

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ-BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİMDALI**

**RİLUZOL TEDAVİSİNİN SİSPLATİNE BAĞLI
OLARAK GELİŞEN OTOTOKSİSİTEDEN
KORUNMADAKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Selin ÜSTÜN BEZGİN

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Kadir Kemal UYGUR**

**ANKARA
EKİM 2013**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ-BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİMDALI**

**RİLUZOL TEDAVİSİNİN SİSPLATİNE BAĞLI
OLARAK GELİŞEN OTOTOKSİSİTEDEN
KORUNMADAKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Selin ÜSTÜN BEZGİN

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Kadir Kemal UYGUR**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-11/2011-102 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
EKİM 2013**

T.C.
GAZİÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak

kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/09/2013

BAŞKAN

Prof. Dr. Yusuf Kemal KEMALOĞLU

Gazi Üniversitesi

ÜYE

Prof. Dr. Nebil GÖKSU

Gazi Üniversitesi

ÜYE

Prof. Dr. Kadir Kemal UYGUR

Gazi Üniversitesi

ÜYE

Prof. Dr. Alper CEYLAN

Gazi Üniversitesi

ÜYE

Doç. Dr. Mehmet Birol UĞUR

Gazi Üniversitesi

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin her safhasında büyük katkıları bulunan ve eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, başta tez hocam Sayın Prof. Dr. Kadir Kemal UYGUR olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Suat ÖZBİLEN, Prof. Dr. Erdoğan İNAL, Prof. Dr. Nebil GÖKSU, Prof. Dr. Fikret İLERİ, Prof. Dr. Ahmet KÖYBAŞIOĞLU, Prof. Dr. İsmet BAYRAMOĞLU, Prof. Dr. Yusuf KEMALOĞLU, Prof. Dr. Sabri USLU, Prof. Dr. Metin YILMAZ, Prof. Dr. Alper CEYLAN, Doç. Dr. Yusuf KIZIL, Doç. Dr. Utku AYDİL, Uzm. Dr. Hakan TUTAR ve kliniğimizin kurucusu Sayın Prof. Dr. Necmettin AKYILDIZ'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca bu çalışmada büyük emekleri geçen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Çiğdem ELMAS, Dr. Güleser GÖKTAŞ, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Özlem GÜLBAHAR ve Odyoloji Bilim Dalı'ndan Dr. Çağır GÖKDOĞAN'a yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık sürecimi birlikte tecrübe ettiğim ve çalışmaktan onur duyduğum asistan doktor arkadaşlarım Dr. Derya GİRĞİN, Dr. Hosseinali JAFARİ, Dr. Tolgahan ÇATLI, Dr. Ozan GÖKDOĞAN, Dr. Recep KARAMERT, Dr. Raşit CEVİZCİ, Dr. Mehmet DÜZLÜ, Dr. Emine KÖRKUYU, Dr. Veysel Akif SAVAŞ, Dr. Süleyman CEBECİ, Dr. Ayça ANT, Dr. Osman Tuğrul GÜZELDİR, Dr. Mustafa ÇELİK, Dr. Alper DİLCİ, Dr. Furkan KARALOĞLU, Dr. Faruk Kadri BAKKAL ve Dr. Aynur VALİYEVA, Dr. Melih ŞAHİN, Dr. Vildan BAŞTÜRK TUTAR, Dr. Mustafa ÇOLAK, Dr. Cihat ERAVCI, Dr. Ekrem ZORLU'ya, ayrıca tüm KBB klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Vet. Hek. Dr. Şeyda Diker, Vet. Hek. Dr. Elif ERGÜVEN KAYA, Vet. Hek. Dr. Elvan ANADOL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca sevgisi ve desteği ile daima yanımda olan sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Özgür BEZGİN'e ve yaşamım şekillenirken banaverdikleri sevgi ve emeklerden ötürü annem Mehpere ÜSTÜN, babam Fahrettin Faruk ÜSTÜN ve kardeşim Gülin ÜSTÜN'e teşekkür ederim.

Selin ÜSTÜN BEZGİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. İç Kulak Gelişimi	4
2.1.1. İşitme organının gelişmesi	5
2.2. İç Kulak Anatomisi	7
2.2.1. Kohlea	9
2.3. Santral İşitme Yolları	22
2.4. İşitme Fizyolojisi	27
2.6. Ototoksisite	36
2.6.1 Sisplatin Ototoksisitesi	38
2.6.1.1. Klinik özellikleri	38
2.6.1.2. Risk faktörleri	39
2.6.1.3. Genetik predispozisyon	39
2.6.1.4. Sisplatin ototoksisite mekanizmaları	40
2.6.1.5. Kohlear morfolojik etkiler	42
2.6.1.6. Ototoksisite sınıflandırması	44
2.7. Ototoksisite Monitorizasyonu	47
2.8. Riluzol	50
2.9. Kobay	52
2.9.1 Kobay Temporal Kemik Anatomisi	53
2.9.2. Kobayda İşitsel Beyin Sapı Cevapları	55
3.MATERYAL VE METHOD	57
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	57
3.2. Anestezi	58

3.3. Odyolojik İnceleme	59
3.4. Cerrahi Uygulama	60
3.5. Biyokimyasal İnceleme	61
3.6. Transmisyon Elektromikroskopik İnceleme	61
3.7. İstatiksel Değerlendirme	62
4. BULGULAR	63
4.1 İşitsel Beyin Sapı Cevapları (İBC)	63
4.2 Transmisyon Elektromikroskopik İnceleme Bulguları	74
4.3. Biyokimyasal Bulgular	84
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ	105
7. KAYNAKLAR	107
8. ÖZET	130
9. ABSTRACT	132
10. ETİK KURUL ONAYI	134
11. ÖZGEÇMİŞ	135

KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik asid
ATP	: Adenozin trifosfat
ATP az	: Adenozin trifosfataz
İTH	: İç tüylü hücre
DTH	: Dış tüylü hücre
İAK	: İnternal akustik kanal
SOK	: Süperior Olivary Kompleks
MSO	: Süperior olive medial çekirdeği
LSO	: Süperior olive lateral çekirdeği
İK	: İnférieur kollikulus
İBC	: İşitsel beyin sapı cevabı
dB	: Desibel
Hz	: Hertz
HL	: Hearing Level
OAE	: Otoakustik emisyon
TEOAE	: Transient evoked otoakustik emisyon
DPOAE	: Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon
TPMT	: Tiopürin S- metiltransferaz
COMT	: Katekol O- metiltransferaz
ERCC	: Exicision repair cross- complementation
GST	: Glutatyon S- transferaz
ROÜ	: Reaktif oksijen ürünü
TRPV- 1	: Transient reseptör potansiyel vanilloid- 1
JNK- 1	: c-Jun N-terminal kinaz- 1

iNOS	: Nitrik oksid sentaz
NF- kb	: Nükleer faktör- kb
YFO	: Yüksek frekans odyometri
NO	: Nitrik oksid
TEM	: Transmisyon elektronmikroskopi
NMDA	: N-metil-D-aspartat
AMPA	: Alfa amino-3-hidroksil-5metil-4-izoksol-propionik asid
GSH	: Glutatyon
MDA	: Malandialdehid
SOD	: Süperoksid dismutaz
GSH- 1	: Glutamat trasporter- 1
HSP	: Isı şok protein
HSF-1	: Isı şok faktörü- 1
HO	: Hem oksijenaz
DMSO	: Dimetil sulfoksid
TEM	: Transmisyon elektronmikroskopi
KIM- 1	: Böbrek hasar molekülü- 1
NRF2	: Nükleer faktör eritroid 2- ilişkili faktör
mg / kg	: miligram / kilogram
ip	: intraperitoneal
sc	: subkutanöz
cc	: santimetreküp
mmol	: milimol
μ	: mikron
mV	: milivolt

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 2.1. Chang ve Brock Evrelemesi	45
Tablo 4.1. İlaç öncesi ve sonrası 1., 2., ve 3. gruplara ait minimum ve maximum İBC eşik değerleri ve ortancalar	63
Tablo 4.2. İlaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	64
Tablo 4.3. İlaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	64
Tablo 4.4. 1. ve 2. gruplarının ilaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması	66
Tablo 4.5. 1. ve 2. grupların ilaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması	66
Tablo 4.6. 1. ve 3. gruplarının ilaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması	67
Tablo 4.7. 1. ve 3. grupların ilaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması	67
Tablo 4.8. 2. ve 3. gruplarının ilaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması	68
Tablo 4.9. 2. ve 3. grupların ilaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması	68
Tablo 4.10. Click uyaranda ilaç öncesi ve sonrası İBC eşik değerleri arasındaki değişimin gruplar arası karşılaştırılması	69
Tablo 4.11. 8 kHz tone burst uyaranda ilaç öncesi ve sonrası İBC eşik değerleri arasındaki değişimin gruplar arası karşılaştırılması	69
Tablo 4.12. 1. ve 2. grupların eşik değişimlerinin karşılaştırılması	71
Tablo 4.13. 1. ve 3. grupların eşik değişimlerinin karşılaştırılması	71
Tablo 4.14. 2. ve 3. grupların eşik değişimlerinin karşılaştırılması	71
Tablo 4.15. İç tüy hücresi ve dış tüy hücresi dejenerasyon skorlaması	83
Tablo 4.16. Stria vaskularis dejenerasyon skorlaması	83
Tablo 4.17. İşitsel sinir lifleri dejenerasyon skorlaması	84
Tablo 4.18. Kohlea dokusunda ölçülen MDA değerlerinin karşılaştırılması	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Membranöz labirent	8
Şekil 2.2.	Modiolar eksende ikiye kesilmiş sağ kohlea	10
Şekil 2.4.	Stria Vaskularis	12
Şekil 2.5.	Kohleanın radial kesiti	13
Şekil 2.6.	Corti organına kesitsel bakış	14
Şekil 2.7.	Dış tüylü hücre	17
Şekil 2.8.	İç tüylü hücre	18
Şekil 2.9.	İnsan kohleası damarlanması	20
Şekil 2.10.	Kokleanın frekanslara göre tonotropik organizasyonu	33

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 4.1. İlaç öncesi ve sonrasındaki tone burst uyaranda İBC eşikleri.	65
Grafik 4.2. İlaç öncesi ve sonrasındaki click uyaranda İBC eşikleri.	65
Grafik 4.3. İlaç uygulaması sonrası gruplarda meydana gelen eşik değişimleri.	70

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Resim 2.1. Chang ve Brock evreleri	46
Resim 2.2. Genç- erişkin kobay	52
Resim 2.3. Kobay ve ratlarda kafatası	55
Resim 2.4. Kobay kohleası membranöz labirenti	55
Resim 2.5. Kobay İşitsel beyin sapı cevapları	56
Resim 3.1. Kobayda elektrotların yerleştirilmesi	60
Resim 4.1. R65 kodlu kobaya ait ilaç öncesi 8 kHz tone burst uyaranda sağ kulak İBC görüntüsü	72
Resim 4.2. R65 kodlu kobaya ait ilaç öncesi 8 kHz tone burst uyaranda sol kulak İBC görüntüsü	72
Resim 4.3. R65 kodlu kobaya ait ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyaranda sağ kulak İBC görüntüsü	73
Resim 4.4. R65 kodlu kobaya ait ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyaranda sol kulak İBC görüntüsü	73
Resim 4.5. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında dış tüy hücresi	75
Resim 4.6. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında iç tüy hücresi	75
Resim 4.7. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında stria vaskülaris	76
Resim 4.8. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında işitsel sinir lifleri	76
Resim 4.9. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında dış tüy hücresi	78
Resim 4.10. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında iç tüy hücresi	78
Resim 4.11. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında stria vascularis	79
Resim 4.12. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında işitsel sinir lifleri	79
Resim 4.13. R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında dış tüy hücresi	80

Resim 4.14.	R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında iç tüy hücresi	81
Resim 4.15.	R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında stria vascularis	81
Resim 4.16.	R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında işitsel sinir lifleri	82

1. GİRİŞ

Sisplatin (cisdiaminodikloroplatinum), birçok yumuşak doku neoplazmlarında etkili, yaygın kullanımı olan birinci jenerasyon platinum içeren bir kemateropatik ajandır. Germ hücreli tümör, nasofarengeal karsinom, akciğer kanseri, over kanseri, endometriyum kanseri, testis kanseri ve özellikle baş ve boyun kanserleri tedavi protokollerinde sıkça yer almaktadır. Kullanımı sırasında nörotoksisite, nefrotoksisite, ototoksisite, kemik iliği baskılanması, gastrointestinal toksisite gibi yan etkilerle karşılaşılabilir. Bunlar içinde, ototoksisite ve/veya nefrotoksisite doz kısıtlamasına ya da atlanmasına neden olabilen yan etkilerdendir (1-8).

Sisplatine bağlı oluşan ototoksisite sensörinöral işitme kaybı şeklinde açığa çıkmaktadır. Sisplatin tedavisi alan hastalarda %93'ü bulan oranlarda progresif ve geri dönüşümsüz işitme kaybı gelişebilmektedir (9). Bazı hastalarda ilk olarak çınlama ile kendini gösterebilen ototoksisite; sıklıkla doz bağımlı, kümülatif, bilateral ve genellikle kalıcı işitme kaybı şeklinde olmaktadır. Öncelikle işitme azlığı yüksek frekanslarda kayıp ile karakterize olup ilerleyici olabilmekte, konuşmayı farketmede etkili frekanslarda da bozulmalara yol açabilmektedir (10, 11).

İlacın uygulanan kümülatif dozu ve uygulanış şekli, erken veya ileri yaş, renal yetmezlik, önceden var olan işitme kaybı ve yüksek ses maruziyeti, kohlear bölgeye alınan radyasyon sisplatinin ototoksisite gelişme olasılığını arttırabilen faktörlerdendir (11-14).

Ototoksik yan etkinin, sisplatinin DNA'ya bağlanarak apoptozise neden olması ve inflamatuvar kaskad yolağını aktive ederek hücrede oksidatif stres

oluřturması ile gerçekleřtięi dűřűnűlmektedir (15). Oksidatif stres ile oluřan reaktif oksijen űrűnleri, kohlear dokularda koruyucu antioksidan molekűlleri tűketirken, lipid peroksidasyonuna olanak saęlayarak malandialdehid, aldehid, toksik lipid peroksidaz seviyelerini yűkseltmektedirler (16). Kalsiyumun hűcre içine akıřını da arttırıp kohlear hűcrelerde apoptozis geliřimine yol açarlar (16-18). Corti organında bulunan tűylű hűcreler, spiral ganglion hűcreleri ve lateral duvar (stria vaskűlaris ve spiral ligament), hűcre hasar mekanizmalarından esas olarak etkilenen hedef bűlgeler olarak bilinmektedir (15).

Klasik olarak sisplatin ototoksitesisi geliřiminde platinyum – DNA űrűnlerinin veya reaktif oksijen űrűnlerinin bařlattıęı apoptozis mekanizmalarından bahsedilse de sisplatine baęlı ototoksiste patofizyolojisi hala tam olarak aydınlatılabilmis deęildir. Olası mekanizmaları saptama ve koruyucu olabilecek ajanları arařtırma amaçlı literatűrde prelinik ve klinik birçok çalıřmaya rastlanmaktadır. Antioksidanlar (19-27), antiinflamatuvarlar (28-32), kaspaz inhibitűrleri (33), antiapoptotik ajanlar (34), kalsiyum kanal blokerleri (35) alıřmalarda potansiyel koruyucu etkileri açısından arařtırılmıřtır. Ancak halen bu konuda yararlanılabılır, rutin kullanıma girmiř bir ajan ortaya sunulamamıřtır.

Riluzol (2-amino-6-triflorometoksibenzotiol), literatűrde daha çok antiglutamat etkinlięi ve eksitatuvar mekanizma űzerine olan inhibitűr etkisiyle bilinmekle beraber antiapoptotik, antiiskemik, sedatif, antiepileptik űzellikleri de belirtilmiř bir ajandır (36-39). Nűroprotektif etkinlięi ile Amerikan gıda ve ilaç kurumu (FDA) tarafından amniotrofik lateral skleroz hastalıęının ileri gidiřini yavařlatma amaçlı onay alan tek ilaç olarak kabul edilmiřtir (40). Nűroprotektif ve antiapoptotik etki mekanizması kesin olarak açıklanamamıř olan bu ajanın

Na⁺ kanalları ile yüksek voltaj kapılı N tipi ve P/Q tipi Ca⁺⁺ kanalları üzerinde blokasyon ve K⁺ kanallarında aktivasyon etkisi bulunmaktadır (41-44). Kalsiyum kanalları üzerine blokasyon etkisiyle presinaptik nörotransmitter salınımını kontrol etmekte olduğu bilinen riluzolun, presinaptik terminallerde hücre membran depolarizasyonunda önemli görevi olan glutamat salınımı ve glutamata bağlı lipid peroksidasyonu üzerinde etkili olarak hücre ölümüne gidişi önlediği düşünülmektedir. Na⁺ kanal blokasyonu yapan ajanların spinal kord hasarlı deney hayvan modellerinde nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalar vardır (45-47). Riluzolun nöroprotektif etkisinin Na⁺ kanalları veya glutamat veya herikisi üzerine etkisi ile olabileceği de düşünülmektedir (48-50). Endolenfatik hidrops ve akustik travmalı deney hayvan modellerinde riluzolün işitmeyi koruyucu etkisi elektrofizyolojik testler ve kohlear histopatolojik incelemelerle ortaya konmuştur (51-54).

Günümüzde kanser tedavisi klinik uygulamasında en sık kullanılan ilaçlardan biri olan sisplatinin kanser tedavi edici özelliğine zarar vermeden, ototoksik etkisini azaltacak veya önleyecek; *invitro*, *invivo* ve klinik çalışmalarla desteklenecek ve rutin kullanıma girebilecek bir ajanın ortaya konmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu amaçla çalışmamızda, kobaylara sisplatin ile eş zamanlı olarak verilen riluzolun ototoksisite üzerindeki koruyucu etkisi işitsel beyin sapı cevapları, kohlear elektromikroskopik inceleme ve doku örneklerindeki biyokimyasal ölçümler ile ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İç Kulak Gelişimi

İşitme ve dengenin periferik organı olan kulak, temporal kemik içine yerleşmiş, görevleri ve yapıları birbirinden farklı üç yapıdan oluşur.

1. Dış kulak
2. Orta kulak
3. İç kulak

Dış, orta ve iç kulağın embriyolojik gelişimi, üç ayrı yerden ve üç ayrı germ yaprağından olur. Dış kulak yolu ve orta kulak üst solunum ve sindirim sisteminin geliştiği brankial yarık ve ceplerden gelişirken, iç kulak beyinde rhombencephalonun her iki yanındaki ektodermden gelişir. Dış kulak birinci brankial yarıktan, orta kulak ise birinci brankial cepten gelişir. Bu nedenle iç kulak gelişme bozuklukları ile dış ve orta kulak gelişme bozuklukları birbirinden ayrı durumlardır (55).

İç kulak beyin dokusu gibi ektodermden geliştiği için damarlanması ve gelişmesi beyin gelişmesi ile birlikte düşünülmelidir. Yaşın ilerlemesiyle sıklığı artan ve intrakraniyal mikrosirkülasyonu bozan pek çok hastalık iç kulağı da etkiler. Konjenital ya da nörolojik hastalıklar sensörinöral işitme kayıpları ile birlikte seyredebilir.

İç kulak diğer bölümlerden daha erken gelişmeye başlayan kısımdır. Dördüncü hafta başında yüzey ektodermin kalınlaşması sonucu **otik plak** oluşur. Notokord ve paraksiyal mezodermden gelen uyarıcı etkilerle yüzeyel ektodermden otik plak oluşumu sağlanır. İki otik plak yüzey ektodermden hemen içe kıvrım yapar ve altındaki mezenşimin derinlerine girer. Böylece **otik çukur**

oluşur. Yüzey ektoderm ile bağlantısını kaybeden otik keseden oluşan bir divertikül gelişip endolenfatik kanal ve kesesini oluşturmak üzere uzar. Bu durumda otik kesenin iki bölgesi tanımlanabilir (56):

1. Endolenfatik kanal, utrikül ve yarım daire kanallarının geliştiği **arka utriküler bölüm**
2. Spiral organın (Corti) içinde bulunduğu kohlear kanal ve sakkulusu oluşturan **ön sakküler bölüm**

2.1.1. İşitme organının gelişmesi

Kohlear kanal altıncı haftada gelişmeye başlar. Sakkulusun alt ucunda tubuler divertikül yapısında kohlear kanal gelişir ve membranöz kohleayı oluşturmak için spiral biçiminde kıvrılır. Yedinci haftada kohleanın birinci turu oluşmuş ve sekizinci haftanın sonunda $2 + \frac{1}{2}$ tur tamamlanmış olur. Bu sırada kohlea ile sakkulusun geri kalan kısmı arasındaki “**ductus reuniens**” adı verilen bağlantı oluşur. Spiral organ kohlear kanal duvarındaki hücrelerden farklılaşır. Sekizinci kranial sinirin ganglion hücreleri membranöz kohlea kıvrımları boyunca göç ederler ve **spiral gangliyonu** oluştururlar (kohlear gangliyon). Sinir uzantıları bu gangliyondan tüylü hücrelerde sonlanan spiral organa uzanırlar. Spiral gangliondaki bu hücreler embriyonik bipolar yapısını korurlar (56).

Beşinci haftanın ortasında otik kesenin uyarıcı etkileri, otik kese etrafındaki mezenşimin yoğunlaşp **kıkırdak otik kapsüle** dönüşmesini sağlar. Altıncı haftanın başında yoğunlaşma tamamlanır. Endolenfatik kanal bölgesinde yoğunlaşma olmaz. İç kulak yoluna rastlayan küçük bir bölge de yumuşak kalır; buradan ikinci kranial sinir geçecektir. Yoğunlaşan mezenşimal doku değişir, yedinci haftada prekartilaj farklılaşır ve birkaç gün sonra gerçek kıkırdak dokusu

oluşur. Kıkırdagımsı otik kapsül iç kulağın kemik labirentini oluşturmak üzere kemikleşir.

Kıkırdak yapı gevşek olduğu için membranöz labirentin gelişmesini engellemez. Membranöz labirent genişledikçe kıkırdak otik kapsülde vakuoller belirir ve bunlar daha sonra birleşip **perilenfatik aralığı** oluşturur. Böylece membranöz labirent perilenf (perilenfatik aralıktaki sıvı) üstünde yer alır. Kohlea kanalı ile ilişkili perilenfatik aralık iki bölümde gelişir: **skala timpani** ve **skala vestibüli**. Skalalar önce yuvarlak pencerede (skala vestibüli), daha sonra oval pencerede (skala timpani) ortaya çıkar. Skalalar birbirine zıt olarak basiller menbranın her iki tarafında gelişmeye başlarlar. Daha sonra kohlear kanalın skala vestibüliye bakan tarafında **membrana vestibularis (Reissner zarı)**, skala timpaniye bakan tarafında ise **membrana basilaris** oluşur. Kohlear kanalın dış yan duvarı ile otik vezikülü çevreleyen mezenkim dokusundan gelişen kıkırdak otik kapsül taslağı arasında kalan mezenşim dokusundan **spiral kohlear ligament** gelişir. Kohleanın iç ucundaki otik vezikülün içerisinde kalan mezenşimden kıkırdak **modiolus** gelişir ve çevrede oluşan kıkırdak otik kapsül ile birleşir (56).

Corti organının gelişmesi bazal turdan apekse doğru olur. Corti organı kohlear kanalın duvarındaki hücrelerden gelişir. Kohleanın epiteli başlangıçta her yerde aynı olup, daha sonra membrana basilarisin epitelinde farklılaşma oluşur ve dış ve iç kristalar ortaya çıkar. İç krista kohleanın merkezindedir, sonradan **limbus spiralis**i yapar. Dış kristadan ise dış ve iç hücre sütunları farklılaşır. İç sütun bir sıra epitel hücresinden meydana gelmiştir. İç sütunun gelişmesi ile **iç sulkus** oluşur. Dışta kalan 3-4 sıra epitel hücresinden **Corti organı** gelişir. Her iki sütun hücrelerinden pelte biçiminde sıvı salgılanır ve **tektorial membranı** meydana getirir.

Yirmiikinci haftada iç titretilü tüylü hücreler, dış titretilü tüylü hücreler, destek hücreleri ve Hensen hücreleri meydana çıkar. **Stria vaskülaris**, sekizinci haftada gelişmeye başlar ve yirminci haftada gelişmesini tamamlar.

Otik plağın içe çökmesi sırasında oluşan nöral oluşun her iki tarafında akustikofasial tümsek ortaya çıkar. Akustikofasial ganglionu oluşturacak bu bölge, üst ve alt diye ikiye ayrılır; üstte bulunan kısımdan n. vestibülaris superior, altta bulunan kısımdan ise n. vestibülaris inferior doğar. Sekizinci kranial sinirin alt kısmı kalınlaşarak **kohlear siniri** meydana getirir.

İç kulak erişkin boyut ve şekline fetal dönemin ortalarında (20- 22. hafta) ulaşır (56).

2.2. İç Kulak Anatomisi

İç kulak petröz kemiğin derinliklerine yerleşmiştir. İşitme ve denge organlarını barındırır. Yuvarlak ve oval pencereler yoluyla orta kulak, kohlear ve vestibüler akuaduktuslar yoluyla da kafa içi ile bağlantılıdır. **Kemik labirent** ve **membranöz labirent** olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kemik kısmın çevresinde **otik kapsül** bulunur. Otik kapsül vücudun en sert kemiğidir.

İç kulak morfolojisinin anlaşılması yönelik çalışmalar, 1851’de *Alphonso Corti* ile başlamış ve *Corti*’den sonra *Reissner*, *Deiters*, *Bottcher*, *Claudius*, *Hensen* ve *Retzius* çalışmalarıyla kohleanın çizimlerini yapmışlar ve iç kulak yapıları hakkında günümüzde kabul gören ayrıntıları ortaya koymuşlardır. *Retzius*’un çizimleri bugünkü mikroskopik çizimlerle hemen hemen aynıdır (55).

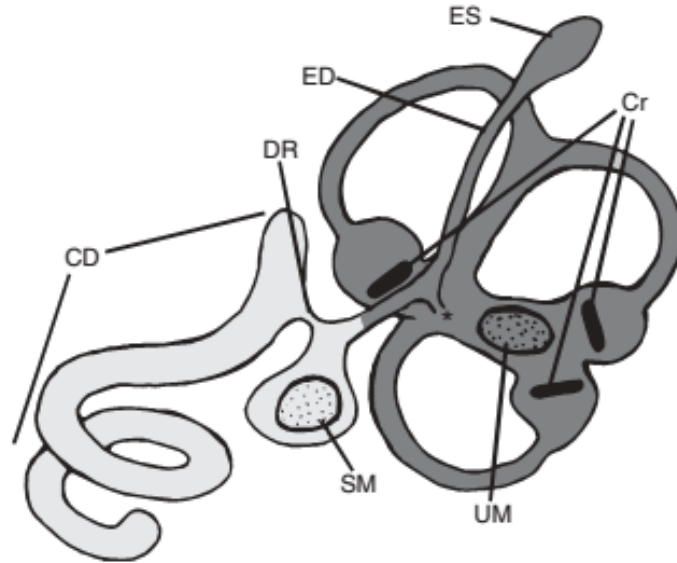
Kemik labirent üç parçadan oluşur:

1. Ön labirent (koklea)
2. Vestibül

3. Arka labirent (yarım daire kanalları)

Membranöz labirentin kemik labirenti aynen tekrar etmekte olduğu Şekil 2.1’de gösterilmektedir. Ancak zar yapılar kemik labirenti tamamen doldurmaz. Onun ancak 1/3’lük kısmını işgal eder. Membranöz labirent endolenfatik sıvı içerir. Bu intrasellüler sıvı içeriğine benzemektedir, yani K^+ konsantrasyonu yüksek, Na^+ konsantrasyonu düşüktür. Membranöz ve kemik labirentler arasında sodyumdan zengin perilenfatik sıvı bulunur (55, 57, 58). Membranöz labirent üç yapı içerir:

1. Kohlea
2. Vestibülde yer alan iki otolit organı
3. Arka labirentteki 3 yarım daire kanalı

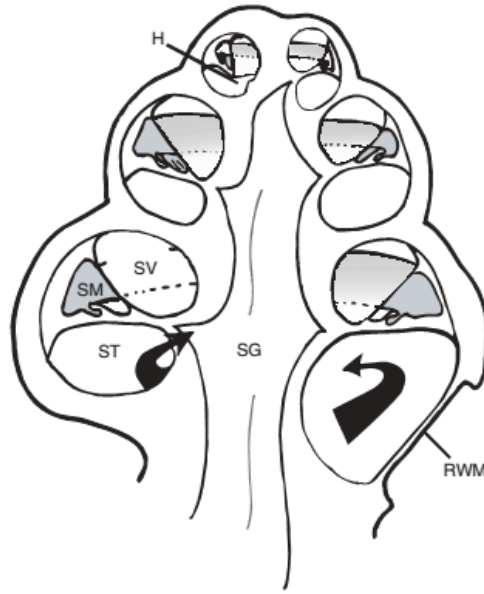


Şekil 2.1. Membranöz labirent, CD: kohlear kanal, DR: duktus reuniens, SM: sakuler makula, UM: utrikuler makula, ED: endolenfatik kanal, ES: endolenfatik kese, Cr: yarım daire kanallarının kristalları

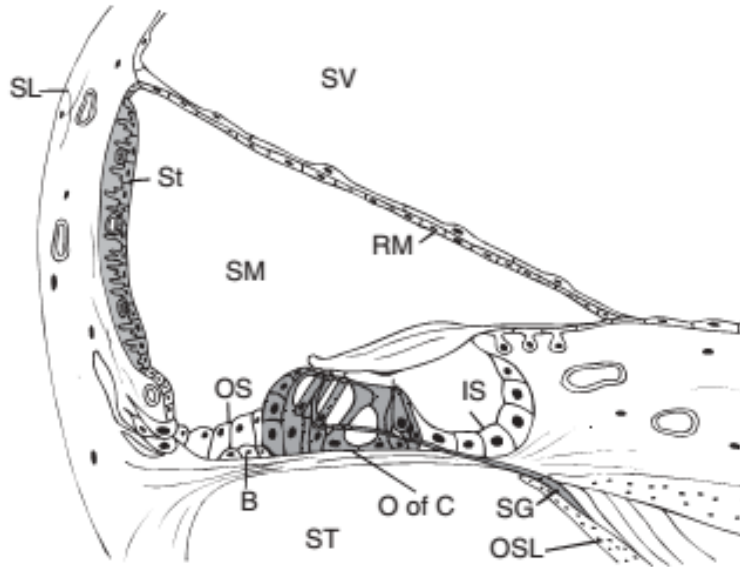
2.2.1. Kohlea

Kohlea; “**duktus kohlearis**” denilen bir boşluktur. Sakkulus ile “**duktus reuniens**” ile birleşir. Modiolus denilen spongiöz kemik etrafında 2,5 dönüşlük bir sarmal yapar. Bu sarmalın toplam uzunluğu ortalama 42 mm’dir (59). Tabanına “**basis kohlea**”, tepesine “**kupula kohlea**” adı verilir. Kohleanın bazal döngüsünün uzunluğu ortalama 22 mm, orta döngüsünün uzunluğu 12 mm, apikal döngüsünün uzunluğu ise 6 mm’dir. Kohlea içindeki spiral kanal içinde **kemik spiral lamina** denen, iç yan duvarda bulunan ve dış yan duvara ulaşmadan serbest sonlanan yarım bir kemik bölme vardır. Kohlear siniri içeren kemik kohlear sinir kanalı basis kohlea ile internal akustik kanal arasında seyrederek ve yaklaşık 1,2 mm uzunluğundadır ve bazal turdan apekse doğru gittikçe genişliği azalır (60). İçerisinde, Corti organına giden ve oradan dönen sinir lifleri bulunur. Kemik lamina dış tarafta inceler; burada sinir uçları myelinlerini kaybeder, kemik laminayı deler ve Corti organına ulaşır. Bu deliklere “**habenulae perforata**” denir.

Kohlear kanal üçgen biçiminde olup; **Reissner membranı**, **lateral duvar** ve **basilar membran** arasındadır. Reissner membranı skala media ile skala vestibüliyi birbirinden ayırır. Baziler membran ise skala media ile skala timpaniyi birbirinden ayırır. Üstte kalan ve vestibüluma açılan skalaya “**skala vestibüli**” ve altta kalan, fenestra kohlea ile orta kulak ile ilişki kuran skalaya ise “**skala timpani**” denir. Skala media ve skala timpani, kohleanın apeksinde **helikotrema** denen bölgede birbiriyle bağlantılıdır (Şekil 2.2). Skala media ve bileşenleri ise Şekil 2.3’de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Modiolar ekseninde ikiye kesilmiş sağ kohlea, H:helicotrema, SM: skala media, SV: skala vestibüli ST: skala timpani SG: modiolus içinde spiral ganglion RWM: yuvarlak pencere membranı



Şekil 2.3. Skala media (SM) bileşenleri, St: stria vaskülaris, RM: Reissner membranı, OS: dış sulkus hücresi, B: Böttcher hücresi, C:Corti organı, SG: spiral ganglion, OSL: kemik spiral lamina, IS: iç sulkus hücresi, SL: spiral ligament

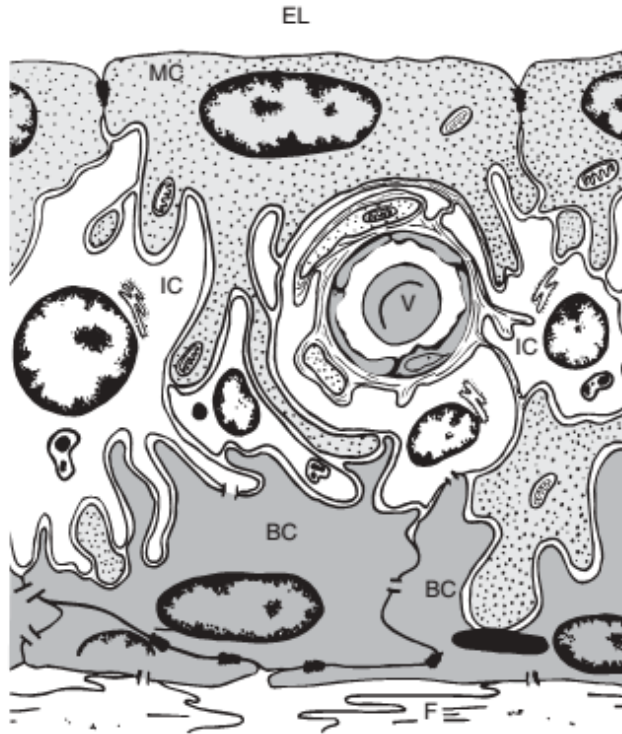
Reissner Membranı: İçte spiral limbusun modiolar tarafına ve dışta stria vaskülarisin üst köşesindeki spiral ligamana bağlıdır. Skala media ve skala vestibüliyi birbirinden ayıran ince bir zardır. Skala media ve skala vestibüliye bakan kısımlarda birer sıra hücre ile bunların arasında uzanmış bazal kısımdan oluşmaktadır. Endolenfe bakan hücreler kübik ve mikrovilluludur, perilenfe bakan hücreler ise yassıdır ve gevşek biçimde birbirine bağlanırlar. Reissner membranı suya geçirgendir. Ancak büyük moleküllerin geçişine izin vermez. Böylece perilenften endolenfe büyük moleküllü hücrelerin geçişi engellenir.

Lateral duvar: Kohlear kanalın yan ve dış duvarıdır. Bu tabakanın dışında da otik kapsülün iç yüzeyi vardır. Spiral ligament dış duvarın en dışta kalan kısmıdır. Gevşek bağ dokusundan yapılmıştır. Burada iyon ileten enzimler de vardır. Spiral ligamentin iç kısmında ise **stria vaskülaris** ile **spiral prominens** bulunur. Spiral ligament Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere ikiye ayrılan, fibroblast benzeri hücrelerden yapılmıştır. Daha çok tip 1 hücreler bulunur. Tip 2 hücreler ise dış sulkusa ve spiral prominense yakın kısımda çoğunluktadır, Na⁺, K⁺ ve ATP ile karbonik anhidraz gibi iyon ileten enzimler içerir (61, 62).

Stria vaskülaris, Reissner membranından spiral prominense kadar uzanır. Yüzeyi ve genişliği bazal membrana doğru azalır. Endolenfle komşu hücreler içerir. Stria vaskülaris, Şekil 2.4’de de görüldüğü üzere **marginal, intermediate ve bazal hücreler** olmak üzere üç çeşit hücreden oluşmaktadır. Marginal hücreler esas fonksiyonel hücrelerdir. Na⁺ K⁺ ATP pompası bulundurur, endolenfatik elektrik potansiyelini kontrol eder, K⁺’dan zengin iyon konsantrasyonu sağlarlar. Endolenfle temas eden yüzeylerinde Na⁺ ve K⁺ iyonları ile ATP içeren mitokondriler bulunur (62-64). İntermediate hücreler stria vaskülarisin orta tabakasını oluşturur. Bu hücrelerin fagositoz yetenekleri vardır. Beraberinde bu

tabakada monositler ve kapillerler bulunur. Bazal hücreler ise dışta bulunan, molekül geçişine izin vermeyen hücrelerdir.

Spiral prominens, stria vaskularis ve baziler membran arasında spiral olarak uzanan bir doku kenarıdır. Bazal membranı oluşturan küboidal formda tek bir epitelyal hücre tabakası tarafından çevrelenir. Spiral prominensin konnektif doku matriksi, omega şeklinde kapillerler ve çok sayıda fibroblast tip 2 hücreleri içermesi iyon transportu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

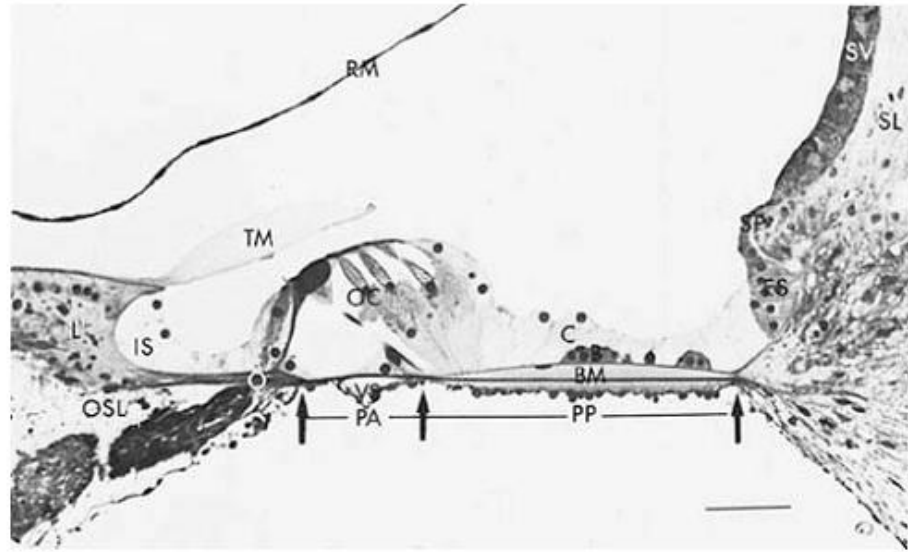


Şekil 2.4. Stria Vaskularis, EL: endolenfatik boşluk, MC: marjinal hücre, V: damar, IC: intermediate hücre, F: fibrosit, BC: bazal hücre

Bazal Membran: Bağ dokusundan oluşan, işitme fonksiyonunda önemli görevi olan bir membrandır. Genişliği bazal turdan apikale doğru gittikçe artar. İnsanda uzunluğu 31,5 mm olarak kabul edilir. **Pars arcuata** ve **pars pectinata** diye iki kısımdan oluşur (Şekil 2.5). Pars arcuata, spiral ligamana doğru uzanır ve iki dala ayrılır. Bu dalların arasında pars pectinata bulunur. Pars pectinata,

glikoprotein ve fibronektinden zengindir ve amorf kristaller halindedir. Bazal membran boyunca genişlik büyük değişiklik gösterir. Bazal membran hareketlerinin ve frekansa özel hareketlerinin farklı olması, yani frekans analizi ve ses şiddetinin alınabilmesi bu sayede olmaktadır (55).

Bazal membranın skala mediaya bakan yüzünde iç ve dış sulkus hücreleri, Boettcher hücreleri ve Corti organı bulunmaktadır.

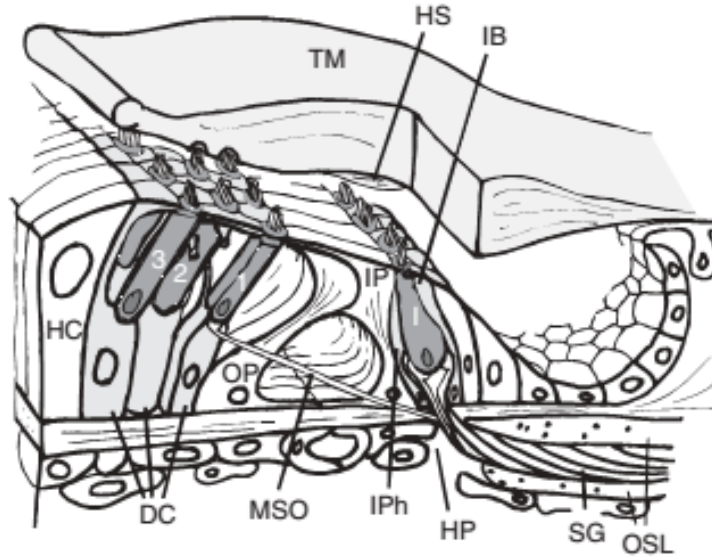


Şekil 2.5. Kohleanın radial kesiti, S: Reissner mebranı, SL: spiral ligament, SV: stria vaskülaris, SP: spiral prominens, ES: eksternal sulkus, BM: basiler membran, PA: pars arcuata, PP: pars pectinata, B: Bootcher hücreleri, C: Claudius hücreleri, CO: Corti organı, TM: tektoryal membran, IS: iç sulkus hücreleri, L: spiral limbus, OSL: kemik spiral lamina.

Claudius hücreleri, baziler membranın endolenfatik yüzeyini döşeyen küboidal formda hücrelerdir. Spiral prominens ve baziler membran arasındaki açık bir kanal olan **dış sulkusu** oluştururlar. Hensen hücrelerinden spiral prominense kadar baziler membran boyunca uzanırlar. Bu hücreler skala medianın endolenfi ile skala timpaninin perilenfi arasında sıkı bir sınır oluşturur.

Boettcher hücreleri ise Claudius hücrelerinin bazal yüzeyleri ile baziler membran arasında uzanır. En sık kohlear tabanda bulunur ve apekse doğru gidildikçe sayıları azalır. Fonksiyonlarının fibronektin ve baziler membran oluşumu için gerekli olabilecek diğer matriks bileşenlerini üretmek olduğu düşünülmektedir.

Corti organı: İşitme fonksiyonunda görev alan en önemli yapıdır. Corti organında (Şekil 2.6) perilenfteki mekanik titreşimleri sinir liflerini uyararak elektriki akımlara dönüştüren, transdüksiyon işlemini gerçekleştiren (65) iki tip sensoriyel hücre görülür; **iç ve dış tüylü hücreler (İTH ve DTH)**. Bunun dışında destek hücreleri, afferent (Tip 1 ve Tip 2 spiral ganglion) ve efferent sinir sonlanmaları (medial ve lateral olivokohlear demetler), iç ve dış pillar hücreler ve Hensen hücreleri bulunur (55).



Şekil 2.6. Corti organına kesitsel bakış, TM: tectoriyel membran, HS: Hensen şeridi, IP: İç pillar hücre, IPh: iç falangeal hücre, HC:Hensen hücresi, DC:Deiters hücresi, IB: iç sulkus hücresi, OP: dış pillar hücre, SG: spiral ganglion, OSL:kemik spiral laminaI: iç tüylü hücre, 1, 2, 3: 1., 2., 3. sıra DTH'leri (sırasıyla), HP: habenula perforata, MSO: medial superior oliver demetten gelen efferent lifler

Sensoriyel hücreler: Stereosilia denilen titrek tüylere sahiptirler. Stereosilialar iç ve dış tüylü hücrelerin apikal kısmında bulunurlar. Uzunlukları bazaldan apikale gittikçe ve içten dışa doğru artar. İç titrek tüylü hücrelerin stereosiliaları dış titrek tüylü hücrelere göre iki kez kalındır ve küp şeklindedir. Stereosilialar gerçek silia değildirler. Titrek tüylerin kutikular plaklarından uzanan uzun ve sert mikrovilluslardır. En uzunları en dışta bulunur.

Sterosilyaların sertliğini içindeki aktin filamanı sağlar. Bunlar dik bir şekilde kutiküler tabakanın içine girerler. Her titrek tüylü hücrenin apeksinde 6 veya 7 dizi sterosilya vardır. Dış tüylü hücrelerin en uzun sterosilyaları tektoryal membranın alt yüzüne bağlanır. Ancak kısa olan iç titrek tüylü hücrelerin sterosilyaları tektoryal membranla ilişki kurmaz (55).

Dış titrek tüylü hücreler: Baziler membran ve retiküler laminanın dalgalanma hareketlerinin ayarlanmasınan sorumlu oldukları düşünülmektedir (58). Silindirik yapıda olup nükleusları bazal olarak yerleşim göstermektedir (Şekil 2.7). Sayıları İTH'den daha çok olup yaklaşık olarak 12000 civarındadır (55). İTH'lere göre daha lateral kısımda üç veya dört sıra, içten dışa olacak şekilde dizilmişlerdir. Üzerlerinde sterosiliaların bulunduğu kutikuler plak içerirler. Bu plak üzerinde endolenfle hücre stoplazması arasında bağlantı sağlamaya yarayacak aralıklar vardır. Corti organı içinde, apikal ya da bazal uçlarından Deiters hücrelerine ve bunların parmaksı çıkıntılarına sıkıca bağlıdırlar.

Sterosilialar hücre yüzeyinde kutikuler plaktan uzanırlar. DTH'nin sterosiliaları "W" şeklindedir. Hücrelerin ve sterosiliaların boyları içten dışa doğru artış gösterir. Dış tüylü hücrelerin uzunlukları (14-55 mikron arası) bazaldan apekse doğru gidildikçe artar. Sterosilialar hücrenin lateral kısmında

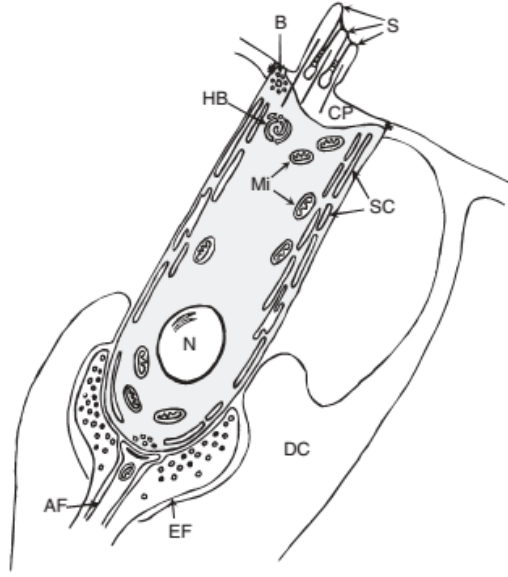
tektoriyel membrana gömülüdür. Sterosiliaların uçları katyon kapıları ile ilişkilidir. En dıştaki sterosilyaya doğru oluşan hareket ile K⁺ kanalları açılır ve K⁺'un hücre içine girişi olur. Hücrenin tabanındaki sinaptik aralığa hücreden sinaptik vezikül salınımı gerçekleşir (58).

Deiters ve **pillar hücreleri** DTH'lerin destek hücreleridir. Pillar hücre modiolusa yakın 1. ve 2. sıra DTH'lerle bağlantılıdır. Birinci sıradaki hücre DTH'ye modiolar ve lateral kısımdan; ikinci sıradaki hücre DTH'ye sadece modiolar kısımdan bağlanır. Üçüncü hücre ise DTH'ye Deiters hücreleri apikal ya da bazal uçlardan sıkıca bağlanır. DTH'leri ile destek hücreleri olan Deites ve pillar hücreleri endolenf ile perilenf arasında sıkı bir bariyer oluştururlar.

Deiters hücreleri, basiler mebran üzerinde yerleşmişlerdir. Her biri dış tüylü hücre ve buna bağlı sinir ucunun tabanını fincan şeklinde sararlar. Sadece tabanda açıklıkları vardır; buradan afferent ve efferent sinir lifleri dış titretilen tüylü hücrelere ulaşır. DTH ile Deiters hücrelerinin parmaklı çıkıntıları arasında sıvı dolu boşluk bulunur. Buna “**Nuel boşluğu**” adı verilir.

Mikrofilamanlardan ve mikrotubullerden oluşan iç ve dış pillar hücreleri içinde perilenf bulunan “**Corti tüneline**” oluşturur. Böylelikle İTH ve DTH bölgelerini birbirinden ayırırlar (55).

İç plazma membranı boyunca, kutikular tabakadan çekirdeğe doğru uzanan tabakalar halinde yüzeyaltı sisternalar vardır. Bu sisternalar içerisinde görevlerinin DTH'lerin hareketleri ile ilişkili olabileceği düşünülen **Hensen cisimcikleri** bulunur.



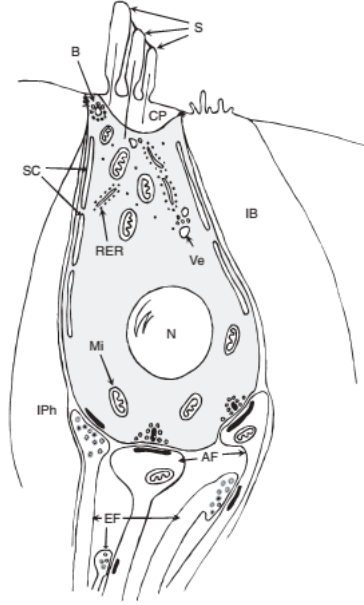
Şekil 2.7. Dış tüylü hücre, N:eksantrik nükleus, Mi: mitokondri, CP: kutikuler plak, B: bazal cisim, DC: Deiter hücresi, AF: afferent sinir lifi, EF: efferent sinir lifi, HB: Hensen cisimciği, SC: yüzeyaltı sisterna

İç titreşim tüylü hücreler: Ses dalgalarını nöral sinyallere kodlamakla görevlilerdir. Sayıları yaklaşık 3500 kadardır. Basık ve bülböz yapıdadırlar, vestibüler hücrelere benzerler (Şekil 2.8). Hücre çekirdekleri merkezde olup sitoplazmik organelleri dağınık yerleşimlidir. Corti organının modiolar tarafında tek sıra hücre biçiminde yerleşmişlerdir. Büyük küre şeklindeki nükleusları hücrenin ortasında bulunur ve iç plazmalemma boyunca yalnızca birkaç sıra yüzey altı sisterna içerirler. Bazal kısımda çok sayıda sinaptik sonlanma yer almaktadır. Efferent sonlanmalar iç saçlı hücre gövdelerinden ziyade afferent sinir lifleri ile sinaps yapar.

İTH sterosilialarının şekli gömülü oldukları daha küçük ve oval şekilli olan kutikuler plaklarıyla da ilişkili olarak “U” şeklindedir. Taban kısmında ortalama 20 adet Tip 1 afferent lif ile bağlantılıdır. Tipik olarak efferent lifler afferent sinir sonlanmalarında İTH’ler ile ilişkiliyken, erişkinlerde İTH’ler nadir olarak efferent

liflerle direk bağlantı halinde olabilmektedir. Bu durum kohlea apikal kesimlerinde daha sıktır.

İç ve dış pillar hücreleri, Deiters hücrelerinin falangial uzantıları ve tüysü hücrelerin sterosilialarının uzandığı apikal yüzeye **retiküler lamina** denir (58).



Şekil 2.8. İç tüylü hücre, RER: endoplazmik retikulum, IB: iç sınır hücresi, IPh: İç falangeal hücre

Hensen hücreleri: Corti organının dış - yan kısmında bulunur. Kohlea apikaline doğru uzunlukları artar. Birkaç dizi halindedirler ve endolenf ile temas etmezler. Hensen hücreleri ile dış titretilen tüylü hücreler arasındaki boşluğa “**dış Corti tüneli**” denir.

İç sınır ve falangeal hücreler: İç sınır hücreleri, iç sulkus hücrelerini iç tüylü hücrelerin medial yüzeyinden ayırır. Corti organının en medial kenarını oluştururlar. Falangeal hücreler ise dış tarafta DTH’leri birbirinden ayırırken iç tarafta İTH’lerle iç sulkus hücrelerinin arasında bulunurlar. Tabanda İTH ile birlikte myelinsiz sinir liflerini çevrelerler (55).

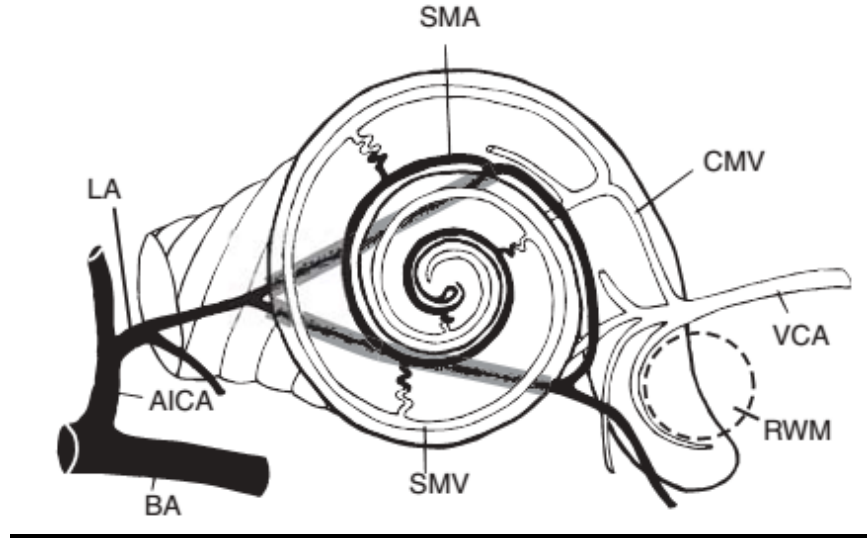
Spiral limbus: Kemik spiral laminanın iç kenarına bağlanır. Spiral biçimde vaskülarize bağ dokusundan oluşur. Spiral limbusun endolenfatik yüzü ince bir hücre dışı membranla örtülüdür. Spiral limbusun bağ dokusu fibroblast benzeri hücreler, vasküler elemanlar ve filamanlar içerir.

İç sulkus: Spiral limbusun dış kenarı ile Corti organının iç kenarı ve yukarıda tektorial mebran arasında bulunan, kübik yapılı, stoplazması açık hücrelerden oluşan kanaldır.

Tektoriyal membran: Spiral limbus, iç sulkus ve Corti organını örten, hücre içermeyen ekstrasellüler bir matrikstir. Fibröz materyalden yapılmıştır ve endolenfle ıslanmıştır. Dış tarafı marjinal bant denilen gevşek bir madde ile sonlanır.

İç kulağın damarlanması

Anterior inferior serebellar arterin dalı olan **labirentin arter**, ikinci kranial sinir ile birlikte iç kulak yoluna girer. Burada dallanarak **ana koklear arteri** ve anterior vestibüler arteri verir. Ana koklear arter kohleanın apeksini besleyen spiral modiolar arter ve kokleanın bazal kıvrımını besleyen vestibülo-koklear arter dallarına ayrılır. Spiral modiolar arter Corti organını, lateral duvarı ve modiolusu besler. Venöz drenaj spiral modiolar venden başlar kohleomodiyolar vene boşalır, kohleaquadukt ven ile birleşir (Şekil 2.9) (66).



Şekil 2.9. İnsan kohleası damarlanması, BA: basiler arter, LA: labirentin arter, AICA: anterior inferior serebeller arter, SMA: spiral modiolar arter, CMV: kohleomodiolar ven, SMV: spiral modiolar ven, RWM: yuvarlak pencere membranı, VCA: kohleaquadukt ven

Kohlear innervasyon

Kohlea üç tip sinir lifi tarafından innerve edilir: otonom, afferent ve efferent. Otonom sinir lifleri Corti organında izlenmemiştir. Ancak kan damarları, modiolus ve spiral laminanın sinir lifleri ile ilişkilidir (58).

Corti organı sinirleri

İç ve dış tüylü hücreler hem afferent ve hem de efferent sinir lifleri ile innerve olurlar. Ancak bunların iç kulaktaki dağılımları farklıdır. Afferent liflerin yaklaşık %90'ı iç tüylü hücrelerle sinaps yapar. Geri kalan afferent sinir lifleri dış tüylü hücrelere gider. Efferent sinir lifleri ise iç ve dış tüylü hücreleri farklı şekilde innerve eder. Efferent sinapslar İTH gövdesinin yakınındaki afferent sinir lifi üzerinde sonlanırken, DTH gövdesinin tabanında sonlanırlar.

Myelinli afferent ve efferent sinir lifleri spiral kemik laminayı radyal biçimde geçer ve laminayı terkedelerken myelinlerini kaybederler. Kemikteki habenula perforata denilen deliklerden geçip Corti organına giderler. İTH afferentleri direkt hücre gövdesine gider. DTH afferentleri Corti tüneline ve

spiral demet olarak Deiters hücrelerinin arasından geçerek kohlear tabana doğru ilerler. Her sinir lifi yaklaşık 10 DTH'yi innerve eder.

Efferent sinir lifleri Rosenthal kanalı içinden spiral olarak ilerler. Kanal içindeki demete intraganglionik spiral demet denir. Bu demetten radial tarzda çıkan sinir lifleri Corti organını innerve eder. İç tüylü hücreleri innerve eden efferent sinir lifleri tüylü hücre tabanının yanında iç spiral demet olarak isimlendirilen spiral bir demet oluştururlar. Bu demetteki lif sayısı koklear apekse doğru artar. Bu lifler iç tüylü hücrelerin afferent sinir lifleri üzerine sinaptik temas oluştururlar. Diğer efferent sinir lifleri iç Corti tüneline girer, spiral olarak ilerler ve sonra radial yönde tüneli çarpazlar ve dış tüylü hücreleri innerve ederler. Dış tüylü hücrelerin innervasyonu apekse doğru azalır (58).

Spiral ganglion

İç ve dış tüylü hücreleri innerve eden nöron hücre gövdeleri spiral ganglionda bulunur. Bu hücre gövdelerini barındıran kemik kanal spiral yönde ilerler, bu kanala “**Rosenthal kanalı**” denir. Spiral ganglion içinde afferent bipolar hücre gövdelerinden kaynaklanan myelinize sinir lifleri ve **intraganglionik spiral demet** olarak isimlendirilen efferent lifleri vardır. Otonom sinir lifleri de spiral ganglion boyunca ilerlerler (58).

Memelilerde spiral ganglion içerisinde iki tip afferent hücre bulunur. Hücrelerin %90'ı **Tip 1**, geri kalan %10'u ise **Tip 2** hücrelerdir. Tip 1 hücreler geniş çekirdekli, içerisinde **Nissl cisimcikleri** bulunan bipolar hücrelerdir. Tip 1 hücreler 50 tabaka myelinle örtülüdür ve iç titreşim hücrelere giderler. Tip 2 hücreler daha küçük, lobullü çekirdekli ve unipolar hücrelerdir. Myelin kılıfları incedir, myelinsiz olarak adlandırılırlar. Tip 2 hücreler dış titreşim tüylü hücreleri innerve ederler.

2.3. Santral İşitme Yolları

VIII. Kranial sinir

İnsanlarda, **VIII. kranial sinir** dört ayrı sinir dalından oluşur: *superior vestibüler, sakküler, posterior vestibüler* ve *koklear sinirler*. Bu sinirler otik kapsülde ayrı kemik kanallarda bulunur ve internal akustik kanalda (İAK) fasiyal sinir ve intermedius sinirle beraber seyrederek. İAK transvers falsiform krest ile superior ve inferior kompartmanlara ayrılır. Superiorda, önde fasiyal sinir ve arkada superior vestibüler sinir bulunur. Bu iki sinir birbirlerinden vertikal kret ile ayrılmışlardır. İnferior kısımda ise önde koklear sinir ve arkada vestibularis posterior ve singular sinir bulunur. Koklear ve vestibüler sinirin yaptığı olukta, fasiyal sinirle bu sinirler arasına n. intermedius yerleşmiştir.

Koklear sinir vestibüler sinir ile porus akustikus internusta birleşir (67-70). İAK içinde vestibüler sinirin sakküler bölümü koklear sinirin longitudinal fissürüne sokulan vestibulokoklear anastomozu (**Oort anastomozu**) meydana getirir (71). İki sinirin birleşmesinden sonra bir klivaj planı genellikle devam eder (72). Koklear sinir lifleri spiral bir seyri takip eder ve kokleotopik bir organizasyona sahiptir. Bazal kıvrım lifleri periferik yerleşirken, kokleanın apeksini innerve eden lifler daha derindedir (73).

Koklear ve vestibüler sinirler arasındaki ilişki İAK'nın en lateralinden serebellopontin köşeye kadar değişiklik gösterir; iki sinir labirentten beyin sapına kadar 90 ° rotasyona uğrar. İAK'da anterior inferior konumda olan koklear sinir beyin sapına vestibüler sinire göre posterior ve lateral olarak girer. Rotasyonun çoğu İAK içinde olur (74-76).

VIII. kranial sinir iki köke ayrılır ve pontomedüller bileşkede beyin sapına girer. Koklear sinir restiform cismin üzerinden geçer ve onun ventromedial yüzünün

üzerinde anteroventral kohlear nükleusun ön ve iç tarafından girer. Her bir lif inen ve çıkan dallar olmak üzere ikiye ayrılır. İnen dallar posteroventral ve dorsal kohlear nukleusları innerve eder, çıkan dal ise anteroventral kohlear nukleusu innerve eder (77).

Kohlear nükleuslar ve Akustik stria

Tüm afferent işitsel liflerin bilgilerinin aktarılması için **kohlear nükleuslar** ilk ve zorunlu bir duraktır. Nükleuslar bilateral olarak pontomedüller bileşkeye lokalize, VIII. kranial sinir giriş noktasının yanındadırlar. Serebeller hemisferleri kaldırdığımızı düşünürsek dördüncü ventrikülün lateral resessinin tabanında görülebilirler (77).

Kohlear nükleuslar iki majör bölümden oluşur: **ventral kohlear nükleus** ve **dorsal kohlear nükleus**. Ventral kohlear nukleus yapısal olarak anteroventral ve posteroventral kohlear nükleus olarak sınıflandırılabilir. Anteroventral nukleus da kendi içinde anterio ve posterior alt bölümlerine ayrılır (77, 78).

Her alt grup farklı hücre grupları içerir. Hücreler yapılarına göre beş değişik biçime sahiptir: *küresel ve globüler çalı biçimli hücreler, multipolar hücreler, ahtapot hücreler, piramidal hücreler ve granüler hücreler*.

Bu hücrelerin herbiri farklı frekansları temsil eden sinir liflerini alırlar ve herbirinin fizyolojik yanıt karakteristikleri vardır. Kohleanın bazal bölgesinden gelen lifler çoğunlukla dorsal çekirdeklerde, apekten gelenler ise ventral çekirdeklerde sonlanırlar. Her hücrenin hassas olduğu tek bir frekans vardır. Buna “**karakteristik frekans**” adı verilir.

Hücrelerden çıkan aksonlar üç demet oluşturur: Ventral akustik stria (trapezoid cisim de denir), İntermediate akustik stria (Helde striası) ve dorsal akustik stria (Monakow striası).

Ventral akustik stria: Medullayı geçerek superior lateral olive, superior medial olive, trapezoid cismin medial nükleusu ve inferior kollikusda sonlanır.

Intermediate akustik stria: Genellikle ahtopot hücrelerinden çıkar ve hem aynı taraf hem de karşı tarafta olmak üzere trapezoid cisimde, superior lateral olivede ve oliva bölgesinde sonlanır.

Dorsal akustik stria: Buradan çıkan lifler lateral lemniscus ve inferior kolliculusun santral nükleusunda sonlanırlar.

Süperior Olivar Kompleks ve Olivokoklear Demet

Süperior olivary kompleks (SOK) pontin gri cevherin hemen dorsalinde, kaudal ponsta bulunur. Bu nükleer kompleks birkaç çekirdekten oluşur: Süperior olive'in medial (MSO) çekirdeği, Süperior olive'in lateral (LSO) çekirdeği, Trapezoid cismin medial çekirdeği ve periolivary çekirdek.

Süperior olivary kompleks morfolojisi, kohlear efferentlerin organizasyonu ve yerleşimleri farklı memelilerde değişkenlik gösterir. Primat olmayan türlerde MSO ve LSO çekirdekleri göze çarparken, insanlarda **MSO çekirdeği** predominanttır ve lateral nükleus küçük ve körelmiştir. MSO çekirdeği bipolar nöronlardan yapılmıştır. LSO çekirdek ise multipolar nöronlar içerir . MSO çekirdek ventral akustik stria yolu ile her iki ventral kohlear nükleustan ipsilateral ve kontralateral innervasyon alır (58).

Süperio olivary kompleks lateral lemniskusa ve lateral lemniskus yoluyla inferior kollikulusa çıkan lifler gönderir. SOK, olivokoklear demet yoluyla Corti organındaki tüylü hücrelere de inen lifler gönderir. Bu yol ilk olarak *Rasmussen* tarafından 1946'da tanımlanmıştır (58).

Lateral Lemniskus

Lateral lemniskus, kohlear nükleusları ve süperior oliver kompleksi inferior kollikulusla birleştiren büyük, çıkan yoldur. Lateral lemniskus ile ilişkili üç temel hücre grubu vardır: ventral lateral lemniskus, intermediate lateral lemniskus, dorsal lateral lemniskus nükleusları. Kohleadan gelen pes frekanslar lateral lemniskusun dorsal çekirdeğine, yüksek frekanslar ise ventral çekirdeğine giderler. Lateral lemniskusun efferent projeksiyonu ise inferior kollikulusun santral kısmıdır.

İnferior Kollikulus

İnferior kollikuluslar (İK) bilateral olarak mezensefalonda bulunurlar. Çıkan işitme yolları için ana iletim istasyonu olarak ve alt beyin sapından medial genikulat cisme ve sonra da işitme korteksine giden akustik bilginin işlenmesinde görev yaparlar. (58). İnferior kollikuluslar üç ana hücre grubundan oluşur: inferior kollikulusun santral nükleusu, İK'nın kaudal ve ventraline yerleşen inferior kollikulusun eksternal nükleusu ve perisantral nükleus. **Santral nükleus** bunlar içinde en büyük ve en baskın olanıdır. Ventrolateral ve dorsomedial olarak bölümlere ayrılır.

İnferior kollikulusun santral nükleusu alt beyin sapından çıkan bilgilerin çoğunu alır. Her iki kohlear nükleustan, SOK'tan, lateral lemniskus nükleuslarından, işitme korteksinden inen afferentlerden input alır. İK'un santral nükleusu düşükten yüksek frekanslara doğru düzenli bir progresyonla birlikte *tonotopik* bir organizasyon gösterir (58).

İnferiorun ana efferentleri medial genikulat cisme gider ancak İK, inferior kollikulus komissürü yoluyla kontralateral İK'ye de lifler gönderir (58). Posterior

talamik kısmın lateral kısmı, süperior kollikulusun derin tabakaları ile de bağlantılıdır.

Medial Genikulat Cisim

Medial genikulat cisim inferior kollikulusun kollarının lifleri ve işitme korteksi arasına eklenen, çıkan işitme yollarında bir iletim istasyonudur. Talamusta bulunur, lateral genikulat cismin iç tarafına yerleşmiştir. Ventral, medial ve dorsal olmak üzere bölümlere ayrılmıştır.

Medial genikulat cismin üç alt bölümü de İK'nın nükleuslarından çıkan lifleri ve işitme korteksinden inen lifleri alır (58).

İşitme Korteksi

İşitme korteksi primer işitme korteksi ve ilişkili işitme alanları olarak ayrılır. İnsanlarda primer işitme korteksi (*Broadmann'ın 41. Ve 42. alanları*) temporal lobun üst kenarlarında bulunur ve spesifik işitme ve nonspesifik ilişkili alanlar (*Broadmann'ın 22. Ve 52. alanları*) tarafından çevrelenmiştir. İlişkili alanlar primer korteksi frontal ve temporoparietal bölgelere bağlar. Bu bölgeler dil, konuşma, görme alanlarını ilgilendirir.

İşitme korteksi talamusa, orta beyine ve ponsa üç ana inen yol verir. Her bir kortikal işitme alanı kısa geri dönüşümlü halkalar kurmak için medial genikulat cisme afferent lifler gönderir. Ayrıca primer işitme korteksi İK'in santral nükleusunun bilateral santral ve ipsilateral perisantral nükleusları ile bağlantı kurar (58).

2.4. İşitme Fizyolojisi

Atmosferde meydana gelen ses dalgalarının kulağımız tarafından toplanmasını takiben beyindeki merkezlerde karakter ve anlam olarak algılanmasına kadar olan süreç **işitme** olarak adlandırılır ve işitme sistemi denen geniş bir bölgeyi ilgilendirir. Dış, orta ve iç kulak ile merkezi işitme yolları ve işitme merkezi bu sistemin parçalarıdır. İşitme birbirini izleyen birkaç fazda gerçekleşir. Bunlar:

1. İşitmenin olabilmesi için ilk olarak ses dalgalarının atmosferden Corti organına iletilmesi gereklidir. Bu mekanik bir olaydır ve sesin bizzat kendi enerjisi ile sağlanır. Bu olaya “**iletim-conduction**” denir.
2. Corti organında ses enerjisi biokimyasal olaylarla elektrik enerjisi haline dönüştürülür. Bu olaya “**dönüşüm-transdüksiyon**” denir.
3. İç ve dış titreşim tüylerinde meydana gelen elektriksel akım kendisi ile ilişkili sinir liflerini uyarır. Bu şekilde sinir enerjisi frekans ve şiddetine göre değişik sinir liflerine iletilir. Yani ses, şiddet ve frekansına göre Corti organında **kodlanmış** olur.
4. Tek tek gelen bu sinir iletimleri işitme merkezinde birleştirilir ve çözülür. Yani sesin karakteri ve anlamı anlaşılır hale getirilir. Bu olaya “**cognition**” veya “**association**” denir (55).

Ses dalgaları üzerine vücudumuzun ve özellikle başımızın engelleyici etkileri vardır. Kulak kepçesinin ve dış kulak yolunun ses dalgalarının yönlendirilmesinde ve şiddetlendirilmesinde rolleri bulunur. Orta kulak ise gelen ses dalgasının iç kulağa geçerken uğrayacağı dB (*desibel*) kaybını telafi ederek, bir çeşit amplifikatör görevi görür ve sesi kuvvetlendirerek perilenfe iletir. Ses titreşimlerinin bazal membrana geçebilmesi bu membranın çevresindeki perilenfin

titreşimini gerektirmektedir. Titreşimin bazal membrana geçebilmesi için, bu membranın her iki tarafında birer pencere bulunması gerekir. Sıkıştırılamayacak özellikteki kohlear sıvılara bu basınç dalgaları saniyede 1,5 km'lik bir hızla iletilir. Bu hızda bir iletimle, basınç dalgasının kohlea hacmindeki yayılımı anlık olur. Kohleaların kemik duvarları sert ve içerdiği sıvı sıkıştırılmaz olduğundan stapes tabanından perilenfe doğru oluşan hareketler yuvarlak pencere zarını da hareketlendirir. Ses, her iki pencereye aynı anda ve aynı fazda ulaşmamaktadır. Oval ve yuvarlak pencerelere ses dalgalarının ulaşma yolları farklıdır. Havadaki titreşim yuvarlak pencerenin titreşmesini sağlarken, oval pencereye ise titreşimler kemikçik zinciri yolu ile gelir. Oval pencereye ulaşan ses enerjisi kulak zarının tahtaravalli ve kemikçik sisteminin yükseltici etkisi ile kulak zarı ve stapes yüzeyi arasındaki büyüklük farkından ötürü yuvarlak pencereye ulaşan ses enerjisinden daha fazladır. Pencerelere ulaşan iki ayrı ses dalgası arasında iletim hızının farklı olması nedeniyle ortaya çıkan faz farkına *dezafej* denir. *Waver* ve *Lawrence* bu olayın önemini yaptıkları deneylerde ortaya koymuşlardır (55).

Bekesy, 1960 yılında gerek kobaylarda ve gerekse insan kadavralarında ses uyararı vererek meydana gelen olayları incelemiştir. Bunun için kobaylarda stroboskop aydınlatma ile ses dalgalarının baziller membranda meydana getirdiği değişikliği araştırmışlardır. Ses dalgalarının perilenfe geçmesi ile perilenf hareketlenir, baziller membranda titreşimler meydana gelir. Bu titreşimler bazal turdan başlayarak apikal tura kadar uzanır. *Bekesy* bu harekete “**gezinen dalga**” adını vermiştir. Baziller mebran bazal turda dar, apikal turda geniştir. Bazal turda baziller mebran daha gergindir ve baziller mebran genişliği arttıkça gerginliği de azalır, böylece bazal turdan apikal tura kadar gezinen dalga iletilmiş olur (79).

Bekesy, baziller membran amplitüdlerinin her yerde aynı olmadığını da ortaya koymuştur. Genellikle yüksek frekanslı seslerde baziller membran amplitüdları bazal turda en yüksek seviyede iken, alçak frekanslarda baziller membran amplitüdü apikal turda en yüksek seviyeye ulaşır. Bu yüzden yüksek frekanslı seslerde gezinen dalgalar bazal turda kalır, alçak frekanslı sesler ise bazal turdan başlayarak apikal tura kadar devam eder (79).

Baziller membran hareketlerinin amplitüdları çeşitli frekanslar için ölçülmüş ve amplitüdların frekanslardaki stimulusun şiddeti ile paralel olarak arttığı görülmüştür. Ancak bu yükselme şiddet artmasına paralel değildir. Yani aralarında *nonlinear* bir ilişki vardır.

Perilemf hücre dışı sıvı niteliğindedir, K^+ iyonlarından fakir ve Na^+ iyonları bakımından zengindir (Potasyum 10 mmol/l, sodyum 140 mmol/l). Skala vestibülü ve skala timpaniyi doldurur. Skala mediada ise K^+ 'dan zengin, Na^+ 'dan fakir (potasyum 145 mmol/l, sodyum 5 mmol/l) olan endolenf vardır.

Ses enerjisinin elektrik enerjisine dönüşümünü sağlayan Corti organı kemik spiral lamina ile baziller membran üzerine yerleşir. Corti organında yapısal ve metabolik desteği sağlayan destek hücreleri ve ses enerjisinin (mekanik enerjinin), sinir enerjisine dönüşümünde çok önemli göreve sahip olan dış ve iç tüylü hücreler bulunur.

İşitme siniri ganglionundaki hücrelerin aksonları beyin kohlear çekirdeklere giderken, dendritleri spiral kemik lamina içinden iç ve dış titreşim tüylü hücrelere gelirler. Tüylü hücrelere gelen 50.000 lifin olduğu düşünülmektedir. Bunların %90-95'i iç tüylü hücrelerde sonlanan Tip 1 nöronlardır. Bir iç tüylü hücre, 15-20 Tip 1 nöron tarafından sinirlendirilir. Geri kalan %10 sinir lifi ise dış

tüylü hücrelerde sonlanan Tip 2 nöronlardır. Burada ise tek bir nöron aşağı yukarı 10 dış tüylü hücreyi birden sinirlendirir.

Tüylü hücrelerin hareketleri baziller membran hareketleri ile büyük ölçüde ilişkilidir. Titrek tüylerin titreşim amplitüdları arttıkça baziller membran amplitüdları da artmaktadır. Amplitüd artması özellikle dış tüylü hücrelerin hareket amplitüdüne bağlı olarak artış gösterir. Yani baziller amplitüd dış tüylü hücrelerin titreşim amplitüdüne bağlı olarak değişir. Her titrek tüylü hücrenin titreşim amplitüdünün en yüksek olduğu bir frekans vardır. Buna o titrek tüylü hücrenin karakteristik frekansı denir. Bu durum baziller membran amplitüdları içinde geçerlidir. Dış titrek tüylü hücreler frekans seçme özelliğine sahiptirler.

Baziller membran hareketleri ile titrek tüylü hücreler ve stereosiliaları hareket ederler. Tektorial membran ile doğrudan (DTH) ya da dolaylı ilişki (İTH) içersinde olan tüylü hücrelerin stereosilialarının tepelerinde spesifik olmayan iyon kanalları vardır ve bu kanallar baziller membran hareketi ile stereosilialar hareket ettikçe hareketin yönüne göre açılır ya da kapanırlar.

İç tüylü hücrelerden salınan majör nörotransmitter “**glutamat**” tır (80). Postsinaptik sinir ucunda iki tip glutamat reseptörü bulunur: kainat ve α - amino-3-hidroksi-5-metilisoksaazol-4-propionik asit (AMPA). Bu reseptörler hızlı afferent transmisyonundan sorumlu iyon kanallarıdır. Corti organında birçok sayıda bulunmaktadırlar. Glutamat reseptör 3 (GR3), GR4, GR5, GR6 ve KA1(kainat) reseptörlerini içermektedirler. Ayrıca N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri de bulunmaktadır. NMDA reseptörlerinin rolü ise iyonik glutamat reseptörlerini ayarlamaktır.

Postsinaptik sinir sonlarında adenosin trifosfat için (ATP) P2X2 reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörler ATP için modölatör rol oynarlar.

Ayrıca tip 1 afferent hücrelerde de hücre içinde metabolik değişiklikleri başlatan metabolik glutamat reseptörleri bulunmaktadır (66).

Spiral ganglionların %5'ni oluşturan tip II hücreler ile hedef organı olan DTH'ler arasındaki sinaptik bölgede görev alan nörotransmitterin ne olduğuna dair açıklamalar devam etse de glutamat aday olarak gösterilebilir (66).

Kohleanın dört temel ekstrasellüler potansiyeli kaydedilebilmektedir. Bunlar: *endolenfatik potansiyel*, *Kohlear mikrofonik*, *sumasyon potansiyeli* ve *birleşik aksiyon potansiyelidir*. Diğer kohlear potansiyellerin aksine **endolenfatik potansiyel**, akustik stimülasyona tepki olarak ortaya çıkmamaktadır; bunun aksine skala mediada kendiliğinden kaydedilen 80-100 mv'lık doğru akım potansiyelidir. Bu endokoklear potansiyel, yüksek yoğunlukta damarlanma gösteren **stria vasküleriste** ortaya çıkmaktadır. Stria vaskülarisin, kohleanın “enerji kaynağı” veya “bataryası” olduğu ve transdüksiyon için oldukça önem taşıdığı düşünülmektedir. Enerji kaynağının niteliği, stria vaskülarisin yoğun damarlanması ve $Na^{+}-K^{+}$ - adenzin trifosfataz (ATPaz) ile ilişkilidir. $Na^{+}-K^{+}$ - ATPaz'ın kohleadaki iyonların taşınmasında önemli bir role sahip olması zorunlu iken, enerji kaynağının niteliği ve iyon değişiminin detayları yoğun bir araştırma konusu olmayı sürdürmektedir (66). **Kohlear mikrofonik**; genellikle kohlea içinde veya yuvarlak pencere yakınında kaydedilen bir alternatif akım potansiyelidir. Dış tüylü hücrelerden potasyum iyonunun mevcut akışını temsil etmekte ve bu baziller membran hareketiyle değiştirilen dış tüylü hücrelerin elektriksel direnci olarak nitelendirilmektedir. Stereosiliaların modiolustan uzağa doğru büküldükleri durumlarda, dış tüylü hücrelerin direnci düşmekte, mevcut akımda artış olmakta, endolenfatik potansiyel azalmaktadır. Stereosiliaların modiolusa doğru bükülmesi durumunda, direnç artmakta, mevcut akımda düşme

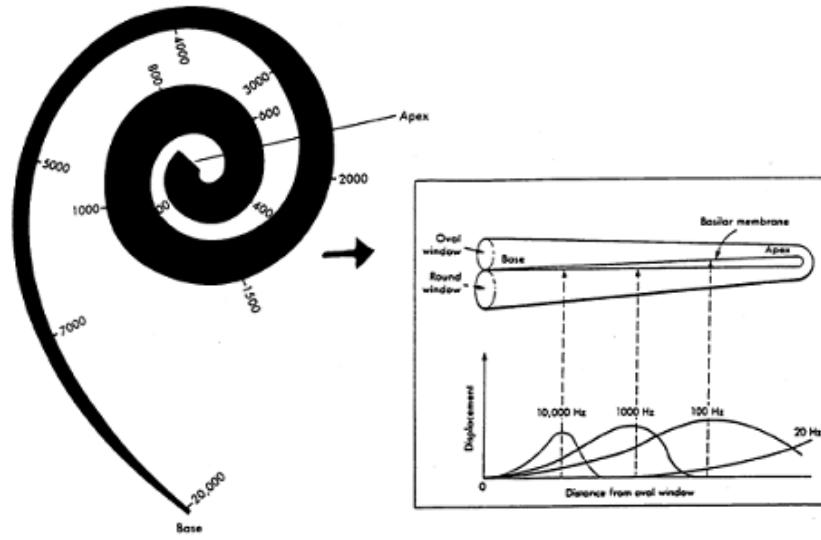
ve endolenfatik potansiyelde artış görülmektedir. Dış tüylü hücre harabiyetinde kohlear mikrofonikler kaybolmaktadır. **Sumasyon potansiyeli**; kohleada sese yanıt olarak kaydedilen bir doğru akım potansiyelidir. Büyük oranda dış tüylü hücrelerin uyarana yanıt olarak beliren intrasellüler potansiyellerinin neden olduğu doğru akım değişikliklerini yansıtmaktadır. **Tüm sinir veya bileşik aksiyon potansiyeli**; en etkin şekilde yuvarlak pencere veya kohlear sinir yakınına yerleştirilen bir elektrodlarla ölçülür. Birleşik aksiyon potansiyelleri kafa derisi elektrotları veya dış kulak kanalındaki elektrodlar ile yuvarlak pencere nişi yakınına bir elektrodun yerleştirildiği transtimpanik yaklaşım yoluyla klinik olarak kaydedilebilir.

Endolenfte +80 mv'luk bir endolenfatik potansiyel vardır. Buna karşılık tüylü hücrelerin içinde ise negatif elektrik yük bulunur: İç tüylü hücrelerde – 45 mv, dış tüylü hücrelerde – 70 mv'dir. Bu fark hücre içine doğru K⁺ iyon akımına neden olur, kimyasal bir takım transmitterler aracılığıyla K⁺ akımı bir elektriki polarizasyon ortaya çıkarır. Bu yolla mekanik enerji stapes tabanından perilenfe aktarıldıktan sonra tüylü hücrelerle elektriki akıma dönüştürülür.

İç ve dış tüylerde meydana gelen elektrikselsel akım kendisi ile ilişkili sinir liflerini uyarır. Bu şekilde sinir enerjisi frekans ve şiddetine göre değişik sinir liflerine iletilir. İnsanlarda işitme siniri 30.000 liften yapılmıştır. Buna karşılık kobaylarda 50.000 sinir lifi vardır. Bu liflerin %90-95'i İTH'de sonlanan myelinli Tip 1 (radial) nöron şeklinde iken, %5-10'u DTH'de sonlanan myelinsiz Tip 2 (spiral) nöron şeklindedir. Tip 1 nöronlar bipolardır. Spiral gangliondan çıkan dendritleri İTH'e ulaşırken, aksonları süperior olivary komplekse ulaşırlar. Tip 2 nöronlar ise unipolardırlar ve DTH'de sonlanırlar.

İşitme siniri afferent bir sinir olmakla birlikte içerisinde 1800 liften ibaret efferent sinir de vardır.

Titrek tüylü hücrelerde olduğu gibi her sinir lifinin duyarlı olduğu bir frekans vardır. Buna *karakteristik frekans* denir. Sinir lifleri ilgili oldukları tüylü hücrelerin karakterlerini aynen yansıtır. Karakteristik frekans ve nonlineer özellik sinir liflerinde de görülür. Bunun sonucunda, kohleada bazaldan apikale doğru frekanslara duyarlılık değişkendir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kokleanın frekanslara göre tonotropik organizasyonu

Spiral gangliondaki sinir hücrelerinin aksonları kohlear nükleus seviyesinde sonlanırlar. Herbirinin nükleus içinde sonlandığı hücreler farklıdır. Kohlear nükleustan çıkan liflerin çoğu beyin sapında çarpazlaşarak karşı taraf süperior olivary kompleks'e giderler. Az miktarda lif ise ipsilateral SOK'ye ulaşır. SOK, yükselen işitme sisteminin ilk merkezi olarak kabul edilebilir.

Süperior olivary kompleks üstündeki işitsel çekirdekler her kulaktan inhibisyon ve eksitasyon yapan lifler alırlar. Genellikle karşı kulaktan gelen lifler eksitasyon yaparken, aynı kulaktan gelen lifler inhibisyon yaparlar.

Medial SOK, dış tüylü hücrelerde biten çarpazlaşan efferent liflerin başlangıç yeridir. Lateral SOK ise çarpazlaşmadan iç tüylü hücrelere giden liflerin başladığı yerdir. Efferent liflerin kokleayı gürültülü ortamda ilgi duyduğu sesi alabilmesi için koruduğu ileri sürülmüştür (81).

Lateral lemniskal olarak giren liflerin büyük kısmı inferior kollikulusta son bulur. Az bir kısmı inferior kollikulusu geçerek medial genikulat cisme ulaşır. Pek az bir kısmı da karşı taraftaki inferior kollikulusa ulaşır. Bu nükleus olasılıkla frekans, şiddet ve gürlük değerlerinin birbirinden ayırt edilmesi ile baural işitme olmak üzere her türlü işitsel davranımla ilişkilidir, salt bir ileti aktarma bölgesi değildir. Talamusun medial genikulat cismi işitsel kortekse direkt bağlanır, ancak spesifik fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

İşitme merkezi temporal lobun **Sylvian fissüründe** yer almaktadır. Birinci ve ikinci işitme alanlarında oluşmaktadır. İşitsel korteksin tüm bölgelerinde hücreler kolonlar şeklinde tonotopik olarak organize olmuştur, her bir alanın özel bir anlamı vardır. Baziler mebrandan işitsel kortekse kadar, sistem frekansla ilgili olarak organize yapıdadır, karakteristik frekansların düzenli bir ilerleme oluşturduğu görülmektedir.

2.5. İşitsel Beyin Sapı Cevabı

İşitsel merkezi sinir sistemi üzerine olan temel bilgilerin en bariz klinik uygulaması, uyarılmış potansiyellerin yorumlanmasını içermektedir. İşitsel beyin sapı cevapları, işitsel yolların alt bölümündeki çok sayıda nöronun senkronize cevaplarının kaydedildiği uzak saha potansiyelleridir. Kayıt elektrodları ile gerçek yanıt üreticileri arasındaki mesafe nispeten uzak olduğundan uzak – alan tekniği olarak bilinir. İşitsel beyin sapı cevapları, ilk olarak 1967’de *Sohmer* ve

Feinmesser tarafından bildirilmiştir (82). Kısa bir süre sonra Jewett ve arkadaşları işitsel beyin sapı cevapları ile ilgili daha detaylı bir seri çalışma yayınlamışlardır.

İşitsel beyin sapı cevapları için kullanılan ses uyaranları clik, ton burst ve gürültüdür. Clik kısa süreli, genellikle 300-3000 frekanslarını birlikte içeren geniş ses band uyarandır. Ton burst ise frekansa selektif bir uyarandır. Kohlea bazal membranının belli bir bölgesini uyarmayı amaçlar. Kulağa dönüştürücü veya özel kulaklıklar yoluyla verilen ve işitme sisteminin bileşenlerinden gelen yanıtlar, aktif elektrod vertekse veya alın orta hatta saç çizgisine, referans elektrod mastoid tepeye veya kulak memesine yerleştirilecek şekilde differansiye amplifikasyon tekniği ile kaydedilir. İşitsel beyin sapı kaydı için ani başlangıcı olan bir stimulus kullanılması gerekir. İşitsel beyin sapı cevaplarına ait potansiyellerin oluşturulması için en sık kullanılan ses stimulusu 100 mikrosaniyelik köşeli bir dalga olan clik'dir. Tüm işitsel sinir lifleri yaklaşık aynı zamanda uyarılmış olduğundan clik sesi işitsel beyin sapı potansiyellerinin uyarılması için en iyi stimulustur. Bunun nedeni ortaya çıkan yanıtın oldukça belirgin dalgalara sahip olmasıdır. İşitsel beyin sapı cevapları, hem işitsel duyarlılığın ön görülmesinde, hem de otonörolojik değerlendirmede kullanılmaktadır. Bu şekilde kohlear sinir ve beyin sapı yollarındaki lezyonları saptamakta kullanılabilmektedir. Kayıtlama, uyanıklık durumundan bağımsız olarak yapılabilmekte ve ilaçların çoğundan etkilenmemektedir. Çocuklar ilaç etkisinde veya uyku sırasında iken sıklıkla test yapılabilir.

İşitsel beyin sapı cevapları, stimulus başlangıcından sonraki 10 milisaniye içinde gerçekleşen yedili dalga serisinden oluşmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kabule göre, dalga pikleri Roma rakamları ile işaretlenmektedir. Dalgaların kaynağının büyük ölçüde şu şekilde oluştuğuna inanılmaktadır: I.

dalga, işitme sinirine; II. dalga, ventril koklear çekirdeğı; III. dalga, dorsal koklear çekirdeğı; IV. dalga, süperior olivary komplekse; V. dalga, lateral lemniscusa; VI. ve VII. dalgalar ise inferior kollikulusa ait elektriki aktiviteleri gösterir. İBC trasesindeki her bir dalganın amplitüdü gerek olgular arasında, gerek aynı olgudaki değışik ölçümlerde farklılık gösterebilirken, latanslar stabildir ve çok iyi belirlenmiştir (83-86).

Bir İBC kaydında dalgaların en belirgin olarak ortaya çıktığı ses şiddeti, eşğin 80 dB üstündeki ses uyarını ile elde edilir. Bir trasenin elde edilebildiğı en düşük ses şiddeti ile hiç saptanmadığı ses şiddeti arasında hastanın **işitme eşğı** bulunur. En belirgin ve her zaman saptanabilen dalga V. dalgadır. II. ve IV. dalgalar her zaman bulunmaz, bu nedenle araştırmaya dahil edilmezler.

Literatürde kobaylarda yapılan İBC incelemelerinde saptanan dalga sayıları hakkında değışik rakamlar verilse de, çalışmaların genelinde ilk dört dalga değerlendirmeye alınmıştır. Bu dalgalar içinde en yüksek amplitüdü olan ve rahatça tanımlanabilen dalga III. dalgadır (87). Çalışmamızda da dalgaları belirlerken III. dalga referans alındı. Kobaylarda İBC eşğı belirlenirken III. dalganın görüldüğü minimum seviye esas alındı.

2.6. Ototoksisite

Bir ilacın ya da kimyasal bir ajanın, işitme kaybı, denge bozukluğu ya da her iki semptomu birden ortaya çıkaracak şekilde iç kulak disfonksiyonuna neden olabilme yatkınlığına ototoksisite denir. İç kulak dokuları hem geçici hem de kalıcı olarak zarar görebilir. Literatürde ototoksisite tanımlaması için gerekli kriterlerden bahsedilse de genel olarak, kullandığımız bir toksik maddenin

ototoksik olduğunun söylenebilmesi için bilateral olarak 250 ile 8000 frekansları arasında en az 10 dB kayıba neden olması gerekmektedir (88, 89).

Ototoksik maddelere bağlı olarak sıklıkla işitme kaybı, çınlama, dengesizlik, baş dönmesi gibi yakınmalar karşımıza çıkmaktadır. Tinnitus bunlar arasında en sık ve çoğu zaman da ilk olarak karşımıza ıkandır. Olgularda tek taraflı bulgularla nadir de olsa karşılaşılsa da tinnitus ve işitme kaybı genellikle bilateral ve simetrikidir. Vestibüler belirtiler orta derece dengesizlikten bulantı-kusma ile seyreden ciddi vertigo ve hatta ossilopsiyaya kadar giden değşken bir klinik tabloya sahiptir. Kompanzasyon mekanizmaları sayesinde zaman içinde bu belirtiler hafifleyebilir. Ancak, toksik maddelerin cinsine ve alım şekli ve süresine bağlı olarak total vestibüler kayıp da söz konusu olabilir.

Böbrek ya da karaciğer yetmezliği olan olgular, bağışıklık sistemi baskılanmış olgular, yaşlı hastalar, daha önce ototoksisite çıkan olgular, birden fazla ototoksik ilacın birarada kullanıldığı olgular, daha önce sensörinöral işitme kaybı olan ve kollajen damar hastalığı olan olgularda ototoksik etkinin daha belirgin olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kohlear implantlı çocuklarda ve erişkinlerde ototoksik ilaçların kullanılması önerilmemektedir (55).

Bazı ailelerde benzer ilaç ototoksisitesi bulguları gösteren birey sayısının fazla olduğu gösterilmiş ve bu durum bazı bireylerin çeşitli ilaçların ototoksik etkilerine karşı genetik olarak hassas olabileceği düşüncesini akla getirmiştir (90). Güncel alışmalar sonucu belirli spesifik mutasyonların bazı hastaları ilaçların ototoksik etkisine yatkın hale getirdiği gösterilmiştir (91).

Ototoksik ilaçların kullanıldığı durumlarda ilacın etkilerinin monitörize edilmesi yolu ile hastalarda meydana gelebilecek toksik etkilerin daha erken tanı alabileceği unutulmamalıdır.

2.6.1. Sisplatin Ototoksitesitesi

Sisplatin ilk olarak 1845 yılında *Peyrone* tarafından sentezlendi ve bu nedenle bazen “*Peyrone’in kloridi*” olarak adlandırılır. *Rosenberg* ve *Cavalieri* 1965 yılında iki platinum elektrodu arasında kalan elektriksel devrenin *Esherichia coli* çoğalmasını durdurduğunu gözlemişler ve platinyum kompleksinin amonyum ve klorid iyonlarından oluştuğunu bulmuşlardır. Deneysel tümör sistemlerinde en aktif platinyum bileşiğinin sisplatin olduğu ortaya konmuş ve bu ilaç 1970’in başlarında klinik kemoterapi için geliştirilmiştir. Sisplatin testis, over, servikal, mesane ve akciğer kanseri gibi yumuşak doku neoplazmlarında ve baş boyun bölgesi squamöz hücreli kanserlerin tedavisinde kullanılan yüksek etkili bir ajandır. Etkisini içerdiği platinyum atomlarının pürin bazlarının N7 pozisyonundaki DNA ile kovalent bağ kurması sonucu, tümör hücrelerinde öncelikle apoptozisi başlatması ve daha sonra yüksek konsantrasyonlara ulaştığında tümör hücresinde nekroz başlatması ile göstermektedir (92) Kullanımı sonrasında bulantı - kusma, nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite gibi ciddi yan etkiler ortaya çıkabilir (8).

2.6.1.1. Klinik özellikleri

Sisplatin ototoksitesitesi ilk olarak *Rossof* ve *arkadaşları* tarafından 1972’de tanımlanmıştır. Sisplatin ototoksitesitesini düşündüren bulgular kulak ağrısı, tinnitus ve subjektif işitme kaybıdır. Tinnitus genellikle geçici olmakla birlikte kalıcı da olabilir. Tinnitus sisplatin ile tedavi edilenlerin %2 ila %36’sı arasında rapor edilmişken, sensörinöral işitme kayıp oranları %93’lü değerleri bulmaktadır (9, 93). Ototoksisite insidansının %4 ile %50 arasında değişiklik

gösterdiğini söyleyen yayınlar da mevcuttur (93-95). Çocuklarda ise bu oran %22 ile %70 arasındadır (96-100).

Ototoksisite tedavi sonrası saatler ya da günler içinde oluşabilir (10). İşitme kaybı (sensörinöral tip), doz bağımlı, kümülatif, iki taraflı, genellikle kalıcı ve öncelikle yüksek frekanslarda kayıp şeklinde oluşur (11). Elektrofizyolojik çalışmalar, sisplatin ototoksisitesinin endokohlear potansiyellerindeki azalma (101), beyin sapı uyarılmış cevaplardaki eşik artışı (101-104) ve distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPOAE) değerlerinde yükselme (104-106) ile ortaya konabileceğini göstermiştir. Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon tüylü hücre hasarının erken ortaya konması için en duyarlı yöntemdir (104).

2.6.1.2. Risk faktörleri

Sisplatine bağlı işitme kaybı uygulanan kümülatif doz, diğer ototoksik ilaçlara maruz kalma, önceden var olan işitme kaybı, gürültüye maruz kalma, düşük serum albumemi ve anemiyi kapsayacak şekilde düşük beslenme düzeyi, kohlear bölgeye alınan radyoterapi, böbrek yetmezliği gibi faktörlerle ilişkili izlenmektedir (12). Yaş da ototoksisite için önemli bir risk faktörüdür. 5 yaş altı çocuklar ve ileri yaşlılar sisplatine bağımlı işitme kaybına daha yatkın bulunmuşlardır (13, 14).

2.6.1.3. Genetik predispozisyon

Platinum toksisitesi olgular arasında belirgin çeşitlilik göstermektedir. Öyle ki, tedavi almış çocukların %20 veya daha fazlasında bu yan etki görülmemektedir (107). Bu durum genetik faktörlerin sisplatinin yan etkilerine daha yatkın bireylerin oluşmasında rol oynadığını düşündürür (108-110).

Ross ve arkadaşlarının çalışmasında **tiopürin S- metiltransferaz (TPMT)** ve **katekol O- metiltransferaz (COMT)** genlerinde oluşan varyasyonlar ile çocuklarda görülen sisplatine bağlı ototoksisite arasında güçlü ilişki saptanmıştır. Olguların taşıdığı riskli alel sayısı ile işitme kaybı gelişme süresi arasında ters orantılı bir ilişki vardır. Sisplatin- DNA onarımı ile ilişkili **ERCC1** ve **ERCC2** (excision repair cross-complementation- eksizyon ile çapraz tamamlayıcı onarım) genler, eksizyon onarım enzimini kodlarlar ve bu genlerin polimorfizmleri sisplatine bağlı oluşabilecek ototoksisite riskini arttırmaktadırlar (111-113). Ayrıca yapılan hayvan çalışmaları **glutatyon S- transferaz (GST)** geninin kohleada bulunduğunu ve ototoksisiteden korumada rol aldığını bulmuştur. **GSTM3** (114) ve **GSTP1**(115) genlerindeki genetik varyasyonların erişkinlerdeki ototoksisite ile ilişkisi ortaya konmuştur. Düşük yoğunluklu lipoprotein ailesinin üyesi olan **megalin** böbreklerin proksimal tubuler hücrelerinde ve iç kulağın marjinal hücrelerinde yüksek oranda gösterilmiş olup bu gende oluşan polimorfizmin sisplatin ototoksisitesine yatkınlığı arttırdığı söylenmektedir. *Riedemann*'ın çalışmasında siplatin tedavisi sonrası işitme kaybı gelişen 25 hasta ve işitme kaybı gelişmeyen 25 hasta karşılaştırıldığında işitme kaybı gelişen olgularda megalin de polimorfizm olduğu dikkati çekmiştir. *Peters ve arkadaşlarının* yapmış olduğu çalışmada ise kanser tedavisi başarıyla sonlanmış 20 hastanın 5'inde mitokondriyal mutasyonlarla ilişkili *Leber'in hereditör optik atrofisi* gözlenmiştir (114).

2.6.1.4. Sisplatin ototoksisite mekanizmaları

Sisplatin'e bağlı gelişen apoptozis oluşumunda birçok mekanizmanın aracı olduğu düşünülmektedir. Literatürde açıklanmış mekanizmalar mevcut olmakla

birlikte, henüz ortaya konmamış mekanizmaların da var olabileceği düşünülmektedir. *Casares ve arkadaşlarının* 2012 yılında hayvan modelleri üzerinde yaptıkları çalışmada sisplatin ototoksitesinden sorumlu olduğu düşünülen mekanizmalar gruplandırılmıştır (116). Bunlar:

Geleneksel mekanizma: Sisplatinin sitotoksik etkisi platinum atomu ile DNA arasındaki bağlara bağımlı olarak oluşan ürünlerin hücre siklusunu bloke edip, p53 aktivasyonu ile apoptozisi indüklemesi ile oluşmaktadır. Oluşan platinyum - DNA ürünlerinin yüksek oranda stria vaskülarisdeki marjinal hücre çekirdeklerinde toplandığı gösterilmiştir. Marjinal hücrelerde gelişen hasar strial boşluklardan K⁺ alımını ve endolenfe K⁺ sekresyonunu bozarak, tüylü hücre kaybına da yol açmaktadır. K⁺ siklusundaki bozulma tip 1 spiral ligament fibrositlerindeki apoptozisle de ilişkilidir.

Reaktif oksijen ürünlerinin rolü: Sisplatinin kohleada reaktif oksijen ürünlerinin (**ROÜ**) oluşumu için kullandığı temel enzim nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazın isoformu olan nitrik oksidaz 3 (**NOX3**)'dür, **transient reseptör potansiyel vanilloid (TRPV1)** kanalını indükleyip aktive ederek bu kanaldan Ca⁺⁺ çıkışını sağlayarak kaspaz sisteminin devreye girmesi ile apoptozisi başlatır. Ayrıca NOX3, süperoksid anyonu ve bunun dönüşümü ile oluşan hidrojenperoksid ve diğer toksik lipid peroksidlerin oluşumunu kohlea içerisinde attırır. Bu olaylar da kohlear hücrelerde Ca⁺⁺ salınımını arttırıp apoptozisi başlatır.

- Kaspaz bağımsız yol, **Poli adenozin difosfor riboz polimeraz (PARP-1)** hiperaktivasyonu sonrası artan **c-Jun N-terminal kinaz (JNK1)** enziminin apoptozisi indükleyen faktörü devreye sokması ile hücre ölümü gerçekleşir.

- Kaspaz bağımlı yol, Sisplatin ile indüklenen Bcl-2 (B hücreli lenfoma 2) gen regülasyonu sonucu oluşan sitokrom c salınımı ile kohleadaki kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesindeki artışa bağılı olarak hücre ölümü olur.

İnflamatuvar yol: Sisplatin inflamatuvar sitokinlerin oluşumunu indükler. Sisplatinle ilişkili bir inflamatuvar mediatör olan nitrik oksid sentaz (**iNOS**) kohlea hasarı ile ilişkili nükleer faktör – kb (**NF-kb**)’u indükler ve apoptozisi başlatır.

Casares ve arkadaşları sonuç olarak apoptozisi ve hücre hasarını birçok faktöre bağılı olan intrasellüler elektrolit değişikliklerin ve inflamatuvar mekanizmaların tetiklediğini ve bu yolların birbiriyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

2.6.1.5. Kohlear morfolojik etkiler

Sisplatinin kohlear morfoloji üzerine olan etkilerine baktığımızda üç majör hedef organdan bahsedilmektedir: **Corti organı**, **lateral duvar hücreleri** (Stria vaskularis ve spiral ligament) ve **spiral ganglion hücreleri**. Ancak sisplatin uygulaması sonrası en belirgin değişiklik DTH kaybıdır. Öncelikle bazal kısımda ve üçüncü sıradaki DTH kaybı görülür (117, 118). Platinum ajanları ile kohlear tüylü hücrelerde gelişen hücre ölümü doz bağımlıdır. DTH’ler sisplatine daha duyarlı iken, İTH’ler karboplatine daha duyarlı bulunmuşlardır (119). Kohlear tüylü hücre ölümü kohleanın bazal kısmında başlar ve ilaca maruz kalmanın devamı halinde apikal kısımlara doğru ilerler (119). Kobaylarda yapılan çalışmalarda DTH’ler ile spiral ganglion hücrelerinin birbirini takip eden yakın zaman aralıklarında, öncelikle DTH’leri olmak üzere hasarlandıklarını ortaya koymaktadır (120). DTH hücrelerine ait destek hücresi olan Deiters hücrelerinde

de oluşan ultrastruktürel değişikliklerin daha önce olduğu ortaya konmuştur (121).

Rybak ve arkadaşları sisplatinden en çok etkilenen yerlerin DTH'leri ve stria vaskularis olduğunu söylemektedir (15). Ancak hangisinin esas hedef hücresi olduğu konusu tartışmalıdır. *Thomas ve arkadaşları* platinyum - DNA komplekslerinin stria vaskularisin marginal hücrelerinde daha fazla birikim yaptığını, DTH'inde ise daha az biriktiğini gözlemlemiş ve sisplatine bağlı hücre hasarında esas hedef hücrenin ne olduğu konusunun tartışılması gereken bir konu olduğunu belirtmişlerdir (122). *Alam ve arkadaşları* ise gerbil kohleaları ile yaptıkları araştırmada kohleaların tüm kısımlarında stria vaskularis TUNEL pozitif boyanma saptamışlardır (18).

Lee ve arkadaşları stria vaskularisteki apoptozisin sisplatin tedavisini takiben 3 gün içinde ortaya çıktığını söylemektedirler (16). Stria vaskularisteki marginal hücrelerde oluşan apoptozis strial bölgeden K⁺ alımını ve endolenf içine sekreyonunu bozarak iç ve dış tüylü hücrelerin metabolik homeostazısını bozar. Bu durum endokohlear potansiyeli düşürür ve sensörinöral iletimi etkiler. Sisplatin lateral duvardaki tip 1 spiral ligament fibrositlerinde de apoptozisi indükler ve endokohlear potansiyel için gerekli K⁺ döngüsünü bozar (123). Etakrinik asid, furosemid ve quabain gibi endolenfteki K⁺ konsantrasyonunu düşüren ilaçların tüylü hücre dejenerasyonu geliştirmesi de benzer bir mekanizmadır (124, 125).

Literatürde sisplatine bağlı oluşan ototoksitenin geçici veya kalıcılığının nedeni sorgulanmıştır. Sisplatin strial marginal hücrelerde birikim yaptıktan sonra endokohlear potansiyeli düşürerek işitme kaybına neden olmaktadır. Oluşan hasar strial hasar sonrasında DTH kaybı ile devam ederse işitme kaybının kalıcı olacağı

görüşü hayvan deneylerinde ve birkaç insan olgu raporlarında belirtilmiştir (13, 126, 127). Siddik ve arkadaşları marginal hücrelerin DNA onarım kabiliyetleri ve onarım mekanizmaları ile platinyum birikimlerini azaltma özellikleri olduğundan bahsetmiştir (128).

2.6.1.6. Ototoksisite sınıflandırması

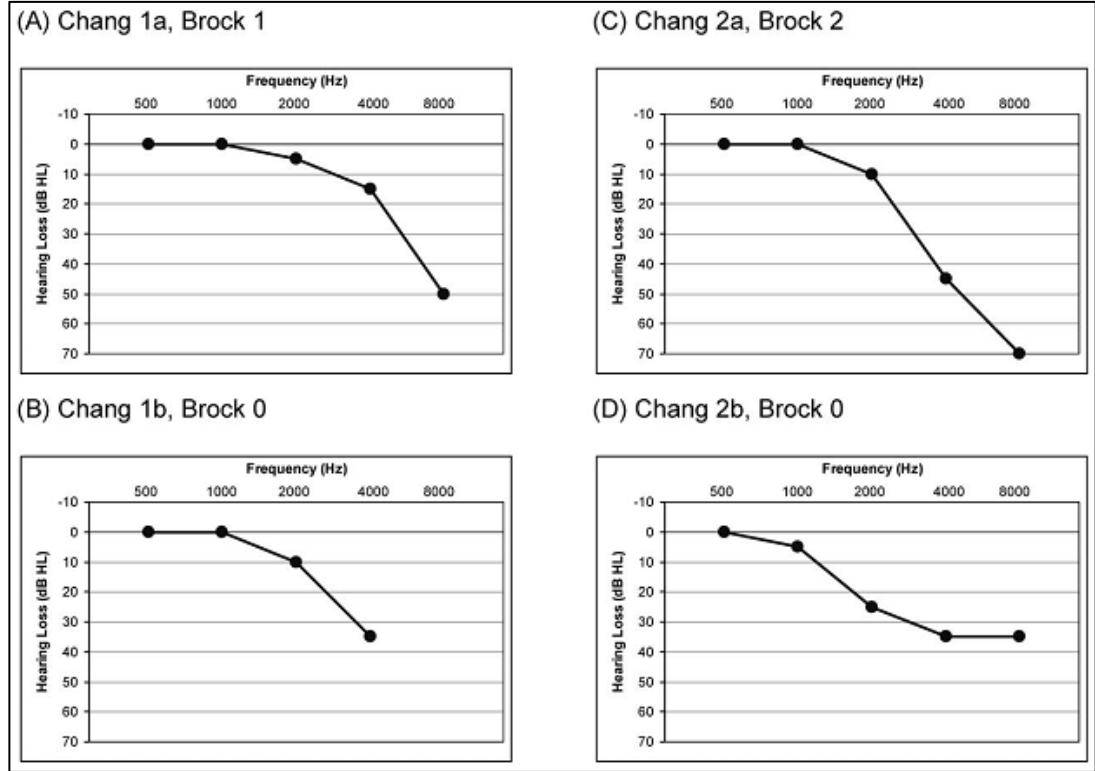
Ototoksisiteyi değerlendirme ve derecelendirme konusunda odyolojik protokoller arasındaki farklılıklar ve standardizasyon eksiklikleri doğru evrelemenin yapılmasını zorlaştırmaktadır. Onkoloji klinikleri genellikle ototoksisiteyi *Ulusal Kanser Enstitüsü'nün* ilaç yan etkilerinin ortak terminolojik kriterlerini değerlendirdiği evreleme sistemini kullanılarak değerlendirmektedirler (National Cancer Institute version 3 ve 4). Kemoterapötiklere bağlı gelişen ototoksisite evre 1, 2, 3, 4 olmak üzere ayrılmaktadır. Subjektif işitme kaybı değerlendirmesi ile ardışık 2 ya da 3 frekanstaki objektif eşik değişikliklerini birleştirmektedirler. Enstitünün yayınladığı 3. versiyonda derecelendirmeye hangi frekansların katıldığı açıkça ortaya konulmamışken, 4. versiyonda bu frekanslar 1, 2, 3, 4, 6 ve 8 kHz olarak belirtilmiştir (129). Ancak bu evreleme sistemi mevcut ototoksisiteyi ve çocuklardaki işitme kaybının klinik belirtilerini daha düşük göstermekle suçlanmaktadır (88, 100). Bunun nedeni olarak bu evreleme sisteminde konuşma frekansları olan düşük frekansların, konuşma frekansı olmayan yüksek frekanslara göre daha önemli olarak ele alındığının düşünülmesidir (99, 100, 130).

Sisplatine bağlı ototoksisite değerlendirmesinde *Brock kriterleri* ve henüz yeni olan *Chang skalası* gibi daha çok tercih edilen evreleme sistemleri mevcuttur (88, 89). Brock kriterleri yüksek frekanslara odaklanmıştır. Standart pür ton

odyogramlar baz alınarak evre 0 - 4 olarak işitme kayıpları ayrılır. Ulusal Kanser Enstitüsü'nün evreleme sisteminin aksine kesin işitme kaybını değerlendirirler. Chang skalası ise Brock kriterlerinin modifiye edilmesi ile oluşturulmuş, spesifitesi ve sensivitesi daha yüksek olan ve klinik uygulamalarla daha uyumlu olan bir evreleme sistemidir (140). Brock kriterlerinde 1, 2, 4 ve 8 kHz frekanslar ele alınırken Chang skalasında 3 ve 6 kHz gibi ara frekanslar da dikkate alınmaktadır. Chang ve Brock evrelemesi (Tablo 2.1) ve evrelerin odyogramları (Resim 2.1) şu şekildedir:

Tablo 2.1. Chang ve Brock Evrelemesi

Chang Evre	Sensörinöral İşitme Kaybı (dB HL)	Brock Evre	İşitme Eşikleri (dB HL)
0	≤ 20 dB 1, 2, ve 4 kHz'da	0	< 40 dB tüm frekanslarda
1a 1b	≥ 40 dB 6- 12 kHz arası herhangi frekansta > 20 ve < 40 dB 4 kHz'de	1	≥ 40 dB 8 kHz'de
2a 2b	≥ 40 dB 4 kHz ve üstünde > 20 ve < 40 dB 1, 2, veya 3 kHz'de	2	≥ 40 dB 4 kHz ve üstünde
3	≥ 40 dB 2 veya 3 kHz ve üstünde	3	≥ 40 dB 2 kHz ve üstünde
4	≥ 40 dB 1 kHz ve üstünde	4	≥ 40 dB 1 kHz ve üstünde



Resim 2.1. Chang ve Brock evreleri

Bunların dışında *Amerikan Konuşma ve Dil İşitme Topluluğunun* 1994'deki kılavuzlarında ototoksisitenin erken teşhisi için koydukları kriterler de ototoksisitenin varlığını ya da yokluğunu ortaya koyma amaçlı kullanılabilir. Bu kriterler; tek frekansta >20 dB işitmede azalma veya ardışık iki frekansta >10 dB azalma gerçekleşmesidir. Bu kriterler hastalarda oluşan ototoksisitenin şiddeti hakkında bilgi vermemekte ve hasta üzerindeki klinik etkileri yeterince ortaya koyamamaktadır (131).

Dana-Farber Kanser Enstitüsü ise yakın zamanda fonksiyonel bir skala önermiştir. Bu skalada:

Evre 1, 4 kHz'ın üzerinde >20 dB işitme kaybı

Evre 2, 4 kHz'da ve üzerinde >20 dB işitme kaybı

Evre 3, 2 kHz ve üzerinde >20 dB işitme kaybı olarak belirlenmiştir.

Pediatric Oncology Derneğinin 42. Uluslararası Kongresi'nde (2010)

tedavi bitiminde hastalarda görülen ototoksisiteyi evrelendirme amaçlı 4 evreden oluşan bir skala geliştirilmiştir (89):

Evre 0, ≤ 20 dB HL tüm frekanslarda

Evre 1, > 20 dB HL 4000 Hz üstünde

Evre 2, > 20 dB HL 4000 Hz ve üstünde

Evre 3, > 20 dB HL 2000 Hz veya 3000 Hz ve üstünde

Evre 4, > 40 dB HL 2000 Hz ve üstünde

2.7. Ototoksisite Monitorizasyonu

Ototoksisite için yapılan odyolojik monitorizasyon öncelikle ilaca bağlı oluşabilecek işitmedeki değişiklikleri erken saptama ve işitmedeki bozulmayı engelleyecek odyolojik müdahaleleri sağlama amacıyla yapılmaktadır. İşitmedeki bozulmanın erken teşhisi tedavide yapılabilecek düzenlemeler veya odyolojik açıdan alınabilecek önlemler ile kişinin hayat kalitesini bozmadan mevcut tedavi sürecinin devam etmesine yardımcı olacaktır.

Odyolojik monitorizasyon için öncelikle tedavi öncesi işitme değerlendirmesi gerekmektedir. Tedavi öncesi değerlendirmelerin eksikliği işitme kaybı ile ilaç arasındaki ilişkiyi ortaya koymada ciddi zorluk yaratmaktadır (132-134). Tedavi öncesi değerlendirme oldukça kapsamlı olmalı, konvansiyonel frekans aralığındaki pür ton eşikleri (0.25-8 kHz), yüksek frekans odyometriyi (YFO), timpanometriyi, konuşma odyometrisini ve otoakustik emisyon testlerini (OAE) içermelidir (146).

Yüksek frekans odyometri ve otoakustik emisyon testleri konvansiyonel pür ton odyometriye göre işitme sitemindeki değişiklikleri daha erken saptaması,

mevcut hastalığı nedeniyle düşük durumda olan hastalarda davranışsal cevaplara dayanmaması ile daha caziptir. Odyoloji kliniklerinde zaman tüketimi açısından daha verimli ve hesaplı bulunmaktadır (135).

Yüksek frekans odyometri ototoksisiteyi erken saptamada etkili bulunmuştur (136-140). Siplatinin etkisini öncelikle kohleanın bazal kısmındaki hedef hücrelerde göstermesi ve YFO'da konvansiyonel testlerde bakılmayan 8000 Hz ile 16 veya 20 kHz frekans aralığına bakılması buna neden olmaktadır. Üstelik YFO'un sessiz bir hastane odasında, hasta yatağında yapılabileceği gösterilmiştir (141, 142). Ancak YFO konvansiyonel frekans aralığında işitme kaybı olan hastalarda yapılamayabilir (143, 144). Hastada daha önceden var olan işitme kaybının varlığı da YFO'nun yararlılığını kısıtlar.

Sisplatin toksisitesi ilk olarak kohleada dış tüylü hücreleri etkilediği için erken tanı için DTH fonksiyonu ile ilişkili olan otoakustik emisyon (OAE) testleri de kullanılabilmektedir. Klinikte en çok transient OAE (TEOAE) ve distorsiyon ürünü OAE (DPOAE) testleri kullanılmaktadır. Literatüre bakıldığında TEOAE (145, 146) ve DPOAE (147, 148) cevapları konvansiyonel işitme eşiklerinden daha önce, ancak YFO eşiklerinden daha geç değişme eğilimindedir. Çocuklarda ototoksisite monitorizasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada YFO'nin DPOAE'dan daha önce değişiklikleri saptadığı ve bu iki testin de konvasiyonel frekans aralığında bakılan eşik değerlerinden daha önce değiştiği görülmüştür (149). Distorsiyon produkt OAE'nin sisplatinin ilk önce etkilemiş olduğu yüksek frekansları daha iyi ölçmesi sebebiyle ototoksik değişiklikleri TEOAE'dan daha erken saptadığı düşünülmektedir (148). Ayrıca DPOAE'nin şiddetli sensörinöral işitme kayıpta bile TEOAE'ye göre daha iyi kayıt alabildiği belirtilmektedir (150, 151).

Yüksek frekans odyometri ve OAE testlerin işitme kayıplı hastalarda, bilhassa yaşlı hastalarda kullanılması problemli olabilir (143, 144, 148). Otoakustik emisyon testleri özellikle de DPOAE, çocuklarda sisplatine bağlı oluşan ototoksisitenin monitorizasyonunda kullanımı uygun bir testtir. *Coradini ve arkadaşlarının* çalışmasında YFO ve DPOAE sonuçları arasında tutarlılık saptanmıştır (97). Öte yandan *Knight'ın* çalışmasında YFO genellikle OAE testlerine göre değişiklikleri daha erken saptamıştır. Çocuklarda otitis medianın sık görülmesi, sisplatin alan hastaların immunsupresif özellikleri ve baş boyun kanserli olgularda bu bölgeye alınan radyasyon OAE testi için kısıtlayıcı durumlardır. Bu nedenle OAE testlerinin timpanogram ve ideal olarak çoklu frekans timpanogram testleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir (131).

Ototoksik ilaçların, özellikle de sisplatinin sık yan etkilerinden biri tinnitustur (152, 153). Ancak şu anda tinnitus ile ototoksisite monitorizasyonu gelişmiş değildir. Tinnitus değerlendirme methodları seyrek olarak raporlanmaktadır. Tinnitusun ototoksisitenin erken belirteci olduğu konusunda yaygın bir kanı olmasına rağmen YFO ve OAE değişikliklerinden daha önce belirdiğine ilişkin resmi bir araştırma mevcut değildir.

İşitsel uyarılmış potansiyel testleri ise ototoksisite monitorizasyonu için potansiyel, cazip testlerdir. *Tlunak ve arkadaşları* 8000 Hz ve üzerindeki cevapları çalışmalarında raporlamışlardır (154). Yüksek frekans işitsel uyarılmış potansiyel testleri YFO testleri gibi davranışsal cevap gerektirmemesinden dolayı hasta popülasyonda ve kemoterapi alan çocuklarda daha elverişlidir. Tekrarlayan sedasyon gereksinimi bir dezavantaj oluştursa da bu durum magnetik rezonans

inceleme, kemik iliği biyopsisi gibi işlemler için zaten anestezi alması gerekecek olan çocuklarda eş zamanlı olarak yapılabilir.

Sisplatin ototoksitesi monitorizasyonu için her ilaç kürü öncesi tekrarlayan değerlendirmeler yapılmalıdır. Siplatin, gecikmeli ve ilerleyici işitme kaybı yapabileceği için takipler kemoterapi bitiminden birkaç ay sonrasına kadar devam ettirilmelidir. Bu durum medikal takipler için yapılacak görüşmelerle kordine edilebilir. Eğer hasta baş boyun bölgesine radyasyon almışsa monitorizasyon bir veya iki yıla kadar önerilir. Çünkü bu hastalarda işitme kaybı ilerlemeye devam edebilir (131).

2.8. Riluzol

Riluzol (2-amino-6-trifluoromethoxybenzothiazole) antikonvülzan, sedatif, antiiskemik, antiepileptik özellikleri olan nöroprotektif bir ajandır (36, 38, 39, 49). *Amerikan gıda ve ilaç kurumu (FDA)* tarafından amyotrofik lateral sklerozda hastalığın ilerlemesini yavaşlatma amaçlı geliştirilmiştir (40, 155). Yakın zaman çalışmalarda riluzolun apopitozisi ve nekrotik hücre ölümünü zayıflattığı, hatta önlediği bile söylenmektedir (54, 156). Riluzol, glutamat salınımını inhibe eder ve glutamat nörotransmitter antagonistisi olarak bilinir (50). Glutamat iç tüylü hücrelerle spiral ganglion nöronlarının ara yüzünde bulunan esas nörotransmitterdir (157). Aktivitesini NMDA, kainat ve alfa amino-3-hidroksil-5 metil-4-izoksol-propionik asid (AMPA) reseptörleri üzerinden göstermektedir (158).

Glutamatın aşırı salınımı postsinaptik reseptörlerin aşırı stimüle olmasına sebep olup spiral ganglion nöronlarına yoğun iyon geçişine izin vermektedir. Bu durumun direk olarak proapopitotik kaspaz kaskadını aktive ederek (159) ve

dolaylı olarak NMDA ilişkili nitrik oksit sentazı uyarıp ve nitrik oksit (NO) üretimini arttırarak hücre stresi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Yüksek seviyelerdeki NO süperoksid anyonların ve peroksinitrat gibi moleküllerin oluşmasına neden olur (160). Riluzol, antiglutamaterjik etkisini, Na^+ ve Ca^{++} bağımlı voltaj kanallarını bloke ederek, K^+ kanallarını ve G-protein bağımlı sinyal iletim yolunu aktive ederek yapmaktadır (41, 43, 161-164).

Riluzole yüksek voltaj kapılı N tipi ve P/Q tipi Ca^{++} kanallarını da bloke ederek nöroprotektif etkiye katkıda bulunabilir (46). Ca^{++} kanalları presinaptik bölgede glutamat salınımını kontrol eder. Glutamatın aşırı stimülasyonu spiral ganglion nöronları yüzeyinde bulunan NMDA reseptörlerini uyararak direk olarak kaspaz kaskadını ve dolaylı olarak nitrik oksit sentezini başlatır (159, 160).

Voltaj duyarlı Na^+ kanallarının spinal kord hasarlı deney modellerinde güçlü nöron koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (45). Riluzol, presinaptik Na^+ ve Ca^{++} iyon kanallarını bloke ederek ve presinaptik glutamat salınımını azaltarak yararlı etkilerini göstermektedir. Her ne kadar riluzolün nöroprotektif etkisinin kesin mekanizmaları netleşmemiş olsa da nöroprotektif etkinin Na^+ blokasyonu veya glutamat blokasyonu veya her ikisinin birlikte etkisiyle olabileceği düşünülmektedir (41, 44, 48-50, 164).

Oksidatif stres altında riluzolun glutamin alımını ve glutamat taşıyıcılarını (GluTs) aktive ederek glutatyon (GSH) sentezini başlattığı belirtilmiştir. Endojen glutatyonun reaktif oksijen ürünlerini temizleyen en iyi ve temel tiol tripeptidlerden biri olduğuna dikkat çekilmektedir (155).

Riluzol santral bölgede rol alması için üretilmiş bir ilaçtır. Farelerde kan - labirentin bariyerini çok az geçtiği gösterilse de çalışmalarda intraperitoneal sistemik uygulama ile kohlear bölgedeki etkileri gösterilmiştir (51, 53).

Ülkemizde 50 mg'lık tabletleri bulunmaktadır. Riluzol hidrofobiktir ve intraperitonel olarak verilebilmesi için deterjan benzeri ajanlarda çözülmesi gereklidir. Bunlar: dimetil sulfoksit (DMSO), dimetilforamid, methanol ve hidroklorür olabilir (51). Yayınlarda riluzolun 8 mg/kg sistemik dozunun akustik travma ile oluşan işitme kaybındaki etkisi gösterilmiş ve bu durum kobaylarda riluzolun etkili kan - beyin bariyeri ve kan - labirentin bariyeri geçişine sahip olduğunu ortaya koymuştur (53).

Çalışmamızda “**riluzol hidroklorid**” kullanılmış olup, serum fizyolojik ile çözülmüştür ve kobaylara intraperitonel olarak uygulanmıştır.

2.9. Kobay

Kobay (guinea pig), kemirgen ailesine ait memeliler grubundandır (165). Latince kemirgen anlamına gelen “*Rodentia*” takım ismini alır. Kobayların kulak yapıları insaninkiyle benzer özellikler taşır. Ayrıca uysal olmaları, boyutları ve temporal kemik uzunlukları sayesinde mikrodiseksiyon işlemi için en uygun olan hayvanlardır. Kobayların 8 türü vardır. Çalışmamızda “albino” cinsi, erkek, ağırlıkları 350-400 gr olan kobaylar kullanılmıştır (Resim 2.2).



Resim 2.2. Genç- erişkin kobay

2.9.1. Kobay Temporal Kemik Anatomisi

Kobaylarda temporal kemik kafatasının arka - alt tarafına yerleşmiştir (Resim 2.3). Kaudalde occipital, dorsalde parietal, rostralde frontal, palatine, sfenoid, maxilla ve ethmoid kemiklerle komşudur. Kemikler arasındaki bağlantılar sert değildir. Temporal kemikleri mastoid, petrosal, skuamöz ve timpanik kısımdan oluşur.

Timpanik kısım 3 bölüme ayrılır: **timpanik halka**, **timpanik bulla** ve **dorsal bulla**. Timpanik halka silindir şeklindedir ve dış kulak kanalının duvarlarını oluşturur. Tabanıyla timpanik bullanın lateral duvarını yapar. Bu silindirik yapının ön - alt kısmı daha uzundur ve yaklaşık 8 mm kadardır. Dış kulak kanalının en geniş yeri eksternal akustik meatustur, 4 mm çapında olup en dar bölgesi ise timpanik halkanın medial kemik halka ile birleştiği kısımdır ve çapı 3 mm'dir. Kobaylarda timpanik membran sadece pars tensadan oluşmaktadır ve 5- 6 um kalınlıktadır. Pars flaksida yerine ise kemik bir lamel olan supratimpanik krest bulunmaktadır. Timpanik membranın renk ve şekli insaninkiyle benzerdir, daha şeffaf yapıdadır (166).

Timpanik bulla kobay temporal kemiğinde önemli bir alana sahip olan kısımdır. Timpanik bullanın lateral kısmını fibröz tabakası olmayan, çok ince timpanik membran oluşturur. Bulla, anulustan sonra genişlemeye devam eder. Bundan ötürü bulla ile timpanik membran arasında zarın tamamının görülmesini engelleyen ölü bir boşluk mevcuttur. Bu nedenle dış kulak yolundan bakıldığında zarın ancak $\frac{1}{2}$ 'si görülebilmektedir. Bu durum *Göksu*, *Kayhan* ve *Sütbeyazın* çalışmalarında gösterilmiştir (167-170). Bullanın şekli kenarları yuvarlanmış yamuk şeklindedir ve duvarları ince kemik yapıdadır. Timpanik halkanın yukarısında, mastoid ve skuamöz parça ile sınır oluşturan ek hava hücreleri içeren

dorsal timpanik bulla olarak adlandırılan çıkıntı vardır. Timpanik bulla ve dorsal bulla arasında, beyne yakın tarafta, majör ve minör petrosal sinir bulunmaktadır (171). Timpanik bullanın dorsal bullaya boyutsal olarak oranı 5: 1 kadardır. Bu iki havalı alan, içinde inkudomalleol eklemine bulunduğu küçük bir geçiş dışında birbirlerinden ayrıdır. Ancak inkusun gövdesi ve malleusun baş kısmı dorsal bullada yerleşmiştir. Tanımlanan geçiş bölgesini o bölgede bulunan fasial kanal duvarı da daraltmaktadır. Dorsal bullanın insan anatomisindeki karşılığı “*superior bulla, attik veya epitimpanik reses*” olarak adlandırılmaktadır (167, 172).

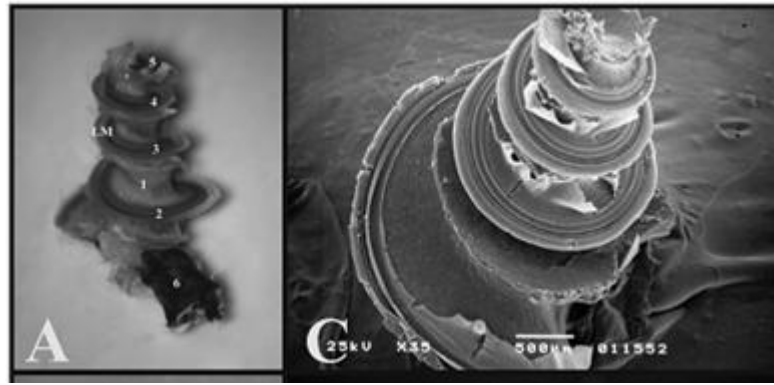
Timpanik bulla ince kemik duvarlarla çevrelenmiştir. Bu duvarlar iç kulağa ait yapıların bulunduğu medial duvar haricinde düz yapıdadırlar. Timpanik kavitenin medial duvarının ortadaki yapısı kohleanın bazal kısmına ait oluşan, insan anatomisindeki analogu promontoryum olan kemik yükseltidir. Antero - lateral ve rostralden bakıldığında bu yapının uzun aksının postero – infero - medialden yükseldiği görünür. Kohlear yükseltinin en uç noktası bulla içerisinde askıda durmakta ve diğer hiçbir yapı ile temas etmemektedir. Bulla medial duvarının superior kısmında oval pencere, yuvarlak pencere, piramidal eminens, stapes kas tendonu, tensor timpani kası, semisircüler kanallar bulunmaktadır.

Kobaylarda 2 adet kemikçik bulunmaktadır. Malleus ve inkus birleşik olup, stapes üçgen şeklindedir. Stapes krurası ile taban arasında *krista stapedius* bulunmaktadır (173).

Kobay kohleası 3 tam ve 1 yarım dönüş yapmaktadır. *Albuquerque* ve *arkadaşları* elektron mikroskopik olarak kohlear yapıları analiz etmişlerdir. Kobayların bazal dönüş, 2. dönüş, 3. dönüş ve apikal dönüşleri mevcuttur. Tüm dönüşlerde tektorial membran, Reissner membranı, Corti organı ve Hensen hücrelerine rastlanmıştır (173). Kobay kohleası membranöz labirenti ve kohleanın elektromikroskopik görüntüsü Resim 2.4’de gösterilmektedir.



Resim 2.3. Kobay kafatası, A) Kobay kafa tabanından timpanik bullanın görünümü C) Kobay kafatası yandan görünüm,



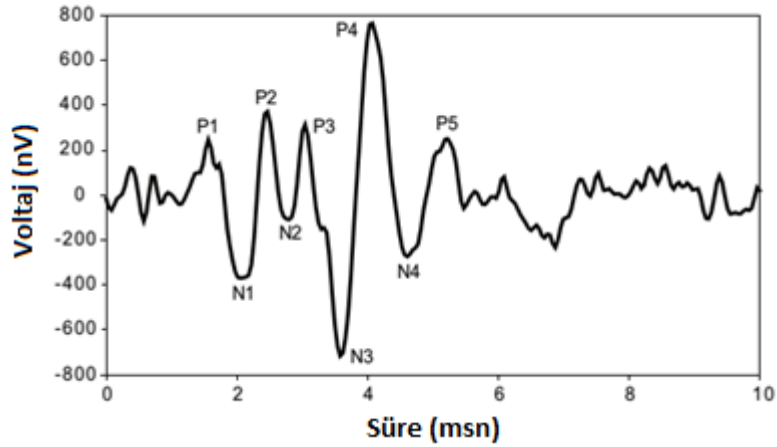
Resim 2.4. Kobay kohleası membranöz labirenti, A) Genç kobay kokleasında membranöz labirentin görünümü, C) Kobay kokleasının elektromikroskopik görünümü

2.9.2. Kobayda İşitsel Beyin Sapı Cevapları

İşitsel elektriksel akımların varlığı ilk olarak 1875 yılında *Caton* tarafından yapılan hayvan deneyleri ile ortaya çıkarılmıştır. Uyarılmış işitsel potansiyellerini erken, orta ve geç latans cevapları olarak 3 grupta sınıflandırabiliriz. Uyarıyı takiben 1-10 ms içinde oluşan ve İBC adı verilen potansiyeller erken latans cevaplarıdır (174-176).

Wada ve Starr'ın 1983 yılında yaptıkları çalışmada uyarının başlangıcından sonraki ilk 10 ms'de 5 pozitif ve 4 negatif dalgadan oluşan İBC'leri elde etmişlerdir. Pozitif dalgalar “P”, negatif dalgalar “N” olarak belirtilmiştir. Bu çalışmaya göre kobay İBC'inde P1- N1 ipsilateral VIII. sinirden,

P2- N2 ipsilateral koklear nükleustan, P3 kontralateral superior oliver kompleksten, N3 kontralateral lateral lemniskustan, P4 her iki superior oliver kompleksten, N4 her iki lateral lemniskustan kaynaklanmaktadır. P4 ve P5'in amplitüdleri %60 oranında az olup, belirsizlerdir (175, 176). Literatürde kobaylarda yapılan İBC incelemesinde saptanan dalga sayıları hakkında değişik rakamlar verilse de, çalışmaların genelinde ilk dört dalga değerlendirmeye alınmıştır. Bu dalgalar içinde en yüksek amplitüdü olan ve rahatça tanımlanabilen dalga III. dalgadır (87). Çalışmamızda dalgalar belirlenirken III. dalga referans kabul edildi. Kobaylarda İBC eşiği belirlenirken III. dalganın görüldüğü minimum seviye esas alındı.



Resim 2.5. Kobay İşitsel beyin sapı cevapları

3. MATERYAL VE METHOD

Çalışmamız Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi olarak yapılmıştır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirilen çalışma için etik kurul izni alınmıştır (Karar tarihi: 7.4.2011; sayı: B.30.2.GÜN.0.05.06.00/80-6489) (Ek 1).

Çalışma esnasında *Helsinki Nihai Senedi*'ndeki deneysel hayvan çalışmaları ile ilgili maddelerin tümüne uyuldu.

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneysel çalışma için Hıfzısıhha laboratuvarından elde edilen, ağırlıkları 350- 400 gr arasında değişen, genç - yetişkin, albino tip, sağlıklı, erkek kobaylar kullanıldı. Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından her bir grup için 8 hayvana izin verilen çalışmada 3 grup bulunmaktadır.

Grup 1

Birinci gruba 3 gün süre ile 5 mg / kg sisplatin (Cisplatin DBL, Faulding Pharmaceuticals, Warwickshire, UK) intraperitonel olarak (i.p) ve yarım saat öncesinde 2 ml serum fizyolojik (i.p) verildi

Grup 2

İkinci gruba 3 gün süre ile 5 mg/ kg sisplatin intraperitonel olarak ve yarım saat öncesinde 6 mg/ kg riluzol hidroklorid (Riluzole hydrochloride 25 mg, Sigma) (i.p) verildi. Riluzol hidrokloridin çözeltisi serum fizyolojikle hazırlandı. İntraperitonel olarak verilen çözeltinin hacmi 2 ml olacak şekilde ayarlandı.

Grup 3

Üçüncü gruba 3 gün süre ile 5 mg /kg sisplatin (i.p) ve yarım saat öncesinde 8 mg/kg riluzol hidroklorid (i.p) verildi. Riluzol hidroklorid ve serum fizyolojikle hazırlanan çözelti ikinci gruptaki gibi 2 ml hacminde intraperitoneal verilecek şekilde hazırlandı.

Kobaylar 1. grup (S grubu) için **S1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8**; 2. grup (R6 grubu) için **R6.1, R6.2, R6.3, R6.4, R6.5, R6.6, R6.7, R6.8**; 3. grup (R8 grubu) için **R8.1, R8.2, R8.3, R8.4, R8.5, R8.6, R8.7, R8.8** olarak kodlandı.

İkinci ve üçüncü gruptaki birer kobay (sırasıyla R6.8 ve R8.1 kodlu) ilaç uygulamasının ikinci gününde ex oldu, çalışmaya 22 kobay ile devam edildi.

İlaç uygulaması boyunca, ilaçların nefrotoksik etkisinden korunma amaçlı tüm hayvanlara subkutan (s.c) olarak yirmişişer cc serum fizyolojik, 3 gün boyunca verildi.

3.2. Anestezi

Odyolojik incelemelerden önce kobaylara 5 mg/ kg Xylazine (Rompun ®, Bayer Vital, Leverkusen, Germany) ve 35 mg/ kg Ketamin HCl (Ketalar ®, Eczacıbaşı Warner Lambert, İstanbul, Türkiye) karışımı %2'lik solüsyon halinde intramuskuler enjeksiyonla verilerek anestezi sağlandı.

Kobayların sakrifikasyonu öncesi yüksek doz Xylazine ve Ketamin HCl karışımı intamuskuler olarak uygulandı ve intrakardiak kan alımı ile ötenazi gerçekleştirildi.

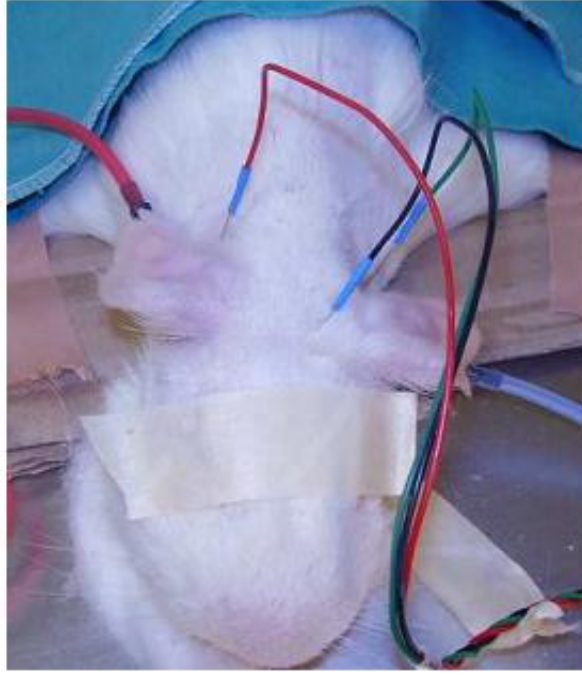
3.3. Odyolojik İnceleme

Çalışmamızda elektrofizyolojik test olarak işitsel beyin sapı cevabı (İBC) kullanılmıştır. Tüm kobayların çalışma öncesi çift taraflı işitsel beyin sapı cevaplarına bakılmıştır. Tüm kobayların kulak muayeneleri ameliyat mikroskobu (Carl Zeiss OPMİ 9- FC) ile yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen kobayların dış kulak yollarının ve kulak zarlarının normal görünümde olmasına dikkat edilmiştir, buşon varlığında temizliği yapılmıştır.

Çalışmaya alınan kobayların İBC ölçümleri Bio - Logic Systems Corp. Marka Navigatör Pro Model (2. 2. 0 versiyonu) cihaz ile gerçekleştirildi. İşitsel beyin sapı cevabı ölçümlerine başlanmadan önce paslanmaz çelikten 20 x 0.30 mm'lik iğne elektrotlar (Magstim marka Neurosign, 100) kullanılmıştır. Toprak elektrot sol mastoid bölge ve referans elektrot sağ mastoid bölge cilt altına, aktif elektrot vertekste cilt altına yerleştirilmiştir (Resim 3.1). Elektrotlar birbirine değdirildiğinde elektrot impedansının “0” Kohm, kobaylara yerleştirildikten sonra ise impedansın “5” Kohm altında olmasına dikkat edilmiştir. Ölçülen taraftaki DKY'dan kanal içine pediatrik kulak probları yerleştirilmiştir.

İşitsel beyin sapı cevaplarının ölçümünde 13.00 *rate click* uyarı, 10 msn analiz zamanı, 1000 *sweep*, 100-1500 Hz filtreleme rarefaction polarite kullanılmıştır. 70 dB nHL şiddet seviyesinde kayda başlanmış alınan yanıtlara göre şiddette değişiklik yapılmıştır. İBC değerlendirmesinde “click” ve “tone-burst” uyarı kullanılmıştır. Tone-burst uyarı 8 kHz'de alternating polaritede, 50-1500 Hz band-pass filtreleme yapılarak uygulanmıştır.

Tüm gruptaki kobayların son ilaç uygulamalarından 24 st sonra, hayvanlar sakrifiye edilmeden önce İBC ölçümleri tekrarlanmıştır.



Resim 3.1. Kobayda elektrotların yerleştirilmesi

3.4. Cerrahi Uygulama

Çalışmada kalan 22 kobaya ilaç uygulamasının bitimini takip eden gün yapılan odyometrik incelemeler sonunda ötanazi işlemi uygulandı. Kobayların öncelikle sağ temporal kemik rezeksiyonu yapıldı. Timpanik bulla kohleaya uzak bir şekilde çalışılarak açıldı ve kohlea orta kulakta görüldü. Kohleanın çevresindeki temporal kemiğe ait kısımlar kohlea etrafında minimal kemik dokusu bırakılacak şekilde alındı. Kohleanın bulunduğu kemik kısım histoloji ve embriyoloji bölümü tarafından hazırlanmış olan %2.5'luk gluteraldehidli solüsyon içerisine atıldı ve bölüme teslim edildi. Daha sonra kobayların sol temporal kemik rezeksiyonu yapıldı ve mikroskop altında kohleayı saran kemik labirent ince bir pik yardımıyla kırıldı ve membranöz labirent tamamen ortaya koyulacak şekilde temizlendi. Takiben membranöz labirent çıkarıldı. Öncelikle geçici süre için

soğuk nitrojen dolu tüplere ve takiben -80 °’de saklanmak ve biyokimyasal incelemede kullanılmak üzere ayrıldı.

3.5. Biyokimyasal İnceleme

Doku ve plazma malandialdehid (MDA) düzeyleri kolorimetrik yöntemle hazır kitler (Northwest Life Science Specialties, LLC, NWLSS™ Malondialdehyde Assay) kullanılarak analiz edildi. Yöntem MDA ile tiobarbütirik asidin (TBA) reaksiyonunu ve oluşan ürünün 532 nm dalga boyunda ölçümünü temel almaktadır

Plazma glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri kolorimetrik yöntemle hazır kitler (Cayman Chemical Company) kullanılarak analiz edildi

3.6. Transmisyon Elektromikroskopik İnceleme

Alınan doku örnekleri transmisyon elektromikroskop (TEM) (Carl Zeiss EVO LS10) ile incelemenin yapılabilmesi için, %2.5’luk gluteraldehit ile hazırlanan EDTA solusyonuna alınarak, dekalsifiye edildi. Sonrasında %1’lik osmiyum tetroksite 1 saat etkin bırakılan dokuların ikinci tespitleri ve boyanmaları sağlandıktan sonra alkol serilerinden geçirildi. 30 dakika propilen oksitte bekletilen dokular sonrasında, propilen oksit ve gömme materyali (R-1030, Araldit CYC212 Epoxy- Resin Kit, Agar, USA) içinde 30 dakika daha bekletilerek gömme materyalinin doku içine geçişi sağlandı. Bu aşamadan sonra gömme materyali içine alınan dokular 2 saat rotatorda oda ısısında, 2 saat 40 °C’de etüvde bekletildi. Son olarak dokular aynı karışım ile yatay gömme bloğuna gömüldü. Hazırlanan bloklardan LKB Leica ultramikrotom ile 1µ’luk kesitler alındı ve toluidin mavisi (Code: T3260, Sigma) ile boyandı. Bilgisayar donanımlı

foto-ışık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Germany) ile incelenen kalın kesitlerden belirlenen bölgeler işaretlenerek formvar kaplı bakır gridler üzerine 0,2–0,5µ'luk ince kesitleri alındı. Alınan kesitler kontrast sağlamak amacıyla, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EVO LS10 TEM-SEM elektron mikroskobunun TEM bölümünde incelenerek fotoğraflandırıldı. Dejenerasyon tabloları oluşturulurken belirlenen kriterler, o gruba ait her bir denek için 0: yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: kuvvetli olarak skorlandırıldı.

Elektromikroskopik inceleme her gruptan 6 kobay olmak üzere toplam 18 kobayın sağ temporal kemiklerinde bulunan kohlealara yapıldı. Bunun nedeni inceleme için gerekli kesit alma prosedürleri sırasında bazı kohlealara (S1, S2, R67, R86, kodlu) ait kesitlerden sağlıklı görüntü alınamamasıydı.

Kohleaları elektromikroskopik olarak incelenmiş olan kobay kodları şunlardır: S3, S4, S5, S6, S7, S8, R6.1, R6.2, R6.3, R6.4, R6.5, R6.6, R8.2, R8.3, R8.4, R8.5, R8.7, R8.8.

3.7. İstatiksel Değerlendirme

İstatiksel analizler SPSS for Windows Version 15.0 paket programında yapılmıştır. Kobayların grup içi minimum ve maximum İBC eşikleri verilmiştir ve sayısal değişkenler için ortanca kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar için Kruskal-Wallis Varyans analizi uygulanmıştır. Grupların ikili olarak karşılaştırılması için Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmayı oluşturan 3 gruba ait elektrofizyolojik, elektromikroskopik ve biyokimyasal bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.1 İşitsel Beyin Sapı Cevapları (İBC)

Çalışmadaki tüm kobayların ilaç öncesi İBC eşikleri kaydedildi. Ancak ilaç sonrası 2. ve 3. gruptan birer kobayın (sırasıyla R6.8 ve R8.1 kodlu) ölmesi üzerine İBC'ler kalan 22 kobay üzerinden analiz edildi. Tablo 4.1'de kobayların ilaç öncesi ve sonrası sağ ve sol kulaklarında click uyarı ve 8 kHz'de tone burst uyarı İBC eşik değerleri özetlenmiştir.

Tablo 4.1. İlaç öncesi ve sonrası 1., 2., ve 3. gruplara ait minimum ve maximum İBC eşik değerleri ve ortancalar

			Grup 1 <i>Min, max</i> <i>Ortanca</i> (dB)	Grup 2 <i>Min, max</i> <i>Ortanca</i> (dB)	Grup 3 <i>Min, max</i> <i>Ortanca</i> (dB)
Click	İlaç öncesi	Sağ	(0) – (10) 0	(-10) – (10) 0	(0) – (0) 0
		Sol	(0) – (10) 0	(0) – (10) 10	(-10) – (10) 0
	İlaç sonrası	Sağ	(10) – (20) 20	(0) – (20) 10	(0) – (20) 10
		Sol	(0) – (30) 20	(0) – (30) 10	(0) – (10) 10
8 kHz	İlaç öncesi	Sağ	(-10) – (10) 0	(-10) – (0) 0	(-10) – (0) 0
		Sol	(-10) – (0) 0	(-10) – (10) 0	(-10) – (10) 0
	İlaç sonrası	Sağ	(10) – (40) 25	(-10) – (10) 0	(0) – (10) 0
		Sol	(10) – (40) 20	(-10) – (30) 10	(0) – (10) 10

Üç grubun ilaç öncesi click ve 8 kHz tone burst uyarandaki İBC eşikleri sağ ve sol kulaklar için birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Sadece salin verilen grupta ilaç sonrası İBC eşiklerinin click ve tone burst uyaranda yükseldiği görülmüştür. İlaç sonrası click uyaranda sol kulaklarda ve 8 kHz tone burst uyaranda sağ ve sol kulaklarda gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır (Tablo 4.2 ve 4.3). İlaç öncesi ve sonrasındaki tone burst ve click uyaranda İBC eşikleri Grafik 4.1 ve 4.2 gösterildi.

Tablo 4.2. İlaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

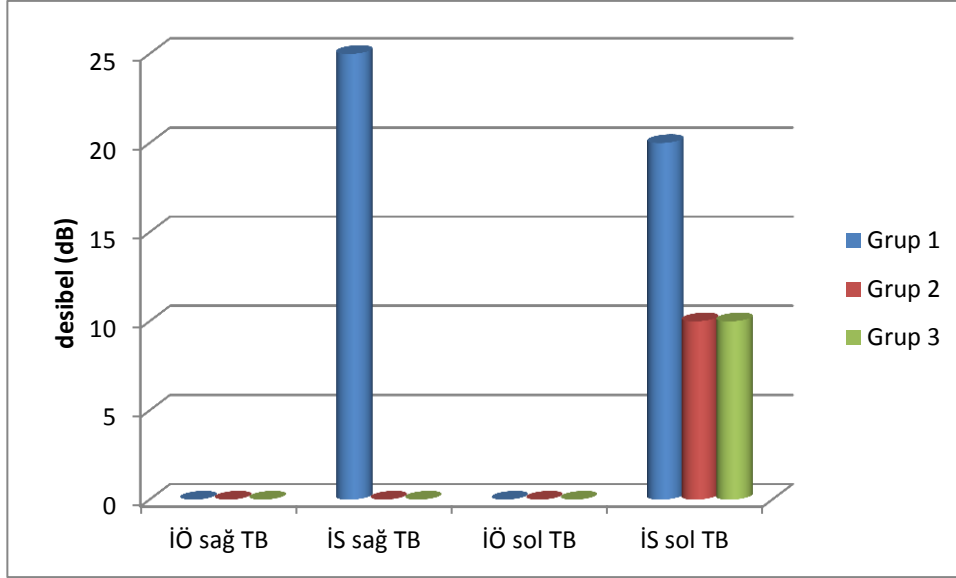
	İlaç Öncesi Sağ / Click (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Click (dB)	İlaç Öncesi Sol / Click (dB)	İlaç Sonrası Sol / Click (dB)
	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>
Grup 1	0 (0-10)	20 (10-20)	0 (0-10)	20 (0-30)
Grup 2	0 ((-10)-10)	10 (0-20)	10 (0-10)	10 (0-30)
Grup 3	0 (0-0)	10 (0-20)	0 ((-10)-10)	10 (0-10)
	p*=0,19	p*=0,27	p*=0,39	p*=0,04

*: Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.3. İlaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

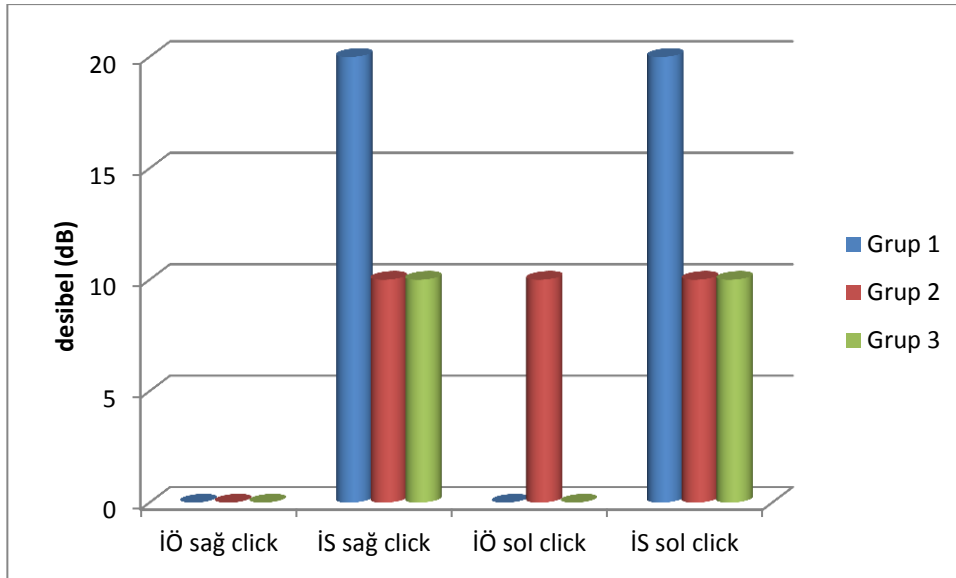
	İlaç Öncesi Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Öncesi Sol / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sol / Tone burst (dB)
	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>
Grup 1	0 ((-10)-10)	25 (10-40)	0 ((-10)-10)	20 (10-40)
Grup 2	0 ((-10)-0)	0 ((-10)-10)	0 ((-10)-10)	10 ((-10)-30)
Grup 3	0 ((-10)-0)	0 (0-10)	0 ((-10)-10)	10 (0-10)
	p*=0,38	p*=0,01	p*=0,46	p*=0,01

*: Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır



Grafik 4.1. İlaç öncesi ve sonrasındaki tone burst uyaranda İBC eşikleri.

İÖ: ilaç öncesi, İS: ilaç sonrası, TB: tone burst



Grafik 4.2. İlaç öncesi ve sonrasındaki click uyaranda İBC eşikleri.

İÖ: ilaç öncesi, İS: ilaç sonrası

İlaç öncesi ve ilaç sonrası 1. ve 2. gruplar arasında İBC eşik değerleri karşılaştırıldı. İlaç sonrası click uyaranda iki grup arasında anlamlı fark görülmezken ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyaranda sağ ve sol kulaklarda anlamlı fark saptandı (Tablo 4.4 ve 4.5).

Tablo 4.4. 1. ve 2. gruplarının ilaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması

	İlaç Öncesi Sağ / Click (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Click (dB)	İlaç Öncesi Sol / Click (dB)	İlaç Sonrası Sol / Click (dB)
	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>
Grup 1	0 (0-10)	20 (10-20)	0 (0-10)	20 (0-30)
Grup 2	0 ((-10)-10)	10 (0-20)	10 (0-10)	10 (0-30)
	p*=0,21	p*=0,11	p*=0,46	p*=0,09

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.5. 1. ve 2. grupların ilaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması

	İlaç Öncesi Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Öncesi Sol / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sol / Tone burst (dB)
	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>
Grup 1	0 ((-10)-10)	25 (10-40)	0 ((-10)-10)	20 (10-40)
Grup 2	0 ((-10)-0)	0 ((-10)-10)	0 ((-10)-10)	10 ((-10)-30)
	p*=0,25	p*=0,01	p*=0,25	p*=0,02

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

İlaç öncesi ve ilaç sonrası 1. ve 3. gruplar arasında İBC eşik değerleri karşılaştırıldı. İlaç sonrası click uyaransa sol kulaklarda ve ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyaranda sağ ve sol kulaklarda anlamlı fark saptandı (Tablo 4.6 ve 4.7).

Tablo 4.6. 1. ve 3. gruplarının ilaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması

	İlaç Öncesi Sağ / Click (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Click (dB)	İlaç Öncesi Sol / Click (dB)	İlaç Sonrası Sol / Click (dB)
	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>
Grup 1	0 (0-10)	20 (10-20)	0 (0-10)	20 (0-30)
Grup 3	0 (0-0)	10 (0-20)	0 ((-10)-10)	10 (0-10)
	p*=0,08	p*=0,36	p*=0,21	p*=0,02

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.7. 1. ve 3. grupların ilaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması

	İlaç Öncesi Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Öncesi Sol / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sol / Tone burst (dB)
	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>	<i>Ortanca (min; max)</i>
Grup 1	0 ((-10)-10)	25 (10-40)	0 ((-10)-10)	20 (10-40)
Grup 3	0 ((-10)-0)	0 (0-10)	0 ((-10)-10)	10 (0-10)
	p*=0,25	p*=0,01	p*=0,68	p*=0,01

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

İlaç öncesi ve sonrası 2. ve 3. gruplar arasında İBC eşik değerleri karşılaştırıldığında sağ ve sol kulaklarda click ve 8 kHz tone burst uyarılarda anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4.8 ve 4.9).

Tablo 4.8. 2. ve 3. gruplarının ilaç öncesi ve sonrası click uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması

	İlaç Öncesi Sağ / Click (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Click (dB)	İlaç Öncesi Sol / Click (dB)	İlaç Sonrası Sol / Click (dB)
	<i>Ortanca (min;max)</i>	<i>Ortanca (min;max)</i>	<i>Ortanca (min;max)</i>	<i>Ortanca (min;max)</i>
Grup 2	0 ((-10)-10)	10 (0-20)	10 (0-10)	10 (0-30)
Grup 3	0 (0-0)	10 (0-20)	0 ((-10)-10)	10 (0-10)
	p*=1,0	p*=0,49	p*=0,08	p*=0,70

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.9. 2. ve 3. grupların ilaç öncesi ve sonrası 8 kHz tone burst uyaranda İBC eşik değerlerinin karşılaştırılması

	İlaç Öncesi Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sağ / Tone burst (dB)	İlaç Öncesi Sol / Tone burst (dB)	İlaç Sonrası Sol / Tone burst (dB)
	<i>Ortanca (min;max)</i>	<i>Ortanca (min;max)</i>	<i>Ortanca (min;max)</i>	<i>Ortanca (min;max)</i>
Grup 2	0 ((-10)-0)	0 ((-10)-10)	0 ((-10)-10)	10 ((-10)-30)
Grup 3	0 ((-10)-0)	0 (0-10)	0 ((-10)-10)	10 (0-10)
	p*=1,00	p*=0,76	p*=0,39	p*=0,77

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır

Üç grup arasında click ve 8 kHz tone burst uyaranda kaydedilen İBC eşik değerlerindeki ilaç öncesi ve sonrasında meydana gelen değişim karşılaştırıldı.

Click uyararı sonrası anlamlı değişiklik gözlenmezken, tone burst uyararı sonrası sağ ve sol kulaklarda gruplar arasında anlamlı fark saptandı (Tablo 4.10 ve 4.11) Üç grupta ilaç uygulaması sonrası meydana gelen eşik değişimleri Grafik 4.3 gösterildi.

Tablo 4.10. Click uyararıda ilaç öncesi ve sonrası İBC eşik değerleri arasındaki değişimin gruplar arası karşılaştırılması

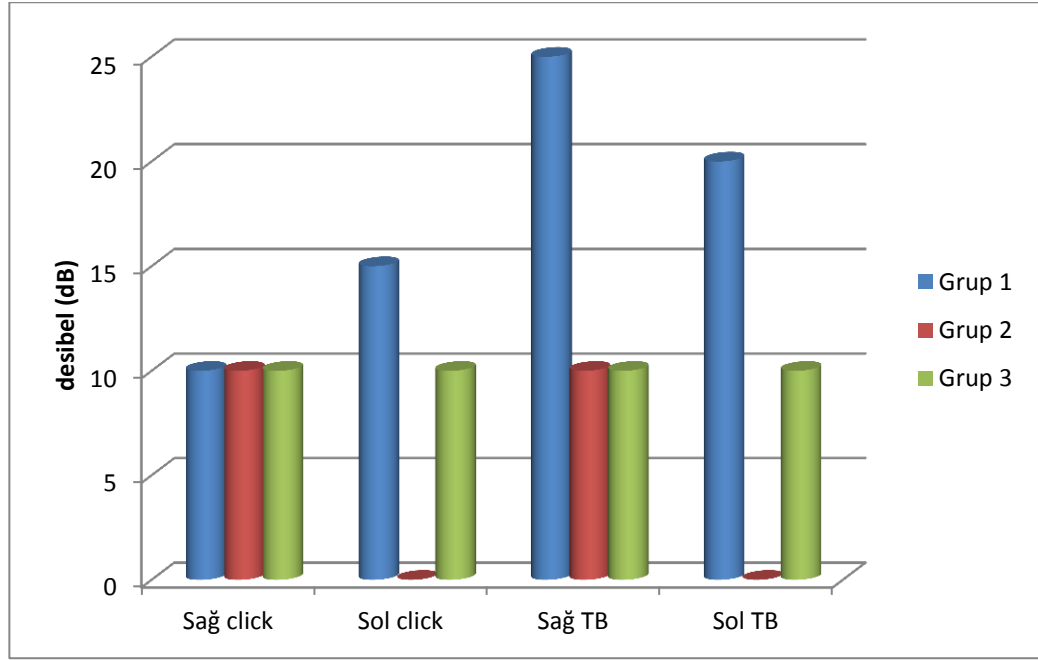
	Sağ Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Click (dB)	
	<i>Ortanca (min; max)</i>	p*	<i>Ortanca (min; max)</i>	p*
Grup 1	10 (0, 20)	0,74	15 (-10, 30)	0,11
Grup 2	10 (0, 20)		0 (0, 20)	
Grup 3	10 (0, 20)		10 (0, 20)	

*: Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.11. 8 kHz tone burst uyararıda ilaç öncesi ve sonrası İBC eşik değerleri arasındaki değişimin gruplar arası karşılaştırılması

	Sağ Kulak Eşik Değişim Tone burst (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim Tone burst (dB)	
	<i>Ortanca (min; max)</i>	p*	<i>Ortanca (min; max)</i>	p*
Grup 1	25 (10, 40)	0,02	20 (10, 50)	0,01
Grup 2	10 (-10, 20)		0 (0, 20)	
Grup 3	10 (0, 20)		10 (0, 20)	

*: Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır.



Grafik 4.3. İlaç uygulaması sonrası gruplarda meydana gelen eşik değişimleri.

TB: tone burst

İlaç öncesi ve ilaç sonrası click ve 8 kHz tone burst uyaran sonucu elde edilen İBC eşik değerleri arasındaki değişimler 1. ve 2. grup; 2. ve 3. grup; 2. ve 3. grup arasında karşılaştırıldı. Sisplatinle birlikte riluzol verilen gruplarla siplatinle birlikte serum fizyolojik verilen grup arasında, sağ ve sol kulaklarda tone burst uyaran ile alınan eşik değerlerde ilaç öncesi ve sonrasındaki eşik değişimleri arasında anlamlı fark bulundu. Riluzolun 6 mg/kg şeklinde verildiği 2. grup ile riluzolun 8 mg/kg şeklinde verildiği 3. grup arasında eşik değişimleri açısından anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4.12, 4.13 ve 4.14).

Tablo 4.12. 1. ve 2. grupların eşik değişimlerinin karşılaştırılması

	Sağ Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sağ Kulak Eşik Değişim / Tone burst (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Tone burst (dB)	
	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*
Grup 1	10 (0, 20)	0,53	15 (-10, 30)	0,06	25 (10, 40)	0,02	20 (10, 50)	0,01
Grup 2	10 (0, 20)		0 (0, 20)		10 (-10, 20)		0 (0, 20)	

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.13. 1. ve 3. grupların eşik değişimlerinin karşılaştırılması

	Sağ Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sağ Kulak Eşik Değişim / Tone burst (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Tone burst (dB)	
	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*
Grup 1	10 (0, 20)	0,89	15 (-10, 30)	0,13	25 (10, 40)	0,01	20 (10, 50)	0,02
Grup 3	10 (0, 20)		10 (0, 20)		10 (0, 20)		10 (0, 20)	

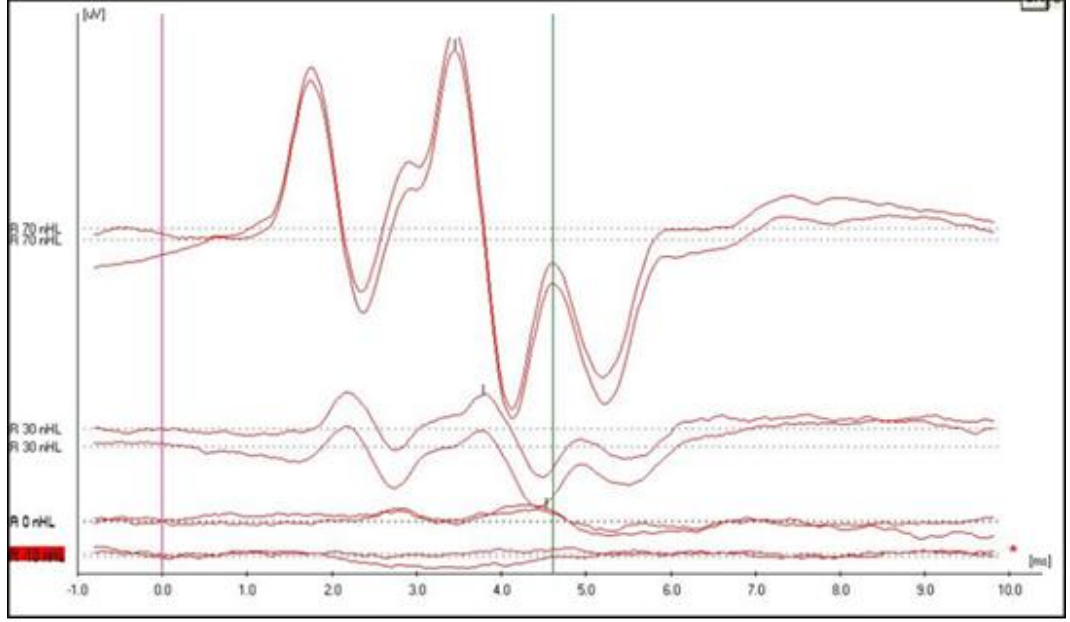
*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

Tablo 4.14. 2. ve 3. grupların eşik değişimlerinin karşılaştırılması

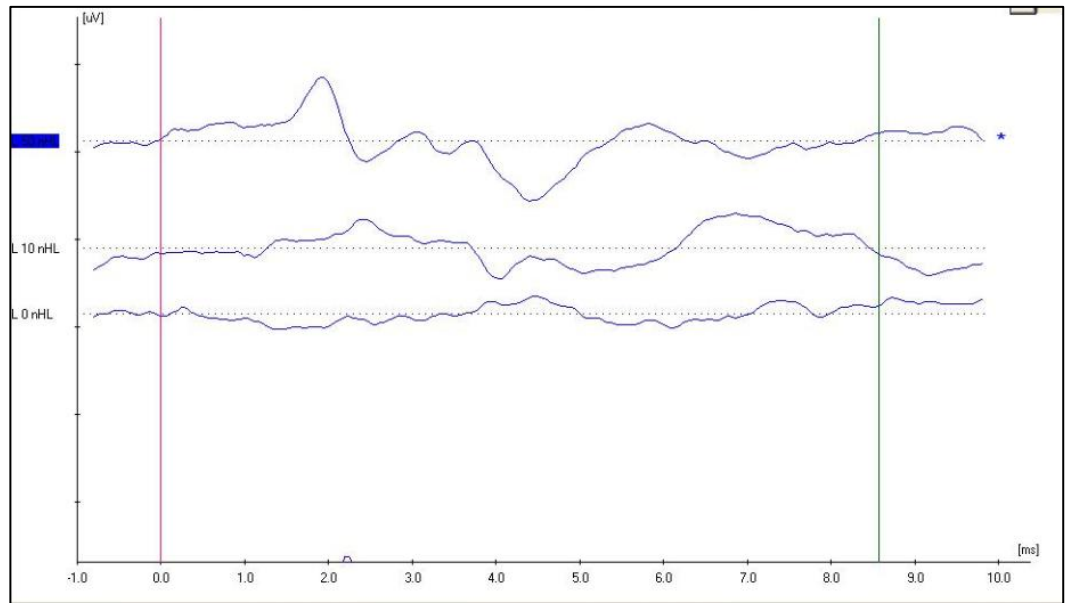
	Sağ Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Click (dB)		Sağ Kulak Eşik Değişim / Tone burst (dB)		Sol Kulak Eşik Değişim / Tone burst (dB)	
	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*	<i>Ortanca (min, max)</i>	p*
Grup 2	10 (0, 20)	0,49	0 (0, 20)	0,39	10 (-10, 20)	0,84	0 (0, 20)	0,39
Grup 3	10 (0, 20)		10 (0, 20)		10 (0, 20)		10 (0, 20)	

*: Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.

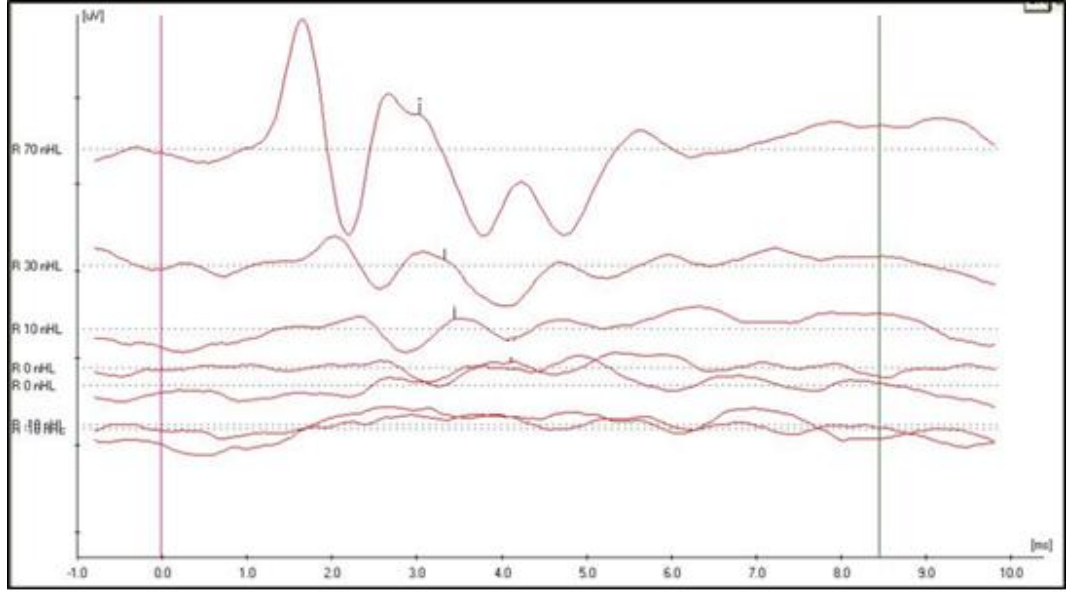
İkinci grupta bulunan R6.5 kodlu kobaya ait, ilaç öncesi ve ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyarandaki İBC cevapları Resim 4.1, 4.2, 4.3, 4.4’de gösterildi.



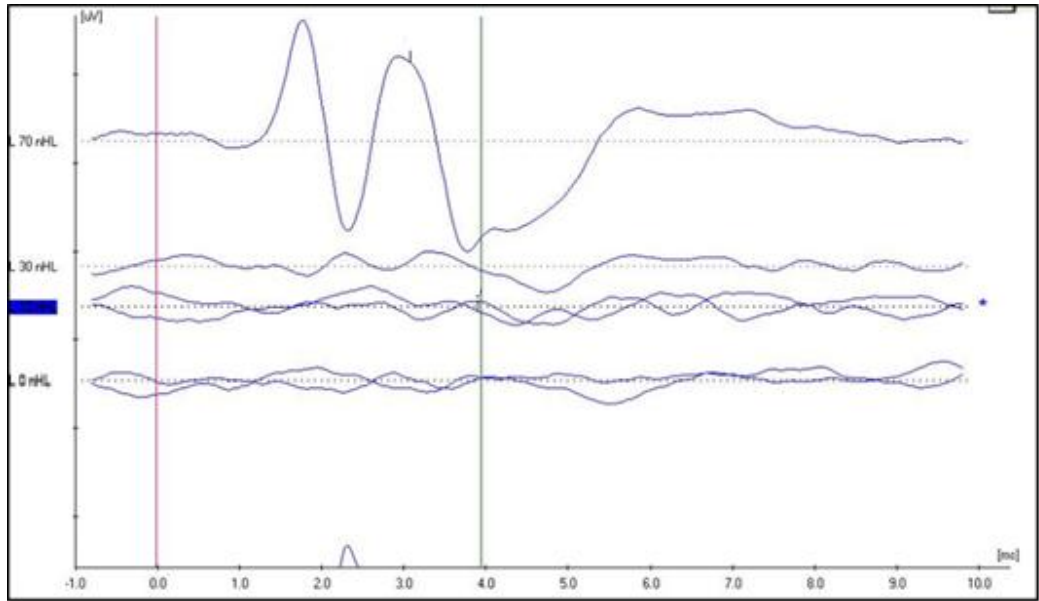
Resim 4.1. R6.5 kodlu kobaya ait ilaç öncesi 8 kHz tone burst uyaranda sağ kulak İBC görüntüsü



Resim 4.2. R6.5 kodlu kobaya ait ilaç öncesi 8 kHz tone burst uyaranda sol kulak İBC görüntüsü



Resim 4.3. R6.5 kodlu kobaya ait ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyaranda sağ kulak İBC görüntüsü

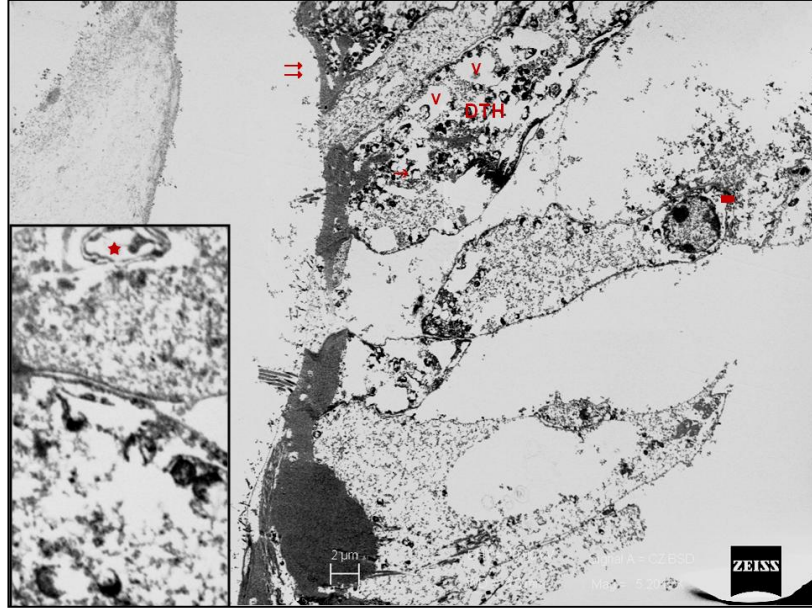


Resim 4.4. R6.5 kodlu kobaya ait ilaç sonrası 8 kHz tone burst uyaranda sol kulak İBC görüntüsü

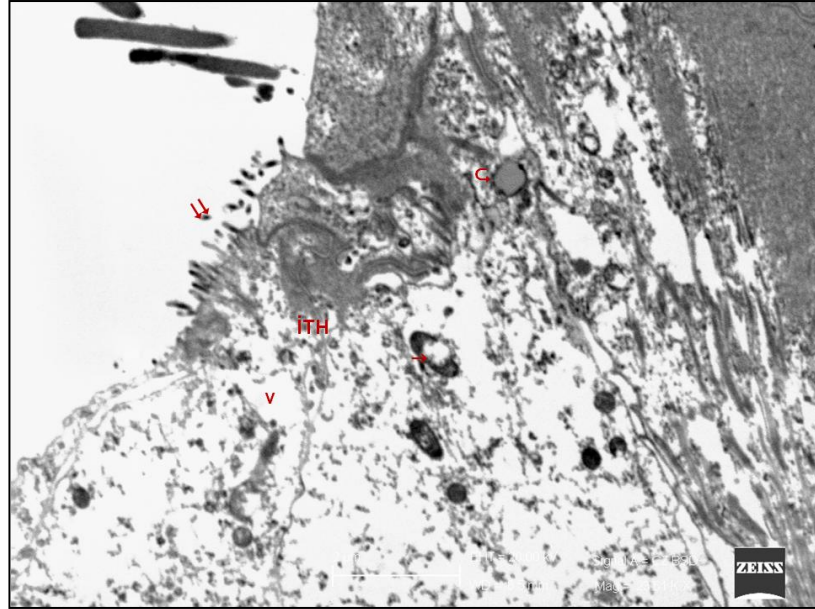
4.2 Transmisyon Elektromikroskopik İnceleme Bulguları

Grup 1

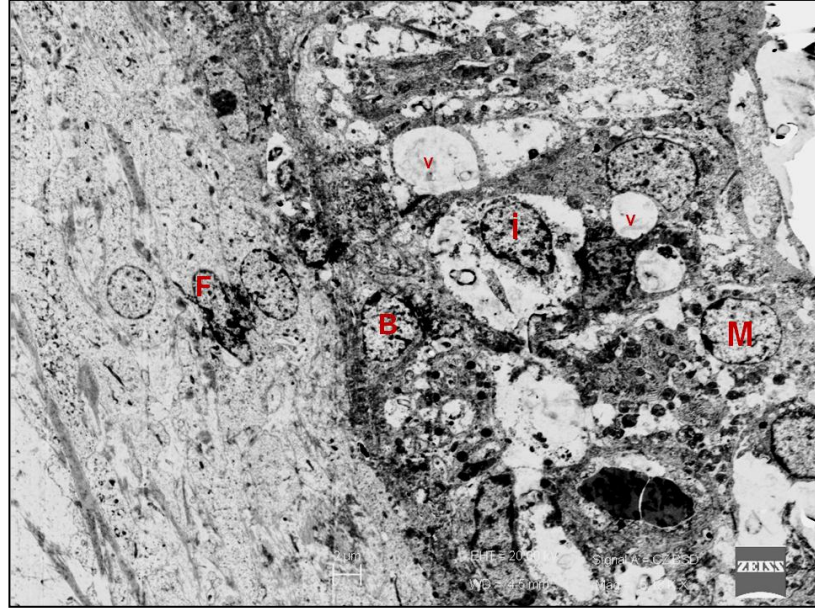
Bazı dış tüy hücrelerinde belirgin stereosilya kaybı izlenmekle birlikte stereosilyalarda da yapısal bozulmalar olduğu görüldü. Yine dış tüy hücrelerinin sitoplazmalarında irili ufaklı vakuoler oluşumlar saptandı. Mitokondriyonların hücre zarı altındaki olağan yerleşimleri bozulmuştu ve bunlar sitoplazmada dağınık halde izleniyordu. Yer yer mitokondriyonlarda kristolizis görüldü. Sinaptik kutuptaki afferent innervasyonda bozulmalar saptandı. Destek hücreleri ve dış tüy hücreleri arasında yan yüz bağlantılarındaki bozulmalar belirgindi. Tüm bulgulara ek olarak büyük büyültmeli incelemelerde miyelin benzeri figürler ayırt edildi. İç tüy hücrelerinde de dış tüy hücrelerinde izlenen dejeneratif bulgular belirgindi. Bu hücrelerde sitoplazmada çevresi elektron yoğun madde ile çevrelenmiş lipid damlacıkları dikkati çekti. Bu grupta stria vaskülaris epitelini oluşturan tüm hücre tiplerinde (marginal, intermediate, bazal hücreler ve fibroblastlar) belirgin dejeneratif bulgular izlendi. En bazalde bulunan fibroblastlar dışındaki tüm hücre tiplerinde dev vakuoler oluşumlar gözlemlendi. En büyük vakuolar yapıların intermedier hücrelerde oluştuğu saptandı. Kristolizis, miyelin figür oluşumları, elektron yoğun cisim akümülyasyonları görüldü. Epiteldeki damar yapılarının azalmış olduğu dikkati çekti. Hücre yan yüz bağlantıları ayırt edilemedi. İşitsel sinir liflerinde ise miyelin lamellerde ayrılmalar, aksonlar arası alanda miyelin figür oluşumları, akson içinde miyelin figür oluşumları, Schwann hücre sitoplazmasında dev vakuoler oluşumlar ve miyelin kılıfta elektron yoğun madde birikimi izlendi (Resim 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).



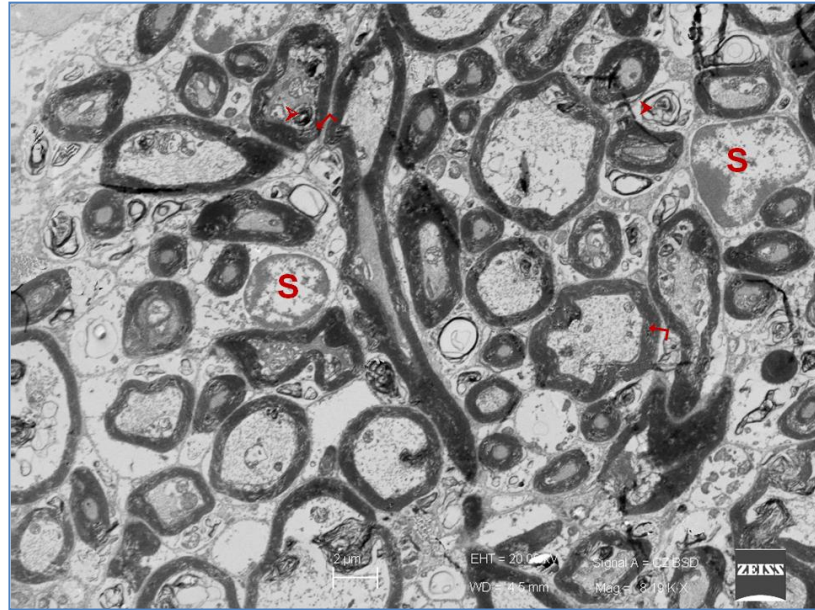
Resim 4.5. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında DTH: Dış tüy hücresi, ⇔: stereosilya kaybı, v: vakouller, →: kristolizis gösteren mitokondriyonlar, ■: afferent innervasyonda dejenerasyon, ★: miyelin benzeri figürler (inset) görülüyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



Resim 4.6. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında İTH: İç tüy hücresi, ⇔: stereosilya kaybı, v: vakouller, →: kristolizis gösteren mitokondriyonlar, C: elektron yoğun madde ile çevrelenmiş lipid damlası dikkati çekiyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



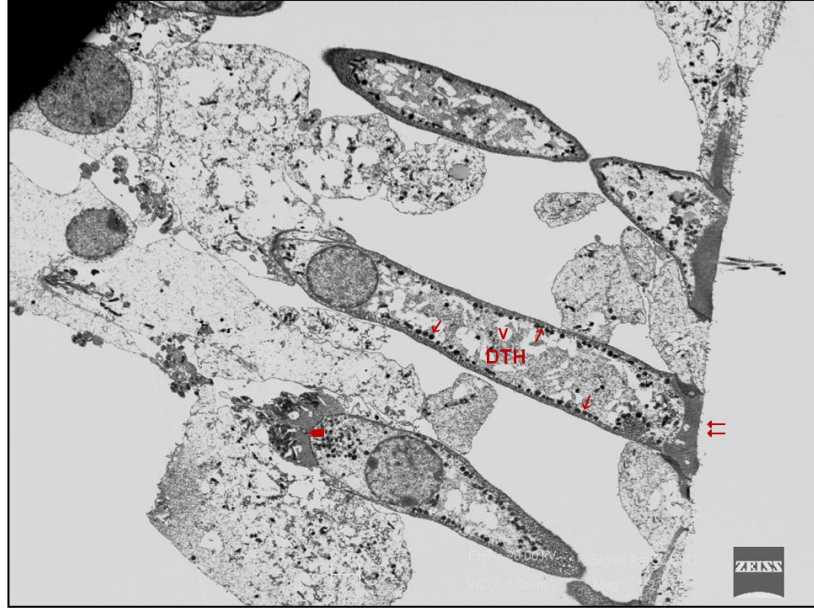
Resim 4.7. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında stria vasküleriste M: Marginal hücre, İ: İntermedier hücre, B: Bazal hücre, F: Fibroblast, v: vakouller izleniyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



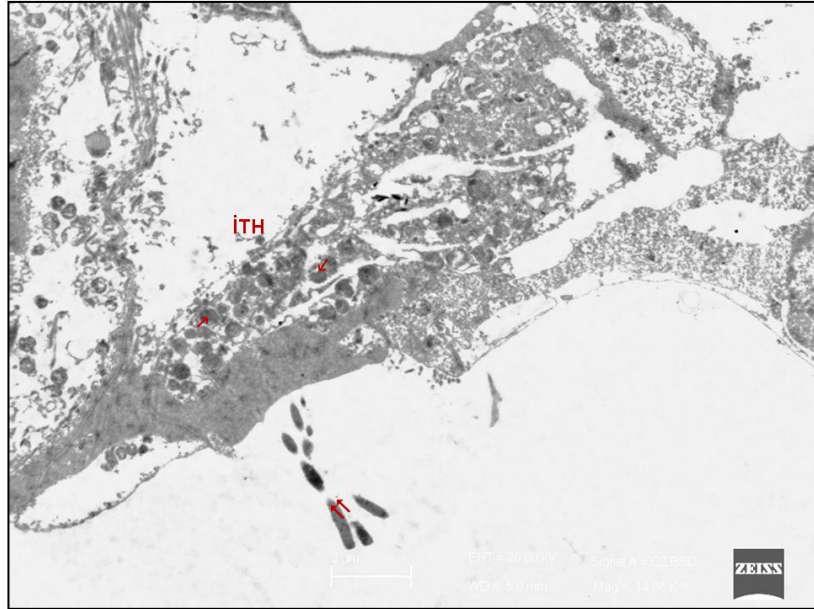
Resim 4.8. S grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında işitsel sinir liflerinde, S: Schwann hücreleri, x: miyelin lamellerdeki ayrılmalara, y: Akson içindeki miyelin figürleri, z: Aksonlar arasındaki miyelin figürleri ayırt ediliyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).

Grup 2

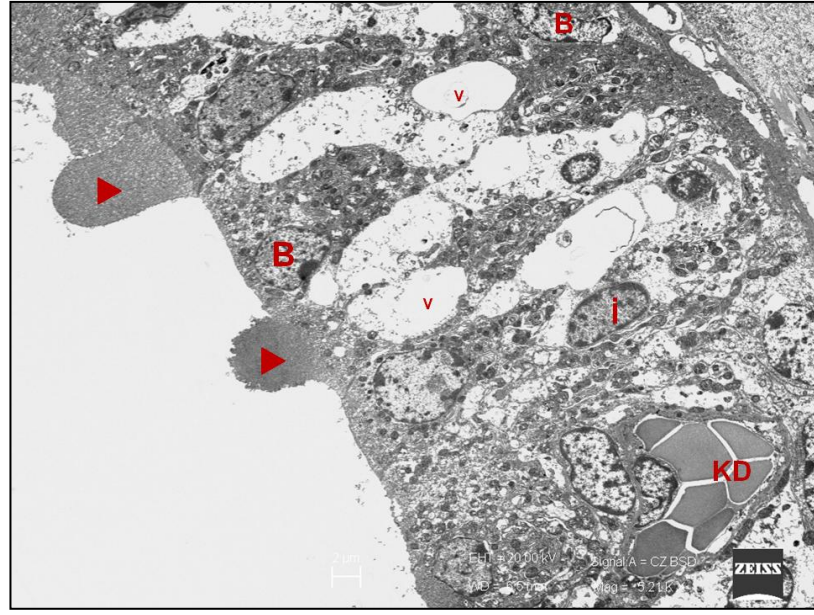
Bu grubun ince yapı özellikleri tabloda belirtilen dejenerasyon kriterleri açısından daha iyi bulundu. Bazı dış tüy hücrelerinde bir önceki gruba benzer olarak stereosilya kaybı belirgin olarak izlenmekle birlikte bu hücrelerde stereosilya yerine kısa düzensiz mikrovillus benzeri oluşumlar görüldü. Bir önceki gruptan ayrıcalıklı olarak mitokondriyonların hücre zarı altında yerleşim gösterdikleri ve S grubunda izlenen krista kaybının bu grupta önemli ölçüde gerilediği saptandı. Afferent innervasyonda bozulma görülmedi. Destek, iç ve dış tüy hücre sitoplazmalarında S grubundaki gibi dev oluşumlar olmasa da sayıca çok belirgin vakuoller izlendi. Tüm hücre tiplerinin çekirdek ve çekirdekçik yapıları normaldi. İç tüy hücrelerinde mitokondriyal krista kaybı izlenmezken, tabloda belirtilen dejeneratif kriterler açısından bir önceki gruba karşın önemli ölçüde dokunun yapısını koruduğu belirlendi. Bu grupta stria vasküleriste yapılan değerlendirmelerde S grubuna oranla ince yapı düzeyinde daha iyi bir görünüm belirlenmekle birlikte, dev vakuollerin halen varlıklarını sürdürdükleri izlendi. Bu grupta S grubundan ayrıcalıklı olarak marginal hücrelerin apikal hücre zarında düzensiz oluşumlar ayırt edildi. Bazı vakuollerin içinde miyelin benzeri figürler dikkati çekti. Kan damarlarının epitel içi dağılımları normaldi ve elektron yoğun cisim kümelenmeleri izlenmedi. İşitsel sinir liflerinde ise S grubundaki tüm dejeneratif bulguların halen varlıklarını sürdürdükleri saptandı (Resim 4.9, 4.10, 4.11, 4.12).



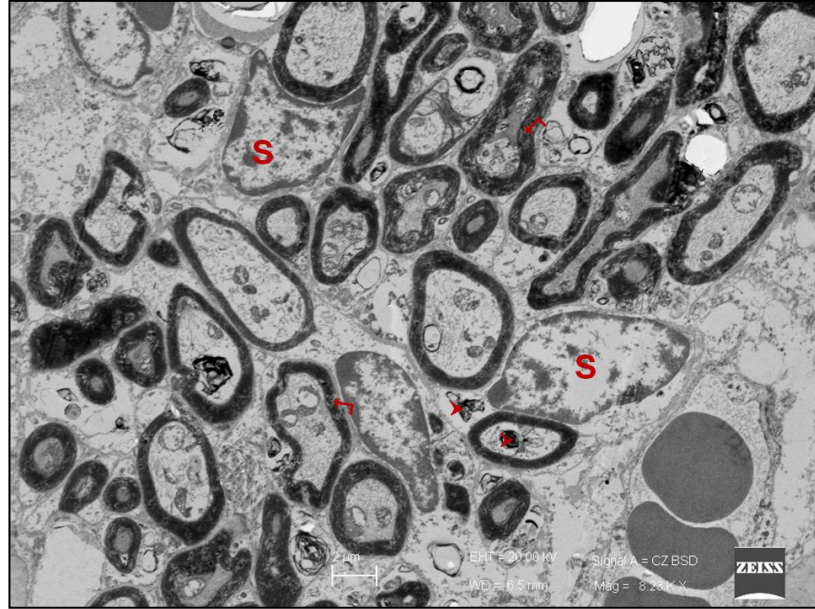
Resim 4.9. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında DTH: Dış tüy hücresi, ⇌: belirgin stereosilya kaybı, v: vakouller, →: hücre zarı altında düzenli yerleşim gösteren mitokondriyonlar, ■: afferent innervasyon görülüyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



Resim 4.10. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında İTH: İç tüy hücresi, ⇌: stereosilya, →: mitokondriyonlar izleniyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



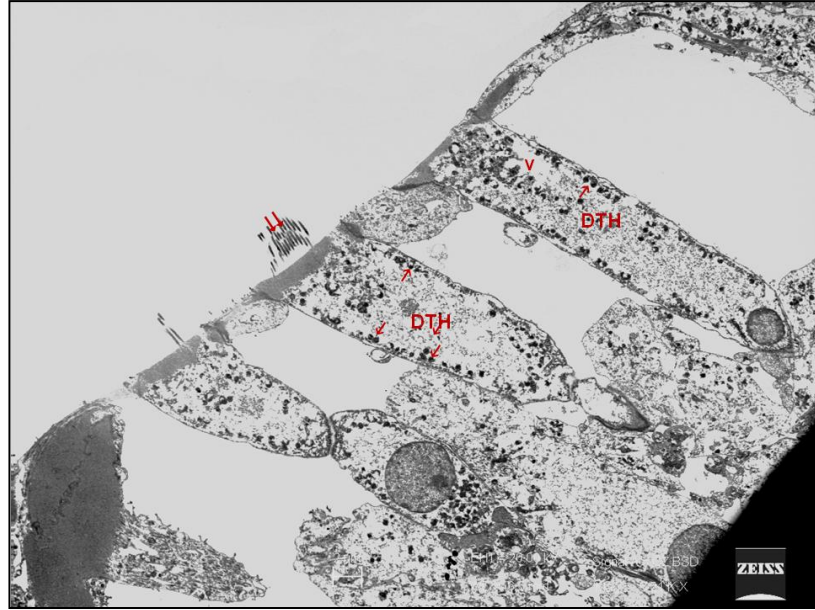
Resim 4.11. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında stria vasküleriste M: Marginal hücre, İ: İntermedier hücre, B: Bazal hücre, v: vakouller, ►: apikal bölümdeki düzensiz oluşumlar izleniyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



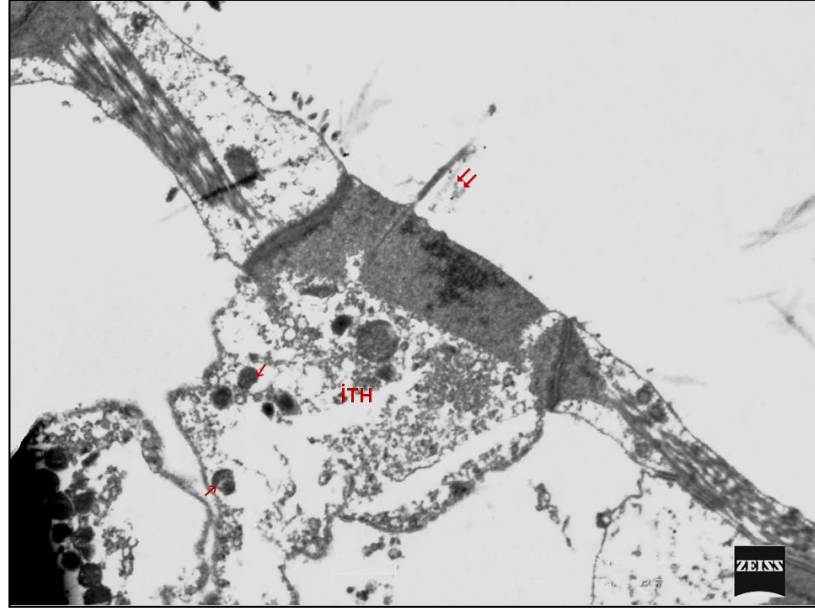
Resim 4.12. R6 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında işitsel sinir liflerinde, S: Schwann hücreleri, ⇨: miyelin lamellerdeki ayrılmalar, ➤: Akson içindeki miyelin figürler, ➤: Aksonlar arasındaki miyelin figürler ayırt ediliyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).

Grup 3

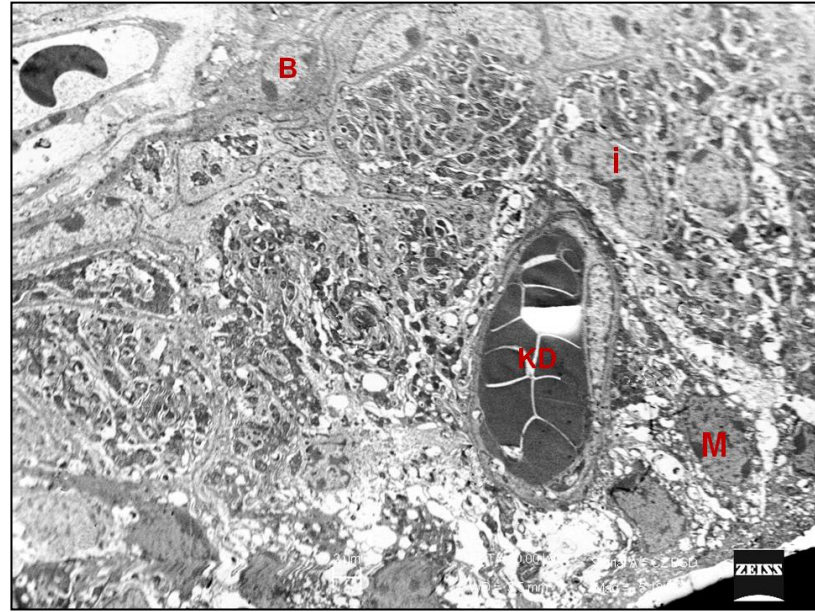
Bu grupta, yer yer gözlenen bazı vakuoler oluşumlar dışında iç, dış tüy ve destek hücreleri normal ince yapı özellikleri gösterdi. Stria vaskülariste de benzer olarak vakuoler yapılar dışında normal stria vaskülaris ince yapısı izlendi. İşitsel sinir liflerinde ise bazı Schwann hücre sitoplazmalarında ve aksonlardaki miyelin benzeri oluşumların varlıklarını sürdürdükleri buna karşın, miyelin kılıftaki ayrılmaların önemli ölçüde gerilediği ve hasardan en çok işitsel sinir liflerinin etkilendiği ya da bir başka deyişle yapılan uygulamada en az rejeneratif etkinin işitsel sinir liflerinde olduğu kanısına varıldı (Resim 4.13., 4.14., 4.15., 4.16.).



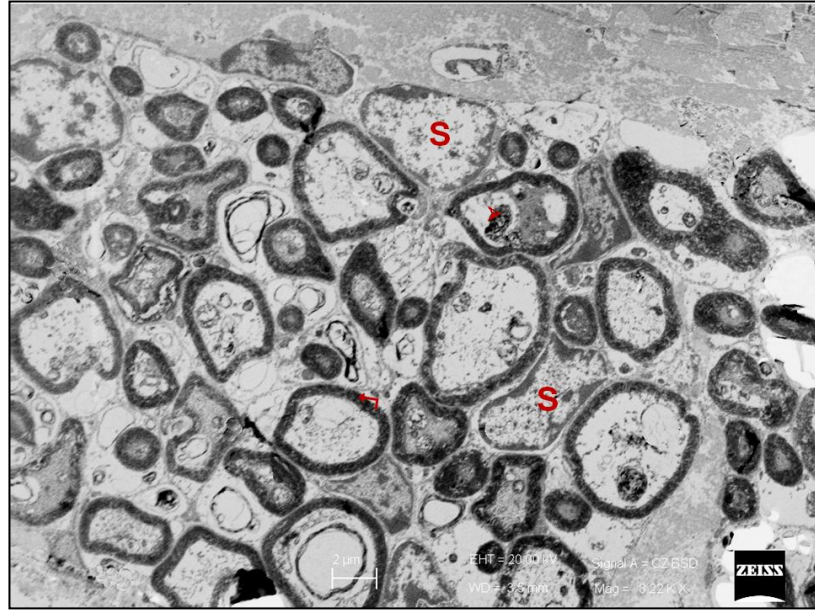
Resim 4.13. R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında DTH: Dış tüy hücresi, ⇔: stereosilyalar, v: vakouller, →: hücre zarı altında düzenli yerleşim gösteren mitokondriyonlar görülüyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



Resim 4.14. R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında İTH: İç tüy hücresi, ⇌: stereosilya, →: mitokondriyonlar izleniyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



Resim 4.15. R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında stria vasküleriste M: Marginal hücre, İ: İntermedier hücre, B: Bazal hücre, (Uranil asetat&Kurşun sitrat).



Resim 4.16. R8 grubuna ait transmission elektron mikroskopi fotoğrafında işitsel sinir liflerinde, S: Schwann hücreleri, ⇔: miyelin lameller, ➤: Akson içindeki miyelin figürler ayırt ediliyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat).

İç tüylü hücre, DTH, stria vaskülaris, işitsel sinir lifleri incelendi. Dejenerasyon dereceleri histoloji ve embriyoloji bölümü tarafından dejenerasyon kriteri kullanılarak değerlendirildi. Gruplarda bulunan her bir denek için 0: dejenerasyon yok, 1: zayıf dejenerasyon, 2: orta dejenerasyon, 3: kuvvetli dejenerasyon olarak skorlandı. Bu şekilde dejenerasyon kriter tabloları hazırlandı. İTH, DTH, stria vaskülaris ve işitsel sinir lifleri dejenerasyonunu derecelendirmek için kullanılan kriterler ve skor sonuçları Tablo 4.15, 4.16, 4.17’de gösterilmiştir. Tablolarda skorların bulunduğu kutucuklarda, 6’şarlı sayı dizileri sırasıyla 1. grup (S) için; S3, S4, S5, S6, S7, S8, 2. Grup (R6) için: R6.1, R6.2, R6.3, R6.4, R6.5, R6.6, 3.grup (R8) için; R8.2, R8.3, R8.4, R8.5, R8.7, R8.8 kodlu koyalara ait skor değerleridir.

Tablo 4.15. İç tüy hücresi ve dış tüy hücresi dejenerasyon skorlaması

Dejeneratif Kriter (İTH – DTH)	İÇ TÜY HÜCRESİ (İTH)			DIŞ TÜY HÜCRESİ (DTH)		
	S	R6	R8	S	R6	R8
Stereosilya Kaybı	2,3,1,3,3,2	2,1,3,2,2,2	0,1,1,2,2,1	2,2,1,3,2,3	2,2,1,2,3,1	0,0,2,1,1,1
Stereosilyalarda Bozulmalar	3,2,2,2,2,2	2,1,1,1,2,2	0,1,0,1,0,1	3,2,1,3,2,2	2,2,1,2,2,2	0,1,0,0,0,1
Vakuoler Oluşumlar	3,3,3,2,3,3	2,3,3,3,3,2	2,1,1,1,1,1	2,2,2,3,2,2	2,2,1,1,1,2	1,0,0,0,1,1
Yan Yüz Bağlantı Bozuklukları	2,1,2,1,1,2	1,1,1,2,1,1	1,1,0,0,0,0	2,1,1,1,1,1	1,1,1,0,1,1	0,0,0,1,0,0
Mitokondri Yerleşiminde Bozulma	3,3,3,3,2,3	1,1,1,0,1,1	0,0,0,0,1,0	3,3,3,2,3,3	1,1,1,2,1,1	1,0,0,0,0,1
Mitokondride kristolizis	2,1,1,1,0,2	1,1,1,1,0,1	1,0,0,1,0,1	2,1,1,1,1,1	1,1,1,1,1,1	0,0,1,0,0,0
Afferent İnervasyonda Bozulma	2,3,2,2,2,2	2,1,1,1,2,1	1,0,1,1,1,1	2,1,1,2,2,1	1,1,1,0,1,1	0,1,0,0,0,0
Lipid Damlacıkları	1,1,1,0,1,1	1,1,1,0,0,1	1,0,0,0,0,0	1,0,0,1,2,2	1,0,0,1,1,0	0,0,1,0,0,0

Tablo 4.16. Stria vaskülaris dejenerasyon skorlaması

Dejeneratif Kriter (Stria Vaskülaris)			
	S	R6	R8
Dev Vakuoler Yapılar	3,3,3,3,3,3	3,2,3,2,3,2	2,1,1,1,1,1
Kristolizis	3,2,3,3,3,3	3,2,2,2,2,2	2,1,1,1,2,2
Miyelin Figür Oluşumları	2,3,2,2,2,2	2,2,2,1,2,2	1,2,2,2,1,1
Elektron Yoğun Cisim Akümüasyonları	2,2,2,3,2,2	2,2,2,2,2,2	2,1,1,1,2,2
Damarların Azalması	3,3,3,3,3,3	3,2,3,2,3,3	2,1,1,1,1,1
Hücre Yan Yüz Bağlantılarında Bozulma	3,2,2,2,2,2	2,1,2,2,1,1	1,0,1,0,0,0
Marjinal Hücre Apikalinde Düzensiz Hücre Zarı Oluşumları	0,0,1,0,1,1	3,3,3,2,3,2	0,0,1,1,0,1

Tablo 4.17. İşitsel sinir lifleri dejenerasyon skorlaması

Dejeneratif Kriter (İşitsel Sinir Lifleri)			
	S	R6	R8
Miyelin Lamellerde Ayrılmalar	3,3,3,3,3,3	3,2,2,3,3,3	1,2,2,2,1,1
Aksonlar Arası Alanda Miyelin Figür Oluşumları	3,3,3,2,3,3	3,3,3,2,3,3	2,3,3,2,2,2
Akson İçinde Miyelin Figür Oluşumları	3,2,3,3,3,3	2,3,3,2,3,3	2,2,2,2,2,1
Schwann Hücre Sitoplazmasında Dev Vakuoler Oluşumlar	3,2,2,2,2,2	2,1,2,2,2,1	1,2,1,1,1,1
Miyelin Kılıfta Elektron Yoğun Madde Birikimi	2,1,1,1,2,1	1,0,1,1,1,1	1,0,0,0,1,0

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Kohlea dokusunda bakılan malandialdehid (MDA)'ın grup içi deneklerde ölçülen minimum ve maximum değerleri ile grubun ortanca değerleri tablo 19'da verilmiştir. 3 grubun birbiriyle, 2. ve 3. grubun 1. grupta yapılan karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla p: 0,01; p: 0,03; p: 0,01). Ancak 2. ve 3. gruptaki ortanca değerleri daha yüksek olduğundan bu durum çalışma için anlamlı bulunmamıştır. 2. ve 3. grup arasında ise yapılan istatistiksel inceleme sonucu anlamlı fark saptanmamıştır (p: 0,109).

Tablo 4.18. Kohlea dokusunda ölçülen MDA değerlerinin karşılaştırılması

	MDA	
	Ortanca (min; max)	p*
Grup 1	4,09 (3,00-9,00)	0,01
Grup 2	6,24 (4,00-8,00)	
Grup 3	4,93 (3,00-10,00)	

*: Kruskal-Wallis Testi uygulanmıştır.

Kobaylarda alınan intrakardiak kanda bakılan MDA, GSH ve SOD değerleri arasında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (p: 0,18; p: 0,86; p: 0,09). Üç grubun kendi aralarında ikili karşılaştırılmaları sonucunda ise sadece 1. grup ile 2. grup arasında SOD değerleri açısından anlamlı farklılık saptandı (p: 0,02).

5. TARTIŞMA

Modern kanser kemoterapisinde birçok ajan kullanılmasına rağmen hastalarda yüksek oranlarda belirgin ototoksositeye neden olan yegane ajan sisplatindir. Deneysel tümör sistemlerinde en aktif platinum kompleksi olarak belirtilmiş, 1970’li yılların başı ve ortasında klinik onkolojide kullanılmak üzere ortaya sürülmüştür. Son iki dekadda solid epitelyal tümörlerin küratif rejim gelişimleri için temel ajan haline gelmiştir. Testis, over, mesane, beyin tümörleri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri, skuamöz hücreli baş boyun tümörleri; çocuklarda nöroblastom, osteosarkom, hepatoblastom, retinoblastom ve germ hücreli tümörler; nüks gelişmiş lenfomalar için hazırlanan kemoterapi protokollerinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (15, 97, 100).

Sisplatin ve diğer platinum bileşenlerinin bulantı, kusma, kemik iliği baskılanması, nefrotoksosite, ototoksosite ve nörotoksosite gibi yan etkileri bulunmaktadır. Yüksek doz kümülatif sisplatin dozu alan hastalarda %30 ila 50 oranında kalıcı nöropati geliştiği bilinmektedir. Genellikle geri dönüşümlü olan myelosupresyon, olguların %5’inde şiddetli lökopeni ve trombostopeni şeklinde oluşmaktadır. Sisplatinin korkulan yan etkisi olan bulantı ve kusma ise, vestibüler toksisite ile ilişkili değildir. Nefrotoksosite ve ototoksosite sisplatinin doz kısıtlayıcı yan etkileridir (15).

Sisplatin ile tedavi edilen olgularda tinnitus insidansı % 2 ila %36 arasında, işitme kaybı insidansı ise %9 ila %91 arasında bildirilmiştir (93, 177). Baş boyun kanser tedavi protokolünde sisplatin verilen hastaların yarısında işitme kaybı gelişmiştir (178). Çocuklarda işitme kayıp oranları %20 ila %70 arasında saptanmıştır (97, 98, 100). Yüksek doz sisplatin kullanımı sonrası (150- 225 mg/

m²) yapılan yüksek frekans odyolojik tetkiklerde hastaların %100'üne yakınında işitme kaybı saptanmıştır (153).

Sisplatin ototoksitesinde işitme kaybı genellikle bilateral ve öncelikle yüksek frekanslarda ortaya çıkmaktadır (6000 ve 8000 Hz). *Rybak ve arkadaşları* 8000 Hz'de %90,5 hastada belirgin sensörinöral işitme kaybı olduğunu göstermişlerdir (179). Sisplatin tedavisine devam edilmesi halinde ilerleyici olarak düşük frekanslarda da tutulum gerçekleşmektedir (2000 ve 4000 Hz) (178). Oluşan işitme kaybı kalıcı olma eğilimindedir. Çoğu çalışmalar zamanla işitme kaybının stabil kaldığını gösterse de sisplatin tedavisinin bitmesine rağmen işitme kaybının ilerleyici seyir gösterebildiğine dair bazı kanıtlar mevcuttur (98). Sisplatin ile oluşan işitme kayıpları konuşmayı anlama ve ayırt etmeyi etkileyebilmektedir. Özellikle çocuklarda olmak üzere konuşmanın ayrılmaz parçası olan işitmenin bozulması, bireylerde kognitif ve psikososyal aksamalara neden olur (100). Bu durum özellikle erken yaşta tedavi alan çocuklar için daha önemlidir.

Sisplatin toksisitesi yaş, eş zamanlı alınan ilaçlar, mevcut otolojik problemlerin varlığı, kranial radyasyon alımı, böbrek fonksiyonları, ilacın uygulanım planı gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Ancak uygulanan kümülatif doz ile ototoksosite şiddeti arasında daha net bir ilişki vardır. Yüksek doz rejim (200 - 400 mg/ m²) uygulanan çocukların ototoksositeye daha yatkın olduğu bildirilmiştir (98). Testiküler kanser nedeni ile sisplatin tedavisi alan hastaların %20'sinde kalıcı ototoksitenin geliştiğinin gösterildiği bir çalışmada, 400 mg / m² kümülatif dozdan fazla ilaç alan hastaların %50'sinden fazlasında kalıcı işitme kaybı geliştiği gözlenmiştir (11). Ancak 600 mg/ m²'den sonra işitmenin daha fazla bozulmadığı bir plato etkisi yaptığı rapor edilmiştir ve sisplatin için kritik birikim

dozu vücut ağırlığına göre 3-4 mg/ kg olarak bildirilmiştir (177). *Cardinaal ve arkadaşları* kobaylarda ototoksite gelişmesi için yeterli kümülatif intraperitoneal sisplatin dozunun 12 mg/ kg olduğunu ortaya koymuşlardır (180). Literatürde 8 mg/ kg, 3 gün süre ile sisplatin dozu kullanımı ile belirgin ototoksite oluşturulduğu bildirilse de özellikle nefrotoksik etkiye bağlı kobay ölüm riski, gruplar içi kullanılan hayvan sayısı düşünülecek olduğunda azımsanmayacak düzeydedir. Bu nedenle çalışmamızda 5 mg/ kg sisplatin, 3 gün süre ile intraperitoneal olarak toplam 15 mg / kg kümülatif dozda verilmiş olup istenen ototoksik etki sağlanabilmiştir. Çalışmada sadece iki kobay, 2 gün aldıkları sisplatin dozu sonrası ex olmuşlardır.

İnsan kulak anatomisiyle benzerlikleri nedeniyle literatürde, sisplatin ototoksisitesi üzerine yapılan hayvan çalışmalarında sıklıkla kobaylar ve ratların tercih edildiği görülmektedir. Çalışmamızda da uygun temporal kemik boyutları, timpanik bullaya ulaşımındaki kolaylık, kohlealarının daha büyük olması ve taşınabilirliklerindeki rahatlık sebebiyle kobay kullanılmasına karar verilmiştir. Albino cinsi erkek kobaylar ile çalışılmıştır. Ayrıca *Momin ve arkadaşları* da kobaylarda riluzolun bioyaranlanımının daha iyi olduğunu düşünmektedirler (54).

Riluzol, aşırı hidrofobik özelliğinden ötürü çok az çözücüde çözülebilmektedir. Bu çözücüler genellikle toksik özellikte olabilmektedir. Toksik olmayan, riluzol ile çözelti hazırlama amaçlı endolenfatik hidrops modellerinde kullanılan dimetilsulfoksit (DMSO) ise nöroprotektif ve antioksidan özelliklere sahip olmasından ötürü, riluzolun hücre ölümü üzerine koruyucu etkilerini araştırdığımız çalışmamızda mekanizmaya additif etkileri olabileceğinden uygun bir çözücü olarak görülmemiştir. Bu nedenle çalışmamızda riluzolun, hidroklorid

formu kullanılmış ve daha ulaşılabilir, ucuz ve fizyolojik olduğunu düşündüğümüz serum fizyolojik ile çözülebilmesi sağlanmıştır.

Çalışmamızda riluzolü kullanmaya karar vermeden önce literatürde sisplatin ototoksitesine neden olabilecek birçok farklı yol ve bu yolları bozarak oluşabilecek hasarlardan koruyacağı düşünülen ve etkinliği araştırılmış pek çok ajanla karşılaşılmıştır.

Sisplatinin neden olduğu sitotoksitenin ve indüklenen apoptozisin birçok mekanizmanın aracılığıyla gerçekleştiğine inanılmaktadır. Klasik olarak bilinen mekanizma, platinyum atomları ile DNA arasında oluşan bağ sonucu ortaya çıkan ürünlerin p53 aktivasyonu yaparak apoptozisi indüklemesidir. Platinyum - DNA ürünlerinin birikimi ilk önce stria vaskularisin marginal hücrelerinde olmakta, bunun sonucunda K⁺ döngüsünde bozulma ve apoptotik sürece giriş gerçekleşmektedir (116). Ayrıca sisplatin kohlea lateral duvarındaki spiral ligamentte bulunan fibrositlerde de apoptozisi, K⁺ kanal aktivasyonu yaparak indüklemektedir. Böylelikle K⁺ hücre dışına çıkmakta, hücre içi K⁺ düzeyleri düşmekte, kaspaz ve pro-apoptotik nükleazlar aktive olmaktadır. *Liang ve arkadaşları* da zar K⁺ geçirgenliğinin sisplatinle iç kulak hücrelerinde apoptozisle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlar, **K⁺ kanal blokerlerinin** apoptotik hücre büzülmesini, kaspaz 3 aktivasyonunu, sitokrom c salınımını, DNA'daki ve birçok hücredeki apoptotik morfolojik değişiklikleri önlediğini in vitro olarak göstermişlerdir (123).

Sisplatin kohlear dokularda reaktif oksijen üretimine neden olmaktadır. Sisplatin uygulanması ile bir NADPH oksidaz izoformu olan **NOX- 3** sentezi artmaktadır. Bu enzimin kohleada reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) oluşumunda esas kaynak olduğu düşünülmektedir (118). Sisplatin kohleada süperoksit

anyonların ve hidrojen peroksidin oluşumuna neden olur. Hidrojen peroksidler de Fe^{++} kullanarak membran poliunsature yağ asitleri ile ilişkiye girecek olan hidroksil radikallerini oluştururlar. Bunun sonucunda kohlear dokularda anti-oksidan koruyucu moleküller olan glutatyon ve süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz gibi enzim miktarları artarken lipid peroksidasyon indükatörü olan malandialdehid (MDA), toksik lipid peroksidler ve 4 - hidroksinonenal ve peroksinitrit gibi aldehydler yükselir, nitrik asid sentaz (iNOS) indüklenir. Bu durum kohlear hücrelere Ca^{++} girişine ve apoptozise neden olur (15). Hidroksil radikalleri sisplatin bağımlı DTH dejenerasyonunda ve işitme kaybında kritik rol oynamaktadır (16). Aşırı ROÜ oluşumu sitozolde Bax geninin aktivasyonuna yol açar. Böylelikle sitozol içine sitokrom - c geçişi olur, kaspaz 3 ve 9 aktive olur. Kaspazlar ile aktive olan deoksiribonükleaz DNA'yı parçalar (118). Kaspaz 1 ise kaspaz 3 ve 9'u aktive edebilmektedir. **Kaspaz 1'in inhibisyonu** ile kohlear hücre hasarının bloke edebilebildiği gösterilmiştir (181). Kaspaz 1 aynı zamanda IL-1b ve IL- 18 prekürsorlerini aktive etmektedir (15).

Nitrik oksidaz- 3 (NOX-3), apoptotik etkisini transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (**TRPV1**) kanalının aktivasyonu ve indüksiyonu ile gösterir. Kohleada stres ilişkili genler olan TRPV 1 ve böbrek hasar molekülü- 1 (KIM- 1) NOX-3'ü regüle eder ve kohleadaki apoptozisi başlatırlar (15).

Nitrik oksid (NO) gibi ROÜ de sisplatin ototoksitesinde rol oynamaktadır. *Kelly ve arkadaşları* sisplatin sonrası rat kohlealarında NO seviyelerinin arttığını saptamışlardır (182). *Nagy ve arkadaşları* tarafından sisplatin uygulanmış farelerde nükleer faktör kappa B (NF- kB) ve iNOS için stria vaskularis ve spiral ligamentte immün tutulumun artmış olduğu gösterilmiştir. NF- kB salınımindaki artışın stria vaskularis ve spiral ligamentte iNOS artışını

indüklediği ve NO üretimine ve işitsel disfonksiyona neden olduğu öngörülmüştür. Ancak işitsel tüylü hücrelerde ise NF- κ B'nin hücre yaşam süresini arttırdığından bahsedilmektedir (183).

Sisplatin sonrası hücrenin poli (ADP- riboz) polimeraz (PARP-1) aktivasyonuna neden olarak kaspaz yolundan bağımsız olan bir başka hücre ölüm yolundan daha bahsedilmektedir. Bu yolda c – Jun N- terminal kinaz 1 (**JNK-1**) enzimi apoptozisi indükleyen faktörün translokasyonu ve bunu takiben gelişen hücre ölümü için gereklidir (184). **HSP 70, HSP 32 (hemoksijenaz HO-1)** gibi ısı şok proteinleri apoptozis yolağı için gerekli olan JNK aktivasyonunu ve hücre ölümünü inhibe ederler (185-187).

Ototoksisite mekanizmalarından korunmak için endojen moleküller, ekzojen ajanlar ya da endojen korunma mekanizmalarını devreye sokan ekzojen ajanlar devreye girebilir. Glutasyon, antioksidan enzimler, ısı şok proteinleri, adenosin reseptörleri ve hem oksijenaz – 1 endojen koruyucu molekülleri oluşturmaktadırlar (188).

Glutasyon ve glutasyon ester sisplatinin yaptığı tüylü hücre hasarına karşı belirgin koruma sağlamaktadır. **N - asetilsistein** ise glutasyon sentez için gerekli prekürsör olan glutasyonu yeniler. N - asetilsisteinin in vivo olarak sistemik ve transtimpanik sisplatin uygulamalarında koruyucu etkisi gösterilmiştir (22, 189, 190).

Withwort ve arkadaşlarının çalışmasında **adenosin A1 reseptör agonistlerinin** yuvarlak pencereye uygulanması sisplatine bağlı eşik yükselmelerini ve tüylü hücre hasarını önlemiştir. Endojen adenosin reseptörlerin koruyucu etkisinin antioksidan savunma sistemini devreye sokarak etkili olabileceği düşünülmüştür (191).

Böbrek hasar molekülü 1 (KIM - 1)'in rat kohlear hücrelerinde salındığı gösterilmiştir. Sisplatin uygulaması ile bu molekülün salınımları indüklenip apoptozisi başlayabilir. Sisplatin öncesi **lipoik asid** kullanımının ratlarda KIM - 1 salınımını azalttığı ve sisplatine bağlı işitme kaybını azalttığı görülmüştür. KIM - 1'in kohleada sisplatin hasarı sonrası bir onarım molekülü olarak da bulunabileceği belirtilmiş ancak bu hipotez henüz kanıtlanmamıştır (192).

Hem oksijenaz – 1 (HO - 1) antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikte bir enzimdir. **Isı şok proteinleri** sisplatine karşı koruyucu etkilerini HO - 1 üzerinden gösterirler (193). Biberde bulunan **piperine**, bitkisel bir alkaloid olup in vitro olarak HO - 1 indüksiyonu ile sisplatine bağlı apoptozisi önlemektedir (228). **Salisilatlar** da HO - 1'i indükler ve sisplatinin antitümör etkisini bozmadan sisplatin ototoksitesini önlerler. Salisilatlar aynı zamanda sisplatine bağlı kohleada artmış olabilecek TNF - alfa salınımı inhibe ederek de sisplatin ototoksitesinden korunma sağlarlar (195, 196). *So ve arkadaşları* da bir **kalsiyum kanal blokeri olan flunarizin**, HO - 1 ve **nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör (NRF2)** salınımını arttırarak ratlarda Corti organının hücre ölümünde koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir (197).

Antioksidanlar kohleada hücre ölümünü önleyici mekanizmalarda artış sağlamaktadırlar. Birçok tiol antioksidan elektrofilik özellikleri, platinyuma karşı aşırı affiniteleri ve serbest radikalleri toplayıcı özellikleri ile sisplatin ototoksitesine karşı koruyucudur. Sodyum tiosülfat, dietiltiokarbamat, D - veya L - methionin, metiltiobenzoik asid, lipoik asid, N - asetilsistein, tiopronin, glutatyon ester ve amifostin antioksidan etkiye sahip olduğu düşünülen moleküllerdir (15).

Sodyum tiosülfat ve mesna (2- merkapto-ethan sulfonat) sisplatinin ototoksik ve antineoplastik etkisini azaltırlar (198). *Wang ve arkadaşları* **sodyum tiosülfatın** perilenfatik perfüzyonunun kobaylarda sisplatin ototoksitesini önlediğini göstermişlerdir (199). Öte yandan *Wimmer ve arkadaşları* ise yuvarlak pencere kenarına yerleştirdikleri mini pompalar aracılığıyla verdikleri sodyum tiosülfatın ototoksiste koruyuculuğunun olmadığını görmüşlerdir (200).

Church ve arkadaşları **amifostinin** hamsterlarda periferik ototoksisteye karşı koruyucu olduğunu bulmuşlardır. Ancak yüksek dozlarda İBC’nda alınan uzamış pikler arası latans, bu ajanın nörotoksisteye de neden olabileceğini göstermiştir. Klinik çalışmalarda kullanımında ise ototoksiste için koruyucu etkisi bulunamamıştır. Metastatik melanomlu erişkin hastalarda sisplatin kullanımını takiben amifostin kullanımına rağmen kabul edilemez ototoksiste gelişimi görülmüştür (201).

D - ve L - metionin sülfür içeren antioksidanlar olup platinyum şelatörleri ve serbest radikal toplayıcıları gibi davranırlar. *Camphell ve arkadaşları* D - methioninin sisplatin almış rat köhlealarında antioksidan enzimlerin azalmasını ve malondialdehidin artışını önlediğini göstermişlerdir (202). *Laurell ve arkadaşları* ise işaretlenmiş D- metioninin otoradyografik incelemelerde daha çok köhlea lateral duvarında ve kısmen de Corti organında biriktiğini görmüşlerdir (13).

Aminoguanidin, sodyum salisilat, yalnız veya tioproninle kombine kullanılan **alfa – tokoferol**, yalnız veya ksantin oksidaz inhibitörü olan **allopürinol** ile birlikte kullanılan **eselen** serbest radikal tutucu diğer antioksidan ajanlardır (203). Aminoguanidin, iNOS inhibitörü olup hidroksil radikallerini toplar. *Kelly ve arkadaşlarının* ratlarda yaptığı bir çalışmada aminoguanidin

kohleadaki malondialdehid üretimini belirgin azalttığı, İBC eşiklerinde kısmen yükselme yaptığı ancak nitrik oksid miktarını azaltmadığı gözlenmiştir (182).

Glutasyon peroksidaz gibi çalışan **eselen** molekülünün ise ratlarda DTH ve işitsel eşiklerini koruduğu gösterilmiştir (204).

Sisplatin ototoksisitesinde kullanılabileceği düşünülen bir başka grup ise **kaspaz- 3 ve 9 inhibitörleri ve p 53 inhibitörleridir**. *Wang ve arkadaşları* kaspaz 3 ve 9 inhibitörlerinin intrakohlear perfüzyonunun dramatik etkisiyle apoptozisi, tüylü hücre kaybını ve işitme eşiklerindeki değişimi azalttığını göstermişlerdir (205). **Pifithrin - alfa'nın** (p53 inhibitörü) organotipik Corti organ kültürlerine eklenmesi durumunda sisplatinin tüylü hücre hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (206). Bu grup ilaçların sistemik yan etkilerini azaltmak amaçlı lokal uygulamaların daha uygun olacağı görüşü hakimdir. Bu nedenle insan çalışmalarında yuvarlak pencereye ilaçların uygulanması gibi lokal uygulamalar daha uygun bir yaklaşım olabilir.

Sisplatin ototoksisitesi üzerine kortikosteroidin etkilerini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. *Waissbluth ve arkadaşlarının* kobaylarda yapmış olduğu bir çalışmada sistemik olarak uygulanan deksametazonun sisplatin öncesi ve sonrasında uygulanması halinde sadece deksametazon veya sadece salin veya sadece sisplatin verilen gruplarla karşılaştırılmasında İBC eşikleri tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Ancak tarama elektron mikroskopisi ile yapılan incelemeler ile deksametazonun stria vaskülaris üzerine koruyucu etkisi olduğu görülmüştür (207). *Hill ve arkadaşları*, sisplatin verilmeden önce uygulanan intratimpanik deksametazonun koruyucu etkisini 8 ve 16 kHz'da İBC eşik değerleri ile göstermişlerdir (208). Steroidin ototoksisiteyi tedavi edici özelliği ise *Çallı ve arkadaşlarının* çalışmasında araştırılmış, intratimpanik steroidin sisplatin sonrası

uygulanması sonucu 1. ve 2. haftanın sonlarında yapılan DPOAE ile yapılan takiplerde steroidin istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek etkisiyle karşılaşılmamıştır (209).

Literatürde Na^+ ve Ca^{++} kanal blokasyonu, K^+ kanal ve G-siklus aktivasyonu yapabildiği belirtilen, ancak daha çok glutamat antagonisti özelliğinden bahsedilen, akustik travma, spinal kord yaralanmaları gibi eksituar mekanizmlarla gelişen hasar oluşumlarını inhibe ettiği düşünülen riluzol, sisplatin ototoksitesinin temelini oluşturan reaktif oksijen ürünleri sonrasında ortaya çıkabilecek mekanizmalar üzerine etkili olabileceği düşüncesiyle çalışmamızda kullanıldı.

Özellikle son on yılda literatürde riluzol ile ilgili insan ve hayvan çalışma sayısının oldukça artmış olduğu gözlemlendi. Özellikle spinal kord hasarlı (156) ve retinal iskemili (210) rat deney modellerinde apoptozisi ve nekrotik hücre ölümünü azalttığı veya önlediği görüldü. Anti- konvülzan, anti- iskemik ve sedatif özellikleri olan ve geniş spektrumlu nöroprotektif bir ajan olarak geçen riluzolun, daha çok eksitotik mekanizma inhibisyonu üzerinden koruyucu etkilerinin araştırıldığına rastlandı (50).

Literatürde kohlea üzerindeki koruyucu etkileriyle ilişkili bulunan çalışmalarda da, öncelikle eksituar inhibisyon etkisi olduğu düşünülen riluzolun, akustik travmalı ve endolenfatik hidropsu hayvan modellerinde çalışıldığı görülmüştür. Bu konuda ilk çalışma 2002 yılında *Wang ve arkadaşları* tarafından akustik travmalı kobay modelinde çalışılmıştır. Takiben *Ruel ve arkadaşları* da akustik travmalı hayvan modelinde riluzolün nöroprotektif etkisini incelemişlerdir. Her iki çalışma da kobaylarla yapılmıştır (52, 53).

Wang ve arkadaşlarının çalışmasında riluzol 36 kobaya lokal, 42 kobaya sistemik olarak verilmiştir. Lokal verilen 36 kobayın sağ kohlealarına osmotik pompa yolu ile 0, 1, 3, 10, 33 veya 100 mikromol dozlarda riluzol verilmiştir. Mini pompalar akustik travmadan 2 gün önce kulaklara yerleştirilmiştir. Riluzol, akustik travma ile birlikte ve 7 gün boyunca uygulanmıştır. Akustik travmadan 30 dk önce ve travma sonrası 20. dk'da, 1., 2., 3., 5., 10., 15. ve 30. günlerde birleşik aksiyon potansiyellerine bakılmıştır. Sol kulaklar kontrol grup olarak kullanılmıştır. Riluzol, 42 kobaya ise intraperitoneal yolla sistemik olarak 1, 2, 4, 6, 8 veya 12 mg/ kg dozlarında verilmiştir. Akustik travmadan 30 dk önce, 30 dk sonra ve akustik travmayı takiben 5 gün boyunca ilaç uygulanmıştır. Her iki grubun kohleaları transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ile tüylü hücrelerin değerlendirilmesi için hazırlanmıştır. Riluzol ile perfüze olmamış 6 kobay kohleası transmisyon elektron mikroskopisi ile akustik travma sonrası, 3'ü altıncı saatte ve 3'ü yirmidördüncü saatte olmak üzere incelenmiştir. Lokal ilaç verilen 15 kobayın perfüze kohleaları ile perfüze olmayan kohleaları fragmente DNA'nın 3- OH ucuna terminal deoksinukleotidil transferazın bağlanması olayına dayanan TUNEL metodu ile travma sonrası 1., 3., 6., 12., 24., 48., 72. saatlerde ve 5. günde incelenmiştir. Akustik travma almamış 2 kobay, yapay perilenfle perfüze 4 kobay ve 100 mikromol riluzol ile perfüze 3 kobayın akustik travma sonrası birinci saatteki sitokrom c düzeyleri çalışılmıştır (53).

Wang ve arkadaşlarının çalışmasında akustik travma sonrası birinci ay kontrollerde riluzol ile tedavi edilen hayvanlarda birleşik aksiyon potansiyellerinin ve tüylü hücre kaybının daha az olduğu gösterilmiştir. Travma sonrası 1. ayda hazırlanan sitokohleogram ile yapılan incelemede 100 mmol riluzol alan grupta %80 İTH ve DTH'lerin ölümden korundukları görülmüş.

TUNEL metodu ile yapılan incelemedeki morfolojik özellikler sağlam lateral membranlı, vakuollü sitoplazmalı tipik otolizis ve hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ile giden apoptozis gözlenmiştir.

Wang ve arkadaşlarının çalışmasında akustik travma sonucu hasarlı mitokondrilerin iç matriksinden, tüylü hücrelerin sitoplazmasına sitokrom c salınımı kanıtlanmıştır (53). Sitokrom c'nin mitokondriden salınmasının kaspaz 3 ve 9 aktivasyonuna yol açarak hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir (211).

Ruel ve arkadaşlarının çalışmasında ise 5 kobaya skala timpaniden 0,2 mm'lik delik açılarak 100 mikromol riluzol, 2,5 ul/dk perfüzyon akış hızında verilmiştir. Verilen ilacın skala vestibuliden çıkması sağlanarak ilacın intrakohlear perfüzyonu sağlanmıştır. Kontrol grubundaki 5 kobaya ise yapay perilemf tek başına verilmiştir. Tüm kobaylara akustik travmayla aynı zamanda perfüzyon işlemi uygulanmıştır. Birleşik aksiyon potansiyelleri 8 kHz tone burst uyaranda travma öncesinde ve 20 dk sonrasında ölçülmüştür. Kohleaların bazal, medial ve apikal kısımları transmisyon elektron mikroskobu ile incelenmiştir (52).

Ruel ve arkadaşlarının çalışmasında kohleadaki işitme kayıpları her iki grupta aynı frekanslarda olsa bile eşik değişiminde %50 azalma saptanmıştır. TEM ile yapılan incelemelerde iç tüylü hücrelerin aşağısında bulunan dendritlerdeki hasarın korunduğu görülmüştür. Yazar bu durumu riluzolün iç tüylü hücrelerden sinaptik aralığa salınan glutamati inhibe ederek veya postsinaptik bölgede glutamaterjik nörotransmisyon blokajı ile yapmış olabileceğini düşünmektedir.

Ruel ve arkadaşlarının yorumundan farklı olarak *Wang ve arkadaşları*; eksitator mekanizmanın glutamat reseptör antogonisti kullanılarak engellenmesinin nöronal dejenerasyonun önlenmesini açıkladığını ancak tüylü

hücre ölümün nöronal hücre ölümüne sekonder bir olay olamayacağını ve riluzolün tüylü hücreleri koruyucu etkisinin ganglion nöronlarının korunması ile açıklanamayacağını söylemektedir. Yazara göre ganglion nöronlarının korunması anti-eksitotoksik mekanizmayla olabilirken, riluzolün tüylü hücreler üzerinde direk olarak henüz aydınlatılmamış başka bir yoldan koruyucu etkisi vardır.

Wang ve arkadaşlarının çalışmasında riluzolün intrasellüler K^+ kontrolü sağlayarak tüylü hücrelerdeki toksik olan K^+ birikimini azalttığından bahsedilmektedir (53). *Duprat ve arkadaşlarına* göre riluzol membran potasyum kanallarını aktive eder ve açar, böylelikle potasyumun tüylü hücre dışına çıkmasına izin verir (163). İntrasellüler K^+ 'un artışı ile voltaj kapılı Ca^{++} kanalları aktive edilip serbest radikal oluşumu ve hücre ölümü tetiklenir (212). *Huang ve arkadaşları* riluzolün aynı zamanda voltaj kapılı Ca^{++} blokasyonu da yaptığını ortaya koymuşlardır (44). Riluzolün bu kanallara etkisi üzerinden koruyucu olabileceği düşünülebilir.

Ayrıca çalışmada *Wang ve arkadaşları* riluzolün lokal ve sistemik uygulamalarının akustik travmadan korunmadaki etkisini ve 8 mg/kg sistemik riluzol dozunun akustik travmaya karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir. İntraperitoneal uygulama ile kohleada doz bağımlı koruyucu etki görmüşlerdir.

Riluzolün kohlea üzerindeki etkinliği endolenfatik hidropslu hayvan modelinde 2 çalışmada incelenmiştir. Her iki çalışmada endolenfatik hidropsta, iç tüylü hücrenin esas nörotransmitteri olan glutamatın postsinaptik bölgede fazla salınması sonucu NMDA reseptörlerinin aşırı stimülasyonu ile hücre içine Ca^{++} girişindeki artış ve bu durumun kaspaz kaskadını devreye sokarak tip 1 spiral ganglion hücrelerin ölümüne ve işitme kaybına yol açtığından bahsedilmektedir. Glutamat antogonizmasının hidrops modelindeki etkisine bakılan ilk çalışma *Sami*

ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Bu çalışmada *Phex (Hyp- Duk)* mutasyonlu fareler kullanılarak geliştirilen endolenfatik hidropsu hayvan modelinde, bir gruptaki farelere postnatal 6. günlerinden itibaren (P6 olarak kodlanan) 30 günlük olana kadar her gün riluzol dimetilsülfoksit (DMSO) ile birlikte verilmiştir. Riluzol verilen grup, sadece DMSO verilen grup ve hiç tedavi almayan gruplarla P21, P25 ve P30 olarak kodlanan günlerde işitsel beyin sapı cevapları açısından karşılaştırılmıştır. Hiç tedavi almamış gruba göre DMSO'nun belirgin işitme koruyucu etki sağladığı; DMSO ile birlikte verilen riluzolün ise koruyucu etki gösterdiği ancak bu etkinin DMSO'nun tek başına kullanımı ile oluşan etkiden istatistiksel olarak ayırt edilemediği belirtilmiştir. Bu çalışmada DMSO riluzolün çözülmesi için kullanılmıştır. DMSO antiinflamatuvar, antioksidan ve Ca^{++} kanal bloker özellikleri ile neuroprotektif bir ajandır. *Sami ve arkadaşları* bu çalışmayı riluzolün glutamat antagonistik etkisinin DMSO'nun antioksidan etkisi üzerine endolenfatik hidropsa bağlı işitme kaybında destekleyici etkisinin olduğunu savunmak üzere yapmışlardır. Ancak çalışmada bu durum ortaya konulamamıştır, yani additif etkiden bahsedilememektedir (51).

Momin ve arkadaşları ise cerrahi yolla endolenfatik hidrops oluşturdıkları kobayları üç gruba ayırmışlar. Birinci gruba sadece DMSO, ikinci gruba DMSO ile birlikte riluzol vermişler, üçüncü grubu ise tedavisiz bırakmışlardır. 24 hafta boyunca ilaç uygulaması yapıp, 4 haftada bir İBC bakmışlardır. İşitme kaybı birinci grupta ve ikinci grupta, üçüncü gruba göre anlamlı olarak az bulunmuştur. Ancak 2. ve 3. gruplar arasında fark saptanmamıştır. Grupların spiral ganglion hücre düzeyleri incelenmiş ve tedavi alınan grupta dejenerasyon izlenmezken, tedavi almayan grupta belirgin nöronal dejenerasyon izlenmiştir. Yazar ve arkadaşları, kombine tedavinin başarısız olmasını NMDA ve AMPA reseptör

blokajı yapan DMSO'nun, aynı reseptörleri kullanan riluzolun etkisini düşürerek yapmış olabileceği şeklinde açıklamışlardır (54).

Sisplatin ototoksitesinden korunma amaçlı literatürde birçok ajan araştırılmasına ve etkili olduğu düşünülen ajanlar olduğu düşünülmesine rağmen henüz rutin kullanıma giren bir ilaç bulunamamıştır. Riluzol oral kullanımı olan, ciddi yan etkileri olmayan, santral bölgede etkinliği kanıtlanmış bir ajandır. Ülkemizde Rilutek® (Sanofi Aventis) 50 mg'lık tabletleri bulunan riluzol çalışmamızda kobayların sağ ve sol kohleaları iki ayrı bilim dalı tarafından inceleneceğinden sistemik olarak verilmek istenmiştir. Ancak kobaylarda oral formun kullanım zorluğu yaratabileceği düşünülerek, ilaç uygulaması intraperitoneal olarak yapılmıştır. *Wang ve arkadaşlarının* çalışmasında sistemik 8 mg/ kg riluzol dozunun kohlear hücrelerde etkili olması ışığında riluzolun bir gruba 8 mg/ kg dozdan verilmesi uygun bulunmuş, diğer gruba verilen 6 mg/ kg riluzol dozu ile doz farkının koruyuculuk üzerine olan etkilerine bakılmak istenmiştir.

Çalışmamızda riluzol verilen gruplarda her iki kulakta tone burst 8 kHz uyaranda ve sol kulakta click uyaranda değerlendirilen İBC eşiklerinin sadece salin verilen grubun eşik değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır. İlaç öncesi ve ilaç sonrası İBC eşik değişimlerine bakıldığında ise salin verilen grupta diğer iki gruba göre eşik değişimi daha fazla bulunmuştur. Ancak *Wang ve arkadaşlarının* çalışmasında riluzolun sistemik etkin dozu 8 mg / kg olarak saptanmışken; bu bulgudan farklı olarak çalışmamızda 6 mg/ kg riluzol dozu ile de salin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük İBC eşikleri ve hücre dejenerasyon azlığı elde edilmiştir. Ancak 6 mg/ kg ve 8 mg/ kg'dan riluzol verilen gruplar arasında İBC eşikleri açısından

istatistiksel fark gözlenmemiştir. Tone burst 8 kHz uyaranda, gruplar arasında İBC eşiklerinde anlamlı değişikliklerin olması literatürde de bahsedildiği üzere öncelikle yüksek frekanslarda kayıpla giden sisplatin ototoksitesitesi ile uyumlu bulunmuştur.

Transmisyon elektromikroskopik bulgulara baktığımızda kohlea bazal kısımda yapılan incelemelerde riluzol verilen gruplarda salin verilen gruba göre stria vaskülaris ve İTH ve DTH dejenerasyonunda belirgin azlık gözlenirken, işitsel sinir lifleri için dejeneratif bulgular açısından gruplar arası farklılıktan bahsedilememektedir. Bu durum, ilacın en az işitsel sinir liflerini koruduğu ya da en az rejenerasyonu bu hücrelerde sağladığı şeklinde yorumlanabilir. İlaç sonrası İBC eşikleri açısından 6 mg/ kg riluzol alan gruba, 8 mg/ kg riluzol alan grup arasında anlamlı fark saptanmazken, transmisyon elektromikroskopik incelemede 8 mg/kg riluzol alan grupta vakuoller oluşumlar dışında tüylü hücreler ve stria vaskülaris normal izlenmiştir. Bu durum odyolojik sonuçlarda göremediğimiz doz artışı ile koruyucu etkideki artışı istatistiksel olarak olmasa da ortaya koymaktadır. Bu durum *Wang ve arkadaşlarının* çalışmasında da gösterilmiş olan doz ile koruyuculuk artışı ilişkisini desteklemektedir. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak stria vaskülaris ve tüylü hücreler incelenmiştir. Ancak transmisyon elektromikroskopik incelemede aynı kesitte değerlendirilmelerinin zor olmasından ötürü spiral ganglion hücreleri hakkında yorum yapılamamıştır.

Riluzolun İBC eşikleri ile stria vaskülaris ve tüylü hücreler üzerindeki koruyucu etkisinin, sisplatin ototoksitesitesinde etkili olduğundan bahsettiğimiz birkaç yolak ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Sisplatin kullanımı ile artan NOX 3 sentezi, reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bu durum transient potansiyel vanilloid reseptör 1

(TRPV 1) ekspresyonuna neden olur. Takiben hücre içine Ca^{++} girişinde artış meydana gelir, kaspaz aktivasyonu gerçekleşir (15). Ca^{++} kanallarının apoptozise giden yolda önemi ortadadır. Bir Ca^{++} kanal blokeri olduğu bilinen riluzolun hücre ölümünü bu durumu önleyerek yapmış olabileceği düşünülebilir.

Öte yandan riluzol verilmeyen kontrol grubunda belirgin stria vaskülaris dejenerasyonu saptanmıştır. Stria vaskülaris ve burada bulunan spiral ligamentte, endolenf ve hücre içi K^+ miktarının regülasyonunda rol alan $Na^+ K^+$ ATP az pompaları bulunmaktadır. Stria vaskülariste meydana gelebilecek bir harabiyet endolenfte elektrolit imbalansı oluşturacak ve dolaylı olarak tüylü hücrelere de zarar verecektir. Riluzolun stria vaskülaristeki belirgin koruyucu etkisi sayesinde oluşacak uygun elektrolit düzeylerine sahip ortam tüylü hücreler içinde gerekli endolenfatik potansiyeli sağlayacak ve işitmeyi koruyacaktır. Ancak riluzolun K^+ kanallarını aktive ediciği özelliğinin de olması K^+ yolağı açısından çelişkilidir. Çünkü *Liang ve arkadaşları* Ca^{++} kanal blokerleri ile K^+ kanal blokerlerinin apoptozisi azalttığını göstermişlerdir (123). Ayrıca potasyum kanal blokerlerinin belirgin olarak apoptotik hücre büzülmesini, kaspaz 3 aktivasyonunu, sitokrom – c salınımını ve apoptotik morfolojik değişiklikleri azalttığı farklı hücre çeşitlerinde in vitro olarak *Maeno ve Liang* tarafından gösterilmiştir (123, 213). *Liang*, membran potasyum geçirgenliğinin sisplatin ile hasarlı iç kulak hücrelerinde apoptozisi desteklediğini de söylemektedir. Bu durum K^+ kanal aktivasyonu yapan riluzolun, apoptozisi önleyici etkisiyle ters düşmektedir. Bu nedenle riluzolun koruyucu etkinliğini K^+ mekanizması üzerinden açıklamak doğru olmayabilir.

Cesares ve arkadaşları tarafından sisplatin ototoksitesinde etkili olduğu düşünülen bir diğer mekanizma, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ile devreye

giren kaspaz bağımsız yoldur. Burada apoptotizisi indükleyici faktörü aktive eden c –Jun N- Terminal kinaz (JNK 1) enzimi ısı şok proteinleri ile inhibe olarak apoptozisi engellemektedirler. Isı şok proteini 70 (HSP 70), sisplatin ototoksitesini önleyen potent bir JNK fosforilasyon inhibitörüdür (157). Literatürde riluzolun ısı şok cevaplarına aracılık eden **ısı şok faktörü- 1 (HSF- 1)** salınımını arttırarak ısı şok proteinlerini desteklediğine ilişkin ve glutamat transporter 1 (GLT1) salınımını arttırdığını belirten çalışma mevcuttur. Riluzolun apoptozisi engelleyerek, ototoksiteden koruyucu etkinlik kazanması JNK 1 enzim inhibisyonu ile de olabilir (205).

Deng ve arkadaşları rat serebral kortekste metilmerkür (MeHg-) ile oluşturulan oksidatif strese riluzolün etkilerini araştırmışlardır. MeHg'in reaktif oksijen ürünlerini ve malandialdehidi arttırdığını bulmuşlardır. Bu çalışmada riluzolun, MeHg'nin neden olduğu glutamat / aspartat taşıyıcı, glutamat taşıyıcıların fonksiyon ve salınımının azalmasını, glutatyon (GSH)'un azalmasını, oksidatif stressi, patolojik hasarı ve apoptozisi antogonize ettiği gösterilmiştir (155).

Antioksidan etkileri olabileceği düşünülen riluzolun bu özelliğini desteklemek amaçlı çalışmamızda biyokimyasal olarak kohlea dokusunda antioksidan olan glutatyon (GSH) ve superoksid dismutaz (SOD) ile lipid peroksidasyon ürünü olan malandialdehidin (MDA) varlığı gösterilmek istenmiştir. Ancak kohleadan alınan membranöz labirentin kısmın biyokimyasal ölçümler sırasında GSH, SOD ve MDA ölçümleri için yeterli gelmemesinden ötürü kohlear dokuda sadece MDA çalışılabilmiştir. Riluzolun antioksidan etki mekanizması üzerine etkili olabileceğini varsaydığımız çalışmamızda, kohlear dokuda yapılan ölçümlerde MDA değerlerinin düşük çıkması umulurken, serum

fizyolojik verilen grupta daha düşük değerlerle karşılaşılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olan bu fark çalışma için anlamlı bulunmamaktadır. Bu durum, riluzolun hücrelerde oluşan antioksidan etki mekanizması üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu söylememiz konusunda çelişkiye neden olmaktadır. MDA sonuçlarının çalışmayla zıt yönde anlamlı gelmesi çalışmayı zayıflatmaktadır. Ancak riluzolün antioksidan özellik göstermeden de koruyuculuk sağlayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durumda biyokimyasal olarak destekleyici başka parametrelere ihtiyaç duyulacaktır.

Literatürde daha çok glutamat antogonisti özelliğinden bahsedilen, nöroprotektif, anti apoptotik olduğu düşünülen riluzolun etki mekanizması hala netlik kazanmamıştır. Ototoksiteli hayvan modelinde koruyuculuğunu açıklamak için etki yolları düşünüldüğünde riluzolun en çok Ca^{++} kanal blokasyonu yapma özelliğinin üzerinde durulabilir. Öte yandan riluzolun ısı şok proteini oluşumu ve glutatyon sentez mekanizması üzerine olan olumlu etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır. Stria vaskülaris üzerinden direk rol oynayabilecek bir başka koruyucu mekanizma da, buranın sağladığı normal endolenfatik potansiyelin stabil kalması ile yaşamları tehdit altına girmeyecek olan tüylü hücrelerde ve dolayısıyla işitmede koruyucu etkiye sebep olabilir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda, “Riluzol tedavisinin sisplatin ototoksitesinden korunmadaki rolü” işitsel beyin sapı cevapları, kohlear morfolojideki değişiklikler ve kohlear dokudaki biyokimyasal değişiklikler incelenerek ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla elde edilen sonuçlar şöyledir:

1. Riluzolun 6 mg/ kg ve 8 mg/ kg dozlarda, 8 kHz tone burst uyaranda her iki kulakta anlamlı olarak İBC eşik yükselmesini önlediği görülmüştür.
2. Sisplatin sonrası gruplar arasında İBC eşik değerlerine bakıldığında riluzol almayan grupta İBC eşik değerleri gruplar arası karşılaştırmada anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
3. Tone burst uyaranda gruplar arasında ilaç öncesi ve ilaç sonrası İBC eşik değişim değerleri karşılaştırıldığında riluzol almayan grupta anlamlı yüksek değişim değerleri görülmüştür.
4. Riluzol alan gruplarda sisplatinin hedef hücreleri olan stria vaskülaris ve İTH ve DTH’lerinde belirgin dejeneratif bulgu azlığı saptanmıştır.
5. Riluzol alan ve almayan grup arasında işitsel sinir liflerindeki dejeneratif bulgular açısından belirgin fark saptanmamıştır.
6. Riluzol alan gruplarda daha düşük değerlerde olacağını düşündüğümüz, MDA’nın bu grupta daha yüksek çıktığı görülmüştür. Bu durum antioksidan etki mekanizmasını desteklememektedir.

ÖNERİLER

1. Sisplatinin tedavi için kullanımına başlanmadan önce, ilgili bölümler tarafından hastaların ilaç uygulama öncesi bazal işitme eşiklerinin bilinmesi takipler açısından faydalı olacaktır. Bu konuda bu tedaviyi uygulayan bölümlerle iletişime geçilmeli ve sisplatin ototoksitesi ile ilgili bilgilendirmeler yapılmalıdır.
2. Riluzolün ototoksite üzerindeki koruyucu etkileri ve oksidatif mekanizma üzerine olan etkileri başka hayvan çalışmaları ile de araştırılmalıdır.
3. Hayvan çalışmalarıyla yeterli ilerleme kaydedilmesini takiben piyasada ulaşımı kolay olan bu ilacın insanlar üzerindeki etkileri de klinik araştırmalarla ortaya konmalıdır.
4. Riluzolün koruyucu mekanizmasında rol alabileceğini düşündüğümüz ısı şok proteinlerinin kohlear dokuda ortaya konulması ile ilgili biyokimyasal değerlendirmeleri içeren çalışmalar yapılabilir.
5. Riluzolün ototoksite üzerindeki koruyucu rolü kanıtlanırsa bile sisplatinin anti tümör özelliğine olan etkileri de ayrıca araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Frazier AL, Weldon C, Amatruda J. Fetal and neonatal germ cell tumors. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* 2012; 17: 222-230.
2. Jin Y, Cai XY, Shi YX, Xia XY, Cai YC, Cao Y, Zhang WD, Hu WH, Jiang WQ. Comparison of five cisplatin-based regimens frequently used as the firstline protocols in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012; 138 (10): 1717-1725.
3. Lustberg MB, Edelman MJ. Optimal duration of chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2007; 8: 38-46.
4. Omura GA. Progress in gynecologic cancer research: the gynecologic oncology group experience. *Semin. Oncol.* 2008; 35: 507-521.
5. Randall ME, Filiaci VL, Muss H, Spirtos NM, Mannel RS, Fowler J, Thigpen JT, Benda JA. Gynecologic Oncology Group Study, Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J.Clin. Oncol.* 2006; 24: 36-44.
6. Zoltrick BH. Shedding light on testicular cancer. *Nurse Pract.* 2011; 36: 32-39.
7. Bodender DL, Dedon P C, Keng PC, Katz JD and Borch RF. Selective protection against cisplatin-induced toxicity in kidney, gut, and bone marrow by DDTC. *Cancer Res.* 1986; 46: 2751-2755.
8. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin. Pharmacother.* 2003; 4: 889-901.
9. Schellens JH, Planting AS, Ma J, Maliepaard M, de Vos A, de Boer Dennert M, Verwei J. Adaptive inpatient dose escalation of cisplatin in patients with advanced head and neck cancer. *Anticancer Drugs* 2001; 12: 667-675.

10. Buhner C, Weinel P, Sauter S, et al. Acute onset deafness in a 4-year-old girl after a single infusion of cis-platinum. *Pediatr Hematol Oncol* 1990; 7: 145-148.
11. Bokenmeyer C, Berger CC, Hartmann JT, et al. Analysis of risk factors for cisplatin induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1355-1362.
12. Chen WC, Jackson A, Budnick A, et al. Sensorineural hearing loss in combined modality treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2006; 106: 820-829.
13. Laurell G, Jungnelius U, High- dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. *Laryngoscope* 1990; 100: 724-734.
14. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: influence of age and the cumulative doses. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2445-2451.
15. Rybak LP, Whitworth CA, Mukerjee D, et al: Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 226:157- 167, 2007.
16. Lee JE, Nagakawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T et al. Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in Mouse stria vascularis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66: 111- 118.
17. Clerici WJ, DiMartino DL, Prasad MR. Direct effect of reactive oxygen species on cochlear outer hair cells. *Hear Res* 1995; 84: 30- 40.
18. Alam SA, Ikeda K, Oshima T, et al. Cisplatin- induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil. *Hear Res* 2000; 141: 28- 38.
19. Anderson, ME, Naganuma A and Meister A. Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester. *FASEB J* 1990; 4: 3251-3255.

20. Saito T, Zhang ZJ, Manabe Y, Ohtsubo T, Saito H. The effect of sodium thiosulfate on ototoxicity and pharmacokinetics after cisplatin treatment in guinea pigs. *Eur Arc. Otolaryngol* 1997; 254: 281-286.
21. Teranishi MA, Nakashima T. Effects of trolox, locally applied on round Windows, on cisplatin- induced ototoxicity in guinea pigs. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2003; 67: 133- 139.
22. Choe WT, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otol Neurotol.* 2004; 25: 910- 915.
23. Kalkanis JG, Withworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 2004; 114: 538-542.
24. Hyppolito MA, de Oliveira JA, Rossato M. Amifostine otoprotection to cisplatin ototoxicity: a guinea pig study using otoacoustic emission distortion products (DPOEA) and scanning electron microscopy. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2005; 71: 268- 273.
25. Campbell KC, Meech RP, Klemens JJ, Gerber MT, Dyrstad SS, Larsen DL, Mitchell DL, El-Azizi M, Verhulst SJ, Hughes LF. Prevention of noise- and drug- induced hearing loss with D- methionine. *Hear. Res.* 2007; 226: 92- 103.
26. Schmitt NC, Rubel EW, Nathanson NM. Cisplatin- induced hair cells death requires STAT1 and is attenuated by epigallocatechin gallate. *J.Neurosci.* 2009; 29: 3843- 3851.
27. Waissbluth S, Dupuis I, Daniel SJ. Protective effect of erdosteine against cisplatin- induced ototoxicity in a guinea pig model. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2012; 146 (4): 627- 632.
28. Daldal A, Odabasi O, Serbetcioglu B. The prospective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin- induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007; 137: 747- 752.

29. Hill GW, Morest DK, Parham K. Cisplatin- induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections. *Otol. Neurotol.* 2008; 29: 1005-1011.
30. Saliba I, El Fata F, Ouelette V, Robitaille Y. Are intratympanic injections of N-acetylcysteine and methylprednisolone protective against Cisplatin-induced ototoxicity? *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2010; 39: 236- 243.
31. Murph D, Daniel SJ. Intratympanic dexamethasone to prevent cisplatin ototoxicity: a guinea pig model. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2011; 145: 452- 457.
32. Paksoy M, Ayduran E, Sanlı A, Eken M, Aydın S, Oktay ZA. The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin- induced ototoxicity are demonstrated in rats. *Med. Oncol.* 2011; 28: 615- 621.
33. Cooper LB, Chan DK, Roediger FC, Shaffer BR, Fraser JF, Musatov S, Selesnick SH, Kaplitt MG. AAV- mediated delivery of the caspase inhibitor XIAP protects against cisplatin- ototoxicity. *Otol Neurotol.* 2006; 27: 484-490.
34. Staecker H, Liu W, Malgrange B, Lefebvre PP, Van de Water TRR. Vector-mediated delivery of bcl-2 prevents degeneration of auditory hairs cells and neurons after injury. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 2007; 69: 43-50.
35. So HS, Park C, Kim HJ, Lee JH, Park SY, Lee JH, Lee ZW, Kim HM, Kalinec F, Lim DJ, Park R. Protective effect of T- type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin- induced death of auditory cells. *Hear. Res.* 2005; 204: 127-139.
36. Bryson HM, Fulton B, Benfield P. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs* 1996; 52: 549- 563.

37. Faden A, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role excitatory amino acids and NMDA receptors in travmatic brain injury. *Science* 1989; 244: 798-800.
38. Pratt J, Rataud J, Bardot F, Roux M, Blanchard JC, Laduron PM, Stutzmann JM. Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 1992; 140: 225- 230.
39. Romettino S, Lazdunski M, Gottesmann C. Anticonvulsant and sleep-waking influences of riluzole in a rat model of absence epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 1991; 199: 371- 373.
40. Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17 (18): 1942- 1959.
41. Benoit E, Escande D. Riluzole specifiially blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre. *Plugers Arch* 1991; 19: 603-609.
42. Booening JA, Kass IS, Cottrell JE, Chambers G. The effect of blocking sodium influx on axonic damage in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* 1989; 33: 263- 591.
43. Hebert T, Drapeau P, Pradier L, Dunn RJ. Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Mol. Pharmacol.* 1994; 45: 1055- 1060.
44. Huang CS, Song JH, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T. Effects of the neuroprptective agent riluozone on the high voltage- activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 282: 1280- 1290.
45. Schwartz GW, Fehlings MG. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channels blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg* 2001; 94: 245-256.

46. Kaptanoğlu E, Caner H, Sürücü S. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg* 1999; 91: 200- 204.
47. Hains BC, Saab CY, Lo AC. Sodium channel blockade with phenytoin protects spinal cord axons enhances axonal conduction and improves functional motor recovery after contusion SCI. *Exper Neurol* 2004; 188: 365- 377.
48. Pratt J, Archambaud C, Böhme GA. The effect of riluzole and mannitol on cerebral oedema after cryogenic injury in the Mouse. *Neuroscience Lett* 1999; 272: 143- 145.
49. Mu X, Azbill, RD, Springer JE. Riluzole improves measures of oxidative stress following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 2000; 870: 66- 72.
50. Doble, A. The pharmacology and mechanisms of action of riluzole. *Neurology* 1996; 47: 233- 241.
51. Sami J, Chris M, Heddon DO, Jonathan K, Frankel BS, Alex H, Levitt BS, Suhael R, Momin BA, Kumar N, Cliff A. Pharmacological protection of hearing loss in the Mouse model of endolymphatic hydrops. *The Laryngoscope* 2010; 120: 1637-1645.
52. Ruel J, Wang J, Pujol R, Hameg A, Dib M, Puel JL. Neuroprotective effect of riluzole in acute noise- induced hearing loss. *Auditory and Vestibular Systems* 2005; 16 (10): 1087- 1090.
53. Wang J, Dib M, Lenoir M, Vago P, Eybalin M, Hameg A, Pujol R, Puel JL. Riluzole rescues cochlear sensory cells from acoustic trauma in the guinea pig. *Neuroscience* 2002; 111 (3): 635- 648.
54. Momin SR, Melki SJ, Obokhare JO, Fares SA, Semaan MT, Megerian CA. Hearing preservation in guinea pig with long-standing endolymphatic hydrops. *Otology Neurotology* 2011; 32: 1583- 1589.

55. Akyıldız, N. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi Vol 1. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1998: 49-102.
56. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi Vol 2. İstanbul: Nobel Tıp Yayınevleri; 2009: 431- 432.
57. Ballenger JJ, Snow JB. Otolaryngology Head and Neck Surgery. 15th edition. Section 40. Anatomy of the Ear. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996: 838-858.
58. Cumming JW, Flint PW, Harker LA, Haughey BH, Schüller DE. 4th ed. Vol 4. Section 149. Cochlear Anatomy and Central Auditory Pathways St. Louise: Mosby Year Book; 2005.
59. Erixon E, Högstorp H, Wadin K, Rask- Anderson H. Variational anatomy of the human cochlea: Implications for cochlear implantation. Otol Neurotol 2009; 30: 14-22.
60. Stjernholm C, Muren C. Dimensions of the cochlear nerve canal: a radioanatomic investigation. Acta Otolaryngol 2002; 122: 43-48.
61. Lim DJ and others. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the inner ear. Am J Otolaryngol 1983; 4: 33.
62. Schulte BA, Adams JC. Distribution of immunoreactive Na⁺, K⁺- ATP ase in gerbil cochlea. J Histochem 1989; 37: 127.
63. Kerr TP and others. Cellular localization of Na⁺, K⁺- ATP ase in the mammalian cochlear duct: significance for cochlear fluid balance. Am J Otolaryngol 1982; 3: 332.
64. Scheider ME and others. Immunocytochemical and quantitative studies of Na⁺, K⁺- ATP ase distribution in the developing chick cochlea. Hear Res 1987; 31: 39.

65. Gürtler N, Lalwani AK. Etiology of syndromic and nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002 Aug; 35 (4): 891- 908.
66. Roland, PS, Rutka JA. Ototoxicity. Hamilton, London: BC Denker Inc; 2004.
67. Fex J, Altschuler RA. Neurotransmitter- related immunocytochemistry of the organ of Corti. *Hear Res* 1986; 22: 249.
68. Fisch U. Transtemporal surgery of the internal auditory canal: report of 92 cases, technique, indications and results. *Adv Otol Rhinol Laryngol* 1970; 17: 203.
69. Fisch U. Infratemporal fossa approach to tumors of the temporal bone and base of the skull. *J Laryngol Otol* 1978; 92: 949.
70. House WF. Surgical exposure of the internal auditory canal and its contents through the middle cranial fossa. *Laryngoscope* 1961; 71: 1363.
71. Arnesen AR, Osen KK. Fiber population of the vestibulocochlear anastomosis in the cat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984; 98: 255.
72. Silverstein H and others. The unrecognized rotation of the vestibular and cochlear nerves from the labyrinth to the brainstem: its implications to surgery of the eighth cranial nerve. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 95: 543.
73. Arnesen AR, Osen KK. The cochlear nerve in the cat: topography, cochleotomy, fiber spectrum. *J Comp Neurol* 1978; 178:661.
74. Guinan JJ and others. Single auditory units in the superior olivary complex. II. Locations of unit categories and tonotopic organization 1972; 4: 147.
75. Silverstein H. Cochlear and vestibular gross and histologic anatomy (as seen from postauricular approach). *Otolaryngol Head Neck Surg* 1984; 92: 207.

76. Slepeckly N and others. The consisitent occurance of a striated organelle (Friedmann body) in the inner hair cells of the normal chinchilla. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1981; 91: 189.
77. Moore JK, Osen KK. The cochlear nuclei in man. *Am J Anat* 1979; 154: 393.
78. Brawer JR and others. The neuronal architectctures of the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 1974; 155: 251.
79. Cumming JW, Flint PW, Harker LA, Haughey BH, Schüller DE. 4th ed. Vol 4. Section 150. *Molecular Basis of Auditory Pathology* St. Louise: Mosby Year Book; 2005.
80. Raphael Y, Altschuler RA. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 2003; 60: 397–422.
81. Liberman MC. The olivocochlear efferent bundle and susceptibility of the inner ear to acoustic injury. *J Neurophysiol* 1991; 65: 123-132.
82. Sohmer H, Feinmesser M. Cochlear action potantials recorded from the external ear in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1967; 76: 427-436.
83. Jewett DL, Romano MN, Williston JS. Human auditory evoked potentials: possible brain stem components detected on the scalp. *Science* 1970; 167: 1517-1518.
84. Gorga MP and others. Auditory brain stem responses to tone bursts in normally hearing subjects. *J Speech Hear Res*, 1988; 31: 87-97.
85. Gorga MP and others. Auditory brainstem responses from children three months to three years of age: normal patterns of response II. *J Speech Hear Res* 1989; 32: 281-288.
86. Gorga MP and others. Auditory brainstem responses from graduates of an intensive care nursery: normal patterns of response. *J Speech Hear Res* 1987; 30: 311- 318.

87. Proctor TB, Velde T. M, Dayal VS, Bhattacharyya TK, Artwohl J, Towle VL. Auditory Brain Stem Response in Young and Old Guinea Pigs. *The American Journal of Otology* 1998; 19: 226-229
88. Chang KW, Chinosornvatana N. Practical grading system for evaluating cisplatin ototoxicity in children. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1788- 1795.
89. Brock PR, Knight KR, Freyer DR, Campbell KCM, Steyger PS, Blakely BW, Rassekh SR, Chang KW, Fligor BJ, Rajput K, Sullivan M, Neywelt E. Platinum- induced ototoxicity in children: a consensus review on mechanisms, predispositions, and protection, Including a new international society of pediatric oncology Boston ototoxicity scale. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30: 2408- 2417.
90. Casano RA, Johnson DF, Byovskya Y, et al. Inherited susceptibility to aminoglycoside ototoxicity: genetic heterogeneity and clinical implications. *Am J Otolaryngol* 1999; 29: 151- 156.
91. Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, et al. Mitochondrial ribosomal ARNA mutation associated with both antibiotic- induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4: 289- 294.
92. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307-320.
93. Schweitzer VG. Ototoxicity of chemotherapeutic agents. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 1993; 26: 759- 785.
94. Strauss M, Towfighi J, Lipton A, Brown B, Lord S, Harvey H. Cisplatin ototoxicity: clinical experience and temporal bone histopathology. *Laryngoscope* 1983; 93: 1554-1559.
95. Schaefer SD, Post JD, Close LG, Wright CG. Ototoxicity of low – and moderate- dose cisplatin. *Cancer* 1985; 56: 1934- 1939.

96. Laurell G, Jungelius U. High dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. *Laryngoscope* 1990; 100: 724- 734.
97. Coradini PP, Cigana L, Selistre SG, et al. Ototoxicity from cisplatin therapy in childhood cancer. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29: 355-360.
98. Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, et al. Platinum compound- related ototoxicity in children: Long- term follow- up reveals continuous worsening of hearing loss. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 24: 649-655.
99. Kushner BH, Budnick A, Kramer K, et al. Ototoxicity from high- dose use of platinum compounds in patients with neuroblastoma. *Cancer* 2006; 107: 417-422.
100. Knight KR, Kraemer DF, Neuwelt EA. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: Underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8588-8596.
101. Ravi R, Somani S, Rybak LP: Mechanism of cisplatin ototoxicity: Antioxydant system, *Pharmacol Toxicol* 1995; 76: 386.
102. Rybak LP, Somani S. Ototoxicity: amelioration by protective agents. *Ann NY Acad Sci* 1999; 084: 143.
103. Rybak LP, Husain K, Morris G and others: Effect of protective agents on cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000; 21: 513.
104. Hatzopoulos S, Di Stefano M, Camphell KG and others: Cisplatin ototoxicity in the Sprague- Dawley rat evaluated by distortion product otoacoustic emissions. *Audiology* 2001; 40: 253.
105. Sie KG, Norton SJ. Ghanges in otoacoustic emissions and auditory brain stem response after cis-platinum exposure in gerbils. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 116: 585.

106. Sockalingam R, Filippich L, Charles B and others. Cisplatin- induced ototoxicity and pharmacokinetics: preliminary findings in adog mode. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111:745.
107. Ross CJ, Katzov- Eckert H, Dube MP, et al. Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1345- 1349.
108. Shord SS, Thompson DM, Krempel GA, et al. Effect of concurrent medications on cisplatin- induced nephrotoxicity in patients with head and neck cancer. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 207-215.
109. Ekborn A, Laurell G, Anderson A, et al. Cisplatin- induced hearing loss: Influence of the mode of drug administration in the guine pig. *Hear Res* 2000; 140: 38-44.
110. Brock PR, Kolioukas DE, Barratt TM, et al. Partial reversibility of cisplatin nephrotoxicity in children. *J Pediatr* 1991; 118: 531-534.
111. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1291-1295.
112. Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, et al. Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum- based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4939- 4943.
113. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S, et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1534-1538.
114. Peters U, Preisler- Adams S, Hebesien A, et al. Glutathione S-transferase genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Drugs* 2000; 11: 639-643.

115. Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, et al. Cisplatin- induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J. Clin Oncol* 2007; 25: 708-714.
116. Cesares C, Ramirez- Camacho R, Trinidad A, Roldan A, Jorge E, Ramon Garcia- Berrocal J. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012; 269: 2455-2459.
117. Estrem SA, Babin RW, Ryu JH, Moore KC. Cis- diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck.* 1981; 89: 638-645.
118. Watanebe KI, Jinnouchi K, Hess A, Michel O, Baba S, Yagi T. Carboplatin induces less apoptozis in the cochlea of guinea pigs than cisplatin. *Chemotherapy* 2002; 48: 82-87.
119. Laurell G, Bagger- Sjöback D: Dose- dependent inner ear changes after i.v administration of cisplatin. *J Otolaryngol* 1991; 20: 158- 167.
120. Van Ruijven MWM, de Groot JCMJ, Hendriksen F, Smoorenburg G. Immunohistochemical localization of platined DNA in the cochlea of cisplatin- treated guinea pigs. *Hear. Res.* 2005; 203: 112- 121.
121. Ramirez- Camacho R, Garcia – Berrocal JR, Bujan J, Martin – Marero A, Trinidad A. Supporting celss as a target of cisplatin- induced innear ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* 2004; 114: 533- 537.
122. Thomas JP, Lautermann J, Liedert B, Seller F, Thomale J. High accumulation of platinum- DNA adducts in strial marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not in carboplatin ototoxicity. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 23- 29.
123. Liang F, Schulte BA, Qu C, Hu W, Shen Z. Inhibition of the calcium and voltage- dependent big conductance potassium channel ameliorates

cisplatin- induced apoptosis in spiral ligament fibrocytes of the cochlea. *Neuroscience* 2005; 135: 263- 271.

124. Boshier SK, Smith C, Warren RL. The effects of ethacrynic acid upon the cochlear endolymph and stria vascularis. A preliminary report. *Acta Otolaryngol* 1973; 75: 184
125. Konishi T, Mendelsohn M., Effect of quabain on cochlear potentials and endolymph composition in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1970;69: 192
126. Vermoken JB, Kapteijn TS, Hart AA, Pinedo HM. Ototoxicity of cis-diamminechloroplatinum (II): influence of dose, schedule and mode of administration. *Eur J Cancer* 1983; 19: 53
127. Suur CL, Simis YJ, Lansdaal, Rasch CR, Tange RA, Balm AJ, et al. Audiometric patterns in ototoxicity of intra- arterial cisplatin chemoradiation in patients with locally advanced head and neck cancer. *Audiol Neurotol* 2006; 11: 318.
128. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265
129. National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events, version 3.0 and 4.0 Available at: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm Accessed December 15, 2010.
130. Gupta AA, Capra M, Papaioannou V, et al. Low incidence of ototoxicity with continuous infusion of cisplatin in the treatment of pediatric germ cell tumors. *J Pediatric Hematol Oncol* 2006; 28: 91- 94.
131. American Speech- Language- Hearing Association. Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy. *ASHA* 1994; 36 (12): 11-19.
132. Campbell KCM. Audiologic Monitoring for Ototoxicity. In P Roland, J Rutka(Eds), *Ototoxicity*, New York: BC Decker, 2004:153-160.

133. Campbell KCM, Durrant JD. Audiologic monitoring for ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 26: 903-914.
134. Campbell KCM, Kalkanis J, Glatz FR. Ototoxicity: mechanisms, protective agents, and monitoring. *Cur Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 8: 436-440.
135. American Academy of Audiology Position Statement and Clinical Practice Guidelines: Ototoxicity Monitoring, 2009.
136. Dreschler WA, van der Hulst RJ, Tange RA, Urbanus NA. The role of high frequency audiometry in early detection of ototoxicity. *Audiology* 1985; 24: 387- 395.
137. Fausti SA, Frey RH, Rappaport BZ, Schecter MA. High frequency audiometry with an earphone transducer. *Sem Hear* 1985; 6: 347- 357.
138. Frank T. High- frequency hearing thresholds in young adults using a commercially available audiomete. *Ear Hear* 1990; 11: 450- 454.
139. Frank T. High- frequency (8 to 16 kHz) reference thresholds and intrasubject threshold variability relative to ototoxicity criteria using a Sennheiser HAD 200 earphone. *Ear Hear* 2001; 22: 161-168.
140. Campbell KCM, Kelly E, Targovnik N, Hughes LF, Van Sadars C, Gottlieb AB, Dorr MB, Leighton A. Audiologic monitoring for potential ototoxicity in a Phase I Clinical Trial of a new glycopeptide antibiotic. *J Am Acad Audiol: Special Edition on Ototoxicity* 2003; 14: 157-169.
141. Gordon JS, Philips DS, Helt WJ, Fausti SA. The evaluation of insert earphones for high- frequency bedside ototoxicity monitoring. *J Rehab Res Develop* 2005; 42: 353- 362.

142. Valente M, Potts LG, French-St. George M, Goebel J. High frequency thresholds: sound suite versus hospital room. *J Am Acad Audiol* 1992; 3: 287- 294.
143. Kjansuu E, Rahko T, Punnonen R, Karma P. Evaluation of the hearing loss associated with cisplatin treatment by high frequency audiometry. *Gynecol Oncol* 1989; 33: 321- 322.
144. Osterhammel D. High frequency audiometry. Clinical aspects. *Scand Audiol* 1980; 9: 249-256.
145. Zorowka PG, Schmitt HJ, Gutjahr P. Evoked otoacoustic emissions and pure tone threshold audiometry in patients receiving cisplatin therapy. *Int Pediatr Otorhinolaryngol* 1993; 25: 73- 80.
146. Stravroulaki P, Apostolopoulos N, Dinopoulo D, Vossinakis I, Tsakanikos M, Douniadakis D. Otoacoustic emissions- an approach for monitoring aminoglycoside induced ototoxicity in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 50: 177-184.
147. Ress BD, Sridhar KS, Balkany TJ, Waxman GM, Stanger BB, Lonsbury-Martin BL. Effects of cis-platinum chemotherapy on otoacoustic emissions: the development of an objective screening protocol. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121: 693- 701.
148. Lonsbury-Martin BL, Martin GK. Evoked otoacoustic emissions as objective screeners for ototoxicity. *Sem Hearing* 2001; 22: 377- 91.
149. Knight KR, Kraemer DF, Winter C, Neuwelt EA. Early changes in auditory function as a result of platinum chemotherapy: use of extended high-frequency audiometry and evoked distortion product otoacoustic emissions. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1190-1195.
150. Probst R, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. A review of otoacoustic emissions. *J Acoust Soc Am* 1991; 20: 2027-2067.

151. Norton SJ. Cochlear function and otoacoustic emissions. *Semin Hear* 1992; 13: 1-14.
152. Seligman H, Podoshin L, Ben- David J, Fradis M. Drug- induced tinnitus and other hearing disorders. *Drug Saf* 1996; 14: 198-212.
153. Kopelman J, Budnick AS, Kramer MB, Sessions RB, Wong GY. Ototoxicity of high- dose cisplatin by bolus administration in patients with advanced cancers and normal hearing. *Laryngoscope* 1988; 98: 858-864.
154. Tlumak AL, Durrant JD, Collet L. 80 Hz auditory steady- state responses (ASSR) at 250 Hz and 12,000 Hz. *Int J Audiol* 2007; 46: 26- 30.
155. Deng Y, Xu ZF, Liu W, Xu B, Yang HB, Wei YG. Riluzole- triggerde GSH synthesis via activation of glutamate transporters to antagonize methylmercury-induced oxidative stress in rat cerebral cortex. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012
156. Lang- Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, Mantz J, Widmann C, Desmonts J, Lazdunski M. Ischemic spinal cord injury by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; 18: 174-181.
157. Nordang L, Cestreicher E, Arnold W, et al. Glutamate is the afferent neurotransmitter in the human cochlea. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 359-362.
158. Khan MJ, Seidman MD, Quirk WS, et al. Effects of kynurenic acid as a glutamate receptor antagonist in the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257: 177- 18.
159. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium – apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 552-565.

160. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315- 424.
161. Hubert JP, Delumeau JC, Glowinski J, Premont J, Dobel A. Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratidine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanisms of action. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 261- 267.
162. Siniscalchi A, Bonci A, Mercuri NB, Bernardi G. Effects of riluzole on rat cortical neurons: an in vitro electrophysiological study. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 225-230.
163. Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K (+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 906- 912.
164. Peluffo H, Estevez A, Barbeito L, et al. Riluzole promotes survival of rat motoneurons in vitro by stimulating trophic activity produced by spinal astrocyte monolayers. *Neurosci Lett* 1991; 228: 207-211.
165. Cooper G, Schiller AL. External anatomy. In: Cooper G, editor *Anatomy of the Guinea Pig*, Cambridge: Harvard Univ Pr, 1974: 3–17.
166. Öztürk R. Guinea Pig Kulak Cerrahi Anatomisi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2003.
167. Göksu N, Hazıroğlu R, Kemaloğlu Y, Karademir N, Bayramoğlu I, Akyıldız N. Anatomy of the Guinea pig temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; 101:699–704.
168. Sütbeyaz Y, Karaşen M. Guinea pig temporal kemik anatomisi. *Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi* 1998; 5; 3: 173–7.
169. Kayhan FT, Algün Z. A histologic study on temporal bone of guinea pigs. *Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi* 2003; 10 (2):51–57.

170. Ensari N, Polilaktik asit biyoabsorbabl adhezyon bariyer filminin kobaylardaki nörotoksik etkisinin araştırılmasıamacıyla orta kulağa uygulanması. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, 2008
171. Wysocki J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. *Hearing Research* 2005; 199: 103-110.
172. Asarch R, Abramson M, Litton WB. Surgical anatomy of the guinea pig ear. *Ann Otol* 1975; 84: 250-255.
173. Albuquerque AAS, Rossato M, Oliveira JAA, Hyppolito MA. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009; 75: 43-49
174. Ingham N J, Thornton S K, Comis S D, Withington D J. The Auditory Brainstem Response of Aged Guinea Pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1998; 118: 673–680.
175. Wada S, Starr A. Anatomical bases of binaural interaction in auditory brain-stem responses from guinea pig. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*, 1989; 72: 535–544.
176. Wada S, Starr A. Generation of Auditory Brain Stem Responses (ABRs). II. Effects of Surgical Section of the Trapezoid Body on the ABR in Guinea Pigs and Cat. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*. 1983; 56: 340–351.
177. Moroso MJ, Blair RL: A review of cisplatin ototoxicity. *J Otolaryngol* 12: 365, 1983.
178. Blakely BW, Grupta AK, Myers SF, et al: Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arc Otolaryngol* 120: 541, 1994
179. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J. Exp. Med.* 2009; 219:177-186

180. Cardinaal RM, de Groot JC, Huizing EH, et al. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear Res* 2000;144:135–46
181. Jeong HJ, Choi Y, Kim MH, Kang IC, Lee J, Park C, Park R, Kim HM. Rosmarinic acid, active component of Dansam-Eum attenuates ototoxicity of cochlear hair cells through blockage of caspase-1 activity. *PLoS ONE* 2011; 6(4): e18815
182. Kelly TC, Whitworth CA, Husain K, Rybak LP. Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. *Hear. Res.* 2003; 186: 10-16
183. Naggy I, Monge A, Albinger- Hegyi A, Schmid S, Bodmer D. NF- κ B is required for survival of immature auditory hair cells in vitro. *J. Assoc. Res Otolaryngol* 2005;6: 260-268
184. Xu Y, Huang S, Liu ZG, Han J. Poly (ADP- ribose) polymerase-1 signalling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP/TRAF2- mediated JNK1 activation. *J Biol Chem* 2006; 281(13): 8788-8795.
185. Kim HJ, So HS, Lee JH, Park C, Park SY, Kim YH, Youn MJ, Kim SJ, Chung SY, Lee KM, Park R. Heme oxygenase- 1 attenuates the cisplatin-induced apoptosis of auditory cells via down- regulation of reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1810- 1819
186. Choi BM, Chen XY, Gao SS, Zhu R, Kim BR. Antiapoptotic effect of phloretin on cisplatin- induced apoptosis in HEI-OCI auditory cells. *Pharmacol Rep* 2011; 63(3): 708-716.
187. Cunningham LL, Brandon CS. Heat shock inhibits both aminoglycoside- and cisplatin induced sensory hair cell death. *J Assoc Res Otolaryngol* 2006; 7: 299- 307.
188. Rybak LP. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15: 364- 369.

189. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, et al. The use of organotypic cultures of Cort's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* 1997; 18: 559-571.
190. Dickey TD, Muldoon LL, Kraemer DF, Neuwelt EA. Protection against cisplatin ototoxicity by N- acetylsteine in a rat model. *Hear Res* 2004; 193: 25-30.
191. Whitworth CA, Ramkumar V, Jones B, et al. Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1801-1807.
192. Mukherjea D, Whitworth CA, Nandish S, et al. Expression of the kidney injury molecule 1 in the rat cochlea and induction by cisplatin. *Neuroscience* 2006; 139: 733- 740.
193. Bach FH, Heme oxygenase- 1: a therapeutic application. *FASEB J* 2005; 19: 1216- 1219
194. Choi BM, Kim SM, Park TK, et al. Piperine protects cisplatin- induced apoptosis via heme oxygenase- 1 induction in auditory cells. *J Nutr Biochem* 2007; 18(9): 615-622.
195. Li G, Sha SH, Zotova E, et al. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest* 2002; 82: 585- 596.
196. Ramesh G, Reeves WB. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor- alpha. *Kidney Int* 2004; 65: 490- 499.
197. So HS, Kim HJ, Lee JH, et al. Flunarizine induces Nrf2- mediated transcriptional activation of heme oxygenase – 1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1763-1775.
198. Boven E, Verschraagen M, Hulscher TM, Erkelens CAM, Hausheer FH, Pinedo HM, van der Vijgh WJF. Bnp7787, a novel protector against

- platinum- related toxicities, does not affect the efficacy of cisplatin or carboplatin in human tumour xenografts. *Eur J. Cancer* 2002; 38: 1148-1156.
199. Wang J, Faulconbridge RVL, Fetoni A, Guitton MJ, Pujol R, Puel JL. Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin- induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology* 2003; 45: 380- 393.
 200. Wimmer C, Mees K, Stumpf P, Welsch U, Reichel O, Suckfull M. Round window application of D- methionine, sodium thiosulfate, brain- derived neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 in cisplatin- induced ototoxicity. *Otol Neurotol* 2004; 25: 33-40.
 201. Ekborn A, Hanson J, Ehrsson H, Eksborg S, Wallin I, Wagenius G, Laurell G. High dose cisplatin with amifostine: ototoxicity and pharmacokinetics. *Laryngoscope* 2004; 114: 1660- 1667.
 202. Campbell KC, Meech RP, Rybak LP, Hughes LF. The effect of D- methionine on cochlear oxidative state with and without cisplatin administration: mechanisms of otoprotection. *J Am. Acad. Audiol.* 2003; 14: 144- 156.
 203. Rybak LP, Whitworth CA. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today* 2005; 10: 1313- 1321.
 204. Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J. Combined oral delivery of ebselen and allopurinol reduces multiple cisplatin toxicities in rat breast and ovarian cancer models while enhancing anti- tumor activity. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 569-579.
 205. Wang J, Ladrech S, Pujol R, Brabet P, Van De Water TR, Pujol JL. Caspase inhibitors, but not c- Jun NH₂- terminal kinase inhibitor treatment prevents cisplatin- induced hearing loss. *Cancer Res.* 2004; 4: 9217- 9224.

206. Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin- α suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 2003; 120: 191- 205.
207. Waissbluth S, Salehi P, He X, Daniel SJ. Systemic dexamethasone for the prevention of cisplatin- induced ototoxicity. *Eur Arch Otolaryngol* 2013; 270(5): 1597- 1605.
208. Hill GW, Morest DK, Parham K. Cisplatin- induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections. *Otol Neurotol* 2008; 29(7): 1005- 1011.
209. Calli C, Pinar E, Oncel S, Bagrıyanık HA, Sakarya EU. Recovery of hearing in cisplatin- induced ototoxicity in the guinea pig with intratympanic dexamethasone. *Indian J. Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012; 64(1): 46-50.
210. Ettaiche M, Fillacier K, Widmann C, Heurteaux C, Lazdunski M. Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 729- 736
211. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of the apoptotic program in cell free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157.
212. Mattson MP, Calcium and Free Radicals: Mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter- regulated developmental plasticity and cell death. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1996; 3: 79-91
213. Maeno, E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 9487- 9492.

8. ÖZET

“Riluzol tedavisinin sisplatine bağlı ototoksisiteden korunmadaki rolü”

Bu çalışma, riluzol tedavisinin sisplatine bağlı olarak gelişen ototoksisiteden korunmadaki rolünü ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Kobaylar 8'erli 3 gruba ayrıldı ve tüm kobayların her iki kulağındaki işitsel beyin sapı cevap (İBC) eşikleri ilaç uygulama öncesinde tespit edildi. Tüm gruplara 3 gün süre ile 5 mg/kg sisplatin uygulandı. Sisplatin verilmeden 30 dk önce birinci gruba 2 cc serum fizyolojik, ikinci gruba ve üçüncü gruba sırasıyla 6 mg/ kg ve 8 mg/ kg riluzol hidroklorid, serum fizyolojik içinde 2cc'lik çözelti halinde uygulandı. Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra kobayların İBC eşikleri tekrar değerlendirildi. Derin anestezi altında intrakardiyak kan alımını takiben bilateral temporal kemikler sakrifiye edildi. Sağ temporal kemikler transmisyon elektromikroskopik inceleme için ayrılırken, sol kohlea içi mebranöz labirent kısım ise biyokimyasal inceleme için saklandı.

Tone burst 8 kHz uyaranda her iki kulakta ve sol kulakta click uyaranda riluzol hidroklorid verilen grupta, serum fizyolojik verilen gruba göre İBC eşiklerinde anlamlı düşüklük gözlemlendi. Tone burst 8 kHz uyaranda riluzol verilmeyen grupta istatistiksel olarak anlamlı İBC eşik değişimleri görüldü. Transmisyon elektromikroskopik incelemede tüylü hücrelerde ve stria vasküleriste riluzol alan gruplarda, riluzol kullanılmayan gruba göre daha az dejeneratif bulgular gözlemlendi. İlaç öncesi ve ilaç sonrası İBC eşikleri açısından ikinci ve üçüncü grup arasında fark saptanmazken, üçüncü grupta hücreler belirgin olarak normale yakındı. İşitsel sinir liflerindeki dejeneratif bulgular üç grupta belirgin farklılık göstermedi. Malondialdehid (MDA) düzeyleri

beklenilen aksine riluzol verilen grupta istatistiksel açıdan yüksek saptandı ve bu durum çalışma için anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak riluzolun sisplatin ototoksitesinde özellikle 8 kHz'da İBC eşikleri ve tüylü hücreler ve stria vaskülaris dejenerasyonu üzerinde koruyucu etkisi olduğu gözlemlendi. Ancak riluzolun oksidatif mekanizma üzerindeki etkileri, saptanan MDA değerleri ile desteklenemedi.

Anahtar kelimeler: Riluzol, ototoksite, sisplatin

9. ABSTRACT

“The role of riluzole treatment in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity”

The aim of this study was to analyse the role of riluzole treatment for the prevention of cisplatin induced ototoxicity.

Guinea pigs were divided into three groups as 8 animals in each group and auditory brainstem response (ABR) thresholds of all animals were detected bilaterally before any drug administration. 5 mg / kg cisplatin was given for all groups for 3 days. In the first group 2 cc of saline was applied and in the second and third group, 2 cc of drug solution that was prepared respectively with 6 mg/ kg and 8 mg/ kg riluzole hydrochloride was given thirty minutes before cisplatin administration. Auditory brainstem response thresholds of groups were reassessed 24 hours after the final drug application. Following intracardiac blood collection under deep anesthesia, bilateral temporal bones were sacrificed. Right temporal bones were spared for transmission electromicroscopic investigation and membranous labyrinthine of left cochleas was stored for biochemical investigation.

Statistically significant lower ABR thresholds were observed in the treatment group with riluzole hydrochloride on the tone burst 8 kHz stimuli for both ear and click stimuli for only left ear. In the group not-treated by riluzole, significant ABR threshold changes were detected at 8 kHz. Under transmission electromicroscopic examination (TEM), lower degenerative findings about hair cells and stria vascularis were observed in the groups treated with riluzole than the group not-treated by riluzole. While there was no difference in terms of ABR

thresholds between the second and the third group before and after drug administration, hair cells and stria vascularis were seemed significantly closer to normal in the third group than the second group. Contrary to expectations, malondialdehyde (MDA) levels in the group treated by riluzole was statistically higher than the other groups and this is not meaningful result for this study.

In conclusion, the effects of riluzole on protection from cisplatin ototoxicity especially for ABR thresholds at 8 kHz and degeneration of hair cells and stria vascularis was observed. However the effects of riluzole on oxidative mechanisms wasn't supported with the detected MDA levels.

Key words: Riluzole, ototoxicity, cisplatin

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 80-6489
KONU :

07.04/2011

Sayın

Prof.Dr.Kemal UYGUR
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Kemal UYGUR, Selin ÜSTÜN, Çağrı GÖKDOĞAN, Hatice PAŞAOĞLU, Özlem GÜLBAHAR, Osman Tuğrul GÜZELDİR ve Çiğdem ELMAS'tan oluşan, G.Ü.ET-11.032 kod numaralı ve "*Riluzol tedavisinin sisplatine bağlı olarak gelişen ototoksititeden korunmadaki rolü*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.032 and entitled "*The role of riluzole treatment in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Selin

Soyadı: ÜSTÜN BEZGİN

Doğum Yeri / Tarihi: AMASYA / 09.01.1984

Eğitim:

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun
Cerrahisi Anabilim Dalı (2008 – 2013)

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (2002 – 2006)

Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (1995 – 2002)

Sedat Celasun İlköğretim Okulu (1993 – 2005)

Cemil Akyüz İlköğretim Okulu (1991 – 1993)

Yabancı Dil: İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri:

- **Thermal welding versus cold knife tonsillectomy: a prospective randomized study.** Yilmaz M, Duzlu M, Catli T, Ustun S, Ceylan A. Kaohsiung J Med Sci. 2012 May;28(5):270-2.
- **Audiological correlates of tumor parameters in acoustic neuromas.** Tutar H, Duzlu M, Göksu N, Ustün S, Bayazit Y. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013 Feb;270(2):437-41.
- **Castleman's Disease in the Neck and Parotid Region: a Report of Two Cases.** Üstün Selin, Ceylan Alper, Kızıl Yusuf, Utku Aydil. Gazi Medical Journal 2012 23 (2); 69-72.

- **Maksiller sinus ostiumuna göç eden diş implantı ve transnasal endoskopik yaklaşımla çıkarılması: Bir olgu sunumu.** Üstün S, Ceylan A, Kızıl Y, Aydil U. Türk Rinoloji Dergisi (Kabul ediliş: Ağustos 2013).
- **Nörootoloji ve Lateral Kafa Tabanı Mikrocerrahisi Klinik Fellowship** Prof. Dr. Mario SANNA, Gruppo Otologico, Piacenza- İTALYA, 5 Mayıs - 7 Ağustos 2011.