

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ  
HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Ahmet R. KARASALİHOĞLU

**DENEYSEL SİSPLATİN OTOTOKSİSİTESİNDE  
CURCUMİN'İN OLASI KORUYUCU ETKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

**Dr. Mehmet Turgay TÜRKMEN**

EDİRNE-2015

## **TEŐEKKÜR**

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki ilgi ve birikimimi artırmamı sağlayan çok değerli hocam Prof. Dr. Ahmet R. KARASALİHOĞLU'na; asistanlığım süresince her aşamada bilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Muhsin KOTEN, Prof. Dr. Mustafa K. ADALI, Prof. Dr. Cem UZUN, Prof. Dr.Recep YAĞIZ, Prof. Dr. Abdullah TAŞ'a; birlikte çalıŐmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi çalışma arkadaşlarıma ve katkılarından dolayı TÜBAP Birimi'ne, Yrd. Doç. Dr. Erdoğan BULUT ve Sn. Zatiye EVİKELLİ'e, özellikle hayatıma renk, huzur katan sevgili Elif'ime teŐekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>KULAK ANATOMİSİ</b> .....	3
<b>KOBAY (GUİNEA PİG) TEMPORAL KEMİK ANATOMİSİ</b> .....	9
<b>İŞİTME FİZYOLOJİSİ</b> .....	9
<b>OTOTOKSİSİTE</b> .....	15
<b>ANTIOKSİDANLAR</b> .....	18
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	23
<b>BULGULAR</b> .....	32
<b>TARTIŞMA</b> .....	46
<b>SONUÇLAR</b> .....	54
<b>ÖZET</b> .....	56
<b>SUMMARY</b> .....	58
<b>KAYNAKLAR</b> .....	60
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

- ABR** : “Auditory Brainstem Response”, İşitsel Beyinsapı Yanıtları  
**COX-2** : “Cyclooxygenase-2”  
**dB** : Desibel  
**DPOAE** : “Distortion Product Otoacoustic Emission”  
**DTH** : Dış Tüylü Hücreler  
**Hz** : Hertz  
**iNOS** : “Inducible Nitric Oxide Synthase”, İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz  
**İTH** : İç Tüylü Hücre  
**S/N** : “Signal/Noise” oranı, Sinyal/Gürültü  
**SG** : Spiral gangliyon  
**SV** : Stria vaskularis  
**TAC** : Total Antioksidan Kapasite  
**TM** : Timpan membran

## GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin (*Cisamminodikloroplatinum-II*) serviks, over, testis, mesane, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları ve cerrahi müdahalenin yapılamadığı baş boyun karsinomları gibi solid malign hastalıklarda sıkça kullanılan, etkin bir antineoplastik ajandır (1). Sisplatinin yaygın kullanımı kümülatif dozu ile doğru orantılı olarak artan ototoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite ve miyelosüpresyon gibi yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlanmaktadır. Ototoksisite ve nefrotoksisite diğer yan etkiler içinde en önemli doz sınırlayıcı yan etkilerdir (2). Günümüzde vestibüler hasar ve işitme kaybının önemli bir nedeni olan ototoksisite bazı kimyasal ve teropatik maddelere maruziyet sonucu gelişen vestibüler ve koklear hasara verilen genel bir tanımlamadır (3). Gentamisin gibi antibiyotikler, sisplatin başta olmak üzere birçok antineoplastik ajan, bazı diüretikler, antiinflamatuvarlar, antimalaryal ilaçlar ve bazı antiseptik solüsyonlar gibi birçok ilacın ototoksik etkileri bilinmektedir (4). Bu bir çok ilaç ve kimyasal içinde sisplatinin ototoksik etkisi yaşa, ilaç dozuna beraberinde baş boyun bölgesine radyoterapi uygulanıp uygulanmadığına, mevcut renal fonksiyona ve ek antineoplastik ilaç kullanımına göre değişmektedir (5). Sisplatinin ototoksikitesinde ki işitme kaybı; özellikle yüksek frekansları tutan, bilateral, progresif sensorinöral tarzda genellikle geri dönüşsüz özelliktedir (6,7).

Curcumin, Güneydoğu Asya toplumlarının günlük dietlerin de sıkça kullanılan curcumin longa bitkisinden elde edilen bir moleküldür. Zerdeçal olarak isimlendirilmektedir. Antioksidan, antineoplastik, anti enflamatuvar etkilerinin yanısıra antifungal, antiviral ve anti bakteriyel etkileri bilinmektedir. Yapılan birçok deneysel ve klinik çalışmada bu etkileri kanıtlanmıştır. Bu etkilerini stokinler, büyüme faktörleri veya direkt gen transkripsiyonu gibi etki mekanizmaları üzerinden gerçekleştirmektedir (8).

Bu alışma da amaç; gunie piglerde deneysel olarak oluşturulacak sisplatin ototoksisitesi temelinde meydana gelen oksidatif hasarın güçlü bir antioksidan etkinliği de olan curcumin ile önlenmesi hipotezini araştırmaktır. Çalışmamız ışık mikroskopisinde İmmünohistokimyasal incelemelerinin yanı sıra “Distortion Product Otoacoustic Emission” (DPOAE) ve işitsel beyin sapı yanıtları (ABR) ile odyolojik monitorizasyonu ve Total Antioksidan Kapasite (TAC) lmlerini de içermektedir.

## GENEL BİLGİLER

Hem işitme hem de denge organımız olan *organum vestibulocochleare* olarak isimlendirilen kulak; Valsalva'nın 1704 yılında ki tanımlamasından bu yana dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç ana parça altında değerlendirilmektedir (9).

### DIŞ KULAK

Temel olarak kulak kepçesi (*auricula*) ve dış kulak yolu (*meatus acusticus externus*) olmak üzere iki bölümde incelenir. İnsanların kulak kepçesi deri ve perikondrium ile örtülü kompleks kıkırdak yapıdan ibarettir. Kafa kaidesi ile kulak kepçesi arasında uzanan kasların işlevi yoktur. Kulak kepçesi bu pasif yapısına rağmen 5 kilohertz (kHz)'lik bir rezonans frekansına sahiptir. Kulak kepçesinin merkezinde konkal kıkırdak vardır ve erişkinlerde yaklaşık 2,5 cm uzunluğundaki kulak yoluyla devam etmektedir. Dış kulak yolunun 1/3' lük dış kısmı kıkırdak kısımdır ve serümen üreten bezlerle kıl folliküllerini içerir, zengin bir damarsal yapıya sahiptir. Medial 2/3' lük kısımda kemik ile çevrilidir. Cilt ince bir cilt altı dokusuyla periosta bağlıdır ve dokunmaya hassastır ve bu kısım glandlardan ve kıl folliküllerinden yoksundur. Dış kulak yolu oblik yerleşimli kulak zarı ile son bulan bir ucu kapalı bir boru şeklindedir. Bu yapısı eğriliğinin etkisi olmadan uzunluğu ile orantılı olarak 3,5 kHz lik bir rezonans yaratmaktadır. Dış kulak yolu epiteli timpanik membranın epidermal parçasıyla devam etmektedir (9,10).

## **ORTA KULAK**

### **Timpan Membran**

Dış kulak ile orta kulak boşluğunu birbirinden ayıran timpan membran çok katlı, oval biçimde bir perdedir. Erişkinde ortalama kalınlığı 0,07 mm, vertikal uzunluğu yaklaşık 9-10 mm ve horizontal uzunluğu 8-9 mm'dir (11). Timpan membran (TM) dış kulak yolu posterior duvarı ile geniş, ön duvarı ile dar açı yapmaktadır. Timpanik bölümü sulkus timpanikus içine oturur. Buna timpanomeatal halka denir. Halkanın üst ucu açık kalır (Rivinus çentiği). Burayı skuamöz kemiğin aşağıya doğru inen ve scutum adı verilen parçası doldurur. Kulak zarı, sulkus timpanikus içine anulus fibrozus ile tesbit edilmiştir (12). Timpan membran malleusun lateral çıkıntısı ile umbo arasındaki manibrium yapışıktır. Umbo TM'nin medial apeksini yapar (9).

Timpanik kemiğin her iki uzantısının bitim noktalarından malleusun başına doğru iki plika uzanır ve bunlar kulak zarını malleusa bağlar. Bunlara plika malleolaris anterior ve posterior adı verilir. Zarın timpanik kemik içindeki gergin ve esas titreşen kısmına pars tensa adı verilir. Rivinus çentiğini dolduran gevşek kısma ise pars flaksida (şarapnel zarı) adı verilir (11). Pars tensa normalde translüsendir. Bu nedenle bazen inkusun uzun kolunun ve inkudostapedial eklemin görülebilmesine izin verir. Pars tensa dış yüzde skuamöz, ortada fibröz ve iç yüzde ise mukozal tabakalardan oluşmuştur. Pars tensanın kenarlardaki liflerinin kalınlaşması ile fibröz anulus oluşur. Pars flaksida da lamina propria tabakası bulunmaz ve bağ dokusu lifleri daha seyrek (9,10)

Kulak zarının konumu düz değildir. Eğimli bir yerleşim söz konusudur. Kulak zarı konkav şekildedir ve çukur yerinde umbo adı verilen manibrium malleinin ucu bulunur (11).

### **Orta Kulak Boşluğu**

Cavum tympani temporal kemik içinde dış ve iç yüzleri birbirine çok yakın ince bir aralık şeklindeki boşluktur. Vertikal ve sagittal çapı ortalama 15 mm'dir. Transvers çapıysa yukarıda 6 mm, inferiora 4 mm'dir. Tuba östaki ile farinkse bağlı olduğundan içi hava ile doludur. Ayrıca iç ve dış duvarları arasında uzanan kulak kemikçikleri mevcuttur. Orta kulak boşluğu kulak zarı üst hizasından geçirilen horizontal bir hat ile 2 ana bölüme ayrılır. Üstte kalan bölüm epitimpanik reses olarak isimlendirilir (11). Malleusun üst bölümü ile incusun büyük bir bölümü epitimpanik resesde yer alır. Orta kulak boşluğunda TM' a gelen ses titreşimlerini iç kulağa ileten dıştan içe malleus, incus ve stapes denilen hareketli kemikçikler bulunur. Malleus baş, boyun ve manibrium mallei, anterior ve lateral çıkıntı denilen üç



bölümden oluşur. Manibrium mallei parçası ile kulak zarına yapışır. Malleusun üç adet asıcı ligamenti bulunur: Anterior malleolar, lateral malleolar ve superior malleolar ligament. İnkus, bir gövde ve iki koldan oluşur. İnkusun gövde kısmı malleus ile uzun kolu ise stapes ile eklem yapar. Medial ve lateral inkudomalleolar ligamanlar inkus gövdesini malleus başına bağlar. Vücudun en küçük kemiği olan stapes, baş, boyun, taban ve iki bacadan oluşur. Stapes tabanı ligamentum annulare ile oval pencereye sıkıca yapışır. Orta kulak üst, alt, iç, dış, ön, arka olmak üzere 6 duvarı vardır (9).

Üst duvar: Orta kulak boşluğunu kafa tabanından ayıran ince bir kemik tabakadır. Tegmen timpani olarak isimlendirilir.

Alt duvar: Orta kulak boşluğunu juguler fossadan ayıran ince ve dar bir duvar şeklindedir. Hücreler içeren kalın yapıda olabildiği gibi dehisanslar da içerebilir.

Arka duvar: Orta kulak boşluğunu mastoid hücrelere bağlayan mastoid antrumla komşuluk yapan bölümdür. Bu bölgede faysal kanalın son vertikal parçasının hemen önünde bulunan eminentia pyramidalis stapes kasının tutunduğu yerdir.

Ön duvar: Bu bölüm karotis kanalı ile komşu olduğu için *pars caroticus* olarak isimlendirilir. Orta kulak boşluğunu farinkse bağlayan tuba östaki ve tegmen timpaninin hemen altına yerleşen tensor timpani kası da bu bölümde bulunur.

Dış duvar: timpan membran ve bunun yapıştığı kemik halkadan oluşur.

İç duvar: iç kulağın vestibül bölümünün dış duvarıdır. Kokleanın bazal kıvrımının yapmış olduğu çıkıntı olan promontorium, oval ve yuvarlak pencere ve faysal sinirin geçtiği fallop kanalı gibi çok önemli komşuluklar ve yapılar mevcuttur (13).

## İÇ KULAK

Temporal kemiğin petros parçası içinde bulunan iç kulak canlının çevresine uyumunda en önemli duyulardan olan işitme ve denge duyusu ile ilgili spesifik duyu hücreleri ve organize yapıları içermesi nedeniyle ayrıca önem taşımaktadır (9). Anatomik isimlendirmede iç kulak tüm yapılarıyla birlikte *labyrinthus* olarak isimlendirilmektedir. Klinik pratikte ise genel olarak labyrinthus terimi iç kulağın vestibüler kısmını isimlendirmede kullanılır (12). İç kulak içi içe geçen iki kısımdan oluşmuştur; kemik labirent ve membranöz labirent.

Kemik Labirent: Membranöz labirenti hertarafından çepe çevre saran bir yapıdır. Kemik labirent vestibülüm, semisürküler kanallar, koklea, aquaduktus vestibuli ve aquaduktus koklea olmak üzere beş bölümden oluşur.

Vestibulum: Dıştan içe basık ovoid şekildedir. Sagittal, vertikal çapı 5mm ve transvers çapı 3mm dir. Orta kulak boşluğunun iç duvarını yapar. Stapes inkus aracılığı ile kendine gelen titreşimleri fenestra vestibülü aracılığıyla iç kulaktaki perilenfe ulaştırır. Ön duvar kokleaya komsudur. Üst ve arka duvarda semisirküler kanallarla birlesir. İç yan duvarda ise ön altta sakkulus'un yerlestigi sferikal resess, arka üstte ise utrikulus'un yerlestiği eliptikal resess bulunur (9).

Kemik semisirküler kanallar: Superior, posterior ve lateral (horizontal) olmak üzere üç adet semisirküler kanal uzayın üç ayrı düzlemine yerleşmiştir. Her biri yaklaşık olarak bir dairenin 2/3'ü kadar olan bu kanallar vestibulum'a açılır.

Koklea: Şekil itibariyle bir salyangoz kabuğuna benzediğinden bu isim verilmiştir. Vestibulumun ön iç tarafında bulunur. Bir koniye benzer ve yüksekliği yaklaşık 5 mm'dir. Modiolus, kanalis spiralis koklea ve *lamina spiralis ossea*'dan oluşur. Modiolus, kokleanın eksenini oluşturur. Modiolus içindeki ince kanallardan koklear damarlar ve VIII. Kranial sinirin lifleri geçer. Bu kanalcıkların hepsi modiolusun spiral bir şekilde olmasından dolayı modiolusun spiral kanalı adı da verilen Rosenthall kanalına açılırlar. Bu kanalın içinde ganglion spirale de denilen Korti ganglionu bulunur. Canalis spiralis koklea, modiolusun çevresini iki buçuk defa spiral olarak dolanan kemik bir yoldur. Bu yol, vestibulun ön alt kısmından başlar ve zirve veya kupula adı verilen kapalı bir uçla sonlanır. *Lamina spiralis ossea*, modiolustan uzanan kemik bir laminadır. Baziler membran adı verilen fibröz bir tabaka ile devam eder ve karşı duvara ulaşarak canalis spiralis kokleayı ikiye böler. Vestibulumu açılan üst parçaya skala vestibuli, fenestra koklea aracılığıyla cavum timpaniye açılan alt parçaya skala timpani denir. İki skala kokleanın tepesinde helikotrema denilen delikle birleşir. *Lamina spiralis ossea*'nın serbest kenarı ile canalis spiralis kokleanın dış yan duvarı arasındaki baziller membranın üzerinde, korti organı (*organum spirale*) adı verilen işitme organı bulunur (9,13,14).

Aquaduktus vestibuli: Vestibulumun iç yan duvarından başlayıp petröz kemiğin *fossa subarkuata* olarak isimlendirilen kısmında sonlanır. Bu kanalın içinde zar labirente ait duktus endolenfatikus ve onun ucunda sakkus endolenfatikus vardır (14).

Aquaduktus koklea: Skala timpaniden başlayıp petroz kemik alt yüzünde subaraknoidal boşluğa açılan kemik kanaldır. Bu kanal içinde *ductus perilenfaticus* ve *v.canaliculi* koklea vardır (9).

Membranöz labirent: Ektoderm kaynaklı olan membranöz labirent iç kulağın en önemli bölümüdür. İçinde bulunduğu kemik labirentten küçüktür ancak bazı yerlerinden kemik labirente tutunur. Bu iki labirent kısmın arasını perilenf doldurur. Membranöz labirent

utrrikulus, sakkulus, duktus semisirkularis, Duktus endolenfatikus, Duktus perilenfatikus, Duktus koklearis ve korti organından oluşmaktadır (9).

Utrrikulus: Vestibulumun iç yan duvarındaki resesus elipticusda bulunur. İç yan duvarında sakkula utrikului adı verilen kısımda denge hücreleri bulunur ve buradan n. utrikularis başlar. Utrrikulusta duktus semisirkularis'lerin açıldığı beş ve utrikülokoklear duktus'un açıldığı bir adet delik bulunur (12).

Sakkulus: Vestibulumun iç yan duvarındaki resesus sphericusda bulunur. Bunun da iç yan duvarında makula sakkuli adı verilen kısımda denge hücreleri vardır ve buradan n.sakkularis başlar. Sakkulusta bir tane utrikülosakküler duktus'a ait, bir tane de sakkulusu duktus koklearis'e bağlayan duktus reuniense ait iki delik vardır (12).

Duktus semisirkularis: Kemik semisirkuler kanalların içerisinde bulunurlar. Ancak kemik kanalların ancak 1/4'ünü doldururlar. Diğer kısımlar perilenf ile doludur. Membranöz kanalların ampullaları içerisinde krista ampullaris adı verilen kabarık bölgelerde duyu epiteli mevcuttur. Buralardan n. ampullaris anterior, n. ampullaris posterior ve n. Ampullaris lateralis başlar. Her üç n. ampullaris daha sonra n. utrikularis ve n. sakkularis ile birleşerek n. vestibularis'i oluşturur (9,12).

Duktus endolenfatikus: Duktus utrikulosakkularis adlı yapıdan köken alır. Aquaduktus vestibuli adlı kemik kanal içinde ilerler. Fossa subarkuata'daki sakkus endolenfatikus adlı şişlikte dura mater altında sonlanır (9).

Duktus perilenfatikus: Aquaduktus koklea içerisinde bulunur ve skala timpani ile subaraknoid boşluğu birleştirir. İçinde perilenf bulunur (11).

Duktus koklearis: İki ucu kapalı üç yüzlü bir boru şeklinde olan duktus koklearisin tepesinde bulunan kör ucuna çekum kupulare, taban kısmındaki kör ucuna ise çekum vestibulare denir. Çekum vestibulareye yakın bölümünden çıkan duktus reuniens aracılığıyla sakkulusa bağlanır. Duktus koklearis koklear kesitlerde üç duvarlı bir yapı olarak görülür (9,11).

a. Reissner membranı (membrana vestibularis): Duktus koklearisin üst duvarını oluşturur. Skala vestibuli ve skala mediyayı (duktus koklearis) birbirinden ayırır.

b. Ligamentum spirale koklea: Duktus koklearisin dış duvarını oluşturur. Lamina bazillarisin tutunduğu yerdeki çıkıntılı kenarına crista bazillaris; hemen yukarısındaki oluğa sulcus spiralis eksternus; bu oluşumu yukarıdan sınırlayan çıkıntıya prominentia spiralis denir. Dış duvar iç yüzünde stria vaskularis denilen damardan çok zengin bir tabaka mevcuttur.

c. Korti organı (organum spirale): Duktus koklearisin içinde ve alt duvarını oluşturan lamina bazalisin iç üst bölümü üzerine oturur. Çekum kupulaya kadar uzanır.

İç Kulağın Damarları: Labirentin arter, çoğunlukla a. cerebelli anterior inferior'dan ayrılır ve labirenti kanlandırır. Labirentin arter, baziller arterden hatta doğrudan vertebral arterden de çıkabilir. İç kulak kanalına VIII. kranial sinirle birlikte girer ve iki ana dala ayrılır. a. vestibularis anterior ve a. cochlearis communis. Bu dallardan, vestibülü ve kokleayı besleyecek olan dalcıklar çıkar(a. vestibulocochlearis ve a. Cochlearis). Vestibulokoklear ve koklear arter, koklear kanalın lateral duvarında stria vaskularis ve spiral laminada kapiller ağ oluşturarak sonlanır. Koklear arter apekse doğru ilerlerken spiral modiolar arter adını alır. Bu arter bir end arterdir ve obstrüksiyonları sağırlığa yol açabilmesinden dolayı önemlidir. Spiral modiolar arterden arterioller ayrılarak kapiller dallar verirler ve koklear beslenmeyi temin ederler. İç kulağın venöz dönüşü arterlerle birlikte seyreden yandaş venlerin birleşmesi yolu ile oluşan v. labirentica ile olur. Bu da sinüs petrosus superior ve inferior, sinüs transversus ve v.jugularis interna'ya dökülür. Lenfatik sistem endolenf ve perilenf olarak kabul edilir. Bunlar da beyin omurilik sıvısına dökülürler (9,11).

İç kulak sinirleri: Rosenthal kanalındaki spiral gangliyon bipolar afferent sinirlerin hücre gövdeleri tarafından oluşturulur. İki tip nöron vardır. Tüm nöronların %95'ini oluşturan tip 1 nöronlar myelinlidir ve iç tüylü hücrelere dağılırlar. Tip 2 nöronlar myelinsizdir. Toplam nöronların sadececa %5'ini oluştururlar ve dış tüylü hücrelere dağılırlar. Lifler kendi myelin tabakalarını kaybettikleri yer olan habenula perforata yoluyla kemik spiral laminadan corti organına ulaşırlar. Dış tüylü hücrelere yönelen lifler, Deiters hücreleri arasındaki üç grup içerisinde olanspiral ve baziller membran boyunca korti tüneline girerler. Terminal dallar ise spiral liflerden kaynaklanırlar ve çok sayıda dış tüylü hücreyi inerve ederler. Bunun tersine her bir iç tüylü hücre çok sayıda tip 1 lif ile inerve olunur. Tüm sinir sonlanması kadeh şeklinde ve vezikülsüzdür. Granülsüz sonları ile birlikte bu afferent liflere ilaveten granüle olmuş birçok sinir sonlanması hem dış tüylü hücre ile hem de afferent liflerin terminal sonlanımları ile kontakt yapacak şekilde organize olurlar. Bu granüle olmuş sinir sonlanmaları Rasmussen'nin olivokoklear demetindeki beyin kökünden kaynaklanan efferent liflerdir. Hücre gövdeleri süperior olivuar kompleks içerisinde yerleşmiştir. Lifler inferior vestibuler sinir ile birlikte ilk olarak beyin kökünde ilerler fakat vestibulokoklear anastamoz şeklinde kokleaya girerler. İntraganglionik spiral demetlerde lifler, internal spinal demetler ile iç tüylü hücreleri inerve eden afferent liflere dağılırlar. Alternatif olarak lifler korti tüneline ortasından geçerler ve iç saç hücrelerinin gövdelerine dağılırlar. Bu liflerin baskılayıcı karakterde olduğu sanılmaktadır (14).

## **KOBAY (GUİNEA PİG) TEMPORAL KEMİK ANATOMİSİ**

İşitme ve denge üzerine birçok klinik ve deneysel araştırma yapılmaktadır. Bu deneysel çalışmalarda son yıllarda özellikle guinea pig'ler kullanılmaktadır. Guinea pig bir çok yönden otolojik araştırmalarda iyi bir deneysel çalışma objesidir (15). Timpanik bullanın ve kokleanın görece büyük yapısı, koklea, orta kulak ve timpan zarın insan daki karşılıklarına benzerlikleri ve iç kulağa hem deneysel maddelerin ulaşım kolaylığı hemde diseksiyonla kokleya ulaşmanın kolay olması en önemli avantajlarıdır (16). Kobay iç kulağı ve temporal kemiği incelendiğinde insan temporal kemiğine benzemekle birlikte deneysel çalışmalarda dikkat edilecek bazı ayrıntıların varlığı dikkat çekmektedir. Bu benzerlik ve farklılık gösteren bazı özellikler şunlardır:

Koklea orta kulağa doğru dah fazla projeksiyon yapar ve orta kulakta hipotimpanum, mezotimpanumu kapsayan oldukça geniş bir bulla bulunur (17).

İnsanda koklea 2,5 kıvrım yaparken guinea pig' de kıvrım sayısı çeşitli diseksiyon çalışmalarında 3,25 ile 4,25 arasında değiştiği belirtilmiştir (14-18).

Oval ve yuvarlak pencere birbirine dik pozisyonda yerleşmiştir (17).

Guinea pigde ince trabeküllerle ayrılmış multipl hücreler yerine ikisi temporal kemiğin süperiorunda olmak üzere büyük kaviteden oluşan üç adet hücre bulunur (15,16).

Kokleanın bazal kıvrımının hemen üzerinde yuvarlak pencere bulunur. İnsandan farklı olarak yuvarlak pencere horizontal planda yerleşmiştir (17).

Koklea büyüklüğü çalışmalar için ideal boyutta olmasına rağmen semisürküler kanallar oldukça incedir ve anterior semisürküler kanal ile lateral semisürküler kanal vestibüle girmeden önce birleşirler (17).

## **İŞİTME FİZYOLOJİSİ**

Ses elastik bir ortamda partiküllerin yer değiştirmesi sonucu ortaya çıkan kompresyon ve titreşim dalgalarından ibaret bir basınç değişimidir. Kaynağında oluştuktan sonra kulağa dalgalar halinde gelen ses enerjisi dış orta ve iç kulakta aktarılarak ilerlerken dönüşüme uğrar. İç kulakta elektriksel bir enerjiye dönüşür ve aktarıldığı temporal lobda ki Heschl girusu olarak isimlendirilen transvers girusda bu elektriksel ifadenin algılanması sağlanır. Tüm bu sistemi oluşturan sisteme işitme sistemi denir. Bu sistemin parçaları işitme sisteminin değişik safhalarında görev alırlar (19). Bu safhalar esasen dört kısımda incelenir:

- İletim (''conduction'')
- Enerji dönüşümü (''transduction'')
- Sinirsel kodlama ve aktarma (''neural coding and relay'')

- Sesin algılanması ve birleştirilmesi (“cognition and association”) (19).

### **İletim Fazı**

Dış ve orta kulak işitme organının iletim komponentini oluştururlar. Ses dalgası hava gibi düşük empedanslı bir ortamdan iç kulak sıvısı gibi yüksek empedanslı bir ortama geçerken önemli miktarda enerji kaybına uğrar. Dış ve orta kulak kendi frekans aralığında sesi amplifiye ve modifiye eder. Kulak kepçesi ve dış kulak yolu işitmede pasif bir role sahiptir. Çevreden aldıkları sesi timpan membrana iletirler. İki temel etkileri vardır. Belirli frekans aralığında daha belirgin olmak üzere kulak zarı üzerine olan ses basıncını artırır ve ses kaynağının yönüne bağlı olarak ses basıncının farklı olması nedeniyle sesin lokalizasyonunu belirlemeye yardımcı olur. Normal şartlarda ses binaural işitilir. Ses önden geliyorsa iki kulağa aynı anda ulaşır. Sağdan gelen ses sağ kulağa daha önce ulaşır. Bu durum ses dalgalarının sol kulağa daha geç ulaşmasının yanında başın gölge etkisiyle sesin şiddetinin azalması ile de olmaktadır. Süre ve şiddetteki bu interaural farklılık sesin yönlendirilmesinde önemlidir (19). Kulak kepçesi ve dış kulak yolu ses dalgasının amplifikasyonu işlemine katılır. Eğer ses dalgası başla 45 derecelik açı ile gelirse, Kulak kepçesine bağlı olarak 4 kHz de 3 dB lik bir pik amplifikasyon oluşur. Kulak konkası 4-5 kHz de 10 dB lik bir maksimum kazanç sağlar. Dış kulak yolu 1-8 kHz arasında belirgin olan ancak 2,5 kHz de zirve yaparak 15-20 dB i bulan bir kazanç sağlar. Dış kulak yolu bu görevi akustik bir rezonatör gibi davranarak gerçekleştirir ve sonuçta kulak zarı üzerindeki ses basıncını artırır. Dış kulak yolu bir ucu açık boru gibi davranarak, uzunluğuyla orantılı olarak rezonatör özelliği kazanır. Ayrıca ısı hava moleküllerinin hızını etkiler. Dış kulak yolu havayı ısıtmak suretiyle özellikle dış hava ısısı ile orta kulaktaki hava ısısının çok farklı olduğu ortamlarda bu minimal etki önem kazanabilmektedir. Daha geniş olan pars tensa ve daha dar olan pars flaksida olmak üzere iki ana kısımdan oluşan kulak zarı ses dalgalarını sesin geliş açısından etkilenmeden sadece dış yüzeyi ile alır. Amortisman kapasitesi çok yüksektir. Sesli uyarı aldıktan sadece 0,004 sn sonra istirahat pozisyonuna geçmektedir. Ayrıca titreşimleri frekans özgü özelliktedir (19). Kulak zarının ses dalgaları ile titreşimi konusunda fikir birliği yoktur. Khanna ve Tonndorf kendi kulak zarlarında yaptıkları araştırmada frekanslara bağlı timpanik membranda spesifik hareketler belirlemedişlerdir (20). Orta kulak yapılarının anatomik pozisyonları ses dalgalarının amplifikasyonunu kolaylaştırır. Oval pencere içinde stapesin piston benzeri titreşimi, oval pencere aracılığıyla skala vestibüliye aktarılan basıncın, yuvarlak pencere aracılığıyla skala timpaniye aktarılan basınçtan çok daha yüksek olmasını sağlar. İki skala arasında ki bu basınç farkı koklear yapıların mekanik uyarımı için önem taşır.

Ayrıca orta kulak koklear sıvılara iletilen ses enerjisini arttırmak suretiyle bir transformatör görevinde yapar. Ses havadan perilenfe geçerken 30 dB lik bir kayba uğrar. Yani havadan direkt perilenfe ses geçişi etkisizdir. İşte orta kulak ses sinyalini düşük basınçlı hava ortamından yüksek basınçlı sıvı ortama geçirirken kuvvetlendirir. Bu kuvvetlendirmeyi amplifikatör gibi basit bir cihaz gibi yapmaktan ziyade transformatör gibi görev yaparak sağlar. Bunu yaparken titreşim hızını koklear sıvıların empedansına uyumlu olarak azaltmak suretiyle ses basıncını arttırır (12,19). Orta kulak transformatör etkiye çeşitli mekanizmalarla katılır. Temel faktör yüzey alan farklılığıdır; TM yüzeyi (A1), stapes taban yüzeyi (A2). Sabit bir kuvvet uygulamasında küçülen yüzeyle orantılı olarak basınç artar. Stapes tabanına uygulanan basıncı (P2) formülize edersek;  $P1/P2=A1/A2$ . Ölçümler göstermektedir ki, yüzey alanından kaynaklanan farklılık stapes tabanında 22/1 oranında bir basınç farkı yaratmaktadır. Ses geniş yüzey alanlı TM'dan oval pencereye iletilirken böylece amplifiye olur. İkinci önemli faktörde kemikçiklerin kaldıraç etkisidir. Malleus ve incus koronal uzanımda birlikte titreşirler. Malleus uzun eksenini incus uzun kolundan 1,3 kat daha uzun olduğundan kaldıraç etkisiyle ses iletiminde 1.3/1 oranında bir artış sağlanır. Orta kulağın kazandırdığı işitme kazancı düşük frekanslarda daha yüksektir. Orta kulak basınç kazancı 1kHz altında ki frekanslarda ortalama 23 Db'dir ve 900 kHz de 26-27 dB ile zirveye ulaşır. 1kHz üzerindeki frekanslarda her oktavda kazanç ortalama 9 dB azalır, 7 kHz üzerinde çok küçük amplifikasyonlar olur (19).

### **Enerji Dönüşümü ("Transduction")**

Baziller membran hareketleri ile sinir enerjisinin oluşması sürecidir. İşitme sisteminin reseptör organı olan koklea bir ses dalgasını nöronal süreçlere aktarılabilen bir elektrokimyasal uyarana dönüştürür. Koklea dört temel ekstraselüler elektriksel potansiyel süreç ile bu işlemi gerçekleştirir (12,19).

- Endolenfatik=endokoklear potansiyel
- Koklear mikrofonik
- Sumasyon potansiyeli
- Tüm sinir aksiyon potansiyeli veya koklear birleşik aksiyon potansiyeli

**Endolenfatik=Endokoklear potansiyel:** Endokoklear potansiyel akustik uyarandan etkilenmeyen, skala medyada var olan bir elektriksel potansiyeldir. Stria vaskülarisde yerleşik

olan NaKATPaz pompası tarafından oluşturulur. 80-100 mV değerinde direkt bir akımdır. Hipoksiden etkilenir, oksidatif yolla hasar oluşturan ajanlara oldukça hassastır (12,19).

**Koklear mikrofonik:** Corti organında ki dış tüylü hücrelerin silyalı yüzeyinden kaynaklanan değişken bir elektriksel potansiyeldir. Koklear mikrofonu'nin elektriksel dalga formu uyarının elektriksel dalga formuna çok benzer. Koklear mikrofonu aynı kişide bile ölçümler sırasında amplitüd ve faz bakımından büyük değişkenlikler gösterir. Hep ya da hiç eşikleri, refrakter periyodları olmadığı için yorgunluk veya adaptasyon göstermezler (12,19).

**Sumasyon potansiyelleri:** Tüylü hücrelerin içindeki elektriksel potansiyelin yönlendirdiği bir akımdır, daha çok Dış tüylü hücre (DTH)'lerin hücre içi potansiyel ile ilgilidir. Ses uyarınının frekansına ve şiddetine bağlıdır. Hipoksi ve ototoksiste gibi durumlarda Koklear mikrofonu azalır ve Sumasyon Potansiyeli negatifliği artar. Negatif Sumasyon Potansiyelleri iç tüylü hücre (İTH)'lerden, pozitif Sumasyon Potansiyelleri DTH'lerden kaynaklanırlar. Bu potansiyel ses uyarımı sırasında skala timpani ile skala medya arasındaki basınç değişimleri ile oluşan baziller membran hareketlerindeki asimetriyi yani endolenfatik basınç değişimlerini yansıtır (12,19).

**Tüm sinir aksiyon potansiyeli veya koklear birleşik aksiyon potansiyeli:** Tüm sinir aksiyon potansiyeli işitme sinir liflerinden kaynaklanır. Tüm sinir aksiyon potansiyeli'nin amplitüdü, uyarılma eşiğinin 40-50 dB üstünde artar. Fakat latent süre şiddet arttıkça azalır. Stapes aracılığıyla oval pencereye ve skala vestibüliye aktarılan ses dalgası, baziller mebranda ve dolayısıyla korti organında harekte ve sonuçta yuvarlak bencere membranında distansiyona yol açar. Baziller membran hareketinin frekansı ile ses uyarınının frekansı denktir ve bu durum transdüksiyon sürecinin ilk aşamasını oluşturur. Bu vibrasyon koklea bazalinden apeksine doğru hareket eden bir dalga oluşturur. Yüksek frekanslı seslerin uyarımı ile oluşan dalgaların zirvesi koklea tabanında, düşük frekanslı seslerin oluşturduğu dalganın zirvesi ise koklea apeksinde oluşur. DTH'lerin hücre iskeletinde aktif olarak frekans seçiciliği sağlayan kontraktıl proteinler vardır. DTH'lerin kas benzeri boy değişiklikleri onun elektrik polarizasyon derecesini değiştirmektedir. DTH'ler baziller membran vibrasyonunu amplifiye edebilirler. Ayrıca DTH'ler bazalde kalın ve kısa apikalde ince ve uzundur. Bu frekans seçiciliği için önemli bir faktördür. Baziller membran erişkin insanda ortalama 32 mm uzunluğunda bağ dokusundan oluşmuş bir membrandır. Genişliği bazalden apekse doğru giderek artar. Genişliğinde ki bu değişim membranın frekans seçiciliğinde ve ses şiddetinin



algılanmasında önemli bir yer edinir. Bazal membranın dış yanında spiral ligamente yakın hücreler Cladius ve Boettcher hücreleri olarak adlandırılır. Koklear duktusun spiral ligamana doğru kalınlaşarak üç tabaka haline gelir. Koklear duktusun tabanı içte kemik spiral lamina tarafından oluşturulur. Biri üstte diğeri altta iki çıkıntı yapar. Üst çıkıntı spiral limbus olup buraya tektoriyel mebran yapışır. Alt çıkıntından ise Corti organına ulaşan koklear sinir lifleri geçer. Skala timpanide membranöz yapının üzerinde Corti organı yerleşmiştir. Bu yapı iki yandan iki sulkus ile ayrılır. Corti organı İTH, DTH'leri yani işitsel duyu hücrelerini ve destek hücrelerini içerir. İTH'ler genellikle düzenli tek sıra halinde DTH'ler ise 3-4 düzensiz sıra halinde yerleşirler (19,21). İç ve dış tüylü hücreler deiters ve hensen hücreleri başta olmak üzere çeşitli destek hücreleriyle deteklenirler. Her tüylü hücrenin corti organı içinde yer alan gövdesi ve kutiküler tabaka olarak isimlendirilen kalın üst yüzü vardır. Bu üst yüzden gerçek silya olmayan stereosilyalar çıkar. İTH ve DTH sıraları birbirlerinden corti tüneli ile ayrılırlar. İTH'lerin Corti tüneli doğrultusunda dar tepeli, gevşek yapılı büyük bir gövdesi vardır. Hücrenin alt kısmını saran sinir lifleri vardır. Kalın kutiküler tabakadan çıkan stereosilyalar, koklear duktus eksenine paralel 2 veya 3 sıra halinde dizilirler. En içteki sıra en kısa iken en dıştakiler en uzundur. Koklear duktus boyunca dış tarafta yerleşen stereosilyaların boyu lineer artar. Baziller membran 20.000-30.000 civarında basiller lif içerir. Bu liflerin uçları, kokleanın merkezi kemik çatısı içine sıkıca tespit edilmiştir. Fakat distal uçları serbest olup, bu gevşek basiller membran içine gömülü durumdadır. Lifler sert ve bir uçları serbest olduğundan titreşim yapabilirler. Baziller liflerin uzunlukları kokleanın tabanından tepesine doğru artarak devam eder. Ancak basiller liflerin çapları ve sertlikleri apekse doğru giddikçe belirgin bir şekilde azalır. Böylece oval pencereye yakın yerlerde yerleşik olan sert ve kısa lifler yüksek frekanslarda en iyi titreşimi gösterirken, apekse yakın yerleşik uzun ve esnek lifler düşük frekanslarda en iyi titreşimi gösterirler. İlerleyen dalganın yapısında iki komponent bulunmaktadır. Birincisi geniş olarak ayarlanmış, rölatif olarak küçük yer tutatan baziller membran ve koklear sıvıların pasif mekaniğinden kaynaklanan kısım (22). Diğeri de büyük amplitüdü dalganın frekansa özgülüğünü sağlayan kısımdır. Baziller membran mekanik titreşimi arttıran biyolojik aktif bir amplifikatör gibi davranır. Mevcut dalga basiller membranda dalga frekansına eşit doğal rezonans frekansına sahip bölgeye ulaştığında daha güçlü bir hal alır. Sonuç olarak dalga bu noktada ortadan kalkar ve daha ileriye ilerleyemez. Ses dalgası ile tüylü hücrelerin uyarılmasına bağlı hücre içinde oluşan reseptör potansiyelinin üç komponenti vardır. Temel cevap ses uyarımına bağlı depolarizasyondur. Depolarizasyonun büyüklüğü belirli bir noktaya kadar uyarımın şiddetine bağlıdır. Bu noktadan sonra uyarımın şiddeti reseptör potansiyelini arttıramaz. Buna ek olarak

ses dalgasının frekansına bağlı olarak alternatif akımlı bir potansiyelde oluşur. Uyarımla elde edilen dalga hareketiyle stereosilyalarda öne arkaya doğru oluşan hareket tüylü hücrelerde alternatif akımlı bir depolarizasyon-hiperpolarizasyon döngüsü meydana getirir (19,22). Akustik uyarımla tüylü hücrelerde bir direkt akımda oluşur. Tüylü hücreler, stereosilya defleksiyon yönüne göre depolarize veya hiperpolarize olur. Ancak belirli bir defleksiyon derecesinde, depolarizasyon büyüklüğü hiperpolarizasyonunkinden fazladır. Bu yüzden dalga uyarısı net bir doğrusal akım depolarizasyonuna yol açar. Bu durum depolarizasyon ve hiperpolarizasyon cevaplarının büyüklükleri arasında ki farkı gösterir. İç tüylü hücre depolarizasyonu ile hücre yan membranlarında ki voltaj bağımlı iyon kanalları aktive olur. Hücreden K çıkışı sırasında Ca girişi olur. Depolarizasyon şiddetine bağlı olarak Ca girişiyle orantılı şekilde nörotransmitter salınımı olur ve afferent hücreler uyarılır. DTH depolarizasyonu İTH'lere benzer ancak depolarizasyon sonuçları farklıdır. DTH'ler çoğunlukla efferent liflerle inerve olur. Böylece kokleanın hassas ton ayarını sağlamaya yardımcı olur (21,22).

### **Sinirsel Kodlama ve Aktarma (“Neural Coding and Relay”)**

İşitme siniri koklea ile beyin sapını koklear çekirdekler düzeyinde birbirine bağlar. İnsan koklear sinirindeki miyelinli liflerin sayısı yaklaşık 30.000-35.000 arasındadır. İki tip koklear afferent sinir bulunur. Toplamın %95 ini oluşturan tip 1 sinirler, geniş hücre gövdelidirler. Yalnızca İTH'lerle sinaps yaparlar. Geri kalanını oluşturan tip 2 sinir lifleri, miyelin kılıftan yoksundur ve DTH'lerle sinapsdadırlar. Sinir hücreleri spiral gangliyonda bulunur. Aksonları modiulus ve iç kulak yolundan geçerek serebellopontin köşeden beyin sapına girer. Bu sırada kokleanın bazal kıvrımından kaynaklanan lifler, sinir gövdesinin periferinde ve aşağısında, apikalden gelen lifler ise merkezde yer alır. Tip 1 miyelinli lifler bipolardır. Spiral ganglionlarda çıkan dentritler İTH'lere giderken aksonlar superior olivar komplekse ulaşır. Tip 2 hücreler monopolar liflerdir ve DTH'lerde sonlanırlar. İşitme siniri istirahat halinde bile spontan elektriksel deşarj gösterir. Sinir lifleri bu deşarj derecesine göre yüksek, orta ve zayıf olarak üç gruptur. En hassas olan lifler yüksek deşarj gösteren liflerdir ve düşük şiddette ki ses uyarımına yanıt verirler. Kalın dentritleri vardır İTH ve DTH'lerin yüzeyine bakan kısımlarda sonlanırlar. Diğer lifler ince dentritlere sahip olup İTH'lerin modiulusa bakan tarafında sonlanırlar. Tüylü hücrelerde olduğu gibi her sinir lifinin duyarlı olduğu bir frekans vardır. Kokleadaki nonlineer özellik sinir liflerindedir aynen görülür. Yani sinir lifleri ilişkide oldukları tüylü hücrenin özelliklerini aynen gösterirler (19).

### **Sesin Algılanması ve Birleştirilmesi (“cognition and association”)**

Spiral gangliyondaki sinir hücrelerinin aksonları koklear nükleus düzeyinde sonlanır. Bunların her birinin nukleous içinde sonlandığı hücre farklıdır. Koklear nükleous içinde beş ayrı hücre tipi bulunur. Dış görünüşlerinin yanı sıra fizyolojik görevleride birbirinden farklıdır. Koklear nukleolusdan çıkan liflerin çoğu beyin sapında çaprazlaşarak karşı taraf superior olivuar komplekse giderler az miktarda lif ise ipsilateral taraf superior olivuar komplekse ulaşır. Superior olivuar kompleks işitme sisteminin ilk merkezi olarak kabul edilir. Superior olivuar kompleks üzerindeki işitsel çekirdekler her kulaktan inhibisyon ve eksitasyon yapan lifler alırlar. Genellikle karşı kulaktan gelen lifler eksitasyon yaparken aynı kulaktan gelen lifler inhibisyon yapmaktadırlar. Assendan ve desendan işitsel liflerin oluşturduğu demet lateral lemniskus olarak isimlendirilir. Dorsal ve ventral iki nukleusu vardır. Alçak frekans hücreleri dorsal, yüksek frekans hücreleri ventral planda yerleşmiştir. Diğer işitme çekirdekleri gibi ancak daha az düzeyde işitme kodlaması yaparlar. Retiküler formasyonla olan bağlantısı nedeniyle işitsel uyanıklık ve alışkanlıkta rolü bulunmaktadır. Superior olivuar kompleks ve lateral lemniskusta bir şekilde değişikliğe uğramış olan akustik bilgi orta beyinde inferior kollikulus tarafından alınır. Koklear çekirdek kaynaklı liflerin çoğu karşı taraf koklear çekirdeğe geçip inferior kollikulusa doğru uzanır. Talamusda ki işitsel bölge olan medyal geniculat cisim ipsilateral olarak inferior kollikulus ve korteksten uyarıları alır. Tonotropik bilgi buradan kortekse kaydedilmeden iletilir. Serebral korteksin işitme alanları superior temporal girusun sylvian fissürü kısmında ve paryetal operkulumdadır. Bu merkezi işlem alanı assendan çekirdeklerde tonotropik olarak düzenlenmiştir, diğer duyuusal sistemlerle de etkileşen verileri alır. Bu alan hem refleks hemde entelektüel cevaplar için karmaşık bir bütünleştirici sistemdir (19).

### **OTOTOKSİSİTE**

Bir ilacın, kimyasal ajanın iç kulakta fonksiyonel bozulma veya hücresel dejenerasyon yolu ile işitme kaybı ve/veya denge bozukluğu semptomları oluşturması durumunda genel olarak ototoksiteden bahsedilir. Odyolojik değerlendirme ile ototoksiteden bahsedilebilmesi için genel olarak ard arda en az iki frekansda 20 dB veya daha fazla sensorinöral tipte işitme kaybı gelişmiş olması gerekir (3). Literatürde birçok ototoksik ajan mevcuttur. Seligman ve ark. (23) tarafından yapılan bir çalışmada 130 civarında potansiyel ototoksik ajan belirtilmiştir. Gentamisin gibi antibiyotikler, sisplatin başta olmak üzere birçok antineoplastik ajan, bazı diüretikler, antienflamatuvarlar,

antimalaryal ilaçlar ve bazı antiseptik solüsyonlar, arsenik etil ve metil alkol gibi bir çok ilacınve kimyasal maddenin ototoksik etkileri bilinmektedir (23). Birçok medikal tedavi ajanı oral, parenteral veya topikal uygulama sırasında iç kulakta ototoksik etki yapabilecek etkin dozlara ulaşabilmektedir. Ototoksik ajanlar iç kulakta öncelikle belirli bir bölgeyi etkilerler ama artan toksik süreç ile diğer bölgelerde bu etkiye maruz kalır. Sisplatin, salisilatlar, kanamisin ve neomisin daha çok direkt kokleya tüylü hücrelere, furosemid, etakrinik asit, sisplatin stria vaskularise ve gentamisin, streptomisin vestibüle toksik etkilidirler (11). İlaçlara bağlı ototoksisitede ensık görülen semptomlar tinnitus, dengesizlik ve işitme kaybıdır. Tinnitus genellikle yüksek frekanslardadır ve toksik etkinin habercisidir. İşitme kaybı genellikle yüksek frekansları tutan, bilateral, simetrik sensorinöral tipte ve ilerleyici bir karakterdedir. Ancak salisilatlar ve kinin gibi geri dönüşümlü işitme kayıplarında bazı ototoksik maddelerde görülür. Ototoksisiteye bağlı vestibüler fonksiyon bozukluğu nistagmusun olduğu ya da olmadığı bir dengesizlik şeklinde kendini gösterir. Tam bir vestibüler yetmezlik gelişmedikçe merkezi kompanzatuvar mekanizmalarla vestibüler semptomlar zamanla geriler. Ototoksik vestibüler yetmezliklerde hasta görsel veya proprioseptif verilere daha çok ihtiyaç duyar. Bu verileri yetersiz hastalar özellikle yaşlılarda vestibüler bulgular daha ağır olabilir (12). Ototoksik potansiyeli bilinen ajanlarla medikal tedaviler sırasında odyolojik monitorizasyonlar gerekir. Bunun için sıklıkla saf ses odyometri, yüksek frekans odyometri, ‘‘Transient Evoked Otoacoustic Emission’’, DPOAE, ABR ölçümleri kullanılır (3).

### **Sisplatin Ototoksisitesi**

Sisplatin (*cisdiamminedichloroplatinum-II*), testis kanserleri, baş-boyun kanserleri, küçük hücreli akciğer kanseri, over kanserleri, SSS maligniteleri, mide kanserleri, mesane kanserleri gibi çok değişik malign hastalığın tedavisinde etkin ve başarılı bir şekilde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır (24). Ancak klinik uygulamada kullanımını kısıtlayan ciddi yan etkileri görülebilmektedir. Bunlardan ototoksisite ve nefrotoksisite sık olmakla birlikte diğer yan etkiler; kemik iliği supresyonu, gastrointestinal toksisite, periferik nöropatidir (25). Sisplatine bağlı işitme kaybı genellikle progresif, bilateral, simetrik, ve geri dönüşsüz bir sensorinöral karakterdedir. İşitme kaybı önce yüksek frekanslarda başlar ve zamanla konuşma frekanslarında yerleşir (26). Sisplatin korti organında özellikle bazal dönüşünde dış tüylü hücre hasarı yaratmaktadır. Yapılan araştırmalarda sisplatinle kemoterapi gören hastaların %7 sinde tinnitus geliştiğini göstermiştir. İşitme kaybıysa daha çok 4,000-8,000 Hz aralığındaki frekanslar da gelişmiştir ve işitme kaybı şiddeti 15-65 dB arasında

değişmektedir. Sispilatin kullanımının belirgin bir vestibülotoksik etki gösterdiği de anlaşılmaktadır. Aynı çalışmada genel literatür bilgisinin aksine işitme kaybının bazı olgularda geri dönüşümlü olabildiğide tespit edilmiştir (27). Ototoksik etkiyi arttıran diğer sebepler sisplatinin kümülatif dozu, hastanın yaşı, gürültüye maruziyet, nefropati varlığı, ek ototoksik ilaç kullanımı, beslenme yetersizliği ve beraberinde radyoterapi varlığıdır. Sisplatine bağlı ototoksistide öncelikle yüksek frekanslar etkilenir ve 100mg/m<sup>2</sup>'yi aşan dozla birlikte orta frekanslarda da işitme kaybı ortaya çıkar. Hitchcock ve ark. (28) tarafından yapılan bir çalışmada baş-boyun kanseri sebebiyle sadece 40 Gy kadar radyoterapi alan hastalarda dikkate değer işitme kaybı saptanmamış ancak beraberinde 100 mg/m<sup>2</sup> sisplatin tedavisi alan hastalarda ileri derecede işitme kaybı saptanmıştır. Sisplatin tedavisi ile birlikte radyoterapi verildiğinde işitme kaybına neden olacak doz sınırı 10 Gy olarak bildirilmiştir (28). Yapılan histopatolojik incelemeler sisplatin ototoksitesinin etkilediği bölgelerin başında kokleanın bazal ve orta kısımlarındaki DTH'ler olduğunu göstermektedir. Tüylü hücre hasarı bazalden apektse, 3. sıra DTH'lerden ilk sıra DTH'lere ve daha sonra İTH'lere doğru ilerlediğini göstermektedir. Destek hücreleri ve stria vaskülarisde genellikle etkilenmektedir. Spiral ganglion hücrelerindeki değişiklikler de yine DTH hasarının en şiddetli olduğu bazal kıvrımlarda görülür. Dış tüylü hücre hasarının şiddetinin işitme kaybının şiddetiyle, hasar lokalizasyonunun ise işitme kaybının görüldüğü frekanslarla yakın ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Kobaylarda sisplatin ototoksitesinde elde edilen elektrokokleografi sonuçlarında, koklear mikrofoniclerdeki değişikliklerin endokoklear potansiyel değişikliklerden çok daha belirgin olması da, etkilenen bölgenin DTH'ler olduğunu göstermiştir (29). Dış tüylü hücre hasarı ile sesin mekanoelektriksel transdüksiyon işlevinde bozulma ortaya çıkar; bu da kokleanın sensitivite ve frekans selektivite fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek koklear mekanizmaların işleyişini ortadan kaldırmaktadır (30). Sisplatin sitotoksitesinin hücresel mekanizması tam olarak netleşmemiştir. Bu nedenle toksisite mekanizmasını anlamak amacıyla, sisplatin'in etkisi çeşitli hayvan modelleri üzerinde çalışılmıştır. Sisplatin toksitesinden sorumlu birden fazla mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Hücre içerisine difüzyon yoluyla giren sisplatin, antitümoral ve hatta toksik etkisini, hücre içinde reaktif platin türlerine hidrolize olarak gösterir. Reaktif sisplatin metabolitleri, DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu bağların ortaya çıkışı ise DNA transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eder. Sisplatin'in modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyuttaysa, hücre tarafından tolere edilemez ve hücrenin ölümüne neden olur (30). Yapılan bir çalışmada, DTH'lerin, destek hücrelerinin, stria

vaskularis marjinal hücrelerinin ve bazal kıvrımdaki spiral ligamentteki hücrelerin nükleuslarında sisplatin uygulaması sonucunda oluşan platinlenmiş DNA'ların bulunduğu görülmüştür. Bu bulgular sisplatin toksisitesi için bu hücrelerin hedef olduğunu düşündürse de platinium-DNA bileşiklerinin primer lokalizasyonunun stria vaskularis marjinal hücreleri olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (30). Bunun yanı sıra birçok çalışmada, sisplatin toksisitesinin patofizyolojisinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı görülmüştür. Sisplatine bağlı ototoksistide reaktif oksijen radikalleri aracılı hasar antioksidanların azalması ve lipid peroksidasyonunun artması sonucunda oluşur. Süperoksit anyonunda ve hidrojen peroksitte artma koklear hücrelere kalsiyum iyonu akışına ve patolojik değişikliklere neden olur (30). Sisplatin gerek süperoksit iyonlar gerekse hidroksil radikalleri gibi aktif oksijen türlerini üretebilir, dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunun bir indikatörü olan malondialdehit seviyelerinde artışa neden olabilir. Radikal oksijen türlerini temizleyen ve modifiye eden antioksidan enzimler ve yanı sıra küçük moleküller (vitamin E, askorbik asit,  $\beta$ -karoten ve glutatyon) hücrel hasarı sınırlandırmada rol oynar. Bu sistem ökaryotik hücreleri sadece hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikallerinden değil aynı zamanda eşlenmemiş elektronları olan serbest radikallere bağlı hasardan da korur. Üretilen reaktif oksijen radikalleri eğer kontrol edilmezse, protein, DNA ve doymamış yağlar gibi çeşitli hücrel komponentlerle reaksiyona girerek hücre ölümüyle sonuçlanabilecek kimyasal modifikasyonlara ve metabolik, yapısal değişikliklere neden olur (30,31). Antioksidan koruyucu sistem, sitozolik ve membran bağlı küçük moleküllerden, oksidasyon-redüksiyon yollarına katılan değişik enzimlerden, hidrojen peroksiti ve serbest radikalleri temizleyen veya modifiye eden gama-glutamil siklusundan oluşur (30). Sisplatin toksisitesinin moleküler mekanizmalarını açıklayan teorilerden biriside ATPaz, adenilat siklaz, sitokrom P-450 mikrozomal enzimleri ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz gibi bazı kilit enzimlerin inhibisyonudur. Bu teoriye göre ayrıca lizozomal enzim aktivitelerinde değişiklikler, mitokondrial oksijen transportunda ve/veya kalsiyum homeostazisinde bozulmalar olmaktadır (30).

## **ANTIOKSIDANLAR**

Reaktif oksijen metabolitleri oksijen merkezli serbest radikallerdir veya serbest radikallerin indirgenme ürünleridir. Reaktif oksijen metabolitleri (süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit) normal metabolizma süresince üretilmektedir. Ancak, iyonize radyasyon, oksitleyici özellik taşıyan ajanlar (bazı ilaçlar, örn; antineoplastikler, bazı antibiyotikler), hücreye yabancı olan maddeler (ksenobiyotikler), hiperoksi, enflamasyon,

hava kirliliği, kanser, diyabet ve yaşlanma gibi durumlarda reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi artabilir ve hücrel hasara neden olabilir. Bu maddeler, sitoplazmik membranın ve hücre-içi organel membranının lipitlerinin peroksidasyonuna ve membran permeabilitesinin artmasına, enzimlerin ve yapısal proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlar oluşmasına, enzimlerin inaktivasyonuna ve bu arada antiproteazların inhibisyonu sonucu dirençli proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, DNA yapısının bozulmasına ve mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucunda membran yapısının bozulmasının yanı sıra, oluşan lipid peroksitler, immün savunma hücrelerine karşı kemotaktik oldukları için, bu hücreleri dokuya çekerek inflamatuvar reaksiyon oluştururlar. Radikaller proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinde de oksidatif zedelenme yaparlar. Hücrede iyon transportunu ve transmembranal potansiyeli bozarlar. Reaktif oksijen radikalleri oluşma hızının derecesine, antioksidan savunma mekanizmalarının etkinlik derecesine ve diğer özelliklere göre, hücre türlerinin reaktif oksijen radikallerinin toksisitesine duyarlılığı farklıdır. İnsanlarda serbest radikallerin tahribatını önleyen, sınırlayan ve kısmen tamir eden antioksidan mekanizmalar mevcuttu. Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında sınırlı miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler ancak hiperoksijenasyon, iskemi ve sonrası reperfüzyon, radyasyon, stres, dokularda reaktif oksijen radikallerini oluşturan ksenobiyotiklere (sigara dumanı, ozon, asbest, v.b gibi) maruz kalma ve bu radikalleri bol miktarda oluşturan aktive edilmiş nötrofiller eozinofiller ve makrofajların dokuda toplanması gibi durumlarda oksidan/antioksidan dengesi bozularak antioksidan mekanizmalar tükenir. Sitotoksik radikal etkinliği artar hücre zedelenmesine ve ölümüne yol açar (27).

Antioksidan etki tipleri:

- Toplayıcı etki
- Bastırıcı etki
- Onarıcı etki
- Zincir kırıcı etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki" denir. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen molekülü aktararak inaktif veya daha az aktif hale dönüştüren olaya "bastırıcı etki" denir. Zincir kırıcı etki ise moleküllerin serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkisine denir (28). Antioksidanlar; endojen ve ekzojen kaynaklı olmak üzere iki ana grupta toplanırlar.

## **Endojen Antioksidanlar**

1. Enzimatik antioksidanlar: Süperoksit dismutaz, glutatyon, katalaz, peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, glutatyon redüktaz, hidroperoksidazlar ve mitokondrial sitokrom oksidazlardır.

2. Enzimatik olmayan antioksidanlar:

Makromoleküller: Seruloplazmin, miyogloblin, hemogloblin, transferin, ferritin'dir.

Mikromoleküller: Vitamin C, E ve A, tiyol içeren moleküller (glutatyon, n-asetil sistein, metiyonin, kaptopril), glikoz, ürik asit, bilirubin, albumin, ubiquinon, melatonin, selenyum, lipoik asittir.

## **Eksojen Antioksidanlar**

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, folik Asit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, Ca-kanal blokörleri, nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar), nötrofil adezyon inhibitörleri, soya fasülyesi inhibitörleri, rekombinant human-süperoksit dismutaz, trolox-C, endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler (ebselen, asetilsistein), non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları (mannitol, dimetil sülfoksit), demir şelatörleri (desferroksamin, dimetiltiyöüre), sitokinler (tümör nekroz faktörü, interlökin-1, barbitüratlar, flavonoidler (29). Hücre içerisindeki antioksidan savunmanın belkemiğini oluşturan enzimatik antioksidanlar, aktif merkezlerinde Cu, Zn, Mn, Fe, Se gibi metalleri içerirler. Düzeyleri genetik kontrol altındadır. Hücre içerisinde fazla miktarda bulunanları; süper oksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır. Ferritin, transferin, laktoferrin ve seruloplazmin, hidroksil radikali oluşmasını sağlayan haber-weiss reaksiyonunu katalize eden demir ve bakır iyonunu hücrede ve plazmada bağlayarak, mitokondrial sitokrom oksidazlar ise mitokondrilerde doğal olarak oluşan radikalleri suya indirgeyerek etkili olurlar. Enzim olmayan antioksidanlardan E vitamini, lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir ve hücre membranında lokalizedir. Vitamin A ve  $\beta$ - karoten singlet oksijeni baskılayıp süperoksit radikalini temizleyerek ve peroksi radikalleri ile direk etkileşerek antioksidan özelliklerini gösterir (31). Askorbik asit (vitamin C) güçlü bir redükleyici ajan ve antioksidan olup süperoksit anyon, peroksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyonu sonucu metaboliti olan dehidroaskorbik asit oluşturur (26).

Sisplatin ototoksitesini önlemede de birçok antioksidan madde deneysel olarak denenmiştir. Bunlardan bazıları başlıklar halinde aşağıda örneklenmiş ve çalışmamızda antioksidan özelliğinden dolayı kullandığımız curcuminden bahsedilmiştir.



**Quarçetin:** Birçok yeşil bitkide bulunan bir çeşit flavinoid olan quarçetinde güçlü bir antioksidandır. Sisplatin ototoksitesinde antioksidan etkisi açısından denenmiş ve koruyucu etkinliği bilimsel olarak da gösterilmiştir (32).

**Alfa-lipoik asit:** Endojen bir antioksidan madde olan alfa-lipoik asit serbest oksijen radikallerini süpürücü bir etkiye sahiptir. Sisplatin ototoksitesinde iç ve dış tüylü hücreleri koruyucu etkinlikleri gösterilmiştir (33).

**Pomegranate eksteresi:** Nar Akdeniz bölgesinin önemli bir meyvesidir antik yunan kültüründe de yaşamla bağdaştırılmaktadır. Bu meyveden elde edilen pomegranat ekstresi güçlü bir antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliği vardır. Deneysel sisplatin ototoksitesinde oral olarak denenmiş ve istatistiksel olarak etkinliği anlaşılmıştır (34).

**Vitamin C:** Vitamin C yani askorbik asit suda çözünen güçlü bir antioksidandır ve birçok doğal üründe bulunur. Deneysel çalışmalarda intratimpanik olarak sisplatin ototoksitesine karşı kullanılmış ancak etkinliği belli frekanslarda kısmi bir etkinlik gösterebilmiştir (35).

**Resveratrol:** Resveratrol potansiyel bir güçlü antioksidan maddedir. Bitkilerde bitki mantarlarına karşı sentezlenen güçlü bir antioksidandır. Üzüm, böğürtlen ve bunlardan elde edilen kırmızı şarap gibi ürünlerde yüksek miktarda bulunur. Deneysel sisplatin ototoksitesine karşı denenmiş ancak istatistiksel olarak kontrol grubuyla resveratrol uygulanan grup arasında fark saptanamamıştır (36).

**Vitamin E:** Deneysel sisplatin ototoksitesinde denenmiş ve etkinliği gösterilmiş serbest radikal süpürücü bir antioksidandır. Özellikle serbest oksijen radikallerinin yavaş etkili bir süpürücü antioksidan moleküldür (31).

**Melatonin:** Pineal glanddan salınan endojen bir madde olan melatonin vücudun sirkadyen ritminin düzenlenmesinde çok önemli bir görevi vardır, uzun yıllardır antikanser etkinliği araştırılan ve apoptozis sürecinde birçok etkinliği bulunan melatoninin serbest oksijen radikallerine karşı direkt ve indirekt etkinliği saptanmıştır. Serbest oksijen radikali süpürücü etkinliği ile sisplatin ototoksitesinde etkinliği gösterilmiştir (37).

**Curcumin:** Curcumin, Güneydoğu Asya toplumlarının günlük dietlerin de sıkça kullanılan *curcumin longa* bitkisinden elde edilen bir moleküldür. Bu bitkiden elde edilen ürün ülkemizde zerdeçal olarak isimlendirilmektedir. Antioksidan, antineoplastik, anti enflamatuvar etkilerinin yanısıra antifungal, antiviral ve antibakteriyel etkileri bilinmektedir. Yapılan birçok deneysel ve klinik çalışmada bu etkileri kanıtlanmıştır. Bu etkilerini stokinler, büyüme faktörleri veya direkt gen transkripsiyonu gibi etki mekanizmaları üzerinden gerçekleştirmektedir. Literatürde kanıtlanmış bu etkilerinden dolayı “spice for life”/“yaşam baharatı” olarak isimlendirilmektedir (38-41). Diferuloylmethanın curcuminin etkin maddesi olarak tespit edilip izolasyonu 1900 lü yıllara uzanmaktadır. Bu etken madde aracılığıyla Cox-2 enzim inhibisyonu ile antieflamatuvar süreçler ve H atom vericisi olarak superoksit dismutaz metabolitlerini detoksifiye edici rolü ile antioksidan etkinlikler gösterdiği kanıtlanmıştır.(38,40). Serbest oksijen radikali süpürücü etkisinin yanı sıra superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi serbest radikal süpürücü enzimlerin aktivitelerinde arttırarak antioksidan etkinlik sağlamaktadır (39-41). Ayrıca hem inflamatuvar süreçde etkili hemde serbest oksijen radikali üreten bir süreçde aktif rol oynayan iNOS enzim inhibisyonu yoluyla antienflamatuvar ve antioksidan etkinliğini sağlar. Antienflamatuvar etkinliğini serumda proinflamatuvar sitokinler olan İL-1, İL-2, İL-6, İL-8, İL-12 ve TNF-alfa seviyelerini azaltarak gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu mikromoleküler etkileri sayesinde antitümoral etkinlik gösterdiğini kanıtlayan yayınlar da mevcuttur (38).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı (Ek-1) alındıktan sonra Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP)'ne sunulmuş ve TÜBAP-2013-75 no'lu proje ile gerekli kimyasal malzeme ve kitler ile sarf malzemelerin alımı sağlanmıştır (Ek-2). Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilen, 4-8 aylık ve ağırlıkları 200-600 gr arasında değişen, auropalpebral refleksi 30 adet pigmente hartley cinsi erişkin kobay (Guinea pig) kullanılmıştır. Kobaylar %50 nem, 16-21 °C ısı koşullarında *ad libitum* Pelet yem ve vitamin su ihtiyacı içi ek olarak taze sebze ve meyve ile beslenerek barındırılmıştır. Çalışmamızda uluslararası Helsinki deklarasyonunun da bildirilen hayvan bakım ve kullanımı ile ilgili kurallara uyulmuştur.

Elektrofizyolojik ölçümler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Odyoloji Birimi'nde yapıldı. Elektrofizyolojik ölçümler genel anestezi altında yapılırken, intraperitoneal enjeksiyonlar ve gastrik gavaj sırasında herhangi bir anestezi uygulama yapılmadı. Gastrik gavaj uygulama sırasında deney grubundan iki kobay aspirasyon sonrası kaybedildi ve çalışmadan bu kobayların verileri çıkarıldı. Genel anestezi, ketamin hidroklorür (Ketalar ampul, Pfizer, İstanbul) 40 mg/kg + xylazine hidroklorür (Rhompun flakon, Bayer, İstanbul) 10 mg/kg intramusküler ile sağlandı. Tekrarlayan anestezi dozu gerektiğinde, ilk dozun 1/3'ü kadar ketamin hidroklorür i.m olarak uygulandı.

Genel anestezi altında toplam 30 kobayın 60 kulağının otoskopik bakısı yapıldı (Şekil 1) ve dış kulak yolundaki debris veya buşonlar temizlendi. Bütün kobaylarda normal timpanik membran görüntüsü saptandı. İntraperitoneal ilaç uygulaması öncesinde, tüm kobay kulaklarında DPOAE ve ABR testi ile normal işitmenin varlığı araştırıldı. DPOAE ve ABR

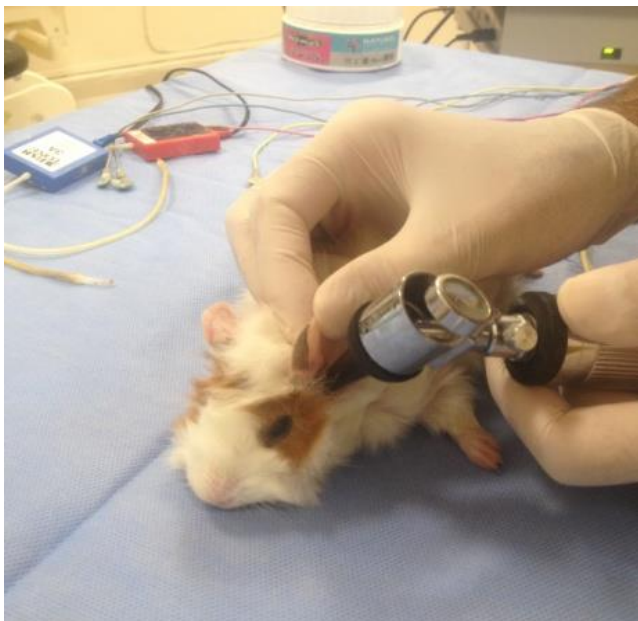
testleri sonucunda, işitmesi normal saptanan toplam 60 kulak çalışma kapsamına alındı ve randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Her bir grupta 10 kobay (20 kulak) yer almaktaydı.

Grup I (çalışma grubu): Bu grupta ki kobaylara sisplatin uygulamasından 5 gün önce başlayıp sisplatin aldığı 3 gününde kapsayacak şekilde gavaş (oral yoldan) 100 mg/ kg/ gün Curcumin (Curcumin, sigma-aldrich, chiana) (Şekil 2), (8 ardışık gün, günde 1 kez) uygulanacaktır. Curcumin uygulamasının 6. gününde kontrol grubu ile birlikte 3 gün ard arda intrapenitoneal 8 mg/kg/gün sisplatin uygulanacaktır.

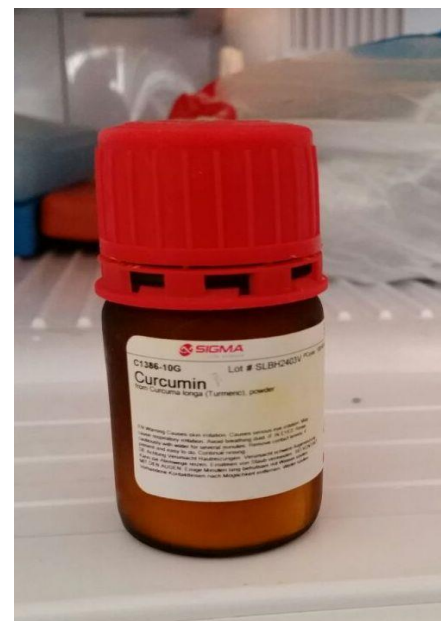
Grup II (kontrol grubu): Bu grupta ki kobaylara 3 gün ard arda günde tek doz intrapenitoneal 8 mg/kg/gün sisplatin uygulanacaktır (Cisplatin “Ebewe” flakon, Liba, İstanbul).

Grup III (sham grubu): Bu grupta ki kobaylara sisplatin ve curcumin verilmeyecektir yalnızca intraperitoneal 1cc serum fizyolojik verilecektir.

Intraperitoneal sisplatin enjeksiyonları, Cisplatin “Ebewe” 10mg/20ml ticari formu kullanılarak, 5 ml’lik enjektör ile 8 mg/kg/gün dozunda, anestezi verilmeden, batın alt kadrantlarına yapıldı. Enjeksiyonlar her gün aynı saatlerde tekrarlandı. Kobaylar enjeksiyon yapıldığı süre içinde dehidrate bırakılmamaya özen gösterildi. Tüm kobaylara, 8 günlük ilaç uygulaması bittikten 24 saat sonra tekrar DPOAE ve ABR ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonunda her gruptaki tüm kobaylar yüksek doz ketamin ve xylazine verilerek önce antioksidan kapasite ölçümü için intrakardiyak kan (2cc) alındı ve sonrasında mikroskopik inceleme için dekapitasyon işlemi tamamlandı. Temporal kemik materyalleri, histopatolojik incelemeler için hazırlandı.



Şekil 1. Kobay kulağının otoskopik incelemesi

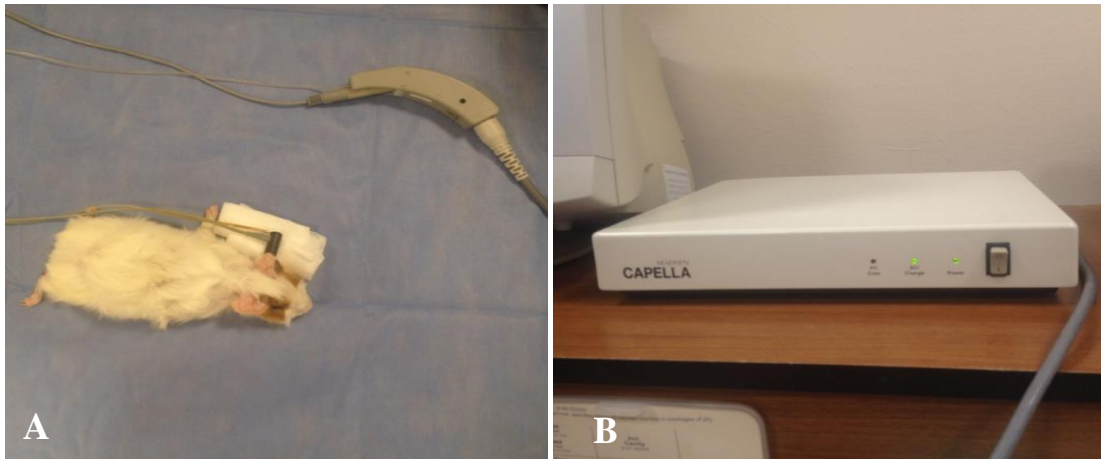


Şekil 2. Curcumin ekstresi

## ELEKTROFİZYOLOJİK TESTLER

### “Distortion Product Otoacoustic Emission” ölçümleri

Distorsiyon ürünü otoakustik emisyonlar ( $2f_1$ - $f_2$  kübik distorsiyon ürünü bileşenleri) Capella-MADSEN (GN Otometrics A/S Taastrup, Denmark) cihazı kullanılarak DPOAE modunda ölçüldü. Kobayın dış kulak kanallarına uygun 1 cm'lik plastik tüp adaptörlerinin ucuna timpanometri plastik prob uçlarından yenidoğan için kullanılan küçük boy bir uç (no:1-2) takıldı (Şekil 3). Bunun kalın kısmına da Capella-Madsen erişkin OAE probu yerleştirildi. Frekans oranı  $f_2$  ve  $f_1$ , ( $f_2/f_1$ ) 1.22 olacak şekilde tutuldu. Uyarın şiddeti  $f_1$  frekansı için L1 ve  $f_2$  frekansı için L2 olarak alındı ve L1-L2 seviyeleri arasındaki fark 10 dB SPL (L1=65dB SPL, L2=55dB SPL) düzeyinde tutuldu. Sonuçlar birincil tonların ( $f_1$  ve  $f_2$ ) geometrik ortalamasında gösterildi. Otoakustik emisyonlar dış kulak kanalındaki iki adet uyarın ( $f_1$  ve  $f_2$ ) için iki farklı hoparlör kullanılarak uyarıldı. DPOAE'lar dış kulak kanalındaki mikrofon ile  $2f_1$ - $f_2$  frekansında ölçüldü ve  $f_1$  ve  $f_2$ 'nin geometrik ortalamalarında 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 ve 8000Hz frekanslarında kaydedildi. Test süresi yaklaşık 60 sn idi. DPOAE amplitüdlerinin gürültü eşiğinin 3 dB üstündeki değerleri anlamlı kabul edildi. Ölçümler gürültü düzeyinin 50 dB'i geçmediği bir odada yapıldı. DPOAE sonuçlarının değerlendirilmesinde; elde edilen  $2f_1$ - $f_2$  kübik distorsiyon ürünleri  $f_1$  ve  $f_2$ 'nin geometrik ortalamasında yani 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 ve 8000Hz frekans bantlarında oluşan sinyal gürültü oranı “Signal/Noise-Ration (S/N-R)” esas alındı. S/N-R oranı DPOAE cevaplarını değerlendirmek için DPOAE amplitüdlere göre daha güvenilirdir. Çalışmamızda bu S/N-R oranları her kobay için frekansa özgü olarak değerlendirildi. S/N-R frekans eğrileri çizildi.



Şekil 3. Kobaya ait Distortion Product Otoacoustic Emission Ölçümleri (A) ve ölçüm cihazı (B)



sağlayacak bir teknik ile gerçekleştirildi. Oksipital bölgeden horizontal ensizyon yapıldı ve cilt öne doğru eleve edildi. Her iki taraftaki temporal kas ve periost önce parietal kemiğin, ardından temporal kemiğin skuamöz parçasının üzerinden eleve edildi. Aurikula laterale ekarte edilerek kıkırdak dış kulak yolu, keskin disseksiyon ile timpanik halkadan ayrıldı. Subperiosteal planda kas dokularının elevasyonuna devam edilerek, temporal kemiğin mastoid ve timpanik parçaları (bulla) ortaya konuldu. Bundan sonraki aşamada mastoid parça oksipital kemikten; skuamöz parça parietal, frontal, palatin ve etmoid kemiklerden; bulla oksipital ve sfenoid kemiklerden; petröz parça sfenoid kemikten disseke edildi. Ortaya konan VII. ve VIII. kranial sinirlerin ekstratemporal kısımları kesildikten sonra temporal kemik, çevre kas dokularından da disseke edilerek kafatasından ayrıldı. Bu aşamadan sonra ışık mikroskopik olarak incelenmesi planlanan koklealar %10 nötral formalin çözeltisine konuldu. Temporal kemik disseksiyonları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde yapıldı.

### **Antioksidan Kapasite Ölçümü**

Ketamin ve xylazin anestezisi altında göğüs ön duvarı insizyonla açıldı. Kalbe ulaşılarak ponksiyonla sol ventrikülden alınan en az 1cc'lik kan örnekleri biyokimyasal incelemeler için jelli tüplere alındı. Kan örnekleri soğutmalı santrifüjde +4 derecede, 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek serum örnekleri endorf tüplere alınarak laboratuvar çalışmaları yapıncaya -80 °C'de muhafaza edildi (Şekil 5). Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAC) düzeyi tespitinde, fotomerik yöntem kullanıldı (42). Bu yöntem 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sülfonat=ABTS+) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen antioksidan kitler (total antioxidant status, TAS, Türkiye) ticari kitleri kullanıldı.

Kit bileşenleri:

Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml

Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml

Standard Solüsyonu: 3 ml

Deiyonize su: 3 ml

Kullanılan cihazlar:

Spektrofotometre ( Spectronic Unicam Helios α, İngiltere)

Soğutmalı santrifüj ( MPW 350R, Polonya)

Otomatik pipetler ( Biohit Proline, Finlandiya )

Vorteks ( Heidolp, Almanya )

Eppendorf Tüp 1,5 ml (Türkiye)

Daha sonra 30 µl standardın ve 30 µl deiyonize suyun 660 nm’de absorbansı okundu. Sırasıyla Δ Abs Standard ve Δ Abs Su değerleri elde edildi. 30 µl örneğin bulunduğu eppendorf tüplere 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm’de absorbansı okunarak Δ Abs 1 değerleri elde edildi. Daha sonra aynı küvete 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm’de absorbansı okunarak Δ Abs 2 değerleri elde edildi. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun yerlere konularak mmol Trolox Equiv./L cinsinden TAK düzeyleri tespit edildi. Örneklere ait anti oksidan kapasiteler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında ölçüldü. Grupların TAC değerleri ortalamaları alındıktan sonra, gruplar arası karşılaştırma istatistiksel yöntemlerle yapıldı.

$\Delta \text{Abs } 2 - \Delta \text{Abs } 1 = \Delta \text{Abs Örnekle}$

$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = [ (\Delta \text{Abs Su}) - (\Delta \text{Abs Örnekle}) ] / [ (\Delta \text{Abs Su}) - (\Delta \text{Abs Standard}) ]$



**Şekil 5. Total anti oksidan kapasite ölçümü sırasında serum örneklerinin eppendorf tüplere alınması.**



## **Işık Mikroskopisi Histopatolojik İncelemeler**

Temporal kemikler dekalsifikasyon sonrası stereomikroskop, (S1300 mm lens Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) altında otik kapsüller mikrodiseksiyonla çıkarıldı. Numuneler 3 gün %10 formaldehid ile fiksasyon işlemi uygulandı ve dekalsifikasyon %10 EDTA 2Na (pH 7.4) kullanılarak gerçekleştirildi. Üç saat sonra, fosfat buffer solüsyon (PBS) çözeltisi yıkamak için kullanıldı ve doku formaldehit içinde 2 gün daha fikse edildi. Rutin ışık mikroskopisi takip işlemi uygulandı. Takip sonrası koklealar orta modiolar ekseninde asimetrik olarak disseke (apikalden-bazale doğru) edildi. Parafin blok (50 m kalınlığında kadar) mid-modiolar alan seri kesitler hazırlanmıştır. Orta modiolar alan (4 m kalınlığında) hematoksil-eozin ile boyandı. Işık mikroskobu kullanılarak skorlama yapıldı.

Stria vaskularis ve Corti organı ışık mikroskobu (Olympus CX 31, Almanya) tarafından görüntülenmiştir ve Olympus E330 dijital kamera kullanılarak fotoğraflanmıştır ve değerlendirilmesinde de Freitas ve ark. (43) tarafından tanımlanan dört-nokta skorlama sistemi kullanılmıştır. Bu skorlama sisteminde sisplatin ile indüklenen DTH hasarı ve dejenerasyonu 4 puanlı bir skala ile değerlendirmektedir. Skorlar korti organı için dış tüylü hücrelerin sayısının tayinine dayanmaktaydı. Kokleanın bazal, orta ve apikal bölümde hücreler sayıldı ve kontrol grubu kullanılarak her bir bölüm için tüylü hücrelerin beklenen sayısı belirlendi. İki bazal bölüm, orta modiolar bölüm ve bir apikal bölüm değerlendirildi ve 15 DTH sayıldı ( bazal bölüm 6 hücre, orta bölüm 6 hücre, apikal bölüm 3 hücre). Subjektif olan marjinal hücre kabarcıklanması, stoplazmik vaküolizasyon, ve intermediet hücrelerin atrofisini (büzüşme) içeren stria vaskularis değerlendirmesine dayanarak dokular şu şekilde kategorize edildi. Normal kalınlıkta stria vaskularis ve marjinal hücre de kabarcıklanma, stoplazmik vakuolizasyon veya hücresel büzüşmenin olmaması: 0 puan, belli belirsiz olması:1, hafif:2, orta:3, ve şiddetli: 4 puan (43,44).

Spiral ganglion hücrelerinde vakolizasyon ve nükleer dejenerasyon subjektif olarak ayrıca değerlendirildi ve değişikliğin şiddetine göre kategorize edildi (değişiklik yok:0, hafif:1, orta:2 ve şiddetli değişiklik: 3 puan) (43,44).

İmmunohistokimya; immunolojik ilkelere dayanarak, varlığı araştırılan antijenlere karşı geliştirilmiş, poliklonal veya monoklonal antikolar aracılığı ile dokudaki antijeniteyi gösteren bir yöntemdir. Çalışmamızda indirek immunperoksidaz yöntemi uygulanmıştır.

Yöntemin uygulanışı; Tümör ve tümör çevresi doğal dokuları en iyi örnekleyen kesite ait parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler yapıldı. Kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Kesitler 1 gece 37°C etüvde bekletilerek deparafinizasyon işlemine başlandı. Deparafinizasyona ksilen ile devam edildi. Bu işlem 60°C etüvde 3 kez 10'ar dakika ksilende

bekletme ve her 10 dakikanın ardından 5'er dakika solüsyon yenilenecek şekilde dışarıda soğumaya bırakma şeklinde uygulandı. Kesilenin giderilmesi için %96'lık alkol muamelesine geçildi. Kesitler alkolde 60°C etüvde 4 defa her seferinde solüsyon yenilenecek şekilde, 10'ar dakika tutuldu. Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.

İmmünohistokimyasal olarak İNOS, Cox-2 ve p53 antikoru için antijen geri kazanımı işlemi yapıldı. Bu işlem için 1/10 oranında distile su ile dilüe edilen (90 ml distile su + 10 ml EDTA buffer), "EDTA buffer 10X pH 8,0" (Kod: ab64216 Lot.GR171628-2) solüsyonu kullanıldı. Kesitler antijen geri kazanım solüsyonunda mikrodalga fırında maksimum watt'ta 20 dakika kaynatma şeklinde uygulandı. Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi. Dokularda bulunan endojen peroksiti bloke etmek için 10 dakika 37°C etüvde metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit uygulaması yapıldı. Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi. Lamlar pH 7,4 olarak hazırlanmış PBS solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Reaktiflerin kesit dışına taşmasını engellemek için lamlardaki kesitlerin etrafı Pap-pen ile çizildi. Her bir lama Large Volume Ultra V Blok (Kod No:ab93677 Abcam ABC Detection kit) damlatıldı ve 7 dakika bekletildi. Sonra solüsyon lamlar üzerinden PBS ile uzaklaştırıldı. Her bir vaka için ayrı ayrı numaralandırılmış lamlara İNOS, Cox-2 ve p53 antikoru damlatılarak oda sıcaklığında, ancak nemli ortamda ("chamber" içinde) 45 dakika inkübasyon yapıldı. Lamlar üzerindeki antikoru distile su ile uzaklaştırılıp PBS solüsyonuna alınarak 5 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 5 dakika yıkanan lamlara, yukarıda tanımlanan kitin 2 nolu biotine bağlanacak olan işaretleyici solüsyonu Anti-Polyvalent Biotinylated antibody, (Ref: AB93677 Lot. gr131667-1) damlatıldı ve 20 dakika daha bekletildi. Tekrar PBS solüsyonu ile 5 dakika yıkanan lamlara, yine aynı kitin 3 nolu solüsyonu, Streptavidinbiotinylated peroxidase-complex, (Ref: ab93677 Lot.gr131667) damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. Lamlar PBS ile 3 dakika yıkandı. Damlatılan "AEC substrate" (ref ab 64252 lot:gr117740) sonrası 10 dakika bekletildi. Lamlar musluk suyunda 5 dakika yıkandıktan sonra, Harris hematoksilen solüsyonunda 1.5- 2 dakika tutularak zıt boyama yapıldı. Lamlar tekrar musluk suyunda yıkandı. Lamlar %5'lik amonyak solüsyonunda 15 saniye tutularak, morartma işlemine tabi tutuldu. Lamlar musluk suyunda yıkandı. Aqueous-Mount (Ref: AML030, Lot. 13457) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyamalardan iNOS ve Cox-2 boyamalarını semikantitatif bir ölçekle derecelendirdik. Boyanmanın şiddetine ve pozitif boyanmanın yüzdesine göre immüno boyama skorlandı. Boyama skorları bölüm başına pozitif hücre yüzdesi (%0-%100) ile immünohistokimyasal boyama şiddetinin çarpılması ile hesaplandı. Boyanma şiddetine göre bölümleri şu şekilde sınıflandırdık; negatif (hiç boyanma olmaması), 1+ (zayıf

boyanma), 2+ (orta derece boyanma), 3+ (güçlü boyanma) ve skorlar 0-300 arasın da değişmekteydi. Aynı örnekten 2 piyes için elde edilen boyanma skorları hesaplandı ve sonuç bu durum için skor olarak kaydedildi (45).

İmmünohistokimyasal p53 değerlendirme için nükleer boyanma olup olmamasına bakıldı, nükleer boyanma tespit edilirse pozitif olarak kabul edildi (46,47). Histopatolojik incelemeler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Sonuçlar ortalama±Std. sapma olarak gösterildi. Curcumin, Sisplatin ve Kontrol grupları arasında ABR, DPOAE değerlerinin ilaç uygulaması öncesi ve sonrası ölçümlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon sign rank test kullanıldı.

İlaç uygulaması öncesi ve sonrası ABR, DPOAE değerleri arasındaki fark değerleri hesaplandı bu değerlere ek olarak TAC değerleride gruplar arasında karşılaştırmada ve histopatolojik incelemelerin sonuçlarının karşılaştırılmasın da Kruskal Wallis testi kullanıldı, fark saptandığında bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.

İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanılarak yapıldı. P<0.05 değeri istatistiksel anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi.

## **BULGULAR**

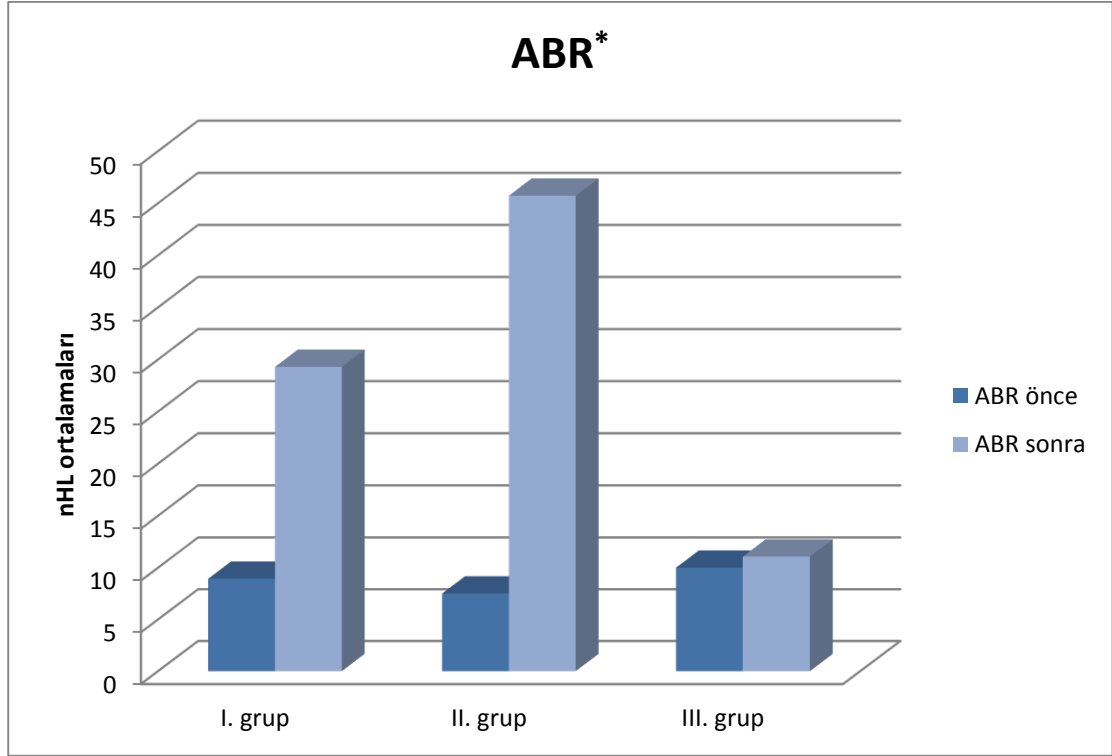
### **ELEKTROFİZYOLOJİK ÖLÇÜMLER**

Her grupta 10 kobay ile başlanan çalışmamız ilerleyen safhalarda sisplatinin toksik etkileriyle ve gastrik gavaj sırasında aspirasyon nedeniyle kaybedilen kobaylardan dolayı her gruptaki kobay sayısı 7 olarak çalışmamız tamamlandı. Her grupta toplam 14 kulak değerlendirildi. Çalışmanın başlangıcında tüm 21 kobayın 42 kulağına ve sisplatin uygulaması sonrası; çalışma grubu ve pozitif kontrol grubu ve sisplatin uygulaması yapılmayan kontrol grubundaki tüm 21 kobayın 42 kulağında tekrar DPOAE ve ABR ölçümleri yapıldı. Elektrofizyolojik ölçümlerde ABR eşik değerleri ve DPOAE 750 Hz, 1000Hz, 1500 Hz, 2000 Hz, 3000Hz, 4000Hz, 6000Hz, 8000Hz frekanslarda s/n oranları karşılaştırıldı.

Çalışma öncesi ve sonrası ABR eşik değerleri öncelikle her grup için gruplar içinde karşılaştırıldı. I. grup ilaç uygulaması öncesi ABR eşik değerleri ortalama  $8,9\pm 2.8$  dB, ilaç uygulaması sonrası ABR eşik değerleri ortalama  $29,8\pm 21$  dB olarak saptanmıştır ve bu değerler arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ). II. grup da ilaç uygulaması öncesi ABR eşik değerler ortalama  $7,5\pm 3.2$  dB olarak saptanmış ve ilaç uygulaması sonrası ortalama ABR eşik değer  $45,71\pm 17.9$  dB olarak saptanmıştır ve ABR eşik değerler arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ). III. grup da ilaç uygulaması öncesi ortalama ABR eşik değeri  $10\pm 3.7$  dB, ilaç uygulaması sonrası ortalama ABR eşik değeri  $11,07\pm 4.8$  dB olarak saptandı, bu değerler arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ).

Grup I. ve III. de ilaç uygulaması öncesi ve sonrası ABR eşik değer farkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0.05$ ). Grup I ile grup II arasında ki ABR eşik değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı

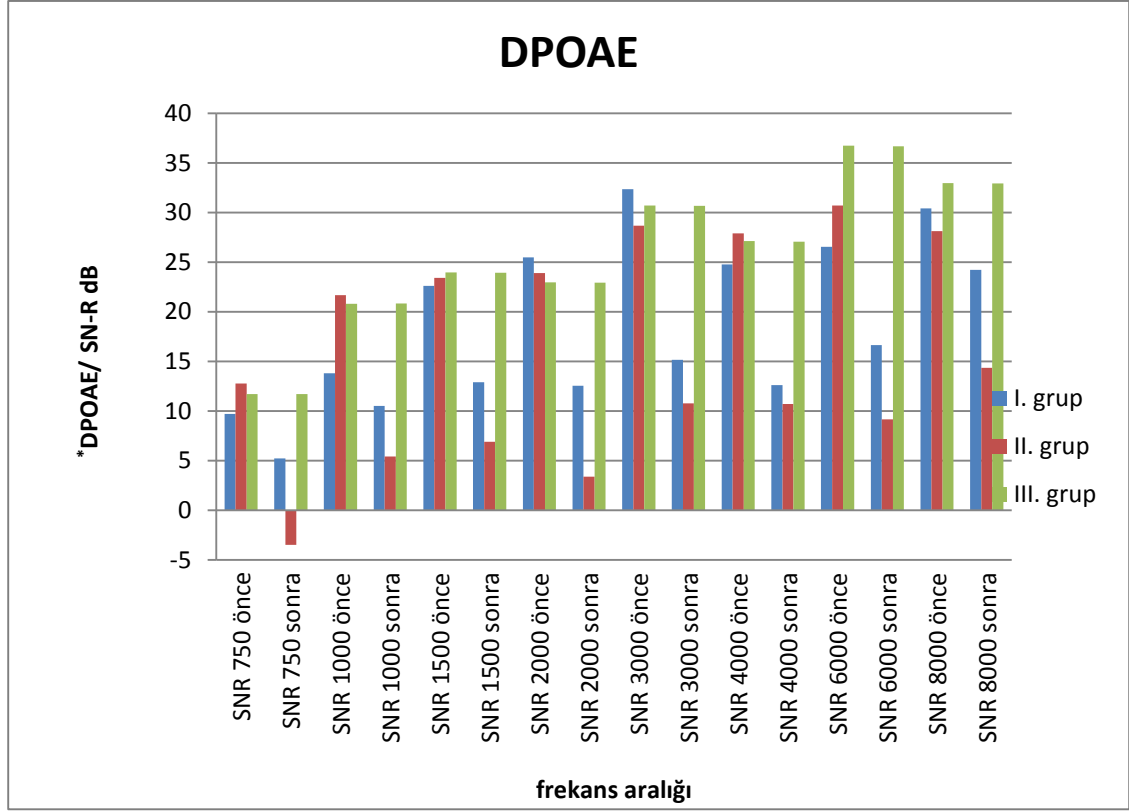
( $p<0.05$ ). Grup II ve grup III arası ABR eşik değerler karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0.05$ ). Tüm bu ABR eşik değer karşılaştırma sonuçları Şekil 6 da gösterilmektedir.



**Şekil 6. Gruplar arası tedavi öncesi ve sonrası auditory brainstem response eşik yanıtları (nHL).**

\*ABR: İşitsel beyinsapı yanıtları

Grup I de ilaç uygulaması öncesi ve sonrası DPOAE s/n oranları grup içinde karşılaştırıldığında 750 Hz, 1500 Hz, 2000 Hz, 3000Hz, 4000Hz, 6000Hz frekanslarında ki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ). Grup II de ilaç uygulaması öncesi ve sonrası s/n oranları karşılaştırıldığında 750 Hz, 1000Hz, 1500 Hz, 2000 Hz, 3000Hz, 4000Hz, 6000Hz, 8000Hz frekanslarında ki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ). Her üç grubunda ilaç uygulaması öncesi ve sonrası s/n oranları Şekil 7 de gösterilmiştir.



**Şekil 7. I. II. ve III. Gruplar arası ilaç uygulaması öncesi ve sonrası s/n oranlarının frekanslara göre karşılaştırılması (dB)**

\*DPOAE S/N-R dB: "Distortion Product Otoacoustic Emission", sinyal/noise-oranı, desibel

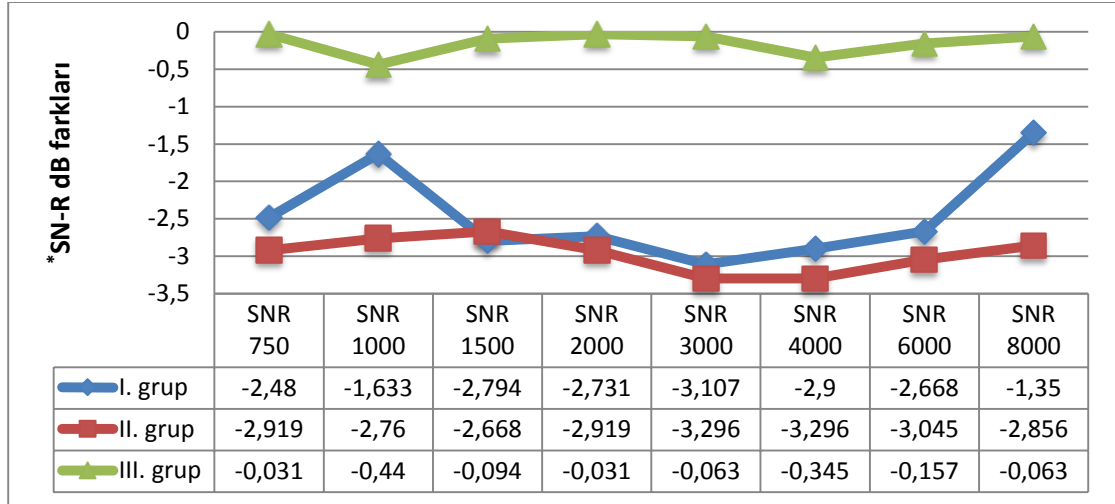
Çalışmamızda I. grup da yer alan toplam 14 kobay kulağının 750 Hz, 1000Hz, 1500 Hz, 2000 Hz, 3000Hz, 4000Hz, 6000Hz, 8000Hz frekanslarda DPOAE ile s/n oran farkları II. ve III. grup ile karşılaştırıldı.

Grup I'in ilaç uygulaması öncesi ve sonrası arasında ki s/n oranları farkı II. grup ile karşılaştırıldığında 750 Hz, 1000 Hz ve 6000 Hz frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0.05$ ).

Grup I ile kontrol grubu, ilaç uygulaması öncesi ve sonrası arasında ki s/n oranları farkı karşılaştırıldığında 1500 Hz, 3000 Hz, 4000 Hz ve 6000 Hz frekanslarında ki azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ).

Grup II ile grup III karşılaştırıldığında; 750 Hz, 1000Hz, 1500 Hz, 2000 Hz, 3000Hz, 4000Hz, 6000Hz, 8000Hz frekansların da ki s/n oranların da azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ).

Her üç grubun ilaç uygulaması öncesi s/n ortalamaları arasındaki farkının karşılaştırılması Şekil 8 de gösterilmiştir.



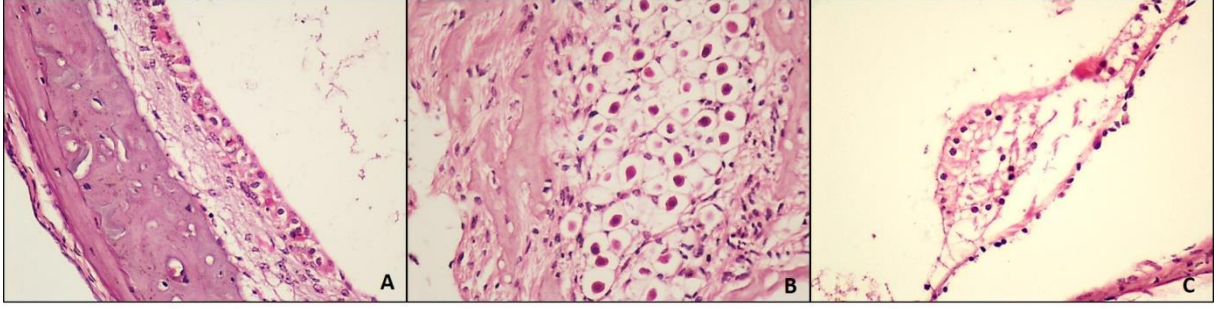
**Şekil 8. İlaç uygulaması öncesi ve sonrası frekanslara göre s/n oran farklarının gruplar arasında karşılaştırılması (dB)**

\*SN-R dB farkları: sinyal/gürültü desibel oran farkları

## HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

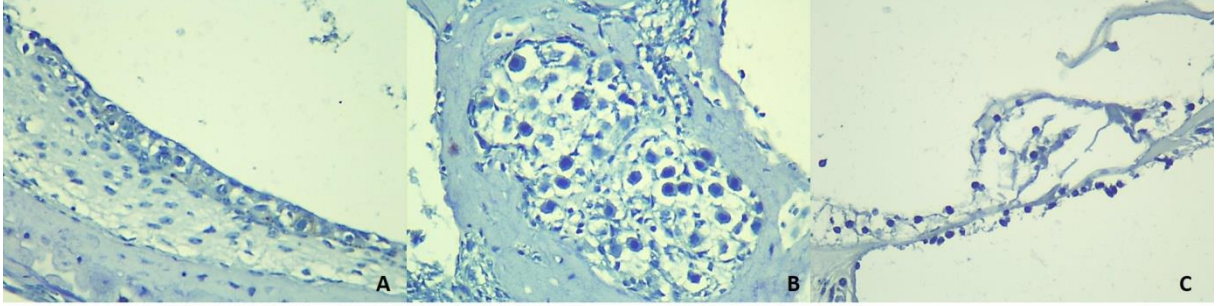
### Işık Mikroskopisi

Çalışmamızda 3 grupta, her gruptan 7 kobay olacak şekilde toplam 14'er kobay kulağı ışık mikroskopik inceleme sonuçları değerlendirildi. Hemotoksilen-eosin (H-E) boyamaya ek olarak yine ışık mikroskopisi altında Cox-2, iNOS ve p53 immünohistokimyasal boyamalarda değerlendirildi. III. grup'un ışık mikroskopisi ile Hemotoksilen-eosin boyama ve Cox-2, iNOS, p53 immünohistokimyasal incelemelerde koklea da normal yapıda stria vaskularis (SV), spiral gangliyon (SG) ve Corti organı (C) izlenmektedir. Corti organı görüntülerinde DTH uzantıları normal yapıda, hücre nükleusları belirgin, sitoplazma yoğunluğunun normal olduğu gözlemlendi. Tektorial membran, destek hücrelerin nükleusları ve sitoplazmik yapıları doğal olarak izlendi (Şekil 9). İmmünohistokimyasal boyamalardan p53, iNOS, Cox-2'e yönelik incelemede boyanma olmadı (Şekil 10-12).



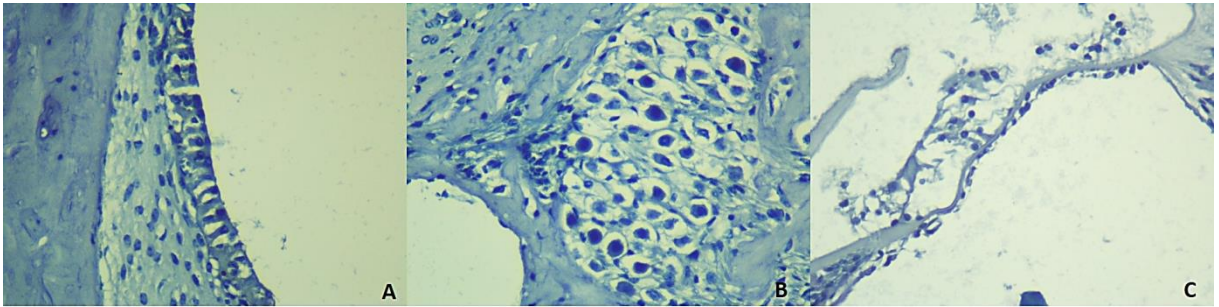
**Şekil 9. III. Grup da Hemotoksilen-eosin boyama (X400);**

Düzenli yapıda Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C) izlenmektedir



**Şekil 10. III. Grup da p53 boyama (X400);**

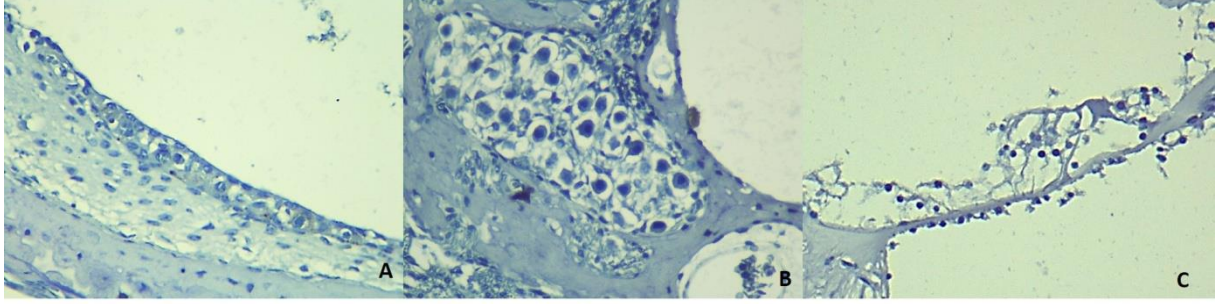
Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da boyanma izlenmedi



**Şekil 11. III. Grup da iNOS boyama (X400);**

Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da boyanma izlenmedi

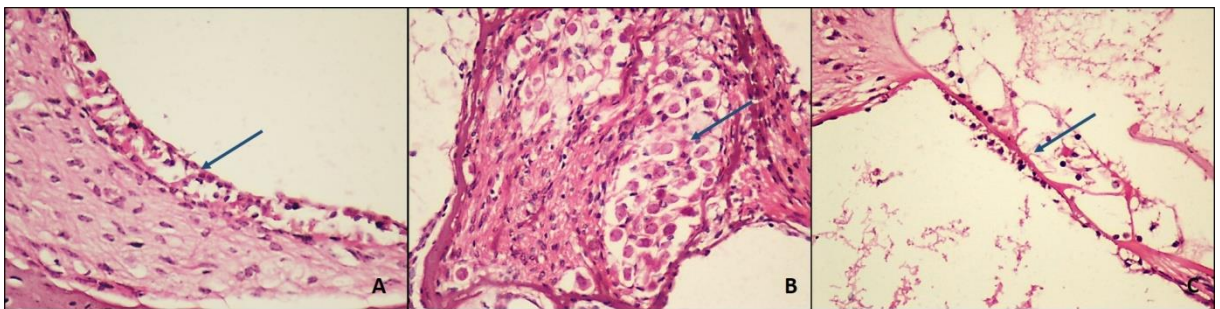




**Şekil 12. III. Grup da Cox-2 boyama (X400);**

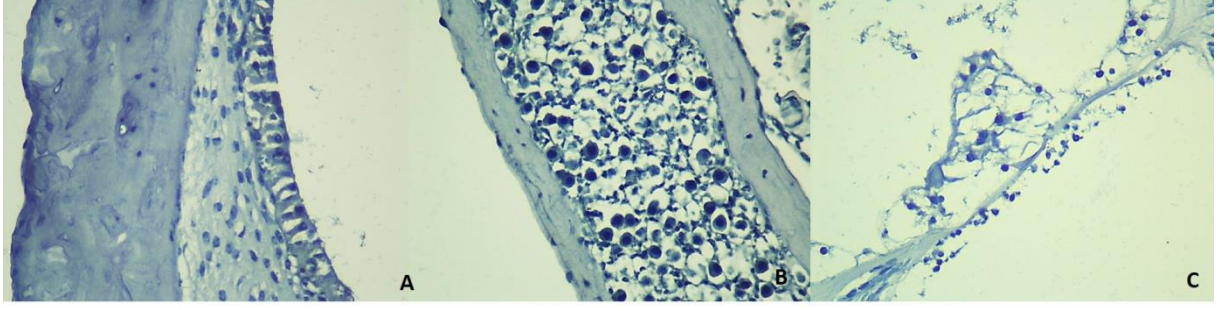
Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da boyanma izlenmedi

Grup II ışık mikroskopisi ile değerlendirildiğinde stria vaskülarisde özellikle marjinal hücrelerde sitoplazmik vakualizasyon ve marjinal hücrelere ek olarak intermediet hücrelerde de atrofi mevcuttu. Spiral gangliyon hücrelerinde ileri derecede nükleer dejenerasyon ve vakualizasyon saptandı. Ayrıca Corti organında DTH'lerde kayıp ve kalan hücrelerde dejenerasyon yaygın şekilde mevcuttu. Tektorial membran ve destek hücrelerinde yaygın dejenerasyon vardı (Şekil 13). İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde p53 ile boyanma izlenmedi ama iNOS ve Cox-2 boyamada stria vaskülarisde de, spiral ganglionda da corti organında da curcumin ve kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek pozitif boyanma oranları vardı (Şekil 14-16).



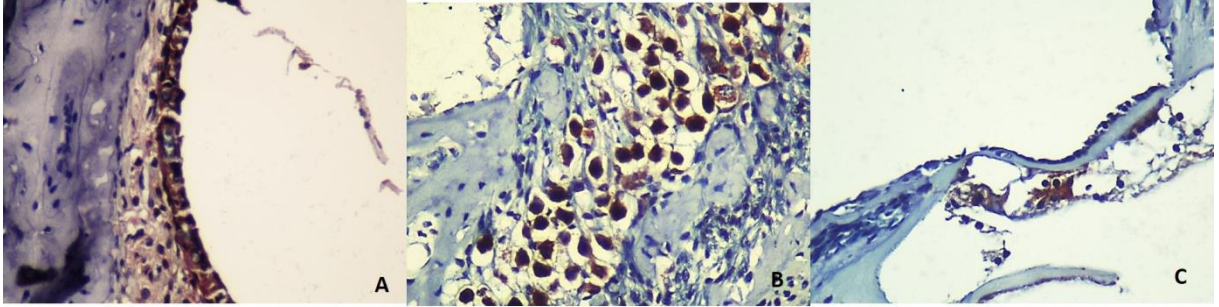
**Şekil 13. II. Grup da Hemotoksilen-eosin boyama (X400);**

Stria vaskülariste sitoplazmik vakualizasyon, ayrılma ve dejenerasyon (A: ok, Hasarlı epitel), ganglion hücrelerinde ileri derecede dejenerasyon (B: ok, dejenere ganglion hücreleri). Corti organın da dış tüylü hücrelerde kayıp ve dejenerasyon (C:ok, dejenere silialı epitel hücreleri)



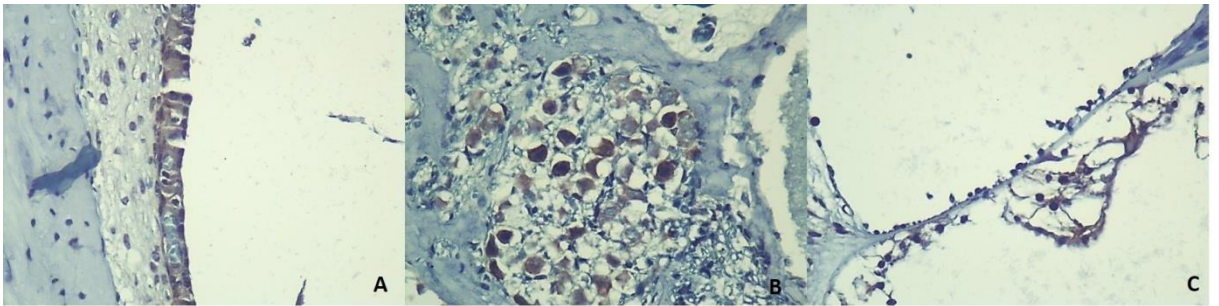
**Şekil 14. II. Grup da p53 boyama (X400);**

Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da boyanma izlenmedi



**Şekil 15. II. Grup da iNOS boyama (X400);**

Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da yüksek oranda boyanma izlendi

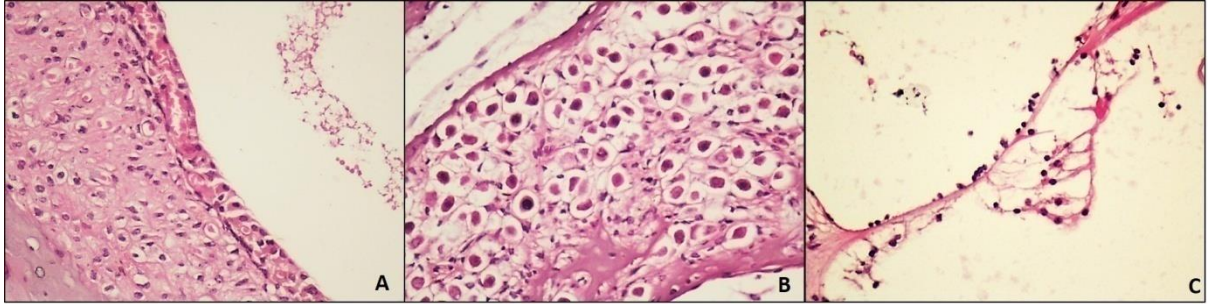


**Şekil 16. II. Grup da Cox-2 boyama (X400);**

Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da orta dereceli yaygın boyanma izlendi.

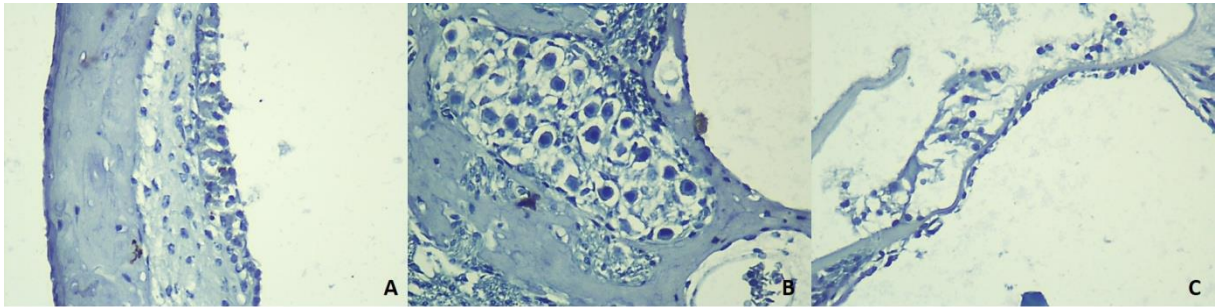
Grup I'in ışık mikroskopik değerlendirmesinde stria vaskülarisde marjinal hücrelerde sitoplazmik vakualizasyon ve atrofi bulgularında siplatin grubuna göre belirgin gerileme mevcuttu. Spiral gangliyon hücrelerinde nükleer dejenerasyon ve vakualizasyon oranları da

sisplatin grubuna oranla anlamlı derecede azalmıştı (Şekil 17). Ayrıca Corti organında DTH'lerde kayıp oranı kalan hücrelerde dejenerasyon şiddetinde belirgin şekilde sisplatin grubuna oranla azdı. Corti organı DTH kayıp oranları ve DTH ortalama sayıları şekil 21 de gösterilmektedir. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde p53 ile boyanma izlenmedi ama iNOS ve Cox-2 boyamada stria vaskulariste de, spiral gangliyonunda da corti organında da II. ve III. grup'a oranla anlamlı derece yüksek pozitif boyanma oranları vardı (Şekil 18-20).



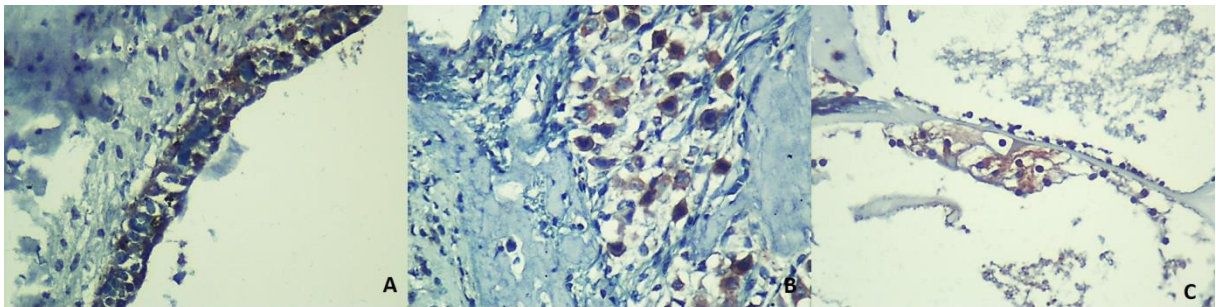
**Şekil 17. I. Grup da Hemotoksilen-eosin boyama (X400);**

Stria vaskularis (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da izlenen hasarda kontrol grubuna göre düzelme izlendi



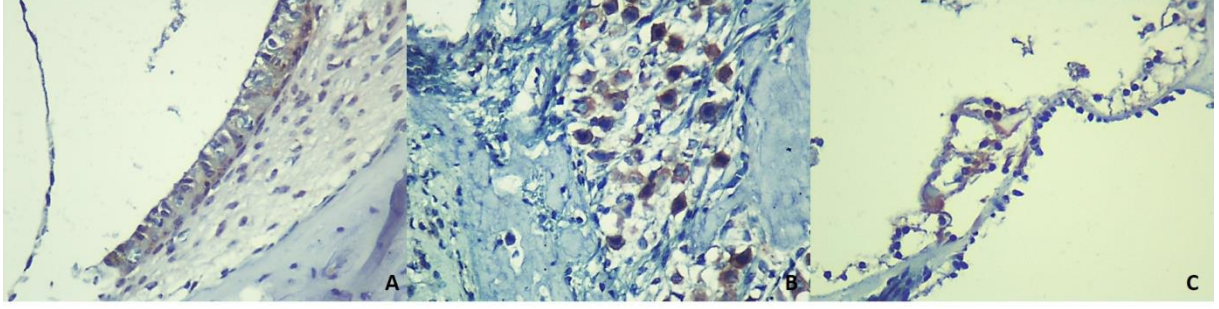
**Şekil 18. I. Grup da p53 boyama (X400);**

Stria vaskularis (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da boyanma izlenmedi



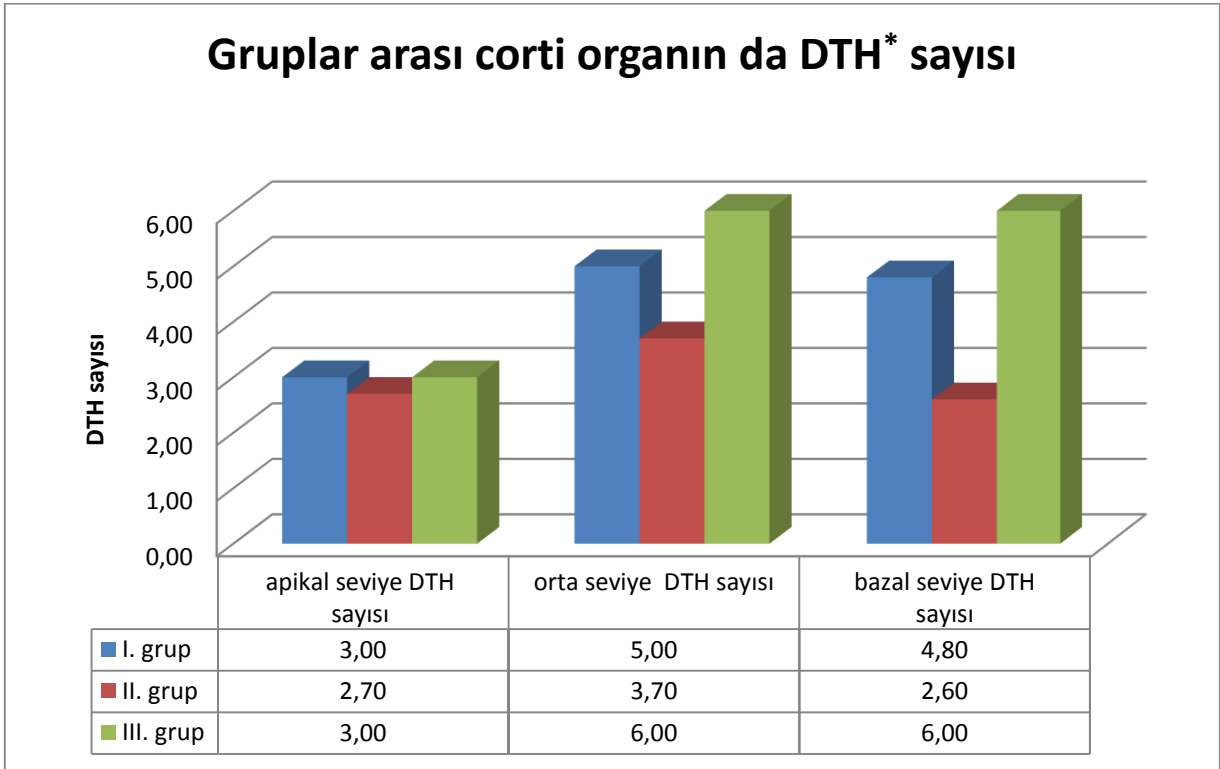
**Şekil 19. I. Grup da iNOS boyama (X400);**

Stria vaskularis (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da boyanma oranları kontrol grubuna göre daha düşük idi



**Şekil 20. I. Grup da Cox-2 boyama (X400);**

Stria vaskülaris (A), Spiral gangliyon (B) ve Corti organı (C)'n da zayıf dereceli boyanma izlendi



**Şekil 21. I. II. ve III. Grupların koklear seviyeler arasında ortalama dış tüylü hücreler sayısının karşılaştırılması.**

\*DTH: Dış tüylü hücreler

Gruplar arası DTH sayısı karşılaştırıldığında, II. ve III. grup DTH sayısı arasında koklanın orta ve bazal seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edildi ( $p<0.05$ ).

Gruplar arası DTH sayısı karşılaştırıldığında, I. ve II. grup DTH sayısı arasında koklanın orta ve bazal seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edildi ( $p<0.05$ ).

Gruplar arası DTH sayısı karşılaştırıldığında, I. ve III. grup DTH sayısı arasında koklanın orta ve bazal seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edildi ( $p<0.05$ ).

Gruplar arası karşılaştırma da apikal segmentlerde DTH sayısında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Tüm gruplara ait boyanma skorları Tablo 1 de gösterilmektedir.

**Tablo 1. Gruplar arası hemotoksilen-eozin stria vaskülaris, Spiral gangliyon ve imminohistokimyasal “inducibl nitric oxide synthase”, “Cyclooxygenase-2”, p53 corti organı, stria vaskülaris ve spiral gangliyon ortalama skorların karşılatırılması**

Grup	HE-SV*	HE-SG**	***iNOS CORTİ	iNOS-SV	iNOS-SG	Cox-2 CORTİ	Cox**** 2 SV	Cox-2 SG	P53 CORTİ	P53 SV	P53 SG
I. grup	ort. skor 1,7±0,48	1,8±0,42	85±15,81	76±17,76	76±12,65	86±13,49	76±12,64	94±21,71	0	0	0
II. grup	ort. skor 2,7±0,48	2,8±0,42	279±24,69	285±15,81	0,1±0,33	282±20,97	285±21,21	285±21,21	0	0	0
III. grup	ort. skor 0,1±0,33	0	0,1±0,33	0,1±0,33	282±25,3	0,1±0,33	0	0,1±0,33	0	0	0

\*SV: Stria vaskülaris, \*\*SG: Spiral gangliyon, \*\*\*iNOS: “Inducibl Nitric Oxide Synthase”, \*\*\*\*COX-2: “Cyclooxygenase-2”.

Grup I ve III arasında SV, SG da iNOS, Cox-2 ve Hemotoksilen-eosin boyanma skorların da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

Grup I ve III arasında Corti organın da iNOS, Cox-2 ve Hemotoksilen-eosin boyanma skorların da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

Grup I ve II arasında SV, SG da iNOS, Cox-2 ve Hemotoksilen-eosin boyanma skorların da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

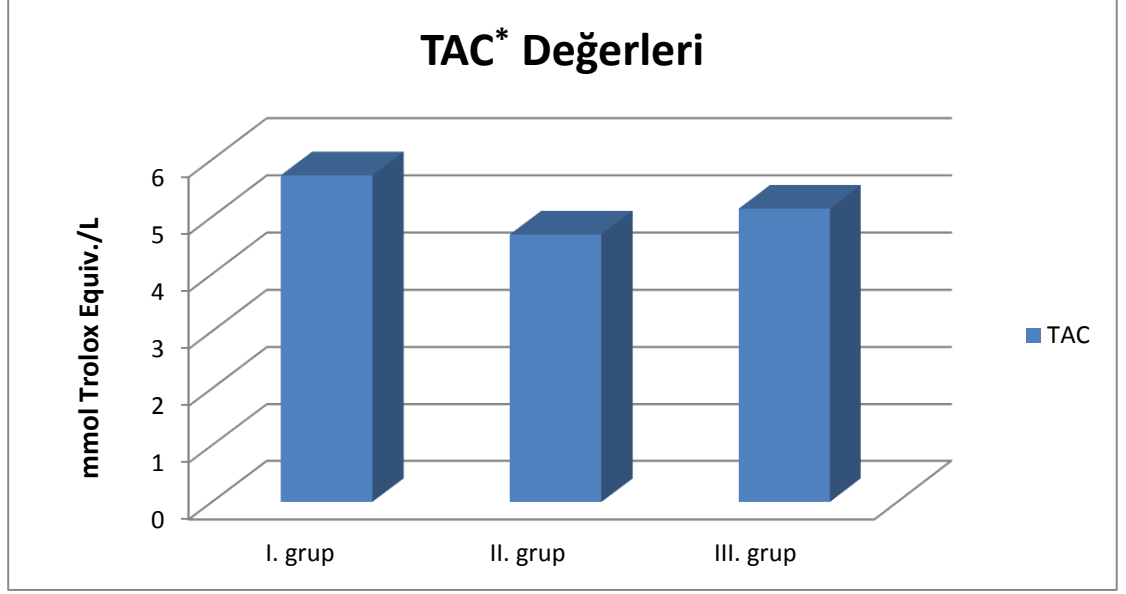
Grup I ve II arasında Corti organın da iNOS, Cox-2 ve Hemotoksilen-eosin boyanma skorların da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

Grup II ve III arasında SV, SG da iNOS, Cox-2 ve Hemotoksilen-eosin boyanma skorların da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

Grup II ve III arasında Corti organın da iNOS, Cox-2 ve Hemotoksilen-eosin boyanma skorların da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

## ANTIOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜMLERİ

Gruplar arası TAC değerler karşılaştırıldı; I. grup da TAC değerleri bir miktar yükselmiş olmasına rağmen, III. grup ile arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (p>0.05). I. grup ile II. grup TAC değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p<0.05). II. grup ile III. grup arasında TAC değerlendirmelerinde ki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Ancak II. grup da ortalama değerler daha düşük saptandı (Şekil 23).



**Şekil 23. I. II. ve III. Grup arasında ki total antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması (mmol Trolox Equiv./L.**

\*TAC: Total antioksidan kapasite.

Grup I ve II arasındaki TAC değerleri farkı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ( $p < 0.05$ )

Her üç gruptaki tüm kobby kulaklarına ait antioksidan kapasite değerleride dahil tüm verileri Tablo 2 de, histopatolojik veriler de Tablo 3 de gösterilmektedir.

**Tablo 2. Genel veri tablosu (odyolojik inceleme ve antioksidan kapasite değerleri)**

(Kulak sayısı) I. grup	ABR-dB-ilk	ABR-dB-son	Dpoae** 0.75khz-s/n-ilk	Dpoae. 0.75khz-s/n-son	Dpoae. 1.0khz-s/n-ilk	Dpoae. 1.0khz-s/n-son	Dpoae. 1.5khz-s/n-ilk	Dpoae. 1.5khz-s/n-son	Dpoae. 2.0khz-s/n-ilk	Dpoae. 2.0khz-s/n-son
1	5	45	7	-1,5	10,7	4,9	8,2	6,8	21,3	8
2	5	50	-0,2	2,2	7,1	1,9	13,1	-3,5	10,3	1,3
3	10	50	6,7	-3,2	10,9	-5,2	16,3	8,2	21,6	4,4
4	10	60	-2	-7,2	2,6	-1,8	1,6	3,9	7,6	0,4
5	5	10	18,3	6,2	23	9,9	37,6	21,6	33,9	28
6	10	10	4,3	10,3	8,7	12	21,9	18,7	7,1	25,2
7	5	10	18,1	17,5	24,8	27	39,5	25,5	37,8	17,4
8	10	10	13,8	7,3	22	10,8	28,2	11	40	9,7
9	10	10	18,1	5	24,8	16,7	39,5	30,5	37,8	21,3
10	10	10	13,8	10,6	22	18,4	28,2	15,3	40	21,2
11	10	10	6,8	3	8,6	15,2	19,5	20,4	27	7,1
12	10	35	8,8	11,4	6,4	9,1	16,5	8,2	21,4	12,7
13	10	60	12,4	9,5	15,1	11,8	33	-2,2	35,1	13,1
14	15	40	10	2,2	6,7	16,7	13,4	16,4	15,9	5,8
<b>II. grup</b>										
1	5	25	17,6	6,6	24,2	24,2	25,2	21,2	33,5	17,9
2	10	40	-1,2	2,2	1,5	6,4	7,9	8	6,6	10
3	5	70	9,5	-23,9	10,3	-6,3	19,7	-14,8	20,5	-13,7
4	10	40	21,9	-20,9	25,2	12,6	30,9	21,5	36,6	6,5
5	10	35	18,1	2,2	26,3	10,7	30	8,7	34,1	8,9
6	5	40	19,4	0,9	25,1	-7,4	34,3	-13,4	35,4	0,1
7	5	50	7,8	-1	23,4	-5,2	29,4	0,8	27,7	-19,5
8	10	70	-1,6	-0,5	12,6	-1,7	15,1	-3,7	17,5	-7,3
9	10	80	16,7	-15	23,5	-4,6	17,6	-5,3	7,7	-0,8
10	5	60	20,8	-0,7	29,3	-6,9	28,8	4,8	8,8	8,5
11	15	20	7	6,5	12,5	18,4	16	23,9	23,3	11,5
12	5	40	14,7	3,3	34,9	12,2	25,3	11	32,4	-1,1
13	5	30	6,9	4,8	19,5	22,3	12,3	27,2	10,8	19,6
14	5	40	21,3	-13,4	35,4	1,4	35,4	6,9	39,7	6,8
<b>III. grup</b>										
1	15	10	11,1	16,1	19,8	26,4	18,2	27,7	11,2	34,4
2	10	10	6,3	12	11,1	7,6	9,1	21,9	8,6	26,7
3	10	5	24,7	16,3	28,5	24	30,7	25,8	30,3	28
4	5	5	14,3	14,1	29,1	25,1	35,4	32,7	30,4	31
5	5	10	18,1	4,6	27,1	6,8	32,5	10	27,8	2,5
6	20	15	-3,8	7,5	7,3	16,5	12,2	18,3	20,3	5
7	10	10	13	18	30	27,2	24,8	32,6	28	27,7
8	10	20	9,3	-3,5	32,5	7,5	36,4	12,1	37,1	20,4
9	10	10	4,6	24,7	6,8	28,5	10	30,7	2,5	30,3
10	10	20	7,6	14,4	16,4	29	18,1	35,3	5	30,3
11	10	10	16,4	13,1	23,9	30,1	25,9	24,7	28,1	28
12	10	10	14,2	9,4	25,2	32,4	32,8	36,3	31	37
13	10	5	11,9	6,3	7,5	11	21,8	9	26,8	8,7
14	5	15	16,2	11,2	26,4	19,9	27,8	18,3	34,4	11,1

\***ABR:** Auditory brainstem response, \*\***DPOAE:** Distortion product otoacoustic emission.

**Tablo 2. (devamı) Genel veri tablosu (odyolojik inceleme ve antioksidan kapasite değerleri)**

	Dpoae. 3.0khz-s/n-ilk	Dpoae. 3.0khz-s/n-son	Dpoae. 4.0khz-s/n-ilk	Dpoae. 4.0khz-s/n-son	Dpoae. 6.0khz-s/n-ilk	Dpoae. 6.0khz-s/n-son	Dpoae**** 8.0khz-s/n-ilk	Dpoae. 8.0khz-s/n-son	TAC***
<b>I. grup</b>									
1	30,3	8	15,6	9,8	22,3	24,1	34,2	31	6,073
2	30	6,7	16,7	7,3	20,4	21,6	36,8	31,6	5,121
3	34,2	6,6	17,5	9,7	17,3	2	32,7	-1,1	5,341
4	12,1	6,9	6,6	6,6	10,2	1,2	33,9	1,7	6,951
5	38,6	23,5	32,6	12,9	38,4	29	38,5	39,2	6,731
6	12,1	21,3	13,2	21,5	19,9	31	28	39,5	4,829
7	46,7	20,2	29,3	10,7	32,8	27,5	23,5	43,6	5,024
8	42,1	18,1	31,4	14,8	31,2	14,7	24,6	23,4	
9	46,7	29,8	29,3	26,2	32,8	6,4	23,5	14,8	
10	42,1	28,2	31,4	16,7	31,2	13,8	24,6	16,1	
11	21,4	18,4	25,9	6,8	26,3	19,6	38,9	32,8	
12	22,6	11,8	21,6	9	21,2	6,3	37,9	14,1	
13	35,9	6,6	36,9	8,7	36,1	17,3	25,1	17	
14	38,3	6,4	39	15,8	31,8	18,8	23,9	35,5	
<b>II. grup</b>									
1	34,4	33,1	34,6	26,1	32,4	8,8	28,1	19,9	4,829
2	10,7	6,8	11	6,6	29	9,2	39,8	11,2	4,975
3	34,8	7,5	35,9	7,5	34	-3,1	22,2	2,9	4,951
4	46,2	6,7	42,6	11,2	41,1	2,7	25,3	6,8	4,439
5	38,1	29	37	16,2	32,2	6,6	7,7	15,8	4,634
6	42	8,4	34,7	10,8	32,9	3,7	23,6	8,3	4
7	41,1	-0,4	36,7	1,1	33,3	-0,8	28	0,9	5
8	10,6	8,2	23,3	8,6	27,4	2,5	31,7	-3,5	
9	7,3	6,8	15	3,4	14,2	-6,9	20,4	0,3	
10	19,9	3,5	21,3	7,5	30,7	-0,5	26,4	2,8	
11	23,6	17,6	23,2	19,9	31	31,2	36	37,3	
12	39,4	6,7	35	7,2	39,3	20,8	31,6	29,1	
13	13	10,5	16,7	14,9	21,6	28,2	34,6	33,6	
14	40,7	6,5	23,7	8,9	30,9	26	38,7	35,6	
<b>III. grup</b>									
1	21	41	24,6	35,8	30,3	38,6	26,1	36	5,731
2	10,5	35,7	21,6	31,1	32,9	35,2	31,8	29,2	4,878
3	42,1	32,1	35,1	24,7	39,7	30,4	35,9	28,5	4,512
4	41,3	38,1	38,8	31	41,7	36,3	38,6	30	5,682
5	33	12,3	21,2	7,1	33,3	35,9	26,7	33	5,487
6	34,7	11,8	21,1	15,6	42,3	34,1	37,8	36,6	4,829
7	37,6	33	35,5	21,4	41,7	33,2	28,8	26,8	4,878
8	38,5	34,6	36,4	21	41,7	42,4	42,4	37,9	
9	12,3	42,1	7,1	35	36	39,8	33	35,8	
10	11,8	41,2	15,7	38,8	34,2	41,6	36,7	38,7	
11	32,2	37,6	24,6	35,4	30,3	41,6	28,6	28,8	
12	38,1	38,5	31	36,3	36,4	41,6	30,1	42,3	
13	35,8	10,4	31,2	21,5	35,3	32,9	29,3	31,7	
14	41	21	36	24,5	38,7	30,2	36	26	

\*\*\*TAC: Total antioksidan kapasite, \*\*\*\*DPOAE: Distortion product otoacoustic emission.



**Tablo 3. Genel veri tablosu (histopatolojik değerler)**

Kulak Sayısı	CORTİ-Apex	CORTİ-orta	CORTİ-bazal	HE-SV	HE-SG	İNOS-CORTİ	İNOS-SV	İNOS-SG	COX2-CORTİ	COX2-SV	COX2-SG	P53-CORTİ	P53-SV	P53-SG
<b>grup1</b>														
1	3	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	3	6	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3	6	6	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
7	3	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	3	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	3	6	6	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>grup 2</b>														
1	3	5	4	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
2	3	5	5	2	1	2	2	2	2	2	2	0	0	0
3	3	5	5	1	2	2	3	2	2	1	1	0	0	0
4	3	4	5	1	2	1	2	2	2	1	1	0	0	0
5	3	5	4	1	2	2	2	2	1	2	2	0	0	0
6	3	5	4	2	2	2	2	1	2	2	2	0	0	0
7	3	6	5	2	1	2	1	2	1	2	1	0	0	0
8	3	5	6	2	2	3	2	2	2	2	1	0	0	0
9	3	5	5	2	2	2	2	2	1	1	2	0	0	0
10	3	5	5	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
<b>grup 3</b>														
1	3	4	3	2	3	4	4	3	1	2	2	0	0	0
2	3	4	2	3	2	4	3	4	2	2	3	0	0	0
3	2	3	2	3	3	4	4	4	1	2	2	0	0	0
4	3	4	3	3	3	3	4	4	2	2	2	0	0	0
5	2	3	3	2	3	4	4	4	1	2	2	0	0	0
6	3	4	2	3	3	4	4	4	2	2	3	0	0	0
7	3	4	2	3	3	3	3	4	2	3	2	0	0	0
8	3	4	3	3	2	4	4	4	2	2	2	0	0	0
9	2	3	3	2	3	4	4	3	1	2	3	0	0	0
10	3	4	3	3	3	4	4	4	2	2	2	0	0	0

COX-2: Cyclooxygenase-2, SG: Spiral gangliyon, SV: Stria vaskülaris, İNOS: İndüklenebilen nitrik oksit sentaz, HE: Hemotoksilen eozin.

## TARTIŞMA

Sisplatin over, testis, akciğer ve solid baş boyun bölgesi tümörlerinde sıklıkla kullanılan etkili bir kemoterapötik ajandır. Nörotoksisite, nefrotoksisite, ototoksisite, gastrointestinal toksik etkiler ve kemik iliği supresyonu gibi yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkilerinden dolayı doz sınırlanması gerekebilir. Tedavinin devamını önleyen en önemlisi nefrotoksisiteyle beraber ototoksisitedir (26).

Ototoksisite nefrotoksik etki gibi hastanın hayatını tehdit edici bir unsur olmasa dahi hayat kalitesini çok belirgin derecede azaltacaktır. Kemoterapide sisplatinin tek başına veya diğer ilaçlarla kombine olarak daha güvenilir bir şekilde kullanımını sağlamak için yan etkilerini önleme konusunda birçok çalışma yapılmıştır (48,49).

Sisplatinin neden olduğu ototoksisite genellikle tinnitusun eşlik ettiği 4000-8000 Hz frekanslarda başlayıp konuşma frekanslarına ilerleyici, bilateral, geri dönüşümsüz karakterde sensorinöral tiptedir. Yapılan bazı çalışmalarda sisplatin kullanan hasta gruplarında %80'lere varan işitme eşiğinde azalmalar tespit edilmiştir (48-50).

Sisplatin ototoksisite insidansı hastanın yaşı, genetik yatkınlığı, ek ototoksik potansiyelli ilaç kullanımı, yetersiz beslenme ve düşük serum albumin düzeyi, baş boyun bölgesine eş zamanlı radyoterapi alma gibi nedenlerle artabilir (7).

Yapılan araştırmalarda ototoksik etkinin genellikle sisplatin kullanımının 2. veya 3. günü ortaya çıkıp 7. güne kadar artarak devam ettiğini göstermektedir. Ayrıca literatürde birçok çalışmada kümülatif sisplatin dozu arttıkça ototoksik etkinin belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (7,27,51).

Bizde çalışmamızda ilk sisplatin dozu uygulamasından 4 gün sonra elektrofizyolojik incelemeleri (DPOAE, ABR) gerçekleştirdik ve belirgin şekilde ototoksik etki geliştiğini saptadık.

Ancak literatürde deneysel hayvan modeli çalışmalarında kullanılan sisplatin dozu ve uygulama süresi belirgin farklılık göstermektedir (52,53). Nakai ve ark. (53) albino guinea piglerde yaptıkları çalışmada; günlük intramuskuler 2 mg/kg sisplatin, 5 gün boyunca uygulamış ilaç uygulamasından 72 saat sonra yapılan ABR ölçümlerinde işitme eşiği değerlerinde azalma saptanmış ve histopatolojik incelemelerde de belirgin DTH kaybı tespit etmişlerdir.

Laurell ve ark. (54) tek ve yüksek doz (8 mg/kg veya 12,5 mg/kg) intravenöz sisplatin uygulamasına karşın, tekrarlanan düşük doz (1 mg/kg/gün, 5 hafta boyunca, haftada 5 gün) intraperitoneal sisplatin tedavisinin, işitme kaybına yol açması yönünden daha etkili olduğunu göstermiştir.

Cardinaal ve ark. (55) albino guinea piglerde yaptıkları bir çalışmada; 8 gün boyunca 0.7, 1.0, 1.25, 1.5 ve 2.0 mg/kg/gün dozlarında sisplatin uygulamışlar ve uygulama sonrası 48. saatte elektrokokleografi testi yapmış ardından kokleaları histopatolojik olarak incelemişler ve 0.7, 1.0, 1.25 mg/kg/gün sisplatin dozlarında DTH kaybı gözlenmezken, 1.5 ve 2.0 mg/kg/gün sisplatin dozlarında sırasıyla %60 ve %65 oranında DTH kaybı saptamışlar.

Waissbluth ve ark. (56) yaptıkları deneysel çalışmada 12 mg/kg tek doz sisplatin uygulaması yapmış ve 72 saat sonra odyolojik incelemeler sonrası kokleaları histopatolojik olarak incelemişler. Yüksek doz deksametazonun DTH hasarını, stria vasküleriste hücre dejenerasyonunu kısmen önlediğini göstermişler.

Yazıcı ve ark. (34) sisplatin ototoksitesine karşı pomegranat ekstresi denedikleri çalışmalarında 3 gün tekrarlayan 8mg/kg/gün dozunda sisplatin intraperitoneal olarak uygulamışlardır ve yeterli ototoksik etki elde etmişlerdir. Bizde çalışmamızda etkinliği gösterilmiş olan bu yöntemi kullandık. III. grup da çalışmanın 5. Günü II. grup ile birlikte 3 gün ard arda 8mg/kg/gün sisplatin uyguladık ve DPOAE ve ABR testlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede ototoksik etki oluştuğunu saptadık.

Sisplatin ototoksitesindeki odyolojik bulgular ve histopatolojik sonuçlar büyük oranda bilinse de temel patofizyolojik mekanizma yapılan birçok çalışmaya rağmen net olarak ortaya konamamıştır. Sisplatin vücutta enzimlerce hidrolize edilerek ototoksik etkilerinden sorumlu metabolitine (*cisidamineaquachloroplatinum-II*) dönüşür. Bu metabolit koklear hücrelerin içine nüfuz ettiği zaman DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu bağların ortaya çıkışı ise DNA transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe

eder. Buna bağılı olarak hücre içinde bir çok proteinin ve enzimin sentezi bozulur (32,57). Sisplatin koklea içinde özellikle stria vaskularis başta olmak üzere, korti organı ve spiral ganglionik hücrelerde birikir ve bu bölgelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu sağlar. Buna ek olarak oluşumuna katkı sağladığı serbest oksijen radikallerinin, sentezini azalttığı antioksidan enzimler aracılığıyla ortamdan uzaklaştırılmalarını da önler (58-60). Yapılan antioksidan kapasitede görev alan ve sisplatin uygulaması ile inhibe olduğu gösterilen bazı kilit enzimler şunlardır; ATPaz, adenilat siklaz, sitokrom P-450, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve mikrozomal enzimler (25). Serbest oksijen radikallerinin hücre içinde lipid peroksidasyonuna sebep olmasıyla hücrelerde apoptoz başlar ve malondialdehid gibi lipid peroksidasyon ürünü maddelerde birikir (30,61).

Hücre zarlarında meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucunda hücre zarı permabilitesi artar, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonun artar ve apoptozis artarak ilerler (61,62). Artan süperoksit iyonlar mitokondriden sitokrom C salınımına yol açarak DNA yıkımını tetikleyen caspase 3 ve caspase 9 enzimlerini aktive eder ve apoptoz gelişimine ek katkı yapar (63). Rybak ve ark. (57) antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın özellikle biriken metabolitlere bağılı olduğunu bildirilmişlerdir. Bu apoptotik süreçler sonucunda kokleada özellikle bazı bölgeler çok daha fazla etkilenirler bunlar; stria vaskularisdeki terminal hücreler, Corti'deki destek ve DTH'leri ve spiral ganglionda ki nöronal hücrelerdir (64).

Sisplatin ototoksisitesine karşı birçok antioksidan madde denenmiş yapılan odyometrik testlerle bazıları sisplatin ototoksisitesini önlemede etkin bulunmuşlardır. Yumuşakhuyulu ve ark. (65) yaptıkları bir çalışmada sisplatin ototoksisitesini önlemek amacıyla sisplatin uygulanan guinea pig grubuna resveratrol vermişler ve ABR test sonuçlarında yalnızca sisplatin alan gruba oranla daha iyi sonuçlar elde etmişler ve reaktif oksijen ürünü oranlarında belirgin olarak azalma saptamışlardır. Benzer bir şekilde wistar albino ratlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada da sisplatin verilen grup ile sisplatine ek olarak 4g/kg E vitamini verilen rat grubu ABR test sonuçları karşılaştırılmış ve sisplatin grubunda ABR değerleri anlamlı olarak E vitamini verilen gruptan düşük saptanmıştır (31).

Zebra balık embriyolarında yapılan bir başka çalışmada da güçlü bir antioksidan olan kuarsetinin tüylü hücrelerde sisplatin toksik etkisine karşı belirgin şekilde koruyucu olduğu histopatolojik incelemelerle gösterilmiştir (32).

Biz de sisplatin ototoksisitesinde denenip etkinliği gösterilen bu antioksidan maddeleri baz alarak çalışmamızda antioksidan etkinliği otolojik araştırmalar dışında kanıtlanmış olan curcumini kullandık.

Özgen ve ark. (40) yaptıkları çalışmada radyasyon ile indüklenen kataraktı, curcuminin antioksidan etkinliği sayesinde engellemek istemişler. Curcuminin antioksidan etkinliği sayesinde, radyasyon uygulaması sonrası ortamda oluşan okside molekülleri detoksifiye ettiği ve curcumin verilen grupta lipid peroksidasyon ürünü olan melondialtehit miktarında belirgin azalma ve total antioksidan kapasitede artma olduğu böylece antioksidan etkinlik ile katarakt gelişme oranında %60 azalma olduğunu saptamışlardır.

Sisplatin oluşturduğu patofizyolojik süreçlerin sonunda belirgin bir lokal inflamatuvar yanıt oluşur ve inflamatuvar sitokinler olan İL-1,İL-6, TNF-alfa seviyeleri artar. Bunların arttığını gösteren literatürde birçok çalışma mevcuttur (66,67). Bu çalışmalar da sisplatin ototoksitesini önlemede antienflamatuvar ajanların özellikle deksametazonun kullanılabilceği yönünde öneriler vardır (30,68,69). Nitekim sisplatin ototoksitesinin önlemek amacıyla yapılan bir deneysel çalışmada da inflamatuvar yanıtı önlemek için deksametazon kullanılmış, inflamatuvar yanıtı göstermek için koklea histopatolojik incelemelerinde TNF-alfa için spesifik boyamalar yapılmış ve stria vaskülaris, spiral gangliyon hücrelerinde belirgin aktivite artışı saptanmıştır. Ayrıca deksametazon uygulanan grupta koklea da inflamatuvar hasarın daha az olduğu saptanmıştır (70).

Curcuminin Cox-2 ve iNOS enzim inhibisyonu ile antienflamatuvar süreçlerde belirgin bir rol oynadığını gösteren birçok bilimsel makale mevcuttur (8,38). Ayrıca iNOS enzim inhibisyonu antienflamatuvar etkinliğe ek olarak curcuminin antioksidan etkinliğine de katkıda bulunmaktadır (40,38). Bizde bu amaçla çalışmamızda lokal inflamatuvar yanıtı gösteren iNOS ve Cox-2 enzimlerine yönelik immünohistokimyasal incelemeler yaptık ve II. grup da kokleada; Corti organında, spiral gangliyonda ve stria vaskülarisde belirgin şekilde boyanma izlenirken curcumin verilen I. grup da bu bulguların anlamlı şekilde gerilediğini tespit ettik. Bu bulgular sisplatin ototoksitesini önleyen koruyucu antioksidan ilaçlarla yapılan çalışmalarla uyumluydu (31-36).

Yaptığımız literatür araştırmasında sisplatin ototoksitesine karşı koruyucu etkinliğini denenen bu maddeler için bir çok farklı uygulama yolları kullanılmıştır. C vitamini için intratimpanik ve intraperitoneal uygulamalar, deksametazon için intratimpanik uygulamalar ve birçok antioksidan için oral yollar kullanılmıştır (35,71,72).

Spiral gangliyon hücrelerinde ki toksik etkilerin özellikle mitokondriyal düzeyde apoptozisi indükleyen mRNA ekspresyonunu arttıran Apaf-1, Caspase-9, Caspase-3 gen aktivasyonunu yolunu aktive eden okside nitrat molekülleri aracılığıyla yaptığını gösteren yayınlar mevcuttur. Liu ve ark. (41) tarafından yapılan bir çalışmada curcuminin süperoksit moleküllerinin özellikle okside nitrit moleküllerinin nörotoksik etkilerinin de engellediği

gösterilmiş ve curcuminin oksidatif hasarda ki nöroprotektif etkisinin bu yolla gerçekleştiği öne sürülmüştür. Yapılan bir başka çalışmada da sisplatin uygulaması sonrası koklea ekstratlarında yüksek miktarda nitrik oksit seviyeleri tespit edilmiş ve aynı çalışma da nitrik oksit sentaz ile stria vaskularis de apopitozisin tetiklendiği gösterilmiştir (71). Bu çalışma da reaktif nitrojen ürünlerinin oluşumunu aminoguanidin kullanarak inhibe etmeyi denemişler ve kobaylara tek doz 16 mg/kg sisplatin uygulaması sonrası 5 gün süre ile aminoguanidin vermişler ve olası koruyucu etkiyi DPOAE testleri ile değerlendirmişler. Sonuç olarak da aminoguanidin uygulanan grupta s/n oran değerleri korunmuş ama uygulanmayan sisplatin grubunda anlamlı olarak azalmıştır (71). Bu da iNOS enziminin curcumin ile regülasyonu sayesinde sisplatin ototoksitesinin kısmen engellendiğini kanıtlamıştır.

Sisplatin ototoksitesinde ki temel mekanizmalardan birinin de iNOS enziminin kontrolsüz indüksiyonu sonucu aşırı miktarda nitrik oksit oluşumu olduğu bir araştırmada gösterilmiştir. Bu araştırma da Watanabe ve ark. (72) guinea piglerle tasarlanan sisplatin ototoksitesi modelinde bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in etkisini araştırmışlar. Araştırma sonucunda ABR eşik değerlerinde daha az bir etkilenme ve koklea da ki okside nitrat molekülü miktarında belirgin azalma tespit etmişler ve koruyucu etkiyi bununla bağdaştırmışlardır.

Ayrıca p53 geninin uyarılması caspas sistemini aktive ederek, hasar gören hücrede apopitozisi indükler. Zhang ve ark. (73) yaptıkları bir çalışma p53 geninin inhibisyonu yoluyla corti organında sisplatin ototoksitesine bağlı apoptozisin önlenebileceğini göstermişlerdir. Ancak biz çalışmamızda p53 gen aktivasyonu saptayamadık. Sisplatin biyokimyasal etkisini p53 gen aktivasyonu sağlayıp hücreleri p53-bax kompleksi ile apopitozise sürükleyerek gerçekleştirir bu yüzden p53 geninin inhibisyonu sisplatinin kemoterapik etkinliğini de kısıtlayabilir (74). Biz çalışmamızda bu çelişkiye yönelik bulgu saptayamadık. Hiçbir grupta p53 e yönelik pozitif boyanma saptanmadı. Kontrol grubunda boyanma zaten beklenmemekteydi. Curcumin verilen grupta boyanma olmaması bize curcuminin apopitotik süreçlerde, p53 üzerinden inhibisyon etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu sisplatinin antitümoral etkinliğinin curcumin tarafından engellemediğini destekler niteliktedir.

Sisplatin ototoksitesi üzerine yapılan prooksidan oluşumlar ve antioksidan etki temelli araştırmalarda okside metabolitlerin tayini ve antioksidan etkiyi değerlendirmek üzere birçok farklı ölçüm yapılmıştır. Okside olan metabolit miktarını göstermek için en çok malondialdehit miktarı ölçülmüş veya okside nitrat molekül miktarına, reaktif oksijen ürünleri miktarlarına bakılmıştır (75,76). Biz çalışmamızı bu bilimsel temel üzerine kurmuş olsak da

okside molekülleri direkt kandan miktar analizi ile değerlendirmedik daha spesifik olarak dokularda okside molekül miktarının göstergesi sayılacak Cox-2 ve iNOS'a yönelik immünohistokimyasal boyamalar yardımıyla göstermeye çalıştık. Korkmaz ve ark. (45) yaptıkları bir deneysel çalışmada; renal iskemi/reperfüzyon sırasında oluşan hücresel hasarın iNOS enzim aktivasyonu yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir. Aynı çalışmada bu enzimi inhibe ettiğinde okside radikaller özellikle okside nitrat miktarında belirgin azalma olduğu kanıtlanmıştır. Hücrelerde ki iNOS aktiviteside immünohistokimyasal boyama yardımıyla gösterilmiştir. İmmüno histokimyasal değerlendirmede bizde çalışmamızda aynı metodu kullandık. Yalnızca sisplatin verilen II. grup da iNOS ile güçlü bir şekilde stria vaskularis terminal hücrelerinde, spiral gangliyon nöronal hücrelerinde ve Corti organında boyanma izlenirken bunun curcumin verilen I. grup da anlamlı derecede daha az olduğu saptanmıştır ve bu bulgular elektrofizyolojik testler ile desteklenmiştir.

Sisplatinle indüklenen nefrotoksisite de renal hücrelerde hasarın temel mekanizmalarından birinin Cox-2 enzim aktivasyonu olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Honma ve ark. (77) bu patofizyolojik mekanizma üzerine tasarladıkları çalışmalarında, sisplatin ile indüklenen renal hasarı önlemek için Cox-2 enzimini meloxicam ile spesifik olarak inhibe etmiş ve nefrotoksik etkileri belirgin şekilde önlendiğini göstermişlerdir. Bizde çalışmamızda aynı patofizyolojik temeli baz alarak grupların histopatolojik incelemelerinde Cox-2 enzimine yönelik immünohistokimyasal inceleme yaptık. Çalışma sonuçlarımız sisplatin nefrotoksisitesindekine benzer şekilde çıktı. Yalnızca sisplatin verilen grupta Cox-2 ile güçlü bir şekilde stria vaskularis terminal hücrelerinde, spiral gangliyon nöronal hücrelerinde ve Corti organında boyanma izlenirken bunun curcumin verilen grupta anlamlı derecede daha az olduğunu saptadık ve bu bulguları elektrofizyolojik testler ile de desteklenmiştir. Curcuminin çalışmamızda Cox-2 aktivasyonunu inhibe etmesi sonucunda odyolojik testler de belirgin bir iyileşme bulgusu saptanmıştır.

Curcuminin etkinliğinin antioksidan temelli olduğunu ayrıca belirleyebilmek için bir çok yayında total antioksidan kapasite miktarı değerlendirilmiştir. Bu miktara incelenmek istenen dokuda bakılacağı gibi direkt olarak kandan da bakılabilir. Örneğin literatür taramamızda karşılaştığımız bir çalışmada insan embriyonik böbrek hücrelerinde sisplatinle indüklenen oksidatif hasarda curcuminin antioksidan etkinliğinin değerlendirmek için TAC ölçümü yapılmış ve curcumin etkinliği ile TAC değerinin korele olduğunu bulmuşlardır (76). Biz de çalışmamızda kobaylardan de kapıtasyon sırasında aldığımız intrakardiyak kan ile TAC taynini yaptık. II. grup da TAC de belirgin bir düşme saptandı ve I. grup da TAC tüm

gruplardan belirgin olarak yüksekti. Bu bulgularımız literatürde sisplatin ototoksitesini önlemeye yönelik kullanılan pomegranate ve bilberry ekstresi çalışmalarıyla uyumluydu (44).

De Lauretis ve ark. (78) yaptıkları bir çalışmada sisplatin ototoksitesinin erken tespiti için ABR'nin anlamlı ölçüde tespit değerinin olduğunu klinik odyolojik verilerle göstermişlerdir.

Fetoni ve ark. (79) wistar ratlar üzerinde yaptıkları bir araştırmada sisplatin uygulanan hayvanlara eş zamanlı tiopronin vermişler etkinliğini hem DPOAE ile hem de elektronmikroskopik inceleme ile değerlendirmişlerdir. Ototoksitate geliştirilen deney grubunda DPOAE da s/n oranlarında ciddi azalma izlenmesine rağmen sisplatin ile birlikte tiopronin alan deney hayvanı grubunda s/n oranının da belirgin bir azalma saptamamışlardır. Ayrıca yalnızca siplatin alan grupta yapılan elektromikroskopik incelemede kokleanın bazal ve orta kesiminde (bazalde daha yoğun) belirgin dış tüy hücresi kaybı görülmüştür. Bununla beraber sisplatinle birlikte tiopronin alan grupta kokleada daha az dış tüylü hücre hasarı saptanmıştır. Bu gibi çalışmalar sisplatin ototoksitesinde özellikle dış tüylü hücre hasarı oluştuğunu göstermektedirler ve bu hasarı odyolojik olarak DPOAE ve ABR ile net olarak değerlendirmek mümkün olmuştur (80-82). Bizde çalışmamızda dış tüylü hasarını ve kokleotoksik etkinin monitorizasyonu için DPOAE testi ile sinyal/nose oranlarını ve ABR ile işitme eşiklerini değerlendirdik. Bulgularımız literatürde sisplatin ototoksitesini önlemek için kullanılan antioksidan maddelerle yapılan çalışmalarla uyumluydu (76). Çalışmamızda kokleada DTH hasarını değerlendirdiğimizde bazal ve orta modiolar seviyede DTH sayısında II. grup da anlamlı derecede azalma mevcuttu. I. grup da ise DTH sayısı II. gruptakine göre bazal ve orta modiolar seviyede anlamlı şekilde fazlaydı. Dış tüylü hücre sayısını Freitas ve ark. (43) tarafından belirttikleri şekilde değerlendirdik. Kapusuz ve ark. (44)'larının sisplatin ototoksitesini önlemek için kullandıkları bilberry ekstresi çalışmamasında da bizimle benzer sonuçlar elde edilmiştir Yazıcı ve ark. (34) sisplatin ototoksitesine karşı antioksidan olan pomegranat ekstresi denedikleri çalışmalarında, çalışmamıza benzer şekilde bazal ve orta modiolar seviyede siplatin uygulanan grupta belirgin bir DTH kaybı oluşmuş ve anti oksidan uygulanan grupta DTH sayısı anlamlı şekilde korunduğu bulunmuştur.

Daha ileri boyuttaki çalışmalarda sisplatin ototoksitesinin önlemek için antioksidan veya koruyucu özelliğide olan maddelerin kullanımından çok sisplatin ototoksitesini direkt olarak moleküler düzeyde engelleyecek gen terapisi uygulamaları yapılabilir ve bunlara yönelik literatürde bazı çalışmalara rastlanmaktadır (82,83). Ancak bunların yapılması için bilinmesi gereken sisplatin ototoksik hasarlandırma yollarının anlaşılması yine bu ototoksik etkiyi engelleyecek maddelerin ve özellikle antioksidanların etki mekanizmalarının analizi



yoluyla anlaşılacaktır. Kuşkusuz sislpatin ototoksisitesi konusunda pek çok araştırmaya daha ihtiyaç duyulacağı açıktır.

Sonuç olarak; deneysel sislpatin ototoksisitesinde curcumin'in olası koruyucu etkisi başlıklı çalışmamızda; curcuminin etkinliğini elektrofizyolojik testler (ABR, DPOAE), histopatolojik incelemeler ve total antioksidan kapasite ölçümü ile değerlendirdiğimizde; sislpatin kullanımına bağlı gelişen ototoksisitenin önlenmesinde curcumin kullanımının koruyucu etkinliğini destekler nitelikte bulunmuştur.

## SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda tasarlanıp uygulanan, Deneysel sisplatin ototoksitesinde curcumin'in olası koruyucu etkisi başlıklı tez çalışmamızda elektrofizyolojik test sonuçları, histopatolojik incelemeler ve total antioksidan kapasite ölçümleri değerlendirmemiz sonucunda şu sonuçlara varılmıştır:

1. Sisplatinin kobayların DPOAE' da ölçülen tüm frekanslarda s/n oranlarını azalttığı saptanmıştır.
2. Sisplatinin kobayların ABR eşik değerlerini belirgin şekilde azalttığı saptanmıştır.
3. Sisplatinin kobayların total antioksidan kapasite değerlerini belirgin şekilde azalttığı saptanmıştır.
4. Sisplatin ve curcumin ile sadece sisplatin verilen grupların DPOAE ölçümlerinde ilaç uygulaması öncesi ve sonrası arasında ki s/n oranları farkı karşılaştırıldığında özellikle pes tonlarda fark saptanmıştır. Bu sonuç curcumin sisplatinin ototoksik etkisini kısmen engellediği şeklinde değerlendirilmiştir.
5. Curcuminin ABR eşik değer azalmasını belirgin şekilde önlediği saptanmıştır.
6. Curcuminin total antioksidan kapasite değerlerini belirgin şekilde arttırdığı saptanmıştır.
7. Histopatolojik incelemelerde kobaylarda basal ve orta modiolar bölümlerde DTH sayısında belirgin azalma saptanmış ancak bu azalma curcumin uygulanan kobaylarda çok daha az miktarda gerçekleşmiştir.

8. Histopatolojik incelemeler sırasında yapılan immünohistokimyasal boyamalarda p53 ile hiçbir grupta pozitif boyanma saptanmamıştır. Ancak sisplatin grubun da iNOS ve Cox-2 ile boyanma oranları diğer gruplara göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur.
9. Bu çalışma; curcuminin, sisplatinin ototoksik etkilerini önlemede anlamlı etkisi olduğunu göstermektedir ve sisplatin kullanımına ek olarak curcumin kullanımının yararlı olacağını destekler niteliktedir.

## ÖZET

Deneysel sisplatin ototoksitesinde curcumin'in olası koruyucu etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmamızda; curcuminin etkinliğini elektrofizyolojik testler (işitsel beyin sapı yanıtları, "Distortion Product Otoacoustic Emission"), histopatolojik incelemeler ve total antioksidan kapasite ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda 4-8 aylık, ağırlıkları 200-600 gr arasında değişen 21 adet pigmente hartley cinsi erişkin kobay (Guinea pig) kullanılmıştır. Kobaylar randomize olarak 3 gruba ayrılmıştır. I. grup (n=7) sisplatine ek olarak curcumin uygulanan çalışma grubu, II. grup (n=7) sadece sisplatin uygulanan kontrol grubun ve III. grup (n=7) serum fizyolojik uygulanan sham grubudur. Çalışmaya başlarken tüm kobayların elektrofizyolojik ölçümleri yapıldı. Son sisplatin uygulamasından 24 saat sonra ölçümler tekrarlandı. Histopatolojik incelemeler için temporal kemikleri hazırlandı ve intrakardiyak kan örneklerinden antioksidan kapasite ölçümleri yapılarak istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı.

Tüm gruplar arasında "Distortion Product Otoacoustic Emission" da sinyal/gürültü oran farkı ve işitsel beyin sapı yanıtları eşik değerleri karşılaştırıldı. I. ve III. grup arasında sinyal/gürültü oranları farkı; 1500 Hz, 3000 Hz, 4000 Hz, 6000Hz frekanslarında ve işitsel beyin sapı yanıtları eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p<0.05). I. ve II. grup arasında sinyal/gürültü oranları farkı 750 Hz, 1000 Hz, 6000 Hz frekanslarında ve işitsel beyin sapı yanıtları eşik değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0.05). II. ve III. gruplar arasında sinyal/gürültü oranları farkı karşılaştırıldığında ise tüm frekanslarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0.05). Histopatolojik incelemelerde gruplar arası dış tüylü hücre sayısı değerlendirildiğinde II. grupta bazal ve orta modiolar seviyede belirgin bir azalma varken I. grupta ise anlamlı

derecede korunma mevcuttu ( $p<0.05$ ). II. grup da indüklenabilen nitrik oksit sentaz ve Cox-2 boyamalarında I. ve III. grup'a oranla anlamlı derecede şiddetli boyanma mevcuttu ( $p<0.05$ ). I.grup ile II. grup arası total antioksidan kapasite değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

Bu çalışma sisplatin kullanımına bağlı gelişen ototoksisitenin önlenmesinde curcumin kullanımının koruyucu etkinliğini destekler nitelikte bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Curcumin; sisplatin; işitme kaybı, sensorinöral; antioksidan

## **THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF CURCUMIN ON EXPERIMENTAL CISPLATIN OTOTOXICITY**

### **SUMMARY**

In our study which was aimed to investigate the potential protective effect of curcumin on experimental cisplatin ototoxicity; the efficacy of curcumin was evaluated by electrophysiological tests (auditory brainstem responses, Distortion Product Otoacoustic Emission) histopathological examination and measurement of total antioxidant capacity. In our study, 4-8 months old and weighing in range of 200-600 gram from 21 pigmented adult Hartley species guinea pigs were used. Guinea pigs were divided into 3 groups randomly. Group I (n=7), the work group curcumin administered in addition to cisplatin; group II (n=7), the control group only cisplatin administered; group III (n=7), the sham group physiological serum applied. Before the study, electrophysiological measurements of all guinea pigs were made. The measurements were repeated 24 hours after the last administration of cisplatin. The temporal bones of guinea pigs were prepared for histopathological examination and statistical comparisons were made by measuring antioxidant capacity from intracardiac blood samples.

Distortion Product Otoacoustic Emission, signal/noise ratio difference and auditory brainstem response thresholds were compared among all groups. Between group I and III, statistically significant difference was found ( $p < 0.05$ ) in signal/noise ratio difference at the frequency of 1500 Hz, 3000 Hz, 4000 Hz, 6000Hz and auditory brainstem response thresholds. Between group I and II, statistically significant difference was detected in s/n ratio

difference at the frequency of 750 Hz, 1000 Hz, 6000 Hz and auditory brainstem response thresholds ( $p < 0.05$ ). Between group II and III, statistically significant difference was found at all frequencies when signal/noise ratio difference was compared ( $p < 0.05$ ). When the number of the outer hair cells were assessed between groups in the histopathological examinations, there was a significant protection in group I ( $p < 0.05$ ) while a significant decrease at the basal and middle modiolar level in group II. The staining of inducible nitric oxide synthase and Cox-2 in group II was significantly more intense than in group I and III ( $p < 0.05$ ). When comparing the total antioxidant capacity values between group I and II, statistically significant difference was detected ( $p < 0.05$ ).

This study has been found supportive to the protective efficacy of curcumin use in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity.

**Keywords:** Curcumin; cisplatin; hearing loss, sensorineural; antioxidant

## KAYNAKLAR

1. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;350(19):1937-44.
2. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M et al. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs* 2013;24(10):1007-19.
3. Mutlu C. Ototoxisite. Çelik O (editör). Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş boyun cerrahisi'nde. İzmir: Asya tıp kitabevi;2007:260-9.
4. Taş A, Yağız R. Ototoxisitenin odyolojik monitörizasyonu. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 2005;22(1):37-41.
5. Pasic TR, Dobie RA. *Cis*-Platinum ototoxicity in children. *Laryngoscope* 1991;101(9):985-91.
6. Rybak LP, Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney Int* 2007;72(8):931-5.
7. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer* 2004;40(16):2445-51.
8. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:1-75.
9. Arıncı K, Elhan A. Anatomî. Ankara: Güneş kitabevi;2001:370-5.
10. Canalis RF. Valsalva's contribution to otology. *Am J Otolaryngol* 1990;11(6):420-7.
11. Akyıldız AN. Kulak hastalıkları ve mikrocerrahisi, cilt-1. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002:22-35.



12. John D, Ferraro D, Ferraro JA. Physiologic acoustics-the auditory periphery. In:Canalis RF, Lambert PR (eds.). The ear comprehensive otology. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins;2000:89-113.
13. Karasalihoğlu AR. Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş-boyun cerrahisi 3. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi,2003:3-87.
14. Ömür M, Dadaş B. Klinik Baş ve Boyun Anatomisi. İstanbul: Ulusal Tıp Kitapevi; 1996:1-213.
15. Wysocki J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. Hear Res 2005;199(2):103-10.
16. Göksu N, Hazıroğlu R, Kemaloğlu Y, Karademir N, Bayramoğlu İ, Akyıldız N. Anatomy of the guinea pig temporal bone. Ann Otol Rhinol Laryngol 1992;101(8): 699-704.
17. şanlı A, Aydın S. Guinea pig kulak cerrahisi anatomik atlası. Ankara: Güneş tıp kitabevi, 2010:5-35.
18. Kayhan FT, Algün Z. Guinea pig temporal kemik anatomisinin histopatolojik özellikleri. Kulak Burun Bogaz İhtis Derg 2003;10(2):51-7.
19. Kanlıkama M. İşitme fizyolojisi. Çelik O (editör). Otoloji ve Nöro-otoloji'de, cilt-1. Ankara: Elit Ofset,2013:59-84.
20. Khanna SM, Tonndorf J. Tympanic membrane vibrations in cats studied by time-averaged holography. J Acoust Soc Am 1972;51(6):1904-20.
21. Brownell WE. Outer hair cell electromotility and otoacoustic emissions. Ear Hear 1990;11(2):82-92
22. Kim DO. Active and nonlinear cochlear biomechanics and the role of outer-hair-cell subsystem in the mammalian auditorysystem Hear Res 1986;22:105-14.
23. Seligmann H, Podoshin L, Ben-David J, Fradis M, Goldsher M. Drug-induced tinnitus and other hearing disorders. Drug Saf 1996 Mar;14(3):198-212.
24. Rybak LP. Vestibüler ve işitsel Toksisite. (Çeviri: S Karahatay, S Yetişer). Koç C (editör). Cummings otolaringoloji baş ve boyun cerrahisi'nde, cilt-4. Ankara: Güneş Tıp Kitapevi;2007:2933-44.
25. Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trail using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. Oncol Rep 2004;11(3):559-95.
26. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. Tohoku J Exp Med 2009;219(3):177-86.
27. Laurell G, Jungnelius U. High-dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. Laryngoscope 1990;100(7): 724-34.

28. Hitchcock YJ, Tward JD, Szabo A, Bentz BG, Shrieve DC. Relative contributions of radiation and cisplatin-based chemotherapy to sensorineural hearing loss in head-and-neck cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(3):779-88.
29. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* 1997;18(5):559-71.
30. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2007;226(2):157-67.
31. Kanter M, Tarladaçalışır YT, Uygun M. Cisplatin Nefrotoksisitesinde E Vitamininin Koruyucu Etkileri: Işık ve Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007;5(3):83-90.
32. Lee SK, Oh KH, Chung AY, Park HC, Lee SH, Kwon SY at al. Protective role of quercetin against cisplatin-induced hair cell damage in zebrafish embryos, *Hum Exp Toxicol* 2015:14.
33. Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 1999;47(2):195-202.
34. Yazıcı ZM, Meriç A, Midi A, Arınç YV, Kahya V, Hafız G. Reduction of cisplatin ototoxicity in rats by oral administration of pomegranate extrac. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(1):45-52.
35. Giran S. Cisplatin Ototoksisitesinde Askorbik Asidin Koruyucu Etkisinin Kobaylarda Elektrofizyolojik Testler ve Ultrastrüktürel Çalışma İle Araştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2009.
36. Erdem T, Bayindir T, Filiz A, Iraz M, Selimoglu E. The effect of resveratrol on the prevention of cisplatin ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(10):2185-8
37. Lopez-Gonzalez MA, Guerraro JM, Rojas F, Delgado F. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* 2000;28(2):73-80.
38. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 2011;16(6):4567-98.
39. Sikora E, Scapagnini G, Barbagallo M. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing* 2010;7(1):1-4.
40. Özgen SC, Dökmeci D, Akpolat M, Karadağ CH, Gündüz Ö, Erbaş H at al. The Protective Effect of Curcumin on Ionizing Radiation-induced Cataractogenesis in Rats. *Balkan Med J* 2012;29(4):358-63.
41. Liu W, Fan Z, Han Y, Lu S, Zhang D, Bai X et al. Curcumin attenuates peroxynitrite-induced neurotoxicity in spiral ganglion neurons. *Neuro Toxicol* 2011;32(1):150-7.

42. Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 2004;37(4):277-85.
43. de Freitas MR, de Castro Brito GA, De Carvalho JV, Gomes RM, Barreto MJ, de Albuquerque R. Light microscopy study of cisplatin-induced ototoxicity in rats. *J Laryngol Otol* 2009;123:590-7.
44. Kapusuz Z, Özkiriş M, Mehtap Kala M, Saydam L. Protective Role of Bilberry Extract Against Cisplatin Induced Ototoxicity in Rats. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;65(4):339-44.
45. Korkmaz A, Kolankaya D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Can J Surg* 2013 Feb;56(1):6-14.
46. Amouian S, Farzadnia M, Memar B, Attaranzadeh A, Tayyebi N. Expression of P53 and Ki67 proteins in renal cell carcinoma and its relationship with nuclear grade. *Iranian J Pathol* 2008;3(1):25-29.
47. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J, Patard J, Manunta A, Moulinoux JP et al. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55(4):501-5.
48. Blakley BW, Gupta AK, Myers SF, Schwan S. Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120(5):541-6.
49. Van den Berg JH, Beijnen JH, Balm AJ, Schellens JH. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. *Cancer Treat Rev* 2006;32(5):390-7
50. Sakamoto M, Kaga K, Kamio T. Extended high-frequency ototoxicity induced by the first administration of cisplatin. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122(6):828-33.
51. Weatherly RA, Owens JJ, Catlin FI. Cisplatin ototoxicity in children *Laryngoscope* 1991;101(9):917-924.
52. Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope* 2001;111(7):1147-55.
53. Nakai Y, Konishi K, Chang KC, Ohashi K, Morisaki N, Minowa Y. Ototoxicity of anticancer drug cisplatin. An experimental study. *Acta Otolaryngol* 1982;93(3-4):227-32.
54. Laurell G, Engstrom B. The ototoxic effects of cisplatin on guinea pigs in relation to dosage. *Hear Res* 1989;38(1-2):27-33.
55. 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. *Hear Res* 2000;144(2):135-46.
56. Waissbluth S, Salehi P, He X, Daniel SJ. Systemic dexamethasone for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270(5):1597-605.

57. Rybak L.P, Husain K, Morris C, Whitworth C, Somani S. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* 2000;21:513-20.
58. Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;174(4):27-34.
59. Bánfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004;279(44):46065-72.
60. Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, SprayD et al. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* 1997;18(5):559-71.
61. García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R, Sanz R, González-García JA, Sánchez-Rodríguez C et al. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol* 2007;152(7):1012-20.
62. Clerici W.J, Hensley K, Di Martino D.L, Butterfield D.A. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* 1996;98(2):116-24.
63. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Baba S, Yagi T. Expression of caspase-activated deoxyribonuclease (CAD) and caspase-3 (CPP32) in the cochlea of cisplatin (CDDP)-treated guinea pigs. *Auris Nasus Larynx* 2003;30(3):219-25.
64. Kuduban O, Kucur C, Sener E, Suleyman H, Akcay F. The Role of Thiamine Pyrophosphate in Prevention of Cisplatin Ototoxicity in an Animal Model. *ScientificWorldJournal* 2013;16:1-5.
65. Yumusakhuylu AC, Yazici M, Sari M, Binnetoglu A, Kosemihal E, Akdas F et al. Protective role of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012;76(3):404-8.
66. So H, Kim H, Lee JH, Park C, Kim Y, Kim E . Cisplatin cytotoxicity of auditory cells requires secretions of proinflammatory cytokines via activation of ERK and NF-kappaB. *J Assoc Res Otolaryngol* 2007;8(3):338-55.
67. Keithley EM, Wang X, Barkdull GC. Tumor necrosis factor alpha can induce recruitment of inflammatory cells to the cochlea. *Otol Neurotol* 2008;29(6):854-9.
68. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7265-79.
69. Kalkanis JG, Whitworth C, Rybak LP. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;269(1):45-52.
70. Shafik AG, Elkabarity RH, Thabet MT, Soliman NB, Kalleney NK. Effect of intratympanic dexamethasone administration on cisplatin-induced ototoxicity in adult guinea pigs *Auris Nasus Larynx* 2013;40 (1):51–60.

71. Kelly TC, Whitworth CA, Husain K, Rybak LP. Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. *Hear Res* 2003;186(1):10-6.
72. Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11(5):401-6.
73. Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 2003;120(1):191-205.
74. Raffo AJ, Kim AL, Fine RL. Formation of nuclear Bax/p53 complexes is associated with chemotherapy induced apoptosis. *Oncogene* 2000;19(54):6216-28.
75. Xiong M, He Q, Wang J, Lai H. Astragalosides reduce cisplatin ototoxicity in guinea pigs. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2011;73(3):131-6.
76. Waly MI, Al Moundhri MS, Ali BH. Effect of curcumin on cisplatin- and oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. *Ren Fail* 2011;33(5):518-23.
77. Honma S, Takahashi N, Shinohara M, Nakamura K, Mitazaki S, Abe S et al. Amelioration of cisplatin-induced mouse renal lesions by cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor. *Eur J Pharmacol* 2013;715(1-3):181-8.
78. De Lauretis A, De Capua B, Barbieri MT, Bellussi L, Passali D. ABR evaluation of ototoxicity in cancer patients receiving cisplatin or carboplatin. *Scand Audiol* 1999;28(3):139-43.
79. Fetoni AR, Quaranta N, Marchese R, Cadoni G, Paludetti G, Sergi B. The protective role of tiopronin in cisplatin ototoxicity in Wistar rats. *Int J Audiol* 2004;43(8):465-70.
80. Eiamprapai P, Yamamoto N, Hiraumi H, Ogino-Nishimura E, Kitamura M, Hirano S et al. Effect of cisplatin on distortion product otoacoustic emissions in Japanese patients. *Laryngoscope* 2012;122(6):1392-6.
81. Cevette MJ, Drew D, Webb TM, Marion MS. Cisplatin ototoxicity, increased DPOAE amplitudes, and magnesium deficiency. Distortion product otoacoustic emissions. *J Am Acad Audiol* 2000;11(6):323-9.
82. Travis LB, Fossa SD, Sessa HD, Frisina RD, Herrmann DN, Beard CJ et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity and ototoxicity: new paradigms for translational genomics. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(5):1-12.
83. Rybak LP, Kelly T. Ototoxicity: bioprotective mechanism. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;11(5):328-33.

## **EKLER**

Ek 1

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

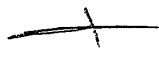
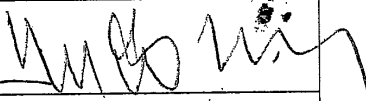
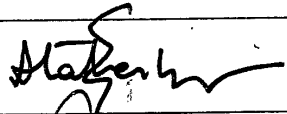
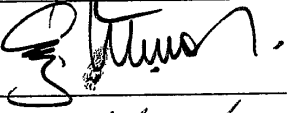
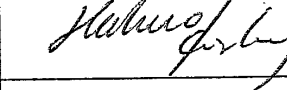
EDİRNE

Oturum Sayısı: 02

Karar Tarihi: 22.02.2013

KARAR NO: 2013.02.04

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Ahmet R. KARASALİHOĞLU'nun yaptığı Araş. Gör. Dr. Mehmet Turgay TÜRKMEN'in Tıpta uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2013/25 protokol nolu "Deneysel Sisplatin Ototoksitesinde Circumin' in Olası Koruyucu Etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

Ek 2



TRAKYA ÜNİ  
İdari ve M

ESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Daire Başkanlığı

12571

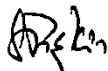
SAYI : 59803669/604-01-01/3974  
KONU:

EDİRNE  
03-35

Sayın Prof. Dr. Ahmet KARASALİHOĞLU  
Trakya Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı  
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve Arş. Gör. Dr. Mehmet Turgay TÜRKMAN'ın "Deneysel Sisplatin Ototoksitesinde Curcuminin Olası Koruyucu Etkisi" başlıklı tıpta uzmanlık projesinin 12 (on iki) ay süre ve 24.540,00 ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 28.05.2013 tarih ve 2013/11 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 7. maddesinin c bendi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
Prof. Dr. Süleyman PIŞKIN  
Rektör Yardımcısı ve  
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

06.06.2013  
tarhinde cevap  
yazıldı.

Posta Adresi  
Trakya Üniversitesi Rektörlüğü  
22050 Balkan Yerleşkesi/ EDİRNE

Tel : 0 284 223 87 45 Faks : 0 284 223 08 48  
e-mail: tubap@trakya.edu.tr



