu ABI Custom TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i systemu *real time* PCR (Viia7, Thermo Fisher Scientific). W losowo wybranych próbkach wykonano sekwencjonowanie metodą Sangera celem potwierdzenia pełnej zgodności genotypowania przy zastosowaniu obu metod.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu Statistica 12 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Rozkład danych został zbadany testem Shapiro–Wilka. Zmienne ciągłe z rozkładem normalnym przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi, a te bez rozkładu normalnego zostały wyrażone jako mediana i rozstęp międzykwartylowy. Do porównania wyników LEAQ pomiędzy grupami w odpowiednich interwałach czasowych (przed aktywacją implantu, w 1., 5., 9., 14. i 24. miesiącu po aktywacji implantu) zastosowano test *U* Manna-Whitneya lub test *t*-Studenta.

Wyniki

Analizowana kohorta składała się z 53 dziewczynek (43,8%) i 68 chłopców (56,2%). Średni wiek aktywacji procesora mowy wynosił 13 miesięcy. Wszystkie dzieci reprezentowały rasę kaukaską, zostały zaimplantowane jednostronnie i korzystały z procesora mowy regularnie. Występowanie wariantów *MMP9* w badanej kohorcie było następujące: C/T – 39 (32,2%), C/C – 82 (67,8%), *BDNF* – Val/Val – 81 (66,9%), Val/Met – 39 (32,2%), Met/Met – 1 (0,9%).

Analiza asocjacji

W analizowanej grupie stwierdzono istotne statystycznie różnice w średnim wyniku badania kwestionariuszem LEAQ w 24. miesiącu po aktywacji implantu pomiędzy pacjentami z różnymi genotypami *MMP9* rs3918242 (średnia wyniku LEAQ dla wariantu C/C to 33,4, a dla wariantu C/T to 32,7) oraz w średnim wyniku badania kwestionariuszem LEAQ w 5. miesiącu po aktywacji implantu pomiędzy pacjentami z różnymi genotypami *BDNF* rs6265 (średnia wyniku LEAQ dla wariantu Val/Val to 19,8, a dla wariantu Val/Met to 22,5) (tabela 1).

Analogicznie stwierdzono istotne statystycznie różnice średnich wyników badania kwestionariuszem LEAQ pomiędzy

osobami z różnymi genotypami *MMP9* i *BDNF* w podgrupie, w której aktywowano implant ślimakowy po 1. roku życia. W przypadku wariantu rs3918242 *MMP9* pacjenci z genotypem C/C mieli istotnie statystycznie wyższy wynik badania kwestionariuszem LEAQ niż pacjenci z genotypem C/T przed aktywacją implantu (średnia wyniku LEAQ dla wariantu C/C to 10,4, a dla wariantu C/T to 4,5), w 1. miesiącu po aktywacji implantu (średnia wyniku badania kwestionariuszem LEAQ dla wariantu C/C to 14,6, a dla wariantu C/T to 7,7), w 5. miesiącu po aktywacji implantu (średnia wyniku badania kwestionariuszem LEAQ dla wariantu C/C to 22,8, a dla wariantu C/T to 16,7), w 9. miesiącu po aktywacji implantu (średnia wyniku badania kwestionariuszem LEAQ dla wariantu C/C to 28, a dla wariantu C/T to 21,8) oraz w 24. miesiącu po aktywacji implantu (średnia wyniku badania kwestionariuszem LEAQ dla wariantu C/C to 33,7, a dla wariantu C/T to 31,9). Dla pacjentów z różnymi genotypami *BDNF* rs6265 nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich wyników badania kwestionariuszem LEAQ w żadnym z badanych interwałów (tabela 2).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich wyników badania kwestionariuszem LEAQ pomiędzy osobami z różnymi genotypami *MMP9* i *BDNF* w podgrupie, w której aktywowano implant ślimakowy przed 1. rokiem życia (tabela 3).

Dyskusja

Obserwacja kliniczna wskazuje, że dzieci z głębokim niedosłuchem czuciowo-nerwowym, nawet jeśli zostaną zaimplantowane w zbliżonym przedziale wiekowym w okresie dużej plastyczności neuronalnej drogi słuchowej, będą rozwijać swoje umiejętności słuchowe w różnym tempie, a ich kompetencje mowne i słownikowe mogą się różnić, często nawet znacząco [2,3,11,12,15,16]. Zidentyfikowanie dzieci, których rokowania są gorsze, jeśli chodzi o wyniki czynnościowe implantacji ślimakowej, wyposażyłoby klinicystów w bardzo cenne narzędzie – pozwalające zoptymalizować terapię głuchoty wrodzonej. W naszym badaniu założyliśmy ocenę związku pomiędzy obecnością wariantów w genach *MMP9* i *BDNF* i wynikami leczenia głuchoty wrodzonej za pomocą implantacji ślimakowej. Aby stworzyć optymalne warunki do zidentyfikowania tego wpływu, przeprowadziliśmy retrospektywną obserwację dużej kohorty zaimplantowanych dzieci, u których wykluczono istnienie, poza głuchotą, znanych czynników ryzyka zaburzeń rozwoju słuchowego. Dzieci te zostały zaimplantowane przed ukończeniem 2. roku życia, w okresie dużej plastyczności drogi słuchowej, i objęte tym samym schematem rehabilitacji słuchu, a obserwacje rozwoju słuchowego przeprowadzono w 6 interwałach czasowych w ciągu 24 miesięcy po aktywacji implantu. Wszystkie dzieci były stałymi użytkownikami implantu ślimakowego. Ocenę wpływu wytypowanych wariantów genetycznych *MMP9* i *BDNF* przeprowadzono również w podgrupach wyodrębnionych ze względu na wiek implantacji.

Analiza wyników wskazuje na związek wariantu rs3918242 *MMP9* z wynikami rozwoju słuchowego oraz na znikomy wpływ wariantów *BDNF* na proces plastyczności. *BDNF* jest neurotrofiną o potwierdzonym wpływie na plastyczność synaptyczną w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych

Tabela 1. Różnice pomiędzy średnimi wynikami badania rozwoju słuchowego kwestionariuszem LEAQ w 6 interwałach (0–24 miesiące) w zależności od genotypów *MMP9* i *BDNF* w grupie badanej**Table 1.** Differences between the means of LEAQ scores measured at 6 follow-up intervals (0–24 months) depending on *MMP9* and *BDNF* genotypes in the study group

Interwały czasowe	<i>MMP9</i> rs3918242		<i>BDNF</i> rs6265	
	Średni wynik LEAQ (SD) C/C vs. C/T	p-value	Średni wynik LEAQ (SD) Val/Val vs. Val/Met	p-value
Przed aktywacją implantu	7,5 (8,6) / 3,7 (4)	0,07	5,1(6,2) / 8,7 (9,7)	0,07
1 miesiąc po aktywacji implantu	11,7 (7,5) / 9,2 (6,4)	0,09	10,1 (6,5) / 12,7 (8,4)	0,13
5 miesięcy po aktywacji implantu	21,2 (6,8) / 19,5 (6,5)	0,19	19,8 (6,6) / 22,5 (6,6)	0,04
9 miesięcy po aktywacji implantu	26,8 (5,5) / 25,1 (6,2)	0,17	25,7 (5,7) / 27,5 (5,9)	0,07
14 miesięcy po aktywacji implantu	31 (4,1) / 30,3 (4,1)	0,28	30,5 (4,3) / 31,4 (3,7)	0,31
24 miesiące po aktywacji implantu	33,4 (2,6) / 32,7 (2,9)	0,04	33,1 (3) / 33,4 (2,2)	0,78

Tabela 2. Różnice pomiędzy średnimi wynikami badania rozwoju słuchowego kwestionariuszem LEAQ w 6 interwałach (0–24 miesiące) w zależności od genotypów *MMP9* i *BDNF* w podgrupie pacjentów, w której aktywowano implant ślimakowy po 1. roku życia**Table 2.** Differences between the means of LEAQ scores measured at 6 follow-up intervals (0–24 months) depending on *MMP9* and *BDNF* genotypes in the subgroup with CI activation after 1 year of life

Interwały czasowe	<i>MMP9</i> rs3918242		<i>BDNF</i> rs6265	
	Średni wynik LEAQ (SD) C/C / C/T	p-value	Średni wynik LEAQ (SD) Val/Val / Val/Met	p-value
Przed aktywacją implantu	10,4 (9,6) / 4,5 (4,4)	0,05	6,6 (6,9) / 12,2 (10,7)	0,07
1 miesiąc po aktywacji implantu	14,6 (8) / 7,7 (6,9)	0,002	10,8 (7,5) / 15,8 (8,7)	0,02
5 miesięcy po aktywacji implantu	22,8 (6,5) / 16,7 (6,9)	0,004	20,2 (6,6) / 22,7 (7,6)	0,17
9 miesięcy po aktywacji implantu	28 (5,1) / 21,8 (7,3)	0,006	25,7 (5,9) / 27,3 (7)	0,28
14 miesięcy po aktywacji implantu	31,7 (3,5) / 29,2 (5,2)	0,14	30,7 (4,1) / 31,5 (4,2)	0,28
24 miesiące po aktywacji implantu	33,7 (1,9) / 31,9 (3,6)	0,01	33,2 (2,7) / 33,2 (2,4)	0,79

Tabela 3. Różnice pomiędzy średnimi wynikami badania rozwoju słuchowego kwestionariuszem LEAQ w 6 interwałach (0–24 miesiące) w zależności od genotypów *MMP9* i *BDNF* w podgrupie pacjentów, w której aktywowano implant ślimakowy przed 1. rokiem życia**Table 3.** Differences between the means of LEAQ scores measured at 6 follow-up intervals (0–24 months) depending on *MMP9* and *BDNF* genotypes in the subgroup with CI activation before 1 year of life

Interwały czasowe	<i>MMP9</i> rs3918242		<i>BDNF</i> rs6265	
	Średni wynik LEAQ (SD) C/C vs. C/T	p-value	Średni wynik LEAQ (SD) Val/Val vs. Val/Met	p-value
Przed aktywacją implantu	3,9 (5,5) / 3 (3,5)	0,72	3,8 (5,3) / 2,9 (3,3)	0,78
1 miesiąc po aktywacji implantu	8,2 (4,9) / 10,4 (5,8)	0,16	9,4 (5,4) / 7,8 (4,9)	0,28
5 miesięcy po aktywacji implantu	19,3 (6,8) / 21,8 (5,2)	0,12	19,5 (6,7) / 22,1 (4,7)	0,11
9 miesięcy po aktywacji implantu	25,4 (5,7) / 27,7 (3,7)	0,13	25,7 (5,5) / 27,7 (3,5)	0,36
14 miesięcy po aktywacji implantu	30,2 (4,6) / 31,1 (2,9)	0,85	30,3 (4,4) / 31,1 (2,8)	0,93
24 miesiące po aktywacji implantu	33,1 (3,4) / 33,4 (2)	0,53	33 (3,2) / 33,9 (1,8)	0,39

u ludzi, dlatego może budzić zdziwienie brak przesłanek odnośnie jej zaangażowania w neuroplastyczność w leczeniu głuchoty wrodzonej [25,26,29,31,32]. Niemniej z tego powodu w dyskusji skupimy się głównie na *MMP9*. W całej analizowanej grupie istnieje związek pomiędzy obecnością wariantu rs3918242 *MMP9* a wynikiem badania rozwoju słuchowego kwestionariuszem LEAQ po 24 miesiącach korzystania z procesora mowy implantu ślimakowego. Natomiast w grupie starszej, zaimplantowanej po 1. roku życia, związek wariantu rs3918242 *MMP9* z wynikami badania kwestionariuszem LEAQ jest silny w prawie wszystkich interwałach czasowych. Największe różnice w średnich wynikach LEAQ pomiędzy nosicielami wariantu C/C i C/T stwierdzono w 1., 5. i 9. miesiącu po aktywacji implantu – wynosiły one powyżej 6 punktów LEAQ (na korzyść nosicieli genotypu C/C), co może odpowiadać 8 miesiącom opóźnienia w rozwoju słuchowym [40,41]. Wyraźnie widoczny jest brak zależności rozwoju słuchowego od badanych polimorfizmów w grupie młodszej, co może być spowodowane szeregiem czynników. Wyniki te są spójne z wynikami analizy opisującej udział wariantów genetycznych rs3918242 *MMP9* i rs6265 *BDNF* w rozwoju słuchowym po wszczępieniu implantu ślimakowego w grupie dzieci, u których rozpoznana głuchota była wynikiem obecności patogennych wariantów w *locus* DFNB1 [42]. Obserwując rozwój słuchowy dzieci, którym wszczępieno implant ślimakowy poniżej 1. roku życia, widzimy, że jest on szybszy niż u dzieci implantowanych później, często bardziej dynamiczny niż u normalnie słyszących rówieśników, a wyniki słuchowe w tej grupie są bardziej spójne [12,16,18]. Wśród potencjalnych przyczyn tego zjawiska można wymienić na przykład udział innych czynników molekularnych regulujących zmiany plastyczne. Możliwe jest również, że wcześniejsza implantacja umożliwiła wyzwolenie fizjologicznych mechanizmów plastyczności, natomiast implantacja po 1. roku życia, poprzedzona dłuższym okresem deprywacji sensorycznej, uruchamia już inne czynniki, wśród nich np. *MMP-9*. Ta obserwacja może stanowić przesłankę do jak najwcześniejszej implantacji, aby doprowadzić pobudzenia akustyczne do drogi słuchowej w okresie jej maksymalnej plastyczności, kiedy szanse na uruchomienie potencjalnie bardziej prawidłowych mechanizmów molekularnej regulacji plastyczności wydają się najwyższe [14,15,43].

Przedstawiane przez nas wyniki należy odczytywać w kontekście udziału innych, poznanych czynników wpływających na wynik rehabilitacji słuchu po implantacji ślimakowej. Dane literaturowe wskazują, że najsilniejszym z nich jest wiek aktywacji procesora mowy implantu oraz współistnienie wad wrodzonych lub chorób przewlekłych [11,12,14,16]. Istotny wpływ ma również otoczenie dziecka, poziom motywacji rodziców lub opiekunów dziecka, ich wykształcenie oraz zaangażowanie [11]. Raporty Geers i wsp. oraz Ching i wsp. ujawniają, że również płeć dziecka istotnie wpływa na wynik rehabilitacji słuchu,

szczególnie w jej wczesnym okresie [44,45]. Ponadto doniesienia z ostatnich lat sugerują, że również etiologia głuchoty ma wpływ na wyniki implantowania. Eppsteiner i wsp. podają, że wyniki rehabilitacji słuchu u dzieci z patogennymi wariantami genów, których ekspresja i funkcja dotyczą głównie ucha wewnętrznego, są lepsze od wyników dzieci, u których występują patogenne warianty genów mających ekspresję w pozostałych częściach drogi słuchowej [46].

Nasze badanie nie jest pozbawione ograniczeń. Ocena ilościowa tak subtelnego procesu, jakim jest rozwój słuchowy dziecka, wymyka się aktualnie dostępnym narzędziom klinicznym. Kwestionariusze rodzicielskie, jak LEAQ, choć powszechnie stosowane, obarczone są błędem wynikającym z ich subiektywnego charakteru, co stanowi ich istotną słabość [12,18,34,35]. Ponadto w procesie rehabilitacji po wszczępieniu implantu trudno jest kontrolować wszystkie czynniki środowiskowe kształtujące rozwój słuchowy dziecka, w tym stopień zaangażowania w ten proces opiekunów osoby implantowanej [11]. W badaniu asocjacji wariantów genetycznych z wynikami behawioralnymi poszerzenie panelu polimorfizmów wniosłoby dodatkową wiedzę na temat zaangażowania białek *MMP-9* i *BDNF* w regulację plastyczności. W świetle naszych wyników nie można wytypować *MMP9* jako molekularnego biomarkera neuroplastyczności w obserwacji długoterminowej. W obliczu braku dostępnych obiektywnych metod badania rozwoju słuchowego u małych dzieci alternatywą jest wydłużenie obserwacji do czasu, kiedy możliwe byłoby wykonanie bardziej wiarygodnych badań u osób zaimplantowanych.

Podsumowanie

W niniejszej pracy wykazano, że obecność genotypu referencyjnego C/C rs3918242 w genie *MMP9* jest dobrym prognostycznym czynnikiem dla rozwoju słuchowego po aktywacji procesora mowy u dzieci bez dodatkowych obciążeń zdrowotnych, implantowanych po 1. roku życia. Dalsze próby badań nad molekularnym podłożem neuroplastyczności w narządzie słuchu i równowagi powinny zmierzać do definiowania kolejnych czynników regulujących potencjał neuronów do zmian plastycznych. W perspektywie, ustalenie nowej metody przewidywania skuteczności wszczępienia implantu ślimakowego do rehabilitacji słuchu pozwoliłoby na bardziej zindywidualizowaną, a dzięki temu skuteczniejszą interwencję terapeutyczną.

Finansowanie: M.M. – grant NCN UMO 2014/13/D/NZ5/03337. L.K. – BRAINCITY MAB/2018/10. Działanie „Centrum Doskonałości w Zakresie Neuroplastyczności i Chorób Mózgu BRAINCITY” jest finansowane w ramach programu Międzynarodowe Agendy Badawcze (MAB) Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego Unii Europejskiej.

Piśmiennictwo

1. Kral A, O'Donoghue GM. Profound deafness in childhood. *N Engl J Med*, 2010; 363: 1438–78.
2. Kral A. Auditory critical periods: a review from system's perspective. *Neuroscience*, 2013; 247: 117–33.
3. Kral A, Kronenberger WG, Pisoni DB, O'Donoghue GM. Neurocognitive factors in sensory restoration of early deafness: a connectome model. *Lancet Neurol*, 2016; 15(6): 610–21.

4. Kotak VC, Sanes DH. Deafferentiation weakens excitatory synapses in the developing central auditory system. *Eur J Neurosci*, 1997; 9(11): 2340–7.
5. Kral A, Tillein J, Heid R, Hartmann R, Klinke R. Postnatal cortical development in congenital auditory deprivation. *Cereb Cortex*, 2005; 15(5): 552–62.
6. Kral A, Hartmann R, Tillein J, Heid S, Klinke R. Congenital auditory deprivation reduces synaptic activity within the auditory cortex in a layer-specific manner. *Cereb Cortex*, 2000; 10(7): 714–26.
7. Tan J, Ruttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB i wsp. Tinnitus behaviour and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of *BDNF* and *Arg3.1* arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience*, 2007; 145(2): 715–26.
8. Tan J, Widjaja S, Xu J, Shepherd RK. Cochlear implants stimulate activity dependent CREB pathway in the deaf auditory cortex; implications for molecular plasticity induced by neural prosthetic devices. *Cereb Cortex*, 2008; 18(8): 1799–813.
9. Lee S-Y, Lee HS, Park M-H. Transcriptome analysis of deafness: intracellular signal transduction signalling pathways regulate neuroplastic changes in the auditory cortex. *Otol Neurotol*, 2010; 41(7): 986–996.
10. Kral A, Sharma A. Developmental neuroplasticity after cochlear implantation. *Trends Neurosci*, 2012; 35(2).
11. Niparko J, Tobey EA, Thal DJ, Eisenbrg LS, Wang NY, Quittner A i wsp. Spoken language development in children following cochlear implantation. *JAMA*, 2010; 303(15): 1498–506.
12. May-Mederake B, Kuehn H, Vogel A, Keilmann A, Bohnert A, Muller S i wsp. Evaluation of auditory development in infants and toddlers who received cochlear implants under the age of 24 months with the LittlEARS Auditory Questionnaire. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2010; 74: 1149–55.
13. Obrycka A, Lorens A, Piotrowska A, Skarżyński H. Ocena rozwoju słuchowego u dzieci z głębokim niedosłuchem, którym wszczepiono implant ślimakowy we wczesnym dzieciństwie. *Now Audiofonol*, 2014; 3(5): 59–65.
14. Leigh J, Dettman S, Dowell R, Briggs R. Communication development in children who receive a cochlear implant by 12 months of age. *Otol Neurotol*, 2013; 34(3): 443–50.
15. Houston DM, Stewart J, Moberly A, Hollich G, Miyamoto RT. Word learning in deaf children with cochlear implants: effects of early auditory experience. *Dev Sci*, 2012; 15: 448–61.
16. Vlastarakos PV, Proikas C, Papacharalampous G, Exadaktylou I, Mochloulis G, Nikolopoulos TP. Cochlear implantation under the first year of age – the outcomes. A critical systematic review and meta-analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2010; 74(2): 119–26.
17. Oziębło D, Obrycka A, Lorens A, Skarżyński H, Ołdak M. Cochlear implantation outcome in children with *DFNB1* locus pathogenic variants. *J Clin Med*, 2020; 15; 9(1): 228.
18. May-Mederake B. Early intervention and assessment of language and speech development in young children with cochlear implantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012; 76(7): 939–46.
19. Konorski J. Integrative Activity of the Brain. An Interdisciplinary Approach. Chicago: University Chicago Press; 1967, p 531.
20. Holtmaat A, Caroni P. Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nature Neurosci*, 2016; 19(12): 1553–62.
21. Reinhard SM, Razak K, Ethell I. A delicate balance: role of *MMP9* in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci*, 2015; 9: 280.
22. Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 1997; 387(2): 167–78.
23. Kral A, Dorman MF, Wilson BS. Neuronal development of hearing and language: cochlear implants and critical periods. *Ann Rev Neurosci*, 2019; 42: 47–65.
24. Rybakowski JK, Skibińska M, Kapelski P. Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (*MMP-9*) gene in schizophrenia. *Schizophr*, 2009; 109: 90–93.
25. Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ. Effect of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: *BDNF* as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol*, 2011; 22(5): 536–42.
26. Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF i wsp. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory – related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci*, 2003; 23(17): 6690–4.
27. Wang X, Bozdagi O, Nikitczuk JS, Zhai ZW, Zhou Q, Huntley GW. Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *PNAS USA*, 2008; 105(49): 19520–5.
28. Nagy V, Bozdagi O, Huntley GW. The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. *Learn Mem*, 2007; 14(10): 655–64.
29. Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions. *Psychiatry Clin Neurosci*, 2010; 64(4): 341–57.
30. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (*MMP-9*): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013; 48(3): 222–72.
31. Wilkość M, Szałkowska A, Skibińska M, Zajęc-Lamparska L i wsp. *BDNF* gene polymorphisms and haplotypes in relations to cognitive performance of healthy subjects. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2016; 76(1): 43–52.
32. Cheeran B, Talelli P, Mori F, Koch G, Suppa A, Edwards M, i wsp. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (*BDNF*) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol*, 2008; 586(23): 5717–25.
33. Weichbold V, Tsiakpini L, Coninx F, D’Haese P. Development of a parent questionnaire for assessment of auditory behaviour of infants up to two years of age. *Laryngorhinootologie*, 2005; 84: 328–34.
34. Obrycka A, Padilla Garcia JP, Pankowska A, Lorens A, Skarżyński H. Production and evaluation of a Polish version of the LittlEars questionnaire for the assessment of auditory development in infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009; 73: 1035–42.
35. Coninx F, Weichbold V, Tsiakpini L, Autrique E, Bescond G, Tamas L i wsp. Validation of the LittlEARS Auditory Questionnaire in children with normal hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009; 73: 1761–8.
36. Geal-Dor M, Jbarah R, Meilijson S, Adelman C, Levi H. The Hebrew and the Arabic version of the LittlEARS Auditory Questionnaire for the assessment of auditory development: Results in normal hearing children and children with cochlear implants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2011; 75: 1327–332.
37. Wanga L, Sun X, Liang W, Chen J, Zheng W. Validation of the Mandarin version of the LittlEARS Auditory Questionnaire. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2013; 77: 1350–4.

38. García Negro AS, Padilla García JL, Sainz Quevedo M. Production and evaluation of a Spanish version of the LittlEARS Auditory Questionnaire for the assessment of auditory development in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2016; 83: 99–103.
39. Obrycka A, Lorens A, Padilla JL, Piotrowska A, Skarzynski H. Validation of the LittlEARS Auditory Questionnaire in cochlear implanted infants and toddlers. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2017; 93: 107–16.
40. Obrycka A, Padilla Garcia JP, Pankowska A, Lorens A, Skarzynski H. Production and evaluation of a Polish version of the LittlEars questionnaire for the assessment of auditory development in infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009; 73(7): 1035–42.
41. Obrycka A, Lorens A, Piotrowska A, Skarżyński H. Wykorzystanie kwestionariusza LittlEARS do oceny skuteczności interwencji związanej ze stosowaniem implantu ślimakowego u małych dzieci z głębokim niedosłuchem. *Now Audiofonol*, 2014; 3: 52–58.
42. Matusiak M, Oziębło D, Obrycka A, Ołdak M, Kaczmarek L, Skarżyński P, Skarżyński H. Functional polymorphism of *MMP9* and *BDNF* as a potential biomarker of auditory plasticity in prelingual deafness treatment with cochlear implantation – a retrospective cohort analysis. *Trends Hear*, 2021; 25: 23312165211002140.
43. Levine D, Strother-Garcia K, Michnick-Glinkoff R, Hirsh-Pasek K. Language development in the first year of life: what deaf children might be missing before cochlear implantation. *Otol Neurotol*, 2016; 37(2): e56–62.
44. Geers A., Nicholas J., Sedey A. Language skills of children with early cochlear implantation. *Ear Hear*, 2003; 24: 46S–58.
45. Ching TYC, Dillon H, Marnane V, Hou S, Day J, Seeto M i wsp. Outcomes of early and late-identified children at 3 years of age: Findings from a prospective population based study. *Ear Hear*, 2013; 34(5): 535–52.
46. Eppsteiner RW, Shearer AE, Hilderbrand MS, DeLuca AP, Hahong J, Dunn CC i wsp. Prediction of cochlear implant performance by genetic mutation: the spiral ganglion hypothesis. *Hear*, 2012; 292(1–2): 51–8.