



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METFORMİN'İN RATLARDA GÜRÜLTÜYE BAĞLI
OLUŞAN İŞİTME KAYBINI İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
ODYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Özge GEDİK

ODYOLOJİ VE KONUŞMA BOZUKLUKLARI PROGRAMI

Ankara, 2018

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METFORMİN'İN RATLARDA GÜRÜLTÜYE BAĞLI
OLUŞAN İŞİTME KAYBINI İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİNİN
ODYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK
PARAMETRELERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Özge GEDİK

ODYOLOJİ VE KONUŞMA BOZUKLUKLARI PROGRAMI

**Bu araştırma; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından 9.2015/3 nolu proje ile desteklenmiştir**

Ankara, 2018

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Metformin'in Ratlarda Gürültüye Bağlı Oluşan İşitme Kaybını
İyileştirici Etkisinin Odyolojik, Biyokimyasal ve Histopatolojik Parametrelerle
Değerlendirilmesi

Özge GEDİK

Doktora Tezi

25.01.2018

Prof. Dr. Mehmet Ali BABADEMEZ

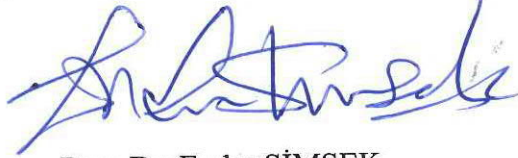
Prof. Dr. H. Hüseyin DERE

Prof. Dr. H. Seyra ERBEK

Doç. Dr. Banu MÜJDECI

Doç. Dr. Bülent GÜNDÜZ

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



Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Enstitü Müdürü

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

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Tarih (25-01-2018)

İmza

Özge GEDİK



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında desteklerini ve tecrübelerini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Ali BABADEMEZ'e, tez izleme komitesi üyelerim Doç. Dr. Banu MÜJDECİ ve Doç. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ederim

Erişçi Elektronik Genel Müdürü Sayın Hürol ERİŞÇİ ve kıymetli arkadaşım Uzm. Ody. Engin DANIŞMEN'e tez çalışmam sırasında vermiş oldukları destek için çok teşekkür ederim.

BVU Araştırma Merkezi çalışanlarına ve BVU KBB ailesine tez çalışmam süresince verdikleri destek için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince göstermiş olduğu sınırsız yardım ve özveri için Opr. Dr. Remzi DOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Bezmialem Odyoloji ailesine destekleri için çok teşekkür ederim.

Sevgili meslektaşlarım Uzm. Ody. Nilüfer BAL ve Ody. Meliha BAŞÖZ'e tez çalışmam süresince göstermiş oldukları samimiyet ve destek için çok teşekkür ederim.

Hayatta iyilik ve doğruluk adına öğrendiğim ne varsa borçlu olduğum, hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimim süresince de büyük bir sabır ve fedakarlık ile yanımda olan canım aileme sonsuz minnettarlık ile teşekkürlerimi sunarım.

Özge GEDİK

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İç Kulak Anatomi ve Fizyolojisi	4
2.2. Tüy Hücrelerinin İnervasyonu.....	5
2.3. Kokleanın Beslenmesi	6
2.4. Gürültü ve İşitme Sistemine Etkisi.....	8
2.5. Gürültüye Bağlı Odyolojik Olmayan Patolojiler.....	18
2.6. Metformin.....	18
2.6.1. Antioksidan Özellik Açısından Metformin.....	20
2.7. Deney Hayvanları	22
2.7.1. 3R Prensipleri.....	23
2.8. Elektrofizyolojik Testler.....	26
2.8.1. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon	26
2.8.2. İşitsel Beyinsapı Cevabı.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Gruplar.....	29
3.2. Elektrofizyolojik Testler.....	30
3.2.1. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon	30
3.2.2. İşitsel Beyinsapı Cevabı.....	31
3.3. Biyokimyasal Analizler	33

3.3.1. DNA Hasarı İncelemesi	33
3.3.2. Oksidatif Stres Parametreleri	33
3.3.2.1. Total Antioksidan Status.....	33
3.3.2.2. Total Oksidan Status	33
3.3.2.3. Oksidatif Stres İndeksi	34
3.3.3. Western Blot.....	34
3.3.4. ELISA (Enzym Linked Immuno Assay) çalışması.....	35
3.4. Histolojik İnceleme	35
3.4.1. İmmünohistokimyasal Boyama.....	36
3.5. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Elektrofizyolojik Bulgular	37
4.1.1. DPOAE Bulguları	37
4.1.2. ABR Bulguları	42
4.2. Biyokimyasal Bulgular	56
4.2.1. DNA Hasarı Bulguları.....	56
4.2.2. Total Antioksidan Status	57
4.2.3. Total Oksidan Status	58
4.2.4. Oksidatif Stres İndeksi	59
4.2.5. COX 2 Enzimi.....	60
4.2.6. HSF-1 proteini.....	61
4.2.7. Interlokin-6.....	62
4.2.8. Interlokin-1 β	63
4.2.9. Tumor Nekroz Faktör- α	63
4.3. Histopatolojik Bulgular	64
5. TARTIŞMA.....	76

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
7. KAYNAKLAR	93
8. EKLER	103
Ek 1. Etik Kurul Karar Metni	103
Ek 2. Biyokimyasal analizde kullanılan malzemelerin marka ve modelleri.....	105
Ek 3. Özgeçmiş	106



ÖZET

Metformin'in Ratlarda Gürültüye Bağlı Oluşan İşitme Kaybını İyileştirici Etkisinin Odyolojik, Biyokimyasal ve Histopatolojik Parametrelerle Değerlendirilmesi

Gürültüye maruziyet işitsel sistemde mekanik ve metabolik hasara neden olmaktadır. Gürültüye maruziyet neticesi hücre ölümünün asıl nedeni olarak iç kulağa kan akımının azalması, serbest radikallerin üretimi ve dış tüy hücrelerinin selüler nekrozu gösterilmektedir. Gürültüye maruziyetin işitme eşiklerinde geçici ve kalıcı değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Çalışmadaki amacımız; bir antioksidan türevi olduğu bilinen Metformin'in gürültüye bağlı oluşan işitme kaybı üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Çalışmamızda normal işitme ile uyumlu olduğu düşünülen DPOAE ve ABR sonuçlarına sahip 32 adet Sprague Dawley dişi rat dört gruba ayrılmıştır. Grup 1 ve Grup 2'ye bazal ölçümlerden sonra 8 saat boyunca 100 dB SPL'de geniş bant gürültü uygulanmıştır. Grup 2'ye gürültünün ardından 1. günden itibaren başlamak üzere 14 gün boyunca Metformin verilmiştir. Grup 3'e bazal ölçümün ardından gürültüye maruz bırakılmaksızın 14 gün boyunca Metformin verilmiş, Grup 4'e ise hiçbir işlem uygulanmamıştır. Gürültüye maruziyet sonrası Grup 1 ve 2'ye 1, 7 ve 14. günlerde, Grup 3 ve 4'e ise 7. ve 14. günlerde tekrar odyolojik ölçümler yapılmıştır. 14. gün sonunda ise biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmede kullanılmak üzere tüm ratlardan intrakardiyak kan örnekleri alınmış ve ratların kokleaları eksize edilmiştir. Çalışmamızın odyolojik ve biyokimyasal sonuçlarına göre; metformin uygulaması gürültüye bağlı oluşan işitme eşikleri üzerinde iyileştirici etkiye sahiptir. Çalışmamızın histopatolojik sonuçlarında ise gürültüye maruz bırakılan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durumun çalışmamızda ışık mikroskupu kullanılmasından kaynaklanabileceği, elektron mikroskupu ile kokleadaki çok küçük değişikliklerin daha ayrıntılı bir şekilde tespit edilebileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: ABR, DNA hasarı, DPOAE, Gürültüye Bağlı İşitme Kaybı, Metformin, Rat

ABSTRACT

Determination of the Healing Effect of Metformin on Noise-Induced Hearing Loss via Audiological, Biochemical and Histopathological Parameters in Rats

Exposure to noise causes mechanical and metabolic damage on auditory system. The main reason for cell death as the result of exposure to noise is shown as the decrease in blood flow to internal ear, production of free radicals and cellular necrosis of outer hair cells. It is known that exposure to noise causes temporary and permanent changes in hearing thresholds. Our aim in the study is to evaluate the effect of Metformin known as an antioxidant derivative, on noise-induced loss of hearing. In our study, 32 Sprague Dawley female rats which have DPOAE and ABR results considered to be consistent with normal hearing, were divided into four groups. Broadband noise was applied to Group 1 and Group 2 for 8 hours at 100 dB SPL after basal measurements. Group 2 was administered Metformin for 14 days after the noise starting from the 1st day. After basal measurement, Group 3 was administered Metformin for 14 days without being exposed to noise while no process was applied to Group 4. After exposure to noise, audiological measurements were carried out to Group 1 and 2 on days 7 and 14 and to Group 3 and 4 on days 7 and 14. At the end of day 14, intracardiac blood samples were received from all rats to be used in biochemical and histopathological evaluation and cochleas of rats were excised. According to audiological and biochemical results of our study, metformin application has a healing effect on noise-induced hearing thresholds. In histopathological results of our study, no significant result was found between the groups being exposed to noise and the control group. It was considered that this case could be due to using light microscope and by using electron microscope, that very tiny changes in cochlea could be identified in more details.

Key words: ABR, DNA damage, DPOAE, Noise-Induced Hearing Loss, Metformin, Rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABR	: Auditory Brainstem Response
AICA	: Anterior Inferior Cerebellar Arter
AMPK	: Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase
ANOVA	: One Way Analysis of Variance Test
ATP	: Adenosine Triphosphate
Ca ²⁺	: Kalsiyum
cm	: Santimetre
COX 2	: Cyclooxygenase-2
°C	: Santigrad derece
dB	: Desibel
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPOAE	: Distortion Product Otoacoustic Emission
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzim-Linked ImmunoSorbent Assay
f1	: Primer frekans 2
f2	: Primer frekans 1
GBİK	: Gürültüye Bağlı İşitme Kaybı
GED	: Geçici Eşik Değişikliği
HIF-1 alfa	: Hipoksi ile tetiklenen faktör-1 alfa
HSF 1	: Heat Shock Factor 1
HRP	: Horseradish Peroxidase
Hz	: Hertz
IHS	: Intelligent Hearing Systems
IL-1 Beta	: Interlökin-1 Beta
IL-6	: Interlökin 6
KED	: Kalıcı Eşik Değişikliği
kHz	: Kiloherzt
kg	: Kilogram
K+	: Potasyum
L1	: Frekans 1'in şiddeti

L2	: Frekans 2'nin şiddeti
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mm ²	: Milimetrekare
ms	: Milisaniye
mμ	: Milimikron
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
NaCl	: Sodyum klorür
NBN	: Narrow Band Noise
NBF	: Neutral Buffered Formalin
nm	: Nanometre
OAE	: Otoacoustic Emission
OBN	: Oktav Band Noise
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
pH	: Power of Hydrogen
PVDF	: Polivinilidenflorit
RNS	: Reactive Nitrogen Species
ROS	: Reactive Oxygen Species
rpm	: Revolutions per minute
SD	: Standart Deviasyon
SNİK	: Sensörinöral İşitme Kaybı
SNR	: Signal to Noise Ratio
SPL	: Sound Pressure Level
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
TAS	: Total Antioksidan Status
TBS	: Tris Buffered Saline
TBS-T	: Tris Buffered Saline-Tween
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-α
TOS	: Total Oksidan Status

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Çalışmaya dahil edilen hayvanlara OAE testinin uygulanması.....	31
Şekil 3.2. Çalışmaya dahil edilen hayvanlara ABR testinin uygulanması.....	32
Şekil 3.3. Çalışmaya dahil edilen hayvanlara yüksek frekans ABR testinin uygulanması	32
Şekil 4.1. Grup 1'e ait DPOAE SNR bulguları.....	38
Şekil 4.2. Grup 2'ye ait DPOAE SNR bulguları.....	39
Şekil 4.3. Grup 2'ye ait bazal DPOAE örneği	39
Şekil 4.4. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1. gün DPOAE örneği.....	39
Şekil 4.5. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7. gün DPOAE örneği	40
Şekil 4.6. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14. Gün DPOAE örneği	40
Şekil 4.7. Grup 3'e ait DPOAE SNR bulguları.....	41
Şekil 4.8. Grup 4'e ait DPOAE SNR bulguları.....	42
Şekil 4.9. Grup 1'e ait ABR eşik bulguları	43
Şekil 4.10. Grup 2'ye ait ABR eşik bulguları	44
Şekil 4.11. Grup 2'ye ait click ABR bazal ölçüm örneği	45
Şekil 4.12. Grup 2'ye ait 8 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.....	45
Şekil 4.13. Grup 2'ye ait 16 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.....	46
Şekil 4.14. Grup 2'ye ait 20 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.....	46
Şekil 4.15. Grup 2'ye ait 32 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.....	47
Şekil 4.16. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün click ABR örneği	47
Şekil 4.17. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 8 kHz tone burst ABR örneği.....	48
Şekil 4.18. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 16 kHz tone burst ABR örneği.....	48

Şekil 4.19. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 20 kHz tone burst ABR örneği.....	49
Şekil 4.20. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 32 kHz tone burst ABR örneği.....	49
Şekil 4.21. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün click ABR örneği	50
Şekil 4.22. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 8 kHz tone burst ABR örneği.....	50
Şekil 4.23. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 16 kHz tone burst ABR örneği.....	51
Şekil 4.24. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 20 kHz tone burst ABR örneği.....	51
Şekil 4.25. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 32 kHz tone burst ABR örneği.....	52
Şekil 4.26. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün click ABR örneği	52
Şekil 4.27. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 8 kHz tone burst ABR örneği.....	53
Şekil 4.28. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 16 kHz tone burst ABR örneği.....	53
Şekil 4.29. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 20 kHz tone burst ABR örneği.....	54
Şekil 4.30. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 32 kHz tone burst ABR örneği.....	54
Şekil 4.31. Grup 3'e ait ABR eşik bulguları	55
Şekil 4.32. Grup 4'e ait ABR eşik bulguları	56
Şekil 4.33. Gruplar arası DNA hasarı bulguları.....	57
Şekil 4.34. Gruplar arası TAS bulguları	58
Şekil 4.35. Gruplararası TOS bulguları	58
Şekil 4.36. Gruplar arası OSI bulguları.....	59

Şekil 4.37. Western Blot analizi ile gruplara ait iç kulaktaki COX 2 enzimi bulguları	60
Şekil 4.38. Western Blot analizi ile gruplara ait iç kulaktaki HSF-1 proteini bulguları	61
Şekil 4.39. Gruplar arası IL-6 bulguları.....	62
Şekil 4.40. Gruplar arası IL-1 β bulguları.....	63
Şekil 4.41. Gruplar arası TNF- α bulguları.....	64
Şekil 4.42. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x100 büyütme, bar: 100 μ m).....	65
Şekil 4.43. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 2. (Hematoksilen&Eozin boyası, x200 büyütme, bar: 100 μ m).....	66
Şekil 4.44. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 3. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50 μ m).....	67
Şekil 4.45. Grup 1'e ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50 μ m).....	68
Şekil 4.46. Grup 3'e ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50 μ m).....	69
Şekil 4.47. Grup 2'ye ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50 μ m).....	70
Şekil 4.48. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 4. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100 μ m).....	71
Şekil 4.49. Grup 1'e ait koklea görüntüsü 2. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100 μ m).....	72
Şekil 4.50. Grup 3'e ait koklea görüntüsü 2. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100 μ m).....	73
Şekil 4.51. Grup 2'ye ait koklea görüntüsü 2. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100 μ m).....	74
Şekil 4.52. Pozitif kontrol dokusuna ait görüntü. (Zıt boyama Hematoksilen, X400 büyütme, bar: 50 μ m).....	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Ratlara ait fizyolojik değerler	24
Tablo 3.1. Çalışmaya dahil edilen gruplar	29
Tablo 4.1. Grup 1'e ait DPOAE SNR değerleri.....	37
Tablo 4.2. Grup 2'ye ait DPOAE SNR değerleri.....	38
Tablo 4.3. Grup 3'e ait DPOAE SNR değerleri.....	41
Tablo 4.4. Grup 4'e ait DPOAE SNR değerleri.....	42
Tablo 4.5. Grup 1'e ait ABR eşik değerleri	43
Tablo 4.6. Grup 2'ye ait ABR eşik değerleri	44
Tablo 4.7. Grup 3'e ait ABR eşik değerleri	55
Tablo 4.8. Grup 4'e ait ABR eşik değerleri	56
Tablo 4.9. Gruplara ait DNA hasarı değerleri.....	57
Tablo 4.10. Gruplara ait TAS, TOS ve OSI değerleri.....	59
Tablo 4.11. Gruplara ait Cox 2 değerleri	60
Tablo 4.12. Gruplara ait HSF-1 proteini değerleri	61
Tablo 4.13. Gruplara ait IL-6 değerleri	62
Tablo 4.14. Gruplara ait IL-1 β değerleri.....	63
Tablo 4.15. Gruplara ait TNF- α değerleri.....	64

1. GİRİŞ

Gürültüye maruziyet işitsel sistemde hasara neden olur ve gürültüye bağlı eşik değişiklikleri meydana gelir. Gürültüye bağlı işitme kaybının mekanizması; vazokonstrüksiyondan kaynaklanan hipoksi, duyuşal hücrelerin metabolik tükenmesi, nörotransmitterlerin aşırı salınımı ve retiküler lamina hasarı ile koklear sıvıların birbirine karışması gibi homeostasisi etkileyebilecek durumlar ile açıklanabilir (1).

Serebral kan akımı ve serebrospinal sıvı basıncı arasındaki ilişki gibi koklear kan akımı ve iç kulak sıvı basıncı arasındaki ilişki de benzerdir (2). Şiddetli gürültüye maruziyetin koklear hasara ve geçici veya kalıcı olarak gürültüye bağlı işitme kaybına neden olduğu bilinmektedir (3). Gürültüye bağlı işitme kaybının (GBİK) birçok mekanizması bilinmesine rağmen patogenezi henüz tam olarak belirlenememiştir. GBİK'te başlıca faktör korti organındaki apoptozistir. Akustik travmayı takiben hücre ölümünün asıl nedeni olarak iç kulağa kan akımının azalması, artmış metabolik aktiviteden kaynaklanan serbest radikallerin üretimi ve dış tüy hücrelerinin harabiyeti gösterilmektedir. Gürültüye maruziyeti takiben iç kulakta reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşur. ROS hücrelerde DNA yapısını değiştirerek ve koklear kan akımını azaltarak iç kulak yapılarına zarar verir (4).

Gürültü travması artmış endositoz, tüy hücresi ölümü ve kalıcı işitme kaybına yol açan mitokondrial lezyonlar, intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonunun yükselmesi ve ROS oluşumunu içine alan koklear patolojilere neden olur. Yüksek ses seviyesine maruziyet veya orta seviyeli kronik sese maruz kalmaktan kaynaklanan orta dereceli akustik hasarın geri dönüşümü olabilir, iç tüy hücrelerinde ve kan beyin bariyerinde geri dönüşebilir fizyolojik değişiklikler ortaya çıkabilir (5).

GBİK'te temel histopatolojik anormallik tüy hücrelerinin kaybıdır. Tüy hücreleri mekanoreseptör gibi çalışır ve baziller membranın mekanik enerjisini elektriksel enerjiye dönüştürür. Enerji dönüşümü sırasında potasyum ve kalsiyum kanalları açılır ve iyon hareketi gerçekleşir. Bu süreçte mitokondride üretilen adenosin trifosfat (ATP) kullanılır. Eğer mitokondri normal çalışmazsa veya

hasarlanmışsa, ATP miktarı yetersiz kalır, fonksiyonel problemlere neden olur. İnsanda gözlenen birçok mitokondrial hastalıkta, ateş veya aşırı egzersiz gibi durumlarda enerji tüketimi artarsa işitme kaybını da içine alan semptomlar ortaya çıkar. Sensörinöral işitme kaybı (SNİK) birçok mitokondrial hastalıkta ana semptomlardan biridir (1).

GBİK'te patoloji dış tüy hücrelerinin mekanoelektriksel iletiminin engellenmesine neden olur. Akustik sinyalin mekanoelektriksel iletim yeri olan korti organı tüy hücreleri ve destek hücrelerini içerir. Baziller membran hareketinde mekanik yaralanmaya neden olan olası mekanizmalar; metabolik tükenme, aktivite ile oluşan iskemi ve/veya hücre membranının bozulması ile oluşan iyon zehirlenmesidir. Patolojik değişiklikler destek hücrelerinin total yıkımına bağlı olarak siliaların birleşme ve kıvrılması sırasındaki değişikliklerdir. GBİK için diğer hipotezler; dış tüy hücrelerinin aşırı uyarılması sonucu sinir kökü harabiyetini, glutamatın aşırı sekresyonunu ve glutasyon azalması sonucu hücresel hasarı içerir. Akustik travmadan dolayı oluşan SNİK yüksek sesle rock müzik dinleyen gençlerde en sık görülen işitme kaybı türüdür (6).

Kokleada ROS üretimi metabolik hasar mekanizması oluşturur. GBİK'te ROS'un anahtar rol oynadığı çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir:

- 1) ROS gürültüye maruziyetten sonra kokleada önemli derecede artar
- 2) Gürültü travmasını takiben endojenöz antioksidan enzimlerin aktivite seviyesinin önemli oranda arttığı gösterilmiştir. Endojenöz antioksidan savunma sistemi yoluyla hücreler oksidatif strese karşı kendi kendilerini korurlar. ROS üretimi sonuç olarak apoptotik hücre ölümüne yol açabilir (7).

Metformin tip 2 diabetes mellitus tedavisinde kullanılan biguanide sınıfı ilaçlardan olan, bilinen ilk antidiyabetik ilaçtır. Antidiyabetik etkilerinin yanında antiobezite, antihiperglisemik, antilipidemik, antineoplastik ve kardioprotektif etkileri de vardır (8).

Metformin hem in vitro hem de in vivo olarak iyi bilinen adenosin monofosfat proteinkinaz (AMPK) aktivatörüdür. Son araştırmalar da metforminin

enerji regülasyonuna katkı sağladığını ve AMPK'dan bağımsız şekilde anti-inflamatuar etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (9).

Metformin glisemik kontrol için başlangıç tedavisidir, hepatik glikoz üretimini azaltır ve tip 2 diyabetli hastalarda ek kilo kazancına neden olmadan insulin sensitivitesini düzenler. Çalışmalar metforminin kardiyovasküler ve serebrovasküler yararlı özelliklerini de göstermiştir (9).

Amaç ve hipotez;

“Yukarıda verilen bilgilerin ışığında; çalışmamızda antioksidan özelliği olduğu bilinen metforminin GBİK üzerinde iyileştirici etkisini odyolojik, biyokimyasal ve histolojik olarak araştırmak amaçlanmıştır.”

“Kokleada gürültüye maruziyet sonucu oksidatif stres mekanizması ile hücresel düzeyde DNA hasarı oluşur ve sonuçta işitme kaybı meydana gelir. Hipotezimiz; antioksidan özelliği olduğu bilinen Metformin iç kulakta gürültüye bağlı oluşan hücresel düzeydeki biyokimyasal mekanizmayı düzenleyerek GBİK üzerinde iyileştirici etkiye sahiptir.”

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İç Kulak Anatomi ve Fizyolojisi

Koklea işitmenin sensör organını oluşturan kemik bir yapıdır. Açılmış koklea 3.1-3.3cm uzunluğa sahiptir. Kokleanın yüksekliği insanlarda yaklaşık 0.5cm'dir. Bütün vücuttaki en sert kemiklerden biri olan temporal kemikte tamamen kapalıdır (10).

Koklea skala vestibuli, skala timpani ve skala media adı verilen üç tane sıvı dolu kanala sahiptir (10), (11). Skala media kokleanın ortasına yerleşmiştir, Reissner's membranı ile skala vestibuliden ve baziller membran ile skala timpaniden ayrılır. Skala mediadaki sıvının iyonik bileşimi intrasellüler sıvıya benzerdir, bu nedenle potasyumdan zengin ve sodyumdan fakirdir, buna karşın skala vestibuli ve skala timpanideki sıvı serebrospinal sıvı gibi ekstrasellüler sıvıya benzerdir, bu nedenle sodyumdan zengin ve potasyumdan fakirdir (10), (12).

Skala media kemik labirentin apikal sonlanmasında kokleanın apeksine doğru daralmaktadır, burada bulunan açıklığa helikotrema denilmektedir. Helikotrema skala vestibuli ve skala timpani arasındaki iletişimi sağlar. İnsanlarda bu açıklığın alanı 0,05 mm²'dir (10).

Baziller membran skala mediayı skala timpaniden ayıran fibröz bir zardır. Bu zar, kokleanın kemiksi merkezi olan modiolustan dış duvara doğru uzanan 20.000-30.000 baziller lif içerir. Baziller membran konnektif dokudan meydana gelir ve skala medianın tabanını şekillendirir (12).

Korti organı, baziller membrandaki titreşime yanıt olarak sinir uyarıları üreten reseptör organdır (12). Dış tüy hücresi ve iç tüy hücresi adı verilen iki farklı türde tüy hücresine sahiptir. Birçok farklı tüy hücresi içerir. Kokleadaki yaklaşık 12.000 dış tüy hücresi baziller membran boyunca 3-5 sıra halinde ve yaklaşık 3.500 iç tüy hücresi tek sıra halinde yerleşmiştir. Tüy hücrelerinin tepelerinde stereosiliya demetleri bulunur. Her bir dış tüy hücresi üzerinde 50-150 stereosiliya W veya V şeklinde 3-4 sıra halinde yerleşmişlerdir. İç tüy hücreleri ise düzleşmiş U şeklinde yerleşmişlerdir (10)–(13).

Koklea bazal uçta apekten daha serttir. Katılıktaki bu kademeli değişiklikten dolayı, sesler baziller membran üzerinde kokleanın bazalinden apeksine doğru ilerleyen dalga oluşturarak kulağa ulaşır. Bu ilerleyen dalga hareketi frekans ayrılması temeline dayanır, baziller membran bunu sesler baziller membran boyunca yerleşmiş duyusal hücreleri aktive etmeden önce sağlar (10), (12).

Baziller membran sesleri frekanslarına göre ayırır, korti organı baziller membran boyunca yerleşmiş, baziller membran hareketini nöral koda dönüştüren tüy hücrelerine sahiptir (10).

Tektoriyal membran, korti organının üzerini kaplayan zarı oluşturur. Bu zar çoğunlukla gerilim kuvveti sağladığı düşünülen kollojen liflerden oluşur. Tektoriyal membranın lateral kenarı korti organının lateral destek hücrelerine liflerle bağlıdır (13). Dış tüy hücrelerinin uçlarındaki stereosiliyalar tektorial membran içine gmldrlr (10), (11), (14).

2.2. Tüy Hücrelerinin İnnervasyonu

Koklear tüy hücreleri korti organındaki sinir lifleri ile olan sinapsları sayesinde işitsel sinir sistemi ile bağlantıdadır (13).

 çeşit sinir lifi kokleayı inerve eder: afferent işitsel sinir lifleri, efferent işitsel sinir lifleri ve otonomik sinir lifleri. İnsanlarda, işitsel sinir yaklaşık 30.000 afferent sinir lifine sahiptir. Afferent liflerin iki türü belirlenmiştir: Tip I miyelinli lifler geniş hücre gövdesine sahiptir ve işitsel sinir liflerinin %95'ini oluşturmaktadır. Tip II lifler ise yaklaşık %5 oranındadır ve miyelinsizdir, küçük hücre gövdesine sahiptir (10), (11).

İşitsel sinir lifleri sinapslar yoluyla tüy hücreleri ile bağlantı sağlar. Bu bağlantılar i ve dış tüy hücreleri için farklıdır. Her bir i tüy hücresinde birçok tip I sinir lifi sonlanır, tek bir tip II işitsel sinir lifi ise birçok dış tüy hücresi ile bağlantıdadır. Her bir i tüy hücresinin yaklaşık 20 sinir lifi aldığı tahmin edilmektedir (10), (14).

Tüy hücreleri gelen bilgiyi iletecek şekilde programlanmıştır. Baziller membran skala vestibuliye doğru yer değiştirdiğinde tüy hücreleri aktive olur.

Baziller membran skala timpaniye doğru yer değiştirdiğinde ise tüy hücrelerindeki elektriksel aktivite inhibe olur. Tüy hücrelerinin stimülasyonu sonucu elektriksel potansiyel ortaya çıkar (15), (16).

Koklea, gelen akustik sinyalin spektral ve temporal akustik analizlerinin işlenmesinden sorumludur. Gelen sinyalin frekans komponentlerinin çözümlemeleri, amplitüdlerinin belirlenmesi ve sinyalin temel temporal yönlerinin tanımlanması için özel olarak programlanmıştır. Bu işlemler akustik sinyalin işitsel işlenmesinin ilk basamağını oluşturur. Sonraki süreç, işitsel yol boyunca son olarak kortekste hızlıca sinyal işlenmesinin gerçekleşmesidir (16).

2.3. Kokleanın Beslenmesi

Koklea yüksek miktarda enerji tüketen kompleks biyolojik bir sistemdir. Normal olarak çalıştığında seslerin kodlanma ve iletimi stria vaskularis tarafından sağlanan endokoklear potansiyel, iç ve dış tüy hücrelerinin hareketi ve 8. sinir nöral lifleri ile baziller membran hareketinin bütünlüğünü gerektirir (17).

Kan akımı oksijen dağıtımı, metabolik maddeler ve karbondioksitin taşınmasını sağlar, beyin gibi temel yapılardaki kan akımı hızı sistemik kan basıncı değişiminin varlığında sabittir ve benzer bir otoregülasyon kokleada bulunmaktadır. Kokleadaki kan akımı hızı ve metabolik ürünler sabit değildir ve bu durum düzenleyici süreçte farklı zorluklara neden olmaktadır, kokleadaki farklı dokular arasında, stria vaskularis ve spiral ligament yüksek kapiller yoğunluğu, metabolik hız ve hipoksiye karşı akut sensitiviteye sahiptir (18).

Koklear kan akımının regülasyonu spiral modiolar arterde oluşur, kokleaya temel kan desteğini sağlar. Kan akımı regülasyonunun bir diğer aşaması lateral duvarda meydana gelir. Spiral ligament kapillerleri stria vaskularisin kapiller yatağına paralel uzanan bir vasküler yataktan oluşur (18).

Koklea çoğunlukla anterior inferior serebellar arterin (AICA) dalı olan labirintin arter ile beslenir. AICA alanında kan akımı bozukluğu oluşsa bile bazı vakalarda koklear fonksiyon devam eder. Bu durum kokleanın kollateral sirkülasyonundan kaynaklanır (2).

Stria vaskularis koklear duvar boyunca perilenfatik ve endolenfatik boşluk arasında yerleşmiş önemli bir yapıdır. Zengin kan desteğine sahiptir ve hücreleri mitokondriden zengindir (10).

Koklear vasküler alanlar 3 parçaya bölünebilir: lateral, spiral ve santral parça. Kokleaya arterial kan desteği santral parça ile sürdürülür. Çünkü spiral parçadaki terminal kan damarlarının kokleanın gelişim periyodu hariç lateral parça ile kan damarı bağlantısı yoktur (2).

Serebrospinal sıvı basıncının artmasının serebral kan akımını azaltması gibi perilenfatik basıncın artması da koklear kan akımını azaltır. İç kulak basıncı arttığında, endokoklear potansiyel, anoksiye cevapta olduğu gibi kokleanın lateral duvarındaki kan akımının kesilmesinden dolayı azalır (2). Perilenfin neredeyse %80'inin kan ve kalan %20'sinin serebrospinal sıvıdan oluştuğu bildirilmiştir (19).

İç kulakta kan-labirent bariyeri labirent sıvısının kimyasal kompozisyonunun düzenlenmesi ve normal koklear fonksiyonun sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (20).

Ani ve progresif sensorinöral işitme kaybı, akut akustik travma, GBİK, Meniere Hastalığı, presbiakuzi ve diğer koklear bozuklukların altında yatan patomekanizmalardan birinin bozulmuş koklear kan akımı olduğu varsayılmaktadır (21).

Guinea piglerde diğer doku ve organlardakine benzer şekilde küçük damarlar kokleada anahtar rol oynar. Kokleaya normal kan desteği iç kulak potansiyelinin ve endolenf üretiminin sürdürülmesi için önemlidir. Ayrıca tüy hücreleri iskemiye yatkındır. Koklear kan akımı bozukluklarının iç kulağın birçok patofizyolojik sürecini kapsadığı düşünülmektedir (22).

Akustik travma hikayesi olmayan kokleada, normal işitmeye sahip olanlarda bile çeşitli türlerde tüy hücresi kaybı gözlenmektedir. Genç guinea piglerde spontan tüy hücresi kaybı oranı %0.58 olarak bildirilmiştir. Normal çinçilya kokleasında ise ortalama kaybolan dış tüy hücresi sayısı 1 ± 0.6 ve iç tüy hücresi sayısı ise $0.5 \pm$

0.2 olarak bildirilmiştir. Spontan kayıp dış tüy hücrelerinde daha sık görülmektedir. Kaybolan hücrelerin yerleşimi korti organı boyunca dağınık olmasına rağmen spontan dejenerasyon apikal bölgede olma eğilimindedir (23).

Dış tüy hücrelerinin ilk sırasındaki stereosiliyaların çoğu zaman diğer iki sıraya göre daha fazla hasara uğradığı kanıtlanmıştır. Dış tüy hücreleri koklear amplifikasyondan sorumludur ve kokleanın işitme sensitivitesine katkıda bulunur. Dış tüy hücrelerindeki stereosiliya demetleri daha sıkı paketlenmiştir ve doğrudan tektoriyal membran ile birleşmektedir, bu özellikler dış tüy hücrelerinin stereosiliyalarını mekanik strese karşı daha dirençli hale getirmektedir ve iç tüy hücrelerinin stereosiliyalarındaki büyük yapısal farklılıklara rağmen, iç tüy hücreleri sağ kalmaya dış tüy hücrelerinden daha fazla müsaittirler (23).

2.4. Gürültü ve İşitme Sistemine Etkisi

Gürültü; rahatsız edici etki oluşturan, istenmeyen elektromanyetik sinyal olarak tanımlanabilir. Gürültünün insan sağlığına bilinen çok sayıda olumsuz etkisi bulunmaktadır. Bir sesin gürültü olarak adlandırılabilmesi için belirli bir şiddet seviyesine ulaşması gerekmektedir (24).

Gürültüye bağlı işitme kaybı (GBİK) sensörinöral işitme kaybının (SNİK) en sık nedenidir. GBİK, mesleki rahatsızlıklar arasında yer alır ve ikinci en sık mesleki yaralanmadır. Dünya sağlık örgütü, dünyada 360 milyon bireyin işitme kaybı sorunu yaşadığını ve bunun %91'inin yetişkin, %9'unun çocuk olduğunu tahmin ettiklerini bildirmiştir. Yaşa bağlı işitme kaybının en yaygın etiyolojik faktörü gürültü kirliliğidir (6). *National Institutes of Health (1990)* gürültüye maruziyet sonucu ortaya çıkan işitme kayıplarının tüm işitme kayıplarının neredeyse 1/3'ünü oluşturduğunu bildirmiştir (24).

Gürültüye maruziyet sağlıklı işitsel olmayan etkiler ve işitsel etkiler şeklinde etkileyebilir. İşitsel olmayan etkiler stres gibi psikolojik etkileri, davranışsal etkileri ve güven duygusunu içine alır. Aşırı gürültünün etkisi oldukça yıkıcı olabilir, kalıcı hafıza kaybı veya psikiyatrik bozukluklara neden olabilir. İşitsel etkiler aşırı gürültüye maruziyet sonucu ortaya çıkan işitme kaybı ve tinnitustur. Kalıcı eşik

değişikliğine neden olabilen gürültü, mesleki gürültü maruziyeti ile ilgili olan temel sorundur (6).

Dünya Sağlık Örgütü 2015 yılında gürültüye maruziyetin geçici eşik değişikliğine (GED) neden olabildiğini ve bu durumda işitmenin tamamen normale döndüğünü, ancak bazen maruziyet öncesi eşiklere dönmenin gerçekleşmeyebileceğini ve bu durumun ise kalıcı eşik değişikliği (KED) olarak adlandırıldığını ve KED'in iletişim ve yaşam kalitesini önemli oranda etkilediğini bildirmiştir (25).

Yaklaşık 85dB'in üzerinde sese maruz kalma başlangıçta GED ile kendini gösterir ve maruziyetin ilk 10-15 günü içinde hızlıca düzelir. Ancak tüy hücrelerinin ve bağlantılı sinir liflerinin tekrarlayan veya uzun süreli gürültüye maruziyeti dejeneratif değişikliklere ve geçici eşik değişikliğinin kalıcı eşik değişikliği haline gelmesine neden olur (6).

İşitme hassasiyetindeki geçici kayıp kalıcı koklear hasara yol açan değişikliklerin daha az şiddetli olarak gözlenmesidir. 50dB'in üzerindeki GED zamanla iyileşerek normal eşik seviyesine dönebilir. Ayrıca 43dB'lik GED'de dış tüy hücrelerinin stereosiliyalarının tektoriyal membrandan ayrılmasının hayvanlarda ilk morfolojik değişiklik olduğu kanıtlanmıştır (25).

GED varlığında özellikle yüksek frekans işitme eşiklerinde yükselme ve tinnitus mevcuttur. Genellikle kısa süreli olarak gözlenir. İyileşme birkaç saat ile birkaç gün sürebilir (6), (24).

Farklı şiddetlerdeki akustik uyarının psikofiziksel etkileri aşağıdakileri kapsar:

1. Hızlı ve ani geçici eşik değişikliğine adaptasyon stimülasyon frekansındaki ses şiddeti ile orantılıdır
2. GED patolojiktir, metabolik yorgunluk başlamıştır. Gelişim ve iyileşme maruziyet zamanı ile logaritmik olarak orantılıdır. Birkaç saat içinde yavaşça geri döner.

3. KED, örneğin mesleki işitme kayıpları, uzun zaman periyodu içinde aşırı gürültüye maruziyet sonucu gelişir (26).

Uzamış maruziyet zamanı korti organı hücrelerinin yıkımına ve muhtemel kaybına neden olur. Bu süreçte iki mekanizma ortaya çıkar:

1. Yüksek şiddetli gürültüye maruziyette, direkt mekanik yıkım olabilir
2. Orta şiddetli gürültüye maruziyette metabolik dekompanseasyon olur (26).

Korti organındaki tüy hücresi lezyonunun yerinin gürültünün frekans komponenti ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Yüksek frekanslı gürültü korti organının bazal kısmını, alçak frekanslı gürültü ise apikal kısmını travmatize eder. Tüy hücresi lezyonlarının bozulma paterninin ayrıca gürültünün şiddeti ile de ilgili olduğu belirtilmiştir. Kokleanın yüksek şiddetli 4 kHz oktav band gürültüye maruz kaldığında fokal lezyonların korti organının bazal yarısının tümüne yayıldığı, kokleanın aynı gürültüye orta şiddet seviyesinde maruz kaldığında ise 4 kHz'e karşılık gelen bölgede fokal lezyonların meydana geldiği bildirilmiştir (23).

Gürültünün frekans kompozisyonunun da ayrıca tüy hücresi hasarının şiddetini etkilediği belirtilmektedir. Yüksek frekanslı gürültünün alçak frekanslı gürültü kompozisyonuna göre daha şiddetli hasar oluşturduğu kanıtlanmıştır (23).

GED'e neden olan fakat KED'e neden olmayan gürültüye maruziyet, yaşa bağlı olarak ilerleyen nöral dejenerasyonun sonucu olarak işitme kaybının hızlanmasına yol açmaktadır. 8-16 kHz oktav band gürültüye (OBN) 100dB SPL'de 2 saat maruz bırakılan farelerde, bu maruziyetin gürültü sonrası 1. gün ölçümde 40dB'lik GED'e yol açtığı bildirilmiştir. GED sonrası nöral dejenerasyon sorunu yeniden değerlendirilmiş ve gürültü sonrası 24 saatte, KED periyodu sırasında tüy hücreleri ve sinir lifleri arasında büyük sinaptik bağlantı kaybı gözlemlenmiştir, nöral kaybın tüy hücresi fonksiyonu sağlam ve eşikler normal fonksiyonuna dönse bile ortaya çıktığı ve bu bilginin GED'in düşünüleninden daha zararlı bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (27).

The American College of Occupational Medicine Noise and Hearing Conservation Committee gürültüye bağlı mesleki işitme kayıplarının özelliklerini yayımlamış ve *The American Occupational Medicine Association Committee*

gürültüye bağlı mesleki işitme kayıplarını devamlı ya da aralıklı gürültüye maruziyet sonucu yavaşça ilerleyen işitme kaybı olarak tanımlamıştır. Komite gürültüye bağlı mesleki işitme kayıplarının özelliklerini aşağıdaki şekilde belirlemiştir:

- İç kulaktaki tüy hücreleri etkilenmiştir, işitme kaybı daima sensörinöraldır.
- Odyometrik patern daima bilateral simetriktir.
- Neredeyse hiçbir zaman ileri derecede işitme kaybına neden olmaz, genellikle alçak frekanslarda sınır 45dB, yüksek frekanslarda ise sınır 75dB dir.
- Gürültüye maruziyet sonlandığında işitme kaybında önemli bir ilerleme olmaz.
- Daha önceki gürültüye maruziyet durumu kulağı gelecekteki gürültüye maruziyete karşı daha hassas yapmaz. İşitme eşikleri yükseldikçe kaybın oranı azalır.
- Hasar erken dönemde 3000, 4000 ve 6000Hz’te ortaya çıkar. En büyük kayıp 4000Hz’te meydana gelir. 3000-6000Hz’ten daha aşağıda ve yukarıda olan frekansların etkilenmesi daha uzun zaman alır.
- Sabit maruziyet durumlarında 3000, 4000 ve 6000Hz’teki kayıp maksimum seviyeye 10-15 yılda ulaşır.
- Yıllarca süren devamlı maruziyet aralıklı gürültüye maruziyetten daha fazla zarar verir (26).

Hasarın lokalizasyonu gürültüye maruziyetin tipine bağlıdır. Beyaz gürültü multifrekans gürültüdür ve pek çok endüstriyel koşulda karşılaşılır, genellikle kokleanın bazal kıvrımının yukarısında hasar meydana gelir. Dar bant gürültü, gürültünün frekansına bağlı olarak farklı alanlarda hasar oluşturur, merkez frekanstaki şiddet arttıkça hasarın büyüklüğü de artar. Yüksek sesle müzik dinleme 2000-8000Hz arasında hasar oluşturur (26).

Yüksek sese maruziyet günde 8 saat ve haftada 5 gün devam ederse kalıcı işitme kaybı meydana gelme riski artar. İşitme bozukluğu rutin aktiviteleri önemli oranda etkilediği zaman göze çarpar. Bu aşamada, kalıcı ve geri dönüşümsüz işitme kaybı meydana gelmiştir. Gürültüye maruziyet sonlandığında, kişi kaybettiği işitme hassasiyetini geri kazanamaz. Bireylerin yaşları fazlalaştıkça gürültüye bağlı işitme kaybına yaşa bağlı işitme kaybının eklenmesi ile işitme daha da kötüleşecektir. Tüy hücrelerinde fokal kayıp ve sinir sonlanmalarında dejenerasyon vardır (6).

Gürültüye bağlı işitme kaybının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Olası birçok patofizyolojik mekanizma arasında koklear kan akımındaki yetersizlik gürültüye bağlı geçici ve kalıcı eşik değişikliklerine katkıda bulunur. Literatür tutarsız olmasına rağmen, birkaç histolojik ve fizyolojik çalışmada gürültüye maruziyetten sonra kokleada azalmış sirkülasyonun işaretleri kanıtlanmıştır. Baziller membran, spiral ligament ve stria vaskülaris kapillerlerinin vazokonstrüksiyonu gürültüye cevap olarak düşünülmüştür. Spiral lamina terminal damarlarındaki baziller membran kapillerinin korti organına oksijen desteği sağladığı düşünülmektedir (2).

İşitme kaybının paterninin ve koklear patolojinin hem baziller membranın cevabı hem de gürültünün akustik karakteristikleri ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Koklea normalde metabolizmayı yüksek seviyede çalıştırır. Enerjiye en çok ihtiyaç duyan kısım stria vaskülaristir, K⁺ iyonlarını sabit düzeyde geçirerek iyon dengesini ve endolenf polaritesini sürdürür. Yüksek enerji ihtiyacı stria vaskülarisin bazal, intermediate ve marjinal hücrelerindeki geniş mitokondri popülasyonu tarafından desteklenir (17).

Gürültüye maruziyetin koklear kan akımında yetersizliğe neden olduğu, iskemiye yol açtığı ve kokleadaki kapiller yapıya zarar verdiği belirtilmektedir. İskemik hasar nitrik oksit üretimini artırır, bu durum ise koklear hücre hasarına neden olur. Bu nedenle kokleada gürültüye bağlı oluşan iskemi spiral limbustaki fibrositlerde apoptozis ile ilgili olabilir. Akustik hasar sonrası sensör yapılarındaki kalıcı değişiklikler limbus ve lateral duvardaki fibrositlerin kaybı ve strial dejenerasyon kadar tüy hücresi kaybı, stereosiliya hasarı ve nöronal kaybı da içine alır (28).

Stria vaskülaris kokleadaki çok önemli bir yapıdır. Koklear kanalda yüksek potasyum ortamı ve endokoklear potansiyel oluşumunu sağlayan enerji kaynağıdır ve bu şekilde pek çok ROS bu dokuda üretilebilir. Stria vaskülariste detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesinin kokleada gürültüye karşı koruyucu önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (7).

Kan ve stria vaskülaris arasındaki bariyer fonksiyonunun varlığı ve bu strial fonksiyonun gürültüye maruziyet sonrası değiştiği bildirilmiştir. Gürültüye

maruziyeti takiben çinçilyalarda bazal ve 2. kıvrımda stria damar geçirgenliğinin arttığı kanıtlanmıştır. Bu bulgular stria vasküleriste endotelial hücre transport sisteminin gürültüye maruziyet ile değişebildiğini ortaya koymaktadır. Bu gibi değişiklikler korti organındaki hasarda önemli rol oynamaktadır (20).

Mitokondrial elektron transport zinciri hücre içindeki reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) ana kaynağı olarak kabul edilmiştir. Normal fizyolojik durumlar altında moleküler oksijenin %98'i mitokondri tarafından tüketilir (17).

Oksidatif stres durumu altında mitokondri ROS'un ana kaynağı olabilir ve ayrıca ROS'a en duyarlı hücre bölgesidir. Bu nedenle, mitokondri özel antioksidan korumasına ihtiyaç duyar çünkü antioksidanlar önemli enerji mekanizmalarıdır ve indüksiyon merkezidir ve pek çok sinyalizasyon yoludur (29).

GBİK'in mekanizması iki ana kategoride sınıflandırılmıştır: 1) direkt mekanik travma ve 2) ROS, reaktif nitrojen ürünleri (RNS) ve diğer serbest radikal ürünlerinin aşırı formasyonundan dolayı iç kulağın hücresel yapılarında indirekt metabolik hasar (30).

Gürültüye bağlı oluşan koklear hasarın, mekanik ve metabolik hasarın yansıması olduğu düşünülür. Mekanik hasar korti organındaki selüler ve intraselüler yapıların doğrudan yıkımıdır. Metabolik hasar ise iç kulaktaki homeostasisin sürdürülmesi için gereken metabolik süreçteki hasar nedeniyle oluşur. Gürültüye maruziyet vazokonstriksiyon, kırmızı kan hücrelerinde birikim, stria vaskülaris ve spiral ligamentte lokalize ödem gibi vasküler değişikliklere neden olmaktadır (20).

Gürültüye maruziyet dış tüy hücrelerinin stereosiliyalarına hasar verir, normalde en uzun stereosiliya tektoriyal membran içine gömülüdür ve koklear kısmın hareketi tektoriyal membranın altı ve korti organının tepesi arasında bir makaslama hareketine neden olmaktadır. Tektoriyal membran ile bağlantılı olan stereosiliyaların bütünlüğünün iletim sürecinde önemli olduğu çünkü stereosiliyaların stria vaskülarise doğru hareketinin stereosiliyaların tepesindeki mekanik iletim kanallarını açtığı ve tüy hücrelerini depolarize ederek endolenften stereosiliyaya potasyum girişine izin verdiği bildirilmiştir (17).

İç tüy hücreleri yüksek şiddetli gürültüye oldukça dayanıklıdır. Bir bölgedeki dış tüy hücrelerinin tamamı yok olduğunda iç tüy hücreleri de yok olur. GBİK'li çinçilyalarda kalıcı işitme kaybı 40dB veya üzeri olduğu zaman genellikle hem iç hem de dış tüy hücrelerinde harabiyet tespit edilmiştir (17).

Yüksek sesten kaynaklanan işitme kaybının hücresel mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Yüksek şiddette gürültüye sürekli maruziyet apoptozis yoluyla korti organındaki dış tüy hücrelerinin ölümüne neden olur. Gürültüye maruziyetten kaynaklanan hücre ölümünün nedenleri; iç kulaktaki kan akımının azalması, metabolik aktivite artışından kaynaklanan serbest radikallerin üretimi ve mekanik travmadan doğrudan etkilenmiş olan dış tüy hücrelerinin hücresel nekrozudur (31).

Gürültü veya ototoksik ilaçlar gibi travmatik ajanlar hücre antioksidan savunma sistemini bastırarak ROS oluştururlar, tüy hücrelerinin antioksidan savunma sistemi kokleanın bazalinde apektan daha zayıftır ve bu durum kokleanın bazalindeki tüy hücrelerinin travma veya yaşlanmaya neden daha hassas olduklarını açıklayabilmektedir (32).

Tüy hücresi hasarında yaygın olarak kabul edilen mediatör ROS'tur, bu serbest radikaller hücre, DNA, proteinler, sitosolik moleküller, hücre yüzey reseptörleri ve membran lipidlerindeki sayısız bileşen ile kimyasal reaksiyona girerek hasara neden olmaktadır ve bu şekilde birçok intraselüler süreci etkilemektedirler. Kokleada ROS oluşumu zararlı gürültü seviyesine maruziyetten sonra gözlenmektedir ve gürültüye maruziyetten sonra 7-10 gün kokleada devamlılık göstermektedir. Oksidatif stresin uzamasının koklear yaralanmanın ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir (25).

Yüksek şiddetli gürültüye maruziyet iki neden ile kokleada ROS oluşumunu artırmaktadır; birincisi, yüksek şiddetli gürültüde koklear metabolizma çok hızlıdır ve bu şekilde serbest radikal oluşumu artar, ikincisi ise, şiddetli durumlarda gürültü koklear kan akımını etkilemektedir. Koklear kan akımı azaldığında korti organında oksijen eksikliği meydana gelir ve iskemi gelişir, artmış ROS aktivitesi travmatik gürültüden sonra birkaç gün devam eder, maruziyetten sonra da birkaç tüy hücresinin ölmeye devam ettiği bildirilmiştir (17).

Nörotropik faktörlerin taşınmasından sonra nöronlardaki ROS seviyelerinde hızlı bir artış olmaktadır, ROS'un nörodejenerasyonda anahtar rol oynadığı, kimyasal reaktivite yoluyla doğrudan toksik etki oluşturduğu, özellikle, ROS'un kokleadaki hücre ölümünde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Gürültünün iç kulaktaki superoksit, peroksinitrit ve hydrosil radikallerini içine alan ROS'u artırdığı bildirilmiştir (33).

Doğrudan biyokimyasal hasarın ötesinde ROS'un dolaylı etkileri de vardır. ROS'un kokleadaki lipit peroksidasyonunu etkilediği kanıtlanmıştır. Lipit peroksidasyon ürünlerinin apoptozise yol açarken bazı vazoaktif lipit peroksidasyon ürünlerinin aşırı gürültüye bağlı olarak koklear kan akımında azalmaya yol açtığı kanıtlanmıştır. ROS'un ayrıca, interlokin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi proinflamator sitokinlerin üretimine neden olan inflamasyona yol açtığı ve bu proinflamator mediatörlerin koklear hasara yol açtığı bildirilmiştir (25).

Stres sinyalizasyonunun inflamatuvar mediatörleri düzenlediği, hem apoptozis hem de ROS oluşumunun inflamasyona neden olduğu, gürültüye maruziyetin IL-6 gibi sitokinlerin üretimini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca gürültüye bağlı tüy hücresi iskemisinin koklear hipoksi uyarılabilir faktör (HIF-1 α) stabilizasyonuna yol açtığı, bu transkripsiyon faktörünün proinflamator TNF- α 'nın artmasına yol açtığı bildirilmiştir (25).

GBİK ile ilgili histopatoloji üzerine çok fazla çalışılmış ve araştırmaların çoğunda genellikle tüy hücreleri ve stereosiliyalardaki patolojik değişikliklere odaklanılmıştır. Afferent dendritler ve spiral ganglion hücreleri gibi diğer sensör yapılara olan zararın da ayrıca işitme kaybına yol açtığı kanıtlanmıştır. İskemik hasar K⁺ konsantrasyonunu değiştirir ve gürültüye maruziyetten kaynaklanan enerji eksikliğine neden olur. Farelerde gürültüye maruziyetten 24 saat sonra kokleada spiral limbustaki kaybın neredeyse tamamı sadece apikal limbusta bulunmuştur, bu nedenle limbusta gürültüye bağlı yaralanma apikalde başlar. Endolenfteki anormal K⁺ konsantrasyonu ve endokoklear potansiyelin tüy hücrelerinin aktivasyonunu etkilediği ve bu şekilde işitmenin azaldığı bildirilmiştir (28).

Nekrozis, apoptozis ve otofaji olmak üzere üç major hücre ölümü tanımlanmıştır. Bunlardan ilk ikisinin iç kulakta meydana geldiği bildirilmiştir.

Nekrozisin hücre gövdesi ve organellerinin morfolojik olarak şişmesi, hücre membran rüptürü ve inflamatuvar cevaba yol açan ekstraselüler boşluktaki hücre içeriğinin dışarı çıkması ile karakterize olduğu, apoptozisin ise, programlı hücre ölümünün en önemli şekli olduğu, plazma membran yüzeyindeki çıkıntı, yakındaki hücre ve makrofajlar tarafından yutulmuş olan apoptotik gövdelerdeki hücrelerin bozulması, fragmentasyon ve nükleer kondansasyona yol açan bir seri internal biyokimyasal süreç ile karakterize olduğu bildirilmiştir. Otofaji son zamanlarda tanımlanmış olan bir programlı hücre ölümü çeşididir (32).

Gürültüye maruziyetten kaynaklanan işitme kaybında, dış tüy hücrelerinde apoptotik sinyal tarafından oluşturulan ROS primer rol oynar (31). ROS doğrudan proteinler, lipidler, DNA ve apoptozisten sorumlu genler olan sinyal işleme molekülleri gibi hareket ederek hücre yapılarına zarar verir (30).

Apoptozis aktif bir süreçtir ve hem hücre membranı hem de mitokondri fonksiyonuna devam eder. Normal fonksiyon gören bir vücutta, apoptozis istenmeyen hücrelerin dokulardan temizlenmesi için çok faydalı bir mekanizmadır. Apoptozis caspase adı verilen enzim ailesi tarafından düzenlenir ve mitokondri, nükleus veya hücre membranından gelen hücre ölüm sinyalleri ile başlatılır. Caspase-8 hücre mekanizmasından hücre ölüm sinyallerini başlatır; caspase-9 mitokondride hücre ölüm sinyalleri tarafından üretilir; caspase-3 ise apoptozisin final aşaması ile bağlantılı bir dengeleyicidir (17).

Caspase'ların, cysteine proteaz ailesi olduğu, apoptoziste major rol oynadıkları; inaktif procaspase şeklinde hücrelerde bulundukları ve procaspase'ların bir veya daha fazla öncü caspase tarafından aktive edildiği bildirilmiştir. Ayrıca öncü caspase-9'un aktivasyonunun intrinsik hücre ölüm yolunun parçası olduğu, mitokondriden cytochrome-c'nin salınımı ve apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1'in bağlanmasını gerektirdiği, caspase-3'ün aktivasyonuna yol açtığı, öncü caspase-8'in, hücre membranındaki ölü reseptörlerle aktive edilen ekstrinsik hücre ölüm yolunun parçası olduğu, caspase-3'ü aktive ettiği ve aktive edilmiş caspase-8'in intrinsik hücre ölüm yolunu çaprazladığı ve caspase-9'u aktive ettiği bildirilmiştir (32).

Akut akustik travma koklear tüy hücreleri ve/veya primer i şitsel nöronların dendritlerinin yıkımına neden olarak ve koklear kan akımını azaltarak hücre membranlarında rüptür gibi yapısal değişikliklere neden olur. Koklear kan akımının azalması iç kulak sıvılarında oksijenin azalmasına neden olur, bazı hücre aktivitesindeki azalma kan akımına bağlıdır (34).

GB K ayrıca periferel i şitsel yolun ötesini de etkiler, hipokampüsteki n roenezisi baskılar ve hipokampal nöronlardaki uzaysal ayarı değiştirir. Seslere emosyonel önem ekleyen amigdala, i şitsel korku durumunda ve akustik startle refleksin ayarlanmasında santral rol oynar (3). Koklear nükleus i şitsel bilginin i  kulaktan beyine aktarıldığı ilk durak olduğundan bu bölgenin de şiddetli sese maruz kaldığı bildirilmiştir. Özellikle dorsal koklear nükleus tinnitus olarak bilinen gürültü sonucu ortaya çıkan patolojik durumlardan birinde jeneratör olarak çalışır (35). Akustik travmanın inferior colliculusta hiperaktiviteye yol açtığı ve bunun yanında eksitatör sistemde mRNA seviyesinde artış ve/veya inhibitör sistemde mRNA seviyesinde azalmaya neden olduğu varsayılmaktadır (36). GB K i şitsel korteks ve *medial genikulat body*'de tonotopik reorganizasyon gibi beklenmeyen fonksiyonel değişikliklere yol açar (3).

Hayvan modellerinde akustik travmanın koklear nükleus, inferior collikulus ve i şitsel korteks gibi santral i şitsel yapılardaki nöronların spontan aktivitesinde artı a neden olduğu ve bu hiperaktivitenin tinnitus için nöral alt yapı sağladığı belirtilmiştir (36 - 38).

Yüksek ses basınç seviyesine maruziyet iç kulağın sensör parçasına kalıcı hasar verebilmekte ve işitme kaybı sonucu santral i şitsel sistemde büyük bir reorganizasyon meydana gelebilmektedir. Ayrıca yüksek frekans işitme kaybını takiben önceden yüksek frekansa hassas olan i şitsel korteksteki nöronlar çevredeki orta frekanslara daha duyarlı olmaya ba lamaktadırlar (39).

Santral i şitsel yapılarda gözlenen artmış *sound evoked aktivite*, lateral inhibisyonadaki azalmadan dolayı çoğu zaman GB K bölgesinin altındaki frekanslarda en fazladır. Santral kazançtaki değişikliklerden başka, GB K genellikle i şitsel korteksin rostral kısmı boyunca devam eden koklear nükleusta spontan deşarj oranında artı a neden olur (3).

İşitme kaybı ile ilişkili tonotopik alanlardaki yükselmiş spontan deşarj oranı tinnitusun nöral korelasyonu olarak düşünüldüğü halde artmış *sound evoked cevaplar* ve artmış santral kazanç hiperakuzi ve gürlük intoleransı ile bağlantılıdır. GBİK ayrıca işitsel korteksteki frekans haritası reorganizasyonunu da etkiler ve internöral senkronizasyonu artırır. Bu nörofizyolojik değişiklikler tinnitus ile bağlantılıdır (3).

2.5. Gürültüye Bağlı Odyolojik Olmayan Patolojiler

- Yüksek frekanslar veya duyulabilir aralığın üzerindeki ultrasonik sesler iç kulağa zarar verir, mide bulantısı ve dizzines'a neden olur.
- Orta frekanslı gürültüye maruziyet, alt ekstremitte koordinasyonu ve düşünce üzerine önemli etkisi olan beyin ve sinir sistemini etkiler.
- Orta vibrasyon ağrı, uyuşukluk ve parmaklarda siyanoza yol açar. Kan damarlarında kontraksiyona neden olur, adrenalin hormonunun aşırı sekresyonundan dolayı ciltte solukluk olur, solunum amplitüdünde değişiklikler olur.
- Şiddetli vibrasyon ellerdeki kemik ve eklemlere zarar verir, şişkinlik ve katılık meydana gelir.
- Alçak frekanslı gürültüye maruziyet kalp atımını azaltır, kan basıncında değişiklik yapar ve solunum güçlüğüne neden olur.
- Jet makinasının gürültüsü gastrik ülserin alevlenmesine ve timüs bezi atrofisine neden olur. Depresyon, anksiyete, güvensizlik duygusu ve paranoyaya neden olabilir (6).

2.6. Metformin

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan oral antihiperglisemik bir ajandır. Glukoz ve yağ metabolizmasının regülasyonu ile karaciğerde metabolik aktivite oluşturur. Ayrıca lipogenezisi azaltır ve lipogenik enzimlerin inhibisyonu aracılığıyla, genellikle asetil-CoA karboksilaz, yağlı asit oksidasyonunu artırır (40). Dünyada kullanılan hipoglisemik ilaçlardan biri olan metformin kanserin önlenmesi ve tedavisinde dikkate alınmaktadır (41).

İskelet kaslarında, metformin insülin sinyalizasyonunu artırır ve aktive edilmiş proteinkinazı aktive eder. Tokluk glikoz seviyesini azaltır ve sistemik insülin direncini azaltır. Adipoz dokuda, lipogenezisi inhibe eder ve aktive edilmiş proteinkinaz aktivasyonunu yağlı asit oksidasyonuna bağlı olarak stimüle eder (40).

Overlerde metformin, sex steroidlerinin aşırı üretimini ve foliküler büyüme ve stereidojenezde aşırı insülinin blokaj etkisi ile prematüre luteinizasyonu önler, bu şekilde ovulasyonu düzenler (40).

Metforminin ayrıca endotelyum üzerinde yararlı etkileri vardır. Aktive edilmiş proteinkinaz aktivasyonu ile, metformin tedavisi proinflamator sitokinlerin üretimini baskılar. Ek olarak, endotelyal nitrik oksit sentezi ve endotelyal hücrelerdeki nitrik oksit üretimini artırır. Bu durum aterosklerotik yaralanmaların hızını azaltmaya yardım eder (40).

Mitokondrial homeostazı düzenler böylece oksidatif stres ve hücre ölümünü önleyerek uyarılmış apoptozisi azaltır. Mitokondrial fonksiyon ile birbirini tamamlayan antioksidan sistemi destekler. Respiratuar komponentlerin tüketimini önemli oranda azaltır (40).

Metformin alan diyabetik hastalar bu ilacı almayanlar ile karşılaştırılmış ve metformin alan hastaların oksidatif durumlarının düzeldiği bu sonuca göre; metforminin antioksidan özelliklere sahip olabileceği veya stres durumlarında ROS üretimini düzenleyebileceği ileri sürülmüştür (42).

Hücrese düzeyde, metforminin bu yararlı etkileri inflamatuvar mediatörlerin salınımının inhibisyonunu kapsayan metabolik regülatör AMPK aktivasyonu ile bağlantılıdır (42).

Metformin aşağıdakileri kapsayan bir ajandır:

- 1) Neredeyse %60 oranında oral olarak alınan bir ilaçtır,
- 2) Temel yan etkisi genellikle böbrek yetmezliğinde görülen laktik asidozdur,
- 3) Mitokondriden zengin olan hücrelerde birikme özelliği, ROS'un temel özelliğidir,

4) Santral sinir sistemi tümörleri radyasyona maruz kaldığında radyoprotektör olarak kullanılmaya eğilimli olan metformin kan beyin bariyerini bozar,

5) Koklear yapılarda bulunduğu bildirilen organik katyon transporter 2 yoluyla nefronlara tutunur (42).

2.6.1. Antioksidan Özellik Açısından Metformin

Reaktif oksijen ürünleri (ROS) ve reaktif nitrojen ürünleri (RNS)'nin kokleada gürültüye bağlı hücre ölümünde major sorumlu olduğu varsayılmaktadır. ROS normal aerobik metabolizmanın doğal yan ürünü olarak oluşmaktadır (43).

Son birkaç yılda GBİK'i önleyebilen güçlü ilaç çalışmalarında hayvan ve insanlarda geniş miktarda ürün test edilmiştir. GBİK'e karşı korumada fizyolojik mekanizmaların etkinliğine dayanarak bir dizi madde sınıflara ayrılabilir. Bunların arasında yer alan antioksidanlar, ROS'u elimine ederek oksidatif stresi azaltır, glukokortikoidler ve koklear kan akımını düzenleyen maddeler inhibitör transmitter sistemleri aktive eder veya tüy hücrelerindeki apoptozis yollarını tıkar (44).

Akut akustik travma kokleada ROS, RNS ve lipit peroksidasyonu yoluyla oksidatif stresin antioksidan savunma mekanizması kapasitesini aşmasına neden olur. Oksidatif stres apoptozis veya nekroz yoluyla tüy hücresi hasarına ve sensorinöral işitme kaybına neden olan hücre ölümüne yol açar. Akut akustik travmanın tedavisi veya önlenmesi için farmakolojik yaklaşımlar kokleada antioksidan savunma mekanizmasını artıran antioksidan ilaçların kullanımının gelişimidir (45).

Bazı antioksidan maddelerin profilaktik kullanımının GBİK'i azalttığı kanıtlanmıştır. Ayrıca GBİK modelinde şiddetli gürültü ile kokleanın mekanik olarak hasarlandığı ve ayrıca ROS yolu ile metabolik stresin tüy hücrelerinin ölümüne neden olduğu, bu patolojik mekanizmalara göre antioksidan maddelerin ROS'u azaltarak şiddetli gürültüye maruziyet sonrası kokleayı tüy hücresi kaybından koruduğu bildirilmiştir (44).

Bazı ilaçlar akustik travmanın tedavisinde kullanılır. Genellikle, hepsi mikrosirkülasyonun tedavisinde doğrudan etkilidir. Hiperbarik oksijen terapisi

mikrosirkülasyonun tedavisinde ve sensörinöral işitme kaybını içine alan bazı hastalıkların tedavisinde uygun görülmektedir (34).

Antioksidan vitaminler ve magnezyum kombinasyonunun GBİK'in önlenmesinde ve ototoksisitede ilave yarar sağladığı kanıtlanmıştır. Karoten ve tocopherol, askorbik asit ve tocopherol ve carotene ve askorbik asitin antioksidan aktivite üzerindeki ek katkıları gösterilmiş, GBİK'ten korumada carotene, vitamin C ve E, magnezyum kombinasyonunun ek yararı kanıtlanmıştır. Ayrıca kalsinörin inhibitörünün aktivasyonunun kalsiyum homeostasisinde ROS üretimine ve ROS'un neden olduğu defisitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (27).

Gürültüye maruziyet sonrası 10. gün yapılan değerlendirmede tek bir antioksidan ajanın kullanıldığı hayvanlarda anlamlı farklılık gözlenmezken kombine antioksidan ajanların (vitamin A, C, E ve magnezyum) kullanıldığı hayvanlarda ABR ölçümünde tüm frekanslarda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık elde edilmiştir (46).

Serbest oksijen radikali üretimi çeşitli nörodejeneratif sendromların patogeneğinde önemli rol oynamasına karşın, antioksidan ajanlar nörodejeneratif süreçlerde terepatik role sahiptir. Bu nedenle antioksidan kullanımı GBİK tedavisinde faydalı olabilir. Gürültüye maruziyetten sonraki 7-10 güne kadar serbest oksijen radikali üretiminde artış devam eder; bu periyodun süresi gürültü parametrelerinin çeşidine bağlıdır. Gürültüye maruziyeti takiben, erken evrede (1-2 saat sonra) hidroksil radikalleri ve superoksitler artar. Gürültüye maruziyeti takiben ilk 1-30dk içinde oluşan serbest oksijen radikalleri yağ peroksidasyonu ürünü ve peroksinitrittir ve lipid peroksidasyonu üretimi ilk 1-5 saat içinde artar (4).

Antioksidan özelliği olabileceği düşünülen metformin yeni keşfedilen selüler ve mitokondrial fonksiyonlardaki etkisinden dolayı son zamanlarda popülerlik kazanmıştır (40).

Radyasyonu takiben hücre ölümünün en önemli nedeninin ROS olduğu bildirilmiştir. Buna göre; metformin ROS'u uzaklaştırır ya da azaltır. Suda gamma ışını kullanılan eski çalışmalar metforminin hipermetabolik hücrelerde serbest radikal üretimini azalttığını kanıtlamıştır. Bununla birlikte, aynı araştırma grubunun başka bir çalışmasında metforminin minimal ROS temizleme aktivitesinin olduğu

bulunmuştur. Bu kanıt metforminin ROS üretimini düzenleyen intraselüler mekanizma yoluyla hareket ettiğini akla getirmektedir (42).

Metforminin ana mekanizmasının mitokondride ROS üretimini azaltan respiratuar zincirin inhibisyonu olduğu ileri sürülmüştür. Hücre kültür çalışmaları metforminin temizleme ve intraselüler metabolik düzenleme etkisini reddetmiştir (42).

Metforminin kortikal nöronlarda hücre ölümünü azaltan oksidatif stresi önlediği kanıtlanmıştır. Koklear işitsel tüy hücre sıralarındaki in vitro çalışmalarda metforminin ROS üretimini azaltarak gentamicin uygulaması sonrası sağ kalımı artırdığı belirtilmiştir (42).

Standart dozda metformin kullanan hastalarda kanser gelişme riskinin hiç metformin kullanmamış diyabetiklerle karşılaştırıldığında daha az olduğu bildirilmiştir (42).

Sıradışı hidrofilik yapısından dolayı metformin, hücre membranından pasif olarak difüze olamaz ve hepatositlere tutunmak için organik katyon transporter ailesinin üyelerine bağlanır. Hepatositlere girince ilk olarak mitokondrial matriks içinde birikir. Metformin mekanizmasında AMPK rolü 2001 yılında belirlenmiştir ve metforminin ratlarda AMPK aktivasyonunu stimüle ettiği kanıtlanmıştır. Metforminin ayrıca kanserin ilerlemesinde rol oynadığı bilinen inflamatuvar süreci değiştirebileceği bildirilmiştir (47).

Günümüzdeki sonuçlar en azından hayatın erken döneminde örneğin; adolesan dönemde metformin tedavisinin organizma fonksiyonlarını düzenleyebileceğini göstermektedir. Metforminin kan beyin bariyerini geçebileceği ve santral sinir sistemi ve metabolizmayı harekete geçirebileceği gözlenmiştir (41).

2.7. Deney Hayvanları

Laboratuarlarda, özel koşullar altında yetiştirilen omurgalı hayvanlardır. Bilimsel deneylerde kullanılmak amacı ile yetiştirilirler (48).

Deney hayvanları genel olarak üç temel amaç için kullanılmaktadırlar: 1) ilaç ve tıbbi ürünlerin geliştirilmesi, 2) insan sağlığı ve yaşamı için gerekli araştırmaların yapılması, 3) toksik olabileceği düşünülen ürünlerin test edilmesi (48).

Deneyisel çalışmalarda en sık kullanılan türler: Kobay (*Cavia porcellus*), Fare (*Mus musculus*), sıçan (*Rattus norvegicus*), golden hamster (*Mesocricetus auratus*), tavşan (*Oryctolagus cuniculus*), köpek (*Canis familiaris*), kedi (*Felis catus*), bildircin (*Coturnix caturmix*) (48).

2.7.1. 3R Prensibi

3R prensibi deneylerde kullanılan hayvanların belirli yasal düzenlemeler çerçevesinde kullanılmaları amacı ile oluşturulmuştur. İngilizce ‘*replacement, reduction ve refinement*’ kelimelerinin baş harflerinden oluşturulmuş ve 1959 yılında Russell ve Burch tarafından yayımlanmıştır. Dilimize ‘‘başka şey kullanma, azaltma, arındırma’’ olarak çevrilmiştir (49).

Replacement (Başka şey kullanma): Mümkün olduğunca deneyler sırasında daha az duyarlı olan hayvanların ya da alternatif başka materyallerin gelişmiş sisteme sahip olan hayvanların yerine tercih edilmesidir. Bu alternatif materyallerin avantajları bulunmakla birlikte organizmada meydana gelen biyolojik olayları temsil etme konusunda probleme neden olabilmektedirler (48), (49).

Reduction (Azaltma): Gereksiz hayvan kullanımının önüne geçilmesinde büyük önem taşımaktadır. Araştırma öncesi literatür taraması ve planlama ile kesin ve doğru bilginin elde edileceği en az sayıdaki hayvan miktarı tespit edilebilmektedir (48), (49).

Refinement (Arındırma): Araştırmada kullanılacak hayvanlara uygun anestezi ve analjeziklerin tercih edilmesi, ortam ve çalışmacılardan kaynaklanabilecek stresin en aza indirilmesi ile çalışma sırasında hayvanlara yönelik acı verici uygulamaların şiddetinin azaltılmasıdır (48), (49).

1985 yılında *The International Foundation for Ethical Research* ‘‘responsibility’’ ilkesini oluşturarak 4R biçiminde genişletmiştir. Bu ilkede ise; toplumun deney hayvanlarının kullanım alanları ve kullanımı konusundaki

farkındalığının artırılması ve kişisel sorumluluğun artırılması amaçlanmaktadır (48), (49).

Çabuk üreyebilmesi, kullanımının kolaylığı, kısa sürede üreyebilmesi ve genetik olarak benzer grupların oluşturulabilmesi nedeni ile deneysel çalışmalarda rat çok tercih edilen bir türdür (50). Tablo 2.1’de ratlara ait fizyolojik değerler gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Ratlara ait fizyolojik değerler (50).

Erişkin vücut ağırlığı (dişi)	200-300 gr	Eritrosit sayısı	5-10 x 10 ⁶ /mm ³
Erişkin vücut ağırlığı (erkek)	300-500 gr	Hematokrit	%36-57
Doğum ağırlığı	5-6 gr	Hemoglobin	11-18 gr/dl
Vücut yüzey alanı	230cm ² /50gr 250cm ² /130gr 325cm ² /200gr	Ort. alyuvar hacmi	46.0-65.0fl
Vücut sıcaklığı	35.9-37.5°C	Ort. alyuvar Hemoglobini	11.9-19.0pg
Yaşam süresi	2.5- 3.5 yıl	Ort. alyuvar hemoglobin konsantrasyonu	25.9-35.1g/dl
Gıda tüketimi	5-6gr/100gr /gün	Lökosit sayısı	3-17x 10 ³ /mm ³
Su tüketimi	10-12ml/100gr /gün	Nötrofil	%9-34
Gastrointestinal kanal geçiş zamanı	12-24 saat	Lenfosit	%65-85
Seksüel olgunluk (dişi)	65-110 gün (13hafta)	Eozinofil	%0-6
Seksüel olgunluk (erkek)	65-110gün (13 hafta)	Monosit	%0-5
Siklus uzunluğu	4-5 gün	Bazofil	%0-1.5
Östrus süresi	14 gün	Trombosit sayısı	500-1300x 10 ³ /mm ³
Gebelik süresi	21-23 gün	İdrar pH	7.3-8.5
Yavru sayısı	6-12	İdrar miktarı	5.5ml/24 saat
Doğurganlık süresi	350-440 gün	İdrarın özgül ağırlığı	1040-1070
Işık periyodu (aydınlık/ karanlık)	12/12		
Oksijen tüketimi 250gr için)	0.84 (0.68-1.10) ml/g/saat		
Kalp atım sayısı	250-500/dak		

Ratlarda timpanik kavite işitsel kemikçiklerden oluşan üç ayrı yapıyı kapsar: hipotimpanumu oluşturan timpanik bullanın alt kısmı, timpanik membran ile sınırlı orta kısım (mezotimpanum) ve superior epitimpanik kısım (epitimpanum). Timpanik bulla duvarı pürüzsüzdür. Rostral kısımda, bulla işitsel tüp kanalına dönüşür. Bullanın posteromedial duvarı sinir ve damarlar ile yanyanadır. Bullanın kaudali, stylomastoid foramenin aşağısı, jugular foramenin içine açılan kondilar kanala doğru ilerler (51).

Timpanik kavitenin santral tepesi kokleanın bazal kısmının çıkıntısı olan promontoryumdur. Bu çıkıntı ratlarda fazla yüksek değildir (51).

Kokleanın şekli $2^{1/2}$, $2^{3/4}$ dönüştür. Kokleanın uzun eksenini modiolusa doğru kavislidir. Yapısı nedeni ile kokleanın bazal kısmına kadar vücut düzlemine yaklaşık 45 derece oblik uzanır. Koklear spiral kanalın uzunluğu 9-11mm'dir. Vestibüler ve timpanik skala çok küçüktür, eni ve boyu 1mm'nin altındadır (51).

Koklear kanalikül skala timpaninin ventral duvarında belirir ve kranial kaviteye yanaşır. İnternal akustik kanal ve posterior semisirküler kanal arasında ortalama 2.24mm mesafe ilerler (51).

Oval pencere vestibülün lateral duvarında yerleşmiştir. Semisirküler kanallar vestibülün posterior ve superior duvarından oluşur (51).

Ratların işitsel kemikçikleri insanlarla karşılaştırıldığında daha küçüktür ve insandaki büyüklüğün yaklaşık çeyreği kadardır. Modiolusun boyu norveçli ratlarda 2.45mm ve wistarlarda 1.75mm'dir (51).

Baziller membranın uzunluğu işitme eşikleri ile ilişkili görünmektedir. Kısa baziller membran yüksek frekanslarda daha fazla hassasiyete sahiptir. İşitsel hassasiyette bir diğer etken metabolik orandır. Metabolik oran vücut kitle fonksiyonudur. Yüksek metabolik oran özellikle yüksek frekanslarda işitsel hassasiyetin sürdürülmesi için gereklidir (52).

İnsanlar 16 Hz-20 kHz arası ses dalgalarına duyarlı iken ratlar ultrasonik ses adı verilen 20 kHz üzerindeki seslere de duyarlıdır (50). Ratlarda işitme aralığı insanlardan daha geniştir. İşitme aralığı 70dB'de 250-80.000 Hz arasında

değişmektedir. Seslere en duyarlı aralık ise 8.000-32.000 Hz'tir. 5 haftadan daha genç ratlar ise seslere daha duyarlıdır (53).

Wistar ratlarda ortalama işitme eşik değerleri farklıdır. Yüksek frekanslarda eşikler alçak frekanslara göre daha düşüktür (54).

İşitme eşiklerinde gözlenen sonuçlara benzer şekilde latanslar frekans ile ters ilişki gösterir. Yüksek frekanslarda alçak frekanslara göre dalgaların latansları daha kısadır (54).

Wistar ratlarda ABR genellikle beş dalgadan oluşur. Fakat bu dalgaların morfolojileri ABR değerlendirmesinde kullanılan tone burst uyarının frekansına bağlıdır. Örneğin, beş adet tek tepeli dalga öncelikle yüksek frekanslarda gözlenir, alçak frekanslarda ise dalgalar daha karmaşık görünür (54).

Ratlarda ABR dalga paternlerinde frekansa bağlı değişikliklerin olduğu kanıtlanmıştır (54).

2.8. Elektrofizyolojik Testler

2.8.1. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon

Otoakustik emisyonlar (OAE) normal fonksiyon gören kokleada üretilen, alçak gürültülü mikrofon ile kulak kanalından ölçülebilen seslerdir. OAE'ler spontan ya da uyarılmış olabilirler (55), (56). Spontan OAE'ler dar bantlı ve düşük sinyal seviyelidirler ve normal insan kulağında yaklaşık %50 oranında bulunurlar. Uyarılmış OAE'lar ise *transient* uyarılmış OAE, *stimulus frequency* OAE ve distorsiyon ürünü OAE'ü kapsar (55).

DPOAE kulağın eş zamanlı olarak, kokleanın iki saf ses uyararı ile uyarılması ile elde edilen seslerdir. Non-invaziv yaklaşım ile koklear fonksiyon değerlendirilir (55). Yapılan çalışmalar sonucu DPOAE'de en iyi sonucun 2f1-f2 frekansında olduğu bunun sebebinin de DPOAE'lerin baziller membran üzerinde oluştuğu yerden kaynaklandığı belirtilmektedir (56).

Periferal işitsel sistem ile ilgili ayrıntılı bilgiler verebilen DPOAE'ler, dış tüy hücresi lezyonunu normal işitsel fonksiyona sahip olanlardan ayırmayı sağlar. OAE'ların varlığı normal fonksiyon gören dış tüy hücresi varlığını kanıtlar (56).

Kemirgenlerin koklear gelişimleri doğumdan sonra 16-18. güne kadar devam etmektedir, bu nedenle ratlarda DPOAE ile koklear gelişim araştırılabilir (55). Ratlarda dış kulak yolunun çok dar olması nedeni ile ölçüm sırasında probe yerleşiminde güçlükler yaşanmakla birlikte DPOAE ratlarda kolay bir şekilde elde edilebilmektedir (56).

2.8.2. İşitsel Beyinsapı Cevabı

İşitsel beyinsapı cevabı (ABR) normal ya da patolojik durumlarda sıklıkla kullanılan uyarılmış potansiyel kayıt tekniğidir (54).

ABR kullanımı hem laboratuarda hem de klinik ortamda işitme seviyesinin belirlenmesinde çok yaygındır. Afferent kaudal işitsel sistem yoluyla yayılan akustik sinyalin iletiminden elde edilen birleşik uyarılmış aksiyon potansiyelidir (57).

Bu tekniğin kullanımı kolaydır ve non-invazivdir, klinik ve deneysel çalışmalarda kullanım için idealdir. ABR kafa derisinden uzak alan kayıttır ve genellikle 5-7 pozitif dalgadan oluşur, işitsel uyarandan sonraki ilk 10ms içinde gözlenir (54).

ABR farklı beyinsapı nükleuslarından kaynaklanır. Öncelikle insanda I-V tepesinin sorumlu olduğu yerler:

I) işitsel sinirin distali; II) işitsel sinirin proksimalı; III) medial koklear nükleus; IV) superior olivary kompleks; V) inferior colliculusta sonlanan lateral lemnisküs (57).

Ratların işitsel sistemi postnatal 10-12. günde çevresel seslere duyarlı hale gelir. İzleyen 2-5 hafta içinde, büyük bir gelişim gösterir ve olgun duruma gelir. Bu kritik periyod sırasında, frekans ve şiddet gibi temel akustik özelliklerin gösterilmesi, yüksek çözünürlük ve hassasiyete ulaşır (58).

ABR çalışmalarında hayvanlar kullanıldığı zaman, deneklerin hareketsiz kalması zorunludur. Akustik uyarının iletilmesi için genellikle kulaklıklar kullanılır ve uyarılmış potansiyeller genellikle subkutanöz elektrotlar ile elde edilir. Bu durumda geçici immobilizasyon gerekir. İmmobilizasyon çoğu zaman genel anestezi ile gerçekleştirilir. Bu amaçla yaygın olarak isoflurane ile ketamin ve xylazine'in karışımı kullanılır. Her ikisi de rat ve fare gibi küçük memeli hayvanlarda iyi tolere edilir (57).

Elektrofizyolojik ABR eşikleri işitme kaybının derecesini belirlemede yüksek hassasiyete sahip olmasından ve sedatiflerden ve anestezik ajanlardan etkilenmemesinden dolayı daha sık kullanılmaktadır (34).

Ketamin/xylazine genellikle vct ağırlığının 1/15'i oranında kullanılır ve intramusküler solüsyon şeklinde verilir ve genellikle birkaç dakika sonra etki eder ve tam iyileşme birkaç saat sonra olur (34).

Kemirgenler ve memeliler arasında ABR açısından gözle görünür farklılıklar bildirilmiştir. Farelerde II. dalganın posterior ventral koklear nükleustan kaynaklandığı, III. dalganın anterior ventral koklear nucleus ve trapezoid body'den, IV. dalganın superior olivary kompleks, V. dalganın lateral lemniscus ve inferior collikulustan kaynaklandığı ileri srlmştir. Ratlarda ise IV. dalganın lateral lemnisküs ve inferior collikulus, V. dalganın medial geniculat body ve/veya talamokortikal yayılımdan oluştuğu ileri srlmştir (54).

İşitsel beyinsapı nükleusunda radyofrekans lezyonları kullanılarak ratlarda yapılan bir çalışmada, dalga IV ve V'teki değişikliklerle ilgili olarak lateral lemniskste değişiklikler gösterilmiştir, inferior collikulustaki lezyonlar ABR dalgalarını önemli oranda etkilememiştir (54).

İnsanlarda I, III ve V. dalgalar daha belirgindir ve çoğu zaman ABR parametrelerinin ölçümünde kullanılır. III. ve V. dalgalar daha büyüktür ve bu yüzden çoğu zaman işitme eşiklerinin belirlenmesinde kullanılır. Aksine ratlarda II. dalga daha büyük, III. dalga küçüktür; V. dalga ise ABR parametrelerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmamaktadır (54).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Çalışmamız Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Doktora Programı tezi olarak yapılmıştır. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni ile; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi'nde, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin maddi desteği ile yapılmıştır. Etik Kurul Karar tarihi: 19.06.2015 Sayı:2015/143 Etik kurul başlık değişikliği tarihi: 23.11.2017 Sayı:2017/255

3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Gruplar

Çalışmada 32 adet Sprague Dawley dişi rat kullanılmıştır. Ratların ağırlıkları ortalama 200-240gr'dır ve yaşları ortalama 4 aydır. Ratlar 12'şer saat karanlık ve aydınlık ortamda, sıcaklığı $21^{\circ}\text{C} \pm -1$ olan, serbest yemek ve su alabildikleri, 50dB SPL'in altında arka plan gürültü seviyesi olan bir ortamda barındırılmıştır. Hayvanlar Ulusal Laboratuvar Hayvanlarını Koruma ve Kullanma Yönetmeliğine uygun şekilde kullanılmıştır.

Tüm ratların kulak muayeneleri KBB hekimi tarafından yapılmıştır. Muayenede dış kulak yolunda buşon ve otit görüntüsü bulunan hayvanlar çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm ratların dış kulak yolu ve kulak zarları normal görünümündedir.

Çalışmada kullanılan ratlar 8'erli şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Tablo 3.1.'de çalışmaya dahil edilen gruplar ve uygulanan işlemler gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya dahil edilen gruplar.

GRUP	UYGULANAN İŞLEM	SAYI
Grup 1 (Gürültü)	8 saat 100dB SPL geniş bant gürültü	8
Grup 2 (Gürültü+Metformin)	8 saat 100dB SPL geniş bant gürültü+Metformin	8
Grup 3 (Metformin)	Metformin	8
Grup 4 (Kontrol)	Herhangi bir işlem uygulanmadı	8

Çalışmanın başlangıcında tüm ratlara DPOAE ve ABR ölçümleri yapılmıştır. DPOAE ve ABR ölçümlerinden önce tüm ratlara intraperitoneal ketamin hydrochloride (40mg/kg) ve xylazine (5mg/kg) kullanılarak anestezi uygulanmıştır.

Bazal ölçümler tamamlandıktan sonra Grup 1 ve Grup 2'deki ratlar 8 saat süre ile 100dB SPL geniş bant gürültüye maruz bırakılmıştır. Gürültü sessiz kabin içinde karşılıklı olarak yerleştirilmiş iki adet hoparlör aracılığı ile verilmiştir. Hayvanlar hoparlörlerin ortasına gelecek şekilde kafes içinde konumlandırılmıştır. Grup 1 ve Grup 2'deki ratlara gürültüye maruziyetten sonra 1, 7 ve 14. günlerde, Grup 3 ve Grup 4'teki ratlara ise 7. ve 14. günlerde DPOAE ve ABR ölçümleri tekrarlanmıştır.

Grup 2 ve Grup 3'teki ratlara gürültüye maruziyet sonrası 1. günden başlanarak 14 gün boyunca 70 mg/kg/gün Metformin oral gavaj ile verilmiştir.

3.2. Elektrofizyolojik Testler

3.2.1. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon

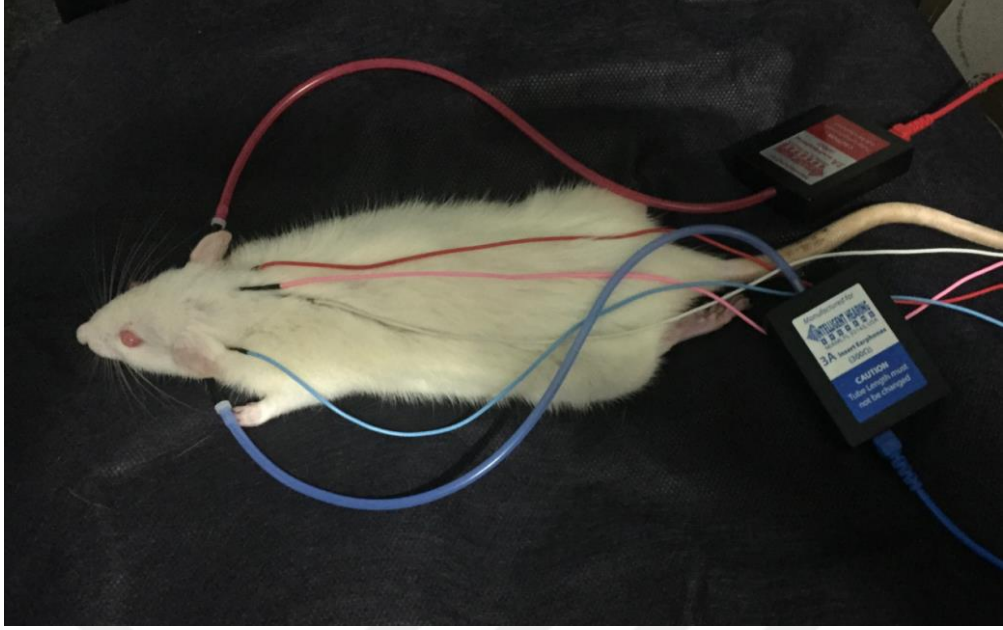
DPOAE ölçümlerinde Intelligent Hearing System (IHS) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler sessiz kabinde yapılmış ve ölçüm sırasında ratların kulağına uygun olan probe seçilmiştir. Ölçüm sırasında $f2/f1$ oranı 1.2 seçilmiş, şiddet seviyesi ise $L2=L1-10$ olarak belirlenmiştir ($L2=55\text{dB}$, $L1=65\text{dB}$). Ölçüm sırasında $2f1-f2$ frekansında sinyal gürültü oranı (SNR) 6dB ve üzerinde olan DPOAE'ler pozitif olarak kabul edilmiştir. DPOAE ölçümü 2834, 4002, 5636, 7988, 11.288, 15.991, 22.608Hz frekanslarında yapılmıştır. DPOAE sonuçlarının değerlendirilmesinde SNR oranı dikkate alınmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmaya dahil edilen hayvanlara OAE testinin uygulanması.

3.2.2. İşitsel Beyinsapı Cevabı

ABR ölçümlerinde Intelligent Hearing System (IHS) cihazı ile subkutan iğne elektrotlar kullanılmıştır. Pasif elektrot vertekse, aktif elektrot mastoid cilt altına ve toprak elektrot alına yerleştirilmiştir. Ölçümler sessiz kabinde yapılmış ve ölçüm sırasında ratların kulağına uygun olan yenidoğan probu kullanılmıştır. Ölçümler click uyaran ile ve 8 kHz, 16 khz, 20 kHz ve 32 kHz'te toneburst uyaran kullanılarak yapılmıştır. Ölçümlerde alternate polarite kullanılmıştır. Averajlamada 400 sweep, filtrelemede 30-3000 Hz filtreleme kullanılmıştır. Uyaran rate'i 37.1/sec olarak ayarlanmıştır. Ölçüm sırasında ipsilateral kayıt alınmıştır. Click ve 8 kHz tone burst uyaran için ER 3 insert earphone, 16 kHz, 20 kHz ve 32 kHz tone burst uyaran için ise *high frequency transducers* kullanılmıştır. Uyaran 80dB SPL düzeyinde verilmeye başlanmıştır ve 20dB'lik basamaklar halinde II. dalganın görüldüğü en düşük seviyeye kadar inilerek eşik taraması yapılmıştır. ABR eşiği II. dalganın görüldüğü minimum şiddet seviyesi olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.2. Çalışmaya dahil edilen hayvanlara ABR testinin uygulanması.



Şekil 3.3. Çalışmaya dahil edilen hayvanlara yüksek frekans ABR testinin uygulanması.

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. DNA Hasarı İncelemesi

14. gün elektrofizyolojik ölçümlerin sonunda tüm ratlardan intrakardiyak 5ml kan örnekleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümünden bir Uzman Biyolog ve bir KBB hekimi tarafından alınmıştır. Alınan kan örnekleri 2-4 ° C altında heparinize tüplerde saklanmıştır. Bir ml histopaque – 1077 üzerine 1ml taze heparinize kan yavaşça konulup 2100 rpm ve 25°C’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml tuzlu fosfat tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 170 rpm ve 25°C’de 10 dakika santrifüj edilmiş, üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu (pH=7.4) ile 106 mononükleer lökosit/µl olacak şekilde dilüe edilmiştir. Boyama işlemi yapıldıktan sonra 20 büyütmeli floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 20nm) DNA görüntüsü değerlendirilmiştir.

3.3.2. Oksidatif Stres Parametreleri

3.3.2.1. Total Antioksidan Status

Total antioksidan status (TAS) ölçümü için reaktif 1 (75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 AM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O çözülerek hazırlanır) ve reaktif 2 (7.5 mM hidrojen peroksit, 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır) hazırlanmıştır. 50µl alınan örnek üzerine 100µl reaktif 1 ve 150µl reaktif 2 eklenerek 10dk boyunca 37°C’de inkübe edilmiş ve daha sonra 412nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.3.2.2. Total Oksidan Status

Total oksidan status (TOS) ölçümü için reaktif A (140 mM’lık NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır, ana solüsyonda önce %10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total hacimde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlanır) ve reaktif B (ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihidroklorid çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif

hazırlanır) hazırlanmıştır. Örneklerden 100'er µl alınıp üzerlerine sırasıyla, 150 µl reaktif A ve 150 µl reaktif B eklenmiş ve 1 dakika 37 °C'de bekletildikten sonra spektrofotometrik olarak 240 nm'de okunmuştur. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılmış ve sonuçlar µmol.Trolox.ekivalent/L olarak ifade edilmiştir. Tüm spektrofotometrik ölçümler için Abbott ARCHITECT i2000 SR otoanalizörü kullanılmıştır.

3.3.2.3. Oksidatif Stres İndeksi

TAS'ın birimi µmol.Trolox.ekivalent/L'ye çevrilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır.

$$\text{Oksidatif stres indeksi (OSI)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{ekivalent/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol.Trolox.ekivalent/L})} \times 100$$

3.3.3. Western Blot

Western blot analizi için dokular homojenize edilmiş ve 14000g'de 15 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra supernatantlar toplanmış ve kullanılacak zamana kadar -20°C'de saklanmıştır. Bütün örneklerin protein miktarı Bradford yöntemi ile ölçülmüş ve 10xSDS tamponu ile protein miktarları eşit hale getirilmiştir. Protein miktarları eşitlenen örnekler daha sonra yükleme tamponu ile birlikte 95°C'de 5 dakika boyunca kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Her kuyucukta 80µg olacak şekilde örnekler %12'lik SDS-Poliakrilamid jele yüklenmiştir. Jel, 20 dakika 80 V'da daha sonra 100 dakika 120 V'da olacak şekilde elektroforez yapılmıştır. Elektroforez işleminden sonra jelde yürütülen örnekler IBlot (Invitrogen, USA) cihazı ile PVDF membrana aktarılmıştır. Membran, TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl 0.05% Tween 20) ile %5'lik olarak hazırlanan yağsız süt tozu kullanılarak, 1 saat boyunca oda ısısında çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra membran 3 kere 5'er dakika boyunca TBS ile yıkanmıştır.

Her bir antikor için bu işlemler aynı şekilde yapılmıştır. Çalışmamızda HSF 1, Cox-2 ve β Actin antikorları (1:1000 oranında dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) kullanılmıştır. 24 saat sonra her bir membran

tekrar TBS-T ile 3 kere 5'er dakika boyunca yıkanmış, TBS-T ile yıkanan membranlar, HRP konjuge edilmiş sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Membranlar, kemilüminesans görüntüleme için Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) solüsyonunda 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Görüntüleme işlemi Vilber Laurmat Fx5 Fusion (Vilber Laurmat XA, USA) görüntüleme sistemi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen görüntülerin optik dansitide analizi için Image J (Glyko, Novato, CA, USA) yazılımı kullanılmıştır.

3.3.4. ELISA (Enzym Linked Immuno Assay) çalışması

Serumda IL-6, IL-1 β ve TNF- α seviyesini ölçmek için ticari olarak satılan ELISA kitlerinden (Assay Designs, Ann Arbor, MI) yararlanılmıştır. ELISA çalışması için deneklerin kanları, sakrifiye edilirken serumu ayırmak için kullanılan biyokimya analiz tüplerine alınmıştır. Daha sonra 3.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Serumu ayrılan tüpler ELISA kitinden çıkan protokole göre çalışılmıştır.

3.4. Histolojik İnceleme

Deney gruplarından alınan koklea dokuları %10'luk nötral tamponlu formalin (NBF) içerisinde 72 saat fikse edilmiştir. Dokular Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonu içerisinde (100ml 0.1 M fosfat tamponu içerisinde) 2 günde bir değiştirilerek, +4°C 'de 1 ay süresince, kontrollü olarak dekalsifiye edilmişlerdir. Daha sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiş, ksilen ile şeffaflaştırılmıştır. Bu işlemi takiben 60°C'lik parafinde 1 gece bekletilmiş ve parafin içine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan lam üzerine 5 μ m kalınlığında kesitler alınmıştır. Mikroskopik inceleme için Hematoksilen & Eosin bileşik boyama yöntemi ile boyanmış, boyanan kesitler ışık mikroskobu (Nikon, Eclipse i5, Japonya) ile incelenmiştir.

3.4.1. İmmünohistokimyasal Boyama

Alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletilmiş, deparafinize etmek amacıyla ksilende 3x5 dakika tutulmuştur. Saf alkol ve %96'luk alkolde 10 dakika bekletildikten sonra metanol ile hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika bekletilerek endojen enzim blokajı yapılmıştır. Önce musluk suyu sonra distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı için sitrat tamponda 10 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakılmıştır. Oda ısısında soğutulan kesitler PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletilmiştir. Tavşan poliklonal anti-Caspase-3 (1:100, Abcam, Cat:13847) birincil antikorda 1 gece boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Birincil antikor sonrası streptavidin-peroksidaz yöntemi kullanılarak DAB kromojenik işaretleme yapılmıştır. Bu metot için Histostain®-Plus 3rd Gen IHC Deteksiyon Kiti (Cat: 85-9073, Invitrogen, CA, USA) kullanılmıştır. Zıt boyama için 1dk Hematoksilen ile nükleuslar boyanarak yıkama sonrası entellan ile kapama yapılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için, *Statistical Package for the Social Sciences 13.0* versiyon paketi (SPSS Inc, Chicago, Illinois, ABD) windows programında kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm nicel değişkenler, merkezi konum (ortalama ve medyan gibi) ve dağılım ölçüleri (standart sapma (SD) gibi) kullanılarak hesaplanmıştır. Dağılımın normal olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testleri kullanılarak kontrol edilmiştir.

Grupların kendi içindeki DPOAE ve ABR değerlerini karşılaştırmada tekrarlanmış ölçümlerde ANOVA kullanılmıştır ($p < 0.05$ anlamlı kabul edildi). Post-hoc analiz için Tukey HSD testi kullanılmış, Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ($p < 0.008$ anlamlı kabul edildi).

Gruplararası biyokimyasal ve histopatolojik verilerin karşılaştırılmasında ANOVA kullanılmıştır ($p < 0.05$ anlamlı kabul edildi). Post-hoc analiz için Tukey HSD testi kullanılmış, Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır ($p < 0.008$ anlamlı kabul edildi).

4. BULGULAR

Elektrofizyolojik bulgular değerlendirilirken sağ ve sol kulağa ait cevapların ortalamaları alınmıştır. Çalışmayı oluşturan gruplara ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

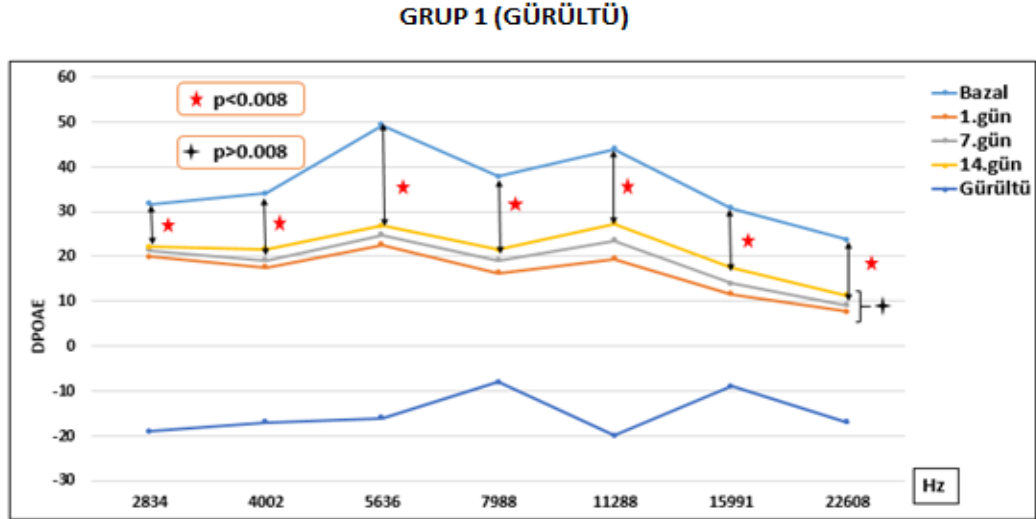
4.1. Elektrofizyolojik Bulgular

4.1.1. DPOAE Bulguları

Sadece gürültü verilen Grup 1'e ait bazal, 1, 7 ve 14. güne ait DPOAE değerleri Tablo 4.1.'de, DPOAE SNR değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Gürültü sonrasında elde edilen DPOAE SNR değerleri ile bazal DPOAE SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.008$).

Tablo 4.1. Grup 1'e ait DPOAE SNR değerleri.

DPOAE	Bazal (dB SPL)	1. gün (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
2834	31.68±6.16	19.93±5.14	21.28±9.06	22.14±5.14
4002	34.06±6.16	17.62±4.97	19.14±6.09	21.57±5.72
5636	49.25±7.9	22.56±7.27	24.85±8.75	26.78±9.47
7988	37.87±5.42	16.32±1.99	19.07±11.7	21.42±6.27
11288	43.87±4.64	19.5±8.87	23.57±9.84	27.35±10.6
15991	30.75±4.06	11.62±7.6	13.92±8.61	17.57±8.36
22608	23.75±5.89	7.75±5.55	9.14±4.52	11.35±7.62



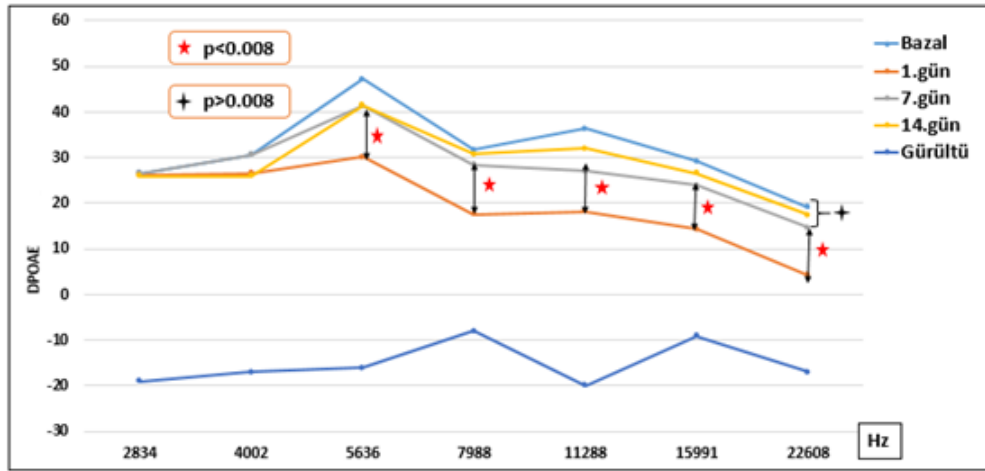
Şekil 4.1. Grup 1'e ait DPOAE SNR bulguları.

Gürültü + Metformin verilen Grup 2'ye ait bazal, 1, 7 ve 14. güne ait DPOAE değerleri Tablo 4.2.'de, DPOAE amplitüdündeki değişimler ise Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Gürültü + Metformin uygulaması sonrası 1. gün elde edilen DPOAE SNR değerleri ile bazal DPOAE SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.008$). 1. gün elde edilen DPOAE değerleri ile 7. gün elde edilen DPOAE SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. 7. ve 14. gün elde edilen DPOAE SNR değerleri ile bazal değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).

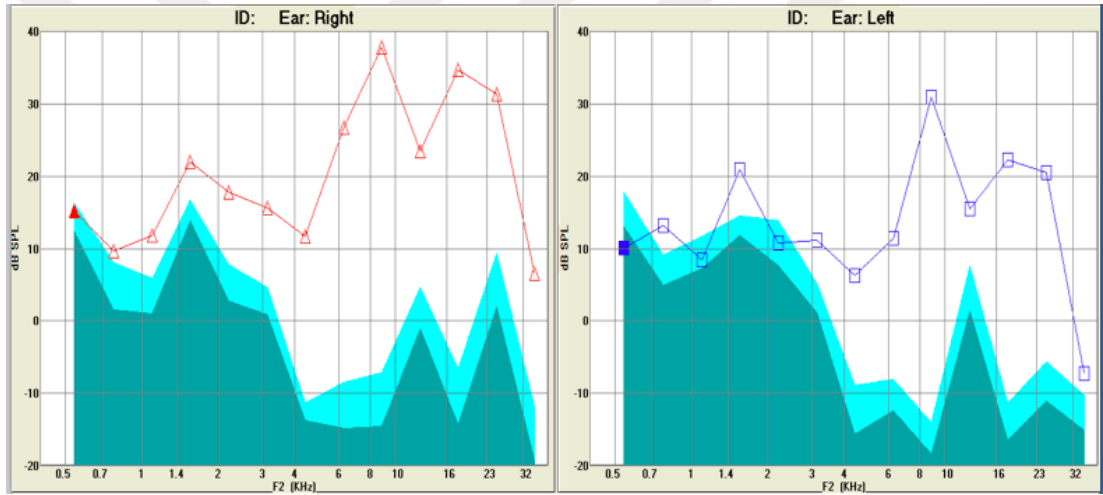
Tablo 4.2. Grup 2'ye ait DPOAE SNR değerleri.

DPOAE	Bazal (dB SPL)	1. gün (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
2834	26.5±6.25	26.2±6.39	26.64±5.37	26±9.95
4002	30.56±6.98	26.5±6.2	30.64±3.81	26±12.16
5636	47.25±6.76	30.18±8.78	41.28±9.9	41.4±9.8
7988	31.75±4.75	17.62±3.48	28.42±7.73	30.8±9.07
11288	36.37±5.35	18.25±12.11	27±13.8	32±9.61
15991	29.25±6.6	14.25±3.78	23.92±7.47	26.6±7.76
22608	19.06±6.58	4.31±7.07	14.64±6.45	17.5±8.29

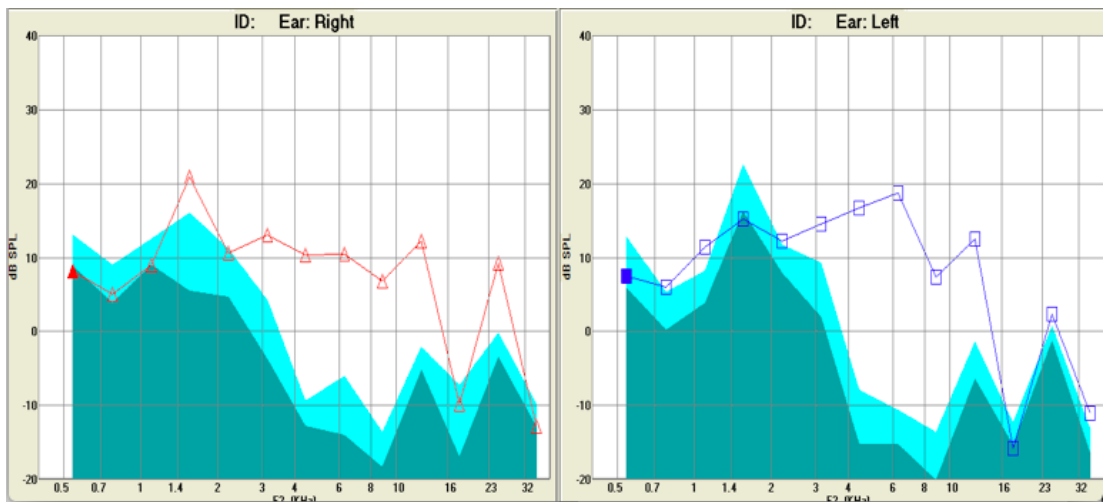
GRUP 2 (GÜRÜLTÜ+METFORMİN)



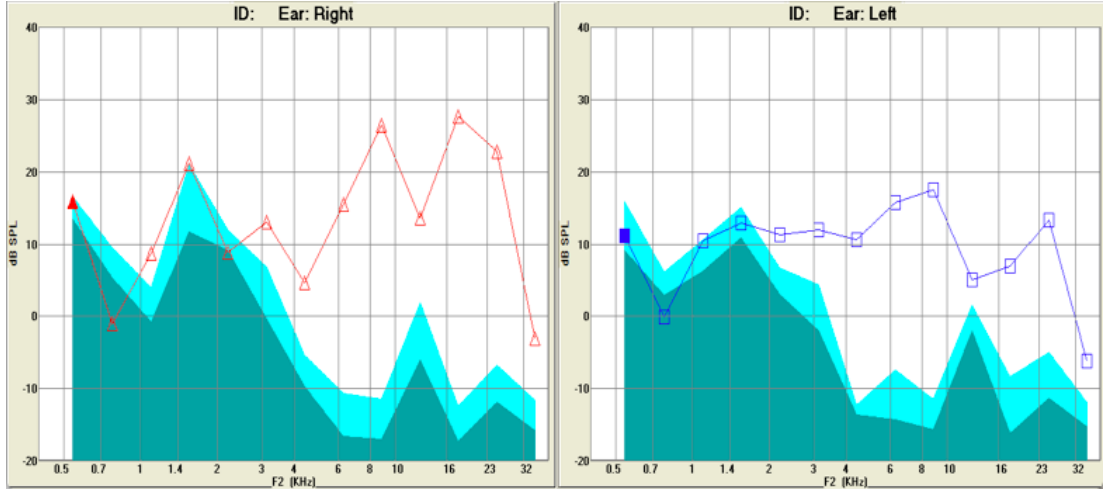
Şekil 4.2. Grup 2'ye ait DPOAE SNR bulguları.



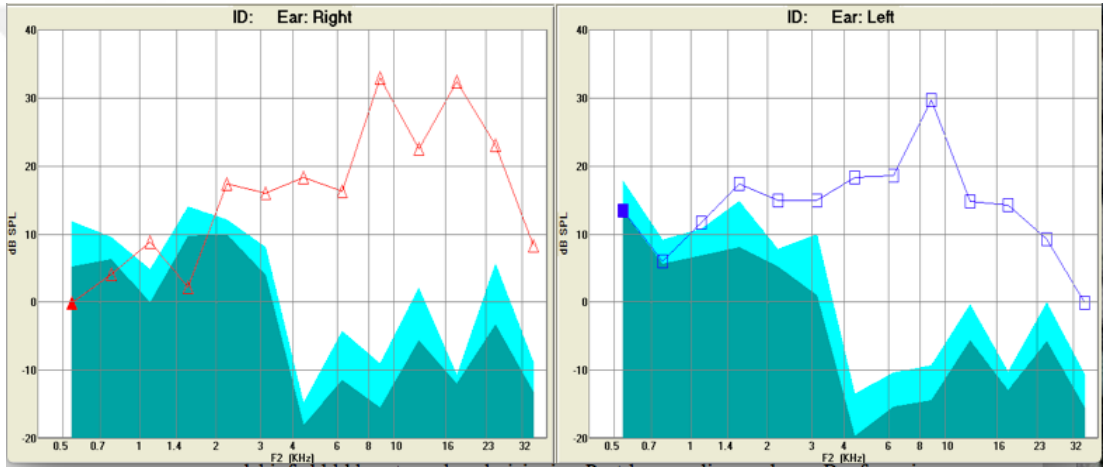
Şekil 4.3. Grup 2'ye ait bazal DPOAE örneği.



Şekil 4.4. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1. gün DPOAE örneği.



Şekil 4.5. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7. gün DPOAE örneği.



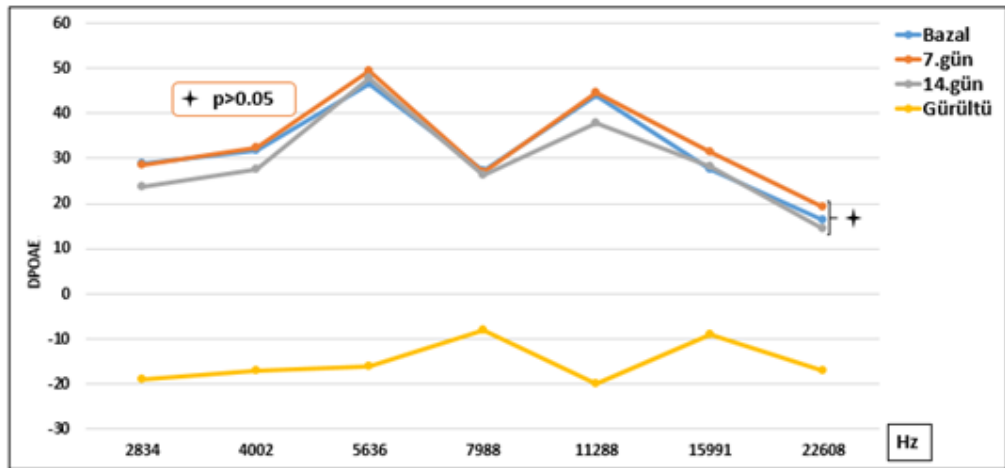
Şekil 4.6. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14. Gün DPOAE örneği.

Sadece Metformin verilen Grup 3'e ait bazal, 7. ve 14. günlere ait DPOAE SNR değerleri Tablo 4.3.'te, DPOAE SNR değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Metformin uygulaması sonrası 7. ve 14. gün elde edilen DPOAE SNR değerleri ile bazal DPOAE SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.3. Grup 3'e ait DPOAE SNR değerleri.

DPOAE	Bazal (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
2834	28.87±2.24	28.42±2.24	23.85±7.19
4002	31.62±6.69	32.28±6.69	27.5±6.06
5636	46.62±3.79	49.35±3.79	47.92±3.83
7988	27.31±4.97	26.85±4.97	26.35±4.86
11288	43.93±5.76	44.57±5.76	37.85±7.11
15991	27.68±4.7	31.35±4.77	28.21±6.54
22608	16.43±10.37	19.14±10.37	14.35±6.02

GRUP 3 (METFORMİN)

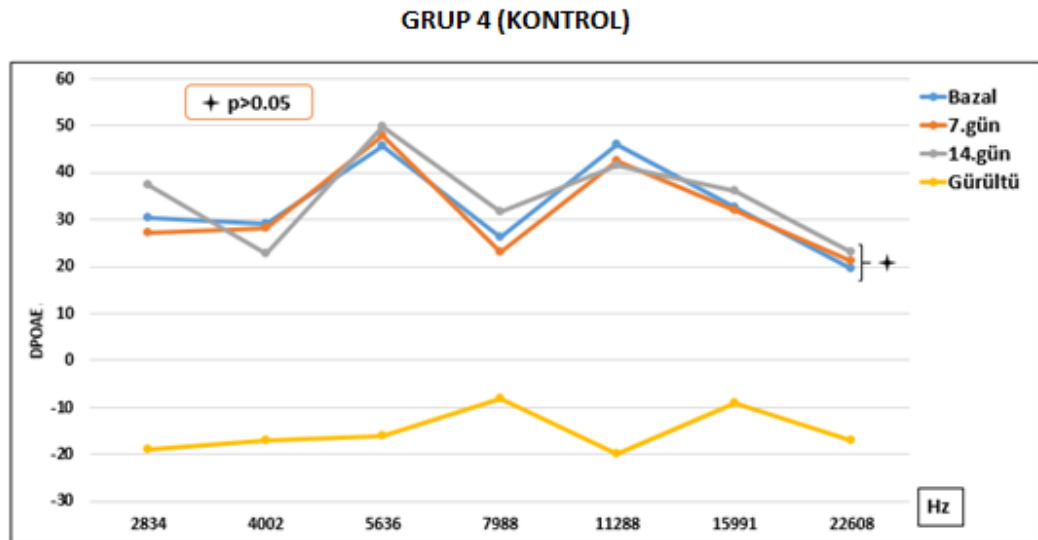


Şekil 4.7. Grup 3'e ait DPOAE SNR bulguları.

Grup 4 (Kontrol Grubu)'e ait bazal, 7. ve 14. günlere ait DPOAE SNR değerleri Tablo 4.4.'te DPOAE SNR değerlerindeki değişimler ise Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda 7. ve 14. gün elde edilen DPOAE SNR değerleri ile bazal DPOAE SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.4. Grup 4'e ait DPOAE SNR değerleri.

DPOAE	Bazal (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
2834	30.43�4.64	27.1�3.92	37.4�4.37
4002	29.18�6.06	28.1�6.48	22.6�6.55
5636	45.75�3.1	47.9�4.45	49.7�4.29
7988	26.06�5.39	23.1�5.27	31.6�5.16
11288	45.93�3.73	42.3�3.33	41.6�4.26
15991	32.43�3.5	32�4.05	36.2�4.38
22608	19.5�3.93	21�2.94	22.9�4.05



Şekil 4.8. Grup 4'e ait DPOAE SNR bulguları.

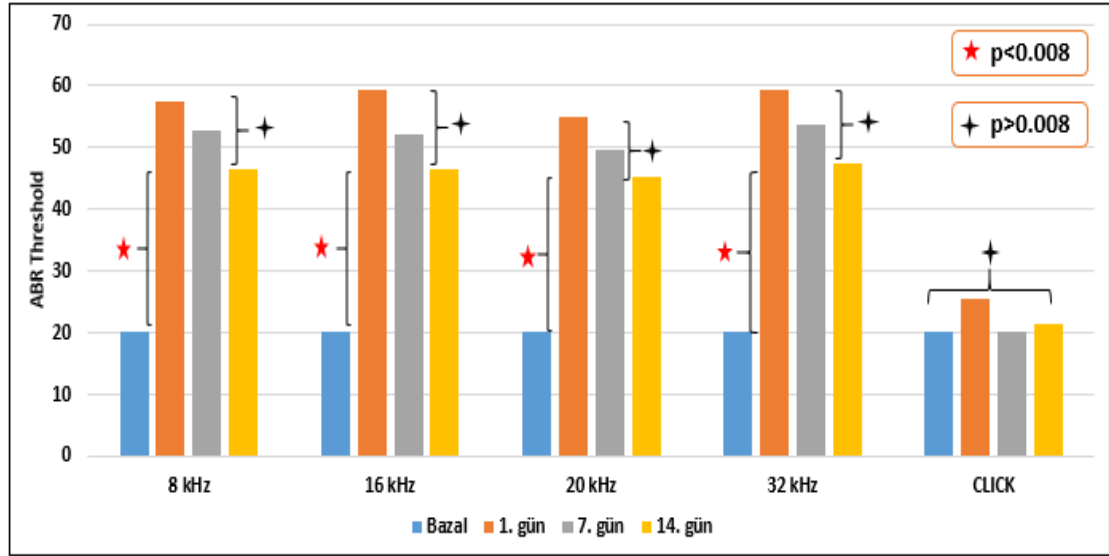
4.1.2. ABR Bulguları

Sadece gürültü verilen Grup 1'e ait bazal, 1, 7 ve 14. güne ait ABR e ik değerleri Tablo 4.5.'te, ABR e ik bulgularının karşılaştırması ise  ekil 4.9.'da gösterilmiştir. 8, 16, 20 ve 32 kHz'te gürültü sonrası elde edilen ABR eşikleri ile bazal ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.008$). Click uyararı ile yapılan değerlendirmede bazal ABR eşikleri ile 1, 7 ve

14. günde elde edilen ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,008$).

Tablo 4.5. Grup 1'e ait ABR eşik değerleri.

ABR	Bazal (dB SPL)	1. gün (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
8 kHz	20±2.14	57.5±7.74	52.71±12.06	46.42±6.33
16 kHz	20±2.5	59.37±4.42	52±8.77	46.42±10.08
20 kHz	20±1.09	55±10.32	49.57±12.15	45.28±12.83
32 kHz	20±2.88	59.37±4.42	53.85±13.25	47.42±9.28
Click	20±2.12	25.6±8.92	20±4.56	21.42±5.34

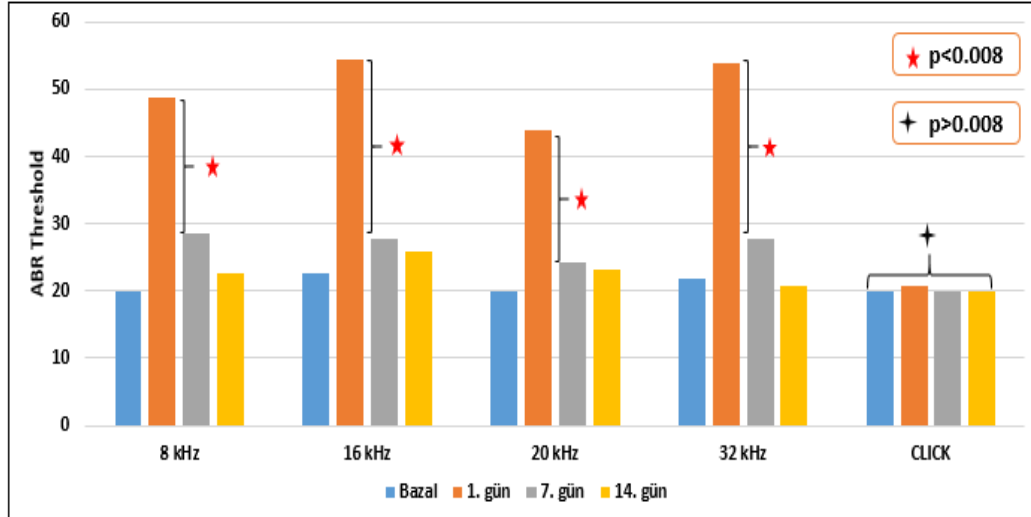


Şekil 4.9. Grup 1'e ait ABR eşik bulguları.

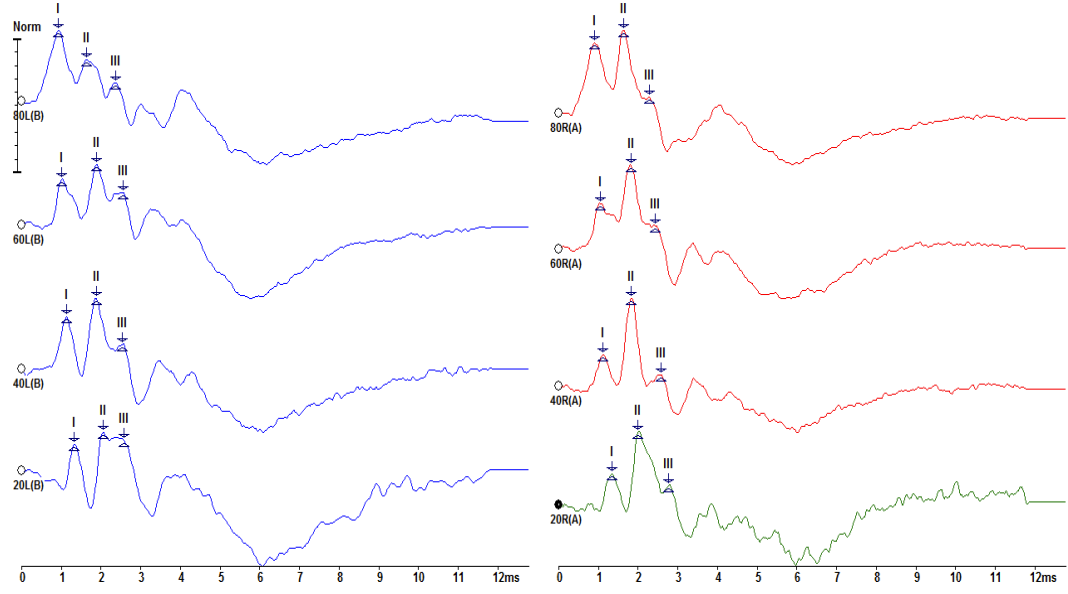
Gürültü+Metformin verilen Grup 2'ye ait bazal, 1, 7 ve 14. güne ait ABR eşik değerleri Tablo 4.6.'da, ABR eşik bulgularının karşılaştırması ise Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Gürültü + Metformin uygulaması sonrası 8, 16, 20 ve 32kHz'te 1. gün elde edilen ABR eşikleri ile bazal ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,008$). Click uyararı ile yapılan değerlendirmede bazal ABR eşikleri ile 1, 7 ve 14. günlerde yapılan ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,008$). 8, 16, 20 ve 32 kHz'te 7. ve 14. gün elde edilen ABR eşikleri ile 1. gün elde edilen ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,008$).

Tablo 4.6. Grup 2'ye ait ABR eşik değerleri.

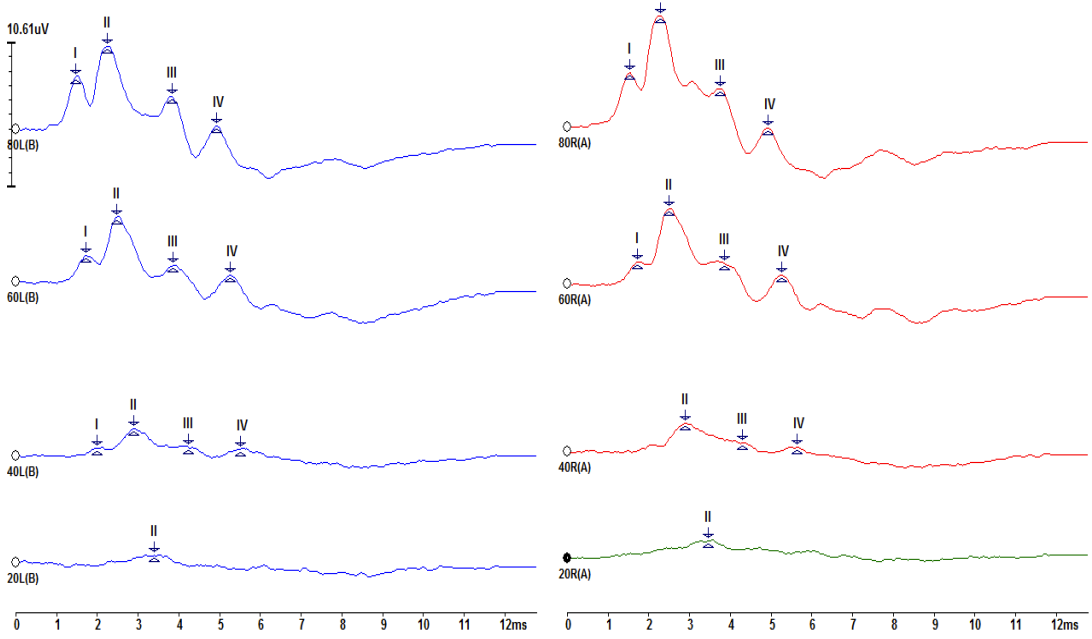
ABR	Bazal (dB SPL)	1. gün (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
8 kHz	20±2.51	48.75±9.57	28.5±10.99	22.5±4.52
16 kHz	22.5±4.47	54.37±7.27	27.8±8.92	25.8±6.68
20 kHz	20±2.58	43.75±8.06	24.2±8.51	23.3±6.51
32 kHz	21.87±4.03	53.75±7.18	27.8±11.88	20.8±2.88
Click	20±5.91	20.62±2.53	20±4.24	20±2.5



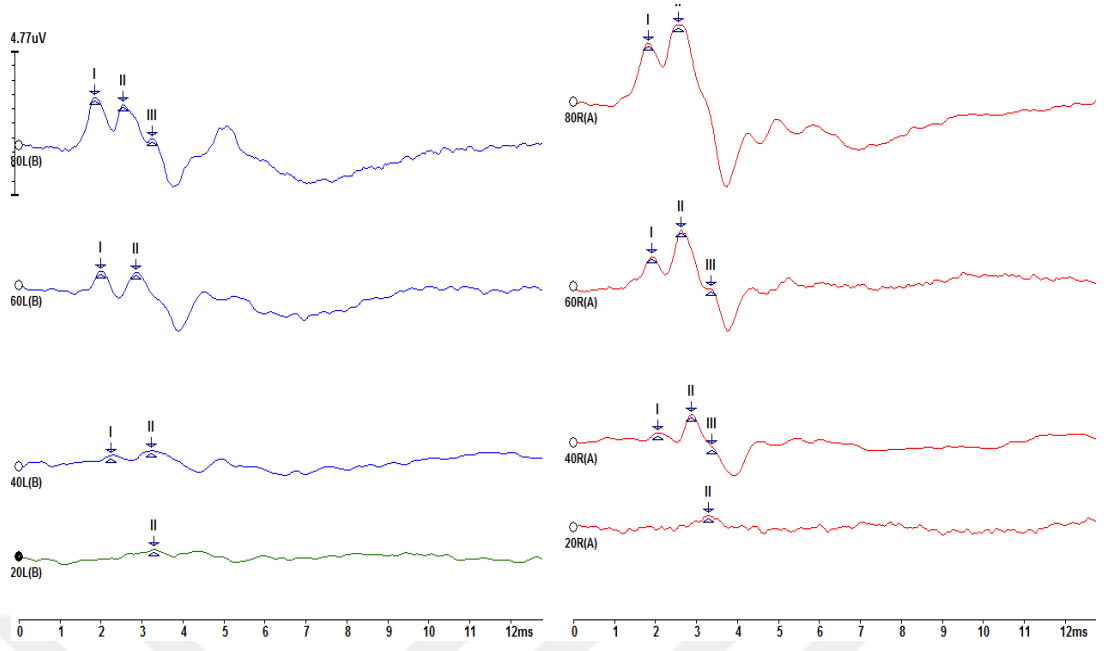
Şekil 4.10. Grup 2'ye ait ABR eşik bulguları.



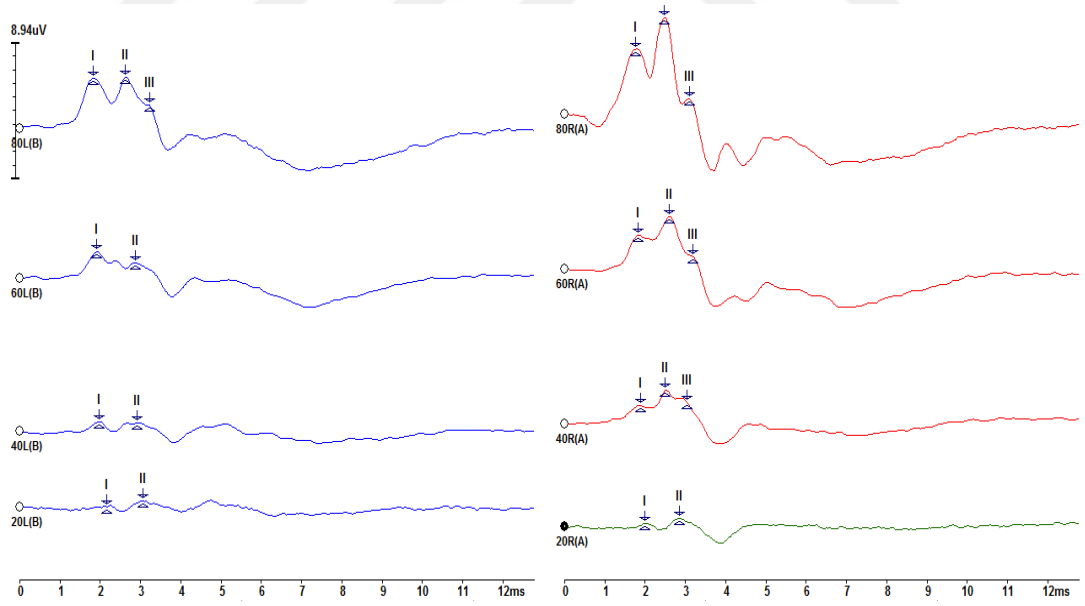
Şekil 4.11. Grup 2'ye ait click ABR bazal ölçüm örneği.



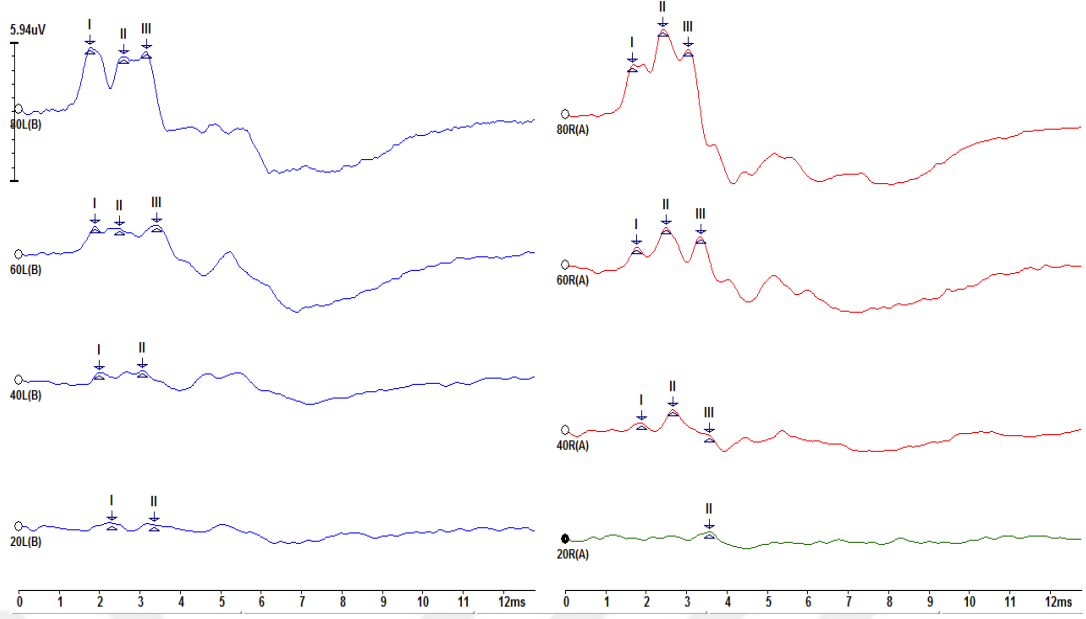
Şekil 4.12. Grup 2'ye ait 8 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.



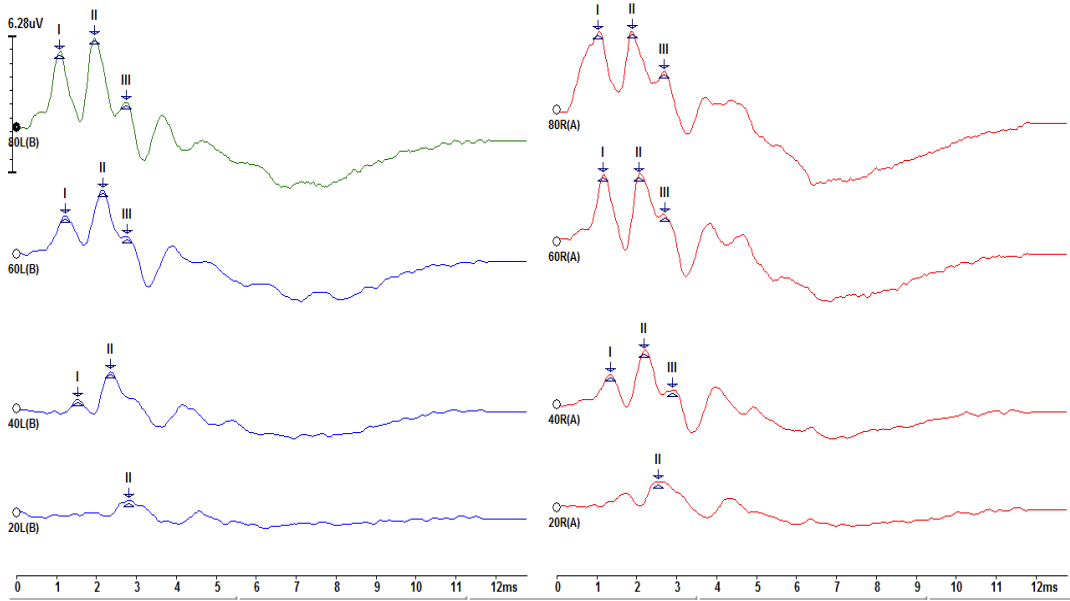
Şekil 4.13. Grup 2'ye ait 16 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.



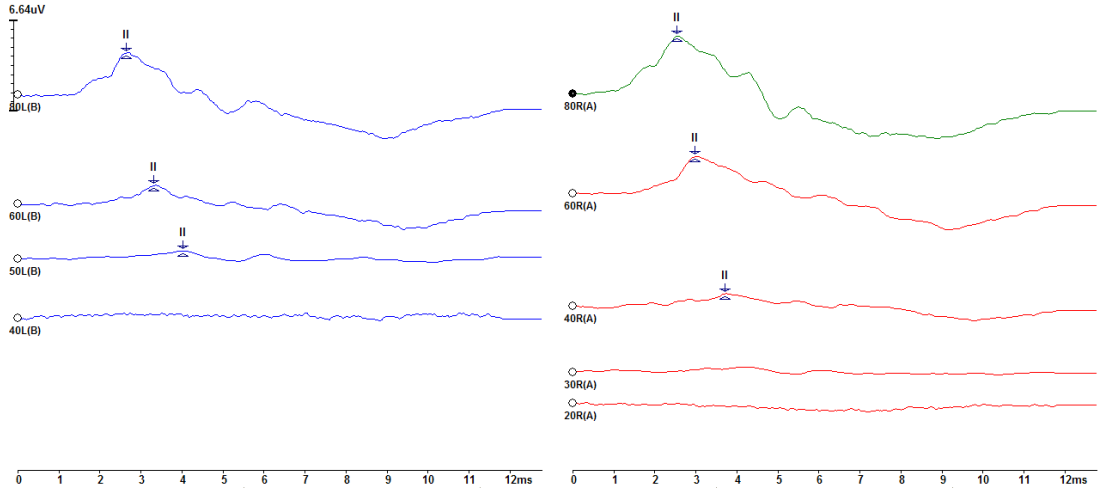
Şekil 4.14. Grup 2'ye ait 20 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.



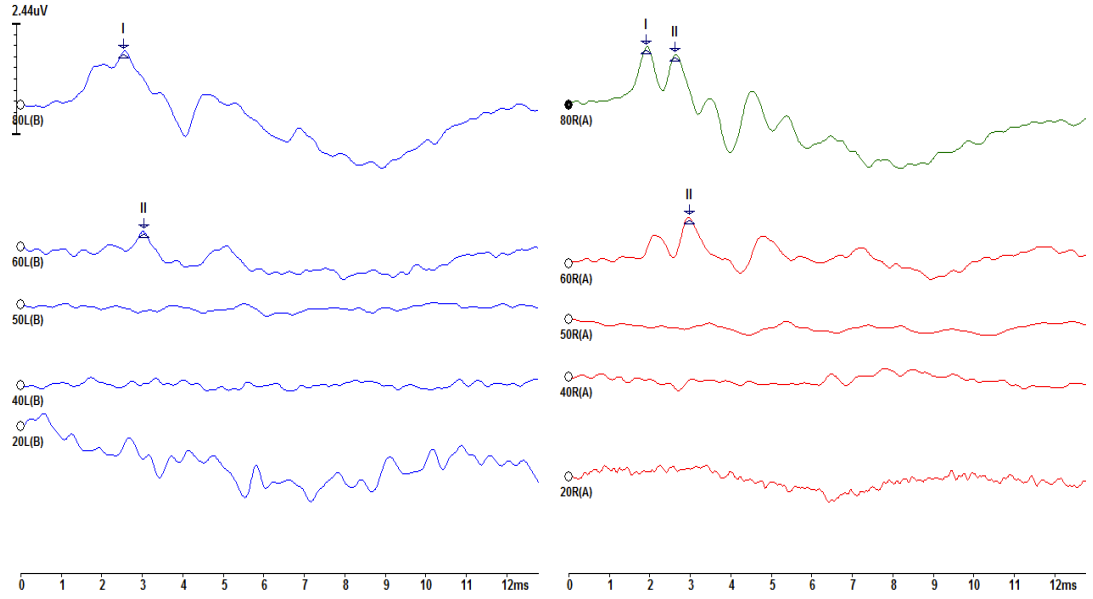
Şekil 4.15. Grup 2'ye ait 32 kHz tone burst ABR bazal ölçüm örneği.



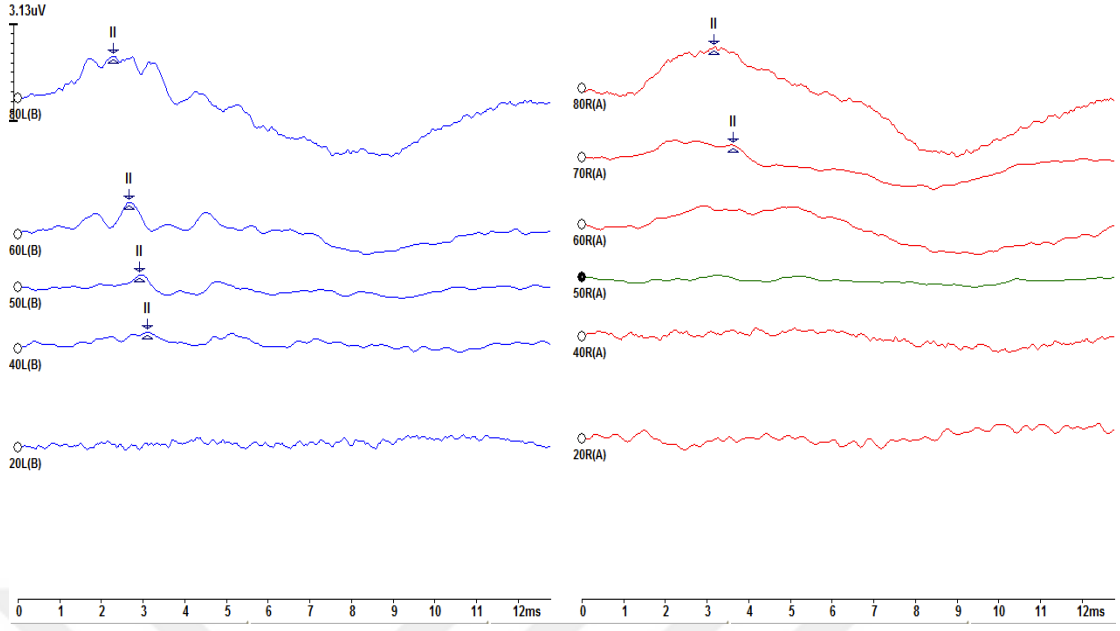
Şekil 4.16. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün click ABR örneği.



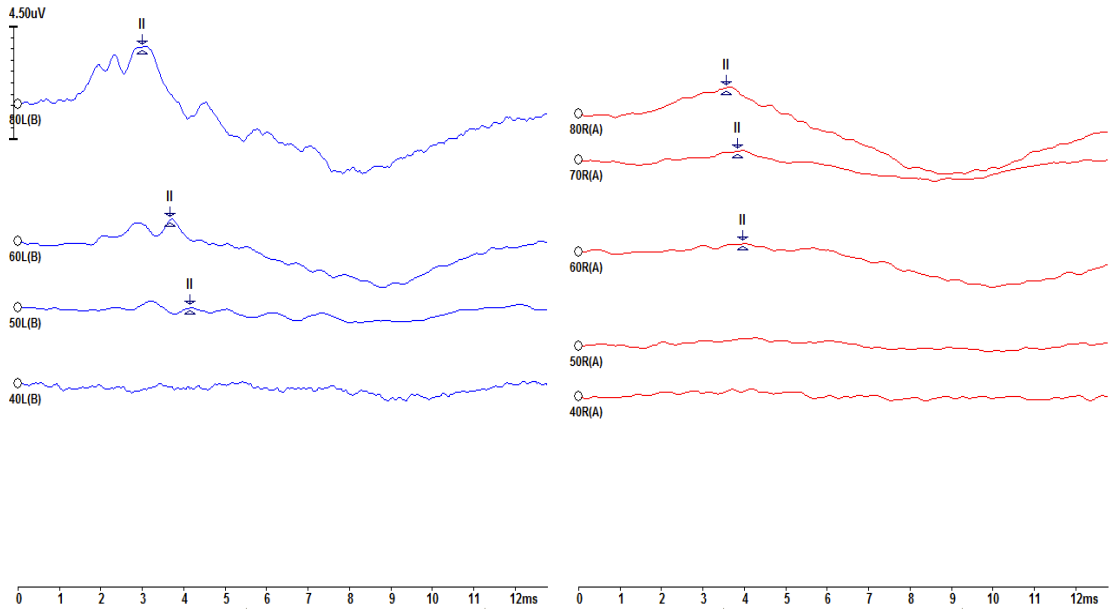
Şekil 4.17. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 8 kHz tone burst ABR örneği.



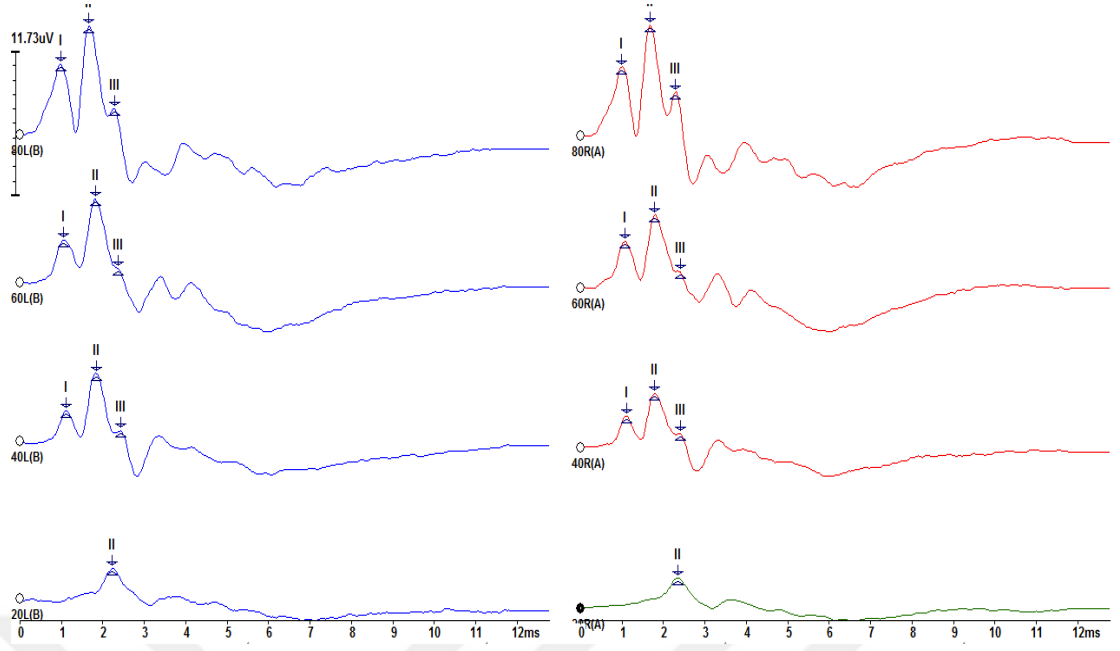
Şekil 4.18. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 16 kHz tone burst ABR örneği.



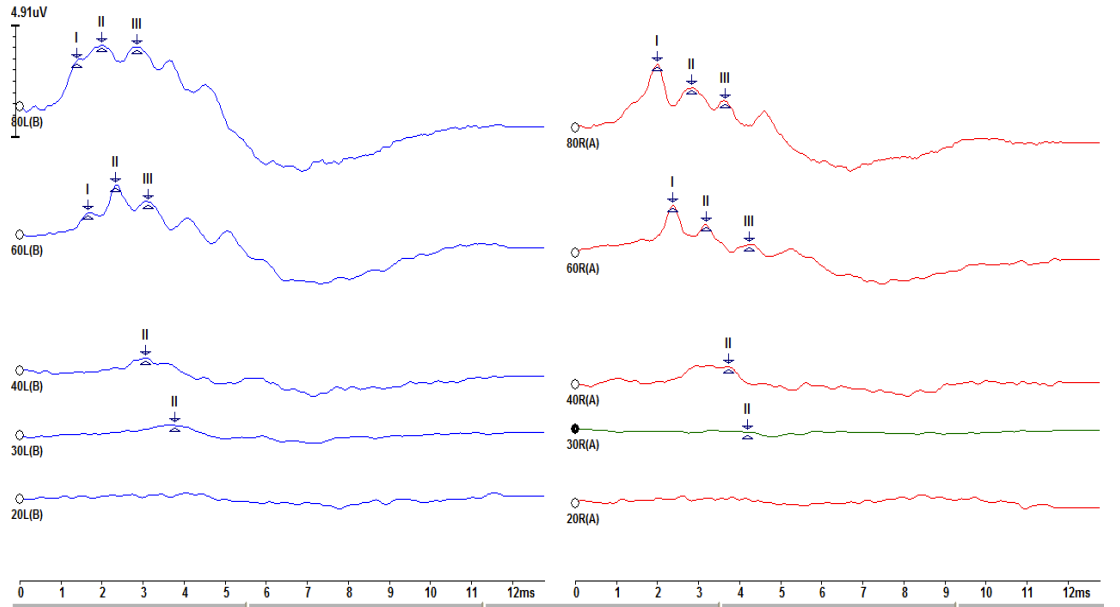
Şekil 4.19. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 20 kHz tone burst ABR örneği.



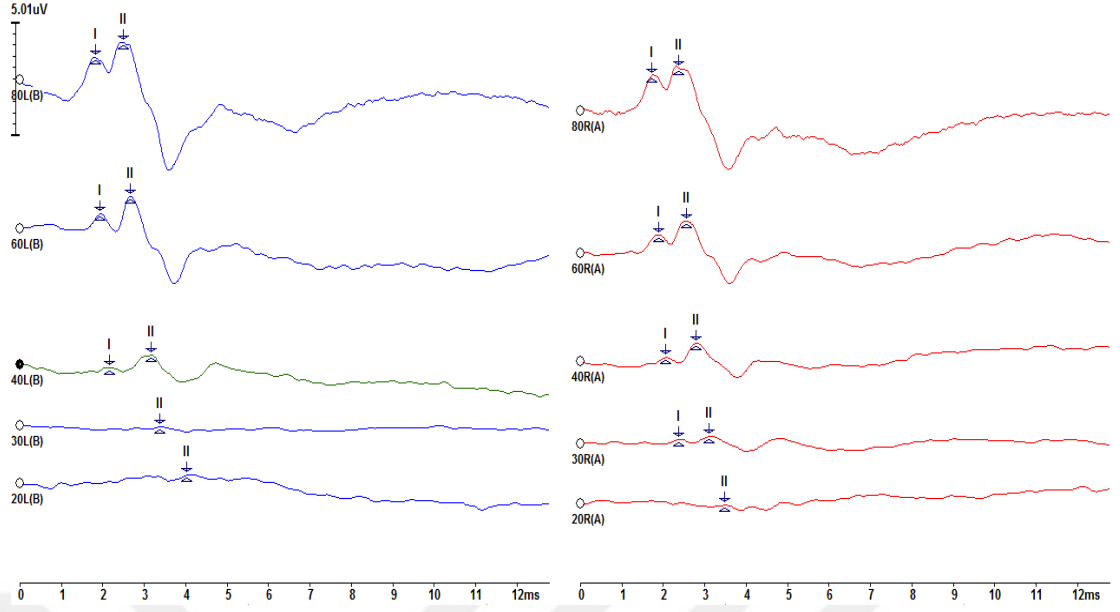
Şekil 4.20. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 1.gün 32 kHz tone burst ABR örneği.



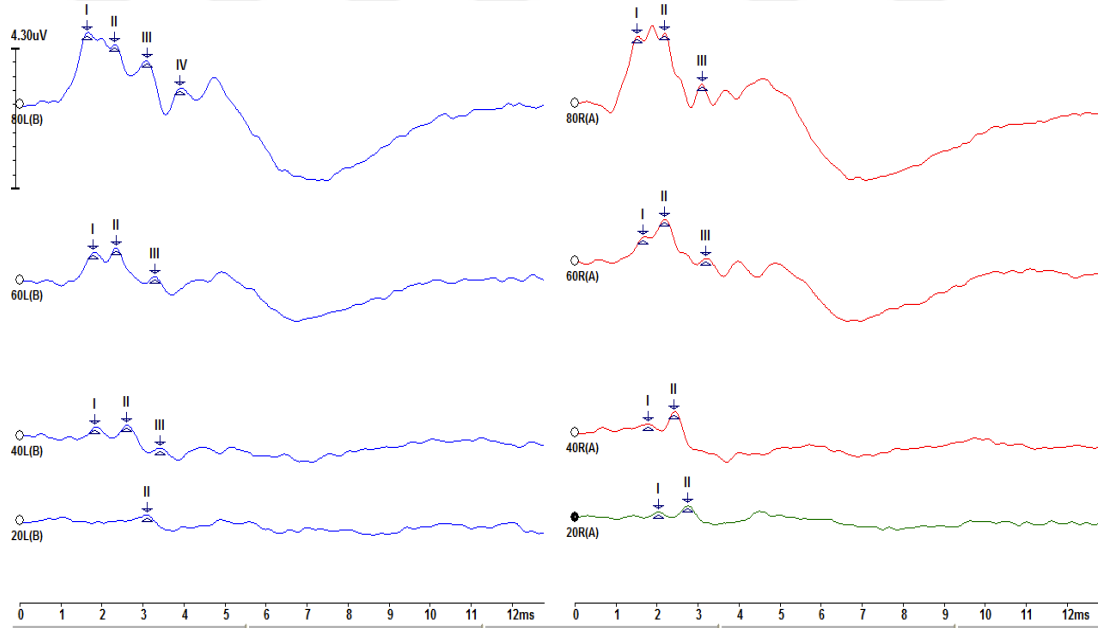
Şekil 4.21. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün click ABR örneği.



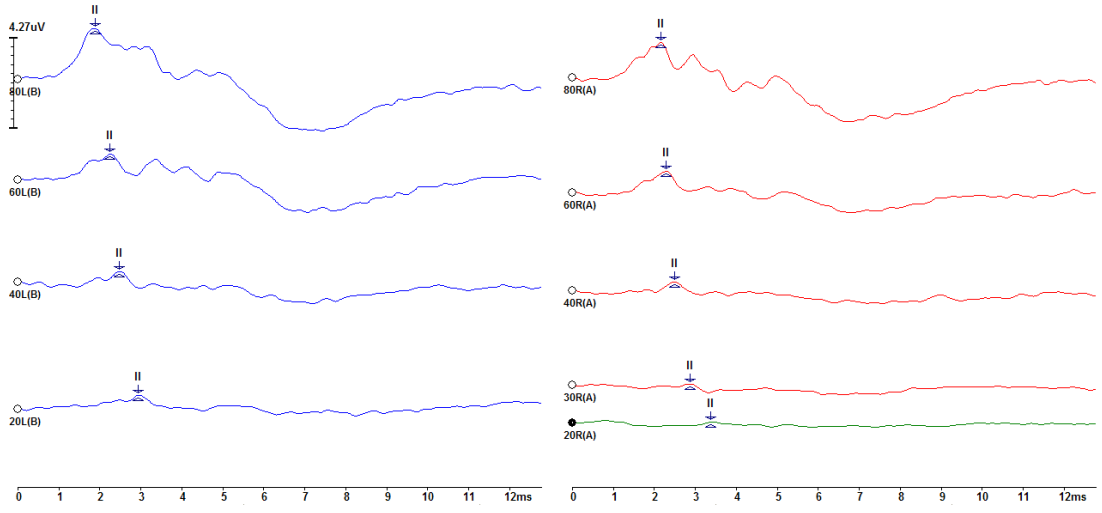
Şekil 4.22. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 8 kHz tone burst ABR örneği.



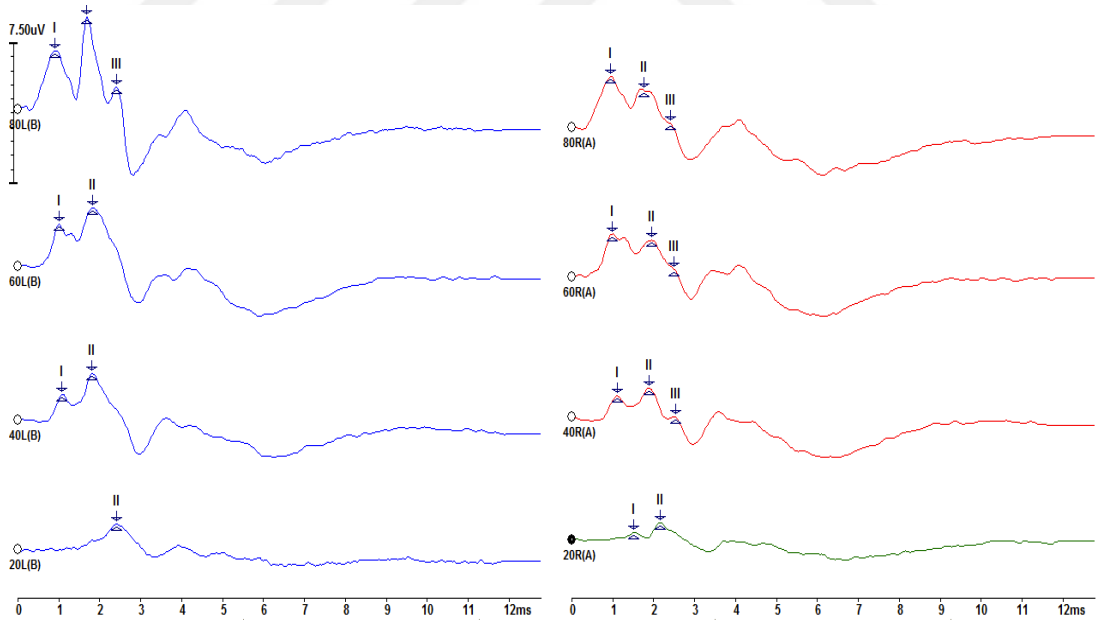
Şekil 4.23. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 16 kHz tone burst ABR örneği.



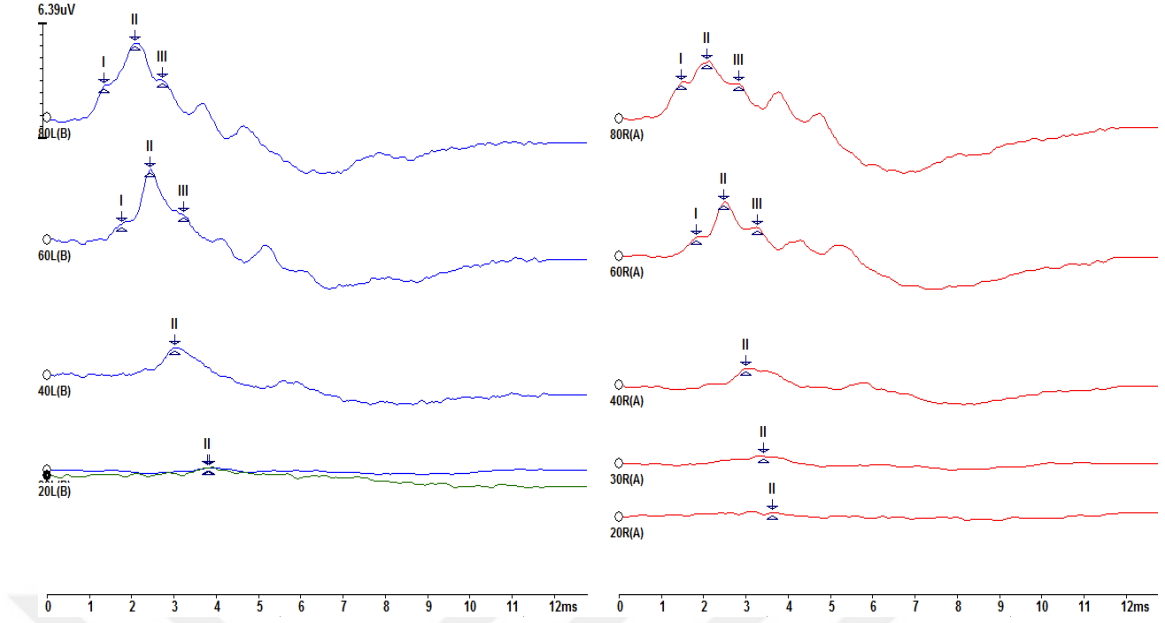
Şekil 4.24. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 20 kHz tone burst ABR örneği.



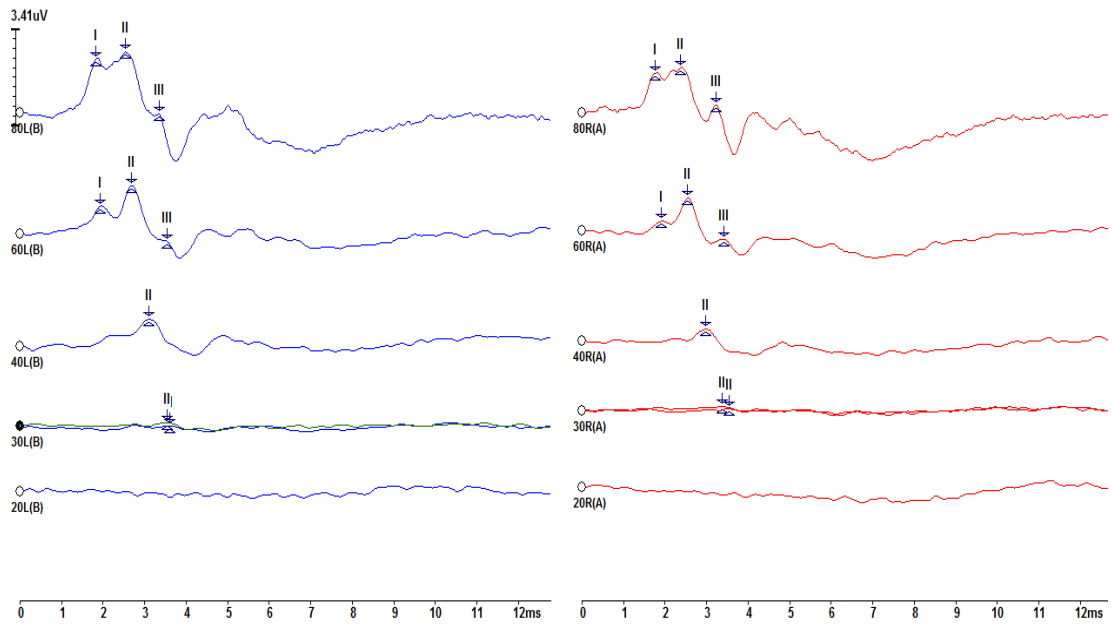
Şekil 4.25. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 7.gün 32 kHz tone burst ABR örneği.



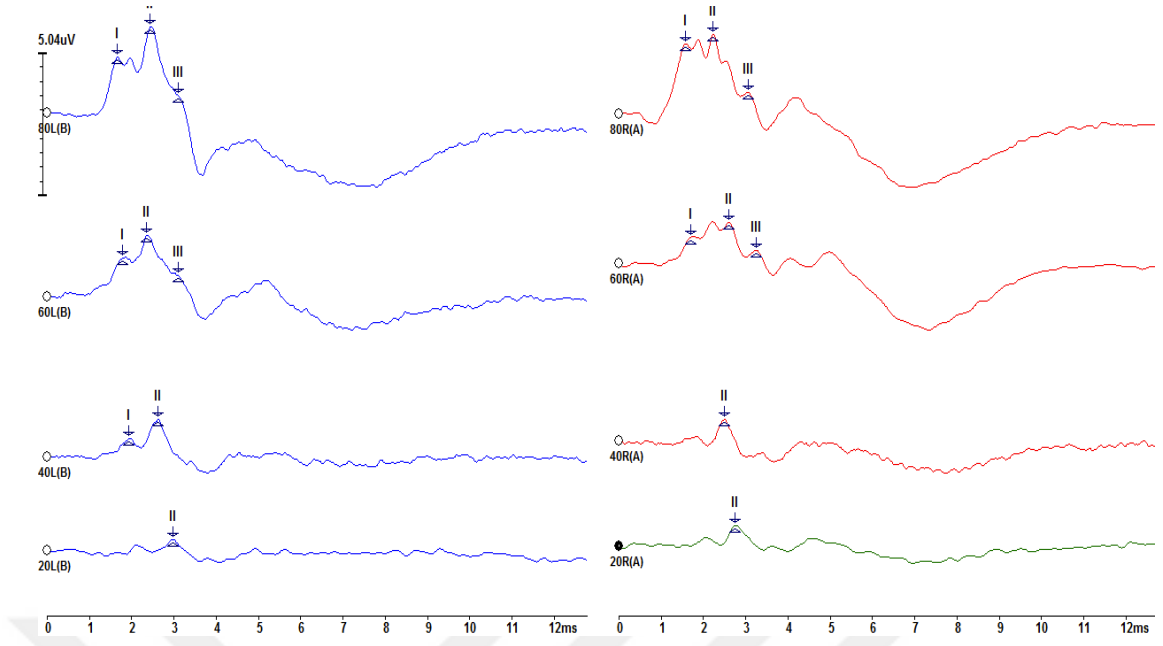
Şekil 4.26. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün click ABR örneği.



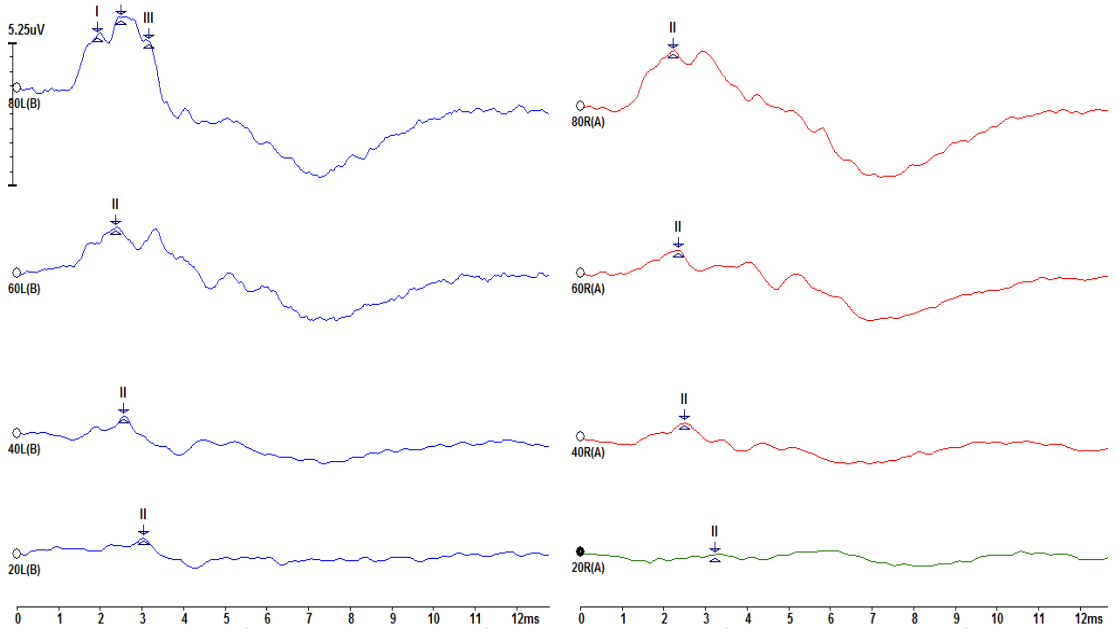
Şekil 4.27. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 8 kHz tone burst ABR örneği.



Şekil 4.28. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 16 kHz tone burst ABR örneği.



Şekil 4.29. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 20 kHz tone burst ABR örneği.

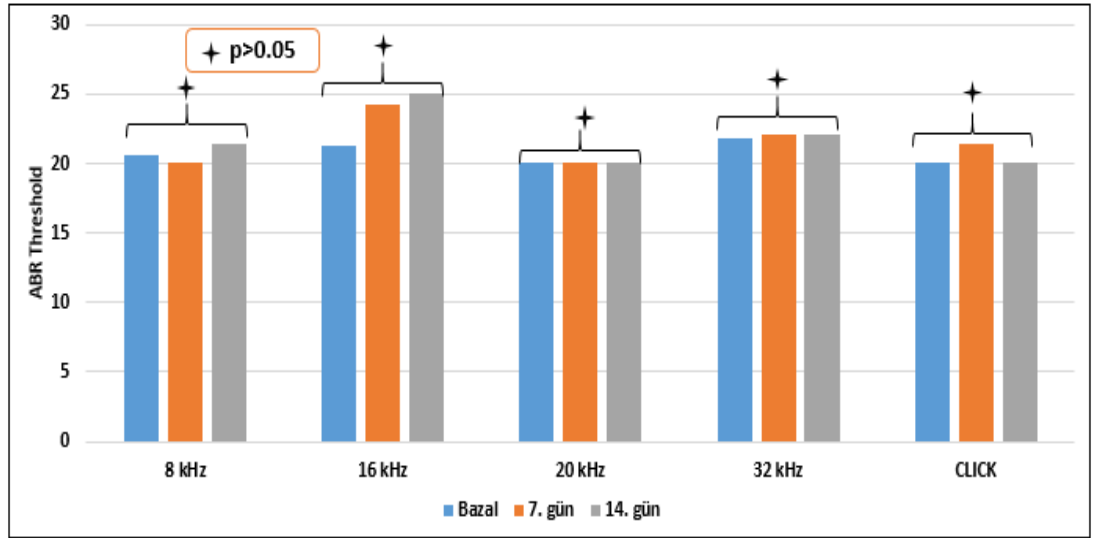


Şekil 4.30. Grup 2'ye ait gürültüye maruziyet sonrası 14.gün 32 kHz tone burst ABR örneği.

Sadece Metformin verilen Grup 3'e ait bazal, 7. ve 14. günlere ait ABR eşik değerleri Tablo 4.7.'de, ABR eşik bulgularının karşılaştırması ise Şekil 4.31.'de gösterilmiştir. 8, 16, 20 ve 32 kHz'te ve click uyararı ile yapılan değerlendirmede Metformin sonrası 7. ve 14. gün elde edilen ABR eşikleri ile bazal ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.7. Grup 3'e ait ABR eşik değerleri.

ABR	Bazal (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
8 kHz	20.62±2.5	20±2.32	21.4±3.63
16 kHz	21.25±3.41	24.28±5.13	25±5.18
20 kHz	20±4.63	20±2.67	20±4.25
32 kHz	21.87±4.03	22.14±4.25	22.14±2.91
Click	20±4.16	21.42±3.63	20±2.5

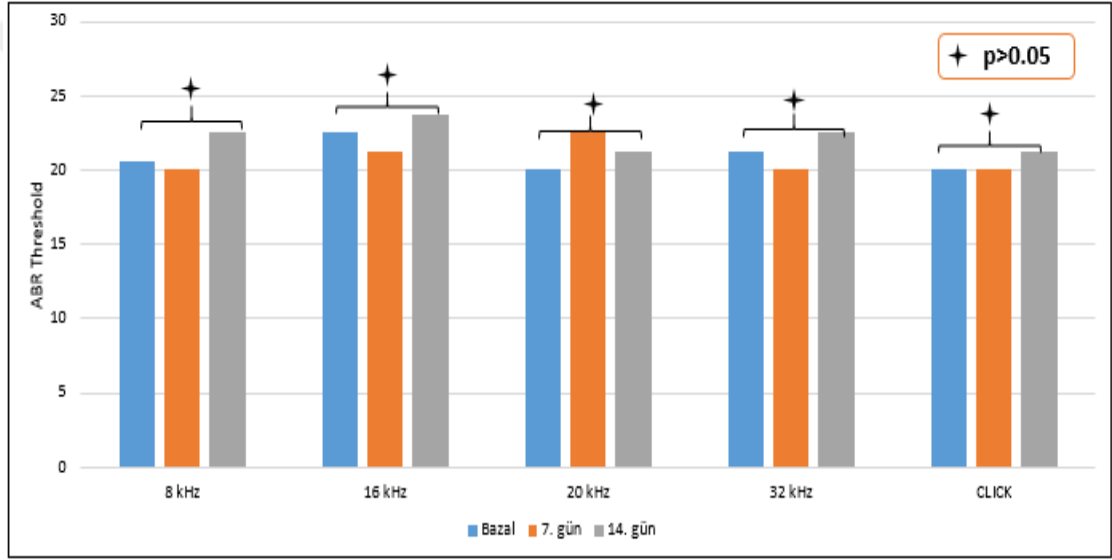


Şekil 4.31. Grup 3'e ait ABR eşik bulguları.

Grup 4 (Kontrol Grubu)'e ait bazal, 7. ve 14. günlere ait ABR eşik değerleri Tablo 4.8.'de, ABR eşik bulgularının karşılaştırması ise Şekil 4.32.'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda 8, 16, 20 ve 32 kHz'te ve click uyararı ile yapılan değerlendirmede 7. ve 14. gün elde edilen ABR eşikleri ile bazal ABR eşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.8. Grup 4'e ait ABR eşik değerleri.

ABR	Bazal (dB SPL)	7. gün (dB SPL)	14. gün (dB SPL)
8 kHz	20.62±2.5	20±1.65	22.5±3.82
16 kHz	22.5±4.47	21.25±4.68	23.75±7.5
20 kHz	20±2.92	22.5±6.32	21.25±8.15
32 kHz	21.25±3.89	20±1.89	22.5±4.85
Click	20±3.41	20±5.37	21.25±6.47



Şekil 4.32. Grup 4'e ait ABR eşik bulguları.

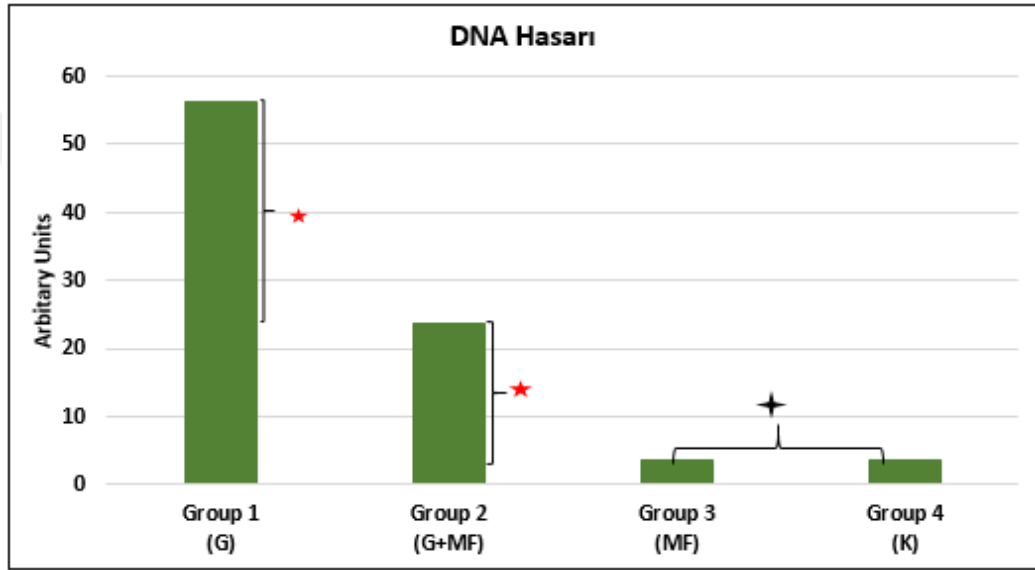
4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. DNA Hasarı Bulguları

Gruplara ait DNA hasarı değerleri Tablo 4.9.'da, DNA hasarı karşılaştırması ise Şekil 4.33.'de gösterilmiştir. $p < 0.008$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grup 1'de DNA hasarı değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.008$). Grup 2'de DNA hasarı değeri Grup 3 ve 4'ten anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.008$). Grup 3 ve 4 arasında DNA hasarı açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.008$).

Tablo 4.9. Gruplara ait DNA hasarı değerleri.

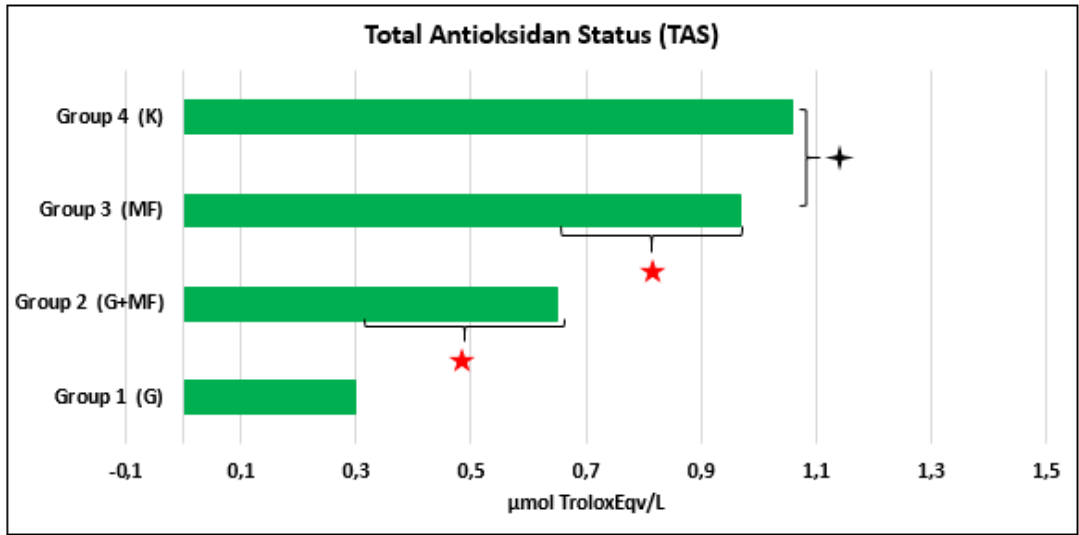
Gruplar	DNA Hasarı
Grup 1(G)	56.24±21.95
Grup 2 (G+MF)	23.64±10.34
Grup 3 (MF)	3.6±1.57
Grup 4 (K)	3.6±2.08



Şekil 4.33. Gruplar arası DNA hasarı bulguları.

4.2.2. Total Antioksidan Status

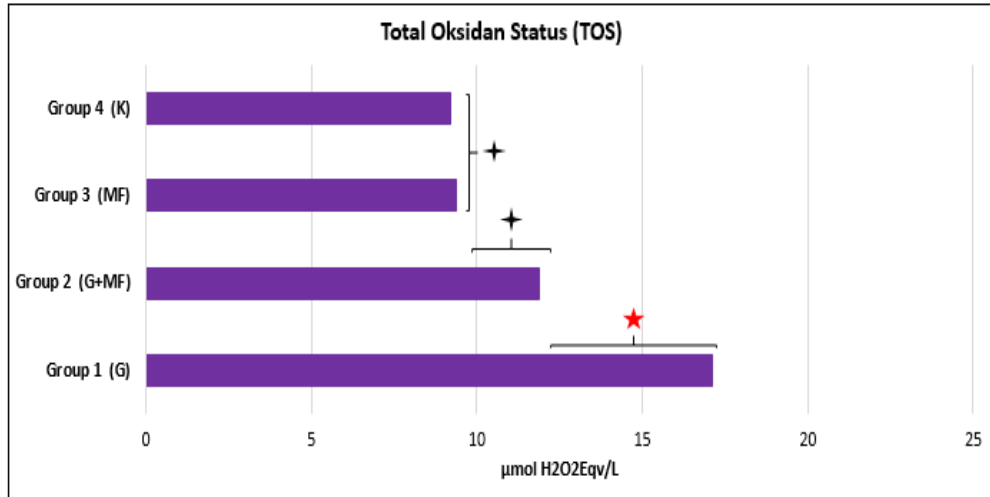
Gruplara ait TAS değerleri Tablo 4.10.'da, TAS karşılaştırması ise Şekil 4.34.'de gösterilmiştir. Grup 1'de TAS değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.008$). Grup 2'de TAS değerleri Grup 1'den anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 3'te TAS değerleri Grup 2'den anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. TAS değerleri açısından Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.008$).



Şekil 4.34. Gruplar arası TAS bulguları.

4.2.3. Total Oksidan Status

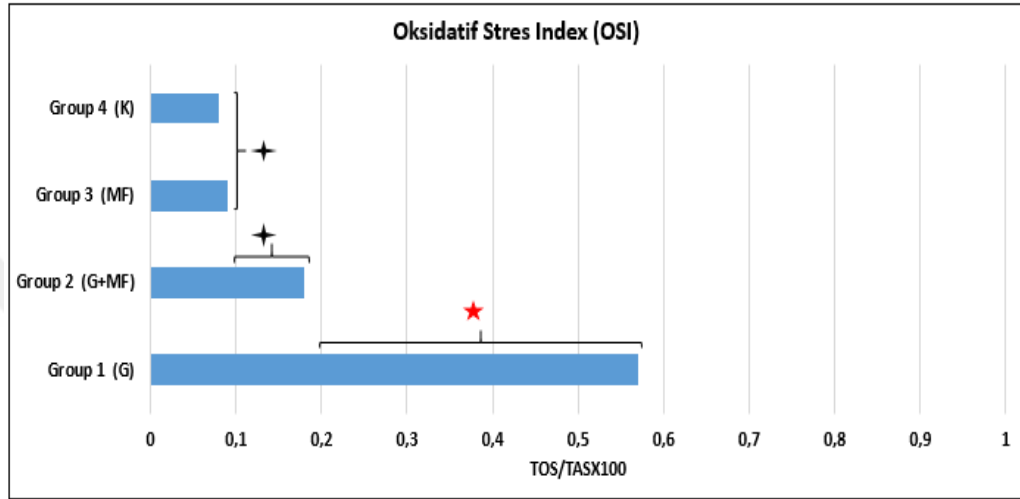
Gruplara ait TOS değerleri Tablo 4.10.'da, TOS karşılaştırması ise Şekil 4.35.'de gösterilmiştir. Grup 1'in TOS değeri diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.008$). Grup 2, 3 ve 4 arasında TOS değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0.008$).



Şekil 4.35. Gruplararası TOS bulguları.

4.2.4. Oksidatif Stres İndeksi

Gruplara ait OSI değerleri Tablo 4.10.'da, OSI karşılaştırması ise Şekil 4.36.'da gösterilmiştir. Grup 1'in OSI değeri diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2, 3 ve 4 arasında OSI değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).



Şekil 4.36. Gruplar arası OSI bulguları.

Tablo 4.10. Gruplara ait TAS, TOS ve OSI değerleri.

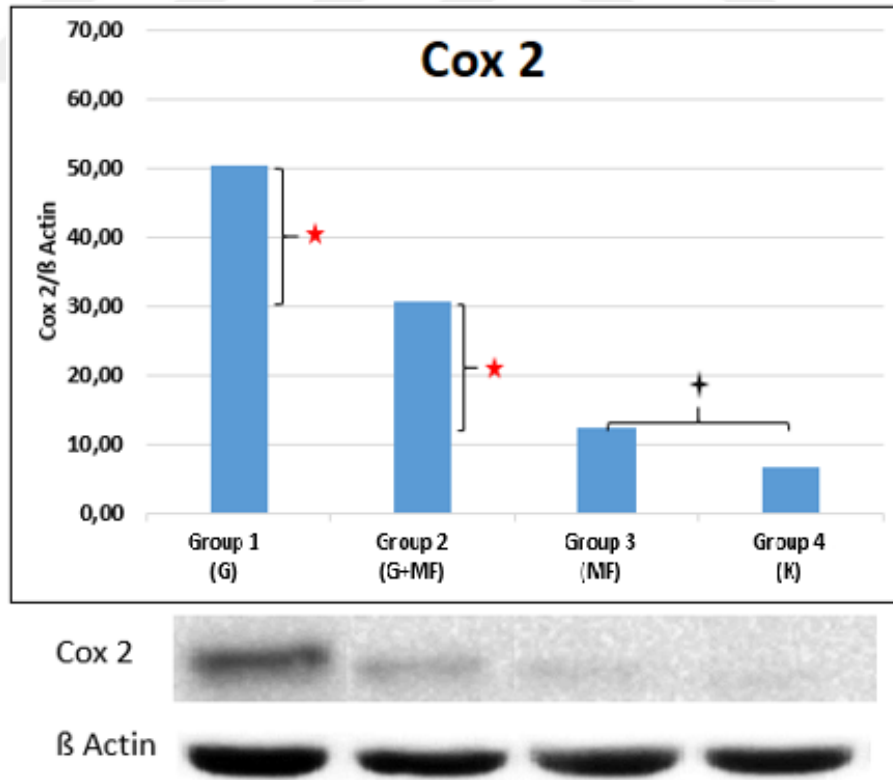
Gruplar	TAS(μmol TroloxEqv/L)	TOS($\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Eqv/L}$)	OSI (TOS/TASx100)
Grup 1 (G)	0.3±0.12	17.13±6.25	0.571±0.17
Grup 2 (G+MF)	0.65±0.28	11.9±4.23	0.18±0.02
Grup 3 (MF)	0.97±0.11	9.37±3.57	0.09±0.01
Grup 4 (K)	1.06±0.35	9.21±2.98	0.08±0.01

4.2.5. COX 2 Enzimi

Gruplara ait COX 2 değerleri Tablo 4.11.'de, COX 2 karşılaştırması ise Şekil 4.37.'de gösterilmiştir. Grup 1'in COX 2 değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2'nin COX 2 değeri Grup 3 ve 4'ten anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 3 ve 4 arasında COX 2 değeri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 4.11. Gruplara ait COX 2 değerleri.

Gruplar	COX 2
Grup 1 (G)	50.44±19.35
Grup 2 (G+MF)	30.66±14.72
Grup 3 (MF)	12.38±4.39
Grup 4 (K)	6.52±2.04



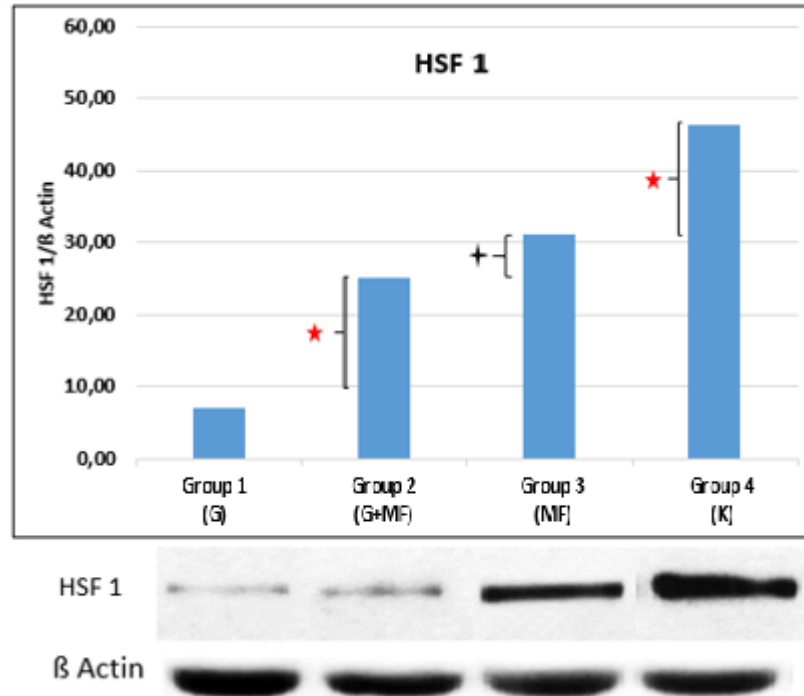
Şekil 4.37. Western Blot analizi ile gruplara ait iç kulaktaki COX 2 enzimi bulguları.

4.2.6. HSF-1 proteini

Gruplara ait HSF-1 proteini değerleri Tablo 4.12.'de, HSF-1 proteini karşılaştırması ise şekil 4.38.'de gösterilmiştir. Grup 1'in HSF-1 değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2 ve 3' n HSF-1 değerleri arasında anlamlı fark olmayıp bu değerler Grup 1'den anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 4' n HSF-1 değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$).

Tablo 4.12. Gruplara ait HSF-1 proteini değerleri.

Gruplar	HSF-1
Grup 1 (G)	7.16±4.38
Grup 2 (G+MF)	25.22±10.03
Grup 3 (MF)	31.26±11.36
Grup 4 (K)	46.26±14.72



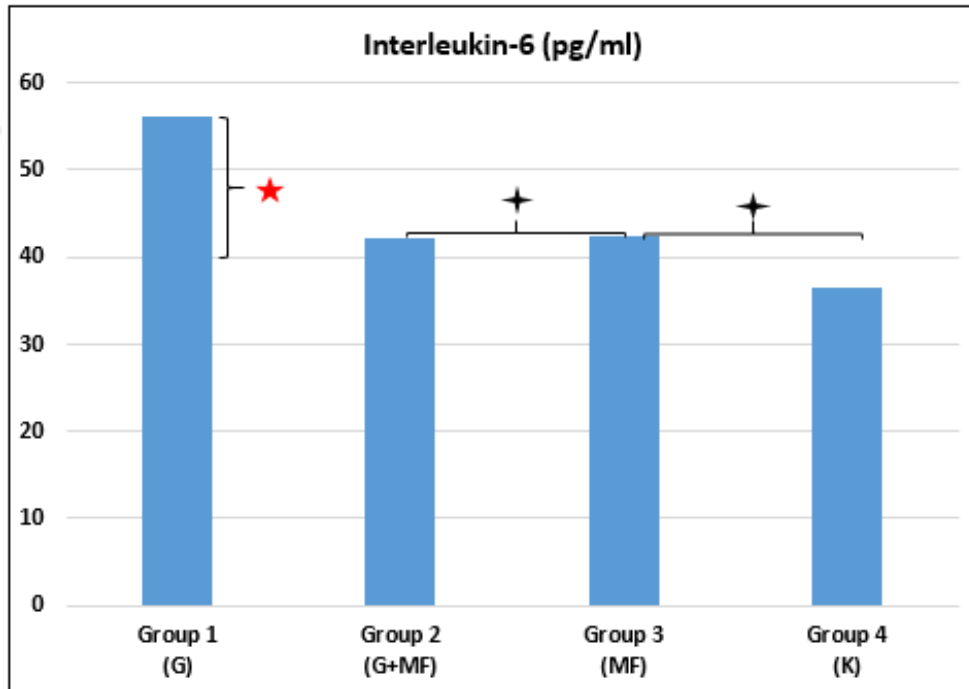
şekil 4.38. Western Blot analizi ile gruplara ait iç kulaktaki HSF-1 proteini bulguları.

4.2.7. Interlokin-6

Gruplara ait IL-6 değerleri Tablo 4.13.'te, IL-6 karşılaştırması ise Şekil 4.39.'da gösterilmiştir. Grup 1'in IL-6 değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2, 3 ve 4'te IL-6 değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 4.13. Gruplara ait IL-6 değerleri.

Gruplar	IL-6 (pg/ml)
Grup 1 (G)	56.16±11.6
Grup 2 (G+MF)	42.1±6.29
Grup 3 (MF)	42.4±5.14
Grup 4 (K)	36.4±4.63



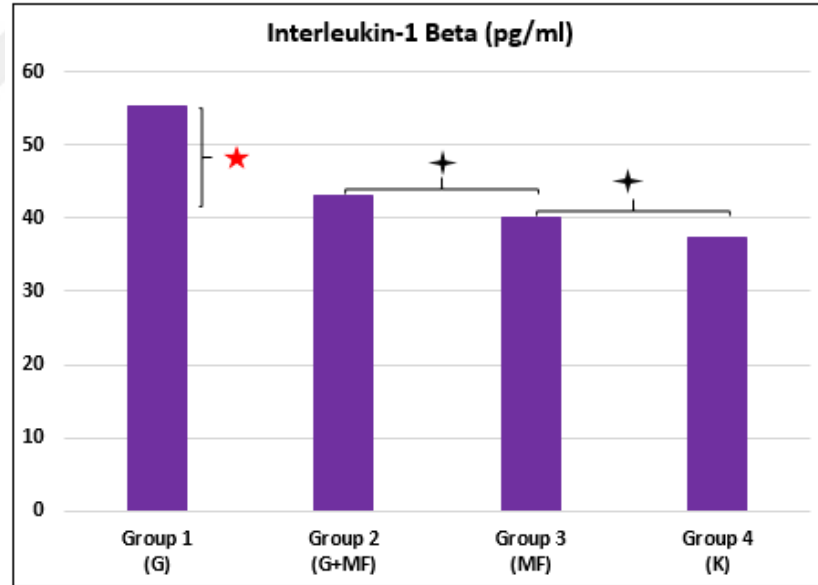
Şekil 4.39. Gruplar arası IL-6 bulguları.

4.2.8. Interlokin-1 β

Gruplara ait IL-1 β değerleri Tablo 4.14.'te, IL-1 Beta karşılaştırması ise Şekil 4.40.'da gösterilmiştir. Grup 1'in IL-1 β değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2, 3 ve 4'te IL-1 β değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 4.14. Gruplara ait IL-1 β değerleri.

Gruplar	IL-1 β (pg/ml)
Grup 1 (G)	55.4 $\pm$ 14.5
Grup 2 (G+MF)	43 $\pm$ 8.34
Grup 3 (MF)	40 $\pm$ 6.17
Grup 4(K)	37.4 $\pm$ 9.50



Şekil 4.40. Gruplar arası IL-1 β bulguları.

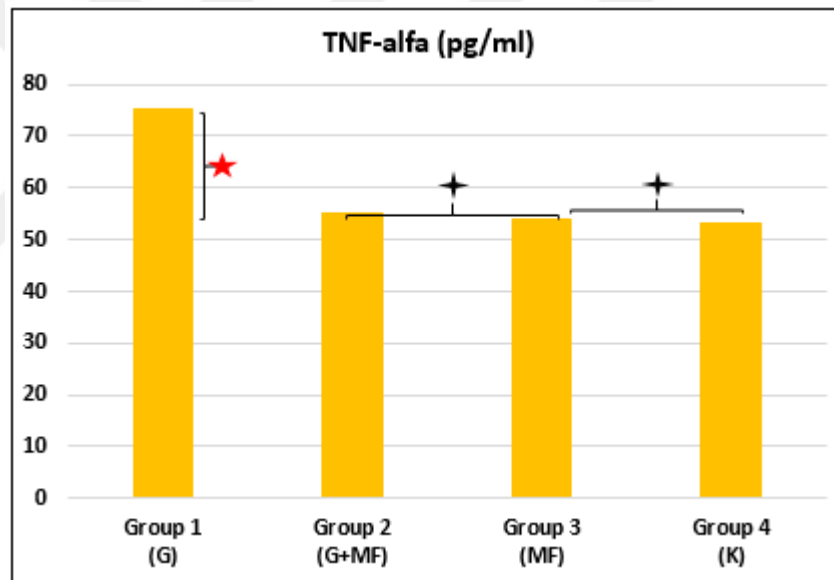
4.2.9. Tumor Nekroz Faktör- α

Gruplara ait TNF- α değerleri Tablo 4.15.'te, TNF- α karşılaştırması ise Şekil 4.41.'de gösterilmiştir. $p<0.008$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grup

1'in TNF- α değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.008$). Grup 2, 3 ve 4'te TNF- α değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).

Tablo 4.15. Gruplara ait TNF- α değerleri.

Gruplar	TNF- α (pg/ml)
Grup 1 (G)	75.3 $\pm$ 27.64
Grup 2 (G+MF)	55.1 $\pm$ 14.02
Grup 3 (MF)	54 $\pm$ 13.87
Grup 4 (K)	53 $\pm$ 15.28

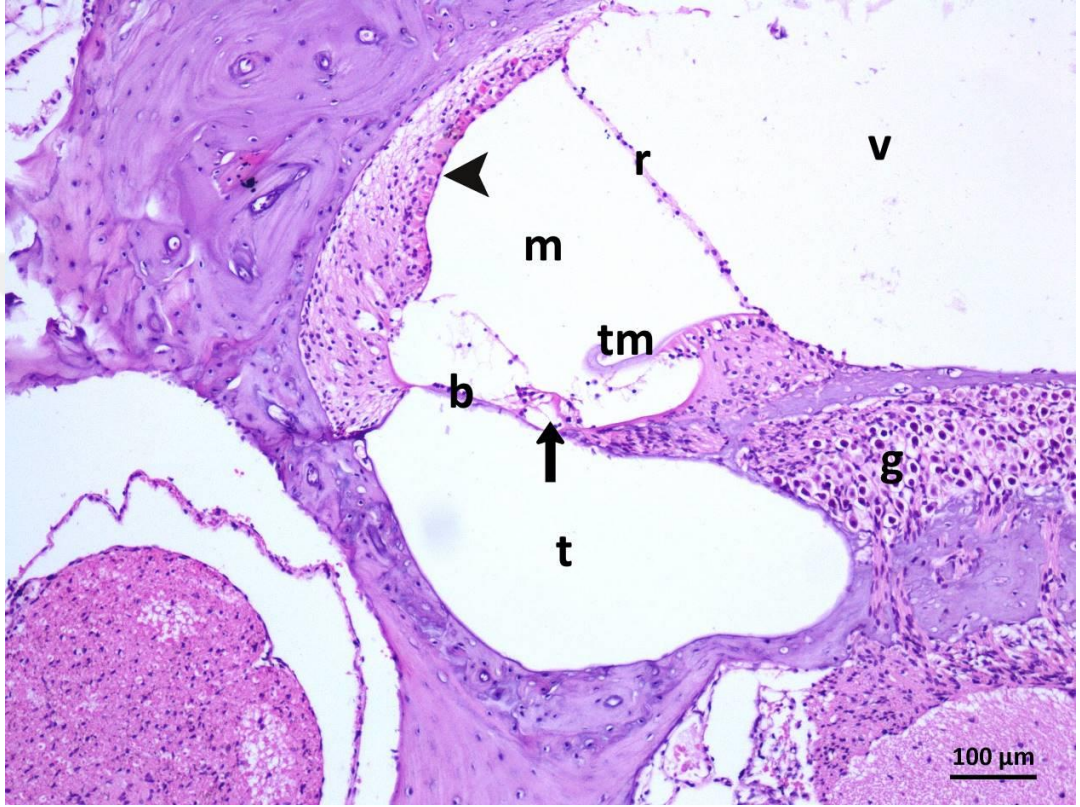


şekil 4.41. Gruplar arası TNF- α bulguları.

4.3. Histopatolojik Bulgular

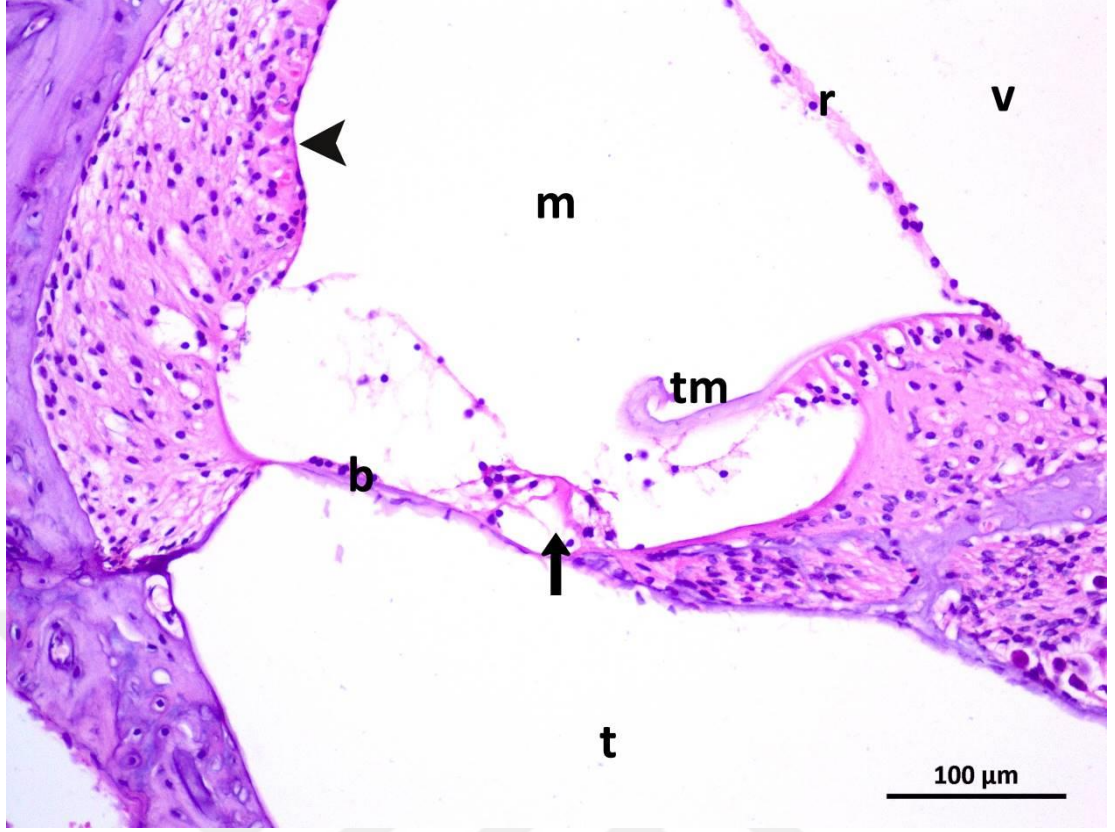
Yapılan histopatolojik incelemelerde tüm gruplarda iç kulağın skala media, skala vestibuli ve skala timpani bölümleri enine kesitte görülmüştür. Skala media ve skala vestibuli arasında reissner membranının uzanmakta olduğu gözlenmiştir. Skala medianın tabanında korti organı, lateral duvarında stria vaskülaris görülmüştür. Kontrol grubuna ait örneklerde stria vaskülaris, spiral gangliyon ve korti organının hücreleri morfolojik olarak normal görünümde bulunmuştur. Gürültü, Metformin ve

Gürültü+Metformin uygulanan gruplardaki stria vaskularis, spiral gangliyon ve korti organında bulunan hücrelerde ışık mikroskopik düzeyde morfolojik açıdan kontrol grubuna göre bir farklılık görülmemiştir. Caspase-3 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile apoptotik hücrelerin saptanması amacı ile yapılan incelemede, hiçbir grupta stria vaskularis, spiral gangliyon ve korti organı içerisinde apoptotik hücre gözlenmemiştir.



Şekil 4.42. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x100 büyütme, bar: 100µm).

Şekil 4.42.'de skala vestibuli (**v**), skala media (**m**) ve skala timpani (**t**) görülmektedir. Skala vestibuli ve skala media arasında yer alan Reissner membranı (**r**) kesintisiz olarak devam etmektedir. Skala medianın lateral duvarında kan damarlarından zengin çok katlı bir epitel olan stria vaskularis (**ok başı**) yer almaktadır. Skala media ve skala timpani arasında baziller membran (**b**) görülmektedir. Korti organı içerisindeki tünel yapısı ve tüy hücreleri (**ok**), üzerlerinde uzanan tektoriyal membran (**tm**) ile korti organı devamında yer alan spiral gangliyon (**g**) normal yapısında görülmektedir.



Şekil 4.43. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 2. (Hematoksilen&Eozin boyası, x200 büyütme, bar: 100µm).

Şekil 4.43.'te skala vestibuli (**v**), skala media (**m**) ve skala timpani (**t**) görülmektedir. Skala vestibuli ve skala media arasında yer alan Reissner membranı (**r**) kesintisiz olarak devam etmektedir. Skala medianın lateral duvarında kan damarlarından zengin çok katlı epitel olan stria vaskülaris (**sv**) yer almaktadır. Skala media ve skala timpani arasında baziller membran (**b**) görülmektedir. Korti organı içerisindeki tünel yapısı ve tüy hücreleri (**ok**) ile üzerlerinde uzanan tektoriyal membran (**tm**) normal yapısında görülmektedir.



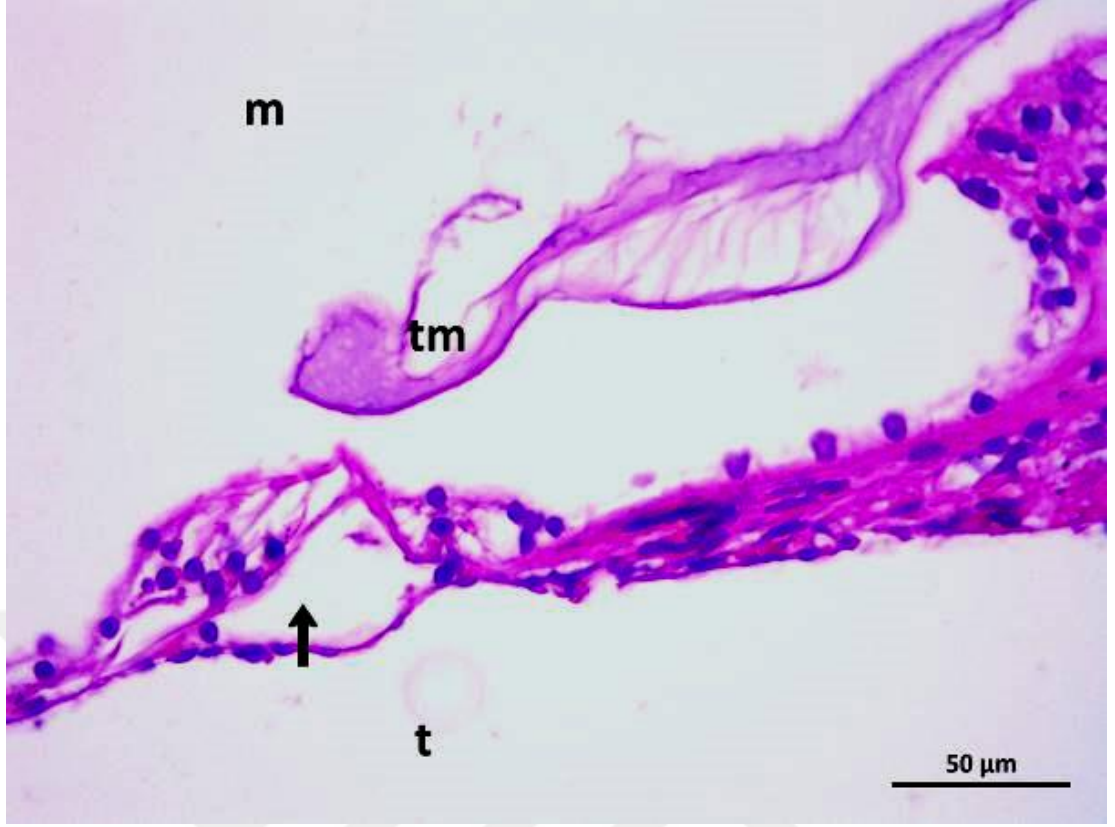
Şekil 4.44. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 3. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50µm).

Şekil 4.44.'te skala vestibuli (**v**), skala media (**m**) ve skala timpani (**t**) görülmektedir. Skala vestibuli ve skala media arasında yer alan Reissner membranı (**r**) devam etmektedir. Korti organı içerisindeki tünel yapısı (**ok**) ve tüy hücreleri ile üzerlerinde bulunan tektoriyal membran (**tm**) normal yapısında görülmektedir.



Şekil 4.45. Grup 1'e ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50μm).

Şekil 4.45.'te skala media (**m**) ve skala timpani (**t**) görülmektedir. Korti organı içerisindeki tünel yapısı (**ok**) ve tüy hücreleri ile üzerlerinde bulunan tektoriyal membran (**tm**) normal yapısında görülmektedir.



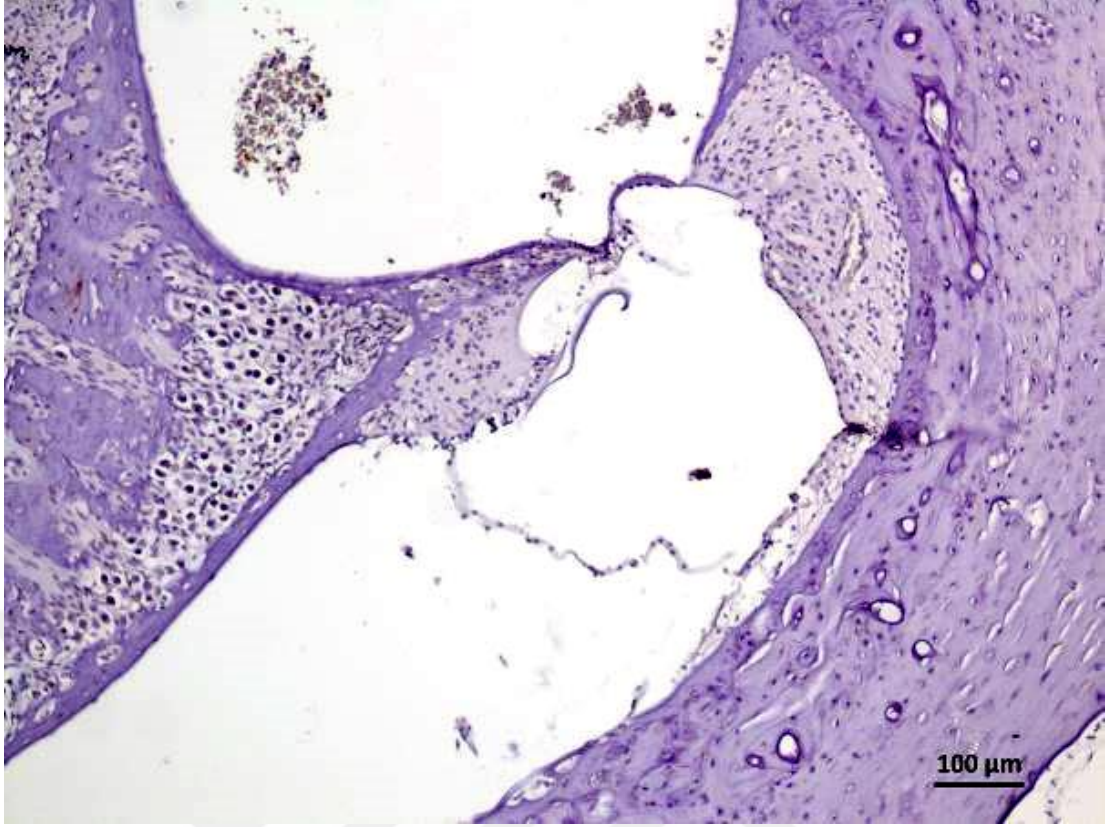
Şekil 4.46. Grup 3'e ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50μm).

Şekil 4.46.'da skala media (**m**) ve skala timpani (**t**) görülmektedir. Korti organı içerisindeki tünel yapısı (**ok**) ve tüy hücreleri ile üzerlerinde bulunan tektoriyal membran (**tm**) normal yapısında görülmektedir.



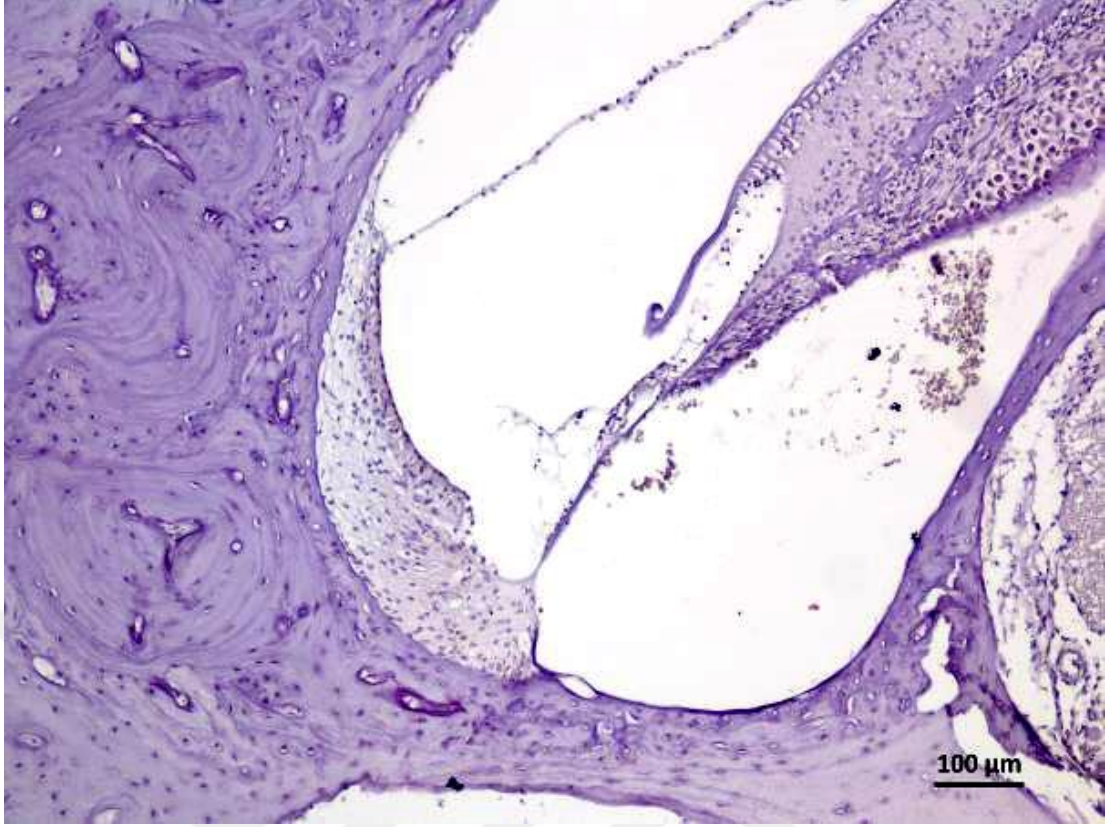
Şekil 4.47. Grup 2'ye ait koklea görüntüsü 1. (Hematoksilen&Eozin boyası, x400 büyütme, bar: 50µm).

Şekil 4.47.'de skala media (**m**) ve skala timpani (**t**) görülmektedir. Korti organı içerisindeki tünel yapısı (**ok**) ve tüy hücreleri ile üzerlerinde bulunan tektoriyal membran (**tm**) normal yapısında görülmektedir.



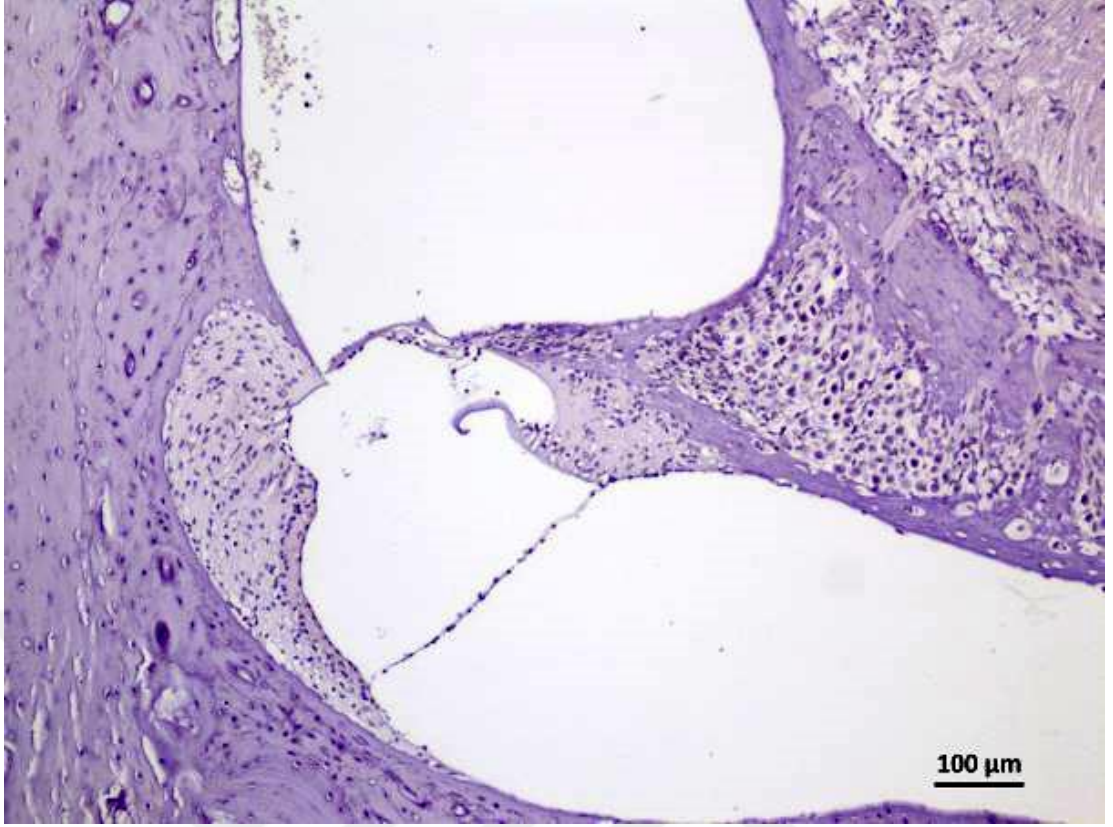
Şekil 4.48. Kontrol grubuna ait koklea görüntüsü 4. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100μm).

Şekil 4.48.'e göre; caspase-3 immünohistokimyasal boyaması yapılan örneklerde caspase-3 pozitif (apoptotik) hücre görülmemiştir.



Şekil 4.49. Grup 1'e ait koklea görüntüsü 2. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100μm).

Şekil 4.49.'a göre; caspase-3 immünohistokimyasal boyaması yapılan örneklerde caspase-3 pozitif (apoptotik) hücre görülmemiştir.



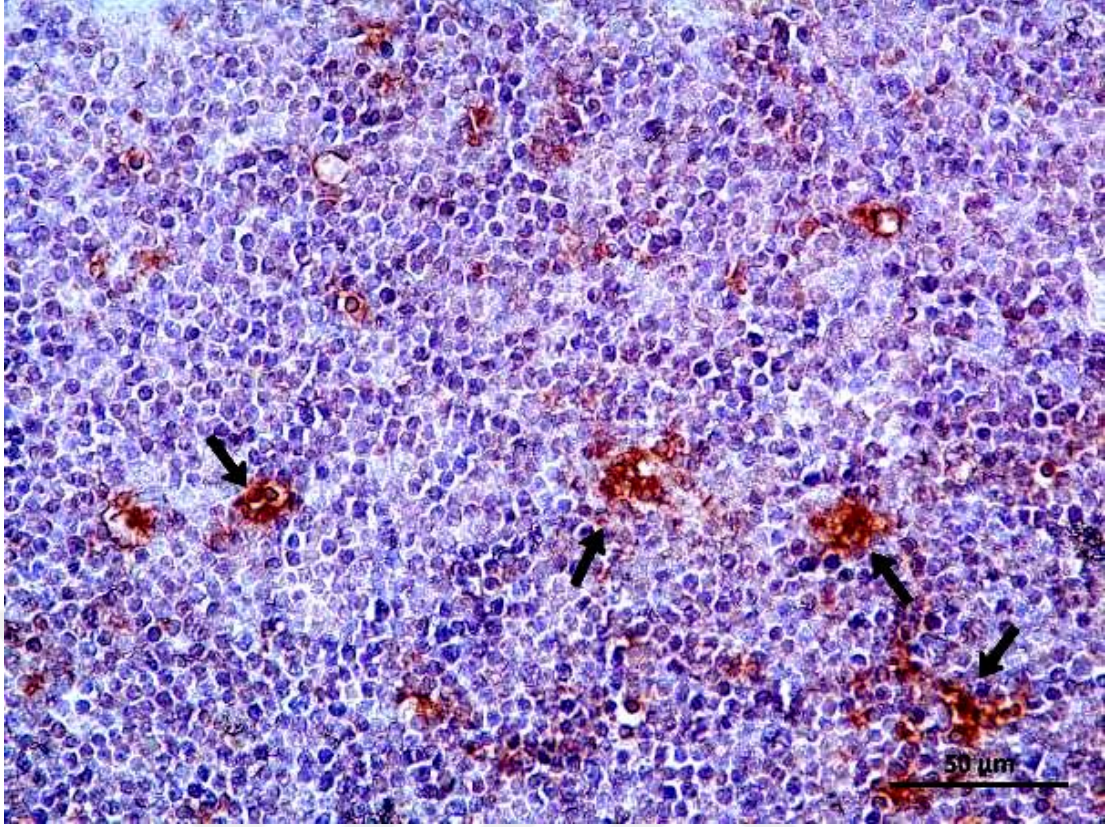
Şekil 4.50. Grup 3'e ait koklea görüntüsü 2. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100μm).

Şekil 4.50.'ye göre; caspase-3 immünohistokimyasal boyaması yapılan örneklerde caspase-3 pozitif (apoptotik) hücre görülmemiştir.



Şekil 4.51. Grup 2'ye ait koklea görüntüsü 2. (Zıt boyama Hematoksilen, x100 büyütme, bar: 100μm).

Şekil 4.51.'e göre; caspase-3 immünohistokimyasal boyaması yapılan örneklerde caspase-3 pozitif (apoptotik) hücre görülmemiştir.



Şekil 4.52. Pozitif kontrol dokusuna ait görüntü. (Zıt boyama Hematoksilen, X400 büyütme, bar: 50µm).

Şekil 4.52.'ye göre; caspase-3 antikorunun pozitif kontrolü için rat timus dokusu immünohistokimyasal olarak boyanmıştır, yapılan boyamada çok sayıda caspase-3 pozitif (apoptotik) hücre kahverengi (**ok**) olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Gürültüye bağlı işitme kaybı önlenabilir bir durumdur fakat gürültüye maruziyet sonucu işitme kaybı meydana gelince bu durum yaşam boyu devam eder. Zararlı seslere maruziyet hassas iç kulak yapılarının zarar görmesine neden olur. Başlangıçta GBİK belirgin olarak 4 kHz'te görülür fakat gürültü seviyesi ve maruziyet süresi arttıkça diğer frekanslara da yayılır (6).

Ulusal İş Güvenliği ve Sağlık Enstitüsü tarafından güvenli olarak farklı gürültü seviyelerine ne kadar süre maruz kalınabileceğinin kılavuzu çıkarılmıştır. Eğer çalışılan yerdeki gürültü ortalama 85dB SPL ise 8 saatlik maruziyetten sonra GBİK açısından risk bulunmaktadır. Ortalama gürültü seviyesi 88dB SPL ise 4 saatlik maruziyetten sonra risk mevcuttur (6).

Literatürde gürültünün ana hedefinin koklea olduğu hem koklear potansiyeller hem de birleşik aksiyon potansiyellerindeki azalma ile (59), (60), (61) ve işitsel sinirin spontan ateşleme oranındaki azalma ile kanıtlanmıştır (62), (63), (64). İşitsel periferik yoldaki bir hasar santral işitsel sistemin çeşitli seviyelerinde fonksiyonel değişikliklere neden olur (65).

Şiddetli gürültüye maruziyetten sonra koklear morfolojide en sık gözlenen değişim korti organındaki tüy hücrelerinin dejenerasyonudur. Tüy hücresi dejenerasyonu çoğu zaman demetler halinde meydana gelir, bu durum gürültüye maruziyetin süresine ve şiddetine bağlıdır (23).

Akustik travma patogenezi multifaktöriyeldir. Akustik travma tüy hücresi hasarı, stereosilia bozuklukları, destek hücrelerinde kollaps, dendritlerde rüptür ve strial ödem gibi yapısal ve metabolik hasara neden olur (31).

Literatürde tüy hücresi hasarının korti organında küçük bir lezyon olarak başladığı, lezyonun gürültüye maruziyet süresince yayıldığı ve maruziyetin sonlanmasından sonra da ilerlemeye devam ettiği bildirilmiştir. Ayrıca lezyonun ilk olarak korti organının gürültünün dominant frekansına karşılık gelen karakteristik frekans bölümünde başladığı, başlangıçtaki hasarın bir veya birkaç lezyondan

oluştugu ve kokleanın hem apikal hem de bazal kısmına doğru yayıldığı bildirilmiştir (23).

İşitme eşikleri geçici olarak etkilenmiş olsa bile iç tüy hücrelerinin sinaptik terminallerinde kalıcı kayıp ve işitsel sinir liflerinde dejenerasyon bulunduğu bildirilmiştir (66), (67).

İç kulak üzerine stresin etkisi değerlendirilmiş ve klinik raporlarda stresin işitme kaybı, tinnitus ve vertigoyu şiddetlendirdiği (68), (69), emosyonel stresin meniere sendromu atağını hızlandırdığı (70) ve stresin tinnitus algısını şiddetlendirdiği bildirilmiştir (71).

Mazurek ve ark. (2010), 24 saatlik emosyonel strese maruziyetin ABR eşiklerinde yükselme ve DPOAE amplitüdlerinde önemli azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (72).

Endojenöz antioksidan sistemler şiddetli gürültüye maruziyetten sonra saatler veya günler içinde, hücre ölümüne neden olan travma sonucu kokleadaki ROS oluşumunu sağlayan, stres türlerine tepki veren kokleadaki major koruyucu sistemdir. Ekzojenöz antioksidanların yönetimi ise terepatik müdahale için büyük potansiyeldir (27).

Lu ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışmada, antioksidan tedavi grubundaki hayvanlarda kontrol grubuna göre her zaman noktasında DPOAE seviyelerinde önemli oranda düzelme gözlenmiştir, etki özellikle 7. ve 21. günlerde dikkat çekmektedir. 8 veya 24 saatte tedavi edilen ve tedavi edilmeyen hayvanlar arasında ölçülen frekanslarda anlamlı farklılık ortaya çıkmamıştır. Antioksidan tedavisinin etkisi gürültüye maruziyetten 21 gün sonra kokleanın bazal kısmında dış ve iç tüy hücrelerindeki kaybın sayısındaki azalma ile kanıtlanmıştır. Fonksiyonel ABR ve DPOAE sonuçları ile tüy hücresi sayısının korelasyonu bu fonksiyonel testlerin 16 kHz'in altındaki frekanslarda limitli araçlar olduğunu göstermektedir (30). Bizim çalışmamızda da 100dB SPL gürültüye 8 saatlik maruziyet sonrası 14 gün boyunca 70mg/kg/gün metformin verilen grupta (Grup 2), gürültü sonrası 1. gün yapılan DPOAE ölçümünde bazal ölçüm değerlerine göre DPOAE SNR değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenmiştir. Gürültüye maruziyet sonrası 7. ve 14. günlerde yapılan ölçümlerde ise bazal ölçüm değerlerine göre DPOAE SNR

değerlerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar bir antioksidan türevi olan metforminin işitme eşiklerinde düzelme sağladığını göstermektedir.

Dış tüy hücresi kaybı oranı baziller membranın bazal kısmında, antioksidan ile tedavi edilmeyen hayvanlarda 84.9 ± 4.1 ve antioksidan ile tedavi edilen hayvanlarda 13.27 ± 5.1 'dir. Benzer şekilde iç tüy hücresi kaybı oranı baziller membranın bazal kısmında, antioksidan ile tedavi edilmeyen hayvanlarda 2.4 ± 1.01 ve antioksidan ile tedavi edilen grupta 0.88 ± 0.38 'dir. Kokleanın apikal kısmı karşılaştırıldığında tedavi edilmeyen hayvanlarda dış tüy hücresi kaybı oranı 2.55 ± 0.63 ve iç tüy hücresi kaybı oranı 0.64 ± 0.02 'dir. Kokleanın apikal kısmında antioksidan tedavisi almış hayvanlarda dış tüy hücresi kaybı miktarı 0.64 ± 0.26 azalmış iken iç tüy hücresi kaybı miktarı da 0.03 ± 0.03 azalmıştır (30).

İç tüy hücrelerindeki ölümün %95'i ve dış tüy hücrelerindeki ölümün %97'sinin kokleanın bazal kısmında meydana geldiği ve bu durumun da tüy hücrelerindeki kaybın lokalizasyonunun travma merkezi bölgesinde ve travma merkezinin yukarısında (14 kHz) olduğu bildirilmiştir (73).

Literatürde antioksidan tedavisinin iç tüy hücrelerindeki akustik hasarı azalttığı kanıtlanmış ve dış tüy hücrelerinin iç tüy hücrelerine göre akustik travmaya daha duyarlı oldukları, akustik travma ile ortaya çıkan ilk 40dB'lik kalıcı eşik değişikliğinin temel sebebinin dış tüy hücresindeki hasardan kaynaklandığı, kalıcı eşik değişikliği 40dB'i aştığında bu durumun genellikle iç tüy hücresi hasarının göstergesi olduğu bildirilmiştir (30). Çalışmamızda gürültüye maruz bırakılan her iki grupta (Grup 1 ve Grup 2) ABR eşik ortalamaları 8, 16, 20 ve 32 kHz'te gürültüye maruziyet sonrası 1. gün 40dB SPL'in üzerinde iken, gürültüye maruziyet sonrası 14 gün boyunca 70mg/kg/gün metformin verilen grupta (Grup 2) ABR eşiklerinin 7. ve 14. gün yapılan ölçümlerde 40dB SPL'in altına düştüğü, sadece gürültüye maruz bırakılan grupta (Grup 1) ise anlamlı bir değişiklik oluşmadığı gözlenmiştir.

Gürültüye maruziyet işitme sisteminde hasar oluşturur ve gürültüye bağlı eşik değişikliğine neden olur. Eşik değişiklikleri geçici veya kalıcı olabilir (1). Gürültü travması geçici eşik değişikliği (GED) veya kalıcı eşik değişikliğine (KED) yol açabilir. Bunların farklı mekanizmalar ile oluştuğu düşünülmektedir. GED stereosilyalardaki bazı değişiklikler veya reaktif oksijen ürünlerindeki artıştan

kaynaklanabilir. Antioksidan tedavisi gürültü travmasına karşı koruyucu olabilir. Ayrıca hayvan çalışmalarında, gürültüye maruziyetten sonra bir antioksidan olan glutatyonda artış gösterilmiştir. Bu durumun iyileşme sürecinin altta yatan mekanizması olabileceği düşünülmüştür (74).

Bizim çalışmamızda Grup 1'deki ratlarda gürültüye maruziyet sonrası 14 günlük takip sürecinde DPOAE SNR değerlerinde bazal ölçüm sonuçlarına göre anlamlı farklılık bulunmuş ve 14 gün sonra DPOAE SNR değerleri tekrar bazal ölçüm değerlerine ulaşamamıştır. Bu sonuçlar literatürde belirtilen sonuçlar ile uyum göstermiş ve gürültüye maruziyet sonrası oluşan eşik değişikliğinde bir miktar düzelme kaydedilmiştir.

Literatürde verilen bilgiye göre geçici eşik değişikliğinde hayvanlarda iyileşme süreci farklılık göstermektedir. Harding ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışmada iyileşme 10 kokleanın 6'sında 2-3 gün içinde gerçekleşmiş ve kalanlar 10 gün içinde iyileşmişlerdir. Bunun yanısıra 10 kokleanın sadece 4'ünde geçici eşik değişikliği 10 gün içinde düzelmiş ve 6 kokleanın 5'inde 10-24 gün içinde kalıcı eşik değişikliğinde iyileşme olmamıştır (75).

Hayvanlardaki deneysel çalışmalar ile şiddetli gürültüye maruziyetin kokleanın dış tüy hücrelerinde yapısal değişikliklere neden olduğu ve ilk olarak birinci sıra, sonra ikinci sıra ve üçüncü sıraya ilerleyerek hasarın iç ve dış tüy hücrelerini kapsadığı belirtilmiştir (34).

Bizim çalışmamızda Grup 3 (metformin) ve Grup 4'te (kontrol grubu) 14 günlük takip sürecinde DPOAE SNR değerlerinde bazal değerlere göre anlamlı farklılık bulunmamıştır. Buna göre sadece metformin verilen grupta, metformine bağlı olarak DPOAE SNR değerlerinde değişiklik saptanmamıştır. Bu durum metformin'in DPOAE testi ile değerlendirilebilen dış tüy hücresi fonksiyonuna negatif bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda Grup 2'deki (gürültü+metformin) ratlarda DPOAE SNR değerlerinde gürültüye maruziyet sonrası 14 günlük takip sürecinin 1. gününde bazal ölçüm sonuçlarına göre anlamlı farklılık bulunmuştur. 7. ve 14. gün elde edilen DPOAE SNR değerlerinde ise bazal ölçüm sonuçlarına göre anlamlı farklılık bulunmamıştır. Yüksek frekans bölgesinde gürültüye maruziyetten daha fazla

etkilenme olduğu gözlenmiştir. Grup 2'deki değerler göz önüne alındığında gürültüye maruziyet sonrası 14 gün 70mg/kg/gün metformin verilen grupta, metformin'e bağlı olarak DPOAE SNR değerlerinde anlamlı şekilde düzelme kaydedildiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda Grup 1'deki ratlarda 8 saatlik 100dB SPL geniş bant gürültüye maruziyet sonrası 1. gün yapılan ABR ölçümünde 8, 16, 20 ve 32 kHz ABR eşik ortalamalarında bazal ölçüm sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuş ve 14 gün sonra ABR eşik değerleri tekrar bazal ölçüm değerlerine ulaşamamıştır. Çalışmamızda Grup 1'deki ratlarda 8, 16, 20 ve 32 kHz bazal ölçüm eşiklerinin ortalaması 20dB SPL olarak elde edilmiş iken gürültüye maruziyet sonrası 1. gün 57.81dB SPL ve 14.gün 46.38dB SPL olarak elde edilmiştir. Xiong ve ark. (2011)'nin yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde click ve 8, 16 ve 32 kHz tone burst uyaranlar kullanılmış ve gürültüye maruziyetten sonra tüm uyaran tiplerinde ABR eşiklerinde artış gözlenmiştir (7). Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda click uyaran ile 1, 7 ve 14. günlerde yapılan ABR ölçümünde, eşik değerlerinde bazal ölçüm eşik değerlerine göre anlamlı farklılık bulunmamıştır. Literatürde gürültü ile en çok etkilenen alanın birinci kıvrım olduğu bildirilmiştir (76), (77), (78). Buna göre çalışmamızda gürültüye maruziyet sonucu 8, 16, 20 ve 32 kHz'te gürültüye maruziyet sonrası 1. gün yapılan ABR ölçümünde eşiklerde yükselme mevcut iken click uyaran ile yapılan ABR ölçümünde eşiklerde değişiklik bulunmaması literatürdeki bu bilgiyi desteklemektedir. Strose ve ark. (2014) ise, her bir koklea kıvrımında hasarlanmış tüy hücresi sayısını analiz etmişler ve gürültüden en çok hasarı alan bölümün kokleanın üçüncü kıvrımı olduğunu, ikinci kıvrımın orta derecede hasar aldığını ve birinci kıvrımın (bazal) gürültü travmasından en az hasarı aldığını ortaya çıkarmışlardır. Her bir sıradaki dış tüy hücresi hasarı gözlemlendiğinde gürültü travmasından en çok üçüncü sıranın etkilendiğini gözlemlediklerini, birinci ve ikinci sıradaki hasarlanmış stereosilya sayısının ise neredeyse eşit olduğunu bildirmişlerdir (74).

Çalışmamızda Grup 2'deki ratlarda 14 günlük takip sürecinin 1. gününde 8, 16, 20 ve 32 kHz ABR eşik değerlerinde bazal ölçüm sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. 7. ve 14. gün elde edilen ABR eşik değerlerinde ise bazal ölçüm ABR eşik değerlerine göre anlamlı farklılık bulunmamıştır. Click

uyaran ile yapılan ABR’de ise eşik değerlerinde 1, 7 ve 14. günlerde bazal ölçüm eşik değerlerine göre anlamlı farklılık bulunmamıştır. Çalışmamızda 8, 16, 20 ve 32 kHz ile yapılan ABR bazal eşik ortalamaları 21.09dB SPL iken gürültüye maruziyet sonrası 1. gün 50.15dB SPL ve 14. gün 23.1dB SPL olarak elde edilmiştir. Grup 1 ile karşılaştırıldığında, metformin tedavisi sonrası 14. gün elde edilen değerlere göre metforminin gürültüye bağlı oluşan işitme eşiklerinde anlamlı düzelme sağladığı gözlenmiştir.

Literatürde iç tüy hücrelerindeki hasarlanma sayısı hesaplanmamasına rağmen bu yapılarda dış tüy hücresi hasarı ile karşılaştırılınca daha az hasar tespit edilmiştir. Bu bulgu, gürültü travmasının iç tüy hücrelerinden daha çok dış tüy hücrelerini etkilediğini ileri süren pek çok çalışma ile uyumludur (74).

Çalışmamızda 1. ve 2. gruplara gürültü verilmesine rağmen click uyaran ile yapılan ABR’de 1, 7 ve 14. günlerdeki eşik değerlerinde bazal ölçüm değerlerine göre anlamlı farklılık bulunmamıştır. Chen ve ark. (2016)’nın yaptıkları çalışmada ise 10-20 kHz OBN (104dB SPL) 35 gün 4 adet rata verilmiştir. Bu gürültüye maruziyet 12-32 kHz arasında 20-40 dB kalıcı eşik değişikliğine neden olmuş, fakat 4-8 kHz’te çok az etkisi olmuş ya da hiç etkisi olmamıştır. Kokleanın bazalinde gürültüye maruziyetten sonra pek çok dış tüy ve iç tüy hücresi kaybı meydana gelmiştir (3).

Literatürde tüy hücresi harabiyetinin korti organının hem apikal hem de bazal kısmına doğru yayıldığını ancak bazal yayılımın apikal yayılıma göre daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Aktif hücre ölüm paterninin yayılımının 110dB SPL şiddetindeki gürültüye maruziyetten sonra ilk 2 gün içinde birinci ve ikinci koklear kıvrımın birleşim noktasından kokleanın bazaline doğru yayıldığı, harabiyet korti organının bazal kısmına doğru yayıldıkça apikal ve bazal kısımlar arasında yapısal ve metabolik farklılıklar gösterdiği, bu bakımdan, bazal kısmın daha az antioksidan kapasite gösterdiği ve sonuçta bu bölgenin daha fazla oksidatif strese maruz kaldığı bildirilmiştir (23).

Bizim çalışmamızda Grup 3 (metformin) ve Grup 4’te (kontrol grubu) 14 günlük takip sürecinde ABR eşik değerlerinde 8, 16, 20 ve 32 kHz tone burst uyaran ve click uyaran ile yapılan ABR’de bazal değerlere göre anlamlı farklılık

bulunmamıştır. Buna göre sadece metformin verilen grupta, metformin'e bağlı olarak ABR eşik değerlerinde değişiklik saptanmamıştır. Bu sonuçlar metforminin işitsel fonksiyon üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Ratlarda bütün test edilen frekanslarda, ABR'yi oluşturan 5 dalganın içinde II. dalganın en büyük dalga olduğu, sonra sırası ile I, IV ve V. dalgaların olduğu ve bunların da benzer amplitüde olduğu belirtilmiştir. III. dalganın ise en küçük amplitüde sahip dalga olduğu bildirilmiştir (54). Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak tüm ratlarda ve tüm frekanslarda en belirgin dalganın II. dalga olduğu gözlenmiştir.

Literatürde serbest radikallerin, ROS/RNS birikimi ve yayılımının zamanla korti organında geniş bir alana, spiral ganglion hücrelerine ve stria vaskularise zarar verdiği bildirilmiştir. Gürültü ve ROS/RNS aşırı üretimi arasındaki bağlantının GBİK'e karşı vitamin E, askorbik asit, d-methionine, N-acetyl-l-cysteine ve coenzime Q mimetic idebenone'u içine alan serbest radikal temizleyicilerin koruyucu etkisi ile kuvvetlendirildiği bildirilmiştir (43). Gürültüye maruziyet sırasında, gürültüye maruziyetten hemen sonra ve gürültüye maruziyetten birkaç saat veya birkaç gün sonra kokleada serbest radikallerin artışı gösterilmiştir. Gürültüye maruziyetten sonraki 7-10 günde serbest radikal formasyonlarında artış meydana geldiği kanıtlanmıştır. Bu durumun ikincil oksidatif patlama olduğu ve gecikmiş hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (45). Literatür ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda Grup 1 ve Grup 2'de DNA hasarı değeri Grup 3 ve Grup 4'ten yüksek bulunmuştur. Literatüre göre; ROS pozitif spiral ganglion hücrelerinin sayısı, apoptotik spiral ganglion hücrelerinin sayısı, stereosiliya kayıplı dış tüy hücrelerinin sayısı ve ABR eşik değişiklikleri pozitif korelasyonludur (7). Bizim çalışmamızda da gürültüye maruziyet sonrası 1. gün Grup 1 ve Grup 2'de DNA hasarı sonuçları ile uyumlu olarak DPOAE SNR değerlerinde düşüş, ABR eşiklerinde ise yükselme kaydedilmiştir.

Farmakolojik bir in vitro çalışmada metformin ile apoptozis ve hücre ölümünün inhibisyonunun gerçekleştiği (79), renal hücreler kullanılarak yapılan bir in vitro çalışmada antiapoptotik ve benzer antioksidan etkinin doğrulandığı (80), metforminin gentamisin, cisplatin ve cıvalı chloride nefrotoksinlere maruz

kalındığında renal hücre kültüründeki hücre canlılığını restore ettiği kanıtlanmıştır (81).

Literatürde metforminin hücre çoğalmasını desteklediği, nöronal plastisiteyi geliştirdiği ve yeni hücre oluşumu ve fonksiyonel bağlantıların birleşmesinin birkaç haftayı aldığı bildirilmiştir (82).

Literatürde metforminin hızlıca kan beyin bariyerini etkilediği ve farklı şekilde biriktiği ve bu şekilde metforminin vasküler inflamasyonu azaltmaya yardımcı olduğu bildirilmiştir. Metformin tedavisinin başlangıçtaki büyük enfarktüs alanının hacminde veya kan glukoz seviyesinde önemli oranda değişiklik yapmaksızın fonksiyonel yarar sağladığı bildirilmiştir. Metformin tedavisinin iyileşmeyi artırmaya yardım ederek ve yaşayan hücre oranını artırarak intrakranial basınç oranının azalmasına katkıda bulunarak ölü dokudaki fagositozu artırdığı bildirilmiştir (82).

Genellikle gürültüye maruziyetten sonra eşiklerin yavaş yavaş kötüleştiği ve morfolojik hasarın arttığı gözlenmiştir. Bu değişiklikler gürültüye maruziyetten sonraki 30 gün boyunca bulunmasına rağmen, gürültüye maruziyetten sonraki ilk 10 gün akut akustik travma tedavisinde önemli bir periyottur. Gürültüye maruziyetten sonraki 10 günde ROS/RNS formasyonu maksimuma ulaşır ve kalıcı eşik değişikliği ve dış tüy hücresi kaybı platoya ulaşır. Gürültüye maruziyetten sonraki 7-10 günde serbest radikallerdeki artıştan dolayı 10 gün boyunca devam eden antioksidan tedavisinin yararlarının gözlenmesi olası bir durumdur çünkü antioksidanlar serbest radikallerin üretiminden kaynaklanan koruyucu veya kümülatif hasarı önleyebilir (45). Literatür ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda Grup 1’de DNA hasarı diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 2’de DNA hasarı değeri Grup 3 ve 4’ten anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 3 ve 4 arasında DNA hasarı açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Şiddetli gürültüye maruz kalan kokleada spiral ganglion hücrelerinin apoptozisini başlatan ROS bulunduğu kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar gürültü sonrası 14 gün metformin tedavisi uygulanan grupta sadece gürültüye maruz kalan gruba göre hem DNA hasarının daha az olması hem de DPOAE SNR amplitüdleri ve ABR eşiklerinin düzelmiş olması metforminin gürültüye bağlı işitme kaybını iyileştirici özelliği olan bir antioksidan olabileceğini düşündürmektedir.

ROS'un akustik travmayı takiben tüy hücrelerindeki apoptozisi başlattığı bilinmektedir. Gürültüye maruziyeti takiben spiral ganglion hücrelerinde 4-HNE ve cas-3 tespit edilmiş, 4-HNE'nin ROS oluşumu için histokimyasal bir marker ve cas-3'ün ise kokleada apoptozis markeri olarak görev yaptığı bildirilmiştir (7).

Gürültüye maruziyete cevaben ROS üretiminin kan akımını azaltabildiği ve vazokonstrüksiyonu azaltan vazodilatör ajanların GBİK'i iyileştirdiği ve antioksidanların ROS'u daha az tehlikeli forma dönüştürdüğü belirtilmektedir (83). Bizim çalışmamızda Grup 2'de TAS değerleri Grup 1'den anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 3'te TAS değerleri Grup 2'den anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. TAS değerleri açısından Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Grup 1'in TOS değeri ise diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 2, 3 ve 4 arasında TOS değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlar 14 gün boyunca 70mg/kg/gün oral gavaj ile verilen metforminin dokuların antioksidan kapasitesini artırdığını göstermektedir.

Şiddetli gürültüye maruziyet kokleadaki kan akımını azaltır. GBİK'te kan akımındaki azalma iskemiyi başlatır ve serbest oksijen radikali üretiminin artmasına neden olur. GBİK tedavisinde kullanılan antioksidanlar vazokonstrüksiyona neden olan serbest oksijen radikallerini azaltır. Akustik travma kokleada akustik enerji oluşturur ve bu enerjinin nöral sinyale dönüşmesi sonucu ROS üretimi oluşur. Doğal antioksidan mekanizmalarının takviyesi işitme kaybını azaltır veya önler. Antioksidanların kullanımı akustik travma tedavisinde çok önemlidir. Çünkü ROS üretimi pek çok nörodejeneratif sendromun patogeneğinde önemli rol oynar, antioksidan ajanlar nörodejeneratif süreçlerde terepatik etkiye sahiptir. Çeşitli hayvan çalışmaları, harici antioksidan ajanların sensoriyal hücre ölümünü ve GBİK'i azalttığını ve serbest radikal temizleyicileri artırdığını göstermektedir (4).

Literatürde şiddetli gürültünün stereosiliya uç bağlantılarının rüptürü, hücre-hücre kavşak rüptürü, pillar hücrelerin bükülmesi ve korti organının baziller membrandan ayrılması gibi mekanik hasara neden olduğu belirtilmiş, şiddetli gürültünün ayrıca glutamat eksitotoksitesine neden olduğu, koklear kan akımını azalttığı, iyon dengesi ve metabolik homeostazisi bozduğu ve oksidatif stresi artırdığı bildirilmiştir (43). Oksidatif stres faktörlerinin işitsel fonksiyon kaybına neden olan DNA hasarına, yağların ve proteinlerin yıkımı ve tetikleyici hücrelerin ölümüne

neden olabildiği ve sonuç olarak işitme kaybı meydana geldiği bildirilmiştir (84). Bizim çalışmamızda Grup 1'in OSI değeri diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 2, 3 ve 4 arasında OSI değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre; çalışmamızda metformin verilmeyen sadece gürültüye maruz bırakılan grupta kanda oksidatif stres parametrelerinin artması ile birlikte işitsel fonksiyonda bozulma meydana geldiği düşünülmektedir.

Morales ve ark. (2010), bir antidiyabetik ajan olan metforminin endotelial hücredeki apoptozisi etkileyerek oksidatif stresi kısmen azalttığını bildirmişlerdir (80).

Her bir hücrede mitokondrial seviyedeki hücre respirasyonu ve organizmadaki anormal üretim ile ilgili olarak normal biyokimyasal olayların yan ürünü olan serbest radikaller üretilir (34).

Bizim çalışmamızda Grup 1'in Cox-2 değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 2'nin Cox-2 değeri Grup 3 ve 4'ten anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 3 ve 4 arasında Cox-2 değeri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Literatürde ısı şok transkripsiyon faktörü 1 (HSF 1)'in uyarılabilir stres cevabını kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörü olduğu, büyük selüler ve çevresel streslerden hücreleri ve dokuları koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu cevabın, çoğu zaman ısı şok cevabı olarak adlandırıldığı, gelişim boyunca insanları bakterilerden koruduğu, stres etkenlerinin HSF 1'i aktive ettiği, nükleusların yerini değiştirdiği ve ısı şok proteinleri için genlerdeki ısı şok elementlerini bağladığı bildirilmiştir. Hem ısı hem de gürültünün stres etkenlerinin kokleadaki ısı şok cevabını aktive ettiği ve gürültü travmasından koruduğu bildirilmiştir (43). Literatür ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda Grup 1'in HSF 1 değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Grup 2 ve 3'ün HSF 1 değerleri arasında anlamlı fark olmayıp bu değerler Grup 1'den anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 4'ün HSF 1 değeri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre; dokuları çevresel stresten koruyan HSF 1'in 14 gün 70mg/kg/gün metformin verilen grupta sadece gürültü verilen gruba göre daha yüksek bulunması, metforminin kokleayı stress

etkenlerinden koruyucu rolü olduğu bilinen HSF 1'in artışı sağladığı neticesine varılmıştır.

Literatürde stresin endokrin, nöronal ve immün sistemi aktive ettiği ve bazı aktif biyolojik bileşimlerin ör; hormonlar, nörotransmitterler ve sitokinlerin salınımına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca stresin tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interleokin 1 β (IL-1- β) ve interleokin 6 (IL-6) olarak adlandırılan proinflamatör sitokinlerin üretimini stimüle ettiği belirtilmiştir (72). Bizim çalışmamızda Grup 1'in IL-6, IL-1 β ve TNF- α değerleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Grup 2, 3 ve 4'te bu değerler açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Metformin tedavisi uygulanmayan grupta sitokinlerin daha yüksek elde edilmesinin, elde ettiğimiz DPOAE ve ABR sonuçları ile uyumlu olarak işitsel fonksiyonu bozduğu düşünülmektedir. Metformin verilen grupta sitokinlerin daha düşük olmasının ise antioksidan özelliği olabileceği düşünülen metforminin sitokinlerin üretimini baskılamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mazurek ve ark. (2010) çalışmalarında, alçak frekanslı ve düşük şiddetli sese 24 saat maruz kalan hayvanlarda serumdaki TNF- α ve kortikosteron konsantrasyonunun arttığını belirtmişlerdir. TNF- α konsantrasyonunun stres sonrası 3 saatte anlamlı şekilde arttığını ve kortikosteron konsantrasyonunun stres sonrası 24 saatte normale döndüğünü belirtmişlerdir. Stres altındaki hayvanların serumundaki TNF- α konsantrasyonunun stres sonrası 6 saatte normal düzeyine döndüğü bildirilmiştir (72).

Literatürde tüy hücresi ölümünün eğiliminin apoptozis ve nekrozise doğru olmasının gürültüye maruziyetin şiddeti ile ilgili olduğu, yüksek şiddetli gürültüye maruziyetin, düşük şiddet seviyesine göre tercihen apoptozise neden olduğu bildirilmiştir. Guinea pig kokleasında üç farklı gürültü seviyesinde tüy hücresi ölüm paterni karşılaştırılmış (110, 115 ve 120dB SPL), kokleanın 120dB SPL gürültüye maruz kaldığında tüy hücresi patogenezinde apoptozisin, 110 veya 115dB SPL gürültüye maruziyette ise nekrozisin dominant olarak bulunduğu bildirilmiştir (23).

Gürültüye maruz kalan kokleada, biyolojik çalışmaların altından apoptozis çıkmaktadır. Caspase 3, 8 ve 9, mitokondriden cytosol'e cytochrome c'nin yer

değiştirmesi ve mitokondriden nükleusa EndoG ve AIF'nin salınımını içine alan birçok apoptotik olayın dahil olduğu bildirilmiştir (23).

Literatürde kokleanın morfolojik analizinde 125dB SPL gürültüye maruz kalan postnatal 14 günlük ratlarda koklear tüy hücrelerinde kayıp gözlenmediği bildirilmiştir. Belirgin tüy hücresi kaybı olmadan akustik travma ile oluşan stereosiliya, stria vaskülaris ve retiküler laminanın bozulmasıyla ilgili koklear yaralanmaların olduğunu bildiren çalışmalar da literatürde yer almaktadır (85). Sekiya ve ark. (2012), 1dk boyunca 4 kHz'te 137dB gürültüye maruz bırakılan ratlarda gürültüye maruziyetten 9 hafta sonra dış tüy hücrelerinin tamamen kaybolduğunu, iç tüy hücrelerinin ise kokleanın daha apikal bölgesinde kısmi olarak korunduğunu bazal ve orta kısımda tam kayıp gözlendiğini kanıtladıklarını bildirmişlerdir (86). Bizim çalışmamızda Gürültü, Metformin ve Gürültü+Metformin uygulanan gruplardaki stria vaskülaris, spiral gangliyon ve korti organında bulunan hücrelerde ışık mikroskopik düzeyde morfolojik açıdan kontrol grubuna göre farklılık görülmemiştir. Caspase-3 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile, apoptotik hücrelerin saptanması amacı ile yapılan incelemede, hiçbir grupta stria vaskülaris, spiral gangliyon ve korti organı içerisinde apoptotik hücre görülmemiştir.

Gürültü travması neredeyse koklea boyunca tüm dış tüy hücrelerinin kaybına neden olur ve daha apikal bölgedeki iç tüy hücreleri korunur (86). Rybalko ve ark. (2015), 8dk gürültüye maruz kalan grupta kokleanın yüksek frekans bölgesinde kontrol grubuna göre daha az sayıda sinaps bulunduğunu, 25dk'lık maruziyet sonucunda 8-40 kHz arası koklear alanda önemli iç tüy hücresi kaybı gözlendiğini belirtmişlerdir (85).

Literatürde gürültüye maruziyetten kaynaklanan işitme kaybında tüy hücrelerindeki apoptozis ve nekrozisin önemli faktörler olduğu ve apoptozisin gürültüye maruziyeti takiben 1. gün başladığı, ABR eşiklerindeki yükselme ve DPOAE amplitüdlerindeki düşüşün gürültüye maruziyet sonrası apoptozisin neticesi olduğunu bildirilmiştir (4).

Chen ve ark. (2013), kokleadaki patolojik değişikliklerin ışık mikroskopu altında anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Korti organının düzensizliğinin tüm mesafelerde ortak olduğu belirtilmiştir. Kokleanın lateral duvarında yapısal hasarın

nadir olduğu ve sadece bir vakada ikinci kıvrımda stria vasküleriste rüptür gözlemlendiği belirtilmiştir (22). Bizim çalışmamızda hiçbir grupta apoptotik hücre gözlenmemiştir ve bulgular kontrol grubu ile aynı elde edilmiştir. Çalışmamızda kokleanın morfolojik analizinde ışık mikroskopu altında tespit edilememiş olan olası morfolojik farklılıkların elektron mikroskopu ile tespit edilebileceği düşünülmektedir.

Gürültü travmasından sonra elektron mikroskopu kullanılarak mitokondrideki morfolojik değişiklikler kanıtlanmıştır. Bu bulgular; tüy hücrelerinin kofullaşması, mitokondrial membran anormallikleri ve destek hücreler, kutikular tabaka ve stereosiliya hasarıdır. İntraselüler kofullaşma, mitokondrial şişme, cristolysis ve intramitokondrial partikülleri içine alan anormallikler de bildirilmiştir (1).

Gürültüye bağı DPOAE değerleri dış tüy hücresi stereosiliya hasarı ile korele değildir. Kalıcı eşik değişikliği ve iç tüy hücresi kaybı, iç tüy hücresi stereosiliya hasarı veya sinir lifi kaybı arasında korelasyon yoktur. Harding ve ark. (2002), korti organının apikal yarısında dış tüy hücresi kaybı %10'u geçene kadar kalıcı eşik değişikliği gözlemlenemediklerini bildirmişlerdir (75).

Harding ve ark. (2002) çalışmalarında, gürültüye maruziyetten 10 gün sonra az sayıda tüy hücresi kaybı bulunduğunu fakat kalıcı eşik değişikliği olmadığını belirtmişlerdir. Maruziyetten 13 gün sonra ise %100 dış tüy ve iç tüy hücresi ve %85 sinir lifi kaybını içine alan, 6 kHz'te 0,38mm fokal lezyon tespit etmişlerdir (75).

Normal dış tüy hücrelerinde, mitokondri sitoplazmada dağılmış, membranlar ve krista normal görünümündedir. Park ve ark. (2012) çalışmalarında, gürültüye maruziyetten 1 saat sonra bulguların normal kontrol grubu ile aynı olduğunu belirtmişlerdir. Ancak daha uzun süre gürültüye maruz kalan diğer gruplarda elektron mikroskopide birkaç anormallik gözlemlenmiştir. Gürültüye maruziyetten sonra bu gruplarda intraselüler kofullaşma gözlenmiş ve mitokondri membranı şişkin ve kısmen kaybolmuştur. Bazı mitokondrilerde yoğun partiküller gözlemlenmişlerini bildirmişlerdir (1).

Xiong ve ark. (2011) çalışmalarında, şiddetli gürültüye maruz kalmayan gruplarda spiral ganglionda Cas-3 için immunoreaktivite bulamadıklarını, şiddetli gürültüye maruz kalan gruplarda ise spiral ganglionda Cas-3 için güçlü immunoreaktivite gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Elektron mikroskopide gürültüye

maruz kalmayan gruplardaki hayvanların tüy hücrelerinde görünür morfolojik değişim bulamadıklarını, normal görünen sağlam stereosilyalı tüy hücresi sırasının kokleanın her kıvrımında gözlendiğini kanıtlamışlardır. Ancak gürültüye maruz kalan grupta ise kokleanın ikinci ve bazal kıvrımında büyük oranda stereosilyalı dış tüy hücresi kaybı gözlendiğini, hasarın çoğunun tüy hücrelerinin ilk ve ikinci sırasında gözlendiğini, iç tüy hücrelerinin koklea boyunca morfolojik bütünlüğü koruduğunu belirtmişlerdir (7).

Cui ve ark. (2011) çalışmalarında, kullandıkları histolojik materyalden kaynaklı olarak gürültüye maruziyet sonrası stereosilya hasarı meydana gelip gelmediğini doğrulayamadıklarını ifade etmişlerdir. Sadece apikal kıvrımda fibrosit kaybı olmasına rağmen 4, 8 ve 16 kHz'te ileri derecede işitme kaybı bulmuşlardır (28).

Choi ve ark. (2011)'nin yaptıkları çalışmada gruplar: (grup 1: gürültü+saline, 24 saat gecikmeli, 9 günlük tedavi), (grup 2: gürültü+3 ilaç kombinasyonu, 48 saat gecikmeli, 3 günlük tedavi), (grup 3: gürültü+3 ilaç kombinasyonu, 48 saat gecikmeli, 8 günlük tedavi), (grup 4: gürültü+3 ilaç kombinasyonu, 24 saat gecikmeli, 3 günlük tedavi), (grup 5: gürültü+3 ilaç kombinasyonu, 24 saat gecikmeli, 9 günlük tedavi) şeklinde belirlenmiştir. Gürültüye maruziyet sonrası ortalama dış tüy hücresi kaybının grup 3, 4 ve 5'te grup 1'e göre önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Grup 5'te ortalama dış tüy hücresi kaybının grup 2, 3 ve 4'e göre önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak dış tüy hücresi kaybı oranının yüksek frekanslarda (2-8 kHz), tedavi gecikmeli (24-48 saat) ve farklı tedavi süreli (3 ve 8-9 gün) deneysel gruplar için ortalaması alınmıştır. 24 saatlik tedavi gecikmesi olan deneysel gruplar için ortalama dış tüy hücresi kaybının grup 1 ile karşılaştırıldığında önemli oranda azaldığı gözlenmiştir ve azalma miktarı %58'dir. Ancak grup 1 ile karşılaştırıldığında 48 saatlik tedavi gecikmesi olan deneysel gruplarda ortalama dış tüy hücresi kaybında önemli farklılık tespit edilmemiştir ve azalma miktarı %28'dir. Grup 1 ve 3 günlük tedavi süresi olan deneysel gruplar 8-9 günlük tedavi süresi olan deneysel gruplar ile karşılaştırıldığında ortalama dış tüy hücresi kaybının önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir ve azalma miktarı %25-63'tür (45).

Cui ve ark. (2011), apoptozisten kaynaklı olarak spiral limbustaki fibrositlerin gürültüye bağlı olarak yok olup olmadığını belirlemek için çalışmalarında kullandıkları her grubun kokleasını DNA ve TUNEL metodu ile analiz etmişlerdir. Gürültüye maruziyetten sonra 12 ve 24. saatlerde sadece apikal kıvrımda spiral limbusta hücreler bulmuşlardır (28).

Literatürde akustik travmaya karşı koruyucu etkisinde antioksidanların optimal alım zamanları hakkında farklı görüşler bildirilmiştir. Düzeltici bileşenlerin akustik travmadan önce, travmadan hemen sonra veya maruziyetten sonraki 5 gün içinde kullanılabileceği bildirilmiştir (4).

Tedavi gecikmesi gürültüye maruziyetten sonra 48 saatten 24 saate düşerse ortalama eşik değışikliğı ve dış tüy hücresi kaybı anlamlı şekilde azalır. Tedavi süresi 3 günden 8-9 güne uzadığında ortalama eşik değışikliğı ve dış tüy hücresi kaybı anlamlı şekilde azalır. Tedavinin maksimum etkinliğinin gürültüye maruziyetten 24 saat sonra tedaviye başlanan, 9 gün tedavi edilen deneysel grupta maksimum olduğu gözlenmiştir. Bu veriler farmakolojik terapinin 24 saat içinde başlamasını ve gürültüye maruziyetten sonraki 10 gün boyunca devam etmesinin chinchilla modelinde akut akustik travma tedavisinde etkili olabileceğini kanıtlamıştır (45). Çalışmamızda gürültüye maruz bırakılan gruptaki ratlara maruziyetten 24 saat sonra 70mg/kg/gün metformin 14 gün boyunca oral gavaj yolu ile verilmiştir. 14. gün yapılan DPOAE ve ABR sonuçlarında ve biyokimyasal parametrelerde metformin verilmeyen sadece gürültüye maruz bırakılan gruptaki ratlara göre anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir.

Literatürde antioksidan ilaçların terepatik etkilerinin tedavinin zamanlaması ve süresine bağlı olduğu ve terepatik etki penceresinin gürültüye maruziyetten sonraki 1-4 saatte ortaya çıktığı bildirilmiştir. Her bir antioksidan ajanın hedefinin ve etkisinin farklı yaralanma mekanizmaları ile akut akustik travmayı tedavi etmesi ve önlemesine rağmen diğer antioksidan ajanlar ile kombinasyonunda etkinliğinin maksimum olabileceği bildirilmiştir (45).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda 32 adet sprague dawley dişi rat kullanılmış ve bu ratların 16 tanesinde gürültüye bağlı işitme kaybı oluşturulmuştur. GBİK oluşturulan ratlardan 8 tanesine 70mg/kg/gün metformin 14 gün boyunca oral gavaj yolu ile verilmiştir. Ratlara gürültüye maruziyet öncesi ve gürültüye maruziyet sonrası 1, 7 ve 14. günlerde tekrar objektif odyolojik testler (DPOAE ve ABR) yapılmıştır. 14. günün sonunda tüm ratlardan intrakardiyak kan örnekleri alınmış, ratların kokleaları eksize edilmiş ve biyokimyasal ve histolojik inceleme yapılmıştır.

Değerlendirme sonucunda:

- 1- GBİK oluşturulan ve 14 gün boyunca 70mg/kg/gün metformin verilen grupta, metformin verilmeyen gruba göre DPOAE ve ABR değerlerinde anlamlı düzelme elde edilmiştir.
- 2- Gürültüye maruz bırakılmayan, sadece metformin verilen grupta DPOAE ve ABR değerlerinde bazal ölçüm sonuçlarına göre farklılık gözlenmemiştir.
- 3- DNA hasarı miktarı gürültüye maruz bırakılan fakat metformin verilmeyen grupta daha yüksek bulunmuştur.
- 4- TAS değeri gürültüye maruz bırakılan ve metformin verilen grupta, gürültüye maruz bırakılan fakat metformin verilmeyen gruba göre daha yüksek bulunmuştur.
- 5- TOS ve OSI değerleri gürültüye maruz bırakılan fakat metformin verilmeyen grupta en yüksek bulunmuştur. Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır.
- 6- Cox-2 enzimi, IL-6, IL-1 β ve TNF- α değerleri gürültüye maruz bırakılan fakat metformin verilmeyen grupta daha yüksek bulunmuştur.
- 7- HSF-1 proteini gürültüye maruz bırakılan fakat metformin verilmeyen grupta daha düşük bulunmuştur.

8- Işıık mikroskopu ile yapılan histolojik incelemede gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Hiçbir grupta Caspase-3 gözlenmemiştir.

İşitme kaybı iletişim ve yaşam kalitesini etkileyen önemli bir handikaptır. Gürültüye maruziyet mesleki yaralanmaların başında gelmekle birlikte özellikle gençlerde yüksek sesle müzik dinleme sonucu da işitme kaybı oluşabilmektedir. Yüksek sese maruziyetin işitme kaybının dışında tinnitus ve hiperakuziye de neden olduğu bilinmektedir.

Gürültüye bağılı işitme kayıplarının önlenmesinde kulak koruyucuların kullanılması ile birlikte antioksidan ajanların kullanımı da günümüzde ön plana çıkmaktadır. Profilaktik tedavinin yanı sıra antioksidan ajanların gürültüye maruziyet sonrası erken dönemde kullanımının gürültüye bağılı işitme kayıplarının iyileştirilmesinde faydalı olabilecekleri kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak;

- ✓ Ratlarda korti organının çok ince olması ışık mikroskopik düzeyde incelemeyi zorlaştırmaktadır. Tüy hücrelerindeki özellikle silyum yapıları ve organel düzeyinde değışiklikler elektron mikroskopi ile ayrıntılı olarak görülebilir. Bu nedenle, deneysel çalışmalarda ışık mikroskopu yerine elektron mikroskopu kullanımının çalışmaların niteliğini artıracakğı ve literatüre daha fazla katkı sağlayacakğı,
- ✓ Metformin'in gürültüye bağılı işitme kayıplarını önleyici ve iyileştirici etkisinin belirlenebilmesi amacıyla farklı dozlarda Metformin kullanımının literatüre katkı sağlayacakğı,
- ✓ Farklı antioksidan türevlerinin Metformin ile kombine kullanımının GBİK tedavisinde yararlı olabileceğı,
- ✓ Gürültüye bağılı işitme kaybına ek olarak tinnitus ve hiperakuziye sahip olan bireylerde Metformin tedavisinin yararlı olabileceğı,
- ✓ GBİK açısından risk altında olan bireylerde toplumun bilinçlendirilmesi ve kulak koruyucu kullanımının yanı sıra profilaktik antioksidan ajanların kullanımının gürültüye bağılı işitme kaybı oranını azaltacakğı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Park MH, Lee HS, Song JJ, Chang SO, Oh S. "Increased activity of mitochondrial respiratory chain complex in noise-damaged rat cochlea," *Acta Otolaryngol.*, vol. 132, pp. 134–141, 2012.
2. Nakashimaa T, Naganawab S, Sonea M, Tominagaa M, Hayashia H, Yamamotoa H, Liua X. "Disorders of cochlear blood flow," *Brain Res. Rev.*, vol. 43, pp. 17–28, 2003.
3. Chen G, Sheppard A, Salvi R. "Noise trauma induced plastic changes in brain regions outside the classical auditory pathway," *Neuroscience*, vol. 315, pp. 228–245, 2016.
4. Aksoy F, Dogan R, Yenigun A, Veyseller B, Ozturan O, Ozturk B. "Thymoquinone treatment for inner-ear acoustic trauma in rats," *J. Laryngol. Otol.*, vol. 129, no. 1, pp. 38–45, Jan. 2015.
5. Li H, Wang Q, Steyger PS. "Acoustic trauma increases cochlear and hair cell uptake of gentamicin," *Plos One*, vol. 6, no. 4, 2011.
6. Taneja MK. "Noise-induced hearing loss," *Indian J. Otol.*, vol. 20, no. 4, pp. 151–155, 2014.
7. Xiong M, He Q, Lai H, Wang J. "Oxidative stress in spiral ganglion cells of pigmented and albino guinea pigs exposed to impulse noise," *Acta Otolaryngol.*, vol. 131, no. 9, pp. 914–920, 2011.
8. Clarke JD, Dzierlengs AL, Nelson NR, Li H, Werts S, Goedken MJ, Cherrington NJ. "Mechanism of altered metformin distribution in nonalcoholic steatohepatitis," *Diabetes*, vol. 64, no. 9, pp. 3305–3313, 2015.
9. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, B. Sherwin R, Zinman B. "Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of

therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.,” *Diabetes Care*, vol. 32, pp. 193–203, 2009.

10. Moller AR. “Anatomy of the Ear,” in *Hearing*, Second., Texas: Elsevier, 2006, pp. 3–16.
11. Seikel JA, King DW, Drumright DG. “Anatomy of Hearing,” in *Anatomy&Physiology for Speech, Language and Hearing*, 4th Ed. Bellegarde M. (ed). 2010, pp. 447–478.
12. Hall JE, “İşitme Duyusu,” in *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji (Medical Physiology)*, 12. Baskı. Yeğen BÇ, Aican İ, Solakoğlu Z. (editörler). Nobel Tıp, 2013, pp. 633–644.
13. Gelfand SA. “Anatomy and Physiology of the Auditory System,” in *Essentials of Audiology*, 2nd Ed. New York: Thieme, 2001, pp. 37–90.
14. Martin FN, Clark JG. “The Inner Ear,” in *Introduction to Audiology*, 8th Ed. Dragin SD. (ed), United States of America, 2003, pp. 274–311.
15. Moller AR, “Physiology of the Cochlea,” in *Hearing*, 2nd Ed. Texas: Elsevier, 2006, pp. 41–56.
16. Seikel JA, King DW, Drumright DG. “Auditory Physiology,” in *Anatomy&Physiology for Speech, Language and Hearing*, 4th. Ed. Bellegarde M. (ed). USA, 2010, pp. 479–520.
17. Henderson D, Bohua H, Bielefeld E. “Patterns and Mechanisms of Noise-Induced Cochlear Pathology,” in *Auditory Trauma, Protection and Repair*, Schacht J, Popper AN, Fay RR. (eds) USA: Springer, 2008, pp. 195–218.
18. Wangemann P, “Cochlear Homeostasis and Homeostatic Disorders,” in *Auditory Trauma, Protection and Repair*, Schacht J, Popper AN, Fay RR. (eds) USA: Springer, 2008, pp. 49–100.

19. Suzuki M, Tatsuya Y, Kaga K. "Development of the blood-labyrinth barrier in the rat," *Hear. Res.*, vol. 116, pp. 107–112, 1998.
20. Suzuki M, Tatsuya Y, Toshio I, Josef M, Kaga K. "Effect of noise exposure on blood-labyrinth barrier in guinea pigs," *Hear. Res.*, vol. 164, pp. 12–18, 2002.
21. Lamm K, Arnold W. "The effect of blood flow promoting drugs on cochlear blood flow, perilymphatic pO₂ and auditory function in the normal and noise-damaged hypoxic and ischemic guinea pig inner ear," *Hear. Res.*, vol. 141, pp. 199–219, 2000.
22. Chen W, Wang J, Chen J, Chen J, Chen Z. "Relationship between changes in the cochlear blood flow and disorder of hearing function induced by blast injury in guinea pigs," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 6, no. 3, pp. 375–384, 2013.
23. Hu B. "Noise-Induced Structural Damage to the Cochlea," in *Noise-Induced Hearing Loss*, Le Prell CG, Henderson D, Fay RR, Popper AN. (eds). London: Springer, 2012, pp. 57–86.
24. Erdoğan A, "Gürültüye Bağlı İşitme Kayıpları," içinde *Temel Odyoloji*, 1. Baskı Belgin E, Şahlı S. (editörler). Ankara: Güneş Tıp, 2015, pp. 383–404.
25. Kurabi A, Keithley EM, Housley GD, Ryan AF, Wong Y. "Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss," *Hear. Res.*, pp. 1–9, 2016.
26. Sataloff RT, Sataloff J. "Classification and Measurement of Hearing Loss," in *Occupational Hearing Loss*, 3rd Ed. Sataloff RT, Sataloff J. (eds). New York, 2006, pp. 47–70.
27. Le Prell CG, Bao J. "Prevention of Noise-Induced Hearing Loss: Potential Therapeutic Agents," in *Noise-Induced Hearing Loss*, Le Prell CG, Henderson D, Fay RR, Popper AN. (eds) London: Springer, 2012, pp. 285–338.

28. Cui Y, Sun GW, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujui M, Kaga K, Owaga K. "Acoustic overstimulation-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlear spiral limbus of mice," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 268, no. 7, pp. 973–978, 2011.
29. Jankauskas SS, Plotnikov EY, Morosanov MA, Pevzner IB, Zorova LD, Skulackov VP, Zorov DB. "Mitochondria Targeted Antioxidant SkQR1 Ameliorates Gentamycin Induced Renal Failure and Hearing Loss," *Biochemistry(Moscow)*, vol. 77, pp. 666–670, 2012.
30. Lu J, Li W, Du X, Ewer DL, West MB, Steawert C, Floyd RA, Kopke RD. "Antioxidants reduce cellular and functional changes induced by intense noise in the inner ear and cochlear nucleus," *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 15, no. 3, pp. 353–372, 2014.
31. Yenigun A, Aksoy F, Dogan R, Yilmaz F, Veyseller B, Ozturan O, "Medical ozone therapy for the inner ear acoustic trauma," *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 77, pp. 1512–1517, 2013.
32. Salvi RJ. "Regeneration and Repair," in *Hair Cell Regeneration, Repair and Protection*, Salvi RJ, Popper AN, Fay RR. (eds). USA: Springer, 2008, pp. 1–38.
33. Green SH, Altschuller RA, Miller JM. "Cell Death and Cochlear Protection," in *Auditory Trauma, Protection and Repair*, Schacht J, Popper AN, Fay RR. (eds) USA: Springer, 2008, pp. 275–320.
34. Colombari GC, Rossato M, Feres O, Hyppolito MA. "Effects of hyperbaric oxygen treatment on auditory hair cells after acute noise damage," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 268, no. 1, pp. 49–56, 2011.
35. Zheng Y, Smithies H, Aitken P, Gliddon C, Stiles L, Darlington CL, Smith PF. "Cell proliferation in the cochlear nucleus following acoustic trauma in rat," *Neuroscience*, vol. 303, pp. 524–534, 2015.

36. Dong S, Mulders WHAM, Rodger J, Woo S, Robertson D. "Acoustic trauma evokes hyperactivity and changes in gene expression in guinea-pig auditory brainstem," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 31, no. 9, pp. 1616–1628, 2010.
37. Mulders WHAM, Robertson D. "Development of hyperactivity after acoustic trauma in the guinea pig inferior colliculus," *Hear. Res.*, vol. 298, pp. 104–108, 2013.
38. Mulders Wham, Robertson D. "Hyperactivity in the auditory midbrain after acoustic trauma: dependence on cochlear activity," *Neuroscience*, vol. 164, pp. 733–746, 2009.
39. Lau C, Zhang JW, McPherson B, Pienkowski M, Wu EX. "Long-term, passive exposure to non-traumatic acoustic noise induces neural adaptation in the adult rat medial geniculate body and auditory cortex," *Neuroimage*, vol. 107, pp. 1–9, 2015.
40. Janjua A, Waheed A, Bakhtiar S. "Protective effect of metformin against gentamicin induced nephrotoxicity in rabbits," *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. 27, no. 6, pp. 1863–1872, 2014.
41. Trombini AB, Franko C, Miranda RA, Oliveira JC, Barella LF, Prates KV, Souza AA, Pavanello A, Malta A, Almeida DL, Tofolo LP, Rigo KP, Ribeiro T, Fabricio GS, Sant'Anna JR, Castro-Prado M, Souza HM, Morais H, Pathias P. "Early treatment with metformin induces resistance against tumor growth in adult rats.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 16, no. 6, pp. 958–64, 2015.
42. Mujica-Mota M. "Otoprotection of Metformin in Radiation-Induced Sensorineural Hearing Loss," 2012.
43. Lomax MI, Gong TW, "Genes That Influence Susceptibility to Noise-Induced Hearing Loss," in *Noise-Induced Hearing Loss*, Le Prell CG, Henderson D, Fay RR, Popper AN. (eds) London: Springer, 2012, pp. 179–204.

44. Tziridis K, Korn S, Ahlf S, Schulze H. "Protective Effects of Ginkgo biloba Extract EGb 761 against Noise Trauma-Induced Hearing Loss and Tinnitus Development," *Neural Plast.*, pp. 1–27, 2014.
45. Choi CH, Chen K, Du X, Floyd RA, Kopke RD, "Effects of delayed and extended antioxidant treatment on acute acoustic trauma," *Free Radic. Res.*, vol. 45, no. 10, pp. 1162–1172, 2011.
46. Le Prell CG, Hughes LF, Miller JM. "Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 42, no. 9, pp. 1454–1463, 2007.
47. Pryor R, Cabreiro F. "Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets," *Biochem. J.*, vol. 471, pp. 307–322, 2015.
48. Ergün Y. "Hayvan Deneylerinde Etik," *ARŞİV 2010; 19 220*, vol. 19, pp. 220–235, 2010.
49. Özkul T. "Deney Hayvanlarının Kullanımında Genel Mevzuat, Düzenleme ve Kurallar," *J. Clin. Anal. Med.*, pp. 1–4.
50. Soylu SM. "Rat Fizyolojisi," *J. Clin. Anal. Med.*, pp. 22–25.
51. Wysocki J. "Topographical anatomy and measurements of selected parameters of the rat temporal bone," *Folia Morphol.*, vol. 67, pp. 111–119, 2008.
52. Alsaleh S, Blakley BW, Meen E, Dewji Z. "Addressing animal model issues in auditory research," *J. Otolaryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 40, no. Suppl. 1, pp. 41–45, 2011.
53. Bahri E, Salgırlı Y. "Deneklerin Fizyolojik Özellikleri ve Deneysel Çalışmalarda Model Oluşturmadaki Zorlukları," *J. Clin. Anal. Med.*, pp. 26–32.
54. Alvarado JC, Santamaria VF, Flores TJ, Blanco JL, Juiz JM. "Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR)

waveforms: a study in wistar rats,” *Neuroscience*, vol. 73, pp. 302–311, 2012.

55. Aimee W. “The characterization of distortion product otoacoustic emissions in the Sprague-Dawley rat during development,” *Progr. Audiol. Commun. Sci.*, 2002.
56. Atar Y, Topaloğlu İ, Saltürk Z, Hilmi U. “Sağlıklı erişkin sıçanlarda işitmenin distorsiyon ürünü otoakustik emisyon ölçüm yöntemiyle değerlendirilmesi,” *Genel Tıp Derg*, vol. 21(4), pp. 131–136, 2011.
57. Ruebhausen MR, Brozoski TJ, Bauer CA. “A comparison of the effects of isoflurane and ketamine anesthesia on auditory brainstem response (ABR) thresholds in rats,” *Hear. Res.*, vol. 287, pp. 25–29, 2012.
58. Bures Z, Grecova J, Popelar J, Syka J. “Noise exposure during early development impairs the processing of sound intensity in adult rats,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 32, pp. 155–164, 2010.
59. Melichar I, Syka J, Ulehlová L. “Recovery of the endocochlear potential and the K⁺ concentrations in the cochlear fluids after acoustic trauma,” *Hear. Res.*, vol. 2, pp. 55–63, 1980.
60. Sohmer H, Kinarti R, Gafni M. “The source along the basilar membrane of the cochlear microphonic potential recorded by surface electrodes in man. Electroencephalography,” *Cinical Neurophysiol.*, vol. 49, pp. 506–514, 1980.
61. Sugisawa T, Ishida A, Hotta S, Yamamura K. “The effect of 6 kHz tone exposure on inner ear function of the guinea pig: relation to changes in cochlear microphonics, action potential, endocochlear potential and chemical potentials of K⁺-ions and Na⁺-ions, using a double-barrel glass electrode,” *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 251, pp. 154–159, 1994.

62. Liberman MC, Dodds LW, "Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. II. Stereocilia damage and alterations of spontaneous discharge rates.," *Hear. Res.*, vol. 6, pp. 43–53, 1984.
63. Liberman MC, Kiang NYS. "Acoustic trauma in cats: cochlear pathology and auditory-nerve activity.," *Acta Otolaryngol.*, vol. 358, pp. 5–63, 1978.
64. Eldredge DH, Mills JH, Bohne BA, "Anatomical, behavioral, and electro-physiological observations on chinchillas after long exposures to noise.," *Adv. Otorhinolaryngol.*, vol. 20, pp. 64–81, 1973.
65. Papesh MA, Hurley LM. "Plasticity of serotonergic innervation of the inferior colliculus in mice following acoustic trauma," *Hear. Res.*, vol. 283, no. 1–2, pp. 89–97, 2012.
66. Kujawa SG, Liberman MC. "Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after 'temporary' noise-induced hearing loss.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 29, pp. 14077–14085, 2009.
67. Wang Y, Ren C. "Effects of repeated 'benign' noise exposures in young CBA mice: shedding light on age-related hearing loss.," *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 13, pp. 505–515, 2012.
68. Al Mana D, Ceranic B, Djahanbakhch O, Luxon LM. "Hormones and the auditory system: a review of physiology and pathophysiology.," *Neuroscience*, vol. 153, pp. 881–900, 2008.
69. Ban JH, Jin SM. "A clinical analysis of psychogenic sudden deafness.," *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 134, pp. 970–974, 2006.
70. A. Fowler, E.P., Zeckel, "Psychosomatic aspects of Meniere's disease.," *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 148, pp. 1265–1268, 1952.
71. Hebert S, Lupien SJ. "The sound of stress: blunted cortisol reactivity to psychosocial stress in tinnitus sufferers.," *Neurosci. Lett.*, vol. 411, pp. 138–142, 2007.

72. Mazurek B, Haupt H, Joachim R, Klapp BF, Stöver T, Szczepek AJ. "Stress induces transient auditory hypersensitivity in rats," *Hear. Res.*, vol. 259, no. 1–2, pp. 55–63, 2010.
73. Chen GD, Fechter LD. "The relationship between noise-induced hearing loss and hair cell loss in rats.," *Hear. Res.*, vol. 177, pp. 81–90, 2003.
74. Strose A, Colombari GC, Rossato M, Hyppolito MA, De Oliveira JAA. "Gentamicin conditioning confers auditory protection against noise trauma," *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 271, no. 10, pp. 2641–2648, 2014.
75. Harding GW, Bohné BA, Ahmad M. "DPOAE level shifts and ABR threshold shifts compared to detailed analysis of histopathological damage from noise," *Hear. Res.*, vol. 174, pp. 158–171, 2002.
76. White DR, Boettcher FA, Miles LR, Grantton MA. "Effectiveness of intermittent and continuous acoustic stimulation in preventing noise-induced hearing and hair cell loss.," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 103, pp. 1566–1572, 1997.
77. Fernandez EA, Ohlemiller KK, Gagnon PM, Clark WW. "Protection against noise-induced hearing loss in young CBA/J mice by low-dose kanamycin.," *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, vol. 11, pp. 235–244, 2010.
78. Clark WW, Bohné BA. Effect of periodic rest on hearing loss and cochlear damage following exposure to noise. *J Acoust Soc Am* 82:1253–1264," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 82, pp. 1253–1264, 1987.
79. Guigas B, Demaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Leverve X. "Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: A pharmacological in vitro study.," *Biochem. J.*, vol. 382, pp. 877–884, 2004.

80. Morales AI, Demaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arevalo M, Leverve X, Lopez-Novoa JM, El-Mir MY. "Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int.*," *Kidney Int.*, vol. 77, pp. 861–866, 2010.
81. Beeson CC, Beeson GC, Schnellmann RG. "A high-throughput respirometric assay for mitochondrial biogenesis and toxicity. *Anal Biochem.*," *Anal. Biochem.*, vol. 404, pp. 75–81, 2010.
82. Venna VR, Li J, Hammond MD, Mancini NS, McCullough LD. "Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 39, no. 12, pp. 2129–2138, 2014.
83. Sjostrand AP, Dogan R, Kocyigit A, Karatas E, Budak BB, Ozturan O. "Therapeutic efficacy of Ginkgo biloba for early-period noise-induced hearing loss: An experimental animal study," *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.*, vol. 37, no. 5, pp. 2–10, 2016.
84. Yuan BC, Su FM, Wu WT. "A predictive model of the association between gene polymorphism and the risk of noise-induced hearing loss caused by gunfire noise," *J. Chinese Med. Assoc.*, vol. 75, pp. 36–39, 2012.
85. Rybalko N, Chumak T, Bures Z, Popelár J, Suta D, Syka J. "Development of the acoustic startle response in rats and its change after early acoustic trauma," *Behav. Brain Res.*, vol. 286, pp. 212–221, 2015.
86. Sekiya T, Viberg A, Kojima K, Sakamoto T, Nakagawa T, Ito J, Canlon B. "Trauma-specific insults to the cochlear nucleus in the rat," *J. Neurosci. Res.*, vol. 90, no. 10, pp. 1924–1931, 2012.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Karar Metni



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2015/ 143
KONU: Sn. Öğr. Gör. Özge GEDİK

19.06.2015

Sayın Öğr. Gör. Özge GEDİK,

“Metformin’in ratlarda gürültüye bağlı oluşan işitme kaybını önleyici etkisinin odyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerle değerlendirilmesi” başlıklı projeniz 19.06.2015 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkan Vek.

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Prof. Dr. Serdar ÜŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Nasuhi GÜNAY
Üye

Hakan AKTÜRK
Üye

KATILMADI

KATILMADI

KATILMADI

- Etik kurumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2017/255
KONU: Sn. Öğr. Gör. Özge GEDİK

23.11.2017

Sayın, Öğr. Gör. Özge GEDİK

“Metformin’in ratlarda gürültüye bağlı oluşan işitme kaybını önleyici etkisinin odyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerle değerlendirilmesi” başlıklı projenize ait dilekçeniz 23.11.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve proje başlığınızın “Metformin’in ratlarda gürültüye bağlı oluşan işitme kaybını iyileştirici etkisinin odyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerle değerlendirilmesi” olarak değiştirilmesi talebiniz onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

KATILMADI

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Şerife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurumumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

Ek 2. Biyokimyasal analizde kullanılan malzemelerin marka ve modelleri

Malzeme	Marka	Model
Santrifüj	Hermle	Z326R
Derin dondurucu	Arçelik	2354 A+D
Dikey Jel	Bio-rad	Mini Protean Tetracell
Isıtma Tablosu	IKA	C-MAG HS 7
İnkübatörlü Çalkalayıcı	Stuart	SI500
Steril Kabin	Biosafety Cabinet	Class II
Çeker ocak	Assist Lab	Standart çeker ocak
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat	Fx 7
Otoklav	Nüve	BM 15/30
PZR Cihazı	Applied Biosystems®	Veriti® Thermal Cyclers
Su Banyosu	Nüve	BM 15/30
Şırınga Filtreleri	Santa Cruz	UltraCruz ® Syringe Filter, MCE
Ultrasonikatör	Engineer Live	UIP1000
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1800
Yatay Jel Elektrophorez Sistemi	Bio-Rad	The Mini-Sub® cell GT
Otomatik Pipetler	Axygen	
Buz Makinası	Scotsman	AF80
Distle Su Cihazı	Nüve	ND 12
Deiyonize Su Cihazı	Merck Millipore	Milli-Q Integral
Isıtıcı Blok	Stuart	SBH130
pH Metre	Hanna	HI 2209
KCI	Merck	
KH ₂ PO ₄	Merck	
Lizozim	Vivantis	
MnCl ₂	Merck	
Acrylamide	Sigma	
BisAcrylamide	Sigma	
NaAc	Merck	
NaCl	Merck	
Proteinaz K	Life	
SDS (Sodium Dotesil Sulfate)	Sigma	
T4 DNA Ligaz Tampon	Life	
TEMED	Sigma	
Trisma Base	Sigma	
Trisma HCl	Sigma	
H ₂ SO ₄	Sigma	
HCl	Sigma	
Triton X 100	Sigma	
Tween – 20	Sigma	
NaOH	Merck	
Asetik asit	Merck	

Ek 3. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Özge GEDİK
Doğum tarihi	: 06.01.1985
Doğum yeri	: Osmaniye
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: TC
Adres	: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Odyoloji Bölümü Fatih/İstanbul
Tel	: 0507 4572108
Faks	:
E-mail	: ozgedik1@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Osmaniye Anadolu Lisesi
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümü
Yüksek lisans	: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Programı
Doktora	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Programı
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türkiye Odyoloji, Konuşma ve Ses Uzmanları Derneği,	