

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ-BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER, TİMOKİNON VE OKSİTOSİNİN
GENTAMİSİN OTOTOKSİSİTESİNE KARŞI POTANSİYEL
KORUYUCU ETKİLERİNİN ANALİZİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

Dr. Fuat AYDEMİR

UZMANLIK TEZİ

KONYA 2019

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ-BOYUN CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTER, TİMOKİNON VE OKSİTOSİNİN
GENTAMİSİN OTOTOKSİSİTESİNE KARŞI POTANSİYEL
KORUYUCU ETKİLERİNİN ANALİZİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

Dr. Fuat AYDEMİR

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Çağatay Han ÜLKÜ

KONYA 2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, tezimin hazırlanması sürecinde de katkılarını esirgememiş olan tez danışmanım Prof. Dr. Çağatay Han Ülkü' ye

Destekleriyle her zaman yanımda olan değerli hocalarım: Prof. Dr. Hamdi Arbağ' a, Doç. Dr. Mehmet Akif Eryılmaz' a, Doç. Dr. Mitat Arıcıgil'e ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif Dündar'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışmada katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem Elmas ve Arş. Gör. Dr. Cemile Merve Seymen' e teşekkürlerimi sunarım.

Klinikte beraber çalışmaktan mutlu olduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve klinik personeline teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca sevgi ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Odm. Betül Aydemir'e ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mart 2019

Dr. Fuat AYDEMİR

ÖZET

Kafeik Asit Fenetil Ester, Timokinon ve Oksitosinin Gentamisin Ototoksisitesine Karşı Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Analizi: Deneysel Çalışma

Dr. Fuat AYDEMİR

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2019

Amaç: Bu çalışmada gentamisin ile hayvan modelinde oluşturulan sensörinöral işitme kaybına, kafeik asit fenetil ester (CAPE), timokinon ve oksitosinin potansiyel koruyucu etkilerini araştırmak ve bu sayede ileride ototoksisite ve sensörinöral işitme kaybı tedavisi için yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara kaynak oluşturmak amaçlanmaktadır.

Yöntem: 50 tane Wistar Albino soyu rat 10 denekten oluşan 5 gruba rastgele seçim metoduna göre ayrıldı. Grup I kontrol grubu olarak belirlendi. Grup II 'ye gentamisin, Grup III' e gentamisin ve kafeik asit fenetil ester (CAPE), Grup IV' e gentamisin ve timokinon, Grup V' e ise gentamisin ve oksitosin uygulandı. Her grubun anestezi altında tedavi öncesi ve tedavi sonrası ABR ve DPOAE Testleri ile işitme eşikleri ölçüldü. Çalışma sonunda tüm ratlara anestezi altında ötanazi uygulanarak kokleaları çıkartıldı ve elektron mikroskopik inceleme yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızda elektrofizyolojik test (DPOAE, BİUP) ve elektron mikroskopik inceleme sonuçlarımıza göre gentamisin ile ototoksisite oluştu. Kafeik asit fenetil esterinin gentamisin ototoksisitesine karşı hem işitsel hem de hücresel düzeyde koruyucu etkisi olduğu görüldü. Gentamisin ototoksisitesine karşı timokinonun işitsel düzeyde koruyucu olduğu ve oksitosinin ise hücresel düzeyde koruyucu etkilerinin olduğu izlendi.

Sonuç: Kafeik asit fenetil esterinin koruyucu etkisinin güçlü antioksidan özelliğinden kaynaklandığını ve gentamisinin ototoksik etkisini azaltabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Gentamisin, kafeik asit fenetil ester, timokinon, oksitosin, ototoksisite

Bu tez Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından “171518005” proje numarası ile desteklenmiştir.



ABSTRACT

Analysis of Potential Protective Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester, Timokinon and Oxytocin against Gentamycin Ototoxicity: An Experimental Study

Aim: In this study, it is aimed to investigate the potential protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), thymokinon and oxytocin on sensorineural hearing loss made with gentamicin in animal model and to provide a source for experimental and clinical studies to be performed in the future for the treatment of ototoxicity and sensorineural hearing loss.

Methods: 50 Wistar Albino rats were divided into 5 groups consisting of 10 subjects according to random selection research method. Group I was determined as control group. Gentamicin was administrated to Group II, gentamicin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) to Group III, gentamicin and thymokinone to Group IV, and gentamicin and oxytocin to Group V. The hearing evaluation of all rats were tested under anesthesia with DPOAE and ABR before and after study. And the end of the study, euthanasia was performed under general anesthesia in all rats, and cochleas of all rats were removed and electron microscopic examination was performed.

Results: In our study according to outcomes of electrophysiological test (DPOAE, ABR) and electron microscopic examination ototoxicity was occurred with gentamicin. Caffeic acid phenethyl ester has a protective effect against gentamicin ototoxicity at both auditory and cellular levels. It was observed that thymokinone was protective for the auditory level and oxytocin had protective effects for cellular level against gentamicin ototoxicity.

Conclusion: We conclude that the protective effect of caffeic acid phenethyl ester is due to its strong antioxidant properties and may decrease the ototoxic effect of gentamicin.

Key words: Gentamicin, caffeic acid phenethyl ester, thymokinone, oxytocin, ototoxicity

İÇİNDEKİLER

Sayfa:

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İç Kulağın Gelişimi.....	3
2.1.1. Membranöz Labirent Gelişimi.....	3
2.1.2. Osseöz Labirent Gelişimi.....	4
2.2. İç Kulak Anatomisi.....	5
2.2.1. Kemik Labirent.....	5
2.2.2. Membranöz Labirent.....	6
2.2.3. Destekleyici Hücreler.....	9
2.2.4. Sensöryal Hücreler.....	10
2.2.5. Koklear İnnervasyon.....	11
2.2.6. Vasküler Yapı.....	12
2.3. İşitme Fizyolojisi.....	12

2.3.1. Kokleanın Elektrik Potansiyelleri.....	16
2.4. Aminoglikozid Ototoksitesisi.....	17
2.4.1. Farmakokinetik.....	17
2.4.2. Ototoksosite Mekanizmaları.....	18
2.4.3. Histopatoloji.....	18
2.4.4. Klinik Bulgular.....	19
2.4.5. Korunma.....	19
2.5. Kafeik Asit Fenetil Ester.....	20
2.5.1. Antioksidan Etkisi.....	21
2.6. Timokinon.....	23
2.6.1. Antioksidan Etkisi.....	23
2.7. Oksitosin.....	25
2.7.1. Antioksidan Etkisi.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Grupların Oluşturulması.....	27
3.2. DPOAE Ölçümü.....	28
3.3. BİUP Ölçümü.....	29
3.4. Koklear Diseksiyon.....	30
3.5. Elektron Mikroskopik İnceleme Yöntemi.....	30
3.6. İstatistiksel Analiz.....	32
4.BULGULAR.....	33
4.1. DPOAE.....	33
4.1.1. Grup I (Kontrol).....	33

4.1.2. Grup II (Gentamisin).....	35
4.1.3. Grup III (Gentamisin+Kafeik Asit Fenetil Ester).....	37
4.1.4. Grup IV (Gentamisin+Timokinon).....	38
4.1.5. Grup V (Gentamisin+Oksitosin).....	40
4.2. BİUP.....	41
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	43
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ.....	61
7. KAYNAKLAR.....	63

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa:</u>
Tablo 4.1: Grup I işlem öncesi ve sonrası SNR oranları	34
Tablo 4.2: Grup II işlem öncesi ve sonrası SNR oranları	35
Tablo 4.3: Grup II - Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması	36
Tablo 4.4: Grup III işlem öncesi ve sonrası SNR oranları	37
Tablo 4.5: Grup III - Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması	38
Tablo 4.6: Grup IV işlem öncesi ve sonrası SNR oranları	39
Tablo 4.7: Grup IV - Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması	39
Tablo 4.8: Grup V işlem öncesi ve sonrası SNR oranları	40
Tablo 4.9: Grup V-Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması	41
Tablo 4.10: Grupların işlem öncesi ve işlem sonrası BİUP ortalamaları	42
Tablo 4.11: Grup I ve II ile diğer gruplar arası işlem sonrası BİUP ortalamalarının karşılaştırılması	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa:</u>
Şekil 2.1: İç kulağın görünümü	5
Şekil 2.2: Reissner membranının üç tabakasını gösteren transmisyon elektron mikrograf	6
Şekil 2.3: Corti organının yapısı	9
Şekil 2.4: Sinüs dalga modeli	13
Şekil 2.5: Baziler membranın tonotopik organizasyonu	14
Şekil 2.6: Baziler membranın ilerleyen dalga hareketi	15
Şekil 2.7: Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.8: Timokinonun kimyasal yapısı	23
Şekil 2.9: Oksitosinin kimyasal yapısı	25

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa:</u>
Resim 3.1: DPOAE ölçümü	29
Resim 3.2: BİUP ölçümü	30
Resim 4.1: Kontrol grubuna ait yarı ince kesit görüntüleri	44
Resim 4.2: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan gruba ait yarı ince kesit görüntüleri	45
Resim 4.3: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve kafeik asit fenetil esteri uygulanan gruba ait yarı ince kesit görüntüleri	46
Resim 4.4: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve timokinon uygulanan gruba ait yarı ince kesit görüntüleri	47
Resim 4.5: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve oksitosin uygulanan gruba ait yarı ince kesit görüntüleri	48
Resim 4.6: Kontrol grubu ve Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan gruba ait ince kesit görüntüleri	49
Resim 4.7: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve kafeik asit fenetil esteri, timokinon ve oksitosin uygulanan gruplara ait ince kesit görüntüleri	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg: Mikrogram

µmol: Mikromol

ABR: Auditory Brainstem Response

AKT: Protein kinaz B

BDMA: Benzyldimethyl amine

BİUP: Beyinsapı işitsel uyarılmış potansiyelleri

C: Santigrat

CAPE: Caffeic Acid Phenethyl Ester

CAT: Katalaz

dB: Desibel

DDSA: Dodecenyl succinic anhydride

DMSO: Dimetilsülfoksit

DPOAE: Distorsiyon product otoacoustic emissions

EDTA: Ethylenediamine tetra acetic acid

GSH: Glutatyon

GST: Glutatyon-S-transferaz

HL: Hearing level

HMC-1: Human mast cell-1

Hz: Hertz

ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1

IL: İnterlökin

JNK: c-Jun N-Terminal Kinaz

K⁺: Potasyum

kg: Kilogram

kHz: Kilohertz

L-NAME: Nitro-L-arginine methyl ester

MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinaz

MCP-1: Monosit kemotaktik protein-1

MDA: Malondialdehit

mg: Miligram

mL: Mililitre

mm: Milimetre

MPO: Myeloperoksidaz

mV: Milivolt

Na⁺ - K⁺ ATPaz: Sodyum potasyum adenozin trifosfataz

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen

NFkB: Nükleer faktör kappa B

NO: Nitrik oksit

NS: Nigella sativa

OH: Hidroksil

OT: Oksitosin

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

RT-PCR: Revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu

SNR: Signal Noise Ratio

SOD: Süperoksit dismutaz

STZ: Streptozotosin

TBHQ: Tertbutilhidroquinon

TEM: Transmisyon elektron mikroskopi

TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa

TQ: Timokinon

XO: Ksantin oksidaz

α : Alfa

β : Beta



1.GİRİŞ-AMAÇ

Bazı ilaç ve kimyasal maddelerin kullanımı nedeniyle gelişen ve iç kulakta genellikle kalıcı olarak ortaya çıkan hasar ototoksisite olarak adlandırılır. Ototoksisiteye neden olabilecek ajanlar; aminoglikozidler, antineoplastik ilaçlar (sisplatin/karboplatin), loop diüretikler, kinin ve salisilatlardır. Aminoglikozid antibiyotikler, klinikte gram negatif bakterilerin neden olduğu çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda kullanılmaktadır. Son yıllarda, gelişmiş ülkelerde, aminoglikozidlerin kullanımı nispeten kısıtlanmıştır. Aminoglikozidlerin kullanımının azalması, diğer geniş spektrumlu antibiyotiklerin gelişimi ve aminoglikozidlerin ciddi yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte kistik fibrozis hastalarında ve üriner sistem enfeksiyonları, tüberküloz ve visseral leishmaniasis gibi birçok enfeksiyon tipinde çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması, aminoglikozidleri sürekli klinik kullanımda tutmuştur. Literatürde aminoglikozid ototoksisitesine karşı birçok ajanın koruyucu etkinliği ile ilgili çalışmalar olsa da kabul edilmiş bir tedavi protokolü halen bulunmamaktadır.

Aminoglikozid ototoksisitesinin altında yatan ana sebebin serbest oksijen radikalleri olduğu düşünülmektedir. Amidoglikozidler non-lipidofilik yapıda olup, tüylü hücre içerisine mekanoelektriksel transdüser kanallar yolu ile girerler (Namura 1990, Marcotti 2005). Daha sonra oluşan aminoglikozid-demir kompleksi, araşidonik asit metabolizmasından oluşan serbest oksijen radikalleri gibi elektron vericileri ile reaksiyona girer. Serbest oksijen radikalleri vasıtasıyla aktive edilen yolaklar sonucunda hücre apoptozise uğramaktadır. Burada kilit rolü serbest oksijen radikalleri oynamaktadır.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir (Heşen 1996). Geleneksel tıpta; anti-inflamatuar, antiviral, antimitojenik, antikarsinojenik, immünmodülatör ve antioksidan etkileri nedeniyle yıllardır kullanılmaktadır. Rat modellerde CAPE uygulamasının böbrek, karaciğer, kalp, akciğer, beyin ve nöral yapılar gibi çeşitli dokularda farklı ajanların neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Bakır 2013). Literatürde aminoglikozidin iç kulakta toksik etkilerine karşı CAPE uygulaması ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Timokinon, Nigella sativa bitkisinin uçucu yağının ana bileşenidir. Analjezik, antiinflamatuar, antibakteriyel, antidiyabetik, antiülserojenik, antineoplastik ve immünmodülatör gibi terapötik etkilere sahiptir. Timokinonun en önemli özelliklerinden

birinin antioksidan etkisi olduğu düşünölmektedir. Literatürde aminoglikozidin iç kulakta toksik etkilerine karşı timokinon uygulaması ile ilgili sadece iki çalışma vardır (Sağıt 2014, Aksoy 2015).

Oksitosin hamilelik süresince kanda miktarı artan bir hormondur. Güncel hayvan çalışmaları oksitosinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini göstermiştir. Oksitosin; glutasyon ve süperoksit dismutaz (SOD) tüketimini azaltmakta, NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimlerini inhibe etmekte, nitrik oksit (NO) düzeyini arttırmakta ve apopitozisi ve inflamasyonu önlemektedir (Bilmez 2016). Literatürde gentamisin ototoksisitesine karşı oksitosin uygulaması ile ilgili yapılmış bir çalışma yoktur.

Çalışmamızda gentamisin ototoksisitesinin; kafeik asit fenetil ester, timokinon ve oksitosin ile önlenmesi ve ototoksisite tedavisi için yeni bir yaklaşım tanımlamak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İç Kulağın Gelişimi

Dış, orta, iç kulağın embriyojenik gelişimi, üç ayrı yerden ve üç farklı germ yaprağından olur. Dış kulak ve orta kulak üst solunum ve sindirim sisteminin geliştiği brankial yarık ve ceplerden, iç kulak ise dış ektodermden gelişir (Akyıldız 1998).

2.1.1. Membranöz Labirent Gelişimi

İç kulak filogenetik olarak kulağın diğer bölümlerine göre daha erken ortaya çıkar ve buna bağlı olarak ilk gelişen bölümdür. Gestasyonun üçüncü haftasının sonunda, otik plak embriyonun sefalik ucunun lateral yüzeyinde, kapanan nöral tüpün arka beyin bölümüyle temasta olan ektodermin bir kalınlaşması olarak diferansiye olabilir. Yine ektodermden türeyen nöral tüp, santral sinir sistemini oluşturmaya yönelir. Bu temas kısa ömürlüdür. Nöral tüpün kapanmasına kadar, ince ektoderm tabakası onu nöral epitelden ayırır. Otik plak, membranöz labirentin öncüsü otokist veya otik vezikülü oluşturacak şekilde bir oyuk ve kapalı bir kese halinde invajine olur. İkinci veya üçüncü brankiyal arklar arasında yerleşik olan otokistin sekizinci kraniyal sinir tarafından desteklendiği tahmin edilebilir. İçte migrasyon gösterir, şeklini değiştirir ve dramatik olarak büyür, öyle ki onuncu haftaya kadar erişkin şeklini, yirminci haftaya kadar erişkin boyutunu alır.

Otokist genişlemektense uzar. Kraniyal bölümün sınırları, gelişen endolenfatik duktus olarak çizilir. Kaudal bölüm, koklear duktus olmak üzere yönlendir ve ara bölüm olan utrikülosakküler alan vestibüler öncüdür. Bu ayrımlar gebeliğin beşinci haftasında fark edilebilir. Vestibüler bölüm, koklear bölümden önce daha eski filogenetik durumunu koruyarak hafifçe şekil almaya başlar. Vestibüler kesenin utriküler bölümünden, santral epitelin füzyonu ile semisirküler kanallara çevrilen üç dış cep belirir. İlk olarak altıncı haftada superior kanal tamamlanır. Daha sonra posterior kanal tamamlanır ve lateral kanal en son gelişen kanaldır. Utrikül ve sakkül altıncı haftada gelişmeye başlar ve utrikülosakküler duktusu meydana getirir. Koklear duktus, bağlantının fark edilebilir şekilde daralması ile altıncı haftada sakkülden köken almaya başlar; duktus reuniens sekizinci haftaya kadar görülebilir. Koklear duktus yirminci haftaya kadar tam uzunluğuna erişmemekle beraber, sekizinci haftada 1,5 kıvrım ve onuncu haftada 2,5 kıvrıma sahip olacak şekilde hızla büyür.

Vestibüler sistemin duyuşal epiteli, üç krista ve iki maküla ile kokleadaki Corti organı otokistin ektodermal epitelinden kaynaklanır. Başlangıçta birbirlerine yakın olan bu altı bölge, membranöz labirentin duvarında gelişir. Makula, hücre diferansiyasyonuna eşlik eden epitelin yoğun proliferasyonu ile gebeliğin altıncı haftasında gelişir. Özellik gösteren hücreler ve otokonyal membran on ikinci haftaya kadar belirginleşir. Kristanın gelişimi bu olaya paralel gider; sekizinci haftada ayırt edilebilir ve yirmi üçüncü haftada erişkin şekline ulaşır.

Kokleanın duyuşal epiteli, kanal büyüyüp kendi sarmal şeklini alırken, yedinci haftada gelişmeye başlar. Medial duvarda yer alırken, epitel tabakaları iki kabarıklık şeklinde organize olur ve kokleanın uzunluğu boyunca spiral şekil alır. Daha büyük olan iç kabarıklık iç saçlı hücrelere ve tektoriyal membrana dönüşür. Küçük olan dış kabarıklık, dış saçlı hücreler dönüşür. Destek hücreler her iki kabarıklıktan gelişir. İç saçlı hücreler, baziler membran boyunca aynı pozisyonu alacak olan dış saçlı hücrelerden daha önce ortaya çıkar ve böylelikle saçlı hücreler on birinci haftadan itibaren fark edilebilirler. Kokleanın en bazal bölümü orta bazal bölümünün hafifçe arkasında uzanmasına karşılık, saçlı hücre gelişimi başlangıçta kokleanın orta bazal bölgesinde belirginleşir ve apekse doğru ilerler; bazal bölge maturasyonu apekse göre 1-2 hafta önde gider. Destekleyici hücreler aynı yönde gelişir ve yirmi birinci haftada Corti tüneli her seviyede mevcuttur. Bu zaman civarında Corti organı en azından bazal kıvrımında fonksiyonel olur. Koklear duktusun şekli, ilk değişiklikler bazal kıvrımda olmak üzere yaklaşık on ikinci haftada ovalden üçgene doğru değişmeye başlar. Osseöz labirentin çevresindeki mezoderm bu işleme katılır. Endolenfatik duktus ve kese, iç kulağın üçüncü trimester zamanında gelişmeye devam eden yegane bölümlerdir. Tam büyüklüğe erişim yetişkin yaşa kadar sağlanmaz (Bailey 2011).

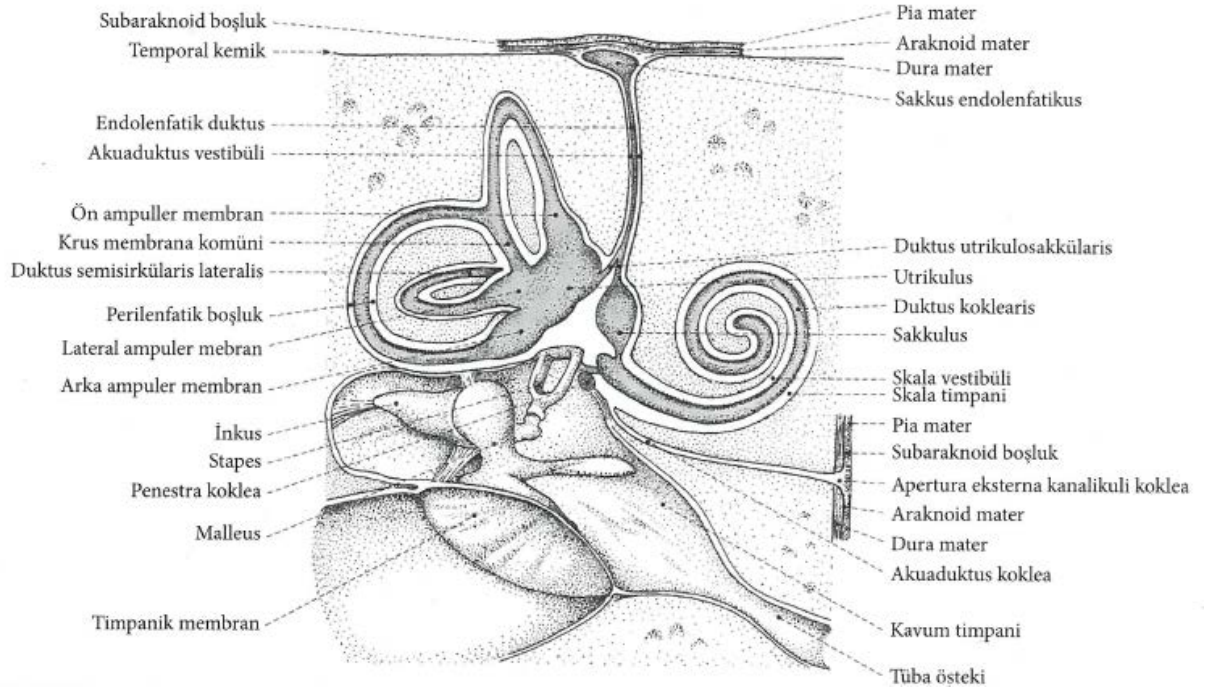
2.1.2. Osseöz Labirent Gelişimi

Perilenfle dolu osseöz labirentin gelişiminin en önemli tarafı, membranöz labirenti gelişmekte olan kemik otik kapsülden ayıran mezodermdeki bir çekilme (rezorpsiyon) işlemidir. Gebeliğin sekizinci haftasında, membranöz labirenti çeviren vasküler prekartilajın yapısı içinde, perilenfatik boşluğu ayırmak üzere vakuoller gelişir. Bu işlem utrikül ve sakkül etrafında başlar ve oradan dışa doğru ilerler. Skala timpaniye varacak olan koklear duktusun etrafındaki bölüm, skala vestibülden önce gelir ve gelişim apikal kıvrımdan daha çok bazal kıvrımda ileridir. Perilenfatik boşluk yirmi dördüncü haftaya

kadar tamalanır. Prekartilajın orijini nöral krista hücrelerinden bir küçük katkı ile sefalik mezodermdendir. Sefalik mezoderm baziler membrana, Reissner membranına ve aynı zamanda nöral kristadan da türeyen stria vaskularise katkıda bulunur (Bailey 2011).

2.2. İç Kulak Anatomisi

İç kulak koklea ve labirenter sistemden oluşur. Kemik labirent ve membranöz labirent olarak incelenir. İç kulağın görünümü Şekil 2.1 ' de gösterilmiştir (Koç 2013).



Şekil 2.1: İç kulağın görünümü (Koç 2013)

2.2.1. Kemik Labirent

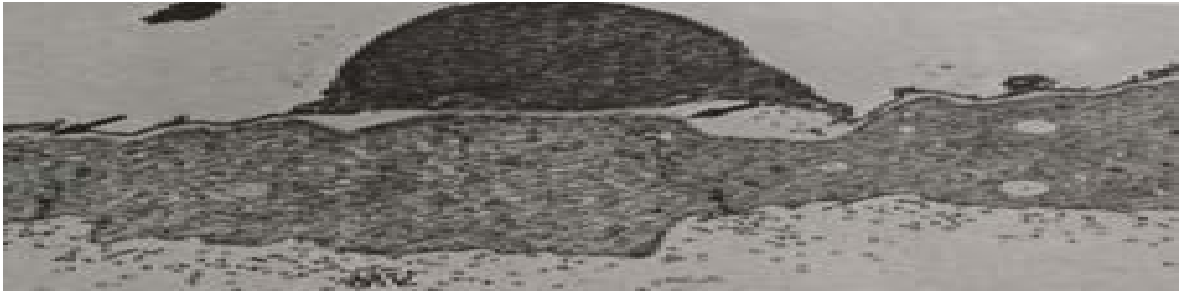
Kemik koklea vestibülün anteriorunda yerleşim gösterir. Erişkin bir insanda 2,5 dönüşlük bir sarmal yapar. Bu sarmalın toplam uzunluğu ortalama 42 milimetredir (Erixon 2009). *Modiolus* denilen spongioz kemikten yapılmış bir eksen etrafında yerleşmiştir. Tabanına *basis koklea*, tepesine *kupula koklea* adı verilir. Koklea içindeki spiral kanal içinde *lamina spiralis ossea* denilen yarım bir kemik bölme vardır. Koklear siniri içeren kemik koklear sinir kanalı *basis koklea* ile internal akustik kanalın fundusu arasında seyredir ve 1,2 mm uzunluğunda ve 2,6 mm çapındadır (Koç 2013).

2.2.2. Membranöz Labirent

Membranöz labirent kemik labirent içine yerleşen, hücre ve dokuları içeren kanallardan oluşur. Bazı sınırlar boyunca, Reissner membranı gibi, membranöz labirent yalnız iki sıra hücre kalınlığındadır. Kokleanın en özelleşmiş dokusu ve sensöriyel hücrelerin yerleşim yeri, skala media'nın membranöz dokuları içindedir. Bu skalaya koklear duktus da denilmektedir. Üçgen şeklindeki koklear duktus üç bölgeye ayrılabilir:

- 1.) Skala media ve skala vestibuli arasındaki sınırı oluşturan *Reissner membranı*.
- 2.) Spiral ligaman, stria vaskularis, spiral prominens ve dış sulkusu içeren *lateral duvar*.
- 3.) Skala media ve skala timpani arasında sınır oluşturan baziler membran ve *osseöz spiral lamina*.

Reissner Membranı: Üç yapraklı yapısıyla skala media'yı skala vestibülü'den ayırır. Reissner membranı medialde spiral limbusun modiolar kenarına ve lateralde stria vaskularisin apeksinde spiral ligamana yapışır. Endolenfe bakan hücreler çok sayıda apikal mikrovillus içeren "tight junction" larla kapanmıştır. Şekil 2.2 'de Reissner membranının üç tabakasını gösteren transmisyon elektron mikrograf kesitlerinden biri gösterilmiştir. Trilaminar bazal membran iki hücre tabakası arasında uzanır. Perilenfe bakan yassı hücrelerdir ve birbirlerine gevşek olarak bağlanırlar.



Şekil 2.2: Reissner membranının üç tabakasını gösteren transmisyon elektron mikrograf. Devamlı bazal membran (oklar) skala vestibulinin perilenf yüzündeki skuamoz hücreleri, skala medianın endolenf yüzündeki apikal mikrovillusları olan sıkı bağlantılı hücrelerden ayırır (Cummings 2010)

Spiral Ligaman: Koklear duktusun lateral duvarının en büyük kısmını oluşturur ve gevşek konnektif doku ve iyon geçişinde görevli enzimlerden zengin hücrelerden oluşur. Lateral sınırı otik kapsülün iç yüzüdür ve medial sınırını ise stria vaskularis ve spiral prominens

oluşturur. Spiral ligaman skala vestibuli ve timpani içlerine kadar uzanarak bu iki perilenfatik kanal arasındaki ilişkinin lateral yolunu oluşturur. Spiral ligaman hücrelerinin endolenf ve saçlı hücrelerden, endolenfatik K⁺ kaynağı gibi görünen stria vaskularise K⁺ resirkülasyonunda önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Spiral ligaman matriksi fibroblast benzeri hücreler ve çok sayıda ekstrasellüler filaman içerir. Spiral ligamanda tip I fibroblast benzeri hücreler baskındır. Tip II fibroblast hücrelerin Na⁺ - K⁺ ATPaz ve karbonik anhidraz iyon geçişinde görevli enzimleri içerdiği gösterilmiştir (Cummings 2010).

Stria Vaskularis: Koklear duktusun endolenfatik sınırını oluşturur. Reissner membranının yapışma yerinden, spiral prominense kadar uzanır. Stria vaskularis bazal membranı olmayan bir epiteldir. Temel olarak üç hücre tipi (marjinal, intermediate ve bazal hücreler) içeren stratifiye epitelyum ve intraepitelyal kapillerlerden oluşur. Marjinal hücreler stria vaskularisin temel fonksiyonel birimidir ve pozitif endokoklear potansiyel üretir ve koklear endolenfin düşük sodyum, yüksek potasyum iyon konsantrasyonunun sürdürülmesini sağlar. Intermediate hücreler stellat formdadır, melanin içerirler ve fagositik aktivite gösterirler. Karbonik anhidraz enzim aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir. Stria vaskularisin bazal tabakası, birkaç tabaka halinde sıkışmış bazal hücreler tarafından maddelerin parasellüler transportuna kapanmıştır. Bu hücreler yer yer lipid inklüzyonları içerir ve apikal süreçleri marjinal ve intermediate hücrelere doğru aralara girecek şekilde uzanır.

Spiral Prominens: Stria vaskularis ve baziler membran arasında spiral olarak uzanan bir doku kenarıdır ve bir bazal membran oluşturan küboidal formda tek bir epitelyal hücre tabakası tarafından çevrelenir. Spiral prominensin konnektif doku matriksi omega şeklinde kapillerler ve çok sayıda fibroblast tip II hücreleri içerir.

Eksternal Sulkus : Spiral prominens ve baziler membranın Cladius hücreleri tarafından oluşturulan açık kanala *eksternal sulkus* denir. Eksternal sulkus hücreleri genellikle Cladius hücreleri altında uzanır ve spiral prominens matriksi ve spiral ligaman içerisine uzun kök benzeri süreçler gönderir. Bu hücreler organelerden zengindir fakat elektronlusu sitoplazmaya sahiptir.

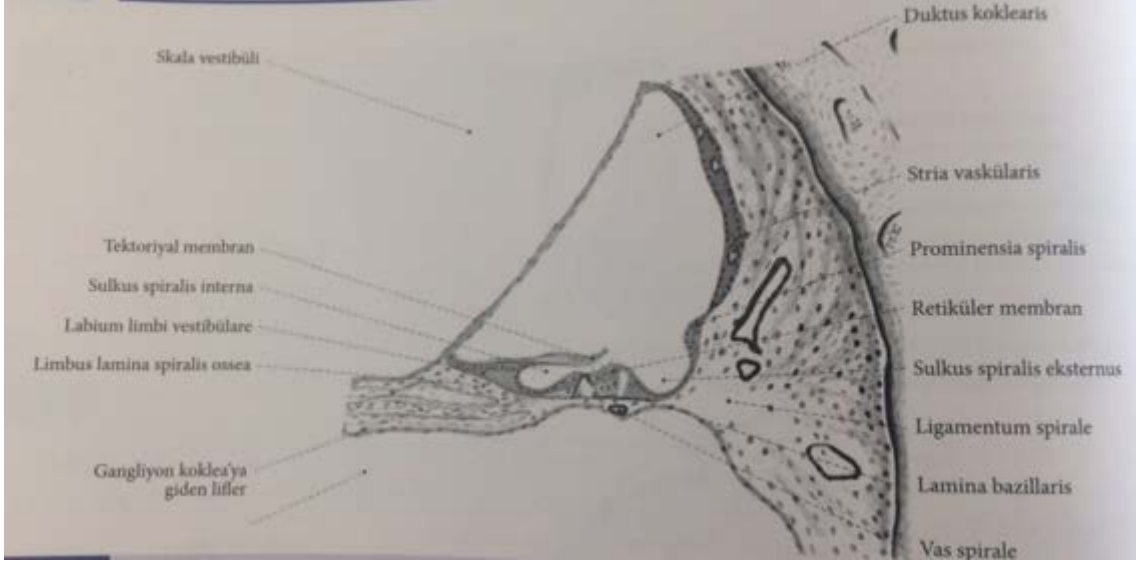
Baziler Membran: Osseöz spiral laminanın lateral kenarından spiral ligamana eklenen *baziler krest* denilen kama şeklindeki dokuya doğru uzanır. Baziler membran temel olarak konnektif dokudan oluşur ve kokleanın tonotopisi için önemlidir.

Baziler membranın skala timpani yüzeyi içi şeklinde, spiral olarak uzanan mezotelyal hücrelerle çevrelenmiştir. Spiral olarak uzandığı için *spiral damar* olarak isimlendirilen damar içi corti tünelinin altında uzanabilir. Bununla birlikte bu damar rudimenter gibi görünmekte ve Corti organının metabolitlerinin değişimi ise baziler membran ve Nuel boşluktan perilenfe olduğu düşünülmektedir.

Cladius Hücreleri: Baziler membranın endolenfatik yüzeyini döşeyen küboidal formda hücrelerdir ve Hensen hücrelerinden spiral prominense kadar baziler membran boyunca uzanırlar. Cladius hücreleri skala media'nın endolenfi ile skala timpani'nin perilenfi arasında sıkı bir sınır oluşturur.

Boettcher Hücreleri: Cladius hücrelerinin bazal yüzeyleri ile baziler membran arasında uzanır. Boettcher hücreleri en sık koklear tabanda bulunur ve apekse doğru sayıca azalırlar. Laterobazal yüzeyleri mikrovillus içerir ve baziler membran üzerinde fibronektin içeren kanallar oluştururlar. Fonksiyonlarının fibronektin ve baziler membran için diğer matriks bileşenlerini üretmek olduğu düşünülmektedir. Karbonik anhidraz içerdiklerinden sıvı transportunda da görevli olabilirler.

Corti Organı: Spiral olarak dizilmiş sensöriyal saçlı hücrelerden, baziler membran tarafından desteklenen destek hücrelerinden oluşur ve tektoryal membran Corti organının üzerine doğru uzanır. Corti organının primer fonksiyonu baziler membranın mekanik vibrasyonlarını beyne ileten nöral impulslara çevirmektir. Ek olarak son kanıtlar saçlı hücrelerin beyin tarafından efferent inervasyona sahip olduğunu göstermiştir ki; saçlı hücreler Corti organından duyusal bilgi niteliğinde mekanoelektrik ses üretebilirler. Retiküler lamina olarak isimlendirilen sert plak benzeri striktür, Corti organının destekleyici ve sensöriyal hücrelerinin apikal proseslerinden oluşur. Corti organının yapısı baziler membran boyunca mesafenin bir fonksiyonu olarak değişir. Koklear apekse doğru, Corti organının radial alanında, iç-dış saçlı hücre ve onların sterosilyalarının boylarında, baziler membrana göre corti organının apikal yüzeyinde, pillar hücre uzunluğunda ve Hensen hücrelerinin boyunda artış olur (Cummings 2010). Şekil 2.3 'te Corti organının yapısı şematize edilmiştir.



Şekil 2.3: Corti organının yapısı (Koç 2013)

2.2.3. Destekleyici Hücreler

Hensen Hücreleri: Corti organının lateral sınırını oluşturur fakat retiküler laminanın bir parçası değildir. Hensen hücreleri boyları koklear apekse doğru artan, birkaç uzun kolumnar hücre sırası oluşturur.

Deiters Hücreleri: Dış tüylü hücreleri tabanında ve apeksinde destekler. Baziler membrana yapışır ve dış tüylü hücrelerin bazal kısmının çevresinde bir kupa benzeri süreç oluşturur. Bu süreç tabanda afferent ve efferent sinir terminallerinin dış tüylü hücrelerle temasına izin vermek üzere açıktır. Dış tüylü hücre gövdesiyle Deiters hücrelerinin falangeal prosesleri arasındaki sıvı dolu boşluk Nuel boşluğudur.

Pillar Hücreler: İç ve dış pillar hücreler birbirine karşıdır ve üçgen şeklinde iç Corti tünelinin ve retiküler lamina bölümlerini oluştururlar. Her bir pillar hücresi küre şeklinde nükleus içeren geniş bir taban ve mikrotübül ve aktin filamanları içeren süreçlere yönelen silindirik apekse sahiptir.

İç Sınır ve Falangeal Hücreler: Bu hücreler, iç sulkus hücrelerini iç tüylü hücrelerin medial yüzeyinden ayırır. İç sınır hücreleri Corti organının en medial kenarını oluşturur. İç falangeal hücrelerin apikal süreçleri iç tüylü hücreleri, lateralde bir diğerinden, medialde ise iç sınır hücrelerinden ayırır.

2.2.4. Sensöryal Hücreler

Sterosilya: Sterosilyaların boyu koklear koklear tabandan apekse doğru gittikçe artar ve lateral olarak dış tüylü hücre sıralarını çaprazlar. İç tüylü hücre sterosilyaları tüylü hücre sterosilyalarına göre iki kat daha kalındır. Sterosilyalar içinden birkaç bağlantı filamanı geçen demet ile birbirine bağlı olup dış çapraz bağlar bir sterosilyayı diğerine ve sıralar arasına yapıştırır. Tepe bağlantıları, mekanoelektriksel transdüksiyonun bir parçası gibi görülen tüylü hücre apparatusudur. Sterosilyanın sert yapısı içindeki aksiyel uzanan, polarize aktin filamanlarının bir sonucudur. Matür koklear tüylü hücreler, vestibüler tüylü hücrelerden farklı olarak, kinosilyum içermez. Dış tüylü hücre sterosilya demeti, köşesi koklear apekse ve birinci tüylü hücreden üçüncü tüylü hücreye doğru daha keskin olan V veya W şeklinde bir patern oluşturur. İç tüylü hücre sterosilyası üç veya dört sıralı hafif bir demet oluşturur. Dış tüylü hücre sterosilyasının tektoryal membrana yapıştığına kanıtları, zaman zaman sterosilya ve tektoryal membran arasındaki direkt ilişkiyi gösteren ve tektoryal membran alt yüzünde sterosilya izlerinin olduğunu gösteren çok sayıda elektron mikroskopik araştırmadan kaynaklanır.

Dış Tüylü Hücreler: Corti organında, apikal kutuplarında Deiters hücrelerinin falangeal süreçlerine yapışırken, bazalde kupa şeklindeki Deiters hücre gövdelerinin içerisine doğru giren silindirik hücrelerdir. Çoğu dış tüylü hücre gövdesi sıvı dolu Nuel boşluk tarafından çevrelenmiştir. Dış tüylü hücreler retiküler lamina içinde medialden laterale pozisyonda yerleşirler. İç plazma membranı boyunca, hücrenin uzunluğuna kütiküler plate'den bazal yerleşimli nükleus bölgesine uzanan birkaç tabaka yüzey altı sisterna vardır. Kütiküler plate altında, yüzey altı sisterna sarmal olabilir ve buna *Hensen Cisimleri* denir. Yüzey altında yerleşen sisternaların görevi henüz iyi tanımlanamamıştır fakat dış tüylü hücrelerin motil özelliklerinde rol aldığı düşünülmektedir (Evans 1990). Dış tüylü hücrenin santral sitoplazması organelden seyrek gibi görünmekte ve nükleusu hücrenin bazal ucunda yerleşmiştir. Nükleus altında ve dış tüylü hücre bazalinde çok sayıda mitokondri bulunur. Deiters hücre çıkıntıları dış tüylü hücrenin bazolateralinde kupa benzeri bağlantılar oluşturur.

İç Tüylü Hücreler: Vestibüler ve dış sıradaki tüylü hücrelere benzer hücrelerdir, dar boyunlu şişe şeklinde destek hücreleri tarafından sıkı bir şekilde çevrelenmiş tek bir hücre sırası oluştururlar. İç plazmalemma boyunca birkaç yüzey altı sisterna vardır ve nükleusları

hücrenin ortasındadır. Bu hücrelerin bazal kutbunda çok sayıda sinaptik sonlanmalar vardır. Her bir afferent sinir sonlanmasına komşu tüylü hücre sitoplazmasında bir presinaptik şerit olur. Efferent sonlanmalar daha büyüktür ve veziküllerle doludur ve iç tüylü hücre gövdelerinden ziyade afferent siniri lifleri ile sinaptik kontak yaparlar.

İç Sulkus: Spiral limbusun lateral kenarı, Corti organının medial kenarı ve apikalde tektoryal membran tarafından sınırlanan spiral açık kanala denir. İç sulkus hücreleri Cladius hücrelerine benzer. Apikal yüzünde kısa mikrovilluslar vardır ve hücreler tight junction'larla bağlantılıdır.

Spiral Limbus: Osseöz spiral laminanın medial bölümünün üzerinde uzanan spiral vaskülarize konnektif doku çıkıntısıdır. Reissner membranı en medial kenarına yapışır. Lateral kenarı, iç sulkus hücreleri tarafından oluşturulan bir kanal üzerine uzanan *Huscke dişleri* denen kama şeklinde bir çıkıntı oluşturur. Spiral limbusun konnektif doku matriksi özellikle tip II kollajen içeren ekstrasellüler filamanlar içerir (Cummings 2010).

Tektoryal Membran: Corti organının üzerine uzanan ekstrasellüler matriks materyali tabakasıdır. Koklear sarmalın iç kenarında spiral spiral limbusun interdental hücrelerine yapışıkır. Fakat dış kenarda Corti organının yüzeyine yapışık değildir. Dış tüylü hücrelerin en uzun sterosilyası tektoryal membranın alt kısmında onun içine gömülüdür (Koç 2013).

Osseöz Spiral Lamina: Spiral olarak modiolutan uzanarak baziler membran medialine yapışan kemik çıkıntısıdır. İnferior spiral lamina bir kanal ve Corti organına giden ve çıkan sinir lifleri için bir yol oluşturur. Lateral kenarında, kemik incelererek *habernula perforata* denilen kanallarca delinir. Burada sinir lifleri myelinlerini kaybeder ve Corti organına gider.

2.2.5. Koklear İnervasyon

Koklea üç tip sinir lifi tarafından inerve edilir; otonom, afferent ve efferent.

Corti Organı: İç tüylü hücreler hemen tamamen afferent sinirler ile inerve olurlar ve kokleadan beyine giden afferent sinirlerin % 90 – 95 ' i iç tüylü hücrelerden kaynaklanır. Her bir iç tüylü hücre ile sinaps yapan çeşitli sayıda farklı afferentler bulunmaktadır. İç tüylü hücre bölgesine gelen efferent lifler ipsilateral orta beyindeki lateral süperior olive'den kaynaklanır ve tüylü hücrenin kendisi ile değil hücrenin hemen alt seviyesindeki

afferent lifler ile temas eder. Bu efferent lifler korti organına gelen efferent inervasyonun yalnızca % 20 ' sini oluşturur.

Dış tüylü hücreler direkt olarak, birkaç tane geniş buton benzeri sonlanma gösteren efferent lifler ile inerve edilir. Kokleanın efferent inervasyonunun % 80 ' i dış tüylü hücrelerde sonlanır. Bu efferent lifler esas olarak kontralateral superior olive ' in medial kısmından kaynaklanır. Dış tüylü hücrelere gelen afferent lifler total koklear afferent inervasyonunun % 5 – 10 ' unu yapar ve Corti organı içinde belirgin şekilde dallara ayrılırlar. Böylece tek bir nöron birden fazla dış tüylü hücre ile sinaps yapar (Koç 2013).

Spiral Ganglion: İç ve dış tüylü hücreleri inerve eden nöron hücre gövdeleri spiral ganglionda bulunur. Bu hücre gövdelerini içeren kemik kanal koklear apekse doğru spiral yönde ilerler ve bu kanala Rosenthal kanalı denir. Spiral ganglion içinde afferent bipolar hücre gövdelerinden kaynaklanan myelinize sinir lifleri ve *intraganglionik spiral demet* olarak isimlendirilen ayrı bir demetten oluşan *en passant* efferent sinir lifleri vardır. Spiral ganglion nöronlarının yaklaşık % 90 ' ı tip I hücrelerdir ve geriye kalanı tip II hücrelerdir. Tip I hücre gövdeleri iç tüylü hücreleri, tip II hücre gövdeleri dış tüylü hücreleri inerve eder.

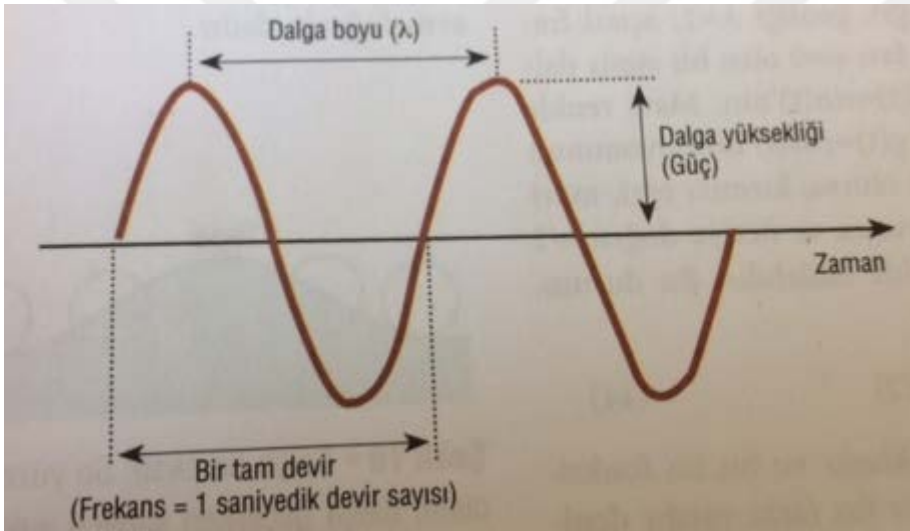
2.2.6. Vasküler Yapı

Anterior inferior serebellar arterin dalı olan labirentin arter, VIII. kranial sinirle beraber internal akustik meatusa girer. Labirentin arter dalları ana koklear arter ve anterior vestibüler arteri oluşturur. Ana koklear arter iki dal verir ; apikale doğru giden spiral modiolar arter ve alt bazal koklear turn yapısını besleyen vestibülokoklear arter. Koklea ; lateral duvarın, spiral limbusun ve spiral ganglionun venüllerinin birleşmesiyle oluşan spiral modiolar vene drene olur (Cummings 2010).

2.3. İşitme Fizyolojisi

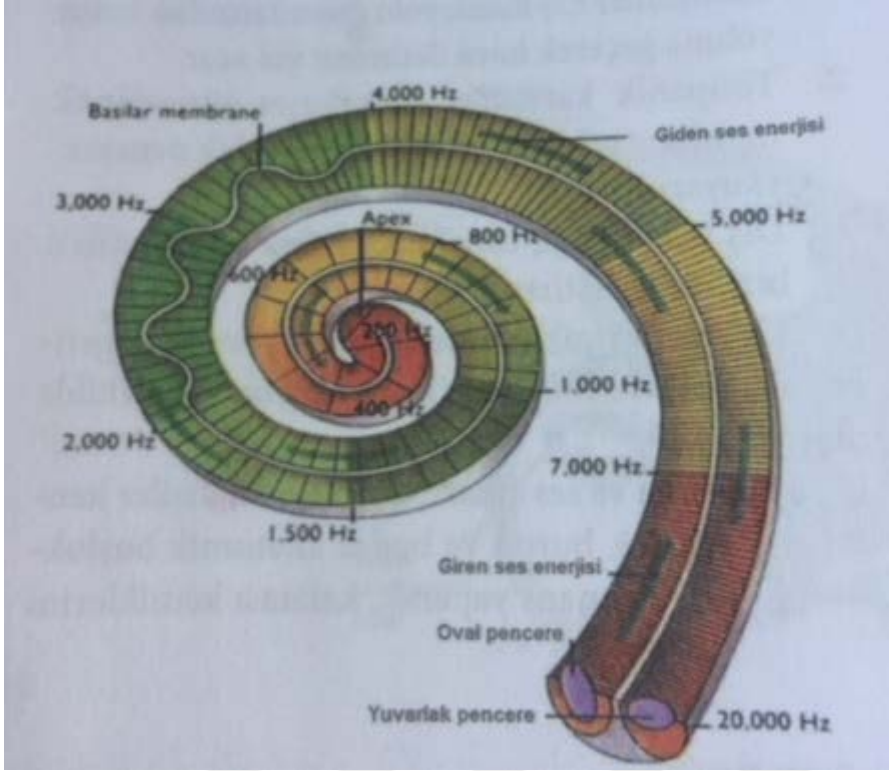
Ses, maddesel bir ortamda yayılabilen, titreşimlerin boyuna dalgalar şeklinde ilerlemesidir. Ses, aynı zamanda hem havanın titreşimi ile oluşan işitme duyusuna verilen addır. Kapsamlı tanımıyla ses; titreşim kaynağının, bir enerji ile titreşime geçmesi sonucu, ortam moleküllerinin birbirlerine yaklaşıp uzaklaşması sonucu oluşan mekanik dalganın insan kulağı tarafından algılandığı şeklidir.

Sesten bahsederken genellikle insan kulağının işitebileceği frekanslardaki titreşimleri kastederiz. İşitme frekans aralığı sıklıkla 20 Hz ile 20 kHz olarak verilir. Bir nesne titreştiğinde çevresindeki hava moleküllerine çarparak basınç etkisi yapar ve bu etki, ses dalgası olarak yayılır. Titreşen nesne ses kaynağı, ses dalgasının bulunduğu bölge de ses alanı olarak adlandırılır. Bir ses kaynağının titreşen yüzeyi ile doğrudan temas halinde olan hava molekülleri, yüzeyle beraber hareket eder. Fakat hareket, çevredeki havaya iletilirken elastik sıkışma ve genişleme kapasitesi ile beraber, kaynağına göre gecikmeli bir harekete neden olur. Ses yokken normalde var olan basınç atmosfer basıncıdır ve statik basınç olarak adlandırılır. Dalgalanan basınç ise ses basıncı olarak bilinir. Bu, sesin belki en önemli özelliğidir. Bir ses dalgasının (sinüs dalgası) frekans, amplitüd ve dalga boyu vardır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Sinüs dalga modeli (Belgin 2015)

Kokleanın bazalinde dalga boyu kısa olan yüksek frekans sesler; apikalinde ise dalga boyu uzun olan alçak frekans sesler algılanır. Kokleada baziler membrandan başlayıp işitsel kortekse kadar devam eden bu özelliğe tonotopik organizasyon adı verilir (Şekil 2.5).



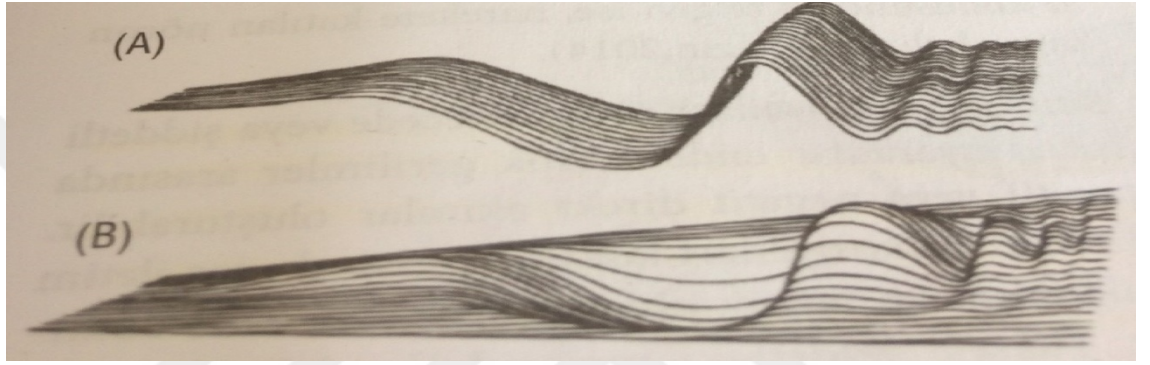
Şekil 2.5: Baziler membranın tonotopik organizasyonu (Belgin 2015)

Kemik yolu ile işitme sensörinöral işitme mekanizmasının bir ölçüsü olarak kullanılır. Bu iletim yolu kullanılarak birçok test metodu geliştirilmiştir. Gerek hava yolu gerekse kemik yolu ile iletilen ses enerjisinin kokleayı uyarış şekli temelde aynıdır. Her iki yoldan da gelen ses enerjisinin son hareketi koklear sıvılarda dalgalanma ve baziler membranda titreşimdir (Belgin 2015).

Kokleadaki ses dalgalarının yayılımı çeşitli teorilerle açıklanmaktadır.

1. Bekesy'e göre, skalalardan herhangi birine uygulanan işitsel titreşimler baziler membranda yer değişimlerine yol açmaktadır. Bu durum *travelling wave* (ilerleyen dalga teorisi) olarak adlandırılır (Şekil 2.6). bu dalga baziler membranın bazal ucundan başlayarak, apekse doğru ilerler. Yayılma hem boyuna hem de enine yöndedir. Yine bu iletim dalgasının en önemli özelliği amplitüdünün gittikçe artarak maksimuma ulaşması ve titreşimlerin daha sonra sönerek faz değiştirmesidir. En büyük titreşim bölgesinden sonra sıvılarda girdap hareketleri başlamaktadır. Bir başka önemli özellik ise bu dalgaların baziler membran üzerinde en büyük titreşim yaptığı yerin her frekans için belirli bölgeler oluşudur (Bekesy 1963).

İşitilebilen her frekans için baziler membran üzerinde değişmeyen “En Büyük Titreşim Noktası” vardır. En büyük amplitüdle titreşen bölge, yüksek frekanslarda bazal bölgede, yani oval pencereye yakındır. İşitsel enerjinin frekansı düştükçe baziler membranın en çok titreşen bölgesi kokleanın tepesine yaklaşır. Baziler membran bazal bölgede daha katı ve dar, apekse doğru gidildikçe esnek ve genişleyen bir yapıya sahiptir. Bu yapısal özelliğinden dolayı her frekans için ayrı bir maksimum titreşim bölgesine sahiptir. En çok titreşen bölgedeki amplitüd uyarıcı ses şiddeti ile doğru orantılıdır (Cooper 2008).



Şekil 2.6: Baziler membranın ilerleyen dalga hareketi (Belgin 2015)

2. Helmholtz’ un yer teorisi’ ne göre, baziler membran ve üzerindeki Corti organı aynı bir piyanonun telleri gibi rezonatördür. Yani, gelen ses dalgalarının frekanslarına uygun bölgeler titreşerek uyarılır ve sesi algılar. Baziler membranın bazal bölgesinin yüksek frekansların, apeksinin ise alçak frekansların rezonatörü olduğu bu teori ile ortaya sürülmektedir.

3. Rutherford’ un frekans veya telefon teorisi’ ne göre, frekansların algılanması işitme sinirinde impulsların meydana geliş sıklığına göre olmaktadır. Mesela 500 Hz’ lik bir sesin işitme sinirini 500 defa arka arkaya uyardığı belirtilmektedir. Halbuki işitme sinirindeki lifler saniyede en fazla 1000 defa uyarılabilmektedir. Farklı zamanlarda diğer sinir liflerinin senkronize çalışmaları düşünülse bile, frekans teorisi ancak 5000 Hz’ in altındaki sesler için geçerli olacaktır. Bu nedenle bu teori bugünkü bilgiler ışığında geçerliliğini yitirmiştir.

4. Wever’ in Volley teorisi’ ne göre, yer ve frekans arasında bir bağlantı kurulmaktadır.

2.3.1. Kokleanın Elektrik Potansiyelleri

Kokleada dört ayrı tip potansiyel mevcuttur.

İstirahat Potansiyeli: Koklea uyarılmadığı zaman bile mevcut olan elektrikli potansiyeldir. Kokleada iki tip istirahat potansiyeli mevcut olup, bunlardan bir tanesi intrasellüler potansiyeldir. Tüy hücrelerinin iç kısımlarından ölçülen bu potansiyel -60 mV değerindedir. Yani Corti organı kendisini çevreleyen sıvıya göre 60 mV negatif değere sahiptir. İkinci potansiyel ise, endokoklear potansiyel olup, scala mediadaki endolenf, perilenfe göre +80 mV' luk bir farklı elektrikli gerilime sahiptir. Böylece bir tüy hücresi zarının dışı ile içi arasında 150 mV civarında potansiyel farkı vardır.

Koklear Mikrofonik: Yuvarlak pencereye yerleştirilen elektrotlarla ölçülebilen, işitsel uyarılara tepki şeklindeki potansiyellerdir. Bunlar uyarının dalga şeklini yansıtır. Şöyle ki, kulağa saf ses verilirse yuvarlak pencereye yerleştirilen elektrottan, bu sese uygun sinüzoidal bir dalga elde edilir. Bu elektriksel tepkiye Wever-Bray fenomeni denir. Koklear mikrofoninin kaynağı dış tüylü hücrelerdir. İlaç ototoksitesisi veya konjenital anomaliler sonucunda, tüy hücrelerinin yok olması durumunda koklear mikrofonik de ortadan kalkar.

Aksiyon Potansiyelleri: İşitme sinirinin aksiyon potansiyelleri, sinir üzerinden yuvarlak pencere veya kokleadan kayıt edilebilir. İşitsel uyarın iç kulaktaki iletim dalgasından sonra elektriksel gerilimlere dönüşür ve işitme sinir liflerinin bir grubunda aksiyon potansiyelleri oluşur. Bir ses uyarınının beyine kadar iletilmesinde taşıyıcı nöronların tümünün toplam aksiyon potansiyelleri işitme sinirinin o andaki aksiyon potansiyelini verir. Belirli bir frekansta eşik şiddetteki uyarının çok az sayıda sinir lifini harekete geçirdiği ve bu nedenle toplam potansiyelin küçük olduğu tespit edilmiştir. Bir başka sonuç da belli bir nöron grubunu uyardığı ancak, uyarın şiddeti arttıkça daha fazla nöronun olaya katıldığı şeklindedir.

Birikim Potansiyelleri: Orta derecede veya şiddetli işitsel uyarınlar endolenfatik gerilimler arasında pozitif veya negatif direkt akımlar oluşturabilir. Birikim potansiyelleri koklea içerisinde ses iletim dalgasının en büyük olduğu bölgeden elde edilirler. Birikim potansiyellerinin kaynağının, iç tüy hücreleri olduğu sanılmaktadır (Belgin 2015).

2.4. Aminoglikozid Ototoksitesisi

Ototoksisite koklear ve/veya vestibüler olarak iç kulak dokularının, ilaçlar ve terapötik ajanlar nedeni ile hücresel dejenerasyonu ve fonksiyonel olarak bozulmasıdır (Arslan 1999). İç kulak dokuları hem geçici hem de kalıcı olarak zarar görebilir. Birçok ajan ototoksisiteye neden olabilir.

Aminoglikozid antibiyotikler antienfeksiyöz ajanların önemli bir sınıfıdır. Bu ilaç tüberküloz ve diğer hayati tehdit edici enfeksiyonlar ile başa çıkabilmek için geliştirilmiştir. Bu sınıf ilaçların ilk geliştirilen üyeleri streptomisin ve dihidrostreptomisindir. Öncül klinik çalışmalar bu ilaçların böbrek ve iç kulağa zarar verebildiğini göstermiştir. Bunun üzerine bir grup yeni aminoglikozid geliştirilmiştir. Dihidrostreptomisinin çok toksik olduğu anlaşılmış ve piyasadan çekilmiştir. Neomisin sistemik kullanım için çok toksik bulunmuş ve lokal uygulanım için sınırlandırılmıştır. Bu grubun diğer üyeleri kanamisin, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin ve sisomindir. Bu ajanların bir kısmı diğerlerine oranla ototoksik özellikleri tam bir selektivite göstermese de hem koklea hem de vestibül üzerine daha toksiktir. Toksisite genellikle maruziyetten sadece günler veya haftalar sonra gelişir. Aminoglikozidlerin işitsel toksisite insidansı yaklaşık % 20 iken vestibüler toksisite % 15 civarındadır (Cummings 2010).

2.4.1. Farmakokinetik

Bu ilaçlar yüksek yüklü moleküler olup oral absorpsiyonları zayıftır. Ağızdan verilmiş dozun yaklaşık olarak % 3 kadarı gastrointestinal yoldan emilir. Normalde ağır enfeksiyonlar için parenteral yolla kullanılırlar. Aminoglikozidlerin doku konsantrasyonları genellikle aynı andaki serum konsantrasyonun yaklaşık olarak üçte biridir. Kan-beyin bariyerini geçişleri genellikle zayıf olduğu için menenjit tedavisinde intratekal olarak verilir. Aminoglikozidler birincil olarak böbreklerden glomerüler filtrasyon ile atılırlar ve böylece idrarda ilacın yüksek konsantrasyonları saptanabilir. Bozulmuş renal fonksiyon ilacın atılımını azaltabilir. Bu nedenle böbrek yetmezliği ototoksisite için bir risk faktörüdür. Aminoglikozidlerin serum pik ve plato değerlerinin ölçülmesi terapötik etkinliği için kesin rehberlik sağlasa da ototoksisiteden korunmak için kesin garanti sağlamaz. Aminoglikozidlerin plato seviyeleri ve ototoksisite arasında bir ilişki ortaya konmuştur. Ototoksisite bireysel pikler ve plato ölçümlerinden daha çok kan seviyesinin zamana göre eğrisinin altında kalan alanla ilişkilidir. Bir hayvan modelinde

toplam doz veya eğrinin altında kalan alan amikasinin ototoksitesisi için daha değerli bir prediktör olduğu saptanmıştır (Cummins 2010).

2.4.2. Ototoksitesite Mekanizmaları

Aminoglikozidler; lipid çözünürlüğü olmayan, polikatyonik ve büyük yapılı moleküllerdir (Nomura 1990) ve tüylü hücrelerin içine mekanoelektriksel transdüser kanallar yolu ile girerler (Marcotti 2005). Bundan sonra oluşan aminoglikozid-demir kompleksi, araşidonik asit metabolizmasından oluşan serbest oksijen radikalleri gibi elektron vericileri ile reaksiyona girer. Aminoglikozidler tarafından serbest oksijen radikalleri vasıtasıyla aktive edilen c-Jun N-Terminal Kinaz (JNK) hücre apoptozisine katkıda bulunur. Bu enzimin akış yönündeki hedefi transkripsiyon faktörü olan aktive Protein-1' dir. Bundan sonra çekirdekte nükleer faktör kappa B ' de (NFkB) gen translokasyonları meydana gelir ve mitokondriden sitokrom-c salgılanır. En son aşamada kaspazlar (kaspaz 8, 9, ve 3) vasıtasıyla mitokondri membranı hasarlanarak hücre apoptozise uğramaktadır. Ayrıca hücre ölümü kaspazdan bağımsız mekanizmalar ile de olabilir. Apoptozis burada intrinsik mekanizmalı apoptozistir (Rybak 2005, Rybak 2007). Burada kilit rolü serbest oksijen radikalleri oynamaktadır.

2.4.3. Histopatoloji

İnsan ve hayvan temporal kemik histopatolojik çalışmaları, hasarın birincil hedefinin koklear ve/veya vestibüler tüylü hücreler olduğunu göstermiştir. Corti organında bazal turn dış tüylü hücreleri ilk zarar görür. İlaç tedavisi devam ettikçe hasar daha yukarı bölgelere ilerleyebilir. İç tüylü hücreler, dış tüylü hücrelere oranla hasara karşı daha dayanıklıdır. Bu durum iç tüylü hücrelerde ve apikal yerleşimli dış tüylü hücrelerde, bazalde bulunan dış tüylü hücrelere oranla daha fazla antioksidan, glutatyon bulunmasının sonucu olabilir. Spiral gangliyon hücrelerindeki ilerleyici harabiyet hayvan çalışmaları ve insan temporal kemik raporlarında izlenmiştir. Bazı hastalarda dış tüylü hücre harabiyeti olmaksızın spiral gangliyon hücreleri aminoglikozidin doğrudan hasarına maruz kalabilir. Stria vaskularis marjinal hücre ölümüne bağlı olarak inceleyebilir. Vestibüler sistemde tüylü hücre hasarı kristanın apeksinde ve makulanın striola bölgesinden başlayabilir. Tüylü hücre hasarı buradan sonra Tip I tüylü hücrelerin birincil olarak etkilendiği vestibüler sensöriyal epitelin periferine doğru ilerleyebilir. Aminoglikozid toksitesisi iyi kayıt altına alınmış 17 hastanın temporal kemikleri ile yapılmış kantitatif bir çalışmada sonuçlar yaşları uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Streptomisin tüm vestibüler organlarda tip I ve II

tüylü hücrelerde belirgin bir azalma yaratmıştır. Bu hasar kristada yerleşimli tip I hücrelerde daha belirgin iken makulada daha azdır. Tüm aminoglikozidler için Scarpa gangliyon hücrelerinde anlamlı azalma saptanmamıştır (Cumming 2010).

2.4.4. Klinik Bulgular

İlk olarak yüksek frekans işitme kaybı oluşabilir ve klinik olarak ortaya çıkmadan saptanabilir. Devam eden aminoglikozid maruziyeti düşük frekanslarda ilerleyen işitme kaybına yol açabilir. Konuşma frekanslarının tutulması sonucu iletişim kabiliyeti etkilenebilir. İki ya da daha fazla birbirini takip eden frekansta, 20 dB veya daha fazla işitme kaybı gelişmesi, diğer kayıp nedenleri ekarte edildikten sonra ilaca bağlı işitme kaybı olarak kayıt altına alınmalıdır.

Vestibüler ototoksisitesinin başlangıcı öngörülemez ve ototoksik ilacın kümülatif dozu ile ilişkisizdir. Ayaktan hastalar, hareketle ciddi bir şekilde artan ve tam istirahat dönemlerinde azalan denge bozukluğu ve ataksi varlığı fark edilinceye kadar asemptomatiklerdir. Ağır etkilenmiş hastalar genellikle osilopsi de yaşarlar. Başlangıçtan sonraki iki hafta içerisinde klinikte biraz iyileşme izlense de tam düzelme nadirdir.

Birçok risk faktörü, değişik hasta gruplarında ototoksisiteyi artırıp artırmadıklarını saptamaya yönelik çalışılmıştır. Bakteriyemi, ateş, hepatik ve renal yetmezlik gentamisin, tobramisin ve amikasin ile yapılan prospektif, çift kör klinik çalışmalarda ototoksisite ile ilişkili bulunmuştur. Mitokondriyal RNA mutasyonu ototoksisite riskini dramatik olarak artıran çok önemli bir risk faktörüdür. Bu mutasyon hastayı tek doz aminoglikozide karşı bile duyarlı bir hale getirebilir. Aminoglikozide bağlı işitme kaybı gelişen hastaların % 17 ' sine kadarı bu mutasyona sahiptirler. Bilinmeyen bir nedenden dolayı bu mutasyona sahip insanlarda ototoksik etkiye karşı duyarlılık sadece işitsel sistemde izlenirken iç kulağın vestibüler parçasında izlenmez (Cummings 2010).

2.4.5. Korunma

Aminoglikozid ototoksisitesini engelleme, genel ototoksik ajanlardan korunma prensiplerinin yanı sıra mekanizmada meydana gelen olay ve mediatörler üzerinden etkili bir takım yöntemleri de içermektedir. Genel yöntemler arasında daha az toksik olan bir alternatif var ise bu ilacın kullanılması, aminoglikozid verilmesi durumunda tedavinin mümkün olan en erken aşamada sonlandırılması, aynı zamanda işitme ve vestibüler

fonksiyonlarının monitorize edilmesi sayılabilir. Burada özellikle yüksek frekans odyometri ve otoakustik emisyon değerlidir.

Mekanizma üzerine etkili yöntemler ise daha çok demir şelasyonu ve serbest radikaller üzerinden çalışmaktadır. Birçok madde serbest radikal oluşumunu engelleme özelliğine sahiptir. Nitro-L-arginine methyl ester (L- NAME) bunlardan biridir. Nitrik oksit sentaz inhibitörüdür. Pseudomonas aeruginosa ekzotoksini ile oluşan sensorinöral işitme azlığını engellediği gösterilmiştir (Popa 2000). Deksametozonun da nitirik oksit sentezini engelleyerek antiototoksik etki gösterdiği öne sürülmüştür (Park 2004). Organizmayı serbest radikallerden koruduğu bilinen ve oksidatif stres ile miktarı artan glutatyonun gentamisine bağlı ototoksisiteyi engellediği iddia edilmiştir (Lautermann 1995). Diğer bir takım çalışmalarda da N-asetilsisteinin gentamisin ototoksisitesini iyileştirdiği gösterilmiş ve bazı yazarlar bunu N-asetilsisteinin vücutta glutatyon prokürsörü olan sisteine hidrolize olarak miktarını artırmasına bağlıdır (Feldman 2007, Tepel 2007).

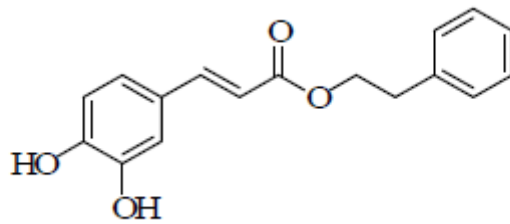
Bir demir şelatörü olan deferroksamin ile yapılan çalışmada, aminoglikozid-demir kompleksini etkileyerek gentamisin toksisitesini engelleyici etkisinin bulunduğu histopatolojik ve odyolojik olarak gösterilmiş ve bu olumlu etkinin kısmi olduğu vurgulanmıştır (Mostafa 2007, Conlon 1998). Benzer şekilde bir demir şelatörü olan ve aynı zamanda antioksidan özellik de taşıyan dihidroksibenzoat ve salisilat aminoglikozid toksisitesinden korunmada etkili bulunmuştur (Chen 2007, Sinswat 2000, Song 1998).

2.5. Kafeik Asit Fenetil Ester

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir (Hepşen 1996). Kafeik asit fenetil ester, 180'den fazla bileşik içeren bal arısı kovanlarından ekstraksiyon yoluyla oluşturulan propolisten elde edilir (Bankova 2005). Eski yıllarda propolis halk tıbbi çerçevesinde antibakteriyel ve antienflamatuar etkileri başta olmak üzere birçok sebeple tedavi amaçlı olarak kullanılmış, iyileştirici rolünün olduğu gözlemlenerek halk tarafından iyice anlaşıldıktan sonra daha çok yaygınlık kazanmıştır. Tıp otoritelerinin dikkatini çekmeye başladığı yıllardan sonra yapılan birçok araştırmada propolisin aktif bileşenlerinin antimikrobik, antienflamatuar, immünmodülatör, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri keşfedilmiştir (Hepşen 1996 ve 1997, Natarajan 1996, Mirzeova

1996, Sud'ina 1993). CAPE ile birlikte propolisin aktif bileşenlerinden olan diterpenoidler ve diğer bazı fenolik bileşiklerin antitümör etkinlikleri oldukça belirgindir.

Bu özelliklerinin hemen hepsi CAPE'nin membranları rahatlıkla geçmesine fırsat verecek fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubuna (-OH) bağlıdır (Şekil 2.7). Bu iki hidroksil grubu moleküle kuvvetli antioksidan özellik kazandırmaktadır. Başlangıçta kimyasal ekstraksiyon metodlarıyla ayrıştırılarak bilimsel araştırmalarda kullanılan CAPE, 1990'lı yılların başında Sigma-Aldrich firması tarafından üretilip ticari preparat olarak piyasaya sunulmuştur (Grunberger 1988). Bilimsel çalışmalarda kullanılan bu ürün, -20 C'de dikkatle saklanması gereken bir üründür, aksi olduğunda biyolojik aktivitesini tümü ile kaybetmektedir. Molekül ağırlığı 284,31 gr/mol olan liyofilize haldeki bu ürünün empirik formülü C₁₇H₁₆O₄ olarak kaydedilmiştir. Etil asetat, dimetilsülfoksit (DMSO) ve etanolde tamamen çözünmektedir. Biyokimyasal ve fizyolojik olarak en dikkati çeken etkisi nükleer transkripsiyon faktörü NF-kappaB' nin çok spesifik bir inhibitörü olmasıdır. CAPE üzerine yapılan ilk çalışmalar, daha çok tümör hücreleri üzerine olan sitotoksikite, transformasyon ve ekspresyon üzerine olmakla birlikte daha sonraları apoptozis üzerine olan etkileri ile NF-kappaB üzerinden etkinlik gösterdiği tahmin edilen enflamasyon çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Daha sonra yoğun bir şekilde hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmalarında CAPE'nin antioksidan etkileri başta olmak üzere bütün etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır.



Şekil 2.7: Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı

2.5.1. Antioksidan Etkisi

CAPE'nin yapısı, güçlü bir antioksidan olan katekol içerir (Park 1999). Sıçanlarda akut böbrek hasarı üzerine propolis ekstraksiyonunun antioksidan aktivitesi çalışması ile, CAPE'nin güçlü antioksidan aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Ozyurt 2006). Modern

tıbbi araştırmalar, propolisin ana antioksidan gruplarının CAPE, kafeik asit, quersetin, galangal ve sinamik asit ester olduğunu gstermiştir. Bir alışmada CAPE içeren propolisin antioksidan etkisinin CAPE içermeyenlere göre daha güçlü olduğu ve CAPE'nin antioksidan aktivitede önemli bir rol oynadığı gsterilmiştir (Sud'ina 1993).

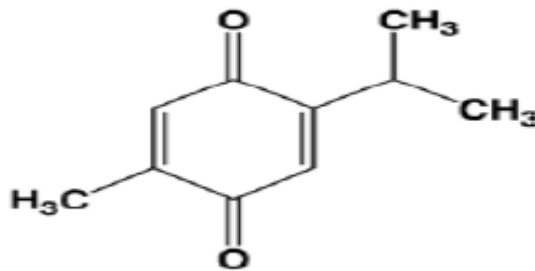
Propolis yanıkların tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır. Yanıklar, iskemik reperfüzyonun neden olduğu yetersiz kan hacmi, iskemi ve vücut hasarına yol açmaktadır. Bu değişiklikler araşidonik asidin metabolik işleminden iyon (demir) salınması, perhidrol ile Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikallerinin oluşumuna yol açma, inflamatuvar sitokinlerin salınması, trombositlerin agregasyonu ve diğer hormon metabolizmasında değişiklikler gibi zincirleme reaksiyonlar şeklinde ortaya çıkar. Bu reaksiyonlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ve salınmasına yol açan oksidasyon reaksiyonu tarafından tetiklenir. Lokal ve sistemik oksidan değişiklikler doku inflamasyonunu stimüle edebilir. Oksidanın artışı ve endojen enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan aktivitenin azalması hücre zarlarının lipid peroksidasyonuna neden olur. Hücre zarının lipid peroksidasyonu, hücre zarlarının likiditesinin ve geçirgenliğinin değişmesine yol açar, protein ve nükleik asidin degradasyon oranını artırıp sonuç olarak hücre lizisine yol açar. Yanık sonrası hücrelerde malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO) ve katalaz (CAT) aktiviteleri belirgin olarak artarken, süperoksit dismutaz (SOD) ve ksantin oksidaz (XO) aktiviteleri de azalır. Bir alışmada CAPE'nin Wistar albino sıçanları tarafından meydana gelen oksidatif hasarı tedavi etme aktivitesinin olup olmadığı test edilmiştir. Sıçanların vücut yzeyinin% 25-% 30'u 100 C su ile yakılarak, sıçanlara günde 10 mol /kg CAPE enjekte edildi ve yanıktan 1,3 ve 7 gün sonra her bir organdaki hasara bakıldı. Yanık sıçanlarda, böbrek ve akciğerlerde CAPE'nin MDA, MPO ve CAT seviyelerini azalttığı ve SOD ve XO aktivitelerini artırdığı gsterilmiştir (Gurel 2004).

Yapılan başka bir çalışmada CAPE'nin, korneal fibroblastlarda proinflamatuvar sitokin IL-1β ile indüklenen IL-6, MCP-1 ve ICAM-1 ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. AKT (protein kinaz B) ve NF-κB'nin IL-1β ile aktivasyonu, CAPE tarafından belirgin bir şekilde inhibe edilirken, mitojen ile aktive olan protein kinazların (MAPK'lar) aktivitesi etkilenmemiştir (Yang 2014). CAPE ile yapılan başka bir çalışmada ise aktiveştirilmiş HMC-1 insan mast hücrelerinde MAPK'ları ve NF-κB sinyalini inhibe ederek CAPE'nin antiinflamatuvar etkileri desteklediği belirtilmiştir (Cho 2014).

2.6. Timokinon

Çörek otu, *Ranunculacea* (*Düğünçiçeğigiller*) familyasının *Nigella sativa* (*NS*) türü olup, bitki çeşitliliği bakımından oldukça zengin olan ülkemizde siyah tohum, siyah kimyon veya bereket tanesi olarak bilinmektedir. Bölgenin iklimine bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte *NS* tohumlarının yapısında, uçucu yağlar (% 0.4-0.45), sabit yağlar (% 32-40) proteinler (% 16-19.9), amino asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler (5.5%), karbonhidratlar (% 33.9), mineraller (% 1.79-3.44), askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit bulunmaktadır. Sabit yağın yapısında doymamış yağ asitlerinden oleik asit, linoleik asit, eikozadienoik, araşidonik asit ve linolenik asit bulunurken, doymuş yağ asitlerinden ise miristik asit, palmitik asit ve stearik asit bulunmaktadır. Uçucu yağın yapısında ise nigellon, karvakrol, p-cymene, d-limonen, α ve β -pinen'in yanı sıra farmakolojik olarak aktif temel bileşenlerden başlıca timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol yer almaktadır (Randhawa 2002, Baytop 1984).

Timokinon (TQ) ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinin) çörek otu uçucu yağında % 18,4-24 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir (Şekil 2.8) (Pari 2009). Antioksidan özelliği nedeniyle pek çok çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 2.8: Timokinonun kimyasal yapısı

2.6.1. Antioksidan Etkisi

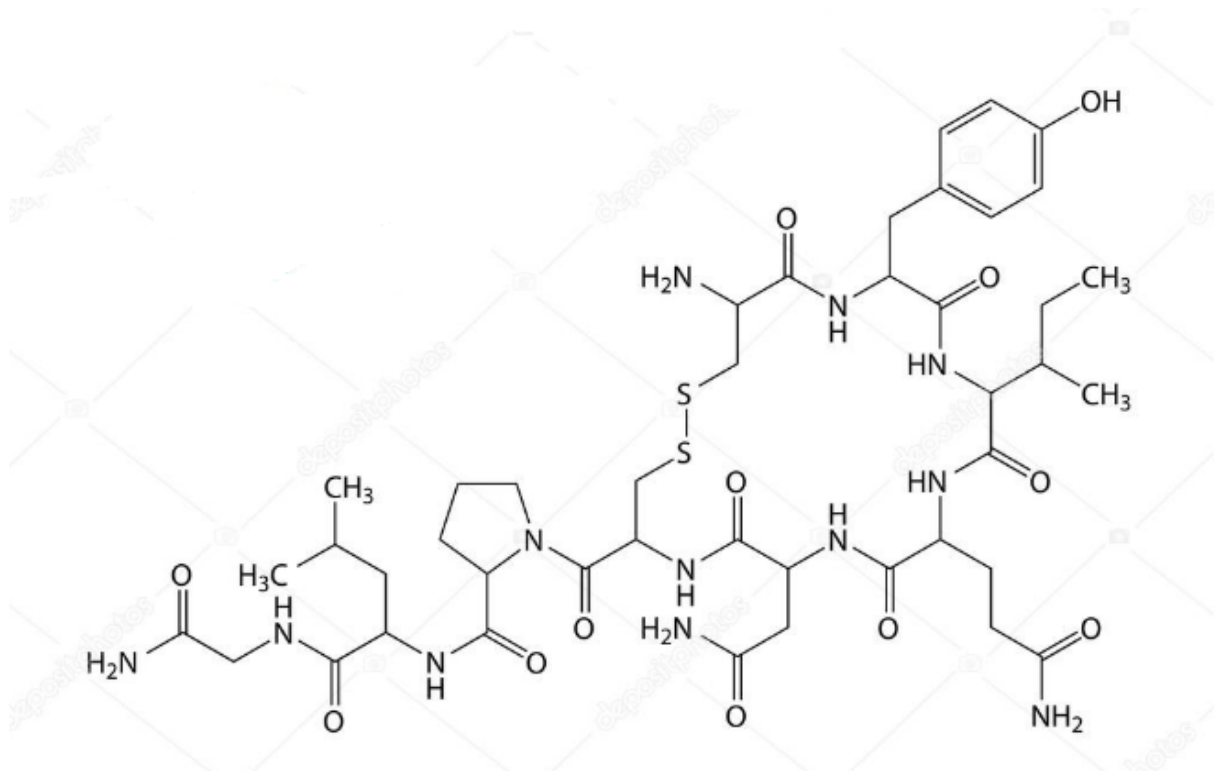
Serbest radikaller elektriksel olarak yüklü olup, hücre membranı içinden geçerek vücuttaki nükleik asitler, proteinler ve enzimler ile reaksiyona girer ve yıkım oluştururlar (Salem, 2005). Çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özellik gösteren timokinonun süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin süpürücüsü

olduğu (Badary 2003) ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği bildirilmektedir (El-Dakhakhny 2002). Doksorubisin ile indüklenen nefropatide timokinonun lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan özellik gösterdiği ve nefropatiyi baskıladığı bildirilmektedir (Badary 2000). Timokinon ve sentetik tertbutilhidroquinon (TBHQ)'un kuvvetli antioksidan ve prooksidan etkileri olduğu ve her ikisi de konsantrasyona bağlı olarak demire bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilirken, timokinonun süperoksit anyon süpürücü olarak TBHQ'dan daha aktif olduğu gösterilmiştir (Badary 2003).

Sıçanlarda yapılan çalışmada koroner, serebral ve periferel damar hastalıklarında risk oluşturan hiperhomosisteinemiye karşı timokinonun koruma sağladığı (El-Saleh 2004) aynı zamanda timokinonun çörek otu tohumundaki diğer bileşenlerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Bourgou 2010). Ratlarda N-nitro-L-arjinin metil esterleri (L-NAME) ile nitrik oksidin kronik inhibisyonundan sonra verilen timokinonun glutasyon (GSH) düzeyini artırırken enzimatik ve nonenzimatik sistemlerdeki süperoksit radikallerin in vitro sentezini inhibe ettiği ve bu antioksidan aktivitesi hipertansiyon ve renal hasara karşı korumada umut verici bir bileşik olduğu belirtilmektedir (Khattab 2007). Ratlarda civa klorür tarafından indüklenen renal oksidatif hasarın önlenmesinde TQ'nun apoptozis ve proliferatif reaksiyonları azalttığı ve timokinonun inorganik civa intoksikasyonunun sebep olduğu akut renal yetmezliğin korunmasında klinik önemi olduğu bildirilmektedir (Fouda 2008). Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda kalp ve beyindeki oksidatif stres araştırılmış ve diyabetlilerde glutasyon-S-transferaz (GST), glutasyon (GSH) ve katalaz (CAT)'daki belirgin azalma ile oksidatif stresin olduğu, bu düşük düzeylerin hem çörek otu yağı hem de timokinon verilmesi ile iyileştirildiği belirtilmektedir (Hamdy 2009). Kolon içine % 3 asetik asit enjekte ederek kolit oluşturulan ratlarda timokinonun tam bir koruyucu etki gösterdiği, bu koruyucu etkinin kısmen antioksidan etkisinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Mahgoub 2003). Ratlarda etanol ile indüklenen akut gastritte timokinon verilmesinin ülser indeksi ile malondialdehit (MDA) seviyesini azalttığı ve GSH sentezini artırdığı belirtilmekte ve timokinonun gastroprotektif etkinliğinin kısmen antioksidan özelliğine bağlı olduğu ortaya konmaktadır (Arslan 2005).

2.7. Oksitosin

Oksitosin, hipotalamusta supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerden salınan ve dokuz aminoasitten oluşan peptit yapıları bir hormon olarak bilinir (Şekil 2.9). Bu iki çekirdeğin yanı sıra oksitosin hipotalamusun yakınındaki diğer çekirdeklerden de (forebrain bundle, bed stria terminalis, zona incerta, substantia innominata vb.) salınarak arka hipofize gelir ve buradan sistemik dolaşıma verilerek özellikle uterus kası, meme bezi ve seminifer tübülleri üzerine etki eder (Kelly 1980 ve Zimmerman 1984).



Şekil 2.9: Oksitosinin kimyasal yapısı

Oksitosin, kanda serbest bir peptit olarak dolaşır. Yarılanma ömrü canlı türlerine göre farklılık gösterir. Bazı metabolitleri biyolojik olarak aktif özellik gösterebilir. Ancak hormon genel olarak böbrekler tarafından etkin olmayan metabolitleri şeklinde vücuttan dışarı atılır. Gebelikte değişmekle birlikte metabolik klirens oranı 19-21 ml/kg/dakikadır (Dawood 1985).

2.7.1. Antioksidan Etkisi

Oksitosinin klasik etkilerinin yanında antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi de vardır. Oksitosin lipid peroksidasyonunu, hücresel antioksidan sistemin bir parçası olan redükte

glutasyon ve süperoksit dismutaz tüketimini ve süperoksit oluşmasına neden olan NADPH oksidaz aktivitesini azaltır (Ahn 1994 ve Kimura 1998)

Laila ve arkadaşları ratlarda cisplatin sonucu gelişen nefrotoksisite ile ilişkili çalışmasında, sistemik 1 mg/kg oksitosin uygulamasının güçlü antioksidan ve koruyucu etkisini göstermiştir (Rashed 2011). Başka bir çalışmada oksitosinin TNF- α , IL-4 ve 6 gibi proinflamatuvar mediyatörlerin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Clodi 2008). Oksitosinin diyabetik nöropati üzerine etkisi ile ilgili ratlarda yapılan bir çalışmada 160 μ g / kg oksitosin uygulamasının Schwann hücre hasarını önlediği, nöropatik demyelinizasyonu azaltıp remyelinizasyonu artırdığı bildirilmiştir (Erbaş 2017).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni alınmıştır (Karar Sayısı: 2016-038). Çalışmada Helsinki Nihai Senedi (1986)' nin deney hayvanlar ile ilgili maddelerine uyuldu.

3.1. Grupların Oluşturulması

Çalışma ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen, sağlıklı 50 adet dişi Wistar Albino türü rat üzerinde gerçekleştirildi. Deney hayvanları Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde sıcaklığı 22 ± 2 santigrat derecede, nemi % 45-65 oranında korunan, serbest yemek ve su alabildikleri ve 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Çalışmamızda otomikroskopik muayene (Carl Zeiss Surgical GmbH-Strasse 22) ile orta kulağın durumu değerlendirilerek, buşon varlığında temizlenip kulak zarı normal görülen sıçanlar çalışmaya dâhil edildi. Deney hayvanları rastgele seçim metoduna göre 5 gruba ayrıldı.

Grup I: Kontrol grubu olarak belirlendi. 10 rata 21 gün boyunca günde tek doz 2 mL/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup II: Gentamisin grubu olarak belirlendi. 10 rata 14 gün boyunca günde tek doz 120 mg/kg gentamisin (Genta ampul, İ.E. Ulugay) intraperitoneal olarak uygulandı. Çeşitli nedenlerden dolayı 3 hayvan ex oldu.

Grup III: Gentamisin + Kafeik asit fenetil ester (CAPE) grubu olarak belirlendi. 10 rata % 10 etanol ile hazırlanan 10 $\mu\text{mol/kg}$ CAPE (Sigma-Aldrich Co LLC, St Louis MO), gentamisin (120 mg/kg/gün-14 gün) uygulamasından 24 saat önce başlanarak, gentamisinle birlikte 14 gün ve gentamisin uygulamasından sonra 7 gün daha intraperitoneal olarak uygulandı. Çeşitli nedenlerden dolayı 3 hayvan ex oldu.

Grup IV: Gentamisin + Timokinon grubu olarak belirlendi. 10 rata 30 mg/kg timokinon (Sigma-Aldrich Co LLC, St Louis MO), gentamisin (120 mg/kg/gün-14 gün) uygulamasından 24 saat önce başlanarak, gentamisinle birlikte 14 gün ve gentamisin uygulamasından sonra 7 gün daha oral gavaj yöntemi ile uygulandı. 3 hayvan ex oldu ve çalışma 7 rat ile tamamlandı.

Grup V: Gentamisin + Oksitosin grubu olarak belirlendi. 10 rata 160 µg/kg oksitosin (Pituisan, Alfasan International BV, Hollanda), gentamisin (120 mg/kg/gün-14 gün) uygulamasından 24 saat önce başlanarak, gentamisine birlikte 14 gün ve gentamisin uygulamasından sonra 7 gün daha intraperitoneal olarak uygulandı. Deney hayvanı kaybı olmadı.

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPOAE) ve beyinsapı işitsel uyarılmış potansiyelleri (BİUP) testleri öncesinde ratlara 10 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg ketamin verilerek anestezi sağlandı. Deneyin sonlandırılmasında da aynı şekilde anestezi uygulanarak servikal dislokasyon metoduyla sakrifikasyon işlemine geçildi.

3.2. DPOAE Ölçümü

Ölçümler Otodynamics Echoport ILO292 USB II cihazı ile yapıldı ve ratlar için yenidoğan probu kullanıldı. f_2 ve f_1 frekansları oranı (f_2/f_1) 1.22 olacak şekilde tutuldu. L1-L2 seviyeleri arasındaki fark 10 dB SPL ($L_1 = 65$ dB SPL, $L_2 = 55$ dB SPL) düzeyinde tutuldu. DPOAE'lar, $2f_1-f_2$ frekansında ölçüldü. DPOAE testi f_1 ve f_2 'nin geometrik ortalamalarında ratların her iki kulağına 1000, 1400, 2000, 2800, 4000, 6000 ve 8000 Hz'de SNR (sinyal gürültü oranı) değerleri kaydedilerek uygulandı. SNR, DPOAE cevaplarını değerlendirmek için DPOAE amplitüdlere göre daha güvenilirdir (Lamm 1998). Tüm ratların her iki kulağına çalışma öncesinde ve çalışma bitiminde 3 günlük gözlem sonrası test uygulandı.



Resim 3.1: DPOAE ölçümü

3.3. BİUP Ölçümü

Ölçümler Medelec Synergy ABR Cihazı ile yapıldı. BİUP ölçümleri için 13 mm iğne elektrotlar (Electrode Disposable Subdermal, 13 mm, 1.5 M, 12 color Natus/019-453900), kanal içi kulaklık (Reusable Tip 300 Insert Phones, Natus/041-704000) ve prematür yenidoğan kulak problemleri (Eartips for use with Intra Auricular Headset and Ear Phone Type: Premature Natus/51023) kullanıldı. Negatif elektrot test edilen tarafın mastoide, pozitif elektrot alına, toprak elektrot karşı taraf mastoide yerleştirildi. Elektrotların uygunluğu impedansmetre ile kontrol edildi. Ölçümde 11.00 rate click uyarı verildi, 10 msn ölçüm zamanı, 100-1500 Hz filtreleme rarefaction polarite kullanıldı. 1500 click uyarının ortalaması alındı. 70 dB nHL ses şiddetiyle teste başlandı, alınan yanıtlara göre 10 dB veya 5 dB azaltılarak test tamamlandı. İşitme eşiğinin belirlenmesinde V. dalganın elde edildiği en düşük ses dB nHL şiddeti referans alındı. Tüm ratlara iki taraflı, çalışma öncesinde ve çalışma sonrası 3 günlük gözlem sonrasında ölçümler yapıldı.



Resim 3.2: BIUP ölçümü

3.4. Koklear Diseksiyon

Anestezi altında servikal dislokasyon sonrası boyun orta hattın aurikula doğru uzanan insizyon ile cilt ve ciltaltı geçildi. Daha sonra mikroskop yardımıyla dış kulak yolu ve timpanik membran izlendi. Dış kulak yolundan orta kulağa girilerek promontoryum görüldü, promontoryum çevresinden koklea oksipital ve sfenoid kemiklerden ve kas dokularından diseke edilerek çıkarıldı. Çıkarılan dokular dekalsifikasyon solüsyonuna konarak histoloji ve embriyoloji bölümüne teslim edildi.

3.5. Elektron Mikroskopik İnceleme Yöntemi

Taramalı elektron mikroskopik (TEM) takibi için alınan doku örnekleri dekalsifikasyon işleminin tamamlanması ve tespit işleminin gerçekleşebilmesi için yaklaşık 15 gün süresince Gluteraldehit içeren EDTA'lı dekalsifikasyon solüsyonuna alınarak ilk tespitleri

sağlandı. Dekalsifikasyon işlemlerinin ardından, fiksasyonun tamamlanması için % 4 glutraldehit solüsyonuna alınarak bir süre daha bekletildiler.

Osmiyum Tetroksit tespiti:

Osmiyum tetroksit (OsO₄) 0.1 g

Distile su 5 cc

1 kısım Sorenson fosfat tamponu + 1 kısım osmiyum tetroksit

Dokular bu şekilde hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksit çözeltisinde 1 saat etkin bırakıldı. Böylece tespit ve boyanmaları sağlanmış oldu.

Dehidratasyon ve blok oluşturulması:

Dokular osmiyumla ikinci kez tespit edildikten sonra, doku içindeki fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirildi.

%50'lik alkol 10 dakika

%60'lık alkol 10 dakika

%70'lık alkol 10 dakika

Uranil asetat30 dakika (1 g uranil asetat+50 ml %80'lik alkol karışımı hazırlandıktan sonra süzülerek 10 dakika bekletildi.)

%80'lik alkol 2 kez yıkandı ve 10 dakika bekletildi.

%90'lık alkol 10 dakika

%96'lık alkol 10 dakika

%100'lük alkol15 dakika

Propilen oksit30 dakika

Propilen oksit +1. gömme materyali 30 dakika

1. Gömme materyali (Araldit CY 212 10 cc + DDSA 10 cc): 1 gece.

2. Gömme materyali (Araldit CY 212 10 cc + DDSA 10 cc + BDMA 0.4 cc + Dibütil fitalat 1 cc): 2 saat oda ısısı.

3. Gömme materyali: 2 saat 40°C etüv.

Daha sonra dokular, içinde aynı gömme materyali bulunan 00 numara jelatin kapsüle gömüldü. Blok içindeki havanın çıkması için 1 saat oda ısısında bekletilen dokular, polimerizasyon için 24 saat 45 C'de, 48 saat 60 C'de etüvde bekletildiler. Süre sonunda etüv kapatılarak dokular etüv içinde kendi hallerinde soğumaya bırakıldı.

Hazırlanan bloklardan LKB Leica ultramikrotom ile 1 µ kalınlığında kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde incelenen kalın kesitlerin resimleri çekildi ve bu bölgeler işaretlenerek formvar

kaplı bakır gridler üzerine 0.2-0.5 μ 'luk ince kesitleri alındı. Kontrast sağlamak için alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EVO LS 10+ED Transmission Elektron Mikroskopta (TEM) değerlendirilerek fotoğraflandı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma istatistikleri verildi. Sayısal değişkenlerin analizinde karma etki modelleri kullanıldı. Analizler SAS University Edition 9.4 programı ile yapıldı. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. DPOAE

Ölçümler tüm ratlara bilateral olarak yapıldı, istatistiksel analiz için denek sayısı değil kulak sayısı baz alındı. Tüm ratlara işlem öncesi ve işlem sonrası (3 günlük gözlem sonrası), 1-1,4-2-2,8-4-6-8 kHz frekanslarda DPOAE uygulandı ve analiz için SNR oranı kullanıldı.

4.1.1. Grup I (Kontrol)

Tüm frekanslar için işlem öncesi SNR oranları gruplar arasında karşılaştırıldı. Grup I ile Grup II kıyaslandığında 1,4 kHz dışında tüm frekanslarda anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0,05$). 1,4 kHz' de Grup I ile Grup II arasında anlamlı fark olduğu ve Grup II' de SNR ortalamasının daha yüksek olduğu izlendi. Bu nedenle 1,4 kHz daha sonraki değerlendirmelerde dikkate alınmadı.

Her frekans için Grup I' in işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları tablo 4.1' de gösterilmiştir. Tüm frekanslarda işlem öncesi ve işlem sonrası SNR ortalamaları arasında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

Grup I	İşlem Öncesi SNR	İşlem Sonrası SNR	P
1 kHz	4,35 ± 5,34	4,88 ± 6,29	0,5052
1,4 kHz	4,39 ± 4,26	5,01 ± 4,02	0,4801
2 kHz	10,3 ± 2,01	10,1 ± 2,18	0,7904
2,8 kHz	11,57 ± 3,67	12,04 ± 4,53	0,693
4 kHz	16,56 ± 4,14	16,37 ± 4,32	0,8772
6 kHz	17,76 ± 5,23	18,84 ± 4,99	0,4138
8 kHz	21,22 ± 6,03	22,49 ± 6,95	0,3795

Tablo 4.1: Grup I işlem öncesi ve sonrası SNR oranları

Grup I ve Grup II arasında işlem sonrası SNR ortalamaları kıyaslandığında, 1 kHz dışındaki tüm frekanslarda Grup I' de SNR ortalamalarının anlamlı şekilde daha yüksek olduğu izlendi.

4.1.2. Grup II (Gentamisin)

Tüm frekanslar için işlem öncesi SNR oranları gruplar arasında karşılaştırıldı. 1,4 kHz dışında tüm frekanslarda anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0,05$). 1,4 kHz’ de Grup I ile Grup II arasında anlamlı fark olduğu ve Grup II’ de SNR ortalamasının daha yüksek olduğu izlendi.

Her frekans için Grup II’nin işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları tablo 4.2’ de gösterilmiştir. 1 kHz dışındaki tüm frekanslarda SNR ortalamasının işlem sonrası anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi ($p<0,05$).

Grup II	İşlem Öncesi SNR	İşlem Sonrası SNR	P
1 kHz	3,52 ± 2,66	3,26 ± 5,17	0,6714
1,4 kHz	8,58 ± 6,08	6,33 ± 4,35	0,0381
2 kHz	10,66 ± 4,6	6,11 ± 2,41	<0,0001
2,8 kHz	12,22 ± 5,56	7,11 ± 4,04	0,0016
4 kHz	14,95 ± 5,12	7,45 ± 2,86	<0,0001
6 kHz	17,99 ± 6,02	10,16 ± 4,24	<0,0001
8 kHz	20,49 ± 6,37	11,93 ± 4,66	<0,0001

Tablo 4.2: Grup II işlem öncesi ve sonrası SNR oranları

İşlem sonrası SNR ortalamaları Grup I ile kıyaslandığında, 1 kHz dışındaki tüm frekanslarda Grup I’ de SNR ortalamalarının anlamlı şekilde daha yüksek olduğu izlendi (Tablo 4.3).

Frekans	SNR Farkı	p
1 kHz	-1,62	0,3673
1,4 kHz	1,32	0,4870
2 kHz	-3,99	0,0055
2,8 kHz	-4,93	0,0142
4 kHz	-8,92	<0,0001
6 kHz	-8,68	0,0002
8 kHz	-10,56	<0,00010

Tablo 4.3: Grup II - Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması

4.1.3. Grup III (Gentamisin + CAPE)

Tüm frekanslar için işlem öncesi SNR oranları Grup III ile diğer gruplar arasında karşılaştırıldı ve anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0,05$).

Her frekans için Grup III'ün işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları tablo 4.4' de gösterilmiştir. 1 kHz, 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz ve 6 kHz' de işlem öncesi ve işlem sonrası SNR ortalamaları arasında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

Grup III	İşlem Öncesi SNR	İşlem Sonrası SNR	P
1 kHz	2,91 ± 5,64	3,99 ± 3,49	0,4373
1,4 kHz	6,57 ± 6,44	4,69 ± 3,8	0,0204
2 kHz	9,24 ± 5,84	8,01 ± 5,6	0,2402
2,8 kHz	13,12 ± 4,82	12,03 ± 3,91	0,3961
4 kHz	15,27 ± 4,62	14,9 ± 4,19	0,4017
6 kHz	19,17 ± 6,25	16,62 ± 5,16	0,1631
8 kHz	23,25 ± 6,16	21,06 ± 5,4	0,0375

Tablo 4.4: Grup III işlem öncesi ve sonrası SNR oranları

İşlem sonrası SNR ortalamaları Grup I ile kıyaslandığında, tüm frekanslarda anlamlı fark olmadığı izlendi (Tablo 4.5).

Frekans	SNR Farkı	p
1 kHz	-0,89	0,1664
1,4 kHz	-0,32	0,6716
2 kHz	-2,09	0,2141
2,8 kHz	-0,01	0,9647
4 kHz	-1,47	0,2606
6 kHz	-2,22	0,4014
8 kHz	-1,43	0,2247

Tablo 4.5: Grup III - Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması

4.1.4. Grup IV (Gentamisin + Timokinon)

Tüm frekanslar için işlem öncesi SNR oranları Grup IV ile diğer gruplar arasında karşılaştırıldı ve anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0,05$).

Her frekans için Grup IV' ün işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları tablo 4.6' de gösterilmiştir. 2,8 ve 4 kHz dışındaki diğer tüm frekanslarda işlem öncesi ve işlem sonrası SNR ortalamaları arasında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

Grup IV	İşlem Öncesi SNR	İşlem Sonrası SNR	P
1 kHz	5,14 ± 3,81	4,61 ± 4,58	0,3678
1,4 kHz	6,22 ± 5,24	5,11 ± 3,37	0,2678
2 kHz	9,45 ± 2,07	7,96 ± 2,09	0,1186
2,8 kHz	14,03 ± 4,23	10,94 ± 3,58	0,0168
4 kHz	14,45 ± 5,37	11,69 ± 4,42	0,0296
6 kHz	17,35 ± 5,13	16,09 ± 4,54	0,2912
8 kHz	22,31 ± 4,47	21,14 ± 4,3	0,4167

Tablo 4.6: Grup IV işlem öncesi ve sonrası SNR oranları

İşlem sonrası SNR ortalamaları Grup I ile kıyaslandığında, 4kHz hariç diğer tüm frekanslarda anlamlı fark olmadığı izlendi (Tablo 4.7).

Frekans	SNR Farkı	p
1 kHz	-0,17	0,7617
1,4 kHz	0,1	0,9751
2 kHz	-2,14	0,1833
2,8 kHz	-1,1	0,4437
4 kHz	-4,68	0,0143
6 kHz	-2,75	0,1523
8 kHz	-1,35	0,4959

Tablo 4.7: Grup IV - Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması

4.1.5. Grup V (Gentamisin + Oksitosin)

Tüm frekanslar için işlem öncesi SNR oranları Grup IV ile diğer gruplar arasında karşılaştırıldı ve anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0,05$).

Her frekans için Grup V' in işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları tablo 4.8' da gösterilmiştir. 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz, 6 kHz ve 8 kHz' de SNR ortalamasının işlem sonrası anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi ($p<0,05$).

Grup V	İşlem Öncesi SNR	İşlem Sonrası SNR	P
1 kHz	3,52 ± 3,1	4,45 ± 3,08	0,2432
1,4 kHz	4,76 ± 4,21	3,4 ± 3,39	0,1214
2 kHz	9,81 ± 3,3	7,59 ± 3,26	0,0045
2,8 kHz	11,48 ± 4,56	8,97 ± 3,75	0,0365
4 kHz	17,23 ± 7,47	11,31 ± 4,92	<0.0001
6 kHz	20,64 ± 6,68	11,7 ± 3,82	<0.0001
8 kHz	21,69 ± 5,46	16,17 ± 4,88	0,0002

Tablo 4.8: Grup V işlem öncesi ve sonrası SNR oranları

İşlem sonrası SNR ortalamaları Grup I ile kıyaslandığında, 2 kHz ve 2,8 kHz' de anlamlı fark olmadığı izlendi izlendi (Tablo 4.9).

Frekans	SNR Farkı	p
1 kHz	-0,43	0,8172
1,4 kHz	-1,61	0,4105
2 kHz	-2,51	0,0895
2,8 kHz	-3,07	0,0512
4 kHz	-5,06	0,0088
6 kHz	-7,14	0,0006
8 kHz	-6,32	0,0029

Tablo 4.9: Grup V-Grup I işlem sonrası SNR oranlarının karşılaştırılması

4.2. BİUP

Ölçümler tüm ratlara bilateral olarak yapıldı, istatistiksel analiz için denek sayısı değil kulak sayısı baz alındı. Tüm ratlara işlem öncesi ve işlem sonrası (3 günlük gözlem sonrası), BİUP uygulandı ve işitme eşiğinin belirlenmesinde V. dalganın elde edildiği en düşük ses dB nHL şiddeti referans alındı.

İşlem öncesi BİUP ortalamaları gruplar arasında karşılaştırıldı ve anlamlı fark olmadığı izlendi ($p>0,05$). Tüm grupların işlem öncesi ve işlem sonrası BİUP ortalamaları tablo 4.10'de gösterilmiştir. Grup I hariç diğer gruplarda eşik değerlerin işlem sonrası yükseldiği ve bu yükselişin istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi ($p<0,0001$).

Grup	İşlem Öncesi (dB nHL)	İşlem Sonrası (dB nHL)	P
Grup I	17,5 ± 10,2	16,5 ± 7,45	0,7065
Grup II	14 ± 8,83	43,57 ± 10,08	<0,0001
Grup III	15,5 ± 11,91	32,86 ± 13,26	<0,0001
Grup IV	14,5 ± 9,99	28,57 ± 10,27	<0,0001
Grup V	14 ± 9,4	34,5 ± 13,17	<0,0001

Tablo 4.10: Grupların işlem öncesi ve işlem sonrası BİUP ortalamaları

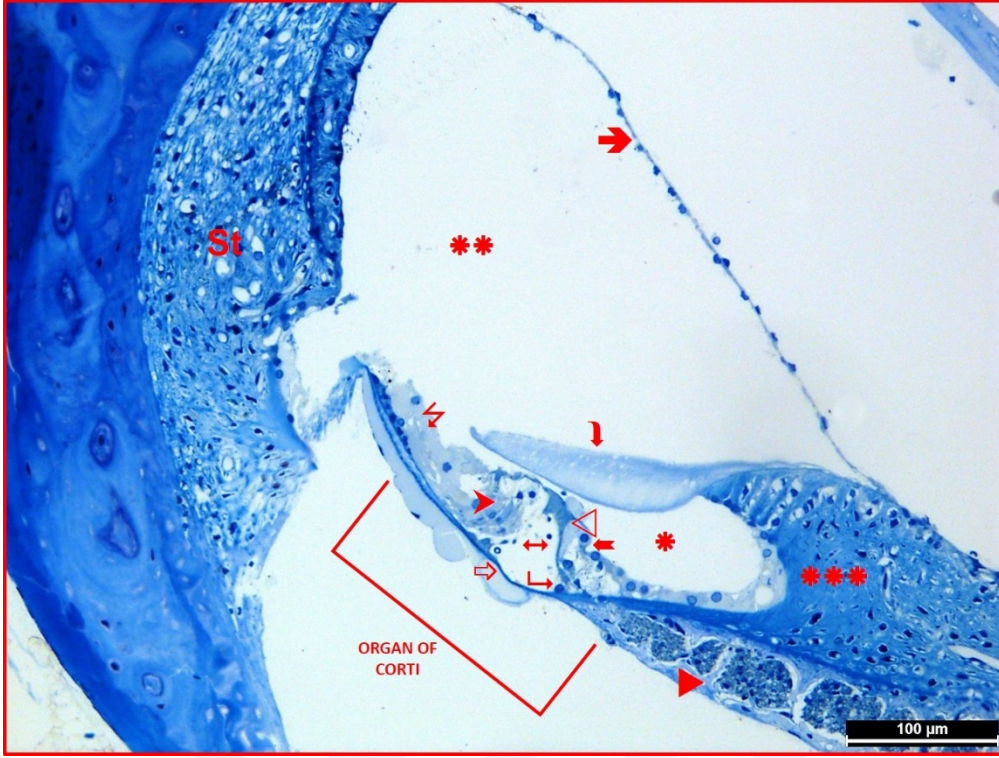
İşlem sonrası BİUP ortalamaları açısından Grup I ile diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu izlendi ($p < 0,05$). Bununla birlikte salt ototoksisite görülen Grup II ile diğer gruplar karşılaştırıldığında işitme eşiklerinin Grup II' de yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi (Tablo 4.11).

Grup	Diğer Gruplar	BİUP Farkı (dB nHL)	P
Grup I	Grup II	-27,07	<0,0001
	Grup III	-16,36	0,0002
	Grup IV	-12,07	0,0035
	Grup V	-18	<0,0001
Grup II	Grup I	27,07	<0,0001
	Grup III	10,71	0,0156
	Grup IV	15	0,0013
	Grup V	9,07	0,0383

Tablo 4.11: Grup I ve II ile diğer gruplar arası işlem sonrası BİUP ortalamalarının karşılaştırılması

4.3 Elektron Mikroskopik Bulgular

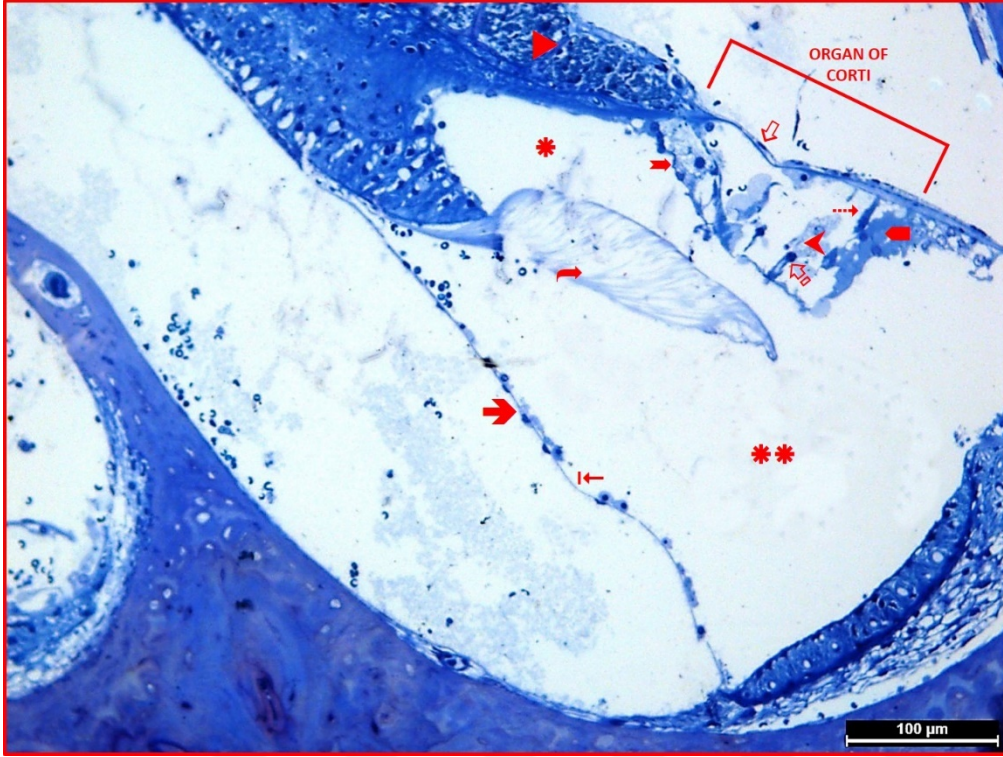
Taramalı elektron mikroskopik (TEM) araştırma için hazırlanan yarı ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde; kontrol grubunda vestibüler membran (Reissner membranı), baziler membran ve tektoriyal membran normal yapıları ile izlendi. İç spiral sulkus ile kohlear duktus, spiral limbus ile afferent ve efferent sinir lifi demetleri yine normal yapıları ile ayırt edildi. Korti organına ait iç ve dış tüy hücreleri ve korti tüneli normal histolojik yapıları ile izlendi. İç falangeal hücreler, iç pillar hücreleri, Boettcher ve Claudius ile Hensen hücreleri de normal şekilde ayırt edildi. Kohlear duktusun bazalini döşeyen stria vaskularis normal yapısında izlendi (Resim 4.1).



Resim 4.1: Kontrol grubuna ait yarı ince kesitlerde ➔: Reissner membranı (Vestibüler membran), ⇨: Baziler membran, ⇐: Tektoriyal membran, *: İç spiral sulkus, **: Kohlear duktus, ***: Spiral limbus, ▶: Afferent ve efferent sinir lifi demetleri, ➔: İç tüy hücreleri, ▶: Dış tüy hücreleri, ↔: Korti tüneli, ▷: İç falangeal hücreler, ⇨: İç pillar hücreleri, ⇐: Boettcher-Claudius-Hensen hücreleri ve St: Stria vaskülaris yapıları izleniyor (Toluidin blue x200).

Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan gruba ait yarı ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde korti organının önemli ölçüde dejeneratif bulgular sergilediği gözlemlendi. Baziler membranın dejeneratif görünüm sergilediği, vestibüler membranın ise devamlılık göstermekle birlikte her iki yüzünü döşeyen epitel incelendiğinde, bu epitelde dökülmeler olduğu ayırt edildi. Tektoriyal membranın homojen yapısını kaybederek fibriler yapı kazandığı, iç spiral sulkusun geniş bir aralıkla kohlear duktus ile devam ettiği ve tektoriyal membranın iç ve dış tüy hücreleri ile bağlantısını kaybettiği izlendi. Birçok iç ve dış tüy hücrelerinin sayısal anlamda göreceli olarak azaldığı, var olan Deiters (dış falangeal) hücreleri ve dış tüy hücreleri ile iç falangeal hücreleri ve iç tüy hücrelerinin karşılıklı olarak birbirleri ile bağlantılarını kaybettikleri, yapısal anlamda ciddi bozulma sergiledikleri saptandı. Özellikle dış tüy hücrelerinin piknotik çekirdekleri ile apoptotik, korti organına ait diğer tüm hücrelerin ise nekrotik görünüm kazandığı izlendi. Korti tünelinin bu apoptotik ve nekrotik hücreler dolayısı ile net şekilde ayırt edilemediği

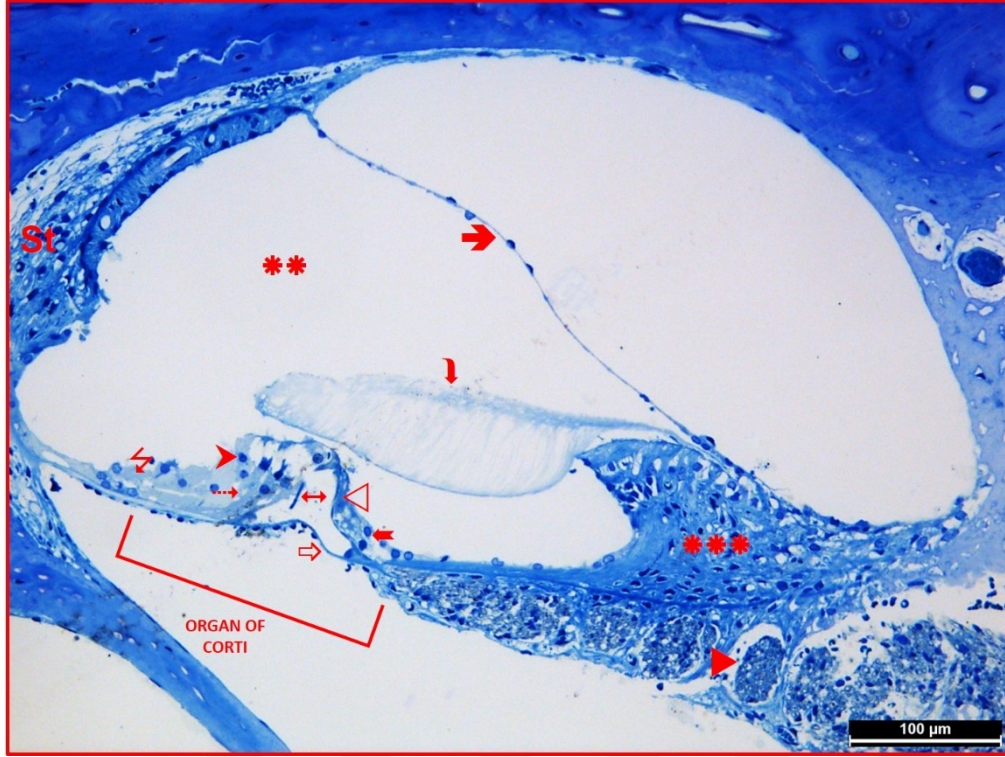
izlendi. Afferent ve efferent sinir lifi demetlerinin de dejeneratif yapı sergilediği dikkati çekti (Resim 4.2).



Resim 4.2: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan gruba ait yarı ince kesitlerde ➔: Reissner membranı (Vestibüler membran), ⇨: Baziler membran, ⇐: Tektoriyal membran, * : İç spiral sulkus, **: Kohlear duktus, ►: Afferent ve efferent sinir lifi demetleri, ➔: İç tüy hücreleri, ►: Dış tüy hücreleri, ⇨: Epitelde dökülme, ⇨ : Deiters (dış falangeal hücreler), ⇨: Piknotik çekirdekleri ile dış tüy hücreleri ve ► : Nekrotik hücreler görülüyor (Toluidin blue x200).

Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve kafeik asit fenetil esteri uygulanan gruba ait yarı ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde baziler ve vestibüler membranlar ile stria vaskularis normal yapıları ile ayırt edildi. Kafeik asit fenetil esteri uygulamasına ait koruyucu etkinin önemli ölçüde kuvvetli olduğu izlendi. Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan gruba kıyasla histolojik olarak; iç tüy hücreleri ile iç falangeal hücrelerin birbirleri ile sıkı bağlantılar yapmış şekilde ve hücre sınırları ile sitoplazmik sınırları net ayırt edilemez durumda oldukları belirlendi. Korti tüneli belirgin ve normal yapısı ile izlendi. Dış tüy hücreleri, Deiters (dış falangeal) hücreleri ve bu hücrelerin tektoriyal membran ile ilişkileri normaldi. Spiral limbus, afferent ve efferent sinir lifi demetleri ile

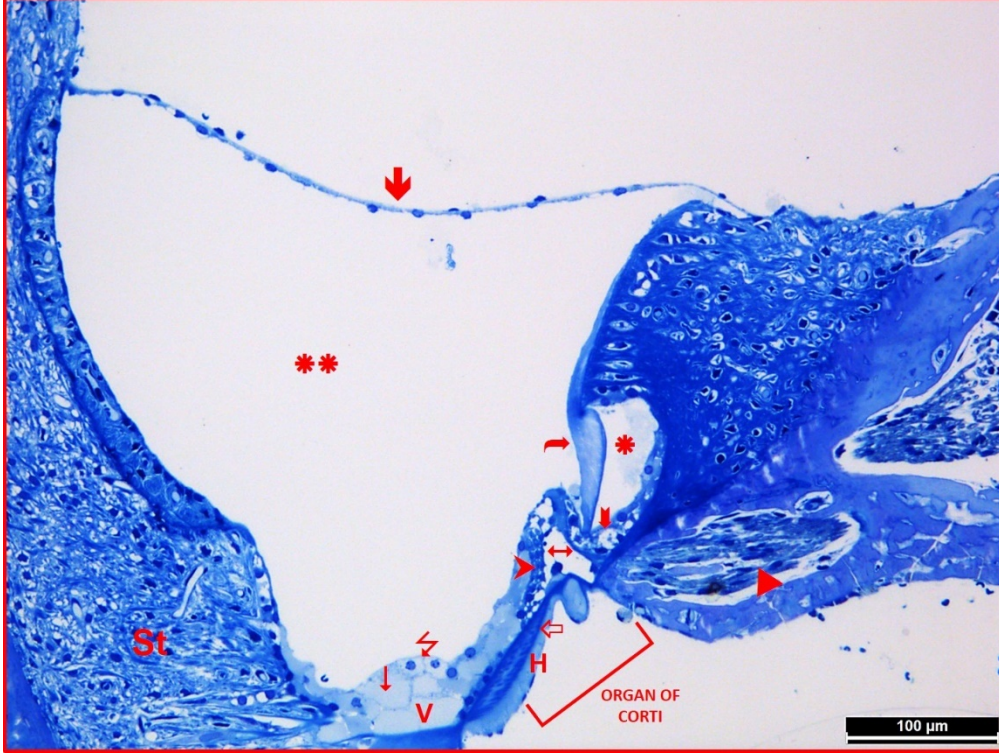
kohlear duktus yapıları normalken; Boettcher, Claudius ve Hensen hücrelerinde kayıp ayırt edildi (Resim 4.3).



Resim 4.3: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve kafeik asit fenetil esteri uygulanan gruba ait yarı ince kesitlerde ➔: Reissner membranı (Vestibüler membran), ⇔: Baziler membran, ↖: Tektoryyal membran, ***: Kohlear duktus, ***: Spiral limbus, ►: Afferent ve efferent sinir lifi demetleri, ➔: İç tüy hücreleri, ►: Dış tüy hücreleri, ⇔: Korti tüneli, ▷: İç falangeal hücreler, ↖: Boettcher-Claudius-Hensen hücreleri, ⇔: Deiters (dış falangeal hücreler) ve St: Stria vaskülaris yapıları izleniyor (Toluidin blue x200).

Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve timokinon uygulanan gruba ait yarı ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde bazılar membranın altında belirgin hyalinizasyon olduğu izlendi. Stria vaskülaris normal yapıda olmasına karşın; stria vaskülarisi izleyen Boettcher, Claudius ve Hensen hücrelerinde belirgin hipertrofi, sitoplazmada vakuolizasyon ve lipid benzeri inklüzyonlar tespit edildi. Korti tüneli izlenmekle birlikte, tüneli çevreleyen iç ve dış falangeal hücreler oldukça dejeneratif şekilde ayırt edildi; bu hücrelerin sitoplazmalarında homojen, koyu renkli hyalin benzeri birikimler olduğu, çekirdeklerin net olarak ayırt edilemediği izlendi. Tektoryyal membran ise oldukça küçük, iç ve dış tüy hücrelerine ulaşamaz durumdaydı. Tektoryyal membranın tüy hücreleri ile ilişki

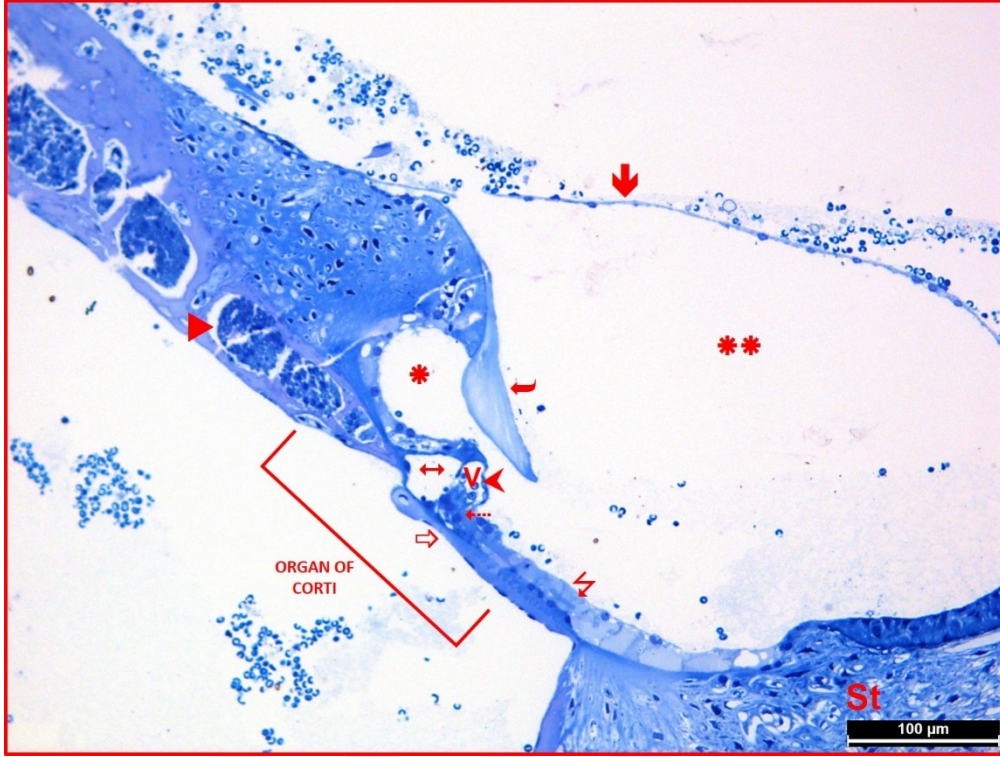
kuramadan, kısa yapısı neden ile iç spiral sulkusa doğru düştüğü izlendi. Tektoriyal membranın kısalığı nedeni ile bazilar membran üzerindeki korti organının kohlear kanala doğru bombeleştiği saptandı. Bu grupta afferent ve efferent sinir lifi demetlerinin de oldukça dejeneratif olduğu ayırt edildi (Resim 4.4).



Resim 4.4: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve timokinon uygulanan gruba ait yarı ince kesitlerde ➔: Reissner membranı (Vestibüler membran), ⇨: Bazilar membran, ⇩: Tektoriyal membran, *: İç spiral sulkus, **: Kohlear duktus, ⬤: Afferent ve efferent sinir lifi demetleri, ⬢: İç tüy hücreleri, ⬤: Dış tüy hücreleri, ⇄: Korti tüneli, ⚡: Boettcher-Claudius-Hensen hücreleri, H: Hyalinizasyon, V: Vakuolizasyon, →: Hipertrofi ve St: Stria vaskularis yapıları izleniyor (Toluidin blue x200).

Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve oksitosin uygulanan gruba ait yarı ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde, histolojik bulguların genel olarak kafeik asit fenetil ester uygulanan grup ile örtüştüğü, ancak bazı ciddi dejenerasyonların da devam ettiği tespit edildi. Bu grupta ayrıcalık olarak; dış tüy hücreleri ile falangeal hücreler arasındaki ilişkiye bakıldığında, destek hücrelerinin normal yapılarında olduğu ancak dış tüy hücrelerinin sitoplazmik yapılarının net olarak izlenmediği, sitoplazmanın tek bir vakuol halinde ayırt

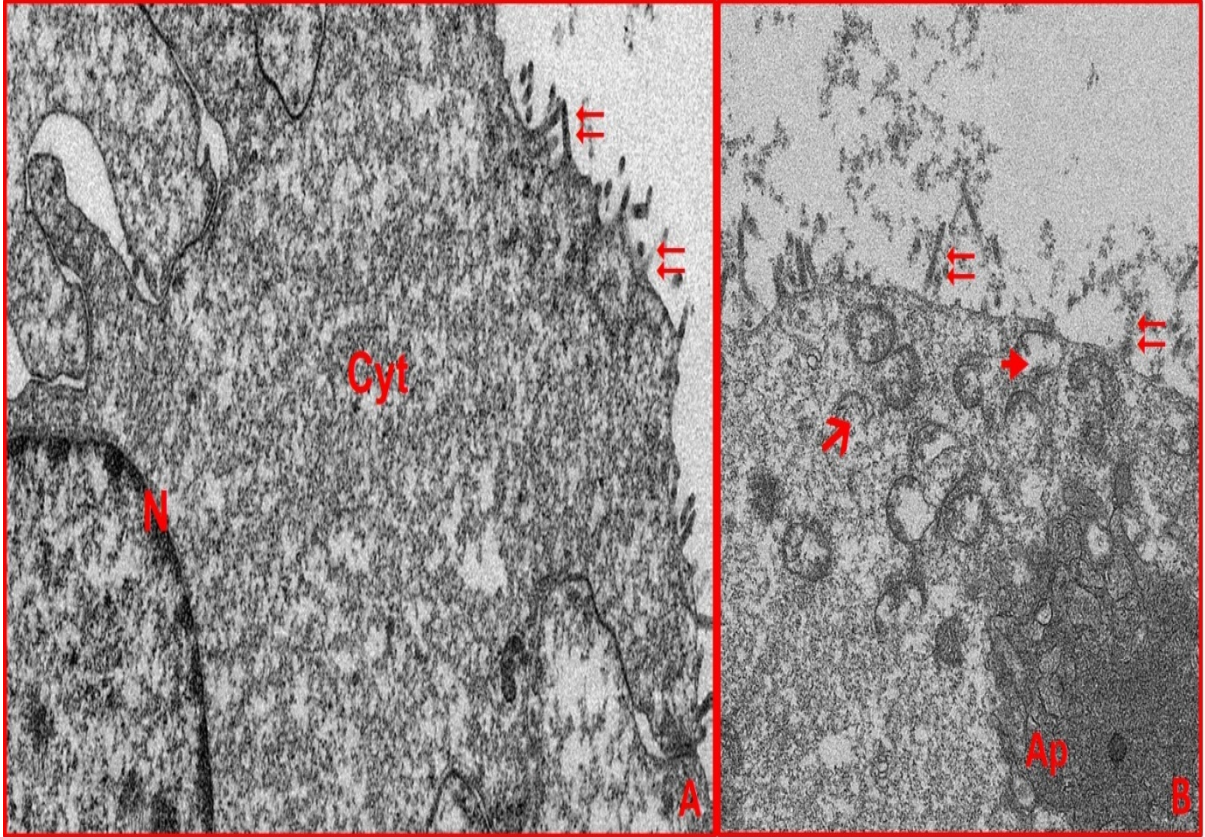
edildiği, siliyer yapı özelliği ve tektoriyal membran ilişkisi bakımından diğer gruptan farklı olarak çok sağlıklı bir görünüm sergilemediği tespit edildi (Resim 4.5).



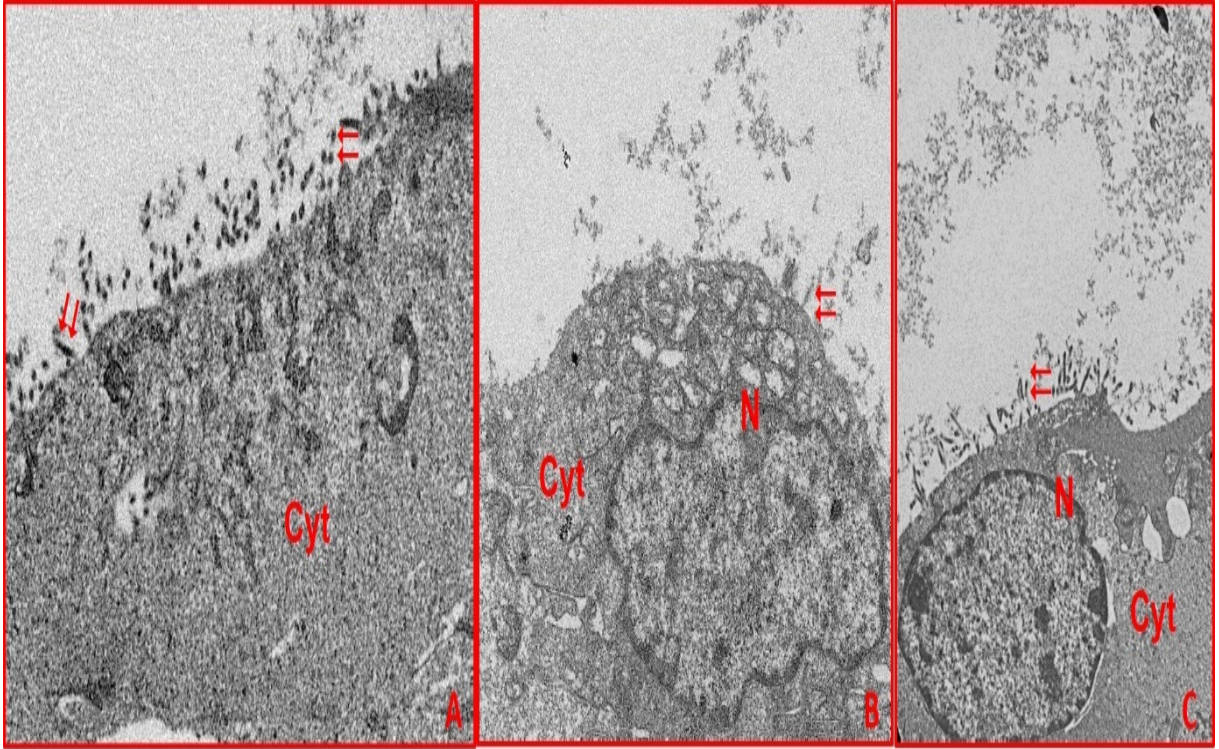
Resim 4.5: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve oksitosin uygulanan gruba ait yarı ince kesitlerde ➔: Reissner membranı (Vestibüler membran), ⇨: Baziler membran, ↖: Tektoriyal membran, * : İç spiral sulkus, **: Kohlear duktus, ►: Afferent ve efferent sinir lifi demetleri, ►: Dış tüy hücreleri, ↔ : Korti tüneli, ⚡ : Boettcher-Claudius-Hensen hücreleri, ⇨ : Deiters (dış falangeal hücreler), V: Vakuolizasyon ve St: Stria vaskülaris yapıları izleniyor (Toluidin blue x200).

Taramalı elektron mikroskopik (TEM) araştırma için hazırlanan ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde iç tüy hücrelerinin çoğu deney grubunda grid meshleri altında kalması ve deney grupları arasında sağlıklı bir karşılaştırma yapılamaması dolayısı ile işitme fiziolojisinde önemli rol oynayan bir diğer hücre olan dış tüy hücreleri ve onlara ait silyum yapıları tüm deney grupları için incelenerek karşılaştırılmıştır. Buna göre; kontrol grubu dış tüy hücrelerinin sitoplazmik ve çekirdek özellikleri ile silyum yapılarının normal görünüm sergilediği ayırt edilirken (Resim 4.6A), gentamisin ile ototoksisite oluşturulan deney grubunda mitokondri kristallerinde kayıp ve mitokondriyal liziz ile apoptotik cisimcikler en dikkat çekici bulgu olarak saptandı. Ayrıca hücrelerin apikal yüzey

farklanması olan silyum yapılarında da yoğun kayıp yaşandığı tespit edildi (Resim 4.6B). Kafeik asit fenetil esteri ve oksitosin uygulanan gruplarda en dikkat çekici bulgu, dış tüy hücrelerinin düzenli silyum yapılarını geri kazandıklarıydı (Resim 4.7A ve 4.7C); buna karşılık timokinon uygulanan grupta silyum kaybının devam ettiği, dış tüy hücrelerinin prizmatik yapılarını kaybederek falangeal hücreler üzerine yerleşmiş yüksek boylu kübik hücre formatına dönüştüğü tespit edildi (Resim 4.7B).



Resim 4.6: Kontrol grubu (A) ve Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan gruba (B) ait ince kesitlerde, dış tüy hücrelerinde N: Çekirdek, Cyt: Sitoplazma, ⇔: Silyum yapıları, ➔: Mitokondri kristalarında kayıp, ➔: Mitokondriyal lizis ve Ap: Apoptotik cisimcikler görülüyor (Uranil asetat-Kurşun sitrat x4800 [A ve B]).



Resim 4.7: Gentamisin ile ototoksisite oluşturulan ve kafeik asit fenetil esteri (A), timokinon (B) ve oksitosin (C) uygulanan gruplara ait ince kesitlerde, dış tüy hücrelerinde N: Çekirdek, Cyt: Sitoplazma ve ⇨: Silyum yapıları izleniyor (Uranil asetat-Kurşun sitrat x2900 [A ve B], x1900[C]).

Sonuç olarak, intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulanan gentamisinin, iç kulak ve korti organı üzerinde ciddi dejenerasyonlara sebep olduğu tespit edildi. Bu dejenerasyonlar üzerinde, uygulanan timokinonun görülen hasarın çoğunlukla devam etmesi dolayısı ile yeterli koruyucu etki sağlayamadığı; ancak kontrol grubuna ait normal histolojik görünümüne en yakın yapının kafeik asit uygulanan grupta olması dolayısı ile kafeik asit fenetil ester uygulamasının iç kulak ve korti organı üzerinde oldukça iyi koruyucu etki sağladığı kanısına varıldı.

5. TARTIŞMA

Ototoksisite, koklear ve/veya vestibüler olarak iç kulak dokularının, ilaçlar ve terapötik ajanlar nedeni ile hücrel dejenerasyonu ve fonksiyonel olarak bozulmasıdır (Arslan 1999). Ototoksisite hem geçici hem de kalıcı olabilir. Ototoksisiteye neden olabilecek birçok ajan vardır. Bunlardan başlıcaları aminoglikozidler, antineoplastik ilaçlar (sisplatin/karboplatin), loop diüretikler, kinin ve salisilatlardır. Bunlar kokleotoksik, vestibülotoksik veya hem kokleotoksik hem de vestibülotoksik etki gösterebilir.

Aminoglikozid antibiyotikler, klinikte gram negatif bakterilerin neden olduğu çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda kullanılmaktadır. Ancak, aminoglikozid antibiyotiklerin klinik kullanımı işitme kaybı, kulak çınlaması ve vestibüler bozukluklarla sonuçlanabilecek ciddi yan etkiler ve özellikle ototoksisite nedeniyle sınırlıdır (Kotecha 1994). Son yıllarda, özellikle endüstriyelmiş ülkelerde, aminoglikozidlerin kullanımı nispeten kısıtlanmıştır. Aminoglikozidlerin kullanımının azalması, diğer geniş spektrumlu antibiyotiklerin oluşması ve aminoglikozidlerin ciddi yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte kistik fibrozis hastalarında ve üriner sistem enfeksiyonları, tüberküloz ve visseral leishmaniasis gibi birçok enfeksiyon tipinde çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması, onları sürekli klinik kullanımda tutmuştur. Ayrıca üretimi çok ucuzdur, bu gelişmekte olan ülkelerde ekonomik olarak zayıf durumdaki popülasyonların sıklıkla aminoglikozidleri tercih etmesinin en önemli nedenidir (Jing 2011). Aminoglikozidler arasında ototoksisite şiddeti farklılık gösterir. En toksik olanı neomisin iken kanamisin, gentamisin ve tobramisin daha az ototoksik etki gösterir. Amikasin ve netilmisin en az ototoksik etki gösteren aminoglikozid türleridir.

Mevcut aminoglikozidler arasında gentamisin, uygun maliyeti ve düşük bakteriyel direncinden dolayı etkili bir ilaçtır (Guthrie 2008). Gentamisin alan hastalarda ototoksisite sıklığı % 2 ila % 25 arasında değişmektedir (Mulheran 2001). Gentamisin ile indüklenen ototoksisite doz bağımlıdır ve işitme hasar gördüğü zaman iyileşme olasılığı çok düşüktür. Gentamisin ile indüklenen işitme bozukluğunun en yaygın nedeni, mekanik bir uyarıyı sinir uyarılarına dönüştüren özel duyuşal reseptörleri olan tüylü hücrelerin kaybı veya disfonksiyonudur (Dror 2010).

Gentamisin kokleanın bazal bölgesinden başlayarak dış tüylü hücrelere hasar verir, daha sonra bu hasar apikal bölgelere doğru ilerler. Bu nedenle öncelikle yüksek frekanslarda işitme kaybı başlar ve daha sonra alçak frekanslara doğru ilerler. Dış tüylü hücrelerdeki hasar DPOAE ile değerlendirilebilir. BİUP testi, proksimalden distale doğru işitme yollarının değerlendirilmesinde kullanılan objektif bir testtir (Schacht 1998). Bu çalışmada işitsel değerlendirme için DPOAE ve BİUP elektrofizyolojik testler kullanılmıştır. Gentamisin ototoksitesisi sıklıkla bilateral, simetrik ve irreversibldir. Keene (1984), gentamisin enjeksiyonu sonrası kobaylarda yüksek frekanslarda bilateral sensörinöral işitme kaybı, kokleanın bazal kıvrım dış tüylü hücrelerinde azalma, spiral ganglion hücrelerinde bir miktar kayıp olduğunu rapor etmiştir. Gentamisinin vestibüler sensoriyal hücrelerde de toksik etkisi mevcuttur. Smith (1980), gentamisin ve tobramisinin hastaların %16'sında koklear hasar, %15'inde de vestibüler hasar yaptığını göstermiştir.

Ototoksisite çalışmalarında insan kulak anatomisi ile benzerlik gösterdiği için sıklıkla ratlar kullanılmıştır. Gentamisin ile yapılan ototoksisite çalışmalarında farklı doz ve süreler olduğu görülmüştür. Gentamisin ile yapılan bir ototoksisite çalışmasında, ön çalışmada ratlara ototoksisite oluşturacak uygun dozun 120 mg/kg/gün olduğu ve 15 gün boyunca günde tek sefer intraperitoneal uygulandığında ototoksisite oluştuğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır (Somdas 2015). Sagit ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 14 gün boyunca günde tek doz 120 mg/kg gentamisin (intraperitoneal) ile ototoksisite oluştuğu belirtilmiştir (Sagit 2015). Çalışmamızda 10 rata 14 gün boyunca günde tek doz 120 mg/kg gentamisin intraperitoneal olarak uygulandı. Çeşitli nedenlerden dolayı 3 hayvan ex oldu. Gentamisin grubunda (Grup II), SNR ortalamaları işlem öncesi ve işlem sonrası karşılaştırıldığında işlem sonrası tüm frekanslarda düşüş olduğu ve 1 kHz hariç diğer tüm frekanslarda bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. Gentamisin grubu SNR ortalamaları açısından kontrol grubu (Grup I) ile karşılaştırıldığında işlem öncesi SNR ortalamalarında 1,4 kHz dışında tüm frekanslarda anlamlı fark olmadığı izlendi. Bu nedenden dolayı 1,4 kHz sonraki değerlendirmelerde dikkate alınmadı. İşlem sonrası SNR ortalamaları kontrol grubu ile gentamisin grubu arasında karşılaştırıldığında 1 kHz dışındaki tüm frekanslarda gentamisin grubunda SNR ortalamalarının anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi. BİUP ortalamaları açısından gentamisin grubunda işlem öncesi ve işlem sonrası BİUP eşik ortalamaları karşılaştırıldığında işlem sonrası ortalamaların daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. BİUP ortalamaları gentamisin grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında işlem öncesi ortalamalar arasında anlamlı bir fark yokken, işlem sonrası ortalamaların gentamisin grubunda daha

yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. Bu bulgular sonucunda 14 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal olarak uygulanan 120 mg/kg gentamisinin istatistiksel olarak ototoksisite oluşturduğu görülmüştür.

Aminoglikozidlerin ototoksik etkileri kokleada genellikle bazal turn dış tüylü hücreleri ilk zarar görür (Probst 1991). İlaç tedavisi devam ettikçe hasar daha yukarı bölgelere ilerleyebilir. Bu durum başlangıçta yüksek frekans işitme kaybına, daha sonra düşük frekanslarda işitme kaybına neden olur. İç tüylü hücreler genellikle çevresindeki tüm dış tüylü hücreler hasara uğradıktan sonra olumsuz yönde etkilenmeye başlar (Probst 1991 ve Wackym 2000). Bazı hastalarda dış saçlı hücre harabiyeti olmaksızın spiral ganglion hücreleri aminoglikozidin doğrudan hasarına maruz kalabilir (Hinojosa 2001). Aminoglikozid kullanımı sonrası stria vaskularis marjinal hücre ölümüne bağlı olarak incelemeler (Hawkins 1973).

Çalışmamızda, elektron mikroskopik inceleme sonucu intraperitoneal enjeksiyon şeklinde uygulanan gentamisinin, iç kulak ve korti organı üzerinde ciddi dejenerasyonlara sebep olduğu tespit edildi. Hem elektrofizyolojik sonuçlar hem de histopatolojik sonuçlara göre gentamisin ile ototoksisite oluşmuştur.

Aminoglikozid ototoksisitesinin altında yatan ana sebebin serbest oksijen radikalleri olduğu düşünülmektedir. Amidoglikozidler non-lipidofilik yapıda olup, tüylü hücre içerisine mekanoelektriksel transdüser kanallar yolu ile girerler (Namura 1990, Marcotti 2005). Daha sonra oluşan aminoglikozid-demir kompleksi, araşidonik asit metabolizmasından oluşan serbest oksijen radikalleri gibi elektron vericileri ile reaksiyona girer. Serbest oksijen radikalleri vasıtasıyla aktive edilen yolaklar sonucunda hücre apoptozise uğramaktadır. Burada kilit rolü serbest oksijen radikalleri oynamaktadır. Yapılan birçok çalışmada reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumu ve bunların iç kulakta artması nedeni ile ototoksisite oluştuğu üzerinde durulmaktadır. Bu sebeple çeşitli antioksidanlar, aminoglikozid ototoksisitesine karşı koruyucu etkileri açısından değerlendirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada gentamisinin demir bağlayıcı olarak görev yapıp, moleküler oksijenin süperoksit radikallerine dönüşümüne neden olabileceği belirtilmiştir (Priuska 1995). Demir şelatörü olarak etki gösteren deferroksamin ile yapılan bir çalışmada, deferroksaminin aminoglikozid-demir kompleksini etkileyerek gentamisin toksisitesini engelleyici etkisinin bulunduğu gösterilmiştir (Mostafa 2007, Conlon 1998). Birçok madde serbest radikal oluşumunu engelleme özelliğine sahiptir. Nitro-L-arjinin metil ester (L-

NAME) bunlardan biridir ve nitrik oksit sentaz inhibitörüdür. *Pseudomonas aeruginosa* ekzotoksini ile oluşan sensorinöral işitme azlığını engellediği gösterilmiştir (Popa 2000). D - metionin ile yapılan bir gentamisin ototoksisite çalışmasında D - metioninin antiototoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Campbell 2007). Deksametozonun da nitrik oksit sentezini engelleyerek antiototoksik etki gösterdiği öne sürülmüştür (Park 2004). Organizmayı serbest radikallerden koruduğu bilinen ve oksidatif stres ile miktarı artan glutatyonun gentamisine bağlı ototoksisiteyi engellediği iddia edilmiştir (Lautermann 1995). Jiang ve arkadaşları salisilat ve dihidroksibenzoatın antioksidan etkilerini NFkB'nin translokasyonu üzerinden oluşturduklarını öne sürmektedir (Jiang 2005). Gentamisin ototoksisitesi ile ilişkili bazı çalışmalarda N-asetilsisteinin gentamisin ototoksisitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (Feldman 2007, Tepel 2007). Sha ve arkadaşlarının yaptığı randomize, çift kör kontrollü bir çalışmada gentamisin kullanan hastalarda asetil salisilik asitin işitme kaybı riskini azalttığı görülmüştür (Sha 2006).

Oksidatif stres, fizyolojik koşullarda antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilir. Antioksidanlar hücreyi ilaç, karsinojen ve toksik maddelerin istenmeyen etkilerine karşı korur. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu bloke ederek ve reaktif oksijen türlerini temizleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasarı en aza indirmek veya ortadan kaldırmak için serbest oksijen radikallerinin artmasını önlemek, tetiklenen biyokimyasal olayları engellemek veya antioksidan kullanmak gerekir. Antioksidan kullanımı bunlar arasında en önemli ve popüler yöntemdir (Dogan 2017). Gentamisin ototoksisitesini önlemek amacıyla yapılan birçok çalışma olsa da günümüzde ototoksisitede rutin kullanım için kabul edilen bir ajan bulunmamaktadır.

Doğal bal arısı ürünü propolisin iyi bilinen bir bileşeni olan kafeik asit fenetil ester (CAPE); anti-enflamatuar, antioksidan ve antineoplastik özellikleri nedeniyle tıpta yüzyıllardır kullanılmaktadır (Koltuksuz 1999, Ilhan 1999, Ozyurt 2004, Iraz 2006). Kafeik asit fenetil ester, doğal olarak oluşan bir fenolik bileşiktir ve kafeik asit ve fenetil alkolden türetilen bir esterdir. Nükleer faktör kappa-B (NF- kB) transkripsiyonunu inhibe ederek pro-inflamatuar sitokinleri ve inflammatuar mediyatörleri azaltır (Orban 2000). Kafeik asit fenetil ester in vitro antimitojenik, antikanserojenik, anti-inflamatuar ve immüno-modülatör özellikler gösterir (Natarajan 1996). Kafeik asit fenetil esterinin membranları rahatlıkla geçmesinin nedeni fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet

hidroksil (-OH) grubudur. Bu iki hidroksil grubu moleküle kuvvetli antioksidan özellik kazandırmaktadır.

Reaktif oksijen radikalleri ototoksisite ile yakın ilişkilidir. Fosfolipidlerdeki poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan oksidatif ürünler apoptotik mediyatörler olarak görev yapar. Reaktif oksijen türleri (ROS), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolunu da içeren apoptotik veya nekrotik yolları aktive eder (Poirrier 2010). Sonrasında çekirdekte NF- κ B transkripsiyonu meydana gelir ve apoptotik süreç başlar. Kafeik asit fenetil ester güçlü doğal antioksidandır ve ciddi yan etkileri yoktur. Karaciğer, kalp, akciğer ve koklea gibi çeşitli yapılarda ROS oluşumunu, lipid peroksidasyonunu ve ksantin oksidaz sistemi inhibe eder (Jaganathan 2009, Iraz 2006, Kızılay 2004, Song 2012, Motawi 2011). Ayrıca inflamatuvar ve immün sitokinler dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonunu indüklemeye önemli rol oynayan NF- κ B'nin güçlü bir inhibitörüdür. Yapılan bir çalışmada kafeik asit fenetil ester, hem oksijenaz -1'in süperindüksiyonu ile endotoksinle bağlı kardiyak stres üzerinde koruyucu etki göstermiştir (Jaganathan 2009, Motawi 2011). Kafeik asit fenetil ester ayrıca in vivo ve in vitro olarak linoleik asit ve araşidonik asidin 5-lipoksijenaz katalizli oksijenasyonunu inhibe ederek kemoterapi ve radyoterapi toksisiteleri üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir (Akyol 2012). Kafeik asit fenetil esterinin aminoglikozid ototoksisitesine etkisi açısından literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda güçlü bir antioksidan olan kafeik asit fenetil esterinin aminoglikozid ototoksisitesine karşı koruyucu etkisine bakılmıştır. Yapılan bir çalışmada 10 μ mol/kg konsantrasyonunda kafeik asit fenetil esterinin, reaktif oksijen türleri oluşumunu tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir (Sud'ina 1993). Başka bir çalışma kafeik asit fenetil esterinin antioksidan etkisinin doz bağımlı olduğunu belirtmiştir (Russo 2002). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda doz olarak 10 μ mol/kg kafeik asit fenetil ester kullandık.

Gentamisin + CAPE (Grup III) verilen grupla diğer gruplar tüm frekanslar için işlem öncesi SNR ortalamaları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı izlendi. Tüm frekanslar için gentamisin + CAPE verilen grupta işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları karşılaştırıldığında 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz ve 6 kHz'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. İstatistiksel olarak gentamisin ile ototoksisite oluşmayan 1 kHz ve 1,4 kHz frekanslar değerlendirilmeye alınmadı. Ayrıca işlem sonrası SNR ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm frekanslarda anlamlı bir fark olmadığı izlendi.

Gentamisin + CAPE grubunun BİUP eşik ortalamaları işlem öncesi ve işlem sonrası karşılaştırıldığında işlem sonrası ortalamaların daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel

olarak anlamlı olduğu izlendi. İşlem sonrası BİUP ortalaması gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında gentamisin + CAPE grubunda ortalamanın daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda hem DPOAE hem de BİUP bulgularımıza göre kafeik asit fenetil esterinin gentamisin ototoksisitesinde etkili bir antioksidan madde olabileceği görülmüştür. Yapılan bir çalışmada ratlarda sisplatin ototoksisitesinde kafeik asit fenetil esterinin etkisi araştırılmış ve DPOAE bulgularına göre kafeik asit fenetil esterinin bozulan işitmeyi düzelttiği belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada sisplatin grubunda plazma ksantin oksidaz aktivitesinin daha fazla arttığını aksine kafeik asit fenetil esterinin ksantin oksidaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Kizilay 2004). Bakır ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ratlarda aminoglikozid kullanımının neden olduğu ototoksisitenin önlenmesi veya azaltılmasında kafeik asit fenetil esterinin antioksidan özelliklerini değerlendirmiştir. İşitme testlerine ek olarak yapılan immünohistokimyasal ve histopatolojik incelemede, kafeik asit fenetil esterle tedavi edilen grupta koklear tüylü hücrelerde bozulma görülmemiştir. Bu sonuçlar kafeik asit fenetil esterinin iç kulakta oksidatif yolakların yol açtığı reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir (Bakır 2013). Başka bir çalışmada zebra balıklarında neomisininden neden olduğu tüylü hücre hasarına karşı kafeik asit fenetil esterinin koruyucu etkisi incelenmiş ve neomisininden indüklediği apoptozis ve apoptotik hücre ölümlerinin kafeik asit fenetil esterle önlenebileceği belirtilmiştir (Park 2014).

Grup III için yapılan elektron mikroskopik inceleme sonucu, kontrol grubuna ait normal histolojik görünüme en yakın yapının kafeik asit uygulanan grupta olması dolayısı ile kafeik asit fenetil esterinin uygulamasının iç kulak ve korti organı üzerinde oldukça iyi koruyucu etki sağladığı tespit edildi. Hem elektrofizyolojik sonuçlar hem de histopatolojik sonuçlara göre gentamisin ototoksisitesinde kafeik asit fenetil esterinin koruyucu etkilerinin olduğu görülmektedir.

Timokinon (TQ) çörek otu uçucu yağında % 18.4-24 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir (Pari 2009). Uçucu yağın yapısında ise nigellon, karvakrol, p-cymene, d-limonen, α ve β -pinen'in yanı sıra farmakolojik olarak aktif temel bileşenlerden başlıca timokinon, ditimokinon, timohidrokinon ve timol yer almaktadır (Randhawa 2002, Baytop 1984). Analjezik, antiinflamatuar, antibakteriyel, antidiyabetik, antiülserojenik, antineoplastik ve immünomodülatör dahil olmak üzere birçok terapötik etkiye sahiptir (Gokce 2011). Timokinonun antioksidan etkisi en önemli özelliklerinden biri olarak kabul

edilir (Basarslan 2012). Antioksidan enzim düzeyini artırdığı ve serbest oksijen radikallerini nötralize ettiği bildirilmiştir (Nader 2010).

Timokinon güçlü antioksidan özelliği nedeniyle son yıllarda farmakolojik çalışmaların odak noktası olmuştur. Ancak antioksidan antivite ilişkili timokinonun koruyucu fonksiyonunun moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. İn vitro ve hayvan çalışmaları, timokinonun, süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri dahil olmak üzere farklı oksijen radikallerinin bir süpürücüsü olarak görev yapabileceğini göstermektedir (Mansour 2002, Badary 2003). Aynı zamanda glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesini de artırır (18). Yapılan deneysel hayvan çalışmaları, timokinonun çeşitli ajanlar tarafından indüklenen kardiyotoksisiteye, hepatotoksisiteye ve nefrotoksisiteye karşı birkaç organ için koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Basarslan 2012, Badary 1997, Nagi 1999 ve 2000). Doksorubisin ile indüklenen nefropatide timokinonun lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan özellik gösterdiği ve nefropatiyi baskıladığı bildirilmektedir (Badary 2000). Ratlarda N-nitro-L-arjinin metil esterleri (L-NAME) ile nitrik oksidin kronik inhibisyonundan sonra verilen timokinonun glutatyon (GSH) düzeyini artırırken enzimatik ve nonenzimatik sistemlerdeki süperoksit radikallerin in vitro sentezini inhibe ettiği ve bu antioksidan aktivitesi hipertansiyon ve renal hasara karşı korumada umut verici bir bileşik olduğu belirtilmektedir (Khatab 2007).

Birçok çalışma timokinonun farklı dozlarının etkilerini incelemiştir. Yüksek dozda timokinon (2 g/kg veya daha fazla) karaciğer, böbrek ve kalpte glutatyon düzeylerini düşürür ve karaciğer ve böbrek toksisitesine neden olur (Badary 1998). Aydın ve arkadaşları rat modelde yaptıkları bir çalışmada iskemi/reperfüzyon hasarında 20 mg/kg intraperitoneal uygulanan timokinonun etkili olduğunu belirtmiştir (Aydın 2015). Bizim çalışmamızda çalışmaya uygun 10 rata 30 mg/kg timokinon oral gavaj yöntemi ile uygulandı ve 3 rat ex olarak çalışma 7 rat ile tamamlandı (Usta 2017 ve Rajkamal 2010).

Gentamisin + timokinon (Grup IV) verilen grupla diğer gruplar tüm frekanslar için işlem öncesi SNR ortalamaları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı izlendi. Tüm frekanslar için gentamisin + timokinon verilen grupta işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları karşılaştırıldığında 2 kHz, 6 kHz, 8 kHz'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Ayrıca işlem sonrası SNR ortalamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4kHz hariç diğer tüm frekanslarda anlamlı fark olmadığı izlendi.

Gentamisin + timokinon grubunun BİUP eşik ortalamaları işlem öncesi ve işlem sonrası karşılaştırıldığında işlem sonrası ortalamanın daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. İşlem sonrası BİUP ortalaması gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında gentamisin + timokinon grubunda ortalamanın daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda hem DPOAE hem de BİUP bulgularımıza göre timokinonun gentamisin ototoksitesinde etkili bir antioksidan madde olabileceği görülmüştür. Sağıt ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sisplatin ototoksitesine karşı timokinonun koruyucu etkisi değerlendirilmiş ve timokinon doz olarak 40 mg/kg intraperitoneal uygulanmıştır. Timokinon verilen ratlarda ölüm görülmemiş ve DPOAE bulgularına göre timokinonun 2-3-4-6-8 kHz frekanslarda sisplatin ototoksitesine karşı etkili olduğu belirtilmiş ve bizim sonuçlarımızla uyumlu olduğu görülmüştür (Sagit 2013). Bizim çalışmamızda meydana gelen rat ölümlerinin toksik etkilerin yanında kullanılan rat türünden (Wistar Albino) kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca aynı yazarın yapmış olduğu başka bir çalışmada ratlara gentamisin ototoksitesine karşı timokinonun koruyucu etkisi incelenmiş ve hem histopatolojik olarak hem de işitsel testler sonucu timokinonun gentamisin ototoksitesini önleyebileceği belirtilmiştir (Sagit 2014). Aksoy ve arkadaşları ratlarda amikasin ototoksitesine karşı timokinonun koruyucu etkisini araştırmış ve doz olarak 40 mg/kg timokinon gavaj yöntemi ile uygulanmıştır. DPOAE ve BİUP sonuçlarına göre amikasin ile ortaya çıkan ototoksik etkinin, eş zamanlı olarak timokinon kullanımıyla aşılabileceği gösterilmiştir (Aksoy 2015).

Grup IV için yapılan elektron mikroskopik inceleme sonucu uygulanan timokinonun görülen hasarın çoğunlukla devam etmesi dolayısı ile yeterli koruyucu etki sağlayamadığı tespit edildi. Ancak yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda hem DPOAE hem de BİUP bulgularımıza göre timokinonun gentamisin ototoksitesinde etkili bir antioksidan madde olabileceği görülmektedir.

Nörohipofiziyal bir peptid olan oksitosin (OT), hipotalamustaki paraventricüler ve supraoptik çekirdeklerde üretilir ve posterior hipofiz bezinden kana salgılanır. Doğum sırasında uterusda kasılma ve süt refleksindeki rollerinin yanı sıra OT, vücutta yaygın bir şekilde eksprese edilen G-protein reseptörleri aracılığıyla geniş bir merkezi ve çevresel etki spektrumuna sahiptir (Gimpl 2011, Gutkowska 2009). Ayrıca, OT çeşitli cinsel ve maternal davranışlar, sosyal tanınma, agresiflik, nöromodülasyon, tolerans ve biliş

gelişimi gibi endokrin ve parakrin aktivitelerinde rol oynar (Tan 2007). Önceki çalışmalar, oksitosinin, antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinler arasındaki dengeyi koruyarak doku iyileşmesinde immünomodülatör ve antiinflamatuvar bir ajan olabileceğini göstermiştir. Ayrıca OT antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleri ile sitoprotektif etkiler göstermektedir (Petersson 2001, Erbas 2012 ve 2013, Erkanli 2013, Akdemir 2014).

Oksitosin sekretuar bir peptid hormon ve biyokimyasal antioksidandır. Oksitosinin beyin zarlarındaki serbest oksijen radikallerini azalttığı, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu önlediği ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Moosmann 2002). Fizyolojik seviyelerde kullanıldığı zaman, OT ayrıca akut inflamatuvar yanıtı, sitokin salınımı ve oksidatif stresi azaltabilir. OT, serbest oksijen radikallerini temizleyerek hücre zarı üzerinde lipid peroksidasyonunu önler. Ayrıca OT, septik hayvan modelinde lipid peroksidasyonunu, nötrofil infiltrasyonunu ve serum TNF- α seviyesini azaltır (Erbas 2012). Başka bir çalışma, OT'nin TNF- α , IL-4 ve 6, makrofaj inflamatuvar proteinleri 1a ve 1b gibi proinflamatuvar mediyatörlerin seviyelerini, lipopolisakkarit kaynaklı inflamatuvar yanıtı ve endotoksemideki vasküler endotel büyüme faktörü seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir (Clodi 2008). Bir çalışmada, rat iç kulağındaki arginin vazopressin ve OT reseptörünü kodlayan genlerin transkriptleri araştırılmış ve her reseptör için spesifik primerler, sıçan iç kulağında revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) metodu ile gösterilmiştir (Kitano 1997).

Literatüre bakıldığında, gentamisin ototoksitesinde oksitosinin koruyucu etkisi daha önce hiç çalışılmamış konu olması nedeniyle, bu çalışma bu konuyla ilgili yapılan ilk hayvan çalışmasıdır. Oksitosinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini araştıran çalışmalarda farklı dozlar kullanıldığı görülmüştür. Laila ve arkadaşları ratlarda cisplatin sonucu gelişen nefrotoksisite ile ilişkili çalışmada, sistemik 1 mg/kg oksitosin uygulamasının güçlü antioksidan ve koruyucu etkisini göstermiştir (Rashed 2011). Ratlarda sisplatin ototoksitesinde oksitosinin koruyucu etkisini inceleyen bir çalışmada bir gruba 4 gün 1 mg/kg oksitosin intraperitoneal uygulanmış ve oksitosinin sisplatin ototoksitesinde koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir (Bilmez 2014). Başka bir çalışmada ratlarda sisplatin nörotoksitesine oksitosinin önleyici etkisi incelenmiş ve 10 gün intraperitoneal 80 ve 160 μ g/kg oksitosin iki farklı grubu uygulanmış, 160 μ g/kg uygulanan grupta sisplatin nörotoksitesine karşı oksitosinin daha fazla koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir (Akman 2015). Oksitosinin diyabetik nöropati üzerine etkisi ile ilgili

ratlarda yapılan bir çalışmada 160 µg / kg oksitosin uygulamasının Schwann hücre hasarını önlediği, nöropatik demyelinizasyonu azaltıp remyelinizasyonu artırdığı bildirilmiştir (Erbas 2017). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda 10 rata 160 µg/kg oksitosin intraperitoneal olarak uygulandı. Deney hayvan kaybı olmadı.

Gentamisin + oksitosin (Grup V) verilen grupla diğer gruplar tüm frekanslar için işlem öncesi SNR ortalamaları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı izlendi. Tüm frekanslar için gentamisin + oksitosin verilen grupta işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları karşılaştırıldığında 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz, 6 kHz, 8 kHz'de SNR ortalamasının işlem sonrası anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi. Ancak işlem sonrası SNR ortalamaları Grup I ile kıyaslandığında, 2 kHz ve 2,8 kHz' de anlamlı fark olmadığı izlendi.

Gentamisin + oksitosin grubunun BİUP eşik ortalamaları işlem öncesi ve işlem sonrası karşılaştırıldığında işlem sonrası ortalamanın daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. İşlem sonrası BİUP ortalaması gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında gentamisin + oksitosin grubunda ortalamanın daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Çalışmamızda BİUP bulgularına göre gentamisin ototoksisitesinde oksitosin koruyuculuk anlamında kısmen etkili iken, DPOAE bulgularımıza göre oksitosinin gentamisin ototoksisitesi üzerinde koruyucu etkisi yoktur.

Grup V için yapılan elektron mikroskopik inceleme sonucu oksitosinin iç kulak ve korti organı üzerinde kısmen koruyucu etki sağladığı tespit edildi. Yapılan elektrofizyolojik çalışmalarda BİUP bulgularına göre gentamisin ototoksisitesinde oksitosin koruyuculuk anlamında kısmen etkili iken, DPOAE bulgularımıza göre oksitosinin gentamisin ototoksisitesi üzerinde koruyucu etkisi olmadığı görülmektedir.

Ototoksisitenin önlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmış olsa da halen geçerli bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Gentamisin ototoksisitesine karşı oksitosinin koruyucu etkisi konusunda daha önce literatürde hiç çalışma olmaması nedeniyle çalışmamız bu konu hakkında yapılan ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Bu nedenle daha geniş çaplı çalışmalar ve klinik deneyimler gereklidir. Ayrıca çalışmamızın en önemli kısıtlılığı koruyucu olarak uygulanan kafeik asit fenetil ester, timokinon ve oksitosinin; gentamisinin antiinfeksiyöz etkisini nasıl etkilediğinin bilinmemesidir. Bu konu hakkında yeni çalışmalar gerekmektedir.

6.SONUÇ

“Kafeik Asit Fenetil Ester, Timokinon ve Oksitosinin Gentamisin Ototoksitesine Karşı Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Analizi: Deneysel Çalışma” isimli çalışmamızda, otoakustik emisyon, beyinsapı işitsel uyarılmış potansiyelleri ve elektron mikroskopik inceleme sonuçlarına göre;

1. Gentamisin (Grup II) uygulanan grupta SNR ortalamaları işlem öncesi ve işlem sonrası karşılaştırıldığında işlem sonrası tüm frekanslarda düşüş olduğu ve 1 kHz hariç diğer tüm frekanslarda bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. BİUP ortalamaları açısından gentamisin grubunda işlem öncesi ve işlem sonrası BİUP eşik ortalamaları karşılaştırıldığında işlem sonrası ortalamanın daha yüksek olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. Elektron mikroskopik inceleme sonucu gentamisinin, iç kulak ve korti organı üzerinde ciddi dejenerasyonlara sebep olduğu tespit edildi. Hem elektrofizyolojik sonuçlar hem de histopatolojik sonuçlara göre gentamisin ile ototoksite oluşmuştur
2. Gentamisin ve kafeik asit fenetil ester (Grup III) uygulanan grupta işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları karşılaştırıldığında 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz ve 6 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. İşlem sonrası BİUP ortalaması gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında gentamisin + CAPE grubunda ortalamanın daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Elektron mikroskopik inceleme sonucu, kontrol grubuna ait normal histolojik görünüme en yakın yapının kafeik asit uygulanan grupta olması dolayısı ile kafeik asit fenetil esterini uygulamasının iç kulak ve korti organı üzerinde oldukça iyi koruyucu etki sağladığı tespit edildi. Hem elektrofizyolojik sonuçlar hem de histopatolojik sonuçlara göre gentamisin ototoksitesinde kafeik asit fenetil esterinin koruyucu etkilerinin olduğu görülmektedir.
3. Gentamisin ve timokinon (Grup IV) uygulanan grupta işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları karşılaştırıldığında 2 kHz, 6 kHz, 8 kHz’de istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. İşlem sonrası BİUP ortalaması gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında gentamisin + timokinon grubunda ortalamanın daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Elektron mikroskopik inceleme sonucu uygulanan timokinonun görülen hasarın çoğunlukla devam etmesi dolayısı ile yeterli koruyucu etki sağlayamadığı tespit edildi.

4. Gentamisin ve oksitosin (Grup V) uygulanan grupta işlem öncesi ve sonrası SNR ortalamaları karşılaştırıldığında 2 kHz, 2,8 kHz, 4 kHz, 6 kHz, 8 kHz'de SNR ortalamasının işlem sonrası anlamlı şekilde daha düşük olduğu izlendi. İşlem sonrası BİUP ortalaması gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında gentamisin + oksitosin grubunda ortalamanın daha düşük olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Elektron mikroskopik inceleme sonucu oksitosinin iç kulak ve korti organı üzerinde kısmen koruyucu etki sağladığı tespit edildi.

Sonuç olarak gentamisin ototoksitesinde kafeik asit fenetil esterinin hem elektrofizyolojik testler (DPOAE, BİUP) hem de elektron mikroskopik çalışmalarla (TEM) koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu koruyucu etkisinin güçlü antioksidan özelliğinden kaynaklandığını ve gentamisinin ototoksik etkisini azaltabileceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

- Ahn H, Lee E, Kim K, Lee C (1994) Effect of glutathione and its related enzymes on chemosensitivity of renal cell carcinoma and bladder carcinoma cell lines. *J Urol* 151:263–267.
- Akdemir A, Erbas O, Gode F, Ergenoglu M, Yenieli O, Oltulu F et al. Protective effect of oxytocin on ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *Peptides*. 2014;55:126–130.
- Akman T, Akman L, Erbas O, Terek MC, Taskiran D, and Ozsaran A. The Preventive Effect of Oxytocin to Cisplatin-Induced Neurotoxicity: An Experimental Rat Model. *Biomed Res Int*. 2015;2015:167235. doi: 10.1155/2015/167235.
- Aksoy F, Dogan R, Ozturan O, Tugrul S, Veyseller B, Ozer OF, Pektas A. An Evaluation of the Protective Effects of Thymoquinone on Amikacin-Induced Ototoxicity in Rats. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2015 Dec;8(4):312-9.
- Akyıldız N. İç Kulak Anatomisi. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 1998; 1.cilt: 49-61.
- Akyol S, Ginis Z, Armutcu F, Ozturk G, Yigitoglu MR, Akyol O, The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapyinduced and radiotherapy-induced toxicity, *Cell Biochem. Funct*. 30 (2012) 438–443.
- Arslan E, Orzan E, Santarelli R. Global problem of drug-induced hearing loss. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 884: 1.14.
- Arslan S O, Gelir E, Armutçu F, Coşkun O, Gürel A, Sayan H, Çelik IL. 2005. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutrition Research*, 25: 673-680.
- Aydin MS, Kocarlan A, Kocarlan S, Kucuk A, Eser I, Sezen E, Büyükfirat E, Hazar A. (2015) Thymoquinone Protects End Organs from Abdominal Aorta Ischemia/reperfusion Injury in a Rat Model. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 30: 77-83.
- Badary OA, Abdelnaim AB, Abdel-Wahap MH, Farid MA, Hamada FMA. 2000. The

- influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 143: 219-226.
- Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH 2003. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 26(2): 87-98.
- Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, AlSohaibani MO, Al-Bekairi AM (1997) Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1356–1361 21.
- Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Bekairi AM, Elmazar MA. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Dev Res* 1998;44:56–61.
- Byron J. Bailey, Jonas T. Johnson, Shawn D. Newsland. Baş & Boyun Cerrahisi Otolarengoloji. 4. Baskı Bölüm 128 ; 2011.
- Bakir S, Ozbay M, Gun R, Yorgancilar E, Kinis V, Keles A, Abakay A, Gokalp O, Topcu I. The protective role of caffeic acid phenethyl ester against streptomycin ototoxicity. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery* 34 (2013) 16–21.
- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100, 114–117.
- Basarslan F, Yilmaz N, Ates S, Ozgur T, Tutanc M, Motor VK, Arica V, Yilmaz C, Inci M, Buyukbas S (2012). Protective effects of thymoquinone on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 16:E167–E171 19.
- Baytop T. 1984. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. İ.Ü. Yayınları No:3255
- Bekesy GV. Hearing theories and complex sounds. *J Acoust Soc Am*, 35(4):588-601;1963.
- Belgin E, Şahlı AS. Temel Odyoloji. Güneş Tıp Kitabevi. Bölüm 3; 2015.
- Bilmez ZEB, Aydın S, Sanli A, Altintoprak N, Demir MG, Erdogan BA, Kosemihal E. Oxytocin as a protective agent in cisplatin-induced ototoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 Apr;77(4):875-9.
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. 2010 Bioactivities of black cummin

essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*; 76 : 210-216.

Campbell KC, Meech RP, Klemens JJ, Gerberi MT, Dyrstad SS, Larsen DL, Mitchell DL, El-Azizi M, Verhulst SJ, Hughes LF. Prevention of noise-and druginduced hearing loss with D-methionine. *Hearing research*, 2007;226(1):92-103.

Chen Y, Huang WG, Zha DJ, Qiu JH, Wang JL, Sha SH. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: from the laboratory to the clinic. *Hear Res.* 2007;226(1-2): 178-82.

Cho, M.S.; Park, W.S.; Jung, W.K.; Qian, Z.J.; Lee, D.S.; Choi, J.S.; et al. Caffeic acid phenethyl ester promotes anti-inflammatory effects by inhibiting MAPK and NF- κ B signaling in activated HMC-1 human mast cells. *Pharm. Biol.* 2014, 52, 926–932.

Clodi M, Vila G, Geyeregger R, Riedl M, Stulnig TM, Struck J et al., “Oxytocin alleviates the neuroendocrine and cytokine response to bacterial endotoxin in healthy men,” *The American Journal of Physiology— Endocrinology and Metabolism*, vol. 295, no. 3, pp. 686–691, 2008.

Conlon BJ, Perry BP, Smith DW. Attenuation of neomycin ototoxicity by iron chelation. *Laryngoscope.* 1998;108(2):284-7.

Cooper NP, Pickles JO, Manley GA. Travelling waves, second filters and physiological vulnerability : A short history of the discovery of active processes in hearing. In : Manley GA, Fay RR, Popper AR, eds. *Active processes and otoacoustic emissions in hearing.* 1st ed. New York : Springer; 39-62, 2008.

Cummings CW, Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA. *Cummnings Otolaryngology Head & Neck Surgery.* 5th ed. Chapter 128 - 130; 2010.

Dawood MY and Khan-Dawood FS. Oxytocin. In : *Clinical Reproductive Endocrinology.* Ed Sherman RF, Page: 233-249, Churchill Livingstone, New York, 1985.

Dogan M, Polat H, Yasar M, Bayram A, Karatas D, Hira I, Kale A, Senel F, Ozcan I. Protective role of misoprostol in prevention of gentamicin ototoxicity.

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 96 (2017): 140-144.

- Dror AA, Avraham KB. Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron* 68, 293–308 (2010). gentamicin ototoxicity. *Arch Otolaryngol* 1982; 108(2):65-70.
- El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HPT. 2002. Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 161-164.
- El-Saleh SC, Al-Sagar OA, Al-Khalaf MI. 2004. Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats *International Journal of Cardiology*, 93: 19-23.
- Erbas O, Oltulu F, Taskiran D. Amelioration of rotenone induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment. *Peptides*. 2012;38:312–317.
- Erbas O, Ergenoglu AM, Akdemir A, et al. Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. *J Surg Res*. 2013;183:313–320.
- Erbas O, Taskiran D, Oltulu F, Yavasoglu A, Bora S, Bilge O, Cinar BP, Peker G. Oxytocin provides protection against diabetic polyneuropathy in rats. *Neurological Research* 2017, 39:1, 45-53.
- Erixon E, Högstorp H, Wadin K, Rask Anderson H. Variational anatomy of the human cochlea : Implications for cochlear implantation. *Otol Neurotol* 2009;30:14-22.
- Erkanli SG, Erkanli K, Aydin U, et al. The protective effect of oxytocin on ischemia/reperfusion injury in rat urinary bladder. *Peptides*. 2013;40:82–88.
- Evans BN. Fatal contractions: Ultrastructural and electromechanical changes in outer hair cells following transmembranous electrical stimulation. *Hear Res*. 1990; 45 : 265.
- Feldman L, Efrati S, Eviatar E, Abramsohn R, Yarovoy I, Gersch E, et al. Gentamicin-induced ototoxicity in hemodialysis patients is ameliorated by N-acetylcysteine. *Kidney Int*. 2007;72(3): 359- 63

- Fouda, AMM, Daba, MHY, Dahab, GM, Sharaf El-Din, OA. 2008. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 103: 109-118.
- Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2011;81:630–68.
- Gokce A, Oktar S, Koc A, Yonden Z (2011) Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Hum Exp Toxicol* 30:897–903 18
- Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44(3):230-2.
- Gurel, A.; Armutcu, F.; Hosnuter, M.; Unalacak, M.; Kargi, E.; Altinyazar, C. Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative organ damage in rat model of thermal trauma. *Physiol. Res*. 2004, 53, 675–682.
- Guthrie O. W. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 249, 91–96 (2008).
- Gutkowska J, Jankowski M. Oxytocin: old hormone, new drug. *Pharmaceuticals*. 2009;2:168–183.
- Hamdy NM, Taha R. 2009. Effects of nigella sativa oil and thymoquinone on oxidative stress and neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacology* 8: 127-134.
- Hawkins JE Jr.: Ototoxic mechanism: a working hypothesis, *Audiology* 12:383, 1973.
- Hepşen İF, Tilgen F, Er H. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1996; 3: 386-391.
- Hepsen İF, Bayramlar H, Gultek A, Ozen S, Tilgen F, Evreklioglu C. Caffeic acid phenethyl ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits. *J Cataract Refract Surg*. 1997; 23(10):1572-6.
- Hinojosa R, Nelson EG, Lerner SA and others: Aminoglycoside ototoxicity: a human temporal bone study, *Laryngoscope* 111:1797, 2001.
- Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H and Akyol O: The effects of caffeic acid

- phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 16: 458-463, 1999.
- Iraz M, Ozerol E, Gulec M, Tasdemir S, Idiz N, Fadillioglu E, Naziroglu M, Akyol O. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin induced oxidative damage to liver in rat, *Cell Biochem. Funct.* 24 (2006) 357–361.
- Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review, *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 830616.
- Jiang H, Sha SH, Schacht J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. *J Neurosci Res.* 2005;79(5): 644-51.
- Jing X, Andra ET, Jochen S. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res.* 2011 November ; 281(1-2): 28–37.
- Keene M, Hawke M, Barber HO, Farkashidy J. Histopathological findings in clinical. *Arch Otolaryngol.* 1982 Feb;108(2):65-70.
- Kelly J and Swanson LW. Additional forebrain regions projecting to the posterior pituitary: Preoptic region, bed nucleus of the stria terminalis and zone incerta. *Brain Res.*197:1-9, 1980.
- Khattab MM, Nagı MN. 2007. Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res*,21: 410-414.
- Kimura C, Zhao QL, Kondo T, Amatsu M, Fujiwara Y (1998) Mechanism of UV-induced apoptosis in human leukemia cells: roles of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease, caspase-3, and stress-activated protein kinases. *Exp Cell Res* 239:411–422.
- Kitano H, Takeda T, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Kimura H (1997) Vasopressin and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear. *Neuroreport* 8:2289–2291.
- Kizilay A, Kalcıoglu MT, Ozerol E, Iraz M, Gulec M, Akyol O, Ozturan O. Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats, *J. Chemother.*

16 (2004) 381–387.

Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. 2. Baskı – Güneş Tıp Kitabevi. Bölüm 4.1 ; 2013.

Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinç M, Karaman A, Gültek A, Akyol O, Gürsoy MH, Aydın E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 34: 1458-1462, 1999.

Kotecha B, Richardson GP. Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear. Res.* 73, 173–184 (1994).

Lamm K, Lamm H, Arnold W. Effect of hyperbaric oxygen therapy in comparison to conventional or placebo therapy or no treatment in idiopathic sudden hearing loss, acoustic trauma, noise-induced hearing loss and tinnitus. A literature survey. 1998.

Lautermann J, McLaren J, Schacht J. Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear Res.* 1995;86(1-2): 15- 24.

Mahgoub AA. 2003. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicology Letters*, 143: 133-143.

Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM (2002) Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct* 20:143–151.

Marcotti W, van Netten SM, Kros CJ. The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J Physiol.* 2005;567: 505-21.

Mirzeova OK, Calder PC. The effects of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55:441-449.

Moosmann B, Behl C. “Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure-activity relationship,” *Molecular Pharmacology*, vol. 61, no. 2, pp. 260–

268, 2002.

- Mostafa BE, Tawfik S, Hefnawi NG, Hassan MA, Ismail FA. The role of deferoxamine in the prevention of gentamicin ototoxicity: a histological and audiological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 2007;127(3): 234-9.
- Motawi TK, Darwish HA, Abd El Tawab AM. Effects of caffeic acid phenethyl ester on endotoxin-induced cardiac stress in rats: a possible mechanism of protection, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25 (2011) 84–94.
- Mulheran M, Degg C, Burr S, Morgan DW, Stableforth DE. Occurrence and risk of cochleotoxicity in cystic fibrosis patients receiving repeated high-dose aminoglycoside therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2502–2509 (2001).
- Nader MA, el-Agamy DS, Suddek GM (2010) Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arch Pharm Res* 33:637–643 20.
- Nagi MN, Alam K, Badary OA, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Bekairi AM (1999) Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem Mol Biol Int* 47:153–159.
- Nagi MN, Mansour MA (2000) Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res* 41:283–289 22.
- Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D and Aggarwal BB: Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9090-9095, 1996.
- Nomura K, Naruse K, Watanabe K, Sokabe M. Aminoglycoside blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channel from rat brain synaptosomal membranes incorporated into planar bilayers. *JMembr Biol.* 1990;115(3): 241-51.
- Orban Z, Mitsiades N, Burke TR Jr, Tsokos M and Chrousos GP: Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation* 7: 99-105, 2000.
- Ozyurt H, Söğüt S, Yildirim Z, *et al*: Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on

- bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin Chim Acta* 339: 65-75, 2004.
- Ozyurt, H.; Pekmez, H.; Parlaktas, B.S.; Kus, I.; Ozyurt, B.; Sarsilmaz, M. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester. *Asian J. Androl.* 2006, 8, 189–193.
- Pari L, Sankaranarayanan C. 2009. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*, 85: 830-834.
- Park, E.H.; Kahng, J.H. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch. Pharm. Res.* 1999, 22, 554–558.
- Park SK, Choi D, Russell P, John EO, Jung TT. Protective effect of corticosteroid against the cytotoxicity of aminoglycoside otic drops on isolated cochlear outer hair cells. *Laryngoscope.* 2004;114(4): 768-71.
- Park MK, Im GJ, Chang J, Chae SW, Yoo J, Han WG, Hwang GH, Jung JY, Choi J, Jung HH, Chung AY, Park HC, Choi J. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against neomycin-induced hair cell damage in zebrafish. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014 Aug;78(8):1311-5.
- Petersson M, Wiberg U, Lundeberg T, Uvnäs-Moberg K. Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides.* 2001;22:1479–1484.
- Poirrier AL, Pincemail J, Van Den Ackerveken P, Lefebvre PP and Malgrange B: Oxidative stress in the cochlea: An update. *Curr Med Chem* 17: 3591-3604, 2010.
- Popa R, Anniko M, Takumida M. Otoprotectant minimizes hearing defects caused by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta Otolaryngol.* 2000;120(3): 350-8.
- Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50:1749 - 1752.
- Probst R, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. A review of otoacoustic emissions. *J Acoust Soc Am* 1991;89:2027-67.
- G. Rajkamal, K. Suresh, G. Sugunadevi, M.A. Vijayaanand & K. Rajalingam. Evaluation of chemopreventive effects of Thymoquinone on cell surface glycoconjugates and

- cytokeratin expression during DMBA induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *BMB Rep.* 2010; 43(10): 664-669.
- Randhawa MA, Al-Ghamdi MS. A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J Med Res*,2002, 41(2): 77-83.
- Rashed LA, Hashem RM, Soliman HM (2011) Oxytocin inhibits NADPH oxidase and P38 MAPK in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother* 65:474–480.
- Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis; role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73(Suppl 1):S21-9.
- Rybak LP, Whitworth CA. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov Today*. 2005;10(19): 1313-21.
- Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 2007;72(8): 931-5.
- Sagit M, Korkmaz F, Akcadag A, Somdas MA. Protective effect of thymoquinone against cisplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013 Aug;270(8):2231-7.
- Sagit M, Korkmaz F, Gurgun SG, Kaya M, Akcadag A, Ozcan I. The protective role of thymoquinone in the prevention of gentamicin ototoxicity. *American Journal of Otolaryngology – Head and Neck Medicine and Surgery* 35 (2014)603–609.
- Sagit M, Korkmaz F, Gurgun SG, Gundogdu R, Akcadag A, Ozcan I. Quercetin attenuates the gentamicin induced ototoxicity in a rat model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 79 (2015) 2109–2114.
- Salem ML 2005. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5(13-14): 1749-1770.
- Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity: prevention in sight? *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 May;118(5):674-7.
- Sha SH, Qiu JH, Schacht J. Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss. *N Engl J Med* 2006; 354:1856.
- Sinswat P, Wu WJ, Sha SH, Schacht J. Protection from ototoxicity of intraperitoneal gentamicin in guinea pig. *Kidney Int.* 2000;58(6): 2525-32.

- Smith CR, Lipsky JJ, Laskin OL, Hellmann DB, Mellits ED, Longstreth J, Lietman PS. Double-blind comparison of the nephrotoxicity and auditory toxicity of gentamicin and tobramycin. *N Engl J Med* 1980;302(20):1106-9.
- Somdaş MA, Korkmaz F, Gurgen SG, Sagit M, Akçadağ A. N-acetylcysteine Prevents Gentamicin Ototoxicity in a Rat Model. *J Int Adv Otol.* 2015 Apr; 11(1):12-8.
- Song BB, Sha SH, Schacht J. Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo- and vestibulo-toxicity. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(2): 189-95.
- Song JJ, Lim HW, Kim K, Kim KM, Cho S, Chae SW. Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 76 (2012) 675–679.
- Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329(1-2):21-4.
- Tan D-X, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, and Reiter RJ. “One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?” *Journal of Pineal Research*, vol. 42, no. 1, pp. 28–42, 2007.
- Tepel M. N-Acetylcysteine in the prevention of ototoxicity. *Kidney Int.* 2007;72(3): 359-63.
- Usta A, Dede S. The Effect of Thymoquinone on Nuclear Factor Kappa B Levels and Oxidative DNA Damage on Experimental Diabetic Rats. *Pharmacogn Mag.* 2017 Oct; 13 (Suppl 3):S458-S461.
- Wackym PA, Storper IS, Newman AN. Cochlear and vestibular ototoxicity. In: Canalis RP, Lampert PR, eds. *The Ear Comprehensive otology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2000; 571-85.
- Yang, J.W.; Jung, W.K.; Lee, C.M.; Yea, S.S.; Choi, Y.H.; Kim, G.Y.; Lee, D.S.; Na, G.; Park, S.G.; Seo, S.K.; et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits the inflammatory effects of interleukin-1 β in human corneal fibroblasts. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2014, 36, 371–377.

Zimmerman EA, Nilaver G, Hou-Yu A and Silverman AJ. Vasopressinergic and oxytocinergic pathways in the central nervous system. Fed Proc. 43:91-96, 1984.

