

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ODYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SPIRULİNANIN RATLARDA SİSPLATİN OTOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

**HAZIRLAYAN
EMEL TAHİR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA, 2020

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ODYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**SPIRULİNANIN RATLARDA SİSPLATİN OTOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

**HAZIRLAYAN
EMEL TAHİR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. ADNAN FUAT BÜYÜKLÜ

ANKARA, 2020

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Emel Tahir tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19 /08 /2020

Tez Adı: SİRULİNANIN RATLARDA SİSPLATİN OTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: 19/08/2020

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 27 / 07 / 2020

Öğrencinin Adı, Soyadı:Emel Tahir

Öğrencinin Numarası:21710464

Anabilim Dalı:Kulak Burun Boğaz Hastalıkları

Programı:Odyoloji Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof.Dr.Adnan Fuat Büyüklü

Tez Başlığı:Spirulinanın Ratlarda Sisplatin Ototoksitesi Üzerine Etkisi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 52 sayfalık kısmına ilişkin, 27 /07/ 2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 10'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: 27 /07 / 2020

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

TEŞEKKÜR

Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Levent N. Özlüoğlu'na ve Başkent Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nın tüm saygıdeğer öğretim üyelerine,

Tezimin her aşamasında desteğini, sabrını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman benden esirgemeyen tez danışmanım ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Adnan Fuat Büyüklü'ye,

Yüksek lisans eğitimi almam için beni cesaretlendiren her daim desteğini hissettiğim, hayatta örnek aldığım insan Prof. Dr. Levent Sennaroğlu'na

Yüksek lisans eğitimimizde büyük emeği olan, tezimin her aşamasında fikir veren ve kadın akademisyenler olarak hep örnek aldığımız Prof. Dr. H. Seyra Erbek'e,

Hem deneyimleri hem tecrübeleri ile eğitimime olan katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Odyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Bülent Gündüz'e,

Kişiliği ve çalışma disiplinini hep örnek alacağım, yüksek lisans eğitimimizin her aşamasında katkıları olan Doç. Dr. Evren Hızal'a

Eğitimim süresince dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen dönem arkadaşlarıma, dostlukları ile yüksek lisans eğitimimi renklendiren Dr. Ceren Karaçaylı, Dr. Gülfem Beyazpınar ve Uzm. Ody. Cevahir Bulut Turay, Uzm. Ody. Burcu Aslan ve Uzm. Ody. Berkay Aslan'a

Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinin değerli çalışanları ve deney sürecindeki yardımları için Dr. F.Ceyda Akın Öçal'a

Nisbeten ileri yaşıta atıldığım öğrencilik serüvenimde bana destek olan aileme ve arkadaşlarıma,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Emel TAHİR

ÖZET

Emel Tahir, Spirilunanın Ratlarda Sisplatin Ototoksitesisi Üzerine Etkisi, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Odyoloji Yüksek Lisans Programı, 2020.

Amaç: Antioksidan etkinliği bilinen spirulinanın sisplatin ototoksitesine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Prospektif kontrollü bu hayvan çalışmasında 28 adet Sprague Dawley rat dört gruba ayrıldı. İlaç uygulamalarından önce ve 10 günlük ilaç uygulaması sonrasında her bir gruptaki ratların her iki kulağına distorsiyon ürünü otoakustik emisyon testi (DPOAE) ve işitsel beyin sapı yanıtı (ABR) testleri yapıldı. 1. Gruptaki ratlara (n = 7), tek doz 1 ml intraperitoneal serum fizyolojik (%0.9) verilirken, 2. gruptaki ratlara (n = 7), 15 mg/kg/gün tek doz sisplatin intraperitoneal olarak verildi. 3. gruptaki ratlara (n = 7), 1000 mg/kg/gün spirulina 10 gün süreyle gavaj ile verildi. 4. gruptaki ratlara (n = 7) 15 mg/kg/gün şekildeki tek doz sisplatin uygulaması ile aynı gün başlanan 1000 mg/kg/gün spirulina 10 gün süreyle gavaj ile verildi.

Bulgular: Çalışma öncesi yapılan ölçümlerde gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark bulunmadı. DPOAE sonuçları açısından 1. grupta ve 3. grupta ilaç uygulaması öncesi ve sonrasında herhangi bir frekansta anlamlı bir fark gözlenemedi. 2. Grupta ise 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında ilaç uygulaması sonrası SNR değerleri uygulama öncesine göre daha düşük bulundu. 4. Grupta 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında ilaç uygulaması sonrası SNR değerleri uygulama öncesine göre daha düşük bulundu. Sadece sisplatin alan ratlar diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha düşük SNR değerleri elde edildi. Son ölçümlerde 1.grup 3 ve 4. Grup ile ikili olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark gözlenmedi. İlaç uygulaması öncesinde grupların ABR eşikleri arasında anlamlı fark bulunmaz iken ilaç uygulaması sonrası 4.grubun ABR eşiklerinin 2. gruba göre daha iyi görüldü. Sadece sisplatin alan ratlarda ise diğer gruplara göre ABR yanıtı daha yüksek eşik değerlerinde elde edilebildi.

Sonuç: Spirulinanın koklear fonksiyonlara olumsuz etkisi yoktur ve sisplatin ototoksitesine karşı parsiyel koruyucu etkisi mevcuttur.

Anahtar Sözcükler: Sisplatin, ototoksite, spirulina, antioksidanlar

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA19/32) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Emel Tahir, The Effectiveness of Spirulina Against Cisplatin Induced Ototoxicity in Rats, Başkent Health Sciences Institute Audiology Master Thesis, 2020.

Objective: The purpose of this study was to assess the protective effect of an antioxidant and antiinflammatory agent “spirulina” against cisplatin-induced ototoxicity in rats.

Material and Methods: This prospective, controlled animal study was conducted with 28 adult Sprague Dawley rats divided into four groups. Before the drug administration, distortion product otoacoustic emission (DPOAE) and Auditory Brainstem Response (ABR) tests were performed. Group 1 (n = 7), received 1 mg intraperitoneal (i.p.) saline. Group 2 (n = 7) received single dose of intraperitoneal (i.p.) cisplatin at 15 mg/kg/day. Group 3 (n = 7) received oral spirulina at 1000 mg/kg/day for 10 consecutive days. Group 4 (n = 7) single dose of intraperitoneal (i.p.) cisplatin at 15 mg/kg/day followed by oral spirulina at 1000 mg/kg/day for 10 consecutive days. Final DPOAE and ABR measures were performed 10 days after the first drug administration.

Results: Before the drug administration there was no significant differences between groups in terms of DPOAE and ABR measurements. Group 1 and 3 showed no significant difference before the drug administration and DPOAE measurements before. Group 2 demonstrated lower SNR values at 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frequencies in final DPOAE measurement. In group 4 final DPOAE SNR values were lower in 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frequencies. In pairwise comparisons; group 1, 3 and 4 had no significant difference in final DPOAE measurement however rats received only cisplatin had lower SNR values than in other groups.

There was no significant difference in terms of ABR threshold before the drug administration. After the drug administration, increase in ABR thresholds was greater

in group 2 than in group 4. Rats received only cisplatin yielded higher ABR thresholds than rats in other groups.

Conclusion: Spirulina does not have negative effect on cochlear functions and has a partial protective role against cisplatin-induced ototoxicity.

Keywords: cisplatin, ototoxicity, spirulina, antioxidants

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: DA19/32) and supported by Baskent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İşitme Fizyolojisi	3
2.2. Rat Kulağının Anatomi ve Fizyolojisi	5
2.3. Ototoksisite	7
2.3.1. Ototoksisitenin odyolojik tani ve takibi	8
2.4. Otoakustik Emisyonlar	9
2.5. İşitsel Beyin Sapi Yanıtları (ABR)	10
2.6. Ototoksisite Patogeneğinde Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Ürünleri.....	11
2.6.1. Sisplatin ototoksisitesi.....	12
2.6.1.1. Sisplatin ototoksisitesine karşı koruyucu ajanlar	14
2.7. Spirulina.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Deney Hayvanları.....	18
3.2. Grupların Oluşturulması	19
3.3. Anestezi Uygulamaları.....	19
3.4. Odyolojik Değerlendirme	20
3.4.1. Distortion product otoakustik emisyon (DPOAE) uygulaması ...	20
3.4.2. İşitsel beyin sapi cevabi (ABR) uygulaması.....	21

3.5. İstatistiksel Yöntem	23
4. BULGULAR	25
4.1. DPOAE Bulgularının Değerlendirilmesi	25
4.2. ABR Eşik Bulgularının Değerlendirilmesi	34
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İnsanlarda ve ratlarda anatomik yerleşime göre ABR dalgaları	10
Tablo 2.2. Sisplatin ototoksitesini önlemek için kullanılan ajanlara dair çalışmalar	16
Tablo 4.1. İlaç uygulaması öncesi gruplara ve frekanslara göre DPOAE sonuçları..	26
Tablo 4.2. Kontrol grubunun ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPAOE değerleri..	28
Tablo 4.3. Sisplatin grubunun ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri	29
Tablo 4.4. Spirulina grubu ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri	30
Tablo 4.5. Sisplatin + Spirulina grubu ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri.....	31
Tablo 4.6. İlaç uygulaması sonrası gruplara ve frekanslara göre DPOAE değerleri .	32
Tablo 4.7. İlaç uygulaması sonrası normal dağılım göstermeyen DPOAE değerlerinin gruplara ve frekanslara göre ikili karşılaştırmalar ile yorumlanması.....	33
Tablo 4.8. İlaç uygulaması sonrası normal dağılım gösteren DPOAE değerlerinin gruplara ve frekanslara göre ikili karşılaştırmalar ile yorumlanması.....	34
Tablo 4.9. İlaç uygulaması öncesi gruplara göre ABR eşik değerleri	34
Tablo 4.10. İlaç uygulaması öncesi ve sonrası gruplara göre ABR eşik değerleri	35
Tablo 4.11. İlaç uygulaması sonrası gruplara göre ABR eşik değerleri	36
Tablo 4.12. İlaç uygulamasının 10. gününde gruplara göre ABR eşik değerlerinin ikili karşılaştırmalar ile yorumlanması.....	36
Tablo 4.13. İlaç uygulaması öncesi ve sonrası gruplara göre ABR latans değerleri.....	37
Tablo 4.14. İlaç uygulaması sonrası gruplara göre ABR latans değerleri.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Korti organı	4
Şekil 2.2. Rat iç kulak anatomisi.....	6
Şekil 2.3. Deney hayvanlarında işitme aralıkları	7
Şekil 2.4. Sprague Dawley ratlarda ABR örneği	11
Şekil 2.5. İnsanda ABR dalgaları.....	11
Şekil 3. 1. Yenidoğan probu ile DPOAE ölçümü	20
Şekil 3.2. Sağ ve sol kulaktan alınan DPOAE yanıtları.....	21
Şekil 3.3. ABR ölçümü için elektrotların yerleşimi.....	22
Şekil 3.4. ABR ile eşik ölçümü.....	23

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABR	işitsel beyin sapı yanıtı
ANOVA	varyans analizi
dB	desibell
DNA	deoksiribonükleik asit
DPOAE	distorsiyon ürünü otoakustik emisyon
DTH	dış tüylü hücre
GPO	glutasyon peroksidaz
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
İTH	iç tüylü hücre
kHz	kilo Hertz
OAE	otoakustik emisyon
SNR	sinyal gürültü oranı
SPL	sound pressure level
SFOAE	uyaran frekansı otoakustik emisyon
SOD	süperoksit dismutaz
TEOAE	geçici uyarılmış otoakustik emisyon
ve ark	ve arkadaşları

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir ilacın ya da kimyasal bir maddenin iç kulağa toksik etki göstererek işitme kaybı, denge bozukluğu ya da her ikisine birden neden olmasına ototoksisite adı verilir. Ototoksisiteye neden olan pek çok ilaç ve madde vardır.

Sisplatin pek çok kanser türünün tedavisinde kullanılan bir antineoplastik ilaçtır. Nefrotoksisite, ototoksisite, miyelotoksisite, gastrointestinal toksisite, periferik nöropati gibi ciddi yan etkileri mevcuttur (1). Sisplatinin ototoksik etkisi irreversible, bilateral, progresif, yüksek frekanslardaki sensörinöral işitme kaybı ve tinnitus ile karakterizedir (1). Sisplatin normal dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir ve kokleada tüylü hücre hasarına neden olabilir. Bu tüylü hücre hasarı bazalden apektense doğru ilerler yani öncelikle yüksek frekans işitme kaybı olur. Düşük sisplatin düzeylerine maruziyette ilk olarak stereosiliaların uç hasarı ortaya çıkmakta, doz arttırıldığında ise planlanmış hücre ölümü (apoptoza) bağlı olarak tüylü hücre kaybı gözlenmektedir (2). Sisplatinin nörotoksik de olduğundan işitme sinirini de etkiler ve sinir hücrelerinde dejenerasyona neden olur (2). Sisplatin ototoksisitesinden koruyucu olabilecek pek çok ilaç ve ajan hakkında literatürde pek çok çalışmaya rastlanmaktadır.

Otoakustik emisyonlar (OAE) sayesinde saf ses odyometrisine henüz yansımamış erken dönem dış tüylü hücre kaybı değerlendirilebilir, işitsel beyin sapı yanıtları (ABR) ile de işitme sınırı ve beyin sapındaki işitsel merkezlerin elektrofizyolojik aktivitesi değerlendirilebilir(3). Sisplatin ototoksisitesine dair çalışmalarda da bu iki yöntem kullanılmaktadır.

Spirulina, mavi ve yeşil alglerden oluşan mikroskobik bir yosun türüdür. Destek gıda olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Antioksidan, antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkisi vardır. Serbest oksijen radikallerini uzaklaştırır, DNA hasarını önler, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimleri harekete geçirir (4). Hayvan çalışmalarında spirulinanın hepatotoksisiteyi ve nefrotoksisteyi azalttığı gösterilmiştir (5, 6). Ototoksisiteye karşı etkinliği çalışılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, antioksidan etkinliği bilinen spirulinanın sisplatin ototoksitesine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını OAE ve ABR ile değerlendirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İşitme Fizyolojisi

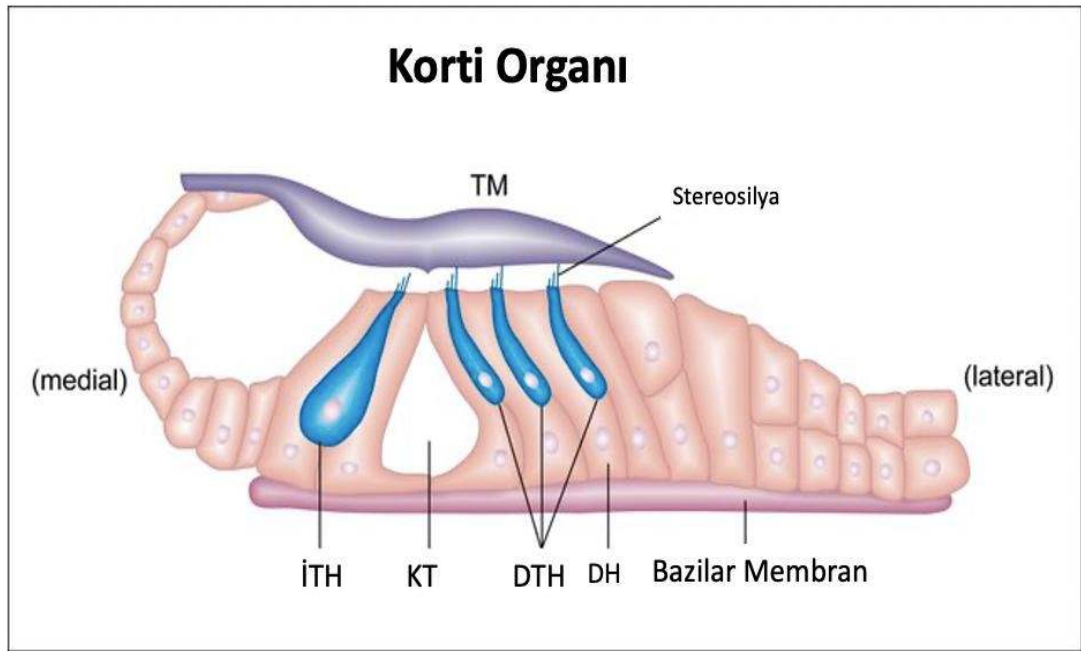
Aurikula tarafından toplanan ses enerjisinin dış kulak yolunu geçerek orta kulağa ulaşması ve burada mekanik olarak güçlendirilmesini takiben iç kulakta elektrokimyasal enerjiye dönüşerek aksiyon potansiyelleri oluşturup santral işitme sisteminde işlenip beyinde algılanmasına “işitme” adı verilir. Bu sistemin parçalarını, dış, orta ve iç kulak ile santral işitsel yollar oluşturmaktadır. Aurikula ve dış kulak yolu sesin toplanması ve sıkıştırılmasında rol oynar. Kulak zarına ulaşan ses dalgaları orta kulakta yer alan kemikçikler (malleus, inkus ve stapes) amplifiye edilir ve iç kulağa iletilir. İşitme dört ayrı fazda incelenir (7);

- 1.İletim (conduction) fazı
- 2.Dönüşüm (transduction) fazı
- 3.Sinirsel Kodlama (neural coding) fazı
- 4.Birleştirme-Algılama (association- cognition) fazı

İletim (conduction) fazı: Aurikula tarafından ses dalgalarının toplanması, filtrelenmesi ve dış kulak yoluna iletilmesi ile bu faz başlar. Dış kulak yolundaki rezonatör süreç ve ses dalgalarının timpanik membrana iletilmesi ile devam eder. Orta kulak tarafından, timpanik membrana ulaşan ses dalgalarının iç kulaktaki sıvı ortama geçişi sağlanır. Bu aşamada kulak zarının tahtarevalli etkisi (catenary lever), kemikçik zincirin yükseltici etkisi (ossicular lever) ve kulak zarı ile stapes tabanı arasındaki alan farkı (hidrolik lever) sayesinde ses dalgalarının hava ortamından sıvıya geçerkenki enerji azalması telafi edilir. Orta kulakta yer alan m. stapedius ve m. tensor timpani kasları da iletim sürecinde yer alır(7, 8).

Dönüşüm (transduction) fazı: Mekanik enerjinin biyokimyasal olaylar ile elektrik enerjisine dönüştüğü bu fazda frekansa spesifik analiz yapılır. Mekanik

enerjinin elektriksel enerjiye dönüşümünde tüylü hücreler önemli rol oynar. Ses dalgalarının perilenfe geçmesi ile perilenf sıvısı ve baziler membran hareketlenir. Kokleanın bazal kıvrımından apikal kıvrımına kadar dalga ilerler ve baziler membran hareketlendikçe tüylü hücreler de hareketlenir. Bazal membrandaki yer değişimi, tektorial membran ve retiküler lamina arasındaki dış tüylü hücreleri hareketlendirir. Tektorial membran ve retiküler lamina arasındaki endolenf hareketi ise iç tüylü hücreleri hareketlendirir. Şekil 2.1’de Korti organı ve tüylü hücrelerin yerleşimi gösterilmiştir. Transdüksiyon olayı kokleada bulunan dört farklı elektriksel potansiyel ile bağlıdır. Bu potansiyeller endolenfatik potansiyel (EP), koklear mikrofoni (KM), sumasyon potansiyeli (SM) ve tüm sinir aksiyon potansiyeli (TSAP) olarak adlandırılır (7, 9, 10).



Şekil 2.1. Korti organı

İTH, iç tüylü hücre; DTH, dış tüylü hücre; KT, Korti tüneli; TM, tektoryal membran; DH: destek hücresi. (Stöver ve ark'nın yazısından adapte edilmiştir)(11)

Sinirsel Kodlama (neural coding) fazı: Dönüşüm fazı esnasında Korti organındaki tüylü hücrelerde oluşan elektriksel akım akustik sinirdeki nöronların dendritlerini uyarır. Tonotopik organizasyon sayesinde yüksek frekans sesler

kokleanın bazal bölgesinde, alçak frekans sesler ise apeks bölgesinde maksimum genlikte titreşim oluşturur. Bu şekilde sinir enerjisi frekans ve şiddetine göre değişik sinir liflerinde aksiyon potansiyeli oluşturur ve kodlama gerçekleşmiş olur (12, 13).

Birleştirme-Algılama (association- cognition) fazı: Kodlanan sinirsel iletimler santral işitme sisteminde birleştirilir ve çözülür. Oluşan aksiyon potansiyelleri koklear nükleuslar, superior olivar kompleks, lateral lemniskus ve inferior kollikulus, medial genikülat cisim boyunca ilerler. Inferior kollikulustan çıkan lifler medial genikülat nükleus aracılığıyla kortekste bulunan işitme merkezine gelirler. Silviyan fissürdeki işitme merkezinde ses karakter ve anlam kazanır (7, 9).

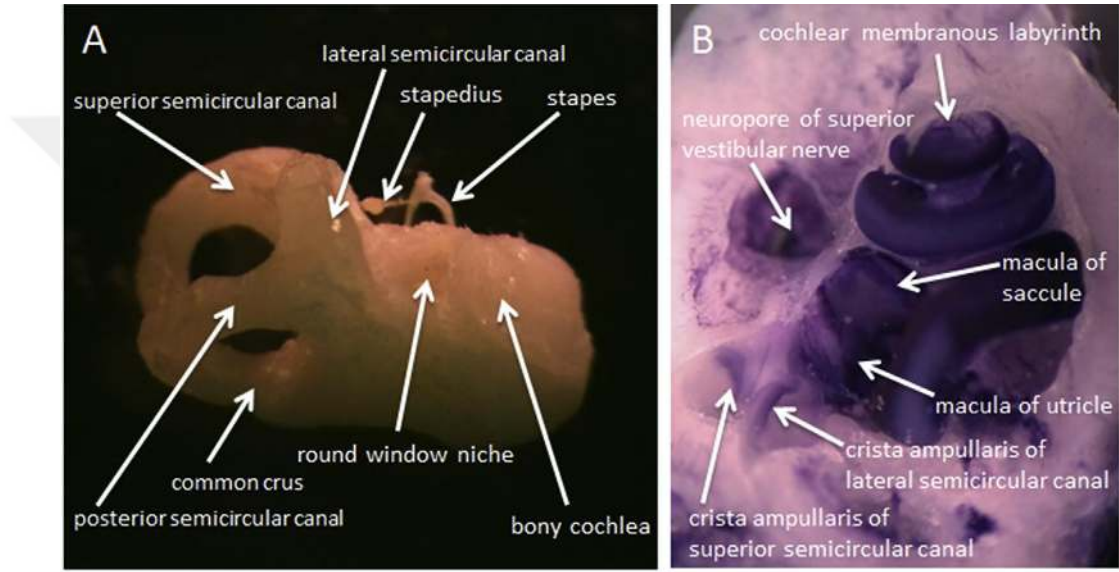
2.2. Rat Kulağının Anatomi ve Fizyolojisi

Ratlar pek çok deneysel çalışmada deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. Laboratuvar ortamında kolay üreyebilmesi, bakımının kolay olması, kısa sürede üreyebilmesi insanda görülen pek çok anatomik yapının ortak olması nedeniyle kulak burun boğaz alanındaki deneysel çalışmalarda da tercih edilmektedirler (14). İç kulak araştırmalarında, ototoksisite, akustik travma, ağır metal, elektromanyetik alan ve radyasyonun etkilerini saptamak için ratlar sıklıkla kullanılır (15). Diğer bir özellik de timpanik membran muayenesinin kolay yapılabilmesidir.

Rat orta kulağı ile insan orta kulağı anatomik olarak benzer yapıları içerir. Ratlarda da insanda bulunan malleus, incus ve stapes kemikçikleri bulunur fakat daha küçük boyuttadır. İnsandan farklı olarak orta kulak kavitesi bulla olarak adlandırılan bir kemik yapının içinde bulunur (16). Timpanik membran yapısı benzer olsa da ratlarda timpanik membranın alanı insanların yaklaşık altıda biri kadardır. Ratlarda pars flaccida insanlara göre daha çok yer işgal eder. Orta kulak mukozası ise mukosiliyer özellik göstermesi bakımından benzerdir (17). Ratların işitme duyuları iyi gelişmiş olmakla birlikte işitme aralığı 70 dB'de 250 - 80.000 Hz

aralığında değişmektedir. Ancak en duyarlı oldukları aralık 8.000- 50.000 Hz'dir. Yüksek frekansta iyi işitmeleri, baş ve pinna uzunlukları, bunların birbirlerine göre uzaysal konumları, kafalarının şekli (sferik oluşu) ve pinna hareketliliğinin mevcudiyeti ile açıklanmaktadır.

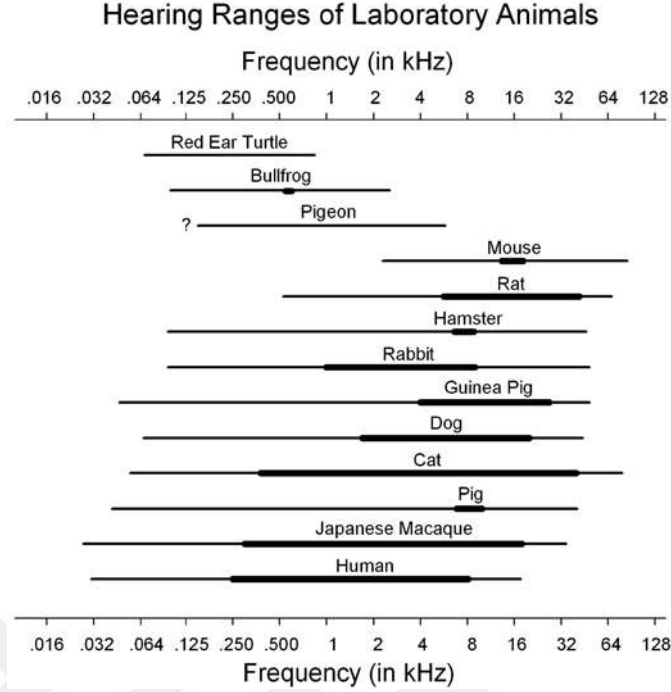
Rat kokleası da insan kokleası gibi 2,5 dönüş yapar ve membranöz labirent yapısı da benzerdir (15, 16) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Rat iç kulak anatomisi

A.Kemik labirent B. Koklear membranöz labirent, utriculus, sacculus ve semisirküler kanallar (Li ve ark'nın yazısından alınmıştır) (15).

İnsan kulağı ratlara ve diğer deney hayvanlarına göre alçak frekansları daha iyi işitir. Bununla birlikte neredeyse tüm memeli hayvanlar insana göre yüksek frekansları daha iyi işitirler. Kafa çapı daha küçük olan memelilerin yüksek frekans işitmesi kafa çapı daha büyük olan memelilere göre daha iyidir (18). İnsanlar ve laboratuvar hayvanlarının işitme aralıkları Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Deney hayvanlarında işitme aralıkları

İnce çizgiler 60 dB SPL (Sound Pressure Level)'de duyulabilen frekans aralığını, kalın çizgiler ise 10 dB SPL'de duyulabilen frekans aralığını temsil eder (Heffner ve ark'nın yazısından alınmıştır). (18)

2.3. Ototoksisite

Ototoksisite; kimyasal veya farmakolojik ajanlar nedeniyle vestibüler ve/veya koklear yapılarda hasar oluşmasıdır (19). Ototoksik ilaçlar kokleayı vestibüler sistemi veya her ikisini birden etkileyebilir. Tarihsel olarak antibiyotiklerin yaygın kullanımının başlaması ile tıp dünyasının dikkatini çekmeye başlamıştır. En bilinen ototoksik ilaçlar; aminoglikozidler, platin bazlı kemoterapotikler, diüretikler, makrolid grubu antibiyotikler ve sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlardır (20).

Ototoksisite şu şekillerde bulgu verebilir; işitme kaybı, çınlama, hiperakuzi, kulak dolgunluğu, baş dönmesi veya dengesizlik. Bulgular geçici hafif çınlamadan kalıcı tam işitme kaybına, hafif dengesizlikten ciddi baş dönmesine kadar çok geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilir (21). Semptomatolojideki kişiden kişiye bu değişiklik kişinin genetik yapısına, metabolik durumuna, komorbid medikal hastalıklarına ve oksidatif stresle baş etme kapasitesine bağlanmıştır (22). Bu

bulgular tedrici olarak karşımıza çıkabileceği gibi aniden de gelişebilir. Ototoksisite hayatı tehdit eden bir durum olmasa da iletişimi ve sosyal hayatı etkileyerek kişilerin yaşam kalitesini düşürebilir.

2.3.1. Ototoksisitenin odyolojik tani ve takibi

Günlük klinik pratikte karşılaşılan en önemli sorun ototoksisitenin geç tani almasıdır. Tanıda hastanın hikaye ve semptomlarının yanı sıra odyolojik tetkik sonuçları önemlidir. Olası semptomlar hakkında hastanın, hasta yakınlarının ve sağlık profesyonellerinin uyanık olması alınabiliyor ise gerekli önlemlerin alınması gereklidir. Ototoksik ilaç uygulaması öncesi ve sonrası odyolojik olarak hastalar değerlendirilmeli ve kemoterapi gibi uzun süreli ilaç uygulamalarında belirli aralıklar ile odyolojik tarama yapılmalıdır (22).

Ototoksisite takibi, ototoksik bir ajanın zaman içindeki etkilerini takip anlamına gelmektedir. Ototoksik bir ilaç veya madde öncelikle kokleanın bazal kıvrımını etkileyerek yüksek frekans işitme kaybı yapacaktır. Hasar apikal kıvrıma doğru ilerledikçe işitme kaybı alçak frekansları da tutmaya başlar. Bu ilerleyişin takibine ototoksisitenin monitorizasyonu adı verilir ve multidisipliner bir ekip tarafından yürütülmelidir. Ototoksisitenin monitorizasyonu sırasıyla şu aşamaları içerir (23);

1. İlaç tedavisi öncesi odyolojik değerlendirme
2. İlaç tedavisi süresince odyolojik takip
3. İşitmedeki değişimin erken tespiti
4. Ototoksisite saptanır ise tedavinin gözden geçirilmesi ve gerekirse alternatif ilaçların seçilmesi
5. Ototoksisitenin ilerlemesinin önlenmesi
6. Ototoksisitenin etkilerini en aza indirmek için erken işitsel rehabilitasyon

2.4. Otoakustik Emisyonlar

Spontan ya da akustik uyarana yanıt olarak iç kulak tarafından üretilen ve dış kulak yolundan ölçülen seslerdir. Kokleadan kaynaklanan OAElar dış tüylü hücrelerin aktivitesine bağlı oluşurlar ve kokleanın motor fonksiyonunu yansıtır. Akustik uyarın sonucu kokleadaki sıvıların ve baziller membranının titreşimine bağlı olarak Korti oranında hareket oluşur. Korti organının bu hareketi tüylü hücrelerin uzantılarında bükülmelere neden olur. Dış tüy hücrelerindeki bu uzantıların aktin ve miyozin lifleri sayesinde kasılabilme yeteneği de vardır. Bu kasımlar ve bükülmeler sonucu ürettikleri titreşimler koklea içinde ayrı bir ses kaynağı gibi davranır (24). OAE, non-invazif olması, maliyet etkin olması, hastalar tarafından kolay tolere edilebilmesi ve objektif bir test olması nedeniyle hem klinik pratikte hem de ototoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılır. Özellikle dış tüylü hücreleri etkileyen ototoksik ilaçların monitorizasyonunda değerlidir (25). İşitme kaybı henüz başlamadan erken koklear değişiklikleri saptayabildiği için ototoksik etkinin saptanmasında konvansiyonel odyometriye göre daha erken bilgi verir (26). Spontan ve uyarılmış olarak iki ana sınıfa ayrılırlar. Spontan OAE; herhangi bir uyarın olmaksızın dış kulak yolundan kaydedilen emisyonlardır. Uyarın gönderilerek elde edilen emisyonlara ise uyarılmış (evoked) OAE adı verilir. Uyarılmış OEA üç alt tipe ayrılır(24, 26).

- a. Uyarın frekansı (Stimulus frequency) OAE (SFOAE): Uyarın olarak kesintisiz saf ses kullanılır,
- b. Geçici uyarılmış (Transient evoked) OAE (TEOAE): Klik veya tone burst uyarın ile elde edilir,
- c. Distorsiyon Ürünü (Distortion product) OAE (DPOAE): Eş zamanlı olarak, farklı frekanslardaki iki saf ses kullanılarak emisyon cevabı alınır.

Distorsiyon Ürünü Otoakustik Emisyonlar (DPOAE): Koklear fizyolojiyi yansıtan, minör ototoksik değişiklikleri gösteren, frekansa spesifik ve non-invazif bir yöntem olan distorsiyon ürünü otoakustik emisyonlar (DPOAE) ototoksisite takibinde oldukça güvenilir bir klinik yöntemdir. Ototoksik ilaç uygulaması öncesi temel bir DPOAE ölçümünü takiben ilaç uygulaması esnası ve devamında yeni

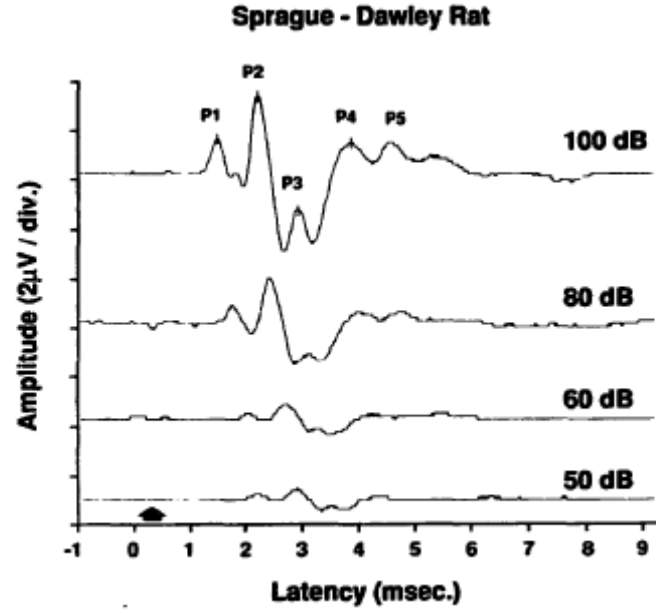
ölçümler alınarak monitorizasyon yapılabilir. Cihaza bağlı olarak yüksek frekanslara çıkan ölçümler de yapılabilir. Bütün bu ölçümler yatak başında da uygulanabilir ve maliyet etkindir. Önemli dezavantajlarından biri pediatrik popülasyondaki efüzyon gibi orta kulak patolojilerinden DPOAE sonuçlarının etkilenmesidir. Diğer bir dezavantaj ise 60 dB veya üzeri işitme kayıplarında ağır dış tüy hücre harabiyeti nedeni ile DPOAE yanıtlarının elde edilememesidir (22).

2.5. İşitsel Beyin Sapı Yanıtları (ABR)

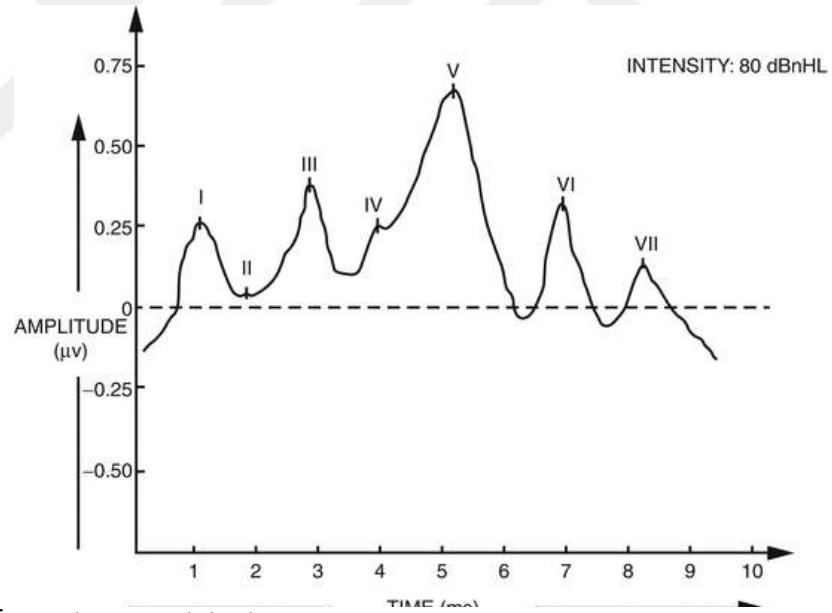
İşitsel beyin sapı yanıtları (Auditory Brainstem Response: ABR) işitme sinirinin başlangıcından orta beyine kadar olan işitsel yolaktaki elektriksel akımı inceler. Klinikte yaygın olarak konvansiyonel odyometriye uyum sağlayamayacak bebeklerde ve yenidoğan işitme taramasında kullanılmaktadır. Özellikle ilk 5 dalga klinik değerlendirmede önemlidir. İnsanlarda I. dalga işitme sinirinin distalinden, II. dalga işitme sinirinin proksimalinden, III. dalga koklear nükleustan, IV. dalga superior olivar kompleksten, V. dalga ise lateral lemniskus ve inferior kollikulustan kaynaklanmaktadır. Deney hayvanlarında ise farklılıklar mevcuttur. İnsanlarda V. dalga eşik değerlendirilmesinde kullanılan ana dalga iken, ratlarda II. dalga bu amaçla kullanılır (27). Dalgaların elde edildiği anatomik lokasyonlar, dalga paterni ve morfolojisi de insanlardan farklıdır (Tablo 2.1, Şekil 2.4, Şekil 2.5). Ototoksik değişikliklerin erken tespitinde ve konuşma frekanslarında oluşabilecek kayıpların monitorizasyonunda ABR de araştırmalarda kullanılmaktadır (3).

Tablo 2.1. İnsanlarda ve ratlarda anatomik yerleşime göre ABR dalgaları

Dalga	İnsan	Rat
I	VIII. sinir distali	VIII. sinir
II	VIII. sinirin proksimali	Posterior ventral koklear nükleus
II	Koklear nükleus	Anterior ventral koklear nükleus ve trapezoid cisim
IV	Superior Olivar Kompleks	Superior Olivar Kompleks
V.	Lateral Lemniskus ve İnferior Kollikulus	Lateral Lemniskus ve İnferior Kollikulus



Şekil 2.4. Sprague Dawley ratlarda ABR örneği
(Overbeck ve ark. yazısından alınmıştır.)(28)



Şekil 2.5. İnsanda ABR dalgaları
(Desphanande ve ark çalışmasından alınmıştır) (29)

2.6. Ototoxisite Patogenezinde Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Ürünleri

İn vitro deneyler ve hayvan deneyleri göstermiştir ki; sisplatin hücrel antioksidan mekanizmayı inhibe ederek koklea, stria vaskularis ve spiral ganglion hücrelerinde aşırı bir reaktif oksijen radikali üretimine neden olmaktadır. Hücre içi antioksidan sistem normal çalışır ise bu reaktif oksijen ürünlerini etkisiz hale getirerek ortamdan uzaklaştırabilir (30). Koklea hassas nöral hücrelere sahip olması ve izole yapısı nedeniyle bu oksijen radikali birikiminden ciddi ölçüde zarar görmektedir. Biriken toksinler kokleanın kapalı yapısı nedeniyle çevre dokulara dağılamaz ve hasarı artırır. Kokleada bulunan ana antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPO) ve glutatyon redüktazdır (30-32).

Reaktif oksijen radikalleri daha sonra pek çok elektrolit değişimi ve genetik alterasyonlara neden olarak hücre fizyolojisini tamamen değiştirebilir. Apoptoz sürecinin başlaması ile tüylü hücrelerin içine kalsiyum geçişi başlar devamında *bax geni* (isimli hücre ölümünü başlatan gen) aktive olur, mitokondriden sitokrom c salınır ve nihayetinde kaspaz 3 ve kaspaz 9 adı verilen proteaz enzimleri çalışarak hücreyi lizise uğratar. Bu süreçte *fodrin* adı verilen tüylü hücrelerin protein iskeletinde bulunan bir protein de yıkıma uğrar. (33).

2.6.1. Sisplatin ototoksisitesi

Sisplatin; pediatrik ve yetişkin tümörlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan etki düzeyi yüksek bir antineoplastik ajandır. Klinikte oldukça geniş bir kullanım alanı vardır. Baş boyun kanserleri, akciğer, meme ve over kanseri tedavisinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Sisplatinin; nörotoksisite, nefrotoksisite kemik iliği toksisitesi, gastrointestinal toksisite ve ototoksisite gibi yan etkileri vardır ve bu yan etkiler hastaların önemli bir kısmında görülmektedir (34). Nefrotoksisite hidrasyon yolu ile elimine edilsede, ototoksisiteyi önlemede halen kanıtlanmış bir yöntem yoktur (35, 36). Sisplatin ototoksisitesi bilateral ve kalıcı özellikle yüksek frekansları etkileyen işitme kaybı ile karakterizedir. Ototoksisitenin ilerlemesi durumunda alçak frekanslar da tutulabilir (30, 36). Sisplatin nedenli işitme kaybı özellikle 4000 Hz

sonrası yüksek frekanslarda görülür ve geri dönüşümlü değildir. Sisplatin kullanımı sonrası işitme kaybı insidansının bazı serilerde %75'e hatta %100'e kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (30, 36, 37). İşitme kaybı özellikle çocuklarda erişkilere göre daha sık görülmektedir. Çocuklarda görülen ototoksitenin önemli bir sonucu da gecikmiş konuşma ve eğitsel problemlerdir (38). Bu nedenle sisplatin ototoksitesinin önlenmesi, üzerinde çalışılmaya değer önemli bir konudur.

Sisplatin uygulaması sonrası en bariz değişim Korti organında olmaktadır. Hayvan çalışmalarında iç ve dış tüylü hücrelerde dejenerasyon ve hücre kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Bu değişimler öncelikle bazal kıvrımdaki dış tüylü hücrelerde başlar, bunu orta apikal kıvrımdaki dış tüylü hücreler ve iç tüylü hücreler takip eder. Korti organındaki bu etkilere ek olarak stria vaskularis ve spiral ganglion hücrelerinde de hasar gösterilmiştir (39, 40). Sisplatin molekülü insan DNA'sına bağlanarak p53 yolağı üzerinden apoptozu indükler (41). Sisplatin ototoksitesinin detaylı moleküler mekanizmaları halen tam aydınlatılamamış olsa da patogeneizde reaktif oksijen ürünlerinin yani oksidatif stresin de önemli rol oynadığına inanılmaktadır. Oksidatif strese karşı kokleanın endojen antioksidan mekanizmaları yetersiz kalır ise kokleada planlanmış hücre ölümü (apoptozis) ve nekroz başlamaktadır (42). Sisplatin mitokondrial yolları aktive ederek tüylü hücrelerde apoptozis başlatmakta ve kalıcı tüylü hücre kaybına neden olmaktadır. Apoptozisin önlenmesinin, sisplatin ototoksitesinin de önlenmesinde yeri olacağı düşünülmektedir. Literatürdeki pek çok yayında, sisplatin ototoksitesini önlememek için ortamdan reaktif oksijen ürünlerini uzaklaştıracak antioksidan maddeler üzerinde yoğunlaşmıştır (30, 43). Bir diğer yaklaşım da antiinflamatuvar ilaçları kullanarak kokleada hasara neden olan proinflamatuvar süreçleri durdurmaaktır. Sisplatinin hedef kanser hücresine girmesinin sağlanması fakat iç kulaktaki tüylü hücrelere girişinin engellenmesi yani hücresel seçicilik yolu ile ototoksitenin önlenmesi de gündeme gelmeye başlayan yeni konulardandır (34).

2.6.1.1. Sisplatin ototoksitesine karşı koruyucu ajanlar

Ototoksositeye neden olan kemoterapötikler kanser tedavisinde kullanılmakta ve çoğunlukla yerine başka ilaç kullanmak mümkün olmamaktadır. Bu da ototoksiteyi önleyici ajanların keşfedilmesi gereksinimini ortaya çıkarmıştır. Pek çok in vitro ve hayvan çalışmasında otoprotektif ajanlar çalışılmıştır fakat bu alandaki klinik çalışma sayısı halen çok azdır. Uzun yıllardır bilinen bir konu olan sisplatin ototoksitesi halen güncel literatürde tartışılmakta ve bu konu hakkında pek çok yayın bulunmaktadır (Tablo 2.2).

İdeal bir otoprotektif ajan toksik olmamalı, iç kulakta yüksek konsantrasyona ulaşabilmeli ve sisplatinin antitümöral etkisini engellememelidir. İç kulakta arzu edilen yüksek konsantrasyon düzeyine erişmek için transtimpanik uygulama yapılabilir. İnvazif bir işlem olması en önemli dezavantaj olsa da sistemik yan etkiden kaçınmak transtimpanik uygulamaların en önemli avantajıdır. Diğer yandan otoprotektif amaçla verilen bir ajan, sisplatinin nefrotoksik ve nörotoksik etkilerini de engelleyebilir. Transtimpanik uygulama ile bu sekonder kazanç elde edilemez (44).

Klinik çalışmalarda gösterilen sisplatine karşı otoprotektif ajanlar arasında N-asetilsistein, sodyum tiyosülfat ve amifostin bulunmaktadır (45-47). N-asetilsistein ve deksametazonun transtimpanik yolla uygulandığında sisplatin ototoksitesini önleyici etkileri olduğu bildirilmiştir (45, 48). Sisplatin nedenli işitme kaybına karşı koruyucu etkisi araştırılan bileşikler arasında *thiol bileşenleri* önemli bir yer tutmaktadır. Otto ve ark'nın bu alandaki ilk çalışmalarından birinde sodyum thiosülfatın ototoksiteden koruyucu etkisi gösterilmiştir (49). Fakat sisplatine bağlanarak ilacın tümörisidal aktivitesini de azalttığını bulmuşlardır. Bu nedenle intratimpanik uygulama gibi lokal uygulamalara da yönelim gündeme gelmiştir (50). Diğer bir thiol bileşeni olan D-methioninin hem sistemik hem de lokal uygulamada otoprotektif etkisi gösterilmiştir (51, 52). Choe ve ark transtimpanik Ringer laktat solüsyonu ve N-Asetil Sistein uygulamasının DPOAE yanıtlarını koruduğunu

göstermişlerdir (53). Yine klinikte sıklıkla kullanılan asetil salisilik asitin de antitümör aktiviteyi bozmadan tüylü hücre hasarını engellediği gösterilmiştir (54).

Bazı ilaçların etkisi gösterilse de henüz günlük kullanıma girmiş ve tedavi klavuzlarında onaylanmış bir otoprotektif ilaç bulunmamaktadır. Yukarıda bahsedilen pek çok ajan in-vitro olarak denenmiş veya hayvan deneyi aşamasındadır. Kanseri hastalarında güvenli kullanımı için ileri klinik araştırmalar gereklidir. Tablo 2’de son yıllarda sisplatin ototoksitesinde yapılmış yayınlar özetlenmiştir.



Tablo 2.2. Sisplatin ototoksitesini önlemek için kullanılan ajanlara dair çalışmalar

Yazar (yayın yılı)	Otoprotektif Ajan	Uygulama Yolu	Deney Hayvanı	Kullanılan Odyolojik Yöntem	Sonuç
Yurtsever ve ark (2020)(55)	PRP	İntratimpanik	Rat	ABR	Başarılı
Lee ve ark (2020)(56)	Zingerone	Sistemik	Rat	ABR	Başarılı
Fernandez ve ark (2020)(57)	Lovastatin	Sistemik	Fare	DPOAE + ABR	Başarılı
Napples ve ark (2020)(58)	Diltiazem+Kitosan	İntratimpanik	Fare	ABR	Başarılı
Kınal ve ark (2019)(59)	Astaksantin	Sistemik	Rat	DPAOE	Başarılı
Bezgin ve ark (2019)(41)	Riluzole	Sistemik	Gine pig	DPAOE	Başarılı
Tanyeli ve ark (2019)(60)	Folik Asit	Sistemik	Rat	ABR	Başarılı
Gündoğdu ve ark (2019)(61)	Quercetin	Sistemik	Rat	DPOAE	Başarılı
Sheth ve ark (2019)(62)	Kafein	Sistemik	Rat	ABR	Başarısız
DE Araujo ve ark (2019)(63)	Melatonin	Sistemik	Rat	DPOAE	Başarılı
Alan ve ark (2018)(64)	İzotretinoin	Sistemik	Rat	DPOAE + ABR	Başarılı
Somdaş ve ark (2018)(65)	N-Asetilsistein	Sistemik	Rat	DPOAE + ABR	Başarılı
Sakat ve ark (2019)(65)	Eugenol	Sistemik	Rat	DPOAE	Başarılı
Kim ve ark (2018)(66)	Alfa Lipoik Asit	Sistemik	Rat	ABR	Başarılı
Kılıç ve ark (2018)(67)	Gallik Asit	Sistemik	Rat	DPOAE	Başarılı
Eroğlu (2018)(19)	Korteksin	Sistemik	Rat	DPOAE	Başarılı
Olgun ve ark (2014)(36)	Resveratrol	Sistemik	Rat	DPOAE + ABR	Başarısız

2.7. Spirulina

Spirulina, mavi yeşil alglerden mikroskobik bir plankton türüdür. Spiral şeklinde olup hücrel olarak basit prokaryot yapıdadır. Besin desteği olarak kullanılan türleri ise *Spirulina platensis* ve *Spirulina maxima* olup Meksika ve Afrika halklarının geleneksel gıdaları arasında yer almaktadır. Besin değeri ve vitamin-mineral içeriği keşfedildikten sonra ticari olarak da üretilip satılmaya başlanan bir gıda desteği haline gelmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü, spirulinayı “süper gıda” olarak tanımlamış ve astronotlar için gıda takviyesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Spirulina yüksek protein, esansiyel aminoasit, beta karoten, esansiyel yağ asitleri, glikolipid, beta karoten, mineral içeriği ile “fonksiyonel bir gıda” olarak tanımlanmaktadır (68). B vitamini, E vitamini, kalsiyum, demir, magnezyum, potasyum ve çinkoyu yüksek oranda içerir (69). Özellikle yüksek miktarda içeriği B12 vitamini nedeniyle vejeteryanlarda da besin desteği olarak önerilmektedir (70). Antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklerinin yanısıra immünmodülatör etkisi de gösterilmiştir (70).

Spirulina ekstresinin antioksidan etkinliği de in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (71). İçeriğinde bulunan C-pikosiyanin; reaktif oksijen radikallerini ortamdan uzaklaştırarak pek çok dokuda antioksidan etkinlik göstermektedir (72). Karaciğer dokusunda sitokrom p450 mekanizması üzerinden hepatik glutatyon S-transferaz aktivitesini artırarak detoksifikasyon sağladığı bilinmektedir (73). Sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisiteye, doksorubisine bağlı kardiyotoksisiteye ve siklosporin nefrotoksisitesine karşı korucu etkisi olduğu gösterilmiştir (74-76).

Sisplatine bağlı oluşan reaktif oksijen bileşikleri renal tübüler epitele zarar vererek nefrotoksik etki göstermektedir (6). Kuhad ve arkadaşları Sisplatinin azalttığı süperoksid dismutaz ve katalaz aktivitesinin *Spirulina fusiformis* tarafından artırıldığını göstermişlerdir (6). Ototoksisitede de benzer antioksidan mekanizmalar yer almaktadır. Literatürde Spirulina’nın otoprotektif etkisine dair güncel bir yayına rastlanamamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA19/32) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Çalışma Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretin ve Araştırma Merkezi laboratuvarında yürütülmüştür. Uluslararası Helsinki Deklarasyonu'nda bildirilen hayvan bakım ve kullanımı ile ilgili kurallara uyulmuştur. Çalışma, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Odyoloji Yüksek Lisans Programı tezi olarak planlanmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Güç analizi için R Project tabanlı çevrim içi WebPower yazılımı ile farklı örneklem sayılarına ilişkin güç değerleri hesaplanmıştır. Her grup için minimum 7 gözlem ile çalışıldığında %87.3 düzeyinde bir test gücüne ulaşılmıştır. Sonuç olarak güç analizi bulgularına göre, araştırma için toplam minimum 28 denek ile araştırma yapılabileceği belirlenmiştir.

Çalışma 28 adet sağlıklı, 12 aylık ve ağırlığı 250-350 gr arasında olan erkek Sprague Dawley cinsi rat üzerinde yapıldı. Ratlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 21 ± 1 C° sıcaklıkta, serbest yemek ve su alabildikleri bir ortamda barındırıldı.

Toplam 28 ratın 56 kulağı çalışmaya alındı. Odyolojik ölçümler öncesinde ratlar sıcak bir örtü üzerine yatırılarak genel anestezi altında otoskopik muayene yapıldı, dış kulak yolunda buşon var ise temizlendi. Dış kulak yolu, orta kulak veya timpanik membran patolojisi saptanan hayvanların çalışma dışı bırakıldı. Çalışmanın başında tüm ratların her iki kulağına DPOAE testi uygulandı ve yanıt alınamayan ratlar çalışma dışı bırakıldı.

3.2. Grupların Oluşturulması

Çalışmaya dahil edilen 28 adet rat, yedişer ratdan oluşan dört gruba ayrıldı. Çalışma grupları şu şekilde belirlendi:

Çalışmada her biri 7 rattan oluşmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Çalışma grupları şu şekilde belirlendi:

1.Kontrol Grubuna (K) tek doz 1 ml serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı.

2.Sisplatin Grubuna (C) tek doz 15 mg/kg sisplatin (Koçak Farma, İstanbul,Türkiye) intraperitoneal olarak verildi.

3. Spirulina Grubuna (S) 1000 mg/kg/gün spirulina (Ege Üniversitesi EGERT Spirulina kapsül) distile su içinde çözülerek gavaj ile günde 2 eşit doza bölünerek 10 gün boyunca uygulandı.

4. Spirulina + Sisplatin Grubuna (CS) tek doz 15mg/kg intraperitoneal sisplatin uygulanması yapıldı ve devamında 1000 mg/kg/gün spirulina distile su içinde çözülerek gavaj ile 10 gün boyunca uygulandı.

3.3. Anestezi Uygulamaları

Tüm ratlara intraperitoneal ketamin hidroklorür 60 mg/kg (Ketalar flk, Pfizer İlaç, İstanbul,Türkiye) ve intraperitoneal ksilazin 6 mg/kg (Rompun %2, Bayer İlaç, İstanbul,Türkiye) uygulandı. Genel anestezi altında öncelikle bütün ratlara DPOAE yapıldı ve beraberinde ABR testi uygulanarak işitsel eşik değerleri elde edildi. Odyolojik değerlendirme sonrası yukarıda bahsedilen intraperitoneal uygulamalar gerçekteştirilerek gruplar oluşturuldu.

On gün sonra, ikinci ölçümler sonrasında 150 mg./kg. dozunda ketamin ve 10 mg/kg ksilazin intraperitoneal yolla uygulanarak ötenazi uygulandı. Ötenazi sonrası

kadavralar dekapite edilerek kokleaları çıkarıldı ve ileride yapılacak histopatolojik çalışmalarda kullanılmak üzere formaldehit içinde tespit edildi.

3.4. Odyolojik Değerlendirme

3.4.1. Distortion product otoakustik emisyon (DPOAE) uygulaması

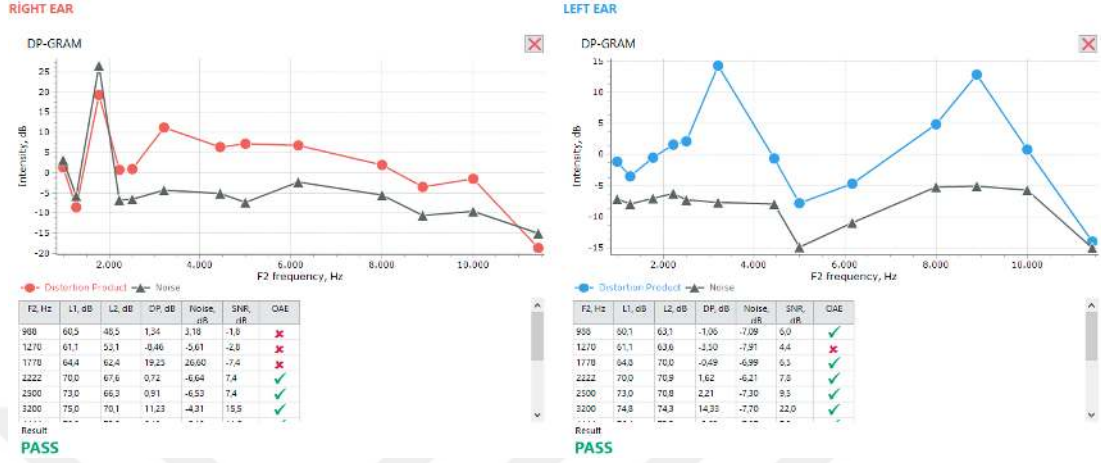
Bu çalışmada OAEların değerlendirilmesi için DPOAE kullanılmıştır. Tüm deneklere çalışma başlangıcında ve ilk ölçümden 10 gün sonra her iki kulaktan DPOAE ölçümü yapıldı. DPOAE ölçümü Neuroaudio (Neurosoft / Rusya) cihazı ile yenidoğan probu kullanılarak yapılmıştır (Şekil3.1). Ölçümler gürültü düzeyinin 50 dB'i geçmediği bir odada, cihazdaki prob kontrol göstergesi ve uyaran dalga formunun uygun olduğu görüldükten sonra yapıldı.



Şekil 3. 1. Yenidoğan probu ile DPOAE ölçümü

DPOAE değerleri dış kulak kanalındaki iki adet uyaran (f_1 ve f_2) için iki farklı hoparlör kullanılarak elde edildi. f_2 ve f_1 frekansları arasındaki oran (f_2/f_1) 1.22 olacak şekilde tutuldu. Uyaran şiddeti f_1 frekansı için L1 ve f_2 frekansı için L2 olarak alındı ve L1=55 ve L2=55 düzeyinde tutuldu. DPOAE'lar, $2f_1-f_2$ frekansında ölçüldü. DPOAE, f_1 ve f_2 'nin geometrik ortalamalarında 988, 1270, 1778, 2222, 2500, 3200, 4444, 5000, 6154, 8000, 8889, 10000 ve 11429 Hz'deki sinyal-gürültü

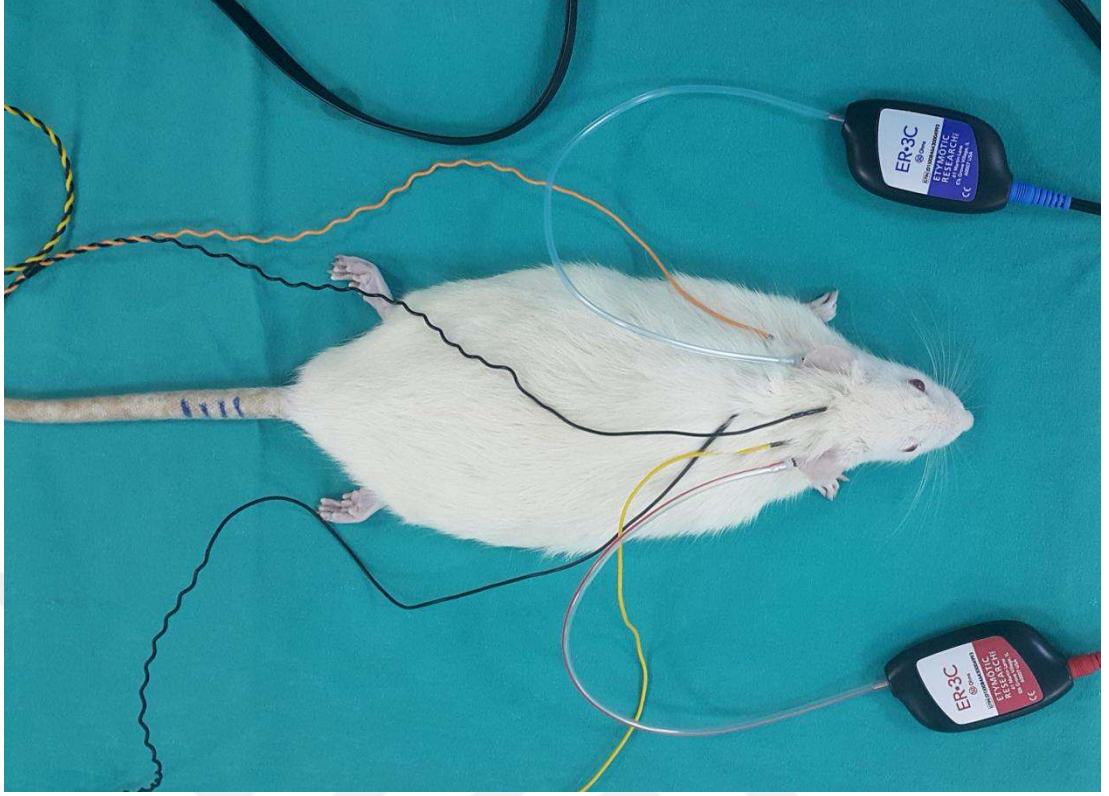
oranları (SNR) kaydedildi (Şekil 3.2). Belirtilen frekanslar cihazın otomatik olarak ayarladığı frekanslardır.



Şekil 3.2. Sağ ve sol kulaktan alınan DPOAE yanıtları

3.4.2. İşitsel beyin sapi cevabi (ABR) uygulaması

ABR ölçümleri Neuroaudio (Neurosoft / Rusya) cihazı ile cilt altı iğne elektrotlar ile iki kulaktan eş zamanlı olarak yapıldı. İğne elektrodlar, aktif elektrot vertekste, referans elektrotlar bilateral mastoid üzerinde ve toprak elektrot sırt bölgesinde olacak şekilde yerleştirildi. (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. ABR ölçümü için elektrotların yerleşimi

İnsert kulaklıklar ile klik uyarı verildi. Uyarıcılar rarefaction polaritede sunuldu. Filtre 100-3000 Hz; tekrar oranı 21,1/sn; zaman penceresi 15 msn olarak ayarlandı. Sinyal ortalama için 2000 örnek alındı. Ölçüm yapılmadan önce impedans bakılıp, 0 ile 3 kOhm arasında olması sağlandı. Eşik düzeyi, gözle saptanabilen, tekrarlanabilirliği olan en düşük şiddet seviyesi olarak tanımlandı. Klik uyarı, 80 dB nHL düzeyinde verilmeye başlandı ve descending metod ile şiddet düzeyi eşik yaklaşana kadar 10 dB'lik adımlarla azaltıldı. Eşik yaklaşınca 5 dB'lik şiddet azaltmalar yapılarak eşik belirlendi. Dalganın güvenilirliği açısından her ölçüm için üst üste en az iki trase oluşturuldu. ABR eşik, ABR'nin II. dalgasının gözlemlenebildiği en düşük şiddet seviyesi olarak tanımlandı (Şekil 3.4).

Ölçümler gürültü düzeyinin 50 dB'i geçmediği bir odada yapıldı. İlk ölçümden sonra ilaç uygulamaları başlanmış ve 10 gün ilaç uygulaması sonrası ikinci ABR ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.4. ABR ile eşik ölçümü

3.5. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analiz ve veri görselleştirme için R Project yazılımı kullanıldı(77, 78). Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadığını test etmek için Kolmogorov-Smirnoff, Shapiro Wilk ve Andersen Darling testleri uygulandı. Değişkenler normal dağılıyor ise parametrik, dağılmıyor ise non-parametrik testler uygulandı. Çalışmanın başında her gruptaki ratların DPOAE ve ABR sonuçlarının rastgele dağılıma uyup uymadığı Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), Welch testi ve Kruskal Wallis varyans analizi ile test edildi. Dört ayrı grubun 10. gündeki ölçümleri arasındaki değişim ANOVA ve Kruskal Wallis Varyans testi ile değerlendirildi. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Homojen dağılım elde edilemiyor ise Welch testi sonuçları dikkate alındı. Çoklu karşılaştırma testleri varyansların homojenliğine göre seçildi. Normal dağılım sağlanıyor ve varyanslar homojen ise Tukey, değil ise Games Howell testleri ile post-hoc değerlendirme yapıldı. Normal dağılım sağlanamadığı durumlarda ise Dunn Testi uygulandı. Çalışmanın başındaki ve 10 gün sonraki DPOAE değerleri ve ABR eşikleri arasındaki farkı karşılaştırmak için eşleştirilmiş örneklem t testi ve Wilcoxon Signed Rank Test kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tanımlayıcı istatistikler için parametrik testlerde ortalama, standart sapma (SS), değerleri, non-parametrik testlerde ise ortanca, ve kartiller arası açıklık (25. ve 75. çeyrek) değerleri verildi.



4. BULGULAR

4.1. DPOAE Bulgularının Değerlendirilmesi

İlaç uygulaması öncesi ve sonrası, grupların her bir frekanstaki DPOAE sinyal gürültü oranı (SNR) sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapmak için ANOVA ve Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. Farkı yaratan grubu saptamak için ise post hoc Tukey ve Dunn testleri uygulandı. 988 Hz, 1270 Hz ve 1778 Hz frekanslarındaki ölçümlerde gürültü gücü sinyal gücünden fazla olduğu için analiz yapılmadı. Gruplar arasında herhangi bir frekansta anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. İlaç uygulaması öncesi gruplara ve frekanslara göre DPOAE sonuçları

	Grup	2222 Hz	2500 Hz	3200 Hz	4444 Hz	5000 Hz	6154 Hz	8000 Hz	8889 Hz	10000 Hz	11429 Hz
Ortalama	K	3.81	7.82	12.8	14.8	13.1	14.9	19	22.2	19.9	13.7
	C	3.18	4.83	7.86	15.8	14.3	14.4	19.8	22.8	20.6	14.4
	S	3.33	5.56	10.3	14.3	11.8	15.3	24.1	26.4	23	15.6
	CS	-0.25	5.46	7.32	17.1	17.9	20.5	23.8	23.5	26.1	14.4
Ortanca	K	6.1	7.6	11.8	13.1	10.4	14.4	13.1	20.1	18.3	11.4
	C	2.25	5.55	6.85	13.8	11.6	9.2	19.5	25.9	19.6	12
	S	5.55	6.55	9.9	14.1	13	13.5	27.5	26.5	16.9	13.6
	CS	1.1	6.4	7.4	15.4	20.9	21.9	23.5	27.7	26.1	12.1
SS	K	4.59	6.56	8.18	8.55	8.95	7.61	12.1	11	13	8.09
	C	5.06	2.51	4.72	8.42	8.33	9.4	10.7	11.5	11.6	5.9
	S	4.01	5.91	7.34	7.77	9.01	9.94	11.8	10.7	11.6	10.9
	CS	7.18	2.86	3	7.8	7.25	9.63	11.1	11.1	9.46	5.6
%25	K	0.325	5.3	6.75	9.8	7.3	8.08	9.2	15.5	7.5	8.8
	C	-0.325	3.28	6.43	7.95	7.03	6.88	10.5	10.8	9.6	10.3
	S	-0.25	2.73	5.7	7.83	7.15	7.3	13.5	20.9	13.1	9.65
	CS	-7.0	6.2	6.1	11.9	12.1	14.1	13.3	14.8	21.4	10.6
%75	K	7.63	9.6	19.7	16.5	13.8	21.6	29.6	33.1	31.6	16.1
	C	6.07	6.65	7.67	22.9	21	21.6	26.6	31	30	18.4
	S	6.15	7.78	15.8	20.4	18.4	21.2	33.9	35.4	31.6	19.3
	CS	6.63	6.77	8.3	21.5	23	27	31.7	31.1	32.2	17.9
p		0.371*	0.291**	0.113*	0.771**	0.265*	0.275**	0.497**	0.664**	0.472**	0.912**

*One Way Anova (Welch Testi)

** Kruskal Wallis Varyans Analizi

İlaç etkisini incelemek amacı ile her bir gruptaki ilaç öncesi ve sonrası DPOAE değerleri eşleştirilmiş örneklem t testi ve Wilcoxon signed rank testi kullanılarak karşılaştırıldı ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edildi.

Kontrol Grubu: Tek doz intraperitoneal serum fizyolojik uygulanan bu grupta tüm frekanslarda DPOAE sonuçları açısından ilaç uygulaması öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenemedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.2).



Tablo 4.2. Kontrol grubunun ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri

	Ortalama	Ortanca	SS	Ort. Fark	t	p
2222Ö	3.807	6.1	4.59	0.91	0.4393	0.668*
2222S	2.893	3.8	5.8			
2500Ö	7.821	7.6	6.56	0.60	0.2368	0.817*
2500S	7.221	7.8	4.92			
3200Ö	12.814	11.75	8.18	3.62	1.2995	0.216*
3200S	9.186	8.45	5.67			
4444Ö	14.771	13.05	8.55	3.25	0.8464	0.413*
4444S	11.514	10.25	8.3			
5000Ö	13.064	10.4	8.95	0.94	0.2710	0.790*
5000S	12.121	10.75	6.6			
6154Ö	14.921	14.4	7.61	0.07	0.0283	0.978*
6154S	14.85	13.85	6.1			
8000Ö	19.036	13.1	12.06	-3.20	-0.6675	0.526*
8000S	22.243	21.8	10.38			
8889Ö	22.236	20.15	11	-0.98	-0.2281	0.823*
8889S	23.221	20.7	10.12			
10000Ö	19.886	18.3	13	-3.11	-0.6699	0.525*
10000S	23	17.95	9.02			
11429Ö	13.686	11.45	8.09	-0.20	0.0675	0.947*
11429S	13.479	12.1	5.21			

*Eşleştirilmiş örneklem t testi,

**Wilcoxon işaretli sıralar testi

Sisplatin Grubu: Tek doz intraperitoneal 15 mg/kg sisplatin uygulanan bu grupta 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında uygulama öncesi ve sonrası SNR değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Sisplatin grubunun ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri

	Ortalama	Ortanca	SS	Ort. Fark	t	p
2222Ö	3.179	2.25	5.06	6.37	3.2487	0.006*
2222S	-3.193	-2.95	6.72			
2500Ö	4.829	5.55	2.51	7.60	3.2319	0.007*
2500S	-2.771	-1.4	8.42			
3200Ö	7.864	6.85	4.72	7.17	3.7174	0.003*
3200S	0.693	1.05	6.47			
4444Ö	15.757	13.8	8.42	10.4	3.5258	0.004*
4444S	5.343	6.2	6.83			
5000Ö	14.343	11.55	8.33	9.99	3.4253	0.005*
5000S	4.35	6.15	6.17			
6154Ö	14.379	9.2	9.4	7.74	1.9658	0.071*
6154S	6.636	6.25	10.27			
8000Ö	19.757	19.5	10.66	11.6	2.5287	0.025*
8000S	8.071	6.5	11.89			
8889Ö	22.757	25.85	11.5	14.4	3.3428	0.005*
8889S	8.343	6.85	10.49			
10000Ö	20.6	19.55	11.63	14.7	3.1181	0.008*
10000S	5.814	2.55	14.4			
11429Ö	14.407	12	5.9	13.4	3.4455	0.004*
11429S	1.057	-2.2	11.28			

**Eşleştirilmiş örneklem t testi

Spirulina Grubu: 10 gün boyunca gavaj ile 1000 mg/kg/gün spirulina uygulanan bu grupta tüm frekanslarda DPOAE sonuçları açısından ilaç uygulaması öncesi ve sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenemedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Spirulina grubu ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri

	Ortalama	Ortanca	SS	Ort. Fark	t	p
2222Ö	3.329	5.55	4.01	0.03	0.0201	0.984*
2222S	3.293	4.15	6.2			
2500Ö	5.564	6.55	5.91	-2.07	-1.1031	0.290*
2500S	7.643	7.6	4.44			
3200Ö	10.307	9.9	7.34	-1.42	-0.6156	0.549*
3200S	11.736	11.4	6.89			
4444Ö	14.286	14.05	7.77	1.47	0.6819	0.507*
4444S	12.814	11	5.89			
5000Ö	11.814	13	9.01	-0.46	-0.1622	0.874*
5000S	12.279	9.2	7.6			
6154Ö	15.293	13.5	9.94	0.60	0.1624	0.874*
6154S	14.693	14.7	7.6			
8000Ö	24.057	27.5	11.84	2.43	0.5671	0.580*
8000S	21.621	24.9	12.37			
8889Ö	26.386	26.5	10.66	0.79	0.1912	0.851*
8889S	25.593	29.55	10.84			
10000Ö	23.021	16.95	11.63	-0.27	-0.0602	0.953*
10000S	23.3	25.35	12.81			
11429Ö	15.593	13.65	10.89	1.08	0.2862	0.779*
11429S	14.507	12.8	6.74			

* Eşleştirilmiş örneklem t testi

Sisplatin + Spirulina Grubu: Tek doz 15mg/kg intraperitoneal sisplatin uygulanması akabinde 10 gün boyunca gavaj ile 1000 mg/kg/gün spirulina uygulanan bu grupta 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında uygulama öncesi ve sonrası SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptandı ($p < 0.05$). 2222 Hz, 2500 Hz ve 3200 Hz frekanslarında ise uygulama öncesi ve sonrası SNR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.5).

İlaç uygulaması sonrası grupların her bir frekanstaki DPOAE sinyal gürültü oranı (SNR) sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldı.) İlaç uygulaması sonrası 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Sisplatin + spirulina grubu ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE değerleri

	Ortalama	Ortanca	SS	Ort. Fark	t	p
2222Ö	-0.25	1.1	7.18	-1.60	-0.706	0.492*
2222S	1.35	1.9	4.28			
2500Ö	5.464	6.4	2.86	1.09	0.815	0.430*
2500S	4.371	3.1	3.86			
3200Ö	7.321	7.4	3	-1.08	-0.594	0.562*
3200S	8.4	6.85	5.8			
4444Ö	17.107	15.45	7.8	5.86	2.201	0.046*
4444S	11.243	11	6.45			
5000Ö	17.9	20.85	7.25	8.94	4.048	0.001*
5000S	8.957	9.45	5.31			
6154Ö	20.529	21.85	9.63	10.9	4.298	< .001*
6154S	9.55	9.9	5.33			
8000Ö	23.8	23.5	11.13	9.32	2.827	0.014*
8000S	14.479	13.85	8.01			
8889Ö	23.457	27.7	11.09	8.84	2.327	0.037*
8889S	14.621	13.15	9.62			
10000Ö	26.143	26.1	9.46	13.5	3.881	0.002*
10000S	12.65	12.4	8.57			
11429Ö	14.371	12.05	5.6	5.69	3.885	0.002*
11429S	8.686	9.1	4.75			

* Eşleştirilmiş örneklem t testi

Tablo 4.6. İlaç uygulaması sonrası gruplara ve frekanslara göre DPOAE değerleri

	Grup	2222Hz	2500Hz	3200Hz	4444Hz	500Hz	6154Hz	8000Hz	8889Hz	10000Hz	11429Hz
Ortalama	K	2.89 ^a	7.22	9.19 ^a	11.5 ^a	12.1 ^a	14.8	22.2 ^a	23.2 ^a	23.0 ^a	13.5
	C	-3.19 ^b	-2.77	0.69 ^b	5.34 ^b	4.35 ^b	6.64	8.07 ^b	8.34 ^b	5.81 ^b	1.06
	S	3.29 ^a	7.64	11.7 ^a	12.8 ^a	12.3 ^a	14.7	21.6 ^b	25.6 ^{ab}	23.3 ^a	14.5
	CS	1.35 ^a	4.37	8.4 ^a	11.2 ^a	8.96 ^a	9.55	14.5 ^b	14.6 ^b	12.7 ^a	8.69
Ortanca	K	3.80	7.80 ^a	8.45	10.3	10.8	13.9 ^a	21.8	20.7	18.0	12.1 ^a
	C	-2.95	-1.40 ^b	1.05	6.2	6.15	6.25 ^b	6.50	6.85	2.55	-2.2 ^b
	S	4.15	7.60 ^a	11.4	11	9.20	14.7 ^a	24.9	29.6	25.4	12.8 ^a
	CS	1.90	3.10 ^a	6.85	11	9.45	9.90 ^a	13.8	13.1	12.4	9.10 ^a
SS	K	5.80	4.92	5.67	8.3	6.60	6.10	10.4	10.1	9.02	5.21
	C	6.72	8.42	6.47	6.83	6.17	10.3	11.9	10.5	14.4	11.3
	S	6.20	4.44	6.89	5.89	7.6	7.60	12.4	10.8	12.8	6.74
	CS	4.28	3.86	5.8	6.45	5.31	5.33	8.01	9.62	8.57	4.75
%25	K	-1.22	4.88	7.2	7.55	9.50	11.0	13.7	16.5	16.6	9.77
	C	-6.90	-5.58	-3.35	0.875	-1.00	3.45	4.07	1.85	-2.65	-6.30
	S	-0.55	6.25	6.52	7.92	7.30	7.75	10.1	18.7	12.5	9.70
	CS	-1.82	2.30	6.25	7.15	7.53	7.67	10.7	10.6	8.32	6.45
%75	K	6.58	10.1	11.4	15.8	14.2	17.1	29.3	31.7	30.1	16.5
	C	-0.10	3.53	3.15	7.28	6.72	6.38	6.90	7.07	6.75	6.45
	S	7.40	9.57	18	16	14.6	20.2	30.5	34.8	33.0	17.3
	CS	4.22	6.98	13.5	15.1	11.5	12.2	20.6	22.1	18.4	10.3
P		0.006*	0.001**	0.003*	<0.001*	<0.001*	0.001**	0.001**	0.003*	<0.001*	<0.001*

^aKontrol grubu, Spirulina Grubu ve Sisplatin+ Spirulina Grubu birbirleri ile ikili olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). ^bSisplatin grubu ;Kontrol grubu, Spirulina Grubu ve Sisplatin+ Spirulina Grupları ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında Sisplatin Grubunda daha düşük SNR değerleri elde edildi($p<0.05$).

*One Way Anova (Post HocTukey Testi ile)

** Kruskal Wallis Varyans Analizi (Post Hoc Dunn Testi ile)

İkili karşılaştırma sonuçlarına göre; 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$) Sisplatin Grubunun SNR değerlerinin diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür ($p > 0.05$). (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8).

Tablo 4.7. İlaç uygulaması sonrası normal dağılım göstermeyen DPOAE değerlerinin gruplara ve frekanslara göre ikili karşılaştırmalar ile yorumlanması

2500 Hz		p*	6154 Hz		p*	11429 Hz		p*
C	CS	0.093	C	CS	0.079	C	CS	0.046
C	K	0.003	C	K	0.008	C	K	0.008
C	S	0.001	C	S	0.006	C	S	0.007
CS	K	0.122	CS	K	0.122	CS	K	0.099
CS	S	0.188	CS	S	0.542	CS	S	0.104
K	S	1	K	S	0.999	K	S	0.999

*Post Hoc Dunn Testi'ne göre p değerleri tablosu.

Tablo 4.8. İlaç uygulaması sonrası normal dağılım gösteren DPOAE değerlerinin gruplara ve frekanslara göre ikili karşılaştırmalar ile yorumlanması

2222 Hz	p*		
C	0.178	0.038	0.024*
CS	—	0.896	0.814
K		—	0.998
3200 Hz	p*		
C	0.010*	0.004*	<.001*
CS	—	0.987	0.494
K	—	—	0.701
4444 Hz	p*		
C	0.123	0.098	0.031
CS	—	1.0	0.932
K	—	—	0.959
			1

*Post Hoc Tukey Testi

5000 Hz	p*		
	CS	K	S
C	0.248	0.013	0.011*
CS	—	1.00	0.932
K	—	—	0.959
8000 Hz	p*		
C	0.404	0.006*	0.009*
CS	—	0.240	0.309
K	—	—	0.999
8889 Hz	p*		
C	0.379	0.002*	<.001*
CS		0.133	0.033*
K			0.928
10000 Hz	p*		
C	0.401	0.001*	0.001*
CS	—	0.992	0.079
K	—	—	1.000

4.2. ABR Eşik Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışma öncesi bazal ABR eşik değerleri saptandı. İlaç uygulaması öncesi ABR eşikleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. İlaç uygulaması öncesi gruplara göre ABR eşik değerleri

	Ortalama	Ortanca	SS	%25	%75	p*
K	11.4	10	3.63	10	10	0.924
C	12.1	10	4.26	10	10	
S	11.4	10	3.63	10	10	
CS	11.1	10	2.89	10	10	

*Kruskal Wallis Varyans Analizi

İlaç etkisini incelemek amacı ile her bir gruptaki ilaç öncesi ve sonrası ABR eşikleri eşleştirilmiş örneklem t testi ve Wilcoxon signed rank testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Sisplatin Grubu ve Sisplatin + Spirulina Grubu ilaç uygulaması öncesi ve sonrası eşikler karşılaştırıldığında eşiklerde yükselme saptandı ($p<0.05$) Kontrol Grubu ve Spirulina Grubunda ise ilaç uygulaması öncesi ve sonrası eşikler arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Ortalama fark değerleri ve test istatistiği (t) değerleri yorumlanarak değişimin hangi grupta daha çok olduğu incelendi. Sisplatin grubundaki eşik yükselmesinin (ortalama fark:-17.1; t:8.83) sisplatin+spirulina grubuna (ortalama fark: -6.79; t:-6.03) göre daha bariz olduğu görüldü (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. İlaç uygulaması öncesi ve sonrası gruplara göre ABR eşik değerleri

		Ortalama	Ortanca	SS	%25	%75	Ort.Fark	t	p
K	ABRÖ	11.4	10	3.63	10	10	-1.43	1.00	1.0**
	ABRS	12.9	10	8.25	10	10			
C	ABRÖ	12.1	10	4.26	10	10	-17.1	8.83	0.001*
	ABRS	29.3	30	7.30	22.5	30			
S	ABRÖ	11.4	10	3.63	10	10	-1.72	2.00	0.773**
	ABRS	12.1	10	4.26	10	10			
CS	ABRÖ	11.1	10	2.89	10	10	-6.79	-6.03	<0.001*
	ABRS	17.9	20	3.78	20	20			

*Eşleştirilmiş örneklem t testi

**Wilcoxon işaretli sıralar testi

İlaç uygulaması sonrası grupların ABR eşik değerleri birbirleri ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapmak için normal dağılım sağlanmadığından Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. Farkı yaratan grubu saptamak için ise post hoc Dunn testi uygulandı. İlaç uygulaması öncesinde grupların ABR eşikleri arasında anlamlı fark bulunmaz iken ilaç uygulaması sonrası Sisplatin grubundaki ortalama ve ortanca ABR eşiklerinin bariz şekilde yüksek olduğu görüldü (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. İlaç uygulaması sonrası gruplara göre ABR eşik değerleri

Grup	Ortalama	Ortanca	SS	%25	%75	p*
K	12.9	10 ^a	8.25	10	10	< .001
C	29.3	30 ^b	7.3	22.5	30	
S	12.1	10 ^a	4.26	10	10	
CS	19.9	20 ^{ab}	3.78	16.3	20	

* Kruskal Wallis Varyans Analizi (Post Hoc Dunn Testi ile)

İkili karşılaştırmalar ile Sisplatin + Spirulina grubu Sisplatin Grubu ile karşılaştırıldığında ABR yanıtı daha düşük eşik değerlerinde elde edildi. Sisplatin Grubunda ise diğer gruplara göre ABR yanıtı daha yüksek eşik değerlerinde elde edilebildi (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. İlaç uygulamasının 10. gününde gruplara göre ABR eşik değerlerinin ikili karşılaştırmalar ile yorumlanması

ABRS		p*
C	CS	< .001
C	K	< .001
C	S	< .001
CS	K	0.007
CS	S	0.011
K	S	0.981

*Post Hoc Dunn Testi'ne göre p değerleri

K: Kontrol C: Sisplatin S: Spirulina CS: Sisplatin + Spirulina

^aKontrol grubu, Spirulina Grubu ile ikili olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi (p>0.05).

^bSisplatin grubu; Kontrol grubu, Spirulina Grubu ve Sisplatin+ Spirulina Grupları ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında Sisplatin Grubunda daha yüksek eşikler elde edildi (p<0.05).

^{ab}Sisplatin + Spirulina grubu kontrol grubu ve Spirulina Grubu ile ikili olarak karşılaştırıldığında daha yüksek eşikler elde edildi. Sisplatin + Spirulina Grubu Sisplatin Grubu ile karşılaştırıldığında daha iyi eşikler elde edildi.

Ek olarak her bir gruptaki ilaç öncesi ve sonrası II. dalga ABR latansları eşleştirilmiş örneklem t testi ve Wilcoxon signed rank testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Tablo 4.13. İlaç uygulaması öncesi ve sonrası gruplara göre ABR latans değerleri

		Ortalama	Ortanca	SS	%25	%75	Ort.Fark	t	p
K	ABRÖ	1.18	1.17	0.043	1.14	1.21	0.057	1.83	0.118*
	ABRS	1.12	1.13	0.044	1.10	1.13			
C	ABRÖ	1.16	1.14	0.039	1.13	1.17	-0.178	-5.15	0.002*
	ABRS	1.33	1.35	0.067	1.27	1.37			
S	ABRÖ	1.14	1.14	0.010	1.13	1.15	-0.048	-1.70	0.140*
	ABRS	1.19	1.17	0.074	1.15	1.25			
CS	ABRÖ	1.28	1.28	0.009	1.27	1.30	-0.072	3.00	0.078**
	ABRS	1.33	1.36	0.055	1.29	1.37			

*Eşleştirilmiş örneklem t testi

**Wilcoxon signed rank test

Sisplatin Grubunda ilaç uygulaması öncesi ve sonrası latanslar karşılaştırıldığında latanslarda uzama saptandı ($p<0.05$) Kontrol Grubu, Spirulina Grubu ve Sisplatin+Spirulina Grubunda ise ilaç uygulaması öncesi ve sonrası latans süreleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

İlaç uygulaması sonrası grupların ABR latans değerleri birbirleri ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında karşılaştırma yapmak için normal dağılım sağlandığından ve varyanslar da homojen dağıldığından one way ANOVA uygulandı. Farkı yaratan grubu saptamak için ise post hoc Tukey testi uygulandı. İlaç uygulaması sonrası Sisplatin grubundaki ve Sisplatin+ Spriulina grubundaki ortalama ABR latanslarının diğer gruplara göre uzun olduğu görüldü. (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. İlaç uygulaması sonrası gruplara göre ABR latans değerleri

Grup	Ortalama	SS	p*
K	1.12 ^a	0.067	< .001
C	1.33 ^b	0.075	
S	1.19 ^a	0.056	
CS	1.33 ^b	0.044	

*One Way ANOVA

K: Kontrol C: Sisplatin S: Spirulina CS: Sisplastin + Spirulina

^aKontrol grubu, Spirulina Grubu ile ikili olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$).

^bSisplatin grubu; Kontrol grubu, Spirulina Grubu ve Sisplatin+ Spirulina Grupları ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında Sisplatin ve Sisplatin+ Spirulina gruplarında ve daha uzun latanslar elde edildi($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Sisplatinin işitme kaybı yaptığı farkedildiğinden beri sisplatin ototoksisitesi ve önlenmesi hakkında çalışmalar süregelmektedir. Genel görüş sisplatinin indüklediği reaktif oksijen radikallerinin kokleada hasar oluşturduğu yönündedir. Bu da sisplatin ototoksisitesini önlemek için antioksidan ve antiinflamatuvar ajanların kullanılması gerektirdiği fikrini kuvvetlendirmiş ve çalışmalar bu yönde ilerlemiştir. Güncel yayınlarda beta glukon, resveratrol, Vitamin E, kafeik asit, etanercept, astaksantin gibi pek çok antioksidan ve antiinflamatuvar ajan çalışılmıştır (59, 79-83). Bu çalışmanın amacı da antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği bilinen spirulinanın sisplatin ototoksisitesine bağlı iç kulak hasarını önleyip önlemediğinin objektif işitme ölçümleri (DPOAE ve ABR) kullanılarak araştırılmasıdır.

Deney hayvanlarında ototoksisite çalışmalarında OAE ve ABR tercih edilmektedir. Literatürdeki pek çok yayında tek bir yöntem kullanılmaktadır. OAE koklea fonksiyonunu yansıtan, hızlı, non invazif ve objektif bir testtir. Koklear fonksiyondaki problemler saf ses odyometrisinde bulgu vermeden önce OAE sayesinde saptanabilir. Yüksek frekanslarda ve 4-8 kHz aralığında DPOAE seviyelerinin saf ses ortalaması ile korele olduğu bilinmektedir (84). DPOAE, kokleadaki dış tüylü hücre hasarına duyarlı olduğundan ve yüksek frekans kaybını erken dönemde tespit etmede duyarlı olduğundan sisplatin ototoksisitesine dair deneysel çalışmalarda en sık kullanılan odyolojik tetkik yöntemidir. Bu nedenle biz de çalışmamızda DPOAE'lerden yararlandık. Ek olarak, sisplatinin bilinen nörotoksik etkisi nedeniyle olası sensörinöral kaybı daha iyi ortaya koyabilmek için ABR de uyguladık. ABR, vestibulokoklear sinirden beyin sapına kadar uzanan işitsel yolaktaki elektriksel aktiviteyi değerlendirir. İnsan ve rattaki ABR dalgaları arasında morfoloji, latans ve amplitüd açısından farklılık göstermektedir. İnsanlarda III. ve V. dalgalar en yüksek amplitüdlü dalgalar olmasına rağmen ratlarda bu II. dalgadır. İnsanlarda koklear sinir ABR'nin I. ve II. dalgalarını üretebilecek kadar uzunluğa sahipken ratlarda sinir trasesi daha kısa olduğundan sadece I. dalgayı üretebilmektedir. Ratlarda II. dalganın ana kaynağı koklear nükleus olarak kabul edilmektedir ve insanlardaki III. dalganın eşleniği olarak düşünülebilir (85). Bu

bilgilere göre ratlarda neden en büyük dalganın V. dalga olmadığı anlaşılabılır. Biz de çalışmamızda II. dalgayı işaretleyerek eşik değerlendirmesinde kullandık. Sisplatine bağlı koklea hasarı tüylü hücreleri etkilediği gibi spiral ganglion hücrelerini de etkiler. Bu yüzden hem kokleanın motor fonksiyonunu değerlendirmek hem de beyin sapına kadar olan işitsel yolaktaki etkilenmeyi değerlendirmek açısından mümkün ise hem OAE hem ABR kullanmak faydalı olabilir. Biz de bu nedenlerden ötürü çalışmamızda her iki testi de yapmayı tercih ettik.

Sisplatin ototoksisitesinin önlenmesine dair araştırmalardan bu tez çalışmasının genel bilgiler bölümünde de bahsedilmiştir. Antioksidan ve antiinflamatuvar ajanlara ek olarak diğer hastalıklar için kullanılan pek çok ilacın da otoprotektif etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Daşlı ve arkadaşları etanercept kullanarak sisplatin ototoksisitesinin önlenip önlenemeyeği üzerine çalışmışlardır. Etanercept; anti tümör nekrozis faktör (TNF) etkisi olan immünmodülatör bir ilaçtır. Sisplatin başlanmadan önce ratlara tek doz etanercept uygulanmış ve DPOAE ile etkisi ölçülmüştür. Ölçümler 9853 Hz'e kadar yapılmıştır. Özellikle yüksek frekanslarda etanerceptin koruyucu etkisi olduğunu ve ototoksisite insidansını azalttığını belirtmişlerdir (83). Bu çalışmanın önemli kısıtlılıkları DPOAE ölçümlerinin yanı sıra başka bir odyolojik ölçüm yapılmamış olması, 10000 Hz ötesindeki yüksek frekansların ölçülmemesi ve histopatolojik inceleme bulunmamasıdır. Bizim çalışmamızda 11429 Hz düzeyine kadar DPOAE yapılabilmiş olması da bir kısıtlılıktır. ABR yapabilmemiş olmamız ise çalışmamızda ek bulgular elde edebilmemizi sağlamıştır. Daşlı ve arkadaşları bu çalışmalarında proinflamatuvar süreçlerin inhibe edilmesinin de ototoksitenin önlenmesinde önemli olabileceğini göstermişlerdir (83). Etanerceptin tek doz uygulanabilmesi ve piyasada bulunabilmesi önemli bir avantaj gibi görünse de net bir ototoksiste önleyici ilaç önermeden önce bu çalışmanın ABR ve histopatolojik incelemeler ile desteklenmelidir.

Bezgin ve arkadaşları da amiyotrofik lateral skleroz tedavisinde kullanılan riluzole isimli bir ilacın sisplatin ototoksisitesi üzerindeki etkisini gine piglerde ABR

ve elektron mikroskopisi kullanarak değerlendirmiş ve hem elektrofizyolojik hem yapısal olarak riluzole'ün koruyucu olabileceğini belirtmişlerdir.(41) Bu çalışmada gine pig gibi kulak çalışmalarında insana daha yakın bir modelin kullanılması ve elektron mikroskopisi uygulanması çalışmanın en kuvvetli yanı olmakla birlikte riluzole gibi bir ilacın endikasyon dışı kullanımının güvenli olup olmadığına dair daha ileri çalışmalar gereklidir. Bizim çalışmamızda rat kullanılmış olup otoloji çalışmalarında gine pigten sonra ikinci sırada tercih edilmektedir ve elektron mikroskopisi kullanılamamıştır. Fakat çalışmamızda kullandığımız spirulina gıda desteği olup ilaç kategorisinde yer almadığından yan etki açısından daha güvenli olabilir.

Gözeler ve arkadaşları kalp yetmezliğinde kullanılan kalsiyum duyarlaştırıcı ajan olan levosimendan üzerinde çalışmışlardır (86). Çalışmalarının dizaynı bizim çalışmamıza çok benzer şekilde Sprague Dawley ratlarda tek doz intraperitoneal 15 mg/kg sisplatin uygulamasını içermektedir. 10000 Hz frekansa kadar DPOAE ölçümü yapabilmışlardır. Ek olarak kanda glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimleri ile histopatolojide kaspaz 3 çalışmışlardır. Sisplatin uygulanan grup ile diğer grupları karşılaştırdıklarında sadece sisplatin uygulanan grupta daha düşük ortalama SNR değerleri elde etmişlerdir. Sisplatin + levosimendan grubu, sadece levosimendan grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Bu sonuç levosimendanın koruyucu etkinliğinin çok yüksek olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bizim çalışmamızda sisplatin ve spirulinanın birlikte uygulandığı grubun ortalama SNR değerleri kontrol grubuna göre daha düşük olsa da sadece sisplatin uygulanan gruba göre daha yüksektir. Spirulina, levosimendan kadar başarılı değildir sonucuna varabilmek için daha ileri düzey çalışmalara ihtiyaç olduğu kesindir. Gözeler ve ark ABR ölçümü yapmamışlardır fakat kanda antioksidan kapasiteyi değerlendirmiş olmaları çalışmalarına zenginlik katmış olup bu konudaki ileri çalışmalarda kanda antioksidan enzim düzeylerinin ölçülmesi önerilebilir. Her ne kadar Gözeler ve arkadaşları levosimendan ile başarılı sonuç elde etmiş olsalar da bu ilaç kardiyovasküler sistem üzerinde etkileri olan pozitif inotrop bir ilaçtır. Ototoksositeye karşı kullanılacak ajanlarda fayda-zarar dengesi gözetmek ve sistemik yan etkilerden mümkün olduğunca kaçınmak ana felsefe olmalıdır. Bu

nedenle daha kolay ulaşılabilen, sistemik yan etkileri daha az bulunan ve m¼mk¼nse doğal gıda takviyesi şeklinde kullanılabilen pek çok madde de ototoksisite çalışmalarında yer bulmuştur. Biz de çalışmamızda piyasada kolay bulunabilen bir gıda takviyesi olan ve ototoksisite alanında çalışılmamış olan spirulinayı kullandık.

Ginkgo biloba ve likopen de iyi bilinen iki antioksidan madde olup Esen ve arkadaşları tarafından sisplatin ototoksisitesinde çalışılmıştır (87). 8000 Hz frekansına kadar DPOAE uygulanan bu çalışmada ginkgo bilobanın alçak, likopenin ise y¼ksek frekanslarda koruyucu etkisinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Daha y¼ksek frekansların da çalışılmaması s¼z konusu aştırmanın zayıf y¼n¼d¼r. Bizim alışmamızda da 11420 Hz ¼zerine ıkılamamış olması da bir kısıtlılık olup, bu kısıtlılık ABR ile kısmen de olsa giderilmeye çalışılmıştır.

Olgun ve arkadaşları resveratrol¼n sisplatin ototoksisitesindeki rol¼n¼ incelemişlerdir. DPOAE, ABR ve elektron mikroskopisinde resveratrol¼n olumlu bir etkisini g¼sterememiřlerdir. Oral uygulanan resveratrol¼n d¼ř¼k dozlarda etkisiz olduğunu, y¼ksek dozlarda ise sisplatinin ototoksik etkisini g¼lendirdięini g¼zlemiřlerdir. Elektron mikroskopisinde ise apoptotik etkileri geri d¼nd¼remedięini saptamışlardır (36).

Spirulina y¼ksek besin değerine sahip imm¼nmod¼lat¼r ve antioksidan etkili olan bir siyanobakteri t¼r¼d¼r. Antioksidan etkisi sayesinde karaciğer b¼brek ve testislerde kemoterapiye bağlı toksik etkileri azalttığı g¼sterilmiřtir (88). Yapısında bulunan C-fikosiyenin pigmenti; s¼peroksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesin arttırarak antioksidan etki g¼sterir. Youn ve arkadaşları superoksit dismutaz veya katalaz gibi etki ederek oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştıran ve oksidatif stresi azaltan tempol isimli bileşiğin sisplatin ototoksisitesini ¼nlemede etkin olabileceğini g¼stermiřlerdir (89). Sisplatine bağlı nefrotoksisite ve n¼rotoksisitede de etkileri g¼sterilmiřtir (89). Biz de çalışmamızda benzer enzimler ¼zerinden etki g¼steren spirulinayı değerlendirdik. Lee ve arkadaşları farelerde spirulinanın n¼roprotektif etkisini incelemişlerdir (90). Spirulinanın reaktif oksijen radikali salımını azaltarak sinir h¼cerelerindeki apoptozu

azalttığını göstermişlerdir. Ototoksisite oluşumunda en önemli basamaklar, reaktif oksijen üretiminin verdiği hasar ve nörotoksisite sebebiyle spiral ganglion hücreleri ve vestibülokoklear sinirde oluşan dejenerasyondur. Reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumunu azaltan ve nöroprotektif etkisi olduğuna dair yayınlar bulunan spirulina ile ototoksisite çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Sisplatin ototoksisitesine dair uzun yıllardır bilinen bir gerçek sülfür içeren bileşiklerin koruyucu olabileceğidir. Sisplatin antitümöral aktivitesini gösterirken de sülfür bağlarını hedefleyerek hücre hasarı oluşturmaktadır. Bu alandaki ilk ve en iddiali yayınlardan biri Campbell ve arkadaşlarına aittir (91). Bu çalışmada sisplatin öncesi 300 mg/kg dozda uygulanan D-methioninin sisplatin ototoksisitesinden tam koruyucu olduğunu ABR eşikleri ve elektron mikroskopisi vasıtası ile göstermişlerdir. Ek olarak D- methioninin sağ kalımı arttırdığını ve kemoterapiye bağlı kilo kaybını azalttığını belirtmişlerdir (91). Biz çalışmamızda glutatyon mekanizması üzerinden de etkinlik gösteren spirulina için tam koruyucu etkinlik gösteremedik. Hem sadece sisplatin hem de sisplatine ek olarak spirulina alan grupta ABR eşiklerinde yükselme gözledik. Sadece sisplatin uygulanan deney hayvanlarındaki eşik kaymasının sisplatin+spirulina grubundaki hayvanlara göre daha bariz olduğunu saptadık. Bu sonuçlara göre spirulinanın tam koruma sağlamasa da kısmi bir koruma sağladığı yorumunda bulunabiliriz.

Çalışmamızda sisplatini takiben ratlara 10 gün boyunca gavaj ile 1000 mg/kg/gün spirulina verilmiştir. Bu dozu belirlerken literatürdeki diğer çalışmaları inceledik (92, 93). Ototoksisite çalışması bulunmamasına rağmen diğer ilaç toksisitesine karşı koruyucu etkinlik çalışmalarında 400, 500 ve 1000 mg/kg/gün gibi dozlar uygulamalarını saptadık (92-94). Çalışmamızda Bousra ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi 1000 mg/kg/gün şeklinde uygulama yapmayı tercih ettik (94). Toz bir gıda olan spirulina gavaj ile verilir iken su ile dilüe edilmek durumunda kalınmıştır ve bu nedenle daha yüksek dozlara çıkılamamıştır. Spirulina kompozit bir gıda olduğu için içindeki pigmentler ve antioksidanlar ayrıştırılarak daha düşük dozlarda daha çok antioksidan etki gösterebilecek maddeler elde edilebilir. Aynı şekilde sistemik dolaşıma verilebilecek maddeler de ayrıştırılabilir.

Spirulinanın içinde bulunan C-fikosiyanin adlı maddenin farelerde oksidatif stresi azaltarak nefrotoksisiteyi önlediğine dair yayınlar mevcuttur (88, 95). Kim ve ark tarafından yapılan çalışmada Korti organı hücre kültüründe C-fikosiyaninin antiapoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir (96). C- fikosiyanin uygulanan hücre serilerinde rekaktif oksijen radikali birikimi azalmış apoptotik genlerin ekspresyonu azalmıştır. Hücre kültüründe olumlu bir etki saptanmış olsa da fonksiyonel faydanın otoprotektif etkisine dair bir hayvan çalışması veya insanlarda yapılmış bir klinik araştırmaya rastlanamamıştır. Spirulina içindeki C-fikosiyanin veya klorofil-a gibi pigmentler izole edilerek özellikle ototoksisite konusunda çalışmalar planlanabilir.

Kalkanis ve arkadaşları sistemik yolla verilen tek doz E vitamininin sisplatin ototoksisitesinden koruyucu olduğunu ABR eşiklerini kullanarak göstermişlerdir (81). Paksoy ve arkadaşlarıda intratimpanik olarak verilen E vitamininin yan etki bakımından güvenli, otoprotektif etki açısından da başarılı olduğunu göstermişlerdir (97). E vitamini oldukça bilinen bir molekül olmasına rağmen insanlarda sistemik uygulamada hangi dozda güvenli ve otoprotektif olacağına dair kesin bir veri yoktur. Çalışmamızda kullandığımız spirulina yoğun kıvamlı olması ve protein açısından zengin olması nedeniyle intratimpanik uygulamaya müsait değildir. Ancak içinde bulunan bileşiklerden C- fikosiyanin gibi maddeler ekstre şeklinde elde edilerek intratimpanik etkinliği ileri çalışmaların konusu olabilir.

Çalışmamızda literatürde önerilen doza uygun olarak 15 mg/kg intraperitoneal sisplatin verilen ratlarda 10 gün boyunca gavaj ile spirulina uyguladık. İlaç uygulamaları öncesi ve sonrasında DPOAE ve ABR ölçümleri yaptık. Sadece sisplatin uygulanan ratlarda yüksek frekanslarda bariz bir düşüş bulduk. Hem sisplatin hem spirulina alan grupta da aynı frekanslarda düşüş olmasına rağmen etkilenimin daha az olduğunu gözledik. Sisplatin grubunun öncesi ve sonrası DPOAE değerleri ile Sisplatin+Spirulina grubunun öncesi ve sonrası DPOAE değerlerini yorumladık. Hangi grupta daha çok değişim olduğunu saptamak için; ortalama fark, test istatistiği (t) ve p değerlerine bakarak sonuçları yorumladık. 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında sadece sisplatin alan grupta ortalama fark değerleri daha yüksektir

yani sisplatinden etkilenim daha fazladır. t değerleri de sadece sisplatin alan grupta SNR değişiminin daha büyük olduğunu doğrulamaktadır. Diğer bir deyişle spirulina sisplatinden etkilenimi tamamen önleyememiş ama ototoksik etkisini azaltmıştır. Benzer bir şekilde ABR sonuçlarımıza da baktığımızda sisplatin grubundaki eşik yükselmesinin (ortalama fark: -17.1; t:8.83) sisplatin+spirulina grubuna (ortalama fark: -6.79; t:-6.03) göre daha bariz olduğu görüldü. İlaç uygulaması sonrası sisplatin grubundaki Sisplatin grubundaki ortalama ve ortanca ABR eşiklerinin diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu gördük.

Sisplatin veya kimyasal ototoksisiteye ek olarak akustik travmaya bağlı iç kulak hasarında da çalışılmış çeşitli antioksidan moleküller mevcuttur. Çörek otu yağı, metformin, oksitosin, timokinon ve curcumin gibi pek çok molekülün akustik travmada da faydalı olabileceği gösterilmiştir (98-102). Bizim çalışmamızdan esilenilerek spirulinanın akustik travma üzerindeki etkisi yeni bir çalışma konusu olabilir.

İlaca bağlı veya akustik travmaya bağlı ototoksisite üzerine ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu alandaki yayınlarda çalışılan pek çok molekül (resveratrol, likopen, astaksantin, folik asit, gallik asit vb) reçetesiz olarak temin edilebilen gıda takviyeleridir. Hastaların da hem etkinlik hem de doz bakımından bilgilendirilmesi ve bu maddeler tavsiye edilecek ise uygun kullanım rejiminin belirlenmesi önemlidir. Spirulinanın da otoprotektif dozunun belirlenmesi için ek çalışmalar yapılmalıdır.

Sisplatin ototoksisitesine karşı üzerinde tam bir görüş birliğine varılmış bir ilaç veya gıda desteği bulunmamaktadır ve günümüzde kemoterapötik ilaçların iç kulakta yaptığı hasarın önlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışma, spirulinanın ratlarda sisplatin nedenli ototoksisite üzerindeki etkinliğini araştıran ilk çalışmadır. Elektrofizyolojik olarak spirulinanın kısmi de olsa koruyucu etkinliği olduğu gösterilmiştir. İnsanlardaki etkinliğinin gösterilebilmesi için ileri klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ratlarda deneysel olarak sisplatin ile ototoksisitenin antioksidan bir ajan olan spirulina ile azaltılabilir ya da önlenabilir olup olmadığı amaçlanmıştır.

Sisplatin grubundaki tüm ratlarda ortaya çıkarılan ototoksisite DPOAE ve ABR ile gösterilmiştir. Sadece sisplatin uygulanan ratlarda yüksek frekanslarda bariz bir düşüş görülmüştür.

DPOAE sonuçlarına göre 988 Hz, 1778 Hz, 2222 Hz, 2500 Hz, 3200 Hz, 4444 Hz, 5000 Hz, 8000 Hz, 8889 Hz, 10000 Hz ve 11429 Hz frekanslarında Sisplatin grubundaki etkilenim Sisplatin+Spirulina grubuna göre daha fazladır. Diğer bir deyişle Sisplatin ve Spirulina alan ratlarda da aynı frekanslarda düşüş olmasına rağmen etkilenimin daha az olduğunu gözlenmiştir. Spirulina sisplatinden etkilenimi tamamen önleyememiş ama ototoksik etkisini azaltmıştır.

ABR sonuçlarına göre sadece sisplatin alan ratların ABR eşikleri diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Sisplatin grubundaki eşik yükselmesinin sisplatin+spirulina grubuna göre daha belirgin olduğu görülmüştür.

Kompleks bir gıda olan spirulina 1000 mg/kg/gün şeklinde gavaj ile uygulanmıştır. İleri çalışmalarda spirulinanın içindeki c-pikosiyanin gibi antioksidan maddeler ayrıştırılarak verilebilir ve intratimpanik uygulama gibi alternatif uygulama metodları da denenebilir.

Bu çalışma spirulinanın ratlarda sisplatin ototoksisitesi üzerindeki etkinliğini araştıran ilk çalışmadır. Sonuçlarımıza göre spirulinanın sisplatin ototoksisitesini önlemede etkili bir antioksidan ajan olabileceği elektrofizyolojik olarak gösterilmiştir. Hücresel düzeydeki yapısal değişiklikleri saptamak için elektron mikroskobu ile yapılacak ileri histopatolojik çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Teranishi M-a, Nakashima T. Effects of trolox, locally applied on round windows, on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2003;67(2):133-9.
2. Fetoni A, Sergi B, Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. Protective effects of α -tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. *Acta otolaryngologica*. 2004;124(4):421-6.
3. Mutlu C. Ototoksisite. In: Çelik O, editör. Kulak Burun Boğaz hastalıkları ve bafl boyun cerrahisi. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2002. s. 257-70.
4. Giridharan R, Lavinya U, Sabina EP. Suppressive effect of *Spirulina fusiformis* on diclofenac-induced hepato-renal injury and gastrointestinal ulcer in Wistar albino rats: a biochemical and histological approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;88:11-8.
5. Lee J, Park A, Kim MJ, Lim H-J, Rha Y-A, Kang H-G. *Spirulina* extract enhanced a protective effect in type 1 diabetes by anti-apoptosis and anti-ROS production. *Nutrients*. 2017;9(12):1363.
6. Kuhad A, Tirkey N, Pilkhwai S, Chopra K. Renoprotective effect of *Spirulina fusiformis* on cisplatin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Renal failure*. 2006;28(3):247-54.
7. Akyıldız N. Kulak hastalıkları ve mikrocerrahisi. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara. 1998:275-330.
8. Brenda L., Lansbury M., Martin GK., AE. L. İşitme ve vestibüler sistemlerin fizyolojisi. *Otolaringoloji Bas Boyun cerrahisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 879-929. p.
9. Belgin E. Periferik İşitme Sisteminin Anatomi ve Fizyolojisi. *Temel Odyoloji* (Belgin E, ed). Ankara, Güneş Kitapevi. 27-38,2015.

10. Goodwin J, Acoustic and electroacoustics, In: Kerr, A.G., Grooves, J. Editors. Scott-Brown's Otolaryngology. 5th edition, Vol 1. Basic Sciences, London, 1-67, 1987.
11. Stöver T, Diensthuber M. Molecular biology of hearing. GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery. 2011;10.
12. Mills JH, Adkins WY. Anatomy and Physiology of Hearing Ed: Bailey BJ, Head&Neck Surgery–Otolaryngology. Lippincott Company, Philadelphia, 1. Edition, Vol. 2: 1441-1461, 1993.
13. Lonsbury-Martin BL, Martin GK; Coats AC. Physiology of the Auditory and Vestibular Systems. In Ballenger JJ. Diseases of the Nose, Throat, Ear, Head&Neck. Lea &Febiger, 948-1005. 1991.
14. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. Nature. 2004;428(6982):493-520.
15. Li P, Gao K, Ding D, Salvi R. Characteristic anatomical structures of rat temporal bone. Journal of otology. 2015;10(3):118-24.
16. Albuquerque AAS, Rossato M, De Oliveira JAA, Hyppolito MA. Understanding the anatomy of ears from guinea pigs and rats and its use in basic otologic research. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 2009;75(1):43-9.
17. Albiin N, Stenfors L-E, Hellström S, Cerne A. Middle ear mucosa in rats and humans. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. 1986;95(5_suppl):2-15.
18. Heffner HE, Heffner RS. Hearing ranges of laboratory animals. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2007;46(1):20-2.
19. Eroğlu O, Karlıdağ T, Kuloğlu T, Keleş E, Kaygusuz İ, Yalçın Ş. The Protective Effect of Cortixin on Cisplatin-Induced Ototoxicity. The Journal of International Advanced Otology. 2018;14(1):27.

20. Arslan E, Orzan E, Santarelli R. Global problem of drug-induced hearing loss. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;884(1):1-14.
21. Cianfrone G, Pentangelo D, Cianfrone F, Mazzei F, Turchetta R, Orlando M, et al. Pharmacological drugs inducing ototoxicity, vestibular symptoms and tinnitus: a reasoned and updated guide. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(6):601-36.
22. Ganesan P, Schmiedge J, Manchaiah V, Swapna S, Dhandayutham S, Kothandaraman PP. Ototoxicity: a challenge in diagnosis and treatment. *Journal of Audiology & Otology*. 2018;22(2):59.
23. Konrad-Martin D, Gordon JS, Reavis KM, Wilmington DJ, Helt WJ, Fausti SA. Audiological monitoring of patients receiving ototoxic drugs. *Perspectives on hearing and hearing disorders: research and diagnostics*. 2005;9(1):17-22.
24. Şerbetçioğlu, B, Dizdar, H. Otoakustik emisyonlar. (Belgin E, ed). *Temel Odyoloji* (113-122). Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri, 2015.
25. Plinkert P, Bootz F, Vossieck T. Influence of static middle ear pressure on transiently evoked otoacoustic emissions and distortion products. *European archives of oto-rhino-laryngology*. 1994;251(2):95-9.
26. Uzun C, Yağız R, Adalı MK, Koten M, Tafl A, Küçü- kusurluoğlu ve ark. Streptomisin ototoksitesinin monitörizasyonunda transient evoked otoakustik emisyon (TEOAE). *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2000;17:155-60.
27. Parham K, Sun X-M, Kim DO. Noninvasive assessment of auditory function in mice: auditory brainstem response and distortion product otoacoustic emissions. *Handbook of mouse auditory research: CRC Press*; 2001. p. 51-72.
28. Overbeck GW, Church MW. Effects of tone burst frequency and intensity on the auditory brainstem response (ABR) from albino and pigmented rats. *Hearing research*. 1992;59(2):129-37.
29. Deshpande S, Houston L, Keith R. Hearing testing, auditory brainstem response (ABR). *Encyclopedia of otolaryngology, head and neck surgery*. 2013:1151-8.

30. Rybak LP, Whitworth C, Somani S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *The Laryngoscope*. 1999;109(11):1740-4.
31. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2009;219(3):177-86.
32. Somani S. Amelioration of Cisplatin induced oto-and nephrotoxicity by protective agents. *Ann Neurosci*. 2001;8:101-13.
33. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Bada S, Hess A, Michel O, et al. Nuclear-factor kappa B (NF-kappa B)-inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. *Anticancer research*. 2002;22(6C):4081-5.
34. Sheth S, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and otoprotection. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017;11:338.
35. Mukherjea D, Rybak LP, Sheehan KE, Kaur T, Ramkumar V, Jajoo S, et al. The design and screening of drugs to prevent acquired sensorineural hearing loss. *Expert opinion on drug discovery*. 2011;6(5):491-505.
36. Olgun Y, Kırkım G, Kolatan E, Kıray M, Bağrıyanık A, Olgun A, et al. Friend or foe? Effect of oral resveratrol on cisplatin ototoxicity. *The Laryngoscope*. 2014;124(3):760-6.
37. Gunes D, Kırkım G, Kolatan E, Guneri EA, Ozogul C, Altun Z, et al. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy*. 2011;57(3):186-94.
38. Knight KRG, Kraemer DF, Neuwelt EA. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(34):8588-96.

39. van Ruijven MW, de Groot JC, Smoorenburg GF. Time sequence of degeneration pattern in the guinea pig cochlea during cisplatin administration.: A quantitative histological study. *Hearing research*. 2004;197(1-2):44-54.
40. Cardinaal RM, de Groot JC, Huizing EH, Veldman JE, Smoorenburg GF. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hearing research*. 2000;144(1-2):135-46.
41. Üstün Bezgin S, Uygur KK, Gökdoğan Ç, Elmas Ç, Göktaş G. The Effects of Riluzole on Cisplatin-induced Ototoxicity. *International archives of otorhinolaryngology*. 2019;23(3):e267-e75.
42. Oh SH, Yu WS, Song B-H, Lim D, Koo J-W, Chang SO, et al. Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplatin-induced acute ototoxicity. *Acta oto-laryngologica*. 2000;120(2):146-50.
43. Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacology & toxicology*. 1995;76(6):386-94.
44. Light JP, Silverstein H. Transtympanic perfusion: indications and limitations. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*. 2004;12(5):378-83.
45. Riga MG, Chelis L, Kakolyris S, Papadopoulos S, Stathakidou S, Chamalidou E, et al. Transtympanic injections of N-acetylcysteine for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity: a feasible method with promising efficacy. *American journal of clinical oncology*. 2013;36(1):1-6.
46. Doolittle ND, Muldoon LL, Brummett RE, Tyson RM, Lacy C, Bubalo JS, et al. Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clinical cancer research*. 2001;7(3):493-500.
47. Gurney JG, Bass JK, Onar-Thomas A, Huang J, Chintagumpala M, Bouffet E, et al. Evaluation of amifostine for protection against cisplatin-induced serious hearing loss in children treated for average-risk or high-risk medulloblastoma. *Neuro-oncology*. 2014;16(6):848-55.

48. Marshak T, Steiner M, Kaminer M, Levy L, Shupak A. Prevention of cisplatin-induced hearing loss by intratympanic dexamethasone: a randomized controlled study. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*. 2014;150(6):983-90.
49. Otto WC, Brown RD, Gage-White L, Kupetz S, Anniko M, Penny JE, et al. Effects of cisplatin and thiosulfate upon auditory brainstem responses of guinea pigs. *Hear Res*. 1988;35(1):79-85.
50. Wimmer C, Mees K, Stumpf P, Welsch U, Reichel O, Suckfüll M. Round window application of D-methionine, sodium thiosulfate, brain-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2 in cisplatin-induced ototoxicity. *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*. 2004;25(1):33-40.
51. Campbell KC, Rybak LP, Meech RP, Hughes L. D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. *Hear Res*. 1996;102(1-2):90-8.
52. Korver KD, Rybak LP, Whitworth C, Campbell KM. Round window application of D-methionine provides complete cisplatin otoprotection. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. 2002;126(6):683-9.
53. Choe W-T, Chinosornvatana N, Chang KW. Prevention of cisplatin ototoxicity using transtympanic N-acetylcysteine and lactate. *Otology & Neurotology*. 2004;25(6):910-5.
54. Li G, Sha S-H, Zotova E, Arezzo J, Van De Water T, Schacht J. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Laboratory investigation*. 2002;82(5):585-96.
55. Yurtsever KN, Baklaci D, Guler I, Kuzucu I, Kum RO, Ozhamam EU, et al. The Protective Effect of Platelet Rich Plasma Against Cisplatin-Induced Ototoxicity. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2020;31(5):e506-e9.

56. Lee CH, Lee D-h, Lee SM. Otoprotective Effects of Zingerone on Cisplatin-Induced Ototoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):3503.
57. Fernandez K, Spielbauer KK, Rusheen A, Wang L, Baker TG, Eyles S, et al. Lovastatin protects against cisplatin-induced hearing loss in mice. *Hearing Research*. 2020;389:107905.
58. Naples JG, Ruckenstein MJ, Singh J, Cox BC, Li D. Intratympanic Diltiazem-Chitosan Hydrogel as an Otoprotectant Against Cisplatin-Induced Ototoxicity in a Mouse Model. *Otology & Neurotology*. 2020;41(1):115-22.
59. Kınal ME, Tatlıpınar A, Uzun S, Keskin S, Tekdemir E, Özbeyli D, et al. Investigation of astaxanthin effect on cisplatin ototoxicity in rats by using otoacoustic emission, total antioxidant capacity, and histopathological methods. *Ear, nose & throat journal*. 2019;0145561319866826.
60. Tanyeli TT, Karadaş H, Akyıldız İ, Gökdoğan O, Sönmez Ç, Cavuş ME, et al. Effect of Folic Acid on Cisplatin-Induced Ototoxicity: A Functional and Morphological Study. *The Journal of International Advanced Otology*. 2019;15(2):237.
61. Gündoğdu R, Erkan M, Aydın M, Sönmez MF, Vural A, Kökoğlu K, et al. Assessment of the effectiveness of quercetin on cisplatin-induced ototoxicity in rats. *The journal of international advanced otology*. 2019;15(2):229.
62. Sheth S, Sheehan K, Dhukhwa A, Al Aameri RF, Mamillapalli C, Mukherjea D, et al. Oral Administration of Caffeine Exacerbates Cisplatin-Induced Hearing Loss. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-13.
63. De Araujo JG, SERRA LSM, Lauand L, KÜCKELHAUS SAS, SAMPAIO ALL. Protective Effect of Melatonin on Cisplatin-induced Ototoxicity in Rats. *Anticancer research*. 2019;39(5):2453-8.
64. Alan MA, Eryılmaz MA, Kaymaz F, Suzer A, Arıcıgil M. Isotretinoin's action against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Pak J Pharm Sci*. 2018;31(6):2579-84.

65. Somdaş MA, Güntürk İ, Balcıoğlu E, Avcı D, Özdamar S. Protective effect of N-acetylcysteine against cisplatin ototoxicity in rats: a study with hearing tests and scanning electron microscopy. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2020;86(1):30-7.
66. Kim K-H, Lee B, Kim Y-R, Kim M-A, Ryu N, Kim U-K, et al. Evaluating protective and therapeutic effects of alpha-lipoic acid on cisplatin-induced ototoxicity. *Cell death & disease*. 2018;9(8):1-13.
67. Kilic K, Sakat MS, Akdemir FNE, Yildirim S, Saglam YS, Askin S. Protective effect of gallic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2019;85(3):267-74.
68. Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S, Miyamoto E. Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2002;48(5):325-31.
69. Blinkova LP, Gorobets OB, Baturo AP. [Biological activity of Spirulina]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2001(2):114-8.
70. Khan Z, Bhadouria P, Bisen P. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2005;6(5):373-9.
71. Miranda M, Cintra R, Barros SdM, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and biological research*. 1998;31(8):1075-9.
72. Bhat VB, Madyastha K. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(2):262-6.
73. Mittal A, Suresh Kumar P, Banerjee S, Rao A, Kumar A. Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolizing enzymes in Swiss albino mice. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 1999;13(2):111-4.

74. Mohan IK, Khan M, Shobha JC, Naidu MUR, Prayag A, Kuppusamy P, et al. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2006;58(6):802.
75. Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Naidu MUR, Sundaram C, Singh S, et al. Protective effect of Spirulina against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2005;19(12):1030-7.
76. Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Rao Naidu MU, Prayag A, Kutala VK. Spirulina attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*. 2006;26(5):444-51.
77. Dawson P, Blomley M. Gadolinium chelate MR contrast agents. Elsevier; 1994.
78. Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression (Third)*. Thousand Oaks CA: Sage. Retrieved from <https://socialsciences.mcmaster.ca...>; 2019.
79. Bayindir T, Iraz M, Kelles M, Kaya S, Tan M, Filiz A, et al. The effect of beta glucan on cisplatin ototoxicity. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*. 2014;66(2):131-4.
80. Yumusakhuylyu AC, Yazici M, Sari M, Binnetoglu A, Kosemihal E, Akdas F, et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2012;76(3):404-8.
81. Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *The Laryngoscope*. 2004;114(3):538-42.
82. Kizilay A, Kalcioglu M, Ozerol E, Iraz M, Gulec M, Akyol O, et al. Caffeic acid phenethyl ester ameliorated ototoxicity induced by cisplatin in rats. *Journal of chemotherapy*. 2004;16(4):381-7.

83. Dasli S, Topdag M, Mutlu A, Kara A, Ozturk M. Prophylactic etanercept treatment in cisplatin ototoxicity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2017;274(10):3577-83.
84. Arnold DJ, Lonsbury-Martin BL, Martin GK. High-frequency hearing influences lower-frequency distortion-product otoacoustic emissions. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 1999;125(2):215-22.
85. Chen T-J, Chen S-S. Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion method in rats. *Experimental brain research*. 1991;85(3):537-42.
86. Gozeler MS, Akdemir FNE, Yildirim S, Sahin A, Eser G, Askin S. Levosimendan ameliorates cisplatin-induced ototoxicity: Rat model. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2019;122:70-5.
87. Esen E, Özdoğan F, Gürgen SG, Özel HE, Başer S, Genç S, et al. Ginkgo biloba and lycopene are effective on cisplatin induced ototoxicity? *The journal of international advanced otology*. 2018;14(1):22.
88. Fernández-Rojas B, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Pedraza-Chaverri J. C-phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food & function*. 2014;5(3):480-90.
89. Youn CK, Kim J, Jo E-R, Oh J, Do NY, Cho SI. Protective effect of tempol against cisplatin-induced ototoxicity. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(11):1931.
90. Lee HY, Ryu GH, Choi WY, Yang WS, Lee HW, Ma CJ. Protective effect of water extracted spirulina maxima on glutamate-induced neuronal cell death in mouse hippocampal HT22 cell. *Pharmacognosy magazine*. 2018;14(54):242.
91. Campbell KC, Rybak LP, Meech RP, Hughes L. D-methionine provides excellent protection from cisplatin ototoxicity in the rat. *Hearing research*. 1996;102(1-2):90-8.

92. Peter SJ, Basha SK, Giridharan R, Lavinya BU, Sabina EP. Suppressive effect of *Spirulina fusiformis* on diclofenac-induced hepato-renal injury and gastrointestinal ulcer in Wistar albino rats: A biochemical and histological approach. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;88:11-8.
93. Khafaga AF, El-Sayed YS. *Spirulina* ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. *Life sciences*. 2018;196:9-17.
94. Boushra AF, Elsayed AM, Ibrahim NA, Abdelwahed MK, Ahmed EI. A comparative study on the possible protective effect of esomeprazole, spirulina, wheatgrass on indomethacin-induced gastric ulcer in male albino rats. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(5):4843-60.
95. Nasri H. C-Phycocyanin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Renal failure*. 2013;35(7):1054-5.
96. Kim Y-R, Do J-M, Kim KH, Stoica AR, Jo S-W, Kim U-K, et al. C-phycocyanin from *Limnothrix* species KNUA002 alleviates cisplatin-induced ototoxicity by blocking the mitochondrial apoptotic pathway in auditory cells. *Marine drugs*. 2019;17(4):235.
97. Paksoy M, Aydurhan E, Şanlı A, Eken M, Aydın S, Oktay ZA. The protective effects of intratympanic dexamethasone and vitamin E on cisplatin-induced ototoxicity are demonstrated in rats. *Medical Oncology*. 2011;28(2):615-21.
98. Culhaoglu, B., Erbek, S. S., Erbek, S., & Hizal, E. (2017). Protective effect of *Nigella sativa* oil on acoustic trauma induced hearing loss in rats. *Audiology research*, 7(2)
99. Kesici GG, Öcal FCA, Gürgen SG, et al. The protective effect of metformin against the noise-induced hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018;275(12):2957-2966. doi:10.1007/s00405-018-5161-7

100. Akin Ocal FC, Kesici GG, Gorgen SG, Ocal R, Erbek S. The effect of intratympanic oxytocin treatment on rats exposed to acoustic trauma. *J Laryngol Otol.* 2019;133(6): 466-476.doi:10.1017/S0022215119001014
101. Aksoy F, Dogan R, Yenigun A, Veyseller B, Ozturan O, Ozturk B. Thymoquinone treatment for inner-ear acoustic trauma in rats. *J Laryngol Otol.* 2015;129(1):38-45. doi:10.1017/S0022215114002680
102. Soyalıç H, Gevrek F, Karaman S. Curcumin protects against acoustic trauma in the rat cochlea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.*2017;99:100-106.doi:10.1016/j.ijporl.2017.05 .029

