

ZÜLEYHA DİLEK GÜLMEZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2017



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DENEYSEL METABOLİK SENDROMDA METFORMİN
UYGULAMASININ KOKLEAR FONKSİYONLAR
ÜZERİNE ETKİSİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK VE
ULTRASTRUKTUREL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

ZÜLEYHA DİLEK GÜLMEZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET ATAŞ**

**ODYOLOJİ ANABİLİM DALI
ODYOLOJİ, DİL VE KONUŞMA BOZUKLUKLARI
PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Odyoloji Anabilim Dalı, Odyoloji, Dil ve Konuşma Bozuklukları Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi Züleyha Dilek GÜLMEZ tarafından Prof. Dr. Ahmet ATAŞ'ın danışmanlığında hazırlanan "Deneysel Metabolik Sendromda Metformin Uygulamasının Koklear Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Elektrofizyolojik Ve Ultrastruktürel Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 07/08/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Ahmet ATAŞ
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi
Odyoloji Anabilim Dalı

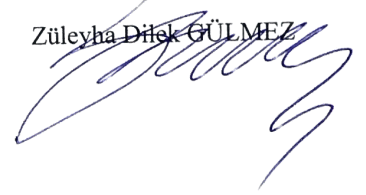
Jüri
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN
Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Zahra POLAT
İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi
Odyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Züleyha Dilek GÜLMEZ



İTHAF

Tez dönemimde aniden kaybettiğim anneanneme ve dayıma ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet ATAŞ ve Yrd. Doç. Dr. Zahra POLAT'a teşekkür ederim.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD'den sayın Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'a, Biyofizik ABD'den Yrd. Doç. Dr. Metin BUDAK'a, Fizyoloji ABD'den Yrd. Doç. Dr. Erdoğan BULUT'a teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD'den sayın Doç Dr. Pınar ATUKEREN'e teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Odyoloji Bölümü'nde, Öğr. Gör. Dr. Eyyüp KARA, Uzm. Ody. Selma YILAR, Uzm. Ody. Halide Çetin KARA, Uzm. Ody. Burcu DEMİRKUNDAK ve Psik. Işık BALTAÇI'ya her anımda yanımda oldukları ve destekledikleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönem arkadaşlarım Ebru KARA, Duygu HAYIR, Serpil Hülya AHMET ve Pınar ERTÜRK'e teşekkür ederim.

Trakya Üniversitesi, Deney Hayvanları Birimi'nde sayın Vet. Hek. Ziya ÇUKUR, Miray KILIÇARSLAN ve tüm laboratuvar çalışanlarına sabırla ve özveri ile tezime yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda yer alan, sevgilerini, desteklerini asla esirgemeyen değerli annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) (Proje No: 22687) ve İstanbul Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) (Proje no: 283.2016-YL-35/27-42) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. KOKLEA	5
2.1.1. Lateral Duvar	7
2.1.1.1. Spiral Ligaman	7
2.1.1.2. Stria Vaskularis	7
2.1.1.3. Spiral Prominens	8
2.1.2. Reissner membranı.....	8
2.1.3. Baziler Membran.....	9
2.1.3.1. Corti Organı	9
2.1.3.2. Tektorial membran	11
2.1.4. Kemik Spiral Lamina	11
2.2. Kokleanın vasküler yapısı.....	11
2.3. İşitmenin Elektrofizyolojik Değerlendirilmesi	12
2.3.1. Otoakustik Emisyonlar (OAE).....	12
2.3.2. İşitsel Beyinsapı Cevapları (ABR).....	13
2.4. Metabolik Sendrom (MetS)	13
2.4.1. MetS Etiyolojisi ve Prevelansı.....	13
2.4.2. Metabolik Sendrom Tanısı.....	14
2.4.2.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)	14

2.4.2.2. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı(NCEP) ve Erişkin Tedavi Paneli(ATP III)	14
2.4.2.3. Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (AACE)	15
2.4.2.4. Uluslararası Diyabet Vakfı (IDF, International Diabetes Foundation).....	15
2.4.2.5. Türkiye Endokrinoloji Metabolizma Derneği Metabolik Sendrom Çalışma Grubu.....	15
2.4.3. Metabolik Sendromun Fizyopatolojisi.....	15
2.4.3.1. İnsülin direnci.....	15
2.4.3.2. Fruktoz Metabolizması ve insülin direnci ilişkisi	17
2.4.3.3. Abdominal obezite, aterojenik dislipidemi	19
2.4.3.4. Diyabet	20
2.4.3.5. Hiperglisemi, hiperinsülinemi ve nöropati ilişkisi.....	20
2.4.3.6. Metabolik Sendrom ve İşitme kaybı	21
2.5. METFORMİN.....	22
2.5.1. Metformin özellikleri	22
2.5.2. Etki mekanizması.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Elektrofizyolojik Ölçümler	26
3.1.1. Timpanometrik İnceleme	26
3.1.2. Distortion Product Otoakustik Emisyon Ölçümü (DPOAE)	27
3.1.3. İşitsel Beyinsapı Cevapları (ABR).....	28
3.2. Histolojik Değerlendirmeler	30
3.2.1. Işık mikroskopisi-histopatolojik Değerlendirme	30
3.2.2. Hematoksilin+Eozin Boyama Prosedürü	31
3.2.3. İmmünohistokimya Prosedürü	31
3.3. Elektron mikroskopisi-Ultrastruktürel değerlendirme.....	32
3.3.1. Moleküler Analizler	37
3.3.1.1. Kan glukoz düzeyleri ve vücut ağırlık değişimleri	37
3.3.1.2. Biyokimyasal Analizler.....	37
a. İnsülin Düzeylerinin Ölçümü.....	38
b. Lipid Hidroperoksid (LHP) Düzeylerinin Ölçümü	38
c. Protein Karbonil (PC) Düzeylerinin Ölçümü.....	38
d. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Düzeylerinin Ölçümü	39
e. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs) Düzeylerinin Ölçümü.....	39

f. Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Miktar Tayini (FRAP)	39
3.3.1.3. Glut5 Gen Ekspresyonu	40
3.4. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Elektrofizyolojik Ölçümler	44
4.2. Histolojik Değerlendirmeler	53
4.2.1. Işık mikroskopisi-histopatolojik değerlendirmeler	53
4.3. Elektron mikroskopisi-Ultrastruktürel Değerlendirmeler.....	55
4.4. Moleküler Analizler	63
4.4.1. Biyokimyasal parametreler	63
4.4.1.1. Kan glukoz düzeyleri	63
4.4.1.2. Serum lipit düzeyleri	64
4.4.1.3. Vücut ağırlık değişimleri.....	64
4.4.1.4. Serum insülin düzeyleri.....	65
4.4.1.5. Serum Lipid Hidroperoksid Düzeyleri.....	65
4.4.1.6. Serum Protein Karbonil Düzeyleri.....	66
4.4.1.7. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Düzeyleri	67
4.4.1.8. Serum İleri Glikasyon Son Ürünleri Düzeyleri.....	67
4.4.1.9. Serum Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Miktar Tayini (FRAP) ..	68
4.4.2. Glut5 Gen Ekspresyonu	68
5. TARTIŞMA	70
KAYNAKLAR	77
ETİK KURUL KARARI	89
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	91
ÖZGEÇMİŞ	92

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 : EGIR kriterlerine göre insülin direnci tanımlanma kriterleri.....	15
Tablo 3-1 : Rutin parafin takip protokolü (Bulut, 2007)	31
Tablo 3-2 : Rutin scanning elektron mikroskopi takip protokolü.....	34
Tablo 3-3 : SEM ile Corti organında yüzey anatomisi değerlendirme parametreleri.....	36
Tablo 4-1 : Kontrol Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL).....	44
Tablo 4-2 : Kontrol Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL).....	44
Tablo 4-3 : Fruktoz Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL).....	45
Tablo 4-4 : Fruktoz Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL).....	45
Tablo 4-5 : Metformin Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL).....	46
Tablo 4-6 : Metformin Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL).....	46
Tablo 4-7 : Fruktoz+Metformin Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL)	47
Tablo 4-8 : Fruktoz+Metformin Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL)	47
Tablo 4-9: Gruplarda kan glukoz değerleri (mg/dl).....	63
Tablo 4-10 : Gruplara ait serum lipit düzeyleri (mg/dl)	64
Tablo 4-11 : Kobayların vücut ağırlık değişimleri (gr)	65
Tablo 4-12 : Gruplarda serum insulin düzeyleri (mU/ml).....	65
Tablo 4-13: Gruplarda serum Lipid Hidroperoksid düzeyleri (nmol/ml).....	66
Tablo 4-14: Gruplarda serum Protein Karbonil düzeyleri (ng/ml).....	66
Tablo 4-15 : Gruplarda İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Düzeyleri (ng/ml).....	67
Tablo 4-16 : Gruplarda İleri Glikasyon Son Ürünleri Düzeyleri (ng/ml).....	67
Tablo 4-17 : Gruplarda Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç (μ M/L)	68
Tablo 4-18 : Gruplarda Glut5 gen ekspresyonu düzeyleri.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Otik kapsül scanning elektron mikroskop görüntüsü (Salt, 2001).....	5
Şekil 2-2 : Mid-modiolar planda kokleanın genel organizasyonu (Raphael, 2003)	6
Şekil 2-3 : Koklear sıvıların dağılımı ve bileşimi (Salt AN. Cochlear Fluids Lab, Washington University. St. Lois- http://www.oto2.wustl.edu/cochlear fluids composition)	6
Şekil 2-4 : Stria vaskularisin genel görünüşü (Bulut, 2007).....	7
Şekil 2-5 : Stria vaskularisteki üç hücre tabakasının dizilimi (Slepeckly, 1996)	8
Şekil 2-6 : Koklea kesiti (Cruz, 2007)	9
Şekil 2-7 : İç ve dış tüylü hücre stereosilya dizilimi (Raphael, 2003).....	10
Şekil 2-8 : Kokleanın vasküler sistemi (https://entokey.com/blood-vessels/).....	11
Şekil 2-9 : Metabolik Sendrom bileşenleri (https://www.fitekran.com/metabolik-sendrom-rehberi/).....	14
Şekil 2-10 : Fruktozun (soldaki D-fruktoz, sağdaki L-fruktoz) 6 karbonlu yapısı (https://tr.wikipedia.org/wiki/Fruktoz)	17
Şekil 2-11 : Glukoz ve fruktoz metabolizması (Jhonson, 2009).....	18
Şekil 2-12 : Metformin'in kimyasal yapısı (https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Metformin.svg)	23
Şekil 3-1 : A tipi olarak adlandırılan örnek bir timpanogram (http://www.utdallas.edu/~thib/rehabinfo/de.htm)	27
Şekil 3-2 : Kobay üzerinde gerçekleştirilen yüksek frekans DPOAE ölçümü	28
Şekil 3-3 : Örnek bir kobaya ait alçak frekans otoakustik emisyon kaydı	28
Şekil 3-4 : Kobay üzerinde gerçekleştirilen yüksek frekans ABR ölçümü	29
Şekil 3-5 : Örnek bir kobaya ait klik uyaran verilerek yapılan işitsel beyinsapı cevapları kaydı.....	29
Şekil 3-6 : Timpanik kavitenin medial duvarına yerleşik koklea	33
Şekil 3-7 : Modiolar ekseninde bazalden apekse doğru koklea.....	34
Şekil 3-8 : Rutin scanning elektron mikroskopi takibi öncesi hazırlık aşamaları ve SEM'de iç tüylü hücreler ile dış tüylü hücrelerin görünümü.	36
Şekil 4-1 : 0. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları.....	48
Şekil 4-2 : 3. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları.....	49
Şekil 4-3 : 10. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları.....	50
Şekil 4-4 : 28. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları.....	50

Şekil 4-5 : 0. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları.....	51
Şekil 4-6 : 3. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları.....	52
Şekil 4-7 : 10. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları.....	52
Şekil 4-8 : 28. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları.....	53
Şekil 4-9 : Kokleanın kontrol (K), fruktoz (F), metformin (M) ve fruktoz+metformin (FM) verilen gruplardaki Hematoksilen+ Eosin (H+E) boyanmış mikrografları izlenmektedir.	54
Şekil 4-10 : Kokleanın kontrol (K), fruktoz (F), metformin (M) ve fruktoz+metformin (FM) verilen gruplardaki VEGF immunreaktivitesini gösteren mikrograflar gözlenmektedir. VEGF ve hematoksilen artalan boyaması.....	55
Şekil 4-11 : Kontrol grubuna ait bir kobayın Corti organı yüzeyinin SEM görüntüsü ..	56
Şekil 4-12 : SEM değerlendirmesinde kontrol grubu dış tüylü hücre stereosilya morfolojisi.....	57
Şekil 4-13 : Fruktoz grubuna ait Corti organı yüzeyindeki DTH sterosilyalarının yer yer tamamen kaybolduğu, parsiyal kayıplar ve stereosilyalarda yapışıklıklar gözlenmektedir.....	57
Şekil 4-14 : Fruktoz grubuna ait Corti organı yüzeyindeki DTH ikinci ve üçüncü sıralarında total stereosilya kaybı gözlenmektedir.....	58
Şekil 4-15 : Fruktoz grubuna ait Corti organı SEM görüntüsünde DTH sterosilyalarında yapışıklıklar, yer yer parsiyal kayıplar (→) gözlenmektedir.....	58
Şekil 4-16 : Metformin grubuna ait bir kobayın Corti organı yüzeyinin normal dış tüylü hücre stereosilya görüntüsü	59
Şekil 4-17 : Metformin grubuna ait bir kobayda normal dış tüylü hücre stereosilya görüntüsü	60
Şekil 4-18 : Metformin grubuna ait bir kobayda normal dış tüylü hücre stereosilya görüntüsü	60
Şekil 4-19 : Fruktoz+Metformin grubundaki bir kobayın Corti organı yüzeyinde DTH sterosilyalarında yapışıklık ve kısmi kayıplar gözlenmektedir.....	61
Şekil 4-20 : Fruktoz+Metformin grubundaki bir kobayın Corti organı yüzeyinde DTH sterosilyalarında yapışıklıklar gözlenmektedir.	62
Şekil 4-21 : Fruktoz+Metformin grubundaki bir kobayın Corti organı yüzeyinde DTH sterosilyalarında yapışıklıklar gözlenmektedir.	62

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AACE	: Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (American Association of Clinical Endocrinologists)
ABR	: İşitsel Beyinsapı Cevapları (Auditory Brainstem Response)
AGE	: İleri glikasyon ürünleri (Advanced glycation end products)
AMPK	: Adenozin monofosfat protein kinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
ATP III	: Erişkin Tedavi Paneli (Adult Treatment Panel III)
BM	: Baziler Membran
Ca⁺²	: Kalsiyum
Cl⁻	: Klor
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPOAE	: Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (Distortion Product Otoacoustic Emission)
DTH	: Dış tüylü hücreler
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FRAP	: Demir indirgeyici antioksidan güç (Ferrin reducing antioxidant power assay)
GLUT5	: Glukoz taşıyıcı 5 (Glucose transporter 5)
HbA1c	: Glikolize hemoglobin
HDL-K	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol
HEI-OC1	: İşitsel doku kültürü
HOMA-IR	: İnsülin direncinin değerlendirildiği homeostatik model
IDF	: Uluslararası Diyabet Vakfı (International Diabetes Foundation)
I/O	: İnkut/Output
IR	: İnsülin Reseptör
İTH	: İç tüylü hücreler
K⁺	: Potasyum
LDL-K	: Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol

MetS	: Metabolik Sendrom
METSAR	: Türkiye Metabolik Sendrom Araştırması
MOC	: Medial Olivokoklear Sistem
Na⁺	: Sodyum
NO⁻	: Nitrik Oksit
NCEP	:Uluslararası Kolesterol Eğitim Programı (National Cholesterol Education Program)
NHANES	:Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirmesi Araştırması (National Health and Nutrition Examination Survey)
OAE	: Otoakustik Emisyon (Otoacoustic Emission)
PKA	: Protein Kinaz A
PTP	: Mitokondri geçirgen gözeneği
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SEM	: Scanning Elektron mikroskobu
SL	: Spiral Ligaman
SM	: Skala Media
SP	: Spiral Prominens
SV	: Stria Vaskularis
T1DM	: Tip 1 Diyabet (Type 1 Diabetes Mellitus)
T2DM	: Tip 2 Diyabet (Type 2 Diabetes Mellitus)
TEKHARF	: Türkiye’de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı
TG	: Trigliserit
TM	: Tektoriyel membran
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
VEGF	:Vasküler Endoteryal Büyüme Faktörü (Vascular Endoterial Growth Factor)

ÖZET

Gülmez, Z.D. Deneysel Metabolik Sendromda Metformin Uygulamasının Koklear Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Elektrofizyolojik Ve Ultrastruktürel Olarak Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Odyoloji Anabilim Dalı. Odyoloji Dil ve Konuşma Bozuklukları Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2017.

Metabolik sendrom, insülin direnciyle başlar, abdominal obezite, glukoz intoleransı veya diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozukluklar ile karakterize bir hastalıktır. Bu komponentler, dokularda hasar oluşturmakta ve dokuların işlevselliği yitirilmektedir. Çalışmamızda deneysel olarak fruktoza bağlı metabolik sendromun işitme sistemini nasıl etkilediği ve Metforminin etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda işitmesi normal olarak değerlendirilen, 32 adet (64 kulak) pigmente Hartley cinsi genç-erişkin kobaylar rastgele 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Grup 1), metabolik sendrom oluşturulan fruktoz grubu (Grup 2), metformin grubu (Grup 3) ve Fruktoz+Metformin grubu (Grup 4) olarak planlandı. Elektrofizyolojik ölçümler 4 hafta boyunca 0.gün, 3.gün, 10.gün ve 28.gün yapıldı. Kan glukoz, lipit ve insülin düzeyleri, vücut ağırlıkları 0.gün, 2.gün, 3.gün, 10.gün ve 28.gün bakıldı. Kobaylar 4. haftada ölçümler tamamlandıktan sonra dekapite edilerek, alınan kan ve doku örneklerinde biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

Kontrol ve metformin gruplarımızda elektrofizyolojik ölçümlerde, morfolojik bulgular ve biyokimyasal analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p<0,05$). Fruktoz grubumuzda; ağırlık değişimlerinde, kan glukoz, lipit ve insülin düzeylerinde metabolik sendrom belirtilerini destekleyecek şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlendi ($p<0,05$). Fruktoz grubunda, elde edilen DPOAE ve ABR cevapları diğer grupların cevapları ile karşılaştırıldığında, 3. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Histolojik bulgular bu sonuçları destekler nitelikte gözlenmiş, dış tüylü hücre ve stria vaskularistaki dejenerasyona bağlı özellikle yüksek frekanslarda başlayan ve orta frekanslara doğru devam eden işitme kaybı elde edilmiştir ($p<0,05$). Fruktoz+metformin grubumuzda 0. gün ile 10. günde metabolik değişimlere bağlı olarak elektrofizyolojik cevaplardaki bozulmanın 10. gün ile 28. gün arasında düzeldiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak fruktozdan zengin diyetle bağlı olarak oluşan metabolik değişikliklerin prooksidan denge yönünde bozulduğu ve bu değişikliklerin metformin ile koklear fonksiyonlar üzerinde hem elektrofizyolojik hem de ultrastruktürel olarak koruyucu yönde bir denge oluşturduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metabolik sendrom; Metformin; İşitsel Beyinsapı Cevapları; Otoakustik Emisyon; Fruktoz; Koklea.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) (Proje No: 22687) ve İstanbul Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) (Proje no: 283.2016-YL-35/27-42) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gulmez, Z.D. (2017) Evaluation of the effect of metformin on cochlear functions electrophysiologically and ultrastructurally in experimental metabolic syndrome. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Audiology, Language and Speech Disorders Department. Master of Thesis. Istanbul. 2017.

Metabolic syndrome is characterized by systemic disorders such as insulin resistance, abdominal obesity, glucose intolerance or diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension and coronary artery disease. These components damage the tissues and the function of the tissues is lost. In our study, the effect of fructose-linked metabolic syndrome on hearing system and the effect of metformin were investigated experimentally.

In our study, thirty-two (64 ears) pigmented Hartley young-adult guinea pigs with normal hearing were randomly divided into 4 groups. Group 1 was control group, group 2 was metabolic syndrome named fructose group, group 3 was metformin group and group 4 was fructose + metformin group. Electrophysiological measurements were made in 0. day, 3rd, 10th and 28th days for 4 weeks. Blood glucose, lipid and insulin levels, body weights were done in 0. day 2nd, 3rd, 10th and 28th days. Biochemical and histopathologic evaluations were performed on blood and tissue specimens taken after decapitation of the guinea pigs at the 4th week.

There was no statistically significant difference between control and metformin groups in electrophysiological measurements, morphological findings and biochemical analyzes ($p < 0,05$). A statistically significant was observed in fructose group in terms of body weight changes, blood glucose, lipid and insulin levels. Electrophysiological measurements were consistent with histological findings in the DPOAE and ABR responses in the fructose group. Hearing loss, especially starting at high frequencies and continuing towards the middle frequencies, due to degeneration of the outer hair cell and stria vascularis was obtained ($p < 0,05$). In the fructose + metformin group, the increase in degenerative changes in the cochlea due to metabolic changes between day 0 and day 28 was less observed than between day 10 and day 28.

As a result, metabolic changes due to fructose-rich diets are impaired in the direction of prooxidant balance. We think that these changes form a balance in cochlear functions both electrophysiologically and ultrastructurally with Metformin.

Key Words: Metabolic Syndrome; Metformin; Auditory Brainstem Response; otoacoustic emission, fructose, cochlea.

The present work was supported by Scientific Research Projects Unit(BAP) of Istanbul University. Project No. 22687 and Istanbul University Faculty Member Training Program (ÖYP) (Project No: 283.2016-YL-35/27-42)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Metabolik sendrom (MetS) günümüzde hareketsiz yaşam, beslenme alışkanlığının değişmesi, çevresel ve kalıtsal etkilerin neden olduğu hastalıklar kümesi olarak adlandırılır (Işıldak, 2004). Metabolik sendrom; insülin direnci sendromu ve sendrom X olarak da bilinen, insanlarda abdominal obezite, aterosklerotik dislipidemi, esansiyel hipertansiyon, insülin direnci, glukoz tolerans bozukluğu, protrombotik ve proinflamatuar durum ile karakterize bir endokrinopatidir (Grundy, 2005). MetS bireyin genetik faktörlerine ve çevresel etmenlere bağlı olarak ortaya çıkan kardiyovasküler hastalık risk artışı ile ilişkili bir grup metabolik bozukluk topluluğudur (Lakka, 2002). Metabolik sendromun altında yatan esas etkenin, insülin direnci olduğu tespit edilmiştir ve insülin direnci; insülin duyarlılığındaki azalma şeklinde tanımlanmaktadır (Henry, 2003). Beslenme ve fiziksel aktivite gibi çevresel faktörlerdeki değişim, özellikle yüksek oranda fruktoz içeren içeceklerin tüketimindeki artış, bu metabolik bozukluktan büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır. Deneysel olarak fruktozca zengin beslenme, insülin direnci, hiperlipidemi, karaciğer yağlanması ve endotel fonksiyon bozukluğu ile seyreden metabolik sendroma benzer bir durum oluşturur.

Diabetes mellitus'ta (DM) işitme kaybı üzerine ilk veriler 1961'de Jorgensen ve Buch tarafından sunulmuştur. DM'li hasta grubunda yapılan bir çalışmada orta frekanslardan yüksek frekanslara doğru giderek artan tarzda sensorinöral işitme kaybı profili vurgulanmaktadır (Carmen, 1994). İşitme kaybı ve diyabet arasındaki nedensel ilişki birçok araştırmacının konusunu oluşturmuş, hatta diyabetiklerde işitme kaybının görülme sıklığı %93'ün üzerinde bildirilmiştir. DM'de, normalden daha erken ve daha fazla sensorinöral işitme kaybına rastlandığı bildirilmiştir. İşitme kaybı, progresif özellik gösteren ve özellikle yüksek frekansları etkileyen bilateral sensorinöral işitme kaybı olarak sınıflandırılmıştır (Dalton, 1998). Diabetes Mellitus'ta hangi mekanizmalarla bu komplikasyonların oluştuğu hakkında tam bir görüş birliği yoktur. Bu konuda birçok araştırmacı değişik fikirler öne sürmüştür. Oluşum mekanizması olarak literatürde belirtilenler; diyabetik anjiyopati sonucu koklear hipoksi, koklear sinirde primer nöropati, vasküler yada metabolik olaylara bağlı sekonder nöropati, ve kokleanın dolaşımındaki glukoz seviyesindeki değişikliklerdir (Carmen, 1994). Araştırmacıları büyük çoğunluğu primer lezyon olarak anjiyopati üzerinde durmuştur.

Bunu destekleyen belli başlı iki neden vardır. İlk olarak histopatolojik çalışmalar, iç kulakta mikrovasküler lezyonlar ve hasarlanma yönünde bulgular vermektedir (Carmen, 1994; Dalton, 1998; Baslo, 1981). İkinci neden ise diyabete bağlı geniş damarsal değişiklikler gözlenmesidir (Çetik, 1991, Malpas, 1989). Diyabetik hayvanlarda yapılan çalışmalarda stria vaskularis kapillerlerinin bazal membranında kalınlaşma olduğu gösterilmiştir. Bu vasküler lezyonların işitme sisteminde nöral dejenerasyon için önemli bir neden olduğu savunulmuştur (Dalton, 1998; Baslo, 1981). Vasküler lezyonların işitmeyi bozmasının şu yolla olduğu düşünülmektedir. Direk olarak koklear kan akımında azalmayla birlikte, kapiller duvarlarda kalınlaşma nedeniyle transport azalarak, koklear sinirde dejenerasyon sonucunda işitmenin etkileneceği savunulmaktadır (Malpas, 1989). Yapılan bir çok çalışmada ise bazı diyabetik komplikasyonların sadece diyabet ile ilgili oksidatif stres ile ilişkilendirilmiş olduğunu göstermiştir (Aladağ, 2009). Yükselmiş ROS (Reaktif oksijen türleri) ve sonrasında oluşan apoptoz bazı işitme kaybı patolojileri ve pek çok hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Op de Beeck, 2011). Dahası, mitokondrial disfonksiyon bazı işitme kaybı tiplerinde önemli bir rol oynar (Yamasoba, 2007). Hücrel enerji metabolizmasındaki belirgin fonksiyonunun yanısıra, son on yılda mitokondrinin ana görevi olarak hücrel ölümün kontrolü üzerine yoğunlaşmıştır. Mitokondrinin geçirgen gözeneği (PTP) sitozol içine sitokrom c'nin salınımı yoluyla apoptozun intrensik yoluna dahil olur (Chang, 2011). Bizim buradaki hipotetik yaklaşımımız, MetS' de oluşan veya ilerlemekte olan işitme kaybının mekanizması kokleanın yapısındaki işitsel reseptörler olan tüylü hücrelerden kaynaklanan patofizyolojik süreç olacaktır. İşitsel reseptörlerden özellikle dış tüylü hücreler kokleada aktif biyomekaniksel süreçte hem akustik sinyalin amplifikasyonunda hem de bu sinyalin işlenmesinde primer yapı olarak hareket eder. Dış tüylü hücreler lateral membranında ki motor protein "Prestin" ile kokleada ki bu aktif süreci yerine getirir. Prestin bir motor proteindir. Ekstrinsik bir voltaj sensörü olarak hareket eder. Ekstrasellüler ve intrasellüler ortamda Cl⁻ iyonlarını taşıyarak, hücrenin depolarizasyon ve repolarizasyon fazlarında mikrosaniyelerde hücre uzunluğunu değiştirirler (Dallos, 2002). Böylece gelen akustik bilgiyi kullanıp, işlemiş olurlar. Bu gelen bilginin dış tüylü hücreler tarafından kullanılması için, tüylü hücredeki homeostatik mekanizmaların özellikle hücre içi enerji transferinin iyi yönlendirilmesi gerekir. AMPK hücrenin enerji durumuna ve sitosolük AMP/ATP konsantrasyonuna duyarlıdır. Hücrel düzeyde ATP

oranını arttırmak için glukoz alımını, glikolizisi, yağ asitlerin oksidasyonunu ve ATP üretimi için gerekli enzimatik aktiviteyi arttırmaları (Föller, 2012). Son yapılan çalışmalarda AMPK' nın kokleada ototoksistide (Chang, 2013) özellikle akustik travmada (Föller, 2012) işitmenin tekrar sağlanması ve tüylü hücrelerin korunması yolunda önemli bir protein olduğunu göstermişlerdir. Fareler üzerinde yaptıkları bu çalışmada AMPK gen ifadesi olan ve olmayan iki grup oluşturulmuş, akustik travma öncesi ve sonrası işitsel uyarılmış beyinsapı cevaplarını değerlendirmişlerdir. AMPK' dan yoksun farelerde akustik travmadan iki hafta sonra kalıcı işitme kaybı gelişmiştir (Chang, 2013).

AMPK ifadesi olan farelerde ise aşırı akustik travmada AMPK kalsiyum (Ca^{+2}) ile aktive olan potasyum (K^{+}) kanalları ile K^{+} çıkışını artırarak hücreyi hiperpolarizasyon fazına getirmiş bu durumda dış tüylü hücrelerde hücrenin aşırı bir şekilde uyarılabilirliğini azaltmış ve dejenerasyonu önlemiştir.

Çalışmamızda kullandığımız antidiyabetik ilaç olan metformin; yaşam için gerekli bir molekül olan AMPK'yı etkinleştirerek, moleküler düzeyde çalışır. AMPK veya bunun moleküler analogları hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunmaktadır. Çeşitli metabolik bozukluklarla gelen diyabet ve obezite, hücresel büyüme bozuklukları ve kanser gelişimine katkıda bulunur. Metformin, AMPK aktivitesini etkinleştirirken, güçlü, sağlıklı bir şekilde metabolik faktörlerin ve bu hücre büyümelerini düzenlemektedir (Adler, 2009; Nathan, 2009).

Metformin, insülin salınımını uyarmadığı için, sülfonilürelerden farklı olarak, ne tip 2 diyabetli hastalarda ne de normal kişilerde hipoglisemi oluşturmaz ve hiperinsülinemiye sebep olmaz. Metformin tedavisi ile açlık insülin seviyeleri ve gün boyu plazma insülin cevabı artarken, insülin sekresyonu uyarılmaz (Nathan, 2009). T2DM tedavisinde sıkça kullanılan bir ilaç olan Metformin, son zamanlarda mitokondriyal geçirgenlik ve sitokrom c salınımı yoluyla apoptoz üzerindeki etkisi konusunda yeni bulgular nedeniyle ilgi görmüştür. Metformin verilerek yapılan bir ön çalışmada HEI-OC1 hücreleri daha az ROS üretmiş ve bu da metforminin kalsiyum modülasyonu yoluyla gentamisine bağlı apoptozu ve anti-apoptik etkileri azaltılmış ROS'u önlediğini göstermiştir (Chang, 2011). Kokleada özellikle dış tüylü hücrelerde basolateral membranda bir şeker taşıyıcısı GLUT5 içermektedir. GLUT5 glukozdan çok fruktoz transportuna daha duyarlıdır (Ashmore, 2008). Bu da dış tüylü hücrelerde hem

hücrel homeostasis, hem de gelen akustik bilginin işlenmesi ve membrandaki motor proteinlerin işlevlerini yerine getirmesi için gerekli bir proteindir.

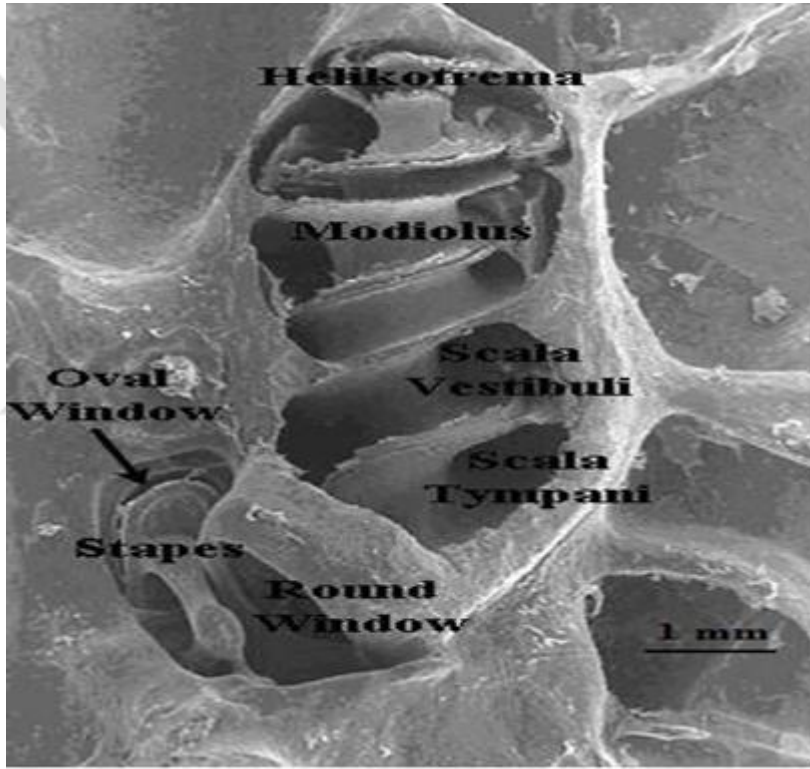
Çalışmamızda fruktoz ile uyarılan metabolik sendrom modelinde metformin uygulamasının koklear fonksiyonlar üzerindeki etkisi değerlendirilerek olası işitme kaybının nasıl oluştuğu yönüne ışık tutacaktır. Metformin uygulaması ile metabolik sendromdaki bu patofizyolojik sürecin nasıl etkilendiği ve mekanizmasının araştırılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

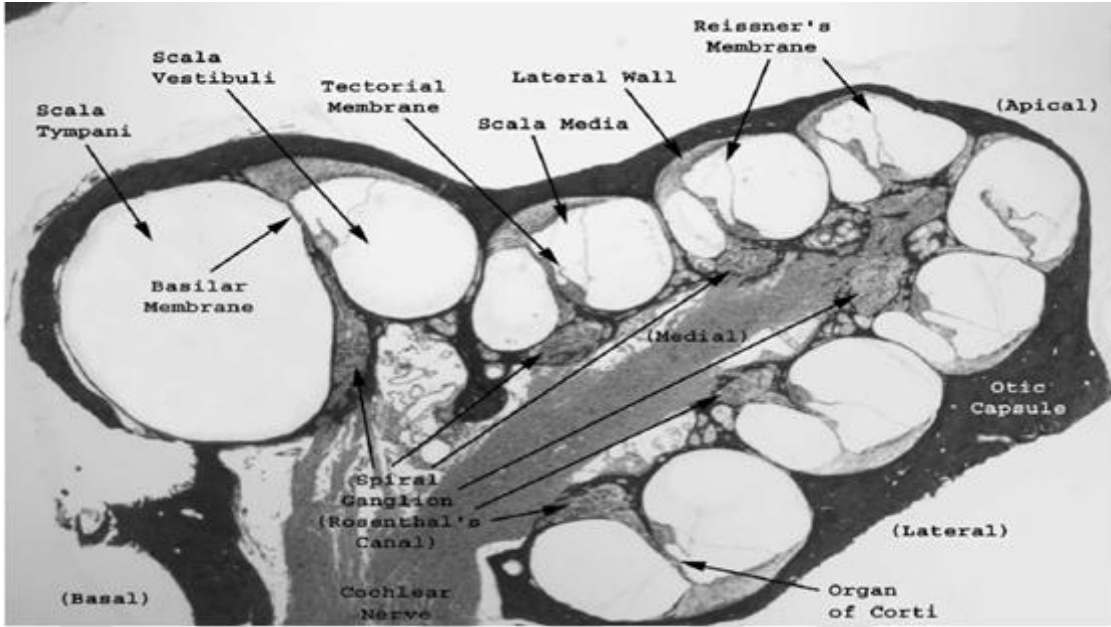
2.1. KOKLEA

Koklea, Yunanca “cochlos” sözcüğünün karşılığı olup salyangoz anlamına gelmektedir (Kandel, 1992). Kokleanin dış kısmı otik kapsül denilen sert kemik yapısı ile çevrilidir (Raphael, 2003). İnsanlarda ortalama 35 mm'dir. Modiolus adı verilen yapı etrafında yaklaşık 2,5 tur dönüş yapmaktadır. Oval pencere ve yuvarlak pencere otik kapsülün orta kulağa açılan kısımlarıdır (Şekil 2-1) Modiolus kan damarlar, bağ dokular, sinirler gibi yapıları barındıran eksendir (Santi, 2001; 2007).



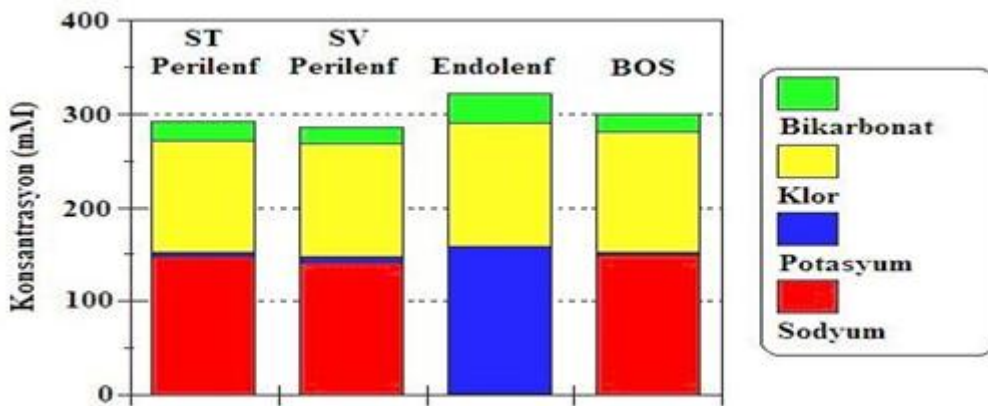
Şekil 2-1 : Otik kapsül scanning elektron mikroskop görüntüsü (Salt, 2001)

Koklea üç kanaldan meydana gelmektedir. Bu kanallar; skala vestibüli, skala media ve skala timpanidir (Şekil 2-2).



Şekil 2-2 : Mid-modiolar planda kokleanın genel organizasyonu (Raphael, 2003)

Skala vestibüli kısmı oval pencereden kokleanın apeksine doğru devam eder ve helikotrema adı verilen küçük bir açıklık yoluyla skala timpaniye bağlanır. Skala timpani de bazale doğru devam eder, oval pencerede sonlanır. Bu yapılarda perilenf sıvısı bulunmaktadır. Perilenfin yapısı ekstrasellüler sıvıya oldukça benzerdir. Perilenfte yüksek oranda sodyum (Na^+) ve düşük oranda potasyum (K^+) iyonları bulunmaktadır. Skala media bu yapılardan farklı olarak endolenf sıvısı içermektedir. Endolenf intrasellüler sıvıya benzer olarak düşük oranda Na^+ ve yüksek oranda K^+ içermektedir. (Şekil 2-3).



Şekil 2-3 : Koklear sıvıların dağılımı ve bileşimi (Salt AN. Cochlear Fluids Lab, Washington University. St. Lois-http://www.oto2.wustl.edu/cochlear_fluids_composition)

Kokleada skala mediada yer alan önemli yapılar; Lateral Duvar, Reissner Membranı, Baziler Membran (BM) ve Kemik Spiral Lamina'dır (Santi, 2007).

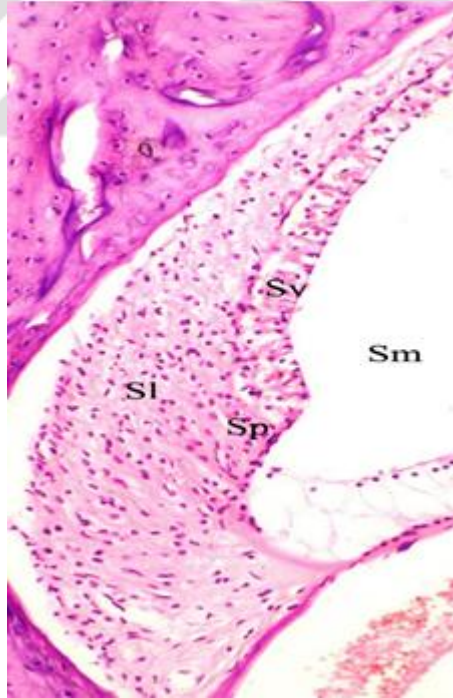
2.1.1. Lateral Duvar

2.1.1.1. Spiral Ligaman

Lateral duvarda en büyük hacme sahip yapıdır. Spiral Ligaman; stria vaskularis ile otik kapsül arasında bulunur. Dokular ve iyon transportu için gerekli enzimler açısından zengindir. Özellikle tip2 fibroblastlar $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ iyon transportu için önemli enzimleri içerir(Dallos, 1978).

2.1.1.2. Stria Vaskularis

Reissner membranı ile spiral prominens arasında yer alır. Vasküler bir yapıdır. Bu yapıdaki hücreler $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ açısından zengindir. Üç tip hücre tabakasından meydana gelmiştir. Bu hücreler; marjinal, intermediate ve bazal hücrelerdir (Donaldson, 1991; Harrison, 2001; Dallos, 1996; Wangemann,1996; Slepeckly, 1996).

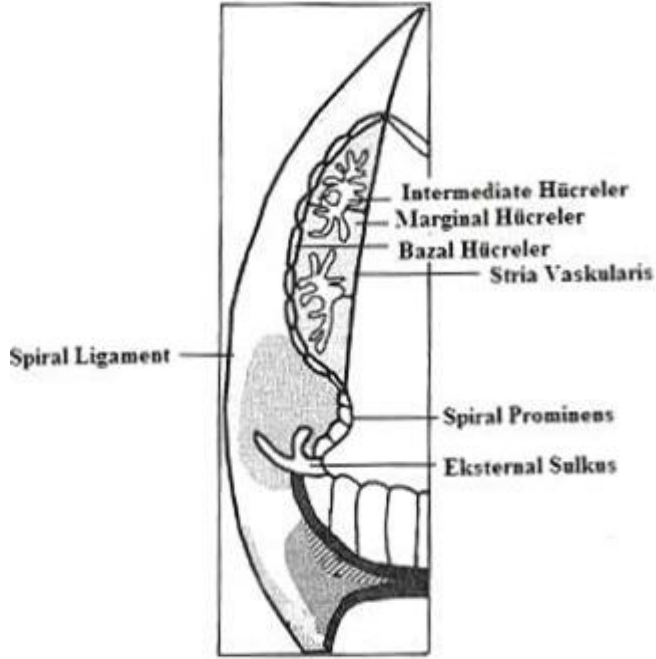


Şekil 2-4 : Stria vaskularisin genel görünüşü (Bulut, 2007)

Sv: Stria vaskularis; Sm: Skala Media;

Sp: Spiral prominens;

Sl: Spiral ligaman



Şekil 2-5 : Stria vaskularisteki üç hücre tabakasının dizilimi (Slepeckly, 1996)

Marjinal hücreler: Endolenfin iyon konsantrasyonunun stabilitesini sağlar. Bazolateral yüzeyi $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ ile $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ kotransporter'den zengin çok sayıda mitokondri içeren yapılardan meydana gelmiştir (Wright, 1997; Dallos, 1996; Wangemann, 1996; Slepeckly, 1996).

Intermediate ve bazal hücreler: Melanin içeren melanositler olarak adlandırılır. (Kros, 1996; Raphael, 2003). Bazal hücreler Na^+ , $\text{K}^+\text{-ATPaz}$ ' bakımından yoksundur (Santi, 2007).

2.1.1.3. Spiral Prominens

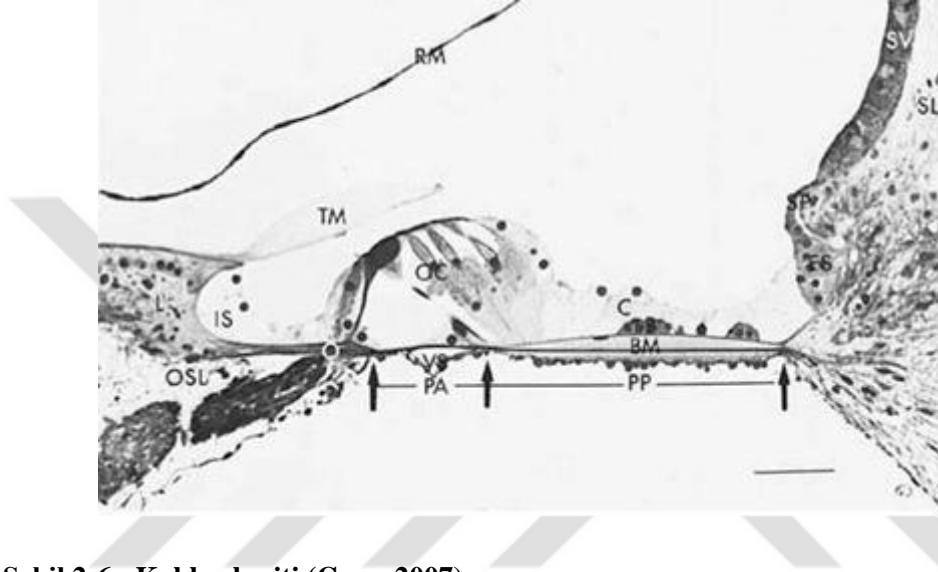
Stria vaskularis ile baziler membran arasında tip II fibroblastların yoğun olduğu yapıdır. İyon transportunda görevlidir.

2.1.2. Reissner membranı

Skala media ile skala vestibüli arasındaki üç zar yapılı kısımdır. Endolenf perilenf arasında iyon geçişleri sağlar.

2.1.3. Baziler Membran

Skala media ile skala timpani arasında bulunan yapıdır. İç kulağa iletilen ses baziler membran üzerinde bulunan Corti organı tarafından frekansa spesifik olarak algılanır (Kandel, 1992). Kokleanın tonotopik yapısını sağlar (Santi, 2007).



Şekil 2-6 : Koklea kesiti (Cruz, 2007)

Baziler Membran (BM) Cladius Hücreleri (C) Stria Vaskularis (SV)
 Pars Arcuata (PA) Tektoriyel Membran (TM) Spiral Ligament (SL)
 Pars Pectinata (PP) Reissner Membranı (RM)

Cladius Hücreleri: Skala mediadaki endolenf ile skala timpanideki perilenf arasında sınır hücreleri olarak gösterilmektedir.

2.1.3.1. Corti Organı

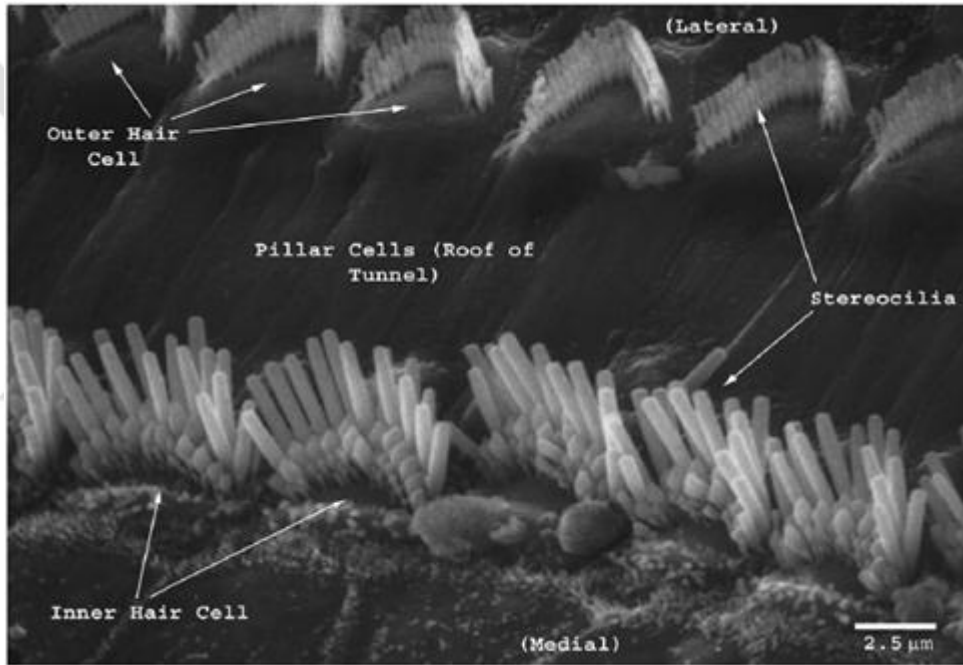
Corti organı skala mediada yer almaktadır. İç kulağa iletilen sesleri reseptör mekanizma gibi algılar.

Corti organında tek sıra şeklinde sıralanan yaklaşık 3500 iç tüylü hücre ve 3-4 sıra halinde sıralanan yaklaşık 12000 adet dış tüylü hücre vardır.

İç tüylü hücreler (İTH); Tek sıra halinde olan yapıdır. Stereosilya dizilimi “U” şeklindedir. Uzunlukları 2-8 µm arasındadır. Bir iç tüylü hücrede ortalama 20-30

arasında değişen stereosilya vardır. (Raphael, 2003; Slepeckly, 1996). Skala mediada bulunan endolenfteki potasyum iyonları stereosilyum içine doğru geçmesi sonucu tüy hücresi depolarize olmaktadır. Ters tarafa doğru eğilmesi tüy hücrelerini hiperpolarizasyona uğratar ve reseptör potansiyel oluşur. Tüy hücrelerinin sinaps yaptığı koklear sinirler uyarılır.

Dış tüylü hücreler (DTH); Koklear kanal boyunca 3–4 sıra dizilim göstermektedirler. Stereosilya dizilimi “W” şeklindedir (Raphael, 2003). Frekansın daha iyi algılanmasında görevi vardır.



Şekil 2-7 : İç ve dış tüylü hücre stereosilya dizilimi (Raphael, 2003)

Dış tüylü hücre lateral duvarına lokalize olmuş protein veya motor proteinler tüylü hücre uzunluğunu değiştirirler. Bu değişim prestin adı verilen motor proteinin işlevine bağlıdır. Dış tüylü hücre motilitesinde, membran potansiyeli değişikliklerinde hücrenin aksiyal sertlik değişiklikleri de eşlik eder (Sacchi, 2001).

2.1.3.2. Tektorial membran

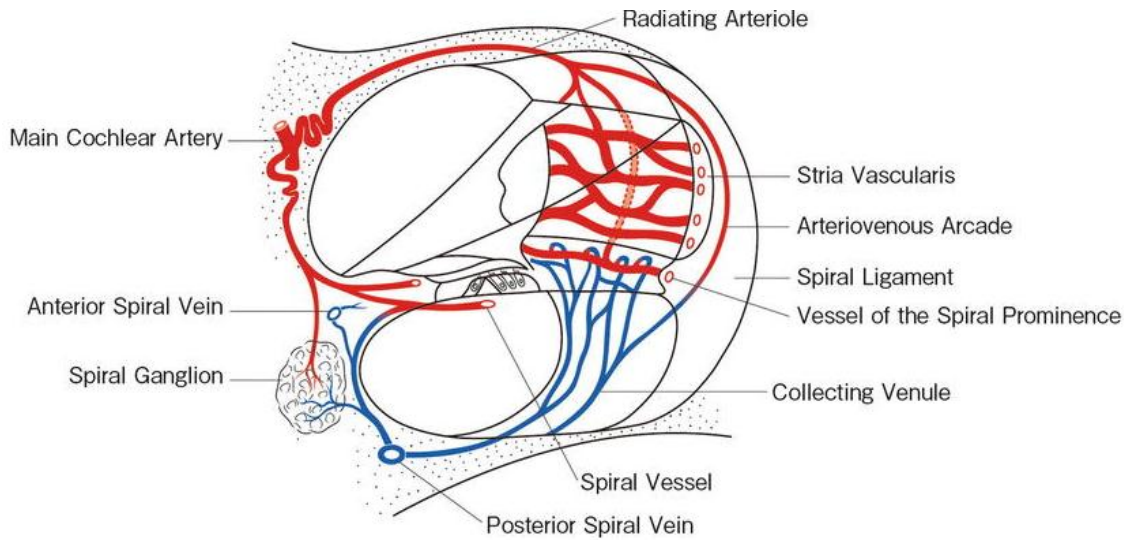
Koklea boyunca bazaldan apekse doğru Corti organı'nın üzerini örten hücresel olmayan bir bağ doku kitesidir. Dış tüylü hücrelerin en uzun sterosilya sırası bu membran yüzeyine temas etmektedir.

2.1.4. Kemik Spiral Lamina

Modiolustan başlayarak baziler membranın medialine yapışır. Kemik bir çıkıntıdır. Corti organına giren ve çıkan sinirlerin geçtiği bir kanaldır. Habenula perforata denilen kısmında ise sinir lifleri miyelin kılıflarını kaybederek Corti organına geçiş yaparlar. (Santi, 2007).

2.2. Kokleanın vasküler yapısı

Labirentin arter, VIII. Kraniyel sinir ile internal akustik kanala girer. Labirentin arter sonra ana koklear arter ve anterior vestibüler arter şeklinde iki dala ayrılır. Ana koklear arter de apekse giden spiral modiolar arter ve bazal kısma doğru giden vestibülokoklear arter olarak iki dala ayrılır. Spiral modiolar arter, iki dala ayrılır. Apekse doğru giden ilk dal skala vestibüli üzerine uzanır. Stria vaskularis, spiral prominens gibi hücrelere doğru kılcal damarlara ayrılır. Bazal kısma doğru giden ikinci dal ise spiral gangliyonu ve spiral limbunu besler. Lateral duvardaki hücreler, spiral lumbus ve spiral gangliyondan spiral modiolar vene doğru kan dolaşımı sağlanır (Axelsson, 1988).



Şekil 2-8 : Kokleanın vasküler sistemi (<https://entokey.com/blood-vessels/>)

2.3. İşitmenin Elektrofizyolojik Değerlendirilmesi

2.3.1. Otoakustik Emisyonlar (OAE)

Otoakustik emisyonlar (OAE)'ı 1978'de David Kemp'in keşfinden sonra ortaya çıkmıştır. Gelen ses uyarını iç kulağa doğru iletilirken dış tüylü hücreler ile mekanik bir enerji oluşur. Oluşan enerji oval pencereden sesin uyarınının geldiği yöne doğru iletilir. Timpanik membranın hareketine bağlı olarak otoakustik emisyon oluşur. OAE'ler periferik işitmeyi değerlendirmede kullanılan hızlı bir test yöntemidir. Özellikle dış tüylü hücre fonksiyonunun fonksiyonu hakkında bilgi vermektedir. (Kemp, 2002; Hall, 1994).

Subjektif testlere kooper olamayan genç, yaşlı, bebeklerde sıklıkla kullanılır. Ayrıca ilaç ototoksitesine maruz kalan bireylerde de yaygın bir şekilde kullanılır. Uygulanmaları kolay ve hızlıdır. (Kemp, 2002; Hall, 1994; Plinkert, 1994).

OAE'lerin sınıflandırılması uyarın ve uyarandan bağımsız olmak üzere 2 çeşittir. Uyarın varlığında elde edilen cevaplar işitmesi normal olan bireylerde elde edilebilir (Kemp, 1978). Dış tüylü hücrelerin hasarında OAE'ler elde edilemez. (Johnson, 2002). OAE testi dış kulak ve orta kulaktaki uyarının kokleaya ulaşmasını engelleyen yapıların (buşon, otitis media, vb.) varlığında elde edilemeyebilir. Bu gibi faktörlerin ekarte edilir test yapılması önerilmektedir (Plinkert, 1994; Bright, 2002).

OAE'lerin sınıflandırılmasında;

Spontan otoakustik emisyonlar(SOAE): Ortamda hiçbir uyarın yok iken kokleadan gelen seslerin mikrofon aracılığı ile kaydedilmesidir. (Kemp, 2002; Hall, 1994; Lonsbury-Martin, 1994).

Uyarılmış otoakustik emisyonlar(EOAE): Uyarın verilerek iç kulak uyarılır. İç kulakta meydana gelen mekanoelektriksel titreşimlerin meydana getirdiği sesler yine aynı şekilde mikrofon ile kaydedilir. (Plinkert, 1994) Üç farklı çeşidi vardır.

1- *Stimulus frekansı otoakustik emisyonlar(SFOAE):* İç kulağa verilen saf ses uyarını ile oluşan cevaplardır. (Kemp, 2002; Lonsbury-Martin, 1994).

2- *Distortion product otoakustik emisyonlar(DPOAE):* İki farklı sesin eş zamanlı olarak verilmesi ile kokleada meydana gelen seslerin kaydedilmesi prensibine dayanır. (Martin, 2002). DPOAE cevapları yaklaşık 50–60 dB üzerindeki işitme kayıplarında oluşmaz. (Hall, 1994; Martin, 2002; Salata, 1998).

3- *Transient evoked otoakustik emisyonlar(TEOAE)*: Kısa süreli uyarılar verilerek ölçülen cevaplardır. Klik uyarı veya tone bip uyarılarını kullanılır. Uyarı şiddeti genellikle 80 dB SPL'dir.

2.3.2. İşitsel Beyinsapı Cevapları (ABR)

İşitsel beyinsapı cevapları (ABR), işitme siniri ve sinir liflerinin senkronize olup olmadığını belirlemeye yarayan bir testtir. Bu yerlerde var olan bir patoloji durumunda ABR testinde tam veya kısmi olarak cevap elde edilemeyebilir.

ABR testinde hem tüm kokleayı uyarı, geniş bant olan klik kullanılmakta hem de frekansa özgü tone burst uyarı kullanılmaktadır (Özdamar, 1996; Muş, 1991).

ABR dalgası Jewett dalga serilerinden oluşur. Bunlar;

I.dalga; koklear sinirin distalinden,

II.dalga; koklear sinirin proksimalinden,

III.dalga; koklear nükleusdan(ventral),

IV.dalga; superior olivary kompleksden(alt pons),

V.dalga; pozitif kısmı lateral lemniskusdan, negatif kısmı inferior kollikulustan, kaynaklanmaktadır. (Özdamar, 1996; Sphelman, 1985; Muş, 1991).

2.4. Metabolik Sendrom (MetS)

2.4.1. MetS Etiyolojisi ve Prevelansı

Çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biri olan Metabolik Sendrom (MetS), insülin direnci sendromu veya Sendrom X, yükselmiş kan basıncı, ateroskleroz, dislipidemi, glukoz intoleransı, abdominal obezite'yi içeren, bunların sonucunda kardiyovasküler hastalık, koroner kalp hastalığı, diyabet ve nihai sonuç olarak ölüm riskini arttıran hastalıklar kümesi olarak adlandırılmaktadır (Alberti, 2009). Metabolik Sendrom'u ilk olarak 1988 yılında Raven tanımlamıştır. En son tanılama kriterleri dünya çapından ATP III kriterleri genel olarak kabul görmekte ve kullanılmaktadır.



Şekil 2-9 : Metabolik Sendrom bileşenleri (<https://www.fitekran.com/metabolik-sendrom-rehberi/>)

Metabolik Sendrom prevalansı Ulusal Sağlık ve Beslenme Çalışması anketine göre (NHANES) Amerika Birleşik Devletleri(ABD)'de %23,7 olarak bulunmuştur. Avrupada yapılan çeşitli anket çalışmaları sonucunda nüfusun yaklaşık %25'i Metabolik Sendrom'a sahip olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde son yıllarda yapılan Metabolik Sendrom anketi çalışmasında(METSAR) NCEP ATP III kriterlerine göre kadınlarda %28, erkeklerde %39 olarak, IDF kriterlerine göre de kadınlarda %51,1, erkeklerde %33,9 olarak belirlenmiştir. TEKHARF (Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı) çalışmasında prevalans 30 yaş ve üstü erkeklerde %28, kadınlarda %45 olarak belirlenmiştir.

2.4.2. Metabolik Sendrom Tanısı

2.4.2.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

İlk olarak Metabolik sendromun kriterlerini 1998 yılında belirleyen ve tanımını yapan organizasyon (WHO, World Health Organization)'dur. İnsülin direnci Metabolik sendromda rol oynayan en önemli faktör olduğu belirtilmiştir. Diyabet hastalığı olan ve olmayan hastalar da tanının içinde yer almaktadır. WHO oral glukoz tolerans testi ile metabolik sendrom belirleneceği belirtilmiştir.

2.4.2.2. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı(NCEP) ve Erişkin Tedavi Paneli(ATP III)

2001 yılında Metabolik Sendromun tanısı için kabul ettikleri kriterler önermişlerdir. ATP III'te WHO'ya göre kardiyovasküler hastalıklar için kanda yüksek oranda kolesterolü tespit etmek amacıyla HDL-K, hipertansiyon, hipertrigliseridemi, kan serum glukoz miktarı ve abdominal obezite kriterlerini öne çıkarmışlardır. ATP III'e göre metabolik sendrom kriteri için insülin direncini tespit etmeksizin yüksek açlık glukozu yeterlidir.

2.4.2.3. Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (AACE)

2003 yılında ATP III ve WHO Metabolik sendrom tanı kriterlerini birleştirerek değerlendirme yapılmasını önermişlerdir. İnsulin direnci metabolik sendrom tanısı için en önemli kriterdir. İnsülin direncine ek olarak, trigliserit düzeyinin yüksek oluşu, HDL-K'nın düşük olması, hipertansiyon, bozulmuş açlık glukoz ve bozulmuş glukoz toleransı gibi faktörlerden de en az ikisinin olması durumu metabolik sendrom için belirleyicidir.

2.4.2.4. Uluslararası Diyabet Vakfı (IDF, International Diabetes Foundation)

Metabolik Sendrom tanısı için abdominal obezite kesinlikle varlığı tespit edilmeli, açlık glukoz seviyesinin yüksek olması, HDL-K'nın düşük olması, yüksek kan basıncı ve yüksek trigliserit düzeyi gibi faktörlerden en az ikisinin varlığı tanıyı belirlemektedir.

2.4.2.5. Türkiye Endokrinoloji Metabolizma Derneği Metabolik Sendrom Çalışma Grubu

2005'da önerilen Metabolik Sendrom tanı kriterlerine göre ATP III ve IDF kriterlerini baz alarak insulin direncinin de yer alması gerektiğini savunmaktadır. Buna göre son kriter; DM, glukoz intoleransı veya insülin direnci seçeneklerinden biri ile hipertansiyon, abdominal obezite veya dislipidemi seçeneklerinden de en az ikisinin varlığı durumunda tanı konulmaktadır.

2.4.3. Metabolik Sendromun Fizyopatolojisi

2.4.3.1. İnsülin direnci

1936'da Himsworth ilk kez insulin direncine vurgu yapmış ve 1988'de Raven diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite ve ateroskleroz durumlarının aynı hastada görülmesinden yola çıkarak aynı metabolik olayların bu hastalarda rol oynadığını belirtmiştir. EGIR(Avrupa İnsülin Direnci Çalışma Grubu) kriterlerine göre; insülin direnci Tablo 2-9' daki kriterlere göre dir.

Tablo 2-1 : EGIR kriterlerine göre insülin direnci tanımlanma kriterleri

Hiperinsülinemi (diyabetik olmayan nüfusun en üst ¼'ü)

Aşağıdaki faktörlerin iki veya daha fazlasının olması durumu

-
- Açlık plazma glukoz seviyesi > 110 mg/dl
 - Kan basıncı > 140/90 mmHg
 - Trigliserit (TG) > 200 mg/dl
 - HDL < 50 mg/dl
 - Bel çevresi > 94 cm (erkek)
 - Bel çevresi > 80 cm (kadın)
-

İnsülin enerji metabolizmasında karaciğerde glikoneogenez ve glikojenolizi inhibe eder. Glukozun hücre içine alınımında, enerji üretiminde ve glikojen olarak depolanmasında görevlidir. İnsülin direnci ise insülinin glukozu hücre içine gönderme yetisinin azalması veya olmaması durumudur. Bu mekanizma bozulduğu zaman karaciğerde glukoz üretimi artması ile kas, yağ hücreleri gibi hücrelerde hücre membranında bulunan glukoz taşıyıcıların sayısı direnç oluştuğunda arttırma özelliğini yitirdiği için hücre içine glukoz alınamaz ve kanda glukoz oranı zamanla artarak hiperglisemi meydana gelir. Bu durumda insülin üretim mekanizması uyarılarak kana insülin salınımı gerçekleşir. İnsülin işlevini yerine getiremez ve kanda yüksek oranda hiperglisemi ışığında hiperinsülinemi ortaya çıkar. İnsülin aynı zamanda yağ dokusunda lipaz enziminin aktivitesini inhibe eder ve bu mekanizmada oluşan aksaklık dolaşımdaki yağ asitlerinin miktarının artmasına neden olur. Dolaşımdaki plazma serbest yağ asitlerinin oranının artması karaciğerde trigliseritlerin birikmesini uyarır.

İnsülin direncinin oluşmasına sebep olan etmenler; hücrel ve anatomik-patofizyolojik olarak ikiye ayrılır. Hücrel etmenler; preresptör düzeyinde olan pankreas beta hücrelerinde insülinin mutasyonu neticesinde anormal salgılanması ve dokularda insüline karşı direnç oluşmasıdır. İnsülin antagonistleri de örneğin glukagon, yağ asitleri, kortizol veya büyüme hormonu gibi antagonistler insülin direncine sebep olur. Son olarak kapiller dansitenin azalması ve endotel hücrelerine transportundaki bozukluklar da hücrel olarak insülin direncine katkıda bulunur (King, 1985). İnsülin direnci reseptör düzeyinde reseptör sayısının azalması ve oluşan mutasyonlardan dolayı oluştuğu bilinmektedir. Postreseptör düzeyinde oluşan patolojiler insülin direncinin oluşmasında en önemli etmen olarak düşünülmektedir. İnsülin reseptör tirozin kinaz aktivitesinin (IR) azalması T2DM'de hipergliseminin sonucu olarak düşünülmektedir.

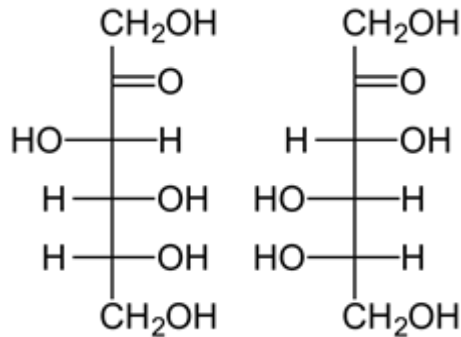
Hiperglisemi kontrol altına alındığında değerlerin normal glisemik değerlere döndüğü gözlenmiştir. İnsülin reseptör sinyal iletim sisteminde insülin reseptöre bağlandıktan sonra reseptördeki tirozin kinaz aktive olur ve insülin sinyali oluşur. Glukoz trasportu için önemli olan bu sinyaller hücre membranında uyarı oluşturur. Hücre membranında çift yönlü enerji harcanmaksızın oluşan bu pasif transferde glukoz transporterlar (GLUT) rol oynamaktadır. GLUT1 ve GLUT 4 iskelet kasında görev yaparken, glukozdan çok fruktoza duyarlı olan GLUT5 bağırsak membranında ve kokleada özellikle dış tüylü hücrelerin basolateral membranında bulunur (Ashmore, 2008). DTH'lerde bulunan motor protein olan Prestin kokleada aktif rolü yerine getirir. GLUT5 ise bu motor proteinin hücre içi enerji döngüsünde rol oynayarak yardımcı olur. Hücre homeostasisi, akustik bilginin işlenmesi ve membrandaki motor proteinlerin işlevi açısından önemli ve gereklidir.

İnsülin direncini ölçmek için HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) indeksi yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsülin direncinin kolayca belirlenebilmesi açısından HOMA-IR formülü geliştirilmiş olup formüle edilmiştir (Bonora, 2000).

$$\text{HOMA-IR} = \text{insülin (mU/ml)} \times [\text{glukoz (mmol/l/22.5)}]$$

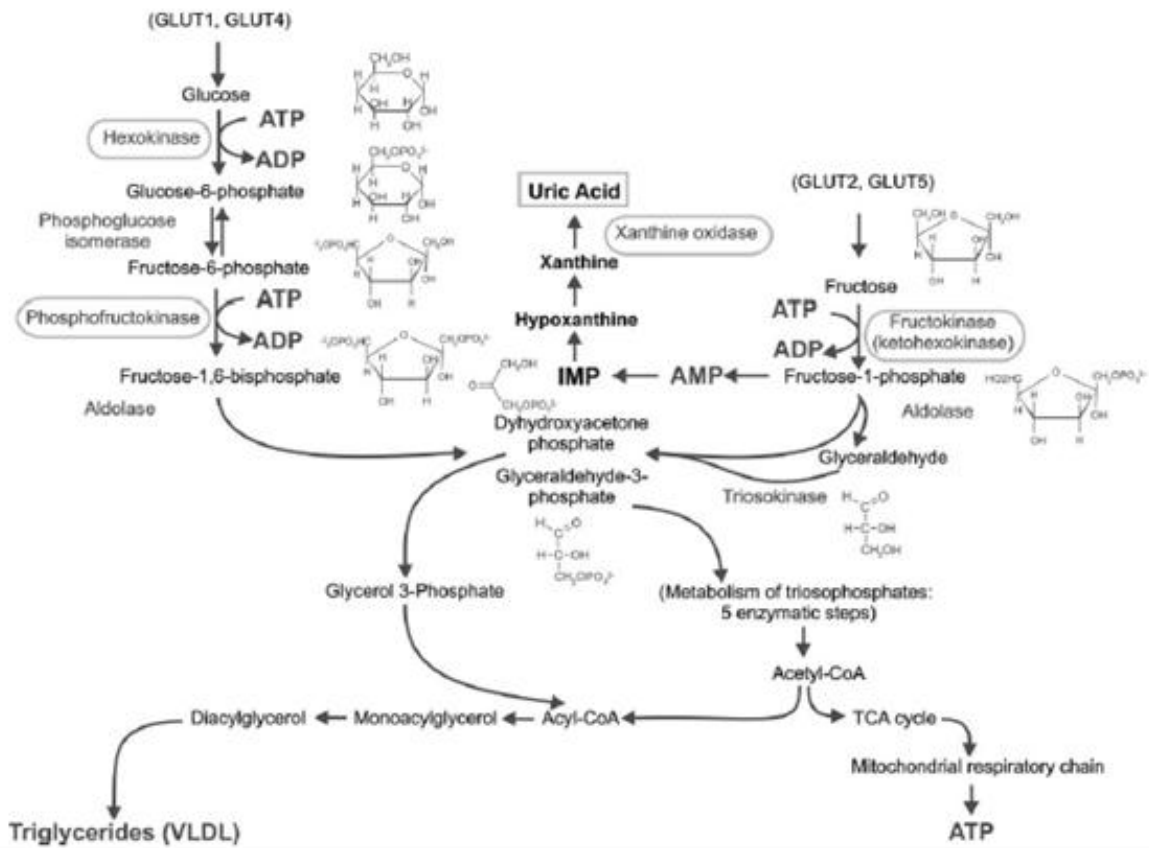
2.4.3.2. Fruktoz Metabolizması ve insülin direnci ilişkisi

Meyvelerde ve balda zengin olarak bulunan fruktoz basit ketonik bir monosakkarittir. Kimyasal formülü $C_6H_{12}O_6$ şeklindedir. Fruktoz trigliserit düzeyini metabolizma döngüsü gereği glukozdan daha fazla arttırdığından iskelet kasında ve dokularda insülin direnci oluşturmasına sebep olmaktadır.



Şekil 2-10 : Fruktozun (soldaki D-fruktoz, sağdaki L-fruktoz) 6 karbonlu yapısı (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Fruktoz>)

Fruktozun sindirimi ve emilimi, duodenum ve jejunumun membranında bulunan glukoz taşıyıcı 5 (GLUT5/SLC2A5) ile pasif olarak yani kolaylaştırılmış diffüzyonla hücre içine alınır ve glukoz taşıyıcı 2 (GLUT2) ile de kana verilir. Fruktoz karaciğerde fruktokinaz ile metabolize olur. Glukoz glukoz-6-fosfata önce dönüştürülür. Sonrasında fruktoz-6-fosfata ve fruktoz1,6-bifosfata dönüştürülür. Fruktoz1,6-bifosfat pruvata krebs döngüsüne katılmadan çevrilir. İnsülin ise glukozun piruvata dönüştürülmesinde görevlidir. Fosfofruktokinaz glikoliz için temel basamaktır. Fruktoz bu basamağı atlayarak glikotik yolağa dahil olur. Fruktozun metabolize olmasıyla ortaya çıkan trioz-fosfat öncelikle glukoneogenez yoluyla glukoz ve glikojene, bir kısmı pruvata bir kısmı ise laktata dönüştürülür. Bu metabolik aktivitelerden geriye kalan karbonik yapı da yağ asitleri şekline dönüştürülür (Jhonson, 2009). Şekil 2-11'de glukoz ve fruktoz metabolizması döngüleri yer almaktadır.



Şekil 2-11 : Glukoz ve fruktoz metabolizması (Jhonson, 2009)

İleri Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glycation End Product(AGE), 1912 yılında Louis Camille Maillard tarafından ilk kez tanımlanmıştır. Vücudumuzda

bulunan aminoasit, lipit gibi moleküller glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritlerle non-enzimatik olarak gerçekleşen glikasyona uğrarlar. Bunun neticesi olarak da İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs) oluşur. Bu ürünlerin hücre içinde aşırı birikmesi ile lipit ve proteinlerle çapraz bağ yaparlar. Protein gibi moleküllerin işlevlerini yitirmesine sebep olup hücre yaşlanmasına ve apoptoza sebep olurlar. Fruktoz glukozdan daha çok AGEs meydana getirir. AGE'ler ayrıca oksidatif strese neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Yüksek ısıya maruziyet besinlerin AGE ürünlerinin artmasına da neden olmaktadır(Ott, 2014).

Kanda bulunan HgA1c hemoglobinin glikasyonu gösterir. Bu değer insülin direnci ve diyabet tanısında önemlidir. Fakat AGE düzeyleri hem endojen olarak hem de eksojen olarak glukoz, fruktoz, proteinler gibi kandaki glikasyon ürünlerinin düzeyini gösterdiği için son yıllarda önemi giderek artmaktadır.

AGE ürünleri inflamatuvar hücrelerin AGE reseptörlerine bağlanarak oksidatif strese ve inflamasyona sebep olurlar. Bu olaylar da ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, romatoid artrit gibi pek çok hastalıkta kendini gösterir. Bu inflamasyona sebep olan AGE'ler ile birlikte bazı endojen moleküller de vardır. Bunlar TNF- α ve IL-6 gibi sitokinler, vazodilatasyon görevi olan nitrik oksit (NO), oksijen radikalleri, histamin gibi moleküllerdir. Bu moleküller hücre membranı ve glikasyon oluşumu için gerekli enzimlerin işlevini bozarak inflamasyona sebep olurlar. AGE'ler indüklenebilir NO sentaz (iNOS)'u aktive eder. Adezyon molekülleri olan VCAM-1 ve ICAM-1 da endotel dokusunda inflamasyona sebep olur(Ott, 2014).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisiyle oluşan lipit peroksidasyon ve karbohidrat oksidasyon ürünleri de proteinlerin aminoasit içeriğinde modifikasyonlar oluşturmakta ve plazma protein karbonil içeriğinde artışa neden olmaktadır. Bu oluşumlar insülin direncinin gelişmesinde etkilidir

2.4.3.3. Abdominal obezite, aterojenik dislipidemi

Karaciğerdeki trigliserit ve kanda dolaşan serbest yağ asitlerinin artışı, insülin salınımı ve işlevi mekanizması bozulduğundan dolayı MetS'li hastalarda visseral yağ dokusu artmaktadır. Visseral yağ dokusu insüline karşı oldukça dirençli bir yapıdır. Adiponektin proteini adipoz (yağ) dokudan salgılanan bir proteindir. İşlevi kanda serbest olarak dolaşan yağ asitlerini regüle etmek, karaciğerde glukoz üretimini engellemektir. İnsülin direnci varlığında, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-

6, rezistin, PAI-1) sentezi artar. Antiinflamatuvar sitokin düzeyleri (adiponektin, IL-10) azalır. Fibroblastlar, makrofaj, lökosit gibi inflamatuvar özellikli hücrelerin yağ dokusuna girmesine sebep olur (Berg, 2002). Lipit anomalileri oluşur. Bu olaylar neticesinde kan plazmasında TG ile küçük yoğun lipoprotein kolesterol (LDL-K)'de artış ve yüksek yoğun lipoprotein kolesterol (HDL-K)'de de azalma meydana gelir. Özellikle bu değer kardiyovasküler hastalık için riski arttırmaktadır(Grundy, 1998).

2.4.3.4. Diyabet

İnsülin direnci ile başlayan prediyabet evresinde pankreasın beta hücrelerinin fonksiyonlarının bozulmasıyla önce tokluk sonra açlık hiperglisemisi meydana gelir. Beta hücrelerinin programlanmış ölümü, kan plazmasında dolaşan serbest yağ asitlerinin yüksekliği sonucu beta hücre apoptozu, hipersekresyonun uzun zaman sürmesi ve hücresel yorgunluk diyabet oluşumuna neden olan etmenlerdir. T2DM'de insülinin ilk sekresyon basamağı bozulur ve hazır olarak hücrelerde bekleyen insülin işlevini yerine getiremez, postprandiyal hiperglisemi oluşur. Beta hücrelerin işlevini yitirmesiyle ikinci basamak olan yeni yapılan insülinin kana verilmesi aşaması da bozulur. Bu durumda yemekten uzun zaman geçtikten sonra bile hiperglisemi devam eder. T2DM'de ve Metabolik Sendrom'da glisemiyi, trigliserit düzeyini regüle eden, farmakolojik olarak önerilen ilaç grupları biguanidler ve tiazolidinedionlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4.3.5. Hiperglisemi, hiperinsülinemi ve nöropati ilişkisi

Periferik nöropati diyabetin geç komplikasyonu olarak eskiden düşünülürken, son zamanlarda glukoz intoleransı ve metabolik sendrom ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Artık makrovasküler komplikasyonların glukoz intoleransının başladığı prediyabet safhasında geliştiği ve periferik nöropatiye sebep olduğu iddia edilmektedir. Metabolik sendromun tek başına öğeleri nöropatiyi geliştirmeyebilir veya patogeneze sebep olmayabilir fakat birbirini indükleyen bu sistemin oluşturduğu hastalıklar kümesi nöropati oluşturma riskini arttırmaktadır.

Glukoz intoleransı makro ve mikro vasküler komplikasyonlarda direk rol oynadığı halen araştırılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hiperglisemiye bağlı mekanizmaların etkisi dikkat çekmektedir. Hiperglisemi, direkt olarak sinir

toksitesi yapmaktadır. Buna yükselmiş oksidatif stres, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ve ileri glikasyon son ürünlerinin birikimi (AGE) ve son olarak polioll yolağı boyunca artan akış sebep olmaktadır (Feldman, 1997). Bu faktörlerin hepsi aksonal mitokondri metabolizmasını hasara uğratarak aksonun distal uçlarına hızlı ve yavaş iletimi bozmaktadır. Nitrik oksidin (NO) aracılığı ile vazodilatasyonun inhibisyonu, adipositlerden serbest yağ asitlerinin ve adipositokinlerin salınımının artması ile endotel disfonksiyonuna, endotel ve son organların direkt metabolik hasarına neden olmaktadır. Bu faktörler de mikroarteriyel vazodilatatif kapasitede azalmaya ve sonuç olarak hipoksiye sebep olmaktadır (Singleton, 2003).

VEGF, damar geçirgenliğini arttıran, vaskülogenezi (embriyoda damar oluşumu) ve anjiyogenezi (var olan damarlardan yeni damar gelişimi) ayarlayan büyüme faktörüdür. İnflamasyon varlığında, kanser oluşumunda, makula dejenerasyonunda, nöropati gibi durumlarda arttığı bilinmektedir (Byrne, 2005).

2.4.3.6. Metabolik Sendrom ve İşitme kaybı

Günümüzde işitme kaybı ile metabolik sendrom arasındaki ilişkiye dair az sayıda çalışma vardır. Yapılan bir çalışmada metabolik sendromun işitme kaybı yapan bağımsız bir risk faktörü olduğu ve ani işitme kaybına sebep olduğu gözlenmiştir (Chien, 2015). Metabolik sendromun özellikle yüksek frekanslarda saf ses işitme eşiklerini belirgin olarak yükselttiği, düşük frekanslardaki düşüşün de sendromun bileşenlerinin seviyesi ile ilişkili olduğuna değinilmiştir (Sun, 2015).

Diyabetin uzun yıllardan beri özellikle yüksek frekanslardan başlayarak işitme kaybına sebep olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Hiperglisemi ve oksidatif stresten dolayı oluşan koklear mikroanjiyopati ve işitsel nöropati özellikle yüksek frekansları etkileyen işitme kaybının patofizyolojisinde yer alan mekanizmalar olarak belirtilmiştir (Szalat, 2006). Diyabetik anjiyopati, intimal glukoprotein birikmesinin ve endotel hücre hasarının sonucu olarak gelişir (Guerci, 2001). Bu etkiler özellikle vasküler yapılarda görülmektedir. Retinada oluşan bu etkiler sonucunda retinopati meydana gelmektedir. Pek çok çalışmada iç kulakta stria vaskularis, baziler membran ve tüylü hücrelerde diyabetik hasar rapor edilmiştir. Özellikle stria vaskularisin zengin mikrovasküler yapısı nedeniyle işitme kaybına sebep olan diyabetik değişikliklerden kolaylıkla etkilenir.

T1DM ile T2DM'li hastalarda makrovasküler ve mikrovasküler hasara bağlı nöropatiler meydana gelmektedir. Her iki diyabet grubunda yapılan çalışmalarda özellikle vasküler sistemin etkilendiği ortaya konulmuştur. Fukushima ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, insülin ile tedavi edilen T2DM'li hasta grubu, oral glukoz azaltıcı ajan kullanan T2DM'li hasta grubu ve diyabetik olmayan kontrol grubu histopatolojik olarak incelenmiştir. İnsülin kullanan grupta, baziler membranın damar çeperleri ve stria vaskularisin damarları tüm koklea kıvrımı boyunca önemli derecede kalınlaştığı, stria vaskulariste atrofi, DTH'lerde önemli ölçüde kayıp gözlenmiştir (Fukushima, 2006).

Diyabetik kokleopatinin kesin nedeni tam olarak belli değildir. Koklear kan akışının azalması ve koklear damar çeperlerinin kalınlaşması gibi vasküler bozukluklar sensorinöral tip işitme kaybına neden olduğu öne sürülmüştür(Kariya, 2010; Fukushima, 2006).

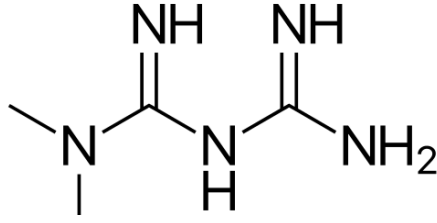
Serbest oksijen radikallerinin kokleada DTH'lerin fonksiyonlarını bozduğu ve hasara uğrattığı bunun sonucu olarak sensörinöral tipte işitme kaybına sebep olduğu iddia edilmiştir (Kariya, 2010).

2.5. METFORMİN

2.5.1. Metformin özellikleri

Metformin (dimetilguanid) molekül formülü $C_4H_{11}N_5$ ve molekül ağırlığı 165,62 olan guanidine bakımından zengin *galega officinalis* bitkisinin köklerinden elde edilir. 1918'de hayvanlar üzerinde kan glukoz seviyesini düşürdüğü keşfedilmiş, oral kan şekeri düşürücü ilaç olarak 1957'de açıklanmıştır. İlk defa T2DM'li yetişkinlerde ve çocuklarda glisemik kontrolü arttırmak için diyet ve egzersizin bir parçası olarak onaylanmıştır. 1957'den beri reçete edilen metforminin güvenilir olduğu (hipoglisemi için düşük riskli, kilo kontrolüne yardımcı), pahalı olmayan, glisemik indeksi ve kan basıncını ayarlayarak mikrovasküler riski azaltabilen, kardiyovasküler mortaliteyi azaltan biguaniddir.

1922'de tarif edilen metforminin sentezi dimetilamin hidroklorür ve 2-siyanoguanidin'in ısıya karşı reaksiyonunu iledir (Şekil 2-12).



Şekil 2-12 : Metformin'in kimyasal yapısı
(<https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Metformin.svg>)

Metformin birincil olarak T2DM'de kullanılmakta, son yıllarda Polikistik Over Sendromu (PKOS)'da da kullanımı önerilmektedir. PKOS'lu hastalarda insülin direnci ile ilişkili diğer semptomlar ve abdominal obeziteye yatkınlık vardır. Serum insülin değeri, insülin direnci ve homosistein seviyesi bu hastalarda daha yüksektir. Bu yüzden bu hasta grubunda da Metformin kullanımı önerilmektedir.

2.5.2. Etki mekanizması

Metforminin ana etkisi, karaciğer glukoz üretimini azaltmaktır. Aynı zamanda insülin duyarlılığını artırır, bu da periferik glukoz alımını arttırmaktadır.

Metformin, öncelikle karaciğer glukoz üretimini baskılayarak (hepatik glikoneogenez) yüksek kan şekerini düşürür. Tip 2 diyabetli ortalama hasta normal glikoneogenesis hızının üç katına sahiptir; Metformin tedavisi bunu üçte bir oranında azaltır. Mitokondrial solunum zincirinin inhibisyonu (kompleks I), AMP-aktive protein kinazı (AMPK) aktive eder, protein kinaz A'nın (PKA) aktivasyonunun azaltılması ile siklik adenosin monofosfatın (cAMP) glukagon tarafından indüklenen yükselmesinin inhibisyonunu sağlar, mitokondriyal gliserofosfat dehidrogenazın inhibisyonu ve bağırsak mikrobiyotasına etki eder.

Metformin, karaciğer ve periferik organlarda insülin duyarlılığını artırarak T2DM'de glisemik kontrolü geliştirir. Bu, hepatik glukoz üretiminin azalmasına (ana etki) ve iskelet kasında glukozun yok edilmesine yol açar. Metformin, karaciğer, ince bağırsaklar ve iskelet kaslarındaki hareketiyle glisemik kontrolü geliştirir. T2DM'de hem bazal hem de postprandial plazma glukoz seviyelerini düşürür. Metformin karaciğerdeki glukoz üretimini azaltarak insülinin duyarlılığını arttırmaktadır. Metformin tedavisi ile açlık insülin seviyeleri ve gün boyu plazma insülin cevabı azalırken, insülin sekresyonu uyarılmaz.

Metforminin antiinflamatuvar etkisi olduğu proinflamatuvar sitokinleri azalttığı, antiinflamatuvar sitokinleri arttırdığı yönünde çalışmalar da mevcuttur (Bergheim, 2006).

Adenozin monofosfat protein kinaz (AMPK) enerjiye duyarlı bir proteindir. Hücresel düzeyde ATP oranını arttırmak için glukoz alımını, glikolizisi, yağ asitlerin oksidasyonunu ve ATP üretimi için gerekli enzimatik aktiviteyi artırır (Föllner, 2012). Metformin, Adenozin monofosfat protein kinaz (AMPK) aktivitesini etkinleştirir, metabolik faktörleri ve hücre büyümelerini regüle eder.

Glukoz taşıyıcılarından biri olan GLUT5, hücresel enerji dönüşümü için önemlidir. GLUT5 gen ekspresyonunun azalması hücre içi enerji döngüsünde bozuklukla paralellik göstermektedir. Glut 5 ağırlıklı olarak incebağırsak ve böbrekte fruktoz ve glukoz transportundan sorumlu olmakla beraber (Nakazawa, 1995), dış tüylü hücrelerde elektromotil cevaplarda etkili olduğu (Belyantseva, 2000a;2000b) ancak koklear amplifikasyonda önemli rol oynamadığı gösterilmiştir (Wu, 2008). Kokleada dış tüylü hücrelerdeki motor proteinlerin arasında yer alan GLUT5 basit difüzyon ile fruktozu hücre içine alır ve fruktoz döngüsünü başlatır (Ashmore, 2008). Metformin, jejenum membranında da bulunan GLUT5 gen ekspresyonunu arttırdığı bazı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Lenzen, 1996).

Metformin'in MetS'nin neden olduğu hücre içi enerji metabolizmasındaki düzensizliği önlediğine dair birçok çalışma yapılmıştır. HEI-OC1 hücrelerinde mitokondride sitokrom c salınımını ve mitokondriyal geçirgenliği arttırdığı, gentamisine bağlı apoptozu önlediği ve ROS'u azalttığı gözlenmiştir (Jung 2012, Chang 2011). Metforminin gentamisin ototoksitesine karşı etkinliği araştırılmış, işitme kaybını önlediğine dair bulgular elde edilmiştir. Farelerde ve kobaylarda yapılan organ kültürü çalışmalarında kokleada dış tüylü hücrelerin çekirdeklerine gentamisine bağlı endonükleaz G translokasyonunu engellediği, tüylü hücreleri koruduğu gösterilmiştir (Oishi, 2014; Mujica, 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Odyoloji Bölümü ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Odyoloji Kliniği'nde gerçekleştirilmiştir. Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından yapılan değerlendirmeler sonucunda 2015/08 kararı ile etik kurul onayından geçmiş (Ek1) ve maddi destek olarak İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) (Proje No: 22687) ve İstanbul Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) (Proje no: 283.2016-YL-35/27-42) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmamızda 2-6 aylık ve ağırlıkları 300-600 gr arasında olan 32 adet (64 kulak) auropalpebral refleksi pigmente Hartley cinsi genç-erişkin kobay (Guinea pig) kullanıldı. Kobaylar %50 nem, 16-21°C ortam sıcaklığı, 12/12 saat gece/gündüz periyodunda, ad libitum pelet yem+Vit. C (mevsimsel taze sebze ve meyve şeklinde) koşullarında barındırıldı. Kobaylar üzerindeki işlemler genel anestezi altında gerçekleştirildi. Genel anesteziye, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar ampul, Pfizer, İstanbul) + 10 mg/kg ksilazine hidroklorür (Rhompun flakon, Bayer, İstanbul) intramüsküler olarak verildi. Tekrarlayan doz gerektiğinde ise ilk dozun 1/3'ü kadar ketamin hidroklorür intraperitoneal olarak uygulandı.

Kobaylar çalışmaya, DKY'nin değerlendirilmesi için otoskopik muayene, orta kulak işlevlerinin değerlendirilmesi için timpanometrik inceleme, normal dış tüylü hücre fonksiyonları için otoakustik emisyon kayıtları, merkezi işitme yolları ve normal işitme varlığının incelenmesi için işitsel beyinsapı cevaplarının kayıt edilmesi ile dahil edildi. Testler sonucu herhangi bir patoloji saptanmayan kobaylar çalışma kapsamına alındı. Çalışmaya dahil edilen 32 kobayın kulaklarına otoskopik muayene yapıldı. Buşon valığında dış kulak yolu temizlendi. Dış tüylü hücrelerin cevaplarını değerlendirmek için "Distortion-Product" Otoakustik Emisyon (DPOAE), normal işitmenin varlığı ise İşitsel Beyinsapı Cevapları (ABR) testleri yapıldı. Çalışmamızda deneysel metabolik sendrom modeli kobaylarda 4 hafta boyunca orogastrik gavaj yöntemi ile % 30 'luk fruktoz (D-Fructose, Merck KGaA Darmstadt, Almanya) diyeti (300gr/lt) uygulanarak gerçekleştirildi.

Araştırma Protokolü

Çalışmada işitmesi normal olarak değerlendirilen kobaylar rastgele dört gruba ayrılarak çalışma kapsamına alındı.

Grup 1: Kontrol grubu (8 kobay=16 kulak) olarak planlandı. Bu grupta ki kobaylara herhangi bir girişim ve ilaç uygulaması gerçekleştirilmedi.

Grup 2: Deney grubu (8 kobay=16 kulak) olarak planlanan bu gruptaki kobaylar yalnızca deneysel metabolik sendrom modeli oluşturularak, Fruktoz grubu olarak planlandı. 4 hafta boyunca %30'luk fruktoz çözeltisi (300gr/lt) orogastrik gavaj yöntemi ile verildi.

Grup 3: Çalışma grubu-1 (8 kobay=16 kulak) olarak planlandı. Bu grupta ki kobaylar Metformin grubu olarak düşünüldü ve 4 hafta boyunca kobaylara günde tek doz (200mg/kg) intraperitoneal Metformin (Diaformin, 1000 mg) enjekte edildi.

Grup 4: Çalışma grubu-2 (8 kobay=16 kulak) olarak planlandı. Bu grupta ki kobaylar Metformin+Fruktoz grubu olarak düşünüldü. Bu gruptaki kobaylara %30'luk fruktoz çözeltisi (300gr/lt) orogastrik gavaj yöntemi ile verilerek deneysel metabolik sendrom modeli oluşturulduktan sonra fruktoz verilmesine devam edilerek günde tek doz (200mg/kg) intraperitoneal Metformin (Diaformin, 1000 mg) 10. günden itibaren enjekte edilecek şekilde planlandı.

Çalışmamızda, deneysel metabolik sendrom modeli elektrofizyolojik ölçümler, histolojik değerlendirmeler ve moleküler analizler olmak üzere üç aşamada değerlendirildi.

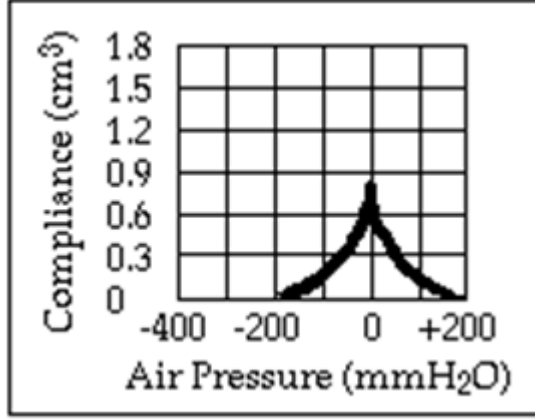
3.1. Elektrofizyolojik Ölçümler

Çalışmamızda işitmesi normal olarak değerlendirilen kobaylar elektrofizyolojik ölçümlerde başlangıç ölçümleri 0. gün olarak kabul edildi ve ölçümler 4 hafta boyunca, 0.gün, 3.gün, 10.gün ve 28.gün olarak tekrarlandı (Dağdelen, 2011).

3.1.1. Timpanometrik İnceleme

Timpanometrik inceleme Capella-MADSEN (GN Otometrics A/S Taastrup, Denmark) cihazı kullanılarak yapıldı. Kobayın dış kulak kanallarına uygun olan yenidoğanlar için kullanılan en küçük boy (no:1-2)prop ucu timpanometri probuna takıldı. Probe ton 75 dB SPL'de 1000Hz ve pompa hızı 100 daPa/sn olarak belirlendi.

Basınç aralığı +200 ve -400 daPa arasında ayarlandı. Normal timpanogram(Tip-A), -100 ile +50 daPa basınç aralığında tepe ve komplians değeri 0,39 ile 1,30 cc arasında kabul edildi.(Şekil 3-1).



Şekil 3-1 : A tipi olarak adlandırılan örnek bir timpanogram
(<http://www.utdallas.edu/~thib/rehabinfo/de.htm>)

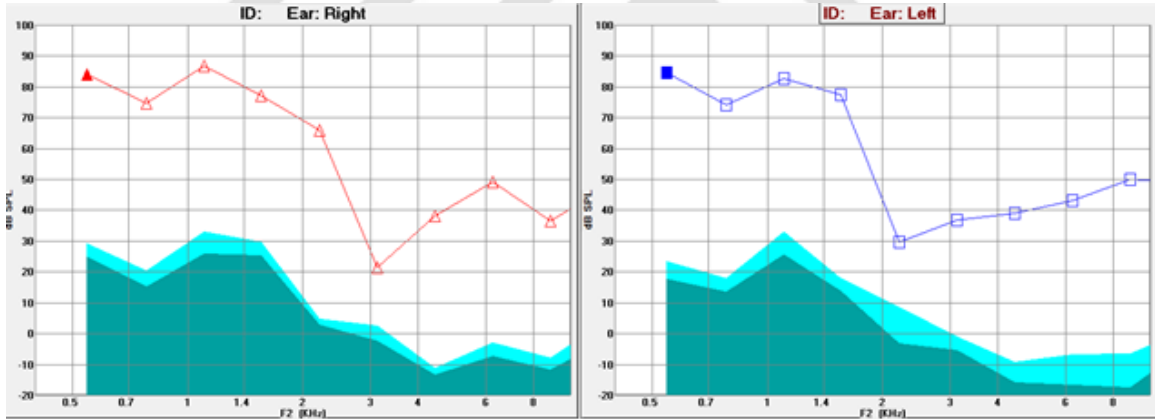
3.1.2. Distortion Product Otoakustik Emisyon Ölçümü (DPOAE)

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyonlar ($2f_1-f_2$ kübik distorsiyon ürünü bileşenleri) IHS SmartDPOAE (Miami, FL) cihazı kullanıldı. IHS-3738 yüksek frekans transdüserler kullanıldı. f_2 frekans 4 kHz ile 32 kHz arasında değişmekte idi. Kobayların dış kulak yoluna ER10B+ prob mikrofon ve ucunda uygun prob ucu takılarak ilk olarak alçak frekans DPOAE cevapları elde edildi. Daha sonra yüksek frekans transdüserlere prob mikrofon takılarak yüksek frekans DPOAE emisyon cevapları elde edildi. Ses basınç seviyesi (SPL); ER10B+ probe mikrofon (Etymotic Research, Inc., Elk Grove Village, IL) ve yazılım-donanım Smart DPOAE System version 4.53 (IHS) ile ölçüldü (Şekil 3-3). f_2 ve f_1 frekansları arasındaki oran (f_2/f_1) 1,22 idi. Uyarın şiddeti f_1 frekansı için L1 ve f_2 frekansı için L2 olarak belirlenip L1-L2 seviyeleri arasındaki fark 10 dB SPL (L1=65dB SPL, L2=55dB SPL) olarak ayarlandı. Dış kulak kanalına verilen iki adet uyarın (f_1 ve f_2) için iki farklı hoparlör kullanılarak uyarıldı. Test süresi ortalama yaklaşık 60 sn idi. DPOAE testinde sinyal gürültü oranı (S/N-R) 6 dB SPL ve üstündeki değerler anlamlı olarak kabul edildi(Le, 1998). Testler ortam gürültüsünün 50 dBA'yi geçmediği bir ortamda gerçekleştirildi. DPOAE sonuçlarının değerlendirilmesinde; elde edilen $2f_1-f_2$ kübik distorsiyon ürünleri f_1 ve f_2 'nin geometrik ortalamasında (500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000,

6000, 8000, 12000, 14000, 16000, 24000, 32000 Hz frekanslarında) S/N-R oranı dikkate alındı (Hall, 1994; Hall, 1993).



Şekil 3-2 : Kobay üzerinde gerçekleştirilen yüksek frekans DPOAE ölçümü

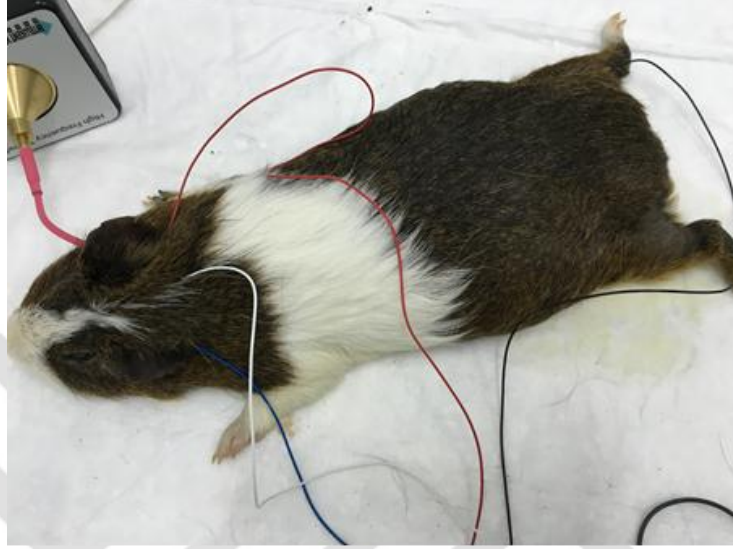


Şekil 3-3 : Örnek bir kobaya ait alçak frekans otoakustik emisyon kaydı

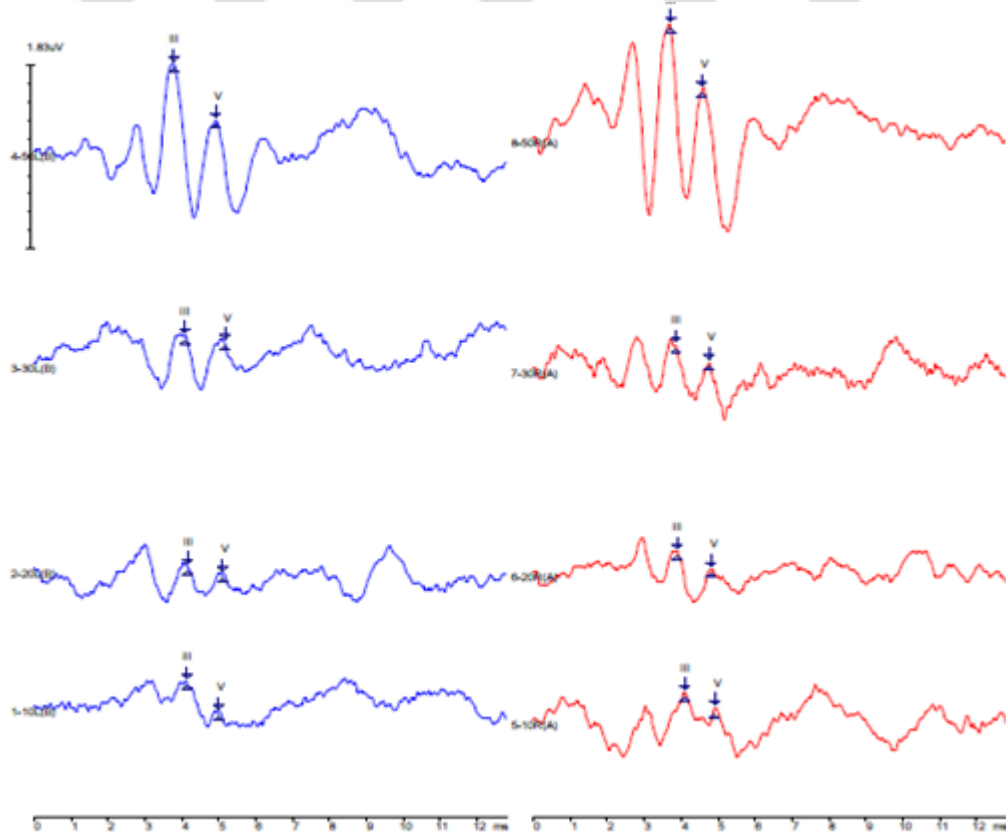
3.1.3. İşitsel Beyinsapı Cevapları (ABR)

İşitsel beyinsapı cevaplarının ölçümleri sırasında, IHS yüksek frekans yazılımı (v. 2.33) ve IHS yüksek frekans transdüsörler (HFT9911-20-0035) ile çalışan IHS SmartEP System (Intelligent Hearing Systems, Miami, FL) kullanıldı. Kobayın dış kulak kanallarına uygun prob, E-A-R Tone 3A ile alçak frekans ölçümü için ve yüksek frekans transdüsörler ile de yüksek frekans ABR ölçümleri için insert kulaklık tüplerine bağlandı. Negatif iğne elektrotlar test edilen kulağın mastoidine, pozitif elektrot altına, toprak elektrot ise kontralateral ayak tarafına yerleştirildi (Şekil 3). Elektrotların impedansları kontrol edildi. Elektrot impedansları 5 kOhm un altında olmasına dikkat

edildi. Uyarılar Tone Burst (8 kHz, 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz) ve klik uyarı şeklinde verildi. Saniyede 11 tone burst ve klik uyarı verilerek, 300 cevabın averajlanması yapıldı. 80 dB SPL'den başlanıp descending-ascending metodu ile işitme eşiği belirlendi. 20 dB SPL normal işitme için sınır kabul edildi.



Şekil 3-4 : Kobay üzerinde gerçekleştirilen yüksek frekans ABR ölçümü



Şekil 3-5 : Örnek bir kobaya ait klik uyarı verilerek yapılan işitsel beyinsapı cevapları kaydı

3.2. Histolojik Değerlendirmeler

Elektrofizyolojik testler bittikten sonra 28. gün kobaylara yüksek doz Tiopental sodyum (Pental Sodyum, İ. E. Ulagay, İstanbul) enjeksiyonu yapıldı. Sonrasında dekapitasyon işlemi yapılarak temporal kemikleri çıkarıldı.

Temporal kemik disseksiyonlarında koklear yapılara ulaşmak için, oksipital bölgeden horizontal insizyon yapılarak temporal skuamöz parçasının üzerinden eleve edildi ve dış kulak yolu, disseksiyon ile timpanik halkadan ayrıldı. Subperiosteal planda, temporal kemiğin mastoid ve bullası ortaya konuldu. Mastoid kısım oksipital kemikten; skuamöz kısım parietal, frontal, palatin ve etmoid kemiklerden; bulla kısmı ise oksipital ve sfenoid kemiklerden; petröz kısmı sfenoid kemikten disseke edildi. Ortaya konan VII. ve VIII. kranial sinirlerin ekstratemporal kısımları çıkarıldıktan sonra temporal kemik, kas dokularından da disseke edilerek karanium kemiklerinden ayrıldı.

3.2.1. Işık mikroskopisi-histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirilmede temporal kemikler disseksiyon öncesi orta kulak boşluğuna veya timpanik kaviteye %10 formalin enjekte edildi. Temporal kemik disseksiyonu sonrası ise timpanik bullaları açılarak koklear yapıya ulaşıldı. Kokleaların fiksasyon işleminde %10 formalin çözeltisi içerisinde ilk hafta yaklaşık +4°C sıcaklıkta, ikinci haftada ise oda sıcaklığına konuldu.

Fiksatif madde artıklarını temizlemek için, koklear metaryel tamponlanmış fosfat solüsyonu ile inkübe edildi. Koklear metaryel pH'sı 7,4 olan 0,1M Na-EDTA (Sigma-Almanya) solüsyonunda iki hafta süreyle oda sıcaklığında dekalsifiye edildi ve dehidrasyon işlemleri alkol serileri ile gerçekleştirildi. Dokuların şeffaflaştırma işlemleri ksilen ile yapıldı. Daha sonra dokular parafine gömüldü ve rutin takip protokolü tamamlandı (Tablo 3-1). Bu işlemlerde tüm solüsyonlar her hafta düzenli değiştirildi. Parafin bloklardan 7 mikronluk kesitler alınarak, dokular deparafinize ve rehidrate işlemleri gerçekleştirildikten sonra, Hematoksilen–Eosin boyası ile boyandı ve Axioplan 2 imaging - Zeiss ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Işık mikroskopik değerlendirmede Corti organı morfolojik olarak incelenerek stria vaskularis, spiral ganglionlar, iç ve dış tüylü hücre de dejenaratif değişiklikler değerlendirildi

Tablo 3-1 : Rutin parafin takip protokolü (Bulut, 2007)

İşlem	Kullanılan madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	2 hafta
Dekalsifikasyon	0.1 M EDTA	3 hafta
Dehidratasyon	% 70 alkol	1 saat
	% 70 alkol	1 saat
	% 90 alkol	1 saat
	% 90 alkol	1 saat
	% 96 alkol	1 saat
	% 96 alkol	1 saat
	% 100 alkol	1 saat
	% 100 alkol	1 saat
	% 100 alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen	15 dk
	Ksilen	15 dk
	Ksilen	15 dk
Emdirme (% 60°C etüv)	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

3.2.2. Hematoksilen+Eozin Boyama Prosedürü

Parafin bloklardan aldığımız 5 µm kalınlığındaki kesitler, parafini uzaklaştırmak için 30 dk. boyunca toluol ile muamele edildikten sonra, sırasıyla %100, %96, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirip suya indirilmiştir. Kesitlere, 10 dk. boyunca Mayer's hematoksilen (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) boyası uygulanmış, morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dk. bekletilmişlerdir. Daha sonra sitoplazma boyaması için Eozin (Merck Millipore) boyasında 1 dk. muamele edilmişlerdir. Dehidratasyon işlemi için; artan derecelerdeki alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) geçirilen kesitler, sonrasında 30 dk. toluol ile muamele edilmiş ve entellan (Merck Millipore) ile daimi preparat haline getirilmişlerdir.

3.2.3. İmmünohistokimya Prosedürü

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nün, koklea dokularındaki reaktivitelerini immünohistokimyasal olarak değerlendirmek için; 5µm kalınlığındaki parafin kesitler, poli-L-lisin kaplı lamlara alınıp, 56°C'de bir gece bekletilmiş ve deparafinizasyon işleminden sonra, azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmişlerdir. Antijen geri kazanımı işlemi için kesitler, özel şalelere alınıp pH=6,0 olan sitrat tamponu solüsyonu ile mikrodalga fırında (Vestel, 1550) 4 kez 5'er dakika inkübe

edilmişlerdir. Oda ısısında soğutulan kesitler, sonra pH 7,2-7,4 olan 0,01M'lik fosfat tamponu (PBS) ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için su ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksid) solüsyonu içinde 5 dakika bekletilmiş, PBS ile 3 kez 5'er dakika tekrar yıkanmıştır. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere, %1'lik preimmün rabbit serumun (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB, ABD) 5 dakika süreyle uygulanmasının ardından, bu serum uzaklaştırılmıştır. Sonrasında koklea doku kesitleri; antikor dilüe etme solüsyonuyla (Invitrogen, Californiya, ABD) hazırlanan, tavşan poliklonal VEGF antikoru (Lifespan Bio Sciences, LS-C389419 Washington, ABD) ile 1/1000 dilusyonda, oda ısısında 1 saat inkübe edilmişlerdir. Negatif kontrol kesitleri, primer antikor yerine PBS ile muamele edilmiştir. Tüm kesitler bu aşamadan sonra, primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen) 10 dakika ve son olarak, HRP-streptavidin (Invitrogen) ile oda ısısında muamele edilmişlerdir. 3,3'-diaminobenzidine tetrahidroklorid dihidrate (DAB; Invitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin ile zıt boyama yapılmış ve entellanla kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar BX-51 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

VEGF immunreaktivitesi; tüm gruplara ait kesitlerde stria vaskülaris alanlarında, (-) Negatif, boyanma yok, (+) Boyanma var, (++) Orta şiddette boyanma, (+++) Şiddetli boyanma, skalası kullanılarak değerlendirilmiştir (Yang, 2015).

3.3. Elektron mikroskopisi-Ultrastruktürel değerlendirme

Temporal kemikler disseksiyon öncesi orta kulak boşluğuna veya timpanik kaviteye %2,5 glutaraldehit enjekte edildi. Temporal kemik disseksiyonu sonrası ise timpanik bullaları açılarak koklear yapıya ulaşıldı (Şekil 3-6) ve pH'sı 7,4 olarak ayarlanan, %2,5 glutaraldehit içeren fosfat tamponunda 12 saat bekletildi. Prefiksasyon işlemleri sonrasında, kemik doku fosfat tamponunda 1 gün bekletildi ve sonrasında dokular pH'sı 7,4 olan 0,1M Na-EDTA (Sigma-Almanya) solüsyonunda iki hafta süreyle oda sıcaklığında dekalsifiye edildi. Temporal kemikte disseksiyonla kokleaya ulaşım şekline göre bu metod daha koruyucu bir metottur (Glueckert, 2005a; Glueckert, 2005b).

Dekalsifikasyon sonrası, koklear metaryel otik kapsül ile çevrili olduğundan, otik kapsül stereo mikroskop (Olympus 1x71 S8-F3, Japan) kullanılarak simetrik

olmayarak bazal-apeks doğrultusunda disseke edildi (Şekil 3-7) ve bu yapılar 72 saat +4°C fosfat tamponunda bekletilerek rutin SEM takibine (Tablo 3-2) alındı.



Şekil 3-6 : Timpanik kavitenin medial duvarına yerleşik koklea



Şekil 3-7 : Modiolar eksende bazaldan apekse doğru koklea

Tablo 3-2 : Rutin scanning elektron mikroskopi takip protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
1. Tespit	% 2,5 Glutaraldehit fosfat	4 saat
Yıkama	PBS	12 saat
2. Tespit	% 1'lik Osmium tetraoksit	1 saat
Yıkama	PBS	15 dakika
Dehidratasyon	% 50 Alkol	5 dakika
	% 70 Alkol	10 dakika
	% 90 Alkol	10 dakika
	% 96 Alkol	10 dakika
	% 100 Alkol	15 dakika

	% 100 Alkol	15 dakika
İnkluzyon materyaline gömme	2/1 Alkol-Amilasetat	15 dakika
	1/1 Alkol-Amilasetat	15 dakika
	1/2 Alkol-Amilasetat	15 dakika
	Saf Amilasetat	
Kritik Kurutma	Karbonmonoksit (CO)	
Tutucuya Yapıştırma		
Altın Kaplama		

Hazırlanan dokular kritik kurutma noktasında karbonmonoksit (CPD 010, Balzer Union- Liechtenstein) ile kurutuldu (Şekil 3-8a). Karbon tutucular ile pirinç bloklar üzerine sabitlendi (Şekil 3-8b) ve argon gazı altında altın (Bio-Rad SC502) ile kaplandı (Şekil 3-8c). SEM değerlendirmesinde öncelikle Corti organı yüzey anatomisi incelendi. Yüzey anatomisinde genel hücre morfolojisi ile dış tüylü hücre stereosilya morfolojisi Tablo 3-3'teki parametreler kullanılarak değerlendirildi (Poyrazoğlu, 1997). Değerlendirilen parametreler koklear frekans bandlarında bazalden apekse doğru ağırlıklı olarak dış tüylü hücre stereosilya morfolojisinin dizilimi incelendi (Şekil 3-8d).

Rutin takip ve dokuların hazırlanması Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, SEM (JEOL 6335F SEM) görüntülenmesi ise Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Görüntüleme Merkezi (TUTAGEM)' de yapıldı.

a) Kritik kurutucu



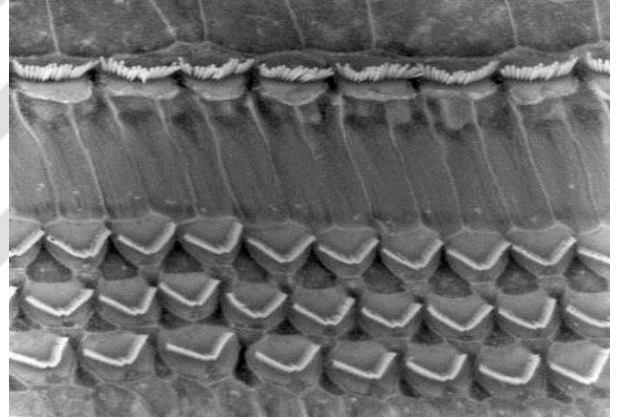
b) Bazal turu blok üzerine sabit koklea



c) Altın kaplama cihazı



d) Dış tüylü hücre stereosilya morfolojisi



Şekil 3-8 : Rutin scanning elektron mikroskopi takibi öncesi hazırlık aşamaları ve SEM'de iç tüylü hücreler ile dış tüylü hücrelerin görünümü.

Tablo 3-3 : SEM ile Corti organında yüzey anatomisi değerlendirme parametreleri

PARAMETRELER	BULGULAR	DEJENERASYON DERECELERİ	PUAN
Genel Hücre Morfolojisi (Yüzey, yan bağlantılar)	Normal hücre görünümü	Normal	0
	Kollaps, yan bağlantılarda düzenli ayrılma	Hafif derece dejenerasyon	1
	Kollaps, yan bağlantılarda düzensiz ayrılma	Orta derece dejenerasyon	2
	Nekroz	İleri derece dejenerasyon	3
Dış Tüylü Hücreler	Normal stereosilya görünümü	Normal	0

(DTH)	Sterosilyalarda düzensizlik	Hafif derece dejenerasyon	1
	Sterosilyalarda yapışıklık ve parsiyel kayıp	Orta derece dejenerasyon	2
	Total sterosilya kaybı	İleri derece dejenerasyon	3
Dejenerasyon yeri	Dejenerasyon yok	Normal	0
	Kokleanın 1/3'ünde tüylü hücre dejenerasyonu	Hafif derece dejenerasyon	1
	Kokleanın 2/3'ünde tüylü hücre dejenerasyonu	Orta derece dejenerasyon	2
	Kokleanın 3/3'ünde tüylü hücre dejenerasyonu	İleri derece dejenerasyon	3

3.3.1. Moleküler Analizler

3.3.1.1. Kan glukoz düzeyleri ve vücut ağırlık değişimleri

Gruplarda kan glukoz düzeyleri ve vücut ağırlık değişimlerinde ilk ölçüm olarak, elektrofizyolojik ölçümlerdeki gibi başlangıç ölçümleri 0. gün olarak kabul edildi ve dört hafta boyunca 2. gün, 3. gün, 10. gün ve 28. gün ölçümler olarak tekrarlandı. Kan glukoz düzeyleri On-call plus marka (San Diego, ABD) glukometrede strip ile kobayın sol arka bacağı soleus kası üzeri lanset ile delinerek ölçüldü. Vücut ağırlık değişimleri ise deney hayvanları biriminde hassas terazide tartıldı.

3.3.1.2. Biyokimyasal Analizler

Elektrofizyolojik ölçümler tamamlandıktan sonra 28. günde kobayların genel anestezi altında göğüs ön duvarı insizyonla açıldı. Kalbe ulaşılarak ponksiyonla sol ventrikülden alınan en az 1cc'lik kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için jelli tüplere alındı. Kan örnekleri soğutmalı santrifüjde +4 derecede, 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek serum örnekleri ependorf tüplere alınarak laboratuvar çalışmaları yapılncaya -80 °C'de muhafaza edildi. Serum örneklerinde, total kolesterol, trigliserit, HDL ve LDL düzeyleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Merkez laboratuvarında Beckman Coulter AU5800 (CA, USA) otoanalizöründe, İnsülin düzeyleri, Antioksidan ve Oksidan Kapasite ölçümleri ise Lipid Hidroperoksid (LHP) Düzeyleri, Protein Karbonil ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri, İleri Glikasyon Son Ürünleri, Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Miktar Tayini

değerlendirilerek İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya laboratuvarında fotomerik yöntem kullanılarak ölçüldü (Erel, 2004).

a. İnsülin Düzeylerinin Ölçümü

Bioassay Technology Laboratory Guinea pig Insulin (INS) ELISA Kiti (China) kullanılmıştır.

Preşip: Serum örnekleri INS monoklonal antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyonu takiben, biyotin ile konjuge anti-Guinea pig INS antikorları Streptavidin-HRP ile birlikte immün kompleksi oluşturmak üzere kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan biyotin ile konjuge anti-Guinea pig INS antikorları yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara substrat A ve substrat B ilave edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen mavi rengin stop solüsyonu eklenmesi ile dönüştüğü sarı renk 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

b. Lipid Hidroperoksid (LHP) Düzeylerinin Ölçümü

Bioassay Technology Laboratory guinea pig Lipid Hydroperoxide ELISA Kiti (China) kullanılmıştır.

Preşip: Serum örnekleri LHP monoklonal antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyonu takiben, biyotin ile konjuge anti-guinea pig LHP antikorları Streptavidin-HRP ile birlikte immün kompleksi oluşturmak üzere kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan biyotin ile konjuge anti-guinea pig LHP antikorları yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara substrat A ve substrat B ilave edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen mavi rengin stop solüsyonu eklenmesi ile dönüştüğü sarı renk 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

c. Protein Karbonil (PC) Düzeylerinin Ölçümü

YEHUA Biological Technology Guinea pig Protein Carbonyl ELISA Kiti (Shanghai, China) kullanılmıştır.

Preşip: Serum örnekleri PC monoklonal antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyonu takiben, biyotin ile konjuge anti-guinea pig PC antikorları Streptavidin-HRP ile birlikte immün kompleksi oluşturmak üzere kuyucuklara ilave

edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan biyotin ile konjuge anti-guinea pig PC antikoru yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara substrat A ve substrat B ilave edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen mavi rengin stop solüsyonu eklenmesi ile dönüştüğü sarı renk 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

d. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Düzeylerinin Ölçümü

YEHUA Biological Technology Guinea Pig Advanced Oxidation Protein Products ELISA Kiti (Shanghai, China) kullanılmıştır.

Preşip: Serum örnekleri AOPP monoklonal antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyonu takiben, biyotin ile konjuge anti-guinea pig AOPP antikoru Streptavidin-HRP ile birlikte immün kompleksi oluşturmak üzere kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan biyotin ile konjuge anti-Guinea domuzu AOPP antikoru yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara substrat A ve substrat B ilave edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen mavi rengin stop solüsyonu eklenmesi ile dönüştüğü sarı renk 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

e. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs) Düzeylerinin Ölçümü

YEHUA Biological Technology Guinea Pig Advanced Glycation End Products ELISA Kiti (Shanghai, China) kullanılmıştır.

Preşip: Serum örnekleri AGEs monoklonal antikoru ile kaplanmış olan kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyonu takiben, biyotin ile konjuge anti-guinea pig AGEs antikoru Streptavidin-HRP ile birlikte immün kompleksi oluşturmak üzere kuyucuklara ilave edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış olan biyotin ile konjuge anti-guinea pig AGEs antikoru yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara substrat A ve substrat B ilave edilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen mavi rengin stop solüsyonu eklenmesi ile dönüştüğü sarı renk 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

f. Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Miktar Tayini (FRAP)

OxiSelect Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay Kiti (San Diego, USA) kullanılarak kolorimetrik ölçüm yapılmıştır.

Prensip: FRAP yöntemi ile Fe^{+3} 'ün indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. Ferrik demir olan Fe^{+3} ; serum örneklerinde bulunan elektron veren antioksidanlar tarafından ferröz formu olan Fe^{+2} 'ye indirgenir. Demir-kolorimetrik prob kompleksinin indirgenme sonucunda meydana getirdiği koyu mavi renkli ürün absorbanası 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür..

3.3.1.3. Glut5 Gen Ekspresyonu

Elektrofizyolojik ölçümleri tamamlanan kobaylar, yüksek doz -250mg/kg-Tiopental sodyum (Pental Sodyum, İ. E. Ulagay, İstanbul) intraperitoneal enjeksiyonun ardından dekapite edilerek cerrahi girişimle temporal kemikleri disseke edildi ve kokleada Glut5 gen ekspresyonunun incelenmesi aşağıda izlenen protokol ile gerçekleştirildi.

a. Kokleada RNA izolasyonu

Temporal kemikler sıvı azot ile inkube edilerek çevre dokulardan kontaminasyonu minimize edildi. Sıvı azotta koklear metaryale ulaşmak için otik kapsül homojenizasyonu sağlandı. Koklear metaryelden 200 mg tartılarak ependorf tüplerine alındı ve üzerine 0.6 ml RNA izolasyon tamponu (2-markaptoetanol ilaveli) eklendi (sıvı azot aşamasından sonraki bütün aşamalar buz içinde yapılmıştır). Koklear metaryel-tampon süspansiyonu metal bıçaklı homojenizatörde yaklaşık 3-5 dakika 2600 g'de santrifüj edildi. Süspansiyonda homojenizasyon sağlandıktan sonra üstte olan sıvı pipetle alınarak steril (DNAaz-RNAaz free) ependorf tüplere aktarıldı ve hacimsel olarak eşdeğerde %70'lik etanol eklenerek vortekslendi. Elde edilen süspansiyondan 700 µl kolona aktarıldı. Kolon 12 000 g' de 15 saniye çevrildi ve alt sıvı tüp ile birlikte atıldı. Kolona 350 µl yıkama tamponu 1 eklenir ve 12 000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı tüple birlikte atılarak kolona bu aşamada DNAaz muamelesi için 80 µl DNAaz enzimi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Kolona 350 µl yıkama tamponu 1 eklenerek 12000 g'de 15 saniye çevrildi. Kolon yeni bir tüpe alınarak 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 12000'g de döndürüldü. Alt tüp sıvı ile birlikte atılarak tekrar kolona 350 µl yıkama tamponu 1 eklenerek 12000 g'de 15 saniye çevrildi. Kolon yeni bir tüpe alınarak 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 12000'g de döndürülerek işlemler tekrarlandı. Kolon yeni bir tüpe aktarılarak kurutmak için oda sıcaklığında 12 000 g'de 2 dakika çevrildi ve sonrasında kolon oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Kolonun merkezindeki membrana yaklaşık 50 µl RNAaz free su konuldu ve oda

sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Kolon kapaklı bir ependorf tüpe alınarak 12000 g'de 2 dakika döndürülerek tüpün dibindeki sıvıda RNA toplandı ve RNA'nın bozulmaması için beklenmeden -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı ya da cDNA'ya dönüştürüldü. Nanodropta ilk ölçümler alınıp RNA miktarları tayin edildi ve bu aşamada da örnekler buz içinde tutuldu.

b. cDNA dönüştürme protokolü

4X master revers- transkriptaz master mix (20 µl mix için) protokolü

2X 4 µl	Reak. Tamp.
2x 0.8 µl	25X dNTP mik (100mM)
2x 2 µl	10X RT random primer
2x 1 µl	Revers Transkriptaz enzimi
2x 4.2 µl	Nükleaz free H ₂ O

(**Not 1:** Normalde protokol 1:1 hacim mastermix-RNA için oluşturulmuş olup oluşacak cDNA miktarını arttırmak için bu çalışmada 2X2 şeklinde kullanılacaktır. **Not 2:** Bu aşamada bütün örnek ve solüsyonlar termocycler yüklemesine kadar buz içinde tutulmalıdır. Toplam hacim 2X reaksiyon miksi için 10 µl, 4x reaksiyon miksi için 20 µl olmalıdır. Örnek sayısı ile bu rakamlar çarpılarak ve pipetlemedeki örnek kayıpları da dikkate alınarak örnek sayısı +3 'e göre hesaplanmalıdır). Son hacim 20 µl ependorflara bölünerek üzerine 20 µl RNA eklenir ve aşağıdaki ısı döngülerine tabi tutulur.

cDNA ısı döngü protokolü:

25 °C	10 dak.
37 °C	120 dak.
85 °C	5 dak.
4 °C	∞ dak.

RNA PCR protokolü

Kobay Glut5 RNA (cDNA) primerleri

Primer Set 3: Amplicon Size = 144

KGlut5-F-5'-	CAAAGTGGCTGCCAGCGTAT	forward	35	58.38
HPLC				
KGlut5-R-5'-	AGGAGTACAGGCCGAACACG	reverse	159	58.94
HPLC				
KGlut5-Prob-	ATGCTGGCCGCTGTGCCGCC	forward	139	68.27
HPLC 5'Fam - 3'Tamra				

House keeping gen ACTB-beta aktin RNA (cDNA)

Name	Sequence	Strand	Position	Tm °C	Purification method	Modification
Primer Set 1: Amplicon Size = 144						
KACTB-F-5'-	CCTTGGCACCCAGCACAATG	forward	154	59.22	HPLC	
KACTB-R -5'	GGCCCGACTCATCGTACTCC	reverse	278	59.16	HPLC	
KACTB-Prob-	AGGCCAGGATAGAGCCGCGATCCACA	reverse	214	68.51		
HPLC 5'Fam - 3'Tamra						

Real-Time PCR protokolü:

TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	25.0 µl
Forward primer	5.0 µl
Reverse primer	5.0 µl
TaqMan probe (2.5-µM)	5.0 µl
DNA sample	5.0 µl
Water	5.0 µl
Total	50.0 µl

Başlangıç: 94°C'de 5 dakika
94°C'de 20 saniye
57°C'de 20 saniye
72°C'de 22 dakika
Tarama (Scan)

} 40 döngü

Sonlanma: 72°C'de 10 dakika

Analiz: Erime ve her döngü sonucu yapılacak tarama sonuç analizi ile ekspresyon tayini yapıldı ve gen ifadesine bakıldı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 15 versiyon (IBM, NY) paket programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler, normal dağılıma uygunluğu araştırıldıktan sonra, non-parametrik ölçümlerde bağımsız gruplar için Kruskal Wallis ve Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Bağımlı grupları araştırmada Friedman testi ve Wilcoxon-t testi uygulandı.



4. BULGULAR

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan metabolik sendrom modeli elektrofizyolojik ölçümler, histolojik değerlendirmeler, moleküler analizler olmak üzere üç aşamada değerlendirildi.

4.1. Elektrofizyolojik Ölçümler

Çalışmamızda odyolojik olarak işitmesi normal sınırlarda olduğu gösterilen 32 kobayda (=64 kulak) gruplara ait elektrofizyolojik ölçüm sonuçlarımız aşağıdaki şekildedir.

- a. Kontrol Grubu:** Kontrol grubunda toplam 16 kulakta 0. gün, 3. gün, 10. gün ve 28. gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 4-1'da ve DPOAE testi ölçümlerinin sonuçları ise Tablo 4-2'de gösterilmektedir.

Tablo 4-1 : Kontrol Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL)

Uyaran\Zaman	0.gün (Ort±SS)	3.gün (Ort±SS)	10. gün (Ort±SS)	28. gün (Ort±SS)
Klik	1,56±2,39	3,75±2,24	7,19±3,64	9,38±4,43
8 kHz	3,09±3,13	6,89±3,10	11,56±3,01	12,81±4,07
16 kHz	13,75±3,42	19,38±4,43	24,69±4,27	28,44±5,07
24 kHz	8,13±3,10	12,81±4,46	19,38±4,43	24,38±4,43
32 kHz	8,75±2,89	14,06±3,28	19,38±4,79	24,69±4,99

Tablo 4-2 : Kontrol Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL)

Frekans\Zaman	0.gün (Ort±SS)	3.gün (Ort±SS)	10. gün (Ort±SS)	28. gün (Ort±SS)
452-545 Hz	51,87±10,56	51,56±9,35	54,06±6,14	51,06±10,18
638-779 Hz	54,94±5,53	55,19±9,45	54,50±4,83	57,63±5,00
903-1105 Hz	59,13±4,86	57,88±6,95	56,19±6,30	55,94±5,98
1277-1557 Hz	63,13±3,50	62,94±4,45	62,69±3,20	61,63±2,83

1806-2211 Hz	45,63±6,70	44,13±8,37	50,19±6,59	52,38±6,27
2554-3130 Hz	33,94±4,52	34,31±5,00	40,75±7,11	35,06±7,51
3628-4422 Hz	49,25±5,59	49,19±8,39	50,63±5,57	47,94±5,90
5123-6244 Hz	52,63±4,86	52,13±5,89	56,31±6,75	50,19±8,12
7240-8844 Hz	51,69±3,44	50,25±4,27	54,13±6,82	51,94±5,81
10245-12503 Hz	48,94±7,81	53,00±7,81	51,50±6,82	47,31±4,30
14480-17672 Hz	58,56±4,21	57,31±5,10	56,44±4,13	47,86±6,09
20490-24990 Hz	19,69±6,41	18,50±5,75	19,69±4,76	21,31±3,89
28976-35344 Hz	16,63±5,33	17,88±6,11	21,19±5,15	18,25±6,62

b. Fruktoz Grubu: Fruktoz grubunda toplam 16 kulakta 0. gün, 3. gün, 10. gün ve 28. gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 4-3 ve DPOAE testi ölçümlerinin sonuçları ise Tablo 4-4'te gösterilmektedir.

Tablo 4-3 : Fruktoz Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL)

Uyaran\Zaman	0.gün	3.gün	10. gün	28. gün
	(Ort±SS)	(Ort±SS)	(Ort±SS)	(Ort±SS)
Klik	2,19±2,56	4,38±3,59	12,50±6,83	25,63±11,38
8 kHz	2,81±3,64	10,00±6,83	17,19±8,16	30,00±11,11
16 kHz	15,00±4,83	26,25±6,19	34,38±9,81	47,81±8,56
24 kHz	11,56±4,73	22,50±6,32	34,38±11,82	48,75±10,41
32 kHz	11,56±4,73	23,13±4,79	35,00±10,33	51,25±12,31

Tablo 4-4 : Fruktoz Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL)

Frekans\Zaman	0.gün	3.gün	10. gün	28. gün
	(Ort±SS)	(Ort±SS)	(Ort±SS)	(Ort±SS)
452-545 Hz	50,69±9,45	45,86±16,81	43,69±13,66	42,50±13,68
638-779 Hz	56,75±6,09	43,69±14,79	47,56±19,31	46,13±14,43
903-1105 Hz	60,25±5,22	54,75±4,19	52,31±7,60	49,88±9,64

1277-1557 Hz	61,88±4,06	56,44±4,98	57,50±8,05	52,44±8,69
1806-2211 Hz	47,06±7,86	39,13±13,53	38,25±12,30	48,75±12,06
2554-3130 Hz	35,06±4,84	28,00±14,77	24,25±9,46	28,44±10,72
3628-4422 Hz	47,88±5,77	46,38±7,56	43,25±7,17	44,44±6,65
5123-6244 Hz	53,56±4,93	46,63±8,31	48,13±6,42	45,69±7,66
7240-8844 Hz	50,63±4,18	45,50±5,54	44,81±5,57	48,00±7,41
10245-12503 Hz	51,75±7,81	49,31±7,28	45,31±5,70	47,81±5,83
14480-17672 Hz	58,44±5,05	54,88±4,54	51,63±10,49	42,31±7,36
20490-24990 Hz	18,44±5,85	14,81±2,17	13,31±4,83	17,63±5,64
28976-35344 Hz	18,88±5,81	9,25±8,98	12,31±8,68	8,69±5,41

c. **Metformin Grubu:** Metformin grubunda toplam 16 kulakta 0. gün, 3. gün, 10. gün ve 28. gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 4-5 ve DPOAE testi ölçümlerinin sonuçları ise Tablo 4-6'da gösterilmektedir.

Tablo 4-5 : Metformin Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL)

Uyaran\Zaman	0.gün (Ort±SS)	3.gün (Ort±SS)	10. gün (Ort±SS)	28. gün (Ort±SS)
Klik	2,50±3,16	4,69±3,86	7,50±4,08	10,93±5,23
8 kHz	2,81±3,64	7,19±4,07	11,56±3,52	14,38±4,43
16 kHz	14,06±3,28	20,63±4,43	26,25±5,00	30,94±5,23
24 kHz	9,69±4,27	11,88±5,12	18,44±4,37	24,69±6,70
32 kHz	9,38±3,59	13,44±3,97	19,06±6,38	24,69±7,63

Tablo 4-6 : Metformin Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL)

Frekans\Zaman	0.gün (Ort±SS)	3.gün (Ort±SS)	10. gün (Ort±SS)	28. gün (Ort±SS)
452-545 Hz	52,69±9,83	51,13±16,16	52,44±15,11	50,88±12,82
638-779 Hz	54,39±5,06	54,06±18,04	52,13±16,09	56,31±11,44
903-1105 Hz	58,31±6,16	56,06±6,62	55,63±5,54	54,88±6,95

1277-1557 Hz	63,25±3,45	62,44±4,79	62,63±5,57	61,25±4,42
1806-2211 Hz	45,94±5,35	42,88±10,20	49,50±9,24	51,38±11,48
2554-3130 Hz	34,75±4,64	33,63±7,91	40,00±8,78	34,06±6,65
3628-4422 Hz	48,44±7,69	48,19±7,33	50,38±6,97	47,56±7,34
5123-6244 Hz	55,31±3,91	50,88±5,62	55,50±6,58	50,13±5,67
7240-8844 Hz	52,06±2,82	48,63±6,06	53,63±8,10	51,56±6,07
10245-12503 Hz	52,50±6,60	51,63±7,48	50,94±7,47	46,06±3,62
14480-17672 Hz	58,81±3,92	57,00±7,67	55,75±7,44	48,75±5,48
20490-24990 Hz	17,56±5,12	18,19±5,22	19,56±5,21	21,19±5,21
28976-35344 Hz	17,56±5,35	16,88±9,84	21,06±6,71	17,63±8,99

d. Fruktoz+Metformin Grubu: Metformin+fruktoz grubunda toplam 16 kulakta 0. gün, 3. gün 10. gün ve 28. gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 4-7 ve DPOAE testi ölçümlerinin sonuçları ise Tablo 4-8’de gösterilmektedir.

Tablo 4-7 : Fruktoz+Metformin Grubunun ABR ölçüm sonuçları (dB SPL)

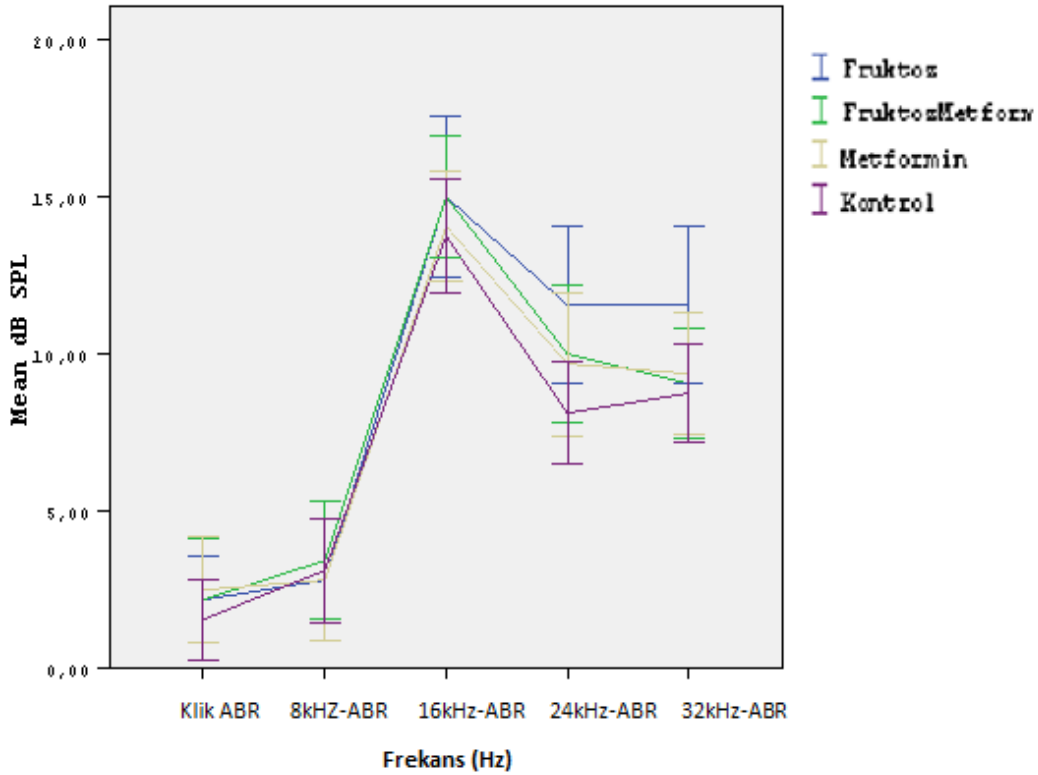
Uyaran\Zaman	0.gün (Ort±SS)	3.gün (Ort±SS)	10. gün (Ort±SS)	28. gün (Ort±SS)
Klik	2,18±3,64	4,69±3,40	6,56±3,97	9,38±4,03
8 kHz	3,44±3,52	9,69±3,86	14,06±3,75	20,31±4,27
16 kHz	15,00±3,65	21,88±4,79	28,44±4,73	34,69±4,99
24 kHz	10,00±4,08	15,63±4,43	23,12±4,79	30,93±6,12
32 kHz	9,06±3,28	14,69±6,18	24,06±6,38	32,50±9,13

Tablo 4-8 : Fruktoz+Metformin Grubunun DPOAE S/N-R ölçüm sonuçları (dB SPL)

Frekans\Zaman	0.gün (Ort±SS)	3.gün (Ort±SS)	10. gün (Ort±SS)	28. gün (Ort±SS)
452-545 Hz	51,56±9,35	45,13±18,30	49,94±9,57	49,75±10,87
638-779 Hz	55,19±9,45	44,75±18,99	50,94±7,64	52,44±7,17
903-1105 Hz	57,88±6,95	55,19±9,58	52,44±10,38	53,38±8,22

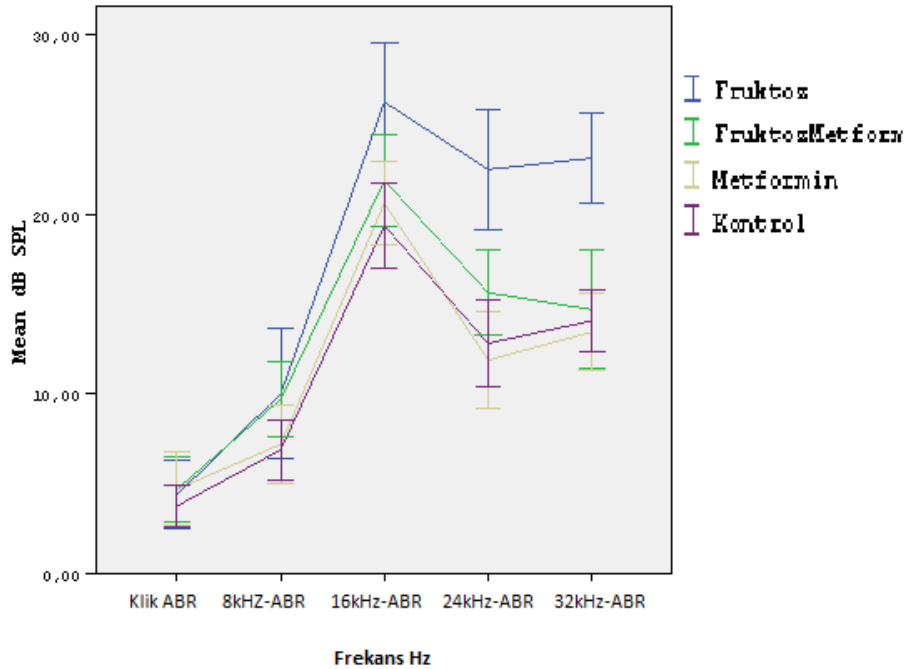
1277-1557 Hz	62,94±4,45	61,56±5,56	57,94±10,90	55,56±7,80
1806-2211 Hz	44,13±8,37	39,25±11,42	46,50±5,13	50,25±6,64
2554-3130 Hz	34,31±5,00	32,88±9,42	37,25±5,25	33,31±6,00
3628-4422 Hz	49,19±8,39	47,31±5,45	48,00±4,99	45,31±8,78
5123-6244 Hz	52,13±5,89	50,81±5,99	54,63±9,12	48,13±6,03
7240-8844 Hz	50,25±4,27	48,50±8,14	49,94±8,37	49,75±3,44
10245-12503 Hz	53,00±7,81	50,31±5,21	48,69±7,57	50,88±4,13
14480-17672 Hz	57,31±5,10	56,13±6,66	53,56±10,78	48,00±6,56
20490-24990 Hz	18,50±5,75	17,50±4,95	17,88±4,30	20,63±3,90
28976-35344 Hz	17,88±6,11	12,69±6,31	19,06±7,36	12,75±4,23

Çalışmamızda elektrofizyolojik test ölçüm sonuçları gruplararası karşılaştırmada ABR eşiklerinde-dB SPL 0. gün ölçümlerinde (Şekil 4-1) klik ve tone-burst (8 kHz, 16 kHz, 24 kHz, 32 kHz) uyarılarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0,05$).

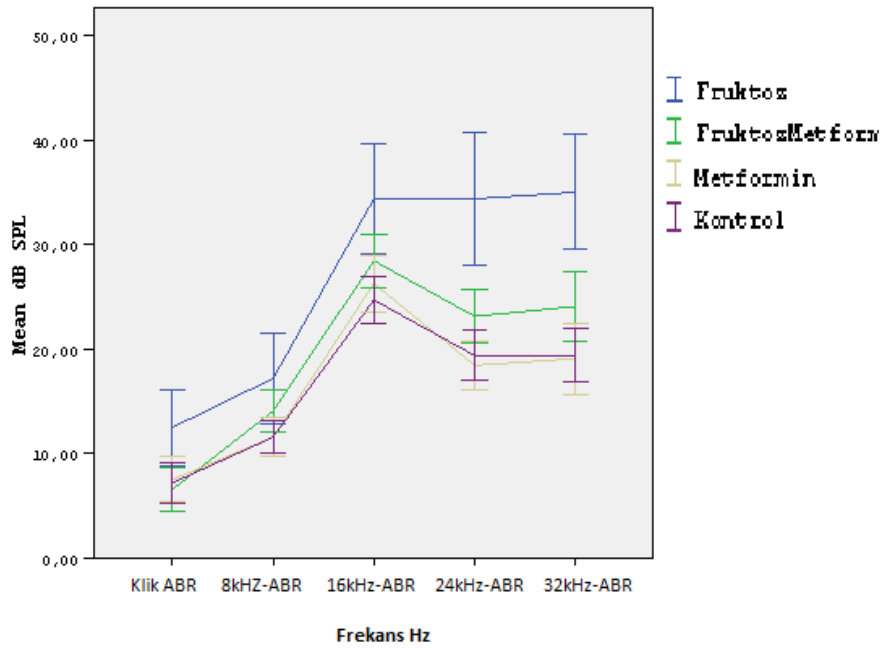


Şekil 4-1 : 0. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları

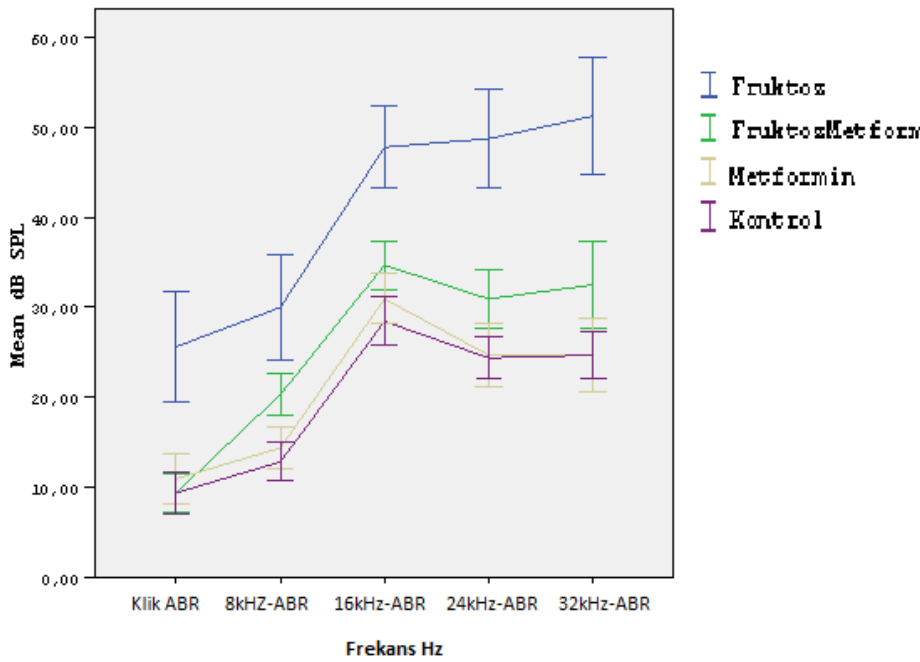
3. ve 10. gün (Şekil 4-2, 4-3) ölçümlerinde fruktoz grubunda 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak eşik cevaplarda anlamlı bir artış gözlenir iken ($p<0,05$), klik uyaranda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). 28. Gün (Şekil 4-4) ölçümlerimizde ise Fruktoz grubumuzda kontrol, metformin ve fruktoz+metformin gruplarımıza göre hem klik uyaranda hem de tone-burst uyaranda 8 kHz, 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz de istatistiksel olarak anlamlı bir saptandı ($p<0.001$). Grup içi karşılaştırmalarımızda ise ölçüm zamanları açısından karşılaştırdığımızda ise fruktoz grubunda 0. güne göre, klik uyaranda 10.günden ($p<0,05$) ve tone-burst uyararlarda ise 3. günden ($p<0,05$) itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik. Fruktoz+metformin grubumuzda ise 10. ve 28. günlerde hem klik ($p<0,05$) hem tone-burst uyararlarda ($p<0.001$) 0. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.



Şekil 4-2 : 3. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları



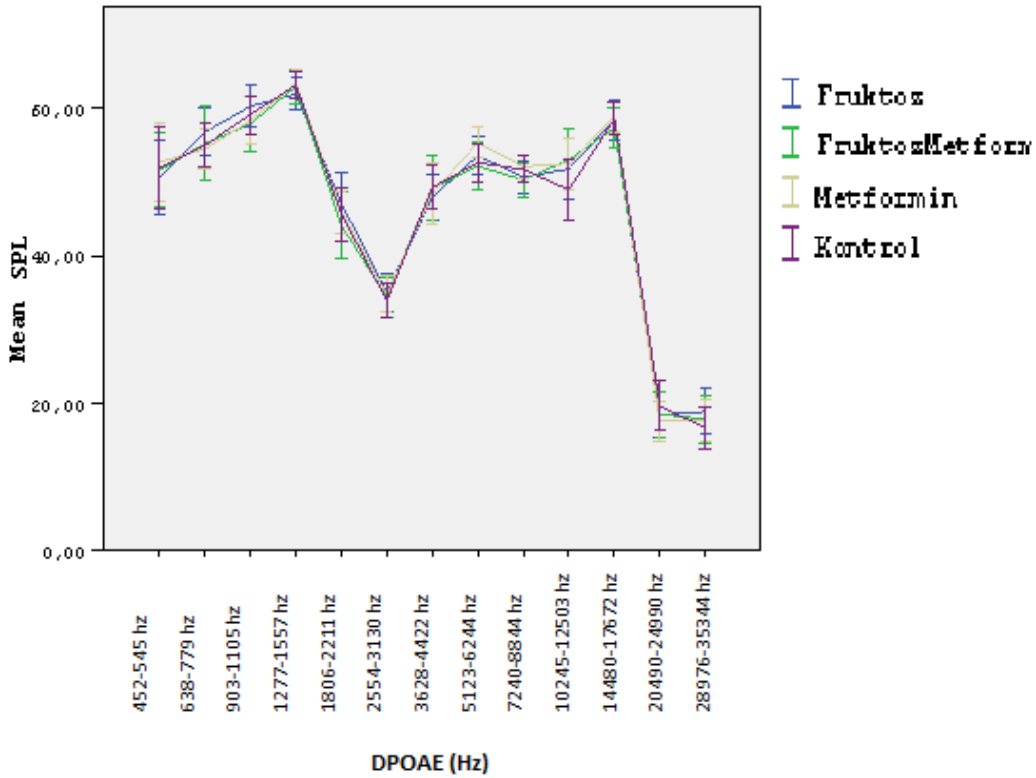
Şekil 4-3 : 10. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları



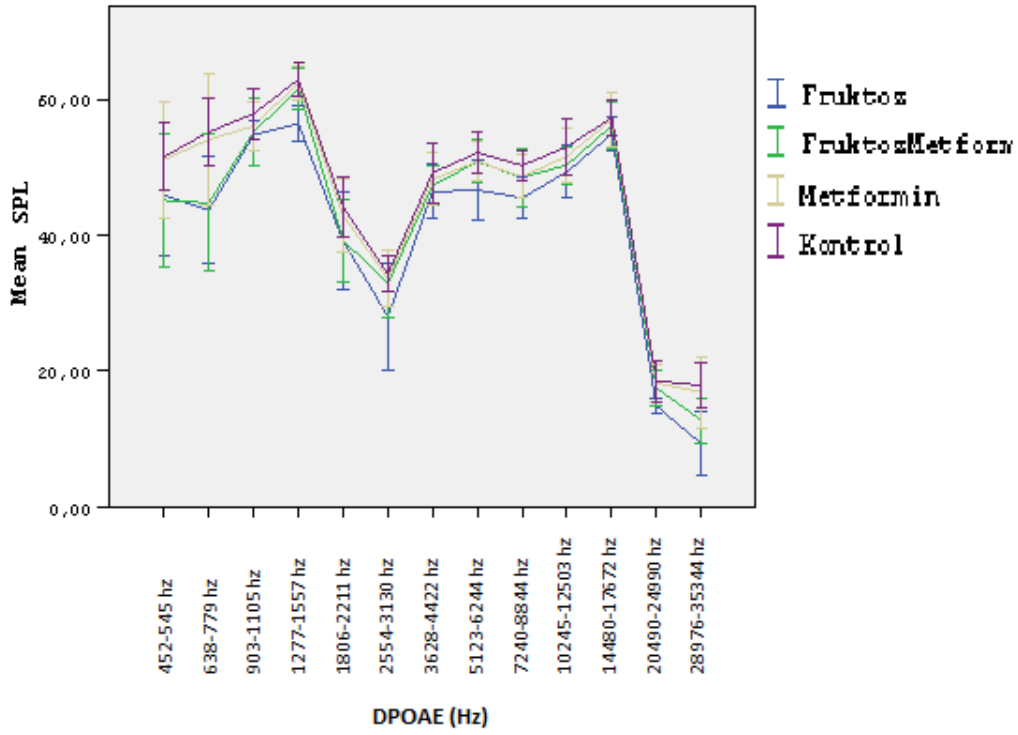
Şekil 4-4 : 28. güne ait gruplar arası ABR eşik cevapları

Çalışmamızda elektrofizyolojik test ölçüm sonuçları gruplar arası karşılaştırmada DPOAE S/N-R cevaplarında 0. gün ölçümlerinde (Şekil 4-5) istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Fruktoz grubumuzda diğer

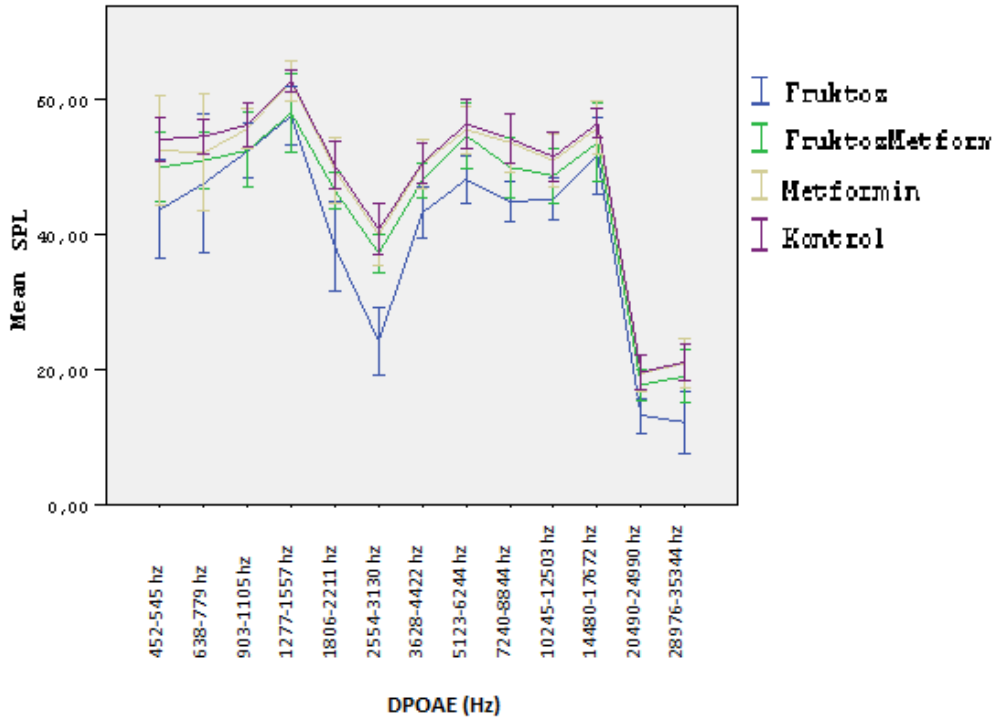
gruplarımıza göre 3. gün ($p<0,05$) ölçümlerinde, 0.5 kHz, 0.75 kHz, 3 kHz, 6 kHz, 8 kHz'de, 10. gün ($p<0,05$) ölçümlerinde ise 2 kHz, 3 kHz, 4 kHz, 6 kHz, 8 kHz'de, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (Şekil 4-6; 4-7). Fruktoz grubumuzda 28. gün ölçümlerimizde ise 0,5 kHz, 0.75 kHz, 1 kHz, 1,5 kHz, 6 kHz, 8 kHz, 24 kHz ve 32 kHz'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$; Şekil 4-8). Fruktoz+metformin grubumuzda ise 3. günden itibaren 0,5 kHz, 0.75 kHz, 1 kHz ve 2 kHz kontrol ve metformin gruplarımıza göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). fruktoz+metformin grubumuzda 10. gün ve 28. gün ölçümlerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Kontrol ve metformin gruplarımızda ise tüm ölçüm zamanlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. ($p>0,05$). Grup içi karşılaştırmalarda ise fruktoz ve fruktoz+metformin grubumuzda 3. günden ($p<0,05$) itibaren DPOAE S/N-R cevaplarında istatistiksel olarak tüm frekans bantlarında belirgin bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$). Fruktoz+metformin grubumuzda ise 10. gün ve 28. günde bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).



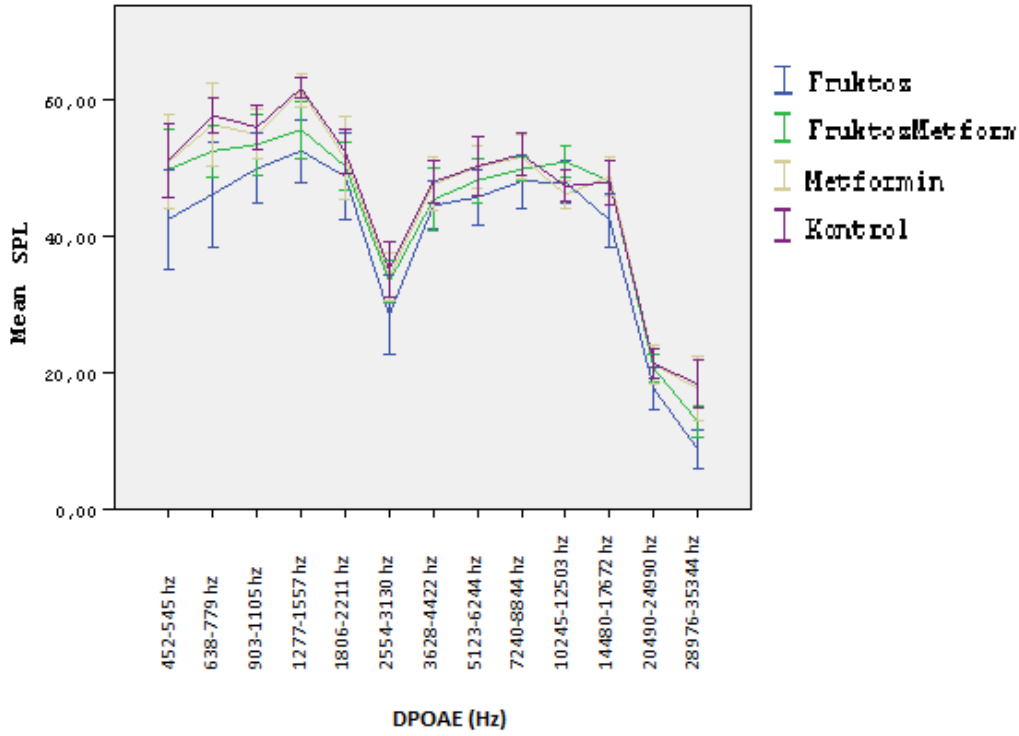
Şekil 4-5 : 0. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları



Şekil 4-6 : 3. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları



Şekil 4-7 : 10. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları



Şekil 4-8 : 28. güne ait gruplar arası DPOAE S/N-R cevapları

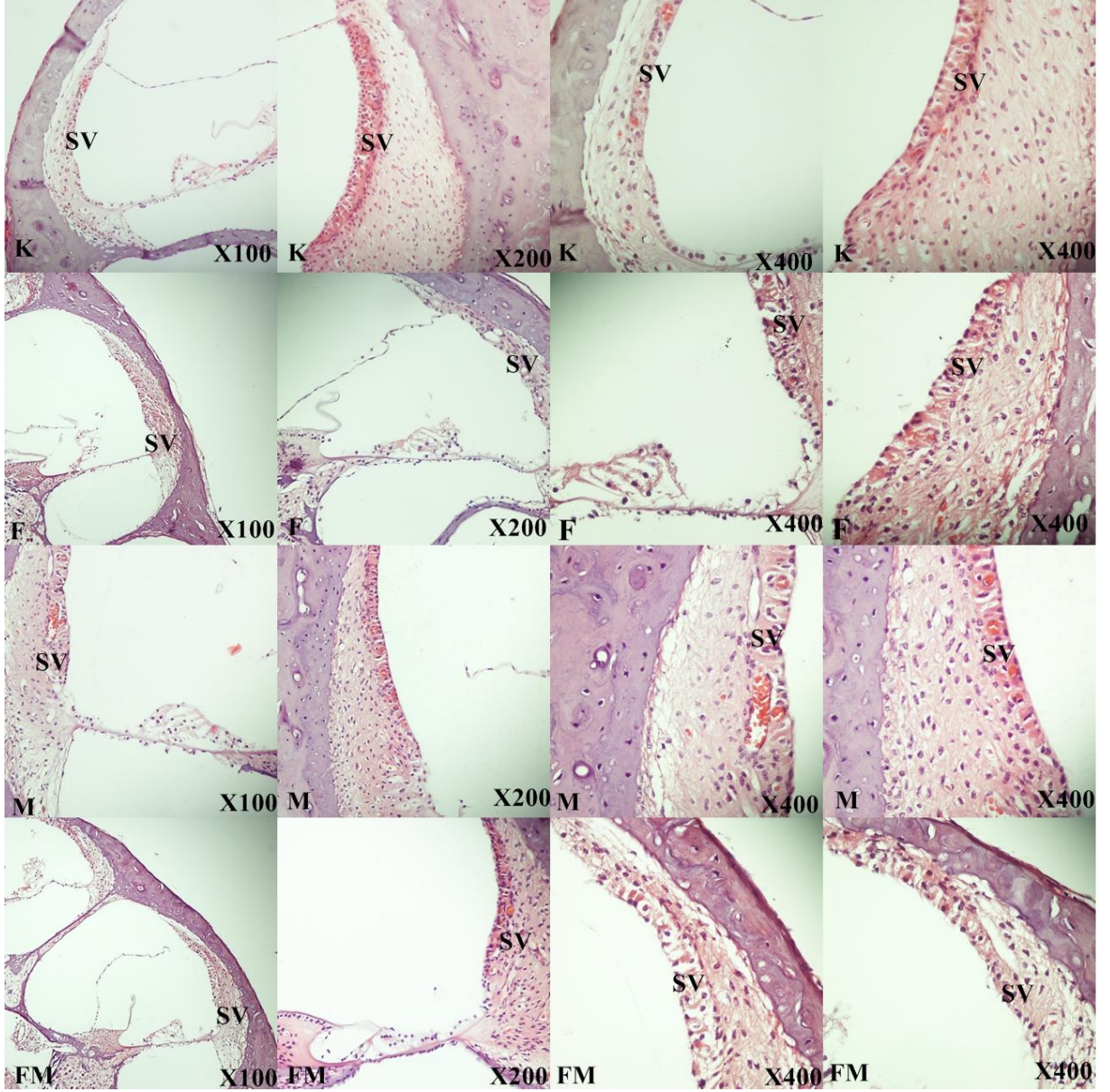
4.2. Histolojik Değerlendirmeler

4.2.1. Işık mikroskopisi-histopatolojik değerlendirmeler

Fruktoz verilen grupta, stria vaskularis epitel hücrelerinde düzensizlik, sitoplazmik vakuolizasyonlar ve atrofi gözlenmektedir. Özellikle stria vaskularisin intermediate ve marjinal hücrelerindeki değişimler dikkati çekmektedir.

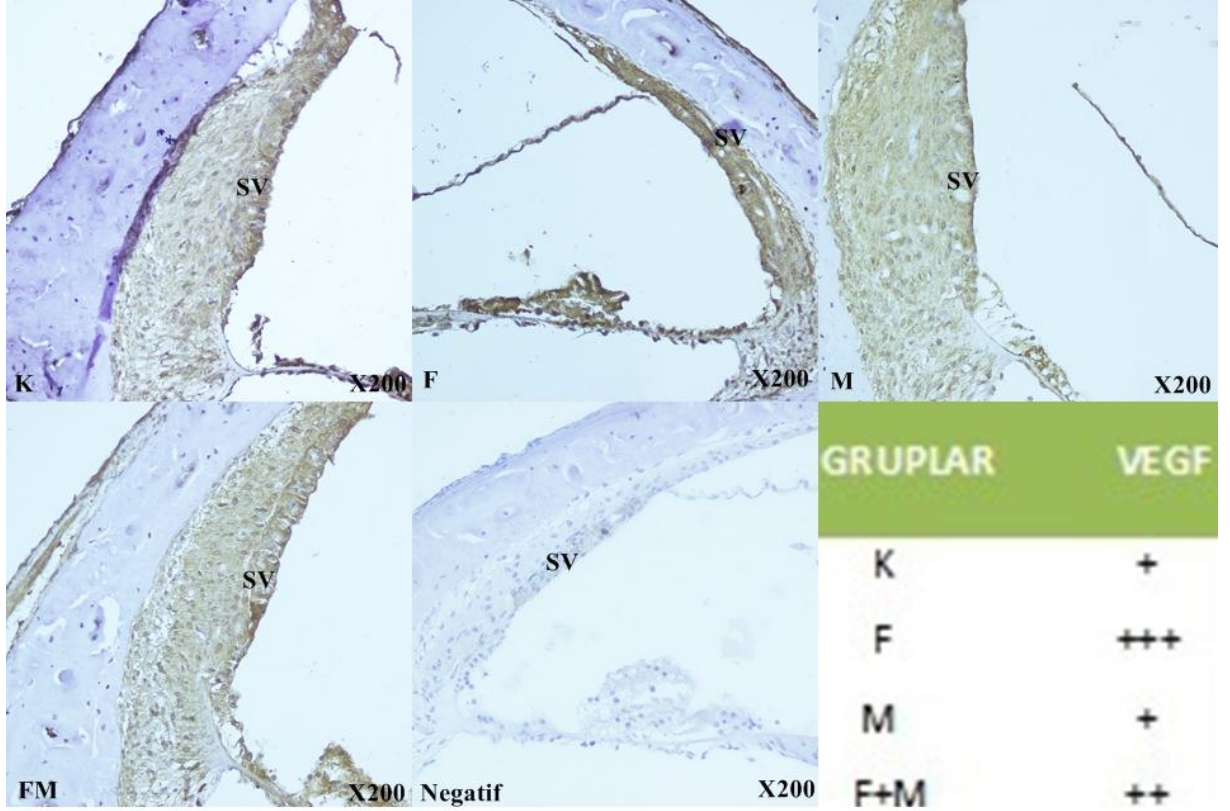
Bu bulgular; Fruktoz+Metformin grubunda, metformin uygulamasına rağmen stria vaskularis epitel hücrelerindeki dejenerasyonun varlığı belirgindir. Intermediate ve marjinal hücrelerde ortaya çıkan bu dejenerasyonun; stria vaskularis kapiler bazal membranlarındaki kalınlaşmadan kaynaklandığını düşünülmektedir (Stria vaskularis epitelinin kapiler bazal membranlarındaki özel bir boyama yapmadığımız için BM kalınlaşmasını yazılmadı).

Metformin grubunda ise koklea histolojisi normale oldukça yakın görünüme sahiptir (Şekil 4-9).



Şekil 4-9 : Kokleanın kontrol (K), fruktoz (F), metformin (M) ve fruktoz+metformin (FM) verilen gruplardaki Hematoksilen+ Eosin (H+E) boyanmış mikrografları izlenmektedir.

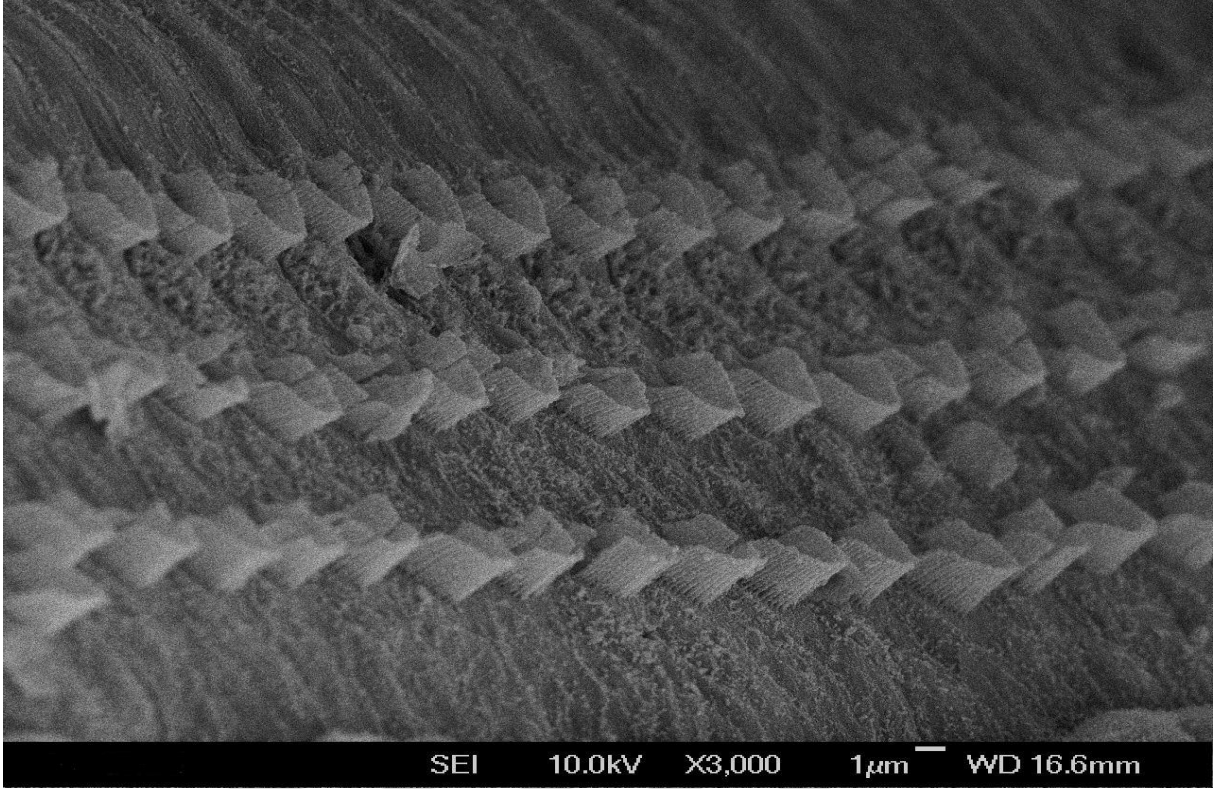
Yapılan incelemelerde, kontrol grubunda VEGF ekspresyonu bulunmaktadır. Fruktoz verilen grupta ise stria vaskularis epitel hücrelerinde VEGF immunreaktivitesinin arttığı, ancak Fruktoz+Metformin grubunda VEGF immunreaktivitesinin Fruktoz grubuna kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Metformin grubunda ise stria vaskularis epitel hücrelerinde VEGF immunreaktivitesinin, kontrol grubuyla aynı düzeylerde olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4-10).



Şekil 4-10 : Kokleanın kontrol (K), fruktoz (F), metformin (M) ve fruktoz+metformin (FM) verilen gruplardaki VEGF immunreaktivitesini gösteren mikrograflar gözlenmektedir. VEGF ve hematoksilen artalan boyaması.

4.3. Elektron mikroskopisi-Ultrastruktürel Değerlendirmeler

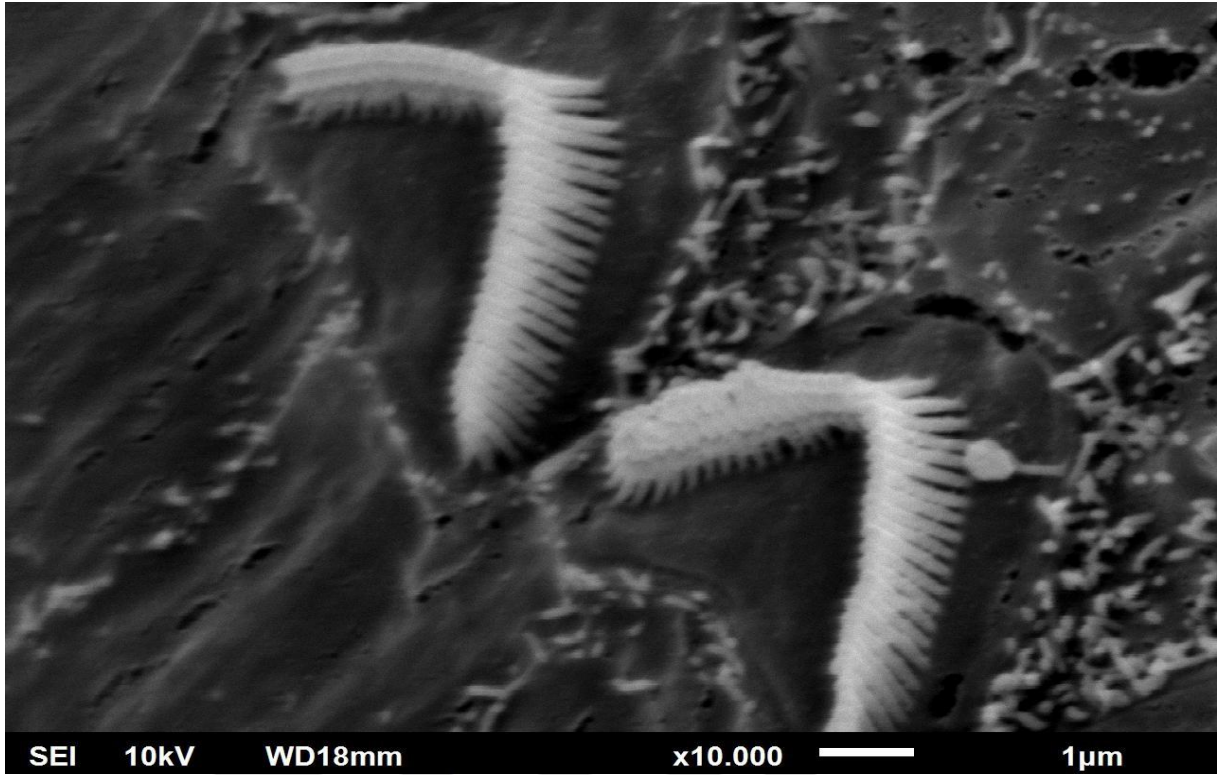
Kontrol grubumuzda sekiz kobayın 16 kulağında yapılan Corti organı yüzey morfolojisi incelemesinde; 14 kulakta tüm koklear segmentlerde hücreler normal olarak değerlendirildi. Yalnızca iki kulakta DTH stereosilyalarında düzensizlik mevcut idi. Histolojik skorlama sonucunda; 14 koklea 0 puan, bir koklea 2 puan ve bir koklea 1 puan (ortalama=0,21) ile değerlendirildi. DTH sterosilya morfolojisi dizilimi değerlendirildiğinde dejenerasyon tespit edilmedi (Şekil 4-11, 4-12).



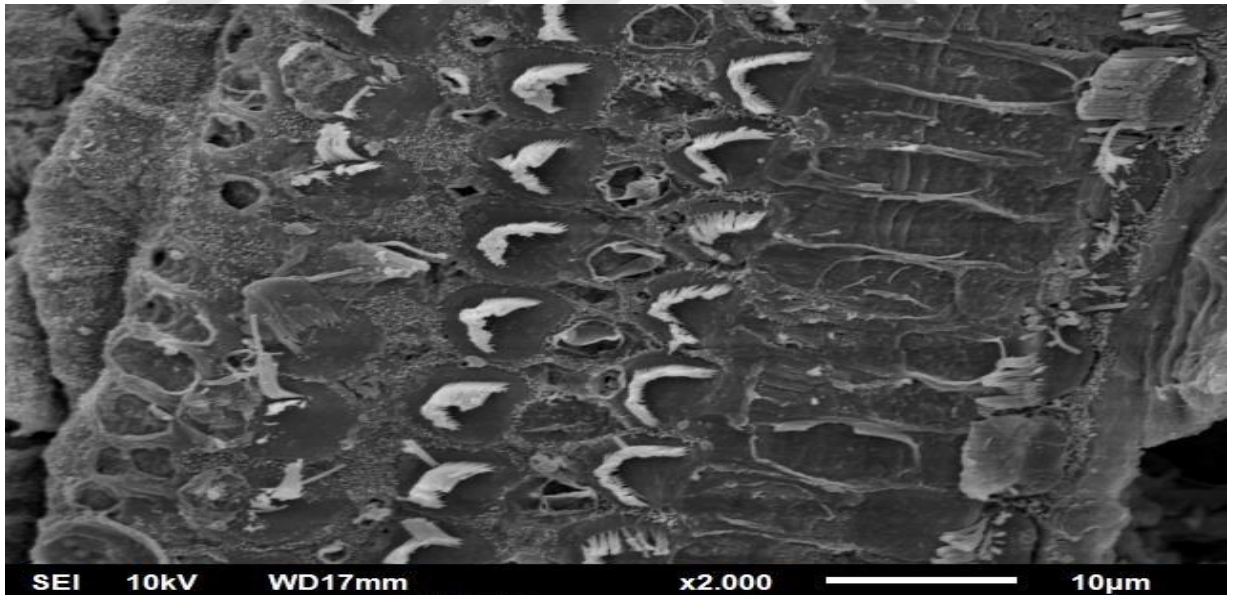
Şekil 4-11 : Kontrol grubuna ait bir kobayın Corti organı yüzeyinin SEM görüntüsü

Fruktoz grubumuzda sekiz kobayın on altı kulağında yapılan Corti organı yüzey anatomisi incelemesinde; on iki kobayın koklealarında yan yüzey bağlantılarında düzensizlikler, kollaps, düzensiz ayrılmalar ve 1/3 bazal bölgesinde dejenerasyon gözlemlendi. Bir kulakta kokleanın 2/3 bazal ve orta bölgesinde düzensizlik, yapışıklık ve parsiyel kayıplar, diğer bir kokleada ise DTH sterosilyalarında düzensizlik ve yapışıklıklara rastlandı. İki kulakta ise kokleanın 1/3 orta bölgesinde DTH sterosilyalarında düzensizlik, parsiyel kayıplar ve yer yer tam kayıplar mevcut idi (Şekil 4-13,4-14,4-15).

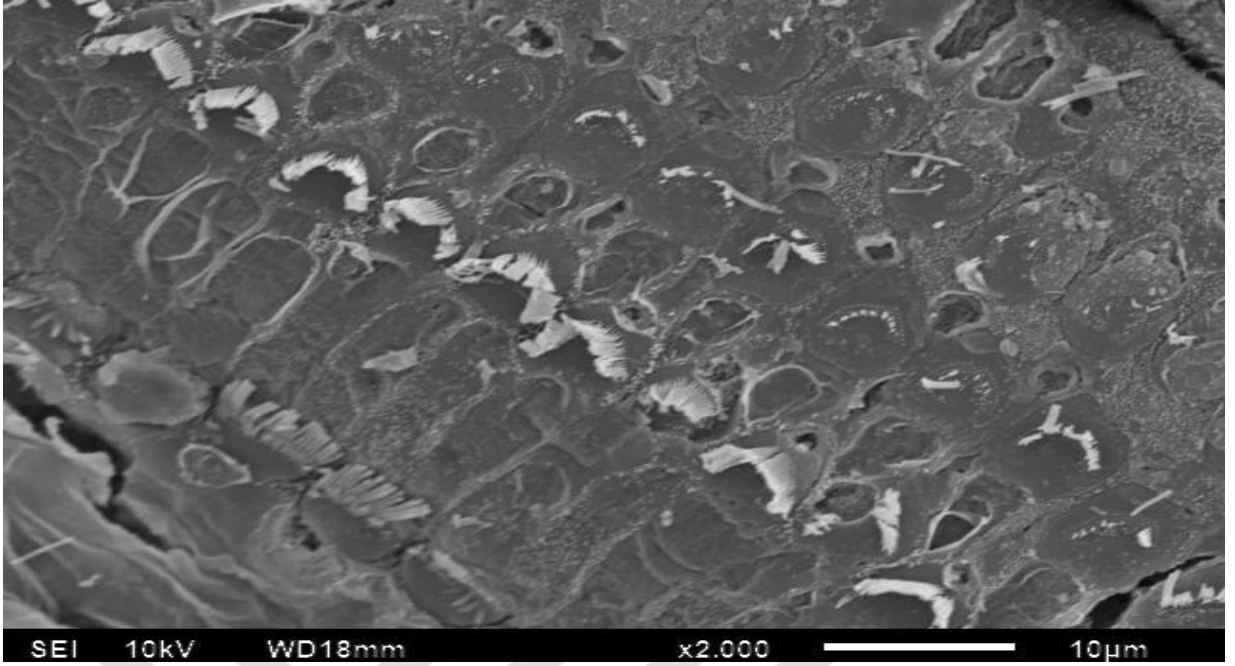
Böylece on iki koklea 48, bir koklea 6, bir koklea 4, iki koklea ise 5 puan ile (ortalama= 4,25) değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$)



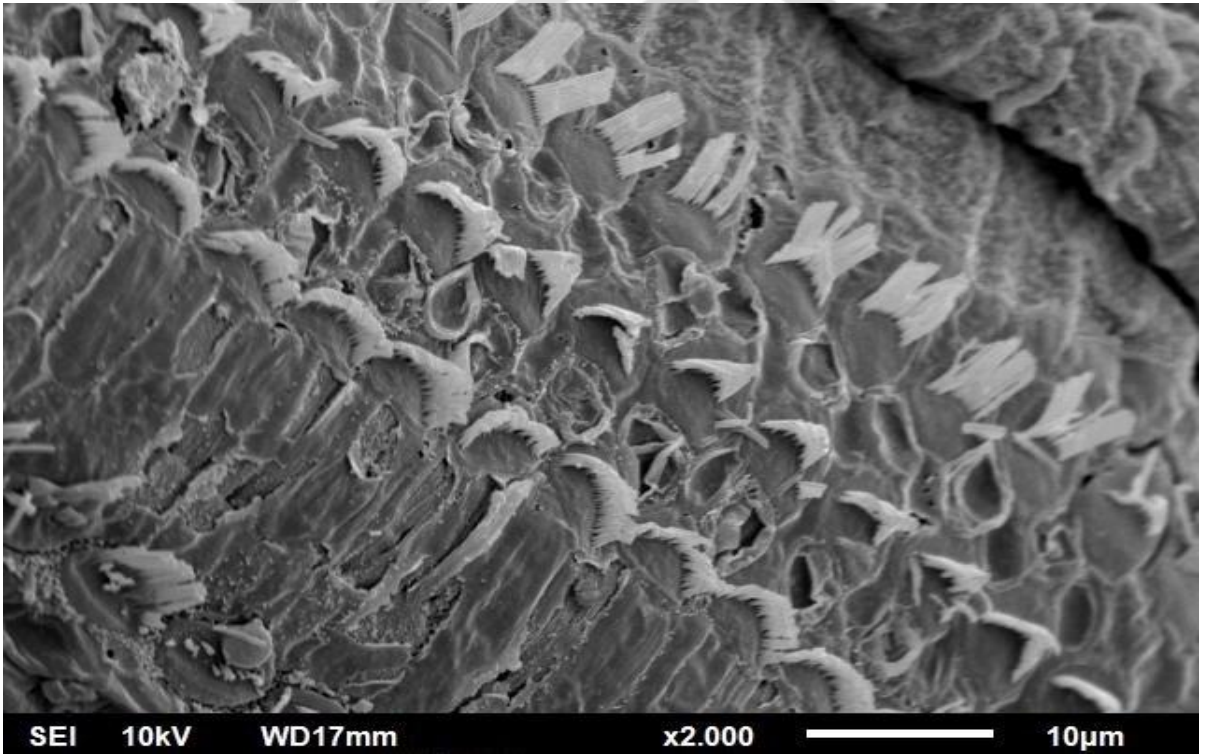
Şekil 4-12 : SEM değerlendirmesinde kontrol grubu dış tüylü hücre stereosilya morfolojisi



Şekil 4-13 : Fruktoz grubuna ait Corti organı yüzeyindeki DTH stereosilyalarının yer yer tamamen kaybolduğu, parsiyal kayıplar ve stereosilyalarda yapışıklıklar gözlenmektedir.

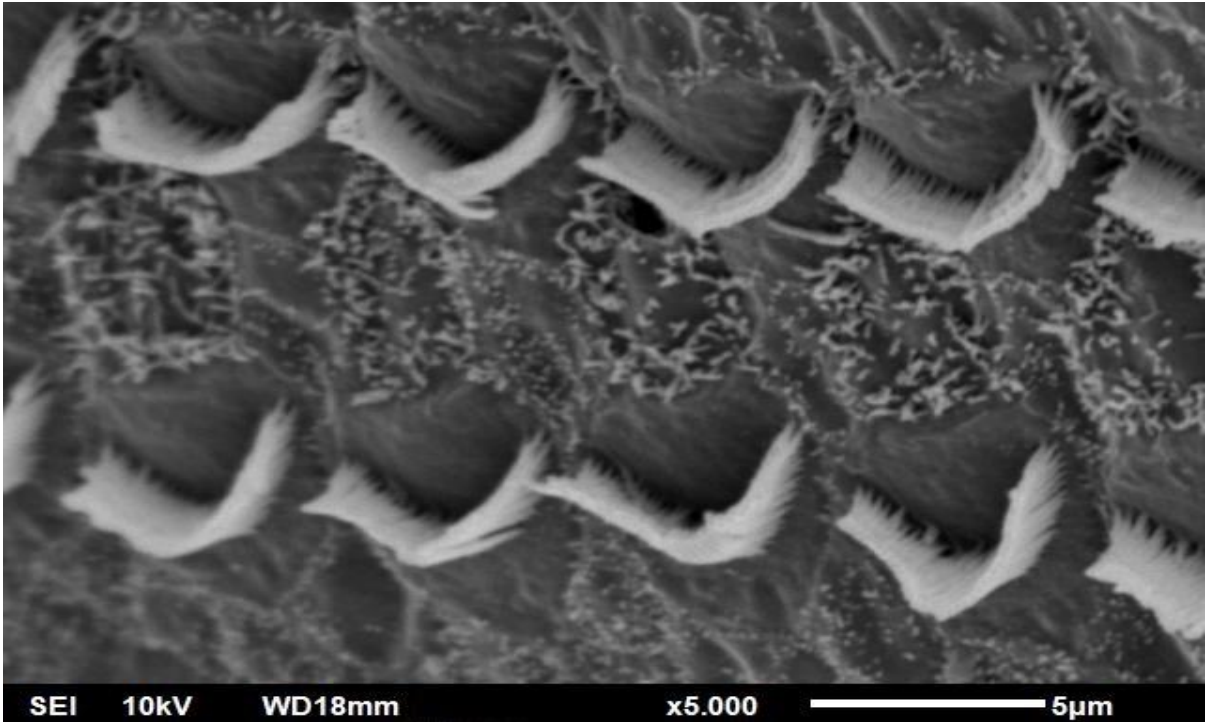


Şekil 4-14 : Fruktoz grubuna ait Corti organı yüzeyindeki DTH ikinci ve üçüncü sıralarında total stereosilya kaybı gözlenmektedir.

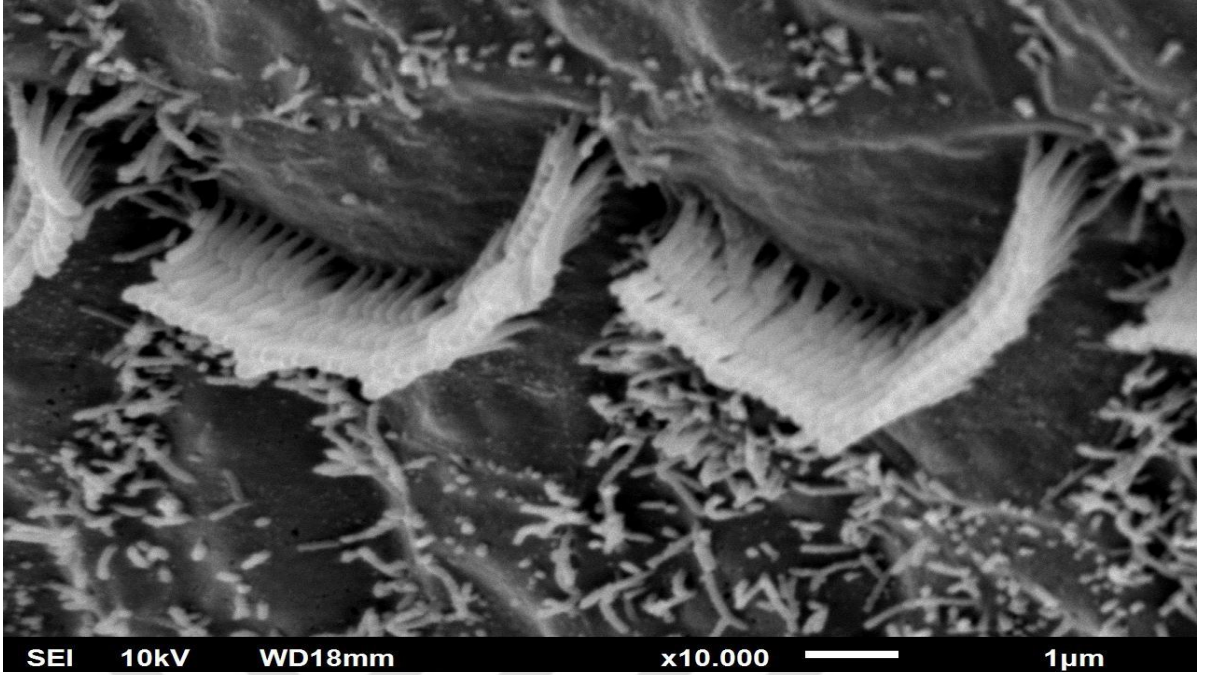


Şekil 4-15 : Fruktoz grubuna ait Corti organı SEM görüntüsünde DTH stereosilyalarında yapışıklıklar, yer yer parsiyal kayıplar (→) gözlenmektedir

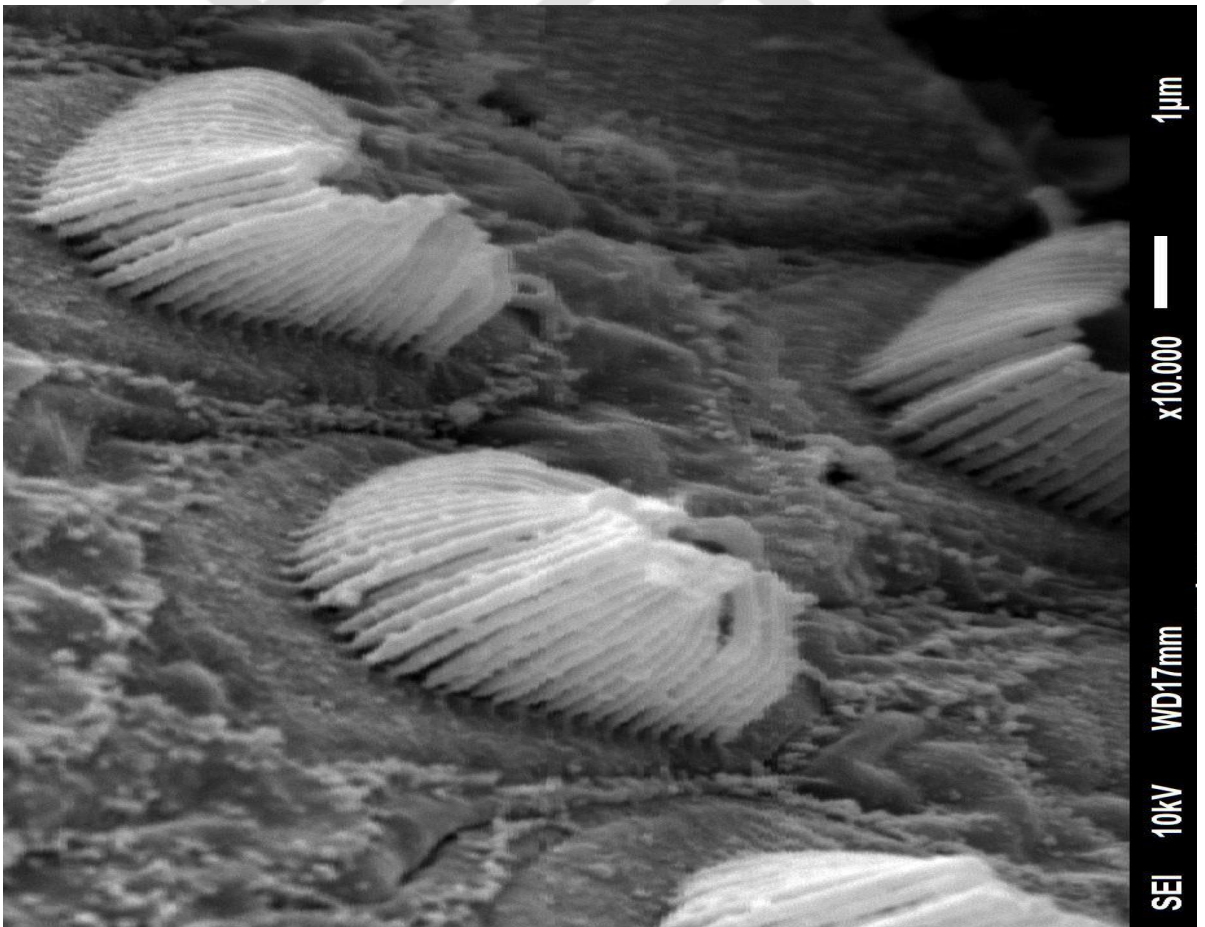
Metformin grubumuzda sekiz kobayın on altı kulağında yapılan Corti organı yüzey anatomisi incelemesinde; on iki kokleada tüm koklea boyunca hücreler normal olarak değerlendirildi. İki koklea DTH stereosilyalarında düzensizlik ve yapışıklıklar mevcut idi. Histolojik skorlama sonucunda; on iki koklea 0 puan ve dört koklea 2 puan (ortalama=0,5) ile değerlendirildi. DTH stereosilya morfolojisi dizilimi değerlendirildiğinde dejenerasyon tespit edilmedi (Şekil 4-16,4-17,4-18).



Şekil 4-16 : Metformin grubuna ait bir kobayın Corti organı yüzeyinin normal dış tüylü hücre stereosilya görüntüsü

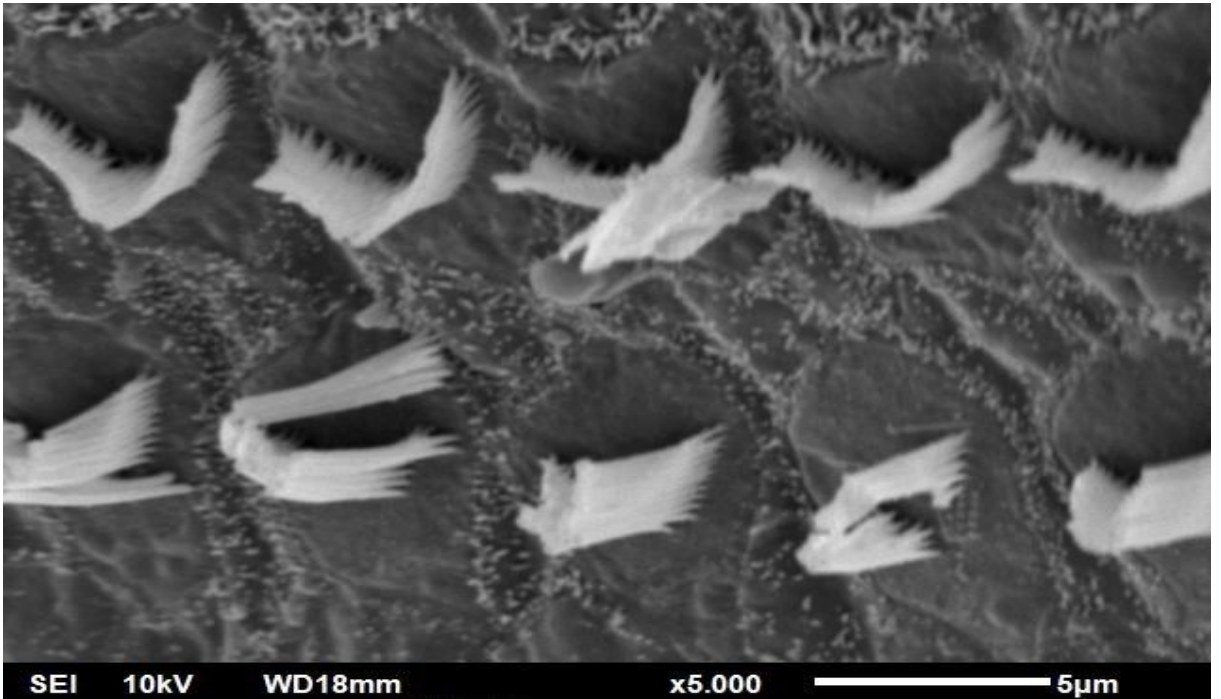


Şekil 4-17 : Metformin grubuna ait bir kobayda normal dış tüylü hücre sterosilya görüntüsü

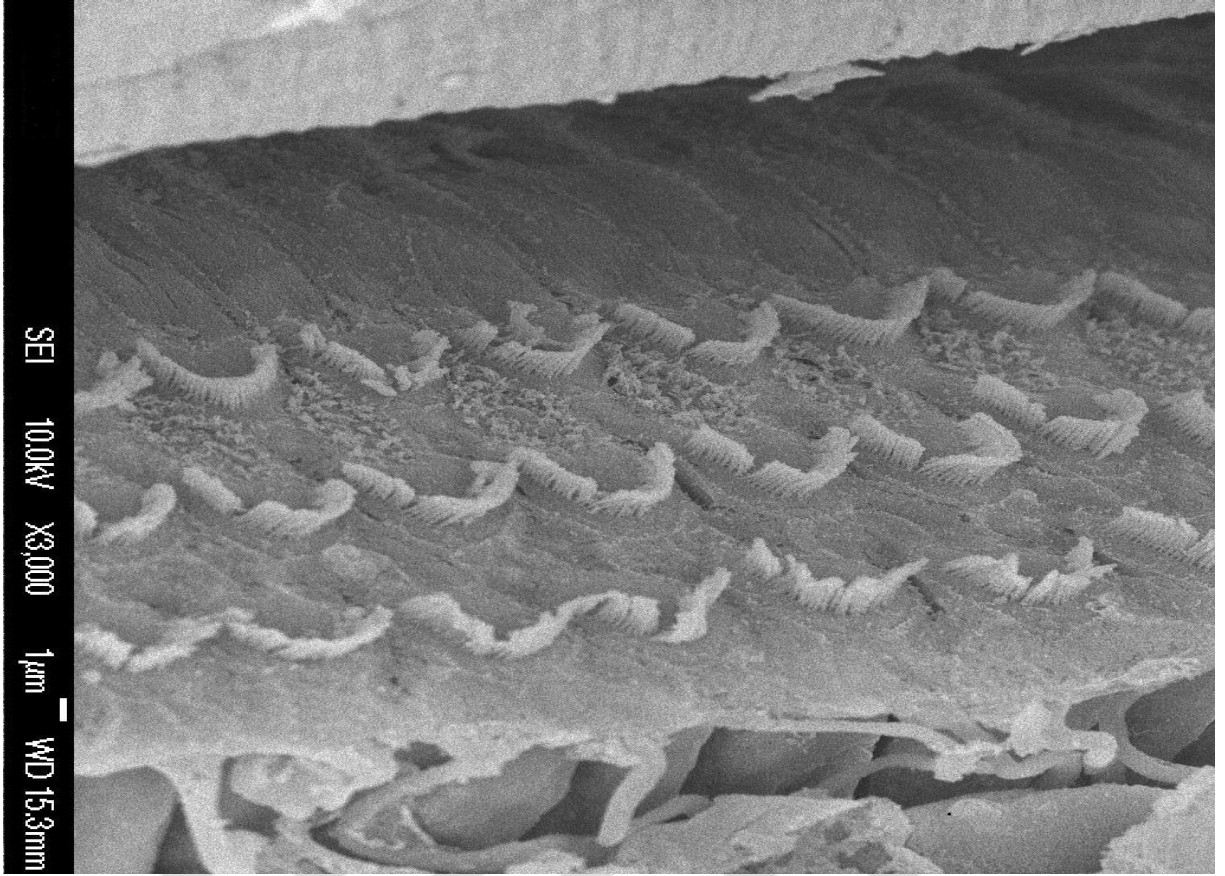


Şekil 4-18 : Metformin grubuna ait bir kobayda normal dış tüylü hücre sterosilya görüntüsü

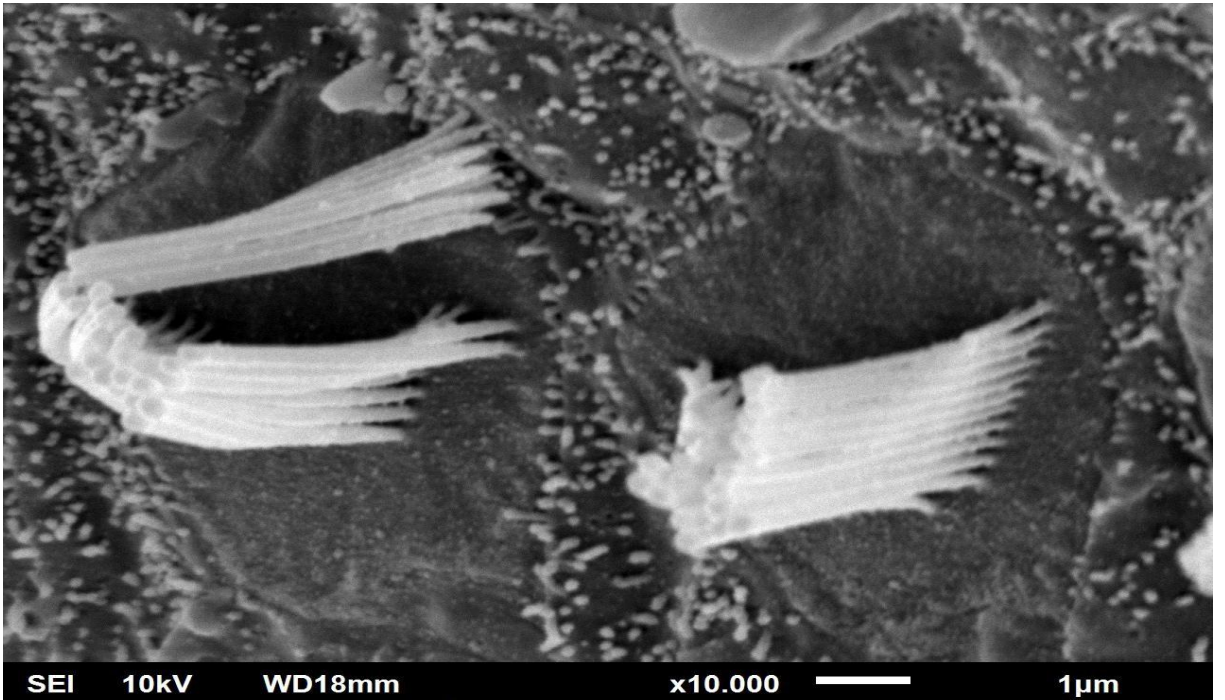
Fruktoz+metformin grubumuzda sekiz kobayın on altı kulağında yapılan Corti organı yüzey anatomisi incelemesinde; dört kulakta normal hücre görünümü, sekiz kokleada yan yüzey bağlantılarında düzenli ayrılma ve stereosilyalarda yapışıklık tespit edildi. Dört kulakta kokleanın bazal (1/3) bölgesinde, DTH stereosilyalarında düzensizlik, yapışıklık ve parsiyal kayıplar gözlendi (Şekil 4-19,4-20,4-21). Böylece sekiz koklea 3, dört koklea 3, bir koklea ise 5 puan ile (ortalama= 2,56) değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4-19 : Fruktoz+Metformin grubundaki bir kobayın Corti organı yüzeyinde DTH stereosilyalarında yapışıklık ve kısmi kayıplar gözlenmektedir.



Şekil 4-20 : Fruktoz+Metformin grubundaki bir kobayın Corti organı yüzeyinde DTH stereosilyalarında yapışikliklar gözlenmektedir.



Şekil 4-21 : Fruktoz+Metformin grubundaki bir kobayın Corti organı yüzeyinde DTH stereosilyalarında yapışikliklar gözlenmektedir.

4.4. Moleküler Analizler

4.4.1. Biyokimyasal parametreler

Kan glukoz düzeyleri ve vücut ağırlık değişimleri 0., 3., 10. ve 28. günler arası değerlendirildi. 0.günde gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, kan glukoz düzeyleri ve vücut ağırlık değişimleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). 28. günde kalpten ponksiyonla alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda lipit (total kolesterol, trigliserid, HDL ve LDL), İnsülin ve Lipid Hidroperoksid (LHP) Düzeyleri, Protein Karbonil ve İleri Oksidasyon Protein Ürünleri, İleri Glikasyon Son Ürünleri, Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Miktar Tayini ölçülerek aşağıda sonuçları verilmiştir.

4.4.1.1. Kan glukoz düzeyleri

Gruplar arası karşılaştırmalar yapıldığında kan glukoz düzeylerinde 48. ve 72. saat ölçümlerinde Kontrol ve Metformin gruplarında bir artış gözlenmez iken, Fruktoz ve Fruktoz+Metformin gruplarında artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı elde edilmedi. Grup içi karşılaştırmalarda da 48. ve 72. saat ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). 10. ve 28. günde kontrol ve metformin gruplarında grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak fark gözlenmez iken, fruktoz grubunda 10. ($p<0,05$) ve 28. ($p<0,001$) günlerde kan glukoz düzeylerinde grup içi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış gözlemlendi. Fruktoz+metformin grubunda ise 10. günde ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmesine rağmen, 28. günde ($p>0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4-9)

Tablo 4-9: Gruplarda kan glukoz değerleri (mg/dl)

Grup/gün	Kontrol	Fruktoz	Metformin	Fruk+Met
	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
0. gün	100,94±4,75	100,27±6,33	98,38±1,82	98,69±3,59
2. gün	102,38±5,18	118,53±15,46	104,19±11,64	112,81±9,15
3. gün	102,75±4,31	132,73±8,46	111,063±9,04	127,94±16,14
10. gün	102,13±4,01	156,4±12,48	111,25±13,45	154,88±10,43
28. gün	95,38±4,59	195,33±14,44	102,25±8,68	125,81±5,44

4.4.1.2. Serum lipit düzeyleri

Gruplarda işitsel değerlendirmeler sonlandırıldıktan sonra alınan kan örneklerinde, gruplar arası karşılaştırmalarda serum lipit düzeylerinde kontrol ve metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmez iken ($p>0,05$), Fruktoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0,05$). Fruktoz+Metformin grubunda serum lipit düzeylerinde sadece total kolesterol düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4-10 : Gruplara ait serum lipit düzeyleri (mg/dl)

Grup	Kontrol (n=8) Ort±SS	Fruktoz (n=8) Ort±SS	Metformin (n=8) Ort±SS	Fruk+Met (n=8) Ort±SS
Total Kolestrol	19,31±4,08	39,73±5,08	16,94±3,8	24,56±4,19
Trigliserid	95,75±8,31	129,07±16,22	94,13±9,34	92,19±8,75
LDL	10,25±2,7	10,33±6,5	9,63±2,28	12,75±2,84
HDL	22,19±4,13	41,67±5,5	21,31±3,77	23,25±2,93

4.4.1.3. Vücut ağırlık değişimleri

Gruplar arası karşılaştırmalar yapıldığında vücut ağırlık değişimleri için Fruktoz grubunda 10. ve 28. günlerde Fruktoz+Metformin grubunda göre istatistiksel olarak anlamlılık gözlenir iken ($p<0,05$), kontrol ve metformin grupları ile karşılaştırıldığında ise 2. gün ölçümlerinden itibaren 3., 10. ve 28. gün ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0,05$). Fruktoz+Metformin grubu, Metformin ve Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ise 10. gün ölçümlerinde istatistiksel olarak bir fark gözlenir iken ($p<0,05$), 28. gün ölçümlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir saptanmadı ($p>0,05$). Grup içi karşılaştırmalar yapıldığında ise Fruktoz grubunda 2. gün ölçümlerinden itibaren 3., 10. ve 28. gün ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenir iken Fruktoz+Metformin grubunda 10. ve 28. gün ölçümlerinde gözlendi ($p<0,05$). Kontrol ve metformin gruplarında ise vücut ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$)

Tablo 4-11 : Kobayların vücut ağırlık değişimleri (gr)

Grup/gün	Kontrol (n=8) ort±SS	Fruktoz (n=8) ort±SS	Metformin (n=8) ort±SS	Fruk+Met (n=8) ort±SS
0. gün	413,44±71,24	464,53±95	425,63±40,08	452,5±85,20
2. gün	417,94±63,45	473,73±92,53	424,56±35,26	453,38±87,19
3. gün	423,56±63,19	485,67±88,77	433,19±32,93	460,94±86,15
10. gün	435,63±61,44	515,93±88,56	444,94±31,72	486,44±83,82
28. gün	447,63±61,35	554,6±98,05	454,25±31,56	496,94±84,53

4.4.1.4. Serum insülin düzeyleri

Gruplarda işitsel değerlendirmeler sonlandırıldıktan sonra 28. günde alınan kan örneklerinde, gruplar arası karşılaştırmalarda serum insülin düzeylerinde kontrol ve metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmez ($p>0,05$) iken, Fruktoz grubunda serum insülin düzeylerinde kontrol, metformin ve kontrol+metformin gruplarına göre belirgin bir artış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,001$). Fruktoz+Metformin grubunda serum insülin düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen bu artış Fruktoz grubuna göre daha az bulundu ve Fruktoz grubu ($p<0,05$), Kontrol ve kontrol+metformin grupları ($p<0,001$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.

Tablo 4-12 : Gruplarda serum insülin düzeyleri (mU/ml)

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
Insülin	20.69±1.31 ^a	48.25±3.36 ^b	20.19±3.08 ^c	36.34±4.17 ^d

a-c: $p>0,05$ b-a; b-c: $p<0,001$ b-d: $p<0,05$

4.4.1.5. Serum Lipid Hidroperoksid Düzeyleri

Gruplar arası karşılaştırmalarda serum Lipid Hidroperoksid (LHP) düzeylerinde kontrol ve metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Fruktoz grubunda LHP düzeylerinde kontrol, metformin ve

kontrol+metformin gruplarına göre belirgin bir artış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.001$). Fruktoz+Metformin grubunda serum LHP düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen bu artış Fruktoz grubuna göre daha az bulundu ve Fruktoz grubu ($p<0,05$), Kontrol ve kontrol+metformin grupları ($p<0.001$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı.

Tablo 4-13: Gruplarda serum Lipid Hidroperoksid düzeyleri (nmol/ml)

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
Lipid Hidroperoksid	3.68±0.27 ^a	5.98±0.75 ^b	3.83±0.51 ^c	4.66±0.54 ^d
a-c: $p>0,05$	b-a; b-c: $p<0.001$	b-d: $p<0,05$		

4.4.1.6. Serum Protein Karbonil Düzeyleri

Gruplar arası karşılaştırmalarda serum **Protein Karbonil** (PK) düzeylerinde kontrol, metformin ve fruktoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Fruktoz grubunda PK düzeylerinde kontrol, metformin ve kontrol+metformin gruplarına göre belirgin bir artış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.001$). Fruktoz+Metformin grubunda serum PK düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi ($p>0,05$).

Tablo 4-14: Gruplarda serum Protein Karbonil düzeyleri (ng/ml)

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
Protein Karbonil	33.12±1.94 ^a	43.98±4.92 ^b	31.63±1.40 ^c	38.67±1.94 ^d
a-c; a-d; c-d: $p>0,05$	b-a; b-c; b-d: $p<0.001$			

4.4.1.7. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Düzeyleri

Gruplar arası karşılaştırmalarda serum İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) düzeylerinde kontrol, metformin ve fruktoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Fruktoz grubunda AOPP düzeylerinde kontrol, metformin ve kontrol+metformin gruplarına göre belirgin bir artış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0,001$). Fruktoz+Metformin grubunda serum AOPP düzeylerinde artış gözlenmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi ($p>0,05$).

Tablo 4-15 : Gruplarda İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Düzeyleri (ng/ml)

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
AOPP	10.59±0.60 ^a	12.92±0.94 ^b	9.69±0.77 ^c	11.23±1.07 ^d
a-c; a-d; c-d: $p>0,05$		b-a; b-c; b-d: $p<0,001$		

4.4.1.8. Serum İleri Glikasyon Son Ürünleri Düzeyleri

Gruplar arası karşılaştırmalarda serum İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGEs) düzeylerinde kontrol, metformin ve fruktoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Fruktoz grubunda AGEs düzeylerinde kontrol, metformin ve kontrol+metformin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0,05$). Fruktoz+Metformin grubunda serum AGEs düzeylerinde azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi ($p>0,05$).

Tablo 4-16 : Gruplarda İleri Glikasyon Son Ürünleri Düzeyleri (ng/ml)

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
AGEs	9.71±0.48 ^a	10.91±0.54 ^b	9.51±0.52 ^c	9.95±0.49 ^d
a-c; a-d; c-d: $p>0,05$		b-a; b-c; b-d: $p<0,05$		

AGEs: İleri Glikasyon Son Ürünleri

4.4.1.9. Serum Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Miktar Tayini (FRAP)

Gruplar arası karşılaştırmalarda serum **Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP)** düzeylerinde kontrol ve metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Fruktoz grubunda **FRAP** düzeylerinde kontrol, metformin ve kontrol+metformin gruplarına göre belirgin bir azalma ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlendi ($p<0.001$). Fruktoz+Metformin grubunda, kontrol ve metformin gruplarına göre serum **FRAP** düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edildi ($p<0,05$). Metformin grubunda FRAP düzeyleri özellikle Fruktoz ve Fruktoz+Metformin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.0001$) artmış olarak elde edildi.

Tablo 4-17 : Gruplarda Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç ($\mu\text{M/L}$)

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
FRAP	41.73±1.95 ^a	30.37±1.41 ^b	42.68±1.15 ^c	34.47±2.05 ^d

a-c: $p>0,05$ b-a; b-c: $p<0.001$ b-d: $p<0,05$ d-a; d-c: $p<0,05$

c-b; c-d: $p<0.0001$

FRAP: Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç

4.4.2. Glut5 Gen Ekspresyonu

Elektrofizyolojik ölçümleri tamamlanan kobaylar, dekapite edilerek cerrahi girişimle temporal kemikleri disseksiyonu sonrasında kokleada Glut5 gen ekspresyonunun incelenmesi için kokleada RNA izolasyonu gerçekleştirilerek ekspresyon tayini yapıldı ve gen ifadesine bakıldı.

Gruplar arası karşılaştırmalarda koklear metaryelden elde edilen dokularda **Glut5 Gen Ekspresyonu** değerlendirildiğinde kontrol, metformin ve fruktoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Fruktoz grubunda **Glut5 gen ekspresyonu** kontrol, metformin ve fruktoz+metformin gruplarına göre belirgin bir artış gösterdi ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı

($p < 0.0001$). Fruktoz+Metformin grubunda gen ekspresyonunda artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi ($p > 0,05$).

Tablo 4-18 : Gruplarda Glut5 gen ekspresyonu düzeyleri

Grup	Kontrol (n=8)	Fruktoz (n=8)	Metformin (n=8)	Fruk+Met (n=8)
GLUT5	0.55±0.23 ^a	5.77±2.01 ^b	0.65±0.38 ^c	1.24±0.5 ^d
b-a; b-c; b-d: $p < 0.0001$		a-c; a-d; c-d: $p > 0,05$		



5. TARTIŞMA

Çalışmamızda fruktozdan zengin diyetle ilgili olarak oluşan metabolik değişimlerin işitme sistemi üzerindeki etkilerini elektrofizyolojik ölçümler, morfolojik bulgular ve biyokimyasal analizler ile değerlendirdik.

Deneyel olarak oluşturduğumuz metabolik sendrom modelimizde amacımız doğrultusunda hücrelerde enerji transferini yönlendiren ve sitosolik AMP/ATP konsantrasyonuna duyarlı olan aktif adenosin monofosfat kinaz (AMPK)'ların, moleküler düzeyde bir antidiyabetik ajan olarak kullanılan metformin ile etkinleştirilmesi sonucu oluşan metabolik değişimlerin koklear fonksiyonlar üzerindeki etkilerini araştırdık.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda AMPK'ların kokleada ototoksisitede (Chang, 2014) özellikle akustik travmada (Föllner, 2012) kokleadaki tüylü hücrelerin korunmasında önemli bir protein olduğu gösterilmiştir. Föllner ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada AMPK gen ekspresyonu olan ve olmayan iki grup oluşturulmuş, akustik travma öncesi ve sonrası işitsel uyarılmış beyinsapı cevapları değerlendirilmiştir. AMPK gen ekspresyonu olmayan farelerde akustik travmadan iki hafta sonra kalıcı işitme kaybı gelişmiştir. AMPK gen ekspresyonu olan farelerde ise aşırı akustik travmada AMPK Ca^{+2} ile aktive olan K^{+} kanalları ile K^{+} çıkışını artırarak hücreyi hiperpolarizasyon fazına getirmiş, bu durumda dış tüylü hücrelerde hücrenin aşırı bir şekilde uyarılabilirliğini azaltmış ve dejenerasyonu önlemiştir.

Metformin, oksidatif strese bağlı hücre ölümlerini mitokondriye bağımlı bir mekanizma ile önlediği bilinmektedir (Chang, 2014). Metforminin özellikle antioksidan, antihiperlipidemik (Alhaider, 2011) ve antihiperlipidemik (Yuan, 2012) etkilerinin yanı sıra, antiinflamatuvar (Kita, 2012) ve antiapoptotik (Yuan, 2012) özellikleri ile karaciğer ve böbrek gibi dokularda koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu açıdan özellikle diyabetik komplikasyonların azaltılmasında veya önlenmesinde etkili olmaktadır.

Fruktozdan zengin diyetle ilgili olarak yapılan deneyel çalışmalarda oluşabilecek metabolik değişimler ile ilgili olarak tam bir uyum gözlenmemesine rağmen, deney hayvanının türü ve sayısı, fruktoz miktarı ve veriliş şekli, genç veya

yetişkin olması da farklılıklara yol açmaktadır (de Moura, 2009). İçme suyu ile verilen fruktoz miktarları %5-50 arasında değişiklik göstermektedir (Mamikutty, 2014).

Çalışmamızda fruktozdan zengin diyeti 4 hafta boyunca orogastrik gavaj yöntemi ile % 30 'luk fruktoz çözeltisi (300gr/lt) uygulayarak, metabolik değişimleri değerlendirdik. Fruktoz bakımından zengin diyetler, deneysel çalışmalarda (de Moura, 2009; Axelsen, 2010) metabolik ve fizyolojik değişimlere neden olduğu için kullanılmış ve açlık kan şekeri, trigliserit (TG) düzeylerinde artışla birlikte insülin direnci geliştirdiği gösterilmiştir (Song, 2012). Song ve ark (2012)'nin yaptıkları çalışmada fruktozdan zengin diyetin obezite ve metabolik sendrom bulguların gelişmesine bağlı olarak, yapılan yeni çalışmalarla birlikte alkolden bağımsız karaciğer yağlanması için risk faktörü olacağını göstermişlerdir.

Çalışmamızda 4 haftalık orogastrik gavaj yolu ile fruktozdan zengin diyet sonucunda kobaylarda kontrol grubuna göre vücut ağırlık değişimlerinde, kan glukoz, serum lipid ve insülin düzeylerinde, metabolik sendromun oluştuğuna dair istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Tablo 4-9, 4-10, 4-11, 4-12). 4 hafta boyunca ölçülen vücut ağırlık değişimleri ve kan glukoz düzeylerinde, fruktoz grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir artış tespit edildi. Fruktoz+metformin grubumuzda ise 28. günde kan glukoz düzeylerinde kontrol ve metformin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Metformin ile yapılan hayvan çalışmalarında (Stepensky, 2005; Li, 2014) metforminin diyabetik ratlarda glukoz düzeyini düşürücü etkisinin oldukça yüksek olduğunu ve 500 mg metforminin insülin duyarlılığını önemli derecede değiştirdiği, plazma metformin düzeyi ile kan glukoz düzeyindeki azalmanın ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

Oral bir antidiyabetik ajan olarak metforminin, hiperglisemiyi azalttığı fakat hipoglisemi yapmadığı ve hiperlipidemiyi önlediği bilinmektedir (American Diabetes Association, 2005). Cusi ve ark (1998) yaptıkları bir çalışmada, metforminin LDL ve VLDL kolesterol konsantrasyonunu düşürürken, HDL konsantrasyonu yükselttiklerini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 4. hafta sonunda serum lipid düzeylerine baktığımızda; fruktoz grubunda diğer gruplarına göre total kolesterol, trigliserit, LDL düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenirken, HDL düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Fruktoz+metformin grubunda; total kolesterol düzeylerinde kontrol ve metformin gruplarına göre bir artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlılık elde edilemedi. Metformin grubunda; LDL, HDL, total

kolestrol, TG konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre değişiklik gözlenmedi. Fruktoz+metformin grubunda ise metabolik değişimlerin gözleendiği 10. günden itibaren fruktozdan zengin diyete ek olarak metformin uyguladığımızda 28. günde LDL, total kolestrol ve TG düzeylerinde istatistiksel olarak belirgin bir düşüş gözlenir iken, HDL konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmedi. Çalışmamızda litaretür bulguları ile uyumlu olarak metforminin, hiperglisemi ve hiperlipidemi önlediği yönünde bulgular elde ettik.

Yapılan çalışmalarda (Dam, 2002; Karaağaç, 2011) diyabette prooksidan-antioksidan dengenin prooksidasyon yönünde değiştirdiği ve diyabete bağlı olarak oluşan komplikasyonların engellenmesinde, antioksidan bileşiklerin destekleyici bir tedavi olarak yararlı olabileceği ileri sürülmüştür. Diyabete bağlı protein oksidasyon ürünlerinin azalmasıyla birlikte serbest radikal oluşumundaki inflamatuvar etkilerin ortadan kaldırılmasında metformin uygulamasının önemli olduğu gösterilmiştir (Farah, 2008). Yapılan başka bir çalışmada (Xie, 2008) metformin uygulamasıyla diyabete oluşan süperoksit anyonlarının DNA oksidasyonunu engellediği gösterilmiştir. Çalışmamızda Lipid Hidroperoksid Düzeyleri, Protein Karbonil, İleri Oksidasyon Protein Ürünleri ve İleri Glikasyon Son Ürünlerinde fruktoz grubunda diğer gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözledik ($p<0,05$). Antioksidan aktivite değerlendirildiğinde ise fruktoz grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemledik. Metformin grubunda fruktoz ve fruktoz+metformin grubuna göre belirgin bir artış tespit ederken, kontrol grubunda daha az bir artış olduğunu gözledik. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, metforminin prooksidan-antioksidan yönündeki dengeyi antioksidan yönünde değiştirdiğini düşündük. Çalışmamızda özellikle antiapoptik ve antioksidan özelliklerinden dolayı antidiyabetik bir ajan olarak kullanılan metforminin, koklear fonksiyonlar üzerindeki olumlu veya olumsuz etkilerini görebilmek amacıyla kullandık.

Diyabet ve işitme kaybı arasındaki ilişkiyi ilk kez Jordao 1875 yılında ortaya konmuştur (Fujita, 2012). Bu çalışmayı destekleyen yayınlarla birlikte (Cullen, 1993; Kakarlapudi, 2003), aksi görüşte olan çalışmalar da bulunmaktadır (Miller, 1983). Diyabetin işitme kaybı açısından, bağımsız bir risk faktörü olduğu daha sonraki yıllarda ileri sürülmüştür (Bainbridge, 2008; Ishii, 1992; Jang, 2011). Diyabetik mikroanjiyopati, ensefalopati ve nöropati diyabet ile ilişkili işitme kaybına neden olarak tanımlanmıştır (Smith, 1995). Fujita (2012) ve ark yaptıkları çalışmada diyabetik ratlarda ABR

eşiklerinde 4 kHz, 8 kHz, 16 kHz, 32 kHz’de kontrol grubuna göre, 1 aylık, 3 aylık ve 5 aylık takiplerde bir artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise streptozin enjeksiyonu ile diyabet oluşturulan ratlarda klik uyararla yapılan ABR ölçümlerinde, sırası ile enjeksiyon öncesi ve sonrası kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmuşlardır(Liu, 2008).

Lasagni ve ark. (2016) tip 1 diyabetli 33 hastada DPOAE cevaplarında özellikle orta frekanslarda (2,4 kHz ve 4 kHz) kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptamışlardır. Yapılan bir meta-analiz çalışmasında ise (Hao, 2017) DPOAE ölçümlerinde özellikle 1 kHz, 2kHz ve 4 kHz’de diyabetik gruplarda kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşün gözlendiğini belirtmişlerdir. Aladağ ve ark (2008) tip 2 diyabetli 40 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, DPOAE amplitüdlerinde 4 kHz de kontrol gruplarına göre anlamlı bir düşüş gözlemişlerdir.

Çalışmamızda ABR testinde, 0.gün ölçümlerinde gruplar arası anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0,05$). 3. ve 10. gün ölçümlerinde fruktoz grubunda 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken, klik uyaranda anlamlı bir fark gözlenmedi. 28. gün ölçümlerimizde ise fruktoz grubumuzda diğer gruplara göre hem klik uyaranda hem de 8 kHz, 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde ettik ($p<0,05$). Grup içi karşılaştırmalarda ölçüm zamanları açısından değerlendirdiğimizde; fruktoz grubunda klik uyaranda 0.güne göre 10.günden ve tone-burst uyararlarda ise 3.günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik. Fruktoz+metformin grubumuzda ise 10. ve 28. günlerde hem klik hem tone-burst uyararlarda 0.güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemledik ($p<0,05$).

Çalışmamızda gruplararası karşılaştırmada DPOAE cevaplarında 0.gün ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Fruktoz grubumuzda diğer gruplarımıza göre 3.gün ölçümlerinde, 0,5 kHz, 0,75 kHz, 3 kHz, 6 kHz, 8 kHz’de, 10. gün ölçümlerinde ise 2 kHz, 3 kHz, 4 kHz, 6 kHz, 8 kHz’de, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). Fruktoz grubumuzda 28. gün ölçümlerimizde de 0,5 kHz, 0,75 kHz, 1 kHz, 1,5 kHz, 6 kHz, 8 kHz, 24 kHz ve 32 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). Fruktoz+Metformin grubumuzda, 3.günden itibaren 0,5 kHz, 0,75 kHz, 1 kHz ve 2 kHz’ de kontrol ve metformin gruplarımıza göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0,05$). Bu grupta 10. gün ve 28. gün

ölçümlerde gruplararası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Fruktoz+Metformin grubunda elde ettiğimiz bu sonuçlar bize metabolik değişimler olduktan sonra 10. günde metformin enjeksiyonuna bağlı olarak ölçüm sonuçlarında farklılık oluştuğunu ve metforminin koruyucu olduğunu göstermektedir. Kontrol ve metformin gruplarımızda ise tüm ölçüm zamanlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Grup içi karşılaştırmalarda ise fruktoz ve fruktoz+metformin grubumuzda 3. günden itibaren DPOAE cevaplarında istatistiksel olarak tüm frekans bantlarında belirgin bir azalma gözlenirken, Fruktoz+Metformin grubumuzda ise 10. gün ve 28. günde bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. DPOAE ve ABR cevaplarında fruktoz grubumuzda, 3. günden itibaren özellikle yüksek frekanslarda farklılıkların gözlenmesi bize kokleanın bazal kıvrımında hasar oluştuğunu belirtmektedir. DPOAE cevaplarında 28.günde 1 kHz, 1,5 kHz, 6 kHz, 8 kHz, 24 kHz ve 32 kHz'de azalma ile birlikte ABR'de (hem klik uyarı hem de 8 kHz, 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz'de) işitme eşiklerinde artış gözlenmesi koklear hasarın bazaldan, kokleanın orta segmentlerine doğru yayıldığını göstermektedir.

Fukushima ve arkadaşlarının yaptıkları histolojik bir çalışmada, diyabetik hastaların stria vaskülaris kapiler duvarlarında kalınlaşma, stria vaskülaris atrofisi ve dış tüylü hücre kaybına sahip olduğu tespit edilmiş (Fukushima, 2006; 2005), başka bir çalışmada da endolenfatik kese ve baziler membran kapillerlerinde mikroanjyopati görülmüştür (Wackym, 1986).

Çalışmamızda ışık mikroskopisi ile yapılan histopatolojik değerlendirmelerde fruktoz grubunda, stria vaskülaris epitel hücrelerinde düzensizlik, sitoplazmik vakuolizasyonlar ve atrofi olduğunu tespit ettik. Özellikle stria vaskülarisin intermediate ve marjinal hücrelerinde değişim olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4-9). Fruktoz+metformin grubunda, metformin uygulamasına rağmen, stria vaskülaris epitel hücrelerinde dejenerasyon olduğu gözlemlendi (Şekil 4-9). Fruktoz grubumuzda intermediate ve marjinal hücrelerde ortaya çıkan bu dejenerasyonun; stria vaskülaris kapiler bazal membranlarındaki kalınlaşmadan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Kontrol ve Metformin grubumuzda ise koklea histolojisinin normale oldukça yakın görünüme sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4-9).

Çalışma gruplarımızda yer alan koblardan elde ettiğimiz elektron mikroskop bulgularımızda, kokleaların bazalinden orta segmentine doğru elde ettiğimiz ultrastruktürel görüntüler elektrofizyolojik bulgularımızla uyumlu bulunmuştur. Fruktoz

grubunda, Corti organı dış tüylü hücre stereosilya morfolojisinde total ve parsiyal kayıplar ile birlikte belirgin bir dejenerasyon olduğunu gözlemledik (Şekil 4-13). Dejenerasyon fruktoz grubumuzda diğer gruplara göre daha belirgin iken, fruktoz+metformin grubumuzda ise daha az oranda dejenerasyon gözlemledik, bu bulgu özellikle metforminin koklear yapılar üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu düşündürmüştür. Fruktoz verilen grupta, iç tüylü hücre hasarından çok, dış tüylü hücrelerde dejenerasyon olduğunu tespit ettik. Bu bulgularımız ABR ve DPOAE ölçümleri ile uyumlu olarak orta derecede işitme kaybını destekler niteliktedir.

Diyabet oluşturulmuş ratlarda, stria vaskülariste VEGF ekspresyonunun arttığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu artışın başlıca sebeplerinin; hiperglisemi ve buna bağlı ROS artışı olduğu düşünülmektedir (Picotti, 2005; Liu, 2008). Çalışmamızda fruktoz grubunda stria vaskülaris epitel hücrelerinde VEGF immunreaktivitesinin arttığı, ancak fruktoz+metformin grubumuzda fruktoz grubuna kıyasla daha az arttığı belirlenmiştir. Metformin grubumuzda ise stria vaskülaris epitel hücrelerinde VEGF immunreaktivitesinin, kontrol grubu ile aynı düzeylerde olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4-10). Bulgularımız ışığında özellikle fruktoz grubumuzda antioksidan kapasitenin diğer gruplarımıza göre azaldığı, prooksidan/antioksidan dengesinin prooksidan lehine bozulduğu tespit edildi. Metformin grubumuzda antioksidan kapasitenin belirgin bir şekilde arttığı, fruktoz grubumuzda ise ROS artışına bağlı olarak VEGF immunreaktivitesinin arttığı gözlemlendi.

GLUT5 bir fruktoz taşıyıcısı olarak, dış tüylü hücre lateral membranında bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Nakazawa, 1995). GLUT5 kokleada işitmenin sağlanması için hücre içi enerji mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda fruktoz grubumuzda 4. hafta sonunda direkt olarak kokleadan elde ettiğimiz metaryelde GLUT5 gen ekspresyonunun diğer gruplarımıza göre belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. DPOAE cevaplarında ki azalmaya bağlı olarak dış tüylü hücrelerde elektromotil cevapların azalması ve buna bağlı olarak ABR ölçümlerinde eşik cevaplarda yükselmeye neden olduğu, stria vaskularisteki vakuolüzyon ve atrofiler, bununla birlikte dış tüylü hücre dejenerasyonunun olması, kokleanın uzun süreli yüksek fruktoz diyetinin GLUT5 gen ekspresyonunun artışına bağlı olarak dejeneratif değişikliklere neden olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda sonuç olarak, fruktoz bakımından zengin diyeteye bağlı olarak oluşan metabolik değişikliklerin prooksidan denge yönünde bozulduğu ve bu

değişikliklerin metformin ile koklear fonksiyonlar üzerinde, hem elektrofizyolojik hemde ultrastrüktürel olarak koruyucu yönde bir denge oluşturduğunu, kokleanın fizyolojik ve morfolojik yapısında meydana gelen dejenerasyonu azalttığı tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Adler, A. I., Shaw, E. J., Stokes, T. and Ruiz, F., Guideline Development Group. (2009). Newer agents for blood glucose control in type 2 diabetes: summary of NICE guidance. *British Medical Journal*. **338**, b1668. Erişim 22.05.2009, <http://www.bmj.com/content/338/bmj.b1668>
- Aladag, I., Eyibilen, A., Güven, M., Atiş, O., Erkorkmaz, Ü. (2009). Role of oxidative stress in hearing impairment in patients with type two diabetes mellitus. *The Journal Of Laryngology And Otology*. **123**, 957-963. <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-laryngology-and-otology/article/role-of-oxidative-stress-in-hearing-impairment-in-patients-with-type-two-diabetes-mellitus/605F541AAFA3FFB021A282BA00022D60>
- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C, James, W.P, Loria, C.M, Smith, S.C.Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. **120**, 1640-1645. Erişim 05.10.2009, <http://circ.ahajournals.org/content/early/2009/10/05/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Alhaider, A.A., Korashy, H.M., Sayed-Ahmed M.M., Mobark M., Kfoury H., Mansour M.A. (2011). Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chemico-Biological Interactions*. **192**, 233-242. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279711001207>
- Ashmore, J. (2008). Cochlear Outer hair cell motility. *Physiological Reviews*. **88**, 173-210. Erişim 01.01.2008, <http://physrev.physiology.org/content/88/1/173.long>
- Axelsen, L.N., Lademann, J.B., Petersen, J.S., Holstein-Rathlou, N.H., Ploug, T., Prats, C., Pedersen, H.D., Kjølbye, A.L. (2010). Cardiac and metabolic changes in long-

term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. **298**, R1560-R1570. Erişim 01.06.2010, <http://ajpregu.physiology.org/content/298/6/R1560>

- Axelsson, A.A., Ryan, A.F. (1988). *Physiology of the ear*. New York: Raven Press.
- Bainbridge, K.E., Hoffman, H.J., Cowie, C.C. (2008). Diabetes and hearing impairment in the United States: audiometric evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *Annals of Internal Medicine*, **149**, 1–10. Erişim 01.07.2008, <http://annals.org/aim/article/741394/diabetes-hearing-impairment-united-states-audiometric-evidence-from-national-health>
- Baslo, P., Kaynar, O. (1981). Diyabetin Nöromusküler Komplikasyonları. *Diabet Yıllığı*, 35-44.
- Beilby, J. (2004). Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *The Clinical Biochemist Reviews*. **25**, 195–198. Erişim 25.08.2004. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1880831/pdf/cbr25_3p195.pdf
- Belyantseva, I.A., Adler, H.J., Curi, R., Frolenkov, G.I., Kachar, B. (2000a). Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *The Journal of Neuroscience*. **20**, RC116. Erişim 15.12.2000, <http://www.jneurosci.org/content/20/24/RC116.long>
- Belyantseva, I.A., Frolenkov, G.I., Wade, J.B., Mammano, F., Kachar, B. (2000b). Water permeability of cochlear outer hair cells: Characterization and relationship to electromotility. *The Journal of Neuroscience*. **20**, 8996–9003. Erişim 15.12.2000, <http://www.jneurosci.org/content/20/24/8996>
- Bonora, E., Targher, G., Alberiche, M., Bonadonna, R.C., Saggiani, F., Zenere, M.B., Monauni, T., Muggeo, M. (2000). Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care*. **23**, 57-63.

- Bright, K.E. (2002). Spontaneous Otoacoustics Emissions. In: Robinette MS, Glatcke TJ. (Eds), *“Otoacoustics emissions” Clinical applications*. 2nd ed. New York: Thieme Medical Press.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D., de Ribaupierre, Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science*. **227**, 194-196.
- Bulut, E. (2009). Corti Organı Frekans Seçiciliğinde Dış Tüylü Hücrelerin Rolü. Doktora Tezi. Edirne
- Byrne, F.R., Morony, S., Warmington, K., Geng, Z., Brown, H.L, Flores, S.A., Fiorino, M., Yin, S.L., Hill, D., Porkess, V., Duryea, D., Pretorius, J.K., Adamu, S., Manoukian, R., Danilenko, D.M., Sarosi, I., Lacey, D.L., Kostenuik, P.J., Senaldi, G. (2005). CD4+CD45RB^{hi} T cell transfer induced colitis in mice is accompanied by osteopenia which is treatable with recombinant human osteoprotegerin. *Gut*.**54**,78-86.
- Carmen, R., Svihovec, D., Gocka, E.F., Ermshar, C.B., Gay, G.C., Vanore, J.F. Hause, L.R. (1994). Audiometric Configuration as A Reflection of Diabetes. *The American Journal of Otology*. 58-65.
- Chang, J., Jung, H.H., Yang, J.Y., Lee, S., Choi, J., Im, G.J., Chae, S.W. (2014). Protective effect of metformin against cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line. *Journal of Association Research Otolaryngology*. **15**, 149-58.
- Chang, J., Jung, H.H., Yang, J.Y., Choi, J., Im, G.J., Chae, S.W. (2011). Protective role of antidiabetic drug metformin against gentamicin induced apoptosis in auditory cell line. *Hearing Research*. **282**, 92-96.
- Chien, C.Y., Tai, S.Y., Wang, L.F., Hsi, E., Chang, N.C., Wu, M.T., Ho, K.Y. (2015). Metabolic Syndrome Increases the Risk of Sudden Sensorineural Hearing Loss in Taiwan: A Case-Control Study. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. **153**, 105-111.
- Cruz, O. L. (Çeviri: Akçam, T., Yetişer, S.) (2007). Kafa tabanı, temporal kemik , dış kulak ve orta kulak anatomisi. *Cummings Otorinololaringoloji ve Baş Boyun*

- Cerrahisi*. Çeviri editörü Koç, C. (4. Baskı) S2801-2814 Ankara: Güneş Tıp Kitabevi
- Cullen, J.R., Cinnamon, M.J. (1993). Hearing loss in diabetics. *Journal of Laryngology and Otology*, **107**, 179–182.
- Cusi, K., & DeFronzo, R. A. (1998). Metformin: A review of its metabolic effects. *Diabetes Reviews*, **6**, 89-131.
- Çetik, F., Soylu, L., Cengizler, İ., Gökçe, G., Yurdakul, H. (1991). Diabetes Mellitus, Ani İşitme Kaybı Ve Fasiyal Paralizi. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayın*. 1051-1054
- Dağdelen, H. (2011). Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ve Metformin-insülin ile diyabet tedavisi gören ratlarda, Oleuropeinin hiperglisemi, total antioksidan kapasite üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi.
- Dallos, P., Falkner, B., (2002). Prestin, a new type of motor protein. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **3**, 104-11.
- Dallos, P. (1996). Overview; Cochlear Neurobiology. In; Dallos, P., Popper, A.N., Fay, R.R. (Eds.), *The Cochlea*. 1st ed. p1-44. Newyork: Springer.
- Dalton, D.S., Cruickshanks, K.J, Klein, R., Klein, B.E.K, Wiley, T.L. (1998). Association of NIDDM and Hearing Loss. *Diabetes Care*, **21**, 1540-1544.
- Dam, P.S. (2002). Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metabolism Research Reviews*, **18**, 176-84. Erişim 29.04.2002, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dmrr.287/abstract>
- de Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. (2009). Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *Journal of Physiology*, **587**, 4919–4929. Erişim 09.10.2009, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.2009.176289/abstract>

- Donaldson, J.A., Duckert, L.G. (1991). Anatomy of the ears. In: Paparella, M.M., Shumrick, D.A., Gluckman, J.L., Meyerhoff, W.L. (Eds). *Otolaryngology* Vol.1, 3th ed, 23-58. Philadelphia: WB Saunders
- Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37, 112-119. Erişim <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912003001711?via%3Dihub>
- Farah, R., Revital, Shurtz-Swirski and Lapin O. (2008). Intensification of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes despite antihyperglycemic treatment. *Cardiovascular Diabetology*, 7, 20. Erişim 22.06.2008, <https://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-7-20>
- Feldman, E.C., Nelson, R.W., Feldman, M.S. (1997). Intensive 50-week evaluation of glipizide administration in 50 cats with previously untreated diabetes mellitus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210, 772-777.
- Fels, J. (2008). From Children To Adults: How Binaural Cues And Ear Canal Impedances Grow. PhD Thesis,. Monchengladbach, Germany.
- Föller, M., Jaumann, M., Dettling, J., Saxena, A., Pakladok, T., Munoz, C., Ruth, P., Sopjani, M., Seebohm, G., Rüttiger, L., Knipper, M., Lang, F. (2012). AMP-activated protein kinase in BK-channel regulation and protection against hearing loss following acoustic overstimulation. *FASEB J*, 26, 4243-4253.
- Fujita, T., Yamashita, D., Katsunuma, S., Hasegawa, S., Tanimoto, H., Nibu, K. (2012). Increased inner ear susceptibility to noise injury in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, 61, 2980-2986.
- Fukushima, H., Cureoglu, S., Schachern, P.A., et al. (2005). Cochlear changes in patients with type 1 diabetes mellitus. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, 133, 100–106.
- Fukushima, H., Cureoglu, S., Schachern, P.A, Paparella, M.M, Harada, T., Oktay, M.F. (2006). Effects of type 2 diabetes mellitus on cochlear structure in humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 132, 934-8.

- Glueckert, R., Pfaller, K., Kinnefors, A., Andersen, H.R., Fischer, A.S. (2005a). Ultrastructure of the normal human organ of Corti. New anatomical findings in surgical specimens. *Acta Oto-Laryngologica*, **125**, 534-39.
- Glueckert, R., Pfaller, K., Kinnefors, A., Fischer, A.S., Andersen, H.R. . (2005b). High resolution scanning electron microscopy of the human organ of Corti. A study using freshly fixed surgical specimens. *Hearing Research*, **199**, 40-56.
- Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., et al. (2005) American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, **112**, 2735-2752.
- Hall, J.W., Baer, J.E., Chase, P.A., Schwaber, M.K. (1994). Clinical application of otoacoustic emissions: what do we know about factors influencing measurement and analysis? *Otolaryngology Head Neck Surgery*, **110**, 22-38.
- Hall, J.W., McCoy, M.J., Whitehead, M.L., Martin, G.K. (1993). Clinical testing of distortion-product otoacoustic emissions. *Ear and Hearing*, **14**, 11-22.
- Hao, J., Fu, X., Zhang, C., Zhang, X., Zhao, S., Li, Y. (2017). Early detection of hearing impairment in patients with diabetes mellitus with otoacoustic emission. A systematic review and meta-analysis. *Acta Otolaryngol.* **137**, 179-185.
- Harrison, R.V., Mount, R.J. (2001). The Sensory Epithelium of The Normal and Pathological Cochlea. In; Jahn A.F., S-Sacchi J. (Eds.) *Physiology of the Ear*. 2nd ed. San Diego; Singular&Thomson Learning, p285-99.
- Henry, R.R. (2003) Insulin Resistance: From predisposing factor to therapeutic target in type 2 diabetes. *Clin Ther.* **25**: B47-B63.
- Ishii, E.K., Talbott, E.O., Findlay, R.C., D'Antonio, J.A., Kuller, L.H. (1992). Is NIDDM a risk factor for noise-induced hearing loss in an occupationally noise exposed cohort? *Sci Total Environment.* **127**, 155–165
- Işıldak, M., Güven, G. S, Gürlek, A. (2004) Metabolik Sendrom ve İnsülin Direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* **35**, 96-99.

- Jang, T.W., Kim, B.G., Kwon, Y.J., Im, H.J. (2011). The association between impaired fasting glucose and noise-induced hearing loss. *Journal of Occupational Health*, **53**, 274–279
- Jang, T.W., Kim, B.G., Kwon, Y.J., Im, H.J. (2011). The association between impaired fasting glucose and noise-induced hearing loss. *Journal of Occupational Health*, **53**, 274–279
- Johnson, R.J., Perez-Pozo, S.E., Sautin, Y.Y., Manitius, J., Sanchez-Lozada, L.G., Feig, D.I., Shafiu, M., Segal, M., Glasscock, R.J., Shimada, M., Roncal, C., Nakagawa, T. (2009) Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocrinology Reviews*. **30**, 96-116.
- Kachar, B., Brownell, W.E., Altschuler, R., Fex, J. (1986). Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature*, **322**, 365-8.
- Kakarlapudi, V., Sawyer, R., Staecker, H. (2003). The effect of diabetes on sensorineural hearing loss. *Otology Neurotology*, **24**, 382–386
- Kandel, E., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. Hearing. In; J.P. Kelly (Eds.). Principles of Neural Science. 3rd ed. East Norwalk, Connecticut; Appleton& Lange; 1992; ch 32, 481-500.
- Karaağaç, N., Salman, F., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2011). Changes in prooxidant/antioxidant balance in tissues of rats following long-term hyperglycemic status. *Endocrinology Research*, **36**, 124-133.
- Kariya, S., Cureoglu, S., Fukushima, H., Morita, N., Baylan, M.Y., Maeda, Y., Nishizaki, K., Paparella, M.M. (2010). Comparing the cochlear spiral modiolar artery in type-1 and type-2 diabetes mellitus: a human temporal bone study. *Acta Med Okayama*. **64**, 375-83.
- Kemp, D.T. (2002). Exploring Cochlear Status with Otoacoustic Emissions. In: Robinette, MS., Glatcke, TJ. (Eds). “*Otoacoustics emissions*” *Clinical applications*. 2nd ed. New York: Thieme Medical Press, 1-45.
- Kemp, D.T. (1978). Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoust. Soc. Am.* **64**, 1386-91.

- King, H., Zimmet, P., Thoma, K., Coventry, J. (1985). Non-insulin-dependent diabetes in Nauruans: a comparison of newly and previously diagnosed cases. *Diabetes Res Clinical Practice*, **1**, 179-84.
- Kita, Y., Takamura, T., Misu, H., Ota, T., Kurita, S., Takeshita, Y., Uno, M., Matsuzawa-Nagata, N., Kato, K., Ando, H., Fujimura, A., Hayashi, K., Kimura, T., Ni, Y., Ootoda, T., Miyamoto, K., Zen, Y., Nakanuma, Y., Kaneko, S. (2012). Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. **7**, 43056.
- Kros, C.J. (1996). Physiology of Mammalian Cochlear Hair Cells. In; P. Dallos, A.N. Popper, R.R. Fay. (Eds.), *The Cochlea*. 1st ed. Newyork: Springer
- Lakka, H.M., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., Niskanen, L.K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., Salonen, J.T. (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* **288**, 2709-2716.
- Lasagni, A., Giordano, P., Lacilla, M., Raviolo, A., Trento, M., Camussi, E., Grassi, G., Charrier, L., Cavallo, F., Albera, R., Porta, M., Zanone, M.M. (2016). Cochlear, auditory brainstem responses in Type 1 diabetes: relationship with metabolic variables and diabetic complications. *Diabet Med*. **33**, 1260-1267
- Lenzen, S., Lortz, S., Tiedge, M. (1996). Effect of metformin on SGLT1, GLUT2, and GLUT5 hexose transporter gene expression in small intestine from rats. *Biochem Pharmacol*. **51**, 893-896.
- Li, X., Zhang, N., Li, Y., Shi, Y., Li, D., Xie, Yi., Xie, Y., Ming, J. (2011). Effects of Metformin and rosiglitazone on peripheral insulin resistance and β -cell function in obesity: a double-blind, randomized, controlled study. *J Int Med Res*. **39**, 358-65.
- Liu, F., Xia, M., Xu, A. (2008). Expression of VEGF, iNOS, and eNOS is increased in cochlea of diabetic rat. *Acta Otolaryngologica*, **128**, 1178-1186
- Lonsbury-Martin, B.L., Martin, G.K., Luebke, A.E. (1996). Physiology of the auditory and vestibular systems. In: Ballenger JJ, Snow JB (Eds). *Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 15th ed. Philadelphia: Williams and Wilkins

- Malpas, S., Blake, P., Bishop, R., Robinson, B., Johnson, R. (1989) Does Autonomic Neuropathy in Diabetes Cause Hearing Deficits? *N Z Med J.* **102**, 874434-874435.
- Mamikutty, N., Thent, Z.C., Sapri, S.R., Sahrudin, N.N., Mohd, Y.M.R., Haji, S.F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *Biomed Res Int.* 2014:263897
- Martin, G.K., Martin, B.L.L. (2002). Distortion Product Evoked Otoacoustics Emissions. In: Robinette MS, Glattke TJ (Eds). *“Otoacoustics emissions” Clinical applications.* 2nd ed. New York: Thieme Medical Press
- Miller, J.J., Beck, L., Davis, A., Jones, D.E., Thomas, A.B. (1983). Hearing loss in patients with diabetic retinopathy. *Am J Otolaryngology*, **4**, 342–346
- Muş, N., Yenişehir, S., Özkaptan, Y. (1991). Retrokoklear ABR anormalliklerinin nörofizyolojik temeli. *Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi*, **1**, 65-70.
- Nakazawa, K., Spicer, S.S., Schulte, B.A. (1995). Postnatal expression of the facilitated glucose transporter, GLUT 5, in gerbil outer hair cells. *Hearing Research*, **82**, 93–99.
- Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R. And Zinman, B. (2009) Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, **32**, 193–203.
- Op de Beeck, K., Schacht, J. & Van Camp, G. (2011). Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hearing Research*, **281**, 18–27.
- Ott, C. et al. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox biology*, **2**, 411–429
- Özdamar, Ö. (1996). İşitsel uyarılma potansiyellerinin tarihçesi. Muş N, Özdamar Ö (Editörler). *İşitsel Beyin Sapı Cevapları ‘Temel Bilgiler ve Klinik Uygulamaları’nda*, Ankara.

- Picciotti, P. (2005). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in the cochlea of different experimental animals. *Acta Otolaryngologica*, **125**, 1152
- Plinkert, P.K., Bootz, F., Vossieck, T. (1994). Influence of static middle ear pressure on transiently evoked otoacoustics emissions and distortion products. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **251**, 95-99.
- Poyrazoğlu, E., GÜngör, A., Uğur, G., Okar, İ., Candan, H. (1997). Ototopikal Siprofloksasinin Koklear Etkilerinin Taramalı Elektron Mikroskopisi İle Gösterilmesi. *KBB ve Baş Boyun Cerrahisi*. **5**, 116-121.
- Raphael, Y., Altschuler, R.A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin*, **60**, 397-422.
- Robles, L., Ruggero, M.A. (2001). Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiology Reviews*, **81**, 1305-1352.
- Ryan, A.F. (2002). New Views of Cochlear Function. In; Robinette, M.S., Glatke, T.J. (Eds), "*Otoacoustics emissions*" *Clinical applications*. 2nd ed. New York: Thieme Medical Press
- Salata, J.A., Jacobsen, J.T., Strasnick, B. (1998). Distortion-product otoacoustic emissions hearing screening in high risk newborn. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, **118**, 37-43.
- Salt, A.N. (2001). Dynamics of The Inner Ear Fluids. In: A. F. Jahn, J. S-Sacchi (Eds.), *Physiology of the Ear*. 2nd ed. San Diego; Singular&Thomson Learning
- Santi, P.A., Mancini, P. (2007). (Çeviri: Karayel F). Koklear Anatomi ve Santral İşitme Yolları. *Cummings Otolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi*. Çeviri editörü Koç, C. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri
- Santos-Sacchi, J., Wu, M., Kakehata, S. (2001). Furosemide alters nonlinear capacitance in isolated outer hair cells. *Hearing Research*, **159**, 69-73.
- Singleton, J.R., Smith, A.G., Russell, J.W., Feldman, E.L. (2003). Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes*, **52**, 2867-2873.

- Slepeckly, N.B. (1996). The cochlear structure. In; P. Dallos, A.N. Popper, R.R. Fay. (Eds.), *The Cochlea*. 1st ed. Newyork: Springer
- Smith TL, Raynor E, Prazma J, Buenting JE, Pillsbury HC. (1995). Insulin-dependent diabetic microangiopathy in the inner ear. *Laryngoscope*, **105**, 236-240.
- Song, M., Schuschke, D.A., Zhou, Z., Chen, T., Pierce, W.M.Jr., Wang, R., Johnson, W.T., McClain, C.J. (2012). High fructose feeding induces copper deficiency in Sprague-Dawley rats: a novel mechanism for obesity related fatty liver. *The Journal of Hepatology*, **56**, 433-440.
- Sphelman, R., Stoneham, M.A. (1985). Evoked potential primer. 2nd ed. London: Butterworth-Heinaman publish
- Stepensky, D., Friedman, M., Raz, I., Hoffman, A. (2005). Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect. *Standards of Medical Care in Diabetes*, American Diabetes Association. *Diabetes Care*, **28**, 4-36.
- Sun, J., Buys, N. (2015). Community-Based Mind-Body Meditative Tai Chi Program and Its Effects on Improvement of Blood Pressure, Weight, Renal Function, Serum Lipoprotein, and Quality of Life in Chinese Adults With Hypertension. *American Journal of Cardiology*, **116**, 1076-1081
- Szalat, A., Raz, I. (2006). Metabolic syndrome and microangiopathy. *Isr Med Assoc J.* **8**, 424-425.
- Wackym, P.A., Linthicum, F.H.Jr. (1986). Diabetes mellitus and hearing loss: clinical and histopathologic relationships. *American Journal of Otology*, **7**, 176-178
- Wangemann, P., Schacht, J. (1996). Homeostatic Mechanisms in the Cochlea. In; P. Dallos, A.N. Popper, R.R. Fay. (Eds.), *The Cochlea*. 1st ed. Newyork: Springer
- Wright, A. (1997). Anatomy and ultrastructure of the human ear. In: Keer, A.G., Gleeson, M. (Eds). *Scott-Brown's Otolaryngology Vol.1*, 16th ed. London: Butterworth-Heinemann Publish

- Xie, Z., Zhang, J., Wu, J., Viollet, B. and Ming-Hui Zou. (2008). Upregulation of Mitochondrial Uncoupling Protein-2 by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells Attenuates Oxidative Stress in Diabetes. *Diabetes*, **57**, 3222-3230.
- Yang, D., Zhou, H., Zhang, J., Liu, L. (2015). Increased endothelial progenitor cell circulation and VEGF production in a rat model of noise-induced hearing loss. *Acta Otolaryngologica*, **135**, 622-628.
- Yuan, H., Li, L., Zheng, W., Wan, J., Ge, P., Li, H., Zhang, L. (2012). Antidiabetic drug Metformin alleviates endotoxin-induced fulminant liver injury in mice. *Int Immunopharmacol.* **12**, 682-688.
- Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G., Shaw, J. (2005) The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *Journal of Atherosclerosis and Thromb.* **12**, 295-300.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/06

Karar Tarihi: 06.06.2014

KARAR NO: 2014.06.01

Yürütücülüğünü İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ATAŞ'ın yaptığı, TÜBİTAK projesi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/18 protokol nolu "Deneysel Metabolik Sendromda Metformin Uygulamasının Koklear Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Elektrofizyolojik ve Ultrastruktürel Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tefik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2015/08

Karar Tarihi: 30.09.2015

KARAR NO: 2015.08.04

Yürütücülüğünü İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ATAŞ'ın yaptığı ve daha önce TÜBİTAK projesi olarak planlanıp TÜHDYEK-2014/18 protokol no ile etik onayı alınan "**Deneyel Metabolik Sendromda Metformin Uygulamasının Koklear Fonksiyonlar Üzerine Etkisinin Elektrofizyolojik ve Ultrastruktürel Olarak Değerlendirilmesi**" başlıklı araştırmanın, Yüksek Lisans öğrencisi Arş. Gör. Züleyha Dilek GÜLMEZ'in yüksek lisans tezi olarak değiştirilmesini öneren TÜHDYEK-2015/42 protokol nolu çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

- İZİMLİ -

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

- MAZETLİ -

Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Yrd. Doç. Dr. Hasan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

Fez. F. Uygur GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

- MAZETLİ -

Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: var yok
Toplantı Katılım: evet hayır

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DENEYSEL METABOLİK SENDROMDA METFORMİN UYGULAMASININ KOKLEAR FONKSİYONLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK VE ULTRASTRUKTUREL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 8 BENZERLİK ENDEKSİ	% 6 İNTERNET KAYNAKLARI	% 6 YAYINLAR	% 1 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
---------------------------------	-----------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
2	readgur.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	OFLUOĞLU, Demet; BULAK, Elif AYDIN; KABLAN, Nilüfer and AKYÜZ, Gülseren. "İnterferansiyel Akımların Kronik Miyofasyal Ağrı Sendromunda Kısa Dönem Etkinliği", Journal of Physical Medicine & Rehabilitation Sciences / Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi, 2013. Yayın	<% 1
4	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1