

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMORADYOTERAPİYE BAĞLI OTOTOKSİSİTE VE
DARBEOETİNİN ETKİSİ**

**Asuman Feda BAYRAK
ORCID : 0000-0001-8403-3018**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Temel Onkoloji Doktora Programı**

DOKTORA TEZİ

**İZMİR
EYLÜL 2021**

TEZ KODU: 2016.KB.SAG.038 Phd-2015970055

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMORADYOTERAPİYE BAĞLI OTOTOKSİSİTE VE
DARBEPOETİNİN ETKİSİ**

**Asuman Feda BAYRAK
ORCID : 0000-0001-8403-3018**

**ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Temel Onkoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Zekiye Sultan ALTUN
ORCID NO: 0000-0002-1558-4534**

**Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
tarafından 2016.KB.SAG.038 (201669) sayı ile desteklenmiştir.**

**İZMİR
EYLÜL 2021**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “ Kemoradyoterapiye Bağlı Ototoksisite ve Darbepoetin Etkisi” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Asuman Feda Bayrak

Tarih:

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her konuda desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Prof.Dr.Zekiye Sultan Altun'a,

Akademik gelişimime büyük katkıları olan, çözüm odaklı kişiliği ile zorlu süreçleri üstesinden gelinebilir kılan, bilimsel ve duygusal desteği ile değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Onkoloji Enstitüsü müdürümüz saygıdeğer hocam Prof. Dr. H. Nur OLGUN'a,

Tez çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi, manevi destek ve bilimsel katkılarından dolayı Prof.Dr. Safiye Aktaş'a,

Doktora eğitimim boyunca katkı ve yardımları için Prof.Dr. Günay Kırkım'a, Prof.Dr.Osman Yılmaz'a,

Laboratuvar çalışmalarım ve deneylerin gerçekleştirilmesinde desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olduklarını gösteren sevgili çalışma arkadaşlarım Doç. Dr. Yüksel Olgun'a, Dr. Öğretim üyesi Oğuz Çetinayak'a, Dr. Efsun Kolatan'a, Araş.Gör. Hande Evin'e, Araş.Gör. Efe Serinan'a ve tüm Onkoloji Enstitüsü ekibine,

Akademik hayatımdaki desteği ve doktoraya başlamamdaki katkılarından dolayı kıymetli hocam Op.Dr.Levent Olgun'a,

Tüm hayatım boyunca, her zaman her koşulda yanımda olan, desteğini ve ilgisini esirgemeyen, beni her zaman motive eden eşim Prof.Dr. Serdar Bayrak'a ve sevgili oğlum Deniz Bayrak'a, destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asuman Feda BAYRAK

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	ii
GRAFİKLER DİZİNİ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
1.2. Araştırmanın Amacı	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	6
3.1. Araştırmanın tipi	6
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	6
Araştırma planı	6
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme	7
3.4. Çalışma materyali	8
3.5. Araştırmanın değişkenleri	8
3.6. Veri toplama araçları	8
İşitme fonksiyonlarının değerlendirilmesi.....	10
Sıçanların sakrifiye edilmesi, her iki iç kulağın, beynin cerrahi olarak çıkarılması.....	10
Doku örneklerinde apoptotik hücre ölümünün saptanması.....	11
Dokularda inflamasyon ve fibrozisin saptanması.....	11
İmmünohistokimyasal incelemeler.....	11
Biyokimyasal incelemeler.....	12
3.7. Verilerin değerlendirilmesi	12
3.8. Araştırmanın kısıtlılıkları	13
3.9. Etik Kurul Onayı	13
4. BULGULAR	14
4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması.....	14
İşitme testlerinin Uygulanması	14
4.2 Odyometrik Ölçüm Sonuçları.....	17
4.3 İmmünohistokimyasal Sonuçlar	20
Hematoksilen Eozin Boyama Sonuçları.....	21
Apoptoz Görüntüleri.....	28
Reaktif Oksijen İlişkili Belirteçler.....	31
4.4 Biyokimyasal Sonuçlar.....	33
Serum Glutasyon Sonuçları.....	33
Serum TNF- α Sonuçları.....	34
Serum IL-1 β Sonuçları.....	35
4.5 İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	35

5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	48
Ek 1. Etik kurul onayı.....	48
Ek 2. Tezden üretilmiş makale.....	49
KATKI.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	51



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Araştırma planı.....	6
Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler	9
Tablo 3. Gruplara göre immünohistokimyasal bulgular	21



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Akış şeması.....	12
Şekil 2. Auditory Brainstem Response (ABR) testinin uygulanması	15
Şekil 3. Ratlara ABR testinin yapılışı.....	16
Şekil 4. Ratların sakrifikasyonu, beyin ve iç kulak dokularının çıkarılması.....	16
Şekil 5a. Olağan görünümde iç kulak	21
Şekil 5b. Olağan görünümde organ korti (x200).....	22
Şekil 5c. Kontrol grubunda olağan görünümde beyin dokusu	22
Şekil 6a. CDDP grubunda Spiral Gangliona ganglion hücrelerinde şekil bozuklukları, küçülme, piknotik değişiklikler	23
Şekil 6b. CDDP grubunda beyin dokusu mikroskopisi	24
Şekil 6c. CDDP grubunda %80 nekroz izlenen kemik iliği dokusu	24
Şekil 7a. DPO grubunda olağan görünümde spiral ganglion	25
Şekil 7b. DPO grubunda olağan görünümde beyin histolojisi	26
Şekil 7c. DPO grubunda olağan sellüler görünümde, her üç seriye ait elemanlar barındıran kemik iliği	26
Şekil 8a. DPO-CDDP grubunda olağan beyin histolojisi	27
Şekil 8b. DPO-CDDP grubunda kemik iliğinde nekroz çok azalmış olarak izlendi	28
Şekil 9 a . Kontrol grubunda spiral gangliona kaspaz 3 negatifliği	29
Şekil 9b. Kontrol grubunda korti organında Kaspaz 9 negatifliği	29
Şekil 10a . CDDP grubunda Spiral gangliona kaspaz 8 pozitifliği	30
Şekil 10b. CDDP grubunda korti organında kaspaz 9 pozitifliği	30
Şekil 11. CDDP grubunda spiral gangliona İNOS negatifliği.....	31
Şekil 12. CDDP- DPO grubunda korti organında nNOS pozitifliği	32
Şekil 13. CDDP-DPO grubunda korti organında HO pozitifliği	32
Şekil 14. CDDP-DPO grubunda korti organında NQO1 pozitifliği	33

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No

Grafik 1. Kontrol grubunda (n=7) serum fizyolojik uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen fizyolojik ABR sonuçları.....	17
Grafik 2. Darbepoetin grubunda (n=7) uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen normal düzeylerde ABR sonuçları	18
Grafik 3. CDDP grubunda uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen ABR sonuçları	19
Grafik 4. Darbo-CDDP uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen ABR sonuçları.....	20
Grafik 5. Gruplara göre serum total glutatyon düzeyleri.....	34
Grafik 6. Gruplara göre serum TNF-alfa düzeyleri.....	34
Grafik 7. Gruplara göre serum IL1- β düzeyleri	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABR	Auditory Brainstem Response (İşitsel Uyarılmış Beyin Sapı Potansiyelleri)
CDDP	Sisplatin
DAB	Di Amino Benzidin
DEÜTFDHAL	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı
DPO	Darbepoetin
DPOAE	Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyon
EPO	Eritropoietin
GST	Glutasyon-S-Transferaz
HE	Hematoksilen Eozin
HO-1	Hem Oksijenaz-1
IP	İntraperitoneal
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksid Sentaz
nNOS	Nöronal Nitrik Oksid Sentaz
Nrf-2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 2
NQO1	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated UTP Nick End Labeling

KEMORADYOTERAPİYE BAĞLI OTOTOKSİSİTE VE DARBEPOETİNİN ETKİSİ

Doktora Tezi

Asuman Feda BAYRAK

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada Wistar türü sıçanlarda Darbepoetin (DPO) uygulamasının sisplatine bağlı ototoksik etkiyi önleyici rolü olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlandı. DPO nun ototoksositeye karşı olası koruyucu rolü nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 2 (Nrf-2) ve hedef genleri, ve apoptoz üzerinden incelendi.

Çalışmada; kontrol, sisplatin(CDDP) (16mg/kg IP tek doz), DPO (25 µg/kg intraperitoneal (IP), sisplatinden önce DPO (25 µg/kg (IP) uygulanan gruplar oluşturulması amacıyla 28 adet wistar albino rat kullanıldı. Deneyin yedinci gününde işitme ölçümleri sonrasında ratlar sakrifiye edildi. Apoptotik hücre ölümü kulak dokusunda in-situ hibridizasyonla TUNEL analizi ile; kaspaz 3, 8, 9 ve Nrf-2 ve Hem oksijenaz-1, NQO1 gibi Nrf-2 ilişkili antioksidan ve iNOS, nNOS düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle, protein ekspresyon düzeyleri dokuda immunohistokimyasal yöntem ile çalışıldı. Her bir grup kendi içinde karşılaştırılarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p<0.05$ düzeyinde anlamlılık kabul edildi. Sisplatin uygulaması ile işitme ölçümlerinde kontrol grubuna göre ototoksik etkileri gösteren tüm frekanslarda işitme kaybı saptandı. İmmunohistokimyasal doku düzeyinde gerçekleştirilen incelemelerde siplatin uygulanan grupta iç kulakta strüktürel değişiklikler, beyin ve sinir dokularında nekroz ve nekroptoz saptandı. Darbopeotin hem sisplatinin ortaya çıkardığı iç kulak ve beyin hasarlarını önlediği hem apoptotik protein ekspresyonları hem de oksidatif stres ile ilişkili belirteçler olan Nrf-2 ve ilişkili Hem oksijenaz-1, NQO1 üzerinden gösterirken nitrik oksit sistemi proteinleri üzerinden etkileri de saptandı.

Bu çalışmada sisplatinin oluşurduğu ototoksosite fonksiyonel düzeyde gösterilmiştir. Darbepoetinin sisplatine bağlı gelişen iç kulak ve beyin hasarına karşı koruyucu olduğu apoptozun azaltılması, antioksidan Nrf-2 ve hedef protein düzeylerinin artışı ile oksidatif stresin önlenerek geliştiği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: darbepoetin, ototoksosite, sisplatin

Tezin sayfa adedi:52

Danışman: Prof.Dr. Zekiye Sultan Altun



THE IMPACT OF DARBEPOETIN ON CHEMORADIOTHERAPY INDUCED OTOTOXICITY

Phd Thesis

Asuman Feda BAYRAK

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Institute of Oncology Department of Basic Oncology

ABSTRACT

This study aims to determine and evaluate whether the administration of Darbepoetin (DPO) has a preventive effect against ototoxic effects due to cisplatin on Wistar rats. DPO's potential protective effect against ototoxicity will be examined through nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and target genes.

In the study; 28 wistar albino rats were used to form, control, cisplatin (16mg/kg IP), DPO (25 ug/kg, IP), DPO administered before cisplatin groups, Apoptotic cell death was determined by TUNEL analysis by in situ hybridization in ear tissue; caspase 3, 8, 9 levels immunohistochemical methods, Nrf-2 and Nrf-2 associated with NrQ2 antioxidant and iNOS, nNOS, protein expressions will be studied by tissue immunohistochemical methods. Each group will be evaluated in comparison.

With cisplatin application, hearing loss was detected in all frequencies showing ototoxic effects compared to the control group. In the examinations performed at the level of immunohistochemical tissue, structural changes in the inner ear, necrosis and necroptosis in the brain and nerve tissues were detected in the ciplatin group. Effects of darbopoetin on nitric oxide system while cisplatin prevented the inner ear and brain damage, both apoptotic protein expressions and nrf-2, associated with oxidative stress, on NQO1 was also detected.

In this study, ototoxicity, which consists of cisplatin has been shown at functional level. Darbopoetin has been shown to protect against inner ear and brain damage due to cisplatin reducing apoptosis, increasing anti-oxidant protein levels, preventing oxidative stress.

Key words: cisplatin, darbopoetin, , ototoxicity

Page number:52

Advisor: Prof.Dr. Zekiye Sultan Altun

1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Sisplatin (CDDP) baş boyun tümörlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Ancak CDDP'in serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olması sonucu oluşan ototoksik, nörotoksik ve nefrotoksik yan etkileri klinik uygulamalarda doz ayarlaması gerektirmektedir. Ototoksik etkileri azaltmaya yönelik ajanlarla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Eritropoetin (EPO) de bunlardan birisidir. Darbepoetin (DPO); eritropoetin daha uzun yarı ömürlü ve *in-vivo* daha etkili aktif sentetik formu olup kronik böbrek yetmezliği ve kanser tedavisine bağlı gelişen anemi tedavisinde kullanılan bir ajandır. Bunun dışında etanol intoksikasyonu ilişkili nörotoksositeye ve CDDP nefrotoksitesine karşı koruyucu olduğu da bildirilmiştir. Literatürde bugüne dek yapılan çalışmalarda DPO ve CDDP ototoksitesini üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

1.2.Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, DPO uygulamasının CDDP ototoksitesini üzerine koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla DPO uygulamasının ratlarda CDDP'in apoptotik etkisini değiştirici bir etkisinin olup olmadığı; hayvanlarda distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPAOE) ve işitsel uyarılmış beyin sapı yanıtları (ABR) ile test edilmesi ve koklea, beyinsapı ve temporal lob dokularının histopatolojik olarak incelemesi ve reaktif oksijen ürün oluşumu, Nrf2 ve ilişkili antioksidan genler olan Nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 2 (Nrf-2), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), hem oksijenaz-1 (HO-1), glutatyon-S-trasferaz (GST), indüklenebilir Nitrik Oksid Sentaz (iNOS), nöronal Nitrik Oksid Sentaz (nNOS), apoptoz ilişkili kaspaz ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

DPO; *in-vivo* olarak CDDP ototoksitesini önleyici bir etkiye sahiptir.

DPO; CDDP'e bağlı gelişen ototoksiteyi, apoptozu azaltarak ortaya çıkarır.

DPO; CDDP'e bağlı gelişen ototoksiteyi Nrf-2 ve ilişkili antioksidan NQO1, HO-1, GST, iNOS ve nNOS ekspresyonlarını değiştirerek ortaya çıkarır.

DPO; CDDP'e bağlı gelişen ototoksisiteyi oksidatif stresi azaltarak glutatyon ve anti-inflamatuar proteinler olan TNF-alfa ve IL-1 β protein düzeylerini değiştirerek ortaya çıkarır.



2. GENEL BİLGİLER

Tüm kulak yapıları üç germ tabakasından köken almaktadır. Dış kulak ve orta kulak brankial yarık ve ceplerden, iç kulak ise beyinde rombensefalonun karşısına gelen dış ektodermden gelişmektedir. Koklea, iç kulağın ön kısmında bulunan, şekli salyangoza benzeyen tüp şeklinde bir kemiktir (1). Koklea; modiolus, kanalis spiralis koklea ve lamina spiralis osseadan oluşmaktadır. Kokleanın eksenini modiolus oluşturur. İçindeki kanallardan koklear damarlar ve sekizinci kranial sinir lifleri geçer. Modiolus içinde korti ganglionu da bulunur. Kanalis spiralis; kokleada modiolusun çevresini iki buçuk defa spiral olarak dolanan bir kemik yoldur. Vestibulun ön alt kısmından başlar ve zirve veya kupula adı verilen kapalı bir uçla sonlanır. Lamina spiralis ossea, modiolustan uzanan kemik bir laminadır. Fibröz bir tabaka ile devam eder ve karşı duvara ulaşarak kanalis spiralis kokleayı ikiye böler. Vestibuluma açılan üst parçaya skala vestibuli, fenestra koklea aracılığıyla kavum timpaniye açılan alt parçaya skala timpani denir. İki skala; kokleanın tepesinde helikotrema denilen delikle birleşir. Lamina osseanın serbest kenarı ile kanalis spiralis kokleanın dış yan duvarı arasındaki baziler membranın üzerinde, korti organı (organum spirale) adı verilen işitme organı bulunur (2).

CDDP; erişkin ve çocukluk çağında görülen pek çok baş boyun tümörünün tedavisinde kullanılmaktadır ve ototoksik, nörotoksik ve nefrotoksik yan etkileri klinik uygulamalarda doz ayarlaması gerektirmektedir. CDDP'in ototoksik etki mekanizmaları kesin bilinmemekle birlikte kokleanın bazal kıvrımındaki ilk sıra hücrelerde başlayıp daha yukarıdaki dış tüylü hücrelere doğru progrese olan ve iç tüylü hücreleri de etkileyen korti organ hasarına neden olmaktadır. CDDP ototoksitesisi reaktif oksijen radikalleri (ROS) ve oksidatif mitokondri hasarı sonucunda meydana gelmektedir (3,4). Artan reaktif oksijen ürünleri ile glutatyon ve antioksidan enzimler tükenmekte ve süperoksit, hidrojenperoksit ve toksik lipidler kohlear hücrelere kalsiyum girişine neden olmakta ve apoptozisi tetiklemektedir. Nitrik oksit (NO) L-arginin aminoasidinden Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi yardımıyla sentezlenen serbest radikaldir. Nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir (iNOS) yoluyla oluşan NO hücrel hasar ve nörotoksitesite yapma potansiyeline sahiptir. NO varlığında sisplatin toksisitesinde artış olduğu

gözlenmiştir. Sisplatin ototoksitesinin patogenezinde inflammatuar sitokinler de rol oynar. IL-6, TNF- α , MCP-1, KC, MIP-2, sICAM-1 ve VEGF gibi inflammatuar yanıt mediatörleri spiral ligamentteki fibrositler tarafından IL-1 β ve TNF- α gibi proinflammatuar sitokinlerden üretilirler. Bu mediatörlerin inflammatuar hücrelerin infiltrasyonunu indüklemesi sonucu fibrosit hasarı ve kohleanın işlevinin bozulmasına neden olur. Proinflammatuar sitokinler cisplatine bağlı kohlea hasarında kritik bir rol oynar. Özellikle TNF- α 'nın aktivasyonunun inhibe edilmesi sisplatin enjeksiyonu sonrası diğer proinflammatuar sitokinlerin ekspresyonunu anlamlı ölçüde azaltır. Mediatörlerin inflammatuar hücrelerin infiltrasyonunu indüklemesi sonucu fibrosit hasarı ve kokleanın işlevinin bozulmasına neden olur. İç kulağın immün fonksiyonu labirentit gibi infeksiyöz hastalıklara karşı korunmada çok önemli olmasına rağmen, immüniteyle ilişkili inflammatuar yanıtlar iç kulakta sıklıkla koklear dejenerasyona ve kalıcı işitme kaybına yol açar (5,6,7,8).

Ototoksiteden korunma için N-asetil-sistein (9), erdostein (10,11), minosiklin (12) dietilditiokarbamat (13), piperin (14), ebselen (15), resveratrol (16), korean red ginseng (17) busilamin (18), ginkgolid B (19), D-metionin (20), acetyl L-carnitine (21), deksametazon (22) gibi koruyucu ajanlar çalışılmıştır. EPO'nun de iç kulak hasarına karşı otoprotektif etkilerini gösteren çalışmalar vardır (23,24,25,26). Spiral ganglion nöron hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, EPO nun iç kulak hücrelerine önemli rejeneratif etkisinin olduğu saptanmıştır (27). DPO; EPO'nun daha uzun yarı ömürlü ve *in-vivo* daha etkili aktif sentetik formu olup kronik böbrek yetmezliği ve kanser tedavisine bağlı gelişen anemi tedavisinde kullanılan bir ajandır. Aynı zamanda solid tümörlü hastalarda kemoterapiye bağlı gelişen anemi tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (28,29). Bunun dışında nörotoksositeye ve nefrotoksositeye karşı da koruyucu olduğu bildirilmiştir (41-48). DPO'nun nöroprotektif etkileriyle ilgili birçok çalışma vardır (30,31,32). Bir çalışmada DPO'nun etanol intoksikasyonu ilişkili nörotoksositeye (33) ve diğer bir çalışmada da CDDP nefrotoksitesine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (34). Ancak DPO'un iç kulak hasarına olan etkileriyle ilgili bugüne dek yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Tavşanlarda deneysel subaraknoid kanamayı takiben serebral vazospazmda rekombinant

EPO ve DPO'nin etkileri karşılaştırılmış; DPO'nin vazospazmı önlediği ve subaraknoid kanama sonrası nöroprotektif etki sağladığı ayrıca DPO ile EPO'den daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (35). Bu nedenle DPO'in CDDP'e bağlı ototoksisitede koruyucu olup olmadığı çalışılmıştır. Bu çalışma ile deneysel olarak CDDP ile ototoksisite modeli oluşturularak DPO'in ototoksisiteyi önleyici etkisi araştırılmıştır. DPO'in daha önceki çalışmalarda saptanan nöroprotektif özelliklerinden yola çıkılarak ototoksisitede etkisi olup olmadığı hipotezinden hareket edilmiştir. DPO'in CDDP'e bağlı ototoksisitede koruyucu olup olmadığı ve olası koruyucu mekanizmanın Nrf-2 ve hedef proteinleri ile ilişkili olup olmadığı çalışılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi:

Çalışma, deneysel analitik bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında (DEÜTFDHAL) ve Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji AD laboratuvarlarında 2016-2021 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Araştırma planı Tablo 1 de sunulmuştur.

Tablo 1. Araştırma planı

Ocak 2016-Nisan 2016	Tez önerisi hazırlanması
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Ocak 2016-Mart 2016	Etik kurul onayı
	Proje önerisinin hazırlanması
Mart 2016-Ocak 2017	Projenin kabul edilmesi
	Malzeme alımları
Ocak 2017- Ocak 2018	Deney gruplarının oluşturulması
	Veri toplama
Ocak 2019- Ocak 2020	Hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi
	İşitme ölçümleri yapılması
Ocak 2020- Haziran 2020	Biyokimyasal ölçümlerin yapılması
Haziran 2020-Aralık 2020	Histopatolojik değerlendirmelerin yapılması
Ocak 2021-Haziran 2021	İstatistiksel analizler
	Tez yazım aşaması

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları:

DEU Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan etik kurul izni alınmış, her biri 6–8 haftalık, ortalama ağırlıkları 200– 250g olan, inbreeding yetiştirilen, 28 adet Wistar türü Albino dişi sıçan, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (DEÜTFDHAL) sağlanmıştır. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında (20 ± 2 °C) ve 12' şer saatlik aydınlık / karanlık ortamında tutulup, standart pellet sıçan yemi ile beslenerek, suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar bir hafta süreyle bu ortamda izlenip ortama uyum göstermeleri sağlandı. Bu amaçla rastgele seçilerek, her birinde yedi adet Wistar türü sıçan bulunan 4 grup oluşturuldu. Her bir grupta tüm hayvanların ajan verilmeden önce işitme fonksiyonları değerlendirildi.

Gruplar:

Grup I (n: 7) Kontrol : Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu

Grup II (n: 7) Darbepoetin : DPO uygulanan sıçan grubu (25 µg/kg intraperitoneal (IP))

Grup III (n: 7) Sisplatin : Sisplatin uygulanan sıçan grubu (16 mg/kg 1 saatlik IP infüzyon) (34)

Grup IV (n: 7) Darbepoetin-Sisplatin : CDDP verilmeden 24 saat önce ve verildikten yarım saat sonra 25 µg/kg DPO tek doz IP uygulanan sıçan grubu

CDDP (Koçak), her çalışmada serum fizyolojik ile dilüe edilerek taze olarak kullanılmıştır.

Her bir grup kendi içinde karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Herbir sıçanda DPOAE ve işitsel uyarılmış beyin sapı potansiyelleri test edilmiştir. Apoptotik hücre ölümü kulak dokusunda in situ hibridizasyonla TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) analizi ile yine koklea, beyin sapı bölgelerinde; kaspaz 3, 8, 9 düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle, HO-1, NQO1 gibi Nrf2 ilişkili antioksidan ve iNOS, nNOS protein ekspresyonları dokuda immünohistokimyasal yöntem ile çalışılmıştır. Antioksidan total glutatyon düzeyleri kit aracılı olarak serumda

belirlenmiştir. Hayvan serumlarında inflamatuvar protein düzeylerinin ELISA ile rat uyumlu ELISA kitleri ile (TNF-alfa, IL-1beta) belirlenmiştir.

Girişimsel işlemler olarak işitme fonksiyonları değerlendirilmeden önce sıçanlara Ketamin hidroklorid (40mg/kg) ve Ksilazin hidroklorid (5mg/kg) intraperitoneal(İP) uygulanarak anestezi sağlanmıştır.

Uygulamalar sonrasında yedinci günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Çalışmanın başlangıcında radyoterapi verilen bir deney grubu oluşturulması da planlanmıştır. Ancak hayvanların radyoterapiye bağlı ex olmaları üzerine radyoterapi uygulanan kısım çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.4 Çalışma Materyali

Araştırmada 28 adet dişi Wistar türü Albino dişi sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (DEÜTFDHAL) sağlanarak kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada işitme fonksiyon testleri ile birlikte beyin, beyin sapı ve koklea dokularında değerlendirilen apoptoz, Nrf-2, HO-1, NQO1 gibi Nrf-2 ilişkili antioksidan, iNOS, nNOS, TNF- α , IL-1 β protein ekspresyonları ve glutatyon düzeyleri bağımlı değişkenlerdir.

3.6 Veri Toplama Araçları

Çalışmaya alınan hayvanların ağırlıkları çalışma boyunca takip edilmiştir. Hayvanların çalışma öncesinde ve ajanların uygulamalarından sonra, sakrifikasyondan önce işitme fonksiyonları değerlendirilmiştir. Çalışmada sakrifikasyon ile beyin, beyin sapı ve koklea dokuları elde edilmiştir. Bu dokularda apoptoz, Nrf-2 ve hedef protein ekspresyonları değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler.

TUNEL KİT
OTOMATİK İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA SETİ
RABBİT ANTİ CASPASE 3 POLYCLONAL ANTİBODY
NQO1 POLİKLONAL ANTİKOR 100 UL
NNOS POLİKLONAL ANTİKOR 100 UL
HEM OKSİJENAZ POLİKLONAL ANTİKOR 100 UL
NOS-2/İNOS POLİKLONAL ANTİKOR 100 UL
RABBİT POLYCLONAL SECONDARY ANTİBODY TO RABBİT IGG – (HRP)
KASPAZ 8 ANTİKORU [CASPASE 8 ANTİBODY]
NRF2 SPESİFİK PRİMER ANTİKOR
CASPASE-9 ANTİKORU
TOTAL GLUTATYON ELISA KİT
TNF-ALPHA ELISA KİT , IL1- β ELISA KİT
SOĞUTMALI SANTRİFÜJ (HERAEUS)
VORTEKS (VELP SCİENTİFİCA ZX3)
DERİN DONDURUCU (HETO ULTRA FREEZE)
PASTÖR FIRIN (THERMO)
ELISA PLATE READER (THERMO)
OTOMATİK İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA CİHAZI (VENTANA)

İşitme fonksiyonlarının değerlendirilmesi:

Tüm gruplardaki sıçanların çalışma başlangıcında (sıfırıncı gün) ve CDDP veya eşdeğer hacimde salin uygulamalarından yedi gün sonra işitme fonksiyonları distorsiyon ürünü otoakustik emisyon (DPOAE) ve işitsel uyarılmış beyin sapı potansiyelleri (ABR) test edilmiştir. İşitme fonksiyonları değerlendirilmeden önce sıçanlara Ketamin hidroklorid (40mg/kg) ve Ksilazin hidroklorid (5mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi uygulanmıştır. Her bir sıçanın kulakları otomikroskopi (Opmi 1, Zeiss, Germany) ile inspekte edilerek, artıklar ve debrisler temizlenmiş, görülebilir bir dış kulak yolu, kulak zarı veya orta kulak anomalisi olmadığı doğrulanmıştır. Herbir sıçanda DPOAE ve işitsel uyarılmış beyin sapı potansiyelleri test edilmiştir. DPOAE testi sessiz odalarda uygulanmıştır. Sıçanların vücut sıcaklıklarının 37°C-38 °C olması sağlanmıştır. Sıçanlara poliüretan platformda yatar pozisyon verilip, başları bantla sabitlenerek hareket etmemeleri ve proba uygun pozisyon verilmesi sağlanmıştır. Sıçanların sağ ve sol kulakları ayrı ayrı Otodynamics ILO 88 Echoport V6 yazılım programlı versiyonu kullanılarak test edilmiştir. Bu çalışmalar sonucu sıçan gruplarının DPOAE ve işitsel uyarılmış beyin sapı potansiyelleri testlerin sonuçları grupların kendi içinde ve gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sıçanların sakrifiye edilmesi, her iki iç kulağın, beynin cerrahi olarak çıkarılması:

CDDP veya eşdeğer hacimde salin uygulamalarından 168 saat sonra (izlemin yedinci gününde) sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Sıçanlara dekapitasyon uygulanarak ve bilateral olarak osteokartilaginöz bileşkeden dış kulaklar ayrılarak, her iki orta ve iç kulak ve beyin çıkarılmıştır. Her iki orta, iç kulak, beyin, beyin sapı formaldehit solüsyonuna alınarak immün histokimyasal inceleme için saklanmıştır. Ayrıca diğer dokular da ileride değerlendirilmek üzere uygun koşullarda saklanmıştır.

Doku örneklerinde apoptotik hücre ölümünün saptanması:

Her iki iç kulak dokusu, koklea, beyin, beyin sapı çıkarılıp formolde fikse ve dekalsifiye edilerek doku takibi sonrası parafine gömülmüştür. Pozitif yüklü lamlara 5 mikrometre kalınlıkta kesitler alınarak morfolojik, histopatolojik olarak değerlendirilerek TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) ile apoptoz oranına bakılmıştır. Bu teknik için Dead End Colorimetric TUNEL system kiti kullanılmıştır. Boyama işlemi otomatik Ventana Discover cihazında yapılmıştır. Apoptoz oranı ışık mikroskobunda % olarak değerlendirilmiştir.

Dokularda inflamasyon ve fibrozisin saptanması:

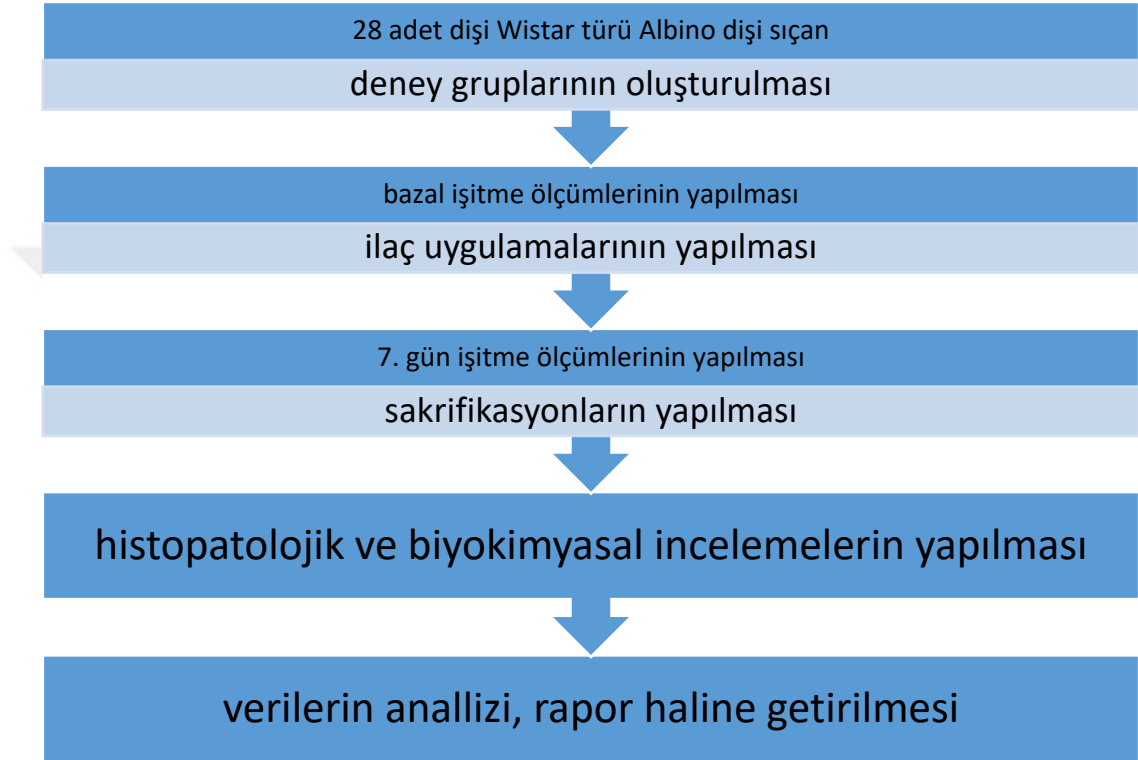
İncelenen dokularda inflamasyon görülürse akut ve kronik olarak tiplendirilerek ve şiddetine göre hafif orta ağır olarak skorlanmıştır. Yine incelenen dokularda fibrozis görüldüğünde Masson trikrom bağ dokusu histokimyasal boyaması yapıp fibrozis hafif orta ağır olarak derecelendirilmiştir.

İmmunohistokimyasal incelemeler:

Boyama işlemleri otomatize Ventana Discover cihazı ile yapılmıştır. İşlem öncesi + yüklü lamlara hazırlanmış 5 mikrometre kalınlıktaki kesitler 37 derece etüvde 12 saat bekletilmiştir. Deparafinizasyon, fiksasyon, azalan alkol serilerinden geçirilip distile su ve PBS yıkama sonrası blokan antikor uygulanmıştır. Bu aşamada yıkama yapılmadan uygun dilüsyonda primer antikorlar 1 saat süre ile bekletilmiştir. PBS ile yıkama sonrası streptavidin biotin sekonder antikor aşamaları ve DAB (di amino benzhidin) ile renklendirme ve hematoksilin ile zemin boyama yapıp lamalar artan alkol serileri uygulaması ve ksilol ile şeffaflandırma yapıp entelan ve lamelle kapatılıp ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Kaspaz 3,8 ve 9, iNOS, nNOS, Nrf2, HO-1, NQK1, GST uygulanan primer antikorlardır.

Biyokimyasal incelemeler:

Serumda total glutatyon ELISA kit aracılı yine anti-inflamatuar TNF-alfa ve IL-1 β protein düzeyleri ELISA kitlerinin çalışma koşullarına uygun olarak çalışıldı. Şekil 1 de çalışmanın akış şeması gösterilmektedir.



Şekil 1. Akış şeması

3.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde tablo ve grafik olarak sunuldu. Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 26.0 versiyonu kullanılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde incelendi. Numerik verilerde ikiden fazla grup olduğu için Non-parametrik Kruskal Wallis testi ve sonrasında ikili grupları karşılaştırmak için Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whithney-U testi kullanıldı. Var yok, ya da az çok olarak değerlendirdiğimiz verilerde ki kare testi uygulandı.

3.8 Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamız öncelikle deneysel bir çalışma olması nedeniyle kendi içinde sınırlılıklara sahiptir. Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda bu verilerin bilimsel anlamda kullanımı uygun olacaktır.

3.9 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı'ndan 29.03.2016 ve 08.12.2020 tarih ve 01/07/2016 karar numarası ve 16/2016 protokol numarası ile çalışmamız için onay alınmıştır (Ek 1).



4. BULGULAR

4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

İşitme testlerinin Uygulanması

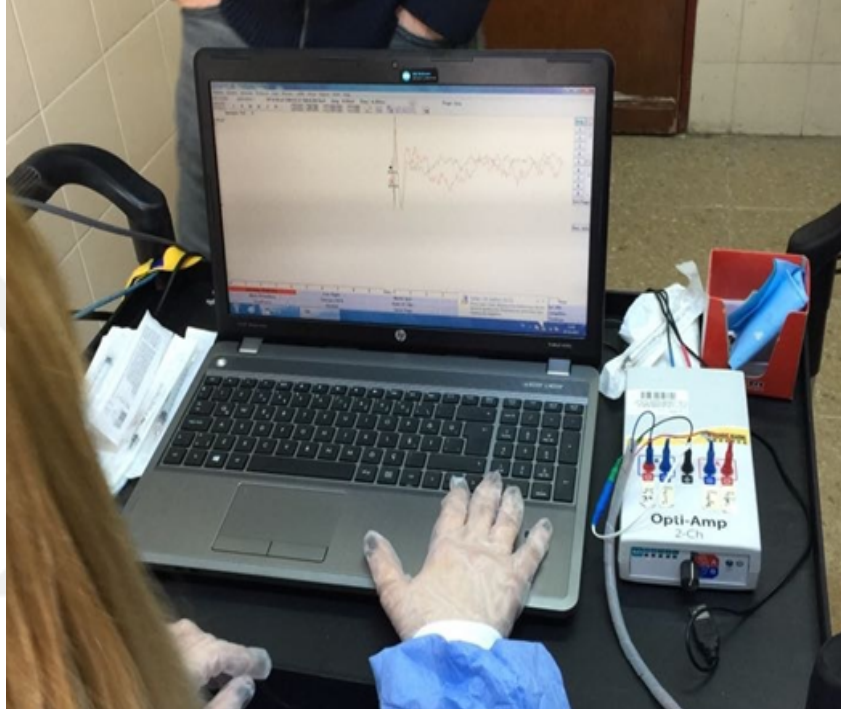
Tüm gruplardaki sıçanların çalışma başlangıcında (0. gün) ve ajan uygulamalarından 7 gün sonra DPOAE ve ABR testleri ile işitme fonksiyonları değerlendirildi. Testler sessiz odalarda uygulandı. Sıçanların vücut sıcaklıklarının 37°C-38 °C olması sağlandı. Sıçanlara poliüretan platformda yatar pozisyon verilip, başları bantla sabitlenerek hareket etmemeleri ve proba uygun pozisyon verilmesi sağlandı. Sıçanların sağ ve sol kulakları ayrı ayrı ölçüldü (şekil 2,3).

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyon testi; Otodynamics ILO 88 Echoport V6 yazılım programlı versiyonu kullanılarak test edildi. DPOAE testi için f_2 ve f_1 frekansları arasındaki oran (f_2/f_1) 1.22 olacak şekilde ayarlandı. L_1 - L_2 seviyeleri arasındaki fark 10 dB SPL ($L_1 = 65$ dB SPL, $L_2 = 55$ dB SPL) şiddetinde tutuldu. DPOAE, f_1 ve f_2 'nin geometrik ortalamalarında 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 ve 8000 Hz'deki sinyal-gürültü oranları kaydedildi. DPOAE'lar, $2f_1$ - f_2 frekansında ölçüldü. Her bir frekansta cevabın sinyal gürültü oranı 3 dB pe SPL'den büyük olarak elde edilen değerler OAE var olarak değerlendirildi.

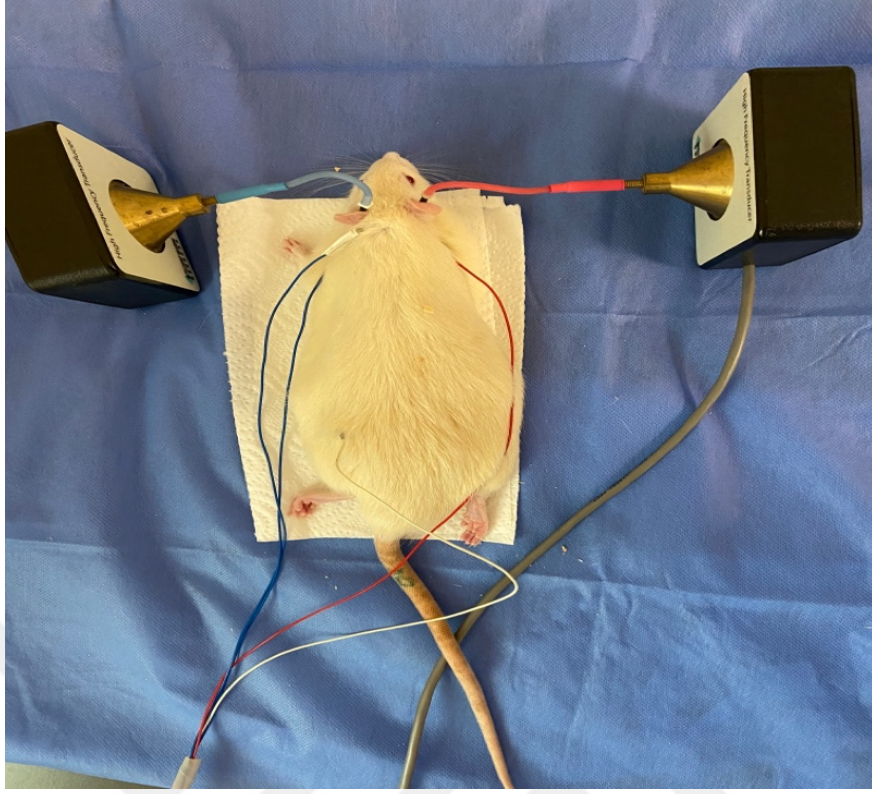
İşitsel uyarılmış beyinsapı potansiyel testi için Intelligent Hearing Systems Smart EP-10 kullanıldı. ABR testi alterne polaritede 8,12,16,20 ve 32 kHz 'de gerçekleştirdi. Kayıt sırasında sub-dermal iğne elektrodlar kullanıldı. Aktif elektrod vertekse, referans elektrod test kulağına, toprak elektrod ise karşı kulağın kulak altına yerleştirildi . Elektrod dirençleri 1 kohm'nin altında tutuldu. Elektrodlarla toplanan biyoelektriksel yanıtlar 31.3 mikrosaniye örnekleme hızında analogdan dijitale çevrildi. Uyarının frekans spektrumunu daha darlaştırmak amacıyla Blackman zarfıyla, iniş-çıkış süresi 1000 ms olan ton burst uyarın kullanıldı. III. dalganın elde edildiği en düşük şiddet düzeyi ratın o frekanstaki işitme eşiği olarak kabul edildi.

Sıçan gruplarının DPOAE ve ABR testlerinin sonuçları grupların kendi içinde ve gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Uygulamanın yedinci günde ototoksik etkileri fonksiyonel düzeyde değerlendirmek için ABR ölçümleri tekrarlandı. Aynı gün hayvanlar sakrifiye edilerek iç kulak, beyin ve sinir dokuları çıkarılarak doku düzeyinde immunohistokimyasal olarak incelemeler yapıldı (Şekil 4).



Şekil 2. Auditory Brainstem Response (ABR) testinin uygulanması



Şekil 3. Ratlara ABR testinin yapılışı

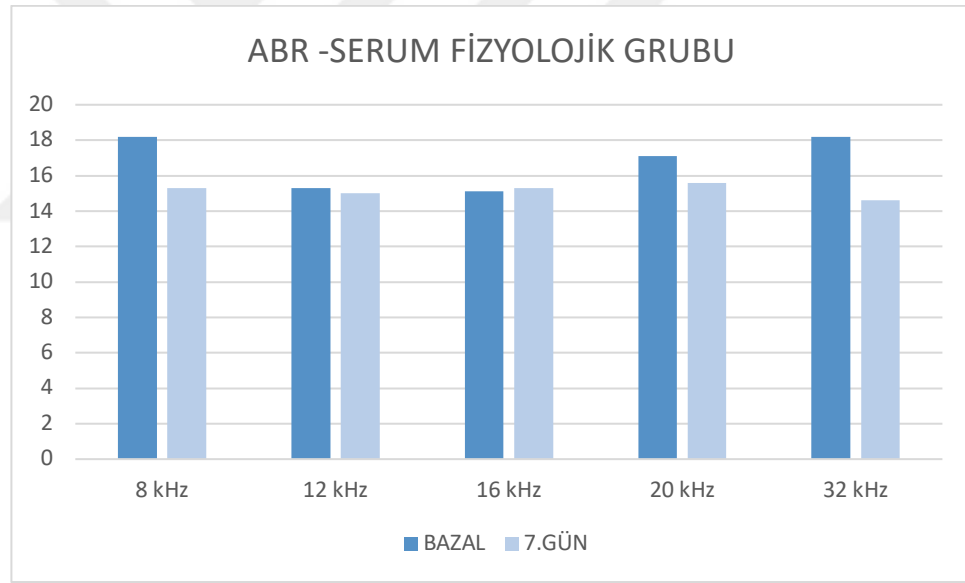


Şekil 4. Ratların sakrifikasyonu, beyin ve iç kulak dokularının çıkarılması

4.2 Odyometrik Ölçüm Sonuçları

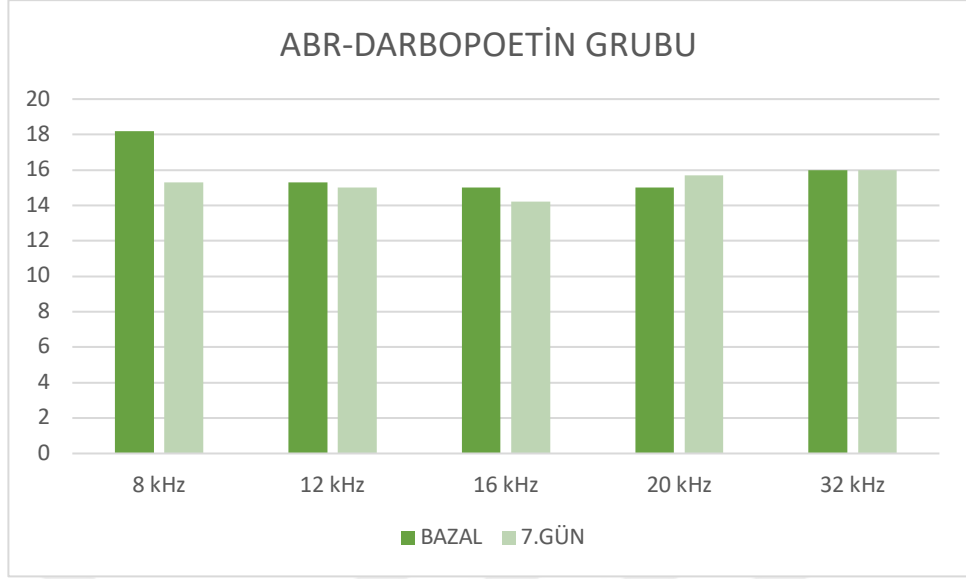
Tüm gruplarda bazal DPOAE testinde tüm frekanslarda güçlü sinyal gürültü oranı saptandı. Kontrol grubu ve DPO grubunda sıfır ve yedinci günlerde DPOAE testinde sinyal gürültü oranı elde edildi. Kontrol grubu ile DPO grubu arasında DPOAE testinde sinyal gürültü oranı açısından farklılık saptanmadı ($p>0.50$). CDDP uygulanan grupta; yedinci gün yapılan DPOAE testinde tüm frekanslarda sinyal gürültü oranlarının kaybolduğu görüldü ve kontrol grubuna göre tüm frekanslarda sinyal gürültü oranının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p=0.000$).

Kontrol grubunda sıfır ve yedinci günlerde tüm ratlarda ABR ölçümleri normal bulundu (Grafik 1).



Grafik 1. Kontrol grubunda (n=7) serum fizyolojik uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen fizyolojik ABR sonuçları

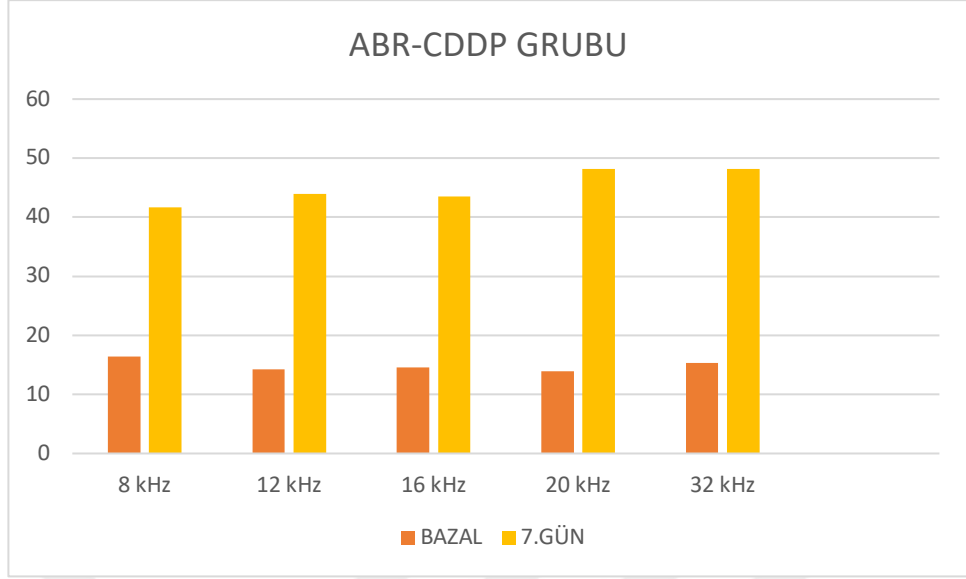
DPO uygulanan grupta sıfır ve yedinci günlerde tüm ABR ölçümleri normal bulundu (Grafik 2).



Grafik 2. DPO grubunda (n=7) uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen normal düzeylerde ABR sonuçları.

Kontrol grubu ile DPO grubu arasında işitme eşikleri açısından farklılık saptanmadı ($p=0.50$).

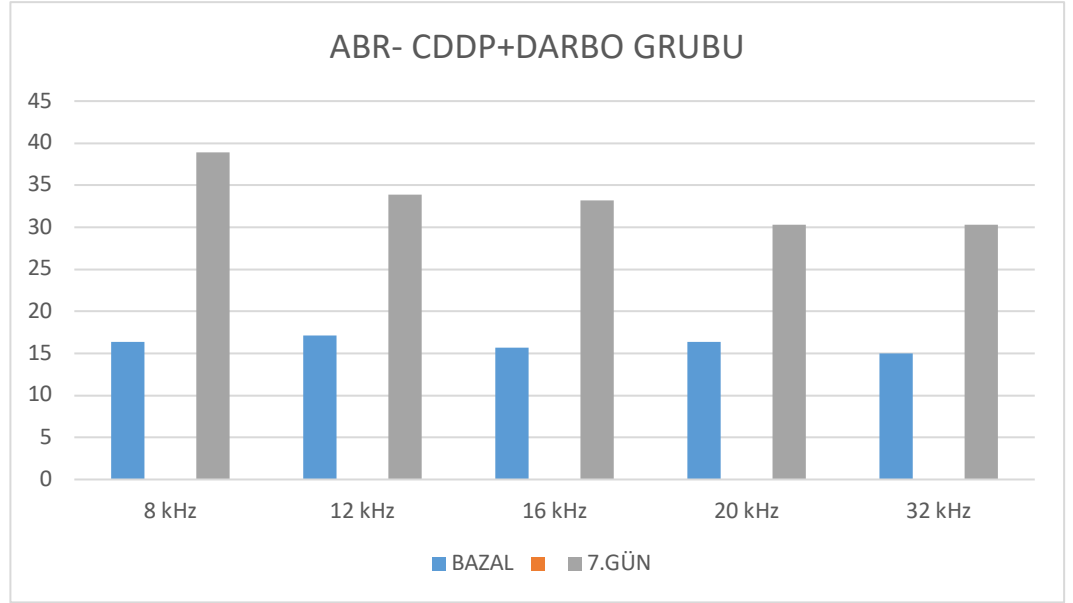
CDDP uygulanan grupta; yedinci gün yapılan ABR ölçümlerde tüm frekanslarda işitme kaybı saptandı (Grafik 3).



Grafik 3. CDDP grubunda uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen ABR sonuçları.

Yedinci günde CDDP grubunda ABR ölçümlerinde kontrol grubuna göre tüm frekanslarda işitme eşiklerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmektedir ($p=0.000$). CDDPin oluşturduğu ototoksisiteyi desteklemektedir.

CDDP ve DPO birlikte uygulandığı grupta yedinci günde tüm frekanslarda işitme kaybı saptandı (Grafik 4).



Grafik 4. CDDP-DPO uygulaması öncesi bazal ve yedinci gün kontrollerde elde edilen ABR sonuçları.

Kontrol grubu ile DPO grubu arasında işitme eşikleri açısından farklılık saptanmadı ($p>0.50$). CDDP-DPO grubunda yedinci gün ölçümlerde işitme eşikleri arasında farklılık olmasına karşın, fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p=0.24$). DPO'nin CDDP'in ototoksik etkisini hafiflettiğini, koruyucu etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

4.3 İmmünohistokimyasal Sonuçlar

İmmünohistokimyasal doku düzeyinde gerçekleştirilen incelemelerde CDDP uygulanan grupta iç kulakta strüktürel değişiklikler, beyin ve sinir dokularında nekroz ve nekroptoz saptandı. DPO'nin CDDP'in ortaya çıkardığı iç kulak ve beyin hasarlarını önlediği, hem apoptotik protein ekspresyonları hem de oksidatif stres ilişkili belirteçler olan Nrf-2 ve ilişkili Hem Oksijenaz-1, NQO1

üzerinden gösterirken nitrik oksit sistemi üzerinden de etkileri saptandı (Tablo 3).

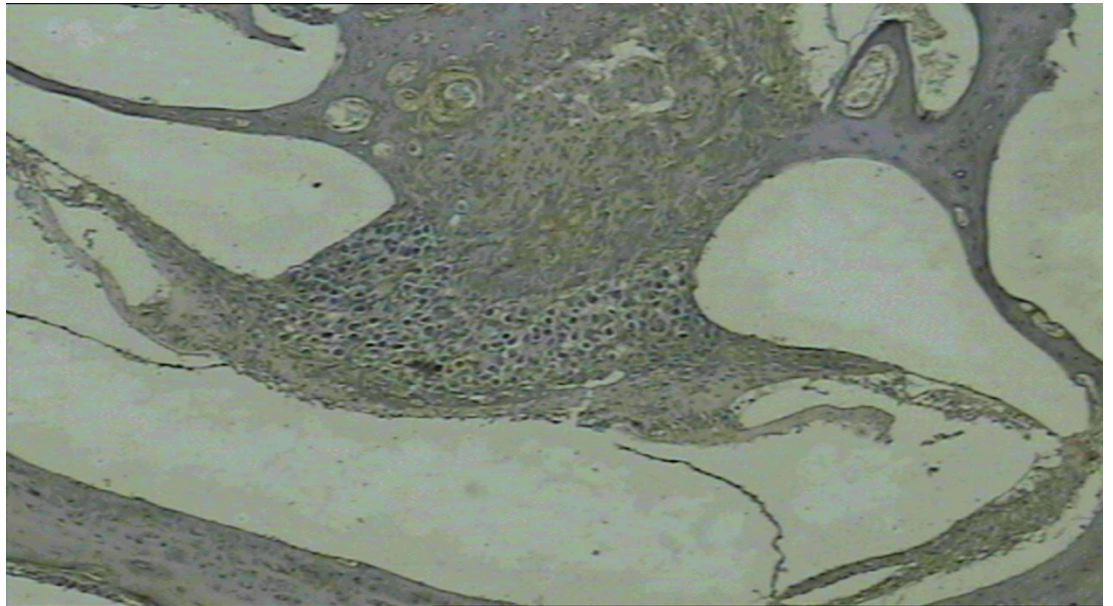
	Control	CDDP	DPO	DPO-CDDP
Caspaz 3	-	++	-	+
Caspaz 8	-	++	-	+
Caspaz 9	-	++	-	+
iNOS	-	-	-	-
nNOS	-	+	-	+
Nrf-2	-	-	-	-
HO-1	-	-	-	+
NQO-1	-	-	-	+

Tablo 3. Gruplara göre immünohistokimyasal bulgular

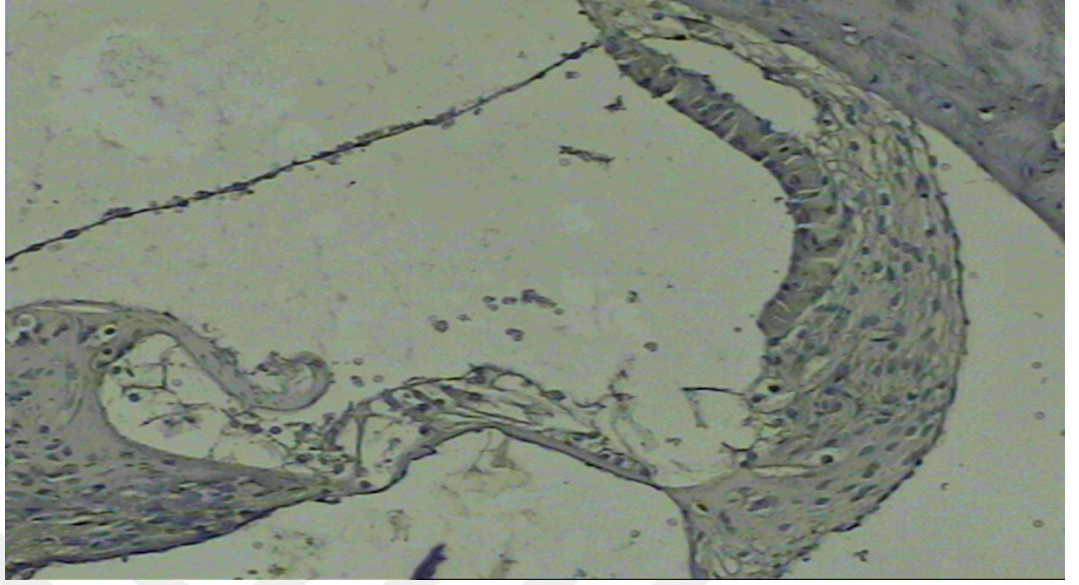
Hematoksilen Eozin Boyama Sonuçları

Kontrol grubu:

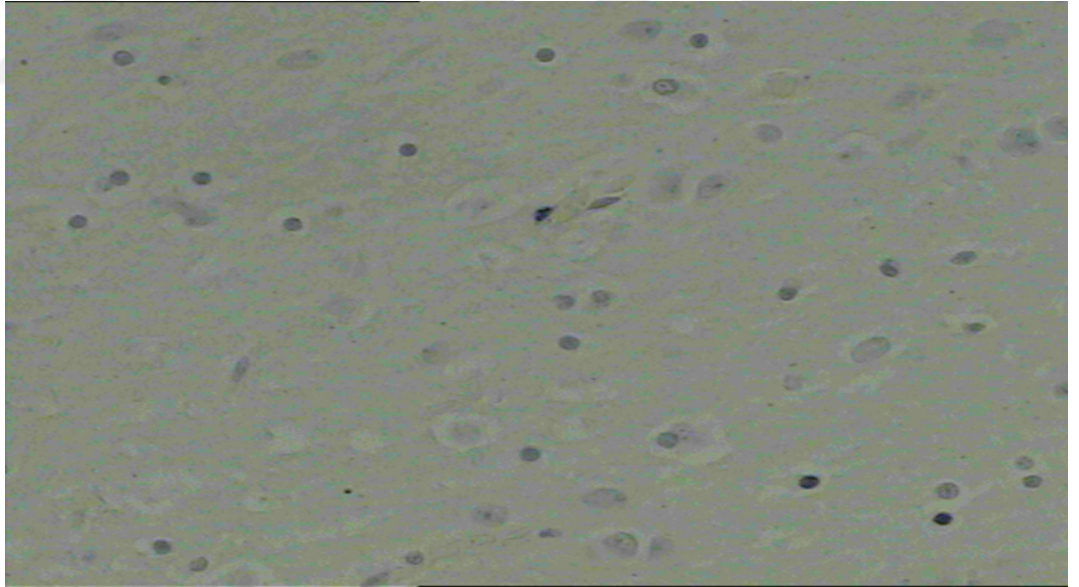
Kontrol grubunda iç kulakta, spiral ganglionda ve beyin dokularında morfolojik yapının bozulmadığı gözlemlendi. Kemik iliği dokuları normal olarak değerlendirildi (Şekil 5a, 5b, 5c)



Şekil 5 a. Olağan görünümde iç kulak (x40)



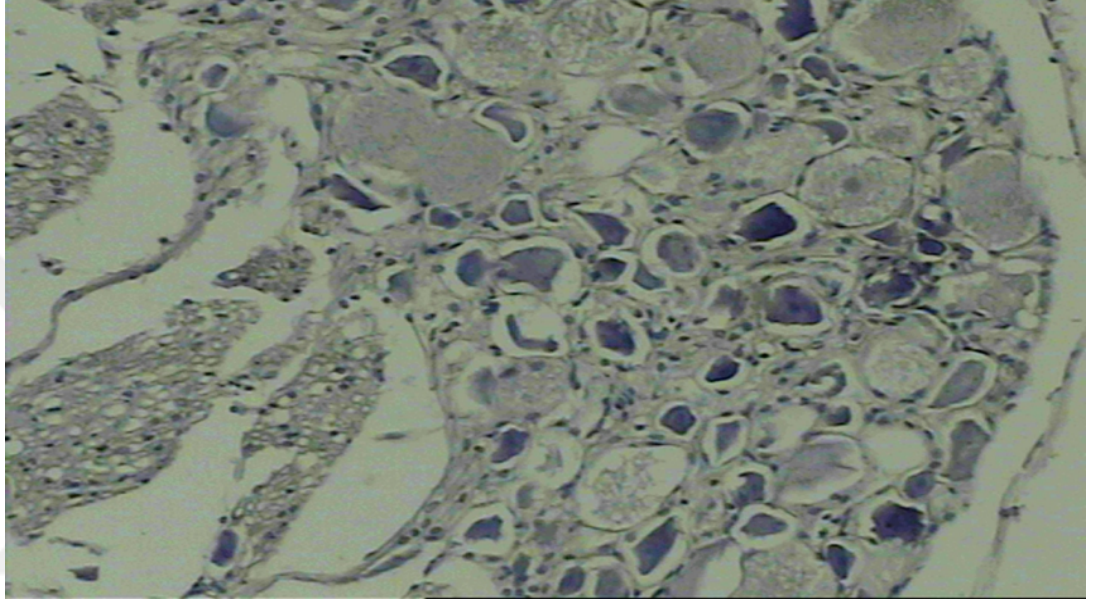
Şekil 5 b. Olağan görünümde organ korti (x200)



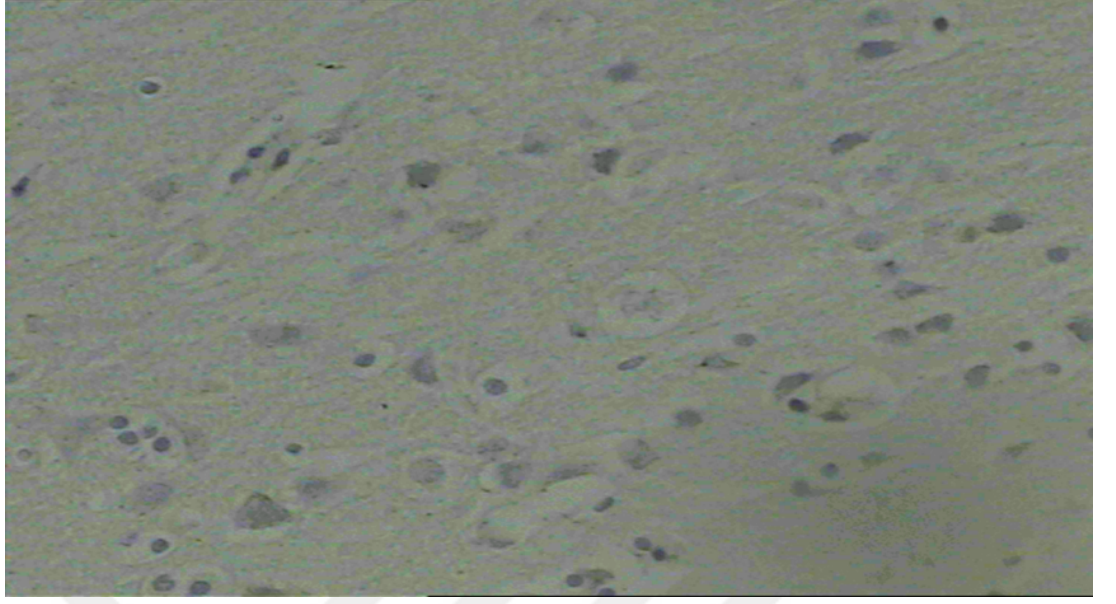
Şekil 5 c. Kontrol grubunda Olağan görünümde beyin dokusu mikroskopisi (x400, HE)

Sisplatin Grubu:

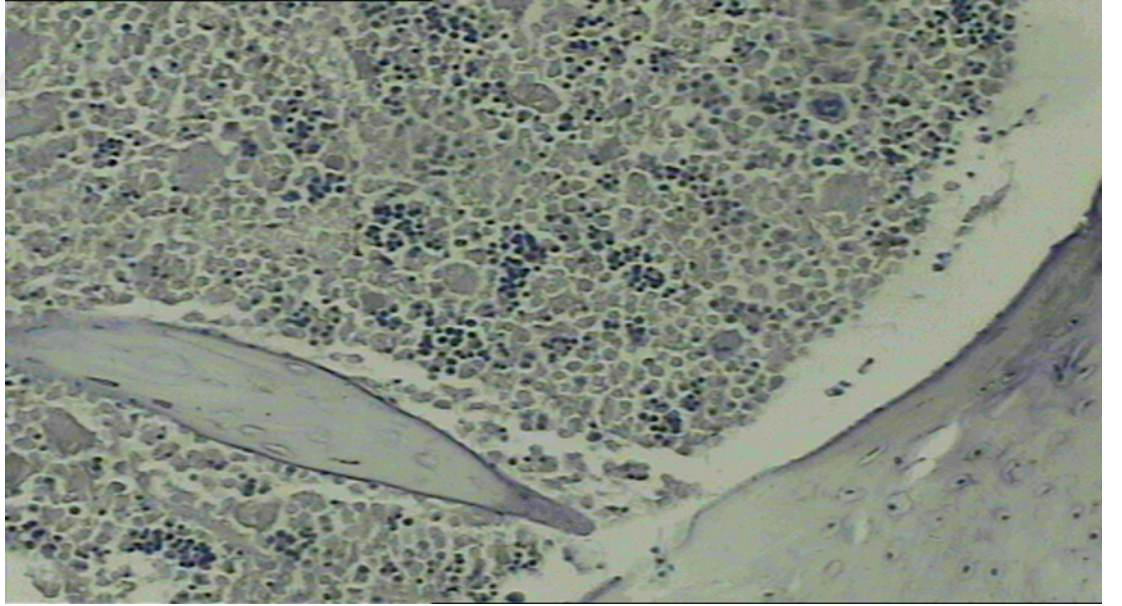
Sisplatine bağlı i kulakta strüktürel değişiklikler, beyin ve sinir dokularında nekroz ve nekroptoz saptandı. Kemik trabekülleri arasında izlenen ilik dokusunda %80 e yakın nekroz gözlendi (şekil 6 a,b,c).



şekil 6 a. CDDP grubunda Spiral Ganglionda ganglion hücrelerinde şekil bozuklukları, küçülme, piknotik değişiklikler (x400, HE)



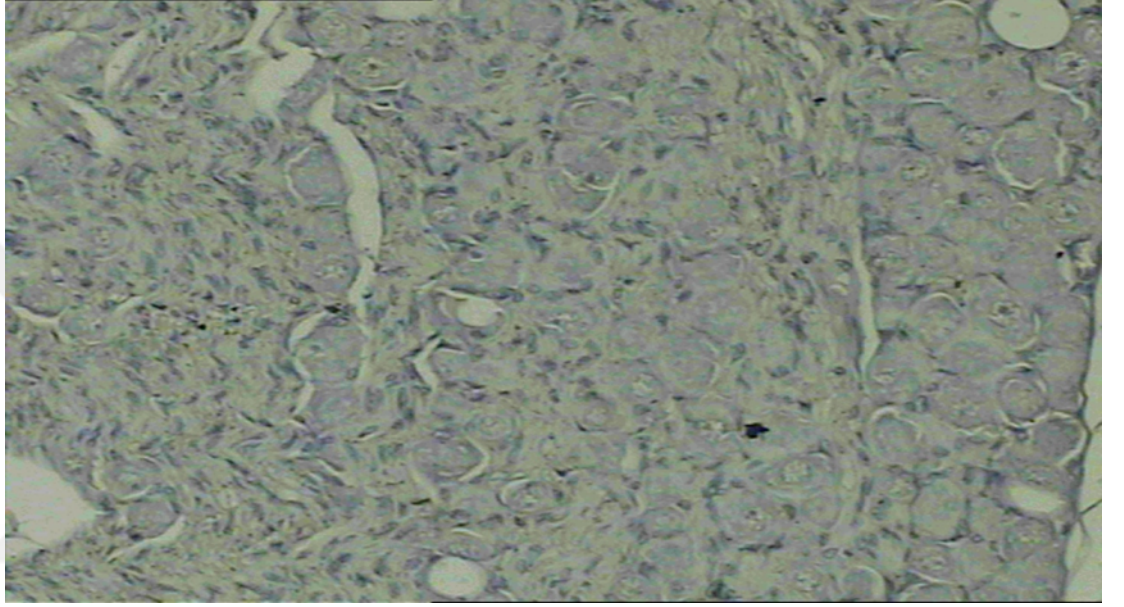
Şekil 6 b. CDDP grubunda beyin dokusu mikroskopisi (x400)



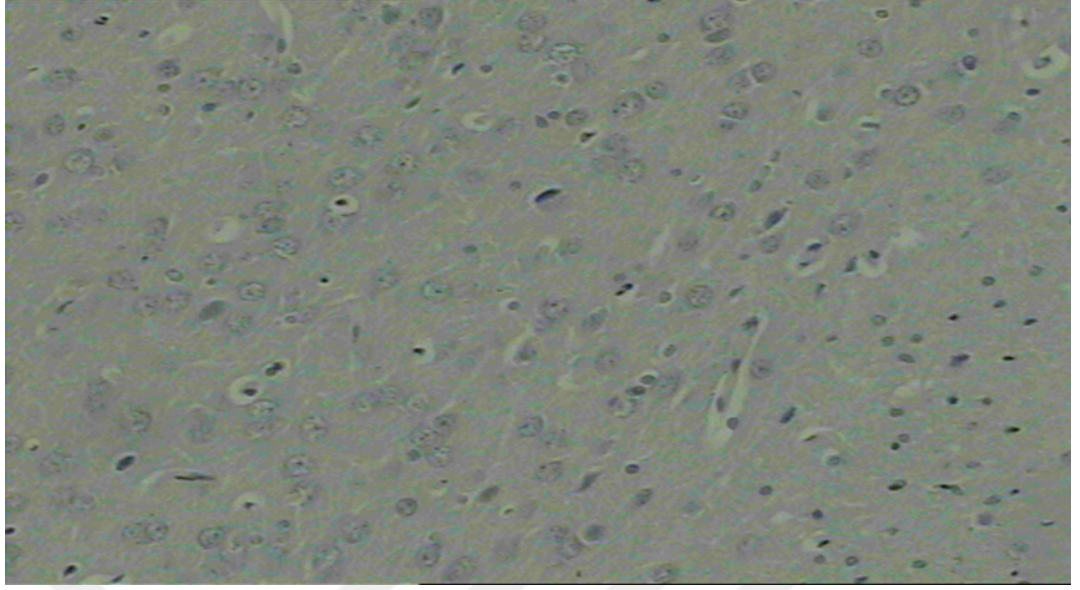
Şekil 6 c. CDDP grubunda %80 nekroz izlenen kemik iliği dokusu (x100, HE)

Darbepoetin Grubu:

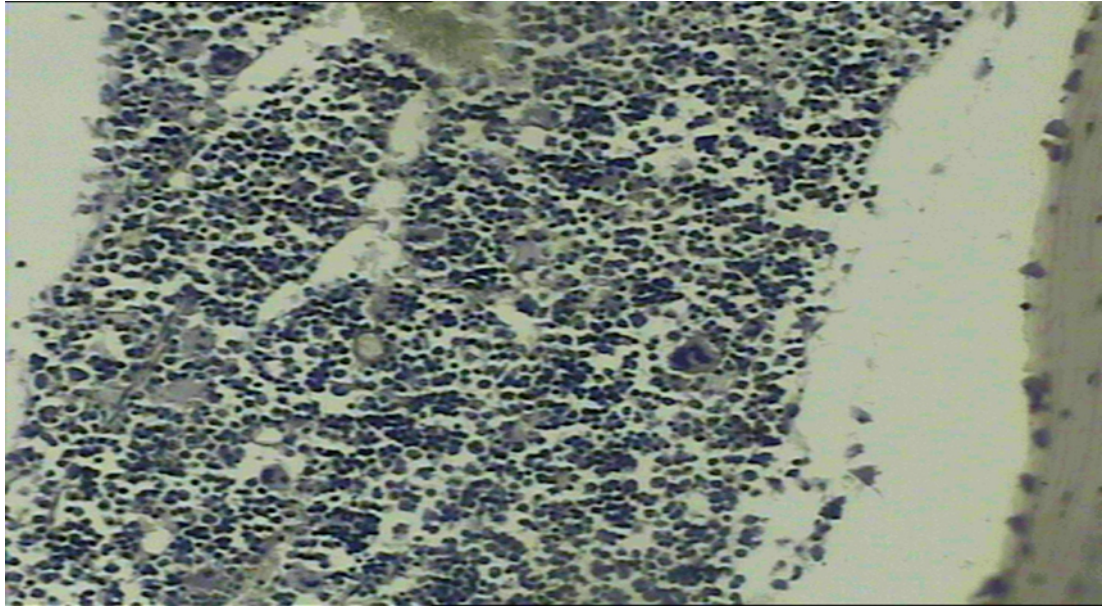
DPO grubunda iç kulakta, spiral ganglionda ve beyin dokularında morfolojik yapının bozulmadığı gözlemlendi. DPO'nin kemik iliği üzerinde yan etkileri gözlemlenmedi (Şekil 7a,b,c).



Şekil 7 a. Darbepoetin grubunda olağan görünümde spiral ganglion (x200, HE)



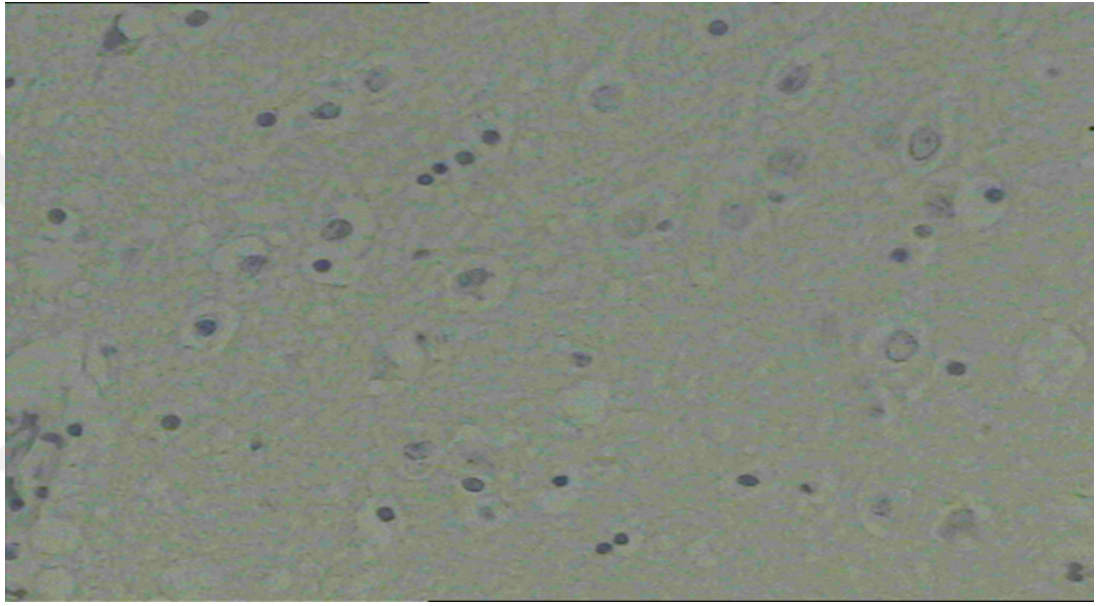
Şekil 7 b. Darbopoetin grubunda olağan görünümde beyin histolojisi (x200, HE)



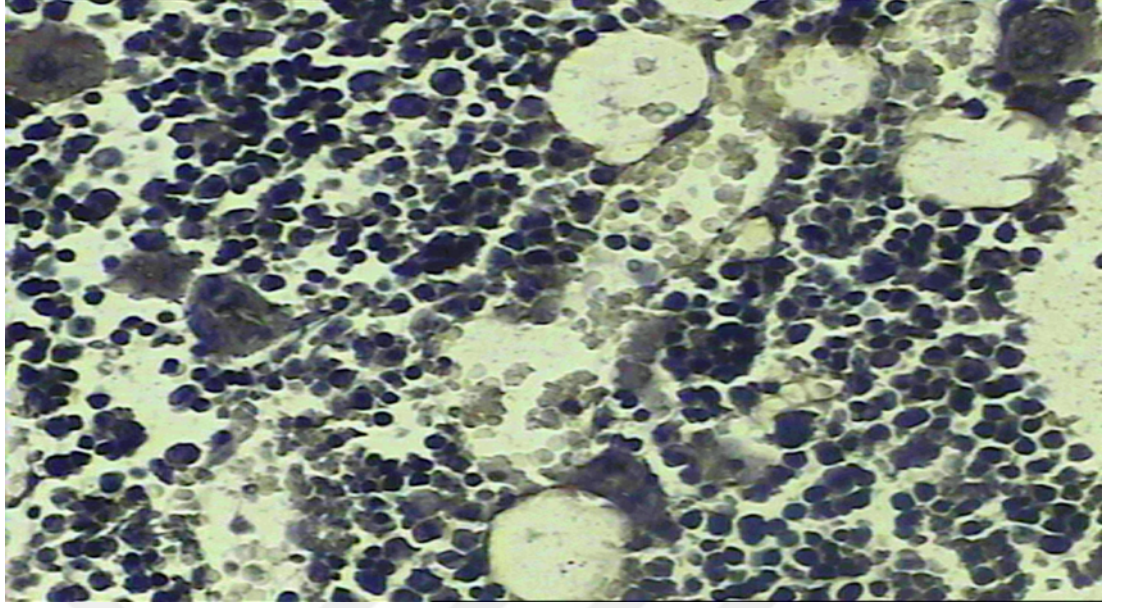
Şekil 7 c. Darbopoetin grubunda olağan sellüler görünümde, her üç seriye ait elemanlar barındıran kemik iliği (x100 HE)

Darbepoetin + Sisplatin Grubu:

İmmunohistokimyasal doku düzeyinde gerçekleştirilen incelemelerde DPO-CDDP grubunda CDDP uygulanan gruba göre azalmış oranda iç kulakta strüktürel değişiklikler, beyin ve sinir dokularında nekroz ve nekroptoz saptandı. Kemik iliğinde nekroz çok azalmış olarak izlendi (Şekil 8 a,b).



Şekil 8 a. DPO-CDDP grubunda olağan beyin histolojisi (x400, HE)

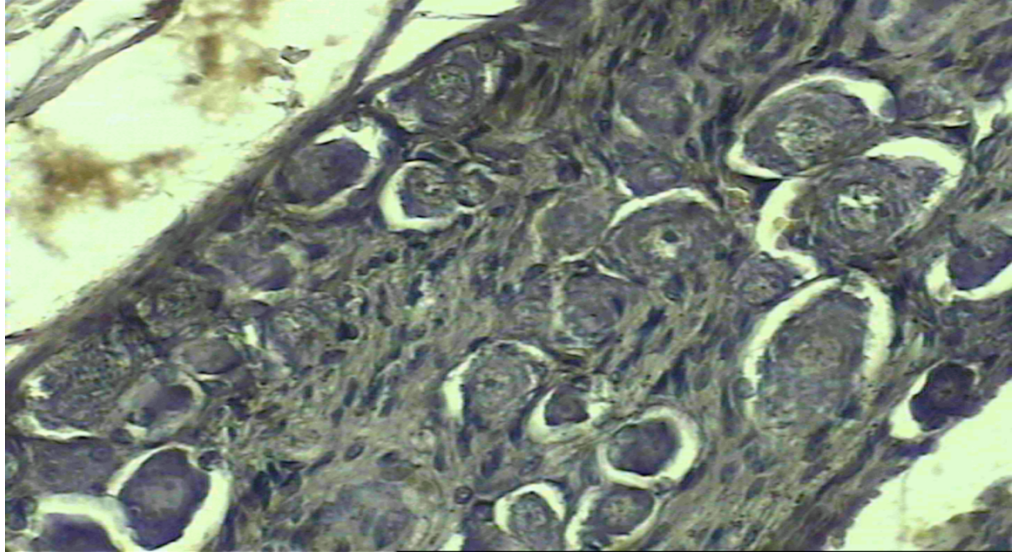


Şekil 8 b. DPO-CDDP grubunda kemik iliğinde nekroz çok azalmış olarak izlendi (x400, HE)

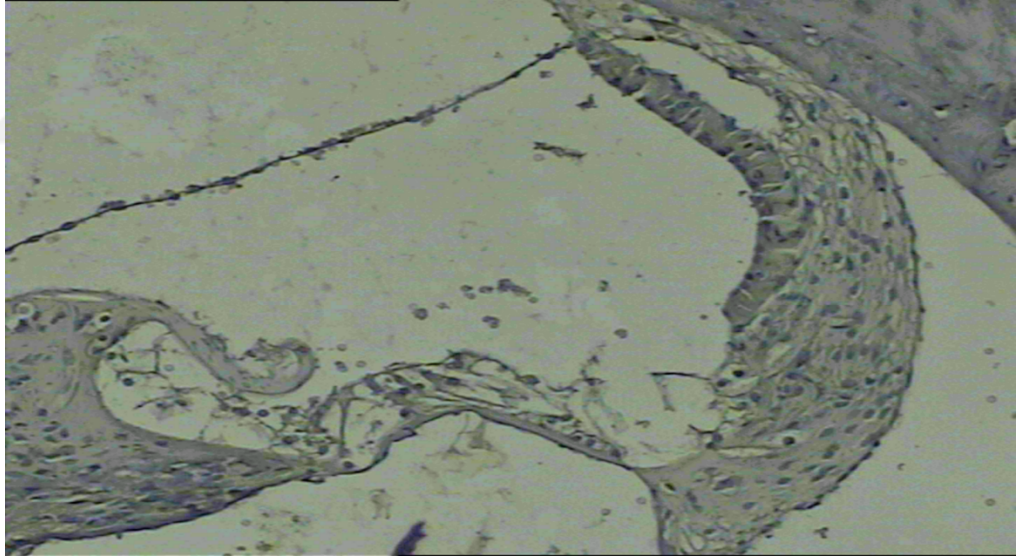
Apoptoz Görüntüleri

Kontrol grubu Apoptoz:

Kontrol grubunda hemen hemen hiç apoptotik hücre saptanmadı. Kohlea kesitinde kaspaz-3, 8 ve 9 antikoru ile immünohistokimyasal boyama negatif saptandı (Şekil 9 a,b).



Şekil 9 a . Kontrol grubunda spiral ganglionda kaspaz 3 negatifliği

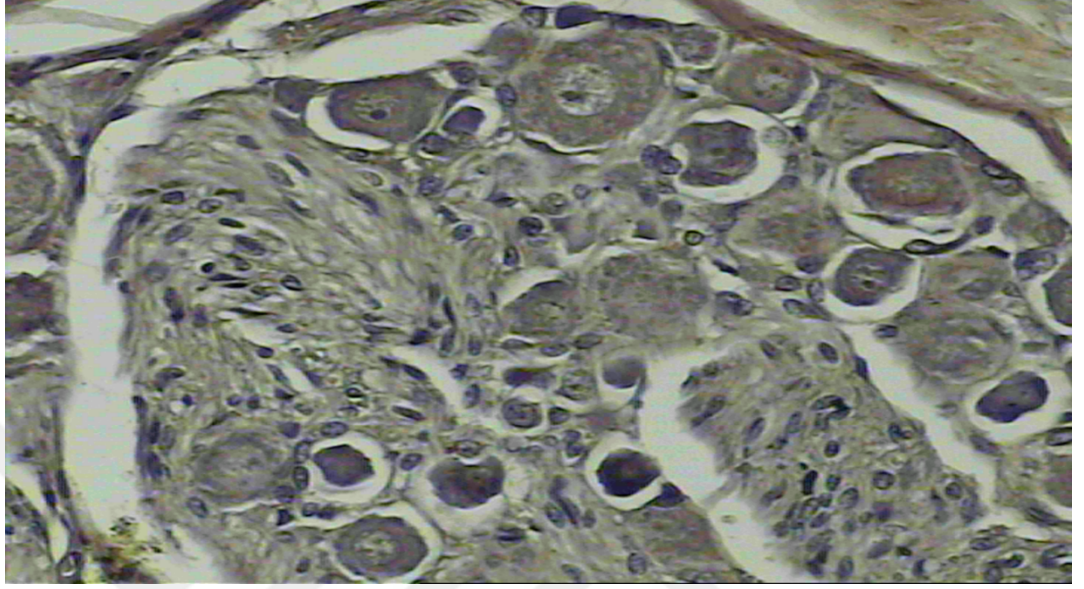


Şekil 9 b. Kontrol grubunda korti organında Kaspaz 9 negatifliği (X200 DAB)

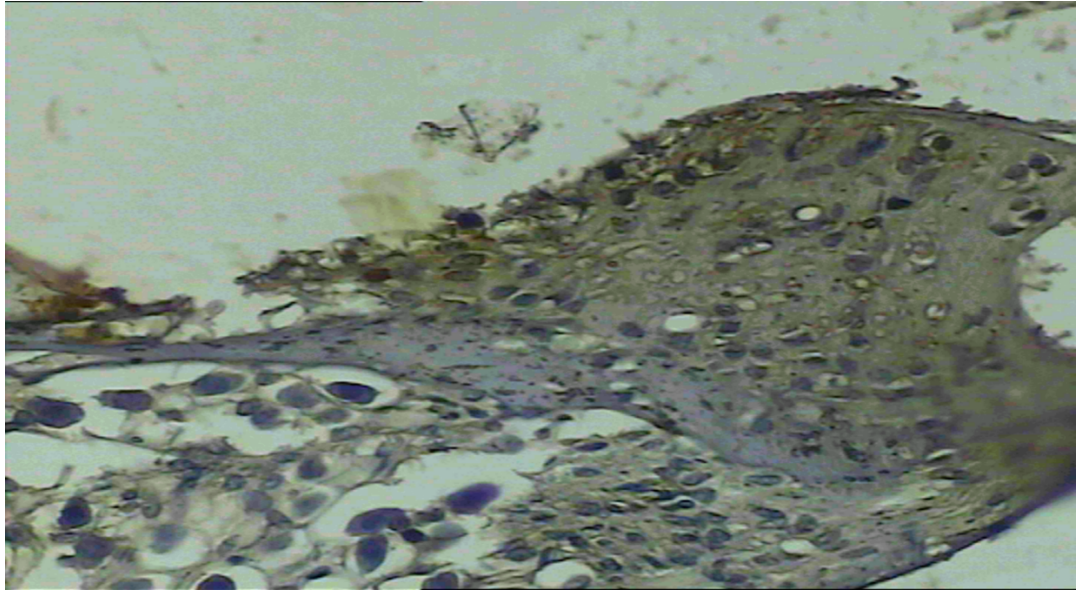
Sisplatin Grubu Apoptoz:

Siplatin grubunda incelenen tüm dokularda belirgin %70-80 düzeyinde apoptotik hücre saptandı. Beyin kesitinde immünohistokimyasal boyama sonucu

kaspaz-3, 8 ve 9 pozitif hücrelerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 10 a,b).



Şekil 10 a . CDDP grubunda Spiral ganglionda kaspaz 8 pozitifliği (X400, DAB)



Şekil 10 b. CDDP grubunda korti organında kaspaz 9 pozitifliği (x400 DAB)

Darbepoetin Grubu Apoptoz:

DPO grubunda incelenen tüm dokularda hemen hemen hiç apoptotik hücre saptanmadı.

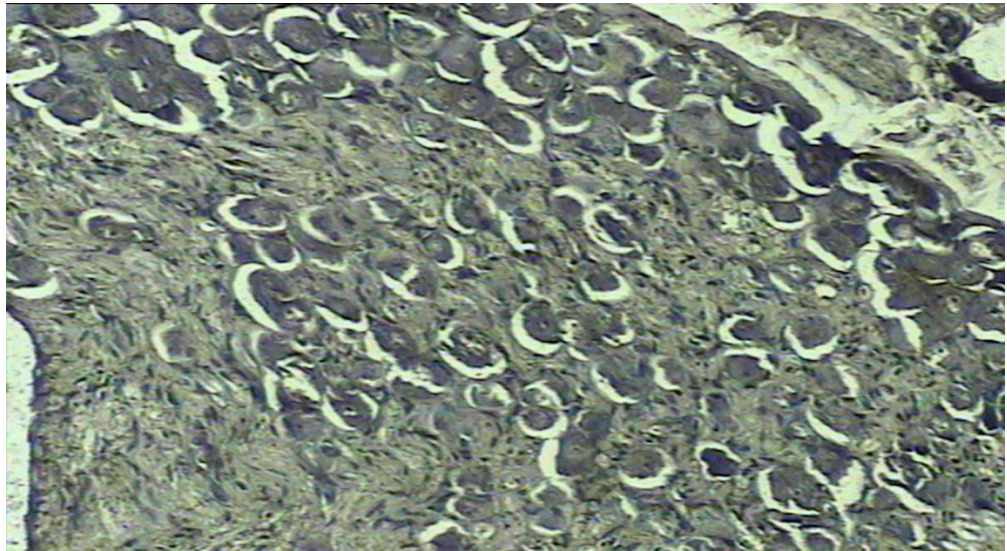
Darbepoetin-Sisplatin Grubu Apoptoz:

CDDP-DPO grubunda incelenen tüm dokularda CDDP grubu ile kıyaslandığında CDDP grubuna göre daha azalmış oranda apoptotik hücre saptandı. CDDP-DPO grubunda, CDDP grubuna göre koklea kesitinde kaspaz-3 ve kaspaz-8 immünohistokimyasal boyama sonucu pozitif hücrelerin belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi.

Reaktif Oksijen İlişkili Belirteçler

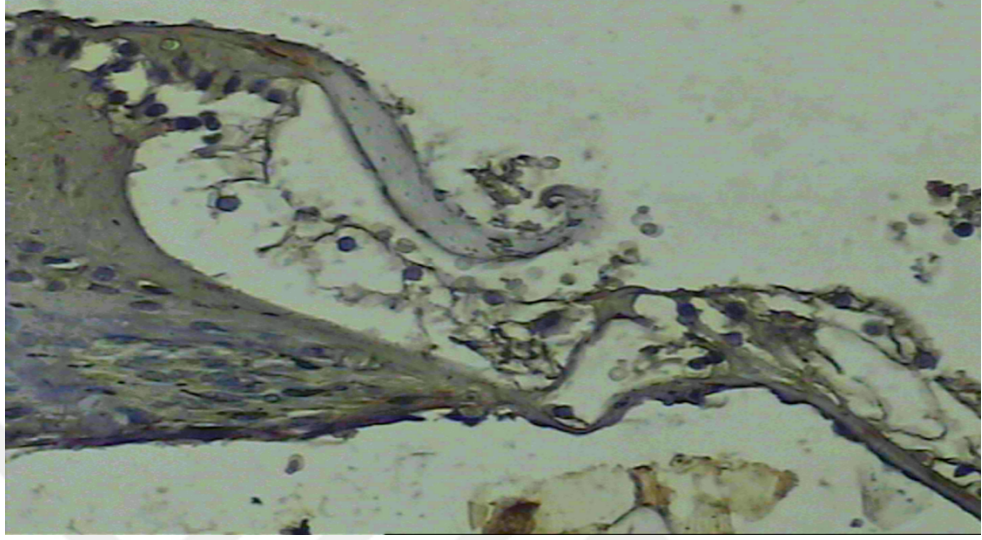
CDDP'in ortaya çıkardığı iç kulak ve beyin hasarları oksidatif stres ilişkili belirteçler olan Nrf-2 ve ilişkili Hem Oksijenaz-1, NQO1 üzerinden gösterilirken DPO'nin hasarı azaltıcı etkileri de saptandı.

CDDP grubu spiral ganglionda iNOS immünohistokimyasal boyama sonucu negatif gözlemlendi (Şekil 11).



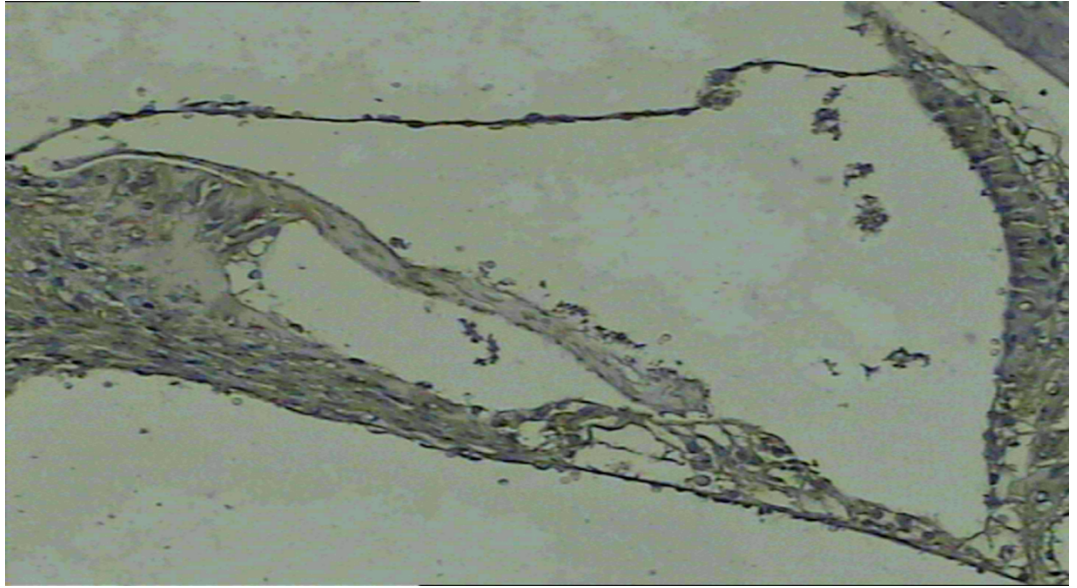
Şekil 11. CDDP grubunda spiral ganglionda iNOS negatifliği

CDDP-DPO grubu koklea kesitinde nNOS immünohistokimyasal boyama sonucu nNOS pozitif hücrelerin CDDP grubu ile kar şıla tırıldı ında belirgin şekilde azaldığı gözlendi ( ekil 12).



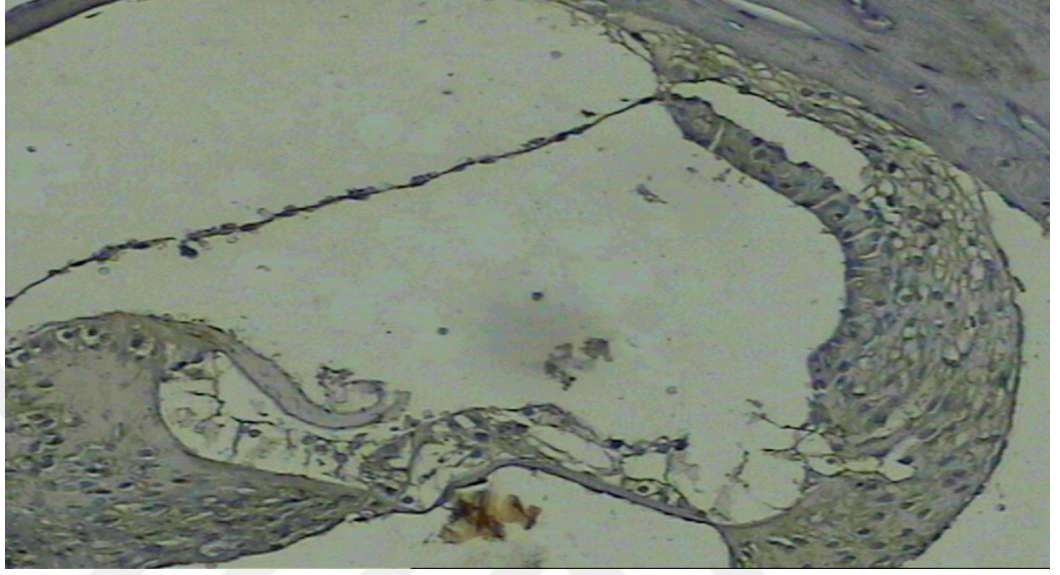
Şekil 12. CDDP- DPO grubunda korti organında nNOS pozitifliği (x400, DAB)

CDDP-DPO grubu koklea kesitinde HO-1 immünohistokimyasal boyama sonucu pozitif hücreler gözlendi ( ekil 13).



Şekil 13. CDDP-DPO grubunda korti organında HO pozitifliği (x400, DAB)

CDDP-DPO grubu koklea kesitinde NQO-1 immünohistokimyasal boyama sonucu pozitif hücreler gözlemlendi (Şekil 14).

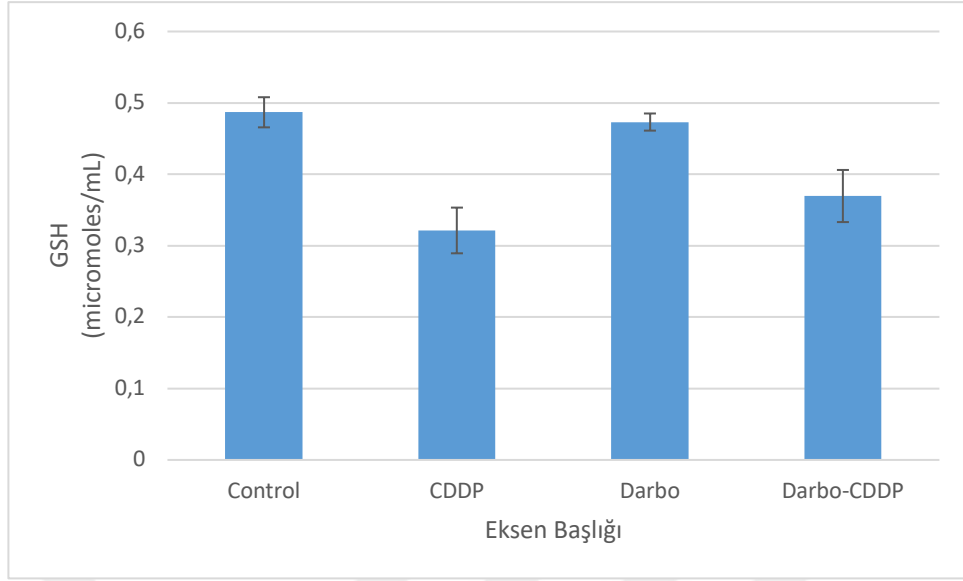


Şekil 14. CDDP-DPO grubunda korti organında NQO1 pozitifliği

4.4.Biyokimyasal Sonuçlar

Serum Glutasyon Sonuçları

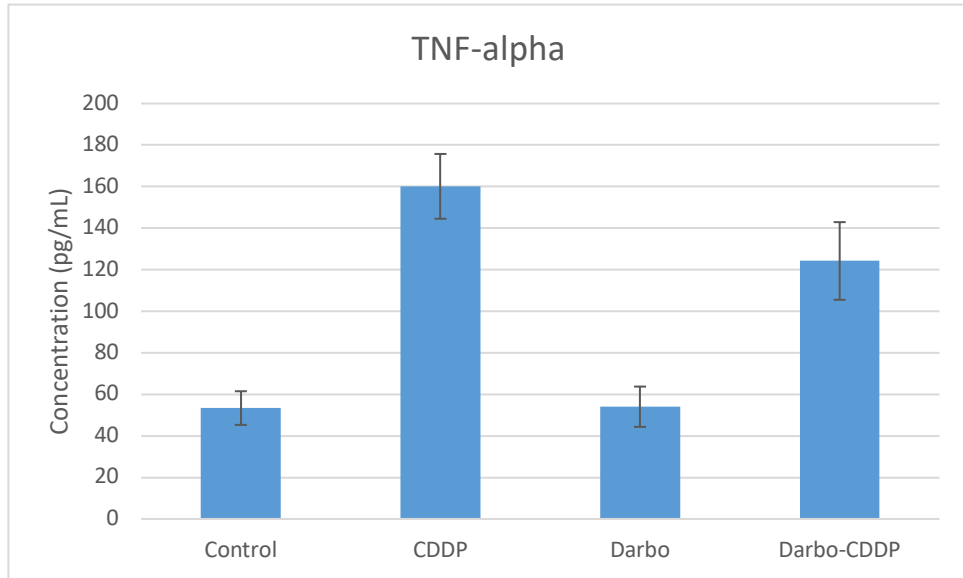
Serum total glutasyon düzeyleri CDDP grubunda azalma gösterirken, DPO eklenmiş grupta bir miktar anlamlı artış saptandı ($p<0.05$) (Grafik 5).



Grafik 5. Gruplara göre serum total glutatyon düzeyleri

Serum TNF- α Sonuçları

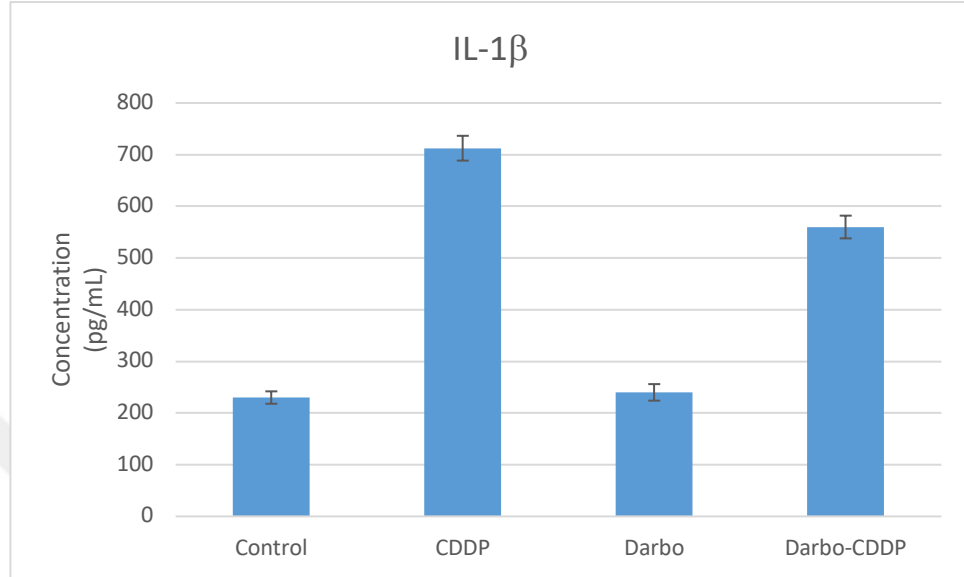
Serum TNF-alfa düzeyleri CDDP grubunda artış gösterirken, DPO eklenmiş grupta anlamlı azalma saptandı ($p<0.05$) (Grafik 6).



Grafik 6. Gruplara göre serum TNF-alfa düzeyleri

Serum IL-1 β Sonuçları

Serum IL1- β düzeyleri CDDP grubunda artış gösterirken, DPO eklenmiş grupta anlamlı azalma saptandı ($p<0.05$) (Grafik 7).



Grafik 7. Gruplara göre serum IL1- β düzeyleri

4.5.İstatistiksel Analiz Sonuçları

Kontrol grubu ile DPO uygulanan grup karşılaştırıldığında dokularda istatistiksel farklılık saptanmadı. DPO tek başına apoptozu indüklediğini ya da ROS'u tetiklemediğini desteklemektedir.

Kontrol grubu ile CDDP uygulanan grup karşılaştırıldığında kokleada kaspaz 3 ve kaspaz-8'de anlamlı artış, fark yanında nNOS ta istatistiksel anlamlı fark olmasa da CDDP hasarını gösteren bulgular saptandı. Yine CDDP grubunda kontrole göre iNOS, Nrf2, HO-1, NQO1 ekspresyonunda farklılık saptanmadı. nNOS da saptanan değişiklik spiral ganglionda görülen hasarı desteklemektedir. Yine CDDP grubunda serum total glutatyon düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı azalma gösterirken, TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde kontrole göre CDDP düzeylerinde artış bulunması antioksidan düzeylerinde azalma ve anti-inflamatuar proteinlerde artışı göstermiştir.

CDDP grubu ile CDDP-DPO uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz- 3, kaspaz-8 ve HO-1, NQO1, nNOS ta CDDP hasarını gösteren ekspresyon artışı bulguları saptandı. DPO'nun CDDP'e eklenmesi (CDDP-DPO grubunda) kaspaz-3ve kaspaz-8 orta pozitiften, istatistiksel anlamlı olmasa da hafif pozitifte doğru ekspresyon değişimi saptanmıştır. Bu bulgu DPO eklendiğinde CDDP'nin indüklediği apoptozu azalttığını/hafiflettiğini desteklemektedir. Yine DPO'nun CDDP'e eklenmesi HO-1, NQO1, nNOS, glutatyon ve anti-inflamatuvar TNF-alfa ve Il-1 β aracılı olarak antioksidan sistemi aktive ettiğini ve nitrik oksid sisteminin değişime uğradığını desteklemektedir.

iNOS ve nNOS ekspresyonları açısından dokularda CDDP ve CDDP-DPO grupları karşılaştırınca ROS artışı olduğu saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$). HO-1 ve NQO1 CDDP grubunda negatifken CDDP-DPO grubunda pozitif ekspresyon göstermesi DPO'ye bağlı olarak HO-1 ve NQO1 aracılı koruyucu etkilerini desteklemektedir.

Kontrol grubu ile CDDP-DPO grubu karşılaştırıldığında HO-1 ve NQO1 kontrol grubunda ve CDDP grubunda da ekspresyon göstermezken CDDP-DPO grubunda ekspresyon göstermiş olup, CDDP'nin indüklediği ROS'a karşı DPO'nin koruyucu etkilerinin ortaya çıktığını desteklemektedir. Kaspaz 3 ve 8 açısından istatistiksel fark saptanmadı. DPO'nin apoptozu azaltıcı etkilerini desteklemektedir.

DPO grubu ile CDDP-DPO grubu karşılaştırıldığında; HO-1, NQO1 ekspresyonunun yarattığı farklılık CDDP'nin indüklediği ROS'a karşı DPO'nin koruyucu etkilerinin ortaya çıktığını desteklemektedir ($p=0.002$). Kaspaz 3, kaspaz-8, kaspaz-9, iNOS, nNOS ve Nrf-2 de anlamlı farklılık saptanmadı.

İşitme ölçümleri ile histopatolojik bulgular arasında Spearman testi ile korelasyonu analizi yapıldığında; 7. Günde kontrol ve CDDP grubu arasında işitme ölçümleri tüm frekanslarda kaspaz 3 ve 8 ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir ($p<0.05$). İşitme kaybı ile kaspaz 3 ve 8 ekspresyonu korelasyon göstermektedir. nNOS, iNOS, ve diğerlerinde korelasyon saptanmadı ($p>0.05$). CDDP ve CDDP-DPO grubunda korelasyon analizi yapıldığında kaspaz 3 ve kaspaz-8 ekspresyonları ile işitme testlerinde 12,16,20,32 Hz de korelasyon

saptandı. HO-1, NQO1 da 12,16,20,32 Hz de korelasyon saptandı. Nrf2 de 20 Hz de korelasyon saptandı (p=0.025). nNOS ta korelasyon saptanmadı (p>0.05).

Kontrol grubu ile CDDP grubu karşılaştırılması Mann-Whitney U sonuçları

Test Statistics^a

	Kaspa z3	Kaspa z8	Kaspa z9	INOs	NNOS	NRF2	HO	NQO1
Mann-Whitney U	,000	,000	,000	12,000	2,000	3,000	15,000	10,000
Wilcoxon W	21,000	21,000	10,000	22,000	12,000	6,000	36,000	20,000
Z	-2,928	-3,028	-2,000	,000	-1,789	,000	,000	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,003	,002	,046	1,000	,074	1,000	1,000	1,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,010 ^b	,004 ^b	,400 ^b	1,000 ^b	,229 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b

a. Grouping Variable: grups

b. Not corrected for ties.

Kontrol grubu ile DPO grubu karşılaştırılması

Test Statistics^a

	Kaspa z3	Kaspa z8	Kaspa z9	INOs	NNOS	NRF2	HO	NQO1
Mann-Whitney U	15,000	15,000	6,000	18,000	8,000	6,000	12,500	12,500
Wilcoxon W	30,000	36,000	12,000	39,000	18,000	16,000	27,500	27,500
Z	,000	-1,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,317	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b	,699 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b
--------------------------------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

a. Grouping Variable: grups

b. Not corrected for ties.

CCDP grubu ile CDDP-DPO grubu karşılaştırılması

Test Statistics^a

	Kaspaz 3	Kaspa z8	Kaspa z9	INOs	NNOS	NRF2	HO	NQO1
Mann-Whitney U	1,500	,000	,000	14,000	10,000	4,000	,000	,000
Wilcoxon W	29,500	28,000	28,000	42,000	16,000	7,000	21,000	10,000
Z	-2,503	-3,028	-1,673	,000	-,143	-,882	-3,317	-3,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012	,002	,094	1,000	,886	,378	,001	,003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,012 ^b	,003 ^b	,250 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	,643 ^b	,002 ^b	,010 ^b

a. Grouping Variable: grups

b. Not corrected for ties.

Kontrol ve CDDP-DPO grubu karşılaştırılması

Test Statistics^a

	Kaspa z3	Kaspa z8	Kaspa z9	INOs	NNOS	NRF2	HO	NQO1
Mann-Whitney U	12,000	15,500	8,000	21,000	4,000	6,000	,000	,000
Wilcoxon W	33,000	36,500	18,000	49,000	14,000	12,000	15,000	15,000

Z	-1,757	-,980	-1,464	,000	-2,182	-1,069	-3,162	-3,162
Asymp. Sig. (2-tailed)	,079	,327	,143	1,000	,029	,285	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,234 ^b	,445 ^b	,315 ^b	1,000 ^b	,073 ^b	,548 ^b	,004 ^b	,004 ^b

a. Grouping Variable: grups

b. Not corrected for ties.

Darbo grubu ile CDDP-Darbo grubu karşılaştırılması

Test Statistics^a

	Kaspa z3	Kaspa z8	Kaspa z9	INOs	NNOS	NRF2	HO	NQO1
Mann-Whitney U	10,000	12,000	6,000	21,000	4,000	8,000	,000	,000
Wilcoxon W	25,000	33,000	12,000	49,000	14,000	18,000	15,000	15,000
Z	-1,618	-1,757	-1,286	,000	-2,182	-1,225	-3,162	-3,162
Asymp. Sig. (2-tailed)	,106	,079	,199	1,000	,029	,221	,002	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,268 ^b	,234 ^b	,383 ^b	1,000 ^b	,073 ^b	,476 ^b	,004 ^b	,004 ^b

a. Grouping Variable: grups

b. Not corrected for ties.

5 TARTIŞMA

CDDP başta çocukluk çağı kanserleri olmakla birlikte erişkinde akciğer, testis kanserleri gibi birçok alanda yaygın kullanımı olan kemoterapötik bir ajandır. CDDP uygulamaları hastalarda toksisitelere yol açabilmektedir. Çocukluk çağında karşımıza çıkan toksisitelerin başında ototoksisite ve bunun sonucunda işitme kayıplarının yaşanması kaçınılmaz hale gelebilmektedir (36). Deneyisel modellerde bugüne dek özellikle CDDP'nin yan etkileri anlamında ototoksisite yanında nefrotoksisite ve nöronal toksisiteler çalışılmaktadır. Özellikle halen kullanımı yoğun bir şekilde devam eden bu ajanların yan etkilerinin azaltılması klinik anlamda önemli bir ihtiyaçtır.

Bu proje CDDP'e bağlı oluşan ototoksisite ve DPO kullanımı ile oluşan biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması amacıyla oluşturulmuştur.

Bugüne dek yapılan çalışmalarda CDDP uygulamasına bağlı ortaya çıkan toksisitelerin önlenmesi amacıyla N-asetil-sistein (9), erdostein (10,11), minosiklin (12) dietilditiokarbamat (13), piperin (14), ebselen (15), resveratrol (16), korean red ginseng (17,38) busilamin (18), ginkgolid B (19), D-metionin (20), acetyl L-carnitine (21), deksametazon (22) gibi maddelerin olumlu koruyucu etkileri hem *in-vitro* hem de *in-vivo* olarak gösterilmiştir (38,39,40,41). EPO de iç kulak hasarına karşı otoprotektif olarak kullanılan maddelerden biridir (23,24,25,26). EPO kronik böbrek yetmezliği ve kanser tedavisine bağlı gelişen anemi tedavisinde kullanılan bir ajan olmasına rağmen spiral ganglion nöron hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada EPO'nin iç kulak hücrelerine önemli rejeneratif etkisinin olduğu saptanmıştır (27). DPO; EPO'nin daha uzun yarı ömürlü ve *in-vivo* daha etkili aktif sentetik formu olup eritropoez uyarıcı etkileri dışında nöroprotektif etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (34,35,37,43). Bir derlemede, eritropoez uyarıcı ajanların preterm ve term bebeklerde nörogelişimsel iyileştirici etkileri olduğu bildirilmiştir (26). Bunun dışında etanol intoksikasyonu ilişkili nörotoksisiteye ve CDDP nefrotoksisitesine karşı koruyucu olduğu da bildirilmiştir (33). Çalışmamıza benzer ancak L-arjinin ajanının CDDP'e bağlı ototoksisitesi açısından eklenmesi

ile hem TNF- α düzeylerinde azalma, antioksidan düzeylerinde artış hem de Nrf2/HO-1 içeriğinde artış gösterdiği bulunmuştur (44).

Eritropoietinin iç kulak hasarına karşı otoprotektif etkilerini gösteren çalışmalar da vardır (23,24,25,26). Spiral ganglion nöron hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada EPO nun iç kulak hücrelerine önemli rejeneratif etkisinin olduğu saptanmıştır (27). Yakın zamanda bir çalışma ile kısmen benzer özellikler içeren zingeron polifenolü kullanılarak yapılaran siplatin (20 mg/kg, i.p.) bağlı ortaya çıkan kardiyotoksisitenin önlenmesinde lipid peroksidasyonun, oksidatif stres ve enflamasyonun azaltılması ile gerçekleştiği gösterilmiştir (42).

Bazı çalışmalarda EPO ve DPO nun etkileri karşılaştırılmış; DPO ile EPO'den daha iyi nöroprotektif etkili sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (35). EPO ile HEI-OC1 hücre hattında gerçekleştirilen CDDP ototoksitesisi çalışmasında Nrf2/antioksidan sistem ilişkili olarak Nrf2, HO-1 ve NQO1 üzerinden artış göstererek EPO'nun CDDP ototoksitesisini düzenleyici etkisi *in-vitro* olarak gösterilmiş olması, DPO kullanımı ile gerektirdiğimiz *in-vivo* çalışmamızın sonuçları ile uyumludur (45).

DPO'nun nöroprotektif etkileriyle ilgili birçok çalışma olmasına karşın literatürde bugüne dek yapılan çalışmalarda DPO'nin ve CDDP ototoksitesisi üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda CDDP'e bağlı ototoksitede DPO'nun koruyucu olup olmadığı ve olası koruyucu mekanizmanın Nrf2 ve hedef proteinleri ile ilişkili olup olmadığının çalışılmış olması oldukça özgündür.

Bu çalışma ile deneysel olarak CDDP ile ototoksitesite modeli oluşturulmuştur. Bu hem fonksiyonel hem de morfolojik ve biyokimyasal düzeyde ortaya konmuştur. Çalışmamızda CDDP uygulaması öncesinde verilen DPO'nun kohlea ve beyin dokularındaki hasarı belirgin düzeyde azalttığı saptanmıştır. DPO, CDDP'in ortaya çıkardığı iç kulak ve beyin hasarlarını önlediği hem apoptotik protein ekspresyonları hem de oksidatif stres ilişkili belirteçler olan Nrf-2 ve ilişkili Hemoksijenaz-1 ve NQO1 üzerinden gösterilirken, hem de nitrik oksit sistemi üzerinden etkileri de saptanmıştır. Yine çalışmamızda DPO'nun CDDP bağlı ototoksitesiteyi önlemede antioksidan

glutasyon ve anti-inflamatuar TNF- α ve IL-1 β moleküllerinin de i e kar  t   n  ortaya koymuştur.

Çalışmamızda DPO'nun, CDDP'in oluşturduğu ototoksisiteyi hafifletici etkisi fonksiyonel, histokimyasal ve biyokimyasal düzeyde gösterilmiştir. DPO'nin CDDP'e bağlı gelişen iç kulak ve beyin hasarına kar   koruyucu olduğu, apoptoz, antioksidan sistem ve nitrik oksid sistemi ilişkili anti-inflamatuar sistem aracılı olarak geliştiği ilk defa gerçekleştirilen bu çalışma aracılığı ile gösterilmiştir.



6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın deneysel bir çalışma olması nedeniyle, darbepoetin uygulamasının sisplatin kullanımı sırasında koruyucu olması açısından dikkate alınmalıdır. Çalışma sonuçlarımızın *in-vivo* deney hayvanları tümör modellerinde daha ileri olarak çalışılması sonrasında klinik açıdan test edilmesi mümkün olabilir.



KAYNAKLAR

1. Lim R, Brichta AM. Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hear Res.* 2016 Aug;338:9-21.
2. Driver EC, Kelley MW. Development of the cochlea. *Development.* 2020 Jun 22;147(12)
3. Rybak L.P., Whitworth C.A., Mukherjea D., Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hearing Research* 2007 Apr;226(1-2):157-67.
4. Rybak L.P., Whitworth C.A. Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today* 2005; 10 (19): 1313 – 1321.
5. Van den Berg J.H., Beijnen J.H., Balm A.J.M., Schellens J.H.M. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. *Cancer Treatment Reviews* 2006; 32: 390– 397
6. Alam S.A, Ikeda K, Oshima T, Suzuki. M, Kawase T, Kikuchi T, ve ark. Cisplatin induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res.* 2000; 141: 28 – 38.
7. Rybak L.P., Husain K., Morris C., Whitworth C., Somoni S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am. J. Otol.* 2000; 21: 513 – 520.
8. Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 858-865.
9. Somdaş MA, Güntürk İ, Balcıoğlu E, Avcı D, Yazıcı C, Özdamar S. Protective effect of N-acetylcysteine against cisplatin ototoxicity in rats: a study with hearing tests and scanning electron microscopy.
10. Kim SJ, Park C, Lee JN, Lim H, Hong GY, Moon SK ve ark. Erdosteine protects HEI-OC1 auditory cells from cisplatin toxicity through suppression of inflammatory cytokines and induction of Nrf2 target proteins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 288 (2015) 192–202
11. Waissbluth S, Dupuis I, Daniel SJ. Protective effect of erdosteine against cisplatin-induced ototoxicity in a guinea pig model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Apr;146(4):627-32.
12. Lee CK, Shin JI, Cho YS. Protective Effect of Minocycline Against Cisplatin-induced Ototoxicity. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2011; 2:77-82.
13. Rybak LP, Ravi R, Somani SM. Mechanism of protection by Diethyldithiocarbamate against Cisplatin ototoxicity – Antioxidant System. *Fundamental And Applied Toxicology*; Jul, 1995, 26(2), 293-300
14. Choi BM, Kim SM, Park TK, Li G, Hong SJ, Park R ve ark. Piperine protects cisplatin-induced apoptosis via heme oxygenase-1 induction in auditory cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (2007) 615– 622

15. Kim SJ, Park C, Han AL, Youn MJ, Lee JH, Kim Y ve ark. Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells. *Hearing Research*, May 2009; 251(1–2), 70–82
16. Olgun Y, Kırkim G, Kolatan E, Kıray M, Bağrıyanık A, Olgun A ve ark. Friend or foe? Effect of oral resveratrol on cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope*. 2014 Mar;124(3):760-6
-
17. Kim SJ, Kwak HJ, Kim DS, Choi HM, Sim JE, Kim SH ve ark. Protective mechanism of Korean Red Ginseng in cisplatin-induced ototoxicity through attenuation of nuclear factor- κ B and caspase-1 activation. *Mol Med Rep*. 2015Jul;12(1):315-22.
18. Kim SJ, Ho Hur J, Park C, Kim HJ, Oh GS, Lee JN ve ark. Bucillamine prevents cisplatin-induced ototoxicity through induction of glutathione and antioxidant genes. *Experimental & Molecular Medicine* 2015 Feb 20; Vol. 47
19. Ma W, Hu J, Cheng Y, Wang J, Zhang X, Xu M. Ginkgolide B protects against cisplatin-induced ototoxicity: enhancement of Akt-Nrf2-HO-1 signaling and reduction of NADPH oxidase. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology* 2015 May; Vol. 75 (5)
20. Gopal KV, Wu C, Shrestha B, Campbell KC, Moore EJ, Gross GW. D-Methionine protects against cisplatin-induced neurotoxicity in cortical networks. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34(5):495-504
21. Gunes D, Kırkim G, Kolatan E, Güneri EA, Ozoğul C, Altun Z ve ark. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy*. 2011; 57:186-194.
22. Parham K. Can intratympanic dexamethasone protect against cisplatin ototoxicity in mice with age-related hearing loss? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011; 145:635-640.
23. Monge AN, Gassmann M, Bodmer D. Erythropoietin but not VEGF has a protective effect on auditory hair cells in the inner ear. *Cell. Mol. Life Sci*. 2009; 66:3595–3599
24. Monge A, Nagy I, Bonabi S, Schmid S, Gassmann M, Bodmer D. The Effect of Erythropoietin on Gentamicin-Induced Auditory Hair Cell Loss. *Laryngoscope*, 2006 116:312–316
25. Messier AM, Ohls RK. Neuroprotective Effects of Erythropoiesis Stimulating Agents in Term and Preterm Neonates. *Curr Opin Pediatr*. 2014 April ; 26(2): 139–145
26. Spasojevic SD, Stojanovic VD, Barisic NA, Doronjski AR, Zikic DR, Babovic SM. Neuroprotective effects of hypothermia and erythropoietin after perinatal asphyxia in newborn rats. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013; 26(15): 1506–1509
27. Berkingali N, Warnecke A, Gomes P, Paasche G, Tack J, Lenarz T ve ark. Neurite outgrowth on cultured spiral ganglion neurons induced by erythropoietin. *Hearing Research* 243 (2008) 121–126

28. Forbes CA, Worthy G, Harker J, Kleijnen J, Kutikova L, Zelek L ve ark. Dose Efficiency of Erythropoiesis-Stimulating Agents for the Treatment of Patients With Chemotherapy-Induced Anemia: A Systematic Review. *Clinical Therapeutics* 2014; 36(4):594-610
29. Ehnert S, Freude T, Eicher C, Burkhardt B, Martinez JJ, Neumann J ve ark. Darbepoetin inhibits proliferation of hepatic cancer cells in the presence of TGF- β . *Arch Toxicol.* 2014; 88:89–96
30. Mann C, Lee JH, Liu J, Stammers AM, Sohn HM, Tetzlaff W ve ark. Delayed treatment of spinal cord injury with erythropoietin or darbepoetin—A lack of neuroprotective efficacy in a contusion model of cord injury. *Experimental Neurology*. 2008; 211:34–40
31. Yilmaz ER, Kertmen H, Dolgun H, Gürer B, Sanlı AM, Kanat MA ve ark. Effects of darbepoetin-alpha in spinal cord ischemia-reperfusion injury in the rabbit. *Acta Neurochir.* 2012; 154:1037–1044
32. Messing RO, McGarvey ML, Bavaria JE, Pochettino A, Szeto WY, Cheung AT ve ark. A Pilot Study of Darbepoetin Alfa for Prophylactic Neuroprotection in Aortic Surgery. *Neurocrit Care* .2013; 18:75–80
33. Seymen P, Aytac E, Esen F, Tel Ç, Demir F, Genç H ve ark. Darbepoetin Alpha Ameliorates Neuronal Damage in a Rat Model of Acute Ethanol Intoxication. *International Journal of Neuroscience*. 2013; 123, 99–103
34. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Lee KW, Shin YT, Na KR. Pretreatment with Darbepoetin Attenuates Renal Injury in a Rat Model of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *The Korean Journal of Internal Medicine* Vol. 24, No. 3, September 2009
35. Kertmen H, Gürer B, Yilmaz ER, Arikok AT, Kanat MA, Ergüder BI ve ark. The comparative effects of recombinant human erythropoietin and darbepoetin-alpha on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in the rabbit. *Acta Neurochir.* 2014; 156:951–962
36. Markman M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents. *Expert Opin Drug Saf* 2003; 2(6): 597–607.
37. Maxwell JR, Ohls RK. Update on Erythropoiesis - Stimulating Agents Administered to Neonates for Neuroprotection. *Neoreviews*. 2019 Nov;20(11):622-635
38. Olgun Y, Kırkım G, Altun Z, Aktaş S, Kolatan E, Kıray M ve ark. Protective Effect of Korean Red Ginseng on Cisplatin Ototoxicity: Is It Effective Enough? *J Int Adv Otol.* 2016 Aug;12(2):177-183.
39. Altun ZS, Güneş D, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N. Protective effects of acetyl-L-carnitine on cisplatin cytotoxicity and oxidative stress in neuroblastoma. *Neurochem Res.* 2010 Mar;35(3):437-43.
40. Tufekci O, Gunes D, Ozoğul C, Kolatan E, Altun Z, Yılmaz O ve ark. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin nephrotoxicity. *Chemotherapy.* 2009;55(6):451-9.

41. Doğan E, Olgun Y, Kırkım G, Kolatan E, Erçetin P, Aktaş S ve ark. The Protective Effect of Recombinant Human Erythropoietin against Cisplatin-Induced Ototoxicity. *Int Adv Otol* 2014; 10(3): 205-10.
42. Soliman AF, Anees LM, Ibrahim DM. Cardioprotective effect of zingerone against oxidative stress, inflammation, and apoptosis induced by cisplatin or gamma radiation in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018 Aug;391(8):819-832.
43. Cruz Navarro J, Pillai S, Ponce LL, Van M, Goodman JC, Robertson CS. Endothelial nitric oxide synthase mediates the cerebrovascular effects of erythropoietin in traumatic brain injury. *Front Immunol*. 2014 Oct 9;5:494.
44. Estfanous RS, Elseady WS, Kabel AM, Abd Ellatif RA. Amelioration of Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats by L-arginine: The Role of Nitric Oxide, Transforming Growth Factor Beta 1 and Nrf2/HO-1 Pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020 Jul 1;21(7):2155-2162.
45. Sun C, Yao Y, Zhang C, Tong D, Xie B. EPO Attenuates Cisplatin-Induced Ototoxicity in HEI-OC1 Auditory Cell Via the Nrf2-ARE Signaling Pathway. *Otol Neurotol*. 2019 Aug;40(7):965-971.

EKLER

Ek 1. Etik kurul onayı

 **DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 01/07/2016
Toplantı Tarihi : 29 Mart 2016

Sayın, Doç.Dr.Zekiye ALTUN
Onkoloji Enstitüsü Anabilim Dalı

16/2016 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Kemoradyoterapiye Bağlı Ototoksisite ve Darbepoeitinin Etkisi" isimli; Asuman Feda BAYRAK, Yüksel OLGUN, Safiye AKTAŞ, Hasan Oğuz ÇETİNAYAK, Günay KIRKIM, Efe SERİNAN, Osman YILMAZ ve Nur OLGUN'un araştırmacı olduğu ve 56 adet sıçan kullanılacağı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Üye Üye (Topl. Kararı)

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

Ek.2 Tezden üretilmiş makale



International Journal of Radiation Biology



ISSN: 0955-3002 (Print) 1362-3095 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/irab20>

Role of *N*-acetyl cysteine and acetyl-L-carnitine combination treatment on DNA-damage-related genes induced by radiation in HEI-OC1 cells

Ufuk Düzenli, Zekiye Altun, Yüksel Olgun, Safiye Aktaş, Ayça Pamukoğlu, Hasan Oğuz Çetinayak, Asuman Feda Bayrak & Levent Olgun

To cite this article: Ufuk Düzenli, Zekiye Altun, Yüksel Olgun, Safiye Aktaş, Ayça Pamukoğlu, Hasan Oğuz Çetinayak, Asuman Feda Bayrak & Levent Olgun (2019) Role of *N*-acetyl cysteine and acetyl-L-carnitine combination treatment on DNA-damage-related genes induced by radiation in HEI-OC1 cells, International Journal of Radiation Biology, 95:3, 298-306, DOI: [10.1080/09553002.2019.1547847](https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1547847)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1547847>



Published online: 06 Feb 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 193



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 2 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=irab20>

KATKI

Bu çalışma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: 2016.KB.SAG.038) tarafından desteklenmiştir.



ÖZGEÇMİŞ



ASUMAN FEDA BAYRAK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi
Telefon
E-posta
İnternet Sayfası



Öğrenim Bilgileri

04 Eylül 2015 - Şu Anda (5 yıl 11 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.89 / 4.0

31 Temmuz 1994 - 31 Temmuz 1998 (4 yıl 1 ay)
DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi), TÜRKİYE
DİĞER, DİĞER
Eğitim Alt Alanı: KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Kasım 1998 - Şu Anda (22 yıl 9 ay) (Tam Zamanlı)
UZMAN DOKTOR, DR., SAĞLIK BAKANLIĞI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Cerrahi Tıp Bilimleri -- Kulak Burun Boğaz

Anahtar Kelimeler

Kulak Burun Boğaz
Temel Onkoloji
Ototoksisite

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

T. TOKAT, T. CATLI, F. BAYRAK, E. B. BOZKURT & L. OLGUN, Cochlear Implantation in Postmeningitic Deafness, JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY, 2018, 1049-2275, 29, 3, E245-E248.

U. DUZENLİ, Z. ALTUN, Y. OLGUN, S. AKTAS, A. PAMUKOGLU, H. O. CETİNAYAK, A. F. BAYRAK & L. OLGUN, Role of N-acetyl cysteine and acetyl-L-carnitine combination treatment on DNA-damage-related genes induced by radiation in HEI-OC1 cells, INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY, 2018, 0955-

3002, 95, 3, 298-306.

Y. OEZKUL, D. ATES, A. IMRE, M. SONGU, K. BALCI, F. BAYRAK & K. OENAL, Analysis of Recurrence after Frontolateral Laryngectomy, TURKISH ARCHIVES OF OTORHINOLARYNGOLOGY-TURK OTORINOLARENGOLOJİ ARSIVI, 2017, 2149-3987, 55, 1, 27-30.

Y. OZKUL, M. SONGU, K. ONAL, A. IMRE, S. ARSLANOGLU, E. HOROZ, F. BAYRAK & E. PİNAR, Effect of surgical intervention on middle-ear cholesteatoma with associated facial paralysis, JOURNAL OF LARYNGOLOGY AND OTOTOLOGY, 2017, 0022-2151, 131, 2, 113-116.

A. F. BAYRAK, Y. OLGUN, A. OZBAKAN, S. AKTAS, C. A. KULAN, G. KAMACI, E. DEMİR, O. YILMAZ & L. OLGUN, The Effect of Insulin Like Growth Factor-1 on Recovery of Facial Nerve Crush Injury, CLINICAL AND EXPERIMENTAL OTORHINOLARYNGOLOGY, 2017, 1976-8710, 10, 4, 296-302.

F. BAYRAK, T. CATLI, G. ATSAL, T. TOKAT & L. OLGUN, Waardenburg Syndrome: An Unusual Indication of Cochlear Implantation Experienced in 11 Patients, JOURNAL OF INTERNATIONAL ADVANCED OTOTOLOGY, 2017, 1308-7649, 13, 2, 230-232.

Y. OLGUN, A. F. BAYRAK, T. CATLI, M. E. CEYLAN, R. AYDIN, U. DUZENLI & L. OLGUN, Pediatric cochlear implant revision surgery and reimplantation: An analysis of 957 cases, INTERNATIONAL JOURNAL OF PEDIATRIC OTORHINOLARYNGOLOGY, 2014, 0165-5876, 78, 10, 1642-1647.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

114S058, Radyasyona Bağlı İşitme Kayıplarının Önlenmesinde (Ototoksisitenin Önlenmesinde) N-Asetil Sistein ve Asetil-L- Karnitin Kombinasyonunun (DNA Hasarı Üzerinden) Etkinliği, 1002 - Hızlı Destek, Araştırmacı/Uzman, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.04.2014 - 15.04.2015, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.04.2014 - 15.04.2015.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0