



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, İSTANBUL GAZİOSMANPAŞA
SAğLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ**

KULAK BURUN BOğAZ VE BAş BOYUN CERRAHİSİ KLİNİğİ

**SİSPLATİN OTOTOKSİSİTESİNİN ENGELLENMESİNDE
MEMANTİN'İN ROLÜ**

Dr. Durdu Tuğçe İnce

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ömer Necati Develioğlu

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2023



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, İSTANBUL
GAZİOSMANPAŞA SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA
MERKEZİ**

KULAK BURUN BOğAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ KLİNİğİ

**SİSPLATİN OTOTOKSİSİTESİNİN ENGELLENMESİNDE
MEMANTİN'İN ROLÜ**

Dr. Durdu Tuğçe İnce

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ömer Necati

Develioğlu

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	2
KULAK ANATOMİSİNE GENEL BAKIŞ	2
İç Kulak (<i>Auris Interna</i>).....	2
1-Vestibulum:.....	2
2-Kemik Semisirküler Kanallar (<i>Canales Semicirculares Ossei</i>):.....	3
3-Koklea (<i>Cochlea</i>):.....	3
3.1.Skala Media (<i>Ductus Cochlearis</i>):	5
3.1.1.Korti Organı (<i>Organum Spirale</i>):.....	6
İŞİTME FİZYOLOJİSİ	7
Koklea Fizyolojisi	8
İŞİTMENİN DEĞERLENDİRİLMESİ	10
Elektrofizyolojik testler.....	11
Otoakustik Emisyonlar (OAE):.....	11
İşitsel Beyin Sapı Cevapları (Auditory Brainstem Response-ABR).....	12
SIÇAN (<i>GENUS RATTUS</i>) KULAK ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ	14
SIÇANLARDA İŞİTMENİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	15
OTOTOKSİSİTE	17
SİSPLATİN'E BAĞLI OTOTOKSİSİTE.....	17
MEMANTİN'İN ÇALIŞMA MEKANİZMASI	18
GEREÇ VE YÖNTEM	22
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	23
Elektrofizyolojik Ölçümler	24
Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon Ölçümü (DPOAE):	24
İşitsel Beyin Sapı Cevabı (ABR):	26
Histolojik Değerlendirmeler.....	27
Işık mikroskopisi:.....	28
Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama Prosedürü:	29
Elektron Mikroskopisi:.....	31
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	32
BULGULAR.....	33
ELEKTROFİZYOLOJİK ÖLÇÜMLER.....	33
Grup A (Sisplatin Grubu).....	33
Grup B (Sisplatin+Memantin Grubu)	34

Grup C (Memantin Grubu).....	35
Tablo 9.Grup C (Memantin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL).....	35
Grup D (Kontrol-SF Grubu).....	36
Tablo 11.Grup D (Kontrol) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)	36
HİSTOLOJİK İNCELEMELER	41
Işık Mikroskopisi ile Değerlendirme	41
Elektron Mikroskopisi ile Değerlendirme.....	44
TARTIŞMA	47
SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	62
EKLER.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum tez danışmanım Doç.Dr. Ömer Necati Develioğlu'na, öğrencisi olduğum için kendimi şanslı hissettiğim Prof. Dr. Mehmet KÜLEKÇİ'ye,

Tezimde sabır ve özveri ile benle çalışan İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Odyoloji Anabilim Dalı'ndan Araş.Gör. Züleyha Dilek GÜLMEZ'e,

Tezime katkı ve desteklerinden dolayı Marmara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Özlem Tuğçe KAYA'ya ve tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan (BEDEHAL) Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN'e, uzun çalışma saatlerinde pozitif enerjisi ve desteğini esirgemeyen Vet. Tek. Nurhayat DÖNEK'e

Tezimin istatistik kısmında tüm isteklerime sabırla cevap veren, her konuda desteğini benden esirgemeyen sayın Oğuzhan CEYLAN'a

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübelerini benle paylaşan başta Op.Dr. Fırat ONUR, Op. Dr. Ethem İLHAN, Op. Dr. Fatih TETİK ve Op.Dr. Derya CEBECİ olmak üzere İstanbul Gaziosmanpaşa KBB kliniğinde çalışmış tüm uzmanlarıma,

Çalışma ortamımı güzelleştiren, tüm klinik ve ameliyathane hemşirelerime, sağlık personellerime

Eğitim hayatım boyunca desteklerini hep hissettiğim, en büyük şansım annem Şükran İNCE, babam Mehmet İNCE, kardeşlerim Necip İNCE, Şadiye Şeyda İNCE, Sema Nur İNCE ve anneannem Durdu ÜNLÜ' ye çok teşekkür ediyorum.

Dr. Durdu Tuğçe İNCE

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABR:	Auditory Brainstem Response
AMP:	Adenosin Monofosfat
ASHA:	American Speech-Language-Hearing Association
AAA:	American Academy of Audiology
DTH:	Dış Tüy hücreleri
dB:	Desibel
DPOAE:	Distortion Product Otoacoustic Emissions
EM:	Elektron Mikroskop
EOAE:	Evoked Otoacoustic Emissions
FDA:	Food and Drug Administration
GSH:	Glutasyon
H&E:	Hematoksilen&Eozin
Hz:	Herzt
IL1β:	İnterlökin 1 beta
IL6:	İnterlökin 6
İTH:	İç Tüy Hücreleri
İPSP:	İnhibitör Postsinaptik Potansiyel
LTP:	Long-term Potential
mGluR:	Metabolik Glutamat Reseptörleri
nAChR:	Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri
NMDAR:	N-metil-D-aspartat Reseptör
NFκB:	Nükleer Faktör Kappa B
OAE:	Otoakustik Emisyon Ölçümleri
PTO:	Pür Ton Odyometri
®:	Register (Tescilli)
ROT:	Reaktif Oksijen türevleri
SEM:	Scanning Electron Microscopy
SFOAE:	Stimulus Frekans Evoked Otoacoustic Emissions
SNİK:	Sensörinöral İşitme Kaybı
SOAE:	Spontan Otoakustik Emisyonlar
SSS:	Santral Sinir Sistemi

SP: Sisplatin
Spl: Sound Pressure Level
SG: Spiral Gangliyon
SV: Stria Vaskularis
TEOAE: Transient Evoked Otoacoustic Emissions
TM: Timpanik Membran
TGF- β : Tumor Growth Factor beta
TNF α : Tümör Nekroz Faktör alfa
™: Trade Mark (Ticari Marka)
YFO: Yüksek Frekanslı Odyometri



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Işık Mikroskopisi İçin Rutin Takip Prosedürü	28
Tablo 2. Hematoksilen&Eozin Boyama Prosedürü	29
Tablo 3. Işık Mikroskopisi ile Değerlendirme	30
Tablo 4. Rutin SEM Takibi	31
Tablo 5. Grup A (Sisplatin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL).....	33
Tablo 6. Grup A (Sisplatin) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL)..	33
Tablo 7. Grup B (Sisplatin+Memantin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)	34
Tablo 8. Grup B (Sisplatin+Memantin) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL).....	34
Tablo 9. Grup C (Memantin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL).....	35
Tablo 10. Grup C (Memantin) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL)	35
Tablo 11. Grup D (Kontrol) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)	36
Tablo 12. Grup D (Kontrol) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL) .	36

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.Normal frekans konumlarına sahip insan kokleasından alınmış yarı kesitli materyalin, Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (Field Emission Scanning Electron Microscopy-FE-SEM) ile görüntülemesi (7).....	4
Şekil 2.Sıçan kokleasından alınan kesitte, koklear kanalın görüntüsü (Işık mikroskopisi, Hematoksilen & Eozin boyama)	5
Şekil 3.Işık mikroskopisi altında dış tüy hücreleri (DTH) ve iç tüy tücrelerinin (İTH) görüntüsü (Hematoksilen&Eozin boyama, 40x).....	6
Şekil 4.A. Tektoryal membranın jel kaplamasına doğru uzanan tüylerin ileri geri hareketiyle tüy hücrelerinin uyarılması. B. Mekanik enerjinin tüy hücreleri tarafından nöral sinyallere dönüştürülmesi(12).....	9
Şekil 5.ABR çalışma prensibi(9).....	13
Şekil 6.Mid-modiolar ekseninde sıçan kokleasının görüntüsü (Işık mikroskopisi, Hematoksilen & Eozin boyama).	15
Şekil 7.Memantin ve NMDAR'lar (3).....	21
Şekil 8.Çalışmada kulak muayenesi için kullanılan otomikroskop ve malzemeler ...	23
Şekil 9.a)Yüksek frekans transdüser b) ER10B+ prob mikrofön	25
Şekil 10. Yüksek frekans transdüser ile DPOAE ölçümü.....	25
Şekil 11.a)E-A-R Tone 3A ile alçak frekans ABR ölçümü b) Yüksek frekans transdüser ile ABR ölçümü	26
Şekil 12.Örnek sıçana ait normal ABR sonucu.....	27
Şekil 13. Koklear yapıların mikrodiseksiyon ile çıkarılması	28
Şekil 14.İlaç uygulama öncesi ve sonrası ABR eşik ortalamaları	38
Şekil 15. İlaç uygulama öncesi ve sonrası DPOAE yanıt ortalamaları.....	39
Şekil 16. Sisplatin grubundan örnek sıçan ABR kaydı	40
Şekil 17. Sisplatin +Memantin grubundan örnek sıçan ABR kaydı	40
Şekil 18. Mid-modiolar ekseninden geçen kesitte genel koklea görüntüsü(H&E,10x) 42	
Şekil 19. Grupların histolojik skor ortalamaları.....	42
Şekil 20.Işık mikroskopisi altında grupların korti organı görüntüleri (H&E,40x)	43
Şekil 21.Işık mikroskopisi altında grupların spiral ganglion görüntüleri (H&E,40x)43	
Şekil 22.Işık mikroskopisi altında grupların stria vaskularis görüntüleri (H&E,40x)44	

Şekil 23. SEM değerlendirmesinde kontrol grubuna ait normal dış tüy hücre morfolojisi	45
Şekil 24. Sisplatin grubuna ait korti organı yüzeyindeki DTH stereosilyalarının yer yer tamamen ya da parsiyel kaybolduğu ve stereosilyalarda yapışıklıklar gözlenmektedir	45
Şekil 25. Sisplatin+Memantin grubuna ait korti organı yüzeyindeki DTH stereosilyalarında kısmi parsiyel kayıplar ve stereosilyalarda yapışıklıklar gözlenmektedir (x1500)	46
Şekil 26. Memantin alan grup SEM görüntülemesinde normal DTH morfolojisi.....	46



ÖZET

Amaç: Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II), baş ve boyunun skuamöz hücreli karsinomu, over, solid testis, prostat, mesane, serviks tümörleri ve küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri dahil olmak üzere birçok malign hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir antineoplastik ajandır. Nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite, Sisplatin için doz sınırlayıcı yan etkilerdir.

Sisplatin kaynaklı ototoksisitenin altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber; Sisplatin'in öncelikle kokleada, özellikle dış tüy hücrelerinde hasara neden olduğu; korti, stria vaskularis, spiral ligaman ve spiral ganglionik hücrelerde aşırı serbest oksijen radikal üretimine yol açtığı öne sürülmüştür. Sitotoksisite, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile ilişkilidir; bu nedenle, zamanla Sisplatin kaynaklı ototoksisiteye karşı korumayı sağlamak için antioksidanlarla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Buna rağmen Sisplatin ototoksisitesine karşı onaylı bir ilaç yoktur. Diğer yandan, memeli kokleasında iç tüy hücreleri ve afferent işitsel nöronlar arasındaki nörotransmisyonu glutamat gibi birçok uyarıcı amino asit aracılık eder. Koklear iskemi veya gürültüye bağlı travmada, aşırı glutamat salınımı nörotoksisiteye sebep olmaktadır. Neden olduğu nörotoksisite, kokleanın iskemi veya gürültü travması gibi bazı patolojik durumlarında çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle glutamat antagonistleri, farklı iç kulak hastalıkları için yeni bir terapötik strateji olabilir. Çalışmamızda glutamat reseptör antagonisti Memantin'in, Sisplatin ototoksisitesinden koruyucu etkinliğini sıçan modelinde göstermeyi amaçladık.

Gereç ve yöntem: Ağırlıkları 400-500 gr arasında olan 28 adet Sprague Dawley cinsi erkek, genç-erişkin sıçan çalışmada kullanıldı. İlaç uygulama öncesi tüm sıçanların DPOAE ve ABR ölçümleri yapılarak; dört gruba ayrıldı. Grup A'ya, çalışmanın 3.gününde 15 mg/kg Sisplatin intraperitoneal tek doz olarak uygulanarak ototoksisite modeli oluşturuldu. Grup B ve C'ye, 10 gün boyunca 10 mg/kg Memantin; Grup D'ye ise 10 gün boyunca 10 ml Serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı. Memantin'in koruyucu etkinliğinin oluşma süresi, ototoksisite çalışmalarında araştırılmamış olmakla beraber; çalışmamızın 3. Gününde Grup B'ye 15 mg/kg Sisplatin intraperitoneal olarak tek doz uygulandı. 7.gün tüm sıçanların DPOAE ve

ABR testleri yapıldı. 10. Gün ise servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı. Koklear yapılar çıkılarak H&E boyama ile ışık mikroskopisinde ve tarama elektron mikroskopisinde değerlendirildi.

Bulgular: Grup A ve B arasında 16 kHz’te ABR eşiklerinde istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Her iki grubun, klik ve tone-burst (8 kHz, 16 kHz, 24 kHz, 32 kHz) uyaranlarda ABR eşik ortalamaları Grup C ve D ‘den istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). Grup C ve D arasında ise istatistiksel anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). DPOAE ortalamalarında Grup A ve B arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Grup A’da kontrol grubuna göre 0,45 kHz, 0,75 kHz ve 24 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken; Grup B’de 3 kHz ve 4 kHz ‘de anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Işık mikroskopi ile incelemelerde dış tüy hücreleri ve spiral ganglion nöronlarında Memantin’in koruyucu olduğu gösterildi. Elektron mikroskopisinde dış tüy hücreler stereosilya kayıplarında Grup B’de Grup A’ya göre gerileme mevcuttu.

Sonuç: Memantin’in, Sisplatin ototoksitesini engelleme potansiyeli mevcuttur.

Anahtar kelimeler: sisplatin, memantin, sıçan, ototoksiste, ABR, DPOAE, ışık mikroskopisi, elektron mikroskopisi

ABSTRACT

Objective: Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) is an effective antineoplastic agent widely used in the treatment of many malignant diseases, including squamous cell carcinoma of the head and neck, tumors of the ovary, solid testis, prostate, bladder, cervix and non-small cell lung tumors. Nephrotoxicity, ototoxicity, and neurotoxicity are dose-limiting side effects for Cisplatin.

Although the cellular and molecular mechanisms underlying cisplatin-induced ototoxicity are not fully understood; Cisplatin primarily causes damage to the cochlea, especially the outer hair cells; It has been suggested that it causes excessive free oxygen radical production in corti, stria vascularis, spiral ligament and spiral ganglionic cells. Cytotoxicity is associated with the formation of reactive oxygen species; Therefore, many studies have been conducted on antioxidants to provide protection against Cisplatin-induced ototoxicity over time. However, there is no approved drug against cisplatin ototoxicity. On the other hand, neurotransmission between inner hair cells and afferent auditory neurons in the mammalian cochlea is mediated by many excitatory amino acids, such as glutamate. In cochlear ischemia or noise-induced trauma, excessive glutamate release causes neurotoxicity. The neurotoxicity it causes is thought to play a very important role in some pathological conditions such as ischemia of the cochlea or noise trauma. Therefore, glutamate antagonists may be a new therapeutic strategy for different inner ear diseases. In our study, we aimed to demonstrate the protective efficacy of the glutamate receptor antagonist Memantine against Cisplatin ototoxicity in a rat model.

Materials and methods: Twenty-eight Sprague Dawley male, young-adult rats weighing between 400-500 g were used in the study. Before drug administration, DPOAE and ABR measurements of all rats were made; divided into four groups. An ototoxicity model was created by administering 15 mg/kg cisplatin intraperitoneally as a single dose to Group A on the 3rd day of the study. Groups B and C, 10 mg/kg Memantine for 10 days; In Group D, 10 ml of physiological saline was administered intraperitoneally for 10 days. Although the protective effect of memantine has not been investigated in ototoxicity studies; On the 3rd day of our study, a single intraperitoneal dose of 15 mg/kg Cisplatin was administered to Group B. DPOAE and ABR tests were performed on all rats on the 7th day. On the 10th day, euthanasia was performed by

cervical dislocation. The cochlear was removed and evaluated by H&E staining, light microscopy and scanning electron microscopy.

Results: A statistically significant difference was found between Group A and B in ABR thresholds at 16 kHz ($p<0.05$). The mean ABR thresholds for click and tone-burst (8 kHz, 16 kHz, 24 kHz, 32 kHz) stimuli of both groups were statistically significantly higher than Groups C and D ($p<0.05$). There was no statistically significant difference between Groups C and D ($p>0.05$). There was no statistically significant difference between Groups A and B in the mean DPOAE ($p>0.05$). While a statistically significant difference was found in Group A compared to the control group at 0.45 kHz, 0.75 kHz and 24 kHz; There was a significant difference between 3 kHz and 4 kHz in Group B ($p<0.05$). Memantine was shown to be protective in outer hair cells and spiral ganglion neurons in light microscopy examinations. In electron microscopy, there was a decrease in the loss of outer hair cells stereocilia in Group B compared to Group A.

Conclusion: Memantine has the potential role in preventing Cisplatin ototoxicity.

Keywords: cisplatin, memantine, rat, ototoxicity, ABR, DPOAE, light microscopy, electron microscopy

GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin ototoksisitesi, klinik olarak tinnitusun eşlik ettiği, orta derecede, yüksek frekanslı bilateral sensörinöral işitme kaybı olarak görülmektedir. Tek taraflı işitme kaybı ve geçici işitme kayıpları nadirdir ancak karşılaşılabılır (1).

Sisplatin kaynaklı ototoksisitenin, artan miktarlarda toksik serbest radikallerden veya hücre içi kalsiyum içeriğinin azalmasına yol açan hücre zarı değişikliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hayvan deneyleri, Sisplatin (SP) ototoksisitesinin öncelikle dış tüy hücrelerini; özellikle kokleadaki bazal ve orta kısım kıvrımlarındaki dış tüy hücrelerini (DTH) hedeflediğini ortaya koymuştur (1,2).

Memantin, N-metil-D-aspartat reseptör (NMDAR) blokörü olup Alzheimer gibi birçok nörodejeneratif hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. NMDAR aşırı aktivasyonu birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkilendirilmiş olsa da NMDAR antagonistlerini terapötik ajanlar olarak kullanma girişimleri, zayıflatıcı yan etkiler nedeniyle sıklıkla başarısız olmuştur. Bu yan etkiler, NMDAR'ların sinaptik iletişim ve hafıza oluşumu dahil olmak üzere beyin işlevlerinde oynadığı kritik roller nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Oysaki, Memantin, NMDAR inhibisyon mekanizmasının bir sonucu olarak patolojik aşırı aktivasyonu inhibe ederken, NMDAR'ların fizyolojik aktivasyonuna izin verdiği varsayılmaktadır(3) NMDAR yoluyla, sıçanlarda Memantin'in hafızayı ve bilişsel işlevi iyileştirdiği gösterilmiştir (3)

Sisplatin ototoksisitesini engellemek için antioksidan madde çalışmaları son yıllarda giderek artmıştır. Buna rağmen hala Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, Food and Drug Administration) onaylı bir tedavi yoktur. Biz çalışmamızda sistemik Memantin kullanımının, Sisplatin ototoksisitesine karşı etkisini sıçanlarda değerlendirdik.

GENEL BİLGİLER

KULAK ANATOMİSİNE GENEL BAKIŞ

Kulak kendi içerisinde dış, orta ve iç kulak yapılarından oluşur. Dış kulak, kulak kepçesi(aurikula) ve dış işitsel kanaldan (meatus) oluşur. Kulak kepçesinin kıkırdak kısmı, perikondrium ve deri ile kaplanarak sarmal ve antiheliks oluşturur. Meatusun, dış 1/3 lük kısmı kıkırdaktan ve iç 2/3 lük kısmı kemikten oluşur. Dış kulak yolunun üzerini örten deride tüy hücreleri ve serumen üreten modifiye yağ bezleri bulunur. Serumenle karışan pul pul dökülmüş cilt döküntüleri, dış kulak yolundan dışa doğru hareket eder ve dış kulağı kendi kendini temizleyen bir sistem haline getirir. Opak veya yarı saydam Timpanik Membran (TM) orta ve dış kulak yolunu ayırır. TM'nin alt kısmı olan pars tensa, dış deri tabakası, orta fibröz doku tabakası ve iç orta kulak mukoza tabakasından oluşur. Östaki borusu disfonksiyonuna bağlı uzun süreli negatif orta kulak basıncı varsa, zarın üst kısmı olan pars flaksida geri çekilebilir. Malleus, inkus ve stapes, sesi orta kulak boyunca zardan kokleaya ileten üç küçük bağlantı kemiğidir. Malleusun sapı, pars tensanın lifli tabakası içinde yer alır. Orta kulakta, malleus başı, orta kulak boşluğunun üst kısmı olan tavan arasındaki inkus ile eklem yapar. İnkusun uzun kolu stapes ile eklenir. Bu artikülasyon (inkudostapedial eklem), travma veya kronik enfeksiyon nedeniyle bozulmaya yatkındır. Stapes taban plakası oval pencerede bulunur ve sesi sıvı dolu iç kulağa iletir ve yükseltir (4).

Ototoksik ajanların iç kulak yapılarını hedef almasından dolayı, iç kulak yapıları ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

İç Kulak (*Auris Interna*)

Temporal kemiğin petröz kısmı içindeki iç kulak hem ses hem de denge duyusu ile ilgili spesifik hücreler içermesi nedeniyle önemli ve hassas bir organdır. İç kulağın tümüne *labyrinthus* denilmektedir(5).

Kemik labirent 3 bölümden oluşur; koklea, vestibül ve semisirküler kanallar

1-Vestibulum:

Dıştan içe basık ovoid şekildedir. Sagittal olarak, vertikal çapı 5mm ve transvers çapı 3mm kadardır. Orta kulak boşluğunun iç duvarını yapar. Stapes, inkus

aracılığı ile kendine gelen titreşimleri *fenestra vestibuli* (oval pencere) aracılığıyla iç kulaktaki perilenfe ulaştırır. Ön duvar kokleaya komşudur. Üst ve arka duvarda semisirküler kanallarla birleşir. İç yan duvarda ise ön altta sakkulusun yerleştiği sferikal resess, arka üstte ise utrikulusun yerleştiği eliptikal resess bulunur(5).

2-Kemik Semisirküler Kanallar (*Canales Semicirculares Ossei*):

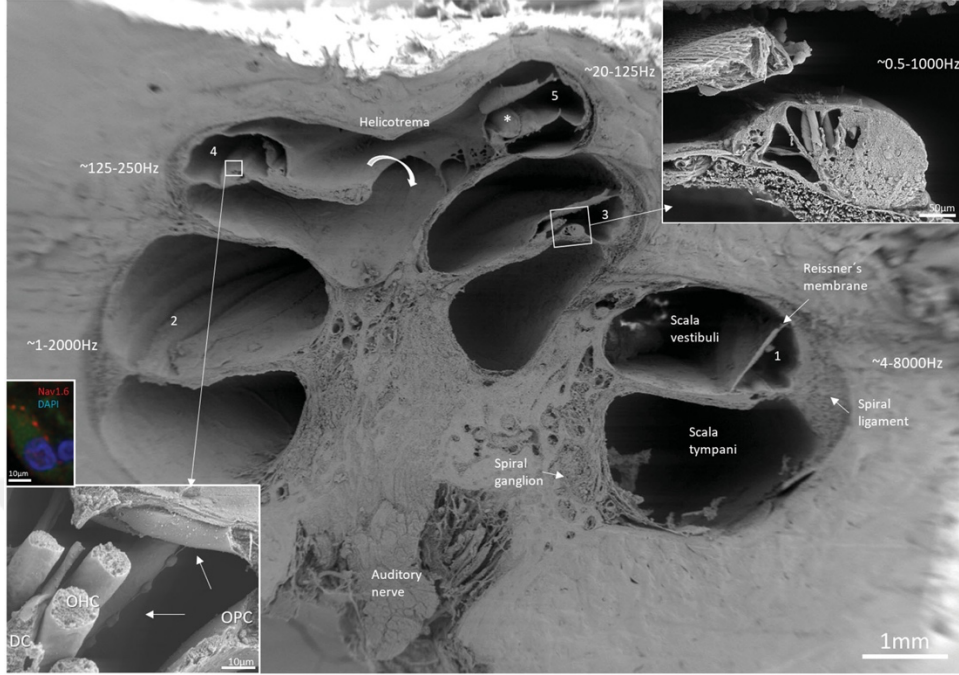
Superior, posterior ve lateral (horizontal) olmak üzere üç adet semisirküler kanal, uzayın üç ayrı düzlemine yerleşmiştir. Her biri yaklaşık olarak bir dairenin 2/3'ü kadar olan bu kanallar vestibulumu açılır.

3-Koklea (*Cochlea*):

Vestibulumun ön-iç tarafında bulunur. Bir koniye benzeyen kokleanın tabanı 9 mm çapında, yüksekliği ise 5 mm kadardır. Koklea tabanda geniş çapa sahip, 2,75 defa dönüş ile apekte daralan bir yapıdır. Tepeden tabana yapılan kesitinde ortada görülen delikli koni şeklindeki yapıya modiolus denilir. Modiolus etrafında 2,75 defa kıvrılmış boru şeklinde yapıya *canalis spiralis cochleae* denir (5) .

İnsan kokleası; skala vestibuli, skala media ve skala timpani adı verilen üç bölümden oluşur ve yaklaşık 35 mm uzunluğundadır. Modiolustan uzanan *lamina spiralis ossea* (kemik spiral lamina), kokleanın merkezi etrafında kıvrılan, üst ve alt koklear odaların sırasıyla; skala vestibuli ve skala timpani olarak kısmi bölünmesini sağlar (Şekil 1). Kokleanın tepesinde, skala vestibuli ve skala timpaninin iletişim halinde olduğu helikotrema bulunur. Spiral lamina aynı zamanda skala medianın alt sınırı olan baziler membranın tutunma noktasıdır (6).

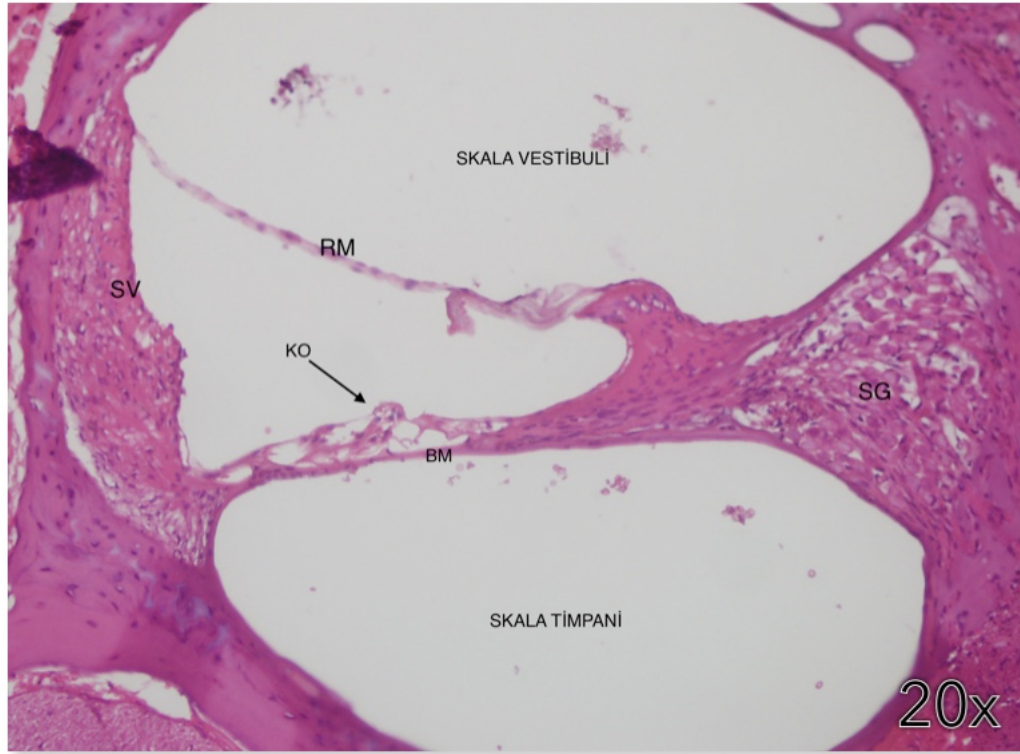
Orta kulak ve iç kulak arasındaki ses enerjisi iletişimi için ilk nokta stapes tabanına bitişik oval pencere (*fenestra vestibuli*) dir. Skala vestibuli oval pencereden kokleanın apeksine doğru devam eder ve helikotrema adı verilen küçük bir açıklık yoluyla skala timpaniye bağlanır. Skala timpani de bazale doğru devam ederek oval pencerede sonlanır (6).



Şekil 1. Normal frekans konumlarına sahip insan kokleasından alınmış yarı kesitli materyalin, Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (Field Emission Scanning Electron Microscopy-FE-SEM) ile görüntülenmesi (7)

(Numune altın-paladyum ile kaplanmıştır. 2nm çözünürlük. 0,5–1 kHz'de işitme organı sağ üst köşede gösterilir. Daha küçük eklerde, düşük frekanstaki dış tüy hücreler (OHC), şaftlarında (oklar) efferent sinir terminallerini gösterir. Bu nöronlar voltaj kapılı sodyum kanalı NaV1.6'yı (kırmızı boyama) ifade eder. Na-EDTA'da dekalsifikasyon yapılmıştır. OHC'ler: dış saç hücreleri. OPC: Tektoryal membranın apikal ucu.)

Skala vestibuli ve skala timpani, 4 mEq/l potasyum ile 139 mEq/l sodyum konsantrasyonlu, ekstraselüler sıvıya benzeyen perilenf sıvısını içermektedir. Skala media, Reissner membranı, baziler membran, kemik spiral lamina ve lateral duvar ile çepeçevre sınırlanmıştır (Şekil 2). Skala media ise 144 mEq/l potasyum ve 13 mEq/l sodyum konsantrasyonlu intraselüler sıvıya benzeyen endolenf içermektedir. Skala media, tabandan apekse doğru yavaşça düşen yaklaşık 80 mV'lık pozitif direk akım dinlenme potansiyeline sahiptir. Bu potansiyel, koklea lateral duvarını kaplayan stria vaskülaristeki $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompaları ile sağlanmaktadır (8).



Şekil 2.Sıçan kokleasından alınan kesitte, koklear kanalın görüntüsü (Işık mikroskopisi, Hematoksilen & Eozin boyama)

Reissner membranı (RM), Stria Vaskularis (SV), Korti Organı (KO), Baziler membran (BM)

3.1.Skala Media (*Ductus Cochlearis*):

Kesiti üçgen şeklinde olan bu yapının tabanı, spiral koklear kanalın (*canalis spiralis cochlea*) dış duvarına oturur ve tepesi de *lamina spiralis osseanin* serbest ucuna yapışır. Üst duvarına *membrana vestibularis* ‘Reissner membranı’, alt duvarına *membrana spiralis (lamina basilaris)*, dış duvarına *paries externus ductus cochlearis* denilir. Kokleanın uzunluğu boyunca, spiral lamina ve baziler membranın genişlikleri ters orantılıdır. Spesifik olarak, aşağıdaki gibi görünürler:

- Kemikli spiral lamina: Tabanda daha geniş ve tepeye doğru daha dar

- Baziler membran:

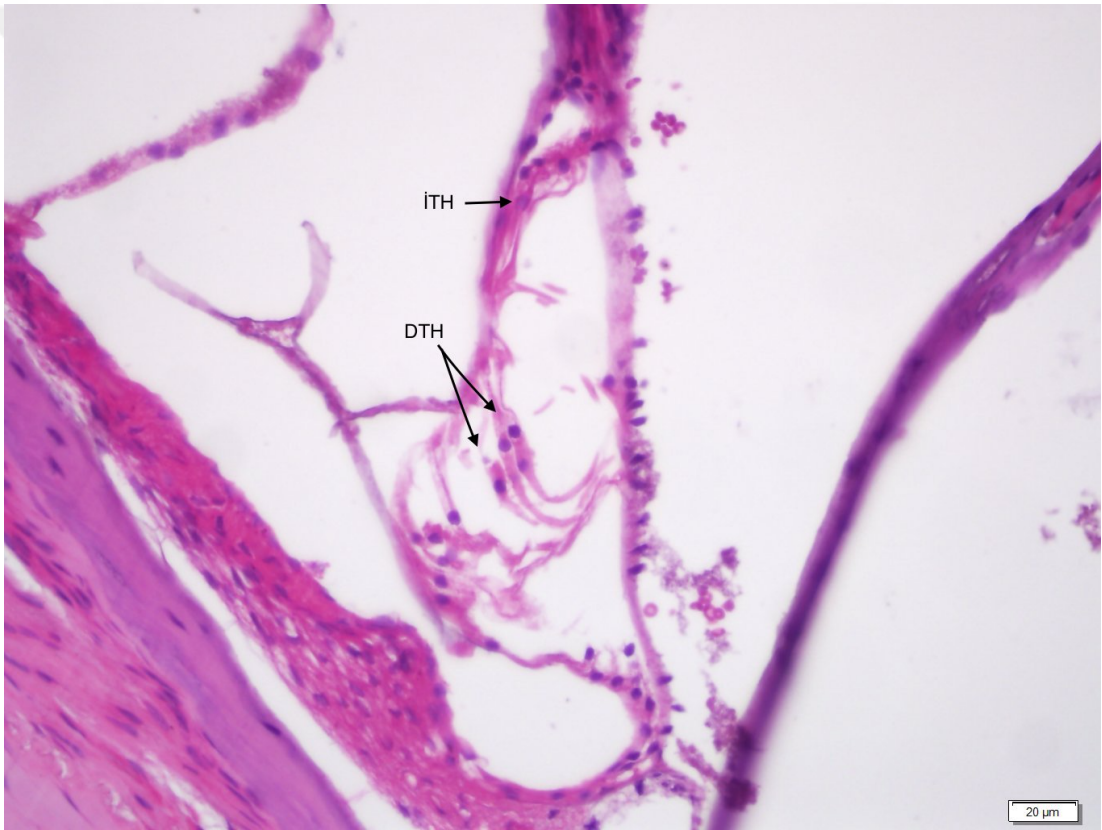
Tabanda daha dar (0,21 mm) ve tepede daha geniş (0,36 mm)

Tabanda daha kalın ve tepede daha ince

Bu anatomi, baziler membrana frekans özgülüğü veren anahtar bir faktördür. Yani koklea, tabanda yüksek frekanslara ve apekte düşük frekanslara duyarlıdır (5,6). Baziler membran üzerinde ses duyusunu alan Korti organı (*organum spirale*) bulunur.

3.1.1.Korti Organı (*Organum Spirale*):

Korti organının önemli yapıları; dış ve iç tüy hücreleri (Şekil 3), destekleyici hücreler (Deiters, Hensen, Claudius), tektoryal membran ve retiküler laminadır. Destek hücreleri Korti organı için yapısal ve metabolik destek sağlamaktadır. Deiters hücrelerinin falangeal süreçleri, retiküler laminanın sıkı hücre kavşaklarını oluşturmaktadır (9).



Şekil 3. Işık mikroskopisi altında dış tüy hücreleri (DTH) ve iç tüy hücrelerinin (İTH) görüntüsü (Hematoksilen&Eozin boyama, 40x)

İç Tüy Hücreleri (İTH): Basık ve büllöz yapıda, genelde tek sıra halinde yerleşim gösterirler. Tüyçükleri yaklaşık olarak düz bir hat veya geniş bir ‘U’ şeklinde dizilim gösterirler. Böylece de Korti organının iç kısmı boyunca bir duvar oluştururlar. İç tüylü hücrelerinin tüyçükleri tektoryal membran ile temas etmemektedir. Her hücrenin

tüyleri apeksleri modiolustan uzakta yerleşmiş, iki sıralı ve çift V şeklinde düzenlenmiş 120 sterosilya içerir (10).

Dış Tüy Hücreleri (DTH): Silindirik yapıda olup nükleusları bazal olarak yerleşim göstermektedir. Üç-dört sıralı olarak bulunur. Bu hücrelerin tüycükleri karakteristik olarak ‘‘W’’ şeklinde izlenir ve tektoryal membran ile temas etmektedir. Tüycükleri üç sıralı 46- 148 adet sterosilyadan oluşur. Dış tüylü hücrelerin uzunluklarında kokleanın bazalinden apeksine doğru gidildikçe artış olur. DTH’nin sterosilyalarında da benzer artış gözlenir(10).

Tüy Hücrelerinin İnnervasyonu:

İnsanlarda tüy hücrelerinin işitsel nöronlar tarafından afferent İnnervasyonu, kokleadan merkezi işitme merkezine bilgi sağlamaktan sorumludur. İki tip nöron vardır. Tüm nöronların %95’ini oluşturan Tip 1 nöronlar miyelinlidir ve iç tüylü hücrelere dağılırlar. %5 kadar olan Tip 2 nöronlar miyelinsizdir ve dış tüylü hücrelere dağılırlar. Yaklaşık 30.000 işitsel nöron vardır. Hücre gövdeleri spiral ganglion oluşturur ve modiolusta Rosenthal kanalındadır (6).

İŞİTME FİZYOLOJİSİ

Ses enerjisi, katı-sıvı-gaz ortamlarda yayılan mekanik bir titreşim dalgasıdır. Ses dalgası, partiküllerin elastik bir ortamda yer değiştirmelerinden oluşur. Diyapozon gibi titreşim yapan bir ses kaynağı karşısında hava partikülleri birbirlerine sürtünerek algıladığımız sesi meydana getirirler. Diyapozonun titreşimi durduğunda partiküller eski pozisyonlarını alarak dinlenme durumuna geçer. Diyapozonun titreşimi ses partiküllerini iter, sonra atmosfer basıncı karşı koyar ve eski durumuna gelir. Diyapozon titreştikçe bu durum bir siklus halinde tekrarlanır. Bu siklus halinde çıkan ses ‘saf sesler’ olarak adlandırılır. Ses dalgasının en basit şekli olan ‘sinüs dalgası’nın sabit bir yükseklik (amplitüd) ve tek bir frekansı vardır. Ses frekansı ise 1 saniyede oluşan siklusların sayısıdır, Hertz (Hz) olarak tanımlanır. İnsan kulağı 20- 20000 Hz. arasındaki frekans sesleri işitir. Sesin şiddet birimi desibeldir (dB) ve insan kulağı tarafından duyulan en küçük ses şiddeti 0 dB olarak tanımlanır. Hava yoluyla gelen ses dalgaları sıvı ortama geçerken uğradığı enerji kaybı logaritmik olarak yapılan

hesaplara göre 30 desibel değerindedir. Orta kulak meydana gelen bu kaybı sesle şiddetini artırarak yeniden kazandırır. Bunu sağlamada;

1. Malleus ve inkus arasındaki kaldıraç şeklindeki eklem ile malleus kolundaki işitsel enerjinin inkus koluna 1,3 kat fazla olarak aktarılması (2.5 dB artış)

2. Kulak zarının titreşen bölümlerinin genişliği (55 mm²) ile stapes tabanı (3,2 mm²) arasındaki oran (26 dB artış)

3.Oval ve yuvarlak pencere arasındaki faz farkı (2.5 dB artış) rol oynar (11).

Koklea Fizyolojisi

Orta kulağa gelen ses dalgaları stapesin tabanı ile skala vestibuli içindeki perilenfi hareket ettirerek kokleaya iletilir. İç kulağın iletim mekanizması oval pencereye kadar gelen titreşimlerin perilenfayı bir pencereden diğerine hareket ettirmesi ile, sıvı sütunların hareketi şeklindedir.

Kokleadaki ses dalgalarının yayılımı için çeşitli teoriler vardır:

Bekesy teorisine göre; İşitsel titreşimler baziler membranda yer değişimlere yol açmaktadır. ‘travelling wave’ ilerleyen dalga teorisi olarak tanımlanan bu teoride baziler membranın bazal ucundan başlayarak apekse doğru işitsel titreşimin oluşturduğu dalga ilerler. Bu yayılma hem boyuna hem de enine doğrudur. Bu iletim dalgasının en büyük özelliği amplitüdünün giderek artması ve maksimuma ulaşarak titreşimlerin daha sonra sönümlenmesidir. Bir başka önemli özellik ise bu dalgaların baziler membran üzerinde en büyük titreşim yaptığı yerin her frekans için belirli bölgeler olmasıdır. İşitilen her frekans için baziler membran üzerinde değişmeyen en büyük titreşim noktası vardır.

Helmholtz yer teorisine göre; gelen ses dalgaları frekanslarına uygun bölgeleri titreştirerek uyarır ve ses algılanır.

Rutherford ’un frekans veya telefon teorisine göre; frekansın algılanması işitme sinirlerinde impuls suların meydana geliş sıklığına göre olmaktadır.

Wever’ın Volley(yayılım) teorisine göre; 5000 Hz kadar olan seslerin algılanması yayılım ateşi şeklindeki hızlı sinir impulsları doğması ile 5000 Hz’i geçen frekanslar ise algılama yer teorisile izah edilmektir (10).

Kokleada 4 tip elektriksel potansiyel mevcuttur:

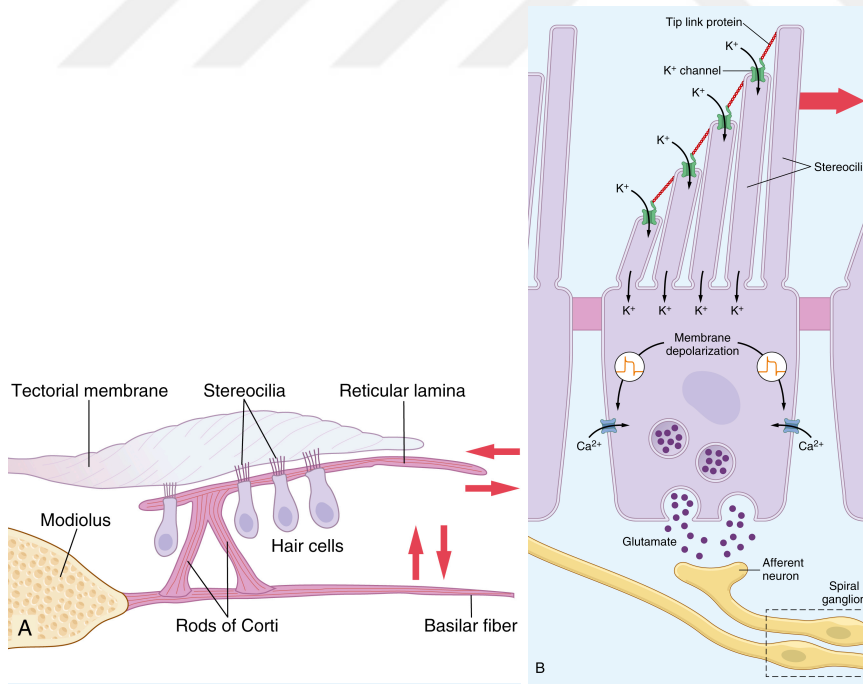
1-İstirahat potansiyeli: Bir tipi tüy hücrelerinin iç kısımdan ölçülen 60 mV değerindedir. İkinci tipi ise endokoklear potansiyel olup; skala medyadaki endolenfin perilenfaya göre 80 mV bir farka sahip olmasından kaynaklanır. Bu iki tip potansiyel ile bir tüy hücresi zarının dışı ile içi arasında 150 mV potansiyel fark vardır.

2- Koklear Mikrofonik: Kaynağı dış tüy hücreleridir. Kulağa bir saf ses verilirse yuvarlak pencereye yerleştirilen elektrot ile bu sese uygun sinüzoidal dalga elde edilebilir. Bu elektriksel tepkiyi Wever-Bray fenomeni denir.

3- Aksiyon potansiyelleri: İşitsel uyarının iç kulaktaki iletim dalgasından sonra elektriksel gerilimlere dönüşmesi ve işitme sinir liflerinin bir grubunda aksiyon potansiyeli oluşturmaktadır.

4-Birikim potansiyelleri: Kaynağının iç tüy hücreleri olduğu düşünülmektedir. Orta derece veya şiddetli işitsel uyarıların endolenfatik gerilimler arasında pozitif veya negatif direkt akımlar oluşturmaları ile oluşur (12).

Baziler membranın hareketi ile tüy hücreleri üzerindeki, tektoryal membranının jel tabakası ile temaslı olan stereosilyalar hareket eder. Bu hareket sonucunda tüy hücreleri ile temasta olan bipolar nöronlar uyarılır (Şekil4).



Şekil 4.A. Tektoryal membranın jel kaplamasına doğru uzanan tüylerin ileri geri hareketiyle tüy hücrelerinin uyarılması. B. Mekanik enerjinin tüy hücreleri tarafından nöral sinyallere dönüştürülmesi(12)

(Stereosilya daha uzun olanlar yönünde büküldüğünde, K^+ kanalları açılır ve depolarizasyona neden olur, bu da voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarını açar. Ca^{2+} akışı depolarizasyonu artırır ve duyu sinirini depolarize eden uyarıcı iletici glutamatın salınmasını sağlar)

Tüy hücreleri ile temastaki bipolar nöronların gövdesi koklea içindeki spiral gangliondadır. Her spiral ganglion hücresi korti organına kısa reseptör lifler, beyin sapındaki koklear nükleuslara ise uzun sinir lifleri gönderirler. Bipolar nöronların santral uzantıları bir araya gelerek işitme sinirini meydana getirirler. Bu sinir denge siniri ile beraber sulkus pontobulbarisin dış kısmından ponsa girer. İşitme siniri ponsa girdikten sonra işitme yollarının 2. nöronlarının bulunduğu ventral ve dorsal koklear nükleuslara dallar gönderirler. Koklear nükleusu terk eden bütün 2. nöronlar orta hattan karşı tarafa geçip o taraftaki superior olivar komplekste sonlanırlar veya lateral lemniskus ve bunun nükleusunu oluştururlar. Lemniskal yoldaki liflerin en fazla miktarı inferior kollikulusta son bulur. Çok az bir kısmı inferior kollikulusu geçerek medial genikulat cisme ulaşır. Pek az bir kısmı da karşı taraftaki inferior kollikulusa ulaşır. Inferior kollikulus algısal analizlerden ziyade işitsel refleks aktivitelerinde rol oynamaktadır. Medial genikulat cisme, temel nükleustan çıkan 3. nöron lifleri belirli bir düzende temporal kortekse gelirler. Primer işitme alanına (*Gyri Temporales Transversi veya Heschel*) gelen liflerin hemen hemen hepsi nükleusun anterior kısmından gelir (10).

İŞİTMENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İşitmenin değerlendirilmesinde saf ses odyometri, konuşma odyometresi ve akustik impedans ölçümleri (timpanometri ve akustik refleks ölçümü) kullanılmaktadır. Bu testlerden saf ses odyometrisi; temel odyolojik değerlendirme sonuçlarının özetlenmesini sağlamaktadır. Günlük odyolojik test bataryası yukarıda tanımlanan odyolojik testlerin yanı sıra elektrokokleografi, otoakustik emisyon ölçümleri (OAE), işitsel beyin sapı cevabı (Auditory Brainstem Response) gibi elektrofizyolojik test yöntemlerini de içermektedir (9). Odyometri, her bir frekansta verilen seslerin duyulabildiği en düşük ses şiddeti(dB) düzeyinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Test edilen frekanslar insan kulağının işitebildiği 20-20000 Hz yelpazesinin tamamını değil ancak 250-8000 Hz arasındaki konuşmanın anlaşılması için önemli frekansları kapsar (10) .

Elektrofizyolojik testler

Otoakustik Emisyonlar (OAE):

1978 yılında Kemp, kulağın sesi aldığı kadar, ses üretme yeteneğine de sahip olduğunu belirtmiştir. Koklea tarafından üretilen bu sesler ‘uyarılmış otoakustik emisyonlar (Evoked Otoacoustic Emissions (EOAE)’ olarak adlandırılır. Kulakta 40-50 dB’ den daha fazla işitme kaybı olması durumunda otoakustik emisyon elde edilemediğinden; otoakustik ilaç, gürültü, hipoksi gibi ajanların iç kulağa verdiği zararı ölçmede kullanılmaktadır (10). Objektif, hızlı, güvenilir, ucuz ve noninvaziv bir yöntem olan OAE ölçümünde; dış kulak yoluna bir prob yerleştirilir. Bu prob aracılığıyla iç kulağa spesifik bir uyarı (klinik, iki frekans özelliği taşıyan uyarı) gönderilir. Gelen ses uyarı iç kulağa doğru iletilirken, dış tüylü hücrelerde mekanik bir enerji oluşur. Oluşan enerji oval pencereden ses uyarısının geldiği yöne doğru iletilir. Timpanik membranın hareketine bağlı olarak oluşan otoakustik emisyon mikrofona yardımıyla kaydedilir. Kokleanın ses uyarısına verdiği yanıtın ölçüldüğü bu test ile dış tüylü hücre fonksiyonu hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (10,13).

OAE’lerin sınıflandırılmasında;

Spontan otoakustik emisyonlar (SOAE): Hiçbir uyarı verilmeden kokleadan gelen seslerin mikrofona aracılığı ile kaydedilmesidir.

Uyarılmış otoakustik emisyonlar (EOAE): Uyarı ile iç kulak uyarılır. İç kulakta meydana gelen mekanoelektrik titreşimlerin meydana getirdiği sesler yine aynı şekilde mikrofona ile kaydedilir.

- 1- Uyarı frekansı otoakustik emisyonlar (SFOAE): İç kulağa verilen saf ses uyarı ile oluşan cevaplar ölçülür.
- 2- Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyonlar (DPOAE): İki farklı sesin eş zamanlı olarak verilmesi ile kokleada meydana gelen seslerin kaydedilmesi prensibine dayanır.
- 3- Geçici uyarılmış otoakustik emisyonlar (TEOAE): Kısa süreli uyarılar verilerek ölçülen cevaplardır. Klinik uyarı veya tone bip uyarıları kullanılır. Uyarı şiddeti genellikle 80 dB SPL’dir (13,14).

İşitsel Beyin Sapı Cevapları (Auditory Brainstem Response-ABR)

İlk kez 1875 yılında Caton tarafından hayvan deneyi ile beyinde elektriksel olayların varlığı ortaya konulmuştur. ABR ise ilk kez 1971 yılında Jewett ve Williston tarafından tanımlanmıştır. Response(cevap), primer olarak işitsel sistemdeki başlangıç nöronlarının senkronize aktivitelerinin yansıtılması ile ölçülür (10).

ABR uyarının verilmesinden yaklaşık 10 msn sonra oluşan pozitiften negatife doğru giden yedi seri dalgayı içermektedir. Klinikte ilk beş dalga (Jewett dalgaları) değerlendirilmektedir.

I.dalga; koklear sinirin distalinden, II. dalga; koklear sinirin proksimalinden, III.dalga; koklear nükleustan (ventral), IV. dalga; superior olivar kompleksten (alt pons), V. dalga; pozitif kısmı lateral lemniskustan, negatif kısmı inferior kollikulustan kaynaklanır (10,15). III., IV., V. Dalgalar beyin sapındaki majör işitsel merkezlerdeki postsinaptik aktiviteyi yansıtırken, I. Ve II. Dalgalar aksiyon potansiyellerinin bir sonucu olmaktadır.

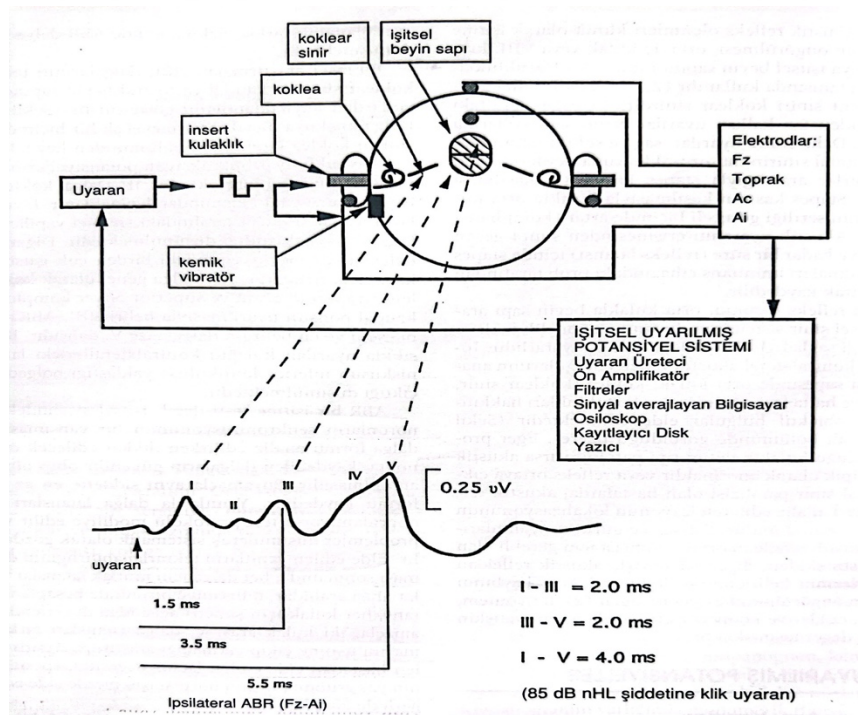
ABR' de en çok kullanılan uyarı klik uyarıdır. Klik uyarı ile kokleanın 2-4 kHz'lik bölgesi uyarılır. Klik uyarılar frekansa spesifik olmadığı için frekansa spesifik kayıt yapmak gerektiği zaman tone burst uyarılar kullanılmaktadır.

Uyarıya karşı işitsel beyin sapı cevabını yorumlanmasında dalgaların latansları, interpeak latans değerleri (I-V, I-III ve III-V interpeak latans değerleri), dalga amplitüdü, V/I dalga amplitüd oranı, kulaklar arası latans farkı, kulaklar arası şiddet farkı, latans şiddet eğrisi ve dalga morfolojisi büyük önem taşımaktadır (Şekil 5).

Dalga formu analiz edilirken dikkat edilecek önemli bir nokta, kaydedilen dalgalarının güvenilir olup olmadığının kontrolüdür. Bu amaçla aynı şiddette en az iki dalga formu kaydedilir. Yanıtlarda dalga latansları birbirini doğrulamıyorsa test tekrarlanır ve teknik problemler düşünülerek sistematik olarak gözden geçirilir. Elde edilen yanıtların tekrarlanabilirliğinin doğrulanması sonucunda, her dalga için mutlak latanslar ve dalgalar arası aralıklar, milisaniye biriminde hesaplanır. Bu latans, her kulak için simetri açısından değerlendirilir. Bu amaçla, iki kulak arası V. dalga latanslar farkının 0.4 ms' nin üstüne çıkıp çıkmadığı araştırılır. Ayrıca test edilen hastadan elde edilen latans değerleri, spesifik hastanın yaş grubuna uygun normal işitenlerde elde edilen değerlerle karşılaştırılır.

Maksimum uyaran verildiğinde net olarak ortaya çıkan I. Dalga'nın latans değerinde gecikmenin belirlenmesi iletim veya mikst tip işitme kayıplarına özgüdür. Eğer I. Dalga küçük ve zayıf, ancak dalgalar arası latans değerleri normal sınırlardaysa (I-V. Dalga latansı <4.60 ms) tiz frekanslı sensöryal (koklear) işitme kaybı beklenir. Uzun dalgalar arası latans değerleri retrokoklear işlev bozukluğunu yansıtır. Erken dalga bileşenleri arası aralıkta (I-III dalgalar arası aralık) uzamışsa (örneğin bu aralık > 2.40 ms ise), posterior fossa bölgesinde koklear siniri veya alt beyin sapını etkileyen patolojileri gösterir. III-V. dalgalar arası aralığın uzaması (örneğin bu aralık > 2.45 ms) ise intraaksiyal beyin sapı işitsel işlev bozukluğunu gösterir. Ayrıca OAE ile normal koklear fonksiyonun gösterildiği vakalarda anormal ABR elde edilmemesi de işitsel nöropati tanımı ve ayırt edilmesi açısından büyük önem taşır (9,10,15) .

ABR ölçümü anestezi ya da sedasyon gibi hastaya bağlı faktörlerden etkilenmez. Koopere olamayan hastalarda, yenidoğan ve çocuklarda ölçüm yapma olanağı sağlar.



Şekil 5.ABR çalışma prensibi(9)

SIÇAN (*GENUS RATTUS*) KULAK ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Sıçanlar, aminoglikozid grubu antibiyotiklere, platin grubu antineoplastik ilaçlara, anti-malaryal ilaçlara, herbisitlere, antiinflamatuvar ilaçlara, diüretik ilaçlara, akustik travmaya bağlı gelişen iç kulak patolojilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır (16).

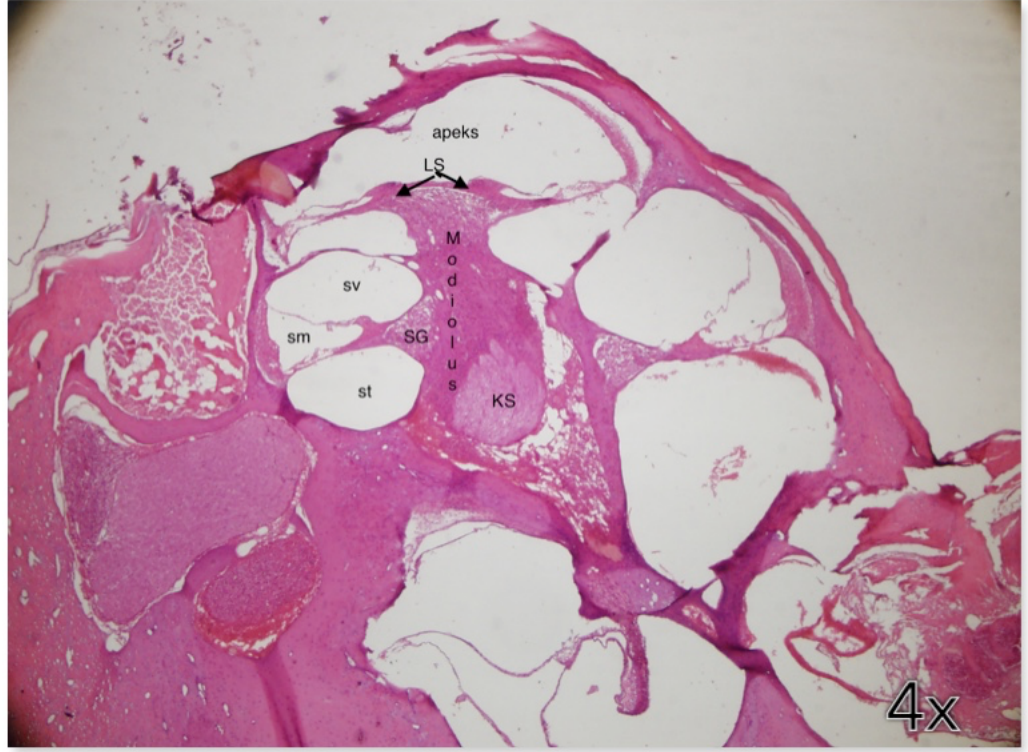
Oliveira'nın 1989 yılındaki çalışmasında, işitme ve vestibüler sistemlerinin insana çok benzemesinden dolayı kobay labirent sistemini seçtiğini belirtmiştir. Bundan farklı olarak, Santos ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarında, rat kulak anatomisinin de insan kulağına anatomik ve patolojik olarak çok benzediği; çalışmalarda kullanımının pratik ve ekonomik olduğu belirtilmiştir (17).

Sıçan temporal kemiği, diğer memelilere benzer olarak; squamöz, petröz, timpanik ve mastoid kemik parçalarından oluşmaktadır. Temporal kemik, kafatasının yan tarafındadır ve lateral kafa tabanının orta ve arka kraniyal fossalarının oluşumuna katkıda bulunur. Üstte parietal kemiği, medial ve inferiorda sfenoid kemiği, önde elmacık kemiği ve arkada oksipital kemiği sınırlar. Öte yandan insan temporal kemiğinin aksine, sıçan temporal kemiğinde kemik bar yapıyla ayrılmış bir internal akustik meatus fundusu yoktur. Bunun yerine, subarkuat fossanın inferior ve anteriorunda iki açıklık vardır. Bu açıklıktan biri diğerinin antero-superiorunda bulunur. Diğer ise oblik bir kemik yapı ile ön tarafı fasyal siniri, arka tarafı ise lateral ve superior semisirküler kanalların utrikul makulasını ve ampullasını besleyen superior vestibüler sinir demetini ikiye ayırır (16).

Timpanik membran, sıçan orta kulak boşluğu yan duvarının orta kısmını oluşturur ve boşluğu kulak kanalından ayırır. Membran pars tensa ve pars flaccidaya bölünebilir. Pars tensa, timpanik sulkusta fibröz kıkırdak yoluyla anulusa bağlanır. Sıçanlarda, farelere benzer; ancak insanlardan ve bazı kemirgenler de dahil olmak üzere bir dizi diğer memeliden farklı olarak, ön ve arka kruslar ve ayak plakası arasında aşağı doğru hareket eden bir stapedial arter vardır (16,18).

Rat kokleasında insandaki gibi membranöz labirent yapısı vardır. Salyangoz şeklindeki koklea, vestibülün önünde yer alır ve modiolus adı verilen bir eksen etrafında spiral şeklinde bir kemik tüpün 2,5 dönüşünden oluşur. Normal bir vücut pozisyonunda, kokleanın apeksi inferior ve anterior tarafı işaret eder. Diğer memelilere

benzer şekilde Modiolustan gelen kemikli spiral lamina, tabandan tepeye doğru spiral şeklinde dönüş yapar. Membranöz labirent yapısı insan kokleasına benzer şekildedir (16).



Şekil 6. Mid-modiolar ekseninde sıçan kokleasının görüntüsü (Işık mikroskopisi, Hematoksilen & Eozin boyama).

Koklear Sinir (KS), Skala Vestibuli (SV), Skala Media (SM), Skala Timpani (ST), Spiral Ganglion (SG), Lamina Spiralis (LS)

SIÇANLARDA İŞİTMENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gelişimsel olarak, sıçan işitme sistemi ancak doğumdan sonra olgunlaşırken; insan işitme sistemi doğum öncesi gelişimini tamamlar. Dolayısıyla insan doğumdan itibaren duyabilir. Bundan dolayı araştırmacılar insan koklea gelişimini inceleme olanağı bulamazken; sıçan yavrularında doğumdan 12-14 gün sonra, sıçan kokleası tamamen olgunlaşmadan işitsel beyin sapı yanıtı alınabilir. Bunun yanında ABR, sıçanlarda işitme kaybının değerlendirilmesi için hızlı bir ölçümdür ve ABR dalgaları boyunca not edilen farklı özelliklere dayalı olarak işitsel yol boyunca lezyon bölgesini ayırt etmeye yardımcı olabilir (19).

İşitsel beyin cevabı yanıtları kullanılarak sıçanlarda işitme eşiklerini tahmin etmek için yaygın olarak tone burst uyaranları veya klik uyaranları kullanılır. Tone burst, frekansa özgü bilgi sağlama avantajına sahiptir, oysa klik uyaranlar, baziler membranın daha geniş bir bölgesini eşzamanlı olarak etkinleştirdiği ve işitme yeteneğinin hızlı bir genel tahminini sağladığı düşünülür. Bununla birlikte, bir tıklama uyaranına verilen gerçek koklear yanıt, ideal bir geniş bant yanıtı değildir. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, yaygın olarak "chirp" olarak adlandırılan yükselen frekans uyaranları kullanılır ki; bu sayede baziler membran frekans yanıtının zamansal dağılımını telafi ederek baziler membranın daha senkron aktivasyonunu sağlar (20).

Spankovich ve arkadaşları 2008 yılında, fare modelinde klik uyaranlarına alternatif olarak chirp ABR'lerin kullanımını uyarlamış ve göstermiştir. Çalışma, chirp (özellikle A-cıvıltısının), sıçanda hızlı ABR eşikleri ve genlik ölçümleri elde etmek için en uygun geniş bant uyaran olduğu sonucuna varmıştır.

Sıçanların işittiği frekans aralığı yaklaşık olarak 250 Hz ila 80 kHz'dir ve en yüksek hassasiyet 8 ile 38 kHz arasında meydana gelir, bu aralık, insan kulağının algıladığı frekans aralığından çok daha yüksektir (21).

ABR işitsel sinirin distal ucundan inferior kollikulusa ve ötesine kadar ses odaklı aktivite hakkında bilgi sağlayan uzak alan yanıtlarını temsil eder. Bu uyarılmış potansiyellerden elde edilen veriler, kokleadan gelen ikincil yardımcı bilgilerle desteklenebilir. Koklear sağlığının en yaygın olarak kullanılan dolaylı ölçümlerinden biri DPOAE'dir. Sağlıklı kulağa verilen birincil ton çiftlerinde distorsiyon ürünlerinin varlığı, DTH motilitesi ile bağlantılı aktif doğrusal olmayanları yansıtır. DPOAE'ler, iletim tipi işitme kayıpları ve DTH kayıplarını gösterdiğinden, hayvanların koklear patoloji incelemelerini taramak için kullanılmaktadır. Sıçanlarda, DTH'lerin gürültünün neden olduğu mekanik ve metabolik streslere karşı savunmasızlığı nedeniyle, DPOAE'lerin sensörinöral işitme kaybının (SNİK) erken evrelerinin hassas bir ölçüsü olduğu gösterilmiştir. Gürültüye maruz kaldığında, ABR ölçümlerinde SNİK kanıtlarının gözlenebilmesinden önce daha zayıf DPOAE'ler meydana gelir. ABR ve DPOAE'ler, özellikle erken evrelerde SNİK'i saptamak ve uzun dönemli değerlendirmeleri yapmak için birlikte kullanılabilir (19).

OTOTOKSİSİTE

Ototoksik ilaçlar koklea, vestibüler sistem veya her ikisi üzerinde etkili olabilir. Ototoksisiteye neden olma potansiyeline sahip 600'den fazla ilaç kategorisi vardır. Aminoglikozid grubu antibiyotikler, platin bazlı kemoterapötik ajanlar, loop diüretikler, makrolid antibiyotikler ve anti-malaryal ilaçlar, çocuklarda ve yetişkinlerde çeşitli enfeksiyonlara ve malignitelere karşı iyi belgelenmiş etkinliği olan yaygın olarak kullanılan ototoksik ilaçlardır. İlaçlara bağlı işitme sisteminde hasar; tinnitus, işitme kaybı, hiperakuzi, kulakta dolgunluk ve baş dönmesi gibi semptomlar ile ortaya çıkabilir (22).

Ototoksisite tipik olarak 8.000 Hz'nin üzerindeki frekanslarda başlar ve daha düşük konuşma frekanslarına doğru ilerler. Bu nedenle, American Speech-Language-Hearing Association (ASHA) ve American Academy of Audiology (AAA), temel değerlendirmenin 250 Hz'den 8.000 Hz'e kadar pür ton odyometri (PTO) ve 9.000 Hz'den 20.000 Hz'e kadar yüksek frekanslı odyometri (YFO) gibi davranışsal ölçümleri içermesi gerektiğini önermektedir. Bu ölçümleri artı olarak OAE (DPOAE özellikle ve timpanometri gibi objektif ölçümler ile kişisel değerlendirme anketleri eklenmelidir (23–25). Herhangi bir ajanın ototoksik sayılabilmesi için, uygulama sonrasında PTO'da bilateral 250-8000 frekansları arasında en az 10 dB kayıp olması gerekmektedir (25).

SİSPLATİN'E BAĞLI OTOTOKSİSİTE

Sisplatin (cis-diamindiklorplatin), 1978 yılından itibaren Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, Food and Drug Administration) tarafından onaylı olarak birçok solid kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Yetişkinlerde baş ve boyun kanserleri, testis, over ve akciğer kanserinde kullanılmaktadır. Ayrıca pediatrik yaş grubunda nöroblastom, osteosarkom, hepatoblastom, germ hücreli tümörler ve medullablastom gibi birçok kanser türünün tedavisinde kilit rol oynamaktadır (2).

Sisplatin, nefrotoksik, ototoksik ve nörotoksiktir. Sisplatine bağlı ototoksisite mekanizması tam olarak açıklanamamış olmamakla beraber; progresif olarak dış tüy hücrelerini hasara uğrattığı, antioksidan madde(glutasyon) ve enzimlerin (superoksidaz vb) sentezini azaltarak serbest oksijen radikallerini artırdığı; oksidatif stresin artışının koklea, stria vaskularis, spiral ligament ve spiral ganglion hücrelerde hasar ile ototoksisiteye sebep olduğu gözlenmiştir. Ek olarak SP, süperoksit artışına sebep olarak antioksidan enzimlerin azalması ve nötralizasyonuna sebep olmaktadır (2,26) .

Sisplatin kaynaklı ototoksisiteye, reaktif oksijen türlerinin seviyelerindeki artışlara ek olarak inflamatuvar moleküller de eşlik eder; *tümör nekroz faktör alfa (TNF α)*, *interlökin 1 β (IL1 β)*, ve *interlökin 6 (IL6)*; ve *nükleer faktör kappa B (NF κ B)* . SP, kullanımı ile kokleada özellikle stria vaskularis ve spiral ligamentte, *NF κ B* ve *indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS)* ekspresyonunu artırır. *NF κ B aktivasyonu*, *TNF α* , *IL1 β* , *IL6* gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerini artırır (27) .

Sisplatin kaynaklı ototoksisitenin, artan miktarlarda toksik serbest radikallerden veya hücre içi kalsiyum içeriğinin azalmasına yol açan hücre zarı değişikliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (1).

MEMANTİN'İN ÇALIŞMA MEKANİZMASI

Memantin (3,5- dimethyl-1-adamantanamine) ligand kapılı, kalsiyum geçirgen, voltaj bağımlı NMDA tip Glutamat ve Nikotinik Asit Reseptör blokörüdür. 1989'da Memantin'in, NMDAR'ları yaklaşık 1 uM'lık bir IC50 [11-19] ile inhibe ettiği bulundu, bu da terapötik konsantrasyon aralığına iyi bir şekilde tekabül etmektedir. Alzheimer hastalığının tedavisinde Memantin tipik olarak 20 mg/gün dozunda uygulanır(28).

Memantin, NMDAR kanalını bloke ederek çalışır. Memantin, sadece kanal açıldıktan sonra kanala girebildiği ve akım akışını engelleyebildiği için "açık kanal engelleyici" olarak sınıflandırılır. Yüksek konsantrasyonlarda (10-500 uM), Memantin, serotonin ve dopamin alımı, Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri (nAChR'ler), serotonin reseptörleri, sigma-1 reseptörleri ve voltajla aktive olan Na⁺ kanalları dahil olmak üzere birçok Santral Sinir Sistemi (SSS) hedefini etkiler(3).

NMDAR'lar dört adet alt ünite olmak üzere, heteromerik ligand bağlı iyon kanallarından oluşur. Üç adet NMDAR alt ünite ailesi vardır; NR1 NR 2, NR3.

Fonksiyonel olarak glutamat bağımlı NMDAR'lar, NR1 ve NR2 alt birimlerini içermelidir; NR3 alt birimi ise zorunlu değildir. NR3 alt birimi, NMDAR özelliklerini modüle eder. NMDAR'larda, kanal aktivasyonu için iki tip agonist gereklidir; NR2 alt birimlerinde bir glutamat bölgesi agonisti ve NR1 alt birimlerinde bir glisin bölgesi agonisti bulunur.

NMDAR'ların kanalları iki farklı özellik sergiler:

1-Endojen Mg^{2+} tarafından voltaja bağlı kanal blokajı ile; tipik nöronal dinlenme potansiyellerinde NMDAR aracılı akımın %90'ından fazlasını inhibe eder. Bununla birlikte, postsinaptik depolarizasyon, kanal boyunca voltaj alanını değiştirerek Mg^{2+} 'ı dışarı çıkmaya zorlar ve NMDAR aracılı akımları artırır. Bu nedenle, akımın NMDAR'lar aracılığıyla etkili bir şekilde iletilmesi için iki çakışan sinyal, glutamatın presinaptik salınımı ve postsinaptik depolarizasyon, NMDAR'ların "tesadüf dedektörleri" olarak hareket etmesine izin verir.

2-Yüksek Ca^{2+} geçirgenliği; NMDAR aktivitesine derin fizyolojik ve patolojik önem kazandırır. Eş zamanlı sinaptik öncesi ve sonrası aktivite ile NMDAR'lar yoluyla Ca^{2+} akışını uyarılır. Sonuç olarak bir dizi hücre içi sinyal yolu aktive edilir. Bu aktivasyon sonucunda; sinaptik bağlantıların stabilizasyonu, uzun süreli potansiyelin (Long-term potansiyel-LTP) depresyonu veya güçlenmesi ve nekrotik-apoptotik nöron ölümü görülür. Bu nedenle, NMDAR aktivitesinin inhibisyonu, zararlı veya faydalı olabilen çok farklı sonuçlara sahip olabilir(3) .

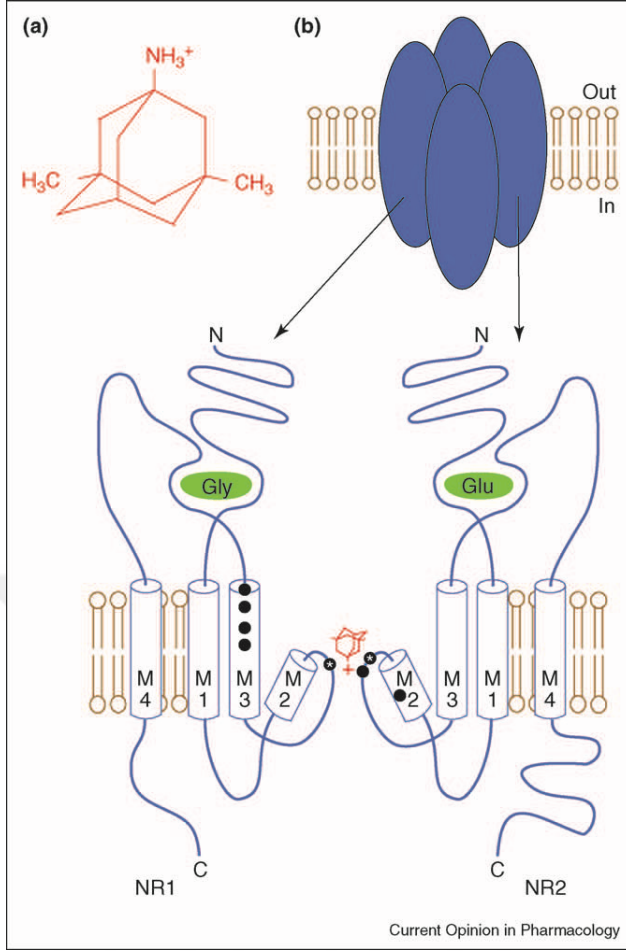
Hipoksik iskemik beyin hasarları, travma, epilepsi ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, HIV ile ilişkili demans, multipl skleroz, amiyotropik lateral skleroz, Huntington Koresi gibi nörodejeneratif hastalıkların temelinde farklı mekanizmalar olsa da sonuçta NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ile nöron dejenerasyonu görülmektedir (29). Bu patogenez düşünüldüğünde, tedavide Ketamin gibi NMDAR antagonistleri kullanılabilir; fakat Ketamin hafıza bozukluklarına neden olur, şizofreni semptomlarını etkileyici bir doğrulukla yeniden üretir, yaygın olarak suiistimal edilir ve orta konsantrasyonlarda nöronlarda vakuoller ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümünü indükler. Oysaki Memantin iyi tolere edilir ve psikotik yan etki insidansı düşüktür. Memantin'in yararlı etkileri ve Ketamin'in nörotoksik etkileri, kısmen NMDAR'ların beyindeki uyarım ve inhibisyon üzerindeki güçlü etkilerinin dengesindeki kaymalardan kaynaklanabilir. Bu nedenle, bir ilacın

reseptör üzerinde etki mekanizmasındaki görünüşte küçük farklılıklar, klinik etkilerinde büyük farklılıklara dönüşebilir (3).

Memantin'in normal sinaptik aktiviteyi ve hipokampal LTP 'yi olumsuz yönde etkilememesi, reseptöre bağlanma ve ayrılma kinetiğinin hızlı olması klinik olarak kullanılabilme potansiyelini artırmaktadır.

DTH'ler, memeli işitme organının mükemmel duyarlılığı ve frekans çözümleme kapasitesi için çok önemli olan aktif mekanik amplifikasyon mekanizmasının merkezi ögesidir. Bu amplifikasyonu DTH'ler, en az 70 kHz'e kadar olan frekanslarda, membran potansiyellerinin değişmesi ile hücre uzunluklarını değiştirerek yaparlar. Koklear amplifikasyon ise, DTH'lerle sinaps yapan kolinerjik medial olivokoklear sistem, kolinerjik uyarı ile kalsiyum ile aktive olan SK2 tipi K^+ kanalları kullanır. Sonuçta inhibitör hiperpolarizasyonu sağlanır.

Olivokoklear sistem, iki zaman ölçeğinde akustik stimülasyona tepkisini azaltarak koklea üzerinde etki eder. nAChR'ler tarafından Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanallarının hızlı açılmasının neden olduğu bir "hızlı etki"yi, ikinci haberci sistemleri içerdiği düşünülen daha yavaş bir etki takip eder. Memantin'in en belirgin etkisi hızlı inhibitör postsinaptik kanal blokajı olduğu için, SK2 kanal açılmasına dayalı olarak hızlı efferent etkiyi bloke etmesi beklenebilir. Ayrıca, bu inhibisyona DTH, nAChR yoluyla Ca^{2+} akışının ortadan kaldırılması neden olduğu için, aynı sinaptik olaylarda Ca^{2+} akışı tarafından tetiklendiği düşünülen ikinci, daha yavaş efferent etki Memantin tarafından bloke edilmesi de beklenir(30).



Şekil 7. Memantin ve NMDAR'lar (3)

(a) Memantin'in yapısı. (b) NMDAR'ların (üst panel) dört alt birimli kuaterner yapısını ve iki NMDAR alt biriminin transmembran yapısını (alt panel) gösteren diyagram (mavi renkle gösterilmiştir, ön ve arka alt birimler netlik için çıkarılmıştır; asıl düzenlemenin NR1 alt birimine bağlı glisin (yeşil), NR2 alt birimine bağlı glutamat (ayrıca yeşil) ve kanalı bloke eden Memantin (kırmızı) ile. N-bölgeleri, Mg^{2+} ve birçok organik bloker tarafından kanal blokajına kritik olarak dahil olan asparagin kalıntıları, yıldızlarla tanımlanır.

Metabolik glutamat reseptörleri (mGluR) şizofreni, depresyon, ilaç bağımlılığı, anksiyete, Alzheimer ve Parkinson hastalığı ve iskemik beyin hasarında rol oynamaktadır. mGluR2 ve mGluR3, siklik adenosin monofosfat (AMP) oluşumuna negatif olarak bağlanır ve glutamat iletimini düzenleyen presinaptik otoresptörler olarak işlev görür. Sinaptik yarık çevresinde lokalizasyonları, nörotransmitterin sinaptik aktif bölgeden kaçmasına yol açan herhangi bir aşırı glutamat salınımına bir yanıt sağlar; mGluR2/3'ün aktivasyonu bu salınımı bastırır. mGluR2/3 reseptör aktivasyonu tarafından indüklenen inhibitör etkilere, hücre içi siklik AMP seviyelerindeki bir azalma veya voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının azalmış aktivitesi

aracılık eder. mGluR3 ayrıca glial hücreler üzerinde lokalizedir ve mGluR3 aktivasyonunun nöroprotektif dönüştürücü, tümör büyüme faktörünün β (TGF- β) salınımını uyardığı gösterilmiştir (29). Eylemleri nedeniyle, mGluR2/3 eksitotoksisteyi ve nöronal hasarı azaltmak için umut verici hedefler olarak görünmektedir. Preklinik çalışmalar, mGluR2 ve/veya mGluR3'ün seçici agonistler tarafından aktivasyonunun, yetişkinlerde ve yetişkinlerde deneysel iskemi modellerinde nörokoruma ile sonuçlandığını göstermiştir (3).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde gerçekleştirilmiştir. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından yapılan değerlendirmeler sonucunda 2022/05 kararı ile etik kurul onayından geçmiş (Bkz Ek 2) ve maddi destek olarak İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) (Proje No: 22/056) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmanın tasarımı, 'Reporting Data on Auditory Brainstem Responses (ABR) in Rats: Recommendations Based on Review of Experimental Protocols and Literature-2021' klavuzuna uygun olarak yapılmıştır (31).

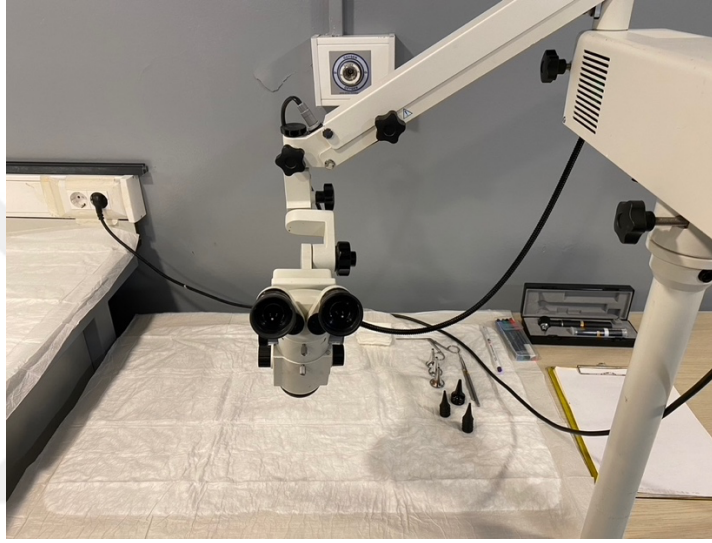
Çalışmada, ağırlıkları 400-500 gr arasında olan 28 adet Sprague Dawley cinsi genç-erişkin erkek sıçan (*genus rattus*) kullanıldı. Sıçanlar, %35-45 nem, 22-24°C ortam sıcaklığı, 12/12 saat gece/gündüz periyodunda, ad libitum pelet yem koşullarında ve her kafeste maximum 4 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Deney hayvan temini, barındırma ve yapılan işlemler Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda (BEDEHAL) yapıldı.

Çalışma sırasında "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlarda Kullanılan Omurgalı Hayvanların Korunmasına İlişkin Avrupa Sözleşmesi" ne (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes-ETS 123) uyulmuştur (Strazburg,1986).

Sıçanlar üzerinde yapılan otomikroskopik muayene, DPOAE ve ABR ölçümleri genel anestezi altında; 50 mg/kg Ketamin hidroklorür (Ketalar ampul, Pfizer, İstanbul) + 10 mg/kg Ksilazin hidroklorür (Rompun flakon, Bayer, İstanbul)

intraperitoneal uygulanarak verildi. Tekrarlayan doz gerektiğinde ise ilk dozun 1/3'ü kadar Ketamin hidroklorür intraperitoneal olarak uygulandı. Anestezi derinliği 'Cilt ya da parmak kısırtma yanıtları' ve 'fizyolojik yanıtın izlenmesi' ile takip edildi.

Sıçanlar çalışmaya, DKY'nin değerlendirilmesi için otomikroskop (Zeiss, Almanya) altında muayene (Şekil 8), 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 beyin sapı cevaplarının kaydedilmesi ile dahil edildi.



Şekil 8.Çalışmada kulak muayenesi için kullanılan otomikroskop ve malzemeler

Testler sonucunda işitme değerleri normal olan 28 sıçanın 'Distortion-Product' Otoakustik Emisyon (DPOAE) ve İşitsel Beyin Sapı Cevapları (ABR) testleri yapıldı.

Çalışmada ototoksisite modeli, tek doz 15 mg/kg Sisplatin (Cisplatin 50 mg /100 ml flakon, Koçak Farma), intraperitoneal uygulama ile oluşturuldu.

Memantin ile yapılan sıçan deneylerinde 10 mg /kg Memantin (Melanda, 5 mg/0,5 ml çözelti, Aris) uygulamasının nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (32). Çalışmamızda aynı dozu intraperitoneal olarak uyguladık.

ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ

Çalışma başlangıcında 28 sıçanın (56 kulak) DPOAE ve ABR ölçümleri alındı. Her bir sıçanın 14 gün takip edilmesi planlandı. Çalışma sürecinde 4 hayvan kaybı yaşandığından 24 sıçan (48 kulak) çalışma sonucunda değerlendirmeye alındı. Çalışmanın 9. gününden itibaren; Grup A (Sisplatin) ve Grup B (Sisplatin+Memantin)

gruplarında ishal, dehidratasyon bulguları; cilt tonusunda azalma, tüylerde dikleşme ve öz bakımında azalma gibi genel durumda kötüleşme görüldüğünden, etik kurallara (ETS 123) uyularak çalışma 10. gününde sonlandırıldı.

Grup A: Sisplatin deney grubu (6 sıçan=12 kulak). Çalışmanın 3.gününde tek doz SİSPLATİN (15 mg/kg) intraperitoneal (ip) uygulanarak, ototoksisite modeli oluşturuldu.

Grup B: Siplatin +Memantin çalışma grubu (6 sıçan=12 kulak). 10 gün boyunca her gün MEMANTİN (10 mg/kg) ip. Uygulandı. Çalışmanın 3. Gününde tek doz SİSPLATİN (15 mg/kg) ip uygulandı.

Grup C: Memantin çalışma grubu (6 sıçan=12 kulak). 10 gün boyunca her gün sadece MEMANTİN (10 mg/kg) intraperitoneal (ip) uygulandı.

Grup D: Kontrol grubu (6 sıçan=12 kulak). 10 gün boyunca her gün 10 ml %0,9 NACL (Serum fizyolojik) intraperitoneal (ip) uygulandı.

Çalışmamızda, Sisplatin ototoksisitesine karşı sistemik Memantin kullanımı elektrofizyolojik testler ve histolojik değerlendirmeler olarak iki aşamada değerlendirildi.

Elektrofizyolojik Ölçümler

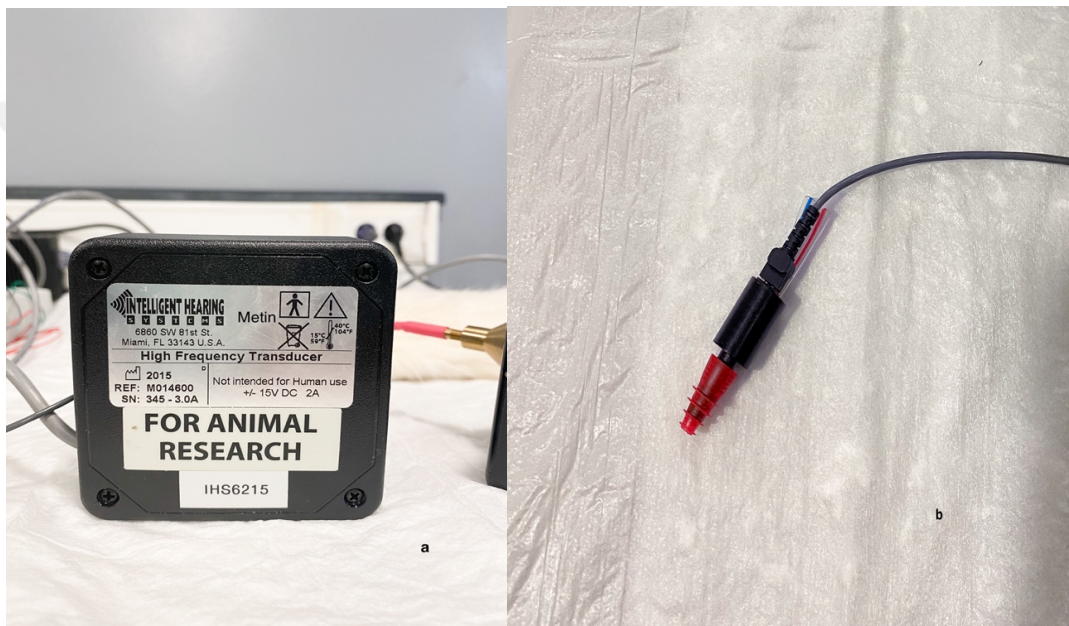
Çalışmaya dahil edilen deney hayvanlarının elektrofizyolojik ölçümleri 0.gün ve 7. Gün olarak yapıldı.

Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon Ölçümü (DPOAE):

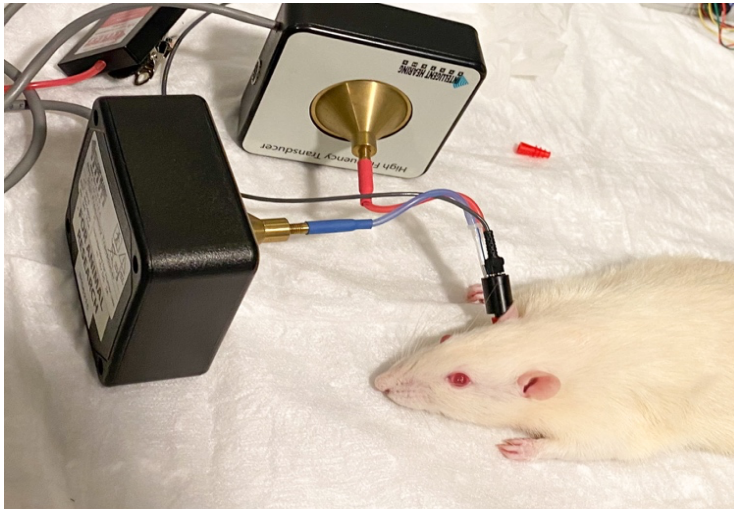
Distorsiyon ürünü otoakustik emisyonlar (2f1-f2 kübik distorsiyon ürünü bileşenleri) IHS SmartDPOAE (Miami, FL) cihazı kullanıldı. IHS-3738 yüksek frekans transdüserler kullanıldı (Şekil 9a). F2 frekans 4 kHz ile 32 kHz arasında değişmekte idi. Sıçanların dış kulak yoluna ER10B+ prob mikrofona (Şekil 9b) ve ucunda uygun prob ucu takılarak ilk olarak alçak frekans DPOAE cevapları elde edildi. Daha sonra yüksek frekans transdüserlere prob mikrofona takılarak yüksek frekans DPOAE emisyon cevapları elde edildi (Şekil 10). Ses basınç seviyesi (SPL); ER10B+ prob mikrofona (Etymotic Research, Inc., Elk Grove Village, IL) ve yazılım-donanım Smart DPOAE System version 4.53 (IHS) ile ölçüldü. f2 ve f1 frekansları arasındaki oran (f2/f1) 1,22 idi. Uyarın şiddeti f1 frekansı için L1 ve f2 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 uyarıcı (f1 ve f2) 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. Testler ortam gürültüsünün 50 dBA'yi geçmediği bir ortamda gerçekleştirildi.

DPOAE sonuçlarının değerlendirilmesinde; elde edilen 2f1-f2 kübik distorsiyon ürünleri f1 ve f2'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 (12).



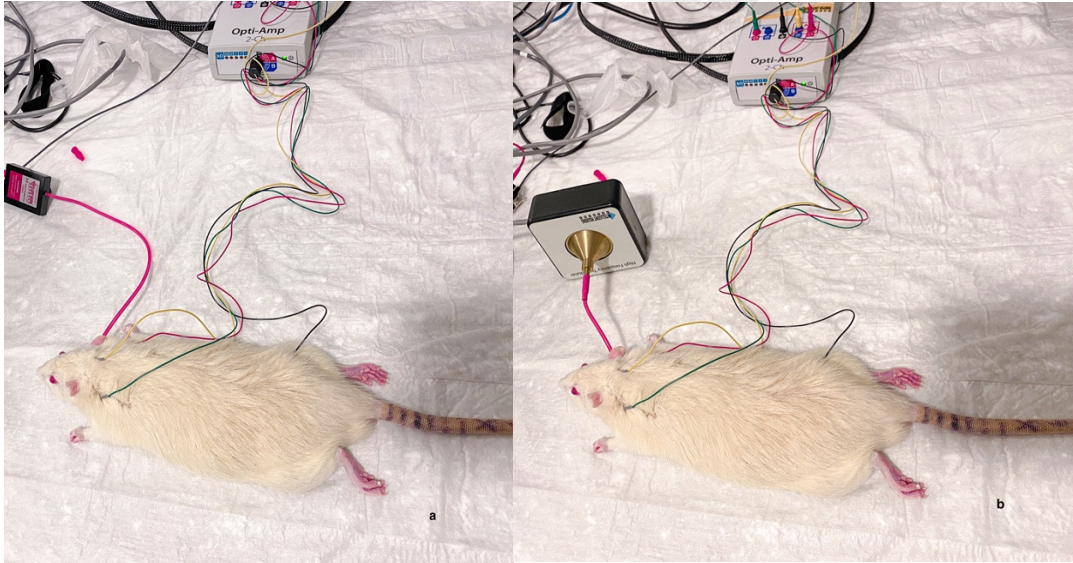
Şekil 9.a)Yüksek frekans transdüser b) ER10B+ prob mikrofön



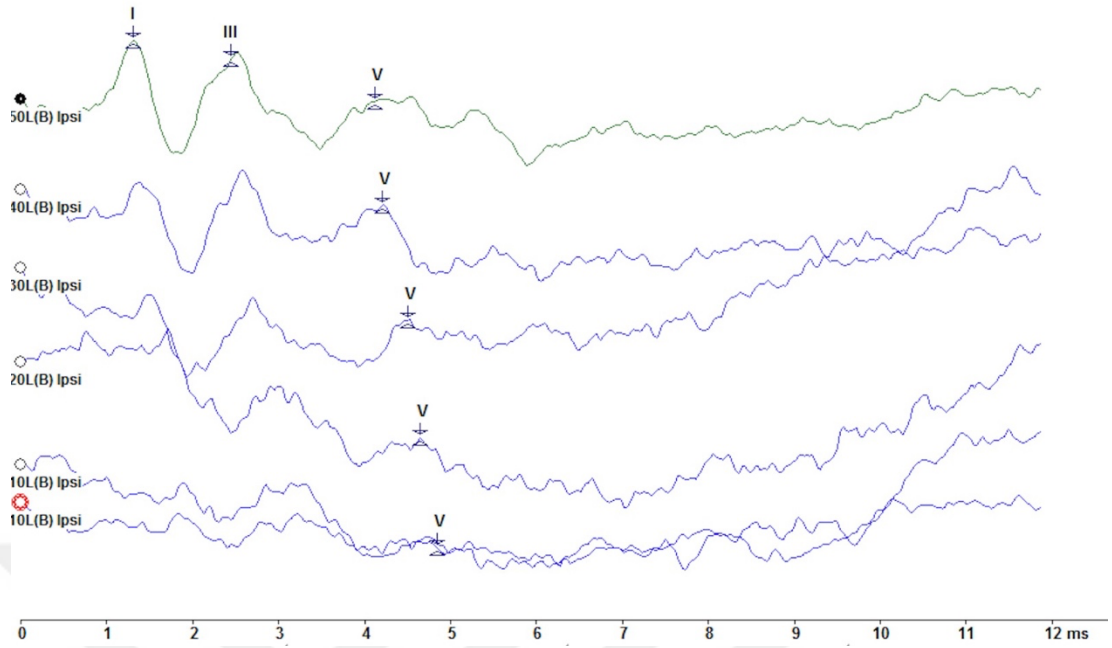
Şekil 10. Yüksek frekans transdüser ile DPOAE ölçümü

İşitsel Beyin Sapı Cevabı (ABR):

İşitsel Beyin Sapı 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. Sıçanın 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 alına, toprak elektrot ise kontralateral ayak tarafına yerleştirildi (Şekil 11). 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 ortalama alınması yapıldı. 80 dB SP'den başlanıp descending-ascending metodu ile işitme eşiği belirlendi. 20 dB SPL normal işitme için sınır kabul edildi (Şekil 12).



Şekil 11.a) E-A-R Tone 3A ile alçak frekans ABR ölçümü b) Yüksek frekans transdüsör ile ABR ölçümü



Şekil 12.Örnek sıçana ait normal ABR sonucu

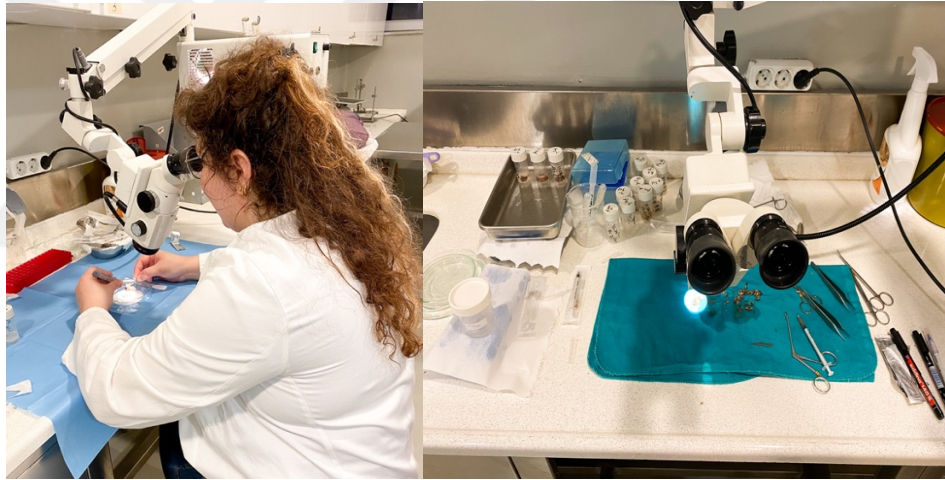
Histolojik Değerlendirmeler

Çalışmanın 10.gününde sıçanlara yüksek doz Tiopental sodyum (Pental Sodyum, İ. E. Ulagay, İstanbul) enjeksiyonu yapıldı. Sonrasında servikal dislokasyon işlemi yapılarak temporal kemikleri çıkarıldı.

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

Işık mikroskobisi:

Histopatolojik değerlendirilmede, sıçanların sol temporal kemik disseksiyon materyalleri Ostesoft® (Merck Millipore, Almanya) hızlı dekalsifikasyon solüsyonu içine konularak yaklaşık 16 saat oda ısısında bekletildi. Ardından solüsyon artıklarından temizlemek için, diseksiyon materyali tamponlanmış fosfat solüsyonu (PBS-phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, Almanya) ile yıkandı. Koklear yapı mikroskop altında mikrodiseksiyon ile kemik korteksten diseke edildi (Şekil 13). Eppendorf tüplerine alınan koklealar %10'luk formalin solüsyonuna (Merck Millipore, Almanya) alındı. Oda ısısında 1 hafta bekleyen dokuların dehidratasyon işlemleri artan derecelerdeki alkol serilerinde (Ethanol, Isolab, Almanya) tamamlandı. Dokuların şeffaflaştırma işlemleri ise ksilen ile yapıldı. Daha sonra dokular parafine gömüldü ve rutin takip protokolü tamamlandı (Tablo 1).



Şekil 13. Koklear yapıların mikrodiseksiyon ile çıkarılması

Tablo 1. Işık Mikroskobisi İçin Rutin Takip Prosedürü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Dekalsifikasyon	Hızlı dekalsifikasyon solüsyonu	16 saat
Yıkama	Tamponlanmış fosfat solüsyonu	1 saat (+4 derece)
Tespit	Formalin %10 solüsyon	1 hafta oda ısısında

Suda Bekletme	%70 Alkol	12 saat
Dehidratasyon	%90 Alkol %90 Alkol %96 Alkol %96 Alkol %100 Etanol %100 Etanol	15 dakika 30 dakika 15 dakika 30 dakika 30 dakika 1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen	5 dakika
Parafinizasyon	Parafin Parafin	1 saat (56 derece) 2 saat (56 derece)
Gömme	Parafin	Oda ısısında

Hematoksilen&Eozin (H&E) Boyama Prosedürü:

Parafin bloklardan aldığımız 5 µm kalınlığındaki kesitleri, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerine tabi tutuldu. Ardından, Ghill Hematoksilen (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) ve Alkollü Eozin (DDK Italia, Vigevano, İtalya) ile boyanan kesitler, Entellan (Merck Millipore, Almanya) ile daimi preparat haline getirilmişlerdir (Tablo 2). Hazırlanan preparatlar Olympus DP72 kamera sistemli - Olympus BX51 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Işık mikroskobik değerlendirmede korti organı morfolojik olarak incelenerek stria vaskularis, spiral ganglionlar ve dış tüylü hücredeki dejeneratif değişiklikler değerlendirildi ve semikantitatif olarak skorlandı.

Tablo 2.Hematoksilen&Eozin Boyama Prosedürü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon ve rehidratasyon	Etüvde (56 derece) Ksilen Ksilen %100 Etanol %96 Alkol %90 Alkol %70 Alkol Distile Suda Yıkama	2 saat 1 saat 1 saat 2 dakika 2 dakika 2 dakika 2 dakika 2 dakika
Nükleer Boyama	Ghill Hematoksilen Çeşme Suda yıkama	5 dakika 3 dakika
	%70 Alkol	1 dakika

Sitoplazmik Boyama	Alkollü Eozin	3 dakika
Dehidratasyon	%70 Etanol %90 Etanol %96 Etanol %100 Etanol	1 dakika 1 dakika 1 dakika 1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen Ksilen	1 saat 1 saat

Işık mikroskopisinde histolojik değerlendirme Freitas ve ark. tarafından tanımlanan skorum sistemi kullanıldı. Stria vaskülaris değerlendirmesinde ise subjektif olan marjinal hücre kabarcıklanması, sitoplazmik vakuolizasyon ve intermedint hücrelerin atrofisi kullanıldı. Normal kalınlıkta stria vaskülaris ve marjinal hücrede kabarcıklanma, sitoplazmik vakuolizasyon veya hücre sel büzüşmenin olmaması: 0 puan, belli belirsiz olması:1, hafif:2, orta:3, ve şiddetli: 4 puan

Spiral ganglion hücrelerinde vakuolizasyon ve nükleer dejenerasyon subjektif olarak ayrıca değerlendirildi ve değişikliğin şiddetine göre kategorize edildi (değişiklik yok:0, hafif:1, orta:2 ve şiddetli değişiklik: 3 puan)(33,34). Mid-modiolar eksenden geçen kesitlerde sağlam nükleuslu DTH'ler sayılarak puan verildi. (Tablo3)

Tablo 3. Işık Mikroskopisi ile Değerlendirme

		YOK	BELLİ-BELİRSİZ	HAFİF	ORTA	ŞİDDETLİ
STRİA VASKÜLARİS	Marjinal Hücrede şişme	0	1	2	3	4
	Sitoplazmik Vakuolizasyon	0	1	2	3	4
	İntermedint Hücre Atrofisi	0	1	2	3	4
SPIRAL GANGLİON	Sitoplazmik Vakuolizasyon	0	1	2	3	4
	Nükleer Dejenerasyon	0	1	2	3	4
İntakt nükleuslu DTH	3 tane	2 tane	1 tane	YOK		
Skor	0	1	2	3		

Elektron Mikroskopisi:

Sıçanları sol temporal kemik disseksiyon materyalleri Osteosoft® hızlı dekalsifikasyon solüsyonu içine konularak yaklaşık 16 saat oda ısısında bekletildi

Ardından solüsyon artıklarından temizlemek için, disseksiyon materyali tamponlanmış fosfat solüsyonu ile inkübe edildi. Dekalsifikasyon sonrası, koklear materyal otik kapsülden mikroskop altında mikrodiseksiyon ile diseke edildi. Eppendorf tüplerine alınan koklealar %2,5'lik ve pH sı 7,4 olarak ayarlanan Glutaraldehit solüsyonunda (Merck Millipore, Almanya) 4 saat (+4 derecede) bekletildi. Ardından +4 derecede fosfat tamponunda bekletilerek rutin SEM (Scanning electron microscopy) takibine (Tablo 4) alındı(35,36).

Tablo 4. Rutin SEM Takibi

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Dekalsifikasyon	Hızlı dekalsifikasyon solüsyonu	16 saat
Yıkama	Tamponlanmış Fosfat Solüsyonu (PBS)	1 saat (+4 derece)
Tespit	%2,5 Glutaraldehit fosfat	4 saat (+4 derece)
Yıkama	Tamponlanmış fosfat solüsyonu (PBS)	12 saat (+4 derece)
Tespit	%1 Osmium Tetraoksit	1 saat
Yıkama	1.YIKAMA -PBS 2.YIKAMA-PBS	15 DAKİKA 15 DAKİKA
Dehidratasyon	%50 Etanol %70 Etanol %90 Etanol %96 Etanol %100 Etanol %100 Etanol	5 dakika 10 dakika 10 dakika 10 dakika 15 dakika 15 dakika
İnklüzyon materyaline gömme	2/1 Etanol-Amilasetat 1/1 Etanol-Amilasetat 1/2 Etanol-Amilasetat Saf Amilasetat	15 dakika 15 dakika 15 dakika 24 saat

Kurutma	Kurutma Kağıdı Üzerinde Manuel Kurutma	8-10 gün
Tutucuya yapıştırma		
Altın Kaplama		

Rutin takip, dokuların hazırlanması ve SEM (JSM-5200 SEM) görüntülenmesi Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar ortalama±Std. sapma olarak gösterildi. Sisplatin, Sisplatin+Memantin, Memantin ve Kontrol grupları arasında ABR, DPOAE değerlerinin ilaç uygulaması öncesi (0.gün) ve sonrası (7.gün) ölçümlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon sign rank test kullanıldı. Gruplar arası ilaç uygulaması öncesi ve sonrası ABR, DPOAE değerlerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı, fark saptandığında bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Histopatolojik incelemelerin sonuçlarının değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

İstatistiksel analizde IBM SPSS Statistics 28.0.1 kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan Sisplatin'e bağlı ototoksisite modelini elektrofizyolojik ölçümler ve histolojik değerlendirmeler olmak üzere iki kategoride değerlendirdik.

ELEKTROFİZYOLOJİK ÖLÇÜMLER

Çalışmamızda odyolojik olarak işitmesi normal sınırlarda olduğu gösterilen 24 sıçanın her iki kulağından ölçüm yapıldı (=48 kulak). Gruplara ait elektrofizyolojik ölçüm sonuçlarımız aşağıdaki şekildedir.

Grup A (Sisplatin Grubu)

Grup A grubunda toplam 12 kulakta 0. Gün ve 7. Gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 5'te ve DPOAE testi ölçüm sonuçları Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 5. Grup A (Sisplatin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)

Uyaran/Zaman	0.gün (Ort±SS)	7.gün (Ort±SS)
Klik	10,00	54,17±38
8 kHz	10,83±2,88	59,58±40,47
16 kHz	15,83±9	59,17±33,96
24 kHz	20,42±11,76	57,50±29,88
32 kHz	20,83±15,64	75,83±32,03

Tablo 6. Grup A (Sisplatin) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dB SPL)

Frekans/Zaman	0.gün (Ort±SS)	7.gün (Ort±SS)
452-545 Hz	52,25±23,07	44,83±23,54
638-779 Hz	47,58±19,42	39,75±25,89
903-1105 Hz	58,75±9,38	57,92±8,80
1277-1557 Hz	49,25±18,78	44,75±19,86

1806-2211 Hz	47,25±8,19	44,33±9,96
2554-3130 Hz	25,75±5,02	23,75±10,11
3628-4422 Hz	40,92±4,31	36,67±9,26
5123-6244 Hz	17,67±5,58	15,92±10,62
7240-8844 Hz	26,42±9,69	18,42±10,10
10245-12503 Hz	20,67±6,09	17,25±4,35
14480-17672 Hz	22,67±10,57	18,58±11,45
20490-24990 Hz	27,33±5,71	27,67±4,22
28976-35344 Hz	12,83±10,38	7,33±9,51

Grup B (Sisplatin+Memantin Grubu)

Grup B grubunda toplam 12 kulakta 0. Gün ve 7. Gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 7’de ve DPOAE testi ölçüm sonuçları Tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 7.Grup B (Sisplatin+Memantin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)

Uyaran/Zaman	0.gün (Ort±SS)	7.gün (Ort±SS)
Klik	10,00	27,5±34,41
8 kHz	10,83±2,88	32,5±32,78
16 kHz	12,08±4,98	34,17±27,78
24 kHz	13,33±4,92	40,83±29,98
32 kHz	17,92±11,17	52,5±36,46

Tablo 8.Grup B (Sisplatin+Memantin) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL)

Frekans/Zaman	0.gün Ort±SS)	7.gün Ort±SS)
452-545 Hz	46,08±22,31	55,17±13,1
638-779 Hz	40,25±25,72	46,75±18,58
903-1105 Hz	57,33±5,03	59,08±5,63
1277-1557 Hz	43,83±22,45	53,33±9,59

1806-2211 Hz	47,17±6,04	47,42±3,7
2554-3130 Hz	25,33±5,59	26,50±5,12
3628-4422 Hz	39,67±4,99	40,33±3,2
5123-6244 Hz	16,92±6,08	10,08±5,83
7240-8844 Hz	22,75±16,51	14,50±9,76
10245-12503 Hz	21,58±8,8	15,75±6,32
14480-17672 Hz	14,08±10,86	11,67±11,59
20490-24990 Hz	28,33±2,1	28,67±5,71
28976-35344 Hz	10,00±9,58	7,00±6,19

Grup C (Memantin Grubu)

Grup C grubunda toplam 12 kulakta 0. Gün ve 7. Gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 9 ve DPOAE testi ölçüm sonuçları Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 9.Grup C (Memantin) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)

Uyaran/Zaman	0.gün (Ort±SS)	7.gün (Ort±SS)
Klik	10,00	10,00
8 kHz	11,67±3,89	10,83±2,88
16 kHz	17,92±11,57	15,00±14,46
24 kHz	12,50±6,21	18,33±10,29
32 kHz	27,50±20,05	21,67±21,6

Tablo 10.Grup C (Memantin) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL)

Frekans/Zaman	0.gün Ort±SS)	7.gün Ort±SS)
452-545 Hz	52,67±17,51	61,75±8,79
638-779 Hz	47,08±24,37	55,92±16,71
903-1105 Hz	58,83±5,3	59,33±5,54
1277-1557 Hz	54,50±15,07	55,67±5,78

1806-2211 Hz	46,17±4,36	46,67±8,03
2554-3130 Hz	28,25±6,45	29,58±4,60
3628-4422 Hz	41,17±3,24	41,00±4,86
5123-6244 Hz	17,83±8,25	19,58±6,76
7240-8844 Hz	17,83±11,1	20,50±8,68
10245-12503 Hz	18,83±5,7	18,00±5,42
14480-17672 Hz	17,17±14,03	16,92±12,95
20490-24990 Hz	30,25±5,19	31,33±3,44
28976-35344 Hz	7,33±11,69	15,17±11,37

Grup D (Kontrol-SF Grubu)

Grup D grubunda toplam 12 kulakta 0. Gün ve 7. Gün yapılan ABR ölçüm sonuçları Tablo 11 ve DPOAE testi ölçüm sonuçları Tablo 12’de gösterilmektedir.

Tablo 11.Grup D (Kontrol) Grubunun ABR Ölçüm Sonuçları (dB SPL)

Uyaran/Zaman	0.gün (Ort±SS)	7.gün (Ort±SS)
Klik	10,00	10,00
8 kHz	10,75±2,59	10,83±2,88
16 kHz	16,67±9,84	12,50±4,52
24 kHz	17,50±8,66	14,17±5,14
32 kHz	26,67±23,48	15,83±9

Tablo 12.Grup D (Kontrol) Grubunun DPOAE S/N-R Ölçüm Sonuçları (dP SPL)

Frekans/Zaman	0.gün Ort±SS)	7.gün Ort±SS)
452-545 Hz	53,67±16,01	44,25±17,28
638-779 Hz	46,92±15,58	38,67±16,01
903-1105 Hz	57,58±3,89	59,83±5,87
1277-1557 Hz	52,67±15,66	48,58±13,94
1806-2211 Hz	48,25±3,1	48,33±8,79

2554-3130 Hz	23,58±6,33	21,00±8,9
3628-4422 Hz	37,25±5,77	35,42±7,63
5123-6244 Hz	17,50±3,2	14,75±8,5
7240-8844 Hz	21,00±7,64	16,33±8,22
10245-12503 Hz	16,33±5,97	16,08±5,36
14480-17672 Hz	21,08±14,48	17,67±13,24
20490-24990 Hz	31,83±5,71	28,75±3,36
28976-35344 Hz	13,83±9,94	9,17±7,19

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

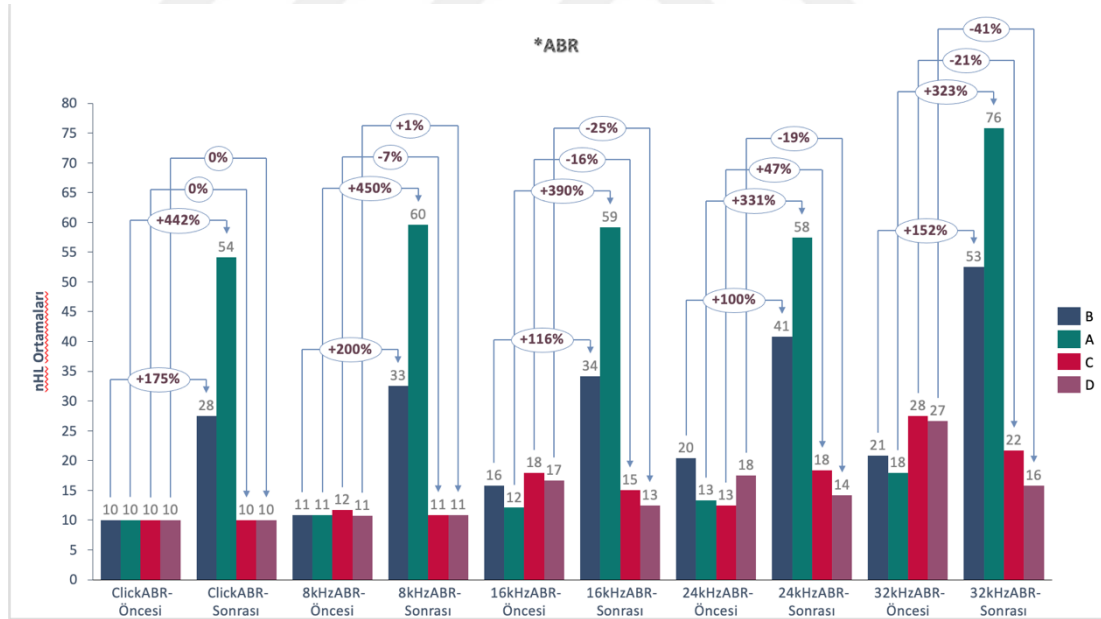
7. Gün ölçülen ABR eşik değerleri gruplar arasında her frekans için karşılaştırıldı. Grup A'da klik, 8 kHz, 16 kHz, 24 kHz ve 32 kHz uyararlarda, Grup C ve D'ye göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.01$). Grup B'de 8 kHz ($p=0.01$), 16 kHz ($p<0.05$), 24 kHz ($p<0.01$) ve 32 kHz ($p=0.001$) uyararlarda Grup D'ye göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenir iken, klik uyararında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). Aynı şekilde Grup B'de, 8 kHz ($p=0.01$), 16 kHz ($p<0.05$), 24 kHz ($p<0.05$) ve 32 kHz ($p<0.01$) uyararlarda Grup C'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenir iken, klik uyararında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). Grup B'de 16 kHz'de ($p<0.05$) Grup A'ya göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken diğer frekanslarda istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Grup C ve D arasında ise istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

0.gün ve 7. Gün ölçülen ABR eşik değerleri gruplar içinde karşılaştırıldı. İki ölçüm arasında değerlendirmede; Grup A'da 8 kHz, 24 kHz ve 32 kHz uyararlarda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken, Grup B'de klik ve tone-burst (8 kHz, 16 kHz, 24 kHz, 32 kHz) uyararlarda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0,05$). Grup C ve Grup D'de ise hiçbir frekansta istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi

($p>0,05$). Şekil 14’te ilaç uygulama öncesi ve sonrası ölçülen ABR eşiklerinin ortalaması frekans ve grup bazında gösterilmiştir.

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

7. Gün ölçülen DPOAE S/N-R cevapları gruplar arasında karşılaştırıldı. Grup A, C ve D grupları ile kıyaslandığında ise 0,45 kHz, 0,75 kHz ve 24 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Grup A ve B arasında anlamlı fark saptanmadı($p>0,05$). Grup B ve C arasında 6 kHz ($p<0,01$), 24 kHz ($p=0,01$) ve 32 kHz’de ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken; Grup B ve D arasında 3 kHz ve 4 kHz ‘de anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Grup C ve D arasında 0,5 kHz, 0,75 kHz ve 3 kHz ‘de istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,01$).

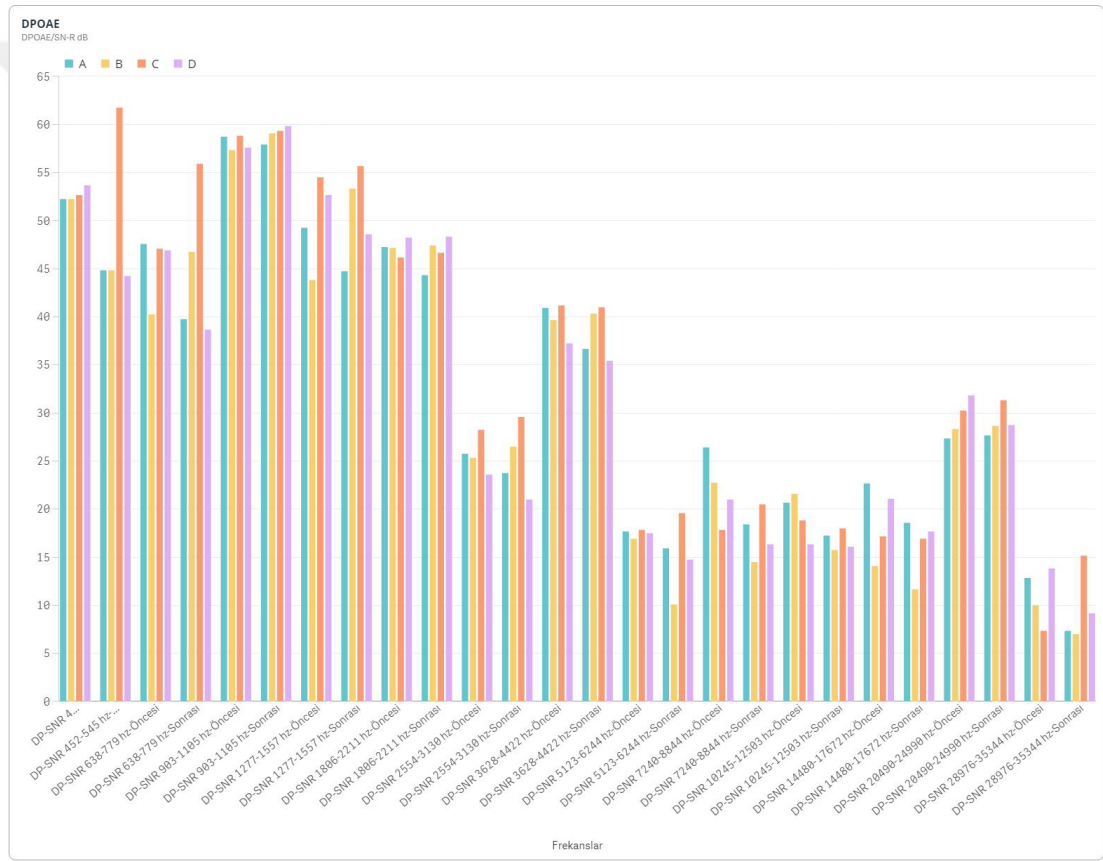


Şekil 14.İlaç uygulama öncesi ve sonrası ABR eşik ortalamaları

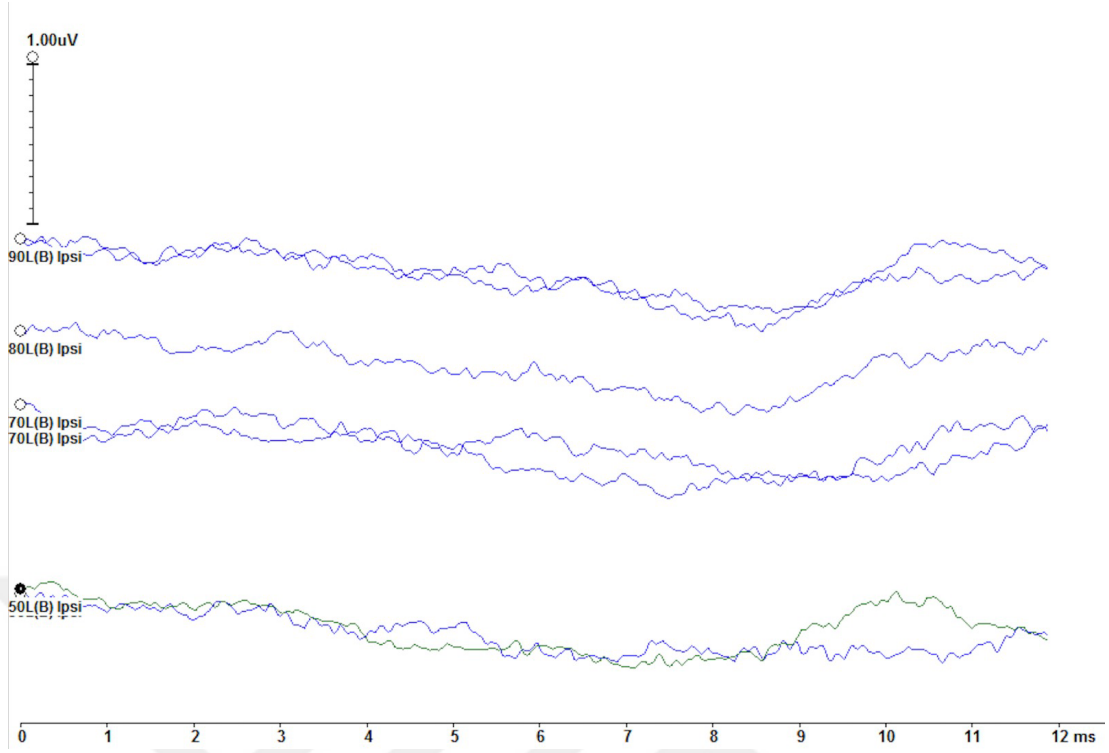
0.ve ve 7. Gün ölçülen DPOAE yanıtlarının grup içinde karşılaştırıldı. Grup A’da 4 kHz ve 8 kHz ‘de istatistiksel olarak anlamlı iken; Grup B’de 6 kHz uyaranda istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0,05$). Grup C de iki ölçüm arasında 32 kHz’de istatistiksel anlamlı fark gözlenirken($p=0,05$), Grup D’de DPOAE S/N-R

cevapları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Şekil 15’te ilaç uygulama öncesi ve sonrası ölçülen DPOAE yanıtlarının grup ortalamaları gösterilmiştir.

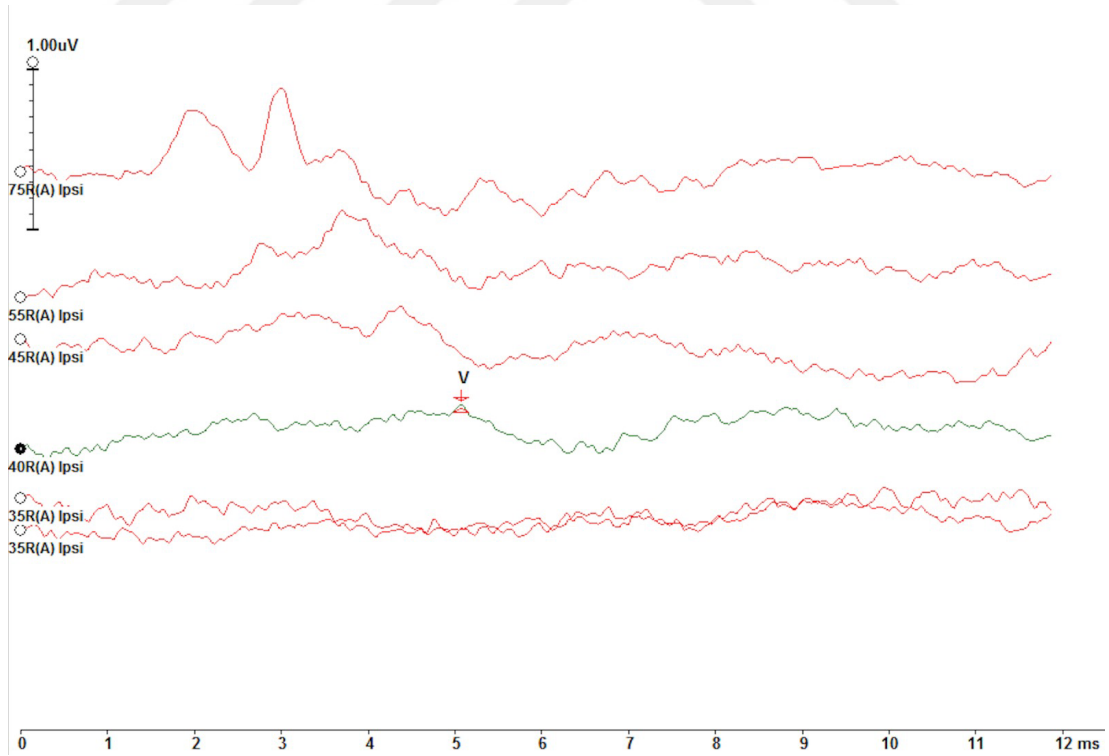
Şekil 16 ‘da Sisplatin grubundan örnek sıçan ABR kaydında, dalga morfolojisi ciddi olarak bozulmuş görülmekle beraber; Şekil 17 de Sisplatin+ Memantin alan gruptan örnek sıçan ABR kaydında dalga morfolojisinde bozulmada azalma görülmektedir.



Şekil 15. İlaç uygulama öncesi ve sonrası DPOAE yanıt ortalamaları



Şekil 16. Sisplatin grubundan örnek sıçan ABR kaydı



Şekil 17. Sisplatin +Memantin grubundan örnek sıçan ABR kaydı

HİSTOLOJİK İNCELEMELER

Işık Mikroskopisi ile Değerlendirme

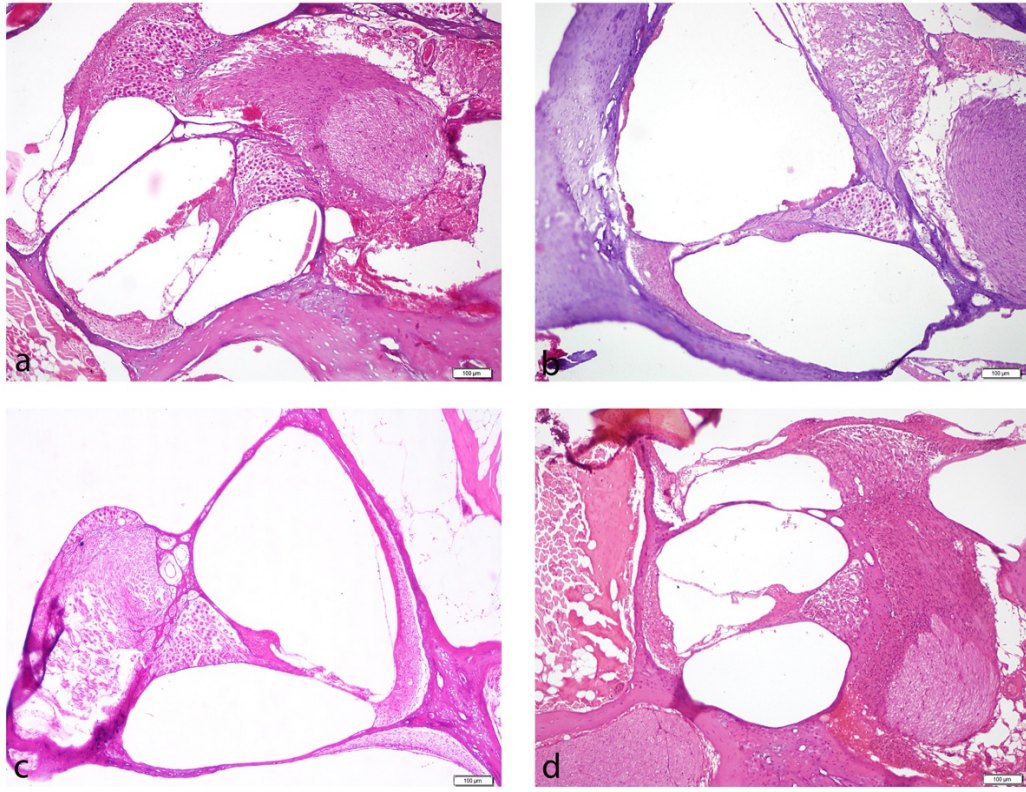
Her gruptaki sıçanların sağ kulakları değerlendirmeye alındı. Modiolar eksenden geçen kesitlerde genel koklea görüntüleri, her grup için Şekil 18’de gösterilmiştir. Grup D’nin ışık mikroskopisi ile Hemotoksilen&Eosin boyamada kokleada normal yapıda stria vaskülaris (SV), spiral gangliyon (SG) ve dış tüy hücreleri (DTH) izlenmektedir.

Grup A ışık mikroskopisi ile değerlendirildiğinde stria vaskülariste özellikle marjinal hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ve marjinal hücrelere ek olarak intermedint hücrelerde de atrofi mevcuttu. Spiral gangliyon hücrelerinde ileri derecede nükleer dejenerasyon ve vakuolizasyon saptandı. Ayrıca korti organında DTH’lerde kayıp ve kalan hücrelerde dejenerasyon yaygın şekilde mevcuttu. Grup A ve D arasında SV($p<0.01$), SG($p<0.01$) ve DTH($p<0.05$) skorlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Grup B’nin SV skorları Grup A’dan istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Grup B’nin SV ve SG skorları Grup D’ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken($p<0.05$); DTH skorlarında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı($p>0.05$). Grup B ile C kıyaslandığında ise SV skorları dışında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı($p<0.05$). Grup C ile D nin SV ve SG skorlarında anlamlı fark bulunurken($p<0.05$); DTH skorlarında anlamlı fark bulunmadı($p<0.05$). Şekil 19’da grupların histolojik değerlendirme skor ortalamaları gösterilmiştir.

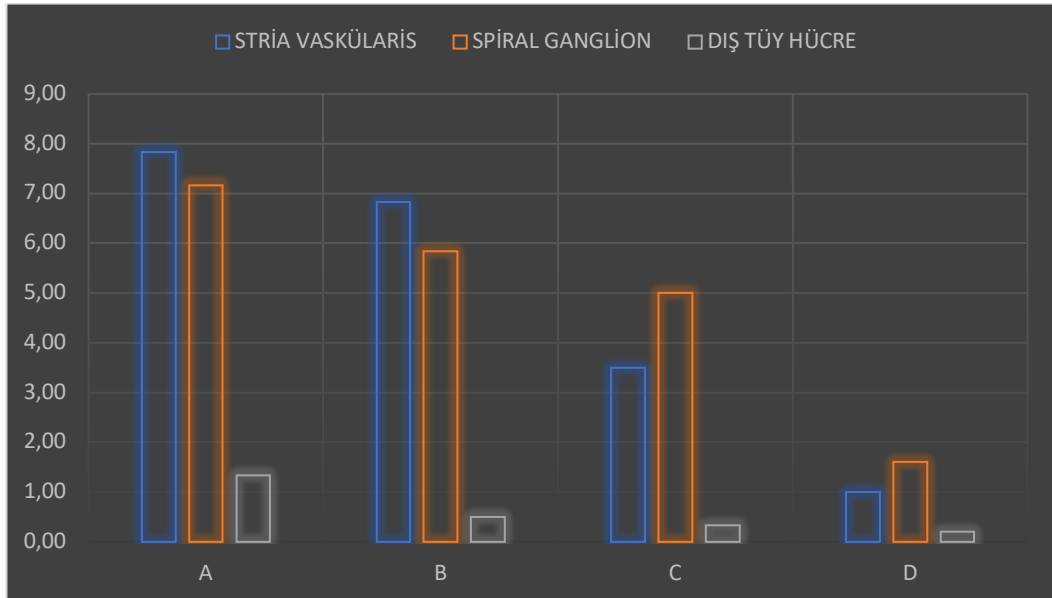
Grup B’nin Korti organında DTH’ lerde kayıp oranı, kalan hücrelerde dejenerasyon şiddeti de belirgin şekilde A grubuna oranla azdı. Şekil 20’ de korti organı görüntüleri gruplar arası kıyaslandığında, A grubundaki tüy ve destek hücre kaybı şiddetli olarak gözlenirken; B grubundaki kayıpta azalma görülmektedir.

Grup B’nin ışık mikroskopik değerlendirmesinde, spiral ganglion hücrelerindeki nükleer değişiklikler ve vakuolizasyonda A grubuna göre gerileme mevcutken; Grup B ve Grup C benzer görünümde idi (Şekil 21).

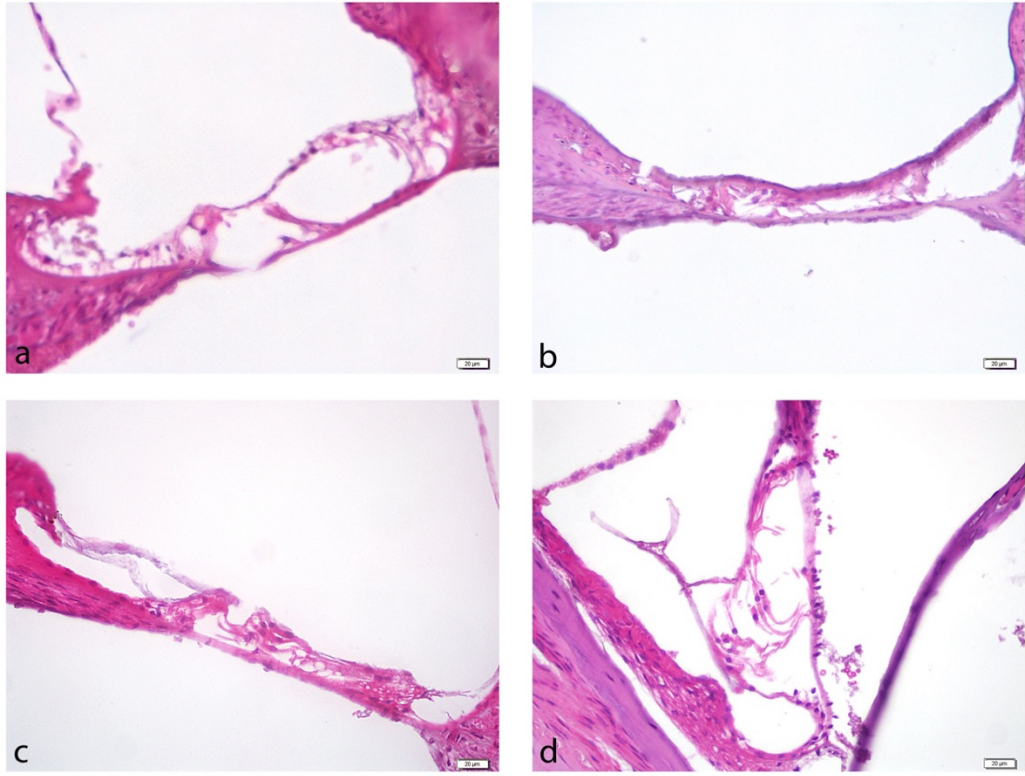
Grup A ve B’ de stria vaskülariste sitoplazmik vakuolizasyon ve atrofi benzer şiddetle görülmekteydi. Grup C’ deki stria vaskülaris hücre atrofisi Grup D’ye göre artmış olarak görülmekle beraber, Sisplatin alan gruplar kadar şiddetli görülmemektedir (Şekil 22).



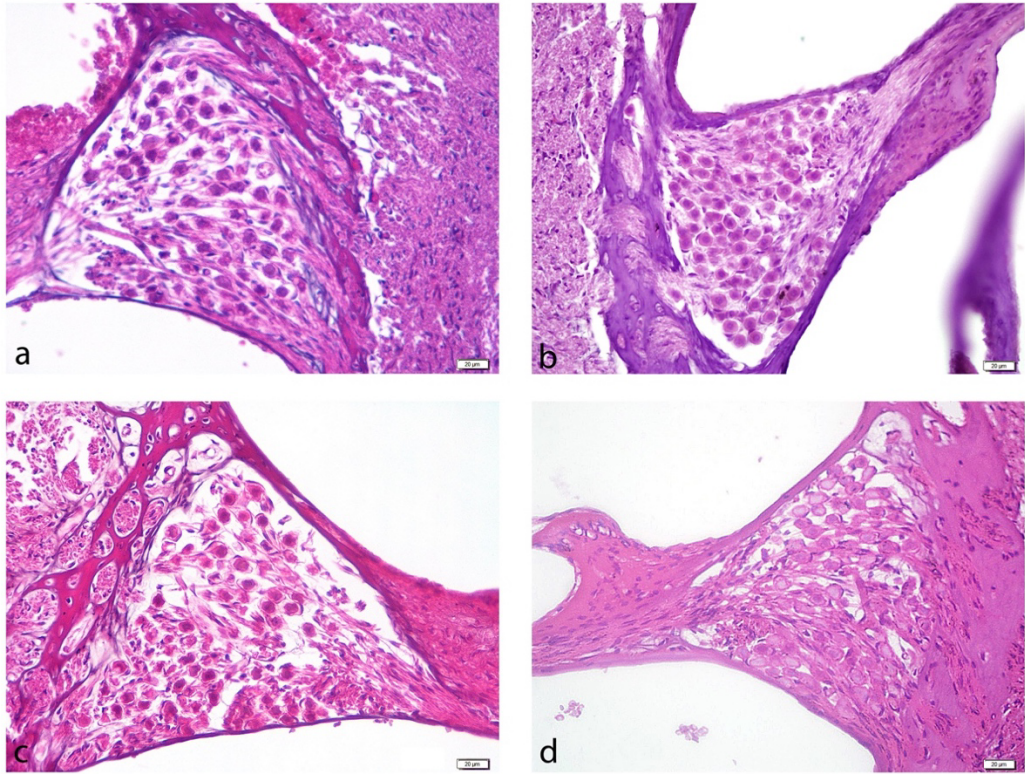
Şekil 18. Mid-modiolar eksenden geçen kesitte genel koklea görüntüsü(H&E,10x)
a, b,c,d grupları temsil etmektedir



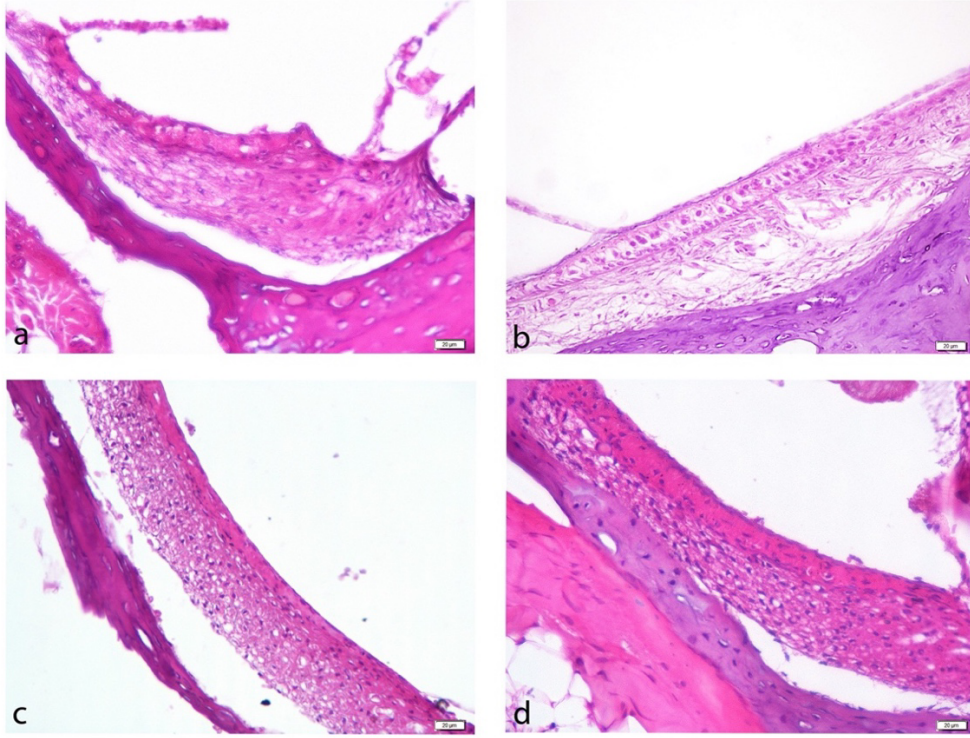
Şekil 19. Grupların histolojik skor ortalamaları



Şekil 20. Işık mikroskopisi altında grupların korti organı görüntüleri (H&E, 40x)



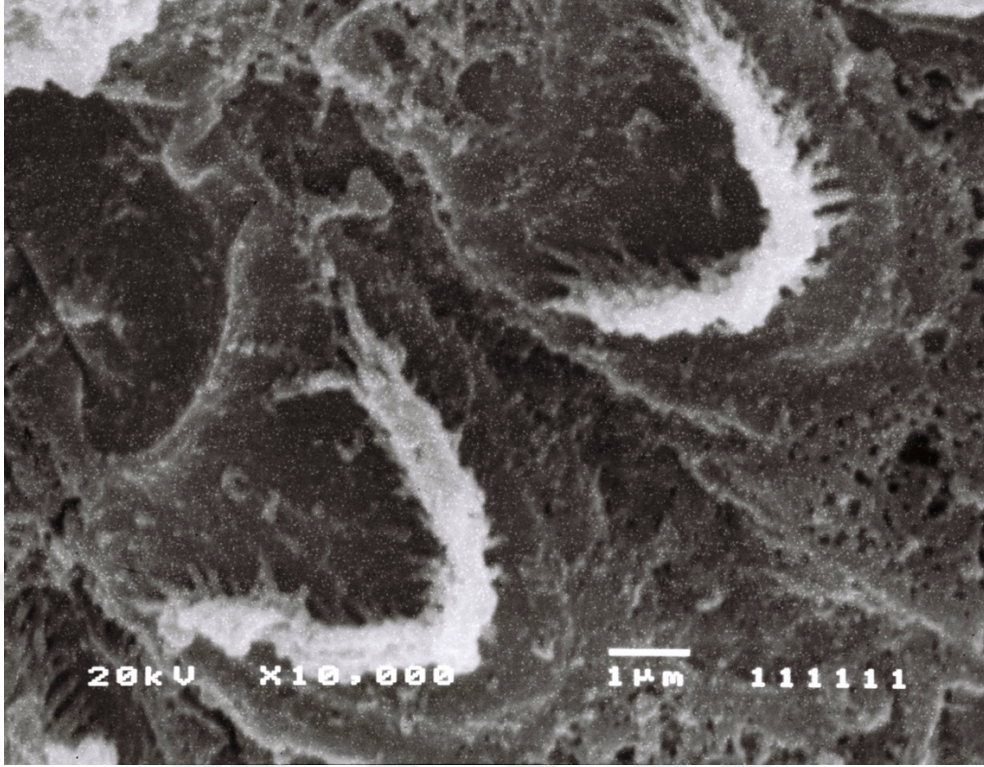
Şekil 21. Işık mikroskopisi altında grupların spiral ganglion görüntüleri (H&E, 40x)



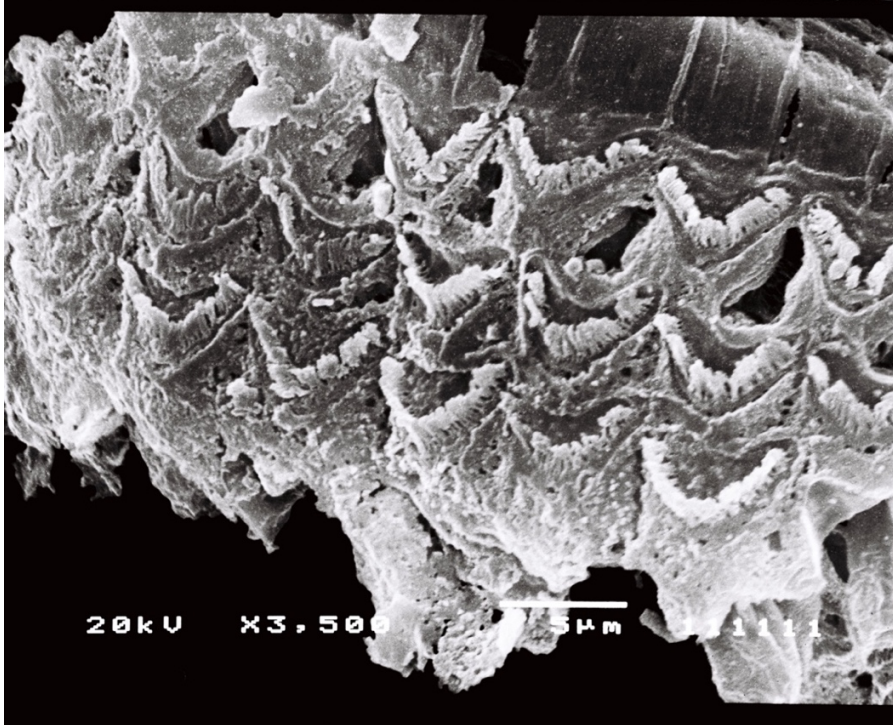
Şekil 22. Işık mikroskopisi altında grupların stria vaskularis görüntüleri (H&E, 40x)

Elektron Mikroskopisi ile Değerlendirme

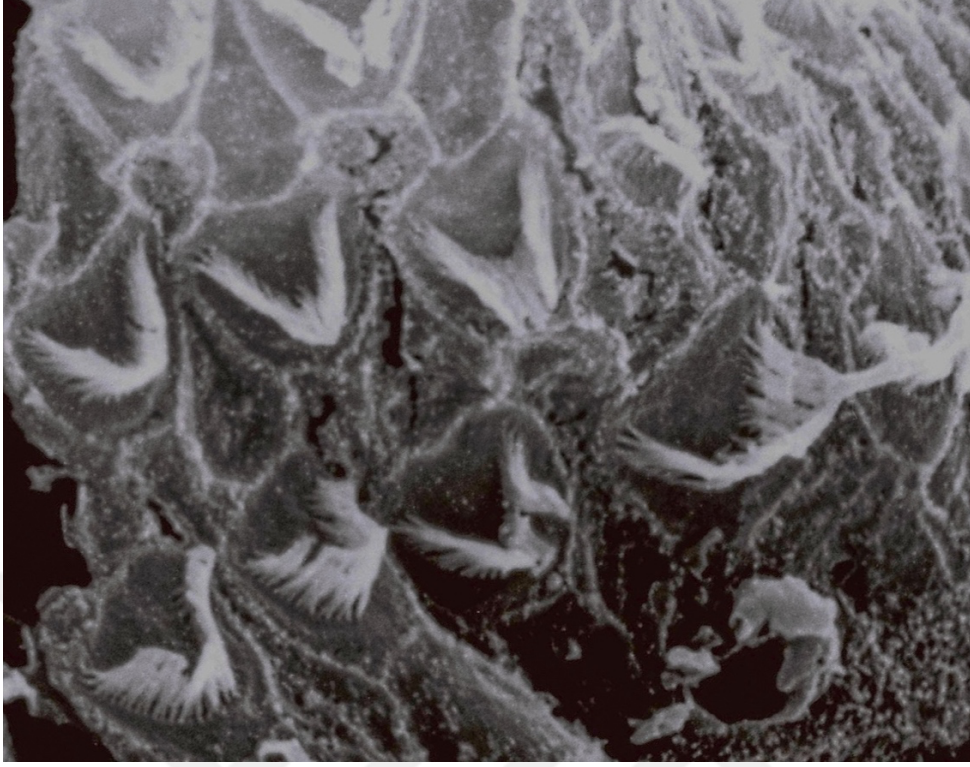
Gruplardaki sıçanların sol kulakları tarama elektron mikroskop (SEM) ile değerlendirildi. Kontrol grubunda normal DTH yapısı gözlemlendi (Şekil 23). Sisplatin alan grupta DTH sterosilyalarında yer yer tamamen kayıplar ve yapışıklar gözlemlendi (Şekil 24). Sisplatin+Memantin alan B grubunda ise DTH sterosilyalarında kayıplar ve yapışıklıklar gözlenmekle beraber; Grup A'ya göre daha az olarak gözlemlendi (Şekil 25). Memantin alan grupta ise DTH morfolojisi doğal olarak gözlemlendi (Şekil 26).



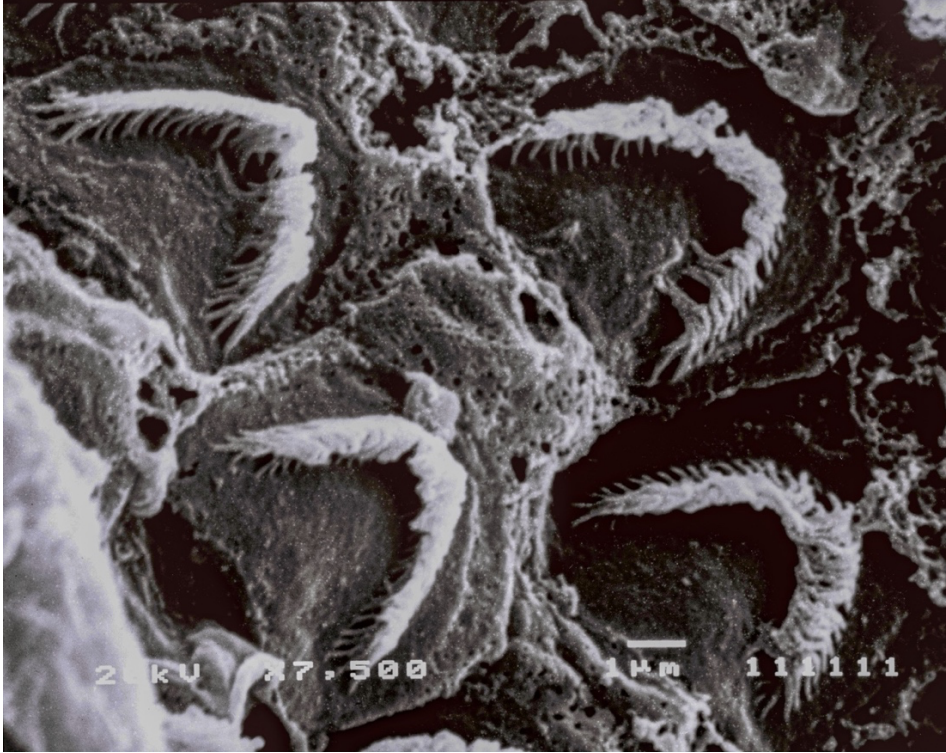
Şekil 23. SEM değerlendirmesinde kontrol grubuna ait normal dış tüy hücre morfolojisi



Şekil 24. Sisplatin grubuna ait korti organı yüzeyindeki DTH stereosilyalarının yer yer tamamen ya da parsiyel kaybolduğu ve stereosilyalarda yapışıklıklar gözlenmektedir



Şekil 25. Siplatin+Memantin grubuna ait korti organı yüzeyindeki DTH stereosilyalarında kısmi parsiyel kayıplar ve stereosilyalarda yapışıklıklar gözlenmektedir (x1500)



Şekil 26. Memantin alan grup SEM görüntülemeye normal DTH morfolojisi

TARTIŞMA

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II), baş ve boyunun skuamöz hücreli karsinomu, over, solid testis, prostat, mesane, serviks tümörleri ve küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri dahil olmak üzere çeşitli malign hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir antineoplastik ajandır. Diğer yandan SP'nin ototoksisite, nefrotoksisite, gastrointestinal toksisite, miyelintoksite ve periferik nöropati gibi ciddi yan etkileri bu ajanın klinik kullanımını sınırlar. Nefrotoksisite ve ototoksisite, başlıca doz sınırlayıcı yan etkiler olarak belirtilmektedir (37).

Sisplatin insanlarda ağırlıklı olarak 6 kHz ve üzerinde, yüksek frekanslarda bir işitme kaybı yaratır. Sisplatin tedavisi devam ettikçe veya doz arttıkça, koklear lezyon apikal olarak yayılır ve orta-yüksek frekanslarda (insanlarda 2–6 kHz) ek işitme kaybına neden olur(38) . SP kullanan hastaların %75-100'ünde işitme eşiklerinin yükselebildiği bildirilmiştir. Çocuklarda bu yan etkinin oranı daha da yüksektir (39).

Pollera ve arkadaşları çalışmalarında, 5 gün boyunca 200 mg/m² Sisplatin kullanımını takiben kalıcı işitme kaybı görüldüğünü belirtmiştir. Çalışmacılar, iki doz Sisplatin tedavisi alan hastaların %75'inde 4-8 kHz arasında 15 dB veya daha fazla işitme kaybı buldular. Çalışma sonucunda, hastaların yarısında, ilk dozdan 48 saat sonra 15 dB veya daha fazla işitme kaybı tespit edildiği belirtilmiştir (40). Sisplatin ototoksisitesi hücresel düzeyde 3. günde başlar ve 7-10 günde maksimum düzeyine ulaşır. Sisplatin bağlı ototoksisitede işitme kaybı genellikle ilk SP dozunu takiben 3-4 gün sonra, yüksek frekanslarda görülmektedir (1). Çalışmamızda ilaç sonrası ölçümleri özellikle SP uygulamasından sonraki 4. Günde gerçekleştirdik.

Literatürde, Sisplatin'in sıçanlarda 5-10 mg/kg dozlarında nefrotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. Oysaki akut ototoksik doz 12-16 mg/kg arasındadır ve nefrotoksik dozun yaklaşık 2 ila 3 katı arasındadır. Sisplatin'in diğer yan etkileri olan kilo kaybı ve ishal 12-14 mg/kg dozunda görülmektedir. Bu istenmeyen yan etkiler tekrarlayan ve kümülatif dozlarda daha çok artmaktadır. Bu durum Sisplatin ototoksisitesi sıçan modellerinde kısıtlılık teşkil etmektedir(41). Nitekim biz de çalışmamızı ishal, kilo kaybı ve hızlı gelişen genel durum bozulması gibi yan etkiler nedeniyle 10.günde sonlandırdık.

Ryan T. Ve arkadaşlarının Fischer 344/NHsd cinsi sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada, art arda 4 gün 3 mg/kg Sisplatin'in Fischer 344/NHsd sıçanında geçerli bir ototoksisite modeli olmadığı; ancak tek doz 12 mg/kg Sisplatin ya da 1 hafta arayla iki kere 6 mg /kg Sisplatin verilmesinin koklear hasarı indükleyerek, model oluşturmaya yeterli olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan çalışmada tekrarlayan dozların Sisplatin'e bağlı sistemik yan etkileri artırdığı gözlenmiştir(38). Bu bilgiler ışığında tek doz 15 mg/kg Sisplatin kullanarak, çalışmamızın ototoksisite modelini oluşturduk.

Sisplatin ototoksisite çalışmalarında, Sisplatin kullanımının, Wistar türü sıçanlarda %33-%50 arasında mortal seyrettiği belirtilmiştir. Fischer 344 ve Sprague Dawley cinsi sıçanların çalışmalarda kullanılması önerilmiştir (38). Biz de çalışmamızda ekonomik olarak daha uygun olması ve daha kolay bulunabilmesi sebebiyle Sprague Dawley cinsi sıçan kullandık.

İnsanlarda genç yaş, bolus ve yüksek doz Sisplatin enjeksiyonları Sisplatin ototoksisitesi için risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Ancak bu istenmeyen etki için cinsiyetin bir risk faktörü olup olmadığı konusunda bir fikir birliği yoktur. Bazı çalışmalar erkek cinsiyetinin bu yan etki için daha fazla tehdit altında olduğu sonucuna varmasına rağmen, diğerleri cinsiyetle ilgili hiçbir ilişki bulamamıştır(42).

Dişi ve erkek sıçanlarda oluşturulan SP ototoksisitesi modelinde, SP'nin dişi sıçanlarda işitmeye daha ciddi zarar verdiği gösterilmiş olup; dişilerde daha çok olmak üzere, her iki cinsiyette de 6 ve 8 kHz'de otoakustik emisyonlarda kötüleşme ve ABR seviyelerinde yükselme görülmüştür(42). Bir diğer çalışmada Sisplatin'e bağlı nefrotoksisiteden dişi sıçanların daha çok etkilendiği gözlenmiştir. Bu durum östrojene bağlanmıştır. Her ne kadar östrojenin kardiyoprotektif ve böbrek koruyucu özellikte olduğu bilinse de yüksek doz östrojen düzeyleri nitroz oksit (NO) üretimi ile artan oksidatif strese neden olabilmektedir(43). Biz çalışmamızın dönemlik östrojen seviyelerindeki değişiklikten etkilenmemesi için erkek sıçanları tercih ettik.

Sisplatin kullanımından kaynaklanan ototoksisite geri dönüşümsüz, çift taraflı ve doza bağlıdır. Sisplatin'in neden olduğu ototoksisitenin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber; oksidatif stresin patogenezin temeli olduğu düşünülmektedir. Sisplatin'in, kokleadaki üç alanı hedef aldığı gösterilmiştir: Korti organının bazal dönüşündeki tüy hücreleri, spiral ganglion hücreleri ve lateral duvar dokuları (spiral ligament ve stria vaskülaris) (2).

İn vitro birçok çalışma, House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1) hücrelerinde, uzun süreli Immortomouse™ koklea kültürlerinden türetilen bir hücre dizisi, Sisplatin ile indüklenen kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunun görüldüğünü bildirmiştir (44,45).

Sisplatin, koklear dokularda birikir ve DNA'ya entegre olur, bu da işlevsiz protein ve enzimlerin sentezi ile sonuçlanır. Bu, azalmış antioksidan enzim sistemi ile bağlantılı olarak aşırı serbest oksijen radikali oluşumuna yol açacaktır. Serbest oksijen radikallerinin in vivo biyolojik etkilerinin kontrolünde yer alan geniş bir enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizma yelpazesi mevcuttur. Serbest oksijen radikallerinin üretimindeki aşırı artışlar veya antioksidan sistemdeki azalma, potansiyel olarak sitotoksik oksidatif stres ile sonuçlanır (46).

Koklea yüksek metabolik aktiviteye sahiptir, bu da onu hipoksik olaylara ve iskemik reperfüzyon hasarına duyarlı hale getirir. Kokleada oksidatif stres yükselmesi membran lipid peroksidasyonunu arttırır, çeşitli hücrel enzimleri tetikler ve ayrıca iyon kanalı fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Artan Reaktif Oksijen Türleri'nin (ROT) üretimi, kokleada bir dizi histopatolojik değişiklik ve fonksiyonel bozulma yoluyla apoptoz ve nekroz ile sonuçlanır (47).

Oksidatif stres sonrası üretilen reaktif oksijen ürünleri, koklear dokulara karşı koruyucu antioksidan moleküllerin lipid peroksidasyonuna izin vererek alfa hidrat, malondialdehit, toksik lipid peroksidaz düzeylerini artırır. Bundan en çok etkilenen hedef bölgeler: spiral ganglion, yan duvar ve kortikal organdaki tüylü hücrelerdir (48). Sisplatin, dış tüy hücrelerinde depolarizasyon aşaması sırasında kalsiyum salınımını bloke eder. Sonuç olarak hücre içi kalsiyum artışı mitokondriyal disfonksiyona neden olabilir. Hücre gövdesi içindeki hücre içi mekanizmaların iyonik dengesizliği ve bozulması daha sonra hücre ölümüyle sonuçlanır (1).

Sisplatin kaynaklı ototoksisitenin temel mekanizmasının apoptoz olduğu düşünülse de Mi-Jin Choi ve ark. Yapmış oldukları çalışmada, Sisplatin kaynaklı ototoksisitenin H & E boyamasında; sitoplazmik organellerin şişmesi, plazma zarının yırtılması ve hücre içeriğinin dışarı salınması şeklinde görülen nekroptotik hücre ölümünden (nekroptoz) kaynaklandığını göstermişlerdir (49). Biz de çalışmamızda Sisplatin alan grubun ışık mikroskopik incelemesinde spiral ganglion hücrelerinde

sitoplazmik vakuolizasyon, nükleer dejenarasyon; stria vaskularisteki marjinal hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ve intermedint hücrelerde atrofi gözlemledik.

Reaktif oksijen türevleri, lipid peroksidasyonuna neden olur ve bu da sitozolde Bax'ın (BCl2 ile ilişkili X proteini) uyarılmasına yol açar. Bax daha sonra hasarlı DTH'ler içindeki kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek apoptoza yol açarak hücre ölümüne sebep olur (2). Kokleanın bazal dönüşünde yer alan dış tüylü hücrelerin en çok etkilendiği; buna bağlı olarak yüksek frekansları içeren işitme kaybı ve tinnitus görülmektedir. Sensörinöral işitme kaybı başlangıçta yüksek frekanslarda gözlenir; ancak, yüksek kümülatif Sisplatin dozlarında tüm frekansları içerecek şekilde ilerleyebilir (2). Çalışmamızda SP'nin ototoksik etkisini, klik ve tone burst (8 kHz, 16 kHz, 24 kHz, 32 kHz) uyaranlarda ABR eşik değerlerinde artış olarak gözlemledik. Kaspaz mekanizmasının engellenerek ototoksisiteden korunmak için çeşitli moleküller araştırılmıştır; sodyum tiyosülfat, glutatyon (GSH), GSH ester, C vitamini ve sodyum salisilat bunlara örnek verilebilir (49).

Ravi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, sistemik SP kullanımının sıçanlarda koklear GSH peroksidaz aktivitesinin kontrol grubuna göre %70'i azaldığını göstermişlerdir. GSH peroksidaz aktivitesinin inhibisyonuna ise; SP'nin GSH peroksidazın esansiyel veya esansiyel olmayan sülfhidril gruplarına doğrudan bağlanması, artan organik peroksitler, platinlenmiş enzimin artan bozunması nedeniyle enzim düzeylerinin azalması ve/veya GSH'nın tükenmesinin sebep olabileceği belirtmişlerdir. In vitro enzim analizleri, SP'nin doğrudan GSH peroksidaza bağlanabileceğini ve onu inaktive ettiğini düşündürmektedir. İn vivo inaktivasyonun kesin doğası belirsizdir. Ayrıca çalışmalarında, kesin nedeni bilinmekle beraber; SP uygulamasını takiben koklear GSH redüktaz aktivitesinde azalma saptanmıştır. Sonuç olarak Sisplatin kaynaklı koklear hasara, antioksidanların (GSH ve GSH peroksidaz) tükenmesi ve koklear GSH redüktaz aktivitesinin azalması aracılık edebileceği belirtilmiştir (48).

Hücre canlılığının, katalaz veya SOD aktivitesinin inhibisyonundan ziyade GSH ile ilgili enzim, GSH peroksidaz inhibe edildiğinde özellikle azaldığı gösterilmiştir(50). Sisplatin'in hücresel etkileri çok yönlü olmakla beraber; özellikle glutatyon yolaklarında oluşturduğu patolojiler ototoksisite mekanizmasının temeli olabilir.

Glutamat, alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionat (AMPA) ve N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörlerini aktive ederek; hücre içi Ca^{+2} birikimi ile karakterize eksitotoksisiteye, nitrik oksit sentaz aktivasyonuna, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasına ve serbest radikallerin üretimine sebep olur. Oksidatif stresin uyarılması da sonuç olarak proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar vererek programlanmış hücre ölümünün başlamasına neden olabilir. Glutamat aracılı toksisitenin memeli kokleasında gürültü travması ve iskemi gibi patolojik koşullar altında meydana geldiği gösterilmiştir. Bu nedenle farklı koklear bozukluklarda çok önemli bir rol oynayabilir(51).

Dış tüy hücreler ile efferent nöron arasındaki inhibitör sinapsta, postsinaptik hücrelerin hiperpolarizasyonu; $\alpha 9$ alt birimini içeren, yüksek oranda Ca^{+2} geçirgen nAChR yoluyla, SK-tipi Ca^{+2} ile aktive K^{+} kanallarının açılmasından kaynaklanır. Memantin koklear dış tüy hücrelerinde, nAChR blokajı ile İPSP (İnhibitör postsinaptik potansiyel) 'yi engelleyerek etki göstermektedir. Memantin, aşırı uyarılmış NMDA-tipi glutamat reseptörleri yoluyla esas olarak yoğun Ca^{+2} akışı tarafından tetiklenen eksitotoksik nöronal hücre ölümünü önlemek için terapötik olarak kullanılabilir. Diğer yandan, DTH'da nAChR blokajı ile postsinaptik inhibitör hiperpolarizasyonu engelleyerek koklear patolojilerin tedavisinde kullanılabilir (30).

Memeli kokleasında iç tüy hücreleri ve afferent işitsel nöronlar arasındaki nörotransmisyon glutamat gibi birçok uyarıcı amino asit aracılık eder(51).

Kobaylarda yapılan bir çalışmada, Memantin'in memeli kokleasında iç tüy hücreleri üzerinde selektif NMDA antagonizmi yaptığı gösterilmiştir(52). Bu nedenle Memantin, Karoverin gibi glutamat antagonistleri, ani işitme kaybı, gürültü travması, presbiakuzi ve kulak çınlaması gibi iç kulak hastalıkları için yeni bir farmakolojik ilaç sınıfını temsil edebilir (51).

Literatürde Memantin ile yapılan ototoksisite çalışmaları kısıtlı olmakla beraber; sıçanlarda beyinde oksidatif strese(53) ve travmatik beyin hasarına(54) karşı koruyucu etkinliği çalışılmıştır.

Sıçanlarda kontrollü kortikal beyin hasarı oluşturularak yapılan Memantin çalışmasında; tek doz 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg Memantin karşılaştırılmıştır. Kortikal doku kaybı ve nöron dejenerasyonunu sadece 10 mg/kg Memantin'in azalttığı gözlenmiştir (54). Biz de çalışmamızda 10 mg /kg Memantin kullandık.

Ototoksisitede modellerinde Memantin tedavisinin etkinliği hakkında kısıtlı çalışmalar bulunmaktadır. Yeni Zelanda tavşanlarında oluşturulan Aminoglikozid ototoksisitesi çalışmasında Memantin kullanılmıştır. Çalışma sadece DPOAE testi ile değerlendirilmiş ve Memantin'in ototoksisiteyi engellemede kullanılabileceği belirtilmiştir (55).

Topdağ ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı SP ototoksisitesi çalışmasında intratimpanik olarak Memantin, Deksametazon ve Pirasetam kombinasyonları denenmiştir. Çalışma sadece ışık mikroskopisi altında histolojik olarak değerlendirilmiştir. Topdağ ve arkadaşlarının da çalışmalarında belirttikleri gibi ABR testi ve elektron mikroskopik değerlendirilmelerin eklenmesi gerekmektedir (56).

Sisplatin ototoksisitesi çalışmalarında, daha çok DPOAE testi kullanılmaktadır. DPOAE'lerin ölçümü, saf ton odyometrisi ile ölçülen işitsel eşiğin yükselmesinden önce saptanabilir. Dış tüy hücrelerindeki değişiklikleri tespit etmede DPOAE duyarlı bir test olsa da i tüy hücrelerinin değerlendirilmesinde yetersizdir ABR değerlendirilmeleri çalışmalara eklenmelidir (57). Çalışmamızda ABR, DPOAE, ışık ve elektron mikroskopik değerlendirmeleri kullandık.

Son yıllarda artan antioksidan alışmaları SP ototoksisitesine korunmak için de denenmiştir. zm kabuğu, yerfıştığı, böğürtlen, dut ve budak otu gibi bitkilerde bulunan Resveratrol ile yapılan çalışmada; DPOAE lmleri SP+Resveratrol alan grupta, 1. Ve 5. Günler arasında sadece 3.996 Hz'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş (58).

Biz alışmamızda SP alan grupta 0. ve 7. gün arasında DPOAE ölçümlerinde 4 ve 8 kHz anlamlı düşüş görürken, SP+Memantin alan grupta 6 kHz'de istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. akıl ve ark. ın yapmış olduğu G biloba ekstratı ile yapılan hayvan deneyinde SP ototoksisitesini tedavi grubunda 3, 4, 6 ve 8 kHz frekanslarında 10 ve 17. günlerde, sinyal-gürültü oranı değerleri, her iki kulak için 1, 1.5 ve 2 kHz frekansları için iki grup arasında hiçbir fark gösterilmemiş. Ancak her iki kulak için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş (1).

Kalcıoğlu ve ark. sıçanlara tek doz Sisplatin (16 mg/kg) kullanımına karşı Erdostin kullanarak yapmış olduğu çalışmada; Sisplatin grubunda 5. günde DPOAE

düzeylerinde 3-8 kHz arasında anlamlı bir düşüş gözlenirken, Sisplatin+ Erdostin grubunda anlamlı bir azalma görülmemiştir (59).

N-asetilsistein (NAC) ile yapılan çalışmada, Sisplatin enjeksiyonundan 4 saat sonra verilen NAC'ın, negatif histopatolojik bulguları ve Sisplatin'in neden olduğu OAE ve ABR eşiklerinin zayıflamasını önlediği görülmüştür (60).

Sisplatin'in hücre içinde TNF α düzeyini artırdığı bilinmektedir (27). Gelişen ototoksisiteyi engellemek için TNF α blokörü Etanersep çalışılmıştır. Çalışmacılar DPOAE ölçümleri sonucunda, kokleadaki inflamasyonun Sisplastin'in ototoksisite mekanizmalarından biri olduğu ve Etanersep'in bu mekanizmayı inhibe ederek ototoksisiteyi önlediği sonucuna varmışlardır (61). Diğer çalışmalar ise şöyledir; antiapoptik proteinleri artırarak etki gösteren bir nöroprotektif ajan olan Sertralin (62); kaspaz 1 ve 3'ün inhibisyonu yoluyla IL-1 düzeylerini azaltarak koruyucu etki sağlayan Minosiklin(57); bir antioksidan molekül olan NADH'nin oluşumunu artıran Laktat(57), Resveratrol (26).

Literatürdeki birçok çalışma, antioksidan sistemi arttırarak Sisplatin ototoksisitesinden korunma yöntemlerini araştırmıştır. Bu çalışmalarda N-asetilsistein, D-metionin, L-metiyonin, ebselen ve allopurinol, tiopronin, vitamin E ve steroidlerin koruyucu etkileri gösterilmiştir (37). Sisplatine bağlı DTH kaybını önlemek için sıçanlarda, antioksidan ve antiinflamatuvar olan Dekspantenol sistemik olarak denenmiştir. DPOAE ve biyokimyasal tetkikler ile değerlendirilen çalışmada, Dekspantenol tedavisi Sisplatin ototoksisitesini engellemede anlamlı bulunmuştur (63). Deksametazon ile yapılan sıçan çalışmasında; Deksametazon'un ROT ve NADPDH oksidaz 3 (NOX-3) düzeylerini azaltarak Sisplatin ototoksisitesini engellediği gösterilmiştir (64).

Sisplatin kaynaklı ototoksisite çalışmaları sıklıkla yapılmakla beraber hala tüy hücrelerinin kaybını veya işitsel sinirlerin işlev bozukluğunu tamamen önleyebilecek FDA onaylı bir ürün bulunmamaktadır (65).

SONUÇ

Mevcut sonuçlar, Memantin'in, kokleada Sisplatin kaynaklı ABR eşik kaymalarını ve inflamatuvar ve apoptotik değişiklikleri azaltma potansiyelini ortaya koymaktadır. Sisplatin gibi ototoksik ajanların, oksidatif stresin, inflamasyonun, apoptozun, gürültünün ve yaşlanmanın neden olduğu ototoksisitenin altında yatan ortak mekanizmalar olduğundan, Memantin, ototoksik yaralanmaların çeşitli nedenleri için uygulanabilir. Bununla birlikte, bu çalışma, ototoksisite ile ilgili hücresel değişiklikleri moleküler düzeyde analiz etmemiştir. Memantin'in etkinliği ile ilgili detaylı moleküler analiz çalışmaları yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Cakil B, Suren Basar F, Atmaca S, Kurnaz Cengel S, Tekat A, Tanyeri Y. The protective effect of Ginkgo biloba extract against experimental cisplatin ototoxicity: Animal research using distortion product otoacoustic emissions. *Journal of Laryngology and Otology*. 2012 Nov;126(11):1097–101.
2. Rybak LP, Mukherjea D, Ramkumar V. Pharmacology and Ototoxicity: Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Prevention. *Semin Hear* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 8];40(2):197. Available from: [/pmc/articles/PMC6486366/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31866666/)
3. Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine. Vol. 6, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd; 2006. p. 61–7.
4. Michael J. Wareing. Hutchison's Clinical Methods. 24th ed. 2018. 439–463 p.
5. Arıncı Kaplan EA. Duyu Organları. In: *Anatomi*. 4th ed. Güneş Kitapevi; 2006. p. 380–6.
6. Christina L. Runge DRF. Neuroanatomy of the Auditory System. In: Paul Flint, editor. *Cummings Otolaryngology: Head and Neck Surgery*. 7th ed. 2021. p. 1938–44.
7. Liu W, Glueckert R, Schrott-Fischer A, Rask-Andersen H. Hearing, Balance and Communication ISSN: (Print) (Human cochlear microanatomy-an electron microscopy and super-resolution structured illumination study and review Human cochlear microanatomy-an electron microscopy and super-resolution structured illumination study and review. 2020 [cited 2022 Oct 25]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ihbc20>
8. Schulte BA, Schulte2 BA, Adams JC. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Distribution of Immunoreactive Na, K-ATPase in Gerbil Cochlea'. Vol. 37. 1989.

9. Bailey BJ, JTT, NSD. Baş ve Boyun Cerrahisi -Otolarengoloji. 4th ed. Korkut N, editor. Baş ve Boyun Cerrahisi-Otolarengoloji . Güneş Tıp Kitapevi; 2011.
10. Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. 3rd ed. Vol. 1, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. Güneş Tıp Kitapevi; 2019.
11. Devranoğlu İ. İşitme Fizyolojisi. In: Devranoğlu İ, editor. Dış ve Orta Kulak Cerrahisi. 1st ed. 2011. p. 11–4.
12. Hall JE, HME. The Sense of hearing . In: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology . 14th ed. 2021. p. 663–73.
13. Kemp DT. Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use [Internet]. Vol. 63, British Medical Bulletin. 2002. Available from: <https://academic.oup.com/bmb/article/63/1/223/377500>
14. Lonsbury-Martin BL, Martin GK. The clinical utility of distortion-product otoacoustic emissions. Ear Hear [Internet]. 1990 [cited 2022 Aug 1];11(2):144–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2187725/>
15. Hall JW III. The New Handbook of Auditory Evoked Responses. Boston: Allyn and Bacon; 2005.
16. Li P, Gao K, Ding D, Salvi R. Characteristic anatomical structures of rat temporal bone. J Otol. 2015 Sep 1;10(3):118–24.
17. Albuquerque AAS, Rossato M, de Oliveira JAA, Hyppolito MA. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. Braz J Otorhinolaryngol. 2009;75(1):43–9.
18. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. Vol. 117, Surg. 1997.
19. Escabi CD, Frye MD, Trevino M, Lobarinas E. The rat animal model for noise-induced hearing loss. J Acoust Soc Am. 2019 Nov;146(5):3692–709.
20. Dau T, Wegner O, Mellert V, Kollmeier B. Auditory brainstem responses with optimized chirp signals compensating basilar-membrane dispersion a) [Internet]. 2000. Available from: <http://acousticalsociety.org/content/terms>.
21. Kelly JB, Masterton B. Auditory Sensitivity of the Albino Rat. Vol. 91, Journal of Comparative and Physiological Psychology. 1977.

22. Ganesan P, Schmiedge J, Manchaiah V, Swapna S, Dhandayutham S, Kothandaraman PP. Ototoxicity: A challenge in diagnosis and treatment. *J Audiol Otol*. 2018 Apr 1;22(2):59–68.
23. American Speech-Language-Hearing Association. Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy. *ASHA* 1994;36(Suppl 12):11-9.24).
24. Fausti SA . High-frequency audiometric monitoring strategies for early detection of ototoxicity. *Ear Hear* 1994;15:232-925.
25. American Academy of Audiology position statement and clinical practice guidelines: ototoxicity monitoring 2009 [cited 2016 Jan 5]. [Internet]. [cited 2022 Nov 28]. Available from: <http://www.audiology.org/publications-resources/document-library/ototoxicity-monitoring>)
26. Yumusakhuylu AC, Yazici M, Sari M, Binnetoglu A, Kosemihal E, Akdas F, et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2022 Aug 8];76(3):404–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22261612/>
27. Lee CH, Lee DH, Lee SM, Kim SY. Otoprotective effects of zingerone on cisplatin-induced ototoxicity. *Int J Mol Sci*. 2020 May 2;21(10).
28. Witt A, Macdonald N, Kirkpatrick P. Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2004 [cited 2022 Aug 13];3(2):109–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15040575/>
29. Bratek E, Ziembowicz A, Salinska E. N-acetylaspartylglutamate (NAAG) pretreatment reduces hypoxic-ischemic brain damage and oxidative stress in neonatal rats. *Antioxidants*. 2020 Sep 1;9(9):1–17.
30. Oliver D, Ludwig J, Reisinger E, Zoellner W, Ruppertsberg JP, Fakler B. Memantine Inhibits Efferent Cholinergic Transmission in the Cochlea by Blocking Nicotinic Acetylcholine Receptors of Outer Hair Cells [Internet]. 2001. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org>
31. Domarecka E, Kalcioglu MT, Mutlu A, Özgür A, Smit J, Olze H, et al. Reporting Data on Auditory Brainstem Responses (ABR) in Rats:

Recommendations Based on Review of Experimental Protocols and Literature. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/brainsci11121596>

32. Salih NA, Al-Baggou BK. Effect of memantine hydrochloride on cisplatin-induced neurobehavioral toxicity in mice. *Acta Neurol Belg.* 2020 Feb 1;120(1):71–82.
33. Kapusuz Z, Özkırış M, Kala M, Saydam L. Protective Role of Bilberry Extract Against Cisplatin Induced Ototoxicity in Rats. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery.* 2013 Dec 1;65(4):339–44.
34. de Freitas MR, de Castro Brito GA, de Carvalho J v., Gomes RM, Barreto Martins MJ, de Albuquerque Ribeiro R. Light microscopy study of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Journal of Laryngology and Otology.* 2009 Jun;123(6):590–7.
35. Eroglu S, Cevizci R, Turan Dizdar H, Tansuker HD, Bulut E, Dilci A, et al. Association of Conductive Hearing Loss with the Structural Changes in the Organ of Corti. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec [Internet].* 2021 Jul 1 [cited 2022 Nov 28];83(4):272–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33784680/>
36. Yılmaz NDS, Gür ÖE, Ensari N, Bulut E, Kaya OT, Sırvancı S, et al. Effect of perinatal biotin deficiency on auditory pathway of the Wistar-Albino rats. *Acta Otolaryngol [Internet].* 2019 Aug 3 [cited 2022 Nov 28];139(8):677–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31124733/>
37. Eroğlu O, Karlıdağ T, Kuloğlu T, Keleş E, Kaygusuz İ, Yalçın Ş. The protective effect of cortexin on cisplatin-induced ototoxicity. *Journal of International Advanced Otology.* 2018 Apr 1;14(1):28–34.
38. Harrison RT, Seiler BM, Bielefeld EC. Ototoxicity of 12mg/kg cisplatin in the Fischer 344NHsd rat using multiple dosing strategies. *Anticancer Drugs.* 2016 Sep 1;27(8):780–6.
39. Doğan M, Polat H, Yaşar M, Kaya A, Bayram A, Şenel F, et al. Protective role of misoprostol against cisplatin-induced ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 2016 Nov 1;273(11):3685–92.
40. Pollera CF, Marolla P, Nardi M, Ameglio F, Cozzo L, Bevere F. Very high-dose cisplatin-induced ototoxicity: a preliminary report on early and long-term

- effects. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 1988 Feb [cited 2022 Aug 9];21(1):61–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3342465/>
41. Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of Cisplatin Ototoxicity: Antioxidant System. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76(6):386–94.
 42. Kirkim G, Olgun Y, Aktas S, Kiray M, Kolatan E, Altun Z, et al. Is there a gender-related susceptibility for cisplatin ototoxicity? *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2015 Oct 24;272(10):2755–63.
 43. Pezeshki Z, Nematbakhsh M, Nasri H, Talebi A, Pilehvarian AA, Safari T, et al. Evidence against protective role of sex hormone estrogen in Cisplatin-induced nephrotoxicity in ovariectomized rat model. *Toxicol Int* [Internet]. 2013 Jan [cited 2022 Aug 12];20(1):43–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23833437/>
 44. Chung WH, Boo SH, Chung MK, Lee HS, Cho YS, Hong SH. Proapoptotic effects of NF- κ B on cisplatin-induced cell death in auditory cell line. <http://dx.doi.org/101080/00016480701881811> [Internet]. 2009 [cited 2022 Aug 11];128(10):1063–70. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00016480701881811>
 45. Devarajan P, Savoca M, Castaneda MP, Park MS, Esteban-Cruciani N, Kalinec G, et al. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res*. 2002 Dec 1;174(1–2):45–54.
 46. Doğan M, Polat H, Yaşar M, Kaya A, Bayram A, Şenel F, et al. Protective role of misoprostol against cisplatin-induced ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2016 Nov 1;273(11):3685–92.
 47. Gozeler MS, Ekinci Akdemir FN, Yildirim S, Sahin A, Eser G, Askin S. Levosimendan ameliorates cisplatin-induced ototoxicity: Rat model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019 Jul 1;122:70–5.
 48. Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of Cisplatin Ototoxicity: Antioxidant System. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76(6):386–94.
 49. Choi MJ, Kang H, Lee YY, Choo OS, Jang JH, Park SH, et al. Cisplatin-induced ototoxicity in rats is driven by RIP3-dependent necroptosis. *Cells*. 2019 May 1;8(5).

50. MICHIELS C, REMACLE J. Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *Eur J Biochem* [Internet]. 1988 [cited 2022 Aug 12];177(2):435–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2903826/>
51. Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D. New Approaches for Inner Ear Therapy with Glutamate Antagonists. Vol. 119, *Acta Otolaryngol* (Stockh). 1999.
52. Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D. Memantine suppresses the glutamatergic neurotransmission of mammalian inner hair cells. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* [Internet]. 1998 Jan [cited 2022 Aug 13];60(1):18–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9519376/>
53. Liu W, Xu Z, Deng Y, Xu B, Wei Y, Yang T. Protective effects of memantine against methylmercury-induced glutamate dyshomeostasis and oxidative stress in rat cerebral cortex. *Neurotox Res*. 2013 Oct;24(3):320–37.
54. Abrahamson EE, Poloyac SM, Edward Dixon C, Dekosky ST, Ikonovic MD. Acute and chronic effects of single dose memantine after controlled cortical impact injury in adult rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2019;37(3):245–63.
55. Pavlidis P, Maurer J, Apostolidou E, Kekes G, Kouvelas D. Memantine's action against aminoglycoside-induced ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2014;271(6):1491–6.
56. Topdag M, Iseri M, Gelenli E, Yardimoglu M, Yazir Y, Ulubil SA, et al. Effect of intratympanic dexamethasone, memantine and piracetam on cellular apoptosis due to cisplatin ototoxicity. *Journal of Laryngology and Otology*. 2012 Nov;126(11):1091–6.
57. Chirtes F, Albu S. Prevention and Restoration of Hearing Loss Associated with the Use of Cisplatin. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/925485>
58. Erdem T, Bayindir T, Filiz A, Iraz M, Selimoglu E. The effect of resveratrol on the prevention of cisplatin ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2012 Oct;269(10):2185–8.
59. Kalciglu MT, Kizilay A, Gulec M, Karatas E, Iraz M, Akyol O, et al. The protective effect of erdosteine against ototoxicity induced by cisplatin in rats.

- Eur Arch Otorhinolaryngol [Internet]. 2005 Oct [cited 2022 Aug 9];262(10):856–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15742177/>
60. Somdaş MA, Güntürk İ, Balcıoğlu E, Avcı D, Yazıcı C, Özdamar S. Protective effect of N-acetylcysteine against cisplatin ototoxicity in rats: a study with hearing tests and scanning electron microscopy. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020 Jan 1;86(1):30–7.
 61. Daslı S, Topdag M, Mutlu A, Kara A, Ozturk M. Prophylactic etanercept treatment in cisplatin ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2017 Oct 1;274(10):3577–83.
 62. Ozturk M, Ucar S, Sarj F, Erdogan S, Topdag M, Iseri M. Possible Protective Effect of Sertraline against Cisplatin-Induced Ototoxicity: An Experimental Study. *The Scientific World Journal* [Internet]. 2013;2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.2423/2424-6460.1310007>
 63. Toplu Y, Kizilay A, Sapmaz E, Parlakpınar H, Kelles M, Kalcioglu MT, et al. The effect of dexpanthenol on ototoxicity induced by cisplatin. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2016 Mar 1;9(1):14–20.
 64. Dinh CT, Chen S, Bas E, Dinh J, Goncalves S, Telischi F, et al. Dexamethasone Protects Against Apoptotic Cell Death of Cisplatin-exposed Auditory Hair Cells In Vitro. 2015.
 65. Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. *Hear Res* [Internet]. 2005 [cited 2022 Aug 9];201(1–2):81–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15721563/>

