



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAŞA BAĞLI İŞİTME KAYBININ ÖNLENMESİ VE
TEDAVİSİNDE KOENZİM Q10'UN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Togay MÜDERRİS

ODYOLOJİ VE KONUŞMA BOZUKLUKLARI PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAŞA BAĞLI İŞİTME KAYBININ ÖNLENMESİ VE
TEDAVİSİNDE KOENZİM Q10'UN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Togay MÜDERRİS

ODYOLOJİ VE KONUŞMA BOZUKLUKLARI PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Önlenmesi Ve Tedavisinde Koenzim Q10'un Etkisi

Togay MÜDERRİS

DOKTORA TEZİ

19.02.2020

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Mehmet Ali BABADEMEZ

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Muzaffer KIRIŞ

Prof. Dr. Mehmet Ali BABADEMEZ

DoçDr.Banu MÜJDECİ

Doç.Dr.Bilgehan BÖKE

Doç.Dr.Bülent GÜNDÜZ

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için gereken
tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz

Prof.Dr.Seyfullah Oktay Arslan

Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

19.02.2020

Togay MÜDERRİS



TEŞEKKÜR

Bu teze başlarken beni her anlamda özgür bırakan, tez dönemi süresince desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ali BABADEMEZ ve doktora eğitimi ve tez dönemi boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her konuda yol gösterip, yardımcı olan Doç.Dr.Banu MÜJDECİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, tez çalışması sırasında yardımlarını esirgemeyip, çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emek harcayan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hipotezler.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İşitme Fizyolojisi ve Anatomisi.....	4
2.1.1. Santral İşitsel Yollar.....	6
2.2. Yaşlılık.....	7
2.3. Yaşlanmanın Kulak Üzerine Etkileri.....	7
2.4. Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Etyolojisi.....	8
2.4.1. Oksidatif Stres.....	10
2.4.2. Apoptoz.....	12
2.4.3. İnflamasyon.....	13
2.5. Yaşlılığa Bağlı İşitme Kaybının Sınıflandırması.....	15
2.6. Tanı.....	15
2.7. Ayırıcı Tanı.....	16
2.8. Tedavi.....	16
2.9. Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Psikososyal Etkileri.....	17

2.10. C57/BL6 Farelerin İşitsel Özellikleri.....	17
2.10.1. C57/BL6 Farelerde Yaşa Bağlı İşitme Kaybı.....	18
2.11. Farelerde ABR Ölçümü.....	19
2.12. Koenzim Q10.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Laboratuvar Hayvanları.....	23
3.2. Çalışma Grupları.....	23
3.2.1. Kontrol Grubu.....	23
3.2.2. Sham Kontrol Grubu.....	24
3.2.3. Erken Tedavi Grubu.....	24
3.2.4. Geç Tedavi Grubu.....	25
3.3. İşitsel Beyin Sapı Cevabı Testi.....	25
3.4. Koklea Homojenatlarında Yapılan Gen İfadeleme Çalışmaları.....	28
3.4.1. Dokudan RNA İzolasyonu.....	30
3.4.2. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi.....	30
3.4.3. Kantitatif Real Time PCR Yöntemi.....	31
3.5. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. İşitsel Beyin Sapı Cevabı Sonuçları.....	33
4.2. Gen İfadeleme Üzerindeki Değişiklikler.....	39
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
7. KAYNAKLAR.....	52

8. EKLER.....62

Ek-1. Etik Kurul Onayı.....62

Ek-2. Özgeçmiş.....63



ÖZET

Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Önlenmesi ve Tedavisinde Koenzim Q10'un Etkisi

Yaşa bağlı işitme kaybı, veya presbiakuzi, işitme duyusunun azalması, gürültülü ortamlarda konuşmayı ayırt etmenin zorlaşması ve ses lokalizasyonunun bozulması ile karakterizedir ve günümüzde etkin bir tedavisi yoktur. Bu çalışmanın amacı, presbiakuzinin önlenmesi ve tedavisinde CoQ10'un etkisinin belirlenmesidir. Bu amaçla, 32 adet C57BL/6 fare, 4 deneysel gruba ayrıldı; kontrol, sham kontrol, erken tedavi ve geç tedavi grubu. Erken tedavi grubuna fareler 3 aylıkken CoQ10 başlanırken, geç tedavi grubuna 6. ayda tedavi başlandı. Farelere, işitme kaybının tespiti için her üç ayda bir olmak üzere ABR testi yapıldı ve her iki kulak için dB cinsinden ayrı ayrı eşik düzeyleri belirlendi. Çalışmanın 12. ayı sonunda, farelerin iç kulağından alınan koklea dokusunda, inflamasyonda ve apoptozda etkili olan iNOS, COX-2, NF- κ B, Bcl-2, Bax ve Bak gen ifadenme düzeyleri Real-time PCR yöntemi ile analiz edildi. Deneyin 12. ayında yapılan ABR'lerde erken tedavi grubundaki farelerde eşik düzeyleri geç tedavi, kontrol ve sham kontrol gruplarına göre anlamlı olarak iyiydi ($p<0.001$). Geç tedavi grubunun ABR eşik düzeyleri kontrol gruplarından daha iyi olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Çalışmanın başlangıcından 15. aya kadar erken tedavi grubunda oluşan ABR eşik düzey değişikliği tüm frekanslarda kontrol gruplarından düşüktü ($p<0.001$). Erken ve geç tedavi gruplarının son eşik değişim farkları 11.875 dB ile 23.125 dB arasında değişiyordu ve bu fark 4 kHz'de anlamlı değilken ($p>0.05$), 8, 12 ve 16 kHz'de erken tedavi grubunda anlamlı olarak düşüktü ($p<0.001$). Erken tedavi grubunda kontrol gruplarına kıyasla Bax, Bak gibi pro-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin azaldığı ($p<0.05$), Bcl-2, Bcl-xL gibi anti-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin arttığı ($p<0.05$) ve inflamasyonda rol oynayan inflamatuvar mediatörlerden NF- κ B, COX-2 ve iNOS genlerinin mRNA ifadenme düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığı ($p<0.05$) gözlemlendi. Bu sonuçlar, CoQ10'un, yaşa bağlı işitme kaybının önlenmesinde, işitme kaybı başlamadan tedaviye başlandığında etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ABR, antioksidanlar, Koenzim Q10, oksidatif stres, yaşa bağlı işitme kaybı

ABSTRACT

The Effects of Coenzyme Q10 in the Prevention and Treatment of Age-Related Hearing Loss

Age-related hearing loss is characterized by gradual, progressive sensorineural hearing loss and deterioration of sound localization and currently no effective treatment is available targeting this issue. The aim of this study is to evaluate the effects of CoQ10 in the prevention and treatment of age-related hearing loss. For this purpose, 32 C57BL/6 mice were assigned into four groups as follows; control, sham control, early and late treatment. Treatment was started at three months of age in the early treatment group while at sixth month in the late treatment group. For detection of the hearing loss, ABR test was performed once every three months. At the end of the study period, the cochleae of the animals were harvested and iNOS, COX-2, NF- κ B, Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Bak levels were analyzed with Real-Time PCR. In the ABR's performed at the end of the study, hearing thresholds of the mice in early treatment group were better than other groups ($p < 0.001$). Hearing levels were also better in late treatment group, compared to control groups, but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). When the threshold shifts were analysed, the shift in early treatment group was significantly lower at all frequencies, when compared to control groups ($p < 0.001$). Threshold shifts of early and late treatment groups were ranged between 11.875 dB and 23.125 dB. While this difference was not significant in 4 kHz ($p < 0.05$), it was significantly lower in 8, 12, and 16 kHz ($p < 0.001$). mRNA expression levels of pro-apoptotic genes Bax and Bak were lower ($p < 0.05$), anti-apoptotic genes Bcl-2, Bcl-xL were higher ($p < 0.05$) and NF- κ B, COX-2 and iNOS genes that play a role in inflammation were lower ($p < 0.05$), in the early treatment group. These results suggest that, CoQ10 is effective in prevention of age-related hearing loss, especially when started before the onset of hearing loss.

Keywords: ABR, age related hearing loss, antioxidants, Coenzyme Q10, oxidative stress

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

COX-2	: Cyclooxygenase-2 (Siklooksijenaz-2)
iNOS	: Inducible Nitric Oxide Synthase (Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz)
CoQ10	: Coenzyme Q10 (Koenzim Q10)
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Bcl-2	: B-cell Lymphoma 2 (B-hücreli Lenfoma 2)
Bax	: Bcl-2 Associated X Protein (BCL-2 ilişkili X Protein)
Bak	: Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer
Bcl-Xl	: B-cell Lymphoma Extra Large (B-hücreli Lenfoma Ekstra Büyük)
SPL	: Sound Pressure Level (Ses Basınç Seviyesi)
dB	: Desibel
ABR	: Auditory Brainstem Response (İşitsel Beyinsapı Cevabı)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RNS	: Reactive Nitrogen Species (Reaktif Azot Türleri)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
mtDNA	: Mitokondriyal Deoksiribonükleik Asit
DTH	: Dış Tüylü Hücre
İTH	: İç Tüylü Hücre
SGN	: Spiral Ganglion Nöronları
ATP	: Adenozin Trifosfat
LDL	: Low Density Lipoprotein (Düşük Dansiteli Lipoprotein)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
TB	: Tone Burst
Ort	: Ortalama
SS	: Standart Sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yaşa bağlı işitme kaybı, risk faktörleri ve oksidatif stres.....	9
Şekil 2.2. Fare modelinde koklear sensöriyel epitelde DTH'de oluşan azalma ve SGN'lerdeki kaybı gösteren elektron mikroskopik görüntüler.....	19
Şekil 2.3 Farelerde klik ve tone burst uyaranlara cevap olarak oluşan ABR kayıt örnekleri.....	20
Şekil 2.4. Koenzim Q10'un kimyasal yapısı.....	21
Şekil 3.1. Deney protokolü.....	26
Şekil 3.2a. ABR test düzeneği.....	26
Şekil 3.2b. ABR elektrotlarının yerleştirilmesi.....	27
Şekil 3.3. Çalışmanın 6. ayında erken tedavi grubunda sol kulaktan ABR örneği (12 kHz).....	28
Şekil 3.4a. Dekapitasyon ve derinin eksizyonu sonrası mouse kafasının ventralden görünüşü.....	28
Şekil 3.4b. Fare kafatasının açılması, beyin ve kranial sinirlerin eksizyonu sonrası kafa tabanının ve her iki temporal kemiğin ventralden görünüşü.....	29
Şekil 3.4c. Çıkarılan fare temporal kemiğinin ventralden görüntüsü.....	29
Şekil 4.1. Deney başlangıcında uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	33
Şekil 4.2. Fareler 6 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	34
Şekil 4.3. Fareler 9 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	35
Şekil 4.4. Fareler 12 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	37
Şekil 4.5. Deneyin 12. ayında uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	38
Şekil 4.6. Tedavi başlangıcı ve sonu arasında gruptaki ABR eşiği değişimi.....	39
Şekil 4.7. Yaşa bağlı işitme kaybı modelinde CoQ10'un hedef genlerin bağlı mRNA ifadenme düzeyleri üzerindeki etkisi.....	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.....	31
Tablo 3.2. Gene özgü primer dizileri ve prob numaraları.....	32
Tablo 4.1. Çalışmanın başlangıcında uyaran frekanslarına göre farelerdeki işitme eşikleri ortalaması.....	33
Tablo 4.2. Çalışmanın 3. ayında uyaran frekanslarına göre farelerdeki işitme eşikleri ortalaması.....	34
Tablo 4.3. Fareler 9 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	35
Tablo 4.4 Fareler 12 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	36
Tablo 4.5. Fareler 15 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması.....	37
Tablo 4.6. Tedavi başlangıcı ve sonu arasında gruptaki ABR eşiği değişiklikleri.....	39

1. GİRİŞ

Yaşa bağılı sensorinöral işitme kaybı veya presbiakuzi, yaşlanmaya eşlik eden, yavaş ilerleyen işitme kaybıdır. Presbiakuzi, işitme duyusunun azalması, gürültülü ortamlarda konuşmayı ayırt etmenin zorlaşması, akustik uyarıların beyinde yavaşlaması ve ses lokalizasyonun bozulması ile karakterizedir. İşitme kaybı tipik olarak yüksek frekanslarda görülür (1,2).

Presbiakuzi yaşlı nüfusu etkileyen en yaygın durumlardan biridir. 65 yaş ve daha üstü yetişkinlerin %35'inde değişik derecelerde Presbiakuzi olduğu gösterilmiştir. Yaşa bağılı işitme kaybı, bireyi iletişim yeteneğinden alıkoymakta, bu yüzden de günlük hayatını olumsuz yönde etkileyerek hayatı tek başına idame ettirebilme yetisini kaybettirmektedir. Hastalar sıklıkla depresyon ve bununla ilişkili sosyal geri çekilme ile karşılaşmaktadır. Bu yüzden presbiakuzi, önemli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir (3).

Serbest radikal hasarının nedeni olan oksidatif hasar, hücrelerin biyolojik yaşlanmasındaki yaşa bağılı patolojilerin belki de en temel nedenidir. Oksidatif hasar, benzer şekilde presbiakuzi patogenezinde de önemli bir intrinsik faktördür. Hücrelerin normal faaliyetleri sırasında bir yan ürün olarak ortaya çıkan serbest radikaller, mitokondriyal genom silinmelerine neden olmaktadır. İnsan temporal kemik çalışmaları, presbiakuziden etkilenen yaşlı bireylerde, hastalıktan etkilenmemiş yaşlı bireylere kıyasla mitokondriyal genom silinmelerinin sıklığında bir artış olduğunu ortaya koymuştur (4).

Yaşa bağılı gelişen bir durum olan presbiakuzi patogenezinde oksidatif hasarın katkısı göz önünde tutulduğunda, antioksidanların, hastalığın başlamasını veya ilerlemesini önleyebileceği düşünülebilir. Bu nedenle, folat, melatonin, askorbik asid, alfa lipoik asid, melatonin, karnitin de dahil olmak üzere çok sayıda antioksidanın, presbiakuzinin önlenmesi veya tedavisindeki rolü araştırılmış ve farklı antioksidanların yaşa bağılı işitme kaybı gelişiminin önlenmesinde ve tedavisinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (5,6).

İnflamasyon sırasında, farklı sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler tarafından uyarılarak inflamatuvar süreçte görev alan monositler, makrofajlar, sinoviyal hücreler, fibroblastlar, kondrositler ve endotel hücrelerinde siklooksijenaz-2 (COX-2) ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) genlerinin ifadelenmesinde artış izlenir. İşitme kayıplarında, COX-2 ve iNOS başta olmak üzere çeşitli inflamatuvar mediatörlerde artış olduğu, koenzim Q10 (CoQ10)'un bu mediatörlerin miktarında ciddi miktarda azalmaya yol açtığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (7, 8).

Çok hücreli organizmalarda, organizmaların homeostazisinin sağlanmasında, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması için evrimleşmiş en önemli mekanizma apoptotik hücre ölümüdür ve apoptoz, hücrelerin yaşamı ve ölümü arasındaki dengenin korunması için elzemdir (9). Pek çok farklı molekül tarafından kontrol edilen apoptoz, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile karakterize olan dışsal (reseptör aracılı) ve mitokondri-apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile karakterize olan içsel (mitokondriyal) yolak olmak üzere iki şekilde başlatılabilir. Çeşitli proteinler, apoptozu uyarıcı veya baskılayıcı şekilde düzenlerler. Apoptoz organizasyonunda kaspaz enzimleri ve hücre içi Bcl-2 gen ailesi proteinleri (Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax) gibi bazı hücrel molekül görev almaktadır. Yapılan fare deneylerinde sensorinöral işitme kaybı olan farelerde apoptotik hücre ölümünün daha erken olduğu gösterilmiştir (10).

Yaptığımız çalışmada, C57BL/6 farelerinde CoQ10'un presbiakuzide olası koruyucu, geciktirici ve/veya tedavi edici etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, presbiakuzi gelişimi ve CoQ10 uygulamasından sonra, farelerden elde edilen koklea dokularında, inflamasyonda etkili olan proteinler olan iNOS, COX-2, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ile apoptoz oluşumunda etkili olan Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak genlerinin mRNA ifadelenme düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin Real Time PCR yöntemi ile ortaya konulması planlanmıştır.

1.1. Hipotezler

Yaş a ba ğ lı iş itme kayb ının önlenmesi, geciktirilmesi ve tedavisinde, oldukça etkili bir antioksidan olan CoQ10'un olumlu etkisi vardır.

Hipotez 1

H₀: CoQ10 farelerde yaş a ba ğ lı iş itme kayb ını önlemez.

H₁: CoQ10 farelerde yaş a ba ğ lı iş itme kayb ını önler.

Hipotez 2

H₀: CoQ10 ile tedaviye baş lama süresi farelerde yaş a ba ğ lı iş itme kayb ını önlemede etkili de ğ ildir.

H₁: CoQ10 ile tedaviye baş lama süresi farelerde yaş a ba ğ lı iş itme kayb ını önlemede etkilidir.

Hipotez 3

H₀: %30 DMSO'nun iş itme üzerine bir etkisi yoktur.

H₁: %30 DMSO'nun iş itme üzerine bir etkisi vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Fizyolojisi ve Anatomisi

Atmosferde oluşan ses dalgalarının kulak kepçesi tarafından toplanarak beyindeki santral merkezlerde anlam ve karakter olarak algılanmasına kadar olan sürece işitme denir. İşitme birbirini izleyen bir kaç fazda gerçekleşir;

a) *İletim-conduction*: İşitmenin gerçekleşmesi için gerekli olan ilk aşamadır ve ses dalgalarının atmosferden dış ve orta kulak aracılığı ile Corti organına iletilmesidir. Bu olay mekanik bir olaydır ve sesin kendi enerjisi ile sağlanır (11).

b) *Dönüşüm-transduction*: Ses enerjisinin, biyokimyasal olaylarla Corti organında elektrik enerjisi haline dönüştürülmesidir. Ses dalgaları iç kulakta perilenfe geçerek hareketlendirir ve bazalden apikale doğru baziller membranda titreşimler oluşur (12).

c) *Nöral şifre-neural coding*: İç kulaktaki iç ve dış tüylü hücrelerde meydana gelen elektriksel akım, her hücrenin kendisiyle bağlantılı frekansa göre özgülleşmiş sinir liflerini uyarır. Bu şekilde elektriksel enerji, frekans ve şiddetine göre değişik sinir liflerine iletilir. Yani ses, Corti organında şiddet ve frekansına göre kodlanmış olur (11,13).

d) *Cognition-association*: İşitme merkezinde her iki kulaktan ayrı ayrı ve tek tek gelen sinir iletimleri birleştirilir ve süzülür. Yani sesin karakteri ve anlamı anlaşılır hale getirilir (13).

Tüm memelilerde, ses, kulak kepçesi ve dış kulak yolu tarafından toplanarak kulak zarına iletilir, bu da orta kulakta bulunan kemikçiklerin titreşimine neden olur. Bu, ses enerjisinin, iç kulakta bulunan, sıvı dolu koklea üzerinde yerleşen oval pencereye iletimini sağlar. Dışarının hava dolu ortamdan iç kulağın sıvı dolu ortamına aktarılan ses enerjisinin en yüksek seviyede tutulması için, kara hayvanları, dış kulak yolları ses toplayıcı ve orta kulakları mekanik güç arttırıcı (orta kulak kemikçiklerinin kaldıraç etkisi ve timpanik

membran ile oval pencere arasındaki çap farkı sayesinde) olacak şekilde evrilmişlerdir (12).

Kokleanın fonksiyonu, çevresel sesleri algılayıp elektrik enerjisi haline dönüştürerek beyne iletmektir. İç kulak, öncelikle, belirli bir sesi oluşturan farklı frekanslarda ne kadar enerji olduğunu belirler. Koklea, bunu, farklı frekansların kokleanın farklı bölgelerini uyarması şeklinde tanımlanan tonotopik organizasyon sayesinde başarır (11-13).

Koklear kanal üç kompartmandan oluşur; scala vestibuli, scala media ve scala tympani. Scala media ile scala vestibuliyi Reissner membranı ayırken, scala tympani ile scala medianın arasında ise baziller membran bulunur. Scala mediada endolenf bulunurken scala vestibuli ve scala tympani perilenf içerir. Endolenf ve perilenf birbirleriyle karışmayacak şekilde ayrılmıştır. Endolenfin potasyum içeriği yüksekken sodyum içeriği düşüktür ve bu sayede 80-100 mV'luk bir pozitif voltaja sahiptir. Bu pozitif enerji stria vascularis tarafından oluşturulur ve sürdürülür. Stria vascularisteki hücreler membranöz boşluğa potasyum pompalayarak sodyum ve potasyum konsantrasyonları arasındaki bu farkın idamesini sağlar. İç kulak, duyuşal hücreler diğer hücrelerin ürettiği enerjiye bağımlı oldukları için vücutta eşsiz bir yere sahiptir. Vücutta kalp, beyin veya göz dahil bütün organlarda, hücreler ihtiyaçları olan enerjiyi kendileri üretmek için oksijen ve besinleri işlemek zorundadır (11-13).

Tüylü hücreler, işitme ve dengenin duyuşal reseptör hücreleridir ve iç kulaktaki en önemli hücrelerdir. Apikal uçlarında yaklaşık 100 adet stereosilya içermelerinden dolayı bu ismi almışlardır. Endolenf, Corti organında, duyuşal iç ve dış tüylü hücrelerin apikal yüzeylerini kaplar. Bu duyuşal hücreler aktinden oluşan ve yüzeylerinden tektoriyal membrana doğru uzanan stereosilyum demetleri içerir. Bu demetlerdeki bükülme, mekanik olarak kontrol edilen iletim kanallarını açarak tüylü hücrelerde depolarizasyona ve bazolateral presinaptik membrandaki glutamat içeren veziküllerin ekzositozuna neden olur. Bu nörotransmitter sinaptik aralık boyunca yayılır ve spiral ganglion nöronlarındaki postsinaptik membrana ulaşarak bir aksiyon potansiyelinin oluşumunu sağlar. Ses buradan sinir impulsları ile işitme merkezine iletilir. Yüksek tonlar işitme

merkezinin derinlerinde, düşük tonlar ise yüzeylerinde sonlanırlar. İnsan ve farelerde iç kulak yapı ve fonksiyonu benzerdir (10-13).

2.1.1. Santral İşitsel Yollar

Santral işitsel yolları, koklea ve koklear sinirle başlayıp santral işitme korteksine uzanan, içerisinde entegrasyon merkezlerinin bulunduğu oldukça karmaşık bir yapı oluşturur. Koklear sinire ait birinci sıra nöronlar, internal akustik kanaldan çıkarak serebellopontin köşeyi geçer ve ventral ve dorsal koklear nükleusta santral sinir sistemine dahil olur. Burada ikinci sıra nöronlarla sinaps yaparlar (13).

İkinci sıra nöronların bir kısmı aynı taraf superior olivary kompleks uzanırken, daha büyük bir kısmı trapezoid cisimde çaprazlaşarak karşı tarafa geçer. Bu çaprazlaşıp karşıya geçenlerin bir kısmı superior olivary komplekste sinaps yaparken, bir kısmı da kontralateral lemniskusa çıkar. Bu sayede superior olivary kompleks her iki kulaktan uyarı almış olur (12,13).

Üçüncü sıra nöronlar superior olivary kompleksten ve lateral lemniskustan kaynaklanır. Bir kısmı inferior kolikulusta sinaps yapar veya inferior kolikulusa uğramadan direk olarak talamusun medial genikulat cisimciğinde sonlanabilir. İnferior kolikulustan kaynaklananlar da talamusta sinaps yapar (13,14).

Santral işitme yolunda talamusun medial genikulat cisimciği subkortikal merkezdir. Medial genikulattan çıkan lifler işitme korteksine uzanır. Kokleadan kortekse kadar işitmenin tüm aşamalarında tonotopik düzenleme devam eder (14). Her işitme sinir lifi sadece dar bir aralıktaki frekansları yansıtır.

İşitsel korteks temporal lob bölgesindeki Heschl girusunda yer alır ve bilgiyi bütünleme, işlem lokalizasyonu, diskriminasyon ve alt sistemlerin kontrolünden sorumludur. İşitsel korteks de diğer işitme yolları gibi tonotopik olarak organize olmuştur (13,14).

2.2. Yaşlılık

Yaşlanma, doğumdan itibaren başlayıp ölüme kadar süren uzun bir süreçtir. Yaşlılığın tanımı farklılık göstermekle birlikte Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), çevresel etkenlere uyum sağlayabilme yeteneğinin azalması olarak tanımlamaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise genellikle 65 yaş ve üzeri "yaşlı" olarak kabul edilmektedir. Yaşam süresi uzun olan ülkelerde yaşlılık olarak kabul edilen yaş sınırı daha yüksek iken, yaşam süresi kısa olan ülkelerde bu yaş sınırı düşüktür. Yaşlı bireyin takvim yaşı eşiği belirlenirken genel görüş takvim yaşı özelliği ile biyolojik yaş özelliklerinin uyuşması yönündedir, fakat malesef çoğu durumda bu geçerli olamamaktadır (15, 16).

Engellenmesi mümkün olmayan bir süreç olan yaşlılık, kronolojik, biyolojik ve sosyal yönleri ile sorunlar içerir. Yaşlılık, gelişmesi fizyolojik olan bir olay olarak ele alınıp, ruhsal ve bedensel yeteneklerin bir daha düzelmeyecek şekilde azalarak kaybedilmesi, bedenin iç ve dış etmenler arasında denge kurma potansiyelinin azalması, kişinin fiziksel ve ruhsal olarak her yönden gerilemesi şeklinde de tanımlanabilir (17).

Yaşam süresinin uzamasıyla birlikte gelişmekte olan ülkelerde de yaşlı nüfus giderek artmaktadır. Nüfusun yaşlanması; sağlık, aile, eğitim, sosyal güvenlik gibi toplumun birçok alanını etkilemektedir (18, 19). DSÖ 2013 yılında yayınladığı istatistiklere göre Türkiye’de, 1990 yılında 66 yıl olan yaşam süresi, 2011 yılında 76 yıla çıkmıştır (20). Ülkemizdeki 65 yaş üzeri nüfus Türkiye İstatistik Kurumu’na (TÜİK) göre 2012 yılında %7.5 iken, 2023 yılında %10.2, 2050 yılında %20.8 ve 2075 yılında ise %27.7’ye yükseleceği tahmin edilmektedir (21).

2.3. Yaşlanmanın Kulak Üzerine Etkileri

Yaşla birlikte dış, orta ve iç kulak yapılarının hepsinde değişiklikler ortaya çıkar. Dış kulak yolunda bulunan kıllar uzar, kemik bölümün cildi inceler ve serumen salgısının özelliği değişerek daha kuru hale gelir. Bu değişiklikler sonucunda bağılı serumen dışarı daha zor atılır ve kişide işitmede azalma, kulakta kaşıntı ve rahatsızlık hissi oluşur. Orta kulakta yaşlanmayla birlikte kulak zarında

vasküler yapılar azalır, timpanik membran incelir ve mat bir görünüm alır. Eklemlerde kalsiyum birikimi nedeniyle orta kulaktaki kemikçikler ve eklemlerde hareket kısıtlılığına yol açan değişiklikler ortaya çıkar. Dış ve orta kulakta yaşa bağlı görülen anatomik değişiklikler, işitmeyi ve odyolojik bulguları genellikle etkilememektedir, ancak işitme cihazı kullanımı sırasında zorluklara neden olmaktadır (22).

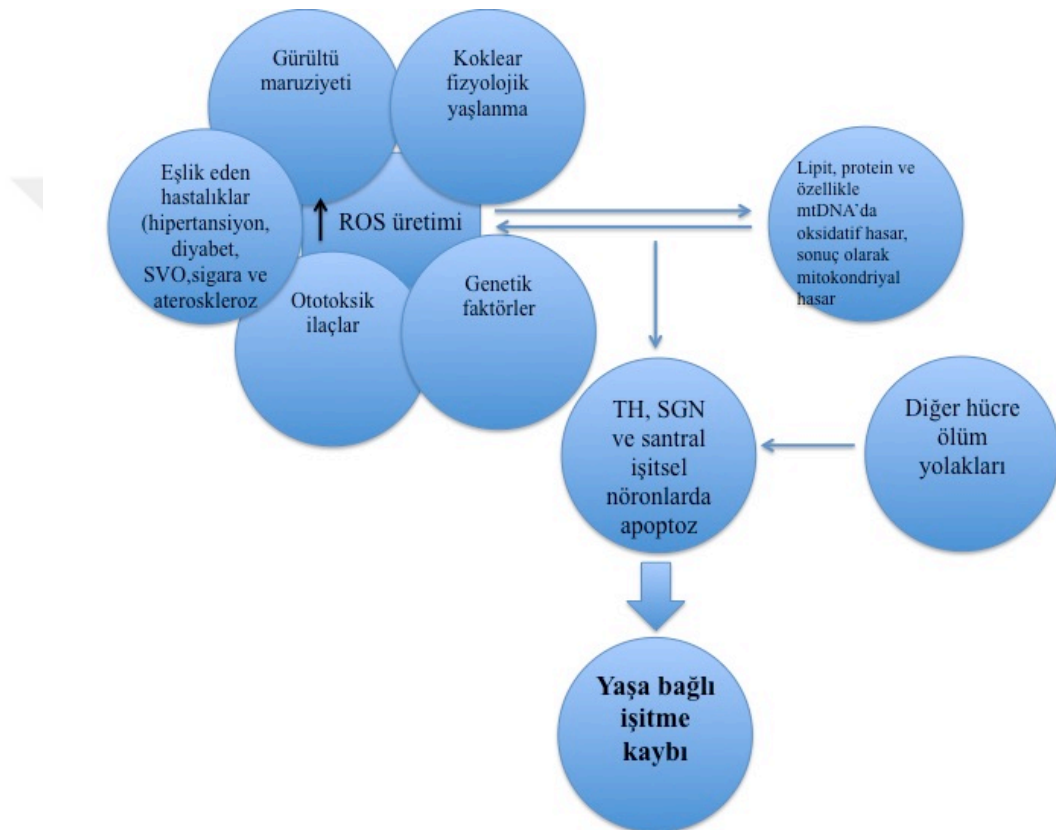
Yaşa bağlı işitme kaybına temel olarak iç kulak yapıları ve santral sinir sisteminde ortaya çıkan değişiklikler neden olur. Yaş, koklear işitme kaybı için en önemli risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Yaşla birlikte iç kulakta tüylü hücrelerin ve destek hücrelerinin dejenerasyonu ve kaybı, baziller membran hareketinin azalması, spiral ganglion hücrelerinin kaybı, stria vasküleriste endolenf üretiminin azalması meydana gelmektedir (22).

2.4. Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Etyolojisi

Yaşa bağlı işitme kaybı, yaşlılarda görülen en sık duyuşal bozukluktur (23-27). 65 yaş üstü insanların %25-40'ında görülür, prevelansı yaşla birlikte artar ve 75 yaş üstünde %40-66 oranında, 85 yaş üstünde ise %80 oranında görülür (28, 29).

Yaşa bağlı işitme kaybının patogenezi hala net olarak anlaşılamamakla birlikte, genetik ve çevresel pek çok faktörün etyolojide rol oynadığı düşünülmektedir. Multifaktöriyel bir bozukluk olduğu ve intrinsik, genetik ve fizyolojik yaşlanma sürecine ek olarak ortaya çıkan farklı ekstrinsik (ototoksik ajanlara ve gürültüye maruziyet, travma, vasküler yetmezlik, metabolik değişiklikler, hormonlar, beslenme şekli ve bağışıklık sistemi) risk faktörleri sonucu geliştiği düşünülmektedir (25, 30-33) (Şekil 2.1). İşitme kaybı tüm bu faktörlerin etkisi ile ilerler ve yaşa bağlı işitme kaybı gelişir (33). Sonuç olarak periferik ve santral işitme sisteminde çok sayıda fonksiyonel ve yapısal değişiklik ortaya çıkar (25, 26, 34, 35). Stria vascularis, tüylü hücreler, primer afferent nöronlar ve santral işitsel yollaklarda değişiklikler olduğu gösterilmiştir (23, 25, 33, 35). Santral değişiklikler koklear nükleustaki nöronlarda azalma ve nörotransmitter salınımındaki değişiklikleri içerir (36-38). Koklear nükleus

nöronlarında ateşleme oranlarında artışla sonuçlanan glisin aracılı inhibisyonda azalma, işitsel orta beyin ve kortekste GABA sentezi ve salınımında değişikliğe neden olur. Dorsal koklear nükleustaki glisin nörotransmisyonu ile ilişkili yaşa bağlı değişiklikler, buradan projekte olan nöronların yoğunluk ve temporal kodlamasındaki farklılıkla ilişkilidir. Superior olivar kompleksteki ve inferior kolikulustaki sinaptik inhibisyonun kaybının, yaşlı hayvanların doğal ortamlarında ses lokalizasyonunun azalmasında neden olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Yaşa bağlı işitme kaybı, risk faktörleri ve oksidatif stres.

İzole santral presbiakuzinin çok nadir görüldüğü ve periferik ve santral anormalliklerin birbirinden ayrılmasının zor olduğu ileri sürülmüştür (23). Yaşa bağlı işitme kaybı olan bireylerin çoğunda bu patolojik değişikliklerin bir karışımının görüldüğü artık net olarak ortaya konmuştur (23).

Yaşa bağlı işitme kaybının nedenleri ile ilgili ilk klinik çalışmalar 19. yüzyılda başlamıştır. Toynbee presbiakuzi gelişen kişilerde patolojik bulgular ile klinik arasındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmıştır (39). Yaşla birlikte Corti

organında ve spiral ganglionda dejeneratif değişiklikler geliştiğini ortaya koyan ilk histolojik çalışmaya Crowe ve Saxon (40) tarafından yapılmıştır. Otte ve ark. (41) ile Suzuka ve Schuknecht (42) de ganglion hücre kaybı ile ileri yaş arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Histopatolojik çalışmalar ganglion hücre kaybının en çok kokleanın bazal kısmında olduğunu göstermiştir. Yaşla birlikte koklear sinir liflerinin sayısında da azalma gerçekleşir. Yapılan çalışmalar, koklear sinir lif kaybının en yoğun olarak kokleanın bazal kısmının ilk 10 mm'lik kısmında olduğunu göstermiştir. Crowe ve ark. (40) ve Suzuka ve Schuknecht (42) yaptıkları çalışmada ganglion hücre sayısındaki azalma ile saf ses eşikleri arasındaki ilişki olmadığını göstermişken, Pauler ve ark. (43) spiral ganglion hücre sayısı ile konuşmayı algılama arasında yakın ilişki bulmuşlardır.

Yaşa bağlı işitme kaybının insidansı farklı toplumlarda, genetik, diyet, sosyoekonomik ve sosyokültürel faktörler ve diğer etkenler sebebiyle de farklılık gösterir (44).

Yaşa bağlı işitme kaybının patogeneğinde farklı moleküler değişiklikler ileri sürülmüştür. Bunlar değişken vasküler özellikler (azalmış eritrosit hareketliliği ve damarsal plastisite sonucu artmış permeabilite), oksijen ve besin taşınımında azalmayla birlikte atıkların uzaklaştırılmasında yetersizlik, genetik mutasyonlar ve serbest radikaller olarak da bilinen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde belirgin artıştır (16, 45, 46).

2.4.1. Oksidatif Stres

Yaşlanmanın serbest radikal teorisinde, yaşlılığın serbest radikallerin oluşturduğu artmış oksidatif hasara bağlı olduğu gösterilmiştir (26, 31, 33). Serbest radikaller hücresel solunumun önlenemez, doğal yan ürünleridir ve süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalinden (OH) oluşur. Oldukça unstabildirler, diğer moleküllerle reaksiyona girerek proteinler, lipidler ve DNA'da hasara neden olurlar (47-49). Redoks homeostazisindeki dengesizlik oksidatif stres olarak isimlendirilir (ROS artışı veya endojen antioksidanlarda azalma) (26, 32, 47, 49). ROS çoğu memeli hücresinde primer olarak mitokondride üretilir ve mitokondriyaların ROS kaynağı olarak

yaşlanmada anahtar rol oynadıkları gösterilmiştir (34, 50, 51). Mitokondride üretilen ROS mitokondriyal DNA (mtDNA), mitokondriyal membranlar, respiratuar zincir proteinleri ve nükleer DNA gibi mitokondriyal fonksiyonları etkileyen anahtar mitokondriyal komponentlerde hasara yol açarlar. Bu bir kısır döngüye neden olur; mtDNA mutasyonunun artması ROS aracılı hücre ölümünü artırır, bunun sonucu olarak da apoptotik yola aktive olur ve hücre ölümüne yol açar (24, 51). Normal koşullarda mitokondride üretilen ROS endojen antioksidan mekanizmalarla (katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon gibi) kolaylıkla metabolize edilir ve iç kulak homeostazı sağlanır (32, 49). Fakat yaşlanma süreci bu denge durumunu bozar.

Bir gaz molekülü olan nitrik oksit, immün sistemi ve sinir sistemini düzenlemektedir ve bir serbest radikal niteliğindedir. Nitrik oksitin ortaya çıkmasına neden olan NO sentaz (NOS)'un 3 formu vardır: NO üretiminden sorumlu nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). iNOS'un, fizyolojik durumlarda santral sinir sisteminde herhangi bir önemi olmasa da patolojik durumlarda önemli rol oynamaktadır. Alzheimer hastalarında oluşan plaklarda bu enzim tespit edilmiştir; enzim patolojik durumlarda mikrogliyalarda eksprese edilir. LPS, IFN- γ , TNF- α ve IL-1 β gibi uyarılar iNOS ekspresyonunu arttırmaktadır (52). iNOS enzimi L-arjinini L-sitruline dönüştürerek NO sentezine neden olur ve bu durum nöronal apoptozu tetikler. NO düzeylerinde izlenen bir artış çok sayıda proteinin nitrasyonunu tetikleyerek Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington ve Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejenaratif hastalığa sahip insanların sinir dokularında bu proteinlerin üretimine yol açmaktadır. Nörotoksik madde maruziyetinden sonra, veya başka patolojik durumlardan sonra NO üretimi ve süperoksit anyonların miktarı yükseldiğinde beyinde nitrostatif /oksidatif stres gelişir. NO ve süperoksit anyonların hepsinin ortaya çıkışı nöronal hücrelerin ölümüne de neden olabilecek sitotoksik maddelerin yapımına neden olabilir (34, 52).

ROS üretimi, iNOS uyarılmasına öncülük ederek, gliyal ve endotelial hücrelerde NO üretimini daha da artırır. Fazla miktarda açığa çıkan NO, yukarıda da bahsedildiği gibi nörodejenaratif hastalıkları da içeren inflamatuvar hastalıklara

yol açabilmektedir. Normal şartlar altında, NO ve ROS düşük konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını düzenleyen sinyal molekülleridir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda bu moleküller önemli sitotoksik moleküllerdir (50).

Çok sayıda çalışma oksidatif stresin presbiakuzi etyolojisinde rol oynadığını ortaya koymuştur (25-27, 47-49). Benzer şekilde, bazı antioksidanlarla yapılan destek tedavisinin yaşa bağlı işitme kaybı gelişimini yavaşlattığı/geciktirdiği gösterilmiştir (5, 6, 38, 46, 48, 53-55).

2.4.2. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü anlamına gelen apoptoz, çok hücreli organizmalarda, organizmaların homeostazisinin sağlanmasında istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması için evrimleşmiş en önemli mekanizmadır ve hücrelerin yaşamı ve ölümü arasındaki dengenin korunması için gereklidir (9). Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki denge apoptozu düzenler.

Apoptoz iki ana yolak aracılığıyla gerçekleşir. Bunlar; hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile karakterize olan dışsal (reseptör aracılı) ve mitokondri-apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile karakterize olan içsel (mitokondriyal) yoldur (9).

Apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2 gen ailesi proteinleri (bcl-2, bcl-xL, bad, bax, bak) oldukça önemli bir role sahiptir (56). Bu proteinler, gelişim ve farklılaşma boyunca canlılığın düzenlenmesinde işlev görürler. Normalde fetal ve erişkin dokularında eksprese olan bcl-2, hücre çoğalmasına neden olmadan, hücrenin yaşamasını sağlayan apoptoz inhibitörüdür. Overekspresyonu, UV, p53, radyasyon, antikanser ilaçlar gibi farklı uyaranlar tarafından başlatılan hücre ölümüne ya engel olur ya da anlamlı şekilde azaltır. Bu işlevi, genel apoptoz yolunu engelleyerek ortaya koyar. Bax protein (bcl-2-associated x protein), bcl-2 ile oldukça fazla yapısal benzerlik göstermesine rağmen, tam tersi olacak şekilde proapoptotik etkinlik gösterir. Bax overekspresyonu homodimerizasyon ile sonuçlanır ve bcl-2 protein ile heterodimer oluşturarak onu inaktive eder. Bu şekilde bcl-2 aktivitesi engellendiğinden apoptoz indüksiyonu gerçekleşir.

Apoptozun, kokleadaki yaşlanma dahil (57) bir çok organda yaşla ilişkili fonksiyon kayıplarında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (58).

2.4.3. İnflamasyon

Canlı organizmalarda inflamatuvar süreç, vücut savunma sistemi için gereklidir ve canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri amacıyla evrilmiştir. Kısa süreli akut inflamasyon, toksinler, mikroorganizmalar veya allerjenler gibi zararlı ajanlara karşı hayati öneme sahip ilk savunma çizgisidir. Fakat, ortaya çıkan bu akut inflamatuvar cevap çözüme ulaşmayarak devam ederse, kronik inflamasyon denilen, daha uzun süreli, çözülmemiş immün cevabı oluşturmak üzere farklı savunma mekanizmaları devreye girer. Tipik olarak makrofaj ve lenfosit ağırlıklı lökosit infiltrasyonu ile kendini gösteren kronik inflamasyon, düşük şiddette ve uzun sürelidir. Bu kronik inflamasyon, hücresel oksidasyon durumu ve hücre ölüm yollarıyla ilişkili olduğu akıldan çıkartılmamalıdır (47, 52).

Yaşlanma sürecinde ortaya çıkan en önemli değişikliklerden birisi, immün cevapta regülasyonun bozulmasıdır ki bu durum kronik sistemik inflamatuvar duruma yol açar (52). Regülasyonu bozulmuş proinflamatuvar araçlardan sitokinler ve kemokinler kronik inflamasyon gelişiminde ana sorumlulardır.

NF- κ B, tüm hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve normal şartlarda sitoplazma içinde inaktif halde bulunur. Aktive olduğunda ciddi inflamatuvar cevaba yol açtığı gösterilmiştir (52). NF- κ B'nın, nöroinflamasyona neden olma sadece proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi değil, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi uyarılabilir enzimlerin etkinleşmesine neden olmasıdır. Tüm ökaryotik hücrelerde inflamatuvar sitokinleri, enfeksiyonları ve farklı stres faktörlerinden oluşan ekstraselüler sinyallerin derecesine göre NF- κ B etkinleşebilmektedir. NF- κ B, inflamasyon, apoptoz, hücrenin yaşamı, immün sistem, ve kontrolsüz proliferasyonu içeren pek çok süreci kontrol ederek inflamatuvar ve immün cevapta rol oynayan genlerin uyarılabilir formlarının ekspresyonunu düzenlemektedir. Dahası, etkin hale gelen NF- κ B, nöronlarda plastisite ve

hayatta kalmayı uyarmaktadır. Diğer taraftan gliyal hücrelerde etkinleşen NF- κ B nörodejeneratif özellikteki inflamatuvar süreçlerde başlıca rol almaktadır (52).

COX-1 ve COX-2 siklooksijenazların iki farklı formudur ve sentezleri farklı genler tarafından kodlanmaktadır. Bu moleküller inflamatuvar yollarda önemli görevlere aracılık ederler. Santral sinir sisteminde; COX-1 ve COX-2'nin sinyal iletim yollarının nöroinflamasyonu ve nörodejenerasyonu ile bağlantısı bulunmaktadır. Bu iki farklı formun, normal fizyolojik ve patolojik durumlarda değişik rolleri bulunmakla birlikte, aynı reaksiyonda görev alarak araziidonik asitten prostaglandin (PG) G_2 ve PGH_2 üretilmesine neden olmaktadır. Bu ürünlerden PGH_2 bir nöroinflamatuvar medyatör olan PGE_2 'ye dönüştürülür. COX-1 sinyal yolu etkinleşince proinflamatuvar özellikler aktive olup nöroinflamasyon ortaya çıkar. Beyinde yerleşmiş bulunan bir grup makrofajın uyarılması COX-1 ekspresyonunda artışa yol açtığı için santral sinir sistemi ve immün sistem arasındaki iletişimde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, TNF- α oluşturulan inflamasyonun neden olduğu kan-beyin bariyerinde bozulma, COX-1'in inhibisyonu ile azaltılmıştır. Bu da bize nöroinflamasyon ve nörodejenerasyon sürecinde COX-1'in önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. COX-2 ise, hücre tipine ve uyarana göre değişecek şekilde, nörotoksik ve antiinflamatuvar süreçlere aracılık eder. Temelde, COX-2 ekspresyonu nöronlarda gerçekleşir ve sinapsın fizyolojik çalışması ve hafızanın şekillenmesinden sorumludur. Nörodejeneratif hastalıklarda COX-2'nin overekspresyonu nöronal zedelenmede artışa yol açmaktadır. Mikroglialardaki ekspresyonu nedeniyle COX-1, COX-2'ye göre nöroinflamasyonda daha kritik role sahiptir. Bu sinyal yollarıyla sinyal yolları da etkileşim içine girmektedir (47).

Sonuç olarak, yaşa bağlı işitme kaybı bir çok faktörden etkilenen bir süreçtir. Etiyopatogenezinde çevresel etmenlerin etkisi olsa da temelde kompleks genetik faktörlerin etkisi de göz ardı edilmemelidir.

2.5. Yaşlılığa Bağlı İşitme Kaybının Sınıflandırması

Schuknecht postmortem temporal kemik incelemesi ile yaşa bağlı değişiklikleri patolojinin meydana geldiği yere ve odyolojik bulgulara göre

ayırarak presbiakuziyi beş alt başlık altında sınıflamıştır. Bu alt başlıklar; sensoriyal (saçlı hücrelerin kaybı), nöral (spiral ganglion nöron kaybı), metabolik veya strial (stria vaskularis atrofi), koklear konduktif (baziller membran elastikiyetinin kaybolması) ve mikst (yukarıda tanımlanan dört presbiakuziden birden fazlasının birlikte görülmesi) presbiakuzidir (59).

Bu sınıflama, işitmenin sadece periferik kısmını göz önünde bulundurarak santral kısım ile ilgili bir açıklama içermediğinden günümüzde fazla kullanılmamaktadır. Presbiakuzi sadece kulak kaynaklı bir kayıp olarak düşünülmemelidir, bu bireylerdeki esas yakınma konuşmanın anlaşılmasındaki problemlerdir. Yapılan histopatolojik çalışmalar yaşa bağlı işitme kaybı olan bireylerin işitme merkezlerindeki hücre sayısında azalma olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte periferden santrale gelen uyarıların hazırlanması ve algılanması için gereken süre de uzamıştır. Bu bireylerde sinaptik fonksiyonlar için gereken zaman da uzamaktadır. Tüm bu değişiklikler nedeniyle, kişilerde SD skorlarında azalma görülür. Bu sebeplerden dolayı, son zamanlarda Schuknecht tarafından yapılmış olan bu sınıflama yerinde presbiakuzinin periferik, santral ve mikst tip olarak üç gruba ayrıldığı sınıflama kullanılmaktadır (60).

2.6. Tanı

İşitme kaybı şikayeti olan kişilerde tanı detaylı bir hikaye, fizik muayene bulguları ve odyolojik testler ile konur. Presbiakuzili bireylerin muayenesinde işitmedeki kaybı açıklayabilecek herhangi bir patoloji bulunmaz. Presbiakuzinin kesin tanısı odyolojik incelemeler ile konulmaktadır.

Yaşa bağlı işitme kaybı bilateral, ilerleyici, sıklıkla yüksek frekansları tutan veya yüksek frekanslardan başlayan sensorinöral tipte bir işitme kaybıdır. İşitme kaybının şiddeti alçak frekanslardan yüksek frekanslara doğru gittikçe artar. Presbiakuzi genellikle 60 yaş civarı başlar ve yaş ilerledikçe işitme kaybı da giderek ilerler (60).

Daha önce de belirtildiği gibi, presbiakuzili hastalarda işitme kaybı ilk olarak yüksek frekanslarda başlar ve bu kayıp, öncelikle gürültülü ortamlarda kişinin iletişimini olumsuz yönde etkiler. Sesleri tanımlama ve lokalize etme

kapasitesi de azalır. İşitme kaybı 2000-4000 Hz aralığına doğru ilerledikçe ünlü fonemlerin tanımlanması ve gürültüsüz ortamlarda dahi konuşmanın anlaşılması etkilenir (60).

2.7. Ayırıcı Tanı

İki taraflı simetrik işitme kaybına yol açan yapan Meniere Hastalığı, ileri koklear otosklerozis, hipotiroidizm, ototoksik ilaç kullanımı, Paget hastalığı, gürültüye maruz kalma, akkiz sifiliz ve kafa travmaları ayırıcı tanıda araştırılmalıdır (60).

2.8. Tedavi

Yaşa bağlı işitme kaybı tıbbi veya cerrahi metodlarla tedavi edilememektedir. Yaşa bağlı işitme kaybının önlenmesi ve tedavisinde şimdiye kadar farklı antioksidan tedavi seçenekleri denenmiş fakat çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (6, 53). Bu çalışmalarda oksidatif yoldaki bir veya daha fazla noktayı hedefleyen antioksidanlar denenmiştir (6, 38, 45, 47, 51-53). Bu antioksidanların bir kısmı yaşa bağlı işitme kaybının önlenmesinde etkiliyken bir kısmında olumlu sonuç alınamamıştır.

Yaşa bağlı işitme kaybında tüylü hücreler ve spiral ganglion nöronlarında progresif kayıp olduktan sonra, memelilerde bu iki hücre tipi yenilenemediğinden, işitme seviyelerini normal hale getirmek imkansızdır. O yüzden yaşa bağlı işitme kaybı gelişmeden önce önlenmesi veya geciktirilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle son dönemlerde yapılan farmakolojik çalışmalar daha çok yaşa bağlı işitme kaybı patogenezinde rol oynayan oksidatif stresi azaltmaya yönelik antioksidanlar üzerine yoğunlaşmaktadır.

Yaşa bağlı işitme kaybı gelişen hastaların, iletişim becerileri ve hayat kalitelerini arttırmak için işitme cihazı kullanması gerekmektedir. İşitme cihazı kullanımı ile yaşa bağlı işitme kaybı olan kişilerin kognitif fonksiyonlarının ve duygu durumunun iyileştirilmesi sağlanır. Fakat buradaki önemli problem işitme kayıplı kişilerin sadece %20'sinin (3) işitme cihazı kullanıyor olmasıdır. O

yüzden, yaşa bağlı işitme kaybı gelişimini engelleyecek veya gelişimini geciktirecek kolay ulaşılabilir bir tedavi gereksinimi vardır.

2.9. Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Psikososyal Etkileri

Yaşla birlikte ortaya çıkan progresif işitme kaybı o kadar sıktır ki, genellikle, ve yanlış bir düşünce olarak, insanlarda yaşlanma sürecinin önlenemez bir parçası olarak kabul edilir. Biraz da bu düşüncenin etkisiyle işitme kaybının hayat kalitesi üzerine etkisi genellikle görmezden gelinir. Fakat, nüfustaki hızlı yaşlanma ve insan ömrünün uzaması, işitme kaybının genel sağlık üzerindeki ve ekonomik önemini gittikçe arttırmaktadır.

Yaşa bağlı işitme kaybı bireyin davranışlarında ve kişiliğinde ciddi etkilere yol açar. Presbiakuzi, ileri yaşlı insanlarda bireyin iletişim yeteneğini azaltan, toplum içinde aktif birey olma becerisini kısıtlayan en önemli hastalıklardan biridir. Bu bireyler ortamdaki konuşmaları tam olarak anlayamadıkları ve karşıdaki kişilere sözlerini sürekli olarak tekrarlattırdıkları için, zaman içinde gündelik sosyal hayattan dışlanırlar. Bundan dolayı yalnız kalmak ve sosyal hayattan dışlanmak, bu bireylerin normalden daha sinirli olmalarına neden olur. Yetişkin ve yaşlı işitme kaybı vakalarının %20-30'unun ileri düzeyde depresif olduğu tespit edilmiştir (61). Sonuçta, yaşa bağlı işitme kaybı, yaşlı erişkinlerin bilişsel, fiziksel, sosyal ve davranışsal fonksiyonları üzerinde olumsuz etkiye sebep olur (62).

2.10. C57/BL6 Farelerin İşitsel Özellikleri

Fareler, yaşa bağlı işitme kaybı çalışmalarında baskın model olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. İnsanlar ve fareler arasındaki işitsel anatomik yapılar ve işitme fizyolojisindeki benzerlikler, genomların yakın evrimsel ilişkisi (fare ve insan genlerinin yaklaşık %99'u aynıdır), bakım masraflarının nispeten ucuz olması ve hayvanların genetik standardizasyonu, fareleri işitsel sistemin fonksiyonel genomiklerinin araştırıldığı çalışmalarda faydalı ve elzem model sistemi yapmaktadır (63-65). Farelerin genetik olarak manipüle edilebilmesinin kolay olması, farelerde insan işitme kaybı mutasyonunu taklit eden çok sayıda

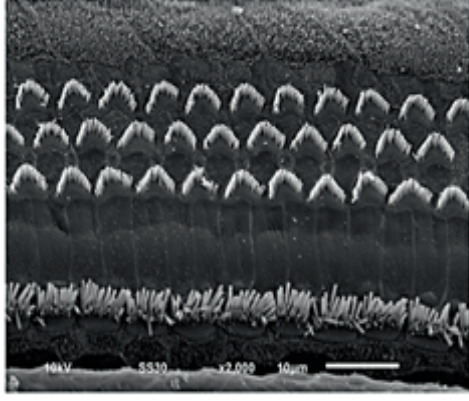
fare modeli geliştirilmesine yol açmıştır, bu da gen fonksiyonun incelenebilmesine olanak sağlar.

2.10.1. C57/BL6 Farelerde Yaşa Bağlı İşitme Kaybı

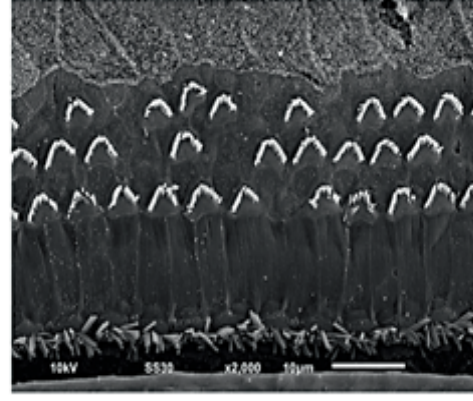
Yaşa bağlı işitme kaybı modeli olarak C57/BL6 fare suşu uzun yıllardır dünya genelinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu suşta insanlarda olduğu gibi, işitme kaybı yüksek frekanslardan başlar. Zaman ilerledikçe işitme kaybı ilerler ve alçak frekanslarda da kayıp görülür. Yine insanlarda olduğu gibi, bu farelerde işitme kaybı cinsel olgunlaşma tamamlandıktan sonra ortaya çıkar. Genç farelerde tüm frekanslarda işitme eşiklerinin mükemmel olduğu gösterilmiştir.

Bu suş, *Cdh23^{ahl}* alleline sahiptir (56). *Cdh23* iç kulak sensoriyal epiteline ifadelenen hücre adezyon glikoproteinini kodlar ve stereosilyaların demet oluşturması ve normal fonksiyonu için gereklidir. Bu farelerde, 3-6. aydan itibaren yüksek frekanslarda kayıp görülmeye başlar, zaman ilerledikçe kayıp alçak frekansları da tutar. 3-7 aylar arasında koklear spiralın tabanında hem iç tüylü hem dış tüylü hücre hasarı aşikar hale gelir. Fareler 7 aylık olduğunda bazal kıvrımdaki spiral ganglion hücrelerinde de kayıp görülür ve bu, iç tüylü hücre kaybını takiben gelişen sekonder nöronal dejenerasyon ile uyumludur (64, 66) (Şekil 2.2). Ek olarak, spiral ligaman ve stria vasküleriste de fibrosit kaybı ve incelmeyi içeren değişiklikler görülür (67). Bu değişiklikler, hep birlikte değerlendirildiklerinde Schuknecht tarafından ileri sürülen yaşa bağlı işitme kaybı alt tipleri ile uyumludur. Farelerde 12-15. aylarda yaşa bağlı işitme kaybının tipik görünümü oturmuş olur, 15. ayda 80 dB SPL'e ABR cevabı alınmaz hale gelir.

Normal işitme- 6. ay



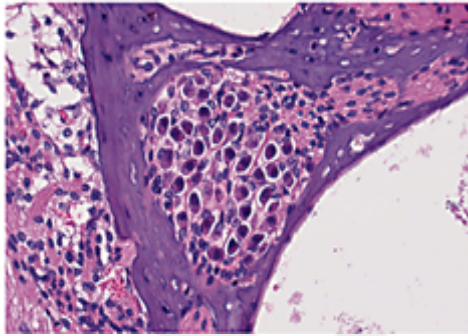
Azalmış işitme- 9. ay



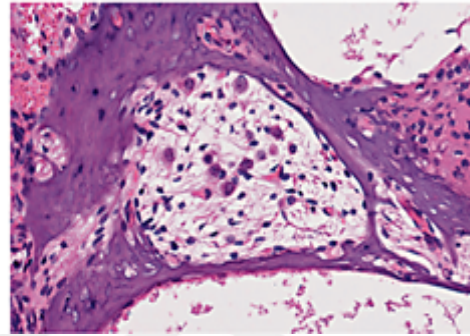
DTH

İTH

Normal işitme



Azalmış işitme



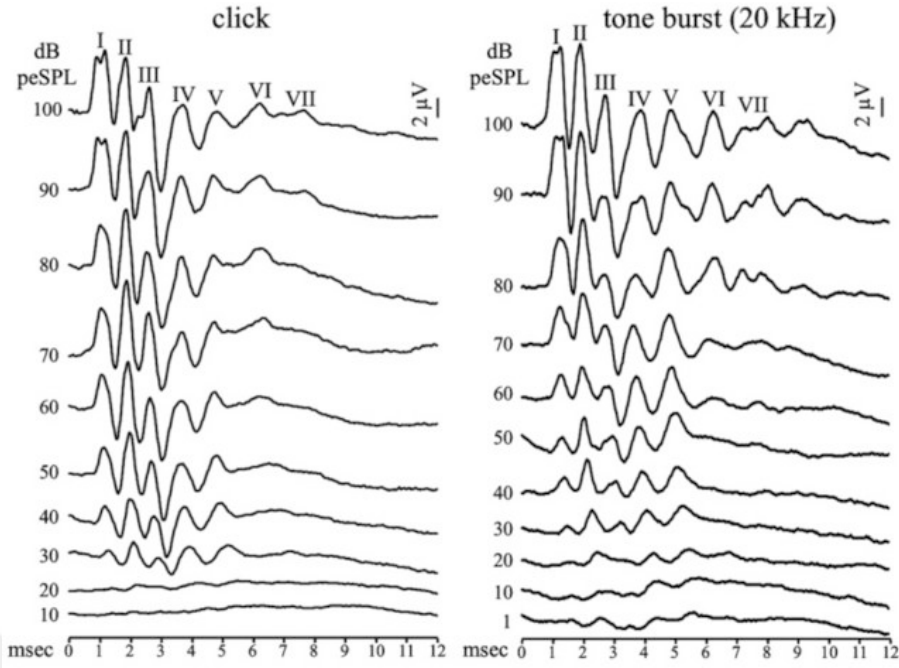
SGN

Şekil 2.2. Fare modelinde koklear sensöriyel epitelde DTH'de oluşan azalma ve SGN'lerdeki kaybı gösteren elektron mikroskopik görüntüler. (64)

C57/BL6 farelerde yaşa bağlı işitme kaybının gelişiminin laboratuvarlar arasında ciddi farklılık gösterdiği ve işitme kaybının gelişiminin 10. aya kadar gecikebileceği ortaya konmuştur (64). Bu farklılığın çevre gürültüsündeki değişiklikler ve işitme kaybının değerlendirme şekline bağlı olduğu düşünülmektedir.

2.11. Farelerde ABR Ölçümü

Yapılan hayvan çalışmaları fare kulağının insan kulağına benzer özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Yapılan ölçümler ve bunların sonuçları genellikle benzer olsa da, arada farklılıklar da bulunmaktadır. Farelerde yapılan ABR incelemelerinde dalga sayısı açısından farklı çalışmalarda farklı sayılar verilmektedir. Farelerde yapılan ABR ölçümlerinde ilk dört dalganın baskın olduğu ve istikrarlı şekilde görüldüğü ve değerlendirmelerin daha çok bu dalgalar göz önüne alınarak yapılması gerektiği bildirilmektedir (67) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Farelerde klik ve tone burst uyaranlara cevap olarak oluşan ABR kayıt örnekleri. (67)

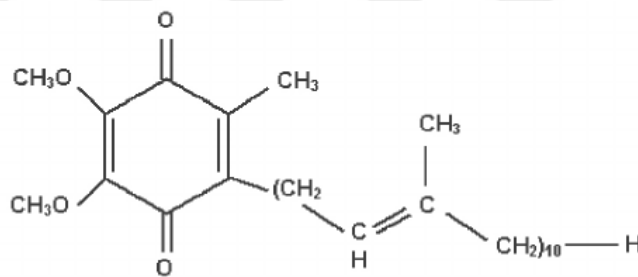
Kemirgenlerde, insanlar ile karşılaştırıldığında, koklear sinir sadece tek bir dalganın oluşumunu takip edebilecek kadar kısa olduğu için; insanlarda oluşan I. ve II. dalga kemirgenlerin I. dalgasına, III. dalga, hayvanın II. dalgasına ve IV. dalga da kemirgenin III. dalgasına denk gelir (68). İnsanlarda koklear sinirin uyarılması ile oluşan I. ve II. dalga sinirin uzunluğunun proksimalden ve distalden bölünmüş iki ayrı dalga kaydı alacak kadar uzun olması nedeniyledir (69). Literatürdeki çalışmalar, kemirgenlerde II. dalganın posterior ventral nükleustan, III. dalganın anterior ventral nükleus ve trapezoid cisimden, IV. dalganın superior olivar kompleksten ve V. dalganın lateral lemniskus ve inferior kollikulustan kaynaklandığını göstermiştir (70). Henry ve ark. göre, IV. dalga lateral lemniskus ve inferior kollikulustan, V. dalga ise medial genikulat cisim ve/veya talamokortikal yollardan köken almaktadır (71). Diğer bir çalışma lateral lemniskustaki patolojilerin IV. ve V. dalgada değişiklikler yaptığını ortaya koymuştur (72). Son yapılan çalışmalar, C57BL/6 farelerde en istikrarlı dalganın IV. dalga olduğunu göstermiştir (67).

Kemirgenlerde ABR ölçümü genel anestezi altında cilt altına yerleştirilen iğne elektrotlar kullanılarak yapılmaktadır. Elektrotlar; aktif elektrot vertekse,

2.12. Koenzim Q10

Koenzim Q10, hayvanlar tarafından de novo olarak üretilen, yağda çözünen bir antioksidandır (73). Doğada oldukça yaygın olması nedeniyle İngilizce "*ubiquitous: her yerde*" anlamına gelen *ubiquinon* olarak da isimlendirilir. Kimyasal yapısı vitamin K'ya benzer fakat vitaminlerden farklı olarak insan vücudunda hemen hemen tüm dokularda sentezlenebildiği için vitamin olarak isimlendirilmez. CoQ10, 10 tane izopren ünitesi içeren 50 karbonlu bir 1,4-benzokinondur (73-75) (Şekil 2.4).

Koenzim Q10, hayvanlar tarafından de novo olarak üretilen, yağda en bir antioksidandır (73). Doğada oldukça yaygın olması nedeniyle de "*ubiquitous: her yerde*" anlamına gelen *ubiquinon* olarak da adlandırılır. Kimyasal yapısı vitamin K'ya benzer fakat vitaminlerden farklı olarak insan vücudunda hemen hemen tüm dokularda sentezlenebildiği için de vitamin olarak isimlendirilmez. CoQ10, 10 tane izopren ünitesi içeren 500 dalgalı bir 1,4-benzokinondur (73-75) (Şekil 2.4).



CoQ10, iç mitokondriyal membranda yerleşmiş olan mitokondriyal elektron transport zincirinin önemli bir bileşenidir. CoQ10, vücutta bir çok hücrenin membranında doymamış lipid zincirlerine bağlı şekilde durarak membrandaki lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin oluşumunu engeller. Hücre membranındaki CoQ10'un büyük bir bölümü CoQ10'un redükte formu olan ubikinol (CoQH₂) şeklindedir ve bu form oldukça güçlü bir antioksidandır (73,74). CoQ10, birincil substratlardan oksidaz sisteme elektron transferi yaparken, aynı zamanda mitokondriyal membrandan membranlar arası boşluğa proton transferinden sorumludur. Bu transfer membranlar arasında proton gradiyenti oluşumuna neden olur. Sonrasında protonlar mitokondrinin matriksine doğru hareket eder ve ATP oluşumu sağlanır. Sonuç olarak CoQ10, hücrelerin

hayati fonksiyonları ve kas kasılması için gerekli olan ATP yapımında önemli bir rol oynamaktadır (74-78).

CoQ10, elektron transport sistemiyle hücrelerin yaşamsal fonksiyonları ve kas kasılması için gerekli ATP oluşumuna neden olarak yaşlanmayı yavaşlatabilir veya geciktirebilir (76, 78).

CoQ10, aynı zamanda hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunu ve LDL kolesterolün oksidasyonunu engelleyerek yaşlanmayı geciktirebilir. CoQ10, tüm bu antioksidan özelliklerinden dolayı serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynar (73, 77, 78).

CoQ10, mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşıyıcı olarak anahtar rol oynar ve oksidatif strese yol açan çok sayıda durumda serbest radikal hasarından koruyucu rol oynar. Çok sayıda çalışma, kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarı, nörodejeneratif hastalıklar, mitokondriyal myopatiler, migren ve yaşa bağlı maküler dejenerasyon gibi çok sayıda hastalıkta destek tedavisi olarak faydalı olduğunu ortaya koymuştur (74-78).

Yapılan çalışmalar, CoQ10'un tüm bu antioksidan özellikleri nedeniyle, apoptoz, inflamasyon ve hücrel redoks reaksiyonlarını azaltmak yoluyla gürültüye (25) ve yaşa bağlı işitme kaybında koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. CoQ10 verilen farelerde gürültü maruziyeti sonrası, dış tüylü hücre kaybının daha düşük olduğu ve bu farelerde oluşan işitme kaybının daha az olduğu ortaya konmuştur.

Özetle, mitokondriyal enerji üretimindeki rolü ve antioksidan özellikleri, CoQ10'un bugüne kadar en iyi ortaya konmuş fonksiyonlarıdır. Bunların yanında, gen ekspresyonu ve hücre sinyalizasyonunda, hücrel redoks reaksiyonlarında, membran stabilitesinin sağlanmasında, hücre büyümesi ve apoptoz kontrolünde de önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (76-78).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları doktora tez çalışması olarak yürütüldü.

3.1. Laboratuvar Hayvanları

Çalışma için, çalışmanın yapılacağı merkez olan Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan etik kurul onayı alındı. (G.Ü.ET-18.067, Sayı: 66332047-604.01.02).

Çalışmada 3 aylık, 20-25 gr. ağırlığında, 32 adet C57BL/6 sağlıklı erkek fare kullanıldı. Fareler, Bilkent Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden tedarik edilerek, 3. aylarını doldurdıklarında deneyin gerçekleştirileceği Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'ne getirildi. Hayvanlar burada deney öncesi ve deney süresince serbest yem ve su ile beslenerek, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık derecesinin sağlandığı plastik kafeslerde, 12 saatlik ışık/karanlık siklusu olacak şekilde barındırıldılar.

3.2. Çalışma Grupları

Fareler 4 deneysel gruba ayrıldı ve her grupta 8 hayvan ($n=8$) olmak üzere düzenlendi: 1) Kontrol, 2) Sham Kontrol Grubu 3) Erken Tedavi Grubu, 4) Geç Tedavi Grubu. Deneyde kullanılan CoQ10 ve DMSO Sigma-Aldrich'ten (Darmstadt, Almanya) tedarik edildi.

3.2.1. Kontrol Grubu

CoQ10 verilmeden takip edilen gruptur. Farelere, ABR eşiğinin tespiti için temel işitsel beyin sapı cevabı (Auditory Brain Stem Response, ABR) yapıldı ve ABR düzeyleri 3. aydan itibaren, her 3 ayda bir olmak üzere 15. ayın sonuna kadar tekrarlandı. Kontrol grubunda bulunan fareler deney süresince (12

ay, fareler 15 aylık olana kadar) serbest yem ve su ile beslendi, deney süresinin bitimi olan 12. ayın sonunda 45 mg/kg Ketamin ve 2.5 mg/kg Ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek iç kulaktan koklea dokusu alındı ve -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Moleküler biyolojik incelemeler için alınan örnekler Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında incelendi (n=8 fare).

3.2.2. Sham Kontrol Grubu

Deneyin başlangıcında, fareler 3 aylıkken, CoQ10'u çözmek için kullandığımız madde olan %30 DMSO içeren salin çözeltisi bir grup hayvana verilmeye başlandı. Bu grup, normalde fareler üzerine etki etmesi beklenmeyen %30 DMSO'nun tek başına kullanıldığında işitme kaybı üzerine yapabileceği olası etkileri belirlemek için oluşturuldu. Bu farelere de ABR, işitme kaybının tespiti için deneyin başlangıcından itibaren her üç ayda bir 12. ayın sonuna kadar (fareler 15 aylık olana kadar) tekrarlandı. Çalışma başlangıcında (fareler 3 aylıkken) ABR düzeyleri belirlendikten sonra, %30 DMSO solüsyonu her hafta taze olarak hazırlanarak farelerin içme suyuna karıştırıldı. Sham kontrol grubunda bulunan fareler deney süresince serbest yem ve su ile beslendi, deney süresinin bitimi olan 12. ayın sonunda 45 mg/kg Ketamin ve 2.5 mg/kg Ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek iç kulaktan koklea dokusu alındı ve -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Moleküler biyolojik incelemeler için alınan örnekler Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında incelendi (n=8 fare).

3.2.3. Erken Tedavi Grubu

CoQ10'un çalışmanın başlangıcından (fareler 3. aylıkken) itibaren verilmeye başlandığı gruptur (işitme kaybını önlemek için CoQ10 verilen grup). Bu farelere de işitme kaybının tespiti için deneyin başlangıcından itibaren her üç ayda bir, 12. ayın sonuna kadar ABR yapıldı. Çalışmanın başlangıcında (fareler 3 aylıkken) ABR düzeyleri belirlendikten sonra, CoQ10, %30 DMSO içinde çözülerek, her fare için yaklaşık 100 mg/kg/gün dozunda olacak şekilde farelerin içme suyuna katıldı ve 12. ayın sonuna kadar verildi. Erken tedavi grubunda

bulunan fareler deney süresince serbest yem ve su ile beslendi, deney süresinin bitimi olan 12. ayın sonunda 45 mg/kg Ketamin ve 2.5 mg/kg Ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek iç kulaktan koklea dokusu alındı ve -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Moleküler biyolojik incelemeler için alınan örnekler Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında incelendi (n=8 fare).

3.2.4. Geç Tedavi Grubu

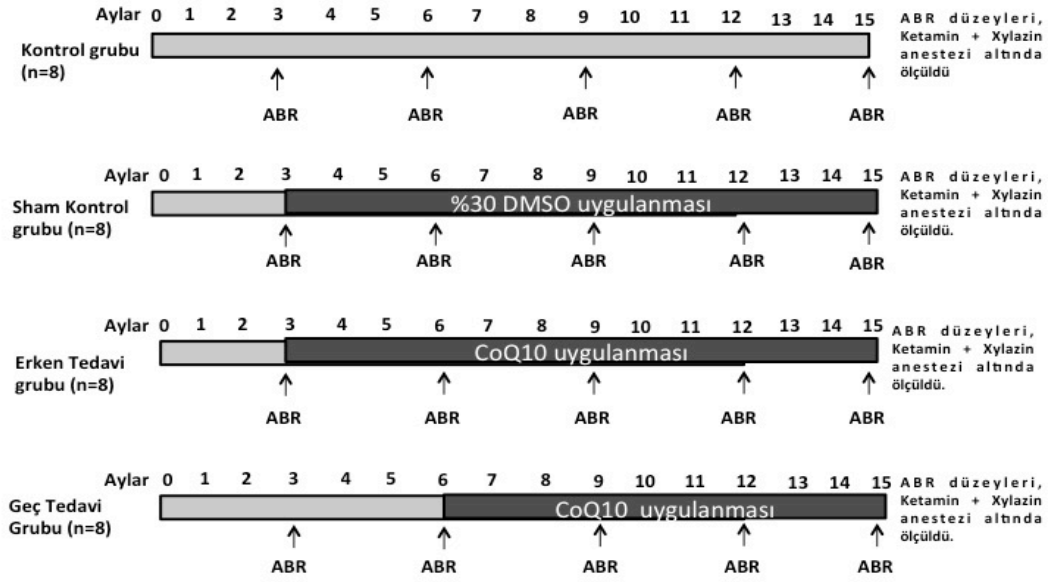
CoQ10'un çalışmanın 3. ayından itibaren başlandığı gruptur (işitme kaybı gelişen farelere, tedavi amacıyla CoQ10 verilen grup, fareler 6 aylıkken ilaç başlandı). Farelere işitme kaybının tespiti için deneyin başlangıcından itibaren her üç ayda bir 12. ayın sonuna kadar ABR tekrarlandı. Çalışmanın 3. ayındaki (fareler 6 aylıkken) ABR düzeyleri belirlendikten sonra, CoQ10, %30 DMSO içinde çözülerek, her fare için yaklaşık 100 mg/kg/gün dozunda olacak şekilde farelerin içme suyuna katıldı ve tedaviye 12. ay sonuna kadar tedaviye devam edildi. Bu grupta bulunan fareler de deney süresince serbest yem ve su ile beslendi, deney süresinin bitimi olan 12. ayın sonunda 45 mg/kg Ketamin ve 2.5 mg/kg Ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek iç kulaktan koklea dokusu alındı ve -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Moleküler biyolojik incelemeler için alınan örnekler Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında incelendi (n=8 fare).

Tüm gruplardaki fareler her hafta tartılarak gruplar arası fark oluşup oluşmadığı değerlendirildi. Farelere tedavi için verilen ilaçlar haftalık olarak taze hazırlanarak, farelerin ağırlıklarına göre içme sularına karıştırıldı, bu sayede her bir farenin yaklaşık olarak aynı dozlarda ilaç alması sağlanmış oldu.

3.3. İşitsel Beyin Sapı Cevabı Testi

Farelere işitme kaybının tespiti için, ilki fareler üç aylıkken olmak üzere, her üç ayda bir ABR yapıldı (Şekil 3.1). ABR öncesi farelere 45 mg/kg Ketamin ve 2.5 mg/kg Ksilazin anestezisi uygulandı. Fareler ısıtıcılı battaniye üzerine alınarak vücut ısılarının 37⁰C'da sabit olması sağlandı ve subdermal iğne

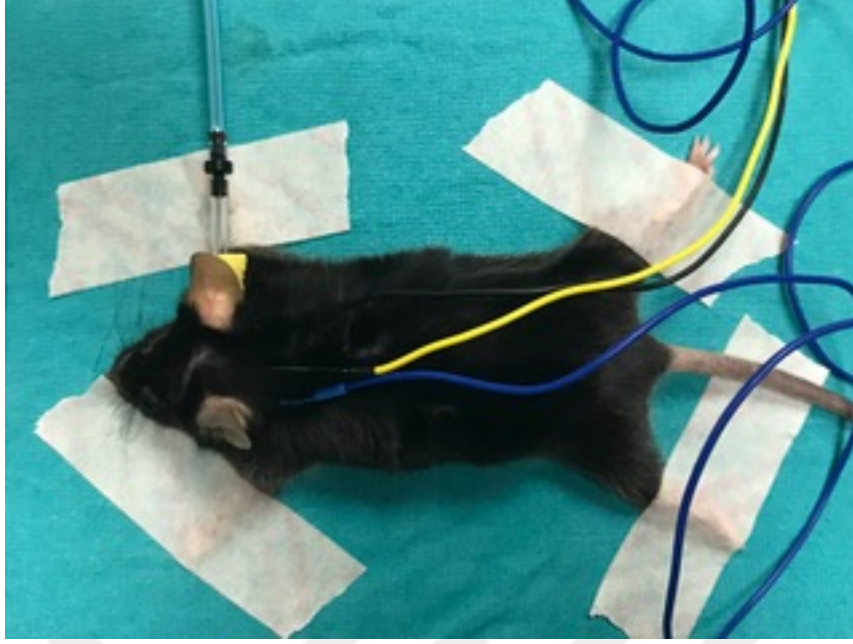
elektrotların pozitif kutbu vertekse, negatif kutup ve topraklama ise ölçüm yapılacak mastoide yerleştirildi (Şekil 3.2a-3.2b).



Şekil 3.1. Deney protokolü.

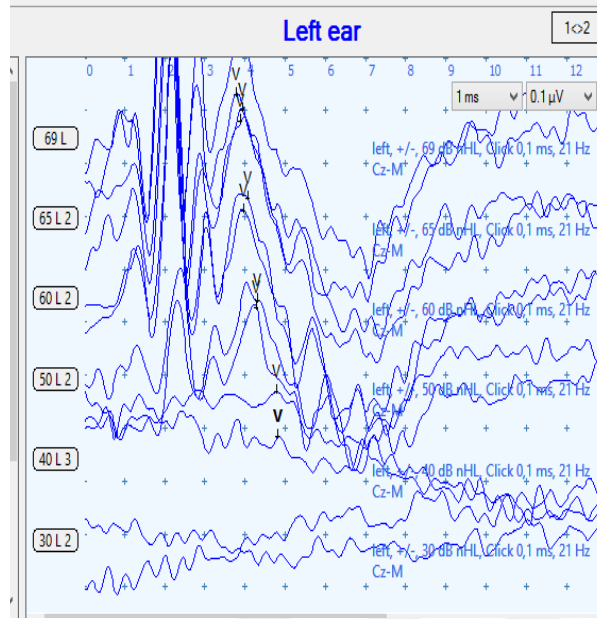


Şekil 3.2a. ABR test düzeneği.



Şekil 3.2b. ABR elektrotlarının yerleştirilmesi.

ABR ölçümleri için iki kanallı Neurosoft marka Neuro-audio® model (Ivanova-Russia-2014) ABR cihazı kullanıldı. Tüm deney hayvanlarına anestezi uygulandıktan sonra sağ ve sol kulak ABR cevapları ayrı ayrı çift trase ile değerlendirildi. ABR eşiği, bir dalga morfolojisiyle beraber ABR'nin V. dalgasının gözlenebildiği en düşük şiddet seviyesi olarak tanımlandı. İşitsel uyaranlar için 125 Hz-16000 Hz frekans spektrumuna sahip ER-2, 10 ohm insert kulaklıklar ile cilt altı disposable iğne elektrotlar (Bionen Medical Devices, İtalya) kullanıldı. Deney hayvanlarının baş bölgesi alanı küçük olduğundan elektrotlar arasında kısa devreyi engellemek için tek kanal kullanılarak ipsilateral kayıt yapıldı. Non-invert (+) elektrot vertekse, ground elektrot kontralateral mastoid üzerine ve invert elektrot (-) ise ipsilateral mastoid üzerine yerleştirildi. İşitsel uyaran olarak frekansa özgü tone burst (TB) 4000 Hz, 8000 Hz, 12000 Hz, 16000 Hz kullanıldı. TB uyaranları daha spesifik hale getirmek için Blackman pencereleme seçildi. ABR kaydı için analiz zamanı 20 msn, TB uyaranlar için 100-2000 Hz, klik uyaranlar için 30-3000 Hz band-pass filtre ve alterne polarite seçildi. Tekrarlama oranı 21/sn, averajlama ise 1024 sweep olarak ayarlandı. Eşikler, maksimum çıkışlardan (110-118 dB SPL) başlanarak 5 dB'lik azalan uyarılar verilerek saptandı. Tekrarlanabilen morfolojide dalgalar saptanamayana kadar uyaran şiddeti düşürüldü (Şekil 3.3).



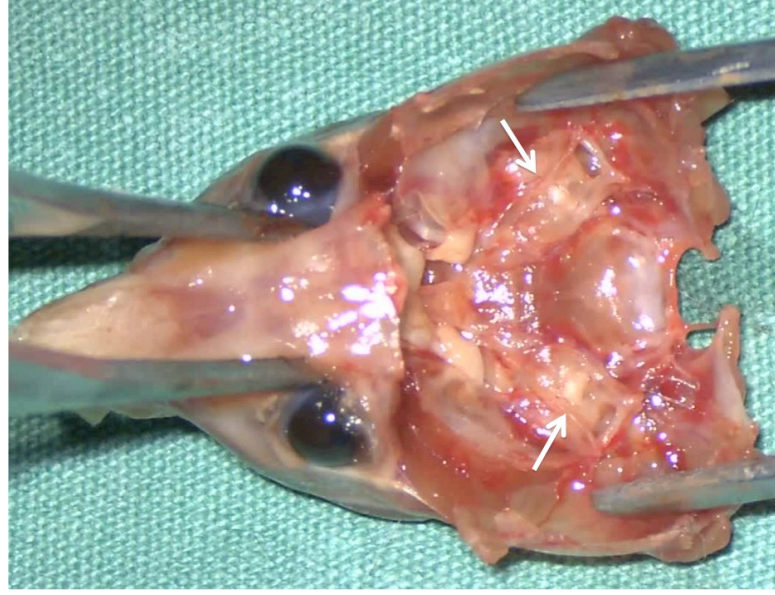
Şekil 3.3. Çalışmanın 6. ayında erken tedavi grubunda sol kulaktan alınmış ABR örneği (12 kHz).

3.4. Koklea Homojenatlarında Yapılan Gen İfadelenme Çalışmaları

12. ay sonunda, deneyin sonlandırılmasını takiben, farenin iç kulağından alınan koklea dokusu (Şekil 3.4a-3.4b-3.5c), CoQ10'un inflamasyonda ve apoptozda etkili olan iNOS, COX-2, NF-kB, Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak genlerinin ifadenme düzeyleri üzerindeki etkisine bakılmak üzere Real-time PCR analizi ile değerlendirildi.



Şekil 3.4a. Dekapitasyon ve derinin eksizyonu sonrası mouse kafasının ventralden görünüşü.



Şekil 3.4b. Fare kafatasının açılması, beyin ve kranial sinirlerin eksizyonu sonrası kafa tabanının ve her iki temporal kemiğin (beyaz oklar) ventralden görünüşü.



Şekil 3.4c. Çıkarılan fare temporal kemiğinin ventralden görüntüsü.

3.4.1. Dokudan RNA İzolasyonu

Farelerden elde edilen iç kulak dokusu, steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra DNaz ve RNaz free 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurulduktan sonra analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiş ve dokular Trizol (İnvitrogen, ABD) kullanılarak homojenizatör yardımı ile homojenize edilerek dokudan RNA izole edilmiştir. 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular alınarak 1000 µl TriReagent solüsyonu içinde IKA-T10 marka homojenizatör ile +4 °C'de homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işleminden sonra 5 dakika beklenerek, hemen ardından 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca karıştırmaya kadar vortekslenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrılmıştır. Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmış ve başlangıçta kullanılan TriFast miktarının yarısı kadar izopropanol eklenerek vortekslenmiştir. Örnekler 1 ya da 1.5 saat -20 °C'de bekletildikten sonra 11.500 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek, üstte kalan süpernatant atılmıştır. 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilmiş ve pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılmıştır. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. Pelet kurumaya bırakıldıktan sonra 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırılmıştır. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı 260 nm dalga boyunda NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, İngiltere) cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4.2. Revers Transkriptaz PCR Yöntemi

Hedef genlere ait mRNA ifadenin düzeylerinin belirlenmesi amacıyla dokudan elde edilmiş RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir. İzole edilen total RNA'ların derişimi ve saflıkları spektrofotometrik olarak NanoDrop ND-1000 cihazı ile saptandıktan sonra, 1 µg total RNA'dan, Random hekzamer primerleri ve cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Almanya) kullanılarak cDNA sentezi

gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 3.1’de verilmiştir. 1 µg RNA, random hegzamerler kullanılarak 75 °C’de 5 dakika bekletildikten sonra karışıma revers transkriptaz enzimi, enzim tamponu ve MgCl₂ eklenip 42°C’de 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen cDNA örnekleri reverse tanskriptazın inaktive olması için 65 °C’ de 10 dk. bekletilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

3.4.3. Kantitatif Real Time PCR Yöntemi

Gen ifade düzeyi çalışmaları kantitatif Real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile Light Cycler-480TM (LC) (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LC TaqMan Master mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nitrik Oksit Sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2), nükleer faktör kappa B (NF-kB) ile apoptoz oluşumunda etkili olan Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak genlerinin mRNA ifade düzeylerini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, Beta actin (ACTB) genine özgü primer ve UPL probu kullanılarak çalışıldı ve referans olarak alınmış ve tüm cDNA örnekleri her bir gen içinde ikişer tekrarlı olarak çalışılmıştır. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi Tablo 3.2’de verilmiştir. Reaksiyon; 95 °C’de 10 dakikalık denatürasyon, 50 °C’de 10 saniye primer bağlanması ve 72°C’de 10 saniyelik zincir uzaması basamaklarını oluşturacak şekilde 45 döngüden oluşan PCR tepkimesi uygulanmıştır. Hedef genlerin ifade düzeyleri ACTB

housekeeping geni referans alınarak REST 2009 (Relative expression soft ware tool) yazılımı (QIAGEN, Almanya) kullanılarak hesaplanmıştır. Göreceli gen ifadelerinin hesaplanmasında REST programı ve “Pfaffl” matematiksel yöntemi kullanılmıştır (79).

Tablo 3.2. Gene özgü primer dizileri ve prob numaraları.

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer	UPL Prob Numarası
ACTB	5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'	64
iNOS	5'-CTTTGCCACGGACGA-3'	5'-TCATTGTACTCTGAG-3'	13
COX-2	5'-GATGCTCTTCCGAGC-3'	5'-GGATTGGAACAGCAA-3'	45
NF-kB	5'-CTCTCGACGTCAGTGGGAAT-3'	5'-CTCGTCCTCTCTCGTCACT-3'	20
Bcl-2	5'-AGTACCTGAACCGGCATCTG-3'	5'-GGGGCCATATAGTTCCACAAA-3'	75
Bcl-xL	5'-TGACCACCTAGAGCCTTGGA-3'	5'-GCTGCATTGTTCCCGTAGA-3'	2
Bax	5'-AGTGTCTCCGGCGAATTG-3'	5'-CCACGTCAGCAATCATCCT-3'	56
Bak	5'-AGAGGGAGCTGGTCATTGC-3'	5'-AAACCTCGCGACTTTGTGAC-3'	33

3.5. İstatistiksel Analiz

Deney sonunda elde edilecek koklea dokusundan yapılacak RNA izolasyonunu takiben elde edilecek RNA’lardan Real-time PCR analizi sonucu iNOS, COX-2, NF-kB, Bcl-2, Bcl-xL, Bak ve Bax mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı (76). Tedavi verilen fareler ile verilmeyenler arasındaki işitme kayıplarının istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS v22 istatistik programı (SPSS Inc, Chicago, Illinois) kullanıldı. ABR sonuçları, gruplar arasındaki farkın anlamlılığının belirlenmesi amacıyla Kruskal-Wallis varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılığın doğrulanması için post hoc Tukey yöntem analizi uygulandı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

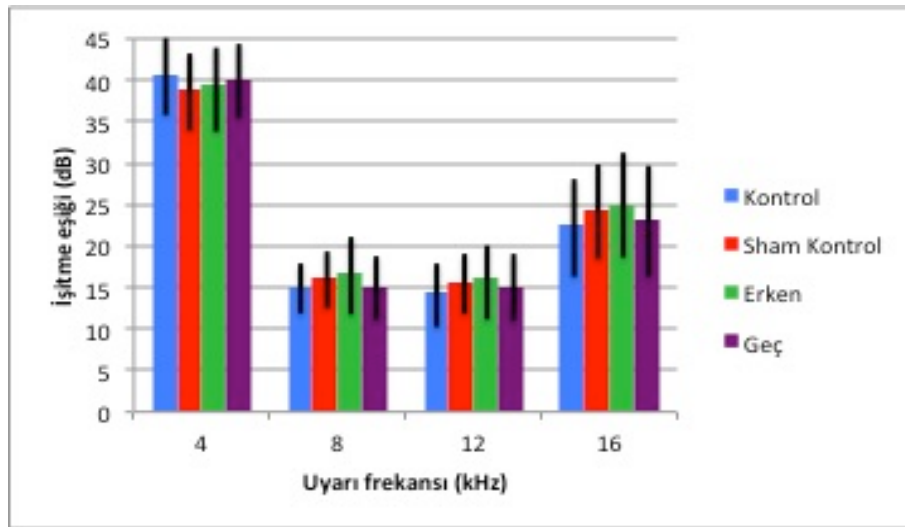
Çalışmaya alınan 32 farenin tümü çalışma süresi olan 12 ayı tamamladı. Farelerin, çalışma öncesi ağırlıkları ile çalışma sonrası ağırlıkları arasında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.520$).

4.1. İşitsel Beyin Sapı Cevabı Sonuçları

Farelere, çalışmanın başlangıcında, fareler üç aylıkken yapılan ABR sonuçları Kruskal-Wallis ANOVA ile değerlendirildi ve deney grupları arasında tüm frekanslarda ABR sonuçları açısından istatistiki olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p=0.810$) (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmanın başlangıcında uyaran frekanslarına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması (değerler dB SPL olarak verilmiştir).

Frekans (kHz)	Kontrol (ort $\pm$ SS)	Sham Kontrol (ort $\pm$ SS)	Erken (ort $\pm$ SS)	Geç (ort $\pm$ SS)	p
4	40,625 $\pm$ 4,673	38,75 $\pm$ 5,342	39,375 $\pm$ 4,978	40 $\pm$ 4,886	0,520
8	15 $\pm$ 3,632	16,25 $\pm$ 3,578	16,875 $\pm$ 4,312	15 $\pm$ 4,323	0,472
12	14,375 $\pm$ 4,312	15,625 $\pm$ 4,776	16,25 $\pm$ 4,933	15 $\pm$ 3,876	0,496
16	22,5 $\pm$ 5,214	24,375 $\pm$ 5,843	25 $\pm$ 5,985	23,125 $\pm$ 6,121	0,510

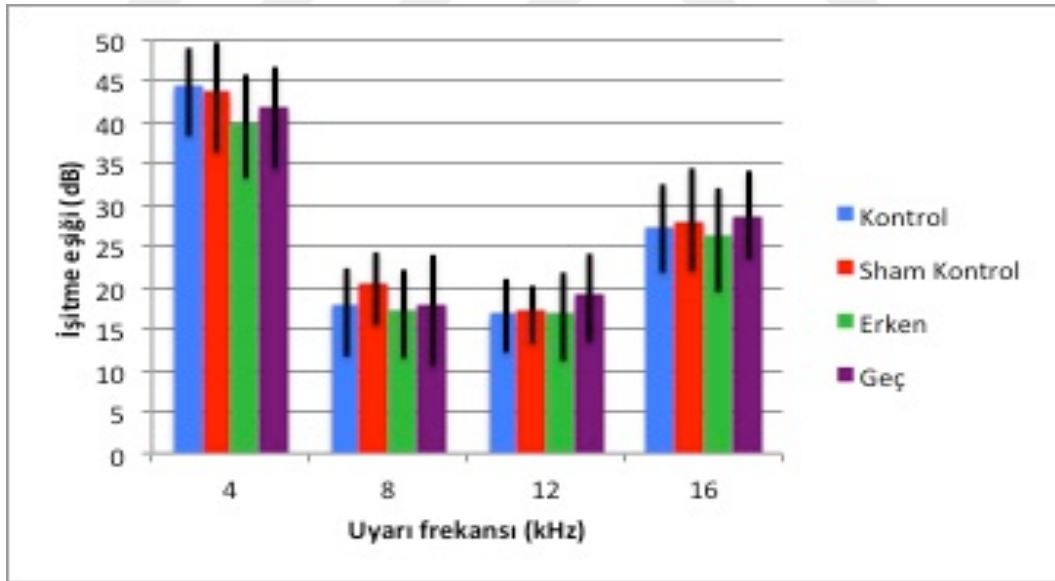


Şekil 4.1. Deney başlangıcında uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması ($p=0,810$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Benzer şekilde, deneyin 3. ayında (fareler 6 aylıkken) yapılan ABR'lerde de gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,635$) (Tablo 4.2, Şekil 4.2). Farelerin ABR eşikleri, deneyin başlangıcında elde edilen eşikler ile karşılaştırıldığında, bütün gruplarda, tüm frekanslarda bir miktar kayıp izlenmesine rağmen 3 ve 6. aylar arasındaki ABR eşikleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (erken tedavi için $p=0,253$, geç tedavi için $p=0,322$, kontrol grubu için $p=0,452$, sham kontrol grubu için $p=0,343$).

Tablo 4.2. Çalışmanın 3. ayında uyaran frekanslarına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması (değerler dB SPL olarak verilmiştir).

Frekans (kHz)	Kontrol (ort $\pm$ SS)	Sham Kontrol (ort $\pm$ SS)	Erken (ort $\pm$ SS)	Geç (ort $\pm$ SS)	p
4	44,375 $\pm$ 4,973	43,75 $\pm$ 5,313	40 $\pm$ 5,212	41,875 $\pm$ 4,892	0,613
8	18,125 $\pm$ 3,323	20,625 $\pm$ 3,967	17,5 $\pm$ 4,112	18,125 $\pm$ 4,033	0,512
12	16,875 $\pm$ 3,612	17,5 $\pm$ 3,453	16,875 $\pm$ 3,834	19,375 $\pm$ 3,673	0,472
16	27,5 $\pm$ 4,345	28,125 $\pm$ 5,173	26,25 $\pm$ 4,873	28,75 $\pm$ 4,364	0,520



Şekil 4.2. Fareler 6 aylıkken, çalışmanın 3. ayında, uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması ($p=0,735$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Deneyin 6. ayında yapılan testlerde (ki geç tedavi grubundaki fareler 3 aydır, erken tedavi grubundaki fareler 6 aydır CoQ10 tedavisi almaktaydı) erken tedavi verilen farelerde ABR eşiklerinin kontrol, sham kontrol ve geç tedavi

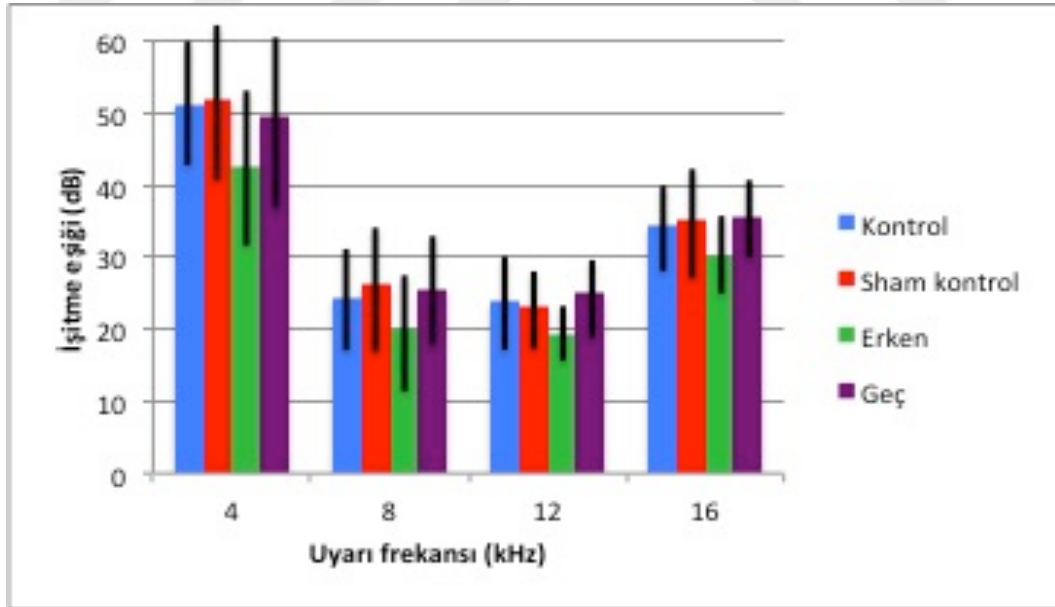
gruplarından anlamlı olarak düşük olduğu saptandı ($p=0,007$). Geç tedavi, kontrol ve sham kontrol grupları arasında ise ABR eşikleri açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,354$) (Tablo 4.3, Şekil 4.3). Deneyin 3. ve 6. ayı arasındaki ABR eşikleri karşılaştırıldığında, erken tedavi grubunda ABR eşiklerinde anlamlı bir fark saptanmazken ($p=0,264$), geç tedavi, kontrol ve sham kontrol gruplarında ise ABR eşiklerinin anlamlı olarak yükseldiği izlendi (geç tedavi için $p=0,004$, kontrol grubu için $p=0,008$, sham kontrol grubu için $p=0,007$).

Tablo 4.3. Fareler 9 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki işitme eşikleri ortalaması (değerler dB SPL olarak verilmiştir).

Frekans (kHz)	Kontrol (ort $\pm$ SS)	Sham Kontrol (ort $\pm$ SS)	Erken (ort $\pm$ SS)	Geç (ort $\pm$ SS)	p*	p**
4	51,25 $\pm$ 8,873	51,875 $\pm$ 9,412	42,5 $\pm$ 10,112	49,375 $\pm$ 10,883	0,005	0,312
8	24,375 $\pm$ 3,323	26,25 $\pm$ 3,967	20 $\pm$ 4,112	25,625 $\pm$ 4,033	0,007	0,245
12	23,75 $\pm$ 3,612	23,125 $\pm$ 3,453	19,375 $\pm$ 3,834	25 $\pm$ 3,673	0,008	0,564
16	34,375 $\pm$ 4,345	35 $\pm$ 5,173	30 $\pm$ 4,873	35,625 $\pm$ 4,364	0,004	0,320

p*: Erken tedavi grubu ile diğer gruplarının karşılaştırılması

p**: Geç tedavi, kontrol ve sham kontrol gruplarının karşılaştırılması



Şekil 4.3. Fareler 9 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki işitme eşikleri ortalaması. (erken tedavi gruplarının işitme ortalaması ile diğer grupların ABR eşikleri ortalaması arasında $p=0,007$, diğer gruplar arasında $p=0,354$). Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

Deneyin 9. ayında (fareler 12 aylıkken) yapılan testlerde, erken tedavi grubunun ortalama ABR eşiklerinin tüm frekanslarda kontrol ve sham kontrol gruplarından daha düşük olduğu saptandı ($p<0,001$). Geç tedavi grubunun ABR eşiklerinin ise kontrol ve sham kontrol grubundan daha düşük olduğu, fakat farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$). Erken tedavi grubunun ABR eşikleri, geç tedavi grubundan daha düşüktü. 12 kHz ve 16 kHz'de bu fark anlamlıyken (sırasıyla $p=0,004$ ve $p=0,006$), 4 kHz ve 8 kHz'de fark anlamlı değildi (Tablo 4.4, Şekil 4.4). Deneyin 6. ve 9. ayları arasındaki ABR eşikleri karşılaştırıldığında, tüm gruplarda ABR eşiklerinin anlamlı olarak yükseldiği görüldü (erken tedavi için $p=0,009$, geç tedavi için $p=0,007$, kontrol grubu için $p=0,006$, sham kontrol grubu için $p=0,004$).

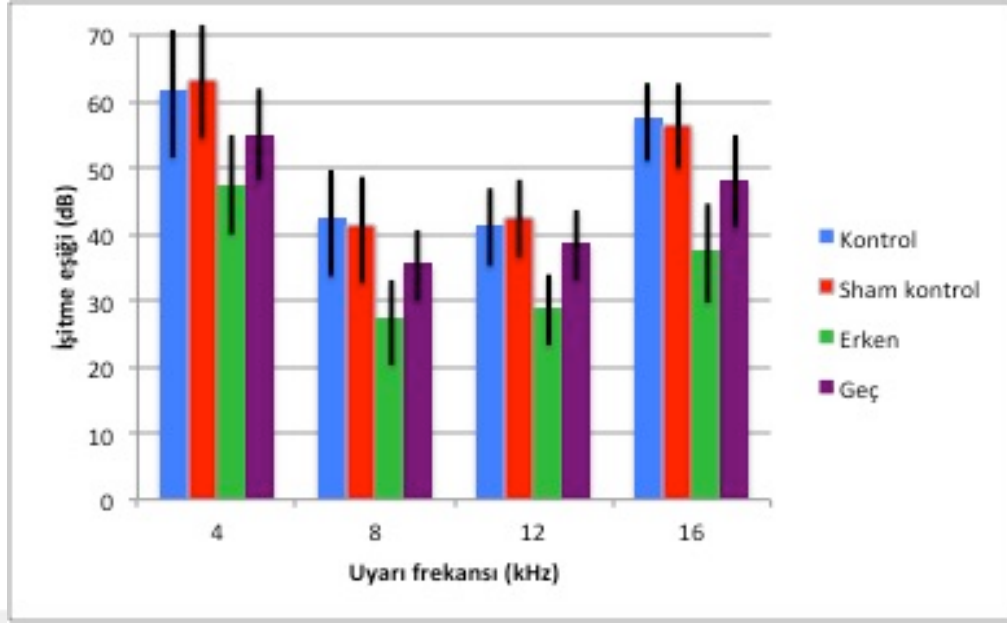
Tablo 4.4. Fareler 12 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması (değerler dB SPL olarak verilmiştir).

Frekans (kHz)	Kontrol (ort $\pm$ SS)	Sham Kontrol (ort $\pm$ SS)	Erken (ort $\pm$ SS)	Geç (ort $\pm$ SS)	p*	p**	p***
4	61,875 $\pm$ 9,673	63,125 $\pm$ 9,412	47,5 $\pm$ 8,122	55 $\pm$ 6,883	0,000	0,102	0,312
8	42,5 $\pm$ 8,323	41,25 $\pm$ 7,967	27,5 $\pm$ 6,112	35,625 $\pm$ 5,433	0,000	0,007	0,245
12	41,25 $\pm$ 8,612	42,5 $\pm$ 8,453	28,75 $\pm$ 7,834	38,75 $\pm$ 6,773	0,000	0,090	0,004
16	57,5 $\pm$ 7,435	56,25 $\pm$ 8,137	37,5 $\pm$ 8,873	48,125 $\pm$ 7,844	0,000	0,112	0,006

p*: Erken tedavi grubu ile kontrol gruplarının karşılaştırılması

p**: Geç tedavi grubuyla kontrol ve sham kontrol gruplarının karşılaştırılması

p***: Erken tedavi ile geç tedavi grubunun karşılaştırılması



Şekil 4.4. Fareler 12 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

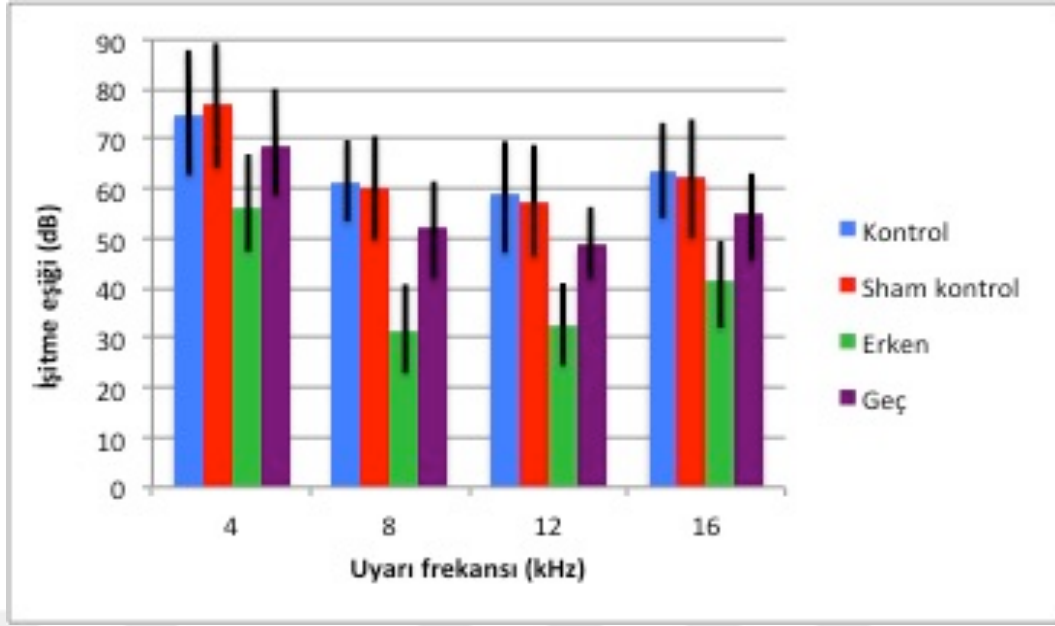
Fareler sakrifiye edilmeden hemen önce, deneyin 12. ayında, fareler 15 aylıkken yapılan ABR'lerde, erken grubundaki farelerde ABR eşikleri geç tedavi, kontrol ve sham kontrol gruplarına göre anlamlı olarak iyiydi ($p=0,000$). Erken ve geç tedavi grupları arasındaki ABR eşikleri ortalaması farkı 12,5 dB ile 21,25 dB; erken tedavi ve kontrol grubu arasındaki ABR eşikleri ortalaması farkı 18,75 dB ile 30 dB; ve erken tedavi ve sham kontrol grubu arasındaki ABR eşikleri ortalaması farkı da 20,625 dB ile 28,75 dB arasında değişiyordu. Geç tedavi grubu ile kontrol gruplarının ortalama ABR eşikleri karşılaştırıldığında, tüm frekanslarda geç tedavi grubunun ABR eşikleri kontrol gruplarından daha iyi olsa da, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,102$) (Tablo 4.5, Şekil 4.5).

Tablo 4.5. Fareler 15 aylıkken uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması (değerler dB SPL olarak verilmiştir).

Frekans (kHz)	Kontrol (ort ± SS)	Sham Kontrol (ort ± SS)	Erken (ort ± SS)	Geç (ort ± SS)	p*	p**
4	75 ± 9,563	76,875 ± 10,112	56,25 ± 9,132	68,75 ± 8,963	0,000	0,070
8	61,25 ± 8,432	60 ± 10,067	31,25 ± 9,012	52,5 ± 7,542	0,001	0,011
12	58,75 ± 8,723	57,5 ± 9,344	32,5 ± 8,123	48,75 ± 8,463	0,000	0,090
16	63,75 ± 9,324	63 ± 9,248	41,25 ± 9,762	55 ± 8,732	0,000	0,112

p*: Erken tedavi grubu ile geç tedavi ve kontrol gruplarının karşılaştırılması

p**: Geç tedavi grubuyla kontrol ve sham kontrol gruplarının karşılaştırılması



Şekil 4.5. Deneyin 12. ayında uyaran frekansına göre farelerdeki ABR eşikleri ortalaması. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

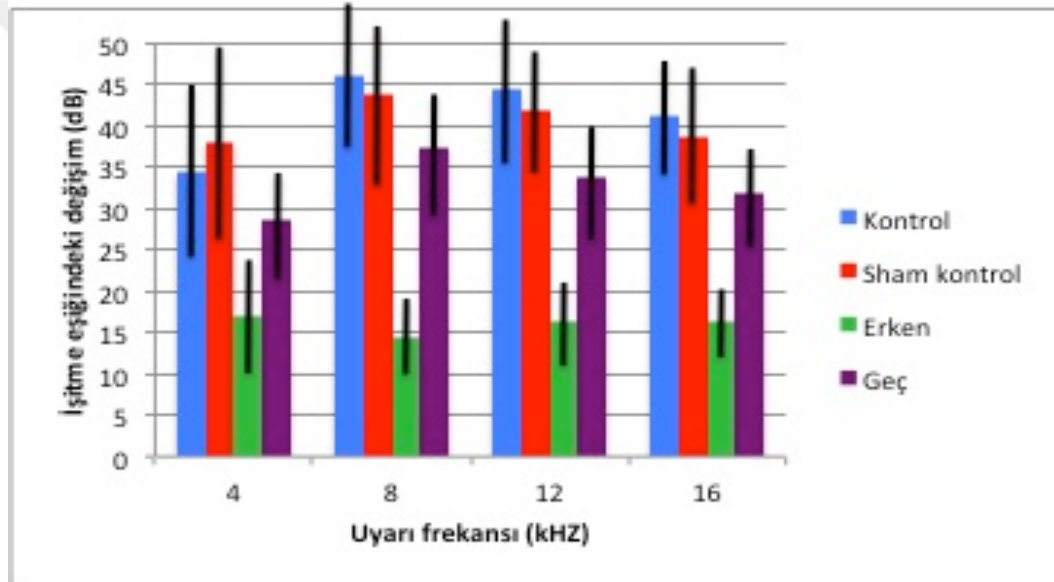
Çalışmanın başlangıcından 15. aya kadar oluşan ABR eşiği değişimleri de değerlendirildi (Tablo 4.6, Şekil 4.6). Kontrol ve sham kontrol gruplarında ortalama ABR eşiği değişimi 34,375 dB ile 46,25 dB arasında değişiyordu ($p=0,935$). Erken tedavi grubunda eşik değişimi 14,375 dB ile 16,875 dB arasındayken, geç tedavi grubunda değişim 28,75 dB ile 37,5 dB arasındaydı. Erken tedavi grubunda ABR eşiği değişiklikleri tüm frekanslarda kontrol gruplarından düşüktü ($p=0,000$). Erken ve geç tedavi gruplarının son eşik değişim farkları 11,875 dB ile 23,125 dB arasında değişiyordu. Bu fark 4 kHz'de anlamlı değilken ($p=0,823$), 8, 12 ve 16 kHz'de eşik değişimi erken tedavi grubunda anlamlı olarak düşüktü ($p=0,000$).

Tablo 4.6. Tedavi başlangıcı ve sonu arasında gruptaki ABR eşiği değişiklikleri (değerler dB SPL olarak verilmiştir).

Frekans (kHz)	Kontrol (ort ± SS)	Sham Kontrol (ort ± SS)	Erken (ort ± SS)	Geç (ort ± SS)	p*	p**
4	34,375 ± 10,235	38,125 ± 11,121	16,875 ± 6,546	28,75 ± 7,131	0,000	0,823
8	46,25 ± 9,986	43,75 ± 10,154	14,375 ± 5,856	37,5 ± 8,324	0,000	0,001
12	44,375 ± 9,824	41,875 ± 9,756	16,25 ± 6,013	33,75 ± 9,345	0,000	0,000
16	41,25 ± 9,142	38,625 ± 8,543	16,25 ± 5,945	31,875 ± 8,648	0,001	0,000

p*: Erken tedavi grubu ile kontrol gruplarının karşılaştırılması

p**: Erken tedavi grubu ile geç tedavi grubunun karşılaştırılması



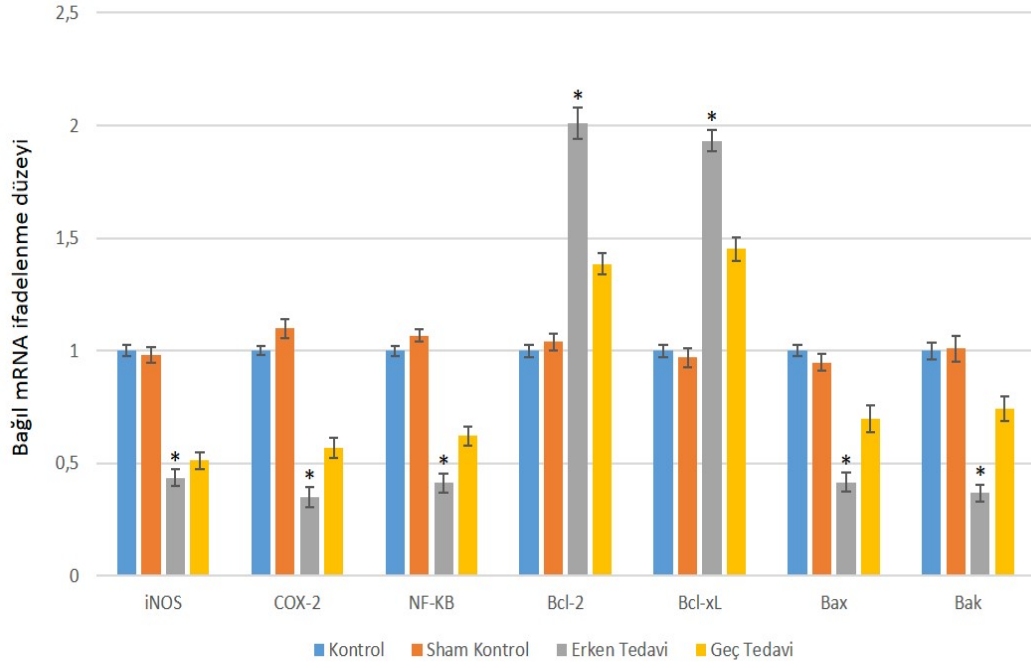
Şekil 4.6. Tedavi başlangıcı ve sonu arasında gruptaki ABR eşiği değişimi. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.

4.2. Gen İfadenmesi Üzerindeki Değişiklikler

Deney protokolünün sonunda elde edilen orta kulak dokularından RNA elde edilerek, ters transkriptaz ile cDNA sentezi yapılmış ve hedef genlerin mRNA ifadenmesi düzeyleri kantitatif Real-Time PCR analiz yöntemi ile belirlendi. Hedef genlerin yaşa bağlı işitme kaybının önlenmesi üzerine düzeltici etkilerinin araştırılması çalışma için çok önemli bir yer tuttuğundan her bir gen için en az 5 tekrar olacak şekilde Real-Time PCR analizi yapıldı.

Real Time PCR analizinde primerlerin ilgili gen dizileri ile bağlanması bu genin ortamdaki derişimi ile doğru orantılıdır. Bir gene ait mRNA ortamda ne kadar fazla bulunursa eşleşmeyle doğru orantılı seyreden amplifikasyonlar ışımanın o kadar erken gerçekleşmesine neden olur. Bu bilgiler ışığında, yaşa bağlı işitme modeli oluşturulduktan sonra uygulanan CoQ10 tedavisi sonucunda orta kulak dokularında iNOS, COX-2, Nf-kB ile apoptoz oluşumunda etkili olan Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak genlerinin mRNA ifadenme düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu genlerin mRNA düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı. İfade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi Qiagen-REST-2009 (Relative Expression Software Tool) programı ile birlikte Qiagen-RT[®] Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 programı kullanılarak eş zamanlı olarak gerçekleştirildi.

Oluşan yaşa bağlı işitme kaybı modelinde, erken tedavi grubunda kontrol ve sham kontrol gruplarına kıyasla hücrede artan apoptozdan sorumlu olabilecek Bax, Bak gibi pro-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı ($p<0,05$), Bcl-2, Bcl-xL gibi anti-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı ($p<0,05$) ve inflamasyonda rol oynayan inflamatuvar mediatörlerden iNOS, COX-2 ve Nf-kB genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığı ($p<0,05$) gözlenirken, geç tedavi grubunda ise kontrol ve sham kontrol gruplarına kıyasla Bax, Bak gibi pro-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin azaldığı, Bcl-2, Bcl-xL gibi anti-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerinin arttığı, ancak bu artış ve azalışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.7). Yine geç tedavi grubunda inflamatuvar mediatörlerden iNOS, COX-2 ve Nf-kB genlerinin mRNA ifadenme düzeylerinin erken tedavi grubuna benzer şekilde azaldığı gözlenirken, bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Yaşa bağlı işitme kaybı modelinde CoQ10'un hedef genleri bağıl mRNA ifadenleme düzeyleri üzerindeki etkisi.

5. TARTIŞMA

Yaşa bağılı işitme kaybı, dünya çapında milyonlarca insanı ilgilendiren, kompleks bir dejeneratif hastalıktır. Duyusal yetersizliğin en önemli sebebi olarak insanları çevresinden uzaklaştırarak izolasyon ve depresyona yol açabilir (61). Ayrıca, geliştikten sonra, yaşa bağılı işitme kaybı rehabilitasyonu, rehabilitasyon merkezleri, cihazlar (işitme cihazları ve koklear implant), ve başka teknolojilerin (80) kullanımını gerektiren oldukça pahalı bir durumdur. Bu durum sosyal güvenlik kurumlarına ağır yük getirdiği gibi, bu tip rehabilitasyon ve cihazların bu kurumlar tarafından tam olarak karşılanmadığı bizim gibi ülkelerde hastaların cebinden çıkan masraflar da oldukça fazladır (81). Sonuç olarak, işitme cihazlarından fayda görecektir hastaların %25 veya daha azı bu cihazları kullanabilmektedir (82); kullanmayan hastaların %76'sı ise cihaz kullanmamanın en önemli sebebini maliyet olarak belirtmektedir. İlginç olarak, işitme cihazlarının sosyal güvenlik kurumları tarafından karşılandığı ülkelerde, ileri yaşlılarda cihaz kullanım oranları %60'ın üzerindedir (83). Yüksek prevelansı, yaşlı bireylerin genel sağlık durumu ve hayat kaliteleri üzerindeki ciddi etkisi ve rehabilitasyonun birey veya sosyal güvenlik kurumlarına maliyeti yaşa bağılı işitme kaybını önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir.

Hücre yaşlanmasında, yaşla ilgili en temel patoloji serbest radikallerin yol açtığı oluşan oksidatif hasardır. Mitokondrilerin, serbest radikallerin (ROS ve RNS) önemli bir kaynağı ve ROS/RNS kökenli oksidatif hasarın asıl merkezi olduğu artık yaygın olarak kabul görmektedir (38).

Koklea dokusu, ses uyarımına cevap veren mekanosensöriyel tüylü hücrelerinin yüksek metabolik ihtiyaçlarından dolayı oksidatif hasara oldukça hassastır. Normalde, fizyolojik durumlar sırasında tüylü hücre mitokondrilerinde üretilen ROS, tüylü hücrelerin endojen antioksidan mekanizmaları ile ortadan kaldırılır. Fakat yaş ilerledikçe ROS yıkımından sorumlu olan enzimlerin ekspresyonu azalır, oksidatif denge bozulur, oksidasyon artarak genetik ve hücresel değişiklikler ortaya çıkar. Bu durum, hücresel disfonksiyon ve ilerleyici koklear dejenerasyonla sonuçlanır (84). ROS'taki bu artış, aynı zamanda koklear

kan akımında azalmayla birlikte, destek yapılar ve sinir liflerinde inflamasyon ve dejenerasyonu da tetikler (85).

Bu çalışmada, oksidatif hasarın hücre yaşlanması ve işitme kaybı üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar ışığında, oldukça güçlü bir antioksidan olan CoQ10 tedavisinin farelerde presbiakuzi gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmanın başlangıcında, fareler henüz 3 aylıkken yapılan ABR incelemelerinde, farelerin ABR eşikleri arasında herhangi bir fark saptanmadı. Benzer şekilde, erken tedavi grubundaki fareler 3 aydır tedavi aldıkları halde, 6. ay kontrol ABR'lerinde de fareler arasındaki ABR eşiklerinin farklı olmadığı saptandı. 6. ay kontrol ABR'lerinde farelerin hepsinde, tüm frekanslardaki ABR eşiklerinde, az miktarda da olsa yükselme olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bu bulgular, bu tür farelerde işitme kaybının fareler 6. aylık olduktan sonra başladığını gösteren literatürdeki önceki çalışmalarla uyumluydu (60-63). Erken tedavi grubundaki fareler 3 aydır tedavi almış olmasına rağmen o gruptaki farelerin ABR eşiklerinin diğer gruplardakinden farklı olmamasının sebebinin; hem henüz farelerde istatistiksel olarak anlamlı bir işitme kaybı gelişmemiş olmasına, hem de CoQ10'un genetik düzeyde yol açtığı değişikliklerin klinik etkilerinin ortaya çıkmamasına bağlı olduğu düşünüldü.

Çalışmanın 6. ayında, fareler 9 aylık olduğunda yapılan ABR'lerde, (bu zaman diliminde erken tedavi grubundaki fareler 6 aydır, geç tedavi grubundaki fareler ise 3 aydır tedavi alıyordu), erken tedavi grubundaki farelerde ABR eşiklerinin kontrol, sham kontrol ve geç tedavi grubundaki farelerden anlamlı olarak daha düşük olduğu görüldü. Geç tedavi grubu ile kontrol grupları arasında ABR eşikleri arasında anlamlı bir fark yoktu. Fareler 6 aylıkken elde edilen eşikler ile 9 aylıkken elde edilen eşikler karşılaştırıldığında, geç tedavi, kontrol ve sham kontrol gruplarında ABR eşiklerinin anlamlı olarak yükseldiği gözlenmişken, erken tedavi verilen grupta 6 ila 9. ay eşikleri arasında anlamlı bir fark saptanamadı. Benzer şekilde, Heman-Ackah ve ark., kombine antioksidan tedavisinin erken dönemde başladığında işitme kaybının ortaya çıkmasını önlemede etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (53). Bu bulgular, erken CoQ10 başlanan farelerde yaşla ortaya çıkan değişikliklerin daha geç ve daha düşük

düzeyde görüldüğünü, yaşa bağlı işitme kaybına yol açan olası mekanizmaların ortaya çıktığı 6. aydan sonra tedavi başlanan farelerde ise CoQ10'un etkisinin henüz görülmediğini ortaya koymuştur. Bu, CoQ10 tedavisine başlama süresinin işitme kaybını engellemede etkili olduğunu ileri süren hipotezimiz ile uyumludur.

Fareler 12 aylık olduğunda, yani erken tedavi grubundaki fareler 9, geç tedavi grubundaki fareler 6 ay süresince tedavi aldıktan sonra yapılan ABR incelemelerinde, erken tedavi grubunun ABR eşiklerinin geç tedavi, kontrol ve sham kontrol gruplarından daha düşük olduğu izlendi. Benzer şekilde, geç tedavi grubunun ABR eşikleri kontrol gruplarından daha düşük olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar (65-67), bu tür farelerde 12. ayda işitme kaybının iyice belirginleştiğini ortaya koymuştur. Bizim çalışmamızda da fareler 12 aylık olduğunda işitme kaybı özellikle kontrol gruplarında belirgin şekilde ilerlemişti. Erken dönemde tedavi başlanan farelerde bir miktar işitme kaybı gözlenirse de, bu farelerdeki ABR eşikleri kontrol gruplarından anlamlı olarak düşüktü. 6 aydır CoQ10 tedavisi alan geç tedavi grubundaki farelerde ise ilacın etkisi görülmeye başlamış ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol gruplarından daha iyi eşikler elde edilmiştir.

Çalışmanın son ABR'si hayvanlar 15 aylıkken, fareler sakrifiye edilmeden hemen önce yapıldı. Yapılan testlerde, erken tedavi grubundaki farelerin ABR eşiklerinin geç tedavi ve kontrol gruplarından anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. Benzer şekilde, çalışma sonunda geç tedavi grubundaki farelerin de ABR eşikleri bütün frekanslarda kontrol grubundaki farelerin ABR eşiklerinden iyiydi ama bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmanın başlangıcından farelerin sakrifiye edildiği 15. aya kadar olan ABR eşiği değişimleri değerlendirildiğinde ise, erken tedavi grubundaki farelerde tüm frekanslardaki ABR eşiği farkının kontrol gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı. Erken tedavi grubu ile geç tedavi grubu karşılaştırıldığında, erken tedavi grubundaki farelerde ABR eşiği farklarının 8, 12 ve 16 kHz'de anlamlı olarak daha düşükken, 4 kHz'de erken ve geç tedavi grupları arasında ABR eşiği değişimi arasında anlamlı bir fark yok gözlenmedi. Geç tedavi grubundaki farelerde ABR eşiği değişimi tüm frekanslarda kontrol

gruplarındaki farelerden daha düşüktü fakat bu fark istatistiksel olarak anlam yaratacak kadar fazla değildi.

Yaşa bağlı işitme kaybının önlenmesi ve tedavisinde şimdiye kadar farklı antioksidan tedavi seçenekleri denenmiş fakat çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Hayvan çalışmalarında, C57BL/6 fareler 17 farklı antioksidan içeren diyetle beslendiklerinde, yaşa bağlı işitme kaybının alfa-lipoik asit ve CoQ10 ile neredeyse tamamen engellendiği, N-asetil-L-sisteinin ise kısmen etkili olduğu gösterilmiştir (27). Çalışmada kullanılan diğer antioksidanların işitme kaybı üzerine herhangi bir etkisi bulunamamıştır. C vitamini desteğinin, C57BL/6 farelerde kokleada C vitamini düzeylerini arttırmadığı, veya yaşa bağlı işitme kaybını engellemediği gösterilmişken (86), E, C vitaminleri, melatonin veya lazaroid verilen Fischer 344 ratlarının, plasebo alan ratlara göre işitsel duyarlılığının daha iyi olduğu ve daha az mtDNA silinmesi izlendiği ortaya konmuştur (45).

Benzer şekilde, 6 ay süresince oral lesitin desteği alan Fischer 344 ratlarda kontrollere göre daha iyi işitme eşikleri elde edilmiştir (87). CBA/J fareleri, A, C, E vitaminleri, L-carnitine ve alfa lipoik asit içeren antioksidanla zenginleştirilmiş diyetle beslendiklerinde iç kulak dokularının antioksidan kapasitesinin belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Fakat bu hayvanlarda spiral ganglion hücreleri ve tüylü hücrelerdeki kayıpta azalma ve yaşa bağlı işitme kaybının derecesinde düzelme saptanmamıştır (88).

Bulgularımız, önceki çalışmaların da ışığında, antioksidan desteğinin, yaşa bağlı işitme kaybından sorumlu genotipik değişiklikler ortaya çıkmadan erken dönemde başladığında daha etkili olduğunu göstermektedir. Yaşa bağlı işitme kaybı ortaya çıktıktan sonra tedaviye başladığında, moleküler seviyede halihazırda başlamış olan apoptotik süreç ve inflamasyon nedeniyle CoQ10 daha az etkili olmuş olabilir. Bu sonuçlar, antioksidanların yaşa bağlı işitme kaybının tedavisinde değil de önlenmesinde etkili olduğunu ortaya koymuş olan önceki çalışmalar (53-57) ile de uyumludur. Bu durum, memelilerde tüylü hücreler ve spiral ganglion nöronlarının rejenere olamamasına bağlıdır, bu nedenle oluşan hasar sonrası işitme tekrar düzelemez. Bu bulgular, CoQ10'un yaşa bağlı işitme kaybı gelişimini önlemede etkili olduğunu ileri süren hipotezimiz ile uyumludur.

Deney süresince hiç bir tedavi uygulanmayan kontrol grubundaki fareler ile, CoQ10'u çözen madde olan %30 DMSO'nun uygulandığı sham kontrol grubundaki fareler arasında ABR eşiklerinde herhangi bir fark saptanmadı. Bu bulgu DMSO'nun işitme üzerine olumlu ya da olumsuz herhangi bir etkisi olmadığı hipotezimizi destekledi.

Sanchez-Rodriguez ve ark., güçlü bir antioksidan ailesi olan polifenollerden oluşan bir karışımın, yaşlanmanın kokleanın bütünlüğü üzerindeki yıkıcı etkilerini azaltarak yaşa bağlı işitme kaybına karşı ciddi bir koruma sağladığını göstermişlerdir (89). İç kulaktaki yaşlılık hasarına karşı oluşan bu koruma, adı geçen maddelerin antioksidan özelliği nedeniyle. Benzer şekilde, Heman-Ackah ve ark. da bir antioksidan tedavi kombinasyonunun (askorbik asit, B12 vitamini, folat, riboz-sistein, NW-nitro-L-arjinin metil ester ve L-sistein-glutasyon disülfid), hayvan modelinde ABR eşik değişimlerini etkin olarak azalttığını göstermişlerdir (53). Marie ve ark., 10 hafta boyunca içme sularına N-asetil sistein katılan farelerde, yaşa bağlı işitme kaybının tamamen engellenmese bile daha geç ortaya çıktığını ortaya koymuşlardır (90). Yazarlar, N-asetil sisteinin bu etkisini, mitokondride üretilen ROS overekspresyonunu azaltarak hücrel ve mitokondriyal hasarı engellemesine, bunun sonucu olarak da koklear tüylü hücreler ve sinir hücrelerinin apoptozisindeki azalmaya bağlamışlardır.

Someya ve ark., C57BL/6J farelerdeki yaşa bağlı işitme kaybının Bak-bağımlı mitokondriyal apoptozis aracılığıyla olduğunu ve mitokondriyal antioksidanları içeren oral destek tedavilerinin, kokleada Bak ifadenmesini düşürerek koklear hücre ölümünü azalttığı ve yaşa bağlı işitme kaybını önlediğini göstermişlerdir (56). Biz de çalışmamızda, benzer şekilde, koklear dokuda Bak ve Bax gibi mitokondriyal apoptozisi yolağında önemli rol oynayan pro-apoptotik genlerin ifadenme düzeylerinin, işitme kaybına yol açan iç kulak hasarı başlamadan CoQ10 verilmeye başlanan farelerde, geç tedavi ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğunu ortaya koyduk. Buna paralel olarak, apoptozisi baskılayan anti-apoptotik genler olan Bcl-2 ve Bcl-Xl genlerinin koklear dokudaki mRNA ifadenme düzeyleri de kontrol ve geç tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksekti. Bu bulgular

bize, CoQ10'un, mitokondriyal apoptozis aracılı hücre ölümünü baskılayarak yaşa bağlı ortaya çıkan değişiklikleri azalttığını göstermektedir.

Memeli hücrelerinde kronik inflamasyonun yaşlanmaya bağlı hücre içi hasarda rol oynadığı net bir şekilde ortaya konmuştur (52). Yaptığımız çalışmada, erken dönemde CoQ10 tedavisi başlanan farelerin koklea dokularında inflamatuvar süreçte farklı seviyelerde önemli rolleri olan mediatörlerden iNOS, COX-2 ve Nf-κB genlerinin ifadenme düzeylerinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğunu bulduk. Geç tedavi grubunda ise bu genlerin ifadenme düzeyleri kontrol gruplarında daha düşük olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum, yaşlılığa bağlı değişikliklerin ortaya çıkmasından sorumlu olan kronik inflamatuvar süreçler henüz ortaya çıkmadan CoQ10 uygulamasının, bu süreçlerin ortaya çıkışını yavaşlattığını göstermektedir. Bu süreçler başladıktan sonra kullanılması da inflamatuvar prosesleri bir miktar baskılamakla birlikte, ne klinik ne moleküler düzeyde bir değişikliğe yol açamamaktadır.

Hayvan deneylerinde farklı çalışmalarda elde edilen farklı bulgular, antioksidan desteğiyle yaşa bağlı işitme kaybının engellenmesi veya geciktirilmesinin, antioksidan bileşiklerin tipi ve dozajı, uygulanan tedavinin zamanlaması ile süresi, üzerinde deney yapılan tür ve suşların özellikleri gibi bir çok faktörden etkilenebileceğini göstermektedir.

Çeşitli antioksidanların, değişik sürelerde denendiği insan çalışmalarında da farklı sonuçlar bildirilmiştir. Suda çözünebilen CoQ10 (QTER®) ve E vitaminin 1 ay boyunca oral olarak verdiği erişkinlerde, QTER alanlarda hava ve kemik işitme eşiklerinde E vitaminine oranla belirgin düzelme saptanmıştır (55). 3 yıl boyunca folik asit verilen bireylerde, alçak frekanslardaki kayıplarda azalma saptanmışken, yüksek frekanslarda bir değişiklik saptanmamıştır (91). Takumida ve ark., yaptıkları iki ayrı çalışmada 8-52 hafta boyunca çeşitli antioksidan kombinasyonlarının (rebamipide, alfa lipoik asit ve C vitamini) verildiği yaşlılarda tüm frekanslarda belirgin düzelme saptanmışken (92, 93), Polanski ve ark. 6 ay boyunca farklı antioksidan (ginkgo biloba ekstraktı, alfa lipoik asit ve C vitamini, papaverin klorhidrat ve E vitamini) alan bireylerde, işitme eşiklerinde anlamlı bir değişiklik gösterememişlerdir (94). Bu

çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmesinin nedeni, kontrollü ortamlarda işitme kaybı gelişmeden önce uzun süre takip edilebilen deney hayvanlarının tersine, işitme kaybını etkileyebilecek gürültü maruziyeti, eşlik eden hastalıklar, beslenme özellikleri, kullanılan ilaçlar ve diğerk farklı çevresel faktörlerin kontrol altına alınamamasıyla birlikte nispeten kısa takip süreleridir. O yüzden yaşa bağlı işitme kaybını inceleyen çalışmalarda tercih edilen yöntem hayvan çalışmalarıdır.

Çalışmamızda, literatürde önceki çalışmalarla (27, 55) uyumlu olacak şekilde, CoQ10'un tek başına kullanıldığında dahi yaşa bağlı işitme kaybına karşı koruyucu etkisi olduğunu gösterdik. Bu etki, özellikle CoQ10 işitme kaybı başlamadan önce kullanılmaya başladığında belirgindi. CoQ10'un bu koruyucu etkisi, yaptığımız moleküler çalışmaların da ortaya koyduğu gibi, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklerinin ortaya çıkardığı antioksidan özelliklerine bağlıdır. CoQ10, koklea dokusunda pro-apoptotik genler olan Bax ve Bak genlerinin ve NF-B, COX-2 and iNOS gibi inflamatuvar aracılarn mRNA ifadenme düzeylerini azaltırken, Bcl-2 and Bcl-xL gibi anti-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeylerini arttırır. CoQ10'un neden olduğu bu değişiklikler, kokleadaki yaşlanma sürecini yavaşlatarak, yaşlanmanın yol açtığı değişiklikleri geciktirir.

Bu çalışmada, fonksiyonel ve moleküler incelemeler ile, oksidatif metabolizmada bir çok noktada etki ederek antioksidan özellik gösteren CoQ10 tedavisinin C57BL/6 farelerde yaşa bağlı işitme kaybının ortaya çıkışını geciktirebileceği ve şiddetini azaltabileceği ortaya konmuştur. Bu fayda, özellikle tedavinin işitme kaybından önce başlandığı erken tedavi grubunda belirgindir. Geç tedavi grubundaki ABR sonuçları da kontrollerden daha iyi olmasına rağmen ne moleküler düzeydeki değişiklikler, ne de ABR eşikleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak iyi değildi.

Bu çalışmanın en önemli sınırlaması, teknik yetersizlikler nedeniyle 32 kHz'i de kapsayan bir ABR cihazı kullanılamamasıdır. Yaşa bağlı işitme kaybı yüksek frekanslarda başlar, bu nedenle bu konu üzerinde yapılmış olan önceki hayvan çalışmalarının, hepsi olmasa bile büyük çoğunluğu, 32 kHz ABR ölçümlerini de içermektedir. Ayrıca, alışmamızda incelediğimiz genlerin sadece koklear dokudaki ifadenme düzeyleri araştırıldı ki, literatürde bu konuda

yapılmış bu kapsamdaki ilk çalışma olmasına rağmen, bu durum işitme kaybının sadece periferik komponentinin moleküler düzeyde incelenmesine neden olmaktadır. CoQ10'un, yaşlanmayla birlikte işitmenin santral yollarında ortaya çıkan değişiklikler üzerine yaptığı etkilerin ortaya konabilmesi için santral işitme merkezlerine yönelik farklı histopatolojik ve moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yaşa bağılı işitme kaybı modeli olarak literatürde yaygın olarak kullanılan C57/BL6 farelerde 6. aydan itibaren yaşa bağılı işitme kaybı gözlenmeye başlandı.

2. Yaşamlarının 3. ayından itibaren 100 mg/kg/gün CoQ10 alan farelerde, yaşla beraber görülen işitme kaybı anlamlı olarak daha düşük şiddette ortaya çıktı. Fareler 9, 12 ve 15 aylıkken yapılan ABR incelemelerinde erken tedavi grubunu oluşturan bu farelerin ABR eşikleri geç tedavi ve kontrol gruplarından anlamlı olarak düşüktü.

3. Altı aylık olduktan sonra CoQ10 tedavisi başlanan farelerdeki işitme eşikleri değerlendirildiğinde, fareler 9 aylıkken yapılan ABR incelemelerinde kontrol gruplarıyla bir fark saptanmazken, 12 ve 15 aylıkken yapılan incelemelerde ABR eşiklerinin kontrol gruplarından daha iyi olduğu saptandı. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum, işitme kaybına neden olan hücresel değişiklikler başladıktan sonra tedavi başlanmasının, halihazırda oluşan hasarı geri dönüştürememesine bağlıdır.

4. Herhangi bir tedavi verilmeyen kontrol grubu ile CoQ10'un çözöldüğü madde olan DMSO'nun uygulandığı farelerde beklendiği gibi 6. aydan itibaren işitme kaybı görölmeye başlamış ve bu kayıp zaman ilerledikçe derinleşmiştir. İki grup arasında çalışma boyunca yapılan ABR'lerde herhangi bir fark saptanmamıştır. Bu durum DMSO'nun işitme üzerine etkisi olmadığını göstermektedir.

5. Çalışmanın başlangıcı ile sonu arasındaki ABR eşığı değişimleri incelendiğinde, erken tedavi grubundaki ABR eşığı değişimi, kontrol gruplarından anlamlı olarak düşüktü. Geç tedavi grubundaki eşik değişimi kontrol gruplarından düşük olsa da, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Erken tedavi ile geç tedavi grupları karşılaştırıldığında, erken tedavi grubunun ABR eşığı değişikliklerinin 8, 12 ve 16 kHz'de geç tedavi grubundan anlamlı olarak düşük olduğu göröldü. 4 kHz'de görölen eşik değişiminde anlamlı fark görölmedi.

6. Fareler sakrifiye edildikten sonra iç kulakları çıkarılarak yapılan moleküler biyolojik incelemede, erken tedavi başlanan farelerin koklealarında pro-apoptotik genler olan Bax ve Bak genlerinin ve NF- κ B, COX-2 and iNOS gibi inflamatuvar araçların mRNA ifadenme düzeyleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüken, Bcl-2 and Bcl-xL gibi anti-apoptotik genlerin mRNA ifadenme düzeyleri yüksekti. Geç tedavi grubunda da benzer değişiklikler görülmesine rağmen, kontrol grupları ile geç tedavi grubu arasındaki ifadenme düzeyi farkları istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgular, CoQ10'un fareler üzerinde ABR incelemeleri ile ortaya koyduğumuz presbiakuziden koruyucu etkisinin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını göstermektedir.

7. Bu sonuçlar, farelerde presbiakuzi gelişimine yol açan mekanizmalar oluşmadan CoQ10 tedavisi başlamanın işitmenin korunmasında etkili olduğunu ortaya koymuştur. İşitme kaybı başladıktan sonra tedavi başlanan farelerde de kontrol gruplarında daha iyi ABR eşikleri ve daha düşük bir ABR eşiği değişimi izlense de, aradaki fark anlamlı değildi. Bu durum işitme kaybına neden olan mekanizmaların yol açtığı hasarın geri dönüştürülemez olmasına bağlı olabileceği gibi, farelere verilen CoQ10 dozunun düşük gelmesi sebebiyle de olabilir. CoQ10'un antioksidan özellikleri nedeniyle işitme kaybının şiddetini azalttığı göz önüne alındığında, işitme kaybı başladıktan sonra farelere daha yüksek dozda verilmesi bu gruptaki kaybın da daha düşük olmasına yol açabilirdi.

8. Sonuçlarımız, piyasada farklı ticari formlarda rahatlıkla bulunabilen bir moleköl olan CoQ10'un yaşa bağlı işitme kaybının ortaya çıkışının geciktirilmesi ve şiddetinin azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. Bu etkinin, özellikle tedaviye işitme kaybı gelişmeye başlamadan önce başladığı zaman daha belirgin olduğu ortaya konmuştur.

9. Bu bulgular ışığında, insanlardaki optimal dozun ve tedaviye başlangıç süresinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Farklı dozların denendiği, daha yüksek frekansları kapsayan ABR incelemeleri ile yapılacak hayvan deneyleriyle birlikte, geniş katılımcı sayısına sahip insan çalışmaları yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Mills JH, Megerian CA, Lambert PR. Precbyacusis and presbyastasis. In: Snow JB, Wackym PA (eds). *Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 17th ed. Connecticut, BC Decker Inc, 2009:333-342.
2. Matthews LJ, Lee FS, Mills Jh, Dubno JR. Extended high frequency thresholds in older adults. *J Speech Lang Hear Res*, 1997, 40:208-214.
3. Kashima ML, Goodwin WJ, Balkany T, Casiano RR. Special considerations in managing geriatric patients. In: Cummings CW, Flint PW, Harker LA, Haughey BH, Richardson MA, Robbins KT, Schuller DE, Thomas JR (eds). *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 4th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby, 2005:351-366.
4. Bai U, Seidman MD, Hinojosa R, Quirk WS. Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study. *Am J Otol*. 1997, 18(4):449-453.
5. Selena E, Steven K, Tina C, Timothy S. A combination antioxidant therapy prevents age-related hearing loss in C57BL/6 mice. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2010, 143:429-434.
6. Derin A, Agirdir B, Derin N, Dinc O, Güney K, Ozcaglar H, Kılınçarslan S. The effects of L-carnitine on presbycusis in the rat model. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2004, 29(3):238-241.
7. Kim JM, Park E. Coenzyme Q10 attenuated DMH-induced precancerous lesions in SD rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010, 56(2):139-144.
8. Wang X, Meng Q, Qiu C, Li P, Qu R, Wang W, Wang Y, Liu L, Zhao Y. Potential therapeutic role of Co-Q10 in alleviating intervertebral disc degeneration and suppressing IL-1 β -mediated inflammatory reaction in NP cells. *Int Immunopharmacol*. 2018, 64:424-431.
9. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007, 35(4):495-516.

10. Park SN, Back SA, Park KH, Kim DK, Park SY, Oh JH, Park YS, Yeo SW. Comparison of cochlear morphology and apoptosis in mouse models of presbycusis. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2010, 3(3):126-135.
11. Akyıldız N. İşitme fizyolojisi. İçinde: Akyıldız N. *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi* 1. Baskı. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998: 78-103.
12. Brenda L, Lansbury M, Martin GK, Luenke AE. Physiology of the auditory and vestibular systems. In: Snow JB, Wackym PA (eds). *Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 17th ed. Connecticut, BC Decker Inc, 2009:45-80.
13. Santi PA, Mancini P. Cochlear anatomy and central auditory pathways. In: Cummings CW, Flint PW, Harker LA, Haughey BH, Richardson MA, Robbins KT, Schuller DE, Thomas JR (eds). *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 4th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby, 2005:3373-3400.
14. Pickles JO. Auditory pathways: anatomy and physiology. In: Celesia GG, Hickok G (eds). *Handbook of Clinical Neurology. The Human Auditory system*. Elsevier; 2015:129:3-25.
15. Roebuck J. When does old age begin? The evolution of the English definition. *Journal of Social History*. 1979, 12(3):416-428.
16. Thane P. The muddled history of retiring at 60 and 65. *New Society*. 1978, 45(826):234-236.
17. Bilginer B, Tuncer A, Apani E. Adana huzurevi ve Yenibaraj sağlık ocağı bölgesindeki 65 yaş ve üzeri yaşlıların demografik özellikleri. *EAJM*. 2000, 32:139-142.
18. T.C. Sağlık Bakanlığı, *Türkiye Sağlıklı Yaşlanma Eylem Planı ve Uygulama Programı 2015-2020*, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kronik Hastalıklar, Yaşlı Sağlığı ve Özürlüler Daire Başkanlığı, Ankara, 2015:20-29.
19. Koçoğlu G, Bilir N. *Yaşlanma 2002: Uluslararası eylem planı*. <http://www.gebam.hacettepe.edu.tr/eylem.pdf>. 25 Ağustos 2019.

20. World Health Organisation. Primary Ear and Hearing Care Training Resource: Advanced Level, https://www.who.int/pbd/deafness/activities/hearing_care/advanced.pdf?ua=1 24 Eylül 2019.
21. TÜİK, İstatistiklerle Yaşlılar, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24644>, 13 Ekim 2019.
22. Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993, 102:1-16.
23. Gates GA, Mills JH. Presbycusis. *Lancet.* 2005. 366(9491):1111-1120.
24. Han C, Someya S. Mouse models of age-related mitochondrial neurosensory hearing loss. *Mol Cell Neurosci.* 2013, 55:95-100.
25. Fetoni AR, Picciotti PM, Paludetti G, Troiani D. Pathogenesis of presbycusis in animal models: a review. *Exp Gerontol.* 2011, 46(6):413-425.
26. Perez P, Bao J. Why do hair cells and spiral ganglion neurons in the cochlea die during aging? *Aging Dis.* 2011, 2(3):231-241.
27. Someya S, Prolla TA. Mitochondrial oxidative damage and apoptosis in age-related hearing loss. *Mech Ageing Dev.* 2010, 131(7-8):480-486.
28. Yamasoba T, Someya S, Yamada C, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hear Res.* 2007, 226:(1-2):185-193.
29. Ateş NA, Unal M, Tamer L, Derici E, Karakaş S, Ercan B, Pata YS, Akbaş Y, Vayisoğlu Y, Camdeviren H. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in presbycusis. *Otol Neurotol.* 2005, 26(3):392-397.
30. Mazelova J, Popelar J, Syka J. Auditory function in presbycusis: peripheral vs. central changes. *Exp Gerontol.* 2003, 38(1-2):87-94.
31. Bielefeld EC, Tanaka C, Chen GD, Henderson D. Age-related hearing loss: Is it a preventable condition? *Hear Res.* 2010, 264(1-2):98-107.

32. Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K. Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res.* 2013, 303:30-38.
33. Someya S, Tanokura M, Weindruch R, Prolla TA, Yamasoba T. Effects of caloric restriction on age-related hearing loss in rodents and rhesus monkeys. *Curr Aging Sci.* 2010, 3(1):20-25.
34. Chen B, Zhong Y, Peng W, Sun Y, Kong WJ. Age-related changes in the central auditory system: comparison of D-galactose-induced aging rats and naturally aging rats. *Brain Res.* 2010, 1334:43-53.
35. Chisolm TH, Willott JF, Lister JJ. The aging auditory system: anatomic and physiologic changes and implications for rehabilitation. *Int J Audiol.* 2003, 42(2):2S3-2S10.
36. Frisina RD, Walton JP. Age-related structural and functional changes in the cochlear nucleus. *Hear Res.* 2006, 216-217:216-233.
37. Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF. Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol.* 2008, 211(11):1781-1791.
38. Tavanai E, Mohammadkhan G. Role of antioxidants in prevention of age-related hearing loss: a review of the literature. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017, 274(4):1821-1834.
39. Toynbee J. Pathological and surgical observations on the diseases of the ear. *Med Chirug Trans.* 1861, 24:190-205.
40. Schacht J, Hawkins JE. Sketches of otohistory. Part 9: presbycusis. *Audiol Neuro Otol.* 2005, 10(5):243-247.
41. Otte J, Schuknecht HF, Kerr AG: Ganglion cell populations in normal and pathological human cochlea. Implication for cochlear implantation. *Laryngoscope.* 1978, 88:1231-1246.
42. Suzuka Y, Schuknecht HF. Retrograde cochlear neuronal degeneration in human subjects. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1988, 450:1-20.

43. Pauler M, Schuknecht HF, White JA. Atrophy of the stria vascularis as a cause of sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*. 1978, 98(7):754-759.
44. Dalton DS, Cruickshanks KJ, Klein BE, Klein R, Wiley TL, Nondahl DM. The impact of hearing loss on quality of life on older adults. *Gerontologist*. 2003, 43(5):661-668.
45. Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss. *Ageing Res Review*. 2002, 1(3):331-343.
46. Seidman MD. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope*. 2000, 110:727-738.
47. Jiang H, Talaska AE, Schacht J, Sha SH. Oxidative imbalance in the aging inner ear. *Neurobiol Aging*. 2007, 28(10):1605-1612.
48. Le T, Keithley EM. Effects of antioxidants on the aging inner ear. *Hear Res*. 2006, 226(1-2):194-202.
49. Coling D, Chen S, Chi LH, Jamesdaniel S, Henderson D. Age-related changes in the antioxidant enzymes related to hydrogen peroxide metabolism in rat inner ear. *Neurosci Lett*. 2009, 464(1):22-25.
50. Du Z, Yang Q, Liu L, Li S, Zhao J, Hu J, Liu L, Qian D, Gao C. NADPH oxidase 2-dependent oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the ventral cochlear nucleus of D-galactose-induced aging rats. *Neuroscience*. 2015, 286:281-292.
51. Böttger EC, Schacht J. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss. *Hear Res*. 2013, 303:12-19.
52. Chung HY, Kim DH, Lee EK, Chung KW, Chung S, Lee B, Seo AY, Chung JH, Jung YS, Im E, Lee J, Kim ND, Choi YJ, Im DS, Yu BP. Redefining chronic inflammation in aging and age-related diseases: Proposal of the seroinflammation concept. *Ageing Dis*. 2019, 10(2):367-382.
53. Heman-Ackah SE, Juhn SK, Huang TC, Weidmann TS. A combination antioxidant therapy prevents age related hearing loss in C57BL/6 mice. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010, 143(3):429-434.

54. Nevado J, Sanz R, Sanchez-Rodrigues C, Garcia- Berrocal JR, MArtin-Sanz E, Gonzalez-Garcia JA, Esteban-Sanchez J, Ramirez-Camacho R. Ginkgo biloba extract (EGb761) protects against aging-related caspase-mediated apoptosis in rat cochlear. *Acta Otolaryngol.* 2010, 130(10):1101-1112.
55. Salami A, Mora R, Dellepiane M, Manini G, Santomauro V, Baretini L, Guastini L. Water soluble coenzyme Q10 formulation (QTER®) in the treatment of presbycusis. *Acta Otolaryngol.* 2010, 130(10):1154-1162.
56. Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, Rabinovitch PS, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Prolla TA. Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, 17:106(46):19432-19437.
57. Someya S, Yamasoba T, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M. Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Hear Res.* 2007, 30:207-218.
58. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, 9(1):47-59.
59. Schuknecht HF. Further observations on the pathology of presbycusis. *Arch Otolaryngol.* 1964, 80:369-382.
60. Akyıldız N. Yaşlanmanın kulak üzerine etkileri. İçinde: Akyıldız N. *Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi 2. cilt 1.* Baskı. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002: 48-56.
61. Kalayam B, Meyers BS, Kakuma T, Alexopoulos GS, Young RC, Solomon S, Shotland R, Nambudiri D, Goldsmith D. Age at onset of geriatric depression and sensorineural hearing deficits. *Biol Psychiatry.* 1995, 38(10):649-658.
62. Mulrow CD, Aguilar C, Endicott JE, Tuley MR, Velez R, Charlip WS, Rhodes MC, Hill JA, DeNino LA. Quality-of-life changes and hearing impairment. A randomized trial. *Ann Intern Med.* 1990, 113:188-194.

63. Albuquerque AA, Rossato M, Oliveira JA, 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.
64. Bowl MR, Dawson SJ. The mouse as a model for age-related hearing loss- a mini-review. *Gerontology* 2015, 61:149-157.
65. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev.* 2013, 12:8-21.
66. Hequembourg S, Liberman MC. Spiral ligament pathology: a major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2001, 2:118-129.
67. Scimemi P, Santarelli R, Selmo A, Mammano F. Auditory brainstem responses to clicks and tone bursts in C57 BL/6J mice. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2014, 34(4):264-71.
68. Zaaroor M, Starr A. Auditory brain-stem evoked potentials in cat after kainic acid induced neuronal loss. I. Superior olivary complex. *Electroencephalog Clin Neurophysiol.* 1991, 80(5):422-435.
69. Hashimoto I, Ishiyama Y, Yoshimoto T, Nemoto S. Brain-stem auditory-evoked potentials recorded directly from human brain-stem and thalamus. *Brain.* 1981, 104(Pt 4):841-859.
70. Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Jareno-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci Res.* 2012, 73(4):302-311.
71. Henry KR. Differential changes of auditory nerve and brain stem short latency evoked potentials in the laboratory mouse. *Electroencephalog Clin Neurophysiol.* 1979, 46(4):452-459.
72. Chen TJ, Chen SS. Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion methods in rats. *Exp Brain Res.* 1991, 85(3):537-542.
73. Laredj LN, Licitra F, Puccio HM. The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie.* 2014, 100:78-87.

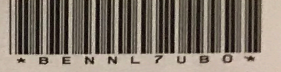
74. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1660(1-2):171-199.
75. Acosta MJ, Vazquez Fonseca L, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, Salviati L. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016, 1857(8):1079-1085.
76. Varela-Lopez A, Giampieri F, Battino M, Quiles JL. Coenzyme Q and its role in the dietary therapy against aging. *Molecules*. 2016, 21(3):373.
77. Toprak K, Ayaz A. Koenzim Q10: Biyolojik aktivitesi ve sağlık üzerine etkisine g¼ncel bakış. *HÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2019, 6(2):1-17.
78. Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr*. 2001, 20(6):591-598.
79. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30(9):e36.
80. National Institutes of Health. Healthy People 2010 28 Vision and Hearing. http://www.healthypeople.gov.tr/document/html/volume2/28vision.htm#_Toc489325915. 30 Ağustos 2019.
81. Donahue A, Dubno JR, Beck L. Guest editorial: accessible and affordable hearing health care for adults with mild to moderate hearing loss. *Ear Hear*. 2010, 31:2-6.
82. Kochkin S. MarkeTrak VIII: 25-years trends in the hearing health market. *Hear Rev*. 2009, 16:12-31.
83. Corna LM, Wade TJ, Streiner DL, Cairney J. Corrected and uncorrected hearing impairment in older Canadians. *Gerontology*. 2009, 55:468-476.
84. Fujimoto C, Yamasoba T. Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. *Oxid Med Cell Longev*. 2014, 582849.
85. Shi X, Nuttall AL. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress. *Brain Res*. 2003, 967(1-2):1-10.

86. Kashio A, Amano A, Kondo Y, Sakamoto T, Iwamura H, Suzuki M, Ishigami A, Yamasoba T. Effect of vitamin C depletion on age-related hearing loss in SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 390(3):394-398.
87. Seidman MD, Khan MJ, Tang WX, Quirk WS. Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002, 127(3):138-144.
88. Sha SH, Kanicki A, Halsey K, Wearne KA, Schacht J. Antioxidant-enriched diet does not delay the progression of age-related hearing loss. *Neurobiol Aging.* 2012, 33(5):1010.e15-1010.e16.
89. Sanchez-Rodriguez C, Martin-Sanz E, Cuadrado E, Granizo JJ, Sanz-Fernandez R. Protective effects of polyphenols on presbycusis via oxidative/nitrosative stress suppression in rats. *Exp Gerontol.* 2016, 83:31-36.
90. Marie A, Meunier J, Brun E, Malmstrom S, Baudoux V, Flaszka E, Naert G, Roman F, Cosnier-Pucheu S, Gonzalez-Gonzalez S. N-acetylcysteine treatment reduces age-related hearing loss and memory impairment in the senescence-accelerated prone 8 (SAMP8) mouse model. *Aging Dis.* 2018, 9(4):664-673.
91. Durga J, Verhoef P, Anteunis LJ, Schouten E, Kok FJ. Effects of folic acid supplementation on hearing in older adults: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2007, 146(1):1-9.
92. Takumida M, Anniko M. Radical scavengers for elderly patients with age-related hearing loss. *Acta Otolaryngol.* 2009, 129(1):36-44.
93. Takumida M, Anniko M. Radical scavengers: a remedy for presbycusis. A pilot study. *Acta Otolaryngol.* 2005, 125(12):1290-12.
94. Polanski JF, Cruz OL. Evaluation of antioxidant treatment in presbycusis: prospective, placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *J Laryngol Otol.* 2013, 127(2):134-141.

8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç.Dr.Togay MÜDERRİS
T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
Bozkaya Eğitim Araştırma Hastanesi
KBB Kliniği
Karabağlar/İZMİR

Araştırmacı grubu Togay MÜDERRİS, Atiye Seda YAR SAĞLAM ve Handan KAYHAN'dan oluşan, G.Ü.ET-18.067 kod numaralı ve "*Yaşa Bağlı İşitme Kaybının Önlenmesi ve Tedavisinde Koenzim Q10'un Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.067 and entitled "*Effects of Coenzyme Q10 on Prevention and Treatment of Age Related Hearing Loss*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Fare (C57BL/6)
Hayvan Sayısı : 32

Ek:1 Liste

BELGENİN AŞLI
ELEKTRONİK İMZALI
.../.../20...



Evrakı Doğrulamak İçin: <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr>
Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
E-posta: hadualak@gazi.edu.tr İnternet Adresi: <http://hadualak.gazi.edu.tr/>

Pin: 92202
Bilgi için :Ayfer Çekmez
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 18 07.

Ek-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: TOGAY MÜDERRİS
Doğum tarihi	: 09.01.1979
Doğum yeri	: ANKARA
Medeni hali	: EVLİ
Uyruğu	: TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Adres	: İZMİR BOZYAKA EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ KBB KLİNİĞİ, KARABAĞLAR, İZMİR
Tel	: 05323076476
Faks	: 02322505050
E-mail	: togaymuderris@yahoo.com
EĞİTİM	
Lise	: TED ANKARA KOLEJİ
Lisans	: CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
Yüksek lisans	: ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 96.25 YDS 2019 ARALIK
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
KBB-BBC DERNEĞİ	YÜZ PLASTİK CERRAHİ DERNEĞİ