

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL VESTİBÜLER VE KOKLEAR TOKSİSİTE MODELİNDE ÇAPRAZ
BAĞLI HYALURONİK ASİTİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DR. ERDAL ERKOÇ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2019

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL VESTİBÜLER VE KOKLEAR TOKSİSİTE MODELİNDE ÇAPRAZ
BAĞLI HYALURONİK ASİTİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

ERDAL ERKOÇ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ENİS ALPİN GÜNERİ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019.KB.SAG.054
proje numarası ile desteklenmiştir.

1. ÖZET	8
1.1. AMAÇ VE HİPOTEZ	8
1.2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
1.3. BULGULAR.....	9
1.4. SONUÇ	9
2. ABSTRACT	10
3. GİRİŞ VE AMAÇ	12
3.1. PROBLEMİN TANIMI VE ÖNEMİ	12
3.2. ARAŞTIRMANIN AMACI VE HİPOTEZİ.....	14
4. GENEL BİLGİLER	15
4.1. KULAK ANATOMİSİ VE İŞİTME FİZYOLOJİSİ	15
4.1.1. İnsan Kulağı Anatomi ve Fizyolojisi	15
4.1.1.1. Dış Kulak.....	15
4.1.1.2. Orta Kulak.....	16
4.1.1.3. İç Kulak	17
4.1.1.3.1. Ses İletimi.....	19
4.1.1.4. Santral İşitme Yolları.....	20
4.1.2. Sıçan (Rat) Kulak Anatomi ve Fizyolojisi	20
4.2. OTOTOKSİSİTE	22
4.2.1. Aminoglikozid Ototoksitesi ve Etki Mekanizması.....	22
4.2.2. Ototoksiteye Etkili Ajanlar	23
4.2.2.1. Hyaluronik asit	25
4.2.3. Ototoksitenin Monitörizasyonu	27
4.2.3.1. Otoakustik Emisyon (OAE)	27
4.2.3.2. İşitsel Beyin Sapı Cevapları (ABR).....	29
4.2.4. Sıçanlarda Odyovestibüler İnceleme.....	29
4.2.5. Sıçanlarda Histolojik İnceleme	31
5. GEREÇ VE YÖNTEM	32
5.1. ARAŞTIRMA TİPİ	32
5.2. ARAŞTIRMA YERİ VE ZAMANI.....	32
5.3. ÇALIŞMA GRUPLARI.....	32
5.3.1. Gruplara Yapılan İşlemlerin Tanımı	34
Genta (n:7): İntratimpanik Gentamisin uygulanan rat grubu.....	34
HA (n:7) İntratimpanik Hyaluronik asit otojel uygulanan rat grubu.....	35
Genta-HA (n:7): İntratimpanik Gentamisin + Hyaluronik asit Otojel uygulanan rat grubu.....	35
Kontrol SF (n: 7): İntratimpanik İzotonik Serum fizyolojik uygulanan rat kontrol grubu	36
5.3.2. Odyolojik Değerlendirme yöntemleri.....	38
5.3.3. Vestibüler Fonksiyonların Değerlendirilmesi	39
5.3.4. Sakrifikasyon ve Histopatolojik Değerlendirme.....	40
5.4. ARAŞTIRMA MATERYALİ.....	41
5.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ	41
5.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	42
5.6.1. Aminoglikozid Toksisitesinin Oluşturulması	42
5.6.2. Anestezi Yöntemi	42
5.6.3. Vestibüler ve Odyolojik İnceleme	43
5.6.4. Ajan Uygulaması	46
5.6.5. Histolojik İnceleme.....	46
5.6.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	47
5.6.5.2. TUNEL Yöntemi.....	48
5.6.5.4. İndirekt İmmunohistokimyasal Yöntem	49
5.6.5.3. Histomorfolojik ve İmmunhistolojik Skorlama	51
5.7. ARAŞTIRMANIN PLANI VE TAKVİMİ	52
5.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	52
5.9. ETİK KURUL ONAYI.....	53

6. BULGULAR	54
6.1. DİSTORSİYON ÜRÜNÜ OTOAKUSTİK EMİSYON (DPOAE) BULGULARI	54
6.2. İŞİTSEL UYARILMIŞ BEYİNSAPI POTANSİYELLERİ (İUBP)	54
6.2.1. İUBP yanıtları	54
6.2.2. Tüm Grupların İUBP Eşik Ortalamaları ve Değişimi	56
6.2.2.1. 4 kHz Eşikleri	60
6.2.2.2. 8 kHz Eşikleri	61
6.2.2.3. 16 kHz Eşikleri	62
6.2.2.4. 20 kHz Eşikleri	63
6.2.2.5. 32 kHz Eşikleri	64
6.2.2.6. Gentamisin (A) grubu (n:7)	67
6.2.2.7. Hyaluronik asit (B) grubu (n:7)	68
6.2.2.8. Gentamisin+Hyaluronik asit Kombinasyon (C) grubu (n:7)	69
6.2.2.9. Serum Fizyolojik (D) grubu (n:7)	70
6.3. VESTİBÜLER ETKİLENME BULGULARI	73
6.3.1. 24. saat vestibüler değerlendirme skorları	73
6.3.2. 7. gün vestibüler değerlendirme skorları	75
6.3.3. 10.gün vestibüler değerlendirme skorları	76
6.4. HİSTOLOJİK GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI	81
6.4.1. Hemotoksilen-Eozin Kesitleri	81
6.4.2. TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 Kesitleri	90
7. TARTIŞMA	94
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
9. KAYNAKÇA	104
10. EKLER	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1:CORTİ ORGANI VE DESTEK HÜCRELERİ.....	18
ŞEKİL 2:PERİFERİK VE SANTRAL İŞİTME YOLLARI.....	20
ŞEKİL 3:HYALURONİK ASİT MOLEKÜLÜ.....	25
ŞEKİL 4:ÇAPRAZ BAĞLANMA MODELİ	27
ŞEKİL 5:GENTAMİSİN GRUBU BAZAL - 4 VE 32 KHZ ABR GRAFİKLERİ	55
ŞEKİL 6: GENTAMİSİN GRUBU ENJEKSİYON SONRASI 7. GÜN - 4 VE 32 KHZ ABR GRAFİKLERİ.....	55
ŞEKİL 7: KOMBİNASYON GRUBU ENJEKSİYON SONRASI 7. GÜN - 4 VE 32 KHZ ABR GRAFİKLERİ	56
ŞEKİL 8:4 KHZ 0,1,7 VE 10. GÜN EŞİK ORTALAMALARI- TÜM GRUPLAR.....	60
ŞEKİL 9:8 KHZ 0,1,7 VE 10. GÜN EŞİK ORTALAMALARI - TÜM GRUPLAR	61
ŞEKİL 10:16 KHZ 0,1,7 VE 10. GÜN EŞİK ORTALAMALARI - TÜM GRUPLAR	62
ŞEKİL 11:20 KHZ 0,1,7 VE 10. GÜN EŞİK ORTALAMALARI - TÜM GRUPLAR	63
ŞEKİL 12:32 KHZ 0,1,7 VE 10. GÜN EŞİK ORTALAMALARI - TÜM GRUPLAR	64
ŞEKİL 13:4-16 KHZ FREKANS IUBP EŞİK ORTALAMALARININ DEĞİŞİM GRAFİĞİ.....	71
ŞEKİL 14:20-32 KHZ FREKANS IUBP EŞİK ORTALAMALARININ DEĞİŞİM GRAFİĞİ.....	72
ŞEKİL 15:VESTİBÜLER ETKİLENME TOTAL PUANLARI - TÜM GRUPLAR	78

RESİMLER DİZİNİ

RESİM 1:SWIMMING (YÜZME) TESTİ	43
RESİM 2: TAİL HANGİNG (KUYRUK ASMA) TESTİ.....	44
RESİM 3: AIR RIGHTING (HAVADA DÜZELME) TESTİ	44
RESİM 4:SIÇAN OAE ÖLÇÜMÜ - SERUM FİZYOLOJİK GRUBU	45
RESİM 5:SIÇAN OTOAKUSTİK EMİSYON VE IUBP ÖLÇÜM ÜNİTESİ	45
RESİM 6:SIÇAN IUBP ÖLÇÜMÜ VE ELEKTROT DÜZEN EĞİ- GENTAMİSİN GRUBU	46
RESİM 7: A:GENTAMİSİN GRUBU - HEMOTOKSİLEN-EOZİN İNCELEMELERİ	81
RESİM 8:B:HYALURONİK ASİT GRUBU HEMOTOKSİLEN-EOZİN İNCELEMELERİ	83
RESİM 9:C:KOMBİNASYON GRUBU HEMOTOKSİLEN-EOZİN İNCELEMELERİ.....	85
RESİM 10:D:SERUM FİZYOLOJİK GRUBU HEMOTOKSİLEN-EOZİN İNCELEMELERİ	87
RESİM 11:TUNEL VE CASPASE GÖRÜNTÜLEME KESİTLERİ A:GENTAMİSİN GRUBU	91
RESİM 12: TUNEL VE CASPASE GÖRÜNTÜLEME KESİTLERİ B:HYALURONİK ASİT GRUBU.....	92
RESİM 13:TUNEL VE CASPASE GÖRÜNTÜLEME KESİTLERİ C:KOMBİNASYON GRUBU.....	92
RESİM 14: TUNEL VE CASPASE GÖRÜNTÜLEME KESİTLERİ D:SERUM FİZYOLOJİK GRUBU.....	93
RESİM 15: ETİK KURUL ONAYI	115

TABLO LİSTESİ

TABLO 1:ÇALIŞMA GRUPLARI	34
TABLO 2:DENEY ZAMAN ÇİZELGESİ.....	37
TABLO 3:VESTİBÜLER HASAR SKORLAMASI	40
TABLO 4:IŞIK MİKROSKOBİK DOKU TAKİP PROTOKOLÜ.....	47
TABLO 5:HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ	48
TABLO 6:TUNEL YÖNTEMİ	49
TABLO 7:İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM.....	50
TABLO 8:DIŞ TÜYLÜ HÜCRE HASARI SKORLAMASI	51
TABLO 9:APOPTOZİS SKORLAMASI.....	51
TABLO 10:HİSTOPATOLOJİK ETKİ SKORLAMASI.....	51
TABLO 11:ARAŞTIRMANIN PLANI VE TAKVİMİ	52
TABLO 12:TÜM GRUPLARIN BAZAL DPOAE AMPLİTÜDLERİ VE STANDART HATA DEĞERLERİ.....	54
TABLO 13:GRUPLARIN TANIMLAYICI ANALİZLERİ –0,1,7,10. GÜN - 4,8,16,20,32 KHZ.....	57
TABLO 14:ABR EŞİK DEĞERLERİNDE KRUSKAL-WALLİS VE BONFERRONİ DÜZELTMESİ – FREKANS BAZLI ANALİZ.....	59
TABLO 15: ABR EŞİKLERİNDE GRUP İÇİ ANALİZLER - FRIEDMAN ANALİZİ VE BONFERRONİ DÜZELTMESİ	66
TABLO 16: VESTİBÜLER ETKİLENME DÜZEYİ TANIMLAYICI ANALİZLERİ.....	73
TABLO 17:GENTAMİSİN GRUBU - VESTİBÜLER TEST BATARYASI HASAR SKORLARI	74
TABLO 18:HYALURONİK ASİT GRUBU - VESTİBÜLER TEST BATARYASI HASAR SKORLARI	75
TABLO 19:KOMBİNASYON GRUBU - VESTİBÜLER TEST BATARYASI HASAR SKORLARI.....	77
TABLO 20:SERUM FİZYOLOJİK GRUBU - VESTİBÜLER TEST BATARYASI HASAR SKORLARI	77
TABLO 21: GÜN BAZINDA VESTİBÜLER ETKİLENME ANALİZLERİ – KRUSKAL-WALLİS VE BONFERRONİ DÜZELTMESİ	79
TABLO 22:AJAN BAZINDA VESTİBÜLER ETKİLENME ANALİZLERİ – FRIEDMAN ANALİZİ VE BONFERRONİ DÜZELTMESİ İKİLİ ANALİZLERİ	80
TABLO 23:HİSTOLOJİK HASAR SKOR TABLOSU	88
TABLO 24:HİSTOLOJİK ETKİLENME TANIMLAYICI ANALİZLERİ.....	89
TABLO 25: HİSTOLOJİK HASAR ANALİZLERİ - ANOVA VE İKİLİ ANALİZDE BONFERRONİ DÜZELTMESİ	90

KISALTMALAR

DKY: Dış Kulak Yolu

dB: Desibel

Hz: Hertz

kHz: Kilo-Hertz

İTH: İç Tüylü Hücre

DTH: Dış Tüylü Hücre

Genta: Gentamisin

HA: Hyaluronik asit

SW: Swimming Test

TH: Tail Hanging Test

AR: Air Righting

VDRs: Vestibular Disfunction Ratios

MoD: Degree of modification

BDDE: 1,4-Butanediol Diglicidile Ether

Ca²⁺: Kalsiyum

SPL: Sound Pressure Level (Ses Basıncı Düzeyi)

OAE: Otoakustik Emisyon

DPOAE: Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon

İUBP: İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyelleri

ABR: Auditory Brainstem Response

SF: Serum Fizyolojik

VDRs: Vestibular Dysfunction Ratings

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Nick End Labelling

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

POD: Peroxidase

PBS: Phosphate-buffered saline

SV: Stria vaskularis

SG: Spiral ganglion

KS: Koklear sinir

K.W: Kruskal-Wallis

1. ÖZET

Deneysel Vestibüler ve Koklear Toksisite Modelinde Çapraz Bağlı Hyaluronik Asitin Etkilerinin İncelenmesi

Dr. Erdal Erkoç

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı
İnciraltı, İZMİR

1.1. Amaç ve Hipotez

Çalışmamızda gentamisin ile sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan vestibulotoksisite ve ototoksisite modelinde çapraz bağlı hyaluronik asit molekülünün iç kulak üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

1.2. Gereç ve Yöntem

Her biri yedi adet sıçandan oluşan, kontrol grubu ile birlikte toplam 4 grubun enjeksiyonları, multidoz olarak 7 gün süreyle yapıldı. Dış kulak yoluna uygun boyda spekulum yerleştirildikten sonra, enjektöre alınan ilaç 20 gauge iğne ile otomikroskopik görüş altında, intratimpanik olarak, kavite doldurulacak şekilde (yaklaşık 0.06 ml) enjekte edildi. A grubundaki sıçanlara 13.33 mg/ml konsantrasyonundaki 0.06 ml gentamisin, B grubundaki sıçanlara 0.06 ml hacminde çapraz bağlı hyaluronik asit otojel, C grubundaki sıçanlara ise 26.66 mg/ml konsantrasyonundaki 0.03 ml gentamisin + 0.03 ml hyaluronik asit otojel karışımı, D grubundaki sıçanlara 0.06 ml serum fizyolojik intratimpanik olarak 7 gün süreyle uygulandı.

Tüm sıçanlar enjeksiyon öncesi ve sonrası, 1, 7 ve 10. günlerde oydovestibüler incelemeye tabi tutuldu. Sakrifikasyonun ardından sıçanların temporal kemikleri çıkarılarak koklea, vestibül, koklear sinir ve spiral ganglion hücreleri ışık mikroskobunda hematoksilin-eozin, TUNEL ve kaspaz-3 boyama yöntemiyle değerlendirildi.

1.3. Bulgular

İUBP testi sonuçlarına göre gentamisin (A) ve kombinasyon (C) gruplarında diğer gruplara göre tüm frekanslar eşiklerinde daha yüksek işitme eşikleri elde edildi. Bu iki grupta da 4, 8, 12, 20 ve 32 kHz frekans değişimlerinde, ilk 24 saatten itibaren istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı yükselme olduğu saptandı ($p<0,05$). Histopatolojik incelemelerde en çok etkilenen grubun hyaluronik asit ve gentamisin kombinasyon grupları olduğu olarak dikkati çekti. Gentamisin ile kombinasyon grupları arasında, odyolojik, vestibüler ve histolojik etkilenme skorları açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Histopatolojik incelemelerde gentamisin (A) ve kombinasyon (C) gruplarında dış ve iç tüylü hücre hasarının yanı sıra, stria vaskülaris, spiral ganglion, koklear sinir ve vestibül hasarı olduğu gösterildi. İzole hyaluronik asit eneksiyonu yapılan grupta (B), geçici efüzyon etkisi ve işitme kaybı dışında kontrol serum fizyolojik uygulanan kontrol grubunda (D) elde edilenlere benzer şekilde iç kulakta histopatolojik hasar oluşturmadığı görüldü. Gentamisin ve hyaluronik asit kombinasyonunun (Grup C) odyolojik testler, vestibüler davranış testleri ve histopatolojik incelemeler ile izole gentamisin eneksiyonu uygulanan (Grup A) gruba benzer şekilde etki yaptığı, aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$).

1.4. Sonuç

Elde edilen bulgularla hyaluronik asit moleküllerinin iç kulağa toksik etki yapmadığı düşünülmüş, izole gentamisine karşılaştırıldığında ABR eşiklerine, vestibüler denge skorlarına ve histopatolojik bulgulara anlamlı katkısının olmadığı saptanmıştır. Kontrollü ilaç salınım mekanizmalarını aydınlatmak için; hyaluronik asit molekülünün, farklı doz ve yöntemlerle uygulanan ilaçlarla kombinasyonlarının denendiği, ilaç kinetiğinin ve hücresel değişikliklerin çok zamanlı testlerle incelendiği ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Ototoksisite, hyaluronik asit, gentamisin, kontrollü ilaç salınımı

2. ABSTRACT

Effect of cross-linked hyaluronic acid in a rat model of vestibular and cochlear toxicity

Dr. Erdal Erkoc

Dokuz Eylül University, Medical Faculty, Otorhinolaryngology Department
İnciraltı, İZMİR

2.1. Objective and Hypothesis

The aim of this study was to investigate the effects of cross-linked hyaluronan molecule in a rat model of vestibulotoxicity and ototoxicity experimentally induced with gentamicin.

2.2. Materials and Methods

There were groups with 7 rats in each. In group A, intratympanic injection of 13.33 mg / ml of 0.06 ml gentamicin concentration, in group B, injection of 0.06 ml hyaluronic acid autogel, in group C, injection of 26.66 mg / ml gentamicin + 0.03 ml hyaluronic acid autogel mixture, in group D, injection of 0.06 ml of saline were administered for consecutive 7 days.

All rats were subjected to audiological and vestibular examinations, before the injections, on days 1, 7 and 10. The rats were sacrificed by applying intracardiac combination of ketamine hydrochloride (50 mg / kg) and xylazine hydrochloride (5 mg / kg) on the 10th day. After sacrifice, temporal bones of rats were removed and their cochlea, vestibule, cochlear nerve and spiral ganglion cells were evaluated by light microscope with hematoxylin-eosin, TUNEL and caspase-3 staining methods.

2.3. Results

According to the results of the ABR test, gentamicin (A) and combination (C) groups had higher hearing thresholds at all frequencies compared with the other groups. In both groups, statistically significant toxicity was observed at 4, 8, 12, 20 and 32 kHz frequencies beginning from the first 24 hours ($p < 0.05$). Vestibular analysis also showed, the significant adverse effects of gentamicin and combination groups after 24 hours ($p < 0.05$). There were no significant differences between the audiological, vestibular and histological results of the gentamicin and the combination groups ($p > 0.05$). Histopathological examinations revealed inner and outer hairy cell damage as well as striae vascularis, spiral ganglion, cochlear nerve and vestibular injury in group A (gentamicin) and group C (gentamicin + hyaluronic acid combination). Isolated hyaluronic acid injection group (B) showed similar results with control saline injection group (D) except for the temporary effusion effect and hearing loss. Hyaluronic acid did not cause histopathological damage in inner ear. The combination of gentamicin and hyaluronic acid injection group (C) had a similar effects like isolated gentamicin injection group (A) in audiological tests, vestibular tests and histopathological examinations. When combination group compared with the gentamicin (A) injections ototoxicity is not significantly different ($p > 0.05$).

2.4. Conclusion

It was thought that hyaluronic acid molecules did not cause toxic effects on inner ear. When compared with isolated gentamicin, it did not make any significant contribution to ABR thresholds, vestibular balance scores and histopathological findings. Further studies are needed to investigate hyaluronic acid combinations by different methods in order to understand the mechanisms of controlled drug release.

Key words: ototoxicity, gentamycin, cross-linked hyaluronic acid, controlled drug release

3. GİRİŞ VE AMAÇ

3.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Ototoksisite akut veya kronik hastalıklar nedeniyle günümüzde sıkça kullanılan ilaçların yaptığı doku hasarı çeşitlerinden biridir. Terapötik ajanların iç kulak dokularında neden olduğu hücresel dejenerasyon ve fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Genel popülasyonun önemli bölümünde kullanılan anti inflamatuvarlar, anti hipertansifler, diüretikler, kemoterapötikler, antibiyotikler, anti-maleryaller ve daha birçok ilaç bu konuda suçlanmaktadır¹. Bu ajanların etkisiyle işitme kaybı ve/veya denge fonksiyonlarında bozulma ortaya çıkar ². Geçici veya kalıcı olabilen bu duruma klinik kullanımda en sık neden olan ilaç gruplarından biri de aminoglikozidlerdir. İlk olarak tüberküloz tedavisi için geliştirilmiş olan, toksisitelerini azaltmak için ilerleyen dönemlerde pek çok alt grubu üretilen aminoglikozidler; geniş spektrumlu ve gram negatiflere etkili olmaları yanı sıra düşük bakteri rezistansı ve düşük maliyet nedeniyle halen sıklıkla kullanılmaktadırlar ^{3,4}. Otolojik deneysel hayvan araştırmalarında da sıkça incelenen gentamisin, toksisite modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hem kokleotoksik hem de vestibulotoksik özellikleri bulunduğundan seçilmiş hastalarda dikkatle kullanılmak zorundadırlar.

Sıklıkla Meniere hastalığının tedavisinde kullanılan intratimpanik gentamisin (İTG) uygulaması; iç kulakta endolenf üretimini sağlayan koyu hücreleri hedef almaktadır⁵. Bu ilaçlar mitokondri ve hücre membranında fosfotidilinositole bağlanarak membran geçirgenliğini artırmakta, bunun sonucunda oksidatif fosforilasyonun kofaktörlerinden magnezyumun kaybı gerçekleşmekte ve hücreyi ölüme götürmektedir. Bu etkiye aminoglikozidlerin kalsiyum duyarlı potasyum kanallarını bloke etmesi de katkı sağlar. Aynı zamanda hayvan deneylerinde bu uygulamanın sensörinöral nöro-epitelyumu da tahrip ettiği ortaya konmuştur. Bunun sonucunda koklea bazal kıvrım hasarına sekonder olarak yüksek frekansları etkileyen kalıcı işitme kaybı ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda utrikuler ve sakkuler

makula hasarına bağlı olarak vestibüler toksisite belirtileri ortaya çıkmaktadır ⁶. Ancak toksisitenin yeri ve düzeyi ilaç uygulama şekline, dozuna, süresine ve kişiye bağlı olarak değişebilmektedir. Bu yüzden aminoglikozidlerin vestibüler ve koklear toksisitesinin incelenmesi ve farklı kullanım protokolleri geliştirebilmek amacıyla birçok ajanla çeşitli kombinasyonlar denenmiştir. İn vivo ve in vitro yöntemler, deneysel hayvan incelemeleri ve yeni ilaç formları gelişen teknolojiyle paralel olarak toksik yan etkileri minimuma indirmeyi hedeflemiştir. Kullanılan ilacın sistemik veya lokal olarak uygulanması, enjeksiyonun orta kulağı katettikten sonra yuvarlak pencere, oval pencere veya stapes tabanı önüne uygulanması, orta kulaktaki kalıcılık ve infüzyon süresi ve kullanım alternatiflerine göre ajanların karşılaştıkları anatomik bariyerler tüm bu çalışmalara konu olmuştur ⁷⁻⁹. Ayrıca gerek iletim dinamiklerini gerekse toksisite düzeyini değiştirmek amacıyla farklı kombinasyonlarla kullanılan ajanların birbirine üstünlükleri odyovestibüler testler ve histolojik incelemelerle araştırılmıştır¹⁰⁻¹⁶.

Aminoglikozidlerin kullanımı ile oluşan ototoksik etkilerden korunmak için deksametazon, taurodeoksikolik asit, asetil sistein, fenofibrat, tiroksin, fosfomisin, salisilik asit, Fe şelatörleri, büyüme faktörleri, hiperbarik oksijen, ferulik asit, kırmızı cinseng gibi birçok potansiyel koruyucu ile çalışmalar yapılmıştır ^{5,17,18}. Ayrıca bu ajanların olası etkileri immünohistokimyalar çalışmalar, ışık mikroskopik bakı, elektron mikroskopisi, PCR veya in vitro kültürler ile tüylü hücre ve nöroepitelyum düzeyinde incelenmiştir ^{5,7,26,27,17,19-25}.

Transtimpanik ajan uygulamasının diğer yöntemlere göre üstünlüğü kabul edilmiş olsa da kombinasyonda kullanılacak maddeler ve formları konusunda fikir birliği yoktur. Son yıllarda özellikle plastik rekonstrüktif cerrahi, genel cerrahi ve kadın doğum alanlarında yara iyileşmesinde ve rejenerasyonunda sıkça kullanılan, kulak burun boğaz uygulamalarında da kullanımı artan hyaluronik asit derivelerinin; uzamış ilaç salınımı ve ajan stabilizasyonu fonksiyonlarının yanı sıra anti inflamatuvar ve rejeneratif etki sağladığına dair bulgular vardır^{11,28-33}. Bizim çalışmamızda, çapraz bağlı hyaluronik asit derivesinin gentamisin ile kombine olarak intratimpanik enjeksiyon yöntemi şeklinde kullanımının, ilacın vestibulotoksik ve ototoksik etkilerine yol açan histopatolojik hasarına olan katkısının odyovestibüler ve histokimyasal testler ile incelenmesi amaçlandı. Histopatolojik

hasar incelemesinde hematoksilin-eozin, TUNEL (dUTP Nick End Labelling), Kaspaz-3 boyamaları kullanıldı.

3.2. Araştırmanın Amacı ve Hipotezi

Çalışmamızda çapraz bağlı hyaluronik asit jel formunun gentamisin ile sıçanlarda oluşturulan deneysel vestibulotoksisite ve ototoksisite modelinde iç kulak üzerine olan etkilerinin incelenmesi planlanmıştır.

Araştırmanın hipotezi:

H0: Çapraz bağlı hyaluronik asitin gentamisinle oluşturulan kokleovestibüler toksisite üzerine etkisi yoktur.

H1: Çapraz bağlı hyaluronik asitin gentamisinle oluşturulan kokleovestibüler toksisite üzerine etkisi vardır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KULAK ANATOMİSİ VE İŞİTME FİZYOLOJİSİ

4.1.1. İnsan Kulağı Anatomi ve Fizyolojisi

Birinci ve ikinci brankiyal yarıktan gelişen kulak; sesin dış, orta ve iç kulak vasıtasıyla dönüştürülerek elektriksel uyarı şeklinde sekizinci sinire, oradan da sırasıyla koklear nukleus, superior olivar kompleks, inferior kollikulus, medial genikulat ve primer işitsel kortekse (Heschl girusu) iletiminden sorumludur. Aynı zamanda iç kulaktaki vestibüler organlar olan utrikul, sakkul ve semisirküler kanallar vasıtasıyla vücudun periferik denge organını oluşturmaktadır. Dış ve orta kulak arası geçişteki bariyer fonksiyonu timpanik membran tarafından oluşturulurken, orta ve iç kulak arası bariyer koklear kemik duvar, yuvarlak pencere ve stapes tabanı ile anuler ligaman tarafından korunmuş oval pencere tarafından oluşturulur.

4.1.1.1. Dış Kulak

Aurikula, üzeri deri ve perikondriumla sarılmış fibroelastik bir kıkırdaktan oluşmaktadır. Aurikulanın devamlılığı yaklaşık 25 mm uzunluğundaki dış kulak yolu ile sağlanır.

Lateralde heliks adı verilen dış kıvrım aşağı uzanarak kıkırdak içermeyen lobülde sonlanır. Buna paralel uzanan, antiheliks isminde ikinci bir kıvrım vardır ve önündeki konkav ve düz alan kavum konka, bunun süperiorundaki daha küçük alan simba konka olarak adlandırılır. Kavum konkanın kıkırdağı dış kulak yolu (DKY)'nın kıkırdak kısmına doğru uzanır ki, bu kıkırdağın superiorda bütünlüğü kesilir ve

buraya auriküler çentik veya insisura terminalis denir. İnsisura terminalisin inferiorunda çıkıntı olarak tragus, onun da altında antitragus bulunur. Auriküla anterior, superior ve posterior ligamentler ve intrensek kaslar ile stabilize edilir. Aurikülanın ayrıca anterior, superior ve posterior olmak üzere 3 tane ekstrensek kası vardır.

DKY 2.5 cm'lik kıvrımlı 'S' şeklinde bir silindirdir ve lateral üste biri kırdağ, serumen bezleri ve kıl foliküllerini içerir. Daha medialde kalan üste ikilik kısmı ise kemikle çevrili ve timpanik membran ile komşu olan bölümdür. Kırdağın ön duvarında Santorini fissürleri denen iki yarık bulunur³⁴.

Auriküla ve DKY'nun kanlanması temel olarak eksternal karotid arter sisteminden gelmektedir ve besleyen arterler posterior auriküler arter, oksipital arter ve superior temporal arterdir. Venleri ise arterlere eşlik ederek juguler vene drene olurlar. Aurikülanın lenfatik drenajı parotis, retroauriküler ve yüzeysel servikal lenf nodlarına olmaktadır. Auriküla ve DKY'nun duysal inervasyonu V., VII. ve X. kraniyal sinirler ve 3. servikal sinir tarafından sağlanır.

4.1.1.2. Orta Kulak

Orta kulak birinci brankial yarığın uzamasıyla oluşan tubotimpanik resesten gelişir. Lateralde timpanik membran, medialde promontoryum, süperiorda tegmen timpani ve orta fossa durası, inferiorda juguler bulbus arasında yer alır. Epitimpanum, mezotimpanum ve hipotimpanum olarak 3'e ayrılır. Malleus, inkus, stapes kemikçiklerini içeren, sesin iletimini sağlayan, aynı zamanda iç kulak basıncının düzenlenmesine katkı sağlayan bir ara bölmedir.

Lateraldeki timpanik membran yaklaşık 9x9 mm boyutunda, 0.1 mm eninde şeffaf, çok katlı bir fibröz yapıdır. Çevresinde fibröz anulus olarak bilinen Gerlach halkasına ve en medialde ise umboya tutunur. Umbo zarın en medialdeki kısmıdır ve bu ekseninde orta kulak transvers uzunluğu 2 mm'ye iner. Orta kulak transvers çapı epitimpanumda yaklaşık 6 mm, hipotimpanumda ise 4 mm uzunluğundadır. Timpanik membranın üst gevşek bölümü pars flaksida (Shrapnell membran), alt

bölümü ise pars tensa olarak adlandırılır. Pars flaksidanın çevresinde tutunabileceği bir fibröz anulus hattı bulunmamaktadır. Bu kısım Rivinus çentiği olarak adlandırılır.

Orta kulak timpanik membranın titreşimini azaltan tensör timpani kası ile sesin iletim şiddetini azaltma görevi bulunan stapes kasını da içerir.

Timpanik membran ile vestibülümün lateral duvarındaki oval pencere arasında sırasıyla malleus, inkus ve stapes kemikçikleri bulunmaktadır. Stapes tabanı ve anuler ligamanı aracılığı ile oval pencereye temas eder. Kemikçikler, kendilerini saran ligamanları ile orta kulak yapılarının stabilizasyonundan, sesin iç kulağa iletiminden ve şiddetin artırılmasından sorumludur³⁵.

4.1.1.3. İç Kulak

İç kulak santral yollar ile bağlantılı olan kısımdır ve tamamen yüzey ektoderminden gelişip, 3. haftada otik plakoddan evrimleşmiştir. Koklea, vestibül ve semisirküler kanallardan oluşan kemik labirent ile Corti organı, utrikul, sakkul, endolenfatik ve perilenfatik sistemi içeren membranöz labirentten oluşur.

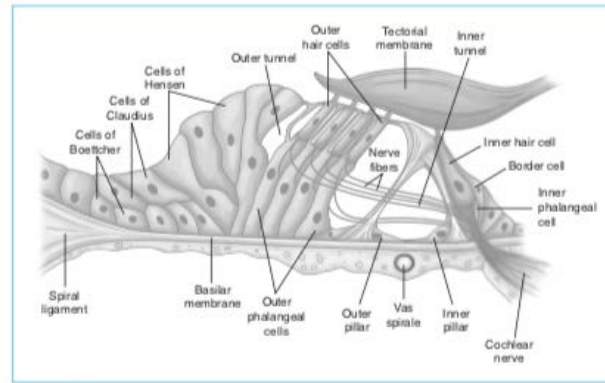
Ses enerjisi koklea düzeyinde aksiyon potansiyelleri haline dönüştürülerek iletilir. İnsan kulağı 20 - 20000 Hz arasını duymaktadır ve her tonun eşiği o tonun frekansına göre değişir. Normal konuşma şiddeti 65 dB, fısıltı şiddeti ise 20-25 dB'dir. Konuşma sesi frekansları 500 - 4000 Hz arasındadır.

İç kulağın işitsel verileri elektriksel iletilere çevirdiği alan Corti organıdır. Sarmal yapmış bir silindir şeklinde ve yaklaşık 35 mm uzunluğunda, 2.5 tur yapmış bir organdır. Sarmal yapmış silindirin içinde tepe noktasında birleşen skala vestibülü, skala media ve skala timpani isminde 3 adet tünel bulunur. Yüksek oranda Na⁺ içeren skala timpani ve skala vestibülü helicotrema'da birleşirler. Yüksek oranda K⁺ içeren skala media ise bu ikisinin arasında uzanıp, skala timpani ve skala vestibüliden sırasıyla baziler membran ve Reissner membranı ile ayrılmaktadır.

Skala media endolenf sıvısını içerirken, skala timpani ve skala vestibülü beyin omurilik sıvısına benzeyen perilenf içerir.

Sesin iletiminden sorumlu olan Corti organı perilenf özeliğinde cortilenf sıvısını ihtiva etmektedir. Corti organı 3 sıra dış tüylü hücre, tek sıra iç tüylü hücre ve ek olarak destek hücrelerini içermektedir. Yaklaşık 12500 adet dış, 3500 adet iç tüylü hücre mekanik ses enerjisinin aksiyon potansiyeline çevrilmesinde görev almaktadır. Dış tüylü hücreler 'w' şeklinde 3 sıra halinde, iç tüylü hücreler ise 2 sıra halinde 'V' şeklinde kalın sterosilyalar içermektedir. Koklear apekse yaklaştıkça sterosilya dizilimi daha seyrek, uzun ve basık hale gelmektedir. Duysal sinir uyarılarının sonlandığı yer %95 oranında iç tüylü hücrelerdir ^{36,37}.

İç ve dış tüylü hücreler arasındaki boşluğa Corti tüneli, dış tüylü hücreler etrafındaki boşluğa ise Nuel boşluğu denmektedir. Boettcher ve Cladius hücreleri baziler membranın en dış kısmında bulunmaktadır. Pillar, Deiters ve Hensen hücreleri destek hücreler olarak adlandırılan grubu oluşturur. Deiters hücreleri dış tüylü hücrelerin etrafında apekte, Hensen hücreleri ise dış tüylü hücrelerin tabanında bulunurlar ³⁷, (Şekil 1¹¹⁹).



Şekil 1:Corti organı ve destek hücreleri

İç kulağın diğer komponentinde ise periferik denge merkezi vardır ve utrikul, sakkul, semisirküler kanalları içerir. Periferik denge merkezi doğrusal ve açısız ivmelenmeyi algılayan alt sistemleri içermektedir. Ayrıca bu merkez vestibulooküler ve vestibülospinal reflekslerin kavşak noktasıdır ve bilişsel tepkilerin, endokrin merkezlerin uyarılmasını da sağlamaktadır. Periferik vestibüler sistemin tahribatı ile denge sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu fonksiyonları monitörize etmek ve olası hasarı erken dönemde saptamak için spontan ve uyarılmış nistagmus

değerlendirmeleri, vestibulooküler refleks ölçümü, vestibüler uyarılmış miyojenik potansiyeller gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir^{38,39}.

Tüm bu kompleks yapı işitmenin ve dengenin dinamiklerini içinde barındırması nedeniyle araştırmalara sıkça konu olmuştur. İşitme ve denge altyapısını etkileyen ototoksik ilaçlar özellikle koklea, utrikul ve sakkulu hedef almaktadır. İç kulağa verilmesi hedeflenen ilaçların iletimini kolaylaştırmak amacıyla, bu ilaçlar bazı diğer ajanlarla kombine edilerek kullanılmış ve iç kulağın bariyerleri aşmaya çalışılmıştır. Bu kombinasyonlar sistemik olarak, orta kulakta yuvarlak ve oval pencere önüne depo formda, yuvarlak pencere perforasyonu ile, iç kulak kateterizasyonu ile veya direkt kokleostomi yoluyla koklear segmentin farklı kesitlerinde spesifik alanlara uygulanmışlardır⁴⁰⁻⁴⁶.

4.1.1.3.1. Ses İletimi

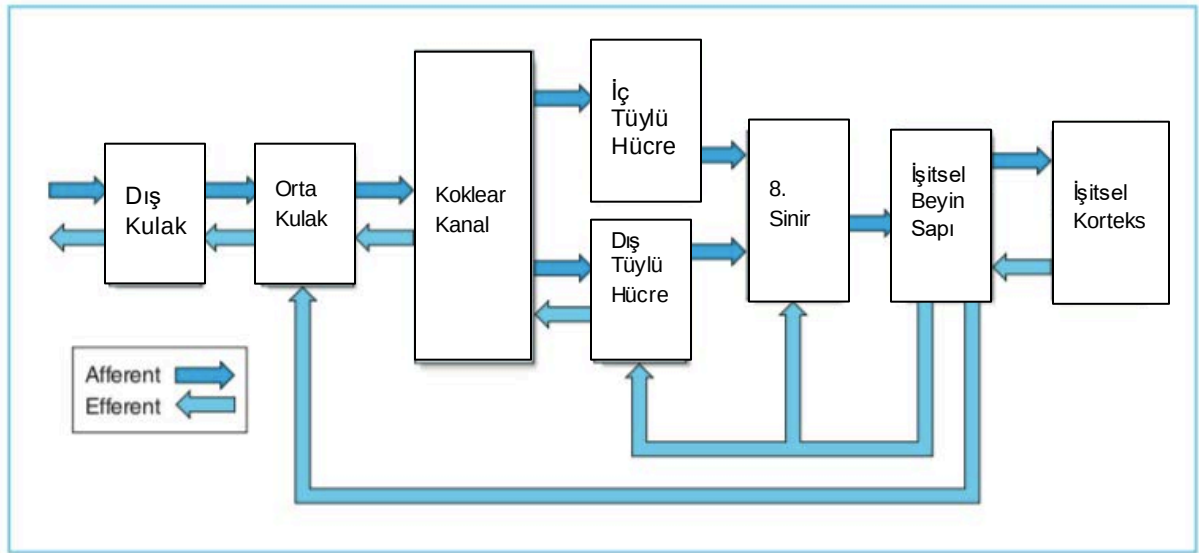
İşitmenin oluşması için ilk aşama sesin iletimidir ve kaynağından çıkan uyarı iletilen organlardan geçerek reseptör odak alanına gelmelidir. Sesin iletilen ortamda ilerleme hızına ses hızı denmektedir. Ses hızının birimi metre/saniye cinsinden belirtilir ve ses dalgasının havada yayılma hızı 340 m/sn'dir. Kokleada sesin iletimi Bekesy'nin ilerleyen dalga teorisi ile açıklanmaya çalışılmıştır⁴⁷.

Dış ve orta kulak iletimi sonrası oluşan perilenf hareketi endolenfi ve dolayısıyla baziler membranı harekete geçirmektedir. Basiller membrandaki Corti organı ve tüylü hücrelerin hareketi sayesinde uyarı elektriksel akıma dönüştürülmektedir. Bu enerji ise modiolus aracılığıyla spiral ganglion dentritlerine aktarılır. Spiral gangliyon hücrelerinin %95'ini oluşturan bipolar tip 1 hücreler iç tüylü hücrelerle, %5'lik dilimi oluşturan tip 2 hücreler ise dış tüylü hücreler ile temas halindedir⁴⁷.

Baziler membranda tonotopik organizasyon mevcuttur, yani her frekansa özgü bir alan bulunmaktadır ve membranın genişliği apekse doğru artar. Bu nedenle lezyon yerine spesifik, frekansa özgü işitsel fonksiyon kayıpları görülür.

4.1.1.4. Santral İşitme Yolları

Kokleadan afferent tip 1 nöronlarla iç tüylü hücrelerden, tip 2 nöronlarla dış tüylü hücrelerden alınan uyarılar, koklear sinir yoluyla sırasıyla dorsal ve ventral koklear nukleus, superior olivar kompleks, lateral lemniskus, inferior kollikulus, medial genikulat cisim ve işitme korteksine iletilir. Kortekse gelen demetin büyük kısmı Broadmanın 41 ve 42. bölgesi, yani A1 alanı olarak da bilinen Heschl girusunda sonlanır (Şekil 2¹¹⁹).



Şekil 2: Periferik ve santral işitme yolları

4.1.2. Sıçan (Rat) Kulak Anatomi ve Fizyolojisi

Sıçan gibi memelilerin kulaklarındaki içerikler insan kulağına benzer şekildedir. Kulağa ait yapılar; aurikula, dış kulak yolu, medialinde kulak zarı, orta ve iç kulak yapıları şeklinde sıralanır. İnsandakinden farklı olarak aurikula ince bir kıkırdak ve bunu saran deriden oluşur ve daha fazla esnektir. Anatomik olarak insana çok bezemeseler de, benzer geçiş yolakları ve anatomik dehissansları nedeniyle deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmışlardır.

Sıçan kulak sayvanı destek kas grubundan yoksun olduğundan oldukça değişken forma sokulabilir ve lobülü yağ doku içermez. Aurikulanın deri tabakası

insandan farklı olarak kıl foliküllerinden oldukça zengindir. Aurikula medialindeki dış kulak kanalı ortalama 7-10 mm uzunluğunda, 3-5 mm çapındadır ve en dar alanı timpanik membranı oluşturduğu bölümdür. Timpanik membranın çapı yaklaşık 3 mm'dir ve etrafında insan kulağında olduğu gibi timpanik anulus bulunmaktadır. Orta kulakta yine 3 adet kemikçik bulunmakla birlikte, farklı olarak orta ve iç kulak yapıları iç içe geçmiş halde bulunur ve timpanik bulla denilen yapının içindedirler. Orta kulakta stapes krurularının arasından internal karotis arter geçer ve antero-rostral seyirli yüzeyel bir fasial sinir traktı bulunmaktadır. Sıçanlardaki timpanik zarda orta kulak ile dış kulak bağlantısını sürekli açık tutacak şekilde bulunan mikro açıklıklar vardır ve bu da sıçan orta kulağının enfeksiyona daha fazla yatkın oluşunu açıklamaktadır ^{48,49}.

Diğer memelilerde olduğu gibi sıçan orta kulağı da sınırları belirgin olmasa da epitimpanum, mezotimpanum ve hipotimpanum olarak üç bölüme ayrılmıştır. Orta kulak kemikçikleri epitimpanum seviyesinde bulunmaktadır.

Sıçan kokleası uzunluğu ortalama 11 mm ve 2.5 tur dönüşe sahiptir. Oldukça küçük oluşu ve kompakt yapısı nedeniyle diseksiyonu zordur. Koklear kısımda bazal parça 6.4 mm, medial dönüş 3.2 mm ve kalan kısım (apikal dönüş) 1.4 mm olarak ölçülmüştür ⁵⁰.

İşitme yolları, ses dalgasının dönüşümü ve amplifikasyonu insandakine benzer şekildedir. Farklı olarak sıçan kulağı 250 ila 70000 Hz arasını işitebilir ve en iyi işitme 8000 - 32000 Hz arasındadır. Bu nedenle yüksek frekans incelemelerinde kullanımı avantaj sağlamaktadır. İnsandan farklı olarak işitsel beyin sapı uyarılmış potansiyel (IUBP) testinde en belirgin dalga morfolojisi II. dalga olarak saptanmıştır ⁵¹.

4.2. OTOTOKSİSİTE

Herhangi bir ajanın iç kulakta yarattığı metabolik veya morfolojik tahribat nedeniyle gelişen işitme kaybı veya denge problemi ototoksisite olarak adlandırılır. Ototoksisite koklear ve vestibüler toksisite olarak ikiye ayrılır. İlaçlar koklea veya vestibüle değişen derecelerde etki ettiği için her ilacın ototoksisite düzeyi farklı klinik yansımalar doğurmaktadır.

Ototoksik ilaçlar esas olarak baziller membran, utrikul ve sakkul makulası ile krista ampullarisin tüylü hücrelerine toksik etki göstermektedir. Hem tip 1 (dış tüylü hücreler) hem de tip 2 (iç tüylü hücreler) duyu hücrelerini etkilerler fakat tip 1 hücreler daha çok zarar görmektedir. Toksik etkiler ilk önce bazal kıvrımın dış tüylü hücrelerinde görülmektedir. Dış tüylü hücrelerin de öncelikle içteki sırası hasar görür. Toksik etki arttıkça üst koklear kıvrımlar, dış tüylü hücrelerin dış sırası ve iç tüylü hücreler de hasardan etkilenir ⁵⁰.

Aminoglikozidler, makrolidler, kinolonlar, bazı diüretikler, antimalaryal, antifungal, antiviral ilaçlar, beta blokerler, anti-konvülzanlar, NSAİ ilaçlar ve kemoterapötikler ototoksik etkileri ile bilinmektedir ⁵². Ototoksik bir ajan kullanan bireyin mevcut hastalıkları, ek ilaçları, aile öyküsü ve çeşitli gen mutasyonlarına bağlı olarak toksisite düzeyinde farklılıklar görülebilir. Hücreyi apoptoza götüren sürecin sonucu olarak hastada tinnitus, dengesizlik, işitme kaybı ve ataksi gibi çeşitli yakınma ve bulgular ortaya çıkmaktadır.

4.2.1. Aminoglikozid Ototoksisitesi ve Etki Mekanizması

Aminoglikozidler ilk olarak tüberküloz tedavisi için üretilmiştir ve ilk üretilen streptomisin'in şiddetli toksik etkileri nedeniyle daha sonraları türevleri ortaya çıkmıştır. Mide bağırsak sisteminden absorpsiyonlarının az olması nedeniyle topikal veya sistemik enfeksiyonlarda parenteral formları sıklıkla kullanılmaktadır. Gram negatif etkinliği yüksek olan geniş spektrumlu bu ilaçların kokleotoksisite ve vestibulotoksisite potansiyeli kullanımlarını oldukça sınırlamıştır.

Aminoglikozid toksisitesinin spesifik olarak neden iç kulağı etkilediği henüz aydınlatılamamıştır. Aminoglikozid toksisitesinde tüylü hücre apeksindeki mekanoelektriksel çevirici kanallar, koklear apeksten bazale doğru akan antioksidan gradient, hücre içi Jun-NH2 terminal kinaz yolağı suçlanmıştır^{3,6,53-55}.

Aminoglikozidlerin pozitif yükleri nedeniyle hücre içi şelat oluşumu,^{12s} ribozomal alt üniteye bağlanması ve esansiyel aminoasit yapımının duraklaması, hücre geçirgenliğinin artışı, reaktif oksijen radikallerinin oluşumuyla lipoksijenaz sisteminin antioksidan tüketimi apoptotik yolların başlangıcını oluşturmaktadır. Mitokondri geçirgenliğinde artış, magnezyum kaybı ve kalsiyum akışı sonrası sitokrom c ve kaspaz aktivasyonu apoptozu başlatmakta, hücreyi nekroza götüren sürecin bir sonucu olarak işitme kaybından osilopsiye kadar uzanan spektrumda etkiler görülmektedir. Magnezyumun kofaktör olarak kullanıldığı enzimatik reaksiyon içeren yolların tıkanması da süreci hızlandıran faktörlerden biri olmaktadır.

Aminoglikozidlerin mitokondri üzerindeki fostotidilinozitle bağlanması ve intrinsek apoptoz kaskadının başlamasıyla gelişen hücre ölümü öncelikle kokleada, utrikulus ve sakkulus makulasında, tüylü hücrelerde gerçekleşmektedir. Histopatolojik çalışmalarda baziler membran dış tüylü hücrelerin ilk sırasının daha kolay tahrip olduğu, toksik etkinin devamı ile ikinci ve üçüncü sıradaki tüylü hücrelerin etkilendiği gösterilmiştir. İlaç toksisitesi başlangıçta tinnitus, tiz frekansları işitme kaybı veya dengesizlik olarak kendini göstermekte, toksik ajan uygulaması dozu ve sıklığı arttıkça etki koklear apekse ve pes frekanslara ulaşabilmektedir. Aminoglikozidlerden amikasin, neomisin ve tobramisin daha çok kokleotoksik iken, gentamisin ve streptomisin daha çok vestibülotoksik kabul edilmektedir. Klinik uygulama sonuçları ve histolojik incelemeler aminoglikozidler arasındaki bu toksik etki farklılıklarını ortaya koysa da bu seçiciliklerinin sebebi henüz açıklanamamıştır^{5,6,18,50,55-57}.

4.2.2. Ototoxisiteye Etkili Ajanlar

Ototoxisiteye etkili ajanları toksik etkiyi artıranlar ve azaltanlar olarak ikiye ayırabiliriz. İlaçların toksik etkilerini nötralize etmek için yapılan çalışmalar özellikle son yıllarda yoğunlaşmıştır. Bu amaçla demir şelatları, glutatyon, salisilat, n-asetil

sistein, d-metionin, hiperbarik oksijen, fenofibrat, resveratrol, dexametazon gibi ajanlar kullanılmıştır^{21,24,58-61}.

Kanser araştırmalarında kemoterapötiklerin etkilerini artırmak ve yan etkilerini hafifletmek amacıyla yeni ajanlar ve transport metodları geliştirilmiş, yöntemler gen terapilerine de konu olmuştur ^{39,41,62,63}.

Bu çalışmaların ana çıkış noktası kar-zarar hesabı gözetilerek verilen sistemik kemoterapötikler olduğundan sisplatin konusunda yapılan incelemelerin sayısı oldukça fazladır. Son yıllarda antibiyotiklerin toksisitesi konusundaki bilinç düzeyinin artışı bu konudaki incelemelerin de artışını beraberinde getirmiştir. Hücreyi ölüme götüren kaskadın inhibe edilmesi amacıyla yolağın farklı noktalarına etkili adjuvan tedaviler denenmiş ve bu ajanlar deneysel hayvan modellerine de konu olmuştur^{5,12,26,64}.

Küçük memelilerin hayvan deney modellerinde sıklıkla kullanılması yeni ajan geliştirmenin yanı sıra, uygulanan ajanın hastaya verilme metodlarının da birbirlerine olan üstünlüklerinin araştırılmasını sağlamıştır. Ajan dozlaması, veriliş şekli, ilacın hedef bölgeye transferindeki dinamiklerin özölmesi, ulaşım sürecindeki anatomik ve fizyolojik bariyer mekanizmalarını anlamak, bu çalışmaların temel hedefleri olmuştur^{6,10,65-67}.

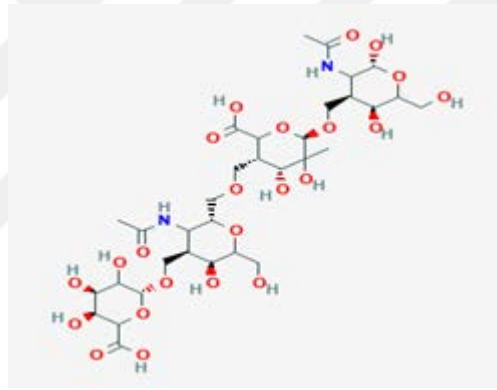
Ototoksik ilaçların toksik etkilerinin nötralize etmesi için proinflamatuvar sitokinlerin ve oksidatif stresin azaltılması, hücre bütünlüğünün korunması ve bozulmuş hücre ve organel membran rejenerasyonun hızlandırılması hedeflenmiştir^{4,5,59,68}. Ototoksisite üzerine koruyucu etki etmesi hedeflenen bir ajanın iç kulakta etki gösterebilmesi için, dış ve orta kulağı katetmesi, yuvarlak ve oval pencere, fissula ante fenestram, kemik labirent mikrofissürleri veya vasküler yolaklar aracılığıyla perilenfe ulaşması gerekmektedir ⁶⁹.

Farmakoloji alanında teknolojinin gelişmesi ile üretilen maddelerin geometrik yapısı, polimer sayısı ve ebatı, difüzyon sabiti, yarılanma ömrü ve akışkanlığı değiştirilerek farklı ilaç formları üretilebilmektedir. Bu sayede istenen etki kullanım öncesinde birebir simüle edilebilmekte ve etki genişliği ortaya konabilmektedir ⁷. Kullanılan ajanların stabilizasyonunu ve verimliliğini artırmak için uygulanan

yöntemlerden biri de yarı katı biyolojik uyumlu molekküllerdir. İlacın yuvarlak pencere ile temas süresini uzatması, düşük dozlarla uzun süreli etki sağlanması amacıyla en sıklıkla kullanılan maddelerden biri; difüzyon sabiti ve akışkanlığı artırılan çapraz bağlı hyaluronik asit molekülüdür. Kanseri araştırmaları ve in vitro çalışmalarda sıkça kullanılan bu molekülün ani ısıtma kaybında steroidlerle kombine olarak kullanılmasıyla steroidlerin periferik konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir^{8,9}.

4.2.2.1. Hyaluronik asit

Hyaluronik asit (HA); D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin monosakkaritlerinden oluşan, lineer polisakkarit dizileri içeren bir glikozaminoglikandır. HA bütün organizmalarda hücreler arasındaki ekstraselüler alanın ana komponentlerinden birini oluşturmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3: Hyaluronik asit molekülü

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=24847767, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24847767> (accessed Jan. 21, 2019).

β -1,4 ve β -1,3 glikozid bağları ile birbirine bağlı olan hyaluronik asit molekülünün boyutları bulunduğu anatomik alana göre değişebilmektedir. Örneğin eklem sinoviyal sıvısında 3-4 milyon dalton iken, göbek kordunda 3,140,000 daltondur.

HA içindeki kimyasal çapraz bağlar hidroksil ve karboksil grupları arasında yer alır. Bağ oluşturmak için sıklıkla 1,4-butanediol diglisidil eter (BDDE) ve divinil-sülfon kullanılmaktadır. HA molekülündeki çapraz bağlanma oranı ve geometrisi

partikülün boyutlarını, dokuda su tutma ve difüzyon kapasitelerini değiştirmektedir⁷⁰⁻⁷².

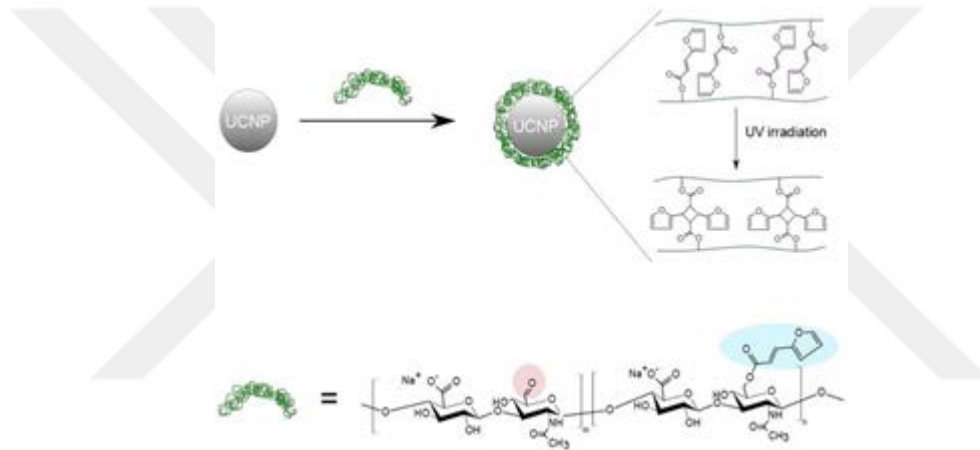
HA'lerde çapraz bağlanmaların değiştirilmesi ile molekülde yeni bir özellik ortaya çıkmaktadır. Buna hyaluronik asitin modifikasyon derecesi (MoD: degree of modification) denilmektedir. MoD; çapraz bağlanmayı yapan kimyasal molekül sayısının, ana molekülü oluşturan disakkarid moleküllerinin sayısına oranı ile hesaplanmaktadır. Bu değer HA'in uygulandığı dokudaki biyolojik uyumunu değiştirmektedir⁷³.

Yapılan çalışmalarda hyaluronik asitin orta kulak ve iç kulaktaki dağılımı ve hücre iskeletini oluşturmaktaki fonksiyonları gösterilmiş ve tedavi amaçlı kullanımda iç kulakta toksik etki yaratmadığı gözlenmiştir^{68,74-76}. Bu moleküllerin farklı bağ yapısı ile polimerleştirilen hyaluronik asit formlarının birbirine üstünlükleri araştırılmış, difüzyon hızı ve stabilitesi açısından farklı çapraz bağlı hyaluronik asit analogları ön plana çıkmıştır^{33,72,73,77}.

HA türevleri, timpanoplasti, osiküloplastik operasyonlarında, yara iyileşmesini artırarak, osiküler zincir stabilizasyonunun sağlanması, orta ve dış kulakta postoperatif greft desteği sağlanması, iç kulak invaziv girişimlerinde travmayı minimuma indirmesi amacıyla kullanılmıştır^{11,30,74,78}. Son yıllarda ise hyaluronik asit derivelerinin çapraz bağlı yeni kimyasal formülleri yara iyileşmesi, sineşi azaltması ve rejenerasyonu artırma etkilerinden faydalanmak üzere endoskopik sinüs cerrahileri, genel cerrahi ve obstetrik cerrahilerde de kullanılmaya başlanmıştır^{33,79-81}.

Tedavi ve toksisite modellerinde çeşitli ajanlarla kombinasyonları kullanılarak; ilaç etki süresi ve verimliliği artırılmaya çalışılmıştır. Gentamisin ve kortikosteroid kombine edildikleri ajanların başında gelmektedirler.

Rejenerasyona katkısı ve enflamasyonu baskılaması nedeniyle farklı ilaçların toksik etkilerini nötralize ettiği gösterilmiş olsa da, in vitro uzamış ilaç salınımı çalışmalarında ilaçların hedefteki toksik etkisini artırabileceğinden de bahsedilmiştir. Kombine edildiği ajanın hedef bölgeye ulaştırılması, depo görevi ile ilacın uygulanan alandaki stabilizasyonunu artırması bu çalışmaların temelini oluşturmuştur. Farmakolojik incelemelerin gelişmesiyle lineer ve değişik açılarda çapraz bağlı formları üretilen, katı, sıvı ve yarı katı lipozomal jel formları bulunan hyaluronik asit molekülü kullanım şekline göre farklı etkiler gösterebilmektedir ^{11,41,64,72,76,77,82-85}, (Şekil 4).



Şekil 4:Çapraz bağlanma modeli

Jiri Mrazek, Photo-crosslinked hyaluronic acid coated upconverting nanoparticles, Journal of Nanoparticle Research 19(2):44

4.2.3. Ototoksisitenin Monitörizasyonu

4.2.3.1. Otoakustik Emisyon (OAE)

Otoakustik emisyonlar koklear dış tüylü hücrelerin oluşturduğu titreşimlerden kaynaklanan ses dalgalarının dış kulak yoluna konulan problarla ölçülmesi esasına dayanmaktadır. 1948 yılında ilk olarak Gold tarafından ortaya atılmıştır. Gerçek anlamda ölçümü ise ilk kez Kemp tarafından 1978 yılında tamamlanmıştır. Ölçüm metodunda dış kulak yoluna, timpanik membrana veya promontoryuma yerleştirilen probda bulunan mikrofon vasıtasıyla alınan ses dalgaları monitöre yansıtılır. Emisyonların ölçülebilmesi için dış ve orta kulakta akustik uyarının işitilmesini

engelleyecek patoloji bulunmamalıdır. Olası bir enfeksiyon, efüzyon, kulak zarı perforasyonu veya sklerozu, dış kulak yolu serumeni ölçüm metouduna göre emisyon alınmasını güçleştirebilmektedir. Otoakustik emisyonların oluşumunu dış tüylü hücrelerin hareketlerinin sağladığı, bu sebeple iç tüylü hücre hasarının emisyonu etkisinin çok az olduğu gösterilmiştir ⁸⁶.

Otoakustik emisyonlar spontan ve uyarılmış olarak iki tipe ayrılmaktadır.

Spontan Otoakustik emisyonlar

Ses uyararı olmaksızın mikrofon ile kaydedilen akustik enerjidir. Toplumun yarısında bulunurlar ve yaşla azalma eğilimindedirler. Genellikle 1-3 kHz aralığında alınmaktadır ve 30 dB'den daha kötü işitme eşiği olan hastalarda alınamazlar. Çeşitli hastalıklarda, ileri yaşlı hastalarda, kokleotoksik ilaç öyküsü olan hastalarda emisyonların alınamaması kokleotoksisite açısından uyarıcı olmalıdır.

Uyarılmış Otoakustik emisyonlar

i. Transient Otoakustik Emisyonlar (TEOAE): Kemp'in tanımladığı bu emisyonlar klik veya tone burst uyarılara karşı alınan yanıtlardır. Klik uyararı geniş aralıkta iken tone-burst uyarısı sonrası frekansa özgü cevaplar ölçülmektedir. Spontan otoakustik emisyonlarda olduğu gibi 30 dB'den daha yüksek işitme eşiklerinde alınmayabilir. Farklı olarak 700 ila 4000 Hz frekansında alınmaktadır.

ii. Stimulus Frekans Otoakustik Emisyonlar (SFOAE): Düşük şiddetteki ve belirli bir tondaki uyarıya karşılık alınan frekans spesifik yanıtlardır.

iii. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyonlar (DPOAE): İki farklı saf ses ile uyarılan kokleadaki dış tüylü hücrelerin koklear mikrofoniği olarak ölçülmektedir. Verilen sesler simültane kullanılır ve $f_1 - f_2$ olarak adlandırılır. Emisyon ölçüm formülü $2f_1 - f_2$, $3f_1 - f_2$ şeklindedir ve verilen en iyi koklea cevabı 1.22 olarak ölçülmüştür. Bir çok ülkede yeni doğan işitme taramasında da kullanılan DPOAE daha çok 6000 Hz üzerindeki yüksek frekanslara özgü olduğundan ototoksisite monitörizasyonunda diğer emisyon ölçümlerine göre daha güvenilirdir ^{47,86,87}.

4.2.3.2. İşitsel Beyin Sapı Cevapları (ABR)

İşitme uyarınının koklear sinir başlangıcından beyin sapının en üst bölümüne kadar olan kısımda yarattığı elektrik akımının ölçümü esasına dayanmaktadır. Uyarının başlamasının ardından 2-10 msn'lik periyoddan sonra 7 adet dalga morfolojisi izlenmektedir.

Dalgaların ölçüm noktaları anatomik olarak;

I. Dalga	Sekizinci sinir distali
II. Dalga	Sekizinci sinir proksimali
III. Dalga	Koklear nukleus
IV. Dalga	Süperior olivary kompleks
V. Dalga	Lateral lemnisküs
VI - VII. Dalga	Inferior kollikulus kaynaklıdır.

İnsanlarda dalgalardan en belirgin olanları V., III. ve I. dalgalardır. Uyarılar klik, tonal ve frekansa özgü gecikmeyi önleyen chirp uyarılar olarak 3'e ayrılmaktadır. Değişken polaritelerde kullanılabilen klik uyarılar 2 - 4 kHz frekans aralığını ölçmektedir. Dar frekans bant özelliğindeki tonal uyarılar ise frekansa özgü yanıtlar için kullanılmaktadır ⁸⁶.

4.2.4. Sıçanlarda Odyovestibüler İnceleme

Sıçanlarda işitsel fonksiyonların değişken etmenlere maruziyet sonrası ölçülmesine ilk olarak Jewet tarafından 1970'de başlanmıştır. Üretimi ve bakımının kolay olması, anatomik ve fizyolojik açısından insanlarla olan benzerlikleri, yüksek frekanslara olan hassasiyetleri sıçanların günümüz deney modellerinde de kullanımını artırmıştır^{6,19,26,88}.

Sıçanlarda yapılan odyolojik incelemeler objektif otoakustik emisyonlar ve işitsel beyin sapı cevaplarından oluşmaktadır. Vestibüler fonksiyonu ölçmek

nispeten daha zor olsa da son yıllarda fare, sıçan ve kobaylara uygulanabilen davranışsal testler ön plana çıkmaktadır^{5,38,89-91}.

Otoakustik emisyonlar dış kulak yoluna yerleştirilen bir prob vasıtasıyla sessiz bir ortamda sedasyon altındaki bir sıçandan rahatça alınabilir. İlk değerlendirmesinde emisyon alınamayan sıçanlar işitme kayıplı kabul edilip çalışma dışında bırakılmaktadır. Test öncesi dönemde deney hayvanlarının vücut ısılarının korunması, testleri etkilemeyecek anestezi madde seçimi, dış kulak yolu ve timpanik membranın otomikroskopi altında değerlendirilmesi önem arzeder⁹².

Bir diğer objektif test işitsel uyarılmış beyin sapı (IUBP=ABR) cevaplarıdır. Sedasyon altındaki sıçanın, kulak ve vertekse yerleştirilen elektrotlar vasıtasıyla santral işitme yolağını değerlendirmek mümkündür². İnsanda yapılan ABR'den farklı olarak sıçan işitsel beyin sapı potansiyellerinde en belirgin olan II. dalga morfolojisidir ve eşik belirlemede kullanılmaktadır.

Sıçan vestibüler fonksiyonlarını ölçmek için birçok davranışsal test modeli tanımlanmıştır. Literatürde en sık kullanılanlar kuyruktan asma (tail hanging), havada düzelme (air righting) ve yüzme (swimming) testleridir. Bu testler başlangıçta nöromusküler gelişim değerlendirilmesi amacıyla kullanılmış olsa da, toksik ajana maruz kalan deney hayvanının hareket ve yönelme davranışları analiz edilerek vestibüler etkilenme düzeyi hakkında da oldukça iyi fikir sahibi olunabilmektedir^{5,89,91,93,94}.

Llorens tarafından uygulanan ve sonradan birçok modifikasyonu geliştirilen davranışsal test bataryasında sıçan veya farelere serbest alan incelemesi, kuyruk asma, havada düzelme ve yüzme testleri yaptırılmıştır^{88-89, 95-97}.

Martin-Lorens sıçanlarla nitril türevlerinin vestibülotoksitesini incelediği çalışmada kuyruk asma testinde tek taraflı kasılma, dönme ve kafa çevirme hareketlerini etkilenme derecesine göre 0-4 puan arasında yorumlamış; R. Cassel ise farelerde tek taraflı vestibüler hasarı araştırdığı deneylerde etkilenmeyi davranışsal testlerle 0-3 puan arasında derecelendirmiştir. Etkilenme düzeyi Martin-Lorens'in çalışmasında vestibüler etkilenme skoru (VDRs: vestibular dysfunction ratings)

olarak belirtilmiştir. Tian ve arkadaşları da sıçanlardaki gentamisin ototoksitesine kırmızı ginsengin etkisinin araştırıldığı çalışmada sıçanların kuyruk asma ve yüzme testlerini yine 0-3 arasında puanlamıştır. Cassel aynı zamanda hayvanların yüzme kalitesi, sudan çıkış anında kurulanma yetisi (grooming) ve sudaki dengesini de 0-3 puan arasında derecelendirmiş ve tek taraflı vestibüler etkilenmenin klinik yansımasını sayısal verilerle monitörize etmiştir^{5,38,94}.

4.2.5. Sıçanlarda Histolojik İnceleme

Sıçanların disseksiyonları sırasında çıkarılan temporal bullaları formaldehit solüsyonunda fikse edildikten sonra dekalsifikasyon sürecine sokulmaktadır. Dekalsifikasyon sonrası kesitleri alınan koklear ve vestibüler alanlar hemotoksilen-eozin boyasıyla mikroskopi altında incelenmektedir. Hemotoksilen-eozin boyasıyla hücrede mikroskopik düzeydeki morfolojik durum göz önüne serilmektedir. Aynı spesimende saptanan morfoloji toksisite düzeyini gösterebileceği gibi dekalsifikasyon travmalarını ve kesit alım problemlerini de benzer şekilde gösterebilmektedir. Bu nedenle toksisite ayırıcı tanısı için apoptozisi saptamak amacıyla TUNEL ve kaspaz-3 tetkikleri kullanılmaktadır^{19,98-100}.

Işık mikroskopi altında tüylü hücre kaybı, kokleovestibüler alanlardaki apoptozis, piknozis ve vakuolizasyon şiddeti ölçülmektedir. Elde edilen veriler, koklear ve vestibüler alanlar için ayrı olmak koşuluyla, daha önce tanımlanan histopatolojik hasar derecelendirmesi ile 0 – 3 puan arasında skorlanmaktadır¹⁰¹.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Araştırma Tipi

Bu araştırma deneysel olarak planlanmış olup, 200-250 gram arasındaki normal işitme ve denge fonksiyonlarına sahip dişi wistar albino sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Her biri 7 sağlıklı sıçandan oluşan 4 ayrı grup oluşturulmuş, sıçanların odyovestibüler ve histopatolojik incelemesi, uygulanan tedaviden haberi olmayan uzman kişilerce değerlendirilip skorlanmıştır.

5.2. Araştırma Yeri ve Zamanı

Öncelikle Ekim - Kasım 2018 tarihinde literatür araştırması yapıldı. Yöntem ve girişimsel işlemlerin uygulama sıralamasının belirlenmesinin ardından Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarında, Kasım 2018 – Şubat 2019 tarihleri arasında pilot çalışma uygulandı. Pilot çalışma tamamlandıktan sonra 28 adet hayvan ile Mart - Nisan 2019 tarihinde deneysel çalışma yapıldı. Sakrifikasyon sonrası diseksiyonlarda elde edilen materyallerin incelemesi Mayıs-Ekim 2019 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında tamamlandı.

5.3. Çalışma Grupları

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Multidisiplin Laboratuvarında randomize olarak seçilen outbred dişi wistar albino sıçanlar ile gerçekleştirildi. Görülebilir bir dış kulak yolu, kulak zarı olan, orta kulak patolojisi olmadığı doğrulanan, tarama DPOAE testlerinde yanıt olduğu gözlenen sıçanlar çalışmaya dahil edildi.

Uygulama ve enjeksiyon dozlarının, test ortamının ve sürelerinin standardizasyonunu sağlamak amacıyla deneysel inceleme öncesi dönemde 4 adet 200 - 250 gr ağırlığındaki sıçan ile pilot çalışma gerçekleştirildi. Pilot çalışmanın tamamlanmasının ardından deneysel inceleme aşamasına geçildi.

Yirmisekiz sıçan kontrol grubu ile birlikte toplam 4 ayrı gruba ayrıldı. Dört grubun enjeksiyonları, multidoz olarak 7 gün süreyle her gün, toplamda 7 doz olarak yapıldı. Ajanlar sadece sağ tarafa, dış kulak yoluna uygun boyda spekulum yerleştirildikten sonra, 20 gauge iğne ve operasyon mikroskobu altında intratimpanik olarak ve kavite doldurulacak şekilde (0.06 ml) enjekte edildi.

Hayvanlara vestibüler değerlendirme testleri yapıldıktan sonra otomikroskopik muayene, sonrasında OAE ve IUBP test incelemeleri yapıldı. Bu işlemler çalışma öncesi bazal değerlendirme olarak, ilaç uygulamaları sonrası ise 24. saat, 7. gün ve 10. gün (sakrifikasyon öncesi) uygulandı. Girişimsel işlemler ve odyovestibüler değerlendirilmelerden önce sıçanların anestezileri; ketamin hidroklorid (50 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulanarak sağlandı. Her enjeksiyondan sonra sıçanlar, anestezinin etkisi tamamen geçene kadar gözlem altında tutuldu ve ilaç uygulanan kulak üstte kalacak şekilde yan yatırılarak kafesine bırakıldı. Her bir gruba sırasıyla gentamisin (grup A), hyaluronik asit (grup B), hyaluronik asit ve gentamisin kombinasyonu (grup C), serum fizyolojik (grup D) intratimpanik olarak uygulandı.

A grubundaki sıçanlara 13.33 mg/ml konsantrasyonundaki 0.06 ml gentamisin, B grubundaki sıçanlara 0.06 ml hacminde çapraz bağlı hyaluronik asit otojel, C grubundaki sıçanlara ise 26.66 mg/ml konsantrasyonundaki 0.03 ml gentamisin + 0.03 ml çapraz bağlı hyaluronik asit jel karışımı, D grubundaki sıçanlara ise 0.06 ml izotonik serum fizyolojik intratimpanik olarak 7 gün süreyle uygulandı. Yedi günlük multidoz uygulama sonrası, 3 gün ilaç verilmeksizin izlenen sıçanlar 10. gün son davranış testleri ve odyolojik incelemeleri uygulanıp sakrifiye edildi.

Gentamisin grubundaki hayvanlara yapılmak üzere mililitresinde 40 mg gentamisin bulunan (Genta, Ulagar ilaç sanayi Türk AŞ, İstanbul, Türkiye) 1 ml gentamisin solüsyonu 2 ve 0.5 ml bikarbonat ile karıştırıldı ve mililitrede sırasıyla 13.33 ve 26.66 mg'lık gentamisin bulunan konsantrasyonlara ulaşıldı. Sonrasında bu solüsyonlardan 0.79 mg gentamisin etken dozu oluşturacak şekilde, A ve C gruplarına sırasıyla 0.06 ve 0.03 ml intratimpanik olarak verildi.

Deneyleerde kullanılmak üzere çapraz bağlı hyaluronik asit molekulünün yarı katı, jel formu (PureRegen Gel Otol 2 ml, Bioregen Biomedical, Changzhou Co. Ltd.) kullanıldı. B ve C grubunda çapraz bağlı hyaluronik jel formu 20 gauge iğne ile sırasıyla 0.06 ve 0.03 ml içeren miktarlar ile tatbik edildi (Tablo 1). C grubunda gentamisin ve hyaluronik asit kombinasyonu aynı enjektörde, eė zamanlı olarak timpanik kaviteye enjekte edildi.

Tüm sıçanlar 0, 1, 7 ve 10. günlerde odyolojik ve vestibüler incelemeye tabi tutulduktan sonra 10. gün intrakardiyak ketamin hidroklorid ve ksilazin hidroklorid kombinasyonu uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası sıçanların temporal kemik diseksiyonları tamamlandı ve spesmenler doku hasarı ve hücre morfolojisi açısından ığık mikroskopik grğ altında incelendi.

Tablo 1:alığma Grupları

A grubu Genta (n:7)	İntratimpanik Gentamisin (0,79mg, 0,06ml) uygulanan sıçan (wistar rat) grubu
B grubu HA (n:7)	İntratimpanik apraz Bağlı Hyaluronik asit (0,06ml) uygulanan sıçan (wistar rat) grubu
C grubu Genta + HA (n:7)	İntratimpanik Gentamisin (0,79mg, 0,03ml) + apraz Bağlı Hyaluronik asit (0,03 ml) uygulanan sıçan (wistar rat) grubu
D grubu Kontrol SF (n: 7)	İntratimpanik Serum fizyolojik (0,06ml) uygulanan sıçan (wistar rat) kontrol grubu

5.3.1. Gruplara Yapılan İğlemlerin Tanımı

Genta (n:7): İntratimpanik Gentamisin uygulanan sıçan grubu

alığmanın 0. günü: İğitme ve denge fonksiyonlarının bazal değerlendirmesi yapıldı.

alığmanın 1 - 7. günü: İntratimpanik enjeksiyon ile 0.06 ml, 0.79 mg gentamisin (13.3 mg /ml) eė hacimde verildi.

İlk enjeksiyon sonrası 24. saatte işitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi.

Çalışmanın 7. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi

Çalışmanın 10. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi. Sakrifikasyon sonrası vestibül ve koklea çıkarılıp değerlendirildi.

HA (n:7) İntratimpanik Hyaluronik asit otojel uygulanan sıçan grubu

Çalışmanın 0. günü: İşitme ve denge fonksiyonlarının bazal değerlendirmesi yapıldı.

Çalışmanın 1-7. günü: İntratimpanik 0,06 ml hyaluronik asit eş hacimde verildi.

İlk enjeksiyon sonrası 24. saat işitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi.

Çalışmanın 7.günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi.

Çalışmanın 10. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi. Sakrifikasyon sonrası vestibül ve koklea çıkarılıp değerlendirildi.

Genta-HA (n:7): İntratimpanik Gentamisin + Hyaluronik asit Otojel uygulanan sıçan grubu

Çalışmanın 0. günü: İşitme ve denge fonksiyonlarının bazal değerlendirmesi yapıldı.

Çalışmanın 1 - 7. günü: İntratimpanik 0.03 ml hyaluronik asit otojel + 0.03 ml, 0.79 mg gentamisin (26.6 mg /ml) eş hacimde verildi.

İlk enjeksiyon sonrası 24. saatte işitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi.

Çalışmanın 7. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi.

Çalışmanın 10. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi. Sakrifikasyon sonrası vestibül ve koklea çıkarılıp değerlendirildi.

Kontrol SF (n: 7): İntratimpanik İzotonik Serum fizyolojik uygulanan sıçan kontrol grubu

Çalışmanın 0. günü: İşitme ve denge fonksiyonlarının bazal değerlendirmesi yapıldı.

Çalışmanın 1 - 7. günü: 0.06 ml intratimpanik serum fizyolojik eş hacimde verildi

İlk enjeksiyon sonrası 24. saatte işitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi.

Çalışmanın 7. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi,

Çalışmanın 10. günü: İşitme ve denge fonksiyonları değerlendirildi. Sakrifikasyon sonrası vestibül ve koklea çıkarılıp değerlendirildi.

Tablo 2:Deney zaman çizelgesi

	Gentamisin (Grup A)	HA (Grup B)	Gentamisin+HA (Grup C)	Kontrol SF (Grup D)
Çalışma 0.Gün (Bazal Ölçümler)	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -DPOAE, ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -DPOAE, ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -DPOAE, ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -DPOAE, ABR
Çalışma 1-7. gün	-Anestezi -İntratimpanik Gentamisin Uygulaması	-Anestezi -İntratimpanik Hyaluronik Asit Uygulaması	-Anestezi -İntratimpanik Gentamisin+ HyaluronikAsit Uygulaması	-Anestezi -İntratimpanik SF Uygulaması
Çalışma 24.Saat	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR
Çalışma 7. gün	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR
Çalışma 7-10. gün	- İzlem	- İzlem	- İzlem	- İzlem
Çalışma 10. gün	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR -Sakrifikasyon -Histolojik İnceleme	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR -Sakrifikasyon -Histolojik İnceleme	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR -Sakrifikasyon -Histolojik İnceleme	-Vestibüler İnceleme -Anestezi -ABR -Sakrifikasyon -Histolojik İnceleme

5.3.2. Odyolojik Değerlendirme yöntemleri

Enjeksiyonlar öncesinde bazal odyolojik incelemeler (ABR ve DPOAE) uygulandı. Ardından enjeksiyon sonrası 24. saat, 7. gün ve 10. günlerde her bir sıçanın işitsel ve vestibüler fonksiyonları değerlendirildi. Vestibüler incelemelerde son test yüzme testi olarak belirlendi. Test sonrası hipotermiden kaçınmak için hayvanlar kurutularak odyolojik incelemeler öncesi anestezi uygulandı. Anestezi için ketamin hidroklorid (50 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı.

Her bir sıçan; bazal test günü, 24. saat, 7. gün ve 10.günler işitsel uyarılmış beyin sapı yanıtları (IUBP=ABR), kuyruk asma testi (tail hanging), havada düzelme testi (air righting reflex) ve yüzme testine (swimming test) tabi tutuldu.

Bu testlerde bazal değerlendirmede normal vestibulokoklear fonksiyona sahip hayvanlar çalışmaya dahil edildi. DPOAE ve ABR testi sessiz odalarda uygulandı. Otoakustik emisyonlar Otodynamics ILO 88 Echoport V6 yazılım programlı versiyonu kullanılarak test edildi. Test stimulusu olarak birbirlerine oranı 1.2 olan iki farklı saf ses 65 ve 55 dB SPL seviyesinde verildi ve 1.5, 2, 4, 6 ve 8 kHz frekans aralığında DPOAE kaydı yapıldı. DPOAE testi koklea cevabı ortam gürültüsünden yüksek, sinyal gürültü oranı 3 dB SPL'den yüksek ve uyarıcı stabilite oranı %65 ve üzeri olacak şekilde kabul edildi.

ABR test kayıtları iki kanallı Smart EP Diagnostic Systems (Intelligent Hearing System, ABD) ile yapıldı. Kayıt elektrodu olarak, platin - iridium iğne elektrod kullanıldı. Her bir sıçan için toplam üç elektrod negatif ipsilateral kulak kepçesi altına, pozitif vertekse, toprak elektrod ise sıçanın sırtına subdermal olarak yerleştirildi. Her iki kulağa da ayrı ayrı standart klik ve 4, 8,16, 20 ve 32 kHz frekanslarında alterne polaritede tone burst uyarılar verilerek, ABR eşik değerleri kaydedildi. Analiz süresi 15 ms, kayıtlama filtresi ise 100-3000 Hz aralığında ve 9,7 uyarı/s sıklığında tutuldu. Uyarı şiddeti 85-0 dB nHL arasında 10 dB nHL basamaklarla azaltıldı, tekrarlanabilir II. dalga'nın gözlemlendiği en düşük uyarı seviyesi eşik değeri olarak kabul edildi. İlaç kullanımdan önce minimum eşik

değer 15 dBnHL olacak şekilde normal işitmesi saptanan sıçanlar çalışmaya dahil edildi.

5.3.3. Vestibüler Fonksiyonların Değerlendirilmesi

Hayvanların vestibüler fonksiyonları daha önce L.Lorens'in tanımladığı kuyruktan asma, yüzme ve havada düzelme testleri ile ölçüldü^{89,102}. Her vestibüler inceleme arasında sıçanlar 10 dakika kafeslerinde tutuldu ve yüzme testi sonrasında ise 30 dakika sıcak ışık kaynağının altında kurutuldu. Yüzme testinde içme suyu kullanıldı ve hipotermiden korunmak amacıyla daha önce ısıtıldı. Davranış testleri körleştirilmiş araştırmacılar tarafından objektif şekilde puanlanabilmesi amacıyla tripod kullanılan kamera ile kaydedildi. Boadas'ın 2005 yılında tanımladığı ve daha sonrasında 2013'de Dyhrfeld, 2016'da Gaboyard'ın, 2019'da Martin-Lorens'in kullandığı derecelendirme metodu, 2018 yılında R.Cassel'in kullandığı modifiye şekliyle uygulandı^{38,88,89,94,97,103} (Tablo 3).

Kuyruktan asma testi: 50 cm yüksekliğindeki masadan sarkıtılacak şekilde plastik flasterler ile kuyruklarından 2 dakika süresince tutturulan sıçanların tek taraflı kasılma ve kalça ekseninde dönme hareketleri derecelendirildi.

Havada düzelme testi: 30 cm yükseklikte 2 dakika süresince sırt üstü tutulan sıçanlar yumuşak tekstil ve köpük zemin üzerine bırakılarak doğrulma becerileri ölçüldü.

Yüzme testi: Silindirik şeklinde, yüksekliği 50 cm, çapı 30 cm olan 3 eş havuzda vücut sıcaklığında, içme suyuna atılan sıçanların 2 dakika süresince yüzme kalitesinde bozulma, kuyruk ekseninde dönme derecesi ve sudan çıktıktan sonra kurulanma becerisindeki etkilenme puanlandı.

Tablo 3: Vestibüler Hasar Skorlaması

VDRs (Vestibüler hasar skorlaması)	Etki Tanımı
0 puan	Etkilenme yok
1 puan	Etkilenme şüphesi mevcut
2 puan	Net etkilenme belirtisi mevcut
3 puan	Ağır derecede etkilenme

Etkilenme puanları toplanarak sıçanların 1, 7 ve 10. gün etkilenme düzeyleri ve kullanılan ajanlara göre gruplar arasındaki istatistiksel farkları ölçüldü.

5.3.4. Sakrifikasyon ve Histopatolojik Değerlendirme

Bir ve 7. günler arası enjeksiyon uygulanan sıçanlar çalışmanın 10. gününde işitme ve denge değerlendirmeleri son kez yapıldıktan sonra intrakardiyak ketamin ve ksilazin uygulanarak sakrifiye edildi ve temporal bullaları histopatolojik inceleme için çıkarıldı. Diseksiyonlar standart olarak tek cerrahi set ile son odyovestibüler incelemeden hemen sonra otomikroskopi altında yapıldı. Her bir sıçanın temporal bullası çıkarıldıktan sonra çevre kas ve kemik fragmanlarından diseke edilerek formaldehite konuldu ve 24. saatte fiksatifleri yenilendikten sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na inceleme için teslim edildi.

Deney sonunda elde edilen dokuların histolojik incelemelerinde iç kulakta baziller membran spiral ganglion, koklear sinir, stria vaskülaris, spiral limbus, dış ve iç tüylü hücreler, spiral ligament, utrikul ve sakkul makulası dejenerasyon açısından değerlendirildi. Histomorfolojik değerlendirme hematoksilen eozin boyaması, TUNEL, aktive kaspaz-3 ile yapıldı, vakuolizasyon, piknozis ve hücrel dejenerasyon değerlendirildi.

TUNEL; apoptozise uğrayan hücreleri tespit etmek için yapılan bir yöntemdir. Bu test ile apoptozisin ileri evrelerinde belirleyici olarak rol alan apoptotik

hücrelerdeki nükleer kromatin fragmentasyonu saptanmaktadır. TUNEL testi metod olarak DNA kırıklarının sonuna polimeraz terminal deoksinükleotidil transferaz eklenerek işaretlenmesi prensibine dayanan bir testtir. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını, serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır. Bu yöntem yaygın olarak "TdT-dUTP nick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılması olan "TUNEL" yöntemi adıyla anılmaktadır.

Kaspaz-3 yöntemi ise sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3'ün immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenmesidir. Aktive kaspaz-3 ün pozitif olması hücrenin geri dönüşsüz apoptoz yolağına girdiğinin göstergesi olarak kabul edilir.

5.4. Araştırma Materyali

Ortalama ağırlıkları 200-250 g olan, 32 adet dişi sıçan (wistar albino rat) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (DEÜTFDHAD) sağlandı. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında ve oniki saatlik aydınlık ve oniki saatlik karanlık alanda tutuldu; palet sıçan yemi ve suyu ile beslendi. Hayvanlar testlerin uygulanacağı laboratuvara en az 30 dakika önce konularak ortam değişimin yaratabileceği stres minimuma indirilmeye çalışıldı. Deney sırasında intratimpanik enjeksiyonlar için otomikroskop (Zeiss, Germany), yüzme testi içinse 3 adet 50 cm yüksekliğinde 30cm çapında silindir su tankları kullanıldı.

5.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımlı değişkeni: İşitme kaybı, Vestibüler Etkilenme, Histolojik etkilene

Araştırmanın bağımsız değişkeni: Gentamisin, Hyaluronik asit, Süre

Araştırmanın kontrollü değişkeni: Cinsiyet, Ağırlık

5.6. Veri Toplama Araçları

Aminoglikozidlerin toksisitesi ve koruyucu ajanların etkileri daha önce sıkça araştırılmıştır. Toksisite modellerinin olduğu çalışmalarda insanla benzerliklerinden dolayı kobay ve sıçanlar kullanılmıştır. Yapılan deneylerde ajan uygulamaları sonrası etkilenmeler odyovestibüler testlerle incelenmiştir. Kokleovestibüler fonksiyon bozuklukları bu deneysel incelemeler sırasında birinci günden itibaren monitörize edilmeye başlanmıştır.

Hayvanların vestibüler skorları davranışsal testlerle ölçülürken, işitsel fonksiyonlarını değerlendirmek için OAE ve IUBP kullanılmıştır. Biz de çalışmamızda sıçanların vestibüler fonksiyonlarını 1., 7. ve 10. gün havada düzeme, yüzme ve kuyruktan asma testleriyle hesapladık. Testler yapılırken vestibüler değerlendirme sonrasında yapılan işitsel incelemeler öncesinde anestezi uygulandı ve 7 günlük multidoz uygulama sonrası 10. gün sıçanlar sakrifiye edilerek temporal bullaları histolojik inceleme amacıyla çıkarıldı.

5.6.1. Aminoglikozid Toksisitesinin Oluşturulması

Gentamisin grubundaki hayvanlara yapılmak üzere mililitresinde 40 mg gentamisin bulunan 1 ml gentamisin solüsyonu (Genta, Ulagar ilaç sanayi Türk AŞ, İstanbul, Türkiye) sırasıyla 2 ve 0.5 ml bikarbonat ile karıştırıldı ve mililitrede 13.33 ve 26.66 mg'lık gentamisin konsantrasyonlarına ulaşıldı. Sonrasında bu solüsyonlardan 0.79 mg gentamisin oluşturacak şekilde sırasıyla 0.06 ve 0.03 ml lik miktar intratimpanik olarak verildi. Uygulama 1 - 7. günler ardışık olarak tekrarlandı.

5.6.2. Anestezi Yöntemi

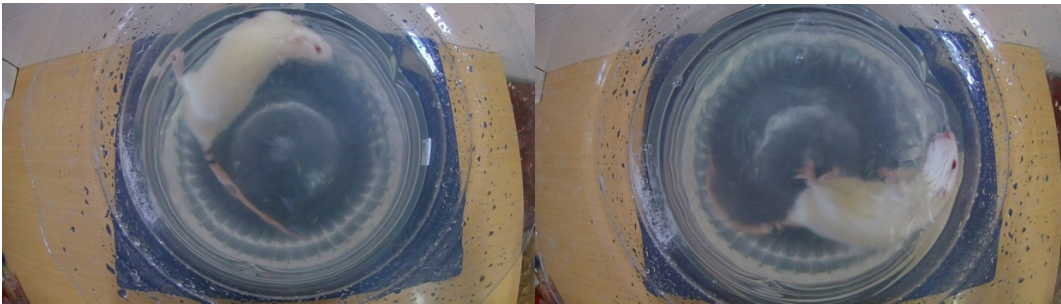
Girişimsel işlemler ve işitme fonksiyonları değerlendirilmeden önce sıçanların anestezileri ketamin hidroklorid (50 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulanarak sağlandı. Her enjeksiyondan sonra sıçanlar, anestezinin etkisi tamamen geçene kadar gözlem altında tutuldu ve kafesine bırakıldı. Her sıçanın otomikroskopik muayenesi günlük olarak yapıldı ve ilaç uygulama sonrası sıçanlar sağlam kulaklarının üzerine lateral dekübit pozisyonda yatırıldı.

Tüm sıçanlar 10. günde incelemeleri sonrasında intrakardiyak ketamin hidroklorid (50 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5 mg/kg) kombinasyonu uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası sıçanların temporal kemik diseksiyonları tamamlandı ve spesmenler ışık mikroskopik bakıda incelendi.

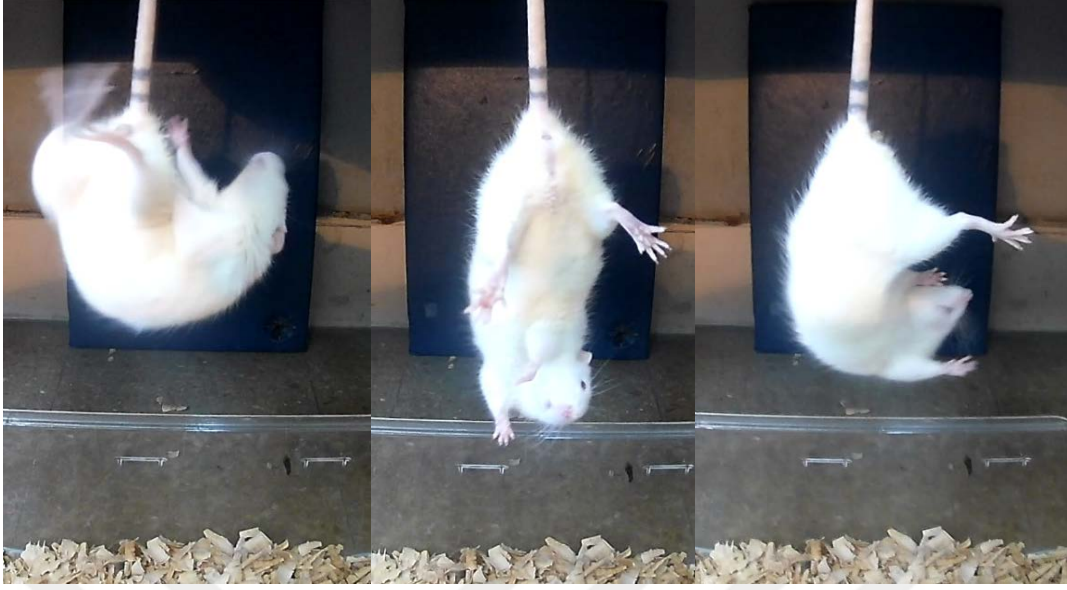
5.6.3. Vestibüler ve Odyolojik İnceleme

Deney sırasında bazal değerlendirme, 24. saat, 7. gün ve 10. gün denge ve işitme testleri uygulandı.

Vestibülopati; iç kulaktaki periferik denge merkezini oluşturan utrikul, sakkul ve yarım daire kanallarında oluşan hasar sonrası gelişen denge problemidir. Vestibülotoksik girişimler ve ilaç uygulamalarındaki ideal dozaj ve kullanım şeklini saptayabilmek amacıyla birçok vestibulopati modeli oluşturulmuştur. Hayvan modellerinde vestibulopatiji derecelendirmek adına çeşitli tarifler yapılmış olsa da bunlar arasında en kullanışlı olanı L.Lorens'in tanımladığı davranışsal test bataryası olmuştur. Yapılan araştırmalarda derecelendirme metodları da modifiye edilmiş ve etkilenme düzeyleri matematiksel olarak formüle edilmiştir. Biz de çalışmamızda vestibülün etkilenme derecesi monitörize etmek için Cassel'in fare modeli üzerindeki skorlamasını kullandık^{89,94}.



Resim 1:Swimming (Yüzme) Testi



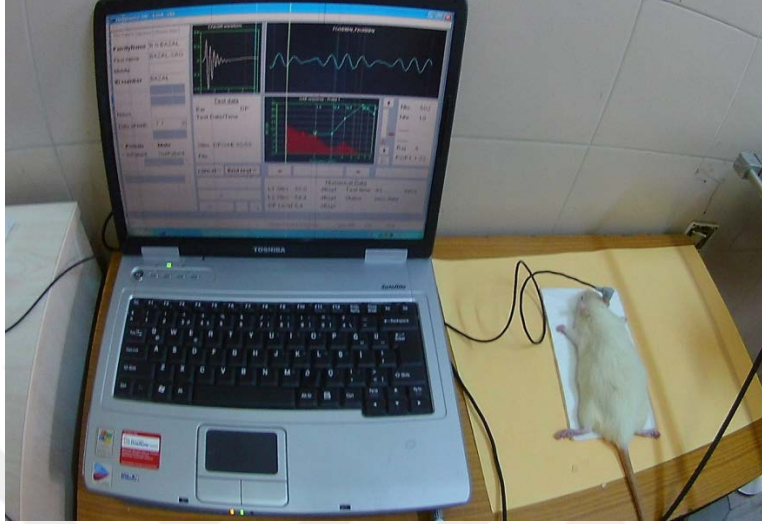
Resim 2: Tail Hanging (Kuyruk asma) Testi

İncelemede Llorens'in tanımladığı yöntemler olan Tail-hanging (kuyruktan asma), Swimming (yüzme) ve air-righting (havada düzelme) testleri uygulandı. Testlerin değerlendirilmesi, ilaç uygulamalarından habersiz olan körleştirilmiş araştırmacılar tarafından 0 - 3 arasında puan verilerek değerlendirildi.



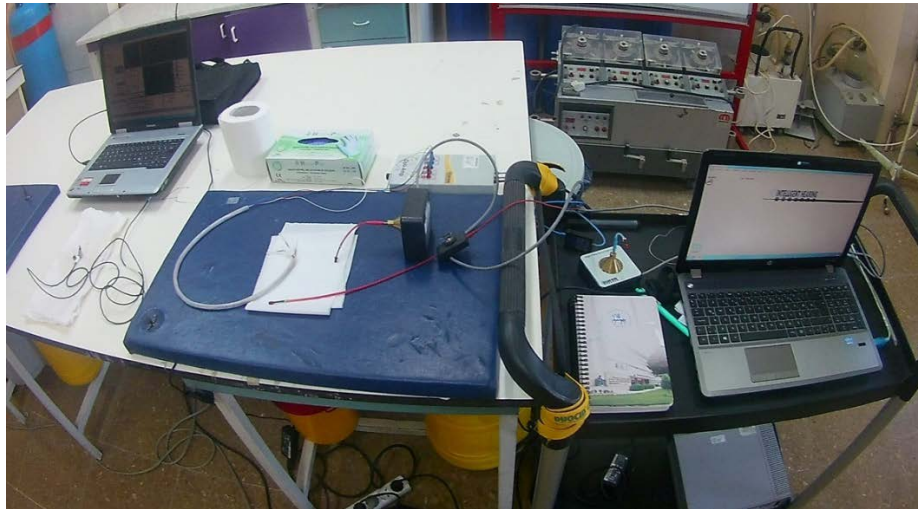
Resim 3: Air Righting (Havada düzelme) Testi

DPOAE testleri için “Otodynamics ILO-V6 Cochlear Emission Analyzer 5.61” (Otodynamics, London) programı kullanıldı; 2 f1 - f2 ölçümü yapıldı ve tetkikte 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 ve 8000 Hz frekans ölçümleri kaydedildi.

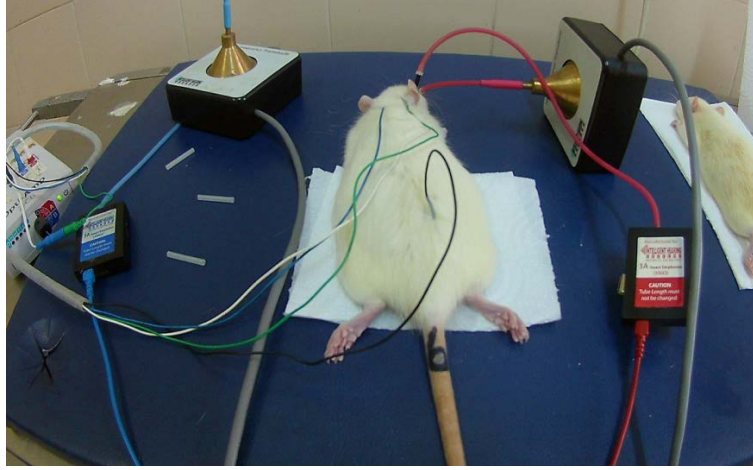


Resim 4: Sıçan OAE Ölçümü - Serum Fizyolojik Grubu

ABR ölçümleri için Intelligent Hearing Systems (IHS, Miami, FL) cihazı Smart-EP 10 kullanıldı; 4, 8, 16, 20 ve 32 kHz’de, saniyede 37.1 kez, alterne polariteli ton burst uyaran kullanıldı. Frekans bazındaki işitme eşikleri II. dalga eşiği saptanarak belirlendi.



Resim 5: Sıçan Otoakustik Emisyon ve IUBP Ölçüm Ünitesi



Resim 6: Sıçan IUBP Ölçümü ve Elektrot Düzenek- Gentamisin Grubu

5.6.4. Ajan Uygulaması

Literatürde yara iyileşmesini hızlandırması, sineşiyi azaltması ve postoperatif dönemde dış kulakta mekanik destek görevi araştırılmış olan, aynı zamanda in vitro çalışmalarda ilaç akışkanlığı ve iletimini artırdığı gösterilen çapraz bağlı hyaluronik asit derivelerinin gentamisin otoksisitesi üzerine olan olası pozitif veya negatif etkilerinin incelenmesi hedeflendi^{76,80,100}.

A grubundaki sıçanlara 13.33 mg/ml konsantrasyonundaki 0.06 ml gentamisin (Genta, Ulagar ilaç sanayi Türk AŞ, İstanbul, Türkiye), B grubundaki sıçanlara 0.06 ml hacminde çapraz bağlı hyaluronik asit otojel (PureRegen Gel Otol 2 ml, Bioregen Biomedical, Changzhou Co. Ltd.), C grubundaki sıçanlara ise 26.66 mg/ml konsantrasyonundaki 0.03 ml gentamisin + 0.03 ml çapraz bağlı hyaluronik asit jel karışımı, D grubundaki sıçanlara ise 0.06 ml izotonik serum fizyolojik intratimpanik olarak 7 gün süreyle uygulandı.

5.6.5. Histolojik İnceleme

Yüzde 10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri 3 günlük formalin fiksasyonunun ardından kesit alınabilmede kolaylık sağlanması için kalsiyum tuzlarını uzaklaştırmak amacıyla dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon ajanı olarak her hafta 2 kere değiştirilmek üzere EDTA bir ay süre uygulandı. Her hafta kemik dokunun yumuşayıp yumuşamadığı insülin enjektörü ile kontrol edildi.

Fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla spesmenler 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika 4 değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu; 60°C'lik etüv içerisinde 2 değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı (Tablo 4).

Tablo 4: Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dk
	% 80 etil alkol	20 dk
	% 95 etil alkol	20 dk
	Aseton (4 değişim)	20 dk
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dk
	Ksilol	30 dk
Emdirme %60 C etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

5.6.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Ardından dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı. On dakika hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile

boyandı. Ardından sırasıyla % 80 ve % 95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5:Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	10 dk
Yıkama	Akar su	10 dk
Boyama	Eosin	2 dk
Yıkama	Akar su	5 dk
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol (3 değişim)	20 dk
Kapama	Entellan	

5.6.5.2. TUNEL Yöntemi

TUNEL (dUTP Nick End Labelling) pozitif hücreleri göstermek amacıyla Roche (Cat. No. 11 684 795 910) kiti kullanıldı. Deparafinize edilen doku kesitleri azalan alkol serilerinden geçirilip distile su ile yıkandı. Proteinaz K solusyonu ile 15 dk 37°C derecede inkübe edilen kesitler yıkama sonrası TDT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) enzimi ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi. PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkamanın ardından POD (Peroxidase) solüsyonu içinde 15 dk 37 °C derecede bekletilip yıkamanın ardından Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche, Darmstadt, Germany) kromojeni ile boyama yapıldı. Mayer's

hematoksilen ile ard alan boyaması yapılan kesitler artan alkol serilerinden geçirilip ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskobu ile incelendi (Tablo 6).

Tablo 6:TUNEL yöntemi

Deparafinizasyon, Yıkama	PBS	3x5 dk
	Proteinaz K	15 dk, 37°C
Yıkama	PBS	3x5 dk
	TDT enzimi	1 saat 37°C
Yıkama	PBS	3x5 dk
	Converter POD	30 dk, 37°C
Yıkama	PBS	3x5 dk
Boyama	DAB	2-10 dk
Yıkama	Distile su	3x5 dk
Ard alan boyaması	Mayer's HE	2 dk
Yıkama	Çeşme suyu	
Şeffaflaştırma		
Kapama	Entellan	

5.6.5.4. İndirekt İmmunohistokimyasal Yöntem

Aktif Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla tavşan spesifik (MAB10753, Sigma, Germany) antikoru kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dk deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı.

Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı; pH 6 ayarlı sitrat tampon ile 5 dk yüksek ısıda mikrodalgada tutulan kesitler 20 dk soğumaya bırakıldı, ardından doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı; 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (Invitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043, USA) ile enkübe edildi ve

ardından yıkama yapılmadan Aktive Kaspase-3 antikoru ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 15 dk enkübe edildi. PBS solusyonu ile yıkama yapıldıktan sonra Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 15 dk uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için DAB (Diaminobenzidine) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 7).

Tablo 7:İmmunohistokimyasal Yöntem

Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Sitrat tampon	5 dk yüksek ısı
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solüsyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Caspase-3	1 gece +4°C'de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

5.6.5.3. Histomorfolojik ve İmmunhistolojik Skorlama

Histopatolojik etkilenme düzeyleri kesit alımı sonrası hemotoksilen-eozin, TUNEL ve kaspaz boyamalar ile incelendi. Yapılan işlemlerden habersiz körleştirilmiş araştırmacılar tarafından etkilenme dereceleri sayısal verilerle skorlandı. Objektif olarak hasar seviyesini tanımlayabilmek adına Freitas'ın geliştirdiği etkilenme derecesi kullanıldı ¹⁰⁴ (Tablo 8 - 10).

Tablo 8:Dış Tüylü Hücre Hasarı Skorlaması

0 puan	Bütünlüğü korunmuş 3 Dış tüylü hücre(DTH) varlığı
1 puan	Bütünlüğü korunmuş 2 Dış tüylü hücre(DTH) varlığı
2 puan	Bütünlüğü korunmuş 1 Dış tüylü hücre(DTH) varlığı
3 puan	Bütünlüğü korunmuş Dış tüylü hücre(DTH) olmaması

Tablo 9:Apoptozis Skorlaması

0 puan	Apoptotik hücre yok
1 puan	1-5 arası apoptotik hücre
2 puan	6-10 arası apoptotik hücre
3 puan	10'dan fazla apoptotik hücre

Tablo 10:Histopatolojik Etki Skorlaması

0 puan	Histopatolojik değişiklik yok
1 puan	Minimal histopatolojik değişim
2 puan	Orta düzeyde histopatolojik değişim
3 puan	Ağır düzeyde histopatolojik değişim, hücre tanımlaması zorlaşmış

5.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Araştırmada öncelikle Ekim 2018 – Temmuz 2019 arasında literatür taraması yapıldı. Ekim 2018 tarihinde etik kurul onayı alındıktan sonra Kasım 2018'de pilot çalışma uygulandı. Ardından başlayan deneysel işlemler Mart – Nisan 2019 tarihlerinde tamamlandı. Veri girişi ve histopatolojik incelemeler Mayıs – Ekim 2019 tarihlerinde tamamlandıktan sonra Eylül – Ekim 2019 tarihlerinde istatistiksel analiz uygulandı. Tez yazımı Haziran – Kasım 2019 tarihleri arasında tamamlandı (Tablo 11).

Tablo 11:Araştırmanın Planı ve Takvimi

	Başlangıç	Bitiş
Literatür taraması	Ekim 2018	Temmuz 2019
Etik kurul onayı	Ekim 2018	-
Pilot Çalışma	Kasım 2018	Şubat 2019
Deneysel Çalışma	Mart 2019	Nisan 2019
Verilerin Girilmesi	Mayıs 2019	Ekim 2019
Histopatolojik inceleme	Mayıs 2019	Ekim 2019
İstatistiksel analiz	Eylül 2019	Ekim 2019
Tez Yazımı	Haziran 2019	Kasım 2019

5.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm grupların odyovestibüler test sonuçları birbiriyle ve grup içi analizlerle karşılaştırıldı. Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 22.0 versiyonu kullanılarak, % 95 güven aralığı düzeyinde incelendi. Verilerin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ölçüldü. Tanımlayıcı istatistiklerde, ABR ve vestibüler hasar analizlerinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testinde dağılımların normal olmadığı görüldü ve gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis varyans analizi ile incelendi ve Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Grup içi farklılıklar Friedman varyans analizi ile incelenerek edilerek anlamlı farklılıklar post-hoc Bonferroni düzeltmesi ile değerlendirildi. Histolojik hasar

analizlerinde verilerin Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testinde normal dağıldığı görüldü. ANOVA testi ve ikili analizler için post-hoc Bonferroni düzeltmesi uygulandı.

5.9. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 52/2018 protokol numaralı 17.10.2018 tarihli, 07/18 Gündem ve Toplantı No'lu etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirildi (Resim 15).



6. BULGULAR

6.1. Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon (DPOAE) Bulguları

Dört gruptan elde edilen distorsiyon ürünü otoakustik emisyon değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 12’de belirtildi. Eşik değerler 1.5, 2, 3, 4, 6 ve 8 kHz frekansları ölçülerek hesaplandı.

Tablo 12:Tüm grupların bazal DPOAE amplitüdları ve standart hata değerleri

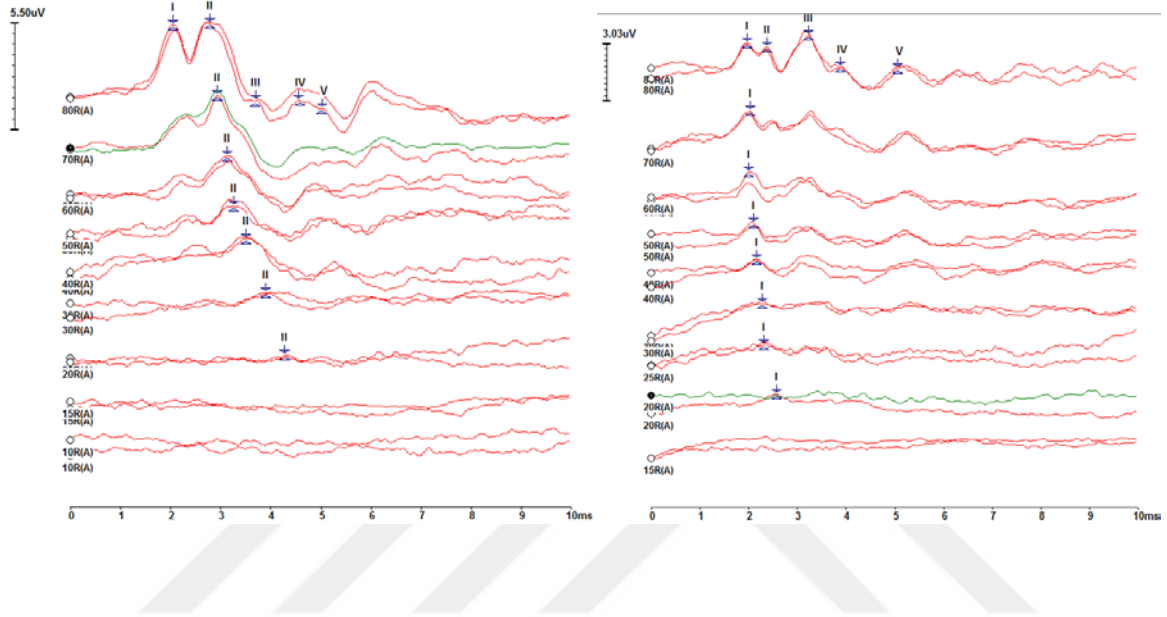
Gruplar Frekans	Gentamisin (A)	Hyaluronik Asit (B)	Gentamisin + Hyaluronik Asit (C)	Serum Fizyolojik (D)
1.5 kHz	6.05±0.6	3.33±0.8	10.7±4.5	0.8±0.3
2 kHz	5.9±2.1	6.9±4.3	7.12±6.7	7.1±4.9
3 kHz	21.63±4.5	16.38±7.7	20.5±7.4	25.11±4.6
4 kHz	29.13±3.6	27.08±8.9	24.81±4.7	27.38±6.2
6 kHz	44.25±3.3	40.9±5.9	41.36±4.1	40.4±4.3
8 kHz	40.33±4.4	37.16±3.1	39.5±2.8	36.16±5.9

6.2. İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyelleri (İUBP)

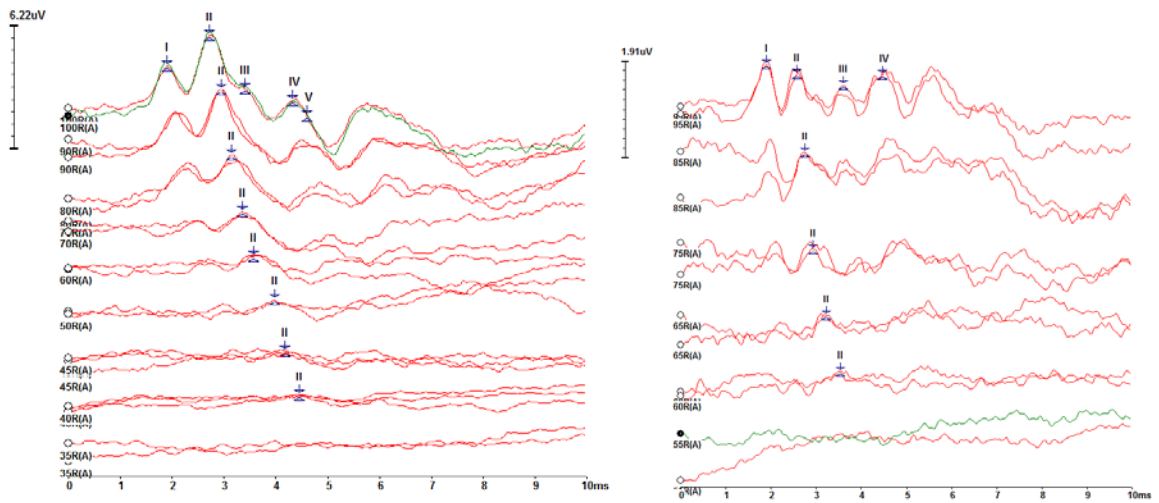
6.2.1. IUBP yanıtları

Yaptığımız testlerde bazal İUBP’de tüm gruplarda 1, 2, 3, 4 ve 5. dalgalar elde edildi. Testlerde 3. dalga en düşük amplitüdlü dalga olarak karşımıza çıktı. Gentamisin (A) ve gentamisin+hyaluronik asit kombinasyonu (C) gruplarında 1. günden itibaren işitme kaybı gözlenirken ($p<0,05$), hyaluronik asit (B) ve kontrol serum fizyolojik (D) grubunda eşiklerde anlamlı değişim saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 5-7).

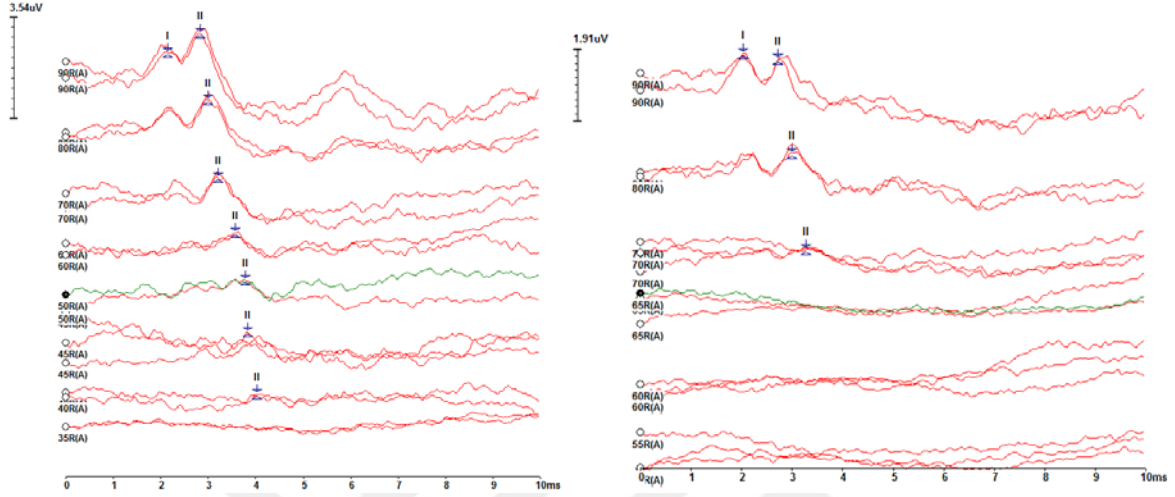
Şekil 5: Gentamisin Grubu Bazal - 4 ve 32 kHz ABR Grafikleri



Şekil 6: Gentamisin Grubu Enjeksiyon sonrası 7. gün - 4 ve 32 kHz ABR Grafikleri



Şekil 7: Kombinasyon Grubu Enjeksiyon sonrası 7. gün - 4 ve 32 kHz ABR Grafikleri



6.2.2. Tüm Grupların İUBP Eşik Ortalamaları ve Değişimi

Deney süresince eşik değerlendirmelerdeki değişimi gözlemek amacıyla 1, 7 ve 10. günler yapılan ABR testlerinde 4, 8, 16, 20 ve 32 kHz frekanslarındaki eşik ortalamaları, standart sapma, minimum ve maksimum değerler saptandı (Tablo 13).

Tablo 13: Grupların Tanımlayıcı Analizleri – 0,1,7,10. Gün - 4,8,16,20,32 kHz

kHz	Gentamisin				Hyaluronik asit				Kombinasyon				Serum fizyolojik				
	Ort.	Std.	Min	Max	Ort.	Std.	Min	Max	Ort.	Std.	Min	Max	Ort.	Std.	Min	Max	
4	Bazal	22.14	9.1	10	40	19.29	3.5	15	25	22.14	2.7	20	25	19.29	1.9	15	20
	1.gün	25.71	3.5	20	30	22.14	2.7	20	25	26.43	2.4	25	30	20	0	20	20
	7.gün	40.71	1.9	40	45	32.71	4.6	25	39	52.86	6.4	45	65	23.57	4.8	20	30
	10.gün	51.43	18	40	85	22.86	2.7	20	25	40	10	30	60	20	2.9	15	25
8	Bazal	21.43	5.6	10	25	21.43	3.8	15	25	22.14	2.7	20	25	17.86	2.7	15	20
	1.gün	30.71	3.5	25	35	26.43	7.5	15	40	28.57	5.6	20	35	22.14	3.9	15	25
	7.gün	55.71	16	35	80	39.86	8.2	30	55	58.57	7.5	55	75	25	4.1	20	30
	10.gün	72.14	20	55	105	36.43	3.8	30	40	51.43	14	35	70	17.86	5.7	15	30
16	Bazal	12.86	2.7	10	15	14.29	3.5	10	20	14.29	1.9	10	15	16.43	3.8	10	20
	1.gün	23.57	4.8	20	30	19.29	3.5	15	25	20	0	20	20	15	4.1	10	20
	7.gün	61.43	17	45	90	33.57	6.3	25	40	62.86	9.9	45	75	19.29	3.5	15	25
	10.gün	68.57	18	45	95	30	5.8	25	40	47.14	13	30	65	17.86	5.7	15	30
20	Bazal	15.71	1.9	15	20	18.57	2.4	15	20	16.43	2.4	15	20	16.43	3.8	10	20
	1.gün	22.14	6.4	15	30	18.57	2.4	15	20	21.43	3.8	15	25	17.14	2.7	15	20
	7.gün	62.86	11	45	75	37.14	9.5	25	55	61.43	10	45	75	20.71	3.5	15	25
	10.gün	69.29	12	55	85	35	5	30	40	61.43	9.9	45	75	20	7.6	15	35
32	Bazal	17.86	2.7	15	20	21.43	3.8	15	25	20	4.1	15	25	19.29	1.9	15	20
	1.gün	28.57	4.8	25	35	24.29	4.5	20	30	24.29	3.5	20	30	18.57	2.4	15	20
	7.gün	78.57	7.5	65	90	45.71	10	35	55	61.43	9.9	45	75	25	2.9	20	30
	10.gün	82.86	7	75	95	42.86	4.9	35	50	61.43	9.9	45	75	22.86	6.4	15	35

İstatistiksel analizde bağımsız değişkenler Kruskal-Wallis testi ile analiz edilip ikili analizlerde Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Bazal değerlendirmelerde gruplar arasında 4, 8, 16, 20 ve 32 kHz'de anlamlı farklılık saptanmadı. Deneyin 1., 7. ve 10. günü yapılan testlerin tümünde (24. saat 20 kHz değeri hariç); gentamisin enjeksiyonu içeren A ve C grupları ile diğerlerinin(B ve D) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 14).



Tablo 14: ABR Eşik Değerlerinde Kruskal-Wallis ve Bonferroni Düzeltmesi – Frekans Bazlı Analiz

4000 Hz				8000 Hz				16000 Hz				20000 Hz				32000 Hz			
K.W. p*	Bonferroni	Post-Hoc		K.W. p*	Bonferroni	Post-Hoc		K.W. p*	Bonferroni	Post-Hoc		K.W. p*	Bonferroni	Post-Hoc		K.W. p*	Bonferroni	Post-Hoc	
Bazal	0.26	gentamisin-hyaluronan	N/A	Bazal	0.10	gentamisin-hyaluronan	N/A	Bazal	0.22	gentamisin-hyaluronan	N/A	Bazal	0.22	gentamisin-hyaluronan	N/A	Bazal	0.25	gentamisin-hyaluronan	N/A
		kombinasyon-gentamisin	N/A			kombinasyon-gentamisin	N/A			kombinasyon-gentamisin	N/A			kombinasyon-gentamisin	N/A			kombinasyon-gentamisin	N/A
		hyaluronan-kombinasyon	N/A			hyaluronan-kombinasyon	N/A			hyaluronan-kombinasyon	N/A			hyaluronan-kombinasyon	N/A			hyaluronan-kombinasyon	N/A
		serum fizyolojik-gentamisin	N/A			serum fizyolojik-gentamisin	N/A			serum fizyolojik-gentamisin	N/A			serum fizyolojik-gentamisin	N/A			serum fizyolojik-gentamisin	N/A
		serum fizyolojik-kombinasyon	N/A			serum fizyolojik-kombinasyon	N/A			serum fizyolojik-kombinasyon	N/A			serum fizyolojik-kombinasyon	N/A			serum fizyolojik-kombinasyon	N/A
		serum fizyolojik-hyaluronan	N/A			serum fizyolojik-hyaluronan	N/A			serum fizyolojik-hyaluronan	N/A			serum fizyolojik-hyaluronan	N/A			serum fizyolojik-hyaluronan	N/A
1.gün	0.01	gentamisin-hyaluronan	0.39	1.gün	0.02	gentamisin-hyaluronan	0.60	1.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.57	1.gün	0.13	gentamisin-hyaluronan	N/A	1.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.85
		kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	N/A			kombinasyon-gentamisin	1.00
		hyaluronan-kombinasyon	0.14			hyaluronan-kombinasyon	1.00			hyaluronan-kombinasyon	1.00			hyaluronan-kombinasyon	N/A			hyaluronan-kombinasyon	1.00
		serum fizyolojik-gentamisin	0.01			serum fizyolojik-gentamisin	0.02			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	N/A			serum fizyolojik-gentamisin	0.00
		serum fizyolojik-kombinasyon	0.02			serum fizyolojik-kombinasyon	0.19			serum fizyolojik-kombinasyon	0.13			serum fizyolojik-kombinasyon	N/A			serum fizyolojik-kombinasyon	0.11
		serum fizyolojik-hyaluronan	1.00			serum fizyolojik-hyaluronan	1.00			serum fizyolojik-hyaluronan	0.40			serum fizyolojik-hyaluronan	N/A			serum fizyolojik-hyaluronan	0.15
7.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.46	7.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.49	7.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.16	7.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.12	7.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.02
		kombinasyon-gentamisin	0.69			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	0.68
		hyaluronan-kombinasyon	0.00			hyaluronan-kombinasyon	0.37			hyaluronan-kombinasyon	0.05			hyaluronan-kombinasyon	0.17			hyaluronan-kombinasyon	1.00
		serum fizyolojik-gentamisin	0.01			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00
		serum fizyolojik-kombinasyon	0.00			serum fizyolojik-kombinasyon	0.00			serum fizyolojik-kombinasyon	0.00			serum fizyolojik-kombinasyon	0.00			serum fizyolojik-kombinasyon	0.01
		serum fizyolojik-hyaluronan	1.00			serum fizyolojik-hyaluronan	0.29			serum fizyolojik-hyaluronan	0.70			serum fizyolojik-hyaluronan	0.59			serum fizyolojik-hyaluronan	0.45
10.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.01	10.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.04	10.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.02	10.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.03	10.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.01
		kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	1.00			kombinasyon-gentamisin	0.64
		hyaluronan-kombinasyon	0.09			hyaluronan-kombinasyon	0.74			hyaluronan-kombinasyon	0.55			hyaluronan-kombinasyon	0.15			hyaluronan-kombinasyon	0.83
		serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00			serum fizyolojik-gentamisin	0.00
		serum fizyolojik-kombinasyon	0.01			serum fizyolojik-kombinasyon	0.01			serum fizyolojik-kombinasyon	0.01			serum fizyolojik-kombinasyon	0.00			serum fizyolojik-kombinasyon	0.01
		serum fizyolojik-hyaluronan	1.00			serum fizyolojik-hyaluronan	0.46			serum fizyolojik-hyaluronan	0.82			serum fizyolojik-hyaluronan	1.00			serum fizyolojik-hyaluronan	0.60

6.2.2.1. 4 kHz Eşikleri

0.gün

Gruplar arası anlamlı fark yok.

1.gün

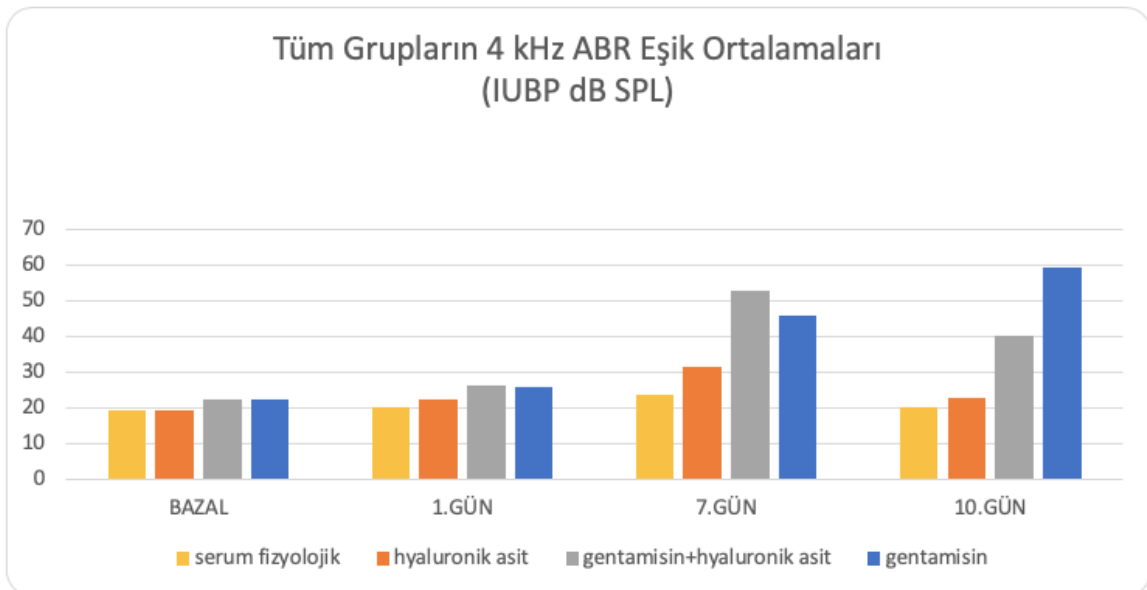
Grup D ile A arasında ($p:0,002$) ve grup D ile C arasında ($p:0,011$) anlamlı farklılık saptandı. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

7.gün

Grup D ile A arasında ($p:0,012$), grup D ile C arasında ($p:0,00$) ve B ile C grubu arasında ($p:0,005$) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

10.gün

Grup D ile A arasında ($p:0,00$), D ile C grubu arasında ($p:0,008$) ve A ve B grubu arasında ($p:0,006$) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.



Şekil 8: 4 kHz 0, 1, 7 ve 10. Gün Eşik Ortalamaları- Tüm Gruplar

6.2.2.2. 8 kHz Eşikleri

0.gün

Gruplar arası anlamlı fark yok.

1.gün

Grup D ve grup A arasında ($p:0,016$) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

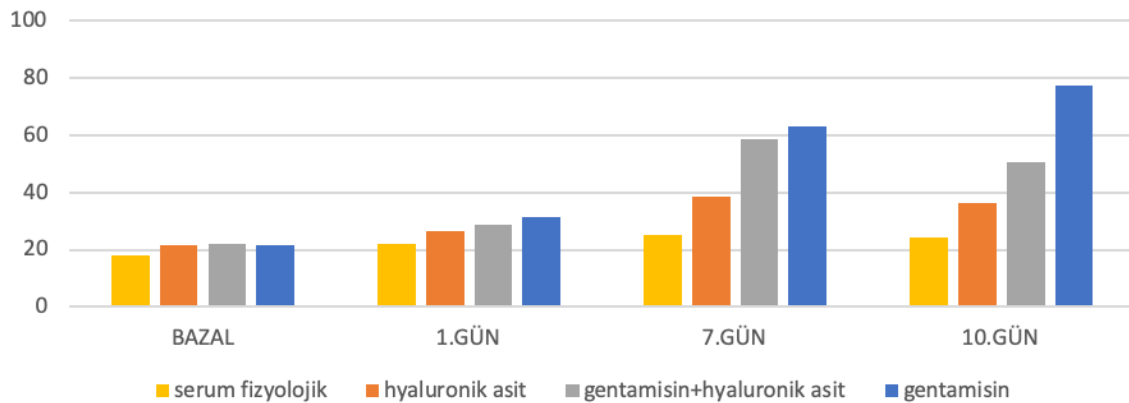
7.gün

Grup D ve grup A arasında ($p:0,001$), D ve C grubu arasında ($p:0,001$) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

10.gün

Grup D ve grup A arasında ($p:0,00$), D ve C grubu arasında ($p:0,006$) ve B ile C grubu arasında ($p:0,04$) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

Tüm Grupların 8 kHz ABR Eşik Ortalamaları
(IUBP dB SPL)



Şekil 9:8 kHz 0,1,7 ve 10. Gün Eşik Ortalamaları - Tüm Gruplar

6.2.2.3. 16 kHz Eşikleri

0.gün

Gruplar arası anlamlı fark yok.

1.gün

D ve A grubu arasında (p:0,003) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

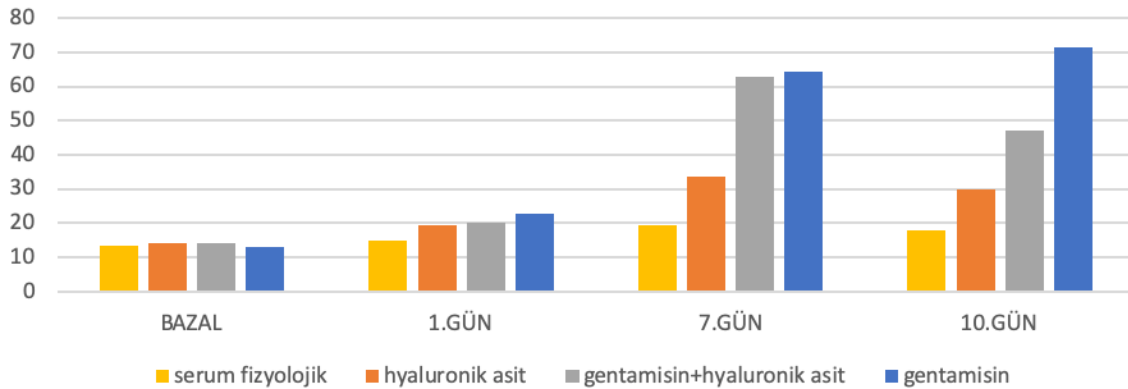
7.gün

D ve A grubu arasında (p:0,001), D ve C grubu arasında (p:0,00) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

10.gün

D ve A grubu arasında (p:0,00), D ve C grubu arasında (p:0,009) ve B ve A grubu arasında (p:0,024) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

Tüm Grupların 16 kHz ABR Eşik Ortalamaları
(IUBP dB SPL)



Şekil 10:16 kHz 0,1,7 ve 10. Gün Eşik Ortalamaları - Tüm Gruplar

6.2.2.4. 20 kHz Eşikleri

0.gün

Gruplar arası anlamlı fark yok.

1.gün

Gruplar arası anlamlı fark yok.

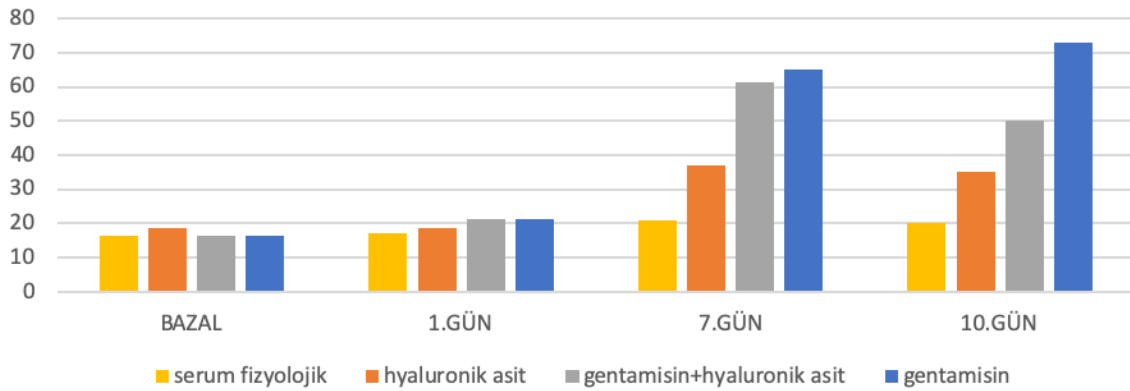
7.gün

D ve A grubu arasında (p:0,00), D ve C grubu arasında (p:0,001) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

10.gün

D ve A grubu arasında (p:0,00), D ve C grubu arasında (p:0,002) ve B ve A grubu arasında (p:0,033) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

Tüm Grupların 20 kHz ABR Eşik Ortalamaları
(IUBP dB SPL)



Şekil 11: 20 kHz 0, 1, 7 ve 10. Gün Eşik Ortalamaları - Tüm Gruplar

6.2.2.5. 32 kHz Eşikleri

0.gün

Gruplar arası anlamlı fark yok.

1.gün

D ve A grubu arasında (p:0,001) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

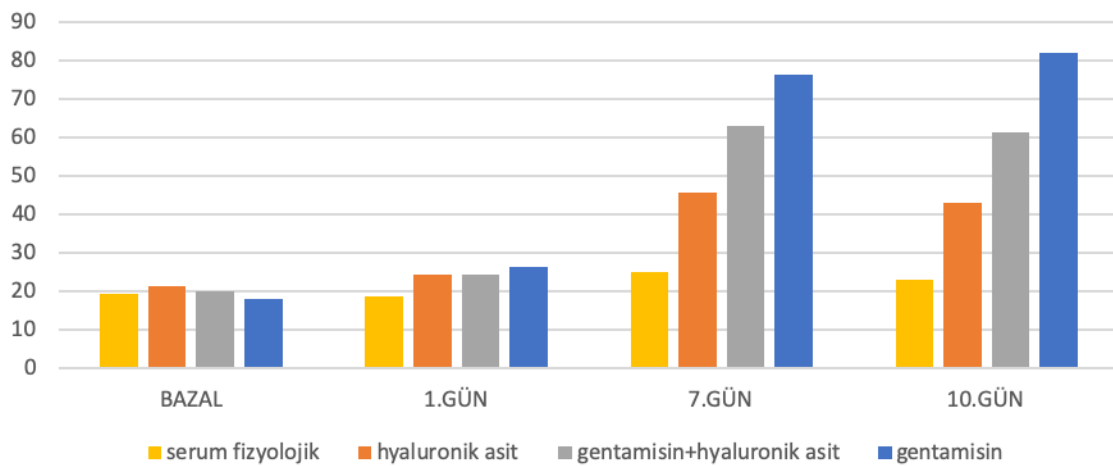
7.gün

D ve A grubu arasında (p:0,00), D ve C grubu arasında (p:0,011) ve B ve A grubu arasında (p:0,021) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

10.gün

D ve A grubu arasında (p:0,00), D ve C grubu arasında (p:0,01) ve B ile A grubu arasında (p:0,012) anlamlı farklılık var. Diğer gruplar arasında ikili analizde anlamlı farklılık yok.

Tüm Grupların 32 kHz ABR Eşik Ortalamaları
(IUBP dB SPL)



Şekil 12:32 kHz 0,1,7 ve 10. Gün Eşik Ortalamaları - Tüm Gruplar

Grupların işitme eşik değerlerinin değişimlerine bakıldığında 24 saatten itibaren gentamisin verilen grupların (grup A ve C) değişimlerinin istatistiksel anlamlı farklılık oluşturduğu saptandı ($p<0,05$). Yedinci gün A ve C grubunun etkisinin belirginleştiği, 7. ve 10. günler gentamisin verilmeyen B ve D gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık oluşturduğu görüldü ($p<0,05$). A ve C grupları arasında 24. saat, 7. ve 10. gün eşik değerleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 8, Tablo 14).

Grupların kendi içinde tekrarlayan ölçümlerdeki değişimleri incelemek için Friedman analizi uygulandı ve gün bazında istatistiksel olarak anlamlı farklılık varlığı araştırıldı. Farklılığın hangi günler arasında olduğunu saptamak için Post-Hoc Bonferroni analizi uygulandı (Tablo 15).

Tablo 15: ABR Eşiklerinde Grup İçi Analizler - Friedman Analizi ve Bonferroni Düzeltmesi

4000 Hz				8000 Hz				16000 Hz				20000 Hz				32000 Hz			
	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc	
Gentamisin (A grubu)	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	0.88	0.00	0.gün - 1.gün	0.88	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	0.89	
		0.gün - 7.gün	0.04		0.gün - 7.gün	0.01		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.01				
		0.gün - 10.gün	0.00		0.gün - 10.gün	0.00		0.gün - 10.gün	0.00		0.gün - 10.gün	0.00		0.gün - 10.gün	0.00				
		1.gün - 7.gün	0.18		1.gün - 7.gün	0.59		1.gün - 7.gün	0.29		1.gün - 7.gün	0.10		1.gün - 7.gün	0.59				
		1.gün - 10.gün	0.02		1.gün - 10.gün	0.04		1.gün - 10.gün	0.10		1.gün - 10.gün	0.10		1.gün - 10.gün	0.04				
7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00				
Hyaluronik asit (B grubu)	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	
		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.01		0.gün - 7.gün	0.00				
		0.gün - 10.gün	1.00		0.gün - 10.gün	0.02		0.gün - 10.gün	0.01		0.gün - 10.gün	0.04		0.gün - 10.gün	0.01				
		1.gün - 7.gün	0.06		1.gün - 7.gün	0.04		1.gün - 7.gün	0.08		1.gün - 7.gün	0.04		1.gün - 7.gün	0.04				
		1.gün - 10.gün	1.00		1.gün - 10.gün	0.18		1.gün - 10.gün	0.23		1.gün - 10.gün	0.04		1.gün - 10.gün	0.14				
7.gün - 10.gün	0.14	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00				
Kombinasyon (C grubu)	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	0.88	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	0.00	0.gün - 1.gün	1.00	
		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.00		0.gün - 7.gün	0.01		0.gün - 7.gün	0.01				
		0.gün - 10.gün	0.02		0.gün - 10.gün	0.03		0.gün - 10.gün	0.01		0.gün - 10.gün	0.08		0.gün - 10.gün	0.01				
		1.gün - 7.gün	0.03		1.gün - 7.gün	0.02		1.gün - 7.gün	0.04		1.gün - 7.gün	0.08		1.gün - 7.gün	0.06				
		1.gün - 10.gün	0.47		1.gün - 10.gün	0.18		1.gün - 10.gün	0.59		1.gün - 10.gün	0.23		1.gün - 10.gün	0.06				
7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	1.00				
Serum fizyolojik (D grubu)	0.05	0.gün - 1.gün	N/A	0.02	0.gün - 1.gün	0.72	0.38	0.gün - 1.gün	N/A	0.47	0.gün - 1.gün	N/A	0.01	0.gün - 1.gün	1.00	0.01	0.gün - 1.gün	1.00	
		0.gün - 7.gün	N/A		0.gün - 7.gün	0.14		0.gün - 7.gün	N/A		0.gün - 7.gün	N/A		0.gün - 7.gün	0.18				
		0.gün - 10.gün	N/A		0.gün - 10.gün	1.00		0.gün - 10.gün	N/A		0.gün - 10.gün	1.00		0.gün - 10.gün	1.00				
		1.gün - 7.gün	N/A		1.gün - 7.gün	1.00		1.gün - 7.gün	N/A		1.gün - 7.gün	0.06							
		1.gün - 10.gün	N/A		1.gün - 10.gün	0.59		1.gün - 10.gün	N/A		1.gün - 10.gün	0.72							
7.gün - 10.gün	N/A	7.gün - 10.gün	0.10	7.gün - 10.gün	N/A	7.gün - 10.gün	N/A	7.gün - 10.gün	1.00	7.gün - 10.gün	N/A	7.gün - 10.gün	1.00						

6.2.2.6. Gentamisin (A) grubu (n:7)

4 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,043), bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,004) ve 1 ile 10.gün arası(p:0,023) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

8 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,011), bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,00) ve 1 ile 10.gün arasında (p:0,043) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

16 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,004), bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,001) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında, 1 ile 10.gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

20 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,004) , bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,004) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında, 1 ile 10.gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

32 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,011), bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,00) , 1 ile 10. gün arasında (p:0,043) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında, 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

6.2.2.7. Hyaluronik asit (B) grubu (n:7)

4 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,004) anlamlı farklılık saptandı. Diğer ikili karşılaştırmalarda anlamlı fark saptanmadı.

8 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,004) , bazal ile 10. gün arasında (p:0,023) , 1 ile 7. gün arasında (p:0,043) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 10. gün arasında, 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

16 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,001) , bazal ile 10. gün arasında (p:0,06) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7, 10. gün arasında, 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

20 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,011) , bazal ile 10. gün arasında (p:0,043) , 1 ile 7. gün arasında (p:0,011), 1 ile 10. gün arasında (p:0,043) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

32 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,003) , bazal ile 10. gün arasında (p:0,011) , 1 ile 7. gün arasında (p:0,043) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 10. gün arasında, 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

6.2.2.8. Gentamisin+Hyaluronik asit Kombinasyon (C) grubu (n:7)

4 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,00) , bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,016) ve 1 ile 7.gün arasında (p:0,031) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 10. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

8 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,002) , bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,031) ve 1 ile 7.gün arasında (p:0,016) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında , 1 ile 10. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

16 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,00) , bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,011) ve 1 ile 7.gün arasında (p:0,043) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 10. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

20 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,001) , bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,006) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında, 1 ile 10. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

32 kHz için bazal değerlendirme ile 7. gün arasında (p:0,008) , bazal değerlendirme ile 10. gün arasında (p:0,008) anlamlı farklılık saptandı. Bazal eşikler ile 1. gün arasında, 1 ile 7. gün arasında, 1 ile 10. gün arasında ve 7 ile 10. gün arasında anlamlı fark saptanmadı.

6.2.2.9. Serum Fizyolojik (D) grubu (n:7)

4, 8, 16, 20 ve 32 kHz için tüm ikili karşılaştırmalar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

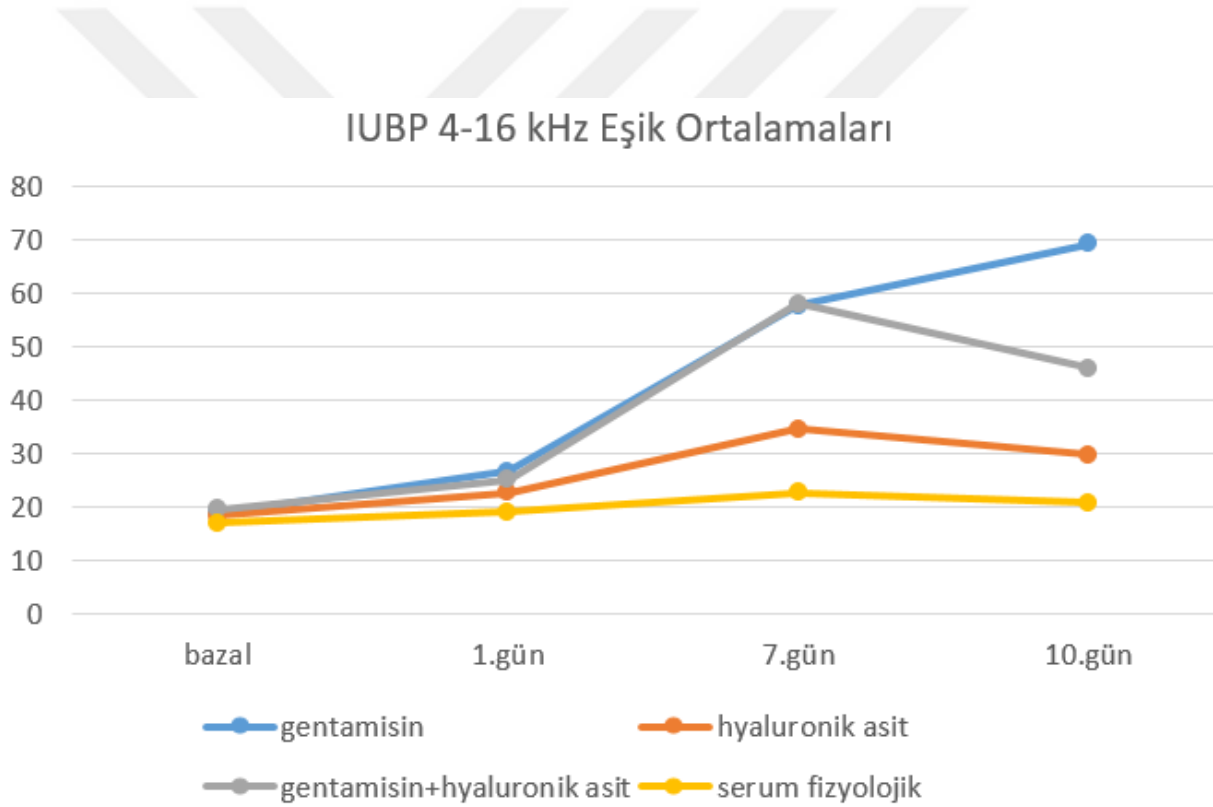
Deneyssel çalışmanın bazal değerlendirmesinde A grubunda enjeksiyonlar öncesi saptanan İUBP ortalama eşikleri 4 kHz için 22.14, 8 kHz için 21.43 dB SPL, 16 kHz için 12.86 dB SPL, 20 kHz için 16.43 dB SPL, 32 kHz için 17.86 dB SPL olarak ölçüldü (Tablo 13). Enjeksiyon sonrası yapılan 24. saat incelemelerinde ise eşik değerlerde yükselme görülmekle beraber, ikili karşılaştırmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık izlendi ($p<0,05$). Günlük tekrarlayan intratimpanik gentamisin enjeksiyonlardan sonra 7. gün İUBP ölçümlerinde eşiklerin belirgin olarak arttığı gözlemlendi. Literatürde çoğu çalışmada saptandığı şekilde en çok etkilenen frekans 32 kHz olarak ölçüldü (78.57 ± 7.4 dB SPL). Çalışmanın bazal değerlendirmesinde işitme eşik değerleri tüm frekanslarda 12.86 – 22.14 dB SPL arasında değişirken, sakrifikasyon öncesi son günü (10.gün) yapılan ölçümlerde tüm frekanslarda İUBP eşiklerinin arttığı gözlemlendi. Eşik ortalamaları 32 kHz'de 82.86 ± 6.9 dB SPL, 4 kHz'de ise en düşük seviye ortalaması olan 51.43 ± 18.41 dB SPL olarak ölçüldü.

B grubunda ise bazal değerlendirmede 4-32 kHz frekanslarının işitme eşikleri ortalaması 22.86 ± 2.6 dB SPL olarak saptandı. B grubuna günlük olarak tekrarlayan hyaluronik asit enjeksiyonları intratimpanik olarak uygulandı ve yuvarlak pencere önünde maksimum etki süresi hedeflendi. Çalışmanın 24. saatinde ise B grubunun işitme eşikleri ortalaması 36.43 ± 3.7 dB SPL olarak saptandı. Eşiklerde 7. ve 10. gün bazal değerlendirmeye göre artışlar olsa da, bunların A ve C grubundan belirgin derece düşük düzeyler olduğu gözlemlendi.

C grubunda 10.gün 32 kHz İUBP ortalaması 61.43 ± 9.8 dB SPL olarak ölçüldü. Oran olarak en çok artan frekans ise 16 kHz Hz oldu (47.14 ± 13.2 dB SPL). En az etkilenme ise 4 kHz'de 40 ± 10 dB SPL ortalama olarak saptandı.

Gentamisin ve hyaluronik asit kombinasyonu uygulanan C grubunda enjeksiyonlar devam ederken 1. ve 7. günlerde bazal değerlere göre eşik ortalamaları istatistiksel anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Enjeksiyonlar sonlandıktan sonra (7 ve 10. günler arasında) hiçbir İUBP eşik ortalamasının artmadığı, bununla birlikte A grubu eşikleriyle aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı gözlemlendi ($p>0,05$).

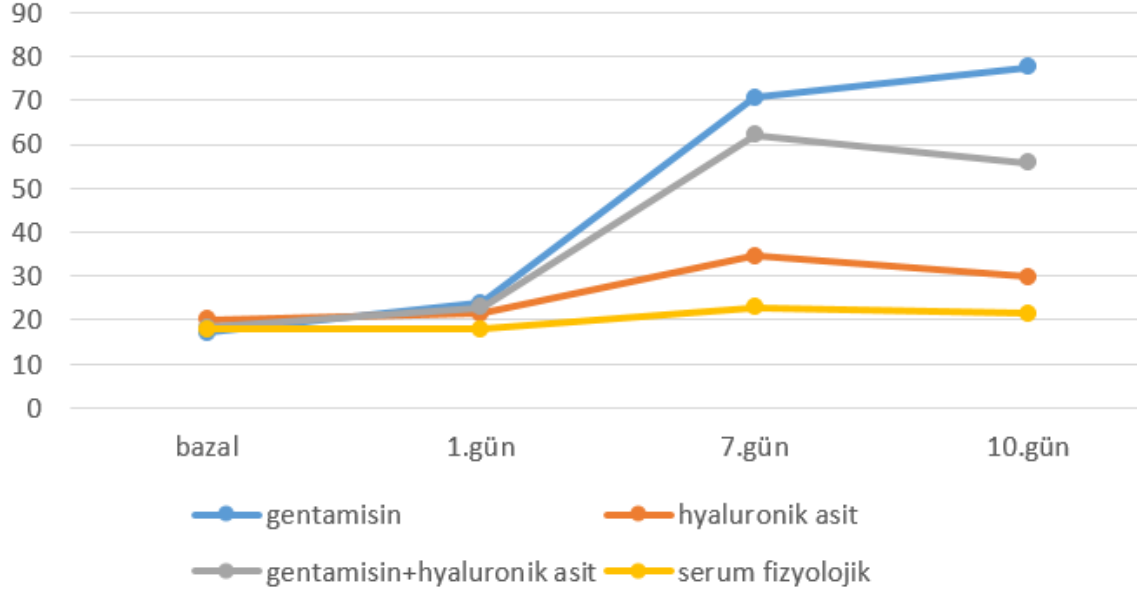
Kontrol D grubunda yapılan bazal değerlendirmede işitme eşikleri ortalamalarından elde edilen verilerle diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 13,14).



Şekil 13:4-16 kHz Frekans IUBP Eşik Ortalamalarının Değişim Grafiği

Gruplar arası 4-16 kHz arasındaki frekansların eşik değişimleri Şekil 13'de verilmiştir. Yüksek frekanslarda görülene benzer şekilde gentamisin ve hyaluronik asit kombinasyon grubunda (C grubu) 7.günden sonra ABR eşik ortalamalarının düştüğü ancak bulgunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir ($p>0,05$).

IUBP 20-32 kHz Eşik Ortalamaları



Şekil 14:20-32 kHz Frekans IUBP Eşik Ortalamalarının Değişim Grafiği

20-32 kHz frekans eşik ortalamalarındaki gruplar arası farklılıkları Şekil 14'de verilmiştir. Hyaluronik asit uygulaması yapılmış olan gruplarda (B ve C grupları) 7 ve 10. günleri arasında ABR eşiklerinde minimal düşüş saptandı ($p>0,05$).

6.3. Vestibüler Etkilenme Bulguları

Davranışsal test bataryasında kuyruktan asma, havada düzelme ve yüzme testleri uygulandı. Bu testler sırasında izlenen tek taraflı kasılma, kalçadan dönme, yüzme kalitesi, dönme davranışı, kurulanma becerisi ve havada düzelme becerileri karşılaştırılmış araştırmacılar tarafından skorlandı.

Tablo 16: Vestibüler Etkilenme Düzeyi Tanımlayıcı Analizleri

Vestibüler Etkilenme Düzeyi Tanımlayıcı Analizleri					
Ajan		Bazal	1.gün	7.gün	10.gün
Gentamisin (A grubu)	Ortalama	0	5.43	11.29	14.86
	Standart Sapma	0	1.3	1.7	2.4
	Minimum	0	4	9	11
	Maksimum	0	7	13	17
Hyaluronik asit (B grubu)	Ortalama	0	0	1.57	1.43
	Standart Sapma	0	0	1	1.27
	Minimum	0	0	0	0
	Maksimum	0	0	3	3
Kombinasyon (C grubu)	Ortalama	0	3.57	9.71	10.71
	Standart Sapma	0	1.4	1.6	3.3
	Minimum	0	2	8	9
	Maksimum	0	5	13	18
Serum fizyolojik (D grubu)	Ortalama	0	0.57	0.86	1.14
	Standart Sapma	0	1.1	1	1.5
	Minimum	0	0	0	0
	Maksimum	0	3	2	4

6.3.1. 24. saat vestibüler değerlendirme skorları

Tüm grupların bazal değerlendirmelerinde sıçan vestibüler davranış skorları normal olarak sonuçlandı ve gruplar arası farklılık izlenmedi. İlk enjeksiyon sonrası 24. saat testlerde gentamisin grubunun etkilenme puanları serum fizyolojik ve hyaluronik asit grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ölçüldü ($p<0,05$). Kombinasyon grubu ve hyaluronik asit grubunun etkilenme düzeyleri arasındaki farklılığın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Gentamisin ile kombinasyon grupları arasındaki ikili analizlerde ise işitme eşiklerinde gözlediğimiz gibi istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Gentamisin grubunun denge fonksiyonlarında 24. saatten itibaren giderek artan bozulma olduğu saptandı. Kuyruk asma testinde tek yöne deviye vücut postürü ve tek yöne kasılma hareketi derecelendirildiğinde bazal değerlendirmede toplam puan 0(sıfır) iken, 1. günde ortalama 5.42 ± 1.1 etkilenme puanı (VDRs), 7. günde 11.3 ± 1.7 etkilenme puanı, 10. günde ise 14.85 ± 2.4 etkilenme puanı sonuçları elde edildi.

Benzer şekilde gentamisin grubundaki sıçanların kalça ekseninde dönme hareketi skorlamasında bazal değerlendirmede puan 0 iken, 1. günde 11 puan, 7. günde 13 puan ve 10. günde 17 puan olarak etkilenme düzeyi belirlendi.

Bu grubun yüzme testinde yüzme kalitesindeki bozulmada bazal değerler 0 puan iken, 1. günde 5 puan, 7. günde 15 puan ve 10. günde 18 puan olarak ölçüldü. Yüzme testi sırasında hayvanların kuyruk eksenleri boyunca sürekli dönme hareketi (rolling) ve havuzdan çıktıktan sonraki temizlenme çabası (grooming) da etki düzeyi ile orantılı olarak puanlandı. A grubu sıçanların rolling skorları bazalde 0(sıfır), 1. gün 2 puan, 7. gün 7 puan ve 10. gün 12 puan olarak saptandı. Grooming indeksi ise bazalde 0, 1. günde 6 puan, 7. günde 15 puan ve 10. günde 18 puan olarak hesaplandı (Tablo 17 - 20).

Tablo 17:Gentamisin Grubu - Vestibüler Test Bataryası Hasar Skorları

A GRUBU Vestibulopati	Bazal	1. gün	7. gün	10. gün	Toplam
TH Postür ve Kasılma	0	5	12	20	37
TH Kalçadan Dönme	0	11	13	17	41
SW Yüzme Kalitesi	0	5	15	18	38
SW Suda Dönme	0	2	7	12	21
SW Kurulanma Becerisi	0	6	15	18	39
AR Havada Düzeltme	0	9	17	19	45
TOPLAM (VDRs)	0	38	79	104	221 puan

B grubu (hyaluronik asit) sıçanların vestibülopati değerlendirmesinde 24. saat, 7. gün ve 10. gün değerlendirmelerinde bazal incelemeye göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar izlenmedi. Total etkilenme skoru 21 olarak ölçüldü.

Kuyruk asma tek yön kasılma postür bozukluğu açısından değerlendirildiğinde sadece iki hayvan sırasıyla 7. ve 10. günlerde 1'er puan aldı. Kalçadan dönme skorunda yine sadece iki sıçan 7 ve 10. günlerde 1'er puan aldı. Kalan tüm sıçanlar 0, 1, 7 ve 10. gün incelemelerde 0 puan aldı. Benzer şekilde yüzme sırası dönme (rolling) skorunda 2 hayvan 1'er puan, kurulanma çabası (grooming) skorunda 4 hayvan 1'er puan, yüzme kalitesi skorunda da 4 hayvan 1'er puan alarak tamamladı. Toplamda 21 kez etki şüphesi (1 puan) olarak tanımlanmakla birlikte, testlerin diğer tüm incelemelerinde ise vestibül etki skoru saptanmadı. Kontrol serum fizyolojik grubu ile yapılan (B ve D grubu) ikili analizlerde de anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 18).

Tablo 18: Hyaluronik Asit Grubu - Vestibüler Test Bataryası Hasar Skorları

B GRUBU Vestibulopati	Bazal	1. gün	7. gün	10. gün	Toplam
TH Postür ve Kasılma	0	0	1	1	2
TH Kalçadan Dönme	0	0	1	1	2
SW Yüzme Kalitesi	0	0	2	2	4
SW Suda Dönme	0	0	2	0	2
SW Kurulanma Becerisi	0	0	2	2	4
AR Havada Düzelmeye	0	0	3	4	7
TOPLAM (VDRs)	0	0	11	10	21 puan

6.3.2. 7. gün vestibüler değerlendirme skorları

Yedinci günde gentamisin grubunun etkilenme puanları serum fizyolojik ve hyaluronik asit uygulanan gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derece farklı ölçüldü ($p<0,05$).

Gentamisin ile kombinasyon grupları arasında ise işitme eşiklerinde gözlediğimiz gibi istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Kombinasyon grubu ve serum fizyolojik grubunun etki düzeyleri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı hesaplandı ($p<0,05$).

C grubu (gentamisin + hyaluronik asit) incelemelerinde, gentamisin grubunda olduğu gibi enjeksiyon sonrası 24. saatten itibaren, anlamlı derecede etkilenme şüphesi ve net etki bulguları gözlenmeye başlandı (3.57 ± 1.4 VDRs, $p<0,05$). Bu grupta tail hanging (kuyruk asma) testinde bazal değerlendirme diğerleri gibi 0 puan olarak hesaplandı, 1. gün grup toplam puanı 6, 7. günde 16 ve 10. günde 15 olarak ölçüldü. Kalça ekseninde dönme skorları bazalde 0, 1. günde 5, 7. günde 9 ve 10. günde 10 olarak ölçüldü.

Yüzme testinde kalitede bozulma skoru bazalde 0, 1. günde 4, 7. günde 18 ve 10.günde 16 olarak ölçüldü. Yüzme sırasındaki dönme hareketi (rolling) puanları bazalde 0, 1. günde 2, 7. günde 8, 10. günde 9 olarak ölçülürken, kurulanma çabası skorları 0, 1, 7 ve 10. gün sırasıyla 0, 4, 10, 13 olarak saptandı.

Vestibülopati skorlarına bakıldığında A grubu skorları her geçen gün artarken, C grubunda 7. ve 10. gün arasında vestibüler hasar skorlarında belirgin bir artış saptanmadı. Bu incelemelerden kuyruktan asma, tek yön kasılma ve yüzme kalitesi skorlarında 10.gün azalma olduğu gözlemlendi (Tablo 19).

6.3.3. 10.gün vestibüler değerlendirme skorları

Onuncu günde gentamisin grubunun etkilenme puanları serum fizyolojik ve hyaluronik asit gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olarak ölçüldü ($p<0,05$). Aynı zamanda kombinasyon grubu ve serum fizyolojik grubunun etki düzeyleri arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Gentamisin ile kombinasyon grupları arasında ise işitme eşiklerinde gözlediğimiz gibi istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 17, 19).

Tablo 19:Kombinasyon Grubu - Vestibüler Test Bataryası Hasar Skorları

C GRUBU Vestibulopati	Bazal	1. gün	7. gün	10. gün	Toplam
TH Postür ve Kasılma	0	6	16	15	37
TH Kalçadan Dönme	0	5	9	10	24
SW Yüzme Kalitesi	0	4	18	16	38
SW Suda Dönme	0	2	8	9	19
SW Kurulanma Becerisi	0	4	10	13	27
AR Havada Düzeltme	0	4	9	11	24
TOPLAM (VDRs)	0	25	70	74	169

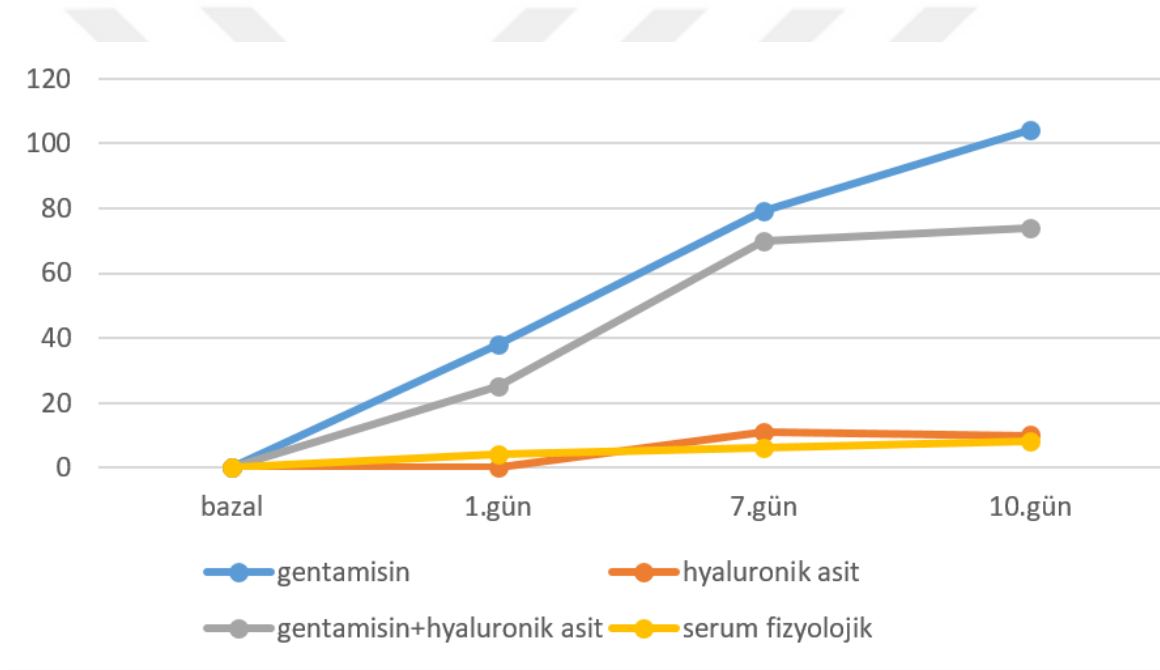
D grubunun incelemesinde bazal skorlar tüm tetkiklerde 0 puan alırken deney süresince toplam 18 etkilenme puanı saptandı. Tıpkı B grubunda olduğu gibi tüm etki puanları birer puandan (etkilenmeye dair şüphe) oluşmaktaydı. Onsekiz etki puanı kuyruk asma testi tek yön kasılmada etki şüphesi gösteren 5 adet, kalçadan dönmede ve yüzme sırasında dönme skorunda 2 adet, grooming, yüzme kalitesi bozukluğu ve havada düzeltme testinde ise 3'er adet sıçandan elde edildi (Tablo 20).

Tablo 20:Serum Fizyolojik Grubu - Vestibüler Test Bataryası Hasar Skorları

D GRUBU Vestibulopati	Bazal	1. gün	7. gün	10. gün	Toplam
TH Postür ve Kasılma	0	0	2	3	5
TH Kalçadan Dönme	0	1	0	1	2
SW Yüzme Kalitesi	0	1	1	1	3
SW Suda Dönme	0	0	1	1	2
SW Kurulanma Becerisi	0	1	1	1	3
AR Havada Düzeltme	0	1	1	1	3
TOPLAM (VDRs)	0	4	6	8	18

Serum fizyolojik ve hyaluronik asit grupları arasında yapılan ikili analizlerde ise 1, 7 ve 10. gün vestibüler etkilenme skorları açısından istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tüm grupların bazal, 1., 7., ve 10. günlerdeki vestibüler etkilenme skorları Şekil 15’de, analizleri Tablo 21, 22’de verilmiştir.



Şekil 15: Vestibüler Etkilenme Total Puanları - Tüm Gruplar

Tablo 21: Gün Bazında Vestibüler Etkilenme Analizleri – Kruskal-Wallis ve Bonferroni Düzeltmesi

Gün Bazında Vestibüler Etkilenme Analizleri			
	Kruskal-Wallis p*	Bonferroni	Post-Hoc
Bazal	1.00	gentamisin-hyaluronan	N/A
		kombinasyon-gentamisin	N/A
		hyaluronan-kombinasyon	N/A
		serum fizyolojik-gentamisin	N/A
		serum fizyolojik-kombinasyon	N/A
		serum fizyolojik-hyaluronan	N/A
1.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.00
		kombinasyon-gentamisin	1.00
		hyaluronan-kombinasyon	0.02
		serum fizyolojik-gentamisin	0.00
		serum fizyolojik-kombinasyon	0.13
		serum fizyolojik-hyaluronan	1.00
7.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.01
		kombinasyon-gentamisin	1.00
		hyaluronan-kombinasyon	0.07
		serum fizyolojik-gentamisin	0.00
		serum fizyolojik-kombinasyon	0.01
		serum fizyolojik-hyaluronan	1.00
10.gün	0.00	gentamisin-hyaluronan	0.00
		kombinasyon-gentamisin	1.00
		hyaluronan-kombinasyon	0.07
		serum fizyolojik-gentamisin	0.00
		serum fizyolojik-kombinasyon	0.03
		serum fizyolojik-hyaluronan	1.00

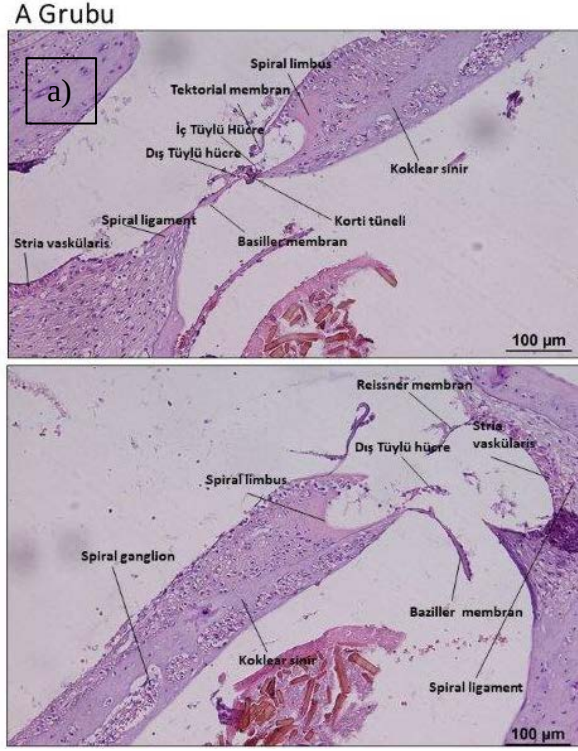
Tablo 22:Ajan Bazında Vestibüler Etkilenme Analizleri – Friedman Analizi ve Bonferroni Düzeltmesi İkili Analizleri

Ajan Bazında Vestibüler Etkilenme Analizleri			
	Friedman p*	Bonferroni	Post-Hoc
Gentamisin	0.00	0.gün - 1.gün	0.89
(A grubu)		0.gün - 7.gün	0.02
		0.gün - 10.gün	0.00
		1.gün - 7.gün	0.72
		1.gün - 10.gün	0.03
		7.gün - 10.gün	1.00
Hyaluronik asit	0.00	0.gün - 1.gün	1.00
(B grubu)		0.gün - 7.gün	0.10
		0.gün - 10.gün	0.18
		1.gün - 7.gün	0.10
		1.gün - 10.gün	0.18
		7.gün - 10.gün	1.00
Kombinasyon	0.00	0.gün - 1.gün	0.89
(C grubu)		0.gün - 7.gün	0.01
		0.gün - 10.gün	0.00
		1.gün - 7.gün	0.37
		1.gün - 10.gün	0.08
		7.gün - 10.gün	1.00
Serum fizyolojik	0.18	0.gün - 1.gün	N/A
(D grubu)		0.gün - 7.gün	N/A
		0.gün - 10.gün	N/A
		1.gün - 7.gün	N/A
		1.gün - 10.gün	N/A
		7.gün - 10.gün	N/A

6.4. Histolojik Görüntüleme Sonuçları

6.4.1. Hemotoksilen-Eozin Kesitleri

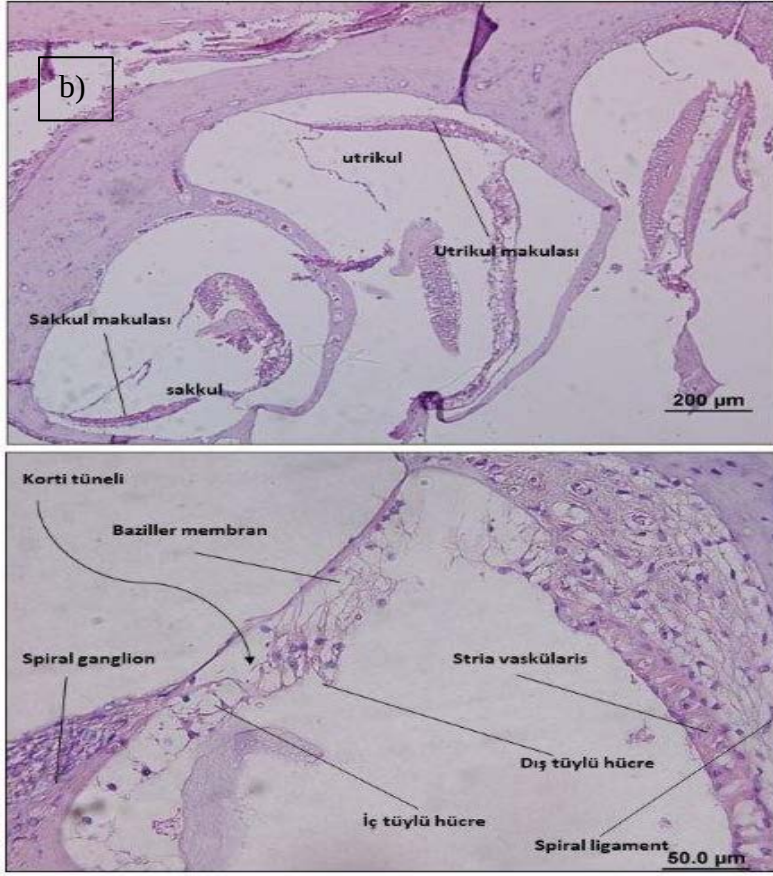
Resim 7: A:Gentamisin Grubu - Hemotoksilen-Eozin İncelemeleri



a)Gentamisin grubu Hemotoksilen-Eozin Kesitleri. Corti organında hücre kayıpları, spiral ganglion, ligament ve baziler membranda deformasyon olduğu gözlenmektedir.

Gentamisin içeren A ve C gruplarında Corti organında, stria vaskülaris, spiral ganglion, koklear sinir, dış tüylü hücreler ve destek hücrelerinde mikroskopik kayıplar ve baziler membranda deformasyon olduğu gözlemlendi. Spiral ganglionda nöronal dejenerasyon ve seyrek yerleşimli nöronlar saptandı.

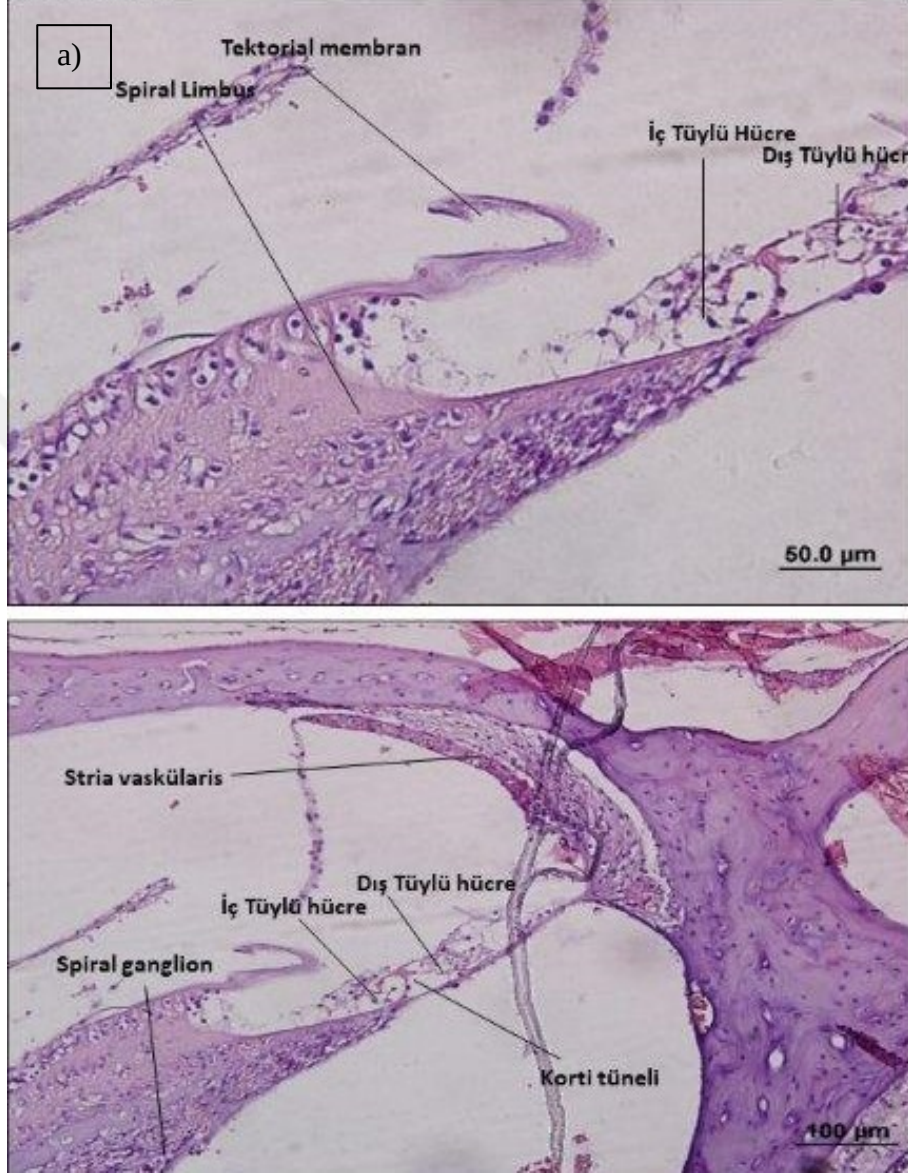
A Grubu



b) Utrikül ve sakulde deformasyon. Stria vaskülaris ve spiral ligamentte yoğun piknozis ve vakuolizasyon izlenmekte. Baziler membranda destek hücre kaybı belirgin.

Aynı zamanda egsentirik yerleşimli nukleuslar, piknozis ve ödem ayırd edildi. Stria vasularis hücrelerinde vakualizasyon ve piknozis olduğu görüldü (Resim 7a, 7b).

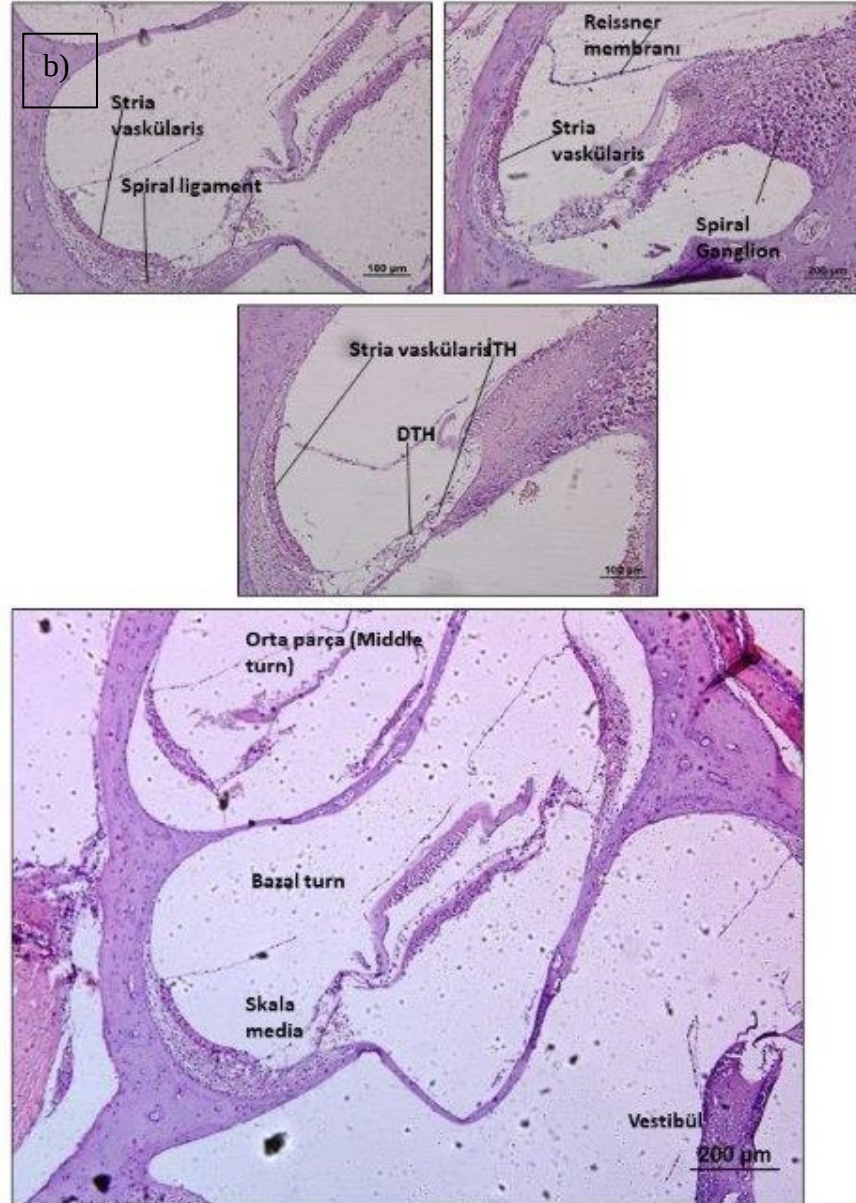
B Grubu



a)Hyaluronik asit grubunda mekanik hasar haricinde olağan DTH,İTH ve Destek hücreleri izlenmektedir.

Hyaluronik asit ve serum fizyolojik grubunda ise en yüksek puan 5 olarak ölçüldü. Serum fizyolojik grubunun toplam histolojik hasar skoru 12, hyaluronik asit grubunun ise 19 olarak hesaplandı ve ikili analizde aralarında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

B Grubu

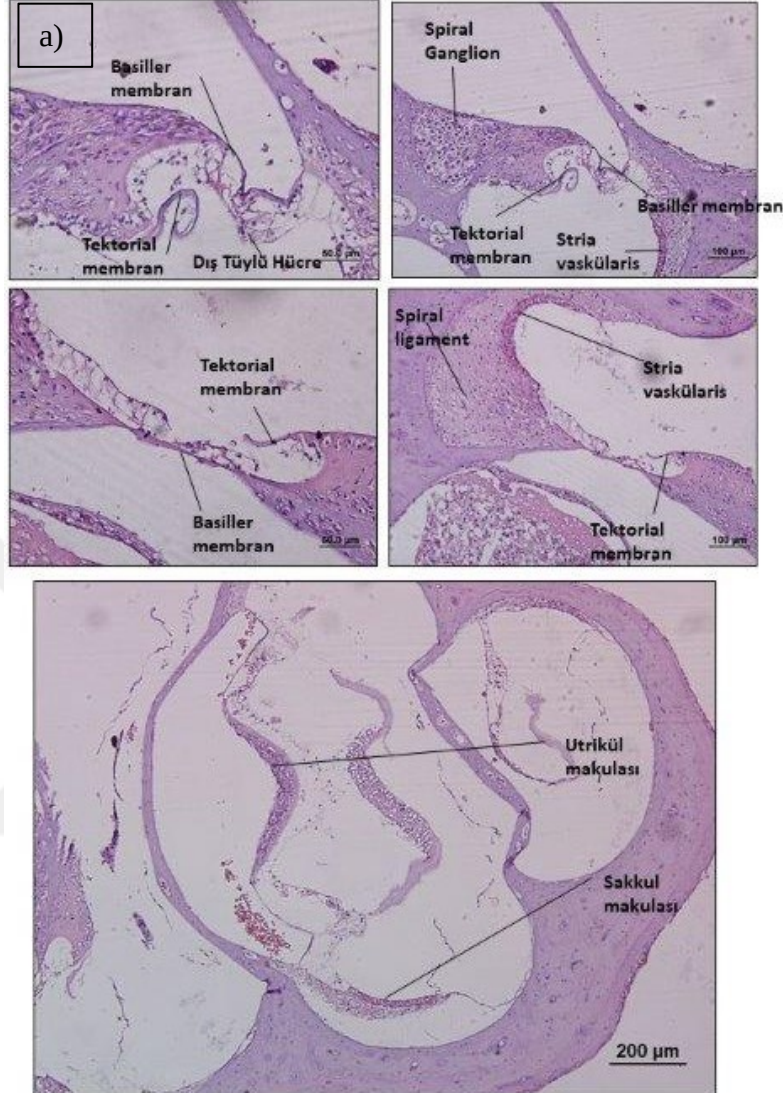


b)Koklea bazal ve middle turn normal morfolojiye yakın izlenmektedir

Hyaluronik asit grubunda piknozis, vakuolizasyon ve apoptozis skorlarının düşük olduğu belirlendi. Sıçan bazında alt grup histopatolojik değişimler en yüksek 1 puan olarak derecelendirildi ve totalde her hayvan en yüksek 5 puan aldı. Toplam histopatolojik hasar skoru 19 olarak ölçüldü (Resim 8a, 8b, Tablo 23).

Hyaluronik asit ve serum fizyolojik grubunun ikili post-hoc analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

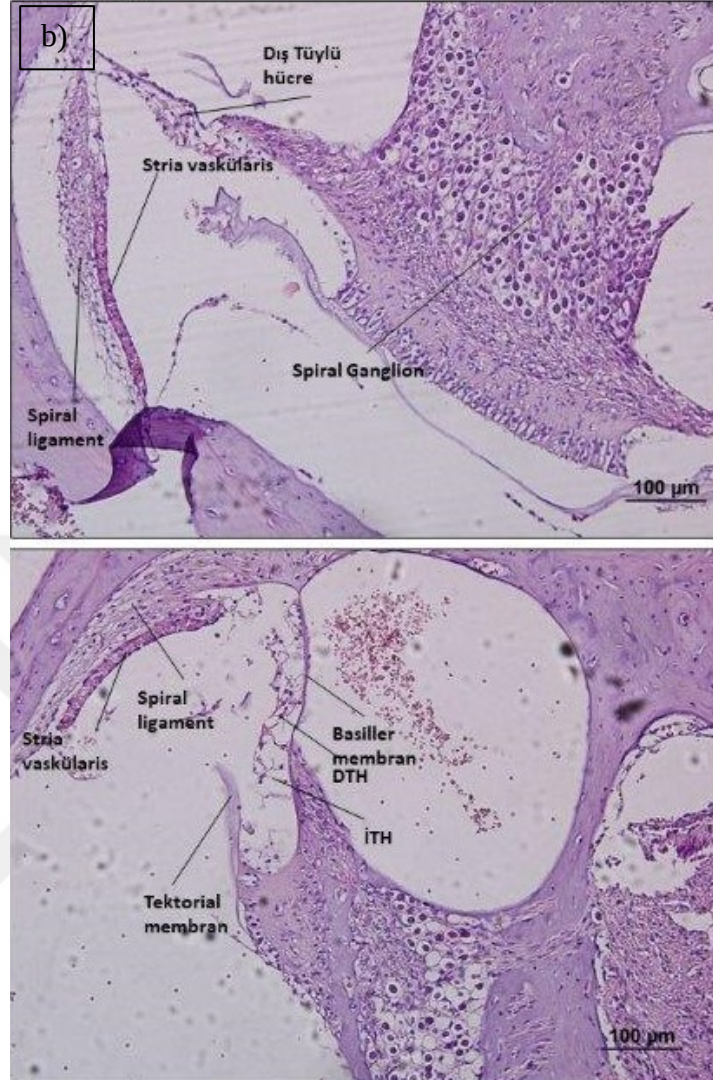
C Grubu



a)Koklear ve vestibüler kesitlerde hüresel vakuolizasyon, spiral limbus ve spiral ganglionda vakuolizasyon, piknozis izlenmektedir.

Odyolojik ve vestibüler hasarın incelendiği analizlerde kombinasyon grubunda izole gentamisin grubuna benzer şekilde, histopatolojik incelemelerde en yüksek hasar oranı olduğu belirlendi (Resim 9a, 9b).

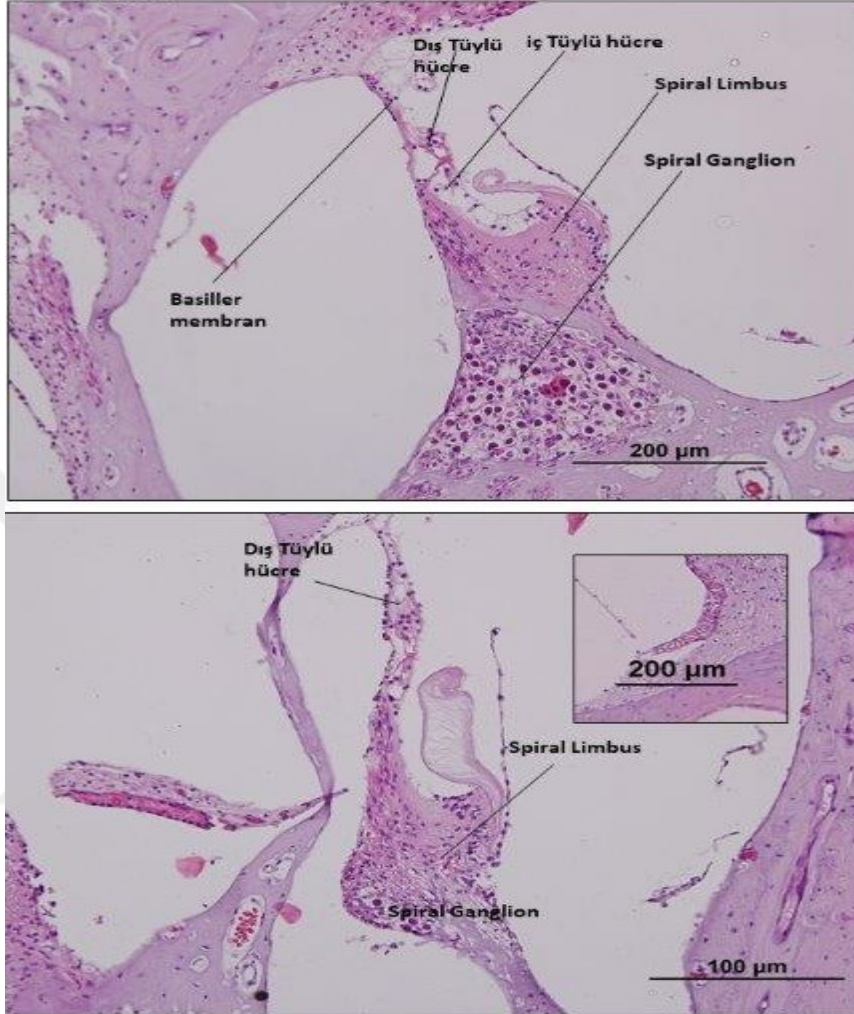
C Grubu



b) Baziller membran, destek hücre, DTH, İTH hasarı. Spiral gangliondaki vakuolizasyon belirgin izlenmekte

C grubunda her bir sıçanın en düşük 13 puan aldığı incelemelerde hasar skoru hyaluronik asit ve serum fizyolojik uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek olarak belirlendi ($p < 0,05$). İzole gentamisin (A) grubundan daha yüksek hasar seviyesi gözlenmesine rağmen her ikisi arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0,05$).

D Grubu



Kontrol grubunda tektorial membrandaki mekanik travma dışında olağan DTH,İTH ve Destek hücre dizilimi

Serum fizyolojik grubunda (D) hyaluronik asit uygulanan gruba (B) benzer şekilde piknozis, vakuolizasyon ve apoptozis skorları düşük olarak hesaplandı. Sıçan bazında alt grup histopatolojik değişimler en yüksek 1 puan olarak derecelendirildi ve totalde her hayvan en yüksek 5 puan aldı. Toplam histopatolojik hasar skoru ise 12 olarak ölçüldü (Resim 10).

Serum fizyolojik ve hyaluronik asit gruplarının ikili post-hoc analizlerinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 23: Histolojik Hasar Skor Tablosu

	DTH	SV	SG	KS	V	TUNEL	KASPAZ
A1	2	1	2	2	2	2	3
A2	1	2	1	2	2	2	2
A3	1	1	2	3	3	2	2
A4	2	2	2	2	2	3	2
A5	2	1	2	2	2	2	2
A6	2	1	1	2	2	2	2
A7	2	0	2	2	2	2	2
B1	0	0	0	1	1	1	1
B2	1	0	0	1	0	1	1
B3	0	1	1	0	0	1	0
B4	1	0	0	0	0	0	0
B5	0	0	0	1	0	0	0
B6	0	0	0	0	1	0	0
B7	2	1	0	0	0	1	1
C1	2	2	2	2	2	2	2
C2	1	2	2	2	2	2	2
C3	2	2	1	2	2	2	2
C4	2	3	2	2	3	2	2
C5	2	2	1	3	2	2	3
C6	2	2	2	1	3	2	2
C7	3	2	2	2	1	3	2
D1	1	1	0	1	0	1	1
D2	0	0	0	1	0	1	0
D3	0	0	0	0	0	0	0
D4	0	0	0	0	0	0	1
D5	0	0	1	0	1	0	0
D6	0	1	0	0	0	0	0
D7	1	0	0	0	0	0	0

A: Gentamisin, B: Hyaluronik asit, C: Gentamisin+Hyaluronik asit, D: Serum fizyolojik, DTH: Dış tüylü hücre, SV: Stria vaskülaris, SG: Spiral ganglion, KS: Koklear sinir, V: Vestibül

Serum fizyolojik ve hyaluronik asit uygulanan gruplar arasında histopatolojik etkilenme açısından anlamlı farklılık bulunmazken, gentamisin ve hyaluronik asit uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$) . Odyolojik ve vestibüler skorlar açısından gentamisin uygulanan gruba benzer toksisite düzeyine ulaşan kombinasyon grubu; histolojik sonuçlarda en yüksek skoru almasına rağmen, ikili analizde gentamisin grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ortaya çıkmadı($p>0,05$).

Tüm grupların histolojik etkilenme skorları Tablo 23'de, ikili karşılaştırma analizleri ise Tablo 25'de verilmiştir.

Tablo 24:Histolojik Etkilenme Tanımlayıcı Analizleri

	n	Ortalama	Min	Maks.	Alt Sınır	Üst Sınır	S.Sapma
Gentamisin	7	13.14	12	15	12.02	14.27	1.2
Hyaluronik asit	7	2.71	1	5	1.14	4.3	1.7
Kombinasyon	7	14.29	13	16	13.26	15.31	1.1
Serum fizyolojik	7	1.71	0	5	0.23	3.2	1.6

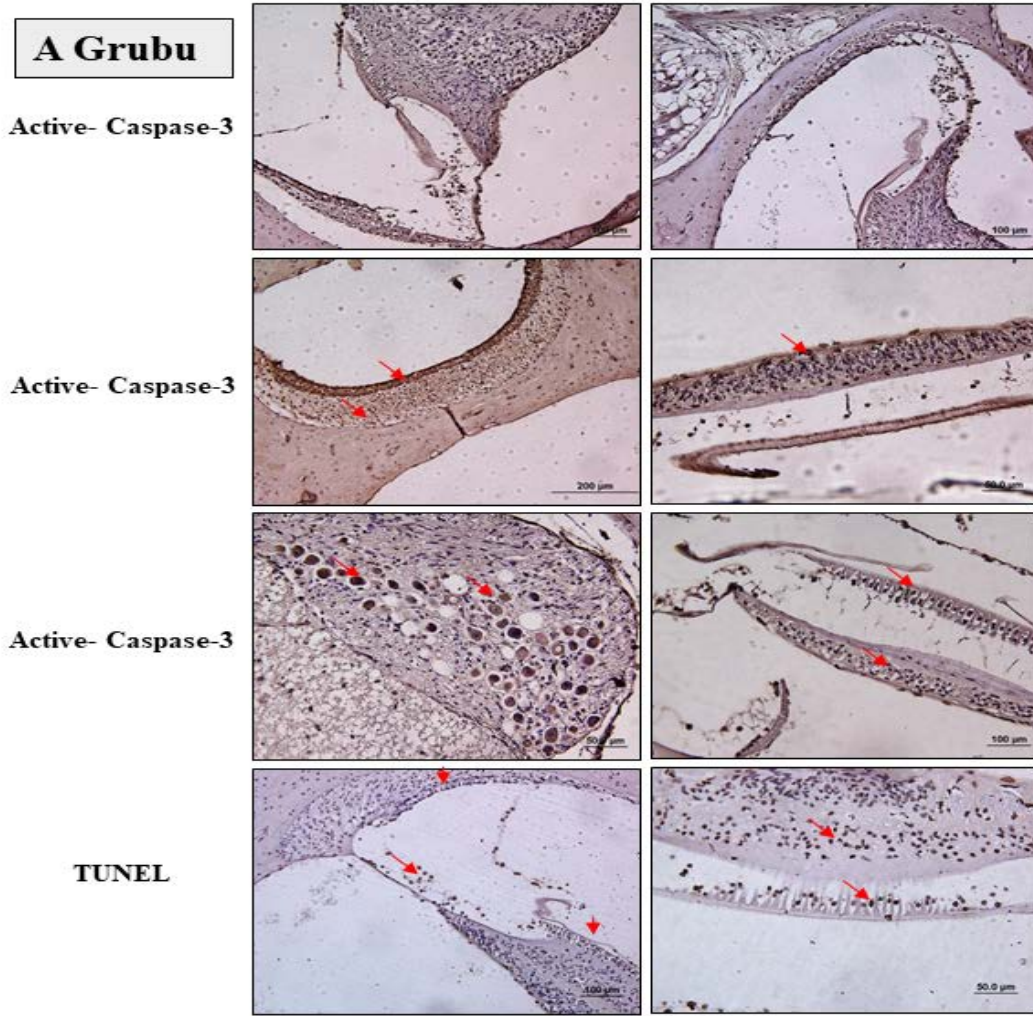
Tablo 25: Histolojik Hasar Analizleri - ANOVA ve İkili Analizde Bonferroni Düzeltmesi

	Ajan	Bonferroni Post-Hoc p*	Std sapma	Alt Sınır	Üst Sınır
Gentamisin	Hyaluronik asit	0.00	0.76	8.23	12.63
	Kombinasyon	0.89	0.76	-3.34	1.06
	Serum fizyolojik	0.00	0.76	9.23	13.63
Hyaluronik asit	Gentamisin	0.00	0.76	-12.63	-8.23
	Kombinasyon	0.00	0.76	-13.77	-9.37
	Serum fizyolojik	1.00	0.76	-1.2	3.2
Kombinasyon	Gentamisin	0.89	0.76	-1.06	3.34
	Hyaluronik asit	0.00	0.76	9.37	13.77
	Serum fizyolojik	0.00	0.76	10.37	14.77
Serum fizyolojik	Gentamisin	0.00	0.76	-13.63	-9.23
	Hyaluronik asit	1.00	0.76	-3.2	1.2
	Kombinasyon	0.00	0.76	-14.77	-10.37

Gentamisin ve kombinasyon gruplarının koklea ve vestibül üzerine olan toksisiteleri incelendiğinde spesifik olarak bir alanda yoğunlaşmayıp, her iki alanda da ağır derecede histopatolojik hasar oluşturdukları görüldü. İki grup arasında bu açıdan anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$).

6.4.2. TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 Kesitleri

Hemotoksilen eozin kesitlerde görülen hücre dejenerasyonu diseksiyon, kesit alımı aşamalarında veya dekalsifikasyon sürecine bağlı olarak da değişebileceği için TUNEL ve Aktive Kaspaz-3 immunohistokimya incelemesi ile hücresel toksisite düzeyi yeniden değerlendirildi (Resim 11 - 14).

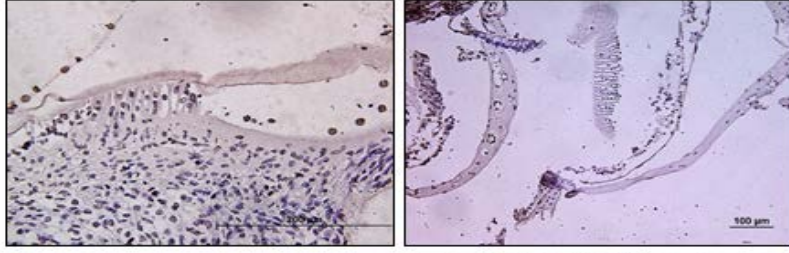


Resim 11:TUNEL ve Caspase Görüntüleme Kesitleri A:Gentamisin grubu

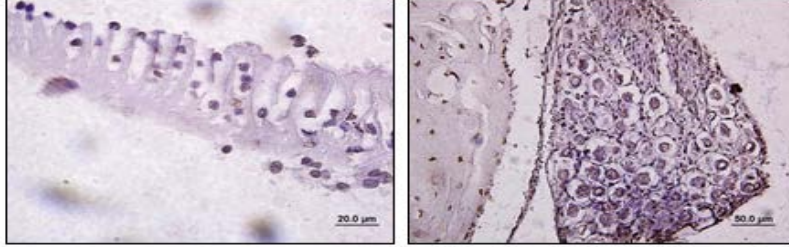
A grubunda kırmızı oklar TUNEL ve Aktive Kaspaz-3 pozitif hücrelerin bulunduğu alanları göstermektedir. Aktif kaspaz-3 kesitlerinde apoptotik yolun son basamağı olan kaspaz-3 sayesinde işaretlenmiş hücreler kırmızı okla gösterilmiştir (Resim 12). Hücrelerde mitokondrial stres sonucu açığa çıkan sitokrom c, apoptotik yolağı, kaspaz-9u, o da kaspaz-3'ü tetkilemiştir ve hücrelerdeki boyanma görülür hale gelmiştir. TUNEL kesitlerinde ise apoptozis sonrası açığa çıkan deoksiribonukleotid uçları terminal deoksiribonukleotidil transferaz (TdT) kullanılarak uç noktalarda çözilemeyen bir substrat haline getirilmiş ve ters metil boyama ile görünür hale getirilmiştir (Resim 11).

B Grubu

Active- Caspase-3



TUNEL

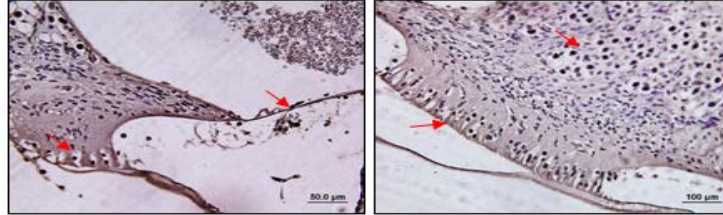


Resim 12: TUNEL ve Caspase Görüntüleme Kesitleri B:Hyaluronik asit grubu

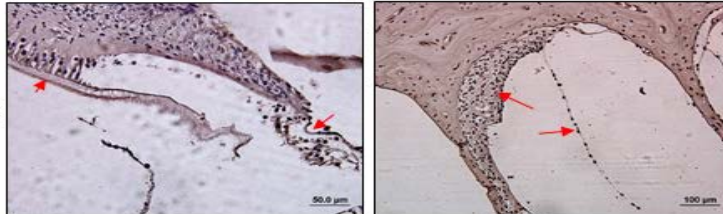
Hyaluronik asit grubunda TUNEL ve aktif kaspaz-3 ile yapılan boyama ve enzimatik işaretlemelerde belirgin apoptozis gösterilmemiştir. İmmunohistomiyasal boyamalarda diğer gruplara göre apoptotik hücre sayısının oldukça az olduğu gözlenmiştir ve reissner ve baziler membrandaki hasarlar kesit alımı ve dekalsifikasyon süreçlerine bağlanmıştır (Resim 12).

C Grubu

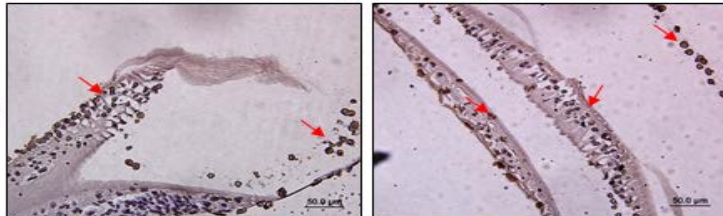
Active- Caspase-3



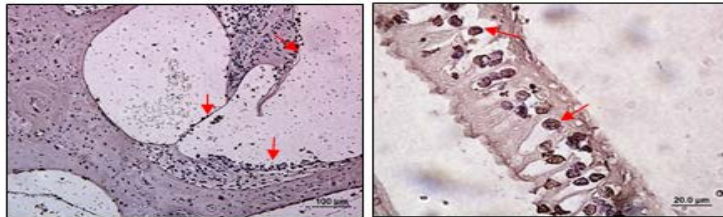
Active- Caspase-3



Active- Caspase-3

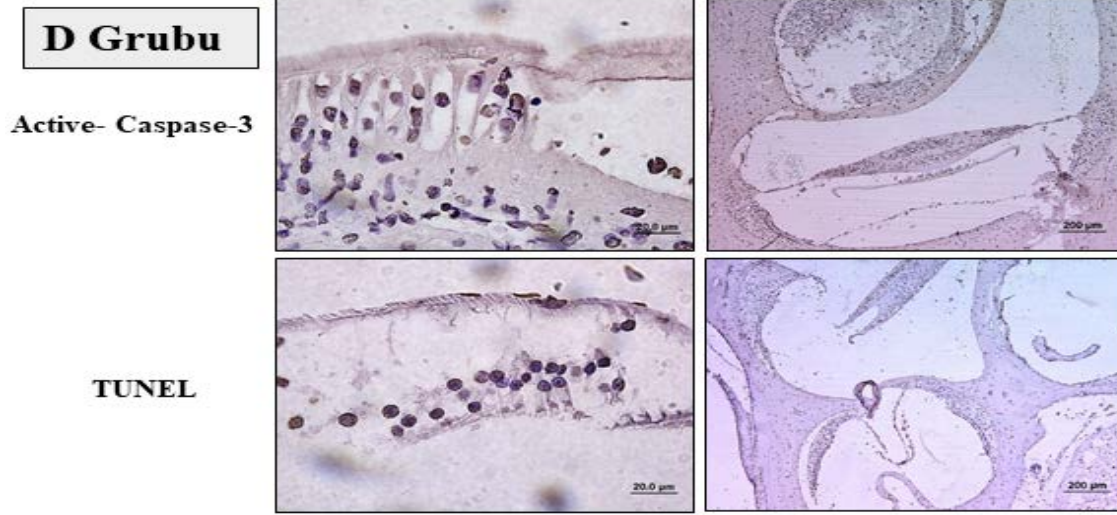


TUNEL



Resim 13: TUNEL ve Caspase Görüntüleme Kesitleri C: Kombinasyon grubu

C Grubunda kırmızı oklar TUNEL ve Kaspaz-3 pozitif hücreler içeren alanları göstermektedir. Reissner membranı, spiral limbus ve Corti organı düzeyindeki immümpozitif hücrelerdeki apoptotik boyanma kırmızı oklarla gösterilmiştir (Resim 13).



Resim 14: TUNEL ve Caspase Görüntüleme Kesitleri D:Serum fizyolojik grubu

D grubundaki görünüm hyaluronik asit grubuna benzer şekilde travmatik hasar olarak düşünüldü ve TUNEL ve Aktive Kaspaz-3 immünpozitif hücre sayısı diğer gruplara göre oldukça azalmıştı (Resim 14).

7. TARTIŞMA

Sıçanlar işitme açısından insan kulağına göre çok daha duyarlı ve toksik maruziyet halinde hasar düzeyi; işitsel beyin sapı potansiyelleri ölçülerek saptanabilen hayvanlardır. Temporal kemik anatomisi insanlara çok fazla benzemese de, iç kulak patolojisi gelişmesi halinde toksisite düzeyleri; elektrofizyolojik testler, vestibüler değerlendirmeler ve histopatolojik incelemelerle tespit edilebilmektedir.

Çalışmamızda sıçan kulağında analogunu kullandığımız hyaluronik asit molekülü vücudumuzda ekstraselüler mesafede, sinoviyal sıvıda, kan plazmasında, iç kulakta yoğunlukla koklea lateral duvarda, endolenfatik kese, tüylü hücreler arası mesafede ve vestibüler perilenfte bulunmaktadır³¹.

Hyaluronik asit; idiyopatik ani işitme kaybında ve Meniere hastalığı tedavisinde kortikosteroidlerle ve vestibülotoksik aminoglikozidlerle birlikte kombine olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda kombine edildiği ajanın yuvarlak pencere ile temasını artırarak etki süresini uzattığı, perilenf konsantrasyonlarını arttırarak gereken minimum etkili dozu azalttığı gösterilmiştir^{7,41,105}. Kullanılan çapraz bağlı hyaluronik asit polimerleri; karboksil ve hidroksil grupları farklı sayı ve geometrilere, amino ve aldehit grupları sayesinde farklı formüllerde üretilmektedir. Farklı formlarının stabilizasyonları, difüzyon katsayıları ve depo edebildikleri ilaç yükü değişmektedir ve bu farklıları sayesinde orta kulakta jel formda uzun süre kalıp, hedef ajanın östaki tüpünden elimine olmaksızın perilenfe uzamış difüzyonunu sağlamaktadırlar^{70,106,107}. Gelişen teknolojiyle birlikte farklı analogları ve yeni çapraz bağlı formları üretilen bu ilaçlar aynı zamanda rejenerasyonu hızlandırması, iyileşme sürecinde doku destek elemanı olarak görev yapabilmesi, cerrahi yaralarda sineşi azaltmasına katkısı nedeniyle literatürdeki çalışmalara sıklıkla konu olmuştur^{44,73}.

Bizim çalışmamızda da gentamisin ile hyaluronik asit kombinasyonunun iç kulak etkilerini saptamaya yönelik olan ABR, vestibüler denge testleri ve histopatolojik incelemeler uygulandı.

ABR yanıtları incelendiğinde; 24. saatten itibaren, izole gentamisin enjeksiyonu uygulanan grupta, 20 kHz frekansı haricinde tüm frekans eşiklerinde yükselme olduğu görüldü. Kelly'nin 1999 yılında; intratimpanik uygulanan gentamisinin orta kulaktan iç kulağa transportunu incelediği çalışmada; ajanın %66'lık kısmının ilk 24 saatte salındığını, kalan kısmının ise yavaş difüzyona uğradığı belirtilmiştir¹⁰⁸. Bizim çalışmamızda da gentamisinin, ilk 24 saatte etkisini, klinik testlere yansıyabilecek şekilde gösterdiği, etkinin sonraki günlerde de artarak devam ettiği saptandı. Gentamisinin kümülatif etkisiyle uyumlu şekilde; ilk 7 gün toksisite şiddetinin arttığı, 7. günden sonra enjeksiyon uygulanmamasına rağmen eşik ortalamalarının artmaya devam ettiği saptandı. İlacın ABR eşik ölçümünde maksimum etkisinin 10. günde olduğu ölçüldü. Bu bulgular uygulama sonrası dönemde de devam eden ilaç difüzyonu ve apoptozis kaskadı nedeniyle, toksisite riskinin devam ettiği görüşünü desteklemektedir^{7,46}.

Hyaluronik asit enjeksiyonu uygulanan B grubu ile serum fizyolojik uygulanan kontrol D grubunun işitme eşikleri yapılan analizlerde, 24. saatten itibaren benzer sonuçlar vermiştir. Her iki grup arasında 1. , 7. ve 10. gün yapılan testlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu da Anniko'nun 1987, Martini'nin 1992, Zou'nun 2017 yılında yaptığı; hyaluronik asitin iç kulağa toksik etkisinin olmadığını gösterdiği çalışmalar ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda daha önceki çalışmalardan farklı olarak hyaluronik asit grubunun incelemelerinde, ilk günlerden itibaren hayvanların otomikroskopik bakılarında zar arkasında efüzyon izlenmiş ve buna bağlı olarak ABR eşiklerinde hafif bir yükselme saptanmıştır. Değişimler serum fizyolojik grubuyla (D) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmasa da, 7. günden sonraki enjeksiyonsuz dönemde işitme eşiklerin düzeldiği gösterilmiştir. Angeli'nin 2007'de kobaylarda, Martini'nin ise 1992'de sıçanlarda hyaluronik asitin geçiçi efüzyon etkisi yaptığı görüşüne paralel olarak; bu grupta 10. gün tüm frekans düzelerinde eşiklerinin düzelmiş olması, efüzyona sebep olan çapraz bağlı hyaluronik asitin yarı katı

formunun sıvıya dönüşmesi ve östaki tüpünden elimine olmasıyla açıklanabilir^{75,109,110}.

Çalışmamızda 24. saatten itibaren gentamisin (A) ve kombinasyon (C) enjeksiyonları uygulanan gruplarda işitme eşiklerinin benzer şiddette yükseldiği gözlemlendi. Kombinasyon grubunda özellikle 4 kHz frekansında işitme eşiklerinde belirgin etkilenme izlendi. İzole gentamisin enjeksiyonu uygulanan grupta işitme eşiklerinin kombinasyon grubuna kıyasla daha çok etkilendiği, her iki grubun karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı gözlemlendi. Her iki grup için 24. saat, 7. gün ve 10. gün ölçülen birbirine yakın sonuçlar; hyaluronik asit kombinasyonunun izole gentamisin uygulamasıyla karşılaştırıldığında uzamış salınım ve artmış difüzyon açısından avantaj sağlamadığını düşündürdü. MacKeith ve ark. 2014 yılında Meniere hastalarında yaptıkları çalışmada; orta kulağa yuvarlak pencere önüne uyguladığı gentamisin emdirilmiş hyaluronik asit tampon uygulamasında, uzamış temas ve salınım süresine bağlı olarak hastaların %50'sinde işitme kaybı, %16'sında ise total işitme kaybı geliştiği saptanmış, hyaluronik asitin belirgin şekilde gentamisin geçişini arttırdığı gösterilmiştir¹⁶. Bizim çalışmamızdaki bulgularımız MacKeith'in çalışmasını desteklememekle birlikte, uygulanan canlının ve enjeksiyon metodunun farklı seçilmiş olmasının, sonuçları da etkilemiş olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca çalışmamızda kullandığımız sıçanlarda yuvarlak pencerenin geçirgenlik düzeylerine yönelik bir ön inceleme yapılmamıştır. Yoshioka 2009 yılında yaptığı araştırmada insanlarda yuvarlak pencere geçirgenliğini; %5 oranında 'hiç yok', %13 oranında ise 'çok az' şeklinde tanımlamıştır. Bu bilgilere dayanarak, kullandığımız sıçanların yuvarlak penceresinde de benzer kalınlık ve geçirgenlik farklılıklarının olabileceği, enjekte edilen ajanların iç kulağa ulaşamama riski olduğu unutulmamalıdır.

Gentamisin ve hyaluronik asit + gentamisin kombinasyonu enjeksiyonları uygulanan gruplarda işitme eşiklerinin tüm frekanslarda arttığı saptandı. Gentamisin enjeksiyonu uygulanan grupta 4, 8, 16, 32 kHz frekans eşiklerinde 1. günden itibaren, kombinasyon grubunda 4 kHz frekans eşiklerinde 1. gün, 8, 16, 20 ve 32 kHz frekans eşiklerinde de 7. günden itibaren belirgin yükselme saptandı. Zhou'nun

2018'de farelerle yaptığı gentamisin çalışmasıyla uyumlu olarak, ölçülen tüm frekans eşiklerinde deney süresince etkilenme gözlendi². Farklı olarak Zhou'nun çalışmasında farelerde gentamisin etkisi ABR eşikleri ile 5 ve 6. haftada ölçülürken, bizim çalışmamızda 1, 7 ve 10. günlerde ölçülmüştür. Ayrıca bizim çalışmamızda tiz frekans etkilenmesi pes frekanslara göre daha yüksek seviyelerde ölçülmüş ve bu etkinin eşik ölçümlerini daha erken dönemde yapmamıza bağlı olduğu düşünülmüştür.

Değişik ilaçların vestibüler fonksiyonlarına etkilerini ölçmek amacıyla; hayvan deneylerinin farklı aşamalarında davranışsal denge testleri uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalara baktığımızda; vestibülotoksik uygulamaların etkilerini ölçmek için yapılan denge testlerinin, ajan uygulamaları sonrasında ilk saatlerden itibaren yapılabildikleri gösterilmiştir. Dyhrfeld ve ark. 2013 yılında; sıçanlarda intratimpanik kainik asit ile yaptığı vestibulotoksikite modelinde etkiyi 90. dakikada görmüş ve 3. saatte maksimum etki skorunu ölçmüştür⁸⁸. Cassel ise 2018 yılında; farelerde intratimpanik kainik asitin etkilerini ölçtüğü çalışmada 4. saatte maksimum etki düzeyini ölçmüştür⁹⁴. Tian ve ark. 2013 yılında sıçanlarda gentamisinin, Wu ve ark. 2017 yılında farelerde sisplatinin denge fonksiyonlarına etkilerini inceledikleri çalışmalarda ilk olarak 7. günde vestibüler testlerde etki gözlemişlerdir^{5,42,98}. Biz de çalışmamızda sıçanlara ilk olarak enjeksiyon sonrası 24. saatte denge testlerini uyguladık.

Güneri ve ark. 2017 yılında sıçanlarda intratimpanik gentamisin ve deksametazon etkisini inceledikleri çalışmada 7 ve 21. gün, Balbuena ve Llorens ise yine sıçanlarda nitril türevlerinin vestibültoksisitesini inceledikleri çalışmada 5., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerde devam eden vestibüler etkilenmeyi denge testleriyle ölçmüşlerdir^{42,102}. Biz çalışmamızda 24. saate ek olarak 7. ve 10. günlerde devam eden vestibüler hasar düzeyini hesapladık.

Bu bulgulara göre gentamisin enjeksiyonu uygulanan grubun vestibüler disfonksiyon skorunun toplam 221 olduğu, kombinasyon enjeksiyonu uygulanan grubun ise 169 olduğu saptandı. Bu iki grup (A ve C grubu), diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturdukları, kendi aralarında yapılan analizlerde ise anlamlı farklılık oluşturmadıkları görüldü. İlk 24

saatten itibaren gentamisin verilen tüm hayvanlarda (A ve C Grupları, n:14) denge testlerinin en az birinde hasar skoru tespit edildi.

Gentamisin uygulanan grupta 24. saat vestibüler etkilenme skor ortalaması 5.43 , 7. gün 11.29 ve 10. gün 14.86 olarak ölçüldü. Gentamisin'in vestibülotoksik etkisinin kokleotoksisite gibi geriye dönüşümsüz olması ile uyumlu olarak; enjeksiyon sonrası dönemde hasarın geriye dönmediği, 10. günde maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlendi. Çalışma süresince yapılan testlerde; vestibüler etki skorlarının ABR eşiklerindeki bozulmaya benzer şekilde arttığı ve 24. saatten itibaren kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturduğu görüldü. Chia'nın 2004 yılında Meniere hastalığında intratimpanik gentamisin protokollerini incelediği meta-analizde, Pike 2007 yılında kedilerde gentamisinin vestibülotoksisitesini incelediği çalışmada gentamisinin selektif vestibülotoksik etkisi vurgulanmıştır. Sheppard'ın 2004 yılında deney hayvanlarında intratimpanik gentamisinin etkilerini incelediği çalışmada ise gentamisinin vestibül selektif olduğunu düşündürecek bulgu olmadığı belirtilmiştir^{53,112,113}. Bizim çalışmamızda da koklear ve vestibüler toksisite benzer şiddette gelişmiş, vestibüler denge skorlarının kokleotoksisiteyi ölçen eşik ölçüm testleriyle paralel seyrettiği gözlenmiş ve selektivite lehine düşündürecek bulgu saptanmamıştır.

Hyaluronik asit uygulanan B grubunun vestibüler testlerine bakıldığında; 24. saatte hiçbir sıçanın denge fonksiyonlarında bozulma saptanmazken, 7. ve 10. günlerde de benzer şekilde hiçbir sıçanda toksik etki gözlenmedi. Tüm grubun deney boyunca aldığı toplam puan 21 olarak ölçüldü. Yapılan araştırmalarda; Anniko 1987 yılında sıçanlara intratimpanik olarak uyguladığı hyaluronik asit çalışmasında, Bagger 1991 yılında kobaylarda stapes tabanını çıkararak, oval pencere nişine uyguladığı hyaluronik asit incelemesinde, Angeli 2007 yılında kobaylarda orta kulakta yara iyileşmesini hyaluronik asit ekleyerek inceledikleri çalışmalarda iç kulak toksisitesi gelişmediğini belirtmişlerdir^{76,114,115}. Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak, izole hyaluronik asit uygulaması yaptığımız grupta toksik etki gözlenmemiş, kontrol grubu ile yapılan ikili analizlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Hyaluronik asit ve gentamisin kombinasyonu uygulanan C grubunun vestibüler etkilenme puanları incelendiğinde; izole gentamisin grubuna benzer şekilde 24. saatten itibaren vestibülotoksik etki olduğu gözlemlendi. Yedinci ve 10. gün skorları sırasıyla 70 ve 74 puan şeklinde hesaplandı. Bu skorlar izole gentamisin grubundan daha az olmakla birlikte, istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılık oluşmadığı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda hyaluronik asitin; intratimpanik uygulanan ajanlarla kombine edildiğinde uzamış salınım, yuvarlak ve oval pencere temas artışı ile iç kulağa difüzyonu artırdığı savunulmuştur. Bunlar arasında; Kelly 1999 yılında hyaluronik asitin intratimpanik gentamisin salınımının süresini uzattığını ve ilacın verimliliğini artırdığını, Borden 2010 yılında intratimpanik deksametazonun hyaluronik asitle kombine edildiğinde perilenfte belirgin olarak daha yüksek saptandığını belirtmişlerdir^{8,108}. Aynı zamanda kombinasyonlarda kullanılan hyaluronik asit molekül formunun da önemli olduğu vurgulanmıştır¹⁰⁷. Bizim çalışmamızda kullanılan hyaluronik asit analogu ve gentamisin kombinasyonunun, izole gentamisin enjekte edilen grupla karşılaştırıldığında; tüm verilerin benzer olduğu ve mevcut ototoksik etkiyi anlamlı olarak değiştirmedeği saptandı.

İlaçlar koklea ve vestibül düzeyindeki etkileri histopatolojik olarak da saptanabilmekte, hasar düzeyleri objektif skorlamalar ile incelenebilmektedir. Groot 1997 yılında kobaylarda sisplatin toksisitesi oluşturup tüylü hücre sayımı ile hasar düzeyinin orantılı olduğunu belirtmiş ve Freitas 2009 yılında sıçanlarda yaptığı sisplatin ototoksikite modelinde hücesel hasar ve apoptozis düzeylerini derecelendirmiştir^{104,118}. Bizim çalışmamızda da histolojik incelemelerde hematoksilen-eozin, kaspaz-3 ve TUNEL yöntemleri ile Corti organı, stria vaskülaris, spiral ganglion, koklear sinir, utrikul ve sakkul makulasındaki hasar skorlanarak incelenmiştir.

B.King 2017 yılında kobaylarda oval pencere nişine gentamisin enjeksiyonu uyguladığı çalışmada belirgin işitme kaybı olmaksızın vestibül toksisitesi oluşturulabildiğini savunmuş fakat hematoksilen-eozin incelemesinde koklea ve vestibül düzeylerinde hücresele toksisite olduğunu belirtmiş fakat istatistiksel anlamlı farklılık saptamamıştır¹¹⁶. Ayrıca hematoksilen-eozin incelemesi yalnızca morfolojik

değişiklere yönelik bulgular verdiğiinden ve mekanik travmayla da oluşabildiğinden, apoptozisin kesin yöntemi olarak kabul edilmemektedir. Hücrel toksisitenin daha anlamlı belirteçleri olan caspas-3 ve TUNEL incelemeleri; hematoksilen-eozin boyamada ortaya çıkan bulguları kesinleştirmek için kullanılmaktadırlar. Olgun 2014 yılında sıçanlarda resveratrolün sisplatin ototoksitesine etkisini incelediği, Jo ise 2019 yılında ferulik asitin sisplatin toksisitesine etkisi incelediği in vitro çalışmada; caspas-3 ve TUNEL incelemelerini kullanmışlardır^{18,22}. Bizim çalışmamızda da hematoksilen-eozin kesitlerinde morfolojik hasar gözlemlendikten sonra kesitler kaspaz-3 ve TUNEL incelemelerine tabi tutulmuştur.

Histolojik sonuçlarımıza baktığımızda; gentamisin içeren gruplarda; hematoksilen-eozin, kaspaz-3 ve TUNEL incelemelerinde ağır toksik hasar olduğu saptandı. İzole gentamisin grubunda histolojik hasar skoru ortalaması 13.14 olarak hesaplanırken, bu sonuçların hyaluronik asit ve kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşturduğu gözlemlendi.

Hyaluronik asit ve serum fizyolojik, iç kulağa toksik etkisi olmayan maddeler olarak kabul edilmektedir. Zou 2017 yılında sıçanlarda iç kulağa hyaluronik asit transportu sonrasında hematoksilen-eozin ve TUNEL kesitlerde toksisite oluşturmadığını göstermiştir¹¹⁰. Bizim çalışmamızda da hyaluronik asit ve serum fizyolojik gruplarında hematoksilen-eozin kesitlerinde hafif morfolojik hasar ve vakuolizasyon saptanmasına rağmen, kaspaz-3 ve TUNEL incelemelerinde anlamlı değişiklikler izlenmemiştir.

Çapraz bağlı hyaluronik asit'in yuvarlak pencere ile temas süresini uzatarak birlikte uygulandığı ajanın etkisini artırdığı literatürde histopatolojik incelemelerle de gösterilmiştir¹¹⁸. Bizim çalışmamızda da intratimpanik hyaluronik asit ile kombine olarak gentamisin kullanılmıştır. İncelemelerde kombinasyon grubunda vestibüler hasar skoru ortalaması 14.29 olarak en yüksek seviyede saptanmış olsa da, izole gentamisin ile karşılaştırıldığında; ABR, vestibüler denge testleri ve histopatolojik incelemelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadığı saptanmıştır.

Tüm sonuçlarımıza baktığımızda, yuvarlak pencere ile temas süresini ve etki düzeyini arttırmayı hedeflediğimiz gentamisin ve hyaluronik asitin kombinasyonun

avantajlarına dair istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir. B.King'in 2013 yılında kobaylarda oval ve yuvarlak pencereye gentamisin uyguladığı çalışmada; oval pencereden trasportun yuvarlak pencereden daha çok olduğu ve vestibüler toksisitenin ışık mikroskopisinde daha belirgin olarak saptandığı belirtilmiştir¹¹⁷. Bizim çalışmamızda ise orta kulak hacmi tamamen doldurulmuş ve hedef ajanın hangi yolu daha çok kullandığına bakılmaksızın, yuvarlak pencere, oval pencere ve diğer anatomik dehissanslardan difüzyonu ile perilenf konsantrasyonları arttırılmaya çalışılmıştır.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çapraz bağılı hyaluronik asit preparatları otolojik ilaç uygulamalarında toksisite riski olmaksızın kullanılabilirler ve çalışmamızın sonuçları bu görüşü desteklemektedir. Orta kulakta gentamisin gibi ajanların orta kulakta kalış süresini, yuvarlak ve oval pencere temas süresini uzatarak, iç kulağa transferini hızlandırabilmekte ve hedeflenen etki düzeyini arttırabilmektedirler. Formlarının yarı katı olması nedeniyle orta kulakta geçici efüzyona sebep olmaları yan etki olarak dikkat çekmektedir.

Çalışmamızın gentamisin uygulaması sonuçlarına baktığımızda; ABR eşikleri, vestibüler etki skorları ve histolojik incelemeleri açısından ilacın selektif kokleotoksik veya vestibülotoksik olduğunu düşündürecek bulgulara rastlanmamıştır. Kombinasyon grubunun histopatolojik bulgular açısından en şiddetli hasar grubu olması; hedef ajanın kontrollü salınımı ve uzamış difüzyonu amacıyla kullanılabileceğini düşündürmüş olsa da izole gentamisin grubuna göre istatistiksel olarak belirgin farklılık oluşturmaması bu hipotezimizi zayıflatmaktadır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda; yara iyileşmesi, anti-oksidan ve rejenerasyon modülatörü etkileri olduğu belirtilen çapraz bağılı hyaluronik asit molekülünün bu özelliklerini destekleyecek histopatolojik bulgulara da çalışmamızda rastlanmamıştır. Bununla birlikte çapraz bağılı hyaluronik asit ve gentamisin kombinasyonunun iç kulaktaki etkilerini incelediğimiz bu çalışma, odyolojik ölçümler, vestibüler değerlendirmeler ve histolojik incelemelerin tamamının birlikte uygulandığı ender çalışmalardan biridir. Bu nedenle ototoksisite; farklı kategorilerdeki inceleme tetnikleri bir arada kullanılarak daha geniş kapsamlı incelenebilmiştir. Ayrıca histopatolojik incelemeler bu tip çalışmalarda çok önemli bir yere sahip olsa da; deneylerin sadece son aşamasına dair bulgular vermesi nedeniyle, kullanılan ilaçların çalışma süresince iç kulaktaki dinamiklerini yansıtmakta yetersiz kalmaktadır. Çalışmamızın ara aşamalarında ilaçların perilenf düzeylerine ve hücresel düzeydeki etkilerine dair bulgularımızın olmaması bir eksiklik olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca farklı araştırmalarda kullanılan canlıların anatomilerindeki çeşitlilik nedeniyle, aynı doz ve metodlarla verilmesine rağmen ilaçların iç kulak kinetikleri değişebilmekte, farklı kalınlık ve geçirgenlik düzeyine

sahip olan yuvarlak ve oval pencerelerin durumu yapılan araştırmaların sonuçlarını doğrudan etkileyebilmektedir.

Sonuç olarak, bizim kullandığımız metodlarla çapraz bağlı hyaluronik asit moleküllerinin iç kulağa toksik etki yapmadığı düşünülmüş, izole gentamisinle karşılaştırıldığında ABR eşiklerine, vestibüler denge skorlarına ve histopatolojik bulgulara anlamlı katkısının olmadığı saptanmıştır. Hyaluronik asit molekülünün, farklı doz ve yöntemlerle uygulanan ilaçlarla kobinasyonlarının denendiği, ilaç kinetiğinin ve hücresel değişikliklerin çok zamanlı testlerle incelendiği ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



9. KAYNAKÇA

1. Joo Y, Cruickshanks KJ, Klein BEK, Klein R, Hong O, Wallhagen M. Prevalence of ototoxic medication use among older adults in Beaver Dam, Wisconsin. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2018;30(1):27-34.
2. Zhou M, Sun G, Zhang L, et al. STK33 alleviates gentamicin-induced ototoxicity in cochlear hair cells and House Ear Institute-Organ of Corti 1 cells. *J Cell Mol Med.* 2018;(11):5286-5299.
3. Rybak L, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int.* 2007;72(8):931-5.
4. Jia Z, He Q, Shan C, Li F. Tauroursodeoxycholic acid attenuates gentamicin-induced cochlear hair cell death in vitro. *Toxicol Lett.* 2018;294:20-26.
5. Tian CJ, Kim SW, Kim YJ, et al. Red ginseng protects against gentamicin-induced balance dysfunction and hearing loss in rats through antiapoptotic functions of ginsenoside Rb1. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:369-376.
6. Lin SCY, Thorne PR, Housley GD, Vlajkovic SM. Resistance to neomycin ototoxicity in the extreme basal (hook) region of the mouse cochlea. *Histochem Cell Biol.* 2018;150(3):281-289.
7. Hao J, Li SK. Inner ear drug delivery: Recent advances, challenges, and perspective. *Eur J Pharm Sci.* 2019;126:82-92
8. Borden RC, Saunders JE, Berryhill WE, Krempel GA, Thompson DM, Queimado L. Hyaluronic acid hydrogel sustains the delivery of dexamethasone across the round window membrane. *Audiol Neurotol.* 2010;16(1):1-11.
9. Rogha M, Kalkoo A. Therapeutic effect of intra-tympanic dexamethasone-hyaluronic acid combination in sudden sensorineural hearing loss. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2017;29(5):255-260.
10. Lee JJ, Jang JH, Choo OS, Lim HJ, Choung YH. Steroid intracochlear distribution differs by administration method: Systemic versus intratympanic injection. *Laryngoscope.* 2018;128(1):189-194.
11. Xu X. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to

- Complex Networks. *Soft Matter*. 2012;8(12):3280-3294.
12. Creber NJ, Eastwood HT, Hampson AJ, Tan J, O'Leary SJ. Adjuvant agents enhance round window membrane permeability to dexamethasone and modulate basal to apical cochlear gradients. *Eur J Pharm Sci*. 2019;126:69-81.
 13. Heo JY, Noh JH, Park SH, et al. An Injectable Click-Crosslinked Hydrogel that Prolongs Dexamethasone Release from Dexamethasone-Loaded Microspheres. *Pharmaceutics*. 2019;11(9):438.
 14. McCall AA, Swan EEL, Borenstein JT, Sewell WF, Kujawa SG, McKenna MJ. Drug delivery for treatment of inner ear disease: Current state of knowledge. *Ear Hear*. 2010;31(2):156-165.
 15. Wu Q, Zhang Y, Dai C, Kong Y, Pan L. The Degeneration of the Vestibular Efferent Neurons After Intratympanic Gentamicin Administration. *J Histochem Cytochem*. 2018;66(11):801-812
 16. Mackeith SAC, Whiteside JH, Mawby T, Bottrill ID. Middle Ear Gentamicin-Soaked Pledgets in the Treatment of Ménière's Disease. *Otol Neurotol*. 2014;35(2):305-9.
 17. Chen Y, Huang WG, Zha DJ, et al. Aspirin attenuates gentamicin ototoxicity: From the laboratory to the clinic. *Hear Res*. 2007;226(1-2):178-182.
 18. Jo ER, Youn CK, Jun Y, Cho S Il. The protective role of ferulic acid against cisplatin-induced ototoxicity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019;120:30-35.
 19. Olgun Y, Kırkım G, Altun Z, et al. Protective effect of Korean Red Ginseng on cisplatin ototoxicity: Is it effective enough? *J Int Adv Otol*. 2016;12(2):177-183.
 20. Ikiz AÖ, Şerbetçioğlu B, Güneri EA, Sütay S, Ceryan K. Investigation of topical ciprofloxacin ototoxicity in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 1998;118(6):808-812.
 21. Özel HE, Özdoğan F, Gülşen Gürgen S, Esen E, Selçuk A, Genç S. Effect of transtympanic betamethasone delivery to the inner ear. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2016;273(10):3053-3061.
 22. Saldaña-Ruiz S, Hernández-Mir G, Sedó-Cabezón L, Cutillas B, Llorens J. Vestibular toxicity of cis-2-pentenitrile in the rat. *Toxicol Lett*. 2012;211(3):281-288.

23. Cobanoglu HB. Is Hyperbaric Oxygen Therapy Effective in Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2019;12(1):66-71.
24. Olgun Y, Kırkım G, Kolatan E, et al. Friend or foe? Effect of oral resveratrol on cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope*. 2014;124(3):760-766.
25. Altun Z, Olgun Y, Ercetin P, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine against cisplatin ototoxicity: Role of apoptosis-related genes and pro-inflammatory cytokines. *Cell Prolif*. 2014;47(1):72-80.
26. Olgun Y, Altun Z, Aktas S, et al. Molecular mechanisms of protective effect of resveratrol against cisplatinium induced ototoxicity. *J Int Adv Otol*. 2013;9(2):145-152.
27. Doğan E, Olgun Y, Kırkım G, et al. The protective effect of recombinant human Erythropoietin against Cisplatin-induced ototoxicity. *J Int Adv Otol*. 2014;10(3):205-210.
28. Mackeith SAC, Whiteside OJH, Mawby T, Bottrill ID. Middle ear gentamicin-soaked pledgets in the treatment of ménière's disease. *Otol Neurotol*. 2014;35(2):305-309.
29. Saliba I, Woods O. Hyaluronic acid fat graft myringoplasty: A minimally invasive technique. *Laryngoscope*. 2011;121(2):375-380.
30. Chauvin K, Bratton C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;121(1):43-47.
31. Danckwardt-Lillieström N, Laurent C, Hellström S, Friberg U, Kinnefors A, Rask-andersen H. Localization of hyaluronan in the human endolymphatic sac: A study using the affinity hyaluronan binding protein. *Acta Otolaryngol*. 1994;114(3):382-386.
32. Liu J, Zhang D, Lian S, et al. Redox-responsive hyaluronic acid-functionalized graphene oxide nanosheets for targeted delivery of water-insoluble cancer drugs. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:7457-7472.
33. Hong L, Shen M, Fang J, et al. Hyaluronic acid (HA)-based hydrogels for full-thickness wound repairing and skin regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2018;29(9):150.
34. Rita M. Schuman, Gregory J. Matz. Bailey BJ, Johnson JT NS. Baş&Boyun Cerrahisi - Otolarengoloji.; 2011;4:2201-2207
35. M.D. Bajin. Aurikula ve Temporal Kemiğin Embriyolojik Gelişimi. Metin O,

- Guneri EA. Kulak Burun Boğaz Ve Baş Boyun Cerrahisi - 1 Otoloji. 2016;1:1- 6
36. Seabury F. A Scanning electron microscopic study of the utricule trichomes in *utricularia biflora* lam. Botanical Gazette. 2015;136(1):87-93.
37. Pickels JO. The Cochlea. An Introduction to the Physiology of Hearing. 1988;4:25-73
38. Martins-Lopes V, Bellmunt A, Greguske EA, Maroto AF, Boadas-Vaello P, Llorens J. Quantitative Assessment of Anti-Gravity Reflexes to Evaluate Vestibular Dysfunction in Rats. J Assoc Res Otolaryngol. 2019. [Epub ahead of print]
39. Staecker H, Praetorius M, Baker K, Brough DE. Vestibular hair cell regeneration and restoration of balance function induced by *math1* gene transfer. Otol Neurotol. 2007;28(2):223-231.
40. M.E. H, R.D. K, P. W, et al. Use of the Round Window Microcatheter in the treatment of Meniere's disease. Laryngoscope. 2001;111(11 I):2046-2049.
41. Shibata SB, Cortez SR, Wiler JA, Swiderski DL, Raphael Y. Hyaluronic Acid Enhances Gene Delivery into the Cochlea. Hum Gene Ther. 2011;23(3):302-310.
42. Guneri EA, Olgun Y, Aslier M, et al. Cochlear and Vestibular Effects of Combined Intratympanic Gentamicin and Dexamethasone. J Int Adv Otol. 2017;13(1):47-52.
43. Plontke SK, Salt AN. Local drug delivery to the inner ear: Principles, practice, and future challenges. Hear Res. 2018;368:1-2.
44. Creber NJ, Eastwood HT, Hampson AJ, Tan J, O'Leary SJ. Adjuvant agents enhance round window membrane permeability to dexamethasone and modulate basal to apical cochlear gradients. Eur J Pharm Sci. 2019;126:69-81.
45. Kelso CM, Watanabe H, Wazen JM, et al. Microperforations significantly enhance diffusion across round window membrane. Otol Neurotol. 2015;36(4):694-700.
46. McCall AA. Drug Delivery for Treatment of Inner Ear Disease: Current State of Knowledge. 2010;46(2):220-231.
47. Serbetcioglu B, Erbek S. Odyolojik Değerlendirme. Belgin E, Sahli A. S. Temel Odyoloji. 2015;1:113-153

48. Hellström S. Anatomy of the Rat Middle Ear. *Acta anat.* 1982;112:346-352
49. Bergin M. Systematic review of animal models of middle ear surgery. *Syst Rev Anim Model middle ear Surg.* 2013;3(3):71.
50. Daudet N, Humbert G, Pujol R, Lenoir M, Ripoll C, Vago P. Characterization of atypical cells in the juvenile rat organ of corti after aminoglycoside ototoxicity. *J Comp Neurol.* 1998;401(2):145-162.
51. Alvarado JC, Fuentes-Santamaría V, Jareño-Flores T, Blanco JL, Juiz JM. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: A study in wistar rats. *Neurosci Res.* 2012;73(4):302-311.
52. Bisht M, Bist SS. Ototoxicity: The Hidden Menace. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;63(3):255-259.
53. Chia SH, Gamst AC, Anderson JP, Harris JP. Intratympanic gentamicin therapy for Ménière's disease: a meta-analysis. *Otol Neurotol.* 2004;25(4):544-552.
54. Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res.* 2001;155(1-2):1-8.
55. 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(2):505-521.
56. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2008;27(50):6407-6418.
57. Hashino E, Shero M. Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res.* 1995;704(1):135-140.
58. Fukushima M, Kitahara T, Uno Y, Fuse Y, Doi K, Kubo T. Effects of intratympanic injection of steroids on changes in rat inner ear aquaporin expression. *Acta Otolaryngol.* 2002;122(6):600-606.
59. Kim SJ, Park C, Lee JN, Park R. Protective roles of fenofibrate against cisplatin-induced ototoxicity by the rescue of peroxisomal and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;353(2017):43-54.
60. Aladag I, Guven M, Songu M. Prevention of gentamicin ototoxicity with N-acetylcysteine and vitamin A. *J Laryngol Otol.* 2016;130(5):440-446.
61. Ke C, Sun L, Qiao D, Wang D, Zeng X. Antioxidant activity of low molecular

- weight hyaluronic acid. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(10):2670-2675.
62. Borkholder DA. State-of-the-art mechanisms of intracochlear drug delivery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;16(5):472-477.
 63. Pararas EEL, Borkholder DA, Borenstein JT. Microsystems technologies for drug delivery to the inner ear. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(14):1650-1660.
 64. El Kechai N, Mamelle E, Nguyen Y, et al. Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear. *J Control Release*. 2016;226:248-257.
 65. Saber A, Laurell G, Bramer T, Edsman K, Engmér C, Ulfendahl M. Middle ear application of a sodium hyaluronate gel loaded with neomycin in a guinea pig model. *Ear Hear*. 2009;30(1):81-89.
 66. Plontke SK, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Salt AN. Dexamethasone concentration gradients along scala tympani after application to the round window membrane. *Otol Neurotol*. 2008;29(3):401-406.
 67. Wang X, Wu J, Li P, et al. Microenvironment-Responsive Magnetic Nanocomposites Based on Silver Nanoparticles/Gentamicin for Enhanced Biofilm Disruption by Magnetic Field. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(41):34905-34915.
 68. Berglin CE, Pierre PV, Bramer T, et al. Prevention of cisplatin-induced hearing loss by administration of a thiosulfate-containing gel to the middle ear in a guinea pig model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(6):1547-1556.
 69. Sagit M, Somdas MA, Korkmaz F, Akcadag A. The ototoxic effect of intratympanic terbinafine applied in the middle ear of rats. *J Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2013;42:1-6.
 70. Xu M, Ma D, Chen D, et al. Preparation, characterization and application research of a sustained dexamethasone releasing electrode coating for cochlear implantation. *Mater Sci Eng C*. 2018;90:16-26.
 71. Wohlrab J, Wohlrab D, Neubert RHH. Comparison of noncross-linked and cross-linked hyaluronic acid with regard to efficacy of the proliferative activity of cutaneous fibroblasts and keratinocytes in vitro. *J Cosmet Dermatol*. 2013;12(1):36-40.
 72. Berkó S, Maroda M, Bodnár M, et al. Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems. *Eur Polym J*.

- 2013;49(9):2511-2517.
73. Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogel films new biomaterials. *J Control Release*. 2000;69:169-184.
 74. Hellström S, Laurent C, Yoon Y-J. Distribution of Hyaluronan in the Middle and Inner Ear. *Orl*. 2010;56(5):253-256.
 75. Martini A, Rubini R, Ferretti RG, et al. Comparative ototoxic potential of hyaluronic acid and methylcellulose. *Acta Otolaryngol*. 1992;112(2):278-283.
 76. Angeli S, S. C, B. G, A. O, J.T. MJ, T.R. VDW. Injectable form of cross-linked hyaluronan is effective for middle ear wound healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007;116(9 l):667-673.
 77. Dal T, Bahar S. The clinical outcomes of using a new cross-linked hyaluronan gel in endoscopic frontal sinus surgery. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2017;274(9):3397-3402.
 78. Sheppard WM, Wanamaker HH, Pack A, Yamamoto S, Slepecky N. Direct round window application of gentamicin with varying delivery vehicles: A comparison of ototoxicity. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2004;131(6):890-896.
 79. Shi R, Zhou J, Wang B, et al. The clinical outcomes of new hyaluronan nasal dressing: A prospective, randomized, controlled study. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27(1):71-76.
 80. Matheny KE, Tseng EY, Carter KB, Cobb WB, Fong KJ. Self-cross-linked hyaluronic acid hydrogel in ethmoidectomy: A randomized, controlled trial. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(6):508-513.
 81. Park AH, Jackson A, Hunter L, et al. Cross-linked hydrogels for middle ear packing. *Otol Neurotol*. 2006;27(8):1170-1175.
 82. Wei S, Xie J, Luo Y, et al. Hyaluronic acid based nanocrystals hydrogels for enhanced topical delivery of drug: A case study. *Carbohydr Polym*. 2018;202:64-71.
 83. Kurioka T, Mizutani K, Niwa K, et al. Hyaluronic acid pretreatment for Sendai virus-mediated cochlear gene transfer. *Gene Ther*. 2016;23(2):187-195.
 84. Mrazek J, Kettou S, Matuska V, et al. Photo-crosslinked hyaluronic acid coated upconverting nanoparticles. *J Nanoparticle Res*. 2017;19(2):44.
 85. Angeli SI. Hyaluronate gel stapedotomy. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2006;134(2):225-231.

86. Özcan O, Yagmurca. Kulak Embriyolojisi. Gündüz M. Odyolojide Temel Kavramlar ve Yaklaşımlar. 2015;1:31-47
87. Cunha EO, Reis A dos, Macedo MB, Machado MS, Dallegrave E. Ototoxicity of cypermethrin in Wistar rats. Braz J Otorhinolaryngol. 2019. [Epub ahead of print]
88. Dyhrfeld-Johnsen J, Gaboyard-Niay S, Broussy A, Saleur A, Brugeaud A, Chabbert C. Ondansetron reduces lasting vestibular deficits in a model of severe peripheral excitotoxic injury. J Vestib Res Equilib Orientat. 2013;23(3):177-186.
89. Llorens J, Dememes D, Sans A. The behavioral syndrome caused by 3,3'-iminodipropionitrile and related nitriles in the rat is associated with degeneration of the vestibular sensory hair cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1993;123(2):199-210.
90. Kim MJ, Kim N, Lee EJ, Han GC. "Tail-Hanging Test" behavioral parameter of vestibular deficit and compensation in Labyrinthectomized Mouse Model. J Int Adv Otol. 2012;8(3):453-462.
91. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. Nat Protoc. 2012;7(6):1009-1014.
92. Gündoğdu R, Erkan M, Aydın M, et al. Assessment of the Effectiveness of Quercetin on Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats. J Int Adv Otol. 2019;15(2):229-236.
93. Nguyen AT, Armstrong EA, Yager JY. Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. J Vis Exp. 2017;(122):1-10.
94. Cassel R, Bordiga P, Pericat D, Hautefort C, Tighilet B, Chabbert C. New mouse model for inducing and evaluating unilateral vestibular deafferentation syndrome. J Neurosci Methods. 2018;293:128-135.
95. Greguske EA. Calyx junction dismantlement and synaptic uncoupling precede hair cell extrusion in the vestibular sensory epithelium during sub-chronic 3,3'-iminodipropionitrile ototoxicity in the mouse. Arch Toxicol. 2019;93(2):417-434.
96. Soler-Martin C. Behavioral disturbances and hair cell loss in the inner ear following nitrile exposure in mice, guinea pigs, and frogs. Toxicol Sci. 2007;96(1):123-32.
97. Boadas-Vaello P, Riera J, Llorens J. Behavioral and pathological effects in

- the rat define two groups of neurotoxic nitriles. *Toxicol Sci.* 2005;88(2):456-466.
98. Wu X, Cai J, Li X, et al. Allicin protects against cisplatin-induced vestibular dysfunction by inhibiting the apoptotic pathway. *Eur J Pharmacol.* 2017;805:108-117.
 99. Sidell D, Ward JA, Pordal A, Quimby C, Nassar M, Choo DI. Combination therapies using an intratympanic polymer gel delivery system in the guinea pig animal model: A safety study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016;84:132-136.
 100. de Araújo MM, Murashima AAB, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014;80(4):330-338.
 101. Freitas MR De, Almeida A, Anne G, Brito DC, Leita FDC, De JV. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. 2009;75(5):745-752.
 102. Llorens J, Balbuena E. Behavioural disturbances and sensory pathology following allylnitrile exposure in rats. *Brain Res.* 2001;904(2):298-306.
 103. Gaboyard-Niay S, Travo C, Saleur A, Broussy A, Brugeaud A, Chabbert C. Correlation between afferent rearrangements and behavioral deficits after local excitotoxic insult in the mammalian vestibule: a rat model of vertigo symptoms. *Dis Model Mech.* 2016;9(10):1181-1192.
 104. De Freitas MR, De Castro Brito GA, De Carvalho J V., Gomes RM, Barreto Martins MJ, De Albuquerque Ribeiro R. Light microscopy study of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *J Laryngol Otol.* 2009;123(6):590-597.
 105. Li L, Chao T, Brant J, O'Malley B, Tsourkas A, Li D. Advances in nano-based inner ear delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;108:2-12.
 106. Wohlrab J, Wohlrab D, Neubert RHH. Comparison of Noncross-Linked and Cross-Linked Hyaluronic Acid with Regard to Efficacy of the Proliferative Activity of Cutaneous Fibroblasts and Keratinocytes in Vitro. *J Cosmet Dermatol.* 2013;12(1):36-40
 107. Mousavi Nejad Z, Torabinejad B, Davachi SM, et al. Synthesis, physicochemical, rheological and in-vitro characterization of double-crosslinked hyaluronic acid hydrogels containing dexamethasone and PLGA/dexamethasone nanoparticles as hybrid systems for specific medical

- applications. *Int J Biol Macromol*. 2019;126:193-208.
108. R.M. K, J.D. M, J.E. M, et al. In vitro release kinetics of gentamycin from a sodium hyaluronate gel delivery system suitable for the treatment of peripheral vestibular disease. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999;25(1):15-20.
 109. Rogha M, Abtahi H, Asadpour L, et al. Therapeutic Effect of Intratympanic Injection of Dexamethasone plus Hyaluronic Acid on Patients with Meniere's Disease. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2019; 31(105): 217–223.
 110. Angeli S, Connell S, Gibson B, Ozdek A, McElveen JT, Van De Water TR. Injectable Form of Cross-Linked Hyaluronan Is Effective for Middle Ear Wound Healing. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007;116(9):667-73.
 111. Zou J, Feng H, Sood R, Kinnunen PKJ, Pykko I. Biocompatibility of Liposome Nanocarriers in the Rat Inner Ear After Intratympanic Administration. *Nanoscale Res Lett*. 2017;12:1-14.
 112. Lyford-Pike S, Vogelheim C, Chu E, Della Santina CC, Carey JP. Gentamicin is primarily localized in vestibular type I hair cells after intratympanic administration. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol*. 2007;8(4):497-508.
 113. Sheppard WM, Wanamaker HH, Pack A, Yamamoto S, Slepecky N. Direct round window application of gentamicin with varying delivery vehicles: A comparison of ototoxicity. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2004;131(6):890-896.
 114. Anniko M, Hellström S, Laurent C. Reversible changes in inner ear function following hyaluronan application in the middle ear. *Acta Otolaryngol*. 1987;104(S442):72-75.
 115. Bagger-Sjöbäck. Sodium hyaluronate application to the open inner ear: an ultrastructural investigation. *Am J Otol*. 1991;12(1):35-39.
 116. King EB, Shepherd RK, Brown DJ, Fallon JB. Gentamicin Applied to the Oval Window Suppresses Vestibular Function in Guinea Pigs. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol*. 2017;18(2):291-299.
 117. King EB, Salt AN, Kel GE, Eastwood HT, O'Leary SJ. Gentamicin administration on the stapes footplate causes greater hearing loss and vestibulotoxicity than round window administration in guinea pigs. *Hear Res*. 2013;304:159-166.
 118. De Groot JCMJ, Hamers FPT, Gispen WH, Smoorenburg GF. Co-

- administration of the neurotrophic ACTH((4-9)) analogue, ORG 2766, may reduce the cochleotoxic effects of cisplatin. *Hear Res.* 1997;106(1-2):9-19.
119. Stach BA. Nature of Hearing Chapter Two. *Clinical Audiology: An Introduction, Second Edition.*; 2010;2:41-99



10.EKLER

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 07/18/2018
Toplantı Tarihi : 17 Ekim 2018

Sayın, Prof.Dr.Enis Alpin GÜNERİ
DEÜ Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

52/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Çapraz bağlı hyalüronik asit'in deneysel vestibüler ve koklear toksisite modelinde iç kulak etkilerinin incelenmesi" isimli; Erdal Erkoç, Aslı Çakır Çetin, Günay Kırkım, Serpil Mungan Durankaya, Hüsnü Alper Bağrıyanık, Osman Yılmaz, Meryem Çalışır, Pembe Keskinöğlu'nun araştırmacı olduğu, 32 adet Wistar Albino saçın verilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı (Araştırmacı)	Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili Üye
Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Üye	Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN Üye (topl. katılamadı)
Prof.Dr.Gülgün OKTAY Üye	Prof.Dr.Günay KIRKIM Üye (Araştırmacı)
Prof.Dr.Türkan ERTAY Üye (Topl.Katılamadı)	Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU Danışman (Araştırmacı)
Prof.Dr.Nergis DÜRMÜŞ Üye	Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN Üye (Topl.Katılamadı)
Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye	Doç.Dr.Orhan KALEMCİ Üye (Topl.Katılamadı)
Z. Kınan Zehra KINAM Üye	Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Resim 15: Etik Kurul Onayı