

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı

TOPIKAL OLARAK KULLANILAN ANTİFUNGAL İLAÇLARIN
OTOTOKSİK YAN ETKİLERİNİN
HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Gülay GÜÇLÜ ASLAN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Asım ASLAN

Manisa, 2005

ÖNSÖZ

03.03.2000 tarihinde başladığım asistanlık eğitimimi tamamlamak üzere olduğum şu son dönemde herkesden önce teşekkürü borç bildiğim; tüm eğitimim sürecindeki teorik öğrenimimde, cerrahiye adım attığım her aşamada, tez çalışmalarımın tamamında bana her zaman destek olan, güven veren, bilimsel birikiminden etkilendiğim özellikle de otoloji konusundaki tecrübelerinden her zaman yararlandığım, asistanlık eğitimine gösterdiği ilgiyi daima sabır ve şefkatle yapabilmeyi başaran, hastalarına karşı yaklaşımına hayranlık duyduğum sayın hocam ve sevgili eşim Doç. Dr. Asım Aslan'a kalbimdeki tüm minnet ve sevgiyle teşekkür ederim.

Olağanüstü sabır ve hoşgörü gördüğüm, asistanı olduğum için her zaman kendimi şanslı hissettiğim, deneyim ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. H. Halis Ünlü'ye, Prof. Dr. Onur Çelik'e, Doç. Dr. AliVefa Yücetürk'e ve Doç. Dr. Cemil Mutlu'ya teşekkürü borç bilirim.

Asistanlık sürecimde her zaman yakınlıklarını hissettiğim, beraber çalışmaktan mutlu olduğum, uzman olup ayrılan ve halen çalışmakta olan sevgili asistan arkadaşlarım Op. Dr. Denizhan Özkaya, Op. Dr. Murat Eğrilmez, Op. Dr. Görkem Eskiizmir, Op. Dr. Dilaver Zencirci, Op. Dr. Kıvanç Günhan, Dr. Haşim Aydın, Dr. Ayça Aykut, Dr. Murat Songu, Dr. Belgin Şenol ve Dr. Tuba Yeniel'e, sevgili hemşire arkadaşlarıma, odyometrist, sekreter ve tüm klinik çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca tez çalışmalarım esnasında hayvan çalışmalarının zorluklarını benimle paylaşan ve unutulmaz desteklerini gördüğüm Op. Dr. Kıvanç Günhan, Dr. Haşim Aydın, Dr. Murat Songu ve histolojik çalışmaları titizlikle yürüten Doç. Dr. Seda Vatansever'e teşekkür ederim.

Son olarak, her şeyden değerli olan canım ailemi çok seviyorum ve onlara minnetlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	2
	1. Otomikozis	2
	i. Predispozan faktörler	3
	ii. Patojenler	4
	iii. Klinik bulgular	4
	iv. Tanı	5
	v. Tedavi	6
	2. Ototoksisite	9
	i. Klinik bulgular	12
	ii. Ototoksik sinerjizm	13
	iii. Histopatolojik bulgular	14
	iv. Odyolojik ve vestibüler monitörizasyon	18
	3. Apoptozis	19
	i. Apoptozis mekanizmaları	21
	ii. Apoptozis regülasyonu	22
	iii. Apoptozis ve ototoksisite	24
III.	GEREÇ ve YÖNTEM	25
IV.	BULGULAR	27
V.	TARTIŞMA	41
VI.	SONUÇ VE ÖNERİLER	47
VII.	ÖZET	48
VIII.	İNGİLİZCE ÖZET	49
IX.	KAYNAKLAR	50

I. GİRİŞ

Otomikozis KBB pratiğinde sık karşılaşılan hastalıklardan biridir (1-5). Otomikozis tedavisinde temel hedefler; semptomların düzeltilmesi, hastalığın eliminasyonu ve rekürrensin önlenmesidir. Bu hedefleri sağlayabilmek için de dış kulak kanalının (DKK) sık temizlenmesi ve kuru bir ortam elde edilmesi gerektiği savunulmaktadır. Bu amaçla klasik olarak borik asit, asetik asit vb kimyasal solüsyonlarının topikal olarak kullanımı önerilmektedir. Ancak son yıllarda klasik tedavi yöntemleri ile elde edilen sonuçların daha da iyileştirilmesine yardımcı olmak için DKK'na topikal olarak antifungal ajanların kullanımı da önerilmektedir (1-13). Timpan membranın intakt olduğu vakalarda bu herhangi bir problem teşkil etmemektedir. Ancak topikal ilaç kullanımı orta kulak boşluğunun direkt olarak dış kulak kanalı ile ilişkisinin olduğu bazı durumlarda riskli olabilir. Bunlar;

- 1) ventilasyon tüpü (VT) olan hastalar,
- 2) timpan membran perforasyonu olan hastalar,
- 3) açık mastoid kavitesi olan hastalardır.

Bu hastalarda da otomikozis gelişme sıklığı azımsanmayacak oranlardadır. Böyle hastalarda DKK'na topikal olarak uygulanan antifungal ilaçlar orta kulakta yuvarlak pencere membranından diffüzyonla kohleaya geçebilirler (14, 15). Ancak bu ilaçların kohleaya geçtikten sonra herhangi bir hasara yol açıp açmadıklarına yani ototoksik özelliklerinin olup olmadıklarına dair literatürde fazla bir veri yoktur (4, 6).

Bu çalışmanın amacı; kobaylarda (guinea pig) topikal antifungal ajanların kohleada ototoksik hasara yol açıp açmadıklarının saptanması ve eğer ototoksikite var ise bunun apoptozis mekanizması ile olup olmadığının araştırılmasıdır.

II. GENEL BİLGİLER

1. OTOMİKOZİS

Otomikozis klasik olarak dış kulak kanalı ve aurikulanın fungal enfeksiyonları olarak bilinmektedir. DKK' nın fungal enfeksiyonlarını ilk kez 1843' de Andral ve Gavarret ile 1844' de Mayer tanımlamışlardır. Ancak otomikoz terimini öneren Virchow'dur (4). Son zamanlarda klasik otomikozis tanımının orta kulak ve açık mastoid kavitelerin fungal enfeksiyonlarını da içerecek şekilde genişletilmesi gerektiği de önerilmektedir (3).

Otomikozis bazı nedenlerden ötürü sıklıkla bir kulak burun boğaz uzmanı için merak konusu olmuştur. Birincisi, otomikozis eğer klasik formunda seyretmiyorsa yanlış tanı konulabilir. Bundan başka otomikozis sıklıkla pek çok DKK enfeksiyonu için kullanılan tedavilere dirençlidir. Hayatı tehdit eden bir hastalık olmamasına rağmen uzun süreli tedavi gerektirmesi ve rekürrense eğilimi nedeniyle hem hasta hem de hekim için can sıkıcı bir hastalıktır. Ayrıca DKK hastalığının izole olup olmaması, başka bir sistemik hastalıkla ilişkili olup olmaması veya altta yatan immün yetmezlik hastalığıyla ilişkili olup olmamasının saptanması açısından klinisyene zorluk yaratmaktadır (2).

Fungusların primer bir enfeksiyöz ajan mı yoksa DKK' nın bakteriyel toksinlerle teması sonrasında deriyi tutan sekonder patojen mi oldukları konusu uzun süreden beri tartışılmaktadır. Günümüzde fungusların primer patojen olabileceğini destekleyen bulgular giderek artmaktadır (2). 12.000' den fazla eksternal otitli kulağın incelendiği bir çalışmada etken olarak fungusların oranı % 9 olarak bulunmuştur (1). Ancak funguslar DKK' da saprofit olarak da bulunabilirler. Topikal veya sistemik antibiyotikler ile tedavi edilen veya edilmeyen bakteriyel enfeksiyon varlığı DKK' nın fizikokimyasal ortamını değiştirerek fungusların çoğalmasını kolaylaştırır (16).

Predispozan faktörler:

Otomikozisin rekürrensini önlemek için predispozan faktörlerin bilinmesi çok önemlidir. Bu faktörler değişik iklim koşulları ve sosyal alışkanlıklar nedeniyle bölgeden bölgeye farklılık gösterebilirler. Ancak her şeyden önce funguslar zaten havadan ve ev tozlarından kolayca kültür edilebilmeleri nedeniyle otomikozis insidansı yüksektir (2). Bununla birlikte tüm fungusların çoğalmaları için üç temel faktöre gereksinim vardır: Nem, ısı ve karanlık (17). Bu açıdan DKK fungusların çoğalması için ideal bir çevre oluşturmaktadır. Ferguson ve ark. DKK'daki serümenin invitro olarak fungusların büyümesini kolaylaştırabildiğini göstermişlerdir (2). Fungal enfeksiyonlar sıcak ve nemli iklimlerde (tropikal ve subtropikal bölgelerde) daha sık meydana gelir. Diğer bölgelerde ise hastaların pek çoğu sıcak ve nemli havanın olduğu yaz ve sonbahar aylarında başvururlar (5). Beaney ve Broughton tropikal ülkelerde otomikozisin daha yüksek oranda görülmesini terleme ile serümenin kompozisyonunda meydana gelen değişikliklere bağlamışlardır (2).

Otomikozis genel olarak kadınlarda daha sık (%80.5) görülür (5). Geleneksel baş örtüsü giyilmesi de DKK'daki nemliliği arttırabileceği için bir risk faktörü olarak bildirilmektedir (3, 5). Paulose ve ark. otomikozisin en sık 20-30 yaşları arasında görüldüğünü bildirmelerine karşın Özcan ve ark. Türkiye'de 31 ile 60 yaş arasında görüldüğünü tespit etmişlerdir (3, 5).

Düzenli olarak yüzmenin otomikozis için muhtemel bir predispozan faktör olduğu bildirilmiştir (3). Oliveri ve ark. ise tuzlu veya tatlı su ile banyo yapmanın belirgin bir risk faktörü olmadığını bulmuşlardır (2). Fakat DKK'nın karıştırılmasının hastalığın gelişmesi açısından en önemli risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Perfore timpanik membranı olan hastalarda otomikozis gelişme prevalansı % 3.4 – 20 arasında bildirilmektedir (3, 5). Bundan başka otomikozis açık kavite mastoidektomi yapılan hastalarda ve tıkaçıcı kulak kalıbı olan işitme cihazlarını kullananlarda da sıktır (16).

Vücudun başka bir yerinde dermatomikoz bulunması otomikozisin rekürrensi açısından bir risk faktörü olabilir, çünkü vücudun değişik bölgeleri arasında kulağa otoinokülasyon yapılabilir. Özcan ve ark. başlangıç tedavisine dirençli olan otomikoz hastalarının % 50' sinde dermatomikoz varlığı tespit etmişlerdir (5).

Beraberinde bir bakteriyel enfeksiyonun olması da otomikozis tedavisine direncin bir göstergesi olabilir. Özcan ve ark. başlangıç tedavisine dirençli otomikoz hastalarının % 80' inin mikst bir bakteriyel ve fungal enfeksiyonu olduklarını bildirmektedirler (5).

Her ne kadar topikal antibiyotik ve steroid damlaları kullanımının otomikozis gelişimine predizpozan olduğu sıklıkla söylene de klinik çalışmalar bunu desteklememektedir. Topikal preparatların yaygın olarak kullanılmaya başlandığı son 20 yılda otomikozis insidansında belirgin bir artış saptanamamıştır (2).

Patojenler:

Otomikozisin klinik hastalık sürecinde sorumlu olarak suçlanan pek çok fungal ajan mevcuttur. Bugüne kadar değişik çalışmalarda 61 farklı suş izole edilmiştir (2). Fakat en sık rastlanan patojen ajanlar *Candida* ve *Aspergillus*' tur.

Patojenler ılıman iklimden tropikal iklime geçtikçe değişiklik gösterebilirler (2). Fakat *Candida* ve *Aspergillus* suşları her iki iklimde de sık görülür. *Penicillium* da bütün dünyada önemli oranda izole edilebilmektedir. Londra ve İsveç' de yapılan çalışmalar *Candida* suşlarına hafif eğilim göstermiştir. Sicilya, Nijerya, Mısır ve Burma gibi subtropikal ve tropikal ülkelerde ise *Aspergillus niger* en sık izole edilen fungal ajan iken *Candida* sadece vakaların % 1-16' sı arasında görülmüştür. Önemli oranda izole edilen diğer funguslar ise *Penicillium* (Mısır'da %17) ve *Candida Parapsilosis*' dir.

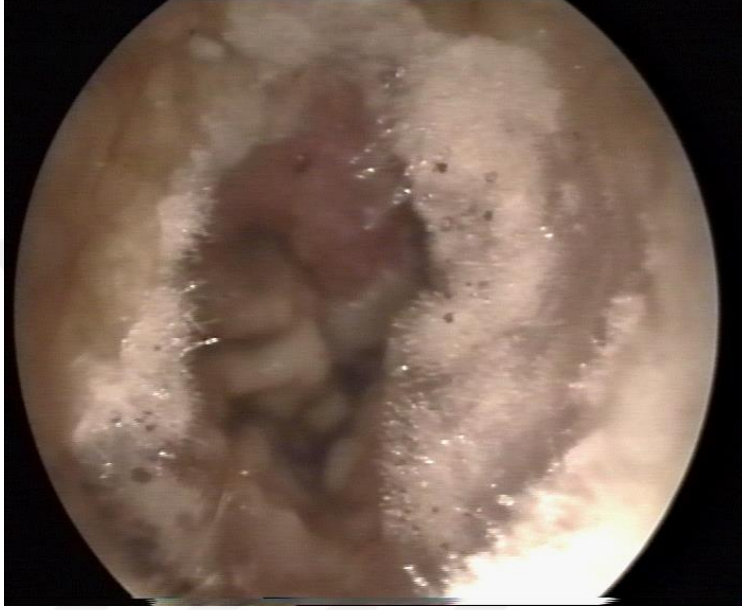
Klinik Bulgular:

Otomikozis semptomları hastadan hastaya değişiklik gösterebilir. Hastaların sıklıkla başvuru semptomları: kaşıntı, kulakta bir şey var hissi, kulak ağrısı, akıntı, işitme kaybı ve çınlamadır. Otomikozisteki en sık görülen şikayet kulak kanalının derinindeki kaşıntı hissidir. Hastalar sıklıkla kulak kanalını dayanılmaz bir şekilde parmak veya bir alet yardımıyla kaşımak isterler. Böyle bir travmanın hastalığın gelişim ve ilerlemesine katkısı olmayabilir. Ancak fungusların subepidermal invazyonunu kolaylaştırabilir. Kaşıntı sıklıkla akıntıyla birlikte olabilen derinde yerleşimli künt bir ağrıya

dönüşebilir. İnflame ve daralmış kanaldaki fungal debrislerin birikimi sıklıkla iletim tipi işitme kaybına neden olur.

Tanı:

Otomikozisli bir hastanın fizik muayenesi sıklıkla DKK' da eritem ve kanal içinde beyaz, gri veya siyah fungal debris varlığını gösterir (Şekil 1).



ŞEKİL 1. DKK'da otomikozise (Candida Albicans) ait beyaz hifler izlenmekte.

Otomikozisin erken evrelerinde debris minimal ve tespiti güç olabilir. Daha uzun süreli vakalarda debris DKK' nı tamamen tıkayabilir. Bu durumda kulağında yabancı cisim olarak pamuk aplikatörünün ucunun kaldığı

hastalarda görülen pamuksu kitle görünümü izlenir. Karakteristik membran oluşumuna neden olan hif çoğalması *miçel* olarak adlandırılır. Bunun görünümü aynı zamanda '*ıslak gazete kağıdı*' veya '*kurutma kağıdı*' olarak da adlandırılabilir. Beraberinde serumenin de bulunması debrise sıklıkla sarı kahverengi bir görünüm verir. Kulak karıştırmalarının sebep olabileceği travma kanamaya neden olup debrisin koyu kırmızı veya koyu lacivert görülmesine de sebep olabilir. Bu nedenle etkili ve güvenli temizleme tekniklerinin kullanımı hem tanı hem de tedavi için önemlidir. İyi bir temizliğin sonucu olarak epitelin en yüzeyel tabakası kaldırılabilmesi için sıklıkla kanamalı, kırmızı membrana (çıplak subepitelyal yüzey) kadar temizliğin yapılması söylenmektedir. Temizlik kanalın tamamen kurutulması ile devam eder çünkü nem kalması fungus çoğalmasını provoke eder.

Eğer otomikozisin tanısında şüphe varsa temizleme sırasında çıkarılan materyalin bir kısmı mikroskopik inceleme için ve bazen de kültür için ayrılmalıdır. Mikroskopik inceleme sıklıkla otoskopide her zaman görülemeyen tomurcuklanan mantarlar veya dallanan filamentleri gösterir. Nemli potasyum hidroksit preparatı fungal elemanların gösterilmesinde sıklıkla yardımcıdır, fakat daha az sıklıkla görülen suşların bazılarını saptayamaz. Ciddi veya şaşırtıcı bazı vakalarda spesmen fungal kültür için mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilir.

Tedavi:

Otomikozis tedavisi son yıllarda dikkate değer değişikliğe uğramıştır. Her ne kadar genellikle dikkatli ve tam bir temizliğin tedavinin köşe taşı olduğu ve topikal ilaçların rolü olduğu kabul edilse de optimal topikal ilaç seçimi üzerinde bir görüş birliği yoktur. Yirminci yüzyılın ilk 75 yılında otomikozise klinik yaklaşımda çok az bir ilerleme saptanmıştı. Sonraları Lawrence ve ark. ve Maher ve ark. klinik hasta bakımında en etkili ajanı bulabilmek için değişik funguslara karşı çeşitli ilaçların invitro testini kullanmaya başladılar (11, 12). Stern ve ark. otomikozisli hastalardan elde edilen patojenlere karşı 13 ajanın invitro etkinliğini araştırmışlardır (9). Buna göre nadir görülen funguslara karşı etkinlik genellikle zayıf bulunmuştu. Klotrimazol ise sıklıkla izole edilen funguslara karşı en büyük inhibisyon alanları meydana getirmişti. Nistatin ise

en geniş aktivite spektrumuna sahip olan preperattı. Merthiolate ise iyi etkinliğe sahip tek antimikrobial olmayan ajandı.

Bu çalışmada kullanılan antifungal ajanlar;

Nistatin ... *Streptomyces noursei* kültüründen izole edilmiştir (18).

Kimyasal bakımdan bir tetraendir ve bir polien makrolid antibiyotiktir. Sitoplazmik membranda sterol sentezini inhibe eder ve membran permeabilitesinde artışa yol açarak hücre ölümüne yol açar. Nistatin çeşitli mantar türlerinin gelişmesini inhibe eder. Buna karşı en fazla duyarlı olan mantarlar Maya mantarlarıdır. Özellikle *Candida albicans* enfeksiyonlarının tedavisinde ve profilaksisinde kullanılır. Deney hayvanlarında Histoplazma, cryptococcus ve coccidioides enfeksiyonlarına karşı etkili bulunmuşsa da bu tür mantar enfeksiyonlarına karşı kullanılmaz. Dermatofitler üzerine etkisizdir. Antibakteriyel etkisi yoktur.

Otomikozis tedavisinde krem, toz, solüsyon veya süspansiyon şeklinde kullanılabilir. Lawrence ve ark. efektif bir antifungal ajan olduğunu bildirmişlerdir (11). Stern ve ark ise mikroorganizmalara karşı en geniş spektruma sahip ajan olarak bulmuşlardır (9). Than ve ark. 1 hafta içinde hastaların %80'ini tedavi eden ikinci en efektif olarak bulmuşlardır (2). Smyth ise mastoid kavileri tutan otomikozisi tedavi etmede çok etkili bulmuştur (4). Gregson ve La Touche ise nistatin tozunun kullanılmasını tavsiye etmişlerdir (4).

Nistatin gastrointestinal kanaldan çok az absorbe edilir. Ağızdan verildiği zaman büyük bir kısmı absorbe ve inaktive edilmeden barsak lümeninde kalır ve feçesle atılır. Nistatin cilt, ağız, özefagus, barsak ve vajinanın candida enfeksiyonlarının tedavisinde lokal olarak kullanılır. Parenteral verildiğinde sistemik (dissemine) candida enfeksiyonlarında kullanılmaz. Nistatine karşı direnç gelişimi bildirilmemiştir. Nistatin nadiren yan tesir yapar. Alerjik reaksiyona neden olmaz. Ancak lokal tahriş yapar.

İmidazol ve triazol grubu ilaçlar ... İmidazol türevi ilaçlar 1978'den itibaren kullanıma girmiştir (18). Geniş spektrumlu *fungistatik* ilaçlardır. Cilt ve mukozaların mantar enfeksiyonları ile kronik mukokütanöz kandidiyazis

tedavisinde diğer ilaçlara göre üstünlük gösterirler. Sistemik kullanılanlar sistemik mantar enfeksiyonlarının çoğunda amfoterisin B'den daha etkin değildirler, fakat ondan çok daha az toksiktirler.

İmidazol türevi antifungal ilaçlardan sonra yapıcı onlara benzeyen N-süstitüe triazol türevi fungistatik ilaçlar geliştirilmiştir. İmidazol ve triazol türevi antifungallere ortak bir adla *azoller* denir. Triazol türevleri imidazol türevleri ile aynı antifungal spektruma ve aynı etki mekanizmasına sahiptir. Ancak triazol türevleri, sistemik verilişte imidazol türevlerine göre üç noktada üstünlük gösterirler. Şöyle ki triazol türevi ilaçlar: 1) daha yavaş metabolize edildikleri için daha uzun etkilidirler ve doz intervalleri daha uzundur, 2) insan hücrelerindeki sterol sentezi üzerinde daha az etkilidirler. Bu nedenle direkt toksik etkileri daha zayıftır, 3) imidazol türevi ilaçların sistemik verilişte yapabildikleri endokrin yan tesirleri göstermezler.

İmidazol ve triazol türevi antifungal ilaçlar mantar hücrelerinin sitoplazma membranındaki ana sterol bileşiği olan ergostreol'ün sentezini 14-metillanosterol'ün desmetildihidrolansterola dönüşümü basamağında inhibe ederler. Bu dönüşümü yapan 14 α -demetilaz enzimi bir mikrozomal sitokrom P450 türüdür. İmidazol ve triazol türevi ilaçlar bu sitokrom P450'yi selektif olarak inhibe ederler. Mantarların sitokrom P450'si imidazol türevlerine memelilerin aynı enzimine kıyasla en az 1000 kez daha duyarlıdır. Bu fark ve selektiflik triazol türevlerinde imidazol türevlerinde olduğundan daha fazla (yaklaşık 10 bin kez) dır. İmidazoller ve triazollere maruz kalan mantar hücrelerinde 14 α -metil steroller birikir ve bunlar membran fosfolipidlerinin asıl zincirlerinin normal düzenini ve membrana bağlı belirli enzimlerin fonksiyonlarını bozarlar; sonuçta mantar hücrelerinin büyümeleri inhibe edilir. Ayrıca hücre permeabilitesi bozulur. Bu grup ilaçların antibakteriyel etkisi yoktur.

Azol antifungal ilaçlardan *klotrimazol*, *izokonazol*, *ekonazol*, *tiokonazol*, *oksikonazol*, *sulkonazol* ve *butokonazol* dermatofitozlara karşı ve sadece lokal kullanılırlar. Bu ilaçlar etkinlik ve yan tesirleri yönünden birbirlerine yakından benzerler. Uygulandıkları cilt bölgelerinden yavaş olarak ve düşük derecede absorbe edilirler. Belirgin bir sistemik etki oluşturmazlar. Gebeliğin ilk üç ayında kullanılmamaları tavsiye edilir. Başlıca yan tesirleri

uygulandıkları yerde bazen eritem, kepeklenme, kaşıntı, iğnelenme, ödem ve ürtiker yapmalarındır.

Tolnaftat ... Toliltiyokarbamat'ın naftil türevi olan sentetik bir maddedir (18). Hiflerin yapısını bozar ve duyarlı fungusların miçelial büyümesini inhibe eder. Dermatofitlere karşı etkilidir. Cilt üzerindeki dermatofitozlara ve pitriazis versikolora karşı %1'lik merhem, solüsyon veya pudra şeklinde kullanılır. Tırnak veya kıl foliküllerini ilgilendiren enfeksiyonlarda etkisizdir. Candidalar ve bakteriler bu ilaca dirençlidirler.

Liston ve Siegel tolnaftatı dirençli otomikoz vakalarında önermektedirler (13). Damato Aspergillus nigere karşı etkili olduğunu ve herhangi bir yan etkisi olmadan iyi tolere edildiğini bildirmektedir (10). Genellikle irritasyona neden olmaz.

2. OTOTOKSİSİTE

Ototoksisite sık kullanılan değişik sayıdaki ilaçlara karşı gelişen bir yan etkidir. Hawkins 1976'da ototoksititeyi şöyle tanımlamıştır (19): Belirli terapötik ajan ve diğer kimyasal maddelerin iç kulak dokularında ve özellikle de 8. kranial sinirin kohlear ve vestibüler parçalarının end organları ve nöronlarındaki hücresel dejenerasyon ve fonksiyonel kayba sebep olma eğilimleridir.

Sistemik kullanılan bazı ajanların ototoksik yan etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Bunlar içinde antibiyotikler (aminoglikozid grubu), loop diüretikleri, kemoterapötik ajanlar (sisplatin), salisilatlar bulunmaktadır. Ancak çeşitli nedenlerle kulağa topikal olarak uygulanan bazı ilaç gruplarının da ototoksiteye neden olabileceği bildirilmiştir (20).

Ototopikal ototoksisite bazı faktörlerle ilişkili olabilir (17):

- 1- **Orta kulağın durumu** ... Orta kulak mukozasının inflamasyonu ototoksik ajanın dağılmasına neden olur ve iç kulağa absorpsiyonu engeller.
- 2- **Timpan membran defektinin boyutu** ... Geniş timpan membran defekti orta kulağa daha büyük oranda ajanın geçişine izin verir.

3- Östaki tüp fonksiyonu ... Östaki tüpünün açılabilirliği de ilacın maruz kalma süresini etkiler.

4- Yuvarlak pencere membranının durumu ... Topikal olarak kullanılan bu ilaçlar orta kulağa ulaşıp yuvarlak pencere ile temas edip buradan diffüzyon yoluyla iç kulağa geçebilmektedirler. Bunun dışındaki muhtemel geçiş alanları (oval pencere nişinin anüler ligamanı, fistüla antefenestra, mikrofissürler ve vasküler kanallar) çok daha az bir öneme sahiptirler (21).

Yuvarlak pencere membranı orta kulak boşluğunu labirentin sıvılardan ayırır. Goycoolea yuvarlak pencere membranı için en az 4 potansiyel fonksiyon belirlemiştir (15):

- 1) Stapes tabanı hareketinin neden olduğu mekanik enerjinin salınımı,
- 2) Ses enerjisinin labirentin sıvılara girişi için alternatif bir geçiş alanı,
- 3) Perilenfin sekresyon ve absorpsiyonu,
- 4) Savunma – antikor ve immünolojik hücrelerin toplanma alanı olarak,

İnsan yuvarlak penceresi oval pencere nişi içindeki bir triangüler reseste yerleşmiştir. Skala timpaniye doğru hafif konvektir ve merkezde kenarlardan daha kalındır. Skala timpaniyi orta kulak boşluğundan ayırır. Vakaların yaklaşık %20'sinde skala timpani orta kulak boşluğundan yalancı bir yuvarlak pencere membranı ile ayrılır. Yalancı membran triangüler fossayı örten mukozal bir örtüdür. Yalancı membranın medial duvarı ile gerçek yuvarlak pencere membranı arasındaki mesafe değişir. İlave olarak %11 vakada, yuvarlak pencere membranını kaplayan yağlı veya fibröz doku tıkaçı da vardır.

Yuvarlak pencere membranı yarı geçirgen, 3 farklı tabakadan oluşur:

1.Dış tabaka orta kulağa bakar ve promontoryum ile devamlılık gösterir. Alçak küboidal skuamöz epitelden oluşmuştur ve yaygın mikrovilluslar ile birlikte sıkı bağlantı kompleksleri ile karakterizedir. Mitokondri, düzgün olmayan endoplazmik retikulum ve Golgi cisimleri az miktarda görülebilir. Dış membran bazal membranın üzerine oturmuştur.

2.Orta tabaka az miktarda sitoplazması olan fibrokistlerden oluşan bir tabakayı içerir. Kollajen ile dolu olan büyük ekstrakapsüler boşluklar vardır. Değişik miktarlarda elastin lifleri bulunabilir. Hem miyelinli hem de miyelinsiz

sinir lifleri yuvarlak pencere membranının orta tabakası içinde izlenebilir ve timpanik pleksustan köken almış gibi görünmektedir. Yuvarlak pencere membranı orta tabakası içinde hem lenf hem de kan damarları bulunur.

3.İç tabaka skala timpaniye bakar. Bu tabaka birbiri üzerine geçiş gösteren hücre görünümü veren ve uzun lateral uzantıları olan skuamöz epiteli içerir. Geniş ekstrakapsüler boşluklar ve gevşek bağlantılar vardır. Bu bağlantılar iç kulağın ekstraselüler boşluklar ile perilenf arasında direkt temasa izin verir gibi görünmektedir.

Permeabilite:

Yuvarlak pencere membranının orta kulak boşluğundaki maddelere permeabilitesi yuvarlak pencere membranının özel bir fonksiyonuymuş gibi görünmemektedir. Fakat Goycoolea'ya göre bu rastlantısal bir niteliklidir. Hayvan çalışmaları yuvarlak pencere membranının permeabilitesinin aşağıdaki faktörlerden etkilendiğini göstermektedir:

1) Potansiyel penetranın yapısı

Molekül büyüklüğü Küçük moleküller daha kolay penetre olurlar. 1000'den küçük moleküler ağırlığı olan moleküller en kolay penetre olurlar.

Moleküler konfigürasyon Molekül biçimi yuvarlak pencere membranına penetrasyon yeteneğini etkiler.

Molekül

Lipofilisite

2) Yuvarlak pencere membranının durumu

Kalınlık Kalın yuvarlak pencere membranları ince olanlara göre penetrasyona daha dirençlidirler.

3) Kolaylaştırıcı ilacın varlığı ... Çeşitli sayıda kolaylaştırıcı tespit edilmiştir.

Bu maddelerin varlığı yuvarlak pencere membranının permeabilitesini arttırmaktadır. Permeabiliteyi arttırdığı gösterilmiş olan maddeler *pantokain*, *histamin*, *prostoglandinler*, *lökotrienler* ve belki de en belirgin olanı *stafilokokal ve streptokokal ekzotoksinleri* içerir.

Penetrasyon 3 farklı mekanizma temelinde meydana gelir:

- Hücreler arası diffüzyon yolu ile ... interepitelyal absorpsiyon sistemi de denir.

- Mikropinositoz yolu ile ... yuvarlak pencere membranının tabakalarında pinositik veziküller ve vakuoller saptanmıştır.
- İç epitelyal hücrelerin uzantıları yolu ile ... transepitelyal absorpsiyon sistemi de denir.

Başka bazı faktörlerin de orta kulakta bulunan toksinlere maruz kalmaktan yuvarlak pencereyi koruduğu gösterilmiştir. Normal insan temporal kemiklerindeki histolojik çalışma sonuçları orta kulaktan yuvarlak pencere nişi yolu ile yuvarlak pencere membranına geçişin spesmenlerin % 70' inde mukoperiosteal katlantılar tarafından sınırlandığını göstermektedir. % 30'unda ise bu katlantılar nişi tamamen tıkamaktadırlar. Bundan başka yuvarlak pencere nişinin derinliği değişkendir ve bazı vakalarda yuvarlak pencere membranı derinde yerleşip ototoksinlerden iyi bir şekilde korunur. Son olarak orta kulak mukozasının kalınlaşması veya yuvarlak pencere yakınlarında mukus yapımında artış potansiyel olarak zararlı ajanlara karşı diğer bir bariyerdir.

5- Kullanılan ajanın konsantrasyonu ve maruz kalma süresi.

Klinik Bulgular:

İlaçlara bağlı ototoksisitenin en fazla görülen semptomları tinnitus, işitme kaybı ve baş dönmesidir. Çoğunlukla tinnitus en sık görülen semptomdur ve ardından oluşabilecek pek çok toksik etkinin erken habercisidir. Tinnitus genellikle yüksek perdeli ve 4 ile 6 kHz arasında değişen frekanstadır. Sıklıkla işitme kaybından önce ortaya çıkar ve onun yerini alır. Tinnitusun tam olarak kaybolması nadirdir. Ancak zamanla nöral elemanların dejenere olması ile tinnitus şiddetinde azalma olabilmektedir. İşitme kaybı ve tinnitus genellikle bilateral ve hemen hemen simetriktir. Bununla birlikte bu semptomlar unilateral olduğunda ototoksisite yoktur denemez.

Vestibüler fonksiyon bozukluğu nadiren kendisini gerçek vertigo olarak gösterir, daha sıklıkla dengesizlik şeklindedir ve hastalar 'dizziness' veya denge kaybından yakınır. Vestibüler semptomlar tam vestibüler kayıp gelişmedikçe, merkezi kompensatuar mekanizmaların bir sonucu olarak zamanla azalma eğilimindedir. Nistagmus olabilir ya da olmayabilir. Ototoksisite sonucu oluşabilen tipik vestibüler fonksiyon bozukluğuna bağlı

olarak hastalar, oryantasyonu sağlamak için görsel ve propriyoseptif bilgiye daha fazla gereksinim duyarlar. Dolayısıyla görsel ve propriyoseptif fonksiyonları bozulmuş daha yaşlı insanlarda klinik vestibüler bulgular daha ciddi olabilmektedir.

Bazı hastalar ototoksisite için daha yüksek risk taşır. Odituar ve vestibüler ototoksitite için potansiyel olarak daha yüksek risk durumları şunlardır;

- Böbrek yetersizliği
- Karaciğer yetersizliği
- Bağışıklık yetersizliği
- İleri yaş
- Ototoksisite öyküsü olması
- Bilinen ototoksik ajanların aynı zamanda kullanılması
- Gürültüye maruz kalma
- Önceden sensörinöral tip işitme kaybı olması
- Kollajen-vasküler hastalıklar

Ototoksik sinerjizm:

İlaçlar: Aynı anda birkaç ototoksik ilaç birden uygulanırsa ototoksisitenin ortaya çıkması daha muhtemeldir (16). Hatta her bir ilaç tavsiye edilen doz limitleri içerisinde kullanılsa bile bu durum geçerlidir. Bunun klasik örneği aminoglikozid ve loop diüretik etkileşimidir. Aminoglikozid verilmesini takiben loop diüretiği verildiğinde korti organında gözlenen hasar tek başına aminoglikozid kullanıldığında meydana gelenle aynıdır fakat daha düşük toplam dozda ve genellikle de çok daha hızlı meydana gelir. Ototoksik etkileşim loop inhibisyonu yapan diüretiklere spesifikmiş gibi görünmektedir, aminoglikozidlere spesifik değildir. Etakrinik asitin viomisin, kapreomisin ve polimiksin B ile etkileşimi aminoglikozidlerin etakrinik asit eklendiğinde oluşturdukları kohlear tüylü hücre hasarına benzerdir.

Eğer loop diüretiği aminoglikozidten önce verilir ise kohleotoksik etki her iki ilacın tek başına kullanımının oluşturduğundan farklı değildir. Bununla birlikte eğer aminoglikozid önce verilir sonra diüretik verilirse kohleotoksik etki artar. Bu durum aminoglikozidinin iç kulak hücre membranı ile etkileşiminin hücre membranı permeabilitesini arttırmasıyla açıklanabilir. Böylece daha yüksek

konsantrasyonda loop diüretiğinin hücrelere penetre olması kolaylaşarak daha ciddi hasar olmasına neden olur.

Gürültüye maruz kalma ve ototoksisite: Gürültüye maruz kalmanın ilaçların neden olduğu kohleotoksisiteye duyarlılığı arttırdığı bildirilmiştir (16). Bu konuda genellikle kanamisin çalışılmış ve gürültü ve ilacın etkisinin aditif bir etkiden ziyade sinerjistik olduğu ileri sürülmüştür.

Aspirin ile gürültünün etkileşimi hakkındaki çalışmaların sonuçları ise çelişkilidir. Bazı çalışmalarda aspirin ve gürültünün birleşik etkisinin işitme kaybı düşünüldüğü zaman aditif özellikte olduğu bildirilmektedir (22, 23). Carson ve ark. yüksek doz aspirin ve gürültüye maruz kalma birlikte olduğunda güçlendirici bir etkiye sahip olduklarını ileri sürmüştür (24). Her ikisine de maruz kalan hayvanlardaki tüylü hücre kaybı tek başına gürültü veya aspirinin neden olduğundan çok daha fazladır. Buna karşılık Woodfort ve ark. gürültü ve aspirine maruz kalan grupta işitme eşiklerinde anlamlı bir fark bulamamışlardır (25). Bazı çalışmalarda gürültünün neden olduğu iç kulak hasarını takiben kohlear vazokonstruksiyon olduğu belirtilirken bazılarında da yüksek şiddette gürültüye maruz kalındıktan sonra kan akımında çok belirgin artış olduğu ileri sürülmüştür (16). Eğer bu ikinci fikir doğru ise kohlear kan akımındaki artışın daha yüksek oranda salisilatın iç kulağa geçmesine ve sonuç olarak daha büyük işitme kaybına yol açacağı düşünülebilir.

Histopatolojik Bulgular:

Bugüne kadarki çalışmalarda en sık aminoglikozid grubu antibiyotiklerin ototoksisiteleri çalışılmıştır. Yapılan hayvan çalışmalarında aminoglikozidlerin korti organında ve vestibüler makulada bağlandığı bölgeler bulunmuştur. Farklı aminoglikozidlerin tercih ettikleri hücre tipleri arasında farklılıklar vardır. Bu da, neden bazılarının daha çok kohleotoksik (kanamisin, tobramisin, amikasin, neomisin, dihidrostreptomisin), bazılarının da vestibülotoksik (gentamisin, streptomisin) etki gösterdiğini açıklar. Bazal kıvrımdaki ilk sıra dış tüylü hücreler (DTH) apikal iç tüylü hücrelerden (İTH) ve Tip I hücreler Tip II hücrelerden daha önce etkilenir. Tüylü hücre kaybının ilerlemesi bazaldan

apikale ve DTH' den İTH' ye, İTH' den destek hücrelerine ve buradan spiral ganglion hücreleri gibi daha santral yerleşimli nöral yapılara doğrudur. Bu ilerleme nedeniyle kohleotoksik aminoglikozidler klinik olarak ilk önce yüksek frekanslarda işitme kaybına yol açar.

Ancak aminoglikozid ototoksisitesine ait hasarın böyle bir ilerleme göstermeden direkt olarak daha santral yerleşimli yapıları da etkilemesi mümkündür. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, uzun süreli tobramisin tedavisinin ototoksik etkileri temporal kemiklerde histopatolojik olarak incelenmiştir (26). Araştırmacılar *spiral gangliyonlardaki dejenerasyonun* aminoglikozidlere bağlı ototoksisitenin *primer* bulgusu olarak ortaya çıkabileceği düşüncesine varmışlardır. Bu ototoksik bulgudan, tüylü hücreler ve ganglion hücreleriyle etkileşime girerek iç kulağın hasar görmesini engelleyen nörotrofinlerin ve asidik fibroblast büyüme faktörü gibi trofik faktörlerin yetersiz oluşunu sorumlu tutmuşlardır. Klinikte bunun yansıması ise konuşmayı ayırt etme skorunda düşme şeklinde olacaktır.

Vestibüler sistemde krista ampöllaris toksisiteye karşı maküla utrikuliden, makula utrikuli de makula sakkuliden daha duyarlıdır.

Hayvan çalışmalarının kliniğe uyarlanması ... Hayvan toksisite verilerinin hangi oranda insanlardaki klinik tedavi protokollerine gerçekçi olarak uygulanabileceği açık değildir. Kanıta dayalı tıpta hayvan verileri en düşük kanıt kategorisi olan D seviyesinde yer almaktadır. Bununla birlikte kanıta dayalı tıbbın insanlardaki spesifik durumlar için tedavi protokollerinin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla diazyn edildiği unutulmamalıdır. Yan etkilerin riskini veya toksik etkileri değerlendirmek için dizayn edilmemiştir. Hayvan toksikolojisi yeni ilaçların değerlendirilmesinde çok önemli bir pozisyonda olduğunu belirtmek gerekir. Eğer yeni potansiyel bir ilacın hayvan modellerinde toksisitesinin olmadığı gösterilmezse (Faz 1 çalışmalar) sonraki geliştirme çalışmaları genellikle durdurulur. Eğer belirgin bir terapötik üstünlüğü gösterilemezse, hayvanlarda ototoksik potansiyeli olduğu gösterilmiş bir ilacın FDA tarafından insanlarda topikal orta kulağa uygulanmasının kabul edilmesi şansı düşüktür.

Hayvan ototoksisitesi ile insan ototoksisitesi arasındaki farkı açıklayan en az 2 muhtemel neden vardır (27):

Birincisi, insanlardaki korti organı ototoksik ilaçlara deney hayvanlarındakinden farklı bir duyarlılığa sahip olabilir. Bununla birlikte bunu destekleyecek bir kanıt yoktur. Sistemik olarak verilen aminoglikozidlerin ototoksisitesini değerlendiren çalışmalar kendine özgü duyarlılık farklılıkları görüşünü desteklemez.

İkincisi, topikal ototoksik ilaçların iç kulak sıvıları ve korti organına verilmiş derecelerinde farklılıklar olabilir. Veriliş farklılıkları orta kulak boşluğundan kohlear sıvılara moleküllerin farklı diffüzyon oranlarına bağlıdır.

Hayvanlar ve insanlar arasındaki farklılıklar ...

**Anatomik farklılıklar :* İnsan yuvarlak pencere membranı inferiorunda hipotimpanumun bulunduğu bir triangüler fossa içine girinti yapar (Şekil 2).



ŞEKİL 2. İnsanda yuvarlak pencerenin görünümü (sağ kulak).

Dik pozisyonda orta kulak boşluğuna yerleştirilen materyallerin yuvarlak pencere membranından uzağa düşmeleri ve hipotimpanumda göllenmeleri

mümkündür. Orta kulak boşluğunun sıvı ile tamamen doldurulması sıvının östaki tüpünden kaçmasına sebep olabilir. Sonuç olarak insanlarda orta kulak boşluğuna konulan sıvı yuvarlak pencere membranı ile yoğun bir temas zamanına sahip olamıyabilir. Buna karşın hayvanlar adeta orta kulak boşluğuna sokulmuş bir yuvarlak pencere membranına sahiptirler. Yuvarlak pencere membranı öyle bir şekilde yerleşmiştir ki temas süresi insanlarda olduğundan belirgin derecede daha uzundur.

Yuvarlak pencere nişinin kemik sınırlarını örten yalancı bir mukozal membrana sahip önemli sayıdaki kulakların varlığı veya yuvarlak pencere membranı üzerindeki yağlı veya fibröz doku tıkaçlarının varlığı orta kulak sıvılarının yuvarlak pencere membranı ile temasını önleyebilir. Bu kulaklarda en azından orta kulak boşluğuna konulan maddelerin yuvarlak pencere membranı ile temasa gelmeleri çok düşük bir ihtimal olup kohleaya penetrasyonları da zordur.

İnsan yuvarlak pencere membranının kalınlığı ile deney hayvanlarının kalınlığı arasında belirgin farklılıklar vardır: kemirgenler 10-14 μm , kediler 20-40 μm , resus maymunu 40-60 μm , insanlar 40-70 μm .

Kalınlıktaki farklılıklar genellikle yuvarlak pencere membranının orta bağ dokusu tabakasında en belirgindir. Kalınlığın yuvarlak pencere membran permeabilitesinin temel belirleyicisi olduğu derecede insanlar deney hayvanlarına göre daha iyi korunuyorlarmış gibi görünmektedir.

Her ne kadar sistemik olarak incelenmemiş ise de östaki tüpü fonksiyonundaki farklılıklar da orta kulak boşluğuna yerleştirilen materyallerin ototoksik potensiyellerini etkileyebilir. Eğer orta kulak boşluğuna yerleştirilen materyaller östaki tüpünden hızla kaçarsa yuvarlak pencere membranı ile temas süresi sınırlı olacaktır.

**Anatomik olmayan farklılıklar:* mukopürülan eksudalı veya eksudasız kalın mukozal ödem varlığı orta kulak ototoksik preparatlarının yuvarlak pencere membranı ile temasına belirgin derecede fiziksel ve/veya mekanik bariyer oluşturabilir.

Otitis mediası olan hayvanların yuvarlak pencere membranlarında zaman içinde belirgin değişiklikler görülmüştür. Vaskülaritede artış, immün reaktif

hücrelerin infiltrasyonu ve zamanla membranın kalınlaşması görülür. Yuvarlak pencere membran permeabilitesinin artmış yuvarlak pencere membran kalınlığı veya orta kulak boşluğunda artmış kollajen nedeniyle azalabileceği ileri sürülmüştür.

Odyolojik ve vestibüler monitörizasyon:

Bugün için ototoksik bir ajanla karşılaşmış bir hastada odyolojik olarak uygulanabilecek standart bir form yoktur. Rutin konuşmayı ayırt etme testi ile saf ses odyometrisi minimum düzeyde test gereksinimini karşılamaktadır. Elektrokohleografi ototoksisiteyi erkenden belirleyebilen bir testtir. Ancak pahalı olması ve uygulama zorluğu rutin kullanımı güçleştirmektedir. Odyometriye uyum sağlayamayan küçük çocukların değerlendirilmesinde de ABR veya otoakustik emisyon kullanılabilir.

Özellikle aminoglikozid ve sisplatin gibi ajanlar ilk önce yüksek frekanslı işitme kaybına sebep olduklarından aynı zamanda yüksek frekans odyometrisi de monitörizasyonda kullanılabilir.

Vestibulotoksik etkiler ise vestibüler testler ile saptanabilir. Hastaların çoğu kalorik test, dönen koltuk veya platform postürografi testine ya uyum sağlayamaz yada gönülsüzdür. Yatağa bağlı hastalarda pozisyonel nistagmus, postüral bakış (gaze) testi ve baş sallama testi gibi yatak başı testleri uygulanabilir. Bunlara ek olarak yatak başında buzlu su ile kalorik test, ucuz ve kolay yapılan bir testtir. Bitermal kalorik test, dönen koltuk ve platform testi oldukça yararlı bilgiler verebilmektedir. Kalorik testle oluşmuş nistagmusun yavaş fazında azalma erken vestibulotoksik etkiyi gösterebilmektedir.

Son zamanlarda vestibüler sistem fonksiyonel bozukluklarını belirlemek için farklı vestibüler end-organlardan kaynaklanan 'short latency vestibüler evoked potentials ' (VsEP) değerlendirilmektedir. Bu test özellikle fonksiyonel vestibulotoksitenin başlangıç evrelerinde duyarlıdır. VsEP'lerin deney hayvanlarında gerek vestibüler gerekse işitsel end-organ fonksiyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde ilaçların vestibüler ve odituar sistem üzerine seçici etkilerini doğrudan objektif olarak belirlemede testin İUBP'yi tamamlayıcı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

3. APOPTOZİS:

Apoptozis, genlerin etkisinde oluşan programlı hücre ölümü, intiharı olarak tanımlanmaktadır (28). Sözcük anlamı yaprak dökümüdür ve ilk kez 1970'li yıllarda kullanılmıştır.

Organizmada hücre popülasyonu, proliferasyon ve apoptozisin baskılanması veya uyarılması yoluyla düzenlenir. Enfeksiyon, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanlar ve yaşlanma gibi etkiler sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri ve iskemi, hücrede zedelenme oluşturur. Hücrenin yanıtı bazı durumlarda adaptasyon (onarım), ancak çoğunlukla ölüm biçimindedir. Hücre ölümü ikiye ayrılır: Apoptozis ve nekrozis. Apoptozis programlı hücre ölümünün bir formu olup istenmeyen veya zararlı hücrelerin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılması olarak bilinir. Nekrozun aksine apoptozis inflamatuvar bir cevap veya takip eden sekonder bir hasara neden olmaz. Tablo 1' de apoptozisin nekrozdan farklılıkları özetlenmiştir.

TABLO 1. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklılıklar.

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Uyaranın kaynağı	İskemi, toksik ajanlar	Bazı fizyolojik, patolojik olaylar
Histolojisi	Hücrede şişme, karyoliz, sitoplazmik organel yıkımı	Piknoz, nükleusta kondensasyon, sitoplazmada apoptotik cisimler
DNA kırılması	Rastgele, yaygın	İnternükleozomal
Çevre dokuda histoloji	İnflamasyon bulguları	Fagositer hücreler egemendir

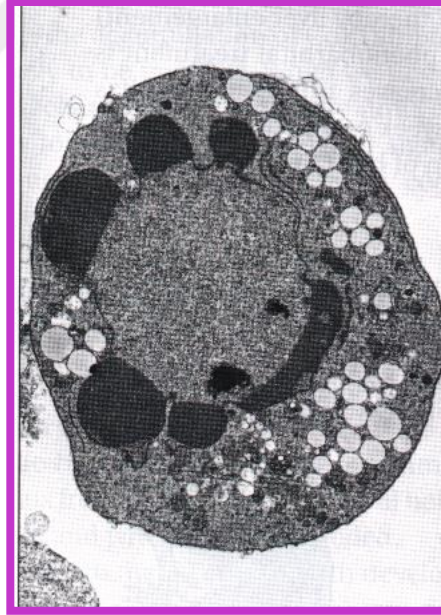
Apoptozis organizmada pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte yer alır. Bu olaylar şunlardır:

- 1- Embriyogeneizde bazı organların boşluklarının oluşumu,
- 2- Hormon düzeyinin düşmesine bağlı involüsyon (menstrüel siklusda, postmenopozal dönemde genital organlarda),
- 3- Hızlı prolifere olan hücrelerde hücre popülasyonunda homeostazın sağlanması (cilt epitel hücreleri, gastrointestinal traktus mukoza epiteli),
- 4- İmmün sistemin onkogenezi (timusta T hücreleri için negatif seleksiyon),

- 5- Parankimal organlarda patolojik atrofi,
- 6- Viral infeksiyonlarda hücre zedelenmesi,
- 7- Tümörlerde hücre ölümü (nekroza eşlik eder),
- 8- Hormona bağımlı tümörlerde patolojik atrofi,
- 9- Sitotoksik T hücreleri aracılığı ile oluşan hücre ölümü,
- 10- Düşük dozda bazı zedeleyici ajanlarla oluşan hücre ölümü (radyasyon, ısı, antineoplastikler).

Apoptozis morfolojik veya biyokimyasal kriterlere göre tanımlanmaktadır (29). Apoptotik değişiklik gösteren hücre için ölüm süreci başlamış demektir.

Işık mikroskopisinde; karakteristik olarak sağlam bir hücre membranı mevcuttur ve komşu hücrelerden ayrılma izlenir. Apoptozise giden bir hücrede görülen diğer hücresel değişiklikler ise hacim kaybı, parçalı çekirdek, sitoplazmik vakuoller, kromatin ağı varlığı, endoplazmik retikulumda dilatasyon şeklinde özetlenebilir (ŞEKİL 3).



ŞEKİL 3.

Elektron mikroskopisi kromatinin yoğunlaşması ve parçalanması, çekirdek parçalanması ve apoptotik cisimler gibi apoptozisin karakteristik morfolojik özelliklerinin saptayabilir (29). Bununla birlikte bu işlem büyük bir hücre popülasyonuna ihtiyaç gösterir, çünkü apoptotik morfolojik özellikler sadece kısa bir süre için görülebilirler. Örneğin apoptotik cisimler fagositoz ve sindirim ile birkaç saat içinde ortadan kaldırılırlar.

Gavrieli ve ark ilk kez 1992'de parafine gömülmüş doku kesitlerinde hücresele seviyede apoptozisi saptamak için TUNEL metodunu geliştirmişlerdir (30). Bu metodun avantajı apoptozisin morfolojik özellikleri ve lokalizasyonu hakkında bilgi sağlamasıdır. Dezavantajı ise TUNEL metodunun apoptozisin yanı sıra nekrozun neden olduğu DNA kırılmalarını da saptamasıdır. TUNEL metodu parçalanmış DNA'nın 3'-OH ucuna terminal deoxynükleotidil transferazın bağlanması esasına dayanır. Sonuç olarak her ikisi de çeşitli endonükleazları aktive eden hücre nekrozu ve otoliz geniş sayıda boyanabilir DNA uçları oluşturabilir. Bundan dolayı TUNEL metodu ile elde edilen sonuçların morfolojik analiz ile de konfirme edilmeleri gerekir (29, 31).

Apoptozis mekanizmaları

Bazı fizyolojik veya patolojik etkenlerin apoptozisi uyarmasından sonra değişik gen ekspresyonları oluşur. Apoptozis bazı gen ve proteinlerle sıkı ilişkidir (32). Bunların başlıcaları proto-onkogen bcl-2, kaspaz ailesi ve sitokrom-c dir. Apoptozisi oluşturan temel olaylar primer olarak mitokondride gerçekleşir. Burada bir dizi reaksiyon meydana gelir:

Gen ekspresyonu sonrasında ikincil mesajcı olarak kalsiyuma bağımlı bir endonükleaz aktive (sitokrom-c salınımı) olur. Bu enzimin etkisi ile kromatin parçalanır ve DNA fragmentasyonu oluşur. Aynı anda aktive olan proteazlar (Kaspazların aktivasyonu) ise, nükleusdaki değişikliklere katkı yanında, hücrenin sitoplazmik organellerinde proteolize neden olmaktadır. Ayrıca artan transglutaminaz aktivitesi de protein polimerizasyonu ve hücrenin kondansasyonuna yol açar. Sonuçta mitokondriyal transmembran potansiyellerinin kaybı ve takiben lipid peroksidasyonunda artış meydana gelir ve hücrenin kromatin yapısı ve yüzey özellikleri değişir. Bu durum fagositlerce algılanır ve hücre fagositte edilir. Apoptotik süreçte kalsiyumun, proteaz ve endonükleazları aktive edici özelliği ile önemli yeri olduğu bilinmektedir.

Apoptozisin Regülasyonu

Apoptozisde yeni proteinlerin sentezine neden olan değişik gen ekspresyonları gösterilmiştir. Hayvanlarda ced-3, ced-4 genleri apoptozisi uyarmaktadır. İnsanlarda bcl-2 ve p53 genleri apoptozisle ilişkili bulunmuştur. APO-1 (Fas) ve CD 3 gibi hücre yüzey antijenleri de apoptozisi bazı antikorların varlığında regüle eder. Apoptozisin regülasyonunda etkili faktörler Tablo 2' de gösterilmiştir.

TABLO 2. Apoptozisde etkili faktörler.

Baskılayıcılar	Arttıranlar
Bcl-2 Mutant p53 c-abl E1B HSV 18 Baklovirüs	Doğal p53 c-myc adenovirüs E1A ICF

İnsanda **bcl-2** (B hücreli lösemi, lenfoma) geni 18. kromozomun uzun kolunda yer alır ve aynı isimdeki proteini kodlar. Bu gen ürünü protein apoptozisi inhibe eder. Bir nükleer transkripsiyon faktörü olan **c-myc** proteininin apoptozisi uyarıcı etkisi, bcl-2 geninin varlığına bağlıdır. Bcl-2 organizmada lenf nodüllerinin follikül kısımlarında ve epidermiste bazal tabakada fazla miktarda bulunur. Ayrıca hormon bağımlı hücrelerde hormon düzeyinin artışında bcl-2 miktarları da artmaktadır. Bu özellikler hücrelerin apoptozisden korunmaları ile ilişkili olabilir. Folliküler lenfomalarda görülen t (14;18) translokasyonunda immünglobülin regülatör gen bölgesi ile bcl-2 gen bölgelerinin komşuluğu ortaya çıkmaktadır. Sonuçta bcl-2 gen aktivasyonu ve buna c-myc veya başka onkogen aktivasyonunun eklenmesi ile lenfoid doku-da malign transformasyon geliştiği gösterilmiştir. Bcl-2 gen ekspresyonundaki aberasyon veya artış lenfoma, lösemi, prostat, kolon ve mide adenokanserlerinde, akciğer kanserleri, nöroblastoma, renal hücreli kanserler ve melanoma gibi çeşitli insan kanserlerinde gösterilmiştir. Kronik miyelositer

lösemi de görülen t (9;22) translokasyonu ile oluşan bcr-abl geni, apoptozise direnç oluşumundan sorumlu bulunmuştur. İlginç olarak bu hastalıkta blastik faza dönüşüm sırasında, wild-tip (doğal tip) p53 kaybı gibi başka bir gen mutasyonu da eklenmektedir. Bazı çalışmalarda lösemi, lenfoma ve solid tümörlerde fazla bcl-2 ekspresyonu ile apoptozisi indükleyen antineoplastiklere direnç arasına pozitif ilişki gösterilmiştir. Kanserde değişiklik gösteren bcl-2 'nin regülasyonunda, bir tümör süpresör gen olan p53 'ün rolü bilinmektedir. Hücre ölümünün düzenlenmesinde kritik noktada, bcl-2 proteini ile homoloji gösteren bax proteininin oluşturduğu heterodimer yapı etkili olabilir. Bcl-2 proteini ile etkileşen, bcl-2 ailesinde yer alan ve fonksiyonları bilinmeyen çeşitli proteinler de tanımlanmıştır.

Özellikle belirgin DNA hasarı bulunan hücrelerde p53 apoptozisi indükler. **Mutant p53** varlığı veya wild-tip p53 yokluğu durumlarında zedelenmiş hücrede yaşam sürer ve neoplastik transformasyon oluşabilir. P53 tümör süpresör genindeki mutasyonlar, insan malignitelerinin %50'sinden fazlasında gösterilmiştir. Germ hücrelerindeki p53 mutasyonu, çeşitli tümörlerin birlikte görüldüğü Li-Fraumeni sendromunda tümör gelişiminin erken evrelerinde gösterilmiştir. Sporadik olgularda tümörün ileri evreye progresyonunda p53 mutasyonları bulunmaktadır. P53 mutasyonları, pek çok tümörde kötü prognozu ifade etmektedir. P53, transkripsiyon faktörü olarak işlevi olan ve DNA replikasyonu ve onarımında rol alan proteinlerle doğrudan etkileşen bir DNA bağlayıcı proteindir. Mutant p53 'ün kodladığı proteinlerin DNA'ya affinitesinin az olması ile tümör gelişimi açıklanabilir. Ayrıca p53 'ün bcl-2 üzerindeki invivo etkileri bilinmektedir. Akut miyeloblastik lösemide p53 eksikliği düzeltildiğinde bcl-2 protein yapımının azaldığı ve apoptozisin arttığı gösterilmiştir. P53 bulunmayan farelerde, bütün dokularda bcl-2 artışı görülmez. İnsan tümörlerinin tedavisinde etkinlik, p53 mutasyonlarının varlığında azalmaktadır. Bazı lösemi, lenfoma, testis germ hücre tümörleri ve Wilm 's tümörü gibi kemoterapi yanıtı iyi olan insan kanserlerinde p53 mutasyonları seyrek. Pek çok ilacın antineoplastik etkisi p53 fonksiyonlarına bağlı apoptozisi indüklemeye bağlıdır.

Hücrelerin apoptozisden korunmasında TPA gibi bazı tümör promoterleri G-CSF, IL3 veya IL6 gibi büyüme faktörleri de etkili olmaktadır.

Apoptozis ve ototoksisite;

Apoptozis iç kulağın bazı hastalıkları ile de birlikte gözlenmektedir (33-38). Li ve ark. gentamisin iç kulak tüylü hücrelerinde apoptozise neden olduğunu göstermişlerdir (33). Benzer şekilde kronik aminoglikozid kullanımı da apoptozis ile sonlanabilmektedir (34). Cisplatin'in de iç kulak tüylü hücreleri ve spiral gangliyon hücrelerinde apoptozise neden olduğu ileri sürülmektedir (35, 36). Ayrıca endolenfatik hidrops, yüksek şiddette sese maruz kalmanın da apoptozise yol açabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (37, 38).

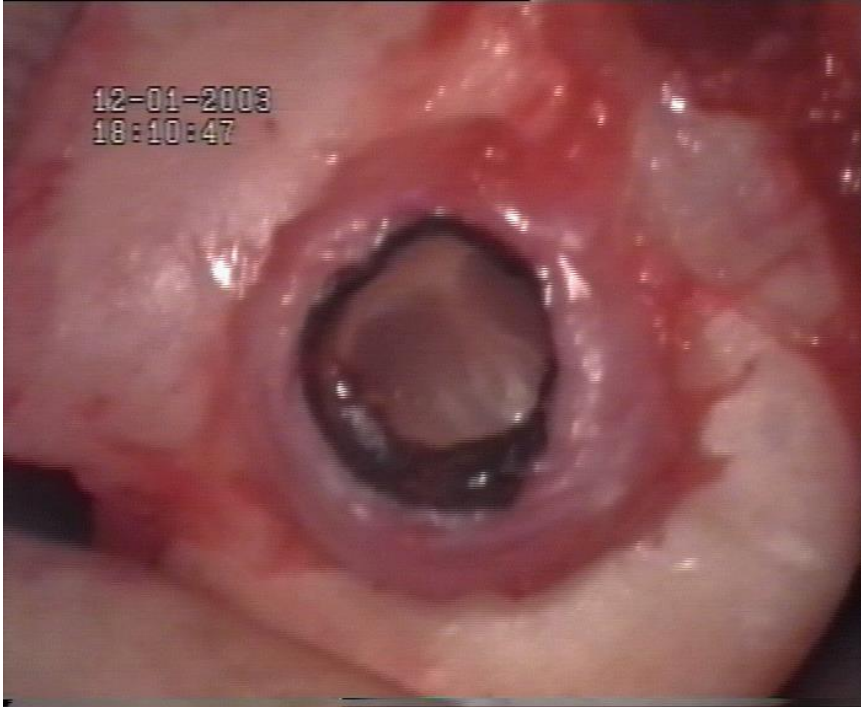
Kohleadaki hücre ölümünün indüklenmesine yol açan kesin moleküler mekanizma açık değildir. Ototoksisite çalışmalarında 37 derecedeki tedaviyi takiben dejenere olan kohlear tüylü hücrelerde görülen özelliklerin bazıları (nükleer yoğunlaşma, sitoplazmik koyulaşma) apoptozis fenomenine benzemektedir (16). Benzer tüylü hücre dejeneratif hücre değişiklikleri aminoglikozid tedavisini takiben invivo olarak da gözlenmiştir. Bununla birlikte tüylü hücrelerin tamamının apoptozise gitmedikleri bazılarının nekrotik oldukları görülmüştür. Aminoglikozidlerin gerçekten apoptozisi tetikleyip tetiklemedikleri dikkatli değerlendirmeyi gerektirir. Apoptozis ile gerçekleşen aktif hücre ölümü hücre tarafından çevresinden ve genomundan gelen bilgiye dayanan bir kararın sonucudur. Muhtemeldir ki apoptozis işlevi 20 derecede durur.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ağırlıkları 200- 300 gram arasında değişen, 6-12 aylık 35 adet Hartley guinea pig (Şekil 4) kullanılmıştır. Bunlar 7'şerli 5 gruba ayrılmışlar ve hayvanların sağ kulaklarına sırasıyla Tolnaftat, Nistatin, Sulkonazol, Bifonazol ve Neomisin (pozitif kontrol grubu olarak) uygulandı. Her bir gruptan 2 şer hayvanın sol kulakları ise negatif kontrol grubu olarak incelendi.



ŞEKİL 4. Guinea pig.



ŞEKİL 5. Guinea pig temporal kemiğinde timpan membranının görünümü.

İlaçlar intraperitoneal ketamin + xylizin anestezi altında 1 haftada toplam üç kere olmak üzere, timpan membran posterior kadranından dental iğne ile orta kulağı tamamen dolduracak şekilde verildi (Şekil 5). Hayvan anesteziden uyanıncaya kadar sağ kulağı yukarıda kalacak şekilde yatırıldı.

Tedavi bitiminden 2 hafta sonra hayvanlar intrakardiyak ketamin verilerek sakrifiye edildi (Şekil 6). Temporal kemikleri diseke edilip dışarı alındıktan sonra (Şekil 7) kohleaları Gluteraldehit solüsyonu içinde (%2.5'lik fosfat ile tamponlanmış, pH sı 7.2 olan saline solüsyonu içindeki) tesbit edildi.

Kohlealar ışık mikroskopisi (H-E, TUNEL ve yarı ince kesitler) ve transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) altında incelendi. Histopatolojik değerlendirme öncesi tüm spesmenler %10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat bekletildi. Sonra spesmenler musluk suyu ile yıkandı ve önce sırasıyla %50, %60, %70, %80 ve %90 lık etanol içinde 30 dakika ve sonra %95 ve %100'lük etanol içinde 1 saat tutuldu. Daha sonra 1:1 oranındaki %100 etanol ve xylene solüsyonu içinde 30 dakika bekletilip parafin içine gömüldü. 5µ kalınlığında transverse kesitler alınıp hematoksilin eosin ile boyandı. Alınan bu kesitler ışık mikroskopu (Olimpus BX40, Tokyo, Japonya) altında incelendi. Korti organı, spiral limbus (SL), spiral gangliyon (SG) hücreleri incelendi.

Apoptozisi saptamak için in situ apoptozis saptama kiti (DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130) kullanıldı. Parafin blok örneklerinden 5µ kalınlığında transverse kesitler alındı. Bu kesitler Xylen içinde tutulup deparafinize edildi. 20µg/ml proteinaz K ile 10 dakika rehidrate ve inkübe edildi. Sonra distile su ile yıkandı. %3'lük hidrojen peroksidaz ile endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. Kesitler daha sonra dengeleme tamponu ile 10-15 saniye ve 37 °C'de nemli atmosferdeki TdT enzimi ile 60 dakika inkübe edildi. Takiben oda sıcaklığında 10 dakika önceden ısıtılmış yıkama tamponuna konuldu. Antistreptavidin peroksidaz ile 45 dakika inkübe edildi. Her bir basamak PBS'de dikkatli yıkama ile ayırt edildi. DAB ile boyama yapıldı ve sayma boyamasın Mayers hematoksilin içinde yapıldı. Her bir vaka için rastgele seçilmiş alanlarda yaklaşık 100 TUNEL pozitif hücre sayıldı. Kahverengi boyanan apoptotik hücre oranları belirlendi.

Nekrozlu alanlardaki hücreler ile kötü morfolojisi olan hücreler ve kesit kenarlarına denk gelen hücreler değerlendirmeye alınmadı.

Elektron mikroskopik inceleme için 1 mm³ lük spesmen %2.5'lik glutaraldehit içinde 4 saat inkübe edildi. Sonra 1.5 saat osmium tetroksit ile muamele ederek postfiksasyon yapıldı. Değişen oranlardaki etanole maruz bırakılarak standart dehidrasyon yapıldı ve Epon 812 (Fluka, Buchs, Switzerland) içine infiltrasyon ve gömme gerçekleştirildi. Ultracut R ultramikrotom (Leica, Nussloch, Germany) ile önce yarı ince kesitler alınıp bunlar metilen blue-azur boyası ile boyandı ve Olympus BX-40 mikroskopunda incelendi. Sonra yine ultramikrotomla çok ince kesitler alındı. 9S elektron mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany) ile görüntüleme öncesinde uranik asetat-kurşun sitrat ile boyandı.



Şekil 6. İntrakardiyak ketamin verildikten sonra guinea pig temporal kemiğinin çıkarılması.

IV. BULGULAR

Makroskopik bulgular:

Herhangi bir ilacın uygulanmadığı negatif kontrol grubunda orta kulak mukozası normal görünümdeydi kohlea ise pembemsi bir görünümde olup stria vaskülerise ait mavimsi görünüm rahatlıkla izlenmektedir (Şekil 7A).

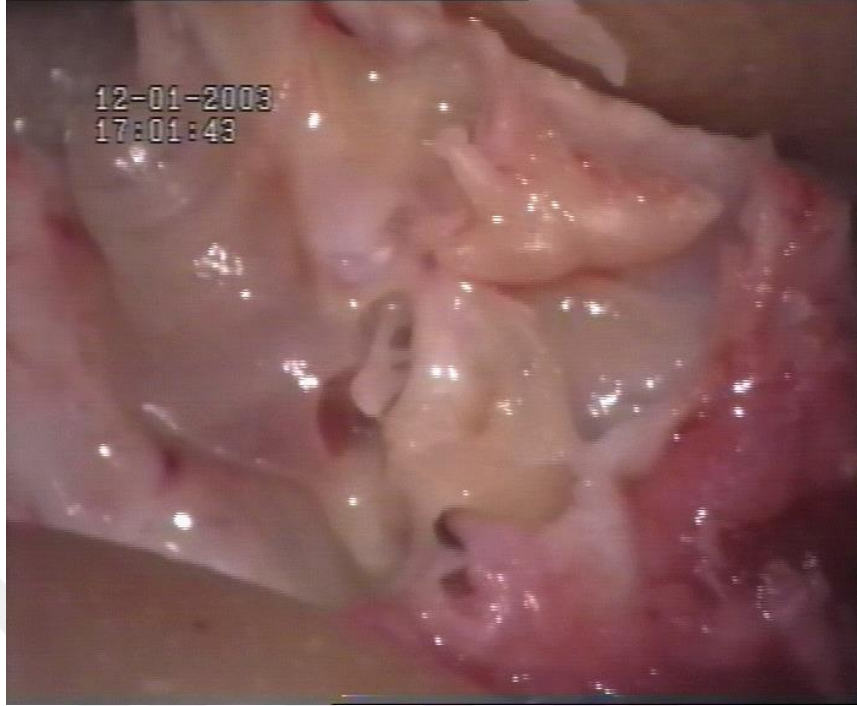
Pozitif kontrol grubunda (neomisin) orta kulak mukozasında herhangi bir değişiklik izlenmezken kohleanın pembemsi renginin mora çevrilmiş olduğu izlenmekteydi (Şekil 7B). Buna rağmen stria vaskülerise ait çizgilenme seçilebilmekteydi.

Tolnaftat uygulanan grupta dış kulak kanalı ve orta kulakta beyaz bir tortu olduğu izlendi.

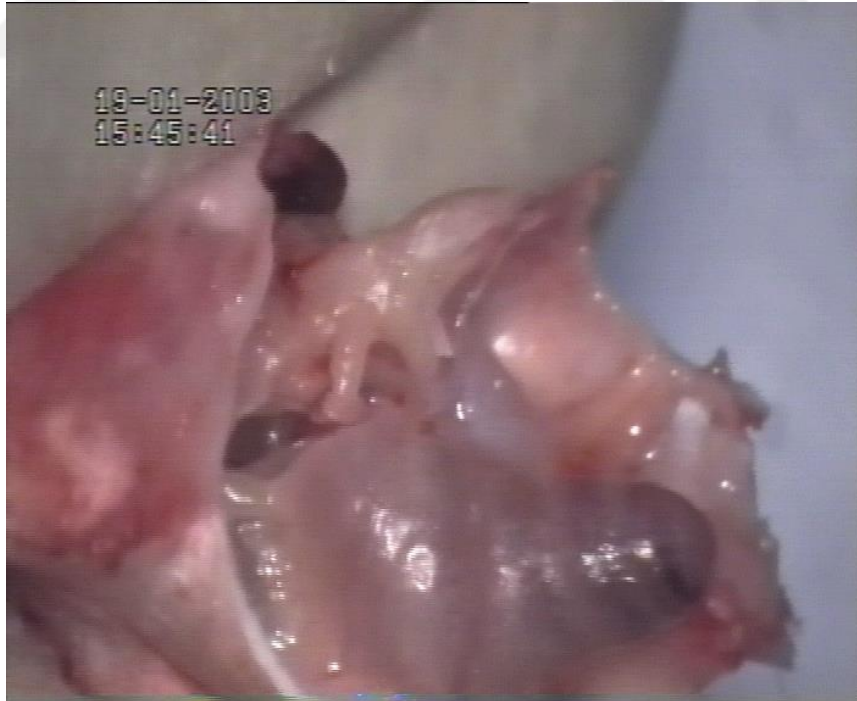
Bifonazol uygulandığında dış kulak kanalında serömüköz sekresyon izlendi. Ayrıca dış kulak kanal cildinde hiperemi ve hafif ödem izlendi.

Nistatin uygulanan grupta ise dış kulak kanalında tortu izlendi. Timpan membranda hiperemi de mevcuttu. Bir tanesinde de timpan membranda perforasyon izlendi.

A)



B)



ŞEKİL 7. Negatif (A) ve pozitif (B) kontrol grubunda kohleanın makroskopik görünümü.

Mikroskopik bulgular:

Şekil 8-9'da normal ve pozitif kontrol grubunda değişik histolojik kesitlerde izlenen değişiklikler görülmektedir. Pozitif kontrol grubunda hematoksilin eozin boyamasında spiral limbüs hücrelerinde ödem ve kromatin yoğunlaşması izlenirken spiral gangliyon hücrelerinde bariz dejenerasyon gözlenmekteydi.

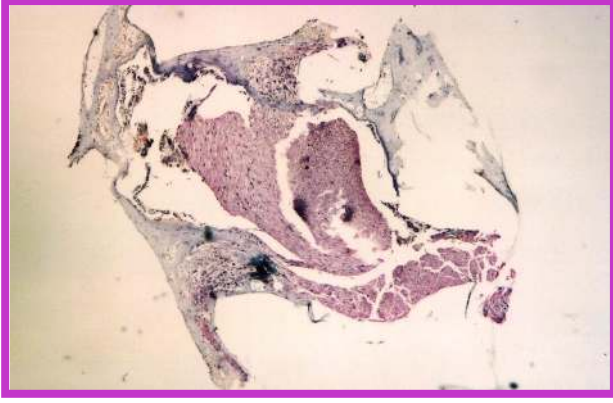
Yarı ince kesitlerde miyelinli aksonlar arasında ödem ve farklı çaplara sahip lifler görüldü. Spiral gangliyon hücrelerinin sitoplazması ödemli olup ve kromatin kümeleşmesi vardı.

TEM incelemesinde ise myelin kılıfta yer yer incelme, çekirdek kromatin fragmentasyon ve çekirdek zarında ayrılmalar izlenmektedir. Ancak sitoplazma normal görünümde idi. TUNEL boyaması ise hem spiral limbusta hem de spiral gangliyonda koyu renkli TUNEL (+) hücrelerin varlığını göstermektedir. Antimikotik ajanların sebep olduğu değişiklikler pozitif kontrol grubunda izlenen değişikliklerle aynı türden olup dereceleri farklılık göstermektedir (Şekil 10-13).

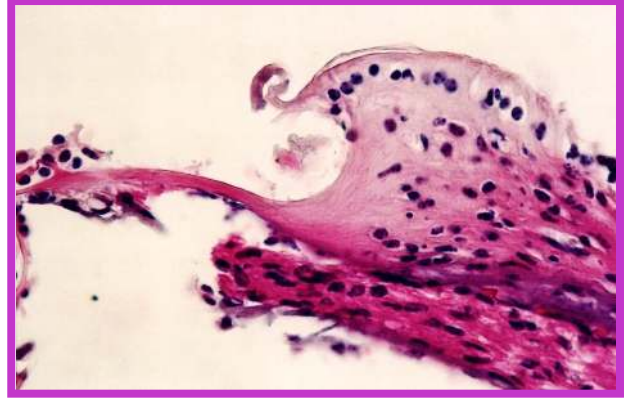
TUNEL (+) boyanan hücre oranları TABLO 3.de verilmiştir.

TABLO 3. TUNEL (+) boyanan hücre oranları.

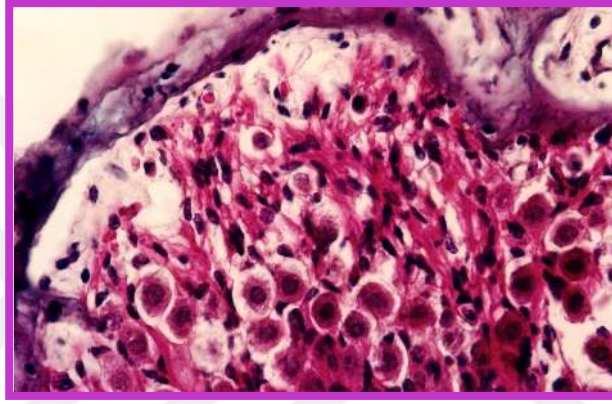
	TUNEL (+)		Normal hücre oranları	
	SL	SG	SL	SG
(-) Kontrol	0	0	100	100
Neomisin	58	34	42	66
Tolnaftat	38	20	62	80
Sulkonazol	12	13	88	87
Bifonazol	32	18	68	82
Nistatin	6	10	94	90



A) X40

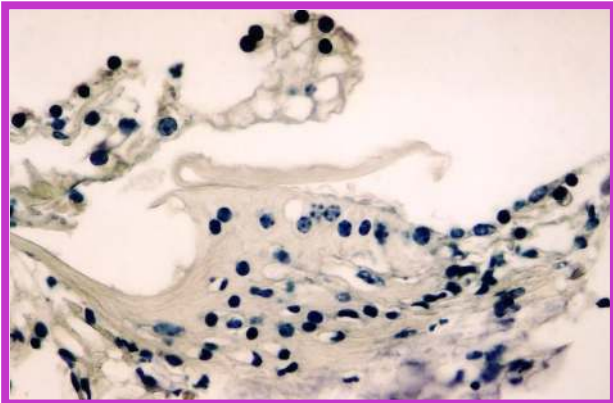


B) Spiral limbus (X400)

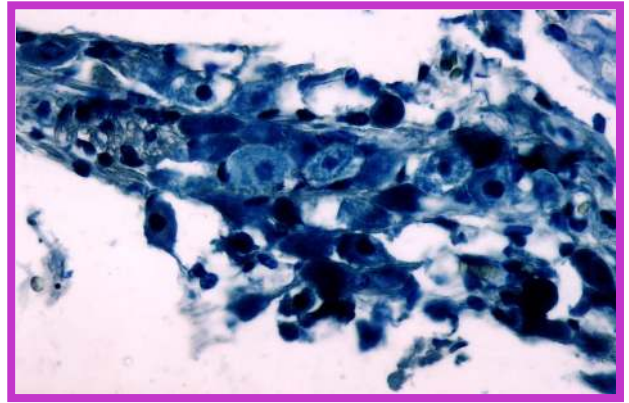


C) Spiral gangliyon (X400)

Şekil 8. Negatif kontrol grubunda HE boyaması.

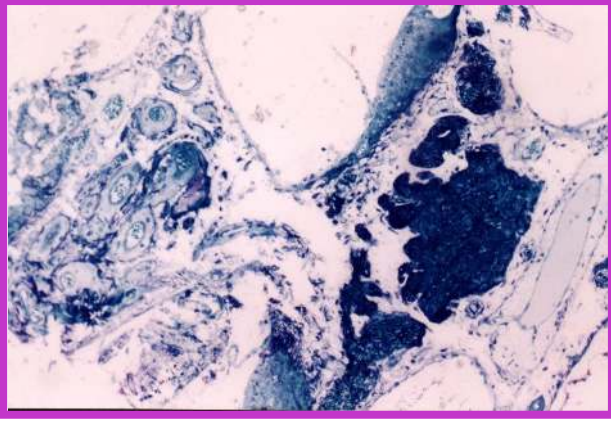


D) Spiral limbus (X400)

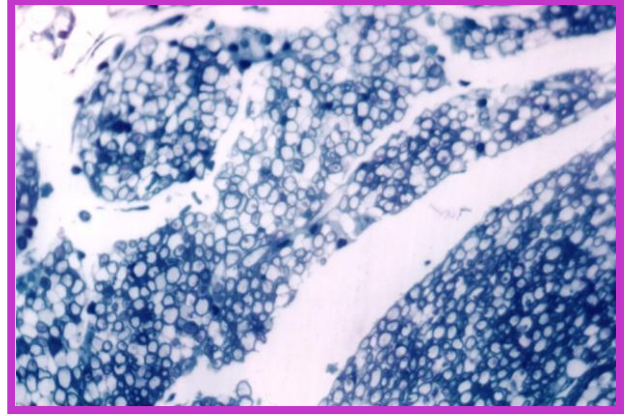


E) Spiral gangliyon (X400)

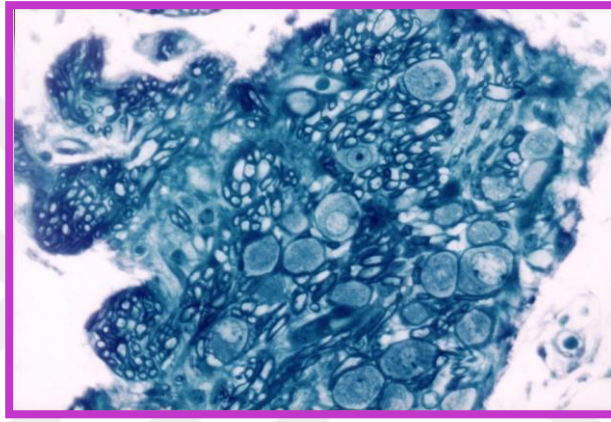
ŞEKİL 8. Negatif kontrol grubunda TUNEL boyaması.



F) X40

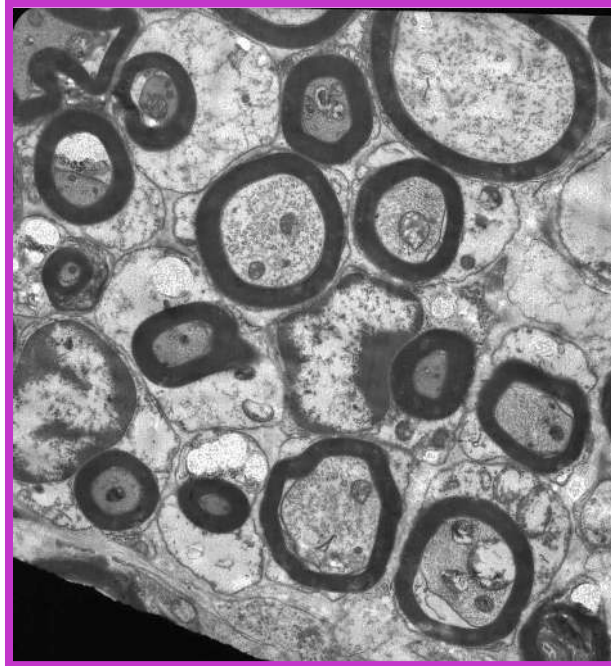


G) Spiral limbus (X400)



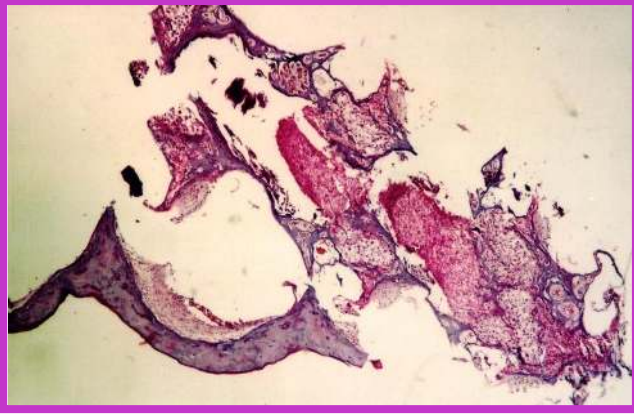
H) Spiral ganglion (X400)

ŞEKİL 8. Negatif kontrol grubunda yarı ince kesit incelemesi.

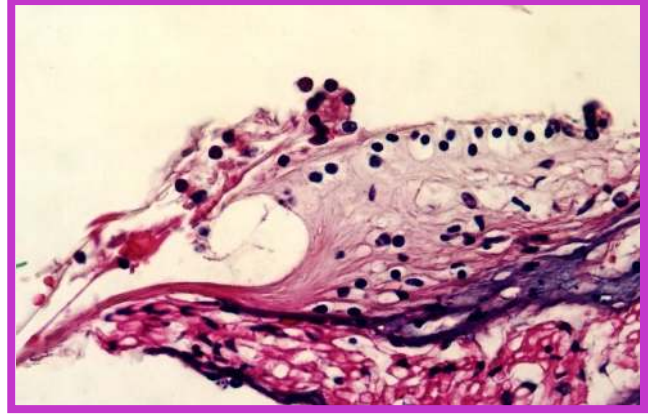


I) X4400

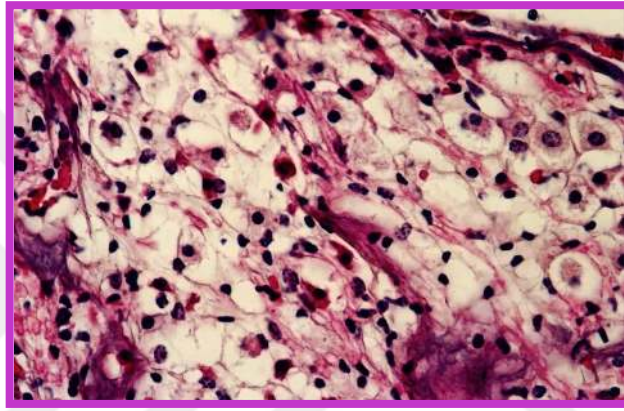
ŞEKİL 8. Negatif kontrol grubunda TEM incelemesi.



A) X40

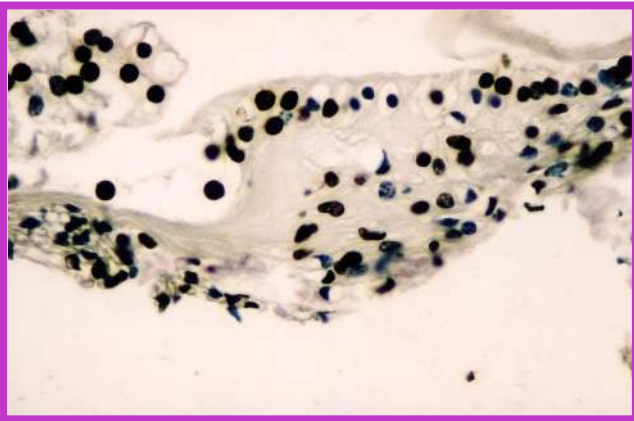


B) Spiral limbus (X400)

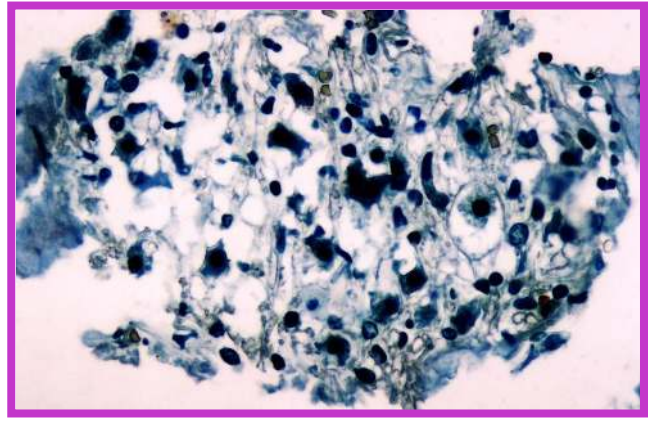


C) Spiral ganglion (X400)

ŞEKİL 9. Pozitif kontrol grubunda (Neomisin) HE boyaması.

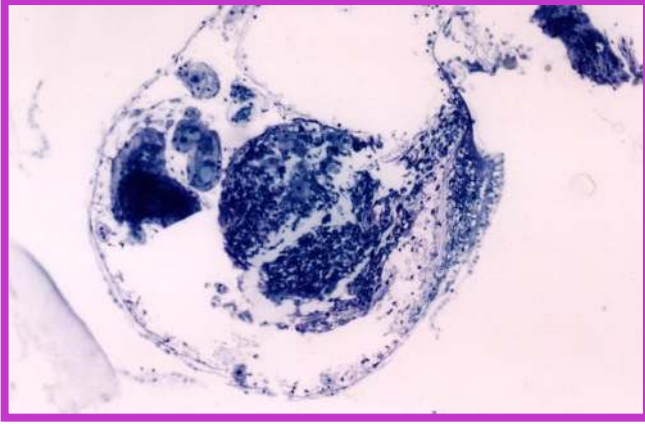


D) Spiral limbus (X400)

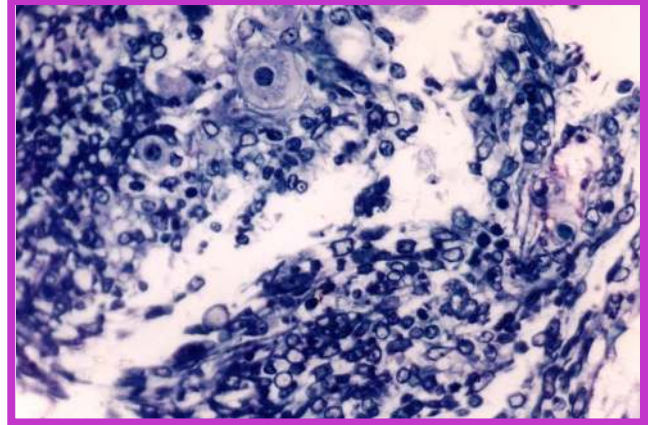


E) Spiral ganglion (X400)

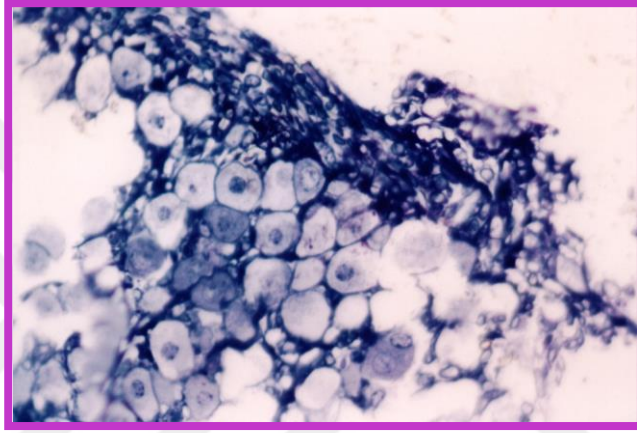
ŞEKİL 9. Pozitif kontrol grubunda (Neomisin) TUNEL boyaması.



F) X40

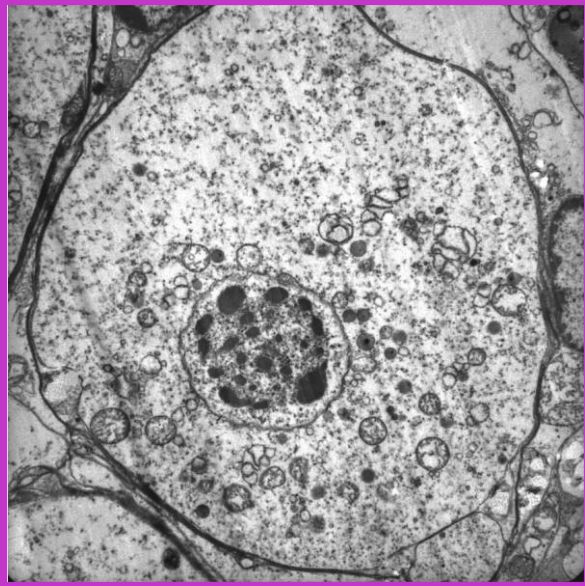


G) Spiral limbus (X400)

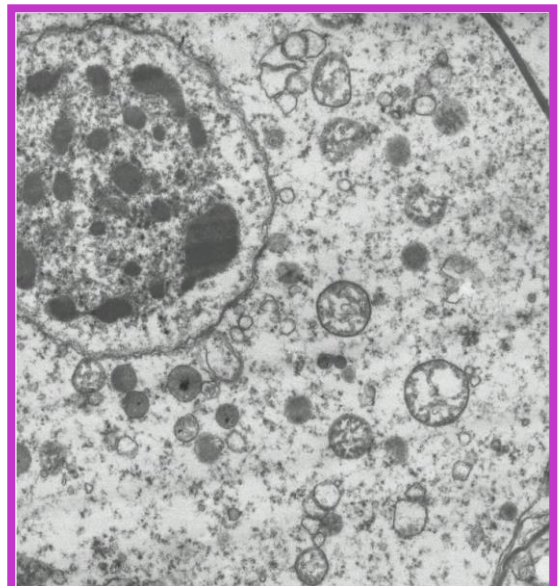


H) Spiral gangliyon (X400)

ŞEKİL 9. Pozitif kontrol grubunda (Neomisin) yarı ince kesit incelemesi.

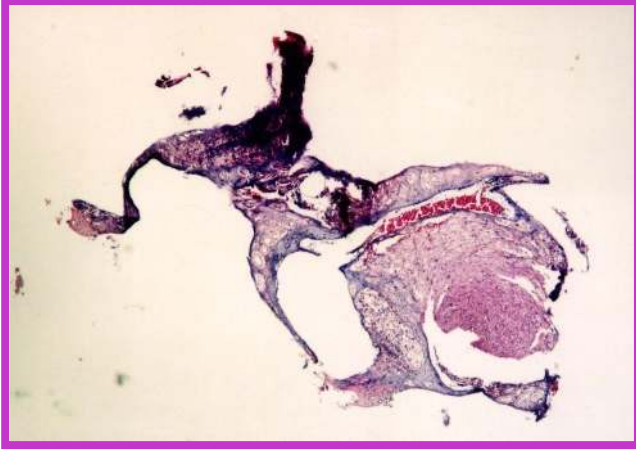


I) X3000



j) X7000

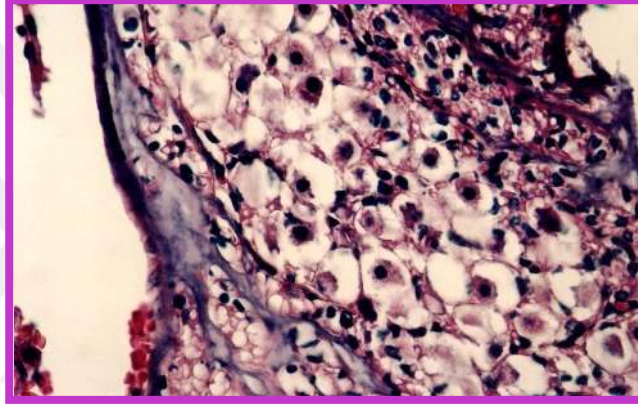
ŞEKİL 9. Pozitif kontrol grubunda (Neomisin) TEM incelemesi.



A) X40

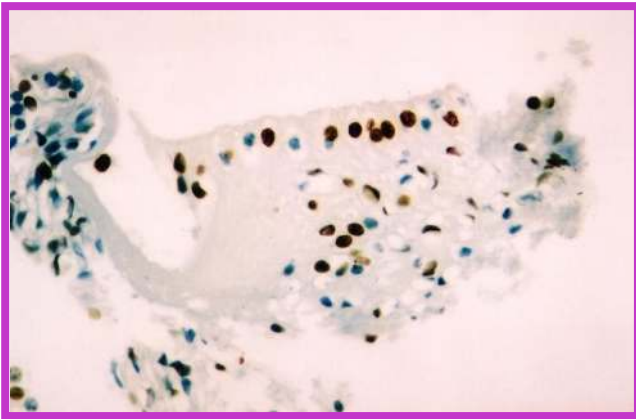


B) Spiral limbus (X400)

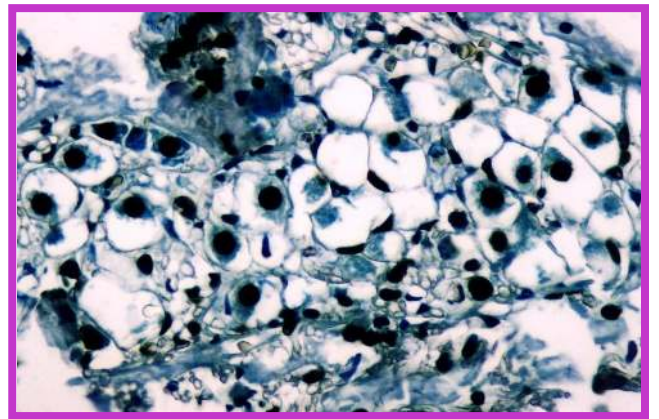


C) Spiral gangliyon (X400)

ŞEKİL 10. Tolnaftat grubu HE Boyaması.

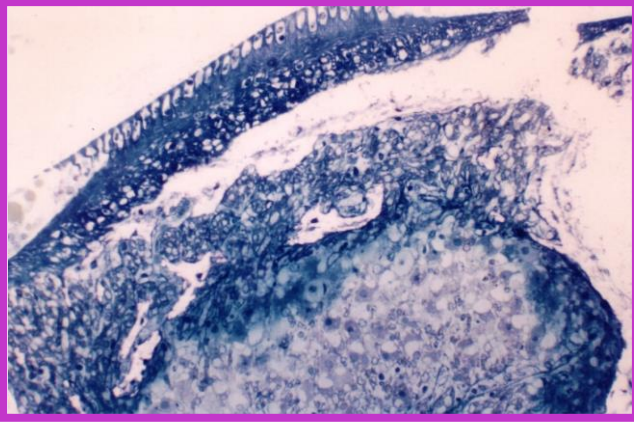


D) Spiral limbus (X400)

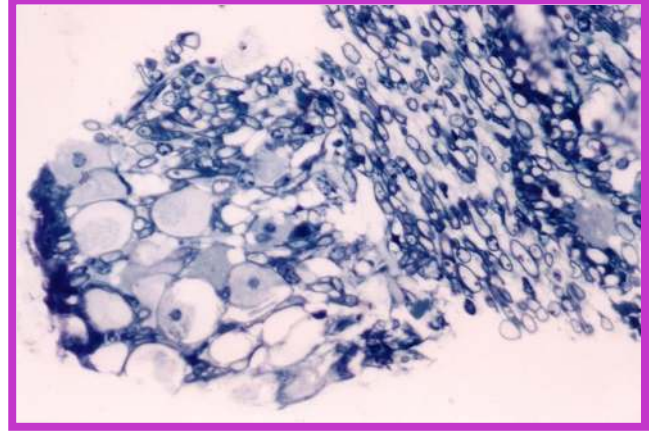


E) Spiral gangliyon (X400)

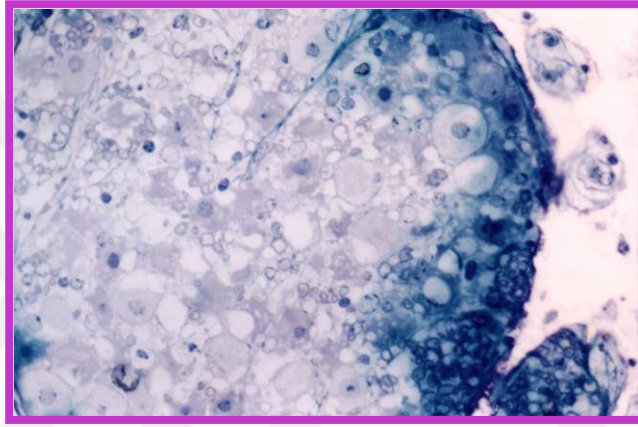
ŞEKİL 10. Tolnaftat grubu TUNEL Boyaması.



F) X100

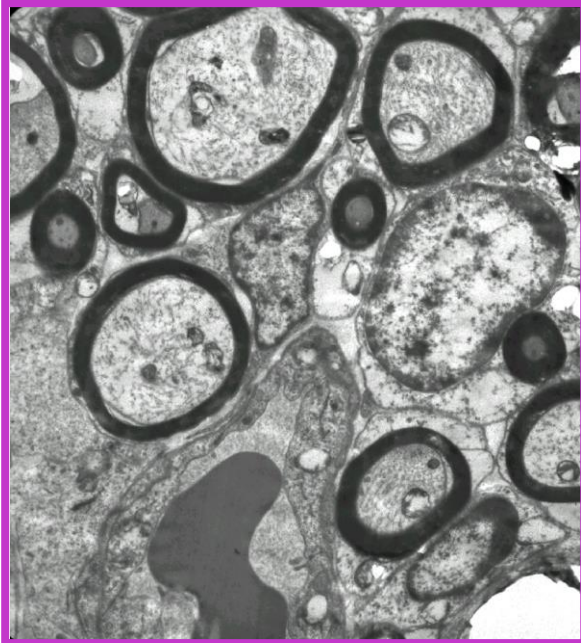


G) Spiral limbus (X400)

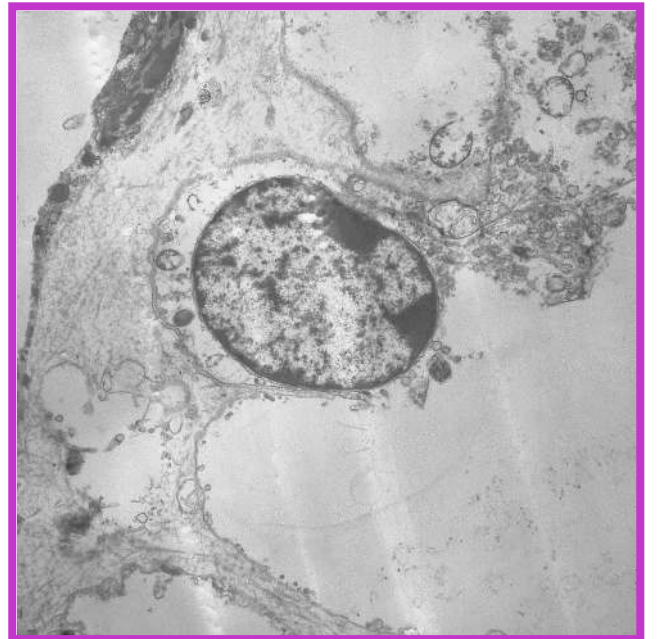


H) Spiral gangliyon (X400)

ŞEKİL 10. Tolnaftat grubu yarı ince kesit incelemesi.

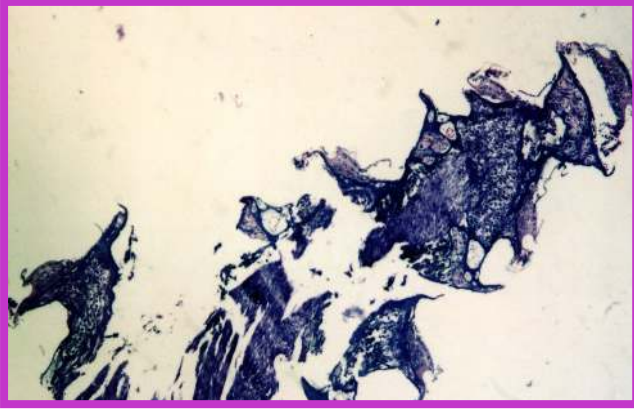


I) X4400

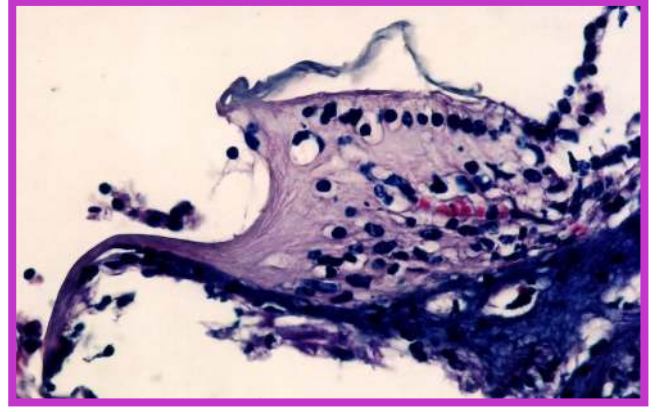


j) X4400

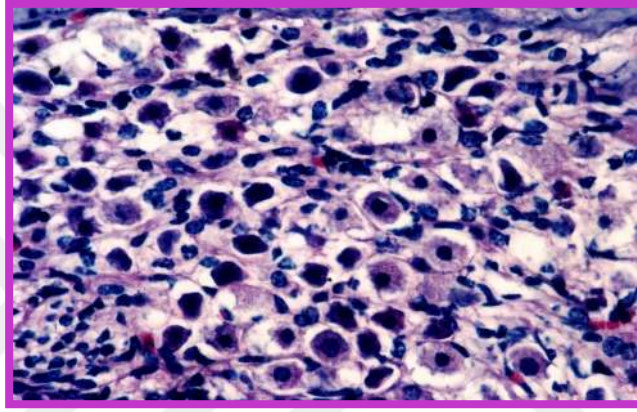
ŞEKİL 10. Tolnaftat grubu TEM incelemesi.



A) X40

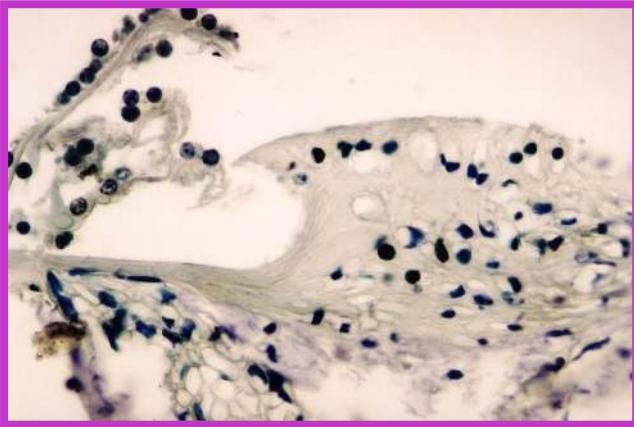


B) Spiral limbus (X400)

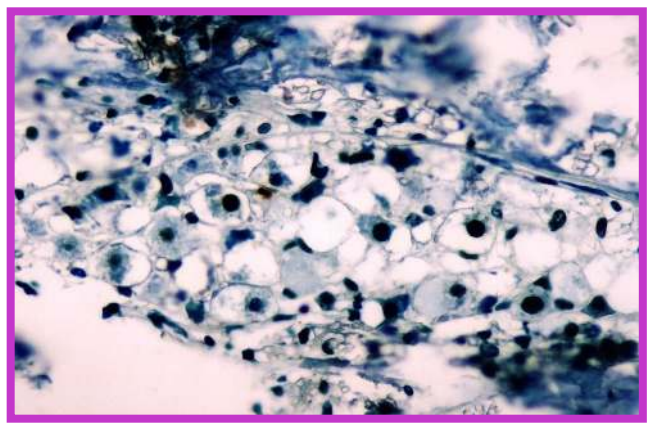


C) Spiral ganglion (X400)

ŞEKİL 11. Sulkonazol grubu HE boyaması.

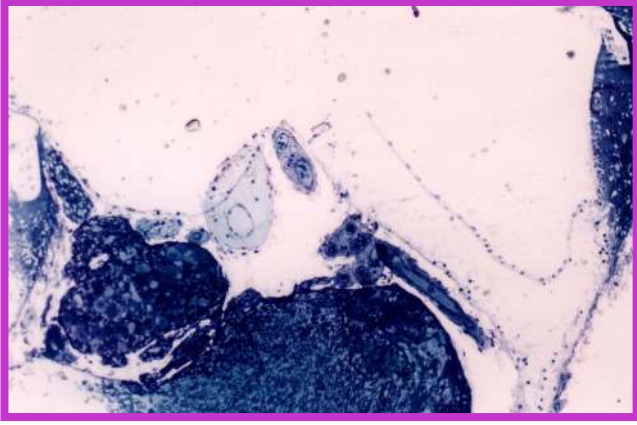


D) spiral limbus (X400)

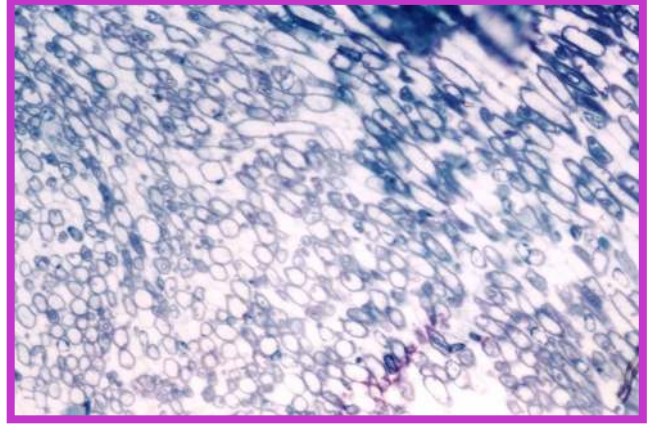


E) Spiral ganglion (X400)

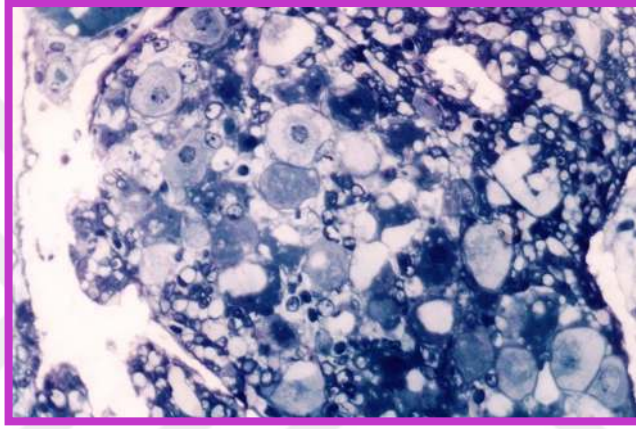
ŞEKİL 11. Sulkonazol grubu TUNEL boyaması.



F) X40

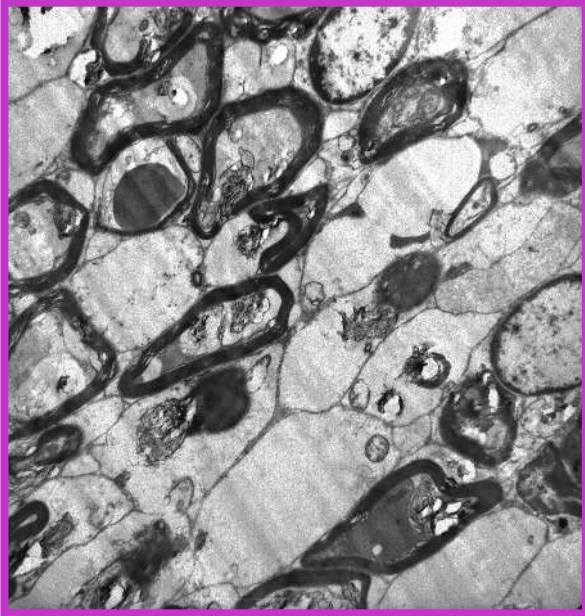


G) Spiral limbus (X400)

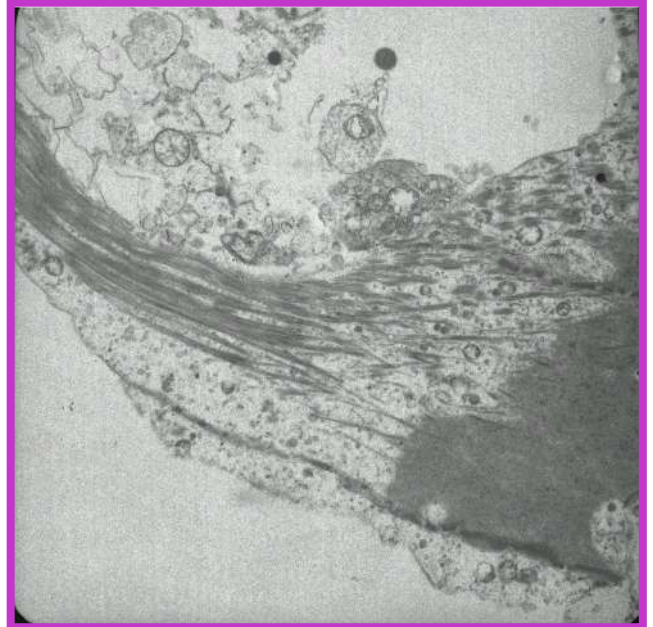


H) Spiral ganglion (X400)

ŞEKİL 11. Sulkonazol grubu yarı ince kesit incelemesi.

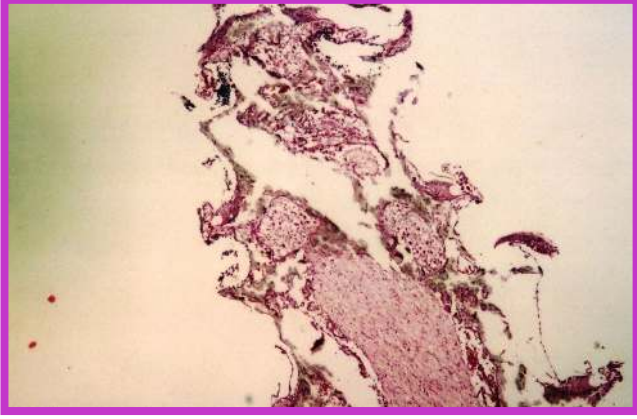


I) X3000

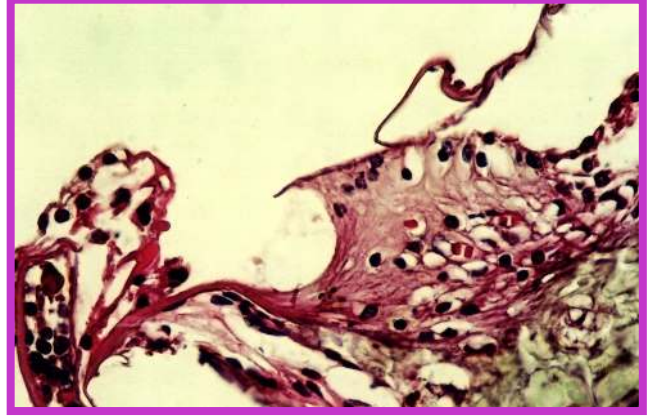


j) X3000

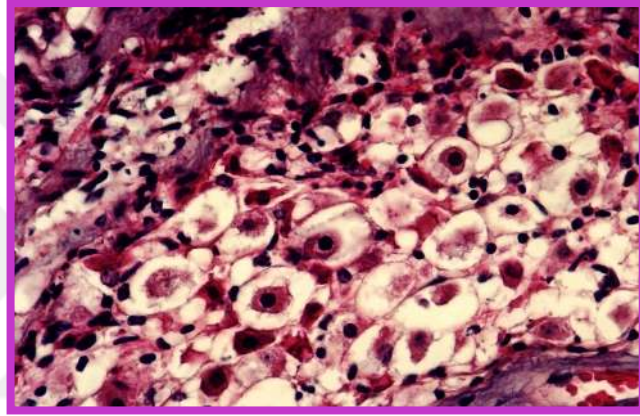
ŞEKİL 11. Sulkonazol grubu TEM incelemesi.



A) X40

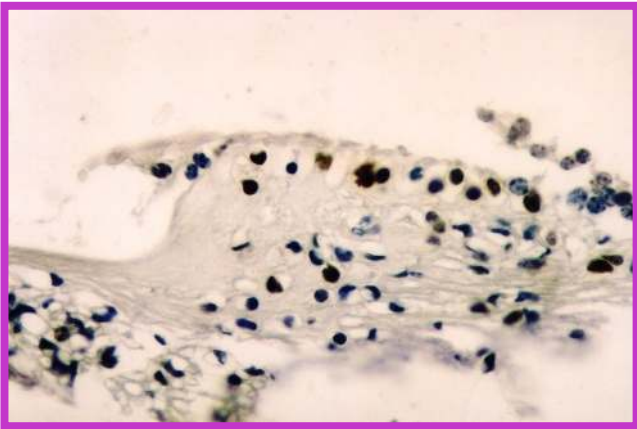


B) Spiral limbus (X400)

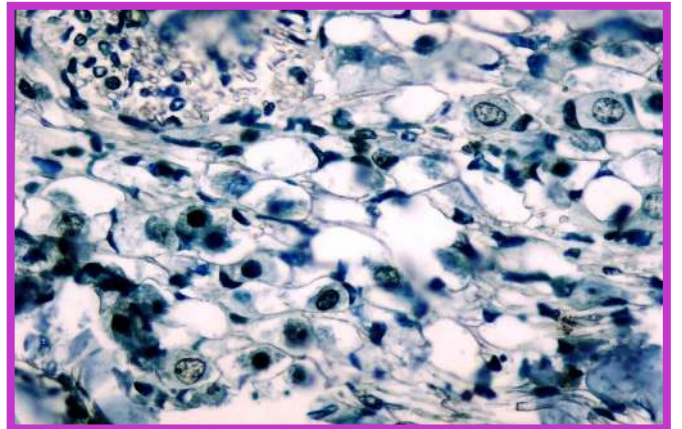


C) Spiral gangliyon (X400)

ŞEKİL 12. Bifonazol grubu HE boyaması.

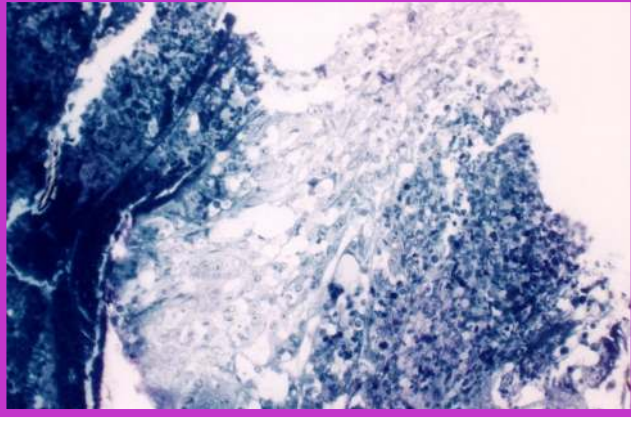


D) Spiral limbus (X400)

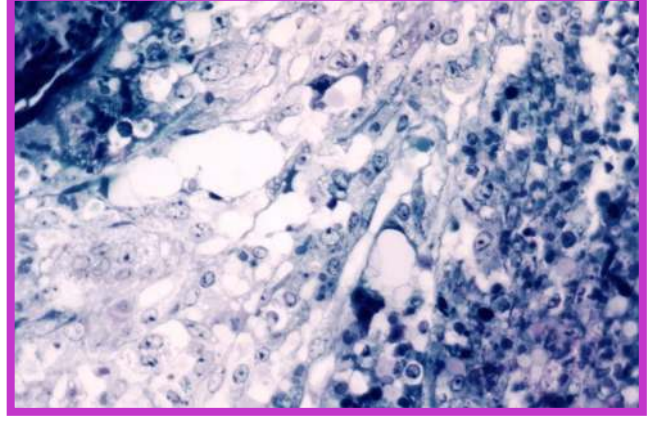


E) Spiral gangliyon (X400)

ŞEKİL 12. Bifonazol grubu TUNEL boyaması.

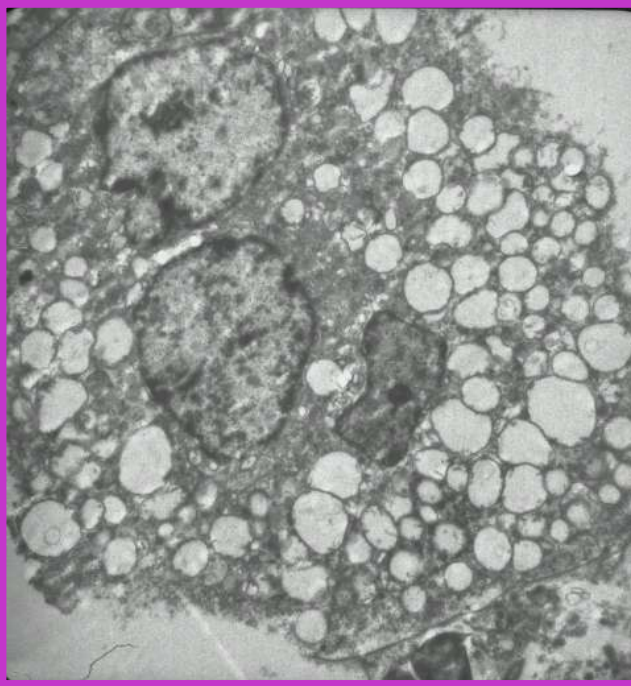


F) Spiral limbus (X200)

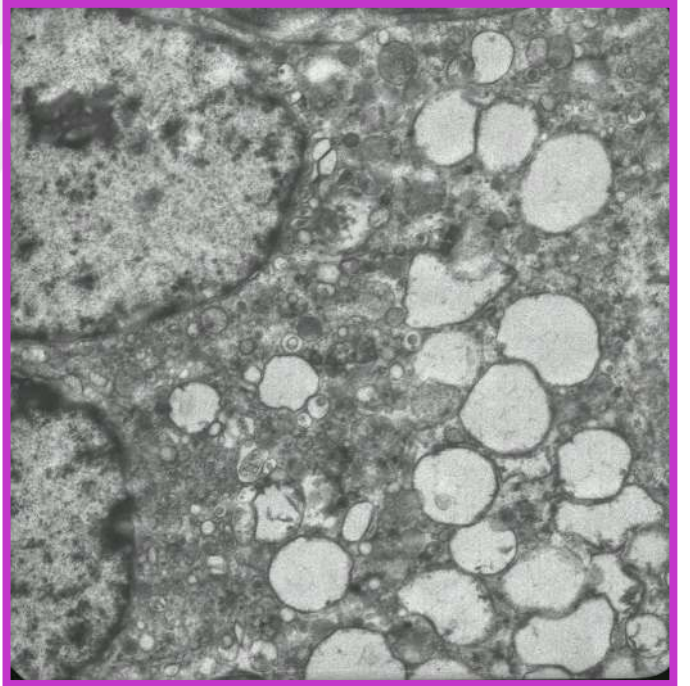


G) Spiral ganglion (X400)

ŞEKİL 11. Bifonazol grubu yarı ince kesit incelemesi.

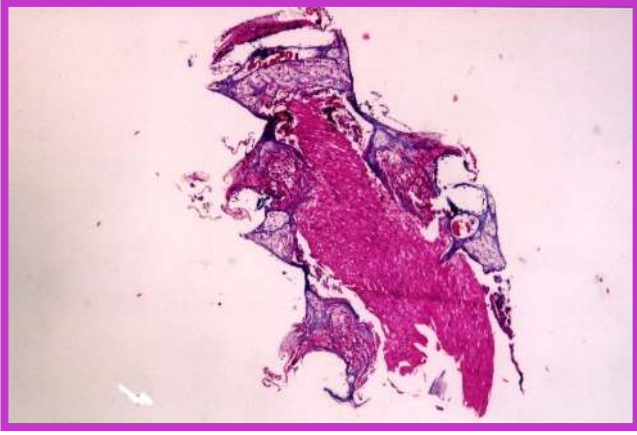


H) X3000



I) X3000

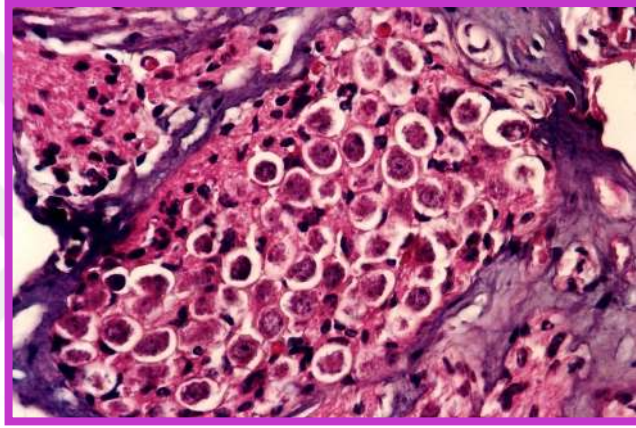
ŞEKİL 12. Bifonazol grubu TEM incelemesi.



A) X40

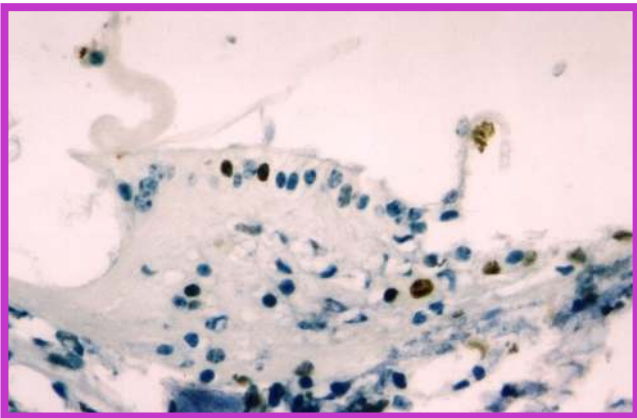


B) Spiral limbus (X400)

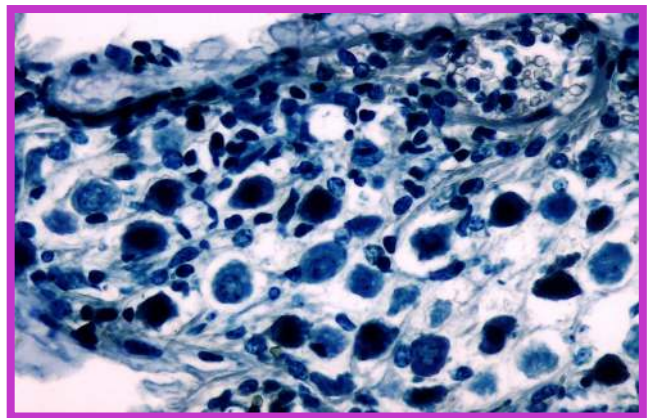


C) Spiral gangliyon (X400)

ŞEKİL 13. Nistatin grubu HE boyaması.

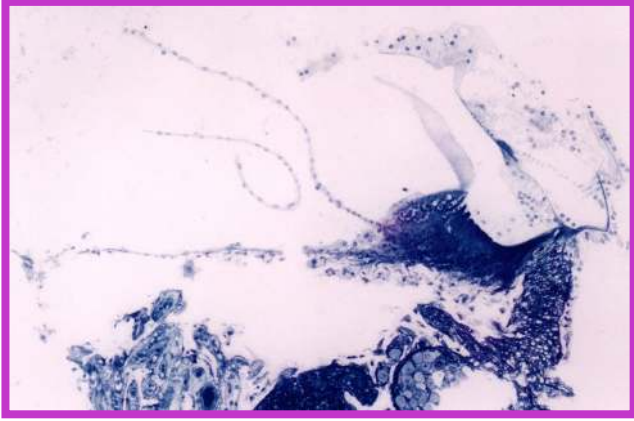


D) Spiral limbus (X400)

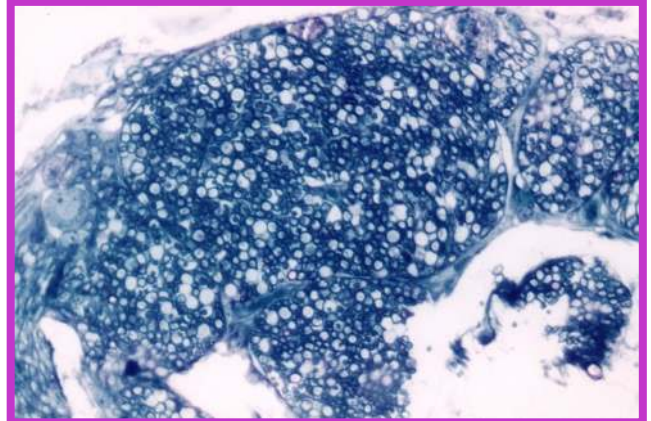


E) Spiral gangliyon (X400)

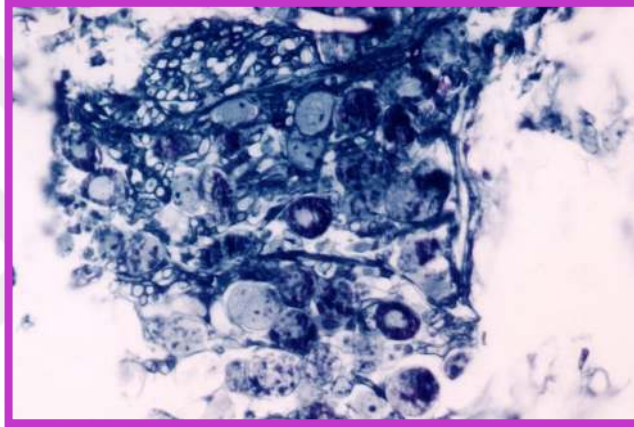
ŞEKİL 13. Nistatin grubu TUNEL boyaması.



F) X40

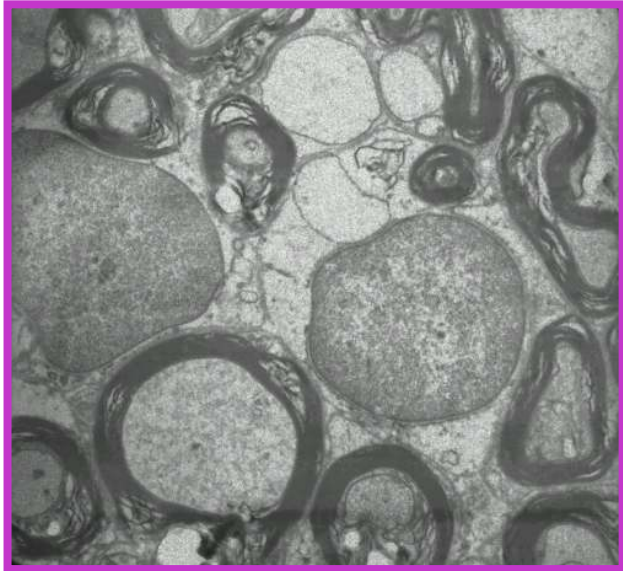


G) Spiral limbus (X400)



H) Spiral ganglion (X400)

ŞEKİL 13. Nistatin grubu yarı ince kesit incelemesi.



I) X7000



İ) X3000

ŞEKİL 13. Nistatin grubu TEM incelemesi.

V. TARTIŞMA

Otomikozis tedavisinin hedefleri semptomların ortadan kaldırılması, hastalığın eliminasyonu ve rekürrensten korunmadır. Bu hedeflere ulaşmada izlenecek yollar ise enfeksiyona sebep olan ajanın saptanması, predispozan faktörlerin belirlenip tedavisi, kulağın temizliği ve kurutulması ve antifungal ajanlarla tedavidir (4).

Temizleme ve kurutma tedavinin esas yönleridir ve semptomatik rahatlama sağlar. Fakat ilave tedavinin gerekli olup olmadığı tartışmalıdır. Stern ve ark. (9) otomikozis vakalarının büyük bir kısmının dikkatli bir temizleme ve kurutma ile tedavi edilebileceğini önermişlerdir. Fakat Nelson ve Damato eğer temizleme ve kurutma tek tedavi yöntemi ise rekürrens gelişmesinin yüksek ihtimalli olduğunu belirtmişlerdir (2, 10).

Antimikotik özellikleri olan pek çok ajan otomikozis tedavisi için önerilmektedir. Fakat en etkin tedavi hakkında bir konsensus yoktur. Günümüzde pek çok yazar genellikle topikal preparat formundaki ilave tedavinin otomikozis tedavisinde yardımcı olarak kullanılabileceğini önermektedirler. Otomikozis için spesifik topikal ilaçların geliştirilmesi ve bu yönde kullanımları için gereksinim olduğu bildirilmesine rağmen hala FDA tarafından kabul edilmiş otomikozis tedavisine spesifik bir otik preparat bulunmamaktadır.

Otomikozis tedavisi bazı hastalarda özellik arzedebilir. Bu hastalar DKK ile orta kulak boşluğunun devamlılık gösterdiği ventilasyon tüpü olan hastalar, timpan membran perforasyonu olan hastalar ve açık mastoid kavitesi olan hastalardır. Ototopikal antimikotik tedavi bu hastalarda gerekli olabilir. Bu vakalarda kullanılabilecek herhangi bir topikal ajan diffüzyon ile yuvarlak pencereden kohleaya geçebilir. Ancak bu antimikotik ajanların çoğunun ototoksik yan etkileri belli değildir. Üretici firmalar otik kullanım için kabulü sürdürmedikleri için bu ajanların ototoksik yan etkileri iyi çalışılmamıştır.

Schönebeck ve Zakrisson antimikotik ajan olarak 5-fluorocytosine kullanmışlar ve tedavi öncesi ve sonrası odyogramlarında fark olmadıklarını belirterek 5-fluorocytosine'in ototoksik olmadığını bildirmişlerdir (7).

Bassiouny ve ark. antifungal solusyon olan econazole'ün timpan membran perforasyonu olduğunda klinik olarak kullanımının güvenli olduğu sonucuna

varmışlardır (8). Paulose ve ark. timpan membran perforasyonu olan hastalarla açık mastoid kavitesi olan hastaların kulaklarına clotrimasole, nistatin ve ekonazol damlatmış ve herhangi bir ototoksik yan etkiye rastlamadıklarını bildirmişlerdir (3). Bununla birlikte son iki çalışmada ototoksisiteye ait objektif bir ölçüm bulunmamaktadır. Yazarlar sonuçlarını klinik gözlemlerine ve bu ajanların yan etkilerinin olmamasına bağlamışlardır.

Eğer bir ajanın ototoksik özellikleri varsa iç kulakta geçici veya kalıcı elektrofizyolojik değişiklikler meydana gelir veya stria vaskularis ile korti organının tüylü hücreleri ve destek hücrelerinde ve spiral ganglion hücrelerinde morfolojik hasar meydana gelebilir.

Spandow ve ark. farelerin yuvarlak pencere nişine gentian violet tatbik edildiğinde işitsel uyarılma potansiyeli latanslarında artış olduğunu bulmuşlar, bunun kohlear fonksiyon bozulmasını gösterdiğini belirtmişlerdir (14). Marsh ve Tom 1989'da guinea piglerde M-cresyl asetat, asetik asit, klotrimazol ve tolnaftat'ın tek doz uygulanması sonrasında ABR eşik değerlerini değerlendirmişler ve M-cresyl asetat ile asetik asitin uygulama sonrasında belirgin derecede eşik değerlerde yükselmeye neden olduklarını rapor etmişlerdir (6). Bununla birlikte klotrimazol ve tolnaftat kullanımı ise eşik değerlerde hafif derecede yükselmeye sebep olmuşlardır. Özdoğan ve ark. kobaylarda topikal bifonazol uygulanmasının otoakustik emisyon ile incelenmesi sonrasında herhangi bir ototoksik yan etkiye sebep olmadığını bulmuşlardır (39).

Ancak topikal ajanların otoksik yan etkilerini göstermenin en iyi yolu kohleanın histopatolojik incelemeleridir. Antimikotik ajanlarla ilgili olarak bu konuda literatürde sadece bir çalışma mevcuttur. Tom, klotrimazol, tolnaftat, mikonazol ve nistatin kullanımının tarama elektron mikroskopik incelemelerinde guinea piglerde tüylü hücre kaybına yol açmadıklarını bildirmektedir (4). Bizim çalışmamızda ise Türkiye'de piyasada fungal enfeksiyonlar için sık kullanılan preparatlar kullanıldı. Bu preparatların ototoksik etkileri kohleada neden olabilecekleri apoptozis miktarlarına bakılarak incelendi. TUNEL yöntemi kullanılarak topikal olarak uygulanan antifungal ajanların değişik derecelerde apoptozise neden olabileceği gösterilmiştir (TABLO 1). Ayrıca apoptotik değişiklikler elektron mikroskopisi

incelenmesiyle de desteklenmiştir. Uygulanan preparatlar içinde tolnaftat ve bifonazol kullanımı ototoksik yan etkisi bilinen neomisinin neden olduğu apopitozis oranına yakın oranlarda apopitozise neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu ajanların potansiyel olarak ototoksik oldukları söylenebilir. Tom tolnaftat kullanımında herhangi bir hücre kaybı izlemediğini bildirmektedir. Bu farklılık muhtemelen her iki çalışmada kullanılan inceleme metodlarındaki farklılıkla açıklanabilir. Tom kohleadaki tüylü hücre sayısına bakarak bunda azalma olup olmadığına bakmış. Biz ise apopitotik hücre sayısına baktık. Apopitotik değişim gösteren hücre morfolojisini korurken asıl değişiklikler hücre içi seviyesinde meydana gelmektedir. Dolayısıyla Tom çalışmasında normal morfolojideki hücrelerin bir kısmı muhtemeldir ki apopitotik değişime gitmiş olabilir. Sulkonazol ve nistatin kullanımının ise çok daha az oranda apopitozis gelişimine neden olduğu gözlenmiştir. Hatta hiçbir tedavinin uygulanmadığı negatif kontrol grubundakilere yakın oranlara sahip olduğu görülmüştür. Bu açıdan bu ajanların pratikte ototoksik olmadıkları söylenebilir. Benzer şekilde Tom da nistatin kullanımının hücre kaybına yol açmadığını bildirmiştir. Ancak nistatini tolnaftattan farklı olarak 2 kere uygulamıştır. Dolayısıyla bu doz farkının da sonuçlar üzerinde etkisi olabilir.

Özdoğan ve ark. nın bifonazol uygulanmasının elektrofizyolojik olarak herhangi bir değişikliğe yol açmadıklarını bildirdikleri çalışmanın sonucu bizim çalışmamızla çelişkili gibi gözükmemektedir (39). Ancak bu kullandıkları tedavi protokolüne bağlı gibi gözükmemektedir. Zira miringotomi yapıp DKK'na 1 hafta süreyle bifonazol damlatmışlardır. Ancak bu yöntemle ilacın yeterli miktarda orta kulağa geçip yuvarlak pencerenin perfüzyonuna neden olması şüphelidir. Biz ise direkt olarak orta kulağı dolduracak şekilde ilaç tatbik ettik. Bu farklılıktan dolayı hayvanlarda herhangi bir elektrofizyolojik değişiklik gözlememiş olmaları yüksek ihtimal dahilindedir.

Apoptozisin ototoksitede rol oynayan önemli mekanizmalardan biri olduğu çeşitli hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Xu ve ark. sisplatin verilmiş sıçanlarda apoptozisin SG ve korti organında hasara neden olan esas mekanizma olduğunu vurgulamışlardır (36). Lee ve ark. ise fare iç kulağına direkt olarak verilen sisplatinin mitokondriyal apoptotik sinyal yolunu kullanarak apoptozise neden olduğunu göstermişlerdir (40).

Bizim çalışmamızdaki diğer bir önemli bulgu da kullanılan ajanların neden olduğu apoptozisin aynı zamanda SL ve SG hücrelerinde de görülmesidir. Bu son zamanlarda literatürde yer alan bazı bulgularla paraleldir. Sone ve ark. tobramisin kullanılmış kistik fibrozisli hastaların temporal kemiklerinin incelenmesinde SG hücrelerinde dejenerasyon saptamışlardır (26). Yine Hoeffler ve ark. transtimpanik gentamisin uygulamasının SG hücrelerini ileri derecede etkileyebileceklerini ve belirgin tüylü hücre hasarı oluşmadan önce SG hücrelerinde hasara ve dolayısıyla erken işitme kaybına yol açtığını göstermişlerdir (41).

Moore ve ark. ise aminoglikozid antibiyotik kullanımını takiben kohlear nükleus nöronlarında kayıba neden olduğunu bildirmektedirler (42). Bizim çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız neomisin de benzer şekilde SG hücrelerinde apoptozis gelişimine neden olmuştur. Aynı gözlemlerin antifungal ajanların tatbikinden sonra da görülmesi genel olarak ototoksisitede SG hücrelerinin de harabiyete uğrayabildiklerini göstermektedir. Bu da ototoksik ajanların kullanımına bağlı kalıcı sensorinöral işitme kaybını açıklamaktadır.

Topikal ilaçların kohleaya ulaşım yolunun hayvanlarda ve insanda benzer olduğuna inanılmaktadır. Yuvarlak pencere membranı orta kulak ile iç kulak arasındaki tek yumuşak doku bariyeridir ve ototoksik ajanların kohleaya ulaşmalarının en direkt yolu olarak kabul edilmektedir. Diğer potansiyel geçiş alanları (oval pencere nişinin anüler ligamenti, fissula ante fenestra, kemik mikrofissürler, lenfatikler ve kan damarları) önemli geçiş yolu gibi gözükmemektedir. Ototopikal preparatlar yuvarlak pencere membranına penetre olur, perilenfe geçer, skala timpaniye giderek Korti organına ulaşırlar. Bununla birlikte deney hayvanları ve insanların anatomileri arasında belirgin farklılıklar vardır. Guinea piglerde yuvarlak pencere membranı direkt olarak orta kulak ile temastadır. Bu nedenle orta kulakta bulunan herhangi bir madde yuvarlak pencere membranı ile daha uzun süre temasta kalır. İnsanlarda ise yuvarlak pencere membranı bir kemik niş içinde bir reseste yer alır ve mukozal katlantılar ve membranlar spesmenlerin %70'inde nişi örtmektedir (21). Bu ilaçların yuvarlak pencere membranı ile temasını sınırlamaktadır. Ayrıca insanda yuvarlak pencere membranı 5-6 kat daha

kalındır ve daha fazla kollajen dansitesine sahiptir. Bu da yuvarlak pencerenin koruyucu bariyer etkisini arttırmaktadır.

Bu anatomik farklılıklar hayvanların ilaç ototoksitesine daha fazla duyarlı olmalarını açıklamaktadır. Bu durum aynı zamanda hayvan deneylerinden elde edilen sonuçların klinik uygulamalarda dikkatli kullanılmasını gerektirir.

Hayvan deneylerinde topikal kullanılan ilaçlar direkt olarak hastalık ve enflamasyonun olmadığı bir orta kulağa verilmektedir. İnsanlarda ototopikal preparatlar inflamasyon ve enfeksiyonu tedavi için kullanılırlar. Eşlik eden değişiklikler (mukozal ödem, granülasyon dokusu, efüzyon, püy ve hücre debrisler) yuvarlak pencere membranının penetrasyonu için ilave bariyer oluşturur. İnflamasyon da yuvarlak pencere membranının permeabilitesini değiştirebilir. Goycoolea ve ark. yuvarlak pencere permeabilitesinin orta kulak inflamasyonunun erken evrelerinde arttığını ve geç evrelerinde azaldığını bildirmişlerdir (15).

Sonuç olarak; topikal antifungal ajanlar değişik oranlarda olsa da ototoksik yan etkileri olabilir. Tolnaftat ve bifokonazol de bu etki daha belirgindir. Ancak guinea pig ile insan yuvarlak pencere membranı arasındaki farklılıklar nedeniyle bu bulguların insanlardaki değeri dikkatle yorumlanmalıdır. Yine de bizim çalışmamızda hem negatif hem de pozitif kontrol gruplarının kullanılmış olması sebebiyle antifungal ajanların potansiyel olarak ototoksik yan etkilere sebep olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle de antifungal ajanların timpan membran perforasyonu olan olgularda kullanılması düşünülüyorsa daha az ototoksositeye sahip olduğu gösterilen sulkonazolün tercih edilmesi daha uygun olacaktır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

DKK ile orta kulak boşluğunun devamlılığının olduğu vakalarda (timpan membran perforasyonu olanlar, ventilasyon tüpü olanlar, açık kaviteli mastoidektomisi olan hastalar) otomikozisin bulunması durumunda topikal antifungal ajanlarla tedavi sıkıntı yaratmaktadır. Bu ajanların otoksik yan etkilerinin bilinmiyor olması ve topikal kullanıldıklarında yuvarlak pencereden difüzyonla kohleaya geçebilmeleri kullanımları hakkında şüpheye neden olmaktadır.

Bizim çalışmamız göstermiştir ki topikal olarak kullanılan tolnaftat ve bifonazol belirgin şekilde apopitozise yol açarak ototoksik etki gösterebilmektedir. Nistatin ve sulkonazol kullanımı bu açıdan çok daha emniyetli olarak görülmektedir. Bu nedenle söz konusu vakalarda bu ilaçların tercih edilmesi daha yerinde olacaktır.

VII. ÖZET

Otomikozis tedavisinde kullanılan topikal antifungal ajanların ototoksik yan etkilerinin olup olmadığı hakkında yeterli veri mevcut değildir. Bu çalışmada tolnaftat, sulkonazol, bifonazol, nistatinin ototoksik etkileri 35 adet guinea pig'de incelendi. Bir grup hayvana da pozitif kontrol grubu olarak neomisin uygulandı. İlaçlar hayvanların sağ timpanik kavitelerine topikal olarak bir haftada üç kez uygulandı. Sol kulakları negatif kontrol grubu olarak değerlendirildi. Tedaviden 2 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilerek kohleaları ışın mikroskopisinde ve elektron mikroskopisinde incelendi. TUNEL boyaması yapılarak spiral limbus ve spiral gangliyondaki apoptotik hücre oranları belirlendi. Tolnaftat ve bifonazol uygulanan kulaklarda sulkonazol ve nistatin uygulananlara göre çok daha fazla sayıda apoptotik hücre tesbit edildi. Bu sonuçlar antifungal ajanların apoptozis yolunu kullanarak ototoksisiteye neden olabileceklerini, bu etkilerin sadece korti organında değil aynı zamanda spiral limbus ve spiral gangliyonda da gözlenebileceğini göstermektedir.

VIII. İNGİLİZCE ÖZET

There is a lack of data regarding ototoxicity of topically applied antimycotics. In this study, the ototoxicity of tolnaftat, sulcanosole, bifonazole and nystatin was studied in 35 guinea pigs. Neomisin was applied as a positive control group. Drugs was injected into the right tympanic cavity, three times in a week. Left ears were evaluated as a negative control group. Animals were sacrificed two weeks after treatment and the cochleas were examined under light microscopy and electron microscopy. The percentage of apoptotic cells in spiral limbus and spiral ganglion were determined by TUNEL method. The percentage of apoptotic cells were higher in ears which tolnaftat and bifonazole were applied, than in ears which sulconazole and nystatin were applied. This findings indicated that antimycotics might cause ototoxicity by apoptosis, this effect can be seen not only in organ of Corti but also in spiral limbus and spiral ganglion.

IX. KAYNAKLAR

1. Mugliston T, O'Donoghue G. Otomycosis- a continuing problem. J Laryngol Otol 1985;99:327-333.
2. Lucente FE. Fungal infections of the external ear. Otolaryngol Clin North Am 1993;26:995-1006.
3. Paulose KO, Al Khalifa S, Shenoy P et al. Mycotic infection of the ear (otomycosis): a prospective study. J Laryngol Otol 1989;103:30-35.
4. Tom LWC. Ototoxicity of common topical antimycotic preparations. Laryngoscope 2000;110:509-516.
5. Ozcan KM, Ozcan M, Karaarslan A et al. Otomycosis in Turkey: predisposing factors, aetiology and therapy. J Laryngol Otol 2003;117:39-42.
6. Marsh RR, Tom LWC. Ototoxicity of antimycotics. Otolaryngol Head Neck Surg 1989;100:134-136.
7. Schönebeck J, Zakrisson JE. Topikal 5-fluorocytosine therapy in otomycosis. J Laryngol Otol 1974;88:227-231.
8. Bassiouny A, Kamel T, Moawad MK et al. Broad spectrum antifungal agents in otomycosis. J Laryngol Otol 1986;100:867-873.
9. Stern JC, Shah MH, Lucente FE. In vitro effectiveness of 13 agents in otomycosis and review of the literature. Laryngoscope 1988;98:1173-1177.
10. Damato PJ. Treatment of otomycosis due to *Aspergillus niger* with tolnaftate. St Luke Hosp Gazete 1966;1:66-68.
11. Lawrence TL, Ayers LW, Saunders WH. Drug therapy in otomycosis: An in vitro study. Laryngoscope 1978;88:1755-1760.
12. Maher A, Bassiouny A, Moawao MK et al. An experimental evaluation of 6 antimycotic agents. J Laryngol Otol 1982;96:205-213.
13. Liston SL, Siegel LG. Tinactin in the treatment of fungal otitis externa. Laryngoscope 1986;96:699.
14. Spandow O, Anniko M, Moeller AR. The round window as access route for agents injurious to the inner ear. Am J Otolaryngol 1988;9:327-335.

- 15.** Goycoolea MV, Muchov D, Schachern P. Experimental studies on round window structure: function and permeability. *Laryngoscope* 1988;98(suppl 44):1-20.
- 16.** Wright A, Forge A, Kotecha B. Ototoxicity. In: Kerr AG, ed. *Scott Brown's otolaryngology*, 6th ed. Bath, England: Butterworth-Heinemann, 1997;3:20/1-20/36.
- 17.** Brockenbrough JM, Rybak LP, Matz GJ. Ototoxicity. In: Bailey BJ, ed. *Head and Neck Surgery- Otolaryngology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001;2:1894-1898.
- 18.** Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji – 1. cilt. 9. baskı*, Ankara: Hacettepe Tıp Kitabevi, 2000: 291-300.
- 19.** Hawkins JE. Drug ototoxicity. In: Keidel WD, Neff WD, eds. *Handbook of Sensory Physiology*, vol. 5. Berlin: Springer-Verlag. 1976:175-195.
- 20.** Rohn GN, Meyerhoff WL, Wright CG. Ototoxicity of topical agents. *Otolaryngol Clin North Am* 1993;26(5):747-757.
- 21.** Pickett BP, Shinn JB, Smith MFW. Ear drop ototoxicity: Reality or Myth? *Am J Otol* 1997;18:782-791.
- 22.** McCabe PA, Dey D. The effect of aspirin upon auditory sensitivity. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 1965;74:312-325.
- 23.** McFadden D, Plattsmier HS, Pasanen EG. Aspirin induced hearing loss as a model of sensorineural hearing loss. *Hear Res* 1984;16:251-260.
- 24.** Carson SS, Prazma J, Pulver SH et al. Combined effects of aspirin and noise in causing permanent hearing loss. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1989;115:1070-1075.
- 25.** Woodfort CM, Henderson D, Hamernik RP. Effects of combinations of sodium salicylate and noise on the auditory threshold. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 1978;87:117-127.
- 26.** Sone M, Schachern PA, Paparella MM. Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hear Res* 1998;115:217-223.

27. Roland PS, Rybak L, Hannley M et al. Animal ototoxicity of topical antibiotics and the relevance to clinical treatment of human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:557-578.
28. Çay F. Apoptozis. ÜNAL A, ed; *Klinik cerrahi onkoloji (içinde)*. 1. baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1997:32-34.
29. Nishizaki K, Yoshino T, Orita Y et al. TUNEL staining of inner ear structures may reflect autolysis, not apoptosis. *Hear Res* 1999;130(1-2):131-136.
30. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
31. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H et al. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996;49:103-111.
32. Niu X, Shao R, Canlon B. Suppression of apoptosis occurs in the cochlea by sound conditioning. *Neuroreport* 2003;14(7):1025-1029.
33. Li L, Nevill G, Forge A. Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J Comp Neurol* 1995;355:405-417.
34. Nakagawa T, Yamane H, Takayama M et al. Apoptosis of guinea pig cochlear hair cells following chronic aminoglycoside treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998;255:127-131.
35. Devarajan P, Savoca M, Castaneda MP et al. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 2002;166:62-71.
36. Xu HJ, Huang WN. Cisplatin-induced apoptotic cell death in spiral ganglion and organ of Corti of mongolian gerbil cochlear. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2003;38:98-100.
37. Watanabe K, Tomiyama S, Jinnouchi K et al. Apoptosis in the hydropic cochlea of guinea pigs following immune reaction of the endolymphatic sac: immunohistochemical analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258:296-299.

- 38.** Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res* 2002;166:62-71.
- 39.** Özdoğan HC, Seven H, Çakır BÖ ve ark. Kobaylarda topikal bifonazol uygulamasının ototoksik etkisinin fonksiyonel olarak araştırılması. *KBB Postası* 2003;13(4):170-176.
- 40.** Lee JE, Nakagawa T, Kim TS et al. A novel model for rapid induction of apoptosis in spiral ganglions of mice. *Laryngoscope* 2003;113(6):994-999.
- 41.** Hoffer ME, Allen K, Kopke RD et al. Transtympanic versus sustained-release administration of gentamicin: Kinetics, morphology, and function. *Laryngoscope* 2001;111:1343-1357.
- 42.** Moore DR, Rogers NJ, O'Leary SJ. Loss of cochlear nucleus neurons following aminoglycoside antibiotics or cochlear removal. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:337-343.